

Gradientelueerimine

Põhiprintsiibid

1

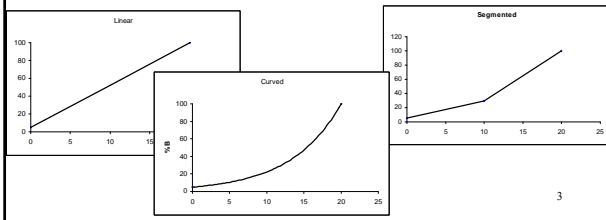
Mõisted

- Gradientelueerimine – mobiilfaasi koostis muutub kromatograferimise käigus
- Isokraatiline elueerimine – Mobiilfaasi koostis on kogu elueerimise käigus sama

2

Kuidas?

- Tugevamat elueerivat jõudu omava mobiilfaasi komponendi sisaldus mobiilfaasis kasvab elueerimis käigus
- Lineaarne, kurviline ja segmentaalne gradient



3

Miks?

- Kui on mitu analüüti ja isokraatiliselt ei ole võimalik saavutada $0.5 < k < 20$
- Proov sisaldab suuri molekule ($M > 1000$ Da)
- Proovid, mis sisaldavad hiljelueeruvaid komponente
- Lahjadele proovidele, mis on lahustatud nõrgas solvendis
- Meetodi arenduses on esialgne gradientelueerimine hea proovi kohta informiooni saamiseks

4

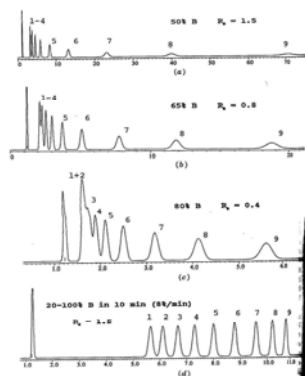


FIGURE 8.2 Separation of diethylhexane homologs by reversed-phase HPLC. Sample bands are C₆ (dimethyl), No. 11 through C₁₀ (deca-parallel), No. 92, 25, 4, and 5 μ m C₁₈ columns; acetonitrile (B)-water mobile phase; 2 mL/min, 60°C. [These chromatograms are computer simulations derived from data in Ref. 4] (The accuracy of computer simulations has been demonstrated in numerous examples; see, e.g.,

5

Probleemid?

- Laboris pole sobivat aparatuuri
- Pisut keerulisem kui isokraatiline elueerimine
- Mõnesid detektoreid ei saa kasutada
- Vajadus kolonni peale kromatograafilist jooksu tasakaalustada
- Ei ole kergesti ühelt masinalt teisele üle kantavad
- Võimalus puhvrite väljasadenemiseks suurem

6

Probleemid?

- Tugeva retentsiooniga lisandite kasutamine raskendab gardiendi kasutamist, kuna kolonni stabiliseerimine võib võtta kaua aega ning lahutamine ei pruugi olla hästi korduv
 - Amiinlisandid
 - Ioon-paar reagentid
- Sama kehtib normaalfaaskromatograafia kohta (polaarsed solvendid)

7

Alternatiivid

- Kui proovi komponentide jaoks ei kehti $0.5 < k < 20$
 - Kasutada teist statsionaarset faasi, nt –CN
 - Kasutada THF MeCN ja MeOH asemel
 - Proovida kahedimensionaalset kromatograafiat

8

Gradientelueerimine meetodi arenduses

- Kasulik ka siis kui lõpliku meetodi puhul eelistatud isokraatiline
- Saame infot proovi komponentide retentsiooni kohta
 - Kas vaja kasutada gradienti või piisab isokraatilisest elueerimisest
 - Näeb ära proovid mis ei sobi pöördfaasiga analüüsiks

9

Gradientelueerimine meetodi arenduses

- Kui isokraatiline meetod tuleb kõne alla siis saab määrata ligikaudse orgaanika sisalduse, mida oleks mõtet proovida
- Kui tuleb kasutada gradientelueerimist, siis saame hinnangu missuguses vahemikus orgaanilise komponendi sisaldus mobiilfaasis muutuma peaks

10

Gradientelueerimine meetodi arenduses

- Esialgne gradientelueerimine võimaldab saavutada rohkemate piikide lahutuse esimeste katsetega -> aja kokkuhoid
- Väiksem tõenäosus eirata väikese sisaldusega proovi komponente, mis elueeruvad kas väga vara või väga hilja

11

Esialgne gradient

- 15 x 0.46 cm kolonn
- Gradient 5st 100%-ni MeCN 60 minutiga
- Kui piigid on väga kromatogrammi alguses on proov pöördfaasiga määramiseks liiga hüdrofiilne
- Kui piike pole üldse näha on detektor vastavate ainete jaoks ebasobiv või proov liiga hüdrofoobne

12

Isokraatiline või gradient?

- Esimese ja viimase proovi piikide retentsiooniajad olgu t_{Ra} ja t_{Rz}
- Retentsiooniaegade erinevus $\Delta t_R = t_{Rz} - t_{Ra}$
- Kogu gradiendi aeg t_G
- $\Delta t_R / t_G < 0.4$ sobib isokraatiline elueerimine
- Samas on gradiendi järskuse mõju selektiivsusele suurem kui isokraatilise elueerimisel %B, seega vahel $\Delta t_R / t_G > 0.15$ eelistatakse gradienti

13

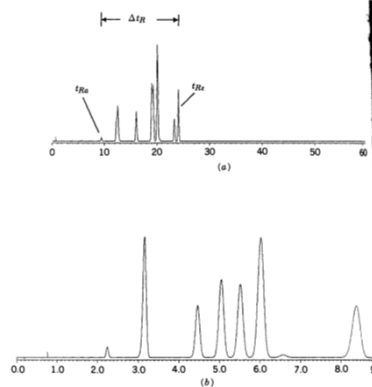


FIGURE 8.6 Use of an initial gradient run in HPLC method development. Substituted aniline sample [14,15]; conditions: 15×0.46 -cm column; 2.0 mL/min; 30°C (a) 5 to 100% acetonitrile-water gradient in 60 min, (b) isocratic separation with 37% acetonitrile-water. See the text for details.

14

TABLE 8.2 Estimation of % B (ACN) for the First Isocratic Run, Based on the Retention Time t_{Rz} of the Last Peak in the Gradient Run^a

t_{Rz} (min)	(% B) _{est} to Give Indicated k for Last Band in Isocratic Run		
	$k = 5$	$k = 10$	$k = 20$
5	6	0	—
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	62	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	—	100	94

Source: Refs. 14 and 15.

^a Required conditions: 15×0.46 -cm column, 5 to 100% ACN in 60 min, 2 mL/min.

Millised gradientelueerimise tingimused?

- Arvutada välja millise %B juures väljub kolonnist esimene ja viimane piik ning järgnevalt optimeerida gradienti nende %B väärtuste vahepeal

16

Gradientelueerimise põhimõtted

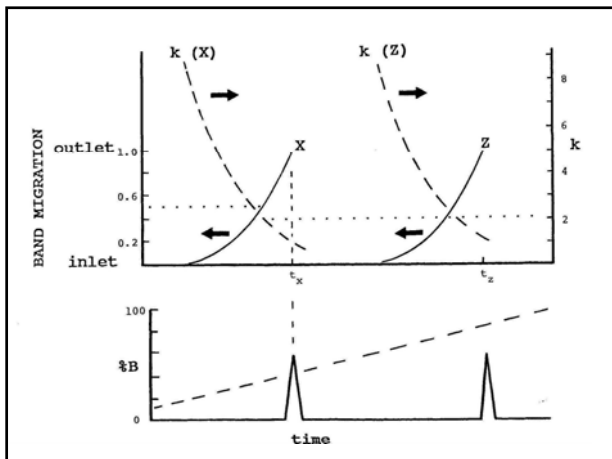
- Mobiilfaasi elueeriv jõud kasvab elueerimise käigus
- Iga piigi jaoks retentsioon k muutub kolonni läbimise käigus
- Varem elueeruvad ühendid alustavad liikumist läbi kolonni väiksema %B juures
- Hiljaelueeruvad piigid alguses üldse ei liigu

17

Gradientelueerimise põhimõtted

- Piigi efektiivne k^* väärtus on määratud k -ga kui piik on migreerunud läbi poole kolonni
- Linearse gradiendi puhul on k^* väärtused kõigi piikide jaoks enam vähem samad
- Kõikidel piikidel on seetõttu sarnane laius ning lahutus ei ole kromatogrammi alguses kehvem kui lõpus

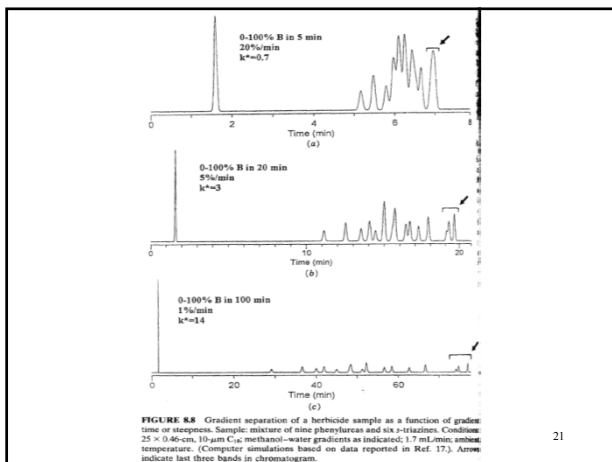
18



%B muutuse kiiruse mõju

- Gradiendi järskus muudab k^* väärtust
- Suurem k^* väärtus viib
 - Lahutus R_S kasvab
 - Piigid muutuvad laiemaks ja madalamaks
 - Kromatograafilise jooksu aeg pikeneb
- %B/min muutus on analoogiline %B muutusele isokraatilisel elueerimisel
- k^* muutus on analoogne k muutusele isokraatilisel elueerimisel

20

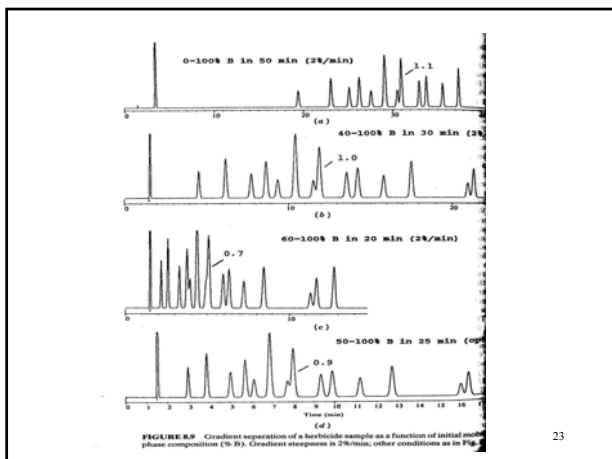


21

B algusprotsendi mõju

- Gradienti mitte alustada 100% veefaasiga, võib pöördumatult kahjustada kolonni
- Esimene piik ei tohiks elueeruda väga hilja, see on ajakulu!
- Liiga kõrge esialgne %B põhjustab lahutuse halvenemist

22

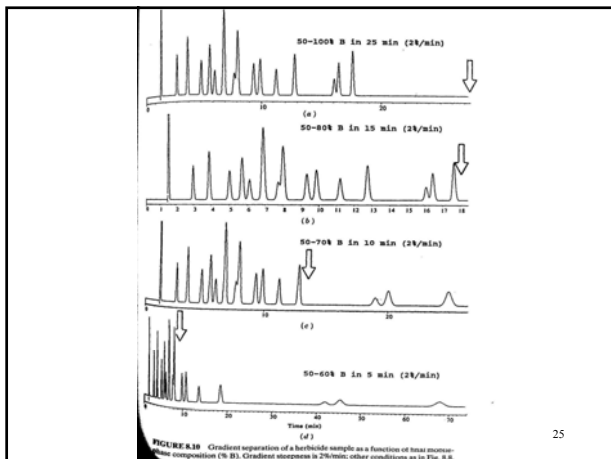


23

B lõpu protsendi mõju

- Kui viimane piik väljub kolonnist palju enne gradiendi lõppu ei ole tarvis %B 100%-ni viia
- Gradiendi pikkus ja lõpuaeg ei ole sama!!! (kolonni surnud ruumala)
- Kui gradient lõpetada ära enne viimase piigi kolonnist väljumist siis jooksu aeg pikeneb ning viimased piigid muutuvad laiemaks

24



25

Gradiendi kuju

- Enamasti lineaarne gradient, lihtne optimeerida
- Kurviline kui oligomeeride segu, kus lahutus halveneb analüütide molekulmassi kasvades
- Segmendiline kui esialgsel lineaarsel kromatogrammil on väga erineva piikide asustusega regioone
- Proovida segmendilist enne kurviga gradiendi kallale asumist

26

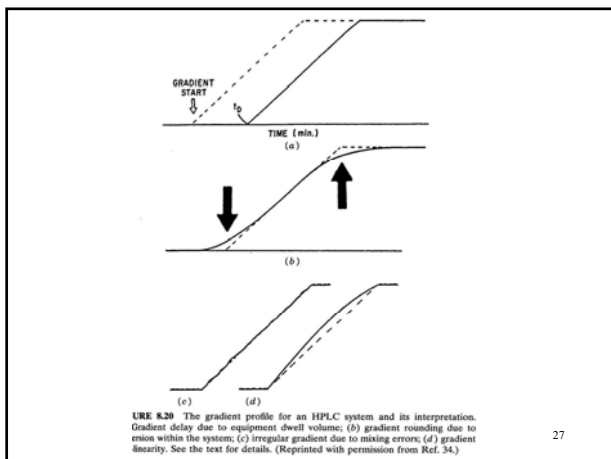


FIGURE 8.20 The gradient profile for an HPLC system and its interpretation. Gradient delay due to equipment dwell volume; (b) gradient rounding due to elution within the system; (c) irregular gradient due to mixing errors; (d) gradient linearity. See the text for details. (Reprinted with permission from Ref. 34.)

27

Segmendiline gradient

- Järsemat gradienti kasutada kromatogrammi piirkonnas, kus piigid on väga laiali
- Väiksem %B/min kasutada piikide poolt tihedalt asustatud regioonis

28

Gradientmeetodi optimeerimine

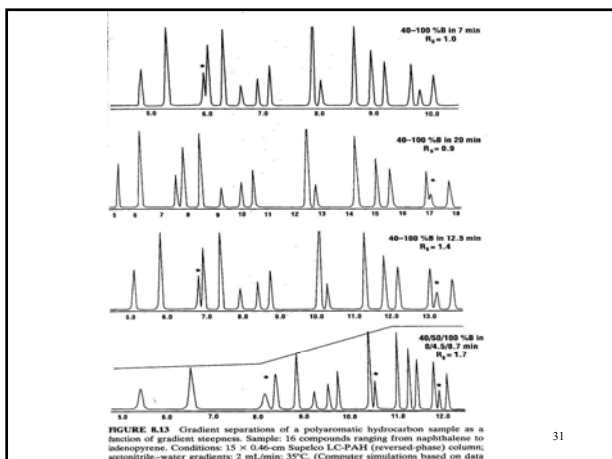
- Defineerida on vaja algne ja lõplik %B ning gradiendi kuju
- Selektiivsuse ja efektiivsuse timmimine käib analoogselt isokraatilise elueerimisega
- Esimesena jooks 5-100% B

29

Gradiendi optimeerimine

- Esialgne %B mõjutab tugevalt esimesi piike kuid mõjutab minimaalselt viimaseid piike
- Seepärast
 - Optimeerimist alustatakse kromatogrammi algusest muutmata lõppu enne kui esimesed piigid on piisavalt lahus

30



31