

# Suuruseralduskromatograafia

Jaan Saame

Mai 2008

## Suuruseralduskromatograafia

- Suuruseralduskromatograafia on üsna levinud analüütilise keemia meetod biopolümeeride ning sünteetiliste polümeeride molekulmasside jaotuse ning keskmise molekulmassi määramiseks
- Suuruskromatograafia meetodid jagatakse:
  - geel-filtreerimiskromatograafiaks (uuritakse näiteks bioloogilisi makromolekule)
  - geel-läbivuskromatograafiaks (uuritakse näiteks sünteetilisi makromolekule)

2

## Suuruseralduskromatograafia meetodid

- Geel-filtreerimiskromatograafias kasutatakse solvendina vett ning kolonni täidab hüdrofiilne sorbent (analüüsitakse vees lahustuvaid proove)
- Geel-läbivuskromatograafia põhineb mittepolaarsete orgaaniliste solventide ja hüdrofoobsete sorbentide kasutamisel (analüüsitakse vees mittelahustuvaid proove)

3

## Põhimõte

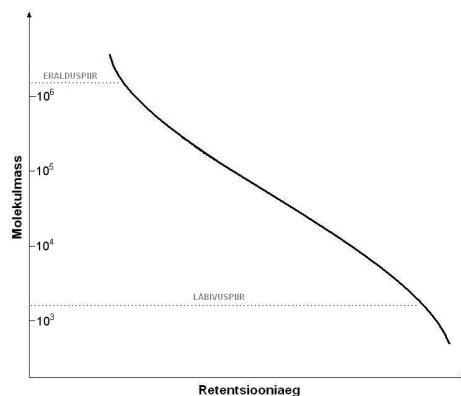
- Kromatograafi ehitus analoogiline tavalise HPLC-ga (põhiline erinevus seisneb kolonnis)
- Statsionaarne faas koosneb enam-vähem ühesuuruste pooridega osakestest, millesse solventi ning proovi osakesed saavad difundeeruda
- Keskmine poorides viibimise aeg sõltub molekulidel nende efektiivsusest suurusest
- Pooridest suuremad molekulid nendesse ei mahu, liiguvad sorbendiosakeste vahel ning väljuvad kolonnist esimesena

4

## Põhimõte

- Pooride läbimõõdust tunduvalt väiksemad molekulid läbivad sorbendiosakeste pooride keerdkäigud ning väljuvad kolonnist viimasena
- Sorbendi pooride keskmise läbimõõduga lähedase suurusega molekulid läbivad ainult neile sobiva suurusega ette sattuvaid poore ning väljuvad kolonnist nende suuruse poolt määratud järjekorras

5



6

## Põhimõte

- Mida vähem on statsionaarse faasi ja analüüdi vahel keemilisi ja füüsikalisi interaktsioone, seda efektiivsem on kolonn
- Suuruskromatograafias eksisteerib maksimaalne ja minimaalne võimalik retentsiooniaeg (olenevalt sellest, kas osakesed läbivad kõikvõimalikud sorbendi poorid või liiguvad ümber sorbendiosakeste)

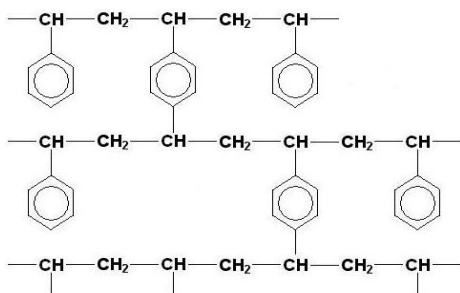
7

## Kolonn

- Statsionaarse faasina kasutatakse mõnest polümeerist või ränidioksiidist koosnevaid poorseid osakesi läbimõõduga 3 - 10  $\mu\text{m}$
- Polümeerse sorbendina kasutatakse näiteks võrkstruktuuriga stüreen-divinüülbenseeni kopolümeere. Pooride suurust kontrollitakse seejuures võrkstruktuuri rist-sidestuse ulatusega
  - Vähemlevinud sorbendid: võrkstruktuuriga dekstraan, polüakrüülamiid

8

### Võrkstruktuuriga stüreen-divinüülbenseeni kopolümeer



9

## Kolonn

- Kui eesmärk on eraldada komponente suhteliselt kitsas molekulmasside vahemikus ( $< 500$ ), siis kasutatakse kolonne, mille sorbendi poorid on võimalikult ühtse suurusega
- Kui komponentide molekulmasside vahemik on suur, kasutatakse sorbente, mille pooride suurus varieerub kindlas laias vahemikus.

10

## Kolonnid

- Kindlas vahemikus varieeruva poorisuurusega sorbentide kasutamine:
  - Ühte kolonni on segatud mitmesuguse kindla pooriläbimõõduga osakesi
  - Järjestikku ühendatakse mitu kolonni
- Lineaarne ala umbes neli suurusjärku, kui:
  - Kaks järjestikku ühendatud kolonni
  - Sorbendi pooride suurus erineb kolonnidel  $\sim 10$  korda
  - Sorbendi pooride suurus kolonnidel kitsas vahemikus

11

## Detektorid

- Suuruseralduskromatograafias kasutatavad detektorid jaotatakse:
  - Kontsentratsioonitundlikud (signaal proportsionaalne analüüdi sisaldusega detektoris): mürdumisnäitaja-, UV-, tihedus-detektor
  - Molekulmassitundlikud detektorid (signaal sõltub lisaks analüüdi sisaldusele lahuses proportsionaalselt ka analüüdi molekulmassist): diferentsiaalne viskosimeeter, FT-ga NMR, MALDI/MS

12

## Kontsentratsioonitundlikud detektorid

- Konts.tundliku detektorina kasutatakse kõige laialdasemalt detektorit, mis põhineb detektorit läbiva lahuse murdumisnäitaja muutuse mõõtmisel (DRI-detektor).
  - Võimeline detekteerima praktiliselt kõiki lahuses lahustunud aineid
  - Reeglina detekteerib polümeeriahela kõiki osasid võrdse tundlikkusega
  - Suur temperatuuritundlikkus, seega pole baasijoon stabiilselt paigas
  - Analüüdi madalate molekulmasside korral kipub olema ka molekulmassitundlik

13

## Kontsentratsioonitundlikud detektorid

- Laialdaselt kasutatav konts.tundlik detektor on ka UV-detektor
  - Detekteerib madalaid kontsentratsioone
  - Vähem temperatuuritundlik kui DRI-detektor
  - Polümeeride ahelas tihti puuduvad aga sobivad kromofoorid
  - Tihti detekteerib polümeeride otsi ning ahela keskosa erinevalt (sõltuvalt sellest, kas kromofoorid asuvad ahela otstes, monomeerides või mõlemas neis)
- Molekulmasside kvantitatiivsel määramisel peab kromatograafil olema vähemalt üks kontsentratsioonitundlik detektor

14

## Molekulmassitundlikud detektorid

- Molekulmassitundlikud detektorid on SEC-analüüsil abiks analüüdi molekulmassi määramisel
  - Suureks abiks keeruliste polümeeride analüüsil
  - Väga oluline ka meetodika valideerimisel ning kalibreerimisgraafikute koostamisel
  - Põhidetektoriks on ikkagi konts.tundlik detektor

15

## Detektorid

- Kasutades järjestikku massispektromeetrit ning mõnda kontsentratsioonitundlikku detektorit, saab komponentide molekulmasse väga täpselt määrata
- Hästi sobib ka murdumisnäitaja-detektori kasutamine koos viskosimeetri ning valgushajuvus-detektoriga (järjestikku)
  - Murdumisnäitaja-detektor on kontsentratsioonitundlikuks detektoriks, valguse hajuvus on proportsionaalne nii molekulmassi kui ka kontsentratsiooniga, viskosimeeter mõõdab kolonni läbinud lahuse piirviskoossust (oluline analüüdi hüdrodünaamilise ruumala määramisel)

16

## Kalibreerimine

- Selleks, et teha SEC-i abil kindlaks proovi komponentide molekulmasse, koostatakse kalibreerimisgraafik
- Kalibreerimisgraafik koostatakse enamasti ühena järgmistest :
  - Standardainete molekulmassi logaritmi sõltuvus retentsioonijast (retentsiooniruumalast)
  - Standardainete hüdrodünaamilise ruumala logaritmi sõltuvus retentsioonijast

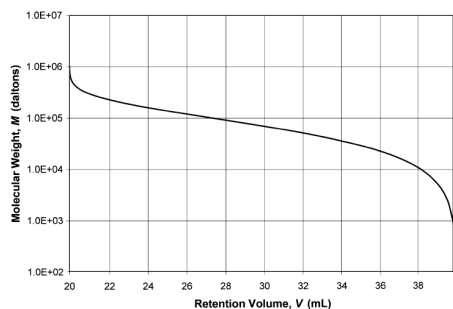
17

## Kalibreerimine

- Molekulmassi sõltvuse koostamine retentsioonijast (retentsiooniruumalast):
  - Kromatografeeritakse erineva molekulmassiga standardainete lahuseid
  - Mõõdetakse retentsioonijad (retentsiooniruumalad) ning koostatakse vastav sõltuvus
  - Kalibreerimisgraafiku lineaarset ala kirjeldab järgmine võrrand:  $\log M = A - mT_E$  ( $\log M = A - mV_E$ ), kus A ja m on süsteemikonstandid

18

## Tüüpiline kalibreerimisgraafik



19

L.K. Kostanski et al, J. Biochem. Biophys. Methods 58 (2004) 159-186

## Kalibreerimine

- Komponenti molekulmassi sõltuvusel retentsioonijast on kalibreerimisgraafiku-  
na on aga selgeid puudusi:
  - Saab kasutada ainult monodispersete ning madala polüdispersusega komponentide korral
  - Piiratud arv sobivaid standardaineid (vähe kitsa molekulmassi vahemikuga standardaineid sünteetiliste polümeeride esindamiseks)

20

## Kalibreerimine

- Eelpool kirjeldatud puudusi pole aga kalibreerimisgraafikul, mis põhineb komponendi hüdrodünaamilise ruumala sõltuvusel retentsioonijast (retentsiooniruumalast)
  - Polümeeri hüdrodünaamiline ruumala on võrdeline selle polümeeri piirviskoossuse ja molekulmassiga
- Selline kalibreerimisgraafik kehtib piisavalt hästi kõikidele polümeeridele

21

## Rakendused

- Suure molekulmassiga molekulide eraldamine madala molekulmassiga osakekest või sooladest
  - Nt. Valkude eraldamine aminohapetest ning väikese molekulmassiga peptiididest
- Oligomeeride eraldamine homologidest (geel-läbivuskromatograafia)
- Suuremate polümeeride molekulmassi või molekulmassi jaotuse kiire määramine
  - Proovi retentsiooniaegu (retentsiooniruumalaid) võrreldakse proovile samaste keemiliste omadustega standardainete retentsiooniaegadega

22

## Rakendusnäide

- Plekist toidupakendite (joogipurgid) polümeerkattest toidu sisse eralduvate ühendite uurimine
- Vaadeldi ühendeid mille molekulmass on alla 1000 Da
- Analüüsist saadav info oluline, kuna polümeersest kattest eralduvad monomeerid, erinevad lisandid ning tundmatud reaktsiooniproduktid on tervist kahjustava toimega
  - Alla 1000 Da molekulmassiga sünteetilised polümeerid kipuvad seedeelundkonnas organismi imendumata

23

## Rakendusnäide

- Eesmärk:
  - Koostada kahe erineva epoksü-, ühe polüestervaigu ning ühe standardse polüstüreeni testsegu kalibreerimisgraafikud
  - Analüüsida graafikute kokkulangevuste/erinevuste põhjuseid
  - Teha järeldused, kas on võimalik määrata kõiki peamisi alla 1000 Da molekulmassiga ühendeid mõne universaalse kalibreerimisgraafiku alusel

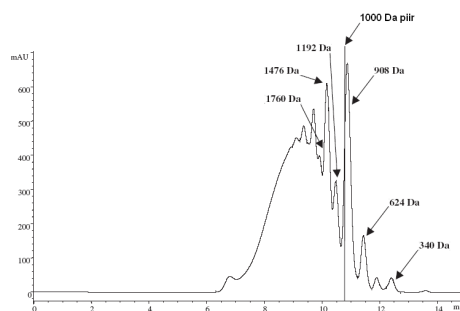
24

## Rakendusnäide

- Aparatuur:
  - Kromatograaf HP1100 (Agilent)
  - Kromatograafil: *autosampler*, automaatne degasaator, kolonni ahi, UV-detektor, ELSD
  - Kontrolliks kõrval samane kromatograaf, kuid varustatud massispektomeetriga: (HPLC-ESI-MS)
- Eluendid: THF (epoksüvaigud), dioksaan (polüestervaik, polüstüreen)
- Ekstraheerimisel kasutati lahustina atsetonitriili

25

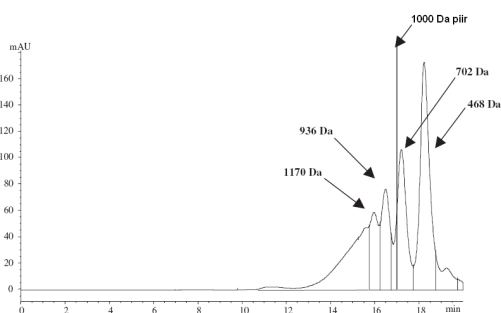
## Ühe epoksüvaigu kromatogramm



26

A. Schaefer, S. Maß, T.J. Simat, H. Steinhart, Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 3 (March 2004), pp. 287–301

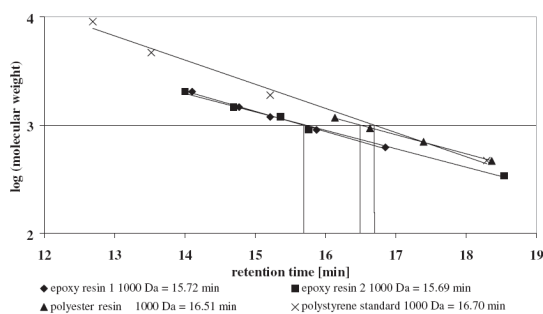
## Polüestervaigu kromatogramm



27

A. Schaefer, S. Maß, T.J. Simat, H. Steinhart, Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 3 (March 2004), pp. 287–301

## Kalibreerimisgraafikud



28

A. Schaefer, S. Maß, T.J. Simat, H. Steinhart, Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 3 (March 2004), pp. 287–301

## Rakendusnäide

- Kalibreerimisgraafikute võrdlemisel tehti järgmised järeldused:
  - Epokü- ning polüestervaikude kalibreerimisgraafikute 0,8 min erinevus 1000 Da kohal on tõenäoliselt tingitud sellest, et epoksüvaikude fragmendid on üldiselt lineaarse, polüestervaikude fragmendid aga tsüklilise struktuuriga
  - Täpse tulemuse saavutamiseks tuleks epoksü- ning polüestervaigu fragmentidele rakendada siiski erinevaid kalibreerimisgraafikuid

29

## Pöördsuuruseralduskromatograafia

- Meetod, mille korral uuritav materjal paigutatakse kromatograafiakolonni, millest juhitakse (eluendi abil) läbi teadaoleva molekulmassiga aineid
- Seejuures saab uurida materjali...
  - Poorsust
  - Pooride suurust
  - Pooride suuruse jaotust
- Kasutatakse näiteks erinevate sorbentide poorsuse uurimisel

30

## Suuruseralduskromatograafia eelised

- Lühikesed ning hästidefineeritud retentsiooniajad
- Komponentid ei saa jääda kolonni kinni
- Puudub intensiivselt sorbendiga interakteerunud molekulide poolt esile kutsutud kolonni deaktiveerimine

31

## Suuruseralduskromatograafia puudused

- Tingituna lühikesest kromatogrammi ajaskaalast mahub sellele vaid piiratud arv piike
- Võimatu eraldada sarnase suurusega osakestega proovi komponente (isomeerid)
  - Normaalse lahustuse saavutamiseks on enamasti vaja komponentide molekulmasside vähemalt 10%-list erinevust

32

## Kirjandus

- D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing : Harcourt Brace College Publishers, 1998
- C.F. Poole, S.K. Poole, Chromatography today, Amsterdam [etc.]: Elsevier, 1991
- L.K. Kostanski et al., Size-exclusion Chromatography— a Review of Calibration Methodologies, J. Biochem. Biophys. Methods 58 (2004) 159–186
- H.G. Barth, B.E. Boyes, C. Jackson, Size Exclusion Chromatography and Related Separation Techniques, Anal. Chem. 1998, 70, 251R–278R
- G.L. Hagnauer, Size Exclusion Chromatography, Anal. Chem. 1982, 54, 265 R–276 R
- T. A. Chamberlin, H. E. Tuinstra, Elution Volume Measurement in Size Exclusion Chromatography, Anal. Chem. 1983, 55, 428–432
- Sadao Mori, Calibration of Size Exclusion Chromatography Columns for Determination of Polymer Molecular Weight Distribution, Anal. Chem. 1981, 53, 1813–1818
- A. Schaefer, S. Maß, T.J. Simat, H. Steinhart, Migration from can coatings: Part 1. A size-exclusion chromatographic method for the simultaneous determination of overall migration and migrating substances below 1000 Da, Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 3 (March 2004), pp. 287–301

33