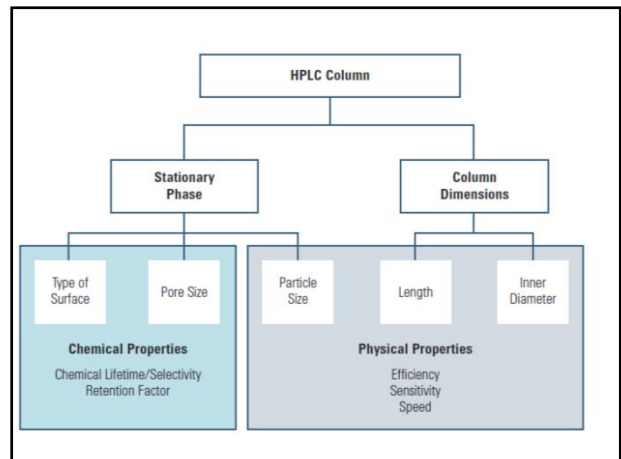


Vedelikkromatograafia liigid

Anneli Kruve

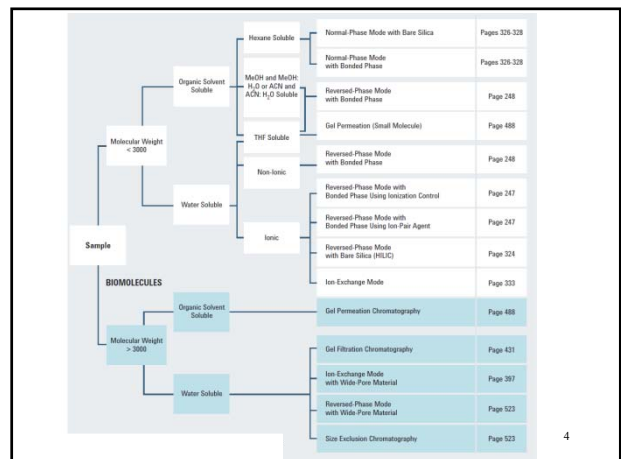
1



Selles loengus käsitleme just statsionaarse faasi keemiat:

- Normaal- ja pöördfaaskromatograafia
 - Ioon-paar kromatograafia
- Suuruseralduskromatograafia
- Enantiomeeride lahutamine
- Ioonkromatograafia

3



4

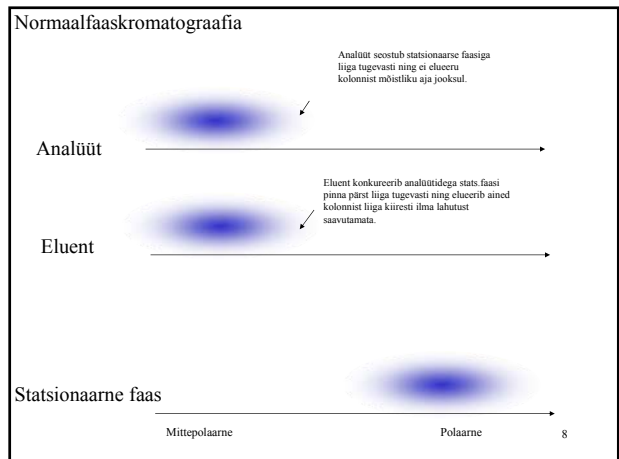
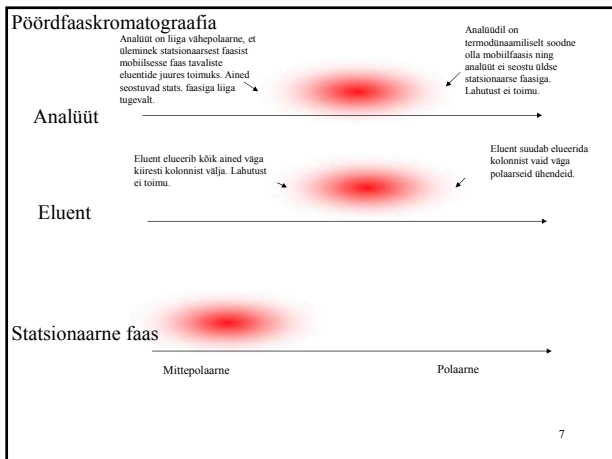
Normaal- ja pöördfaaskromatograafia

5

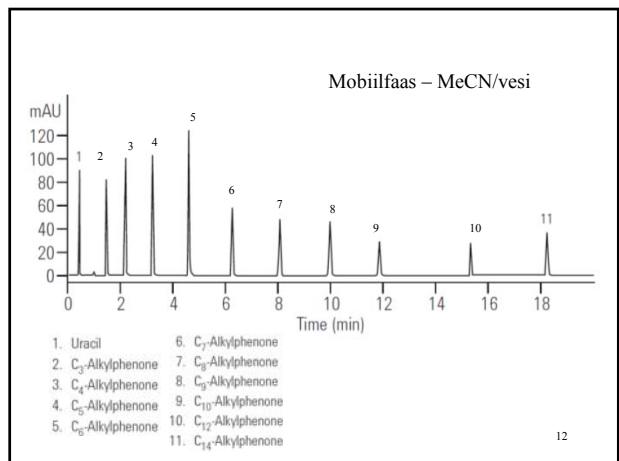
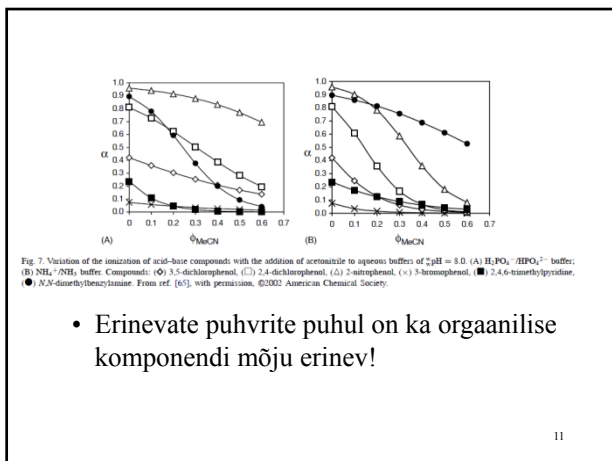
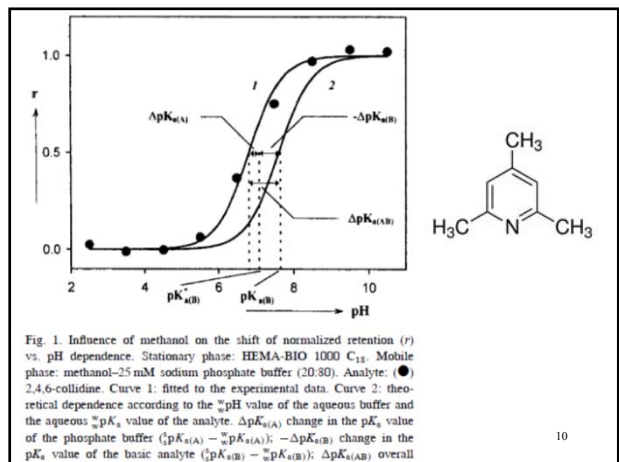
Pöördfaaskromatograafia

- Levinuim vedelikkromatograafia liik
 - Sellega tegeleme lähemalt kogu ülejäänud semestri
- Stats. faasid: $-C_{18}$ ja $-C_8$ peamiselt
- Mobiilfaas: Vesi + MeOH/MeCN/THF
 - Puhverdavad lisandid

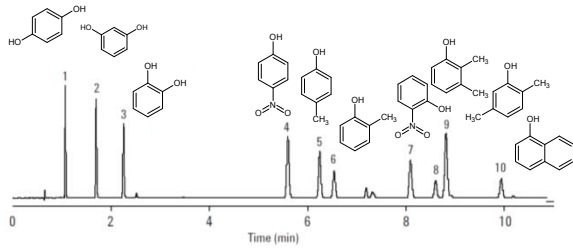
6



- ### pH mõju elueerimisele
- Anioonid ja katioonid elueeruvad kolonnist kiiremini kui vastavad haped/alused
 - Määramaks, mis vormis analüüt mil määral eluendis on tuleb uurida
 - Analüüdi pK_a
 - Eluendi pH
 - Tuleb arvestada, et eluendi pH sõltub ka eluendis olevast orgaanilisest solvendist
- 9



Mobiilfaas: MeCN/vesi + 0.1% sipelghapet



Oluline on hüdrofoobsuse kasv!

13

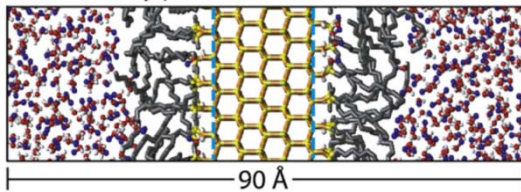
Kuidas uuritakse

- Vaatamata pikaegsele kasutamisele on jäänud pöördfaas-kromatograafia vallas ka mõningaid müsteeriume
 - Nt miks ei ole kolonni jaoks hea kasutada elueerimiseks 100% veefaasi.

14

Molekulaardünaamilised simulatsioonid

Stationary phase in contact with solvent



Lindsey R.K. et al *J Chromatogr A* 1287 (2013) 60-82

15

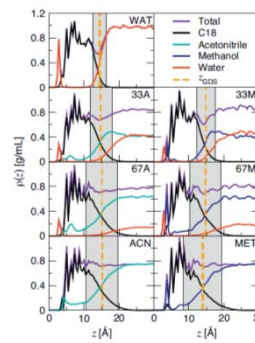


Fig. 8. Solvent and bonded-chain density profiles for C_{18} phases in contact with mobile phases of different compositions (given in mole fraction units): neat water (WAT), 33% 67% and neat acetonitrile (33A, 67A, and ACN), and 33% 67% and neat methanol (33M, 67M, and MET). The shaded gray area and the orange dashed line denote the interfacial region and location of the Gibbs dividing surface, respectively. [For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.]
Taken from Rafferty et al. [72].

Lindsey R.K. et al *J Chromatogr A* 1287 (2013) 60-82

16

- Kuidas ja mil määral on seotud faas solvateeritud?
- Erinevad orgaanilised lahendid solvateerivad seotud faasi erinevalt.

Normaalfaaskromatograafia

Statsionaarne faas on polaarsem kui mobiilne faas

17

Mobiilne faas

- Orgaaniliste lahendite segu
 - Ei sisalda vett

18

Statsionaarne faas

- Anorgaaniline adsorbent
 - Silikageel
 - Alumiinumioksiid
- Polaarne seotud faas
 - Tsüaano
 - Diool
 - Amino

19

Analüüdid

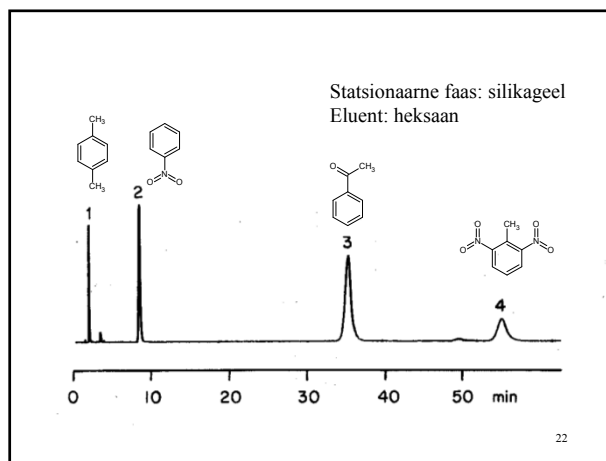
- Neutraalsed ühendid
- Probleemid ioniseeruvate ühendite määramidega
 - Mobiilfaasilisandid

20

Retentsioon

- Kirjeldatakse kui adsorbtsiooniprotsessi
 - Statsionaarse faasi pind on kaetud solvendi molekulidega
 - Analüüdi retentsioon eeldab solvendi eemale tõrjumist

21



HILIC

Hüdrofiilse interaktsiooni
kromatograafia

23

Probleem

- Väga polaarsed ühendid
 - Seostuvad normaafaaskromatograafis statsionaarse faasiga liiga tugevalt ja ei elueeru kolonnist mõistlikult
 - Pöördfaaskromatograafias aga ei seostu üldse statsionaarse faasiga ning neid ei saa üksteisest lahutada
- Kui ühend on iooniline saab kasutada ionkromatograafiat.

24

HILIC kromatograafia olemus:

- Samad statsionaarsed faasid, mis normaal-faaskromatograafias
- Samad eluendid (MeCN/vesi) mis pöörd-faaskromatograafias
- Tegemist on nõ vedelik-vedelik jaotumisega
- Statsionaarne faas on kaetud veerikka kihiga, samas kui mobiilfaasis on veesosakaal väiksem. Analüüt jaotub kahe faasi vahel.
- Mida polarsem on analüüt seda tugevamini seostub ta retentsiooni põhjustava veekihi.
- Polarsemad ühendid elueeruvad hiljem.

25

Suuruseralduskromatograafia (SEC)

26

Sissejuhatuseks

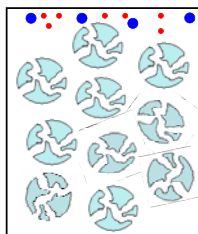
- Suuruseralduskromatograafias (SEC) eristatakse tihti kaht alaliiki:
 - Geelfiltratsiooni korral kasutatakse vee baasil eluent. Põhiline kasutusala: proteiinide eraldamine.
 - Geelläbivus-kromatograafia (*gel permeation*) eluent on orgaaniline solvent. Kasutatakse orgaanikas lahustuvate polümeeride eraldamiseks.

27

SEC lahutuse alused

- Molekulid saavad tungida täidise pooridesse sõltuvalt suurusest.
 - 1. Suured molekulid pooridesse ei tungi ja elueeruvad kiiresti.
 - 2. Väiksed molekulid sisenevad pooridesse ja väljuvad sealt takistusega.
 - 3. Keskmise suurusega molekulid tungivad pooridesse vaid osaliselt. Mida väiksem molekul, seda kauem ta elueerub.

28



Kolonn



29

SEC võimaldab

- Lahutuse aluseks on molekulide hüdrodünaamiline ruumala (suurus).
- Võimaldab eristada
 - Ahela pikkus
 - Alaühikute paiknemine
 - Lõpprühmad
 - Ehitus

30

SEC tulemused

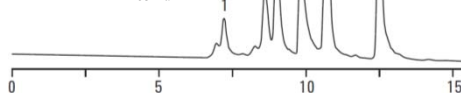
- Piigi ret aeg → keskmine molekulmass
- Piigi kuju → molekulmasside jaotus
- Kalibreerimisel tuleb kasutada samatüübilist polümeeri, mida hakatakse määrama
- Proov peab olema lahustatud samas solvendis kui kalibreerimissegu

31

Kromatogrammi näide

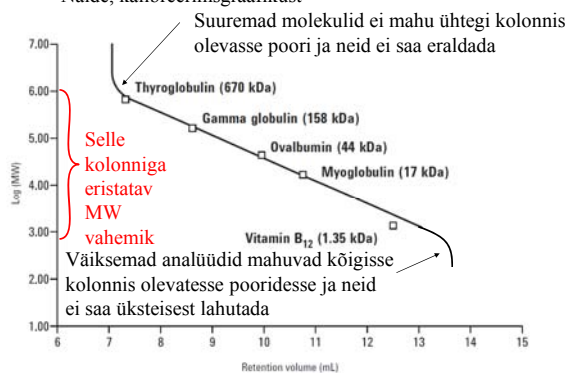
Analüüdid ja nende keskmised molekulmassid:

1. Thyroglobulin 670 kDa
2. Catalase 240 kDa
3. BSA 69 kDa
4. β -Lactoglobulin B 18.5 kDa
5. Myoglobin 17 kDa
6. Tyr-Gly-Gly 253 Da



32

Näide, kalibreerimisgraafikust



33

Statsionaarne faas valmistatakse

- Geelfiltratsiooni korral
 - Dekstran (lineaarne glükoosi polümeer)
 - Polüakrüülamiid
 - Agaros
- Geelläbivus
 - Polüstireeni ja divinüülbenseeni tugevalt ristseotud polümeerid

34

Ioon(vahetus)kromatograafia

35

Terminoloogiast

- Kasutusel on mõisted ioonvahetuskromatograafia (IEC – ion exchange chromatography) ja ioonkromatograafia (IC – ion chromatography)
 - Mõnel pool vaadeldakse neid sünonüümideks.
- IEC käsitleb iooniliste proovide lahutamise protsessi ioonvahetil.
- IC on ioonide lahutamise ja detekteerimise kromatograafia.
 - Detektoriks on enamasti juhtivusdetektor.
 - Lahutamine enamasti IE kolonniga (kuid võib olla RP).

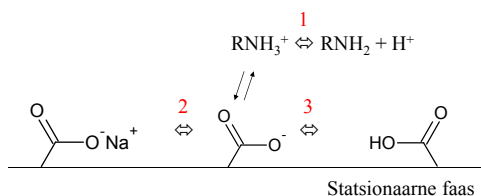
36

IEC retentsioon

- Statsionaarse faasi pinnal on laetud rühmad:
 - amiin, kvaternaarne ammoonium – positiivse laenguga
 - sulfonaat, karboksülaat – negatiivse laenguga
- Retentsiooni aluseks on tasakaalud:
 - $R\cdot K^+ + X^- \rightleftharpoons R\cdot X^- + K^+$ (katioonvahetus)
 - $R^+Cl^- + X^- \rightleftharpoons R^+X^- + Cl^-$ (anioonvahetus)
- Vastandiooni (nt K^+ ja Cl^-) kontsentratsiooni suurendamine vähendab analüüdi retentsiooni

37

1. Mõjutab pH ja aine enda pKa
2. Mõjutab vastasiooni hulk ja omadused
3. Mõjutab pH ja statsionaarse faasi omadused



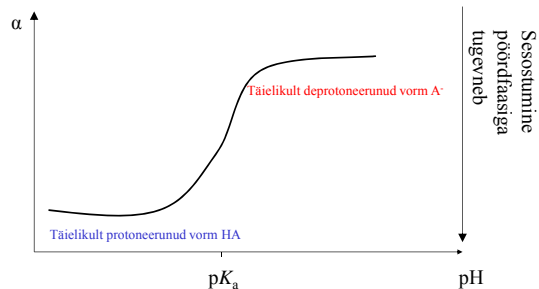
38

Milleks IC?

- Miks mitte kasutada pöördfaas-kromatograafiat (ioonpaar-kromatograafiat)?
- Detekteeritavus
 - Tavalised detektorid ei sobi paljude anorgaaniliste (ja mõnede orgaaniliste) ionide jaoks - juhtivusdetektor
 - MS-detekteerimiseks peaks eluent olema lenduv, ionpaar-reagendid (nt lauriülsulfaat) enamasti ei ole
- Preparatiivne kromatograafia
 - Ioonpaar-reagendi mittelenduvus on probleemiks
- Sobiv mitmeetapilise kromatograafia esmaseks lahutuseks

39

Happed esinevad erinevates vormides sõltuvalt eluendi pH-st



Miks ei saa happeid/aluseid alati määrata pöördfaas või normaalfaas kromatograafiaga?

40

pH mõju

- Analüütideks on sageli alused või happed
- Ioonvahetus on efektiivne, kui analüüdi ja ioonvaheti pind on (vastasmärgilise) laenguga
- Kasutades teadmisi nõrkade ja tugevate hapete ja aluste käitumisest erineva pH juures, tuletada seosed pH ja retentsiooni vahel nõrga ja tugeva ioonvaheti ning nõrga ja tugeva aluse/happe vahel.

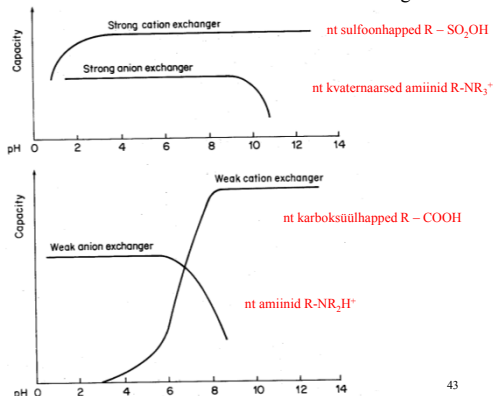
41

Nõrgad ja tugevad ioonvahetid

- Katioonvahetid
 - WCX ja SCX – *weak/strong cation exchange*
- Anioonvahetid
 - WAX ja SAX – *weak/strong anion exchange*
- Tugevad on kasutatavad $2 < \text{pH} < 12$
- Nõrgad kaotavad mingil pH väärtusel laengu
- Nõrku kasutatakse harva
 - selektiivsuse muutmiseks
 - retentsiooni vähendamiseks

42

Erinevad statsionaarsed faasid on erineva mahtuvusega:



43

pH puhul tähele panna

- Silikageeli baasil kolonnid ei kannata enamasti pH>8 ja pH<1.
- Tugevad kationvahetid happe vormis ja tugevad anioonvahetid OH⁻ vormis võivad katalüüsida proovides mitmeid reaktsioone
 - nt estrite hüdrolüüs

44

Soola mõju retentsioonile

- Erinevate anioonide (kationide) retentsioon on erinev
 - Vastasioonidel on erinev võime analüüdi ioone asendada
- Tugev vastasioon vähendab analüüdi retentsiooni rohkem, kui sama kontsentratsiooniga nõrk vastasioon
 - F⁻ (nõrk) < OH⁻ < CH₃COO⁻ < Cl⁻ < SCN⁻ < Br⁻ < CrO₄²⁻ < NO₃⁻ < I⁻ < SO₄²⁻ (tugev)
 - Li⁺ (nõrk) < H⁺ < Na⁺ < NH₄⁺ < K⁺ < Rb⁺ < Cs⁺ < Mg²⁺ < Ca²⁺ < Ba²⁺ (tugev)

45

Orgaanilise solvendi lisand

- Orgaanilise solvendi lisand vähendab retentsiooni
- MeOH ja MeCN lisandit kasutatakse ka selektiivsuse muutmiseks

46

Meetodi väljatöötamine

- Sobiv kolonn
 - Happelistele ja anioonsetele proovidele tugev anioonvaheti; aluseliste ja kationsetele tugev kationvaheti
- Eluent
 - Alustada vee baasil puhvrist. Tüüpiline on pH>6 anioonvahetusel ja pH<6 kationvahetusel
 - Kui proovi pK_a on teada, siis pH>pK_a anioonvahetusel ja pH<pK_a kationvahetusel
 - Kontsentratsioon 20...50 mM

47

Meetodi väljatöötamine

- Eluendi komponent B
 - Puhver + mingi sool (nt K₂SO₄)
 - Proovida gradienti 0...100% B
- Kui nendel tingimustel ei elueeru, siis
 - tõsta temperatuuri
 - lisada metanooli
 - kasutada nõrka ioonvahetit
- Kui retentsioon on paigas (0.5<k<20)
 - siis muuta selektiivsust soola, pH või orgaanika muutmise

48

Ioonvahetid

- Sünteetilised orgaanilised polümeerid

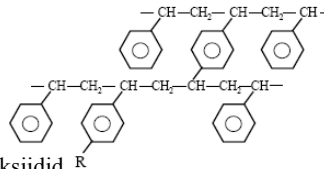
Kõige sagedasemad tahked kandjad ioonkromatograafias. Levinuimateks stüreeni ja divinüülbenseeni kopolümeerimisel saadavad polümeerid. Seejärel viiakse polümeeri sisse sobivad funktsionaalsed rühmad.

Polümeersete materjalide eelis on nende kasutatavus laias pH vahemikus (põhimõtteliselt 0-13 ühikut), saab määrata ka nõrgalt ioniseeruvaid ühendeid. Põhiliseks puuduseks on asjaolu, et ei kolonnis ei saa kasutada suurt rõhku, sest need materjalid on suhteliselt pehmed. Ka limiteerib see kolonni pikkust ning eluendi voolukiirust.

49

Ioonvahetid

- Sünteetilised orgaanilised polümeerid
- Polüstrüreenil põhinev ristsidemetega polümeer:



- Oksiidid
 - Alumosilikaatidel, alumiiniumoksiidil, ränioksiidil ja tsirkooniumoksiidil on ioonvaheti omadused, sest neil maatriksitel on kompenseerimata pinnalaeng, mida neutraliseerivad liikuvad vastastsoonid. Näiteks metallioksiidid võivad sõltuvalt pH-st olla nii katioon- kui ka anioonvahetid.

50

Ioonvahetid

Ioonvahetite iseloomustavad:

- Selektiivsus
 - Statsionaarse faasiga seostuvate ionide afinsus on erinevate ioonvahetite korral erinev ning sõltuv kasutatavatest tingimustest.
- Mõned üldisemad omadused, mis kirjeldavad analüüsitavaiooni, vastastsooni ja eluendi iooneid vastasmõjusid:
 - Analüüsitavaiooni laeng
 - Solvateeritudiooni suurus
 - Polümeerses ioonvahetis olevate põiksidemete arv
 - Analüüsitavaiooni polariseeritavus
 - Ioonvahetiioonmahtuvus
 - Ioonvahetil olevate funktsionaalrühmade iseloom
 - Kõigi ionide vastasmõju ioonvaheti tahke kandjaga

51

Ioonkromatograafia aparaat

Aparaat on sarnane tüüpilisele vedelikchromatograafias kasutatavale:

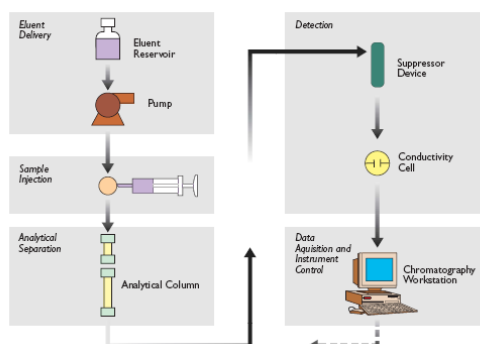
- Kõrgrõhupump
- Proovisisestussüsteem
- Kolonn
- Detektor
- Andmetöötlussüsteem

Kõige problemaatilisemaks osutus sobiva detektori leidmine, põhimõtteliselt võiks kasutada:

- Elektrokeemilisi detektoreid (amperomeetriline, kulonomeetriline)
- Potentsiomeetrilisi detektoreid
- Juhtivusdetektorit**
- Spektroskoopilisi detektoreid (UV-Vis detektor)

52

Ioonkromatograafia aparaat



53

Supressorkolonn

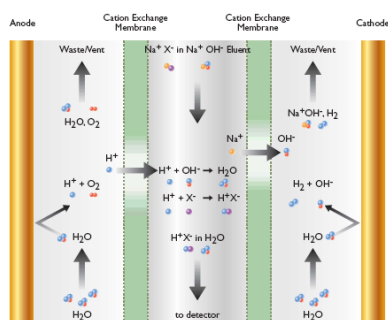
- Põhiliseks takistuseks juhtivusdetektori kasutamisel on eluendi enda liigne juhtivus
- Supressorkolonn võimaldab eluendis olevad ioonid eraldada, nt katioonide korral:



- Puuduseks on vajadus tihti regenereerida

54

Membraansupressor



55

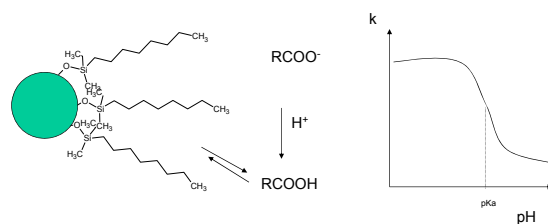
Tavalised rakendused

- Anorgaaniliste ionide määramine
 - Põhiliselt anioonide
- Aminohapete, peptiidide ja valkude määramine
- Nukleiinhapete analüüs

56

Ioonpaar kromatograafia

57



Seega: Karboksüülhappe retentsioon pöördfaaskromatograafias sõltub eluendi pH-st.

Sama kehtib ka nõrkade aluste puhul.

58

Mobiilfaas

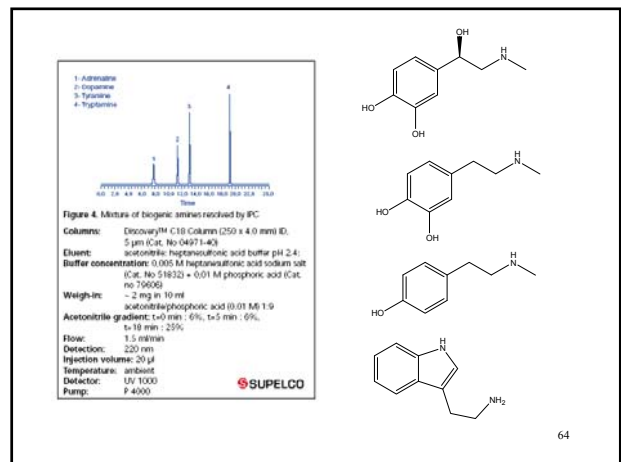
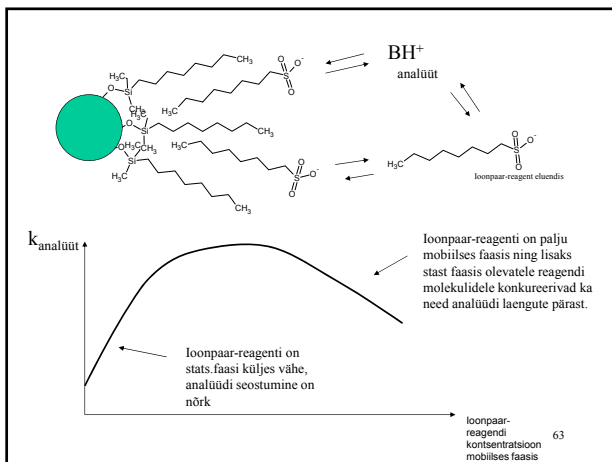
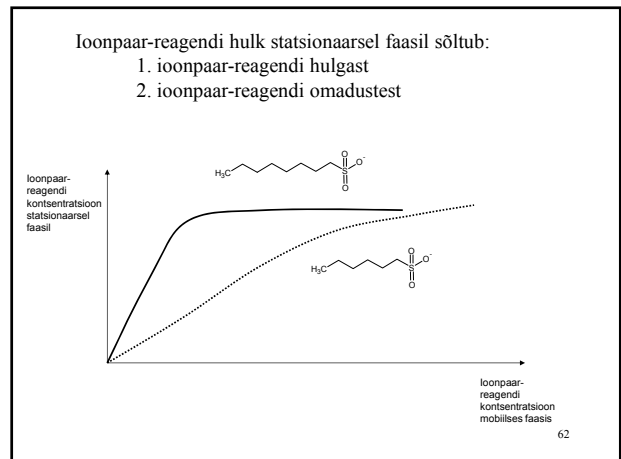
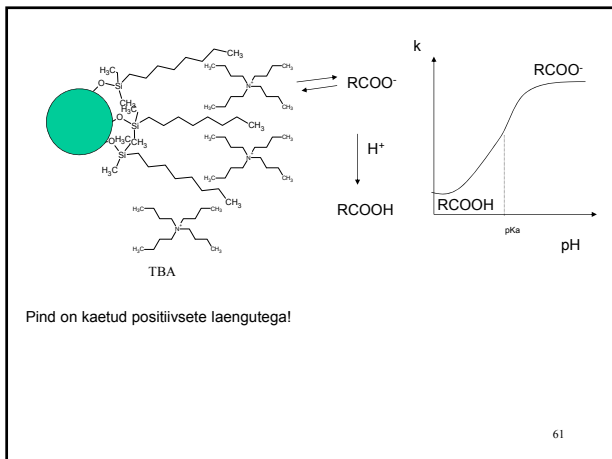
- Ioonpaar-reagent
 - Analüüdile vastaslaenguga
 - Pikk hüdrofoobne saba
 - Seostub pöördfaaskoloniga
- Alküülsulfonaadid
 - Kationide määramiseks
- Tetraalküülamooniumi soolad
 - Anioonide määramiseks

59

Mobiilfaas

- Optimeerimine
 - pH
 - Ioonpaar-reagenti kontsentratsioon
- Gradiendi puhul peavad mõlemad komponendid sisaldama ioonpaar-reagenti sama kontsentratsiooniga

60



Enantiomeeride lahutamine

65

Enantiomeer

- Stereoisomeerid, mis on
 - teineteise peegelpildid
 - ei saa teineteisele asetada (*non-superimposable*)
- Enantiomeeride füüsikalised ja keemilised omadused on samad, välja arvatud valguse polarisatsioonitasandi pööramine
- Nomenklatuur
 - R ja S
 - D ja L
 - + ja -

66

Diastereo(iso)meer

- Stereoisomeerid, mis
 - ei ole teineteisele asetatavad (non-superimposable)
 - ei ole peegelpildid
- Füüsikalised ja keemilised omadused on erinevad

67

Enantiomeeride lahutamine

- Lahutavas süsteemis peab olema kiraalsus:
 - Kiraalne komponent mobiilses faasis
 - Vedel kiraalne statsionaarne faas (vedelik-vedelik jaotuskromatograafia)
 - Tahke kiraalne statsionaarne faas
 - Pärast derivatiseerimist kiraalse reagentiga

68

Enantiomeeride lahutamine

- Lahutamise aluseks on diastereomeerse kompleksi moodustumine analüüdi molekulide ja kromatograafilises süsteemis oleva kiraalse komponendi vahel

69

Kiraalne mobiilfaas

- Mobiilfaasi lisatakse väike kogus mingit kiraalset ainet (ühte enantiomeeri!)
- Sobivad tavalised statsionaarsed faasid ja eluendid
- Kiraalne lisand moodustab kompleksi või ioonpaari analüüdi molekulidega
 - kui tekkinud diastereomeersete komplekside jaotuskoeffitsiendid on erinevad, siis enantiomeerid lahutuvadki

70

Kiraalne mobiilfaas

- Eelised
 - Tavaline kolonn ja eluendid
 - Eluendi lisandi valikul on suur vabadus
 - Saab valida enantiomeeride elueerumise järjekorda
- Puudused
 - Kompleksimoodustumise tasakaal võib olla tundlik (temperatuur, pH, kontsentratsioon)
 - Preparatiivseks lahutuseks ei sobi

71

Kiraalsed statsionaarsed faasid

- Kolme punkti reegel
 - Analüüdi seostumine statsionaarse faasiga peab toimuma kolme sõltumatu interaktsiooni tulemusena
 - Vähemalt üks neist seostumistest peab olema stereokeemiliselt selektiivne

72

Vedel kiraalne statsionaarne faas

- Vedelik-vedelik (jaotus)kromatograafia
- Statsionaarse faasi pinnale on kantud õhuke kiraalse ühendi kiht
 - See ei tohi olla mobiilfaasiga segunev
 - Mobiilfaas peab sama ainega küllastatud olema

73

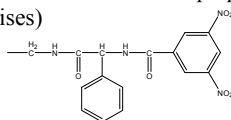
Tahke kiraalne statsionaarne faas

- Statsionaarsele faasile on seotud kiraalne ühend (CSP – *chiral stationary phase*)
 - Pole olemas statsionaarset faasi, millega saaks lahutada kõiki isomeere
- Tüübid
 - Harja-tüüpi CSP
 - Heeliksikujulised polümeerid
 - “Õõnsusega” (*cavity*) faasid
 - Proteinsed
 - Ligandi-vahetusega faasid

74

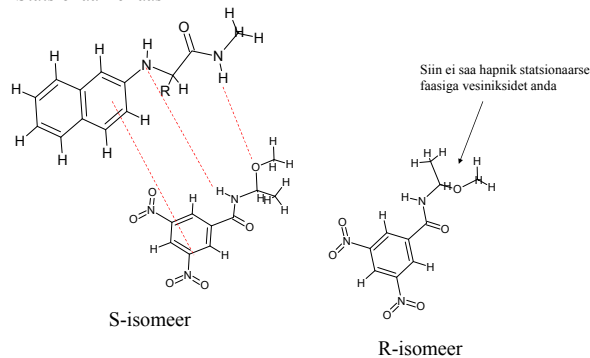
Harja-tüüpi CSP

- Kõige tuntumad on Pirkle tüüpi CSP-d
 - Disainitud vastavalt kolme punkti reeglile
 - Töötavad nii normala- kui pöördfaas-režiimis
 - On saadava mõlema isomeerina – st analütide elueerimisjärjekorda saab ise muuta (oluline nii kvantitatiivses analüüsis kui preparatiivses eraldamises)



75

Statsionaarne faas

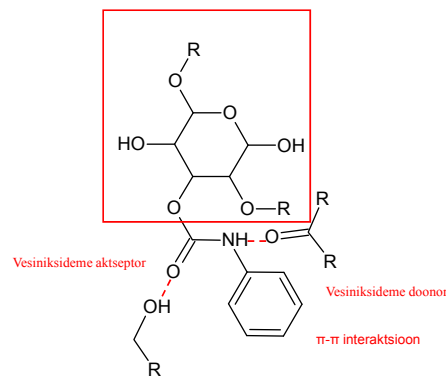


76

Heeliksikujulised polümeerid

- Peamiselt tselluloos ja selle derivaadid
- Kõige universaalsem CSP-de grupp
- Näited
 - tselluloos triatsetaat
 - tselluloos tribensoaat
- Töötavad normaalfaasrežiimis
- Ei kannata vett (ei proovides ega eluendis)

77

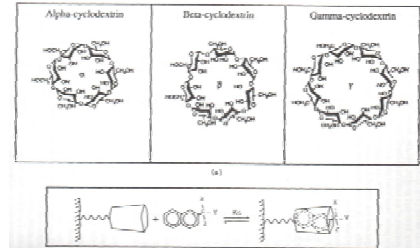


78

Õõnsusega'' (cavity) faasid

- Tsüklodekstriinid
 - 6, 7 või 8 glükoosijäägiga tsüklid
 - peamiselt väikeste molekulide lahutamiseks
 - kasutatakse polaarset eluente
- Krooneetrid
 - lahutatakse aminohappeid ja primaarseid amiine

79



80

Proteiinsed

- Valgud on kõrge enantioselektiivsusega väikeste molekulide suhtes
- Seotakse silikageeli pinnale
- Näiteks
 - albumiin
 - tsellulaas
 - ovomukoid
 - kõik on kallid ja kasutamisel delikaatsed
- Peamiselt kiraalsete ravimite lahutamiseks

81

Proteiinsed

- Kasutatakse pöördfaas režiimis
- Väikene i-PrOH või MeCN lisand (kuni 15%)
- pH muutmisel muutub hapete ja aluste retentsioon
 - pH ↑ k_{hape} ↓ aga k_{alus} ↑

82

Ligandi-vahetusega faasid

- Aminohapped seotakse silikageelile ja küllastatakse Cu^{2+} ionidega
 - selline faas interakteerub aminohapetega vesilahuses ja mõnede β -amino alkoholidega
- Üsna piiratud kasutusega lähenemine
 - kolonnide efektiivsus on madal
 - derivatiseerimata aminohapete vilets detekteeritavus
 - mobiilfaas peab sisaldama Cu^{2+} ioone

83

Kokkuvõte

84

