

Kõrgefektiivne vedelik- kromatograafia

Aparatuur, selle kasutamine ja hooldus

2011 kevad

1

Vedelik-kromatograafia - LC

- Kromatograafia leiutamise ajal (XX saj algus, Mihhail Tsvett):
 - Kolonnid 50 – 500 cm pikad ja diameetriga 1 – 5 cm.
 - Eluendi voolukiirus 0.1 ml/min suurusjärgus.
 - Sorbendiosakeste läbimõõt 150 – 200 µm.
- Voolukiiruse suurendamine sellises süsteemis toob kaasa efektiivsuse languse (vt van Deemter).
- Efektiivsuse ja voolukiiruse samaaegselt tõstmiseks tuli sorbendiosakeste läbimõõtu oluliselt vähendada.

2011 kevad

2

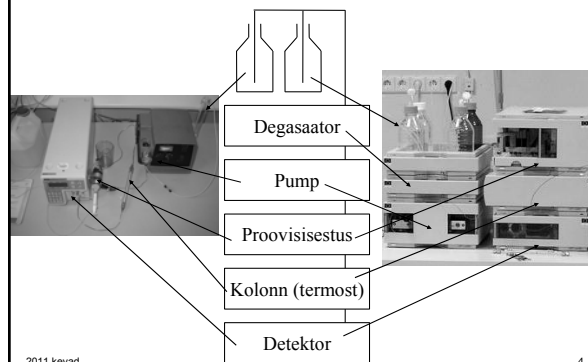
HPLC

- Eluendi pumpamiseks läbi peeneteralise (2 – 10 µm) täidisega kolonni on vaja rakendada kõrget survet – HPLC.
- HPLC (*high-performance* või *high-pressure liquid chromatography*) – kõrgefektiivne vedelik-kromatograafia.
 - Eesti Õiguskeele Keskuse andmebaasis:
 - kõrgrõhuvetik-kromatograafia (eelistermin)
 - kõrgefektiivne vedelik-kromatograafia (eelistermin)
 - kõrgsurvedelik-kromatograafia (sünonüüm)
 - TÜ raamatukogu märksõnastikus:
 - kõrgjõudlusvedelik-kromatograafia, kõrgsurvedelik-kromatograafia

2011 kevad

3

HPLC seadmed, hooldus



2011 kevad

4

Solvendid

- Mobiilse faasi orgaaniline osa tasub osta HPLC puhtusega, sest see on juba filtreeritud läbi 0.45 µm filtri.
- Veefaas (puhverlahus): deioniseeritud vesi takistusega >18 MΩ·cm, hea oleks alandada ka orgaanika sisaldust. Vabriku-veed kipuvad sisaldama Na⁺ ja K⁺, see võib osutada mõnel juhul segavaks.
- **Ühtki eluendi komponenti ei tohi hoida plastanumas!**

2011 kevad

5

Eluendinõu

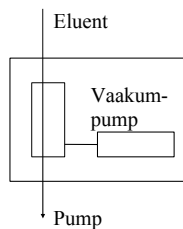
- Peaks olema klaasist (või terasest), sest plastnõud lekitavad plastifikaatoreid ja lasevad gaase läbi.
- Nõu peab olema korgiga suletud (tolm!), kuid tagatud peab olema õhu sissepääs, nt. läbi filtri.
- Vesilahuste anumad peaks olema tumedast klaasist, et vähendada puhverlahuse "kasvamise" võimalust.
- Anum tuleb väga hoolikalt pesta (soovitatakse ka kuivatada 400°C juures).
- Loputada eluendiga 10 korda.

2011 kevad

6

Degasaator

- Kaasaegsetes süsteemides kasutatakse enamasti “on-line” degasaatoreid.
- Tööpõhimõte:
 - eluent voolab läbi õhukeseseinalise PTFE-toru
 - see toru paikneb vaakumis ja gaasid difundeeruvad läbi toru seina



2011 kevad

7

Degasaatori puhul jälgida

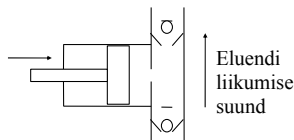
- Degasaator võib mahutada kuni 20 ml eluenti, seega tuleb eluendi vahetamisel see välja pesta!
- Mõnede degasaatorite vaakum muutub suurtes piirides ja nii on degaseerimise efektiivsus vahelduv.
- Kui degasaatorit pikemat aega ei kasutata, siis peaks läbi voolutama deioniseeritud veega (soolad, vetikad) ja seejärel metanooliga.

2011 kevad

8

Pump

- Enamasti kasutatakse kolbpumpasid (*reciprocating pump*), milles eluendi vool tekitatakse kolvi ja klappide sünkroniseeritud liikumisega.



- Gradientelueerimiseks võib kasutada mitmest pumbast koosnevat süsteemi.

2011 kevad

9

Kolbpump

- Eelised:
 - võib tekitada kõrge surve
 - eluendi kiirus on hästi kontrollitav
 - gradiendi kasutamise võimalus
 - sisemine ruumala on väike (35 – 400 µl)
- Puudused:
 - eluendi vool on pulseeriv ja seda tuleb siluda

2011 kevad

10

Gradiendi tekitamine

- Kasutatakse kahte liiki segisteid:
 - madalrõhul segisti – eluendid segunevad enne kõrgsurvepumpa jõudmist
 - odavam osta ja omada – pumba varuosi vaja ühele pumbale
 - gradiendi surnud ruumala on suurem
 - kõrgrõhul segisti – iga eluendi komponendi jaoks on eraldi kõrgsurvepump ja segamine toimub pärast kõrgsurvepumpade läbimist
 - pumba elektroonika peab toime tulema eluendi komponentide erineva kokkusurutatavusega
 - pump peab arvestama segunemise ruumalaefektiga (kuni 20%)

2011 kevad

11

Proovi sisestamine – aas

- Lihtsam variant on aasaga (silmus, *loop*) varustatud klapp.
 - ka paljud automaatsed proovisisestajad (*autosampler*) kasutavad aasaga süsteeme
 - enamasti süstitakse terve aasatäis korraga – süstitava proovi ruumala määrab aasa suurus, kuid võib süstida ka osaliselt täidetud aasa, st täpne doseerimine käib süstla järgi

2011 kevad

12

Proovi sisestamine – automaatne

- Automaatne süsteem (*autosampler*)
- Eelised ja lisavõimalused:
 - proovi ruumala muutmiseks pole vaja tööriistu
 - automatiseeritav
 - nõela pesemine
 - proovi lahjendamine
 - reaktsiooni tekitamine nõelas või vialis (proovi komponente võetakse mitmest vialist)
- Kaugeltki kõik automaatsed proovisisestajad ei võimalda loetletud operatsioone

2011 kevad

13

Kolonni termostaat

- Võimaldab hoida kolonni temperatuuri konstantsena ja kasutada toatemperatuurist kõrgemaid või madalamaid temperatuure.
- Kasutatakse tsirkuleeriva õhu või veega mudeleid, kuid kõige mugavamad on Peltier' termostaadid.
- Kui kõrge temperatuurini kolonni soojendada võib, tuleb vaadata kolonni passist. Reeglina üle 60°C soojendada ei tohiks.

2011 kevad

14

Kolonnid

- Kolonni kest valmistatakse enamasti terasest, sisediameetriga 2 – 4.6 mm. Välismõõt enamasti ¼ tolli ja pikkus 10 – 30 cm.
- Ühendusteks kasutatakse tihti *Swagelok*-ühendusi.
- *Swagelok*-ühenduse puhul fikseerub koonus esimesel kasutamisel toru külge seda enam muuta ei saa.
- NB! Kui toru on kasutatud mingi kolonni ühendamiseks, siis teise tootja kolonnile ei pruugi see enam sobida!

2011 kevad

15

Eelkolonn

- Kasutatakse tihti analüütilise kolonni ees, et pikendada analüütilise kolonni eluiga.
- Eelkolonn (*guard column*) püüab kinni:
 - tahked osakesed (eluendist, proovist), mis võiks kolonni ummistada
 - proovi komponendid, mis keemiliselt seonduvad kolonni täidisega või lagundavad seda
- Eelkolonni täidise materjal peaks olema sama, mis analüütilisel kolonnil, kuid osakesed suurema läbimõõduga.

2011 kevad

16

Eelkolonn?

- Eelkolonn ise ja selle ühendamise kohad tekitavad süsteemis efektiivsuse kao.
- Eelkolonn ja selle hoidjad maksavad raha ...
- Kas eelkolonni tasub kasutada?
- Leidub autoreid, kes nimetavad (analüütilise kromatograafia) eelkolonne tootjate osavaks trikiks.
- Igaüks peab ise arutama ja testima!

2011 kevad

17

Detektor

- Kasutatakse tervet rida detektoreid, mis baseeruvad erinevate füüsikaliste või keemiliste omaduste mõõtmistel:
 - UV-Vis absorptsioon (fikseeritud lainepikkusega ... dioddrivi)
 - fluorestsents
 - elektrijuhtivus
 - elektrokeemilised detektor
 - mass-spektrometriline

2011 kevad

18

Andmehõivesüsteem

- Tänapäevased instrumendid on enamasti arvutiga ühendatud. Arvuti ülesanded on järgmised:
 - kromatograafi tööparameetrite etteandmine (voolukiirus, proovi ruumala jne.) ja jälgimine
 - detektori signaali salvestamine
 - tööparameetrite komplektide (meetodite) salvestamine
 - andmetöötlus
- Kromatograaf toodab suurel hulgal andmeid ja arvuti peab olema piisavalt võimas nii kiiruse kui andmete mahu osas.

2011 kevad

19

Torud

- Kõrge rõhu osas kasutatakse kahte liiki torusid:
 - Roostevaba teras:
 - lihtne painutada
 - korrodeerub (nt. Cl)
 - lõikamine raske (või peab ostma õige pikkusega tüki)
 - PEEK (polüeteer-eeter-ketoon):
 - inertne, kuid pundub THF, DMSO ja metüleenkloriidi toimel
 - painutamine raske (võib kasutada vastavaid nurki)

2011 kevad

20

Liited

- Terastorud ühendatakse enamasti Swagelok-tüüpi ühendustega (koosneb algselt 2-3 toru peal liikuvast tükist). Koonus fikseerub esimesel kasutamisel ja toru ei pruugi muudesse kohtadesse enam sobida.
- Ühenduse tegemiseks on vaja mutrivõtmeid.
- PEEK-torude ühendamiseks on levinud sõrmega keeratavad mutrid (*fingertight nut*).
- **Nipp! Fingertight'i võib kasutada ka terastoru peal!**

2011 kevad

21

Mugavad lisad

- Solvendi valiku klapp (pumba lisa, vaja degasaatori lisakanalit). Ei anna kromatograafiale otseselt midagi juurde, kuid teeb töö oluliselt lihtsamaks kui on vaja teist solventi:
 - kolonni pesemiseks
 - teise kromatograafilise meetodi jaoks
- Kolonni valiku klapp (kolonni termostaadi lisa) võimaldab:
 - vahetada kolonni ilma mutrivõtmeta
 - kasutada erilisi voolutusrezhiime (*back-flush*)

2011 kevad

22

Hoidmine (puhtus)

- Puhtus on kriitilise tähtsusega. Süsteemi sattunud tahked osakesed (tolm) rikuvad pumba tihendid ja ummistavad kolonni.
- **Eluent tuleb enne kasutamist filtreerida!**
- **Proovid tuleb enne sisestamist filtreerida!**
- Filtreerida võib näiteks läbi 0.4 µm suuruste pooridega filtri.
- Filtri materjal sõltub rakendusest. Vesilahuste jaoks sobib näiteks PVDF (polüvinülideenfluoriid).

2011 kevad

23

Hoidmine (keemiline sobivus)

- Eluendi valikul pidada silmas, millega see süsteemis kokku puutuma hakkab
 - pump, tihendid ja torud
 - kolonni täidis
- Kui eluent sisaldab sooli, siis alati pärast töö lõpetamist tuleb süsteem läbi pesta tööeluendiga, kuid ilma phuvri sooladeta. Seejärel tuleb süsteemist läbi voolutada mõnda orgaanilist solventi (nt. atsetonitriil), et vältida korrosiooni.
- Mõnel pumbal on ka “välise” pesemise võimalus.

2011 kevad

24

Hoidmine (kolonn)

- Kuigi kaasaegsed kolonnide täidised on suhteliselt vastupidavad, tuleks kolonne hoida järskude rõhumuutuste eest.
 - pumba voolukiirust tuleb suurendada ja vähendada astmeliselt
 - eluendi koostist muuta astmeliselt
- Üldjuhul tuleb vältida eluendi voolamist kolonnis vastupidises suunas
 - ühendada kolonn alati sama pidi
 - kolonni lahtiühendamisel alustada “alumise” ühenduse avamisega

2011 kevad

25

Jälgimine (väline)

- Kuula, kuidas töötab ...
 - degasser
 - pump
 - klapid (kui neid on)
- Vaata, et ei oleks ...
 - lekkeid
 - kokkumurtud torusid
 - nähtavaid mehaanilisi vigastusi

2011 kevad

26

Jälgimine (rõhk)

- Esmane süsteemi korrasoleku näitaja on rõhk. Pumba rõhku tasub pidevalt jälgida!
 - kui rõhk muutub korrapärase perioodiga, siis on süsteemis õhumull (tavalise binaarse pumba korral on normaalne rõhu kõikumine kuni 1 bar)
 - kui rõhk on ebanormaalselt madal, siis tasubotsida leket
 - kui rõhk on liiga kõrge, siis on kas
 - (eel)kolonn ummistunud
 - toru kokku murtud või umbes
- **Rõhk on kolonni seisukorra hea indikaator.**

2011 kevad

27

Instrumendi hooldus

- Hooldusprotseduurid on vajalikud kui
 - mõni jälgitav parameeter ei ole enam normaalne
 - süsteem ei läbi teste (laboriseseid või instrumendi tootja poolt määratud)
 - süsteem ise annab märku hooldamise vajalikkusest
 - kalendrijärgne hooldus (igakuine, iga-aastane vm.)
- Kui hooldust teostab labori töötaja, siis peab hoolega jälgima tootja instruktsioone!
- Uuri järele, kas pärast “ise-hooldamist” garantii veel kehtib!

2011 kevad

28

Kolonni hooldus

- Kolonni kasutamise ja puhastamise tingimusi tasub uurida kolonni dokumentatsioonist.
- Selleks, et kolonni puhastada tugevalt adsorbeerunud komponentidest, tuleks esmalt voolutada eluendi orgaanilise komponendiga.
 - atsetonitriil
 - tsükloheksaan/atsetonitriil/iso-propanool (25:25:50)
 - diklorometaan/metanool (95:5)
 - erijuhul voolutada aeglaselt DMSO või dimetüülformamiidiga

2011 kevad

29