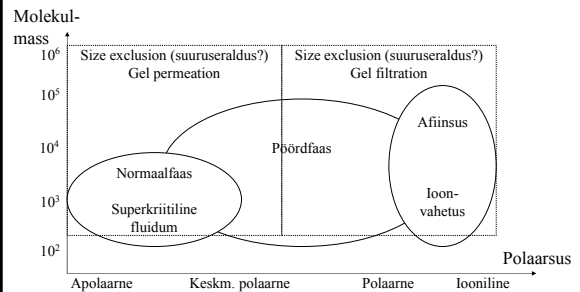


## HPLC statsionaarsed faasid

## Vedelikkromatograafia liigid



## Täidiseosakesed

- Suurema osa HPLC kolonnide täidiste aluseks ehk kandjaks (*support*) on silikageel.
- Polümeersed jm alused on vähelevinud ja neid kasutatakse vaid kindlates rakendustes.
- Kasutatavate osakeste liigitus:
  - Täispoorsed mikrokerad
  - Mikropelliikulid
  - Perfusion particles

## 1. Täispoorsed mikrokerad (*Totally porous microspheres*)

- **Kõige tavalisem.**
- Kompromiss efektiivsuse, proovi hulga, vastupidavuse ja kättesaadavuse vahel.
- Kasutatakse erineva läbimõõdu, poori suuruse ja pindalaga osakesi.
- Kasutatav kõigi HPLC meetodite puhul.



## 2. Mikropelliikulid (*Micropellicular particles*)

- Tahke (silikageelist või polümeerne) tuum, millel on õhuke kiht aktiivset statsionaarset faasi.
- Läbimõõt tavaliselt 1.5 – 2.5 µm.
- Väga efektiivne makromolekulide eraldamiseks kiire massiülekanne tõttu.
- Väikese pinna tõttu sobib vaid väikeste proovikoguste jaoks.
- Piigid on väga teravad, mistõttu kolonnivälise ruumala peab olema minimaalne.



## 3. Perfusion particles

- Suurtel voolukiirustel võivad analüüdi molekulid pooriesse siseneda ja sealt väljuda konvektsiooni ning difusiooni kombinatsiooni teel.
- Kõrvuti suurte läbivate pooridega (4000 – 8000 Å) esineb väiksemate (300 – 1000 Å) võrgustik.

### 3. Perfusion particles (2)

- Piikide laienemine on väike. Nii on kolonni efektiivsus võrreldav väikeste täidiseosakestega.
- Rõhu langus kolonnis on väike.
- Kasutatakse vähe, kuid peetakse sobivaks rakenduseks makromolekulide nt valkude preparatiivset kromatograafiat.
- Väikeste molekulide lahutamiseks rutiinanalüüsil kasutatakse vähe.

### Silikageel täidise materjalina

- Silikageeli baasil valmistatud statsionaarsed faasid annavad **suurima efektiivsuse** võrreldes kõigi teiste alusmaterjalidega.
- Silikageel on mehaaniliselt tugev (jäik) – stabiilsed omadused, madal *backpressure*.
- Täispoorseid silikageeliosakesi valmistatakse mitmete läbimõõtudega (10, 5, 3  $\mu\text{m}$ ) ja erinevate poorsuurustega (nt 8, 30, 100 nm).
- Eelistatud on kerakujulised täidiseosakesed.

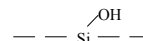
### Silikageel täidise materjalina (2)

- Ei pundu vees ega orgaaniliste solventides – võimaldab gradientelueerimist.
- Pind on keemiliselt modifitseeritav.
- **Puudused**
- Lahustub kõrgematel pH väärtustel (nn sil-gel või xerogel tüüpi lahustub pH > 8, silikageeli soolide agregeerumisel saadavad osakesed kuni pH 9)
- Pind võib olla happeline, mis segab aluseliste ühendite määramist.

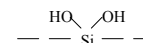
### Silikageeli pind

- Kromatograafias kasutamiseks peab silikageeli pind olema kaetud silanooli kihiga -SiOH. Kontsentratsioon pinnal peaks olema 8  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ .
- Silanoolrühmad pinnal võivad olla:

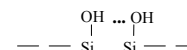
- Vabad



- Paaritised (*geminal*)



- Assotsieerunud

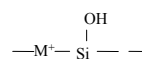


### Silikageeli pind (2)

- Vabu silanoole on enamasti vähesel hulgal. Happelisuse tõttu segavad vabad silanoolid aluseliste analüütide lahutamist.
- Paaritsi silanoole võib olla 25...30% üldisest. Need on vähem happelised kui vabad silanoolid ja ei sega aluseliste komponentide analüüsi.
- Sünteetingimustega püütakse saada võimalikult palju assotsieerunud silanoole. Sobib ka aluseliste komponentide analüüsiks.

### Silikageeli puhtus

- Puhtus mängib olulist rolli polaarsete analüütide korral. Olulised on metallid (Fe, Al, Ni, Zn jm).
- Metallid mõjutavad kolonni omadusi 2 viisil:
  - Metallidega kelateeruvad analüüdid annavad sabatavaid piike.
  - Metall võib aktiveerida (muuta happelisemaks) pinna silanoole.



- Tüüp A – vanem, happelisem; B – uuem, puhtam.

### Polümeersed alused

- Kasutatakse:
  - **Polü(stüreen-divinüülbenseen) PS-DVB**
  - Asendatud metakrülaadid
  - Polüvinüülalkoholid
  - ...
- Edasine jutt käib põhiliselt PS-DVB kohta.
- PS-DVB on ise hüdrofoobne, st seda saab kasutada pöördfaaskromatograafias ilma pinda modifitseerimata.

### Polümeersed alused (2)

- Valmistatakse täispoorseid ja mikropellikulaarseid osakesi.
- Väikesepoorilisi tehakse madala molekulmassiga analüütide ja suurepoorilisi (> 30 nm) makromolekulide jaoks.
- Kasutatav pH-vahemik 1...13.
  - Kasutatav aluselistes tingimustes, kus aluselised ühendid esinevad neutraalsel kujul.
  - Kolonni võib puhastada kasvdõi 0.1 M NaOH-ga.

### Polümeersed alused (3)

- Puudused
  - Sama osakeste suuruse juures on kolonni efektiivsus väiksem (tüüpiliselt 2x väiksem) kui silikageeli korral.
  - Polümeeri pundumine sõltub solvendist, mistõttu gradiendi kasutamine võib olla võimatu. Tihti kasutatakse ainult üht isokraatilist režiimi.

### Grafiitsüsinik

- Poorsed kerad valmistatakse sünteetiliselt.
- Pinda modifitseerimata kasutatakse pöördfaaskromatograafias.
- Retentsioon grafiitsüsiniku pinnal on enamasti tugevam kui alküleeritud silikageelil.
- Kasutatakse selliste ühendite eraldamiseks, mis C<sub>18</sub> kolonnis korralikult ei lahutu (hüdrofiilsed).
- Töötab igal temperatuuril ja pH-l.

### Grafiitsüsinik (2)

- Puudused
  - Kolonnid on madalama efektiivsusega ja õrnemad, kui silikageeli baasil valmistatud.
  - Piikide kuju võib olla halb, eriti suurema k' korral.
  - Kolonni sattunud mustus (nt eluendist) võib anda nn *ghost* piike või pöördumatult adsorbeeruda osakeste pinnale vähendades seeläbi efektiivsust. Proov ja eluent peavad olema puhtad!
  - Müügil on ainult küllalt lühikesi kolonne ja need on kallid.

### Alumiiniumoksiid

- Valmistatakse mitmesuguse läbimõõduga kitsa- ja laiapoorilisi täidiseid.
- Küllaltki tugev ja stabiilne.
- Modifitseerimata kujul kasutatakse normaalfaaskromatograafias, pinda võib modifitseerida.
- Kasutatav kuni pH 12-ni, muus osas silikageeli sarnane.
- Karboksüülhapped seonduvad pöördumatult ...

### Tsircooniumdioksiid

- Kasutatakse nii poorseid kui pellikulaarseid modifitseeritud pinnaga osakesi.
- Kasutatav kõigi HPLC eluentidega pH vahemikus 1...14 temperatuuril kuni 100°C.
- Puudused
  - Pind seob tugevasti CO<sub>2</sub> – degaseerimine!!
  - Samuti seob fluoriide, fosfaate jt jääkasid Lewise happeid.
  - Seob karboksüül- ja sulfoonhappeid ...

### Veel statsionaarseid faase

- Magneesiumsilikaat
  - Aromaatika, amiinid, estrid jpt kemosorbeeruvad.
- Poome klaas (CPG – *controlled-pore glass*)
  - Keemiliselt vastupidav (va leelised), talub kõrget rõhku, pind on modifitseeritav.
- Hüdroksüülapatiit (Ca-fosfaat) – valkude jaoks.
- Hüdroksüülmetakrülaat geel – geelfiltratsioon, afiinsuskromatograafia.
- Agaros (polüsahhariid) – pH 1...14, derivatiseeritav nt afiinsuskromatograafia jaoks.

### Monoliitsed täidised

- HPMC – *high performance monolithic chromatography*
- Tehnoloogia arendati välja valkude kiireks lahutamiseks.
- Teralise täidise osakeste vahele jääb palju vaba ruumi (täidetud on kuni 28% kolonni ruumalast), seega on faasidevaheline massiülekanne aeglane. Monoliitses täidises on vaba ruumi vähe.

### Monoliitsed täidised (2)

- Teralise täidise korral liiguvad molekulid poorides difusiooni mõjul – see on aeglane. Monoliittäidises toimub lahutumine läbivates poorides, kus molekul kandub edasi konvekttsiooni mõjul.
- Kasutatakse väga lühikesi kolonne (algusaegadel isegi membraane).
- Rakendused põhiliselt makromolekulide vallas aga ka väiksemate molekulide jaoks.

### Monoliitsed täidised 3

- Valmistatakse enamasti metakrülaadi baasil
  - GMA – glütsidüülmetakrülaat
  - EDMA – etüleendimetakrülaat
- Ülevaade teemast:
  - Tatiana B. Tennikova and Joachim Reusch, Short monolithic beds: history and introduction to the field, *Journal of Chromatography A*, Volume 1065, Issue 1, 11 February 2005, Pages 13-17. ([http://www.sciencedirect.com/...](http://www.sciencedirect.com/))

### Silikageeli tootmine

### Nõuded täidismaterjalile

- Osakeste läbimõõt 3-10  $\mu\text{m}$ .
  - Suurus ei tohiks varieeruda rohkem kui  $\pm 50\%$  keskmisest.
- Sfäärilised
  - Irregulaarsetega on kolonni raskem ühtlaselt täita, mehaaniline vastupidavus väiksem, hüdrodünaamiline takistus suurem, efektiivsus väiksem.
- Poorsed
  - Poorid 100 Å (tavaline) ja 300 Å (biomolekulid).

### Silikageeli tootmise etapid

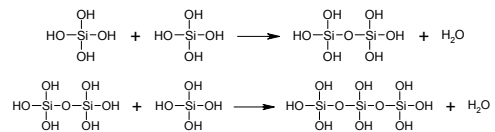
1. Naatriumsilikaadi tootmine liivast või kvartsist
2. Naatriumsilikaadist ränihappe saamine ja tekkiva hüdrogeeli muutmise kserogeeliks
3. Kserogeeli peenestamine ja osakeste sorteerimine

### Naatriumsilikaadi tootmine

- Liiv sulandatakse  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -ga  $700^\circ\text{C}$  juures  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3 + n\text{SiO}_2 = \text{Na}_2\text{O} \cdot n\text{SiO}_2 + \text{CO}_2$
- Tekkinud naatriumsilikaat lahustatakse vees

### Ränihappe saamine

- Happe lisamisel Na-silikaadile  
 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{HCl} = \text{Si}(\text{OH})_4 + 2\text{NaCl}$
- Tekkiv ränihape polümeeriseerub



### Ränihappe hüdrosool ja geel

- Polümerisatsiooni jätkudes tekivad mõneongströmilise läbimõõduga polümeeri mitsellid.
  - Kuni segu on vedel, nimetatakse seda hüdrosooliks
- Osakeste kasv jätkub kuni naabermitsellide pinnal olevate silanoolide ühinemiseni – lahus muutub geeliks
- Sademe vanandamisel muutub see hüdrogeeliks
- Hüdrogeeli kuumutamisel  $120^\circ\text{C}$  saadakse tugev amorfne mass - kserogeel

### Kserogeeli peenestamine ja fraktsioneerimine

- Kuulveskid
- Õhujoaveskid – suhteliselt kerakujulised osakesed
- Fraktsioneerimine toimub õhujoas vastavalt osakeste sedimentatsioonikiirusele

## Sfäärilise silikageeli tootmine

- Mitu varianti
  - Kolloidne neutraliseeritud silikaadi lahus pihustatakse väikesteks tilgakesteks, mis kuivatatakse kuuma õhu joas.
  - Ränihappe sool dispergeeritakse orgaanilises solvendis. Tilgad tahkuvad ja need filtreeritakse välja. Nende kuumutamisel saadakse kserogeel.

## Modifitseeritud silikageel

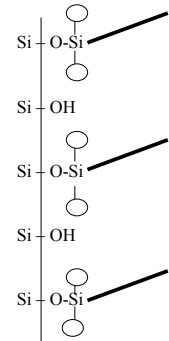
Statsionaarsed faasid ja kolonnid

## Modifitseeritud silikageelid

- Statsionaarseid faase pöördfaaskromatograafia (RP) jaoks valmistatakse kandja pinna modifitseerimise teel orgaaniliste ligandidega.
- $\equiv\text{Si-OH} + \text{Cl-Si}(\text{CH}_3)_2\text{R} \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}(\text{CH}_3)_2\text{R}$
- $\equiv\text{Si-OH} + \text{Cl}_3\text{SiR} \rightarrow \equiv\text{Si-O-SiCl}_2\text{R}$
- $\equiv\text{Si-OH} + (\text{EtO})_3\text{SiR} \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}(\text{OEt})\text{R}$

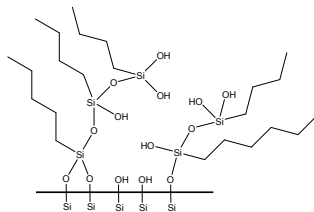
## Monomeerne pind

- Monokloroorganosilaani abil kaetud pind on monomeerne.
- See on kõige tavalisem viis RP faaside valmistamiseks nt ODS ehk  $\text{C}_{18}$  faasid.
  - faaside süntees on hästi reprodutseeritav.
  - sellised faasid on efektiivsed tänu kiirele difusioonile.



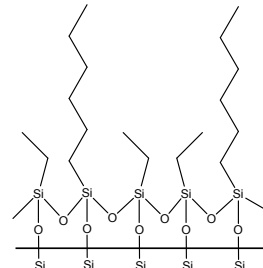
## Polümeerne pind

- Aluse pinna reageerimisel di- või trifunktsionaalse silaaniga saadakse polümeerne pind.
  - Vertikaalselt polümeerne – madala pH juures stabiilsem kui monomeerne, kuid raske reprodutseeruvalt toota.



## Polümeerne pind (2)

- Horizontaalselt polümeerne – stabiilne madala ja kõrge pH juures. Vähelevinud.



### Endcapping

- Suurem osa pinnal olevatest silanoolidest jääb reageerimata steriilise takistuse tõttu.
  - Trimetüülkloorsilaani korral reageerib 51% pinna silanoolidest.
  - Dimetüül-n-oktadetsüüli korral – 34%
- Aluse pinna täielikumaks silaniseerimiseks viiakse läbi *endcapping*, so aluse pinda töödeldakse mõne väikese silaaniga nt trimetüül-kloorsilaan.
- *Endcapping* vähendab silanoolide mõju lahutusele.

### Endcapping (2)

- Isegi pärast *endcapping*ut jääb suur osa silanoole alles.
- Väikesed rühmad hüdroliüsusuvad madala pH juures (pH < 3) kergesti ja muudavad sellega kolonni omadusi.

### Statsionaarsete faaside stabiilsus

- Pikema ahelaga täidised (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>) on stabiilsemad kui lühikesed.
- Silaani pinnale siduv Si-O-Si side katkeb kergemini kõrgemal temperatuuril, madala pH juures ja suure veesisaldusega mobiilse faasi korral.
  - Silaani sidet kaitstakse steriilselt isopropüülide või isobutüülide abil. Need aga vähendavad pinna kaetust statsionaarse faasiga.

### Statsionaarsete faaside stabiilsus (2)

- Kõrge pH juures (pH > 8...9) hakkab lagunema silikageelist kandja.
  - Kandjat kaitseb aluselise keskkonna eest *endcapping*, mis moodustab hüdrofoobse barjääri.
  - Fosfaat- ja karbonaatpuhvid on aluse suhtes agressiivsemad kui orgaanilised ja boraatpuhvid.
  - Kolonni temperatuur < 40°C kaitseb kandjat.

### Olulisemad modifitseeritud faasid

- C18 (oktadetsüül) – kõige enamkasutatavam.
- C8 (oktüül) – laialt kasutatav, eriti proteiinide jaoks.
- Fenüül (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) – nõrk vastasmõju polaarsete analüütidega, mõnevõrra spetsiifiline amino-ühendite suhtes.
- Tsüano (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>CN) – tavaline normaalfaas. Kasutatakse ka pöördfaaskromatograafias selliste segude korral, mis muude kolonnidega elueerusid laias retentsiooniahemikus.

### Kolonni valik (adsorbent)

- Alustada võiks C18-kolonnist.
- Ka C18-kolonne on tohtul hulgal!
  - Proovida kolonni, mis juba olemas.
  - Uurida kirjandust ja tootjate rakendusi (*application note*), helistada müügiesindajale.
  - Müüakse erinevate omadustega kolonnide komplekte (*method development kit*).

### Kolonna valik (pikkus)

- Lühema kolonniga:
  - retentsiooniaeg ( $t_R$ ) väheneb
  - mahtuvusfaktor ( $k'$ ) ei muutu
  - teoreetiliste taldrikute arv (N) väheneb
  - **lahutus ( $R_s$ ) väheneb**
  - rõhk (*backpressure*) väheneb
- Kokkuhoid lühema kolonniga:
  - kiirem lahutumine
  - väiksem eluendi kulu

### Kolonna valik (täidiseosakeste suurus)

- Väiksemad täidiseosakesed (*particle size*):
  - teoreetiliste taldrikute arv (N) suureneb
  - **lahutus ( $R_s$ ) suureneb**
  - rõhk suureneb
- Analüütilises kromatograafias on standardiks kujunenud 5  $\mu\text{m}$  läbimõõduga osakesed.
- Kiiremaks (säästlikumaks) analüüsiks kasutatakse üha enam 3  $\mu\text{m}$  läbimõõduga täidiseid, kuigi on kasutamisel kapriisemad (ummistuvad).

### Kolonna valik (läbimõõt)

- Eluendi voolukiirus erineva läbimõõduga kolonnides konstantse mahtuvusfaktori korral.

| Kolonn       | Kolonna ruumala | Voolukiirus |
|--------------|-----------------|-------------|
| 4.6 x 150 mm | 1.5 ml          | 1.0 ml/min  |
| 3.0 x 150 mm | 0.6 ml          | 0.4 ml/min  |
| 2.1 x 150 mm | 0.3 ml          | 0.2 ml/min  |

- Väiksema läbimõõduga kolonn:
  - aitab solvante kokku hoida
  - suurendab tundlikkust, kuna analüüt on kontseentreeritum
  - tundlikum kolonnivälise (*extra-column*) ruumala suhtes

### “Õige” kolonn

- Ideaalset kolonni ei ole.
- Jämedalt üldistades võib öelda:
  - suurem (pikem, jämedam, suurema täidisega) on kasutamisel robustsem, kuid võib raisata aega ja solvante
  - väiksem (lühem, peenem, peenema täidisega) annab hea lahutuse ja tundlikkuse kiiremini (ökonoomsem), kuid on kasutamisel delikaatsem ja nõudlikum aparatuuri suhtes.