

Vedelikkromatograafia ja massispektromeetria

LOKT.06.016 (4 AP)

2.03.2015

1

Ülevaade

- Vaadeldakse süvendatult analüütilise keemia seisukohalt **vedelikkromatograafiat ja massispektromeetria**
- Kursuse põhitähelepanu on praktilistel aspektidel
 - Rakendusnäited
- Kursusel antakse ülevaade:
 - Olulisematest kromatograafiaga seotud mudelist
 - Kromatograafide ja massispektromeetrite sõlmede ehitusest ja toimimisprintsipidest
 - Proovide ettevalmistusest ja sisestusmeetoditest
 - Kolonnide tüüpidest
 - Metoodikate väljatöötamisest ja valideerimisest

2.03.2015

2

Seos teiste analüütilise keemia kursustega

- Piisava aluse annab:
 - Analüütiline keemia I (LOKT.06.010)
- Kasuks tulevad ka:
 - Analüütiline keemia II (LOKT.06.013)
 - Spektroskoopilised analüüsimeetodid (LOKT.06.017)
 - Kvaliteet keemialaboris (LOKT.06.019)
 - Kromatograafia (LOKT.09.021)

2.03.2015

3

Kursuse info

- <http://tera.chem.ut.ee/~ivo/Chrom/>
- Õppejõud:
 - Ivo Leito, ivo.leito@ut.ee
 - Koit Herodes, koit.herodes@ut.ee
 - Anneli Kruve, anneli.kruve@ut.ee
 - Karin Kipper, karin.kipper@ut.ee
- Töövormid:
 - Loengud
 - Seminarid/arutelud
 - Iseseisev õppimine
 - Praktikum

2.03.2015

4

Töökorraldus

- Aineprogrammi ei läbita toodud järjestuses ja programmis on võimalikud muudatused
 - On võimalik, et mõni teema jääb iseseisvalt õppida
- Tulenevalt erinevate lektorite vabadest aegadest on võimalik teemade mõningane fragmenteeritus
- Infovahetus:
 - **Mis loengus/seminaris öeldud, see eeldatakse olema kõigil kuulnud**
 - **ÕIS-i kaudu e-mail: hoolitsege, et Teil oleks ÕIS-is töötav e-mail**

2.03.2015

5

Eksam

- Kursus lõpeb eksamiga
 - Kirjalik
 - Materjalide kasutamiseta
 - Eksamiküsimused täpsustuvad semestri lõpul vastavalt läbitud ja iseseisvaks õppimiseks antud teemadele
 - Võimalik, et tulevad ka probleemküsimused
 - Eksamile pääsemiseks peab olema läbitud praktikum ja esitatud selle kohta juhendaja poolt heaks kiidetud protokoll.

2.03.2015

6

Vedelikkromatograafia (LC)

- Eraldusmehanismid vedelikkromatograafias
 - Normaal- ja pöördfaaskromatograafia
 - Suuruseralduskromatograafia
 - Ioonkromatograafia
 - Afiinsuskromatograafia
- Statsionaarsed faasid ja kolonnid
- Aparatuur
 - Pumbad, detektorid
- Vedelik-kromatograafilise meetod
 - Väljatötamine ja optimeerimine
- Proovi ettevalmistus

2.03.2015

7

Massispektromeetria (MS)

- Massispektromeetrite ehitus
- Massianalüsaatorid
 - Ioonlöks, kvadрупool, lennuaja MS
- Ioonide detektorid
- Vaakum, selle saamine ja mõõtmine
- Ionisatsioonimeetodid
- MS ühendamine LC-ga: LC-MS
- Rakendused
 - Keemiline analüüs
 - Identifitseerimine
 - Struktuuranalüüs

2.03.2015

8

1.1 Kromatograafilise protsessi matemaatilised mudelid

- Miks on kromatograafilised piigid sageli asümmeetrilised?
- Miks on jaotuskromatograafia märksa populaarsem kui adsorptsioonkromatograafia?

2.03.2015

9

Kromatograafia matemaatiline modelleerimine

- Vaatleme kromatograafilise protsessi eri aspektide matemaatilist kirjeldamist
 - Komponenti (aine) **retentsiooniaeg**
 - Piigi **laius**
 - Piigi **kuju**

2.03.2015

10

Jaotus- ja adsorptsioonkromatograafia

- Jaotuskromatograafia:
 - Vedelik-vedelik-kromatograafia
 - **Jaotumine** kahe vedela faasi vahel
 - Gaas-vedelik-kromatograafia
 - **Jaotumine** vedeliku ja gaasi vahel

2.03.2015

11

Jaotus- ja adsorptsioonkromatograafia

- Adsorptsioonkromatograafia:
 - Vedelik-tahkis-kromatograafia
 - **Adsorptsioon** vedelikus tahkise pinnale
 - Gaas-tahkis-kromatograafia
 - **Adsorptsioon** gaasifaasist tahkise pinnale

2.03.2015

12

Jaotumine gaasilise ja vedela faasi vahel

- Jaotuskromatograafia
- Vedelik-gaas: **Henry seadus**

$$C_i = k_{H,i} \cdot P_i$$

- C_i aine i molaarne kontsentratsioon vedelikus
- P_i aine i partiaalarõhk gaasifaasis
- $k_{H,i}$ aine i Henry konstant
 - Sõltub ainest, vedelikust, temperatuurist

2.03.2015

13

Jaotumine kahe vedela faasi vahel

- Vedelik-vedelik: **Jaotusseadus**

$$K_{d,i} = \frac{C_i^{v2}}{C_i^{v1}} \quad C_i^{v2} = K_{d,i} \cdot C_i^{v1}$$

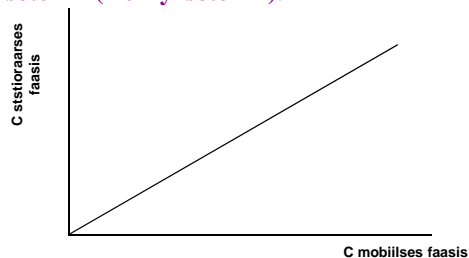
- C_i^{v1} aine i molaarne kontsentratsioon vedelikus 1
- C_i^{v2} aine i molaarne kontsentratsioon vedelikus 2
- $K_{d,i}$ aine i jaotuskoefitsient
 - $K_{d,i}$ Sõltub ainest, vedelikest, vähemal määral temperatuurist

2.03.2015

14

Lineaarne sõltuvus

- Mõlemad seaduspärasused annavad samasuguse lineaarse sõltuvuse - **lineaarse sorptsiooni-isotermi (Henry isotermi)**:



2.03.2015

15

Lineaarne kromatograafia

- Kromatograafia mudelit, kus analüüdi molekulide jaotumist faaside vahel kirjeldab lineaarne sõltuvus nimetatakse **lineaarseks kromatograafiaks**
- Kui võimalik, siis on kasulik töötada lineaarse kromatograafia tingimustes
 - See on märksa lihtsam saavutada jaotuskromatograafias kui adsorptsioonikromatograafias

2.03.2015

16

Kehtivustingimused

- Nii statsionaarne kui ka mobiilne faas on **homogeensed**
 - Puudub võimalus, et erinevad aine i molekulid saavad emmas kummas faasis erineva intensiivsusega kinni hoitud
- Nii statsionaarse kui ka mobiilse faasi maht on **väga palju suuremad** võrreldes aine i hulgaga
 - Aine i molekulid ei ole omavahel vastasmõjus ja ei konkureeri
- Reaalsuses on need tingimused täidetud vaid osaliselt

2.03.2015

17

Jaotusseadus kromatograafias

- Vedelik-vedelik-kromatograafias:

$$K_{d,i} = \frac{C_i^{stats}}{C_i^{mob}}$$

- C_i^{stats} aine i kontsentratsioon stats faasis
- C_i^{mob} aine i kontsentratsioon mob faasis
- $K_{d,i}$ aine i jaotuskoefitsient
 - Sõltub ainest, vedelikest, vähemal määral temperatuurist

2.03.2015

18

Jaotusseadus kromatograafias

- teisendades:

$$K_{d,i} = \frac{\frac{n_i^{stats}}{V^{stats}}}{\frac{n_i^{mob}}{V^{mob}}}$$

- n_i^{stats} aine i moolide hulk stats faasis
- n_i^{mob} aine i moolide hulk mob faasis
- V^{stats} stats faasi ruumala
- V^{mob} mob faasi ruumala

2.03.2015

19

Mahtuvusfaktor

- teisendades:

$$K_{d,i} \cdot \frac{V^{stats}}{V^{mob}} = \frac{n_i^{stats}}{n_i^{mob}} = k'_i$$

- k'_i aine i mahtuvusfaktor
 - Sõltub aineist, jaotuskoeffitsiendist ning faaside ruumaladest

2.03.2015

20

Mahtuvusfaktor

- kuna:

$$k'_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M}$$

- siis:

$$K_{d,i} \cdot \frac{V^{stats}}{V^{mob}} = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M}$$

- $t_{R,i}$ aine i retentsiooniaeg
- t_M süsteemi surnud aeg

2.03.2015

21

Aine i retentsiooniaeg

- teisendades:

$$t_{R,i} = t_M \cdot \left(K_{d,i} \cdot \frac{V^{stats}}{V^{mob}} + 1 \right)$$

- **Elueerumise põhivõrrand**
- Aine i elueerub seda aeglasemalt,
 - mida aeglasem on eluendi vool (t_M)
 - mida pikem on kolonn
 - mida rohkem on jaotustasakaal nihutatud statsionaarse faasi poole
 - mida suurem on statsionaarse faasi ruumala
 - mida madalam on mobiilse faasi ruumala

2.03.2015

22

Piigi laius

- Piigid elueerumisel laienevad
- Seda kirjeldab van Deemter'i võrrand

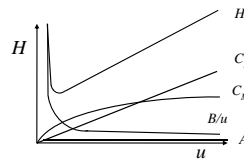
2.03.2015

23

van Deemteri võrrand

$$H = A + B/u + C_S u + C_M u$$

- H – teoreetilise taldriku kõrgus (HETP)
- u – eluendi lineaarne voolukiirus
- A – eddy difusioon (mitu vooluteed)
- B – pikisuunalise difusiooni koeffitsient
- C_S, C_M – massiülekanne koeffitsient statsionaarses ja mobiilises faasis



2.03.2015

24

Täidiseosakeste suuruse ühtluse koefitsient

Täidiseosakeste keskmine diameeter

Mahtuvusfaktori funktsioonid

Statsionaarse faasi kihi paksus täidiseosakeste peal

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{f_S(k')d_f^2}{D_S}u + \frac{f_M(k')d_p^2}{D_M}u$$

Täidise takistus difusioonile

Analüüdi difusiooni-koefitsient mobiilses faasis

Difusiooni-koefitsient stats faasis

5

2.03.2015

Mida veel saab järeldada van Deemter'i võrrandist?

- Kuidas mõjutab efektiivsust
 - stats faasi osakeste kuju?
 - stats faasi osakeste suurus?
 - mobiilfaasi viskoossus?
 - lahutatavate molekulide suurus?
- Kolonni temperatuur?

2.03.2015

26

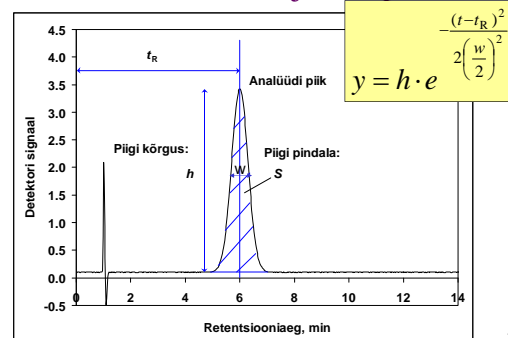
Piigi kuju

- Kui
 - Sorptsiooniisoterm on lineaarne (nn Henry isoterm)
 - Piigi laienemise faktoreid on palju
 - Need faktorid toimivad mõlemas suunas, nii pikivoolu kui ka vastuvoolu
 - Need faktorid mõjutavad kõiki analüüdimolekule võrdselt tõenäosusega, tegemata vahet piigi eri osades olevatel molekulidel
- Siis on piik **Gaussi kõvera** kujuline
 - St piigi laienemine allub Gaussi- ehk Normaalkaotusele

27

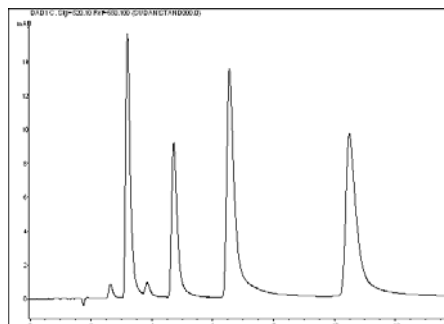
2.03.2015

Gaussi kõvera kujuline piik

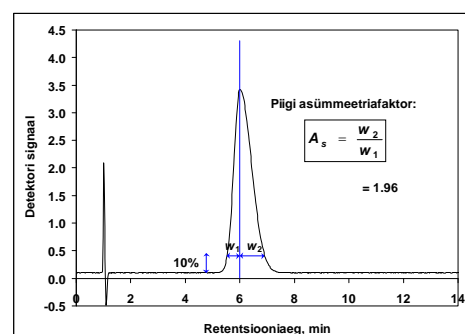


Piigid enamasti ei ole sümmeetrilised

- Enamasti on piikidel **“sabad taga”**



Asümmeetriafaktor



Parameetrite optimaalsed väärtused

- Sabatamine (*tailing*) on probleemne
 - väheneb lahutusvõime
 - Halveneb avastamispiir
- Asümmeetriafaktor:
 - Normaalseteks väärtusteks loetakse: $A_s < 2$

2.03.2015

31

Mittelineaarne sorptsiooniisoterm

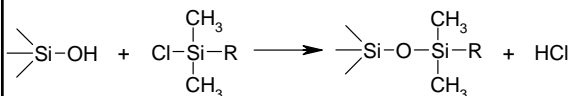
- Ka jaotuskromatograafias on sorptsiooniisoterm sageli mittelineaarne
- Tavalisim põhjus Vedelik-vedelik-kromatograafias pöördfaasi korral:
 - **Adsorptsioon**
- Adsorptsioon toimub
 - Jääk-silanoolrühmadel
 - Silikageelis lisandina olevatel metallikatioonidel

2.03.2015

32

Adsorptsioonitsentrid LC-s

- Enamus stats faase on silikageeli baasil
- **Silanoolrühmad**
- Need pöördfaasi tootmisel derivatiseeritakse:



- Mida täielikum see derivatiseerimine on, seda parem
- Mingi osa jääb alati derivatiseerimata: **jääk-silanool-rühmad**

2.03.2015

33

Mida teha, kui piigid sabatavad?

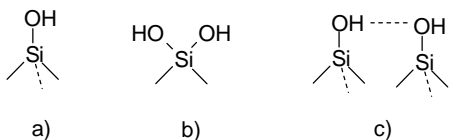
- *End-capping*
 - Lisatakse peale Cl-Si(CH₃)₂-R veel mõnd väiksema molekuliga reagenti
- *Shielding*
 - Cl-Si(CH₃)₂-R asemel kasutatakse nt Cl-Si(t-Bu)₂-R

2.03.2015

34

Silanoolrühmad

- Silanoolrühmi on kolme tüüpi (lihtsustatult):



- Domineerivad a ja c
- Jääk-silanoolrühm on seda tugevamate adsorptsiooniomadustega, mida **happelisem** ta on
 - a-tüüpi: pK_a ca 5 (ca 20%)
 - c-tüüpi: pK_a 8-9 (ca 80%)

2.03.2015

35

Metalli-katioonid

- Eriti adsorbeerivaks muudavad silanoolrühma metallide lisandid
- Need võivad olla
 - vabana (d) või
 - Võres sees (e)
 - Tänu oma valents-omadustele on metalli-aatomid silikageeli võres enamasti + laenguga: metalli-katioonid



2.03.2015

36

Adsorptsiooni sõltuvus ainest

- Selline aktiivsetel tsentritel adsorptsioon mõjutab eeskätt
 - Polaarseid ühendeid
 - Iseäranis aluseliste omadustega ühendeid
 - Vedelik-kromatograafias lisatakse sageli eluendile mõnda alust, mis ise adsorptsioonitsentrite külge kinnitub ja seega analüüdimolekule sealt eemale hoiab
 - Samuti selliseid, mis annavad tugevaid metallikomplekse

2.03.2015

37

Füüsikaline taust?

- Paralleelselt toimuvad kaks sorptsiooniprotsessi:
 - **1. Jaotumine**
 - Faaside mahud on suured
 - Kõik analüüdi molekulid “mahuvad” stats faasi külge
 - Isoterm on lineaarne
 - **2. Adsorptsioon**
 - Adsorptsioonitsentreid on vähe
 - Neid jätkub vaid väga väikesele osale analüüdimolekulidest
 - Kinnihoidmine adsorptsiooniga on märksa tugevam, kui jaotumise kaudu

2.03.2015

38

Adsorptsioon

- Eeldused (1):
 - Molekulide adsorptsioon toimub vaid **tsentritel**
 - **Monomolekulaarne** adsorptsioon
 - Molekulid üksteist ei mõjuta
 - Tsentreid on piiratud hulgal
 - Kõik tsentrid on **energeetiliselt võrdväärsed**

2.03.2015

39

Adsorptsioon

- Eeldused (2):
 - Paralleelselt toimub kaks protsessi: **adsorptsioon** ja **desorptsioon**
 - Nende omavaheline vahekord paneb paika **adsorptsioonitasakaalu**
 - Adsorptsiooniprotsessi kiirus on võrdeline vabade tsentrite hulgaga ja adsorbeerumata molekulide hulgaga vedelfaasis
 - Desorptsiooniprotsessi kiirus on võrdeline hõivatud tsentrite hulgaga

2.03.2015

40

Adsorptsiooni kiirus

- $$v_{\text{ads}} = k_i^{\text{ads}} \cdot C_i^{\text{mob}} \cdot (C_i^{\text{ads_max}} - C_i^{\text{ads}})$$
- Adsorptsiooni kiirus
 - Adsorptsiooniprotsessi kiiruskonstant
 - Molekulide kontsentratsioon mobiilses faasis
 - Molekulide maksimaalne pindkontsentratsioon
 - Molekulide pindkontsentratsioon
- Pinna täitumisaste:
$$\theta = \frac{C^{\text{ads}}}{C^{\text{ads_max}}}$$

2.03.2015

41

Desorptsiooni kiirus

- $$v_{\text{des}} = k_i^{\text{des}} \cdot C_i^{\text{ads}}$$
- Desorptsiooni kiirus
 - Desorptsiooni kiiruskonstant
 - Molekulide pindkontsentratsioon

2.03.2015

42

Tasakaal

- Tasakaal esineb, kui

$$v_{\text{ads}} = v_{\text{des}}$$

- Seega:

$$k_i^{\text{ads}} \cdot C_i^{\text{mob}} \cdot (C_i^{\text{ads_max}} - C_i^{\text{ads}}) - k_i^{\text{des}} \cdot C_i^{\text{ads}} = 0$$

2.03.2015

43

Kontsentratsioon pinnal

- Teisendades:

$$C_i^{\text{ads}} = C_i^{\text{ads_max}} \frac{k_i^{\text{ads}} \cdot C_i^{\text{mob}}}{k_i^{\text{ads}} \cdot C_i^{\text{mob}} + k_i^{\text{des}}}$$

- Asendades adsorptsiooni tasakaalukonstandi:

$$K_i^{\text{ads}} = \frac{k_i^{\text{ads}}}{k_i^{\text{des}}}$$

2.03.2015

44

Langmuir'i isoterm

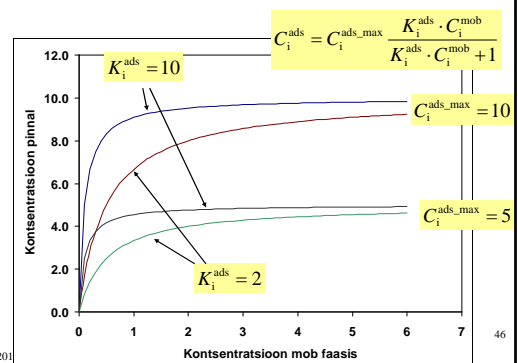
- ... Saame **Langmuir'i** isotermi:

$$C_i^{\text{ads}} = C_i^{\text{ads_max}} \frac{K_i^{\text{ads}} \cdot C_i^{\text{mob}}}{K_i^{\text{ads}} \cdot C_i^{\text{mob}} + 1}$$

2.03.2015

45

Langmuir'i isotermi kuju



2.03.2015

46

Langmuir'i isotermi kuju

- Kui tsentrite arv on mobiilses faasis olevate molekulide arvuga võrreldes väga suur, siis on kuju enam vähem **Henry isotermi kujuga**
- Kui tsentrite arv on väga väike võrreldes mobiilses faasis olevate molekulide arvuga, siis on enam vähem **kõik adsorptsioonitsentrid täidetud**

2.03.2015

47

Langmuir'i mudeli puudused

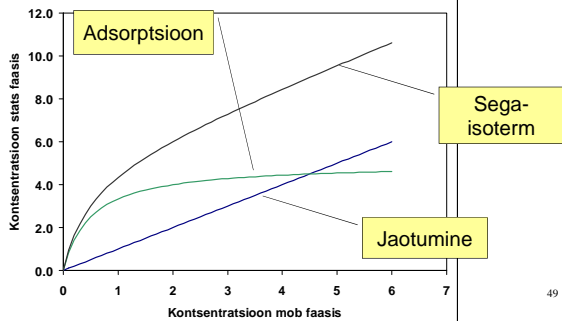
- Adsorptsioonitsentrid pole energiaetiliselt samaväärsed
- Molekulid mõjutavad üksteist
- Adsorptsioon toimub ka juba adsorbeerunud molekulidel – st ei kehti monomolekulaarne adsorptsioon

2.03.2015

48

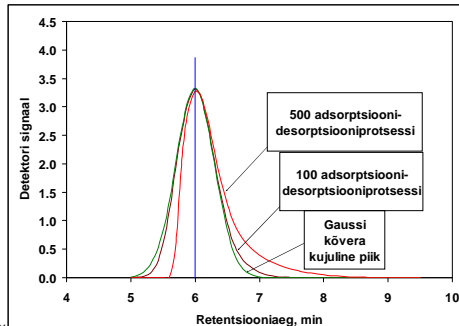
Sorptsiooni-isotermi kuju

- Tekib segaisoterm, mis on **mittelineaarne**:



49

Piigi kuju mittelinearse sorptsiooniisotermi korral



2.03.2011

50

Järeldused

- On hea, kui kromatograafiline protsess on puhtalt jaotuskromatograafiline, **linearse sorptsiooniisotermiga**
 - Piigid on sümmeetrilised
 - Selleks peavad adsorptsioonitsentrid **puuduma** või olema **kõik täidetud**

Mobiilsele faasile võib lisada mõnda **ainet, mis adsorbeerub eriti tugevasti** ja ei lase analüüdimolekulidel adsorbeeruda

Statsionaarne faas, peab olema väga kvaliteetne, **jääksilanoole peab olema vähe** ja nende happelisus madal:
- *endcapping*
- happega pesemine

53

2.03.2015

Järeldused

- Adsorptsioonkromatograafia puhul on oluline, et saaks töötada adsorptsiooniisotermi "Henry alas":
 - Eripind suur
 - Pinnal oleks palju adsorptsioonitsentreid
 - Et need oleksid energeetiliselt sarnased
 - Ka sellest alati ei piisa, sest Henry ala esinemine eeldab Langmuir'i isotermi, aga reaalsuses see päris ei kehti
- Seda on raske saavutada ja seega on **adsorptsioonkromatograafias sabatamine sagedane**
- See on ka üks põhjusi, mis jaotuskromatograafia on märksa populaarsem kui adsorptsioonkromatograafia

2.03.2015

52

Järeldused

- **Sabatavad rohkem nende ainete piigid, mis rohkem adsorbeeruvad**
 - Eeskätt polarsed ühendid
 - Iseäranis aluseliste omadustega ühendid
 - Nendega on gaasikromatograafias just selle tõttu probleemid, sageli ei saadagi mõistlikke piike
 - Vedelik-kromatograafias lisatakse sageli eluendile mõnda alust, mis ise adsorptsioonitsentrite külge kinnitub ja seega analüüdimolekule sealt eemale hoiab
 - Samuti sellised, mis annavad tugevaid metallikomplekse

53

2.03.2015

Palju adsorptsioonimudeleid

- **Freundlich'i isoterm**
 - Monomolekulaarne adsorptsioon
 - tsentrid pole mitte energeetiliselt samaväärsed
 - Tsentrite aktiivsus (ja seega ka adsorptsioonientalpia) langeb logaritmiliselt pinnatäitumisastme kasvades
- **Tjorkini isoterm**
 - Analooone, ainult et aktiivsuse langus on lineaarne
- **BET isoterm**
 - Polümolekulaarne adsorptsioon

2.03.2015

54

Piigi kuju empiirilised mudelid

- On pakutud ca **90 erinevat empiirilist avaldist** piikide kuju kirjeldamiseks
 - Praktiliselt kõik nad võimaldavad kirjeldada asümmeetrilisi piike.
 - Mõned võimaldavad kirjeldada ka mitmetipulisi
- Kõik nad töötavad mingites piirides, kuid päris ideaalsed pole nad ükski

55

V.B. Di Marco, G.G. Bombi *J. Chrom. A* 2001, 931, 1-30

Empiiriliste funktsioonide rakendused

- Sügavam mõistmine
- Piikide dekonvolutsioon
- Kromatograafilised simulatsioonid

56

2.03.2015