

Vedelikkromatograafia (LC)

26.11.2019

1

LC areng

- Algselt viidi LC lahutus läbi kuni 5 m pikkusteks klaaskolonnides (läbimõõt 1-5 cm).
- Täidiseosakeste suurus oli 0,1-0,2 mm.
- Vedelik voolas raskusjõu mõjul.
- Väiksemate täidiseosakeste puhul oleks raskusjõu mõjul voolamine liiga aeglane.
- Vaja kasutada kõrgsurvepumpa ...

26.11.2019

2

HPLC

- Kõrgsurvepumbaga LC süsteemi tõi esimesena turule Hewlett-Packard 1960-tel.
- **HPLC – High Performance Liquid Chromatography**

26.11.2019

3

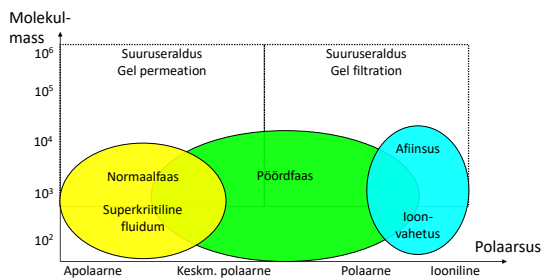
LC liigid

- Jaotuskrom. või vedelik-vedelik krom.
 - Normaalfaas (NP)
 - Pöördfaas (RP)
- Adsorptsioonkrom. või vedelik-tahkis krom.
- Ioonvahetuskrom.
- Suuruseralduskrom.
- ...

26.11.2019

4

LC liigid



26.11.2019

5

Jaotuskromatograafia

- Analüüsitava aine liikumine statsionaarse ja mobiilse faasi vahel võib olla kirjeldatav **jaotusprotsessina** või adsorptsioonina.
 - **Jaotustasakaalu korral saadakse sümmeetrilised piigid** – eelistatud.
- Nii NP- kui RP-LC statsionaarsed faasid toetavad jaotusprotsesse.
 - Stats. faas: tahke kandja pinnale kovalentselt seotud orgaanilised ühendid või adsorbeerunud vedelik.
 - Domineerivad kovalentselt seotud faasid – stabiilsemad ja sobivad gradientlueerimiseks.

26.11.2019

6

Normaalfaas (NP) jaotuskrom.

- **Stats. faas polaarne**
 - Nt. tsüano, amino, diool, (vesi, trietüleenglükool)
- **Mobiilne faas mittepolaarne**
 - Nt. heksaan, iso-propüüleeter
- Esimesena elueerub kõige vähempolaarne komponent
- Mobiilfaasi polaarsuse suurendamine vähendab retentsiooni

26.11.2019

7

Pöördfaas (RP) jaotuskrom.

- **Stats. faas mittepolaarne**
 - Nt. süsivesinikahelad (**C18**, C8) silikageeli pinnal
- **Mobiilne faas polaarne**
 - Nt. vesi segus metanooli või atsetonitriiliga
- Esimesena elueerub kõige polarsem komponent.
 - **pH-l on oluline mõju happeliste ja aluseliste analüütide retentsioonile.**
- Mobiilfaasi polaarsuse suurendamine suurendab retentsiooni

26.11.2019

8

Interaktsioonid jaotuskromatograafias

- Arvestada tuleb analüüdi, statsionaarse ja mobiilse faasi omavahelisi vastasmõjusid.

Vastasmõju	NP (jaotus-, adsorptsioonkrom.)	RP (jaotuskrom)
Analüüt – mobiilfaas	~Nõrk	Tugev
Analüüt – stats. faas	Tugev	Nõrk
Mobiilfaas – stats. faas	~Tugev	~Nõrk
Mobiilfaas – mobiilfaas	Nõrk	Tugev

26.11.2019

9

Adsorptsioonkromatograafia

- **Stats. faas on tahkise pind (polaarne)**
 - Nt. silikageel või alumiiniumoksiid
- **Mobiilne faas**
 - Orgaaniline solvent
- Mida suurem on analüüdi polaarsus, seda pikem on retentsiooniaeg.
- Retentsiooni aluseks on analüüdi ja eluendi molekulide **konkureeriv adsorptsioon-desorptsioon.**

26.11.2019

10

Ioonvahetuskromatograafia

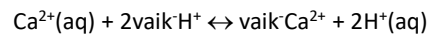
- **Stats. faas on ioonvaheti (ioonvahetusvaik)**
 - Nt. polüstüreeni pinnal sulfoonhape (RSO_3H), karboksüülhape (RCOOH), kvaternaarne amiin [$\text{RN}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$], sekundaarne amiin
- **Mobiilne faas**
 - Katioonide – mineraalhapete lahused
 - Anioonide – aluste ja karbonaatide lahused
- Lahutumise aluseks on **iooni laeng ja hüdrateeritudiooni suurus.**

26.11.2019

11

Ioonvahetustasakaal

- Nt Ca^{2+} korral



- Mida enam on tasakaal nihutatud paremale, seda pikem on Ca^{2+} retentsioon.

26.11.2019

12

Ioovahetuskrom. detektor

- Kõige levinum on juhtivusdetektor.
- Eluendi kõrge juhtivuse kõrvaldamiseks kasutatakse supressorkolonne.
 - Nt. kationide lahutamisel eluendiks HCl. Kui analüütilise kolonni järele ühendada anioonvahetuskolonn, siis Cl^- asendatakse OH^- -ga ja eluendis: $\text{H}^+ + \text{OH}^- = \text{H}_2\text{O}$
- Supressorkolonne tuleb regenererida; uuemaid regenereritakse pidevalt.

26.11.2019

13

Suuruseralduskromatograafia

- Stats. faas on silikageeli või polümeeri osakesed ($10\ \mu\text{m}$), milles ühtlase suurusjaotusega poorid.
- Mobiilne faas
 - Vesi (polaarne stats. faas) – geelfiltratsioon
 - Mittepolaarne orgaaniline sovent (mittepolaarne stats. faas) – geel-läbivus
- Lahutamise aluseks on molekuli suurus.

26.11.2019

14

Suuruseralduskromatograafia

- Läbi kolonni liikumisel ...
 - Mingist piirist suuremad molekulid ei mahu pooridesse ja elueeruvad kiiresti
 - Mingist piirist väiksemad molekulid, läbivad kõiki poore ja elueeruvad aeglaselt
 - Vahepealse suuruse korral ... mida väiksem molekul, seda rohkematesse pooridesse see difundeerub – lahutumine suuruse alusel.
- Puudub interaktsioon analüüdi ja statsionaarse faasi vahel

26.11.2019

15

Kasutamine

- Pöördfaaskromatograafia (RP)
 - Kõige enamkasutatavam (>75%).
 - Esimene valik – seda proovitakse ~ kõige jaoks, kuid töötab tavaliselt keskmise kuni kõrge polaarusega analüütide korral.
- Normaalfaaskromatograafia (NP; jaotuskrom.)
 - Vähesed spetsiifilised kasutusalaad, kui pöördfaaskromatograafia ei sobi.
 - Väga hüdrofoobsed analüüdid lahutuvad paremini.
 - Sobib madala kuni keskmise polaarusega analüütidele.
- Valiku puhul võib otsustavaks saada lahustuvus.

26.11.2019

16

Kasutamine

- Adsorptsioonkromatograafia
 - Spetsiifilised rakendused.
 - Isomeeride lahutamiseks, ainegruppide eraldamiseks funktsionaalrühma järgi.
- Ioovahetuskromatograafia
 - Anioonide lahutamiseks.
 - Metallikationide lahutamiseks, kuid see on loovutamas kohta spektroskoopilistele meetoditele.

26.11.2019

17

Kasutamine

- Suuruseralduskromatograafia
 - Proovide ettevalmistusel järgnevat (pöördfaaskromatograafiliseks) analüüsiks.
 - Makromolekulide molekulmassi määramiseks.
 - Makromolekulide suurusjaotuse määramiseks.

26.11.2019

18