

Kromatograafia

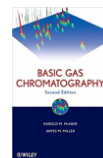
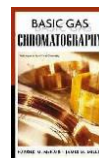
Mitmekesine grupp väga võimsaid meetodeid segude lahutamiseks ja analüüsiks

11.11.2019

1

Kromatograafia Tartus

- Kromatograafia rajaja Mihhail Tsvett töötas 1917-1918. a TÜ Botaanikaaias.
 - Seal on avatud mälestustahvel.
- Ühe olulisima GC raamatu autor Harold McNair pidas TÜ-s seminari 2007.



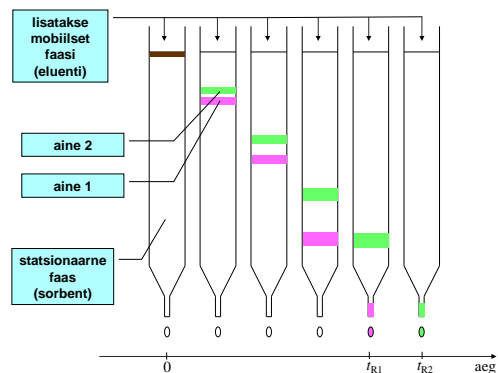
Kromatograafia põhimõte

- Kromatograafia on meetodite grupp **segude komponentide eraldamiseks üksteisest**.
 - Komponentide eraldamise aluseks on nende erinevad **adsorptsiooni-** või **jaotusomadused**.
- Analüütilised kromatograafid mitte ainult ei eralda aineid, vaid ka **detekteerivad** neid. Võimaldavad nii kvalitatiivset kui kvantitatiivset analüüsi.
- Kromatograafia on tõenäoliselt kõige võimsam segude lahutamise ja analüüsimise meetod.
 - Väga sageli kasutusel liitmeetodites parema selektiivsuse saavutamiseks

11.11.2019

3

Kromatograafia põhimõte



11.11.2019

4

Kromatograafia põhimõte

- Ained, mis viibivad rohkem statsionaarses faasis, liiguvad kolonnis aeglasemalt edasi (joonisel aine 2).
 - Retentsiooniaeg on pikem.
- Ained, mis viibivad suurema osa ajast mobiilses faasis, pidurdavad kolonnis vähem ja väljuvad seetõttu kolonnist varem (joonisel aine 1).
 - Retentsiooniaeg on lühem.

11.11.2019

5

Kromatogramm

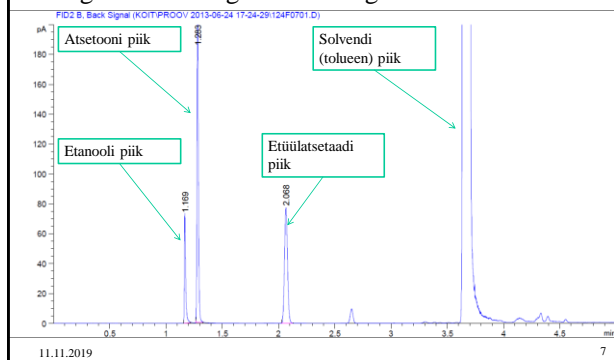
- Kui kolonnile järgneb **detektor**, siis selle signaali muutus ajas moodustab **kromatogrammi**.
- Igale ainele vastab maksimum – piik (i.k. *peak*).
- Õnnestunud kromatografeerimise korral on kõikide analüütide piigid üksteisest lahus.
- **Piikide lahutuse saavutamine** ongi sageli üks põhilisi probleeme kromatograafia juures.

11.11.2019

6

Näidiskromatogramm

- Org. solventide gaaskromatograafiline lahutamine



Mõisteid

Mõiste	Tähis	Selgitus
Statsionaarne faas e. sorbent e. täidis		Kromatograafia kolonnis paiknev aine, milles kolonnist läbi liikuvad molekulid adsorbeeruvad-desorbeeruvad või adsorbeeruvad-desorbeeruvad.
Mobiilne faas		Vedelik (eluent) või gaas (kandegaas), mis läbi kolonni voolates uuritavaid aineid edasi kannab.
Retentsiooniaeg	t_R	Aeg, mis kulub aine sisestamisest tema piigi maksimumi väljumiseni kromatogrammil.
Holdup time (Surunud aeg)	t_M	Sellise aine retentsiooniaeg, mis statsionaarse faasiga üldse ei seondu ja tuleb kolonnist läbi sama kiiresti kui eluent.
Efektiivsus	N, H	Kromatograafilise protsessi omadus hoida piike kitsastena.
Selektiivsus	α, R_S	Kromatograafilise protsessi omadus eraldada ained üksteisest.

11.11.2019

8

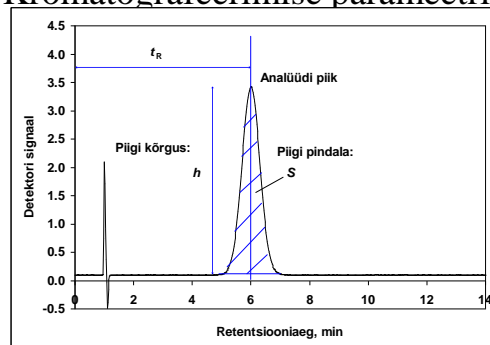
Kromatograafia meetodid

- Mobiilse faasi järgi:
 - Vedelik-kromatograafia
 - Gaasikromatograafia
- Vastasmõju järgi
 - adsorptsioonkromatograafia
 - jaotuskromatograafia
 - ioonkromatograafia
 - ...
- Tehnilise teostuse järgi
 - kolonnkromatograafia
 - planaarkromatograafia

11.11.2019

9

Kromatograferimise parameetrid



11.11.2019

10

Info kromatogrammilt

- Retentsiooniaeg iseloomustab uuritavat ainet.
 - Kindla aine jaoks on samade kromatograferimise tingimuste juures retentsiooniaeg sama.
 - Kvalitatiivne info.**
- Piigi kõrgus ja pindala sõltuvad aine kogusest.
 - Kvantitatiivne info.**

11.11.2019

11

Kvalitatiivne analüüs

- Enamasti kromatograafia detektorid aineid identifitseerida ei võimalda.
 - Ained identifitseeritakse retentsioonaja (t_R) järgi.
 - t_R peab olema sama, mis samadel tingimustel analüüsitud tunnusainel.**
- Detektorid, mis annavad aine identifitseerimiseks sobivat infot:
 - Massispektromeeter (MS).
 - [Diodrividetektor (DAD ehk PDA)]

11.11.2019

12

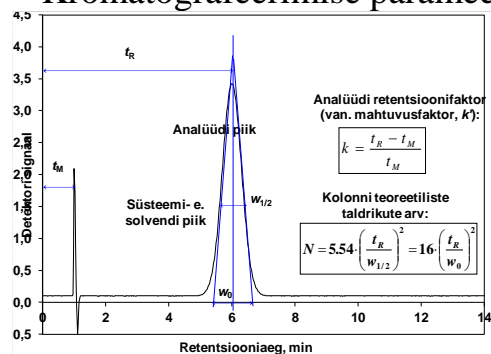
Kvantitatiivne analüüs

- Kvantitatiivne analüüs käib üldiselt kalibreerimisgraafiku meetodil
- Kasutada võib:
 - Piigi pindala.
 - Piigi kõrgust.
- Enamiku detektorite puhul on piigi pindala võrdelises sõltuvuses aine kontsentratsioonist, sellistel juhtudel on kalibrimisgraafik sirge ja läbib punkti 0, 0.

11.11.2019

13

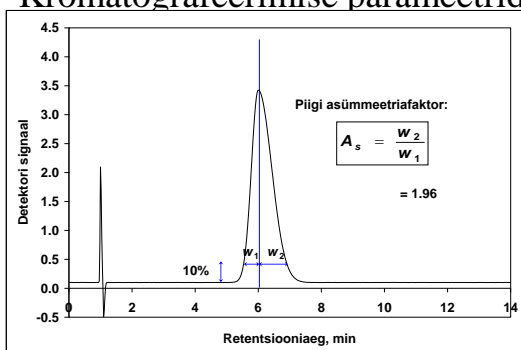
Kromatograferimise parameetrid



11.11.2019

14

Kromatograferimise parameetrid



11.11.2019

15

Kromatograferimise parameetrid

- Parameetrid t_R , k' , $w_{1/2}$, A_s ja N on leitavad iga piigi jaoks
- Kõigi nende parameetrite abil saab:
 - Hinnata lahutuse headust
 - Hinnata süsteemi korrasolekut ja määrata, millal on vaja midagi hooldada või välja vahetada

11.11.2019

16

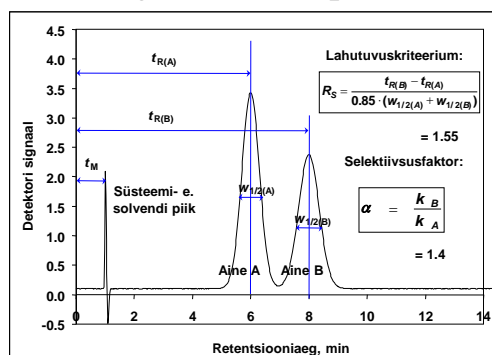
Parameetrite väärtused

- Mahtuvusfaktor:
 - mõistlik: $1 < k' < 20$
 - väga hea: $2 < k' < 10$
- Mõistlikud teoreetiliste taldrikute arvud:
 - Vedelik-kromatograafias: $N = 10\,000 \dots 20\,000$
 - Gaasikromatograafias: $N = 50\,000 \dots 120\,000$
- Asümmeetriafaktor:
 - Normaalselt väärtusteks loetakse: $A_s < 2$

11.11.2019

17

Kromatograferimise parameetrid



11.11.2019

18

Kromatografeerimise parameetrid

- Parameetrid α ja R_s on leitavad kahe piigi jaoks
- Ka nende parameetrite abil saab:
 - Hinnata lahutuse headust
 - Hinnata süsteemi korrasolekut ja määrata, millal on vaja midagi hooldada või välja vahetada

11.11.2019

19

Parameetrite optimaalsed väärtused

- Lahutuskriteerium:
 - piigid loetakse lahutunuks, kui: $R_s > 1.5$
 - „Ohutu“ on, kui: $R_s = 1.7 \dots 2.0$
- Selektiivsusfaktor ei ole nii hea, kui lahutuskriteerium, kuna ta ei võta arvesse piikide laiust

11.11.2019

20

Gaasikromatograafia

Praktiliselt võimsaim meetod
lenduvate (orgaaniliste) ainete
määramiseks keerulistest segudest

11.11.2019

21

Gaasikromatograafia (GC)

- Ained eraldatakse nende erineva **lenduvuse** järgi (selle järgi, kuidas nad jaotuvad gaasifaasi ja sorbendi faasi vahel)
- Kolonnist läbi kantakse ained gaasivoolus. Seda gaasi nimetatakse **kandegaasiks**
- Üldiselt: mida lendavam aine, seda lühem retentsiooniaeg
- Lenduvuse nõue seab meetodile piirangud: mitte kõiki aineid ei saa gaasikromatograafiliselt analüüsida

11.11.2019

22

Gaasikromatograafia tehniline teostus

- Temperatuuri kontroll on väga oluline
- Gaasikromatograafia toimub üldiselt kõrgel temperatuuril
- Temperatuuri ei hoita kromatografeerimise käigus enamasti konstantsena vaid muudetakse etteantud programmi - **temperatuuriprogrammi** - järgi
- Analüüsitavaite ainete hulk on piiratud
 - Peavad olema lenduvad
 - Peavad olema kõrge temperatuuri suhtes püsivad

11.11.2019

23

Nõuded kandegaasile

- Kandegaas peab olema inertne (üldiselt lämmastik või heelium, järjest sagedamini vesinik)
- Kandegaasi puhtus on väga oluline
 - Kandegaas peab olema hapnikuvaba, vastasel korral hakkab ta oksüdeerima statsionaarset faasi ja analüüsitavaid aineid
 - Kandegaas peab olema niiskusevaba
 - Kandegaasi puhastamiseks hapnikust ja niiskusest kasutatakse mitmesuguseid puhastuspadruneid

11.11.2019

24

Proovi sisestamine

- Proovi sisestamine toimub spetsiaalse pordi injektori e. **aurusti** kaudu
 - On olemas ka küllalt keerulisi proovisisestamise süsteeme (PTV jne)
- Proovi lahust süstitakse mikrosüstlaga suurusjärgus mõni mikroliiter.
 - Ka sellest väga väikesest kogusest juhitakse suurem osa kolonnist mööda – joajagamine (*split*).
- Head reprodutseeruvust on raske saavutada.
 - Seetõttu kasutatakse gaasikromatograafias kvantiseerimiseks enamasti sisestandardi meetodit

11.11.2019

25

Kolonnid gaasikromatograafias

- On olemas **täidis**-ja **kapillaarkolonnid**
- Praegusel ajal põhiliselt kapillaarkolonnid
- See on kvartsist kapillaartoru
 - pikkus 20 - 50 m (tavalisim 30 m)
 - sisediameeter enamasti 0.2 .. 0.6 mm
- Statsionaarne faas on kantud kapillaari sisesinale
- statsionaarsed faasid on põhiliselt kõrgmolekulaarsed vedelikud

11.11.2019

26

Kapillaarkolonnid

- Eelised
 - Väga hea lahutusvõime
 - Väga madal foon (foon on tingitud eeskätt statsionaarse faasi kolonnist välja uhtumisest)
- Puudused
 - Kapillaarkolonnid on väga õrnad (neid masinasse installeerides ei tohi liiga kõvasti kinni keerata)
 - Kapillaarkolonnid ei maksa väga suurt proovikogust sisestada - oht kolonni üle koormata
 - Kapillaarkolonnid ei tohi kõrge veesisaldusega proovi süstida
 - Kapillaarkolonnid ei tohi väga “musta” proovi süstida

11.11.2019

27

Nõuded gaasikromatograafia statsionaarsele faasile

- Statsionaarsed faasid peavad olema:
 - temperatuurikindlad
 - inertsed
 - madala lenduvusega
- Selliseid aineid pole ülearu palju
- Põhiliselt kaks gruppi:
 - Polüsiloksaanid
 - Polüetüleenglükoolid
- Statsionaarse faasi valimisel tasub alustada mõnest vähempolaarsest faasist

11.11.2019

28

Kolonnid parameetrid ja valimine

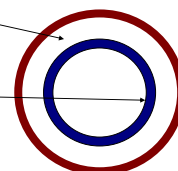
- Pikkus
 - Tasub alustada mitte eriti pikast kolonnist
- Sisediameeter
 - Tasub alustada suhteliselt laia sisediameetriga kolonnist
- Statsionaarne faas
 - Tasub alustada madala polaarsusega kolonnist
 - Madala polaarsusega on enamasti pikema elueaga ja temperatuurikindlamad
 - Madala polaarsusega kolonnid on selektiivsus kergemini ennustatav

11.11.2019

29

Vedela stats. faasiga kapillaarkolonn

- Kolonniks on kvartsist, klaasist, terasest vmt kapillaar:
 - läbimõõt 0.1-0.53 mm
 - pikkus 15-100 m (tavaline 30 m)
- Vedel statsionaarne faas on kantud õhukese kihina kapillaari sisesintele. Statsionaarse faasi ärauhumise vältimiseks see sageli polümeriseeritakse ja/või seotakse kapillaari pinnaga.

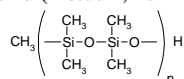


11.11.2019

30

Vedelad statsionaarsed faasid

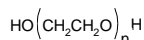
- Mittepolaarsed
 - polüsiloksaanid (metüül-, kuni 5% fenüül)



- Keskmise polaarsusega
 - polüsiloksaanid 35-50% fenüülaseadusega

- Polaarsed

– polüetüleenglükool

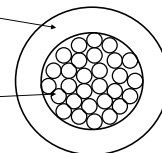


11.11.2019

31

Tahke stats. faasiga täidiskolonn

- Klaasist, terasest toru:
 - läbimõõt 3-5 mm
 - pikkus 0.6-3 m
- Silikageelist, aktiivsest vmt täidiseosakesed:
 - suurus 0.1-0.2 mm



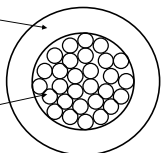
- Kasutatakse gaaside ja lenduvate madalmolekulaarsete ainete eraldamiseks. Seonduvad ka gaasid, mis vedelikes vähe lahustuvad.
- Efektiivsus on enamasti üsna madal ja piigid ebasümmeetrilised.

11.11.2019

32

Vedela stats. faasiga täidiskolonn

- Klaasist, terasest toru:
 - läbimõõt 3-5 mm
 - pikkus 0.6-3 m
- Silikageelist, aktiivsest vmt täidiseosakesed (kandja):
 - suurus 0.1-0.2 mm
- Vedel faas on kantud täidiseosakeste pinnale ja pooridesse. Vedelat faasi võib olla massi järgi 1-25% täidise.



11.11.2019

33

Detektorid gaasikromatograafias

- Levinumad detektorid:
 - Leek-ionisatsioon-detektor (**FID**)
 - Elektronhaarde-detektor (**ECD**)
 - Massispektromeetriiline detektor (**MS**)
- Hiljuti ka: vaakum-ultraviolet-detektor (**VUV**)

11.11.2019

34

Detektorid gaasikromatograafias

Omadus	FID	ECD	MS
Lineaarne ala	6 suurusjärku	4 suurusjärku	3-6 suurusjärku
kasutusala	kõik ained, milles on sees C-H sidemed	Ained, milles on sees halogeeniaatomeid, samuti nitroühendid, peroksiidid jne.	praktiliselt kõik ained
Tüüp	massitundlik	heas lähenduses kontsentratsioonitundlik	heas lähenduses kontsentratsioonitundlik
Kapriisus /leplikkus	leplik	kapriisne	kapriisne

11.11.2019

35

Detektorid gaasikromatograafias

Omadus	FID	ECD	MS
Tundlikkus (avastamispiir) erinevate ainete suhtes	– Seda tundlikum, mida rohkem on molekulis C-H sidemeid, enamasti funktsionaalrühmi alandab tundlikkust – Eriti tundlik alkaanide suhtes, ca 10^{-12} g/s	– eriti tundlik polühalogeenitud ainete suhtes (nt linaan 10^{-13} g/s) – Seda tundlikum, mida rohkem on halogeeniaatomeid – Tundlikkus kasvab reas: F → Cl → Br, I	– tundlikkus sõltub väga tugevasti massispektromeetri töörežiimist ja varieerub 10^{-9} .. 10^{-15} g – Seda tundlikum, mida suurem on aine ionisatsiooniristõige. See on suur polariseeritavatel molekulidel (sisaldavad aromaatsid tuumi, või rühmi nagu -Br, -I, -NH ₂ , -NH-, ...)

11.11.2019

36

Detektorid gaasikromatograafias

Omadus	FID	ECD	MS
Mida vajab oma tööks	- H ₂ - Suruõhk	- <i>makeup</i> gaas. Seda on vaja kapillaarkoloni korral ja ka täidiskoloni korral, kui kandegaas on He. Vajalik on see gaas selleks, et detektori ruumis oleks piisavalt gaasi, mida radioaktiivne allikas saab ioniseerida	- Vaakum

11.11.2019

37

Detektorid gaasikromatograafias

Omadus	FID	ECD	MS
Kapriisus /leplikkus	leplik	kapriisne - detektor on tundlik ka H ₂ O ja O ₂ suhtes, mis seab väga karmid nõuded kandegaasi puhtusele - Karmid nõuded koloni stacionaarse faasi vājauhtumise suhtes: termolabiilsemaid stacionaarseid faase (nt. Carbowax) tasub kasutada vaid küllalt madalal temperatuuril - Kui selle detektoriga töötatakse igapäevaselt ja määrata on vaja väga madalaid kontsentratsioone, siis on kaval masin õõseks käima jätta	kapriisne - detektor on tundlik H ₂ O ja O ₂ suhtes (need mõlemad lühendavad filamenti eluiga jaioonkordisti eluiga), mis seab karmid nõuded kandegaasi puhtusele - Karmid nõuded koloni stacionaarse faasi vājauhtumise suhtes: termolabiilsemaid stacionaarseid faase (nt. Carbowax) tasub kasutada vaid küllalt madalal temperatuuril - Kui selle detektoriga töötatakse igapäevaselt ja määrata on vaja väga madalaid kontsentratsioone, siis on kaval masin õõseks käima jätta

11.11.2019

38

Detektorid gaasikromatograafias

Omadus	FID	ECD	MS
Kas kannatab solvendipiiki?	Jah, üldjuhul pole probleemi	põhimõtteliselt jah	Soovitatav on MS solvendi sisenemise ajaks välja lülitada, kuna solvendipiik kulutab filament ja kaioonkordistit. Praktiliselt kõigi süsteemide juures on võimalik selline asi temperatuuri-programmi sisse programmeerida
Kas kannatab õhku?	Jah	Ei	Ei

11.11.2019

39

Detektorid gaasikromatograafias

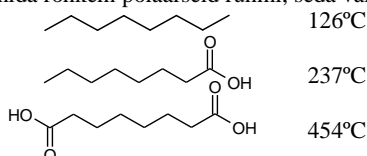
Omadus	FID	ECD	MS
Vajalik hooldus	minimaalne - sisuliselt vaid aeg-ajalt puhastada	oluline - Detektor sisaldab radioaktiivset materjali. Seda detektorit lahti võtta ei soovitata. - Puhastamine on küll vajalik, aga seda tuleks teha <i>bakeout</i> režiimis	oluline - Lahti võtta on keeruline ja aeganõudev - On üsna suur oht, et lahtivõtmisel saab kahjustada - Lihtsam puhastamine käib üldiselt <i>bakeout</i> režiimis

11.11.2019

40

Analüüsitavad ained

- Ained peavad olema lenduvad
- lenduvust võib iseloomustada keemistemperatuuriga
- Analüüsi temperatuuril termiliselt püsivad
- GC aparatuur kannatab enamasti kuni 300°C
- mida suurem on molekul, seda väiksem on lenduvus
- mida rohkem polaarset rühmi, seda väiksem lenduvus



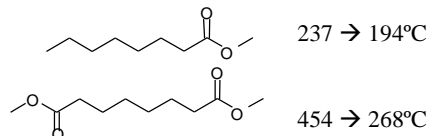
- Ained peavad sobima detektoriga

11.11.2019

41

Analüüsitavad ained

- Isegi kui lenduvus on piisav, võib polaarsete ainete GC analüüsiga raskusi olla – piigid sabatavad.
- Polaarsuse vähendamiseks ja lenduvuse parandamiseks võib analüüdi derivatiseerida.



11.11.2019

42

Vedelik-kromatograafia

11.11.2019

43

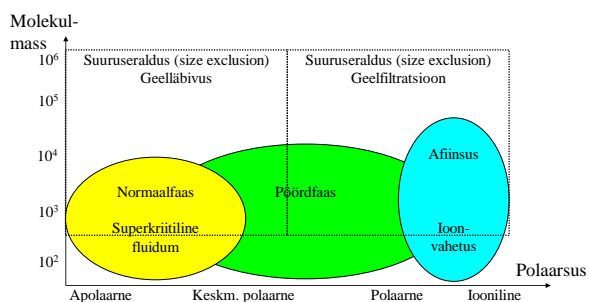
Vedelik-kromatograafia

- Ainete eraldamine võib toimuda mitmete erinevate omaduste järgi. Tavalisim:
 - Polaarsus (“tavaline” **vedelik-kromatograafia**)
 - Iooni laengu ja suuruse suhe (**ioonkromatograafia**)
- Järgnevas vaatleme vedelik-kromatograafiat ja ionkromatograafiat koos.
- Et eraldamine oleks efektiivne, peab kolonn olema statsionaarse faasiga täidetud väga tihedalt. **See toob kaasa vajaduse kasutada kõrget rõhku eluendi surumiseks läbi kolonni**
- Siit sagelikasutatav nimetus: kõrgrõhuvedelik-kromatograafia e. **kõrgefektiivne vedelik-kromatograafia.**

11.11.2019

44

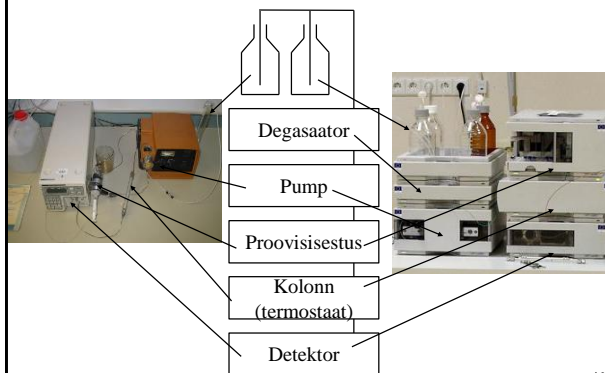
Vedelikkromatograafia liigid



11.11.2019

45

Vedelik-kromatograaf



11.11.2019

46

Eluendid

- Nõuded
 - Peab lahustama proovi
 - Peab olema võimeline analüüte kolonnist läbi kandma
 - Peab tekitama selektiivsuse
 - Ei tohi olla viskoosne
- Pöördfaas-vedelik-kromatograafias
 - Kõige sagedasem: puhverlahus segus mõne orgaanilise lahustiga (enamasti metanool või atsetonitriil)
- Ioonkromatograafias
 - Katioonide lahutamisel sageli mõni hape
 - Anioonide lahutamisel sageli mõni hüdroksiid või karbonaat

11.11.2019

47

Sisestus-süsteem

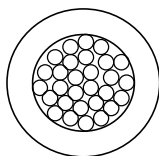
- Üldiselt töötatakse nii, et eluent kogu aeg voolab ja aeg-ajalt spetsiaalse kraani abil sisestatakse eluendi voolu uuritavat lahust
- Erinevalt gaasikromatograafiast on siin võimalik sisestada proovi väga reprodutseerivalt
- Sisestatakse enamasti mõni kuni mõnikümmend mikrolitrit

11.11.2019

48

Kolonnid

- Kolonni kest valmistatakse enamasti terasest, sisediaimeetriga 2 – 4.6 mm ja pikkusega 10 – 30 cm.
- Kasutatakse ka klaasist kestaga kolonne.
- Kolonni sees on täidiseosakesed, mille pind võib olla modifitseeritud.



11.11.2019

49

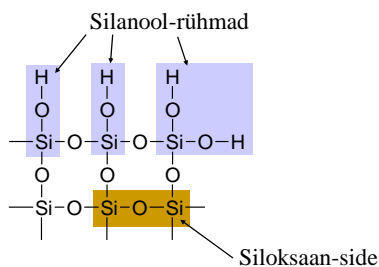
Statsionaarsed faasid

- “Tavalises” vedelik-kromatograafias
 - Kõige sagedasemad on niinimetatud **pöördfaasid** - silikageeli terakesed, mille külge on keemiliselt seotud alküülrühmad (tihti C18).
 - Terakeste läbimõõt kõige sagedamini 5 mikromeetrit.
 - Toimub üleminek väiksematele osakestele.
- Ioonkromatograafias
 - Kõige tavalisemad on polümeeri terakesed, mille külge on seotud **ioonvahetusrühmad**:
 - Katioonvahetuskolonni korral sageli $-\text{SO}_3^-$
 - Anioonvahetuskolonni korral sageli $-\text{NR}_3^+$

11.11.2019

50

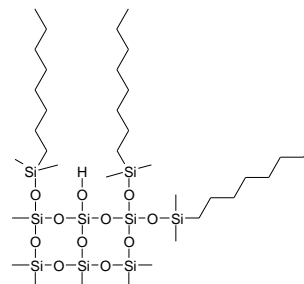
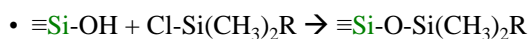
Silikageeli struktuur



11.11.2019

51

Silikageeli pinna modifitseerimine



11.11.2019

52

Detektorid

- “Tavalises” vedelik-kromatograafias
 - UV-Vis spektrofotomeetiline
 - Fluorestsents
 - Elektrokeemiline
 - Massispektrometiline
- Ioonkromatograafias
 - Konduktomeetiline
 - Lihtne ja küllalt odav
 - Vajab temperatuuri kontrolli
 - Puudus: ka eluent juhib, see vähendab tundlikkust
 - Lahendus: Kasutada **supressorit** (supressor sisuliselt eemaldab eluendi ioonid, kuid jätab alles uuritavad ioonid)

11.11.2019

53

Aparatuuriga ümber käimine ja hooldus

- Vedelik-kromatograafide vedelikühendusi tehes ei tohi neid liiga kõvasti kinni keerata
- Pump
 - Kui pumpa mõnda aega ei kasutata, siis on **oluline, et pumpa ei jääks sisse soola sisaldav lahus**
 - Parim, mida sinna sisse jätta, on mõni orgaaniline lahusti või vee ja orgaanilise lahusti segu
 - Ioonkromatograafi puhul võib kaaluda suhteliselt lahja lämmastikhappe lahust
 - Dest. vesi pole hea, sest läheb kasvama
 - Selleks, et pump hästi töötaks, peab eluent olema
 - valmistatud võimalikult puhasest ainetest
 - filtreeritud
 - degaseeritud

11.11.2019

54

Aparatuuriga ümber käimine ja hooldus

- Sissesüstimis-süsteem
 - Sarnaselt pumbale on **oluline, et ei jääks sisse soola sisaldav lahus**
- Kolonn
 - Selleks, et kolonn kaua vastu peaks, peab:
 - eluent olema filtreeritud
 - proov olema filtreeritud
 - proov olema võimalikult "puhas"
 - kasulik on kasutada eelkolonni
 - Kui kolonni mõnda aega ei kasuta, siis:
 - Ei maksa lasta teda ära kuivada
 - Seda, milline vedelik kolonni sisse jätta, on kõige õigem küsida tootjalt

11.11.2019

55

Gaasikromatograafia vs. HPLC

- GC
 - Lenduvad ja termiliselt püsivad analüüdid
 - Efektiivsus kõrgem
 - Ennustamine-kirjeldamine lihtsam
 - Mõnevõrra odavam
- HPLC
 - Pole peaaegu piire analüüdi omadustele
 - Efektiivsus madalam
 - Muudetavaid parameetreid väga palju
 - Keerukam ära õppida ja kasutada
 - Mõnevõrra kallim kui GC

11.11.2019

56