

# Kromatograafia

31.08.15

<http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/krom.pdf>

Kromatograafia on meetod (meetodite grupp) komponentide eraldamiseks ainete segudest. Kromatograafilise analüüsi jaoks on vaja mobiilsest ja statsionaarsest faasist koosnevat süsteemi. Statsionaarne faas on aine, mis süsteemist läbi liikuvaid molekule enda külge seob ja siis jälle lahti laseb. Osakesed saavad süsteemis liikuda tänu mobiilsele faasile, milleks on vedelik (eluent) või gaas (kandegaas), mis läbi statsionaarse faasi voolates segu erinevaid komponente edasi kannab. Kromatograafilise lahutamise põhineb see komponentide erineval liikuvusel läbi kromatograafilise süsteemi (kolonn, plaat, vms). Ühendid, mis sarnanevad rohkem statsionaarse faasiga (st omavad kõrgemat afiinsust selle suhtes), liiguvad aeglasemalt kui ühendid, mis on sarnasemad mobiilse faasiga. Aega, mis kulub ainel kromatograafilise süsteemi läbimiseks, nimetatakse retentsiooniajaks ( $t_R$ ). Erinevate liikumiskiiruste tõttu on ainetel ka erinevad retentsiooniajad.

## 1 Kromatograafia liigid

Kromatograafilisi meetodeid võib liigitada eesmärgi, tehnilise teostuse, mobiilse faasi oleku ja muude parameetrite alusel.

Eesmärgi järgi võib kromatograafia liigitada kaheks: preparatiivne ja analüütiline kromatograafia. Preparatiivse kromatograafia korral on ainete eraldamise eesmärgiks üksikute komponentide kättesaamine, et nendega midagi edasi teha. Näiteks reaktsioonisegust üksiku komponendi puhastamine, et seda kasutada ravimi koosseisus. Analüütilise kromatograafia puhul on eesmärgiks aine olemasolu (kvalitatiivne analüüs) ja hulga määramine (kvantitatiivne analüüs) segus.

Kromatograafilise süsteemi kahe peamise komponendi (statsionaarse ja mobiilse faasi) omaduste varieerimine võimaldab kasutada tehnilise teostuse poolest väga erinevaid segude eraldamise süsteeme. Nii võib statsionaarne faas olla paber (paberkromatograafia) või õhuke poorse aine kiht metall- või klaasplaadil (õhukese kihi kromatograafia, thin layer chromatography (TLC)), täidisena kolonnis (kolonnkromatograafia) või kantud peene toru siseseintele (kapillaarkromatograafia). Mobiilne faas võib olla vedel (vedelikkromatograafia, liquid chromatography (LC)), gaasiline (gaaskromatograafia, gas chromatography (GC)) või superkriitilises olekus (superkriitilise fluidumi kromatograafia, supercritical fluid chromatography (SFC)). Vedelikkromatograafia korral kutsutakse mobiilset faasi ka eluendiks.

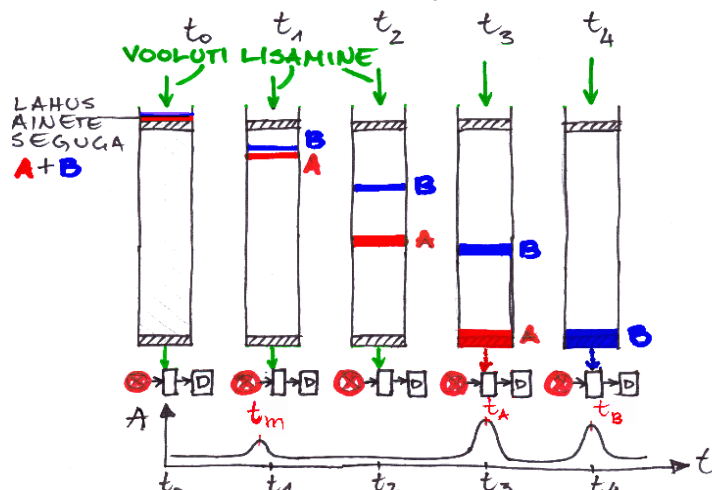
Kromatograafilisele lahutamisele järgneb komponentide detekteerimine kas visuaalselt (kui on värvilised ühendid) või kasutades spetsiaalseid detektoreid.

## 2 Kolonnkromatograafia

Kromatograafia kolonn koosneb klaas- või metallkestast ja poorsest tädisest selle sees. Porse täidise pind toimib statsionaarse faasina. Eluent voolab läbi kolonni raskusjõu mõjul või pumba surve all. Kolonnist väljuvate ühendite identifitseerimise jaoks saab kolonni järele ühendada detektori, milleks võib olla näiteks fotomeeter (joonis 1).

Joonisel 1 on kujutatud viis pilti samast kolonnist eri ajahetkedel. Ajahetkel  $t_0$  on kolonni lisatud lahus uuritavate ainete seguga. Vooluti ühtlasel lisamisel hakkab aine kolonnist liikuma. Iga aine liigub talle omase kiirusega, mis sõltub sellest kui palju aega on aine osakesed voolutis ja kui palju aega tahke faasi pinnale adsorbeerunud. Kolonnide all kujutatud graafikul on näha kolonnist väljuva lahuse neelduvus igal ajahetkel peale ainesegu lisamist kolonni. Sellist graafikut nimetatakse kromatogrammiks. Graafik saadakse, kui kolonni lõppu on lisatud detektor (antud juhul läbivooluküvetiga fotomeeter).

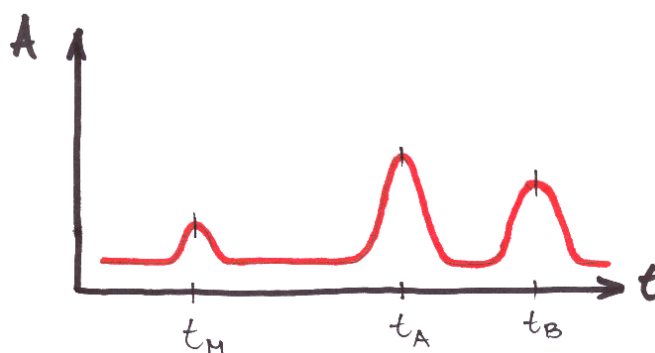
Ajahetkeks  $t_1$  on ained A ja B kolonnis pisut edasi liikunud. Lahusti, milles ained olid lahustatud on juba kolonni läbinud ja detektorini jõudnud. Detektori signaali muutumist sel ajal kui mõni aine seda läbib nimetatakse kromatograafiliseks piigiks. Piikide iseloomustamiseks kasutakse selle maksimumi ajahetke. Proovi lahusti kolonnist väljumise ajahetke nimetatakse surnud ajaks ( $t_m$ ). See on aeg, mille jooksul kolonnis mittepidurduvad ained (ained, mis liiguvad sama kiiresti kui vooluti) jõuavad detektorini. Ajahetkel  $t_2$  on ained kolonnis veelgi edasi liikunud. Näeme, et mida kaugemale ained kolonnis jõuavad, seda rohkem nad teineteisest eralduvad. Ajahetkel  $t_3$  on aine A jõudnud kolonni otsa. Detektor registreerib piigi, mille maksimumi ajahetke nimetatakse aine A retentsiooniajaks ( $t_A$ ). Ajahetkel  $t_4$  on ka aine B jõudnud detektorini. Saame ka aine B retentsiooniaja  $t_B$ .



Joonis 1. Kolonnkromatograafia tööpõhimõtte ja saadav kromatogramm.

**Aine identifitseerimine.** Lähtuvalt ülaltoodud näitest, saab järeldada, et ainete retentsiooniajad on ainetele iseloomulikud suurused, st kahel erineval ainel on erinevad retentsiooniajad. Teades antud aine retentsiooniaega antud tingimustes, saame aine identifitseerida (kindlaks teha).

**Aine koguse määramine.** Mida rohkem on ainet, seda suuremad on selle poolt tekitatava piigi kõrgus ja pindala. Seega saab piigi kõrguse või pindala järgi (kalibreerimisgraafiku meetodil) määrata ka aine kontsentratsiooni.



Joonis 2. Kromatogramm

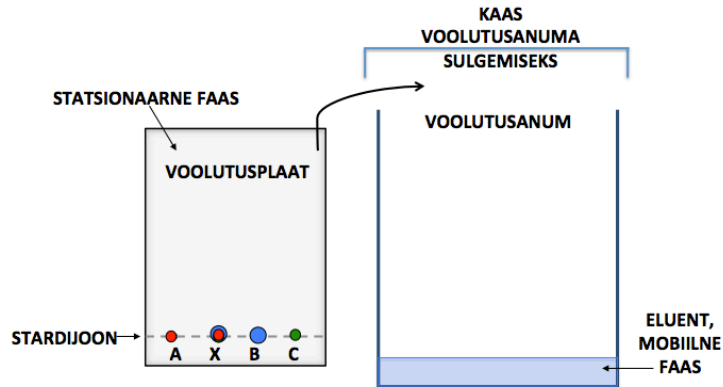
### 3 Planaarkromatograafia ehk õhukese kihi kromatograafia

Planaarkromatograafia on kromatograafia liik, mille puhul statsionaarseks faasiks on adsorbendi õhuke kiht (paber, metall-lehele kantud silikageel vmt), milles mobiilne faas (ehk vooluti ehk eluent) liigub kapillaarjõudude toimel.

Näitena vaatleme segu  $x$  planaarkromatograafilist lahutamist komponentideks  $a$ ,  $b$  ja  $c$  (joonised 3-5):

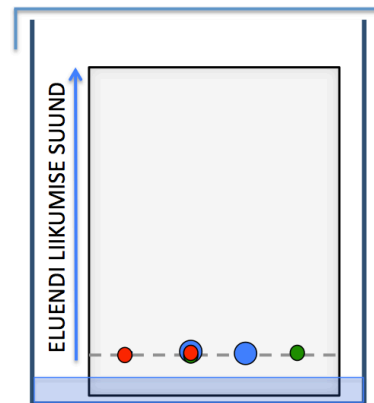
1. Plaadi alumise serva lähedale märgitakse nn stardijoon. On oluline, et peale eluendi lisamist voolutusnõusse jääks see vedelikunivoost kõrgemale. Stardijoonele kantakse väike kogus uuritavat segu ( $x$ ) ja võrdluseks ka aineid, mille sisaldust segus kontrollida soovitakse ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ). (Joonis 3)

2. Seejärel asetatakse plaat voolutusnumasse, mille põhjas on pisut vedelikku, mida nimetatakse voolutiks (ehk eluent ehk mobiilne faas). (Joonis 1)

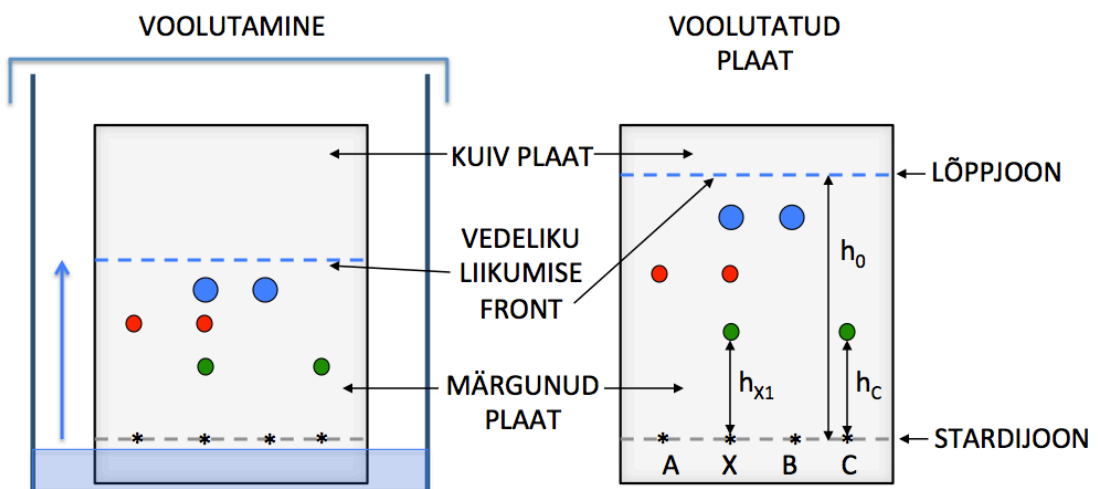


**Joonis 3.** Analüüsivad ained on kantud voolutusplaadile ning asetatakse voolutusnumasse, mille põhjas on vooluti (ehk eluent ehk mobiilse faas).

3. Plaat asetatakse alumist serva pidid vedeliku sisse nii, et vedelik ei ulatu plaadile kantud aineteni. Vooluti voolutusplaadilt aurustumise vältimiseks suletakse voolutusnõu kaanega. Selliselt on kogu voolutuskamber vooluti aurudega küllastunud. Kapillaarjõudude toimele hakkab vedelik mööda voolutusplaadi statsionaarset faasi üles „voolama“ (joonis 4), olgu selleks siis paber või metallplaadile kantud silikageel.
4. Vedeliku voolamisel liiguvad sellega kaasa ka analüüsivad ained. Ainete liikumiskiirused on seejuures erinevad, antud ainele iseloomulikud suurused, mis sõltuvad ainete afiinsusest statsionaarse faasi suhtes. Piltlikult väljendudes: ained, millele „meeldib“ rohkem vedelikus olla liiguvad kiiremini ja ained, millele „meeldib“ rohkem tahke aine küljes olla - aeglasemalt. Nii jõuavad ained stardijoonest eri kaugustele – lahutuvad (joonis 5).



**Joonis 4.** Eluendi liikumine.



**Joonis 5.** Ainete lahutumine voolutusplaadil

5. Üldjuhul liiguvad ained aeglasemalt, kui vedelikufront. Kui vedelik on jõudnud peaaegu plaadi ülemise servani voolata, võetakse plaat voolutusnõust välja ja asetatakse horisontaalpinnale, et eluent saaks plaadist välja aurustuda. Voolamise tulemusel jõudsid ained plaadil eri kaugustele stardijoone ja lõppjoone vahel. Võrreldes omavahel võrdlusainete ja uuritavate ainete kaugusi stardijoonest, saame uuritavas segus olevaid komponente kindlaks teha.

Kui vajalik võrdlusaine puudub, siis võib osutada võimalikuks ühendi määramine tema liikuvuse  $R_F$  alusel (võrrand 1).

$$R_F = \frac{V_X}{V_0} = \frac{h_X}{h_0} \quad (1)$$

Identifitseerimine tugineb sellele, et ühesuguse tööviisi ja -tingimuste korral on iga keemilise ühendi liikumiskiiruse  $V_X$  ja eluendi frondi liikumiskiiruse  $V_0$  suhe konstantne suurus, mis iseloomustab antud ühendit. Liikuvuse  $R_F$  arvulise väärtuse leidmiseks mõõdetakse komponendi laigu keskpunkti kaugus stardijoonest  $h_X$  (joonis 5) ja eluendi frondi kaugus stardijoonest  $h_0$  (joonis 5) ja arvutatakse  $R_F$  vastavalt võrrandile 1.

### 3.1 Ilmutamine (visualiseerimine, detekteerimine)

Tihti on analüüsitavad ained värvitud, mistõttu nad ei ole voolutusplaadil nähtavad. Sellistel juhtudel tuleb plaat pärast voolutamist ilmutada. Ilmutamiseks võib kasutada mõne kemikaali lahust, mis antud ainetega reageerides annab värvilisi ühendeid. Mõningad ained, eriti orgaanilised ühendid, mis pole värvilised, võivad muutuda nähtavaks ultraviolettkiirguse käes. Sellisel juhul vaadeldakse plaate ultraviolettlambi all.

Käesolevas praktikumis viiakse praktilise tööna läbi üks kahest õhukese kihi kromatograafia tööst. „Aminohapete paberchromatograafilise määramise“ töös on voolutusplaadiks kuivatuspaberi taoline paber ja ilmutamine toimub keemilise reaktsiooni abil. „Vees lahustuvate vitamiinide planaarkromatograafilise määramine“ on töö, kus statsionaarseks faasiks on alumiiniumlehele kantud silikageel ning laike analüüsitakse ultraviolettkiirguse abil.

## 4 Kromatograafia loengu ülesanded

1. Mis on sarnast ja mis erinevat planaar- ja kolonnkromatograafias?
2. Planaarkromatograafia plaadilt mõõdeti stardijoone ja lõppjoone vaheliseks kauguseks 6 cm. Ainete A ja B laikude kaugused stardijoonest olid vastavalt 2 ja 4 cm. Arvutada antud ainete liikuvused. Kumb ainetest viibis suhteliselt kauem mobiilses faasis ja kumb statsionaarses faasis?
3. Kas planaarkromatograafiliselt voolutatud aine laigu suurus plaadil näitab midagi aine kohta? Kas see mõjutab aine liikuvuse väärtust? Kui jah, siis mil viisil?
4. Mis põhjustab ainete erineva liikumiskiiruse kolonni läbimisel?