

Kromatograafia

05.09.12

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

Kromatograafia on meetod (meetodite grupp) komponentide eraldamiseks ainete segudest. Meetod baseerub segu komponentide erineval liikuvusel mobiilsest ja statsionaarsest faasist koosnevas süsteemis.

1 Kromatograafia liigid

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

Kromatograafilise ainete eraldamise eesmärgiks võib olla üksikute komponentide kättesaamine, et nendega midagi edasi teha (nt kasutada ravimi koosseisus). Sellist kromatograafiat nimetatakse preparatiivseks.

Analüütilise kromatograafia puhul on eesmärgiks aine olemasolu ja hulga määramine segus.

Statsionaarne faas võib olla paber (paberkromatograafia) või õhuke poorse aine kiht metall- või klaasplaadil (õhukese kihi kromatograafia), tädisena kolonnis (kolonnkromatograafia) või kantud peene toru siseseintele (kapillaarkromatograafia).

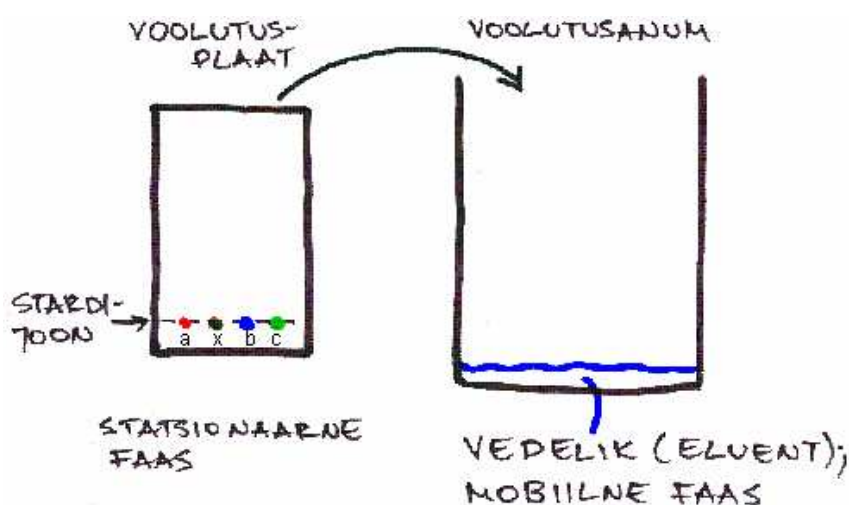
Mobiilne faas võib olla vedel (vedelikkromatograafia), gaasiline (gaaskromatograafia) või superkriitilises olekus (superkriitilise fluidumi kromatograafia).

2 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 liigub kapillaarjõudude toimetel.

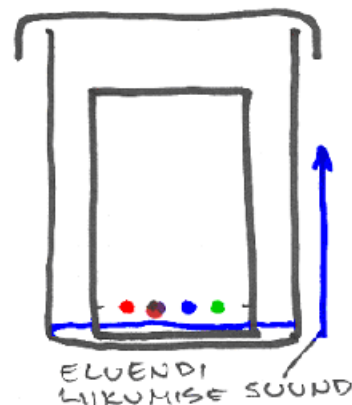
Näitena vaatleme segu x planaarkromatograafilist lahutamist (joonised 1-3):

1. Plaadi alumise serva lähedale märgitakse nn stardijoon. Sellele kantakse pisikene täpp uuritavat segu (x) ja võrdluseks ka aineid, mille sisaldust segus kontrollida soovitakse (a , b , c). (Joonis 1)
2. Seejärel asetatakse plaat voolutus anumasse, mille põhjas on pisut vedelikku, mida nimetatakse voolutiks (ehk eluent ehk mobiilne faas). (Joonis 1)

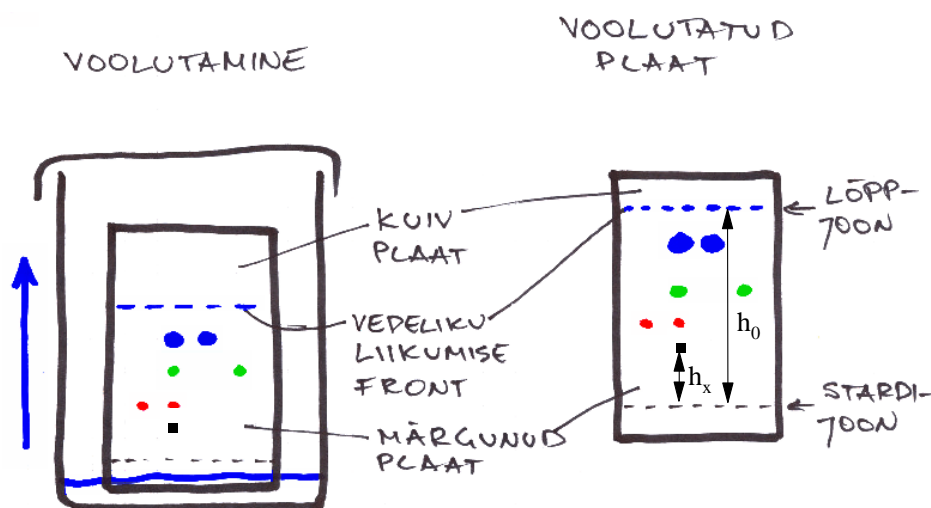


Joonis 1. Analüüsitavad ained voolutusplaadil; voolutusanum mobiilse faasiga.

3. Plaat asetatakse alumist serva pidid vedeliku sisse nii, et vedelik ei ulatu plaadile kantud aineteni. Vooluti voolutusplaadilt aurustumise vältimiseks suletakse voolutusnõu kaanega. Kapillaarjõudude toimele hakkab vedelik mööda voolutusplaadi märguvat ainet üles „voolama“ (joonis 2).
4. Vedeliku voolamisel liiguvad sellega kaasa ka analüüsitavad 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 3).



Joonis 2. Eluendi liikumine.



Joonis 3. 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 stardijoonest 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 3) ja eluendi frondi kaugus stardijoonest h_0 (joonis 3) ja arvutatakse R_F vastavalt võrrandile 1.

3 Ilmutamine (visualiseerimine)

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 lambi all.

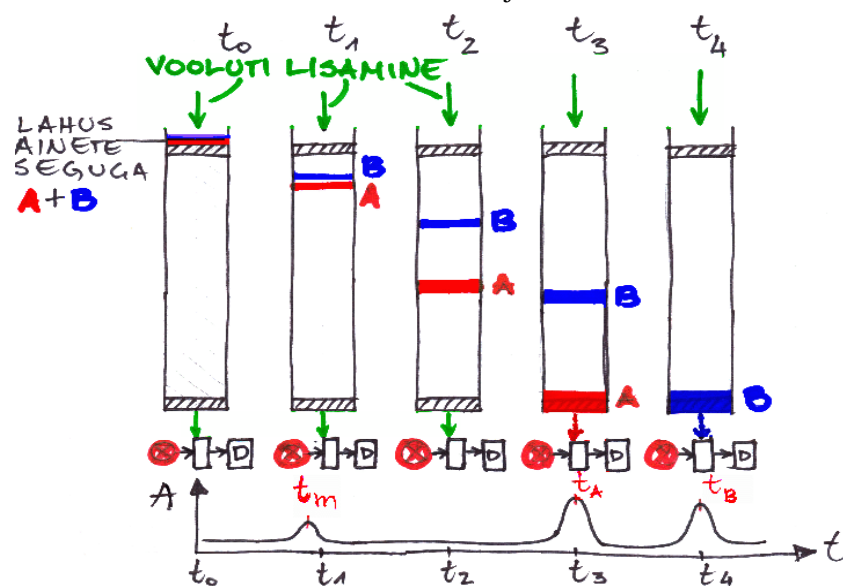
4 Kolonnkromatograafia

Kromatograafia kolonn koosneb klaas- või metallkestast ja poorsest täidisest selle sees. Poorse täidise pind toimib statsionaarse faasina. Eluent voolab läbi kolonni raskusjõu mõjul või pumba surve all. Identifitseerimise jaoks tuleb kolonni järele ühendada detektor, milleks võib olla näiteks fotomeeter (joonis 4).

Joonisel 4 on kujutatud viis pilti samast kolonnist eri ajahetkedel. Ajahetkel t_0 on kolonni lisatud lahuse uuritavate ainete seguga. Vooluti ühtlasel lisamisel hakkab aine kolonnist liikuma. Iga aine talle omase kiirusega, mis sõltub sellest kui palju aega on aine osakesed voolutis ja kui palju aega tahke faasi pinnale adsorbeerunud. Kolonnide all kujutatud teljestikul 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 kolonnist 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.

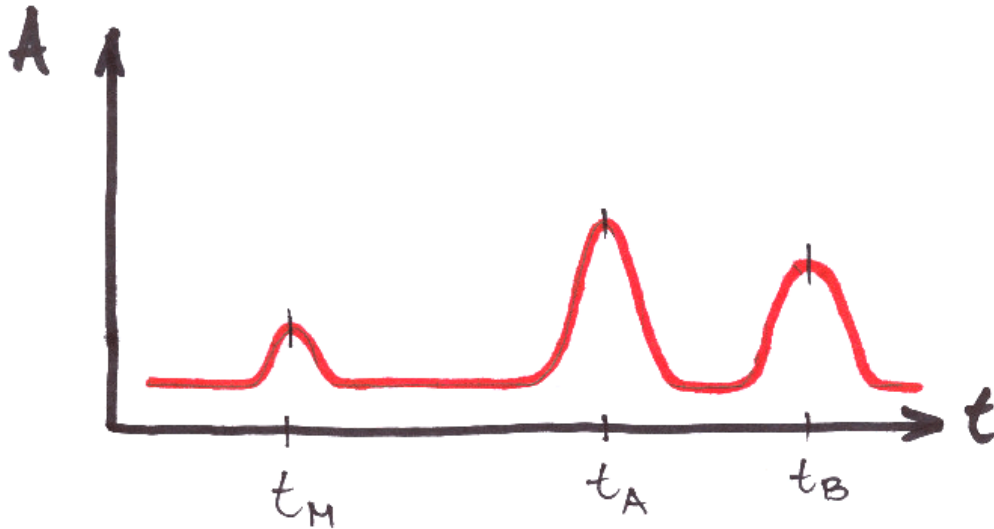
Proovi lahusti piigi maksimumi kolonnist väljumise ajahetke nimetatakse surnud ajaks (t_m), see on aeg, mille jooksul kolonnist mittepidurduvad ained (ained, mis liiguvad sama kiiresti kui vooluti) jõuavad detektorini. Ajahetkel t_2 on ained kolonnist veelgi edasi liikunud. Näeme, et mida kaugemale ained jõuavad, seda rohkem nad teineteisest eralduvad. Ajahetkel t_3 on aine A jõudnud kolonni otsa. Detektor mõõdab 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 4. Kolonnkromatograafia tööpõhimõtte ja saadav kromatogramm.

Aine identifitseerimine. Lähtuvalt ülaltoodud näitest, saab järeldada, et ainete retentsiooniajad on ainetele iseloomulikud suurused. Teades antud aine retentsiooniaega antud tingimustes, saame aine identifitseerida (määratleda).

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 5. Kromatogramm

5 Kromatograafia loengu ülesanded

1. Mis on sarnast ja mis erinevat planaarkromatograafias?
2. Planaarkromatograafia plaadilt mõõdeti startdijoonest ja lõppjoone vaheliseks kauguseks 6 cm. Ainete A ja B laikude kaugused startdijoonest 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?