

## Tartalom

MINTAELŐKÉSZÍTÉS GC-HEZ .....	2
HS-GC (headspace, gőztéranalízis) .....	2
ATD-GC (automatikus termodeszorber).....	8
GC, LC-hez kapcsolt DETEKTÁLÁS EGYÉB LEHETŐSÉGEI NMR.....	9
FTIR.....	9
GC-MS.....	9
Ionforrások .....	10
Ion/Tömeganalizátorok .....	12
GC-MS összekapcsolási lehetőségei .....	17
LC-MS.....	19
LC-hez használható ionforrások: atmoszférikus nyomású ionforrások:.....	20
Ionforrásokkal kapcsolatban át kell gondolni: .....	22
LC-hez használható tömeganalizátorok: .....	23
MS-sel kapcsolható LC technikák .....	24
FEHÉRJE ANALITIKA .....	25
LC módszerek részletesebben .....	25
Egyéb kérdés: HPLC-ről át lehet-e térni UHPLC-re? .....	32
Kapilláris elektroforézis .....	32

Felhasznált anyagok:

    órai jegyzet, diák

Felhasznált szakirodalom:

    Fekete Jenő: A környezetvédelmi analitika alapjai. Budapest, 2003.

    Analitikai kémia. Szerk.: Pokol György. Typotex, 2011.

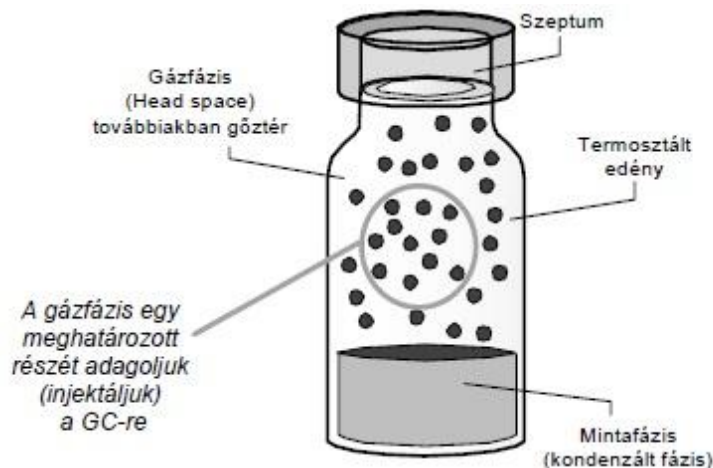
## MINTAELŐKÉSZÍTÉS GC-HEZ

### HS-GC (headspace, gőztéranalízis)

#### - illékony vegyületek mérése

- VOC: 293,15K-on (20°C-on) a gőznyomása 0,01 kPa vagy annál nagyobb érték (vagy póriásabban a forráspontja atm.nyomáson 170-300°C)
- SVOC (S: semi): 300-350°C

#### - alapelv:



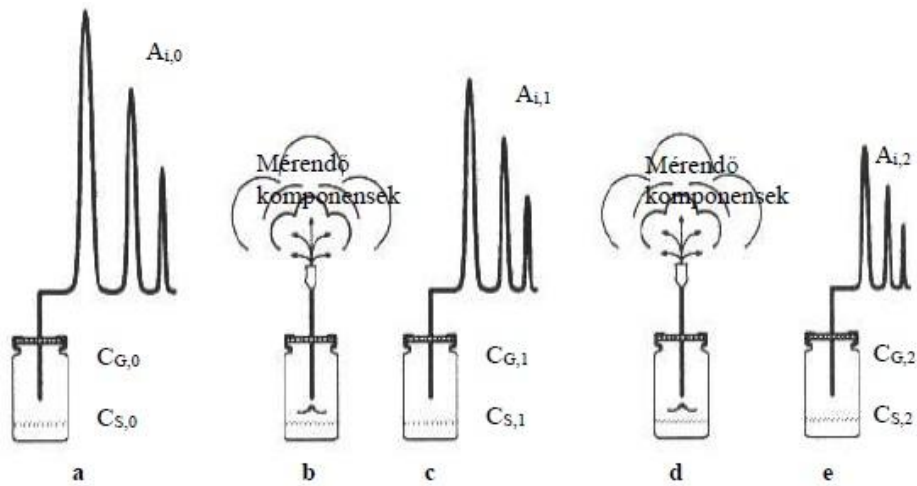
- a mintát egy zárt rendszerbe (üvegbe, **10-20ml**) bemérjük
- állandó hőmérsékleten tartjuk (termosztálás): beáll az **egyensúly a kondenzált (folyadék vagy szilárd) és a gáz fázis között**
- mintát veszek a gázfázisból és a GC-be adagolom
- **a mért csúcsterület arányos a vizsgált anyag koncentrációjával a kondenzált fázisban**

$A_i \sim y_i = k_i c_i$  ahol  $A_i$  a kromatogramon mért csúcsterület,  $y_i$  a komponens móltörtje a gőztérben,  $k_i$  a kalibrációs egyenes meredeksége (érzékenységi faktor, nemcsak a mérendő anyagtól, de a mátrixtól is függ!),  $c_i$  a komponens koncentrációja a kondenzált fázisban

- Henry törvény:  $p_i = H_i x_i = y_i$  ahol  $p_i$  az  $i$  komponens gőztenziója a gőztérben,  $H$  a Henry-állandó,  $x_i$  az  $i$  komponens móltörtje a kondenzált fázisban, valamint  $y_i$  az  $i$  komponens móltörtje (koncentrációja) a gőzfázisban
- $H_i = p_i^* \gamma_i$ , ahol  $p_i^*$  az  $i$  komponens gőztenziója a vizsgált hőmérsékleten ( $x_i = 1$ ),  $\gamma_i$  pedig az  $i$  komponens aktivitási koefficiense (a mátrix és az anyag kölcsönhatásától függ,  $\gamma_i = 1$  ideális oldatoknál) a kondenzált (folyadék vagy szilárd) fázisban

- **mi határozza meg, hogy mi vizsgálható?**
  - a vizsgált anyag illékonysága
    - **termosztálás hőmérsékletén a komponensünk gőznyomása legalább 1-10mbar legyen** (ha ennél kisebb, nem kerül elég anyag az MS-be)
  - a **mátrix:**
    - meghatározza az anyag kipárolgásának mértékét (növelheti és csökkentheti is)
    - a mátrix maga is párolgathat, így az is növelni fogja a gőzteniót (a mitnatartó üvegek nyomástűrése max. 10bar)
      - pl. vízminták esetén 80-90°C fölé nem szabad menni, mert szétrobbanhat az üveg → a mérhető komponensek forrása max. kb. 200-250°C-os lehet
  - az **oldószer** (amennyiben szükséges): nem mehetünk a forráspontja felé (érdemes nagy forrású oldószereket választani)
  - a **mintaadagoló** berendezés anyaga (részleteket később)
- gőztéranalízisnél a minta mátrixának meg kell egyeznie a kalibráló elegy mátrixával
  - ez úgy megoldható, hogy
    - a mátrixra kalibrálunk
    - az eredeti mátrix hatását elhanyagolhatóvá tesszük új mátrix komponensek bevitelével (mátrixnivellálás)
- **fontos szempontok**
  - mely a legmagasabb **termosztálási hőmérséklet**
    - meghatározza, hogy milyen forráspontú anyag vizsgálható: a termosztálási hőmérsékleten legalább 1-10mbar gőznyomása legyen
  - alkalmas-e egy mintatartóból **többszöri adagolásra**
    - azaz az adagolásnál mennyire bomlott meg az egyensúly
  - **zárt rendszerben** adagolható-e a minta a mintatartóból a gázkromatográfba
    - akkor beszélhetünk zárt rendszerről, ha a mintaadagoló és a GC kolonna bemenete közti rendszer zárt (a kolonna vége mindig nyitott lesz!)
  - **hogyan változtatható az adagolt mintatér fogat**, milyen határok között oldható meg automatikusan
  - milyen a **memória effektus** (carry over: mérhető-e kis koncentráció nagy koncentráció után) a nagy koncentrációjú és kis koncentrációjú minták adagolásakor

- alkalmazható-e a **többszöri gázeextrakciós módszer (MHE)** szilárd anyagokból történő illékony komponensek meghatározására
  - az első mérést követően a gőztérrel a külső légtérrel összekötjük → a komponens egy része a szabadba jut → újra termosztáljuk → kisebb gőztér nyomás → mérés → ezeket a lépéseket ismételjük, amíg az anyag koncentrációja a kimutatási határ alá nem csökken (ezzel a mátrix hatást is kiküszöböljük!)
  - a területcsökkenés mértani sorozatot alkot



10.1. ábra

A többlépéses, vagy többszöri gázeextrakciós módszer (Multiple Headspace Extraction)

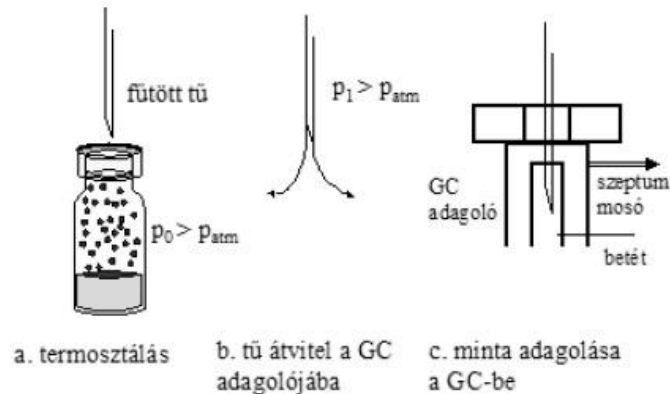
- a) termosztálás után mérés; b) a gőztér lefűvatása; c) újbóli termosztálás utáni mérés;  
d) újbóli gőztér lefűvatás; e) újbóli termosztálás utáni mérés

- összeköthető-e **dúsítási** módszerrel

- két típus

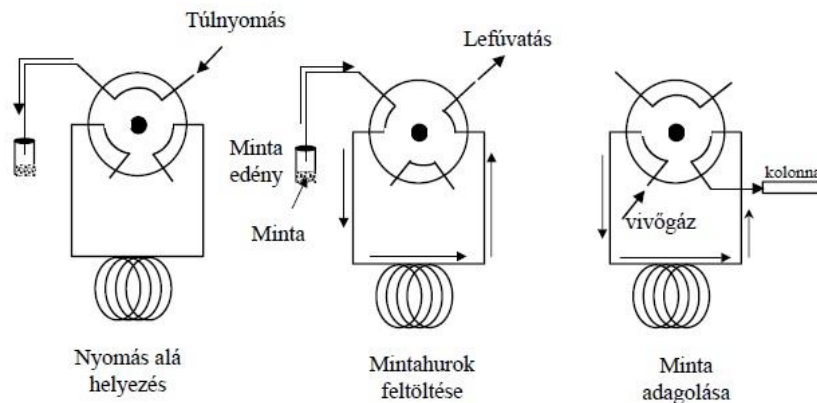
○ statikus vagy egyensúlyi

▪ fecskendő típusú adagoló



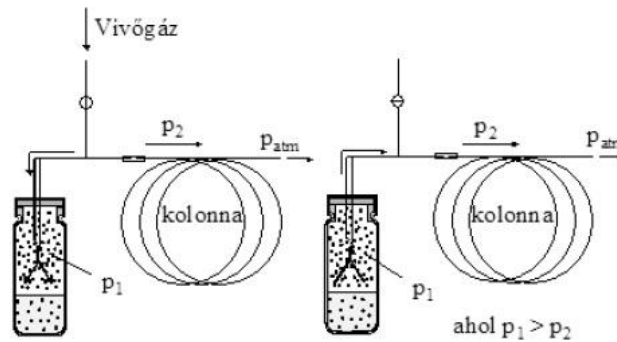
- fűtött tű (hogy ne kondenzálódjon semmi), 1-5 ml-es gáztömör fecskendő
- nem zárt rendszer
- mintavesztés, míg a tű a kolonnához ér
- nagyon eltérő térfogatok adagolása a tű cseréjével lehet
- max. hőm.t megszabja a tű gáztömörsege: **max. 150°C → 250-300°C-os forrptú anyagok**
- **memória effektus** lehetséges
- nem lehet újra adagolni, mivel az első adagolás során túl nagy mennyiséget veszünk el a gőztérből (az új egyensúly során a gőztérben már kevesebb lenne a mérendő komponensből és nem ugyanazt a koncentrációt mérnénk)
- MHE és dúsítás nem lehetséges

▪ túlnyomásos mintaadagoló, hurkos adagolás, loop system



- a gőztérben túlnyomást hoznak létre → a túlnyomásos teret ezután a mintahurokkal kötik össze → nyomáskülönbség hatására a túlnyomásos térből a gázáram a mintatartó hurkon keresztül a szabadba kerül → a mintaadagoló csap átfordításával a vivőgáz a komponenseket a kolonnára szállítja
- minden részében jól termosztált rendszer
- nem zárt a rendszer

- itt is van felső hőmérséklet korlát a loop rendszer miatt (teflon és acél): **max. 150°C**
- többszöri adagolás nem lehet (a fecskendő típusú adagolónál ismertetett okok miatt – gondoljunk arra, hogy itt az egész hurkot fel kell tölteni és még le is fújatjuk!)
- a térfogatot csak a hurok cseréjével lehet változtatni
- **memória effektus** van
- dúsítás, MHE nem lehet
- kiegyensúlyozott nyomású mintaadagolás



Nyomás alá helyezés

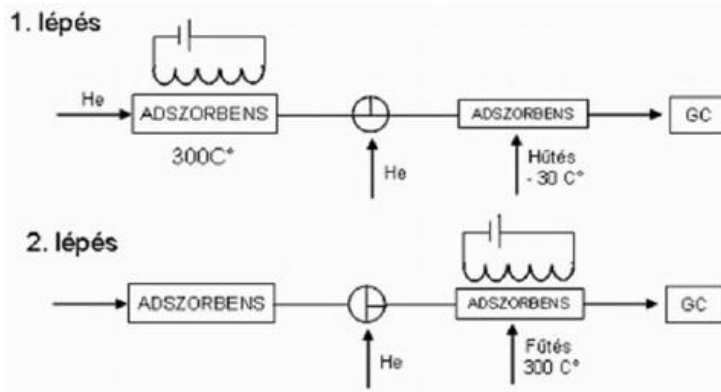
Minta adagolás

- mintatartó nyomás alá helyezése → a vivógázt a kolonna felé egy szelep átfordításával elzárják – a kolonna detektor felőli vége nyitott, így a kolonna elején a nyomás kisebb, mint a mintatartó gőzterében ( $p_2 > p_{atm}$ ) → a  $\Delta p$  nyomáskülönbség hatására a minta a kapilláris kolonnára áramlik
  - ez **zárt rendszer!**
- **nincs szerkezeti anyag** → **legmagasabb termostálási hőmérséklet** → ezzel lehet a legmagasabb hőm.ig elmenni (SVOC-ok is mérhetők, 350°C-os fp.ig)
- nincs mintavesztés
- a mintatérfogat nagyságát  $\Delta p$  és az adagolási idő határozza meg
- **ismételt adagolás** lehet, mivel itt csak kis mennyiséget adagolunk közvetlenül a kolonnára
- **MHE és dúsítás** lehet
- **dinamikus gőztér analízis**
  - az illékony komponenseket inert gázzal kihajtjuk → adszorbensen megkötjük (online vagy offline) → adszorbensről lefűtjük
  - nem lehet újra adagolni: az összes anyag a kolonnára kerül!
    - viszont így az érzékenysége nagyságrendekkel nagyobb
  - az adszorbensre többször vihetünk fel mintát → dúsítás lehetséges
- **online mintaelőkészítés**
  - a mintaelőkészítés a mérőrendszerrel térben és időben mereven összekötött
  - nincs mintavesztés (ami az offline mintaelőkészítés során gyakori)

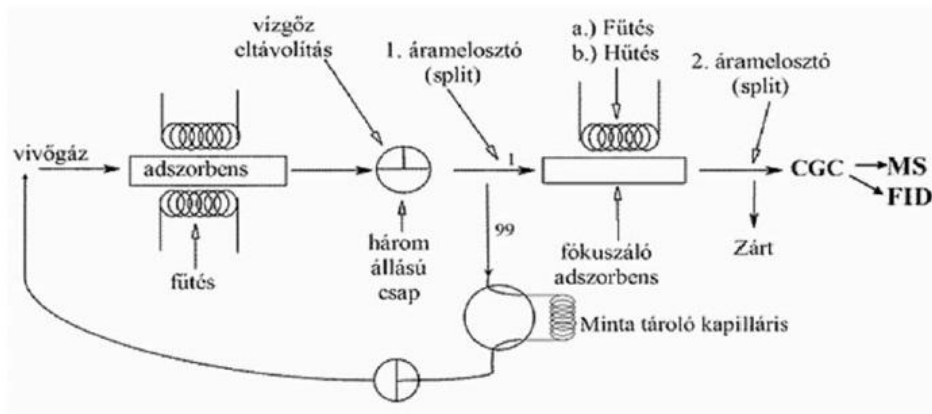
- **automatikus adagolás**
  - az automatizáltság miatt a módszeres hiba a döntő (nem a véletlen) és ez kiküszöbölhető, illetve korrigálható (pl. a mérési eredményeket korrekciós faktorral szorozzuk)
- **rendkívül kis oldószerigény** (oldószermentes/zöld anal.kémiai technika)
  - az oldószer forráspontja legyen sokkal magasabb, mint a vizsgált anyagé
- (a fenti 3 pont azért különösen fontos, mert mindig a mintaelőkészítés terhelt a legnagyobb hibával + nagy oldószerigényű + még sok időt is vesz igénybe)
- felhasználás:
  - gyógyszeriparban a maradékoldószer meghatározására (majdnem egyetlen technika erre) – egyensúlyi adagolás
    - a maradékoldószer a kristályosított gyógyszerhatóanyagban zárványokban megmaradhat → vizsgálatához a zárványokat fel kell oldani pl. dimetil-szulfoxid (DMSO)
  - vízminták – egyensúlyi adagolás
    - aromás, klórozott szénhidrogének, trihalometánok mérése (a fluor nem tartozik ebbe a kategóriába!) – apoláris vegyületek
      - trihalometánok: halogén elemmel (klór, bróm, jód) szubsztituált metán, melyek a víz klórozása során keletkeznek az ivóvízben, karcinogén anyagok
        - pl. kloroform  $\text{CHCl}_3$  (fp.  $\sim 61^\circ\text{C}$ ), bromoform  $\text{CHBr}_3$  ( $\sim 150^\circ\text{C}$ ), jodoform  $\text{CHI}_3$  ( $\sim 218^\circ\text{C}$ ), dibrom-klórmetán  $\text{CHBr}_2\text{Cl}$  ( $\sim 120^\circ\text{C}$ )
    - $80^\circ\text{C}$ -on termosztálunk, különben túl nagy lesz a vízgőz nyomása, illetve a sok víz kiolthatja a FID-t (lángionizációs detektort)
    - só adhatunk a vízhez:
      - biológiai-kémiai reakciókat meggátoljuk – nem változik a minősége
      - növeli a szerves illó anyagok gőztenzióját is
  - csomagolóanyagok vizsgálata – az egyensúlyi adagolásból csak a kiegyensúlyozott nyomású jó erre
  - műbőr, műanyag lágyító tartalmának vizsgálata
  - véralkohol
    - 2 kolonnával 2 detektorral párhuzamos mérés, ha hibahatáron belül megegyezik a két mérés, csak akkor vihető bíróságra a dolog

## ATD-GC (automatikus termodeszorber)

- illékony szerves anyagok meghatározása



- az adszorbensről a mintát lefűtjük (deszorpció) → megkötjük egy másik adszorbensen (fókuszálás) – ne legyen túl nagy térfogatú, hogy a GC-n a csúcs ne szélesedjen ki → lefűtjük innen is (deszorpció)
  - o hátrány: csak egyszer lehet mérni, és nem tudom előre, hogy milyen koncentrációt fogok mérni → NE EZT válasszuk
- új technika: többszöri mintaadagolás



- o egy áramelosztó beiktatásával a minta 1%-a kerül csak rá a kolonnára, a 99%-a egy tároló hurokra kerül, ami – ha szükséges újra mérni – visszavihetünk az adszorbensre és újra lefűthetjük (ha először túl kicsi volt a minta koncentrációja, másodszor nagyobb arányt is felvihetünk a kolonnára)
- a mintavétel elkülönülhet az adagolástól (offline) pl. levegőminták légszennyezés mértékének vizsgálatára (passzív mintavevő)
- az adagolás online össze van kötve a GC-vel



## GC, LC-hez kapcsolt DETEKTÁLÁS EGYÉB LEHETŐSÉGEI

### NMR

- probléma: detektálási térfogat (nem elegendő a GC-ről, LC-ről érkező térfogat)
- gyakorlatban nincs online LC-MS kapcsolás
  - o offline: LC → SPE (szilárdfázisú extrakció) → oldószercsere → NMR

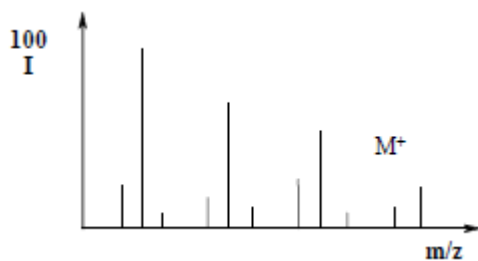
### FTIR

- főleg kábítószer vizsgálatnál

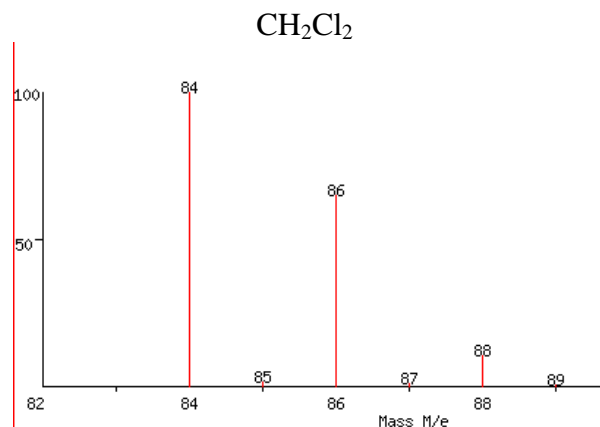
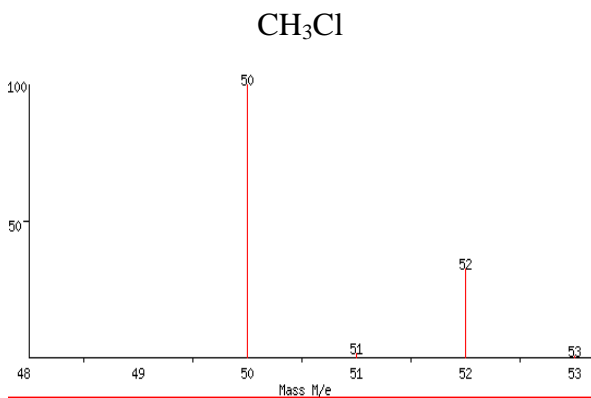
### GC-MS

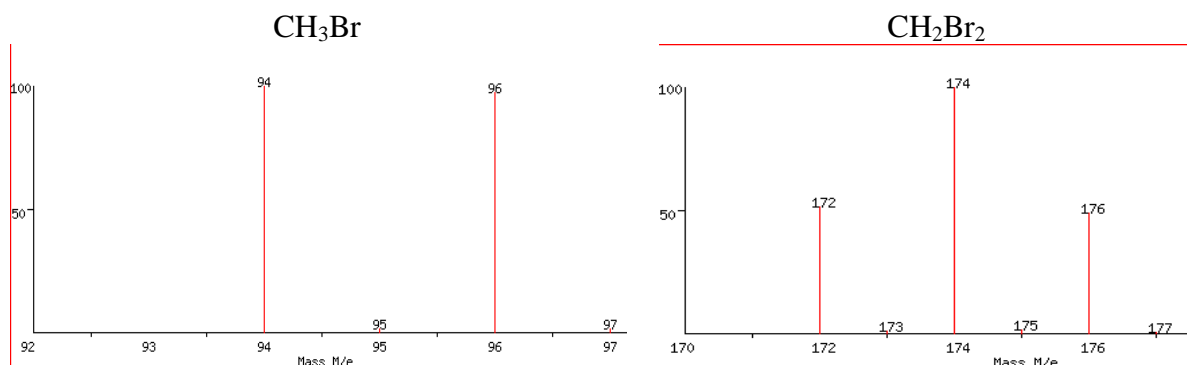
#### MS

- tömegspektrum: az ionizáció során képződött fragmensek tömeg (m) és töltés (z) hányadosa, valamint a legnagyobb intenzitású ionra normált ionintenzitás ábrázolása



- izotópokat is lehet látni! (ez is segíthet az azonosításban)
  - az alábbi internetes szoftverrel prediktálni lehet, hogy fog kinézni az izotóp eloszlás: <http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>
  - példák: Cl ( $^{35}\text{Cl}$  kb. 75%,  $^{37}\text{Cl}$  kb. 25%), Br ( $^{79}\text{Br}$  kb. 50%,  $^{81}\text{Br}$  kb. 50%)



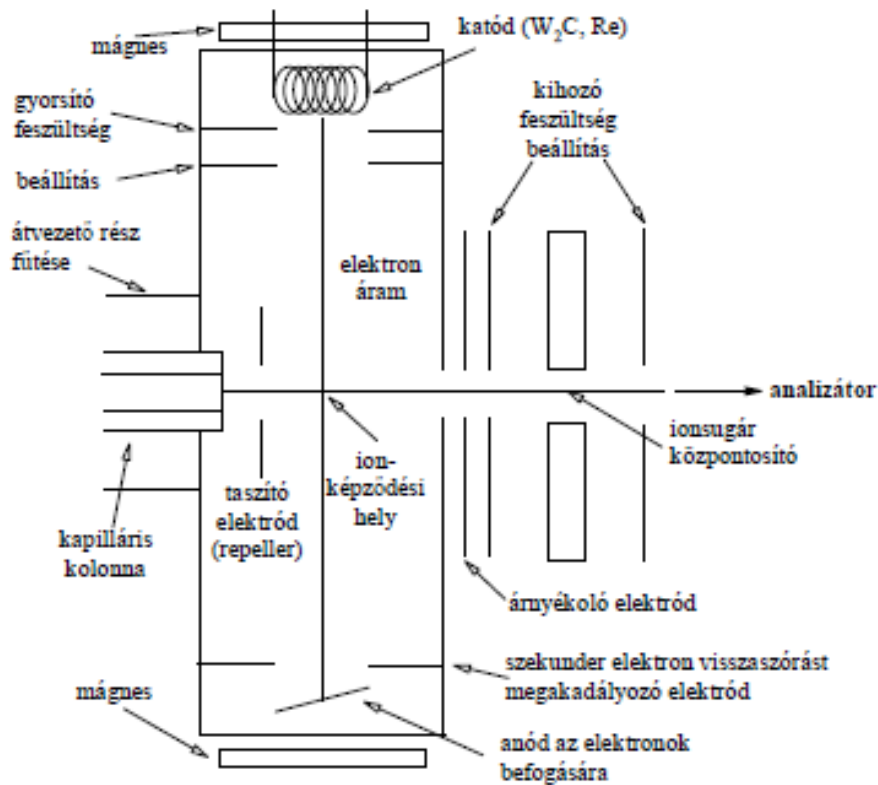


## Ionforrások

- feladat: a molekulákból ionokat állít elő

## EI: elektronionizációs forrás

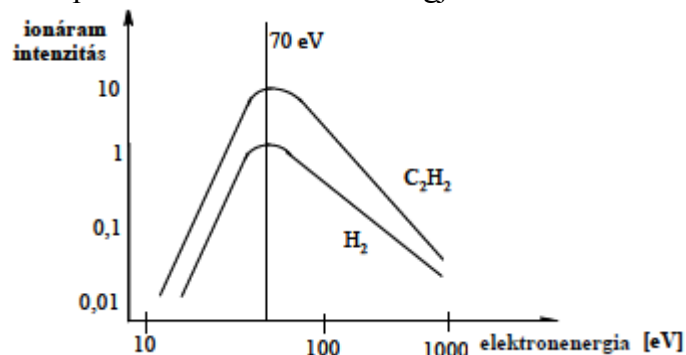
- **feszültségkülönbség hatására gyorsított elektronokat** használnak az ionizációhoz
  - katód (wolfram, rénum) fűtése (200°C-ig) → elektron áram megindul
  - amennyiben az elektron energiája megfelelő, még az ionképződési helyen a molekula adszorbeálja → elektron szakadhat ki a molekulából
    - kb. minden 1000. molekulából képződik egy ion
    - $M + e^- \rightarrow M^{\cdot+}$  (molekulaion) +  $2e^-$
    - mivel a szerves vegyületek első ionizációs energiája jóval kevesebb, mint **70eV** (7-15eV), a molekula **fragmentálódik** – „**kemény ionizáció**”
      - mindig a leggyengébb kötés szakad el először → információ a szerkezetről
      - nem jó, ha túl sok darabra esik szét és a molekulaion már nem is látszik
  - az elektronok az anódba csapódnak – szekunder elektronok is keletkeznek becsapódáskor → ezeket egy elektróddal visszatartják
  - a kamrában képződő pozitív ionokat taszító és kihúzó feszültséggel kijuttatják
  - az ionsugarat mágnessel fókuszálják



5.1.2. ábra

### Elektronionizációs ionforrás felépítése

- 1 eV (elektronvolt): annak az elektronnak az energiája, amelyet 1 V feszültség gyorsít
- rutinméréseknél: 70eV, egyéb esetben 0-100 eV között változhat
  - 70eV-nál kapjuk a legnagyobb ionáram intenzitást → legnagyobb érzékenység → legkisebb kimutatási határ + lehetséges lesz a más laboratóriumokkal való adatösszevetés (spektrumkönyvtár: ehhez is rögzített ionizációs feszültség kell, mert ha minden laborban ugyanakkora feszültséget használnak, akkor a molekula darabolódása csak a szerkezetétől függ)
  - minél kisebb az ionizáló feszültség, annál kevesebb számú fragmens ion képződik + a molekulaion megjelenése valószínűbb



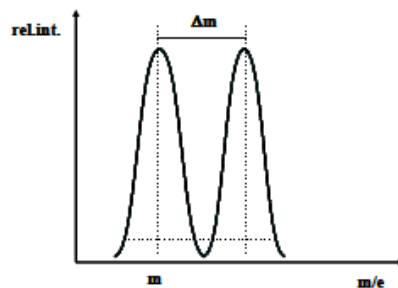
- az ionforrást fűteni kell, hogy az anyagok ne kondenzálódjanak

## CI: kémiai ionizációs ionforrás

- ugyanolyan a felépítése, mint az EI-nek, de itt a vegyület egy **közvetítő gázzal** (CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>10</sub> – nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban, mint a vizsgálandó anyagok) ütközve ionizálódik
  - az ionizációs térben így nagy nyomás van az EI-hez képest
  - kisebb a vegyületnek átadott energia – „**lágymionizáció**” → kisebb fragmentálódás mértéke – a **molekulaionról** kapunk elsősorban infót
    - emiatt az egy ionra jutó intenzitás nagy → nagyobb érzékenység
- ionizáció lehetőségei:
  - elektronvesztés [M]<sup>+</sup>, protonálódás [M+H]<sup>+</sup>, ionasszociáció (a reagens gáz ionjaival adduktot képezhet), negatív ionizáció (pl. CH<sub>4</sub>+N<sub>2</sub>O – nagy elektronegativitású elemet tartalmazó szerves vegyületnél jó)

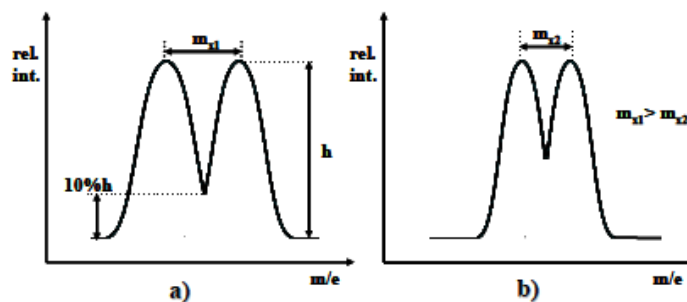
## Ion/Tömeganalizátorok

- feladatuk:
    - felbontják az ionsugarakat m/z és (m+Δm)/z értékű (thomson) sugarakra
      - **TÖMEGFELBONTÁS** definíciója:
        - **$R_m = m/\Delta m$**  (Δm: a legkisebb tömegkülönbség, amelyet még meg tudunk különböztetni)
        - **nincs egységes értelmezése a tömegfelbontásnak**
- példák a definíciókra: Két egyenlő magasságú csúcs még megkülönböztethető, ha (i: 5.3.1. ábra) a görbék az alapvonalon érintkeznek 5σ-ás statisztikai biztonsággal (0 völgy definíció), (ii: 5.3.2. ábra a.) ha köztük lévő völgy magassága kisebb a csúcs magasságának 10%-nál, (iii: 5.3.2. ábra b.) 50%-nál.



5.3.1 ábra

Nincs átfedés: 0 völgy definíció



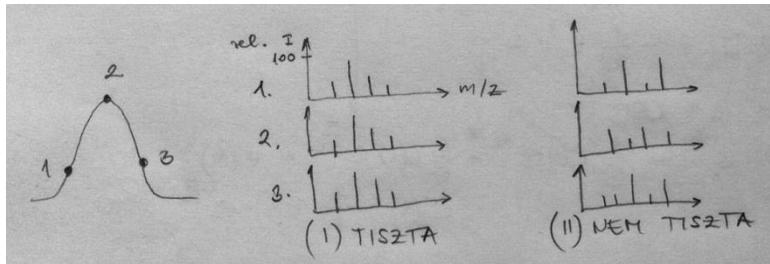
5.3.2 ábra

→ rögzíteni kellene a tömegszámot és hogy a tömegkülönbségeket a Gauss-görbe milyen jellemző értékénél mérjük és

- **kis felbontású (1000-2000):**
  - egy tizedesjegy pontossággal adja meg a tömeget
  - **Q, IT, TOF (reflektron nélkül)**
- **nagy felbontású (>10.000)**
  - **pontos tömegmérés: 4 tizedes jegy** pontossággal adja meg a tömeget (a hibát ppm-ben szokták megadni)→ az **összegképlet** ennek segítségével prediktálható egy **spektrumkönyvtár** segítségével (csupán a molekulaion tömegéből a szerkezet nem adható meg!)
  - nagyon kicsi anyagmennyiség kimutatására is alkalmas
    - pl. neurotoxikus anyagok
  - az 1%-nál kisebb izotóparányok is látszanak
  - **szektoros, reflektronos TOF, MALDI** (ez offline)
- **SZELEKTIVITÁS:** annál jobb, minél jobb a felbontás
- maximalizálja az ionsugarak intenzitását→ ez meghatározza az **ÉRZÉKENYSÉGET**
  - az érzékenységet a **transzmisszió** határozza meg – azaz az analizátor belépő nyílásától az ionok hány %-a jut el a detektorig
  - nagy transzmittancia→ kisebb felbontás!!! (**az érzékenység és a szelektivitás nem növelhető egyszerre**)
  - **nagy felbontás esetén az érzékenység változása:**
    - az abszolút jelintenzitás csökken, de a zaj intenzitása is (elektronikusan is szűrhető) – összességében a **jel/zaj arány javul!**
- **mindig kell referencia anyag!**
- 2 üzemmód
  - **pásztázó (scan):** egy tömegtartományt mérünk (pl. 0-3000V)
    - akkor jó, ha pl. meg kell mondanom, hogy milyen szennyezők vannak egy mintában
    - hátrány: kevés spektrumot akkumulál→ kisebb érzékenység
$$\sqrt{n} = \frac{j_{el}}{z_{aj}}$$
(az NMR-nél is ez az összefüggés érvényes)
  - **kiválasztott ion monitoring/recording (SIM/SIR):** 2-3 kiválasztott ion tömegét mérjük (csak az ionokhoz tartozó feszültségen mérek)
    - a felvételszám nő→ nagy érzékenység
    - minél többféle feszültségen mérek, annál kevesebb lesz az egy ionra jutó felvételek száma
    - min. 2 iont érdemes kiválasztani:
$$\frac{I(M_1^+)}{I(M_2^+)} = \text{állandó } (\pm 10\%),$$
 ahol I az intenzitás

- **csúcstisztaság vizsgálat:**

- egy kapott csúcs egy vagy több komponensnek felel-e meg
- veszünk 3 pontot a csúcson és megnézzük, hogy a pontokhoz tartozó spektrumok egy komponenshez tartoznak-e:



- csoportosítás

- **szektor típusú**

▪ fajtái:

- egyszeres fókuszálású mágneses szektorú
- kétszeres fókuszálású mágneses és elektromos szektorú

- ezek nagy felbontású, nagy tömegtartományú készülékek
- pl. dioxin kimutatására

- **kvadrupól**

▪ fajtái:

- kvadrupól (Q, régi neve: lineáris kvadrupól)
- ioncsapdás ionanalizátor (IT – ion trap, régi neve: ioncsapdás kvadrupól)

- **oszcilláló** elektromos térben választják el az ionokat

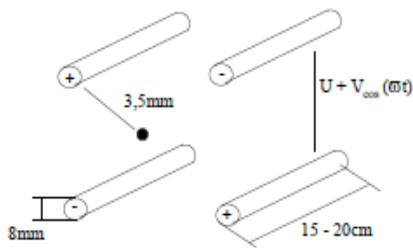
- kis és közepes felbontás, közepes tömegtartomány, max. mérhető tömeg: **3000Da**

- **repülési idő analizátor (TOF)**

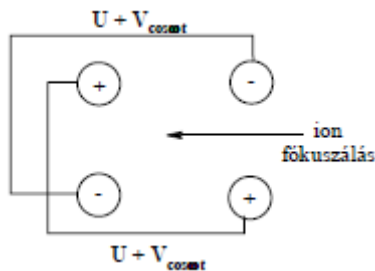
- az elektromos térben a kisebb tömegű ionok gyorsabban mozognak
- régen kis felbontás és kis tömegtartomány – ma már nagy és közepes mindkettőre nézve, **max. mérhető tömeg: ennél a legnagyobb** (elméletileg bármekkora tömegű lehet)
- rendkívül gyors! →GCxGC-hez csak ezt és a FID-et lehet használni emiatt (ld. később)

- **hibrid** analizátorok: egyes analizátorokat egymás után sorba kötjük pl. Q-TOF

## Kvadrupól:

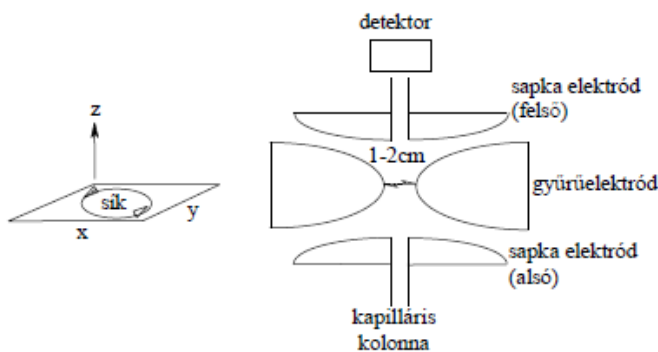


ahol:  $U = 0-130\text{V}$ ,  $V = 0-800\text{V}$ ,  $f = 1-3\text{MHz}$



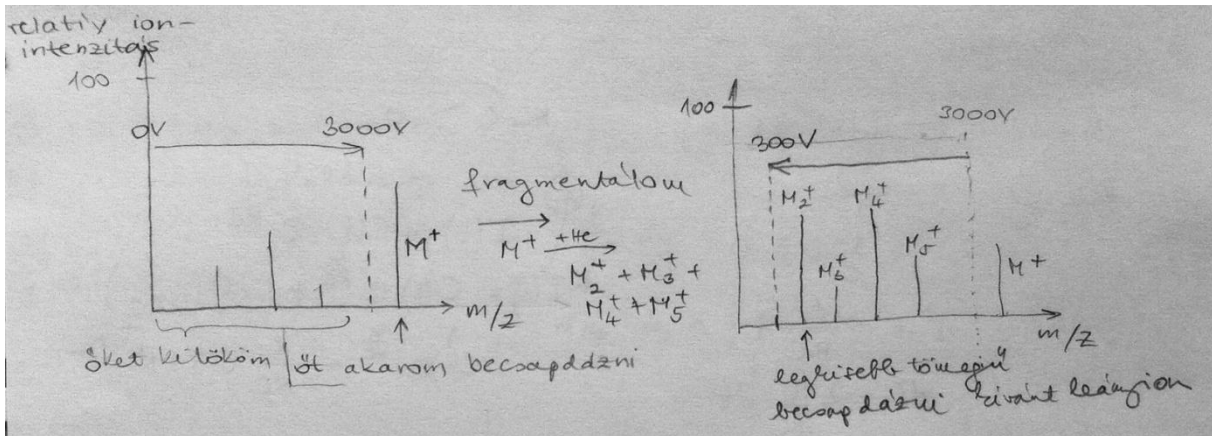
- $U$ : egyenfeszültség
- $V$ : az egyenfeszültségre szuperponált váltófeszültség → a rudak potenciálja folyamatosan változik
- az ionok a rudakkal párhuzamos tengelyre merőlegesen **oszcilláló mozgást** végeznek
- **instabil ionok**: az áthaladás során az amplitúdójuk eléri a rúd távolságát → becsapódik
- **stabil ion: áthalad** – ez adott belépési szög, keresztmetszet,  $U/V$  arány mellett csak egyetlen  $m/z$  ionra igaz (pontosabban egy szűk  $m/z$  intervallumra)
- viszonylag magasabb nyomáson működik ( $10^{-3}$  Pa)

## Ioncsapda:



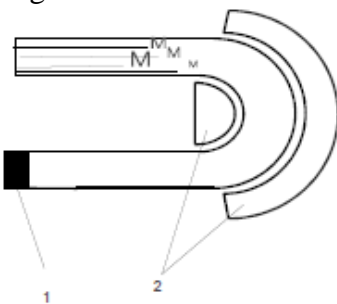
- részei: egy ún. gyűrű elektród + két sapka elektród
- az ionok forognak x-y síkon és **rezegnek z irányban**
- a gyűrűre kapcsolt váltakozó feszültség növelésének hatására a z irányú amplitúdójuk nő → kilépnek a csapda teréből – először a kisebbek (a feszültség növelésével egyre nagyobb ionok válnak instabillá)
- a térben az ionok egymásra is hatnak (taszító kölcsönhatás) és egymás erőterében is eltérülhetnek → előbb is kiugorhatnak (a jelenség neve: **tértöltés**)
  - ez az effektus csökkenthető, ha az ioncsapdába He-t vezetünk
- **tandem MS-re alkalmas**
  - a csapda képes **adott  $m/z$  értékű ionokat ( $M^+$ ) tárolni**
    - a csapdázás előtt eltávolítják a kisebb, nem kívánt  $m/z$  értékű ionokat azzal, hogy addig növelik a feszültséget, amíg az  $M^+$ -nál kisebb ionok ki nem ugranak
    - ezután az egyenfeszültséget nullára állítják → csapdába kerül az  $M^+$
  - a váltakozó feszültség értékét lejjebb visszük annyira, hogy a fragmentálódás után keletkezett ionok közül a legkisebb becsapdázni kívánt ion még bent maradjon

- **fragmentálás:**  $M^+$  energiáját szabályozott körülmények között növeljük az egyenáramú feszültség növelésével → a csapdázott ionok fragmentálódnak (ütközési gázt pl. He használunk ehhez)
- a képződő ionokat növekvő feszültséggel pásztázzuk (ez a folyamat többször ismételhető:  $MS^n$ , ahol  $n=9-10$  is lehet, bár GC esetén 2-nél nem érdemes tovább menni)
  - időbeni tömegelválasztás
  - szelektivitás nő
  - minőségről is infót kapunk



## TOF:

- az ionok tömegüktől függően **különböző sebességgel** mozognak (kisebb m nagyobb sebességgel mozog) → más-más időpontban érik el a detektort
  - a detektor  $\mu s$ -os különbségeket is észlel
- DE az azonos értékű ionok az ionforrásból nem pontosan ugyanakkora kinetikus energiával lépnek ki → kis felbontás
- erre megoldás: **reflektron/iontükör** (a mérendő ion töltésével megegyező polaritású)



26.3.5.7.b ábra

A TOF analizátor elve 1 = detektor, 2 = mágnes

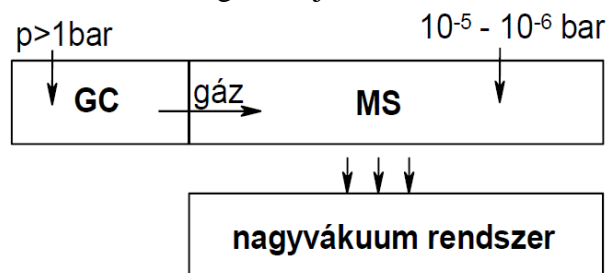
- az úthossz megnő
- mágneses erőter segítségével „körpályára” kényszerítik az ionokat
  - a kisebb tömegű ionok a külső, míg a nagyobbak a belső köríven repülnek
  - az azonos  $m/z$  ionok közötti inhomogenitás (kinetikus energiák közti kül.) is csökken → nagy felbontás (a reflektron polaritása azonos a vizsgált ionéval, így az ionok a reflektronba érkezve lelassulnak, megállnak, majd újra felgyorsulnak –

a nagyobb kinetikus energiával érkező ionok mélyebben hatolnak be és tovább tartózkodnak ott, emiatt később, de nagyobb kinetikus energiával lépnek onnan ki → a detektort azonos időben érik el, mint a kisebb kinetikus energiával érkezők

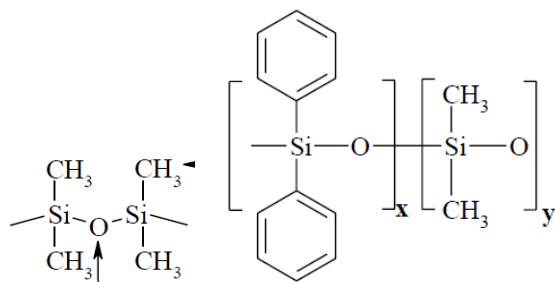


## GC-MS összekapcsolási lehetőségei

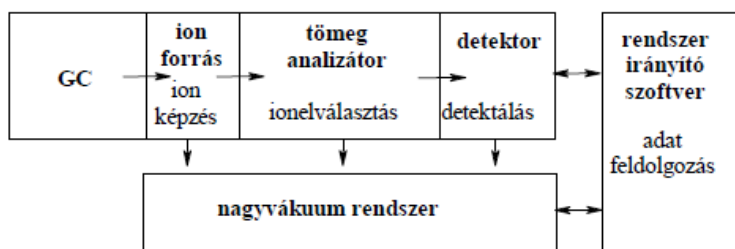
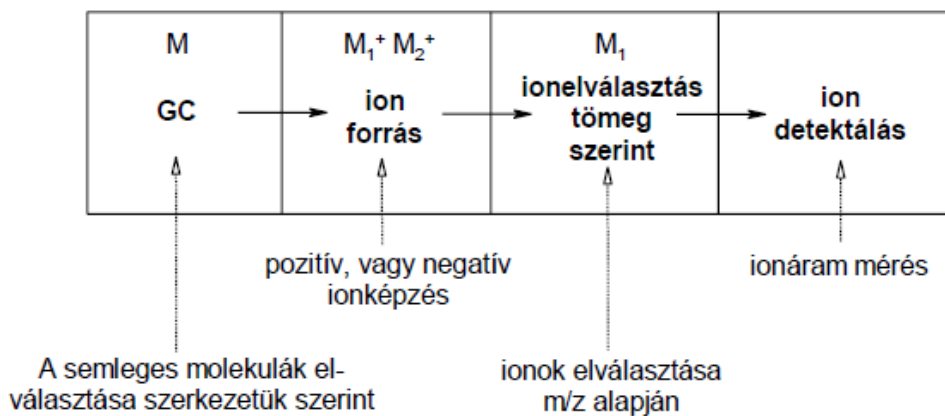
- GC-ből nyert információ: retenciós idő
  - o **baj:**
    - **referencia anyag** mérése szükséges (akkor lehet egyezés, ha a két retenciós idő megegyezik)
    - a mintában más vegyület is lehet, aminek ugyanakkora a retenciós ideje, így **átlapolás/interferencia** jöhet létre a csúcsok között
    - **vegyületek szerkezetére nem ad infót**
  - MS kell
  - o (megj.: a vegyületek 10-20%-a vizsgálható GC-vel)
- a GC is kiegészítheti az MS-t, mivel az MS nem képes különbséget tenni az **izomerek** között, de a GC és az LC szét tudja őket választani megfelelő körülmények között
- kapcsolt, kötőjeles (hyphenated) technika
- **a GC-MS esetén egy anyag azonosításához tehát szükséges:**
  - o **a komponens retenciós ideje összevetve a referencia anyag retenciós idejével**
  - o **tömegspektrum (referenciával)**
- **a kapcsolásnál figyelni kell, hogy:**
  - o az MS **nagy vákuummal** működik – a GC nem → **csak kis áramlási sebességgel (1-5 ml/perc)** működő GC-t lehet MS-hez kötni, különben a nagy áramlási sebesség lerontja a vákuumot



- a töltetes kolonnák kiestek (30-60 ml/perc)
- kapilláris kolonna használható
  - közvetlen kapcsolat csak kis belső átmérőjű (0,1-0,3mm, filmvastagság  $1 \mu\text{m}$ , apoláris és közepesen poláris) esetén (1-5 ml/perc)
    - DE ilyen kolonnán a nagy illékonyságú, szobahőmérsékleten forró anyagok (pl. diklórometán, kloroform) nem mérhetők, mert túl kicsi lenne a visszatartásuk
- o a kolonnák állófázisa elég stabil legyen, különben **kolonnavérzés** felléphet → a kolonnáról leszakadt molekulatömegek megjelennek a tömegspektrumon
  - minél nagyobb a filmvastagság, annál jelentősebb a vérzés → kis filmvastagság kell
  - hőstabil anyag kell pl. polidimetil-sziloxán az egyik legjobb (300-350°C, apoláris), de a fenil-csoportokkal helyettesített sziloxán is jó (ez kicsit polárisabb az aromás gyűrű miatt)



- egyéb feltételek, amikre az MS miatt figyelni kell
  - o **csak ionokat tud egymástól elválasztani!** (↔ a GC-ben nem választhatók szét ionos anyagok)



5.1. ábra

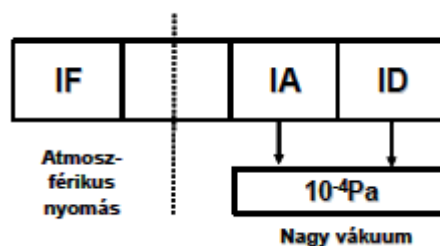
A GC összekötve MS-sel

- GC-hez használt ionforrások:
  - o leggyakoribb: EI
  - o ritkábban CI
- GC-hez használt tömeganalizátor:
  - o kvadrupól (GCxGC-hez csak ez jó!)
  - o ioncsapda
  - o TOF

## LC-MS

### - probléma:

- **eltérő halmazállapotok** vannak a két módszernél – 1ml folyékony mozgófázisból több 100-szoros térfogatú gőz keletkezhet és ha ezt vákuumba kell beküldeni,  $10^9$ -szeres térfogat növekedést is jelenthet!
  - LC: folyadék
  - MS: gőz, még hozzá nagy vákuum!
- megoldás: az ionizációt elkülönítik a ion/tömeganalizátortól
  - **az ionforrás atmoszférikus nyomás alatt** van ( $\leftrightarrow$  GC-vel közvetlenül kapcsolt ionforrás is nagy vákuum alatt van)
  - az ion/tömeganalizátor és az iondetektor nagy vákuumban  
IF = ionforrás, IA = ionanalizátor, ID = iondetektor



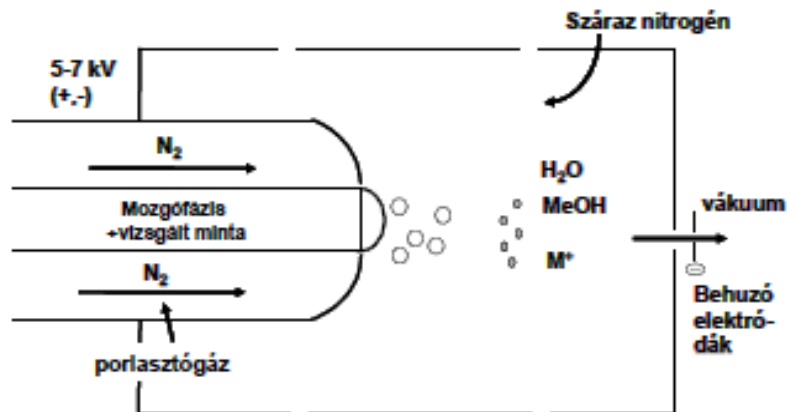
- olyan ionforrásokat lehet csak használni az LC-hez, amelyeknél kicsi az ionizációs energia → ez az ionizációs energia nem lesz elég minden esetben – sokféle molekula (pl. dioxinok és más apoláris anyagok, cukrok és cukorszármazékok) nem ionizálódnak → az MS nem lesz általános detektora a HPLC-nek
- a **kis ionizációs energia** miatt ionelnyomás, illetve ionerősítés is érvényesülhet
  - **ionelnyomás**: ha a mátrix „elveszi” azt a kevés energiát is a meghatározandó anyag elől (ezeket ilyen esetben még a mintaelőkészítés során el kell választani a mérendő komponenstől)
  - **ionerősítés**: egyes mátrix komponensek viszont elősegíthetik a vizsgált anyag ionizációját
- **az ionforrásba szilárd anyag nem kerülhet!**
  - nem minden puffert lehet a HPLC mozgófázisához használni, mert valamelyik nem párolog el (ionpár kromatográfiánál ezért eleve nem is használható)
  - használható **pufferek**: savas – ammónium-formiát, -acetát, -citrát; lúgos –  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  – ez szerves, de hőre könnyen bomlik, így nem kerül szilárd anyag az MS-be (lúgos)
  - NEM használható: szerves pufferek pl.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , foszfát (pedig UV-detektornál ez a legjobb)
  - megj.: **pufferek** = hatásukra az oldat pH-ja egy bizonyos tartományban savanyítással vagy lúgosítással szemben stabilabb lesz („tompító hatás”), egy gyenge sav és annak egy erős bázissal alkotott sója vagy egy gyenge bázis és annak egy erős savval alkotott sója  $\leftrightarrow$

szakzsargonban nevezik pl. a gyenge savakat is „puffernek”, mert tompító hatású, de ez helytelen megnevezés

- a kolonna legyen **kis vérzésű**, különben megjelennek a leszakadt részek a tömegspektrumban
- használják gyógyszer hatóanyagok vizsgálatára
  - ezek általában már eleve só formájában vannak – nincs baj az ionizációval

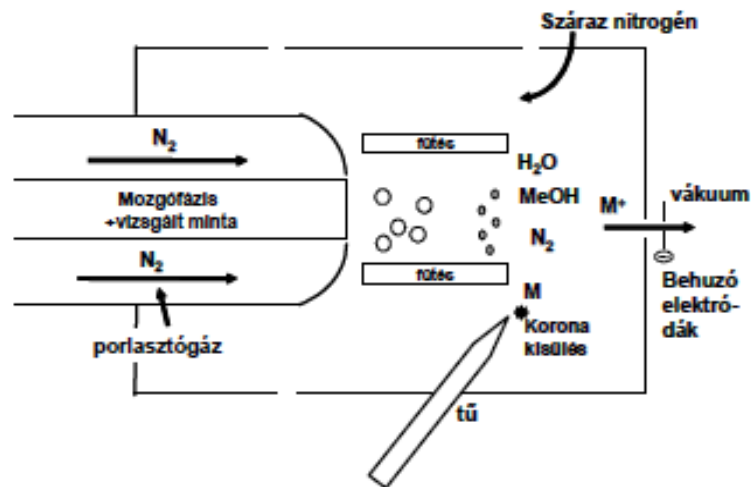
**LC-hez használható ionforrások: atmoszférikus nyomású ionforrások:**

**ESI: electrospray/elektroporlasztásos ionizáció**



- a HPLC-ből érkező mozgófázist egy porlasztó tűn (fém kapilláris) keresztül pumpáljuk be az ionforrásba (a tűre feszültség van kapcsolva)
- a tű és az őt körülvevő fél-henger alakú elektród között 3-5kV feszültségkülönbség van → elektromos mező jön létre → feltölti a folyadék felszínét és töltött folyadékcseppek jönnek létre
- a folyadékcseppeket a meleg N<sub>2</sub> hatására zsugorodni kezdenek → a csepp töltéssűrűsége nő, és amikor meghaladja az ebből adódó taszító erő a felületi feszültségből adódó összehúzó erőt (Rayleigh stabilitási határ), akkor további cseppek szakadnak le (Coulomb robbanás) → gázfázisú ionok keletkeznek a cseppekből egy idő után
- egyszeresen vagy többszörösen + és - töltésű ionok is keletkeznek:  $[M+nH]^{n+}$  és  $[M-nH]^{n-}$  (ha többszörös töltésű ionok keletkeznek, ekvidisztáns tömeg sorozatokat látunk a spektrumon – hiszen az x tengelyen az m/z jelenik meg)
- **inkább poláris, töltött, oldatban ionizált vagy heteroatomos molekulákra pl. fehérjék, oligonukleotidok**

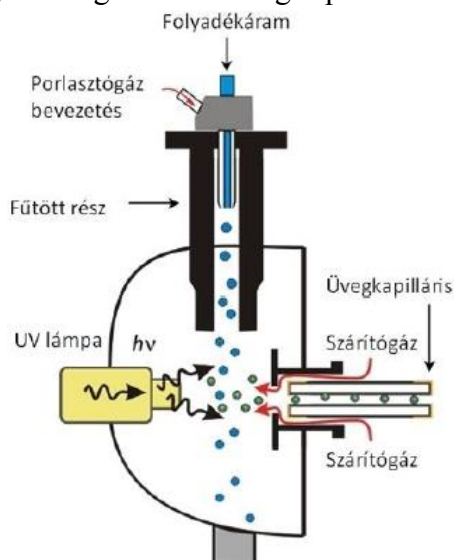
## APCI: atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció



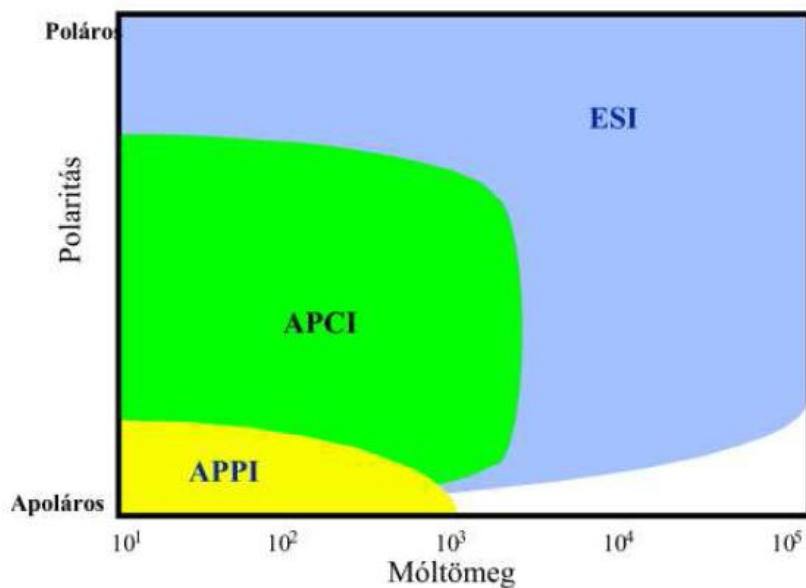
- hasonló az ESI felépítéséhez, csak itt nem töltött cseppek válnak le a kapillárisról
- 250-450°C-os nitrogén gáz párologtatja el a porlasztott cseppeket
- a gázfázisú molekulák egy korona kisülési tűn ionizálódnak
  - o először a mozgófázis molekulái ionizálódnak (protonfelvétel) és ezek adják át a töltésüket a vizsgált molekuláknak
- lágy ionizáció, **kevésbé poláris molekulákra**

## APPI: atm. nyomású fotoionizáció

- erős intenzitású UV-lámpa:
  - o  $M + hv \rightarrow M^{\cdot+} + e^-$
- fényelnyelő reagens is szükséges pl. toluol



- **nagyon apoláris molekulákra** pl. policiklusos aromás szénhidrogének (PAH), szteroidok



### (MALDI)

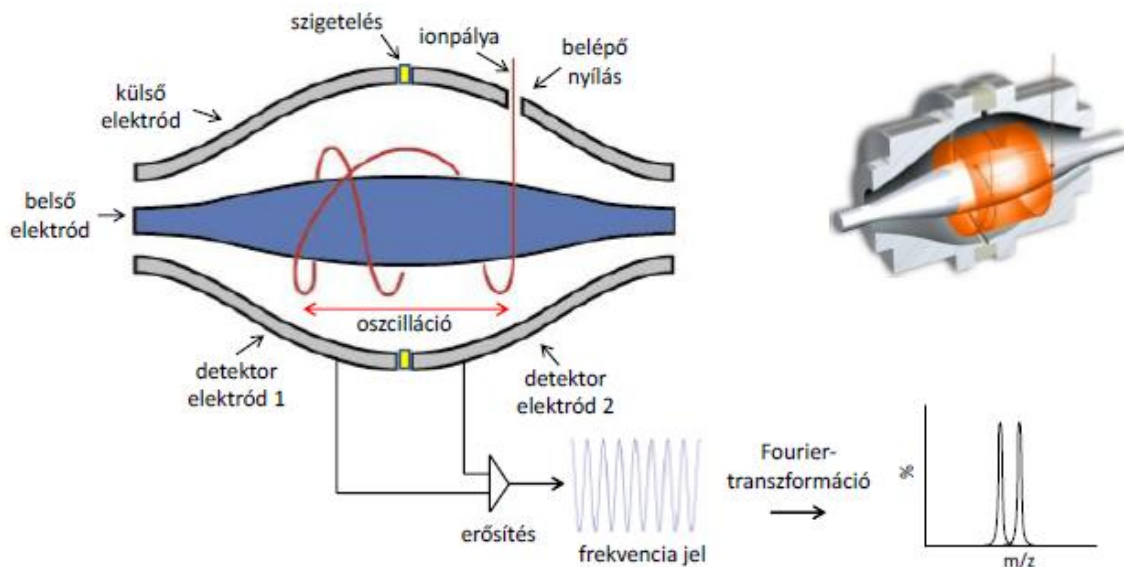
- ez offline technika
- a mintát először LC-vel preparálni kell, majd utána, offline módban lehet csak az MS-re vinni, tehát LC-hez nem köthető
- nagy molekulatömegű anyagok vizsgálatára pl. fehérjék

### **Ionforrásokkal kapcsolatban át kell gondolni:**

- **a lágy ionizáció** során
  - a kis molekulatömegű anyagok nem fragmentálódnak → a molekulaiont látjuk, viszont így **kevés szerkezeti információt kapunk**
  - a nagy molekulatömegű anyagok sem fragmentálódnak, viszont itt több jelet fogunk látni, mert a nagy molekulákon több protonálható csoport van, így többszörösen fog ionizálódni
- ha darabokra akarjuk törni a molekulákat, további egységet kell beiktatni
  - **ütközési kamra (CID)** beiktatása, ahol fragmentálódnak az ionok, majd ezeket is meg lehet mérni egy MS-sel (**LC-MS-MS**)
    - He-t vagy más ütközési gázt vezetnek be, és a molekulaion az ezekkel való ütközések során nyert többlet energia miatt fragmentálódik (feszültséget is adnak a kamrára)
    - az így keletkezett ionokat tovább vezetik egy MS-be, ahol már minőségi/szerkezeti információkat is kaphatunk az „anyaionról”

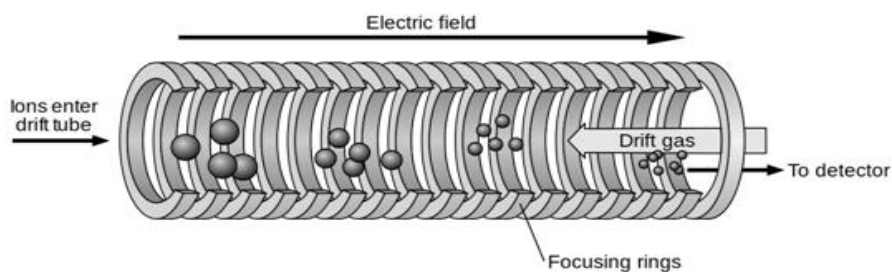
### LC-hez használható tömeganalizátorok:

- **kvadrupól:** kis felbontású
- **ioncsapda:** kis felbontású
- **TOF:** a reflektoros nagy felbontású
- **Orbitap**
  - mágneses térben ciklotron mozgásra készíti az ionokat



### ○ kapcsolt technikák pl.:

- kvadrupól(Q)-Orbitap
- Q-IM-TOF
  - **IM MS: ion mobilitás/ionmozgékonyság spektrométer**
    - elve hasonlít a TOF-ra, de itt nitrogén árammal szembe mennek az ionok, így nemcsak az  $m/z$ -ből adódó **sebességük** lesz a meghatározó (minél nagyobb tömegű, annál lassabb), hanem az is, **hogyan ütköznek a nitrogén molekulákkal**
    - az ütközések hatása miatt az izomereket is szét lehet választani! (ez a többi tömeganalizátornál nem lehetséges)



## Összefoglalva:

- **LC-MS** (LC→ionforrás→tömeganalizátor→detektor):
  - o a lágy ionizáció miatt **szerkezeti információt nem ad** (az LC-hez kapcsolható ionizációs technikákkal legfeljebb csak kis mértékben fragmentálható a molekula)
  - o DE szelektívebb az UV-detektornál (látjuk, ha két csúcsátfedésben van)
- **LC-MS-MS** (LC→ionforrás→tömeganalizátor→CID→tömeganalizátor→detektor)
  - o az ütközési kamrában fragmentálódik az ion→ **szerkezeti információt is** nyerhetünk
- **LC-MS<sup>n</sup>**: ioncsapda

## MS-sel kapcsolható LC technikák

- o NPLC (normál fázisú):
  - a mozgófázis apolárisabb, mint az állófázis→ nehezen ionizálható az oldószer ↔ az LC-hez használható ionforrások ezt megkövetelik → nem egyszerű összekötni→ rutinszerűen NEM használják
- o **RPLC** (fordított fázisú):
  - a mozgófázis polárisabb (pl. víz, MeOH) – ionizálható
  - a mozgófázis csak illékony puffert tartalmazhat
- o RP-IPLC (fordított fázisú ionpár):
  - kis molekulatömegnél sókat használnak – nem jó LC-vel összekötni
  - fehérje esetén: a meghatározandó ion töltésével ellentétes töltésű hidrofóbionként illékony triklór-ecetsavat használnak – ezt lehetne csak
- o **IE** (ion exchange, ioncserés krom.):
  - illékony sókat kell alkalmazni pl. ammónium-klorid (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> NEM)
- o **HILIC** (hidrofil kölcsönhatás krom.):
  - állófázisa poláris szilikagél vagy poláris csoportokkal módosított szilikagél + mozgófázisa kevésbé poláris – ugyanazt a mozgófázist használjuk, mint a RPLC-nél (víz, ACN/acetonitril – a szerves oldószer aránya nagyobb kb. 90-95%)→ azokra kell figyelni, mint az RPLC esetén
- o SEC (méretkizárásos):
  - gyakorlatilag NEM használják MS-sel, mert nagy mennyiségű szerves oldószerrel is használják



## FEHÉRJE ANALITIKA

- a fehérje analitikában az elválasztástechnikai módszerek az alábbiakban segítenek:
  - o a mátrix egyszerűsítése (sok zavaró komponens elválaszthatunk)
  - o heterogenitás vizsgálata
  - o mennyiségi meghatározás
- elválasztási technikák
  - o LC
  - o MS
  - o elektroforézis
  - o NEM LEHET: GC, SFC

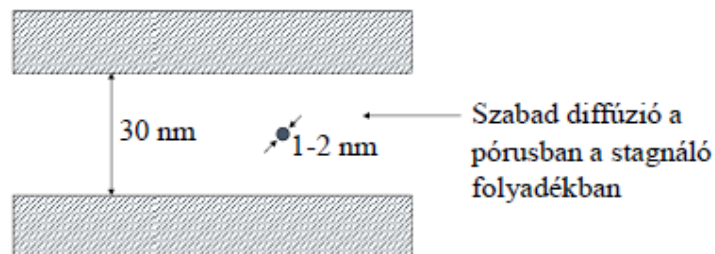
### LC módszerek részletesebben

**NPLC:** NEM jó, mert apoláris oldószerben nem lehet a fehérjéket oldani

### RPLC, RP-IPLC

- használható, a 2 fő LC-technika
- **kapcsolható MS-sel**
  - o kvadrupólhoz is (tömegtartomány felső határa 3000Da – fehérjék mérhetők, mivel többszörösen ionizáltak ld. m/z arány)
- fő problémák
  - o RP eluensek gyengítik a fehérjék hidrofób kölcsönhatásait → **denaturálódik** a fehérje (aktív formában nem frakcionálható)
  - o **nagy nyomás** → **hő termelődik** → **a fehérje konformációját megváltoztathatja** (a retenciós idő is változik) + denaturáció
  - o a fehérje **adott körülmények között az állófázishoz túl erősen kötődhet** → a visszanyerése jelentősen romlik
    - **savas környezetben** a fehérje aminocsoportjai protonálódnak:  $\text{-NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{-NH}_4^+$ 
      - azért van savas környezetben, mert az RP-IPLC-nél triklórecetsavat használnak ionpár képzéshez
    - az állófázis szilikagél alapú, így leógnak szilanol-csoportok, melyek deprotonálódnak, ha nem elég savas a környezet:  $\text{Si-OH} \leftrightarrow \text{Si-O}^- + \text{H}^+$
    - ekkor erős ionos kölcsönhatás jön létre a deprotonálódott szilanol- és a protonálódott amino-csoport között
    - nagyon alacsony pH-n (pl. pH 1) a szilanol-csoportok protonált (semleges) állapotban vannak, de még így sem kerülhető el teljesen ez a jelenség

- ezért ilyen kolonnát kell választani:
  - **Silica B** (nagy tisztaságú) – a Silica A típusú szilikagélek magas fémion tartalmúak, ezért ezek nem alkalmasak erre a célra
  - **a lehető legnagyobb felületi borítottságú töltetet** kell választani (minél kevesebb legyen a szabadon maradt szilanol-csoport)
    - **utószilanizált** töltet kell
- a hőmérséklet emelésével vissza lehetne nyerni a fehérjéket, de az a kolonnát már tönkretenné (max. 60°C-ig bírják, efelett nagyon gyorsan tönkremennek)
- egyéb fontos megfontolások:
  - milyen legyen **a töltet morfológiája** (minden fajtát lehet használni)
    - **teljesen porózus**
    - **részlegesen porózus (héjszerű)**
    - **monolit**
    - **nem porózus**
  - a töltet lehet:
    - szerves alapú (Silica B)
    - szerves szilikagél + szerves monomer
    - a hibrid pH tűrése jobb
    - DE pH 2 alatt bírnia kell (nagyon savas pH-n a Si-O-Si kötések hidrolizálhatnak)
  - töltet módosítása: C18, C4
  - **ne legyen porusgátolt diffúzió**

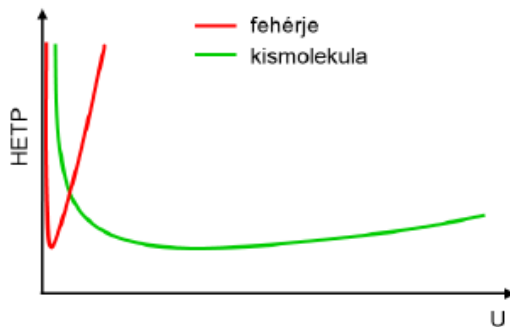


- a fehérjék átl. hidrodinamikai sugara: 1-2nm → az ideális pórusátmérő  $\geq 20\text{nm}$  (a biopolimer alapú töltetek mind 30nm-esek), hogy ne legyen gátolt a diffúzió a pórusokban
- DE a nagyobb pórusátmérő is okozhat csúcshévesedést

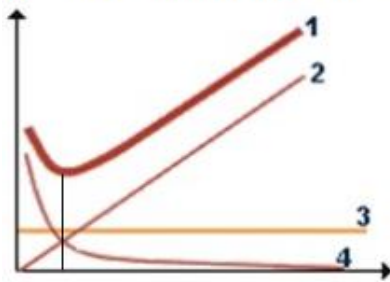
- **kinetikai hatékonyság: a diffúziónak** nagy szerepe van!
  - a van Deemter összefüggés írja le a kinetikai hatékonyságot befolyásoló tényezőket:

$$H = A \cdot d_p + \frac{B \cdot D_M}{u} + C \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M}$$

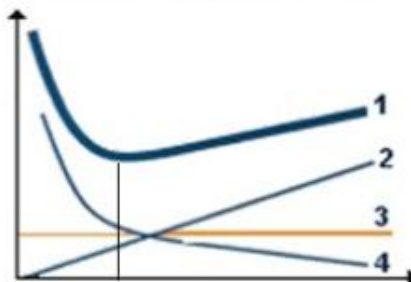
ahol  $d_p$ : szemcseátmérő,  $u$ : lineáris áramlási sebesség [ $\text{cm}^3/\text{s}$ ],  $D_M$ : diffúziós állandó, A tag: örvénydiffúzió, B tag: hosszirányú diffúzió, C tag: áramlási ellenállás



H, nagy molekulák esetén



H, kismolekulák esetén

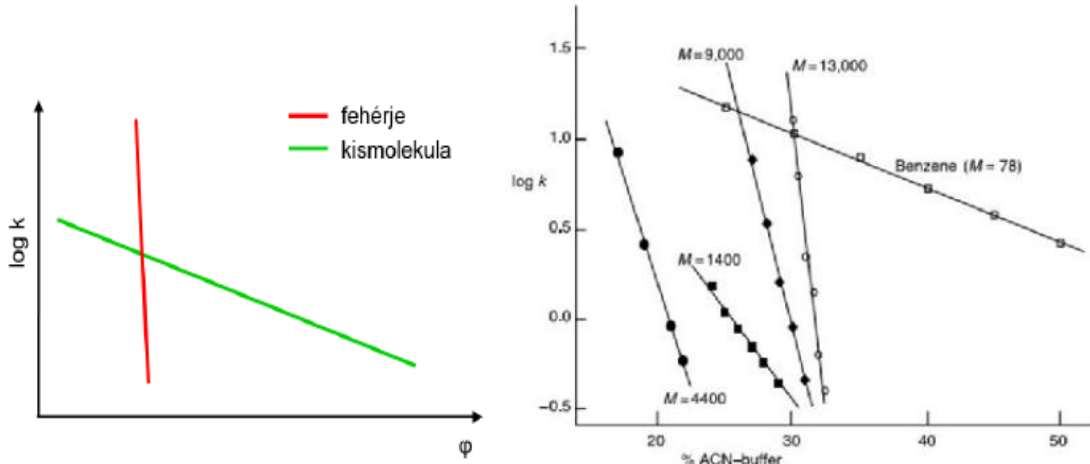


Eredő H (1)  
 Anyagátadás miatti diszperzió (2)  
 Visszakeveredés (3)  
 Axiális diszperzió (4)

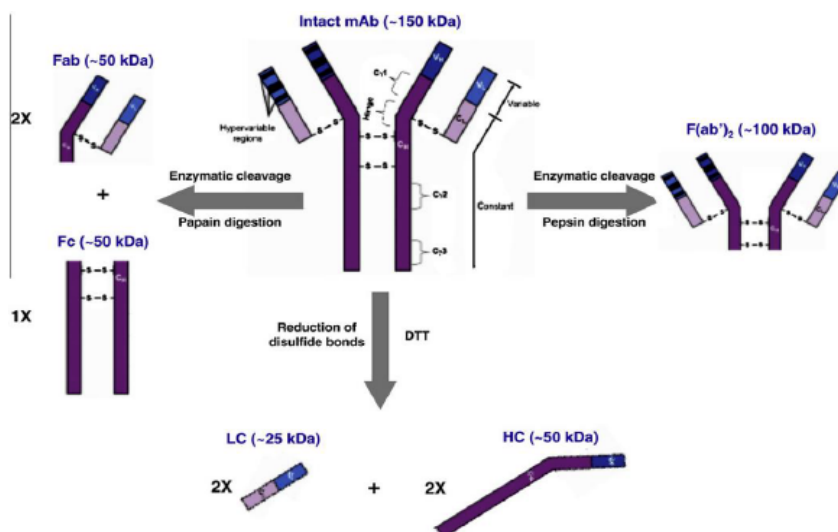
Optimálendő lineáris áramlási sebesség, v (cm/min)

- abban a sebesség tartományban, ahol mérni szoktunk, az anyagátadási ellenállás dominál → cél, hogy az anyagátadási ellenállás kicsi legyen → héjszerű töltetet kell alkalmazni (csak a külső héj átjárható → kicsi diffúziós úthossz)
- megj.: kis molekuláknál vastagabb a héj

- **MINDIG gradienselúciót** használunk
  - o gradienselúció: a **mozgófázis összetételét** (A és B eluens arányát) időben folyamatosan változtatjuk
  - o lineáris gradiensprofil (B eluens arányát lineárisan növeljük az idővel)
  - o lassú gradiensidő

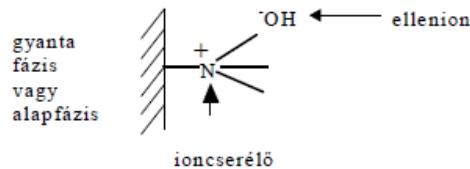


- $k$ : visszatartás/megoszlás  
ahol  $k = n_s/n_m$  ( $n_s$  a komponens mennyisége az állófázison,  $n_m$  a komponens mennyisége a mozgófázisban), minél nagyobb mennyiségben van a komponens az állófázison, annál lassabban jön le az oszlopról, tehát a visszatartása nagyobb lesz
- $\phi$  az egyik eluens aránya
- magyarázat: nagy molekulák esetén az eluens arány kis mértékű megváltoztatásával is nagy mértékben változik a molekula visszatartása  
→ nem lehet gyors gradienssel dolgozni
- RPLC előnye: jobb szelektivitás (pl. SEC-hez képest), mivel a mozgófázis változtatásával „bármilyen” retenciós idő elérhető
- ha túl nagy a vizsgált fehérje pl. monoklonális antitestek
  - o enzimés emésztés szükséges előtte és a fragmenseket (az antitest esetében könnyű és nehéz láncok) elemezzük RPLC-vel

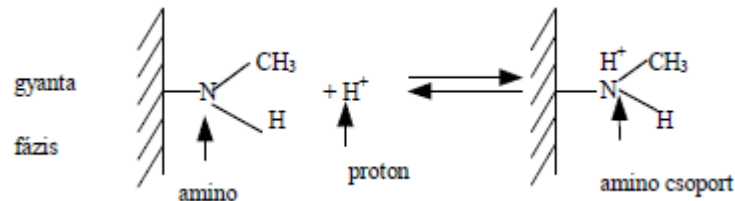


## IE

- ezt is gyakran használják
- vizes közeg → nem denaturálódik a fehérje (**aktív formában frakcionálható**)
- lehet
  - **erős ioncserélő**
    - pl. kvaterner ammóniumionnal (anioncserélő), szulfonil-csoporttal ( $-\text{SO}_3\text{H}$ , kationcserélő) módosított felület



- **gyenge ioncserélő**
  - pl. aminocsoporttal (anioncserélő) vagy karboxil-csoporttal (kationcserélő) módosított felület

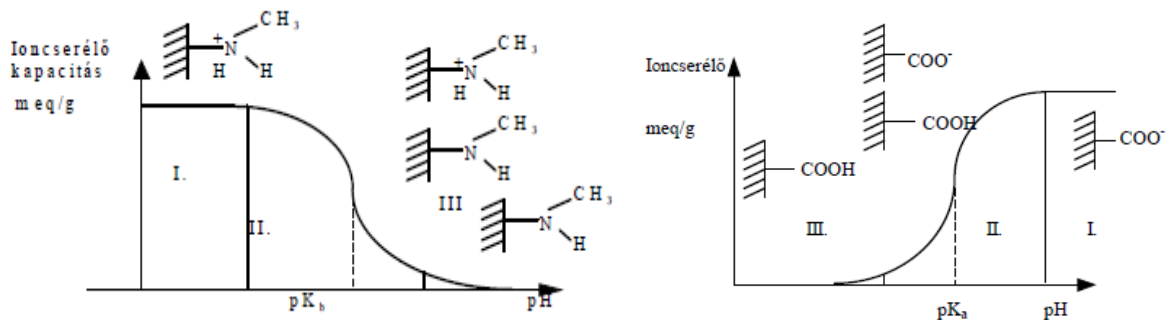


- ökölszabály: a gyengén ionizálható minták erős, míg az erősen ionos tulajdonságú összetevők gyenge ioncserélő töltetek alkalmazásával vizsgálhatók
- az anioncserélőkkel anionokat, a kationcserélőkkel kationokat vizsgálunk
- töltetek
  - alap alapján
    - általában szerves polimer alapúak
      - jó a pH tűrése: pH 1-12/13 használhatók
      - rossz a nyomástűrése
    - szilikagél alapú (erős kationcserélők)
      - jó a nyomástűrés
      - rossz pH tűrés
  - **morfológia** alapján
    - lehet bármilyen (porózus, nem porózus, héjszerű, monolit)
    - felületi ioncserélők:
      - nagyobb nyomást is kibírnak (ált. 200 bar a maximum)
    - nagy pórusú ioncserélők
      - max. 50-70 bart bírnak ☹

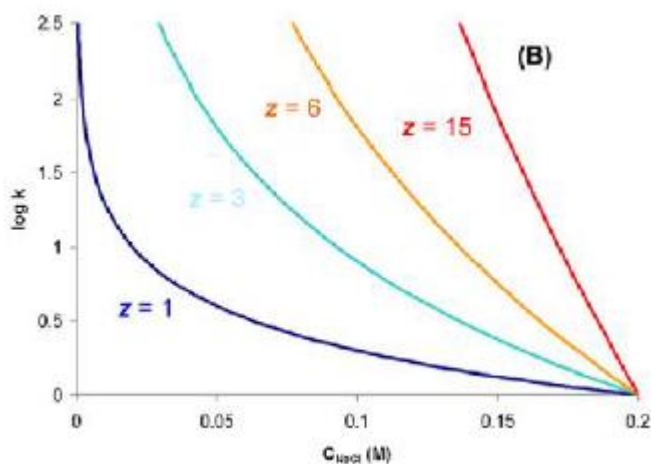
- **gradiens elúció**

○ **pH gradiens**

- a fehérje állapota és a gyenge ioncserélő állapota is egyszerre változik!
  - alapja: a pH befolyásolja mind a fehérje mind a gyenge ioncserélők töltését (az erős ioncserélőt nem befolyásolja – ettől „erős”)  
pl. erősen lúgos pH-n a fehérje karboxil-csoportjai (-COOH) és az amino-csoportjai (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) protonálódnak
- ioncserélő kapacitás függése a pH-tól:



- **só gradiens:** növekvő só koncentrációval csökken a visszatartás

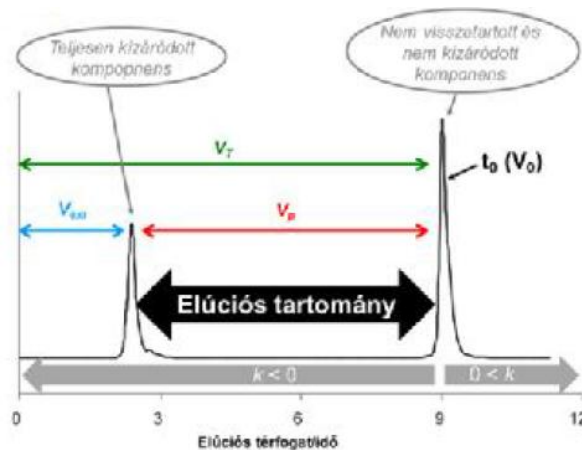


- minél nagyobb a fehérje eredő töltése, annál erősebben fog kötődni, így annál nagyobb sókoncentráció szükséges a deszorbeáláshoz

**HILIC:** elvileg használható, de nem jellemző + a mozgófázis > 50%-a szerves oldószer → denaturálódik

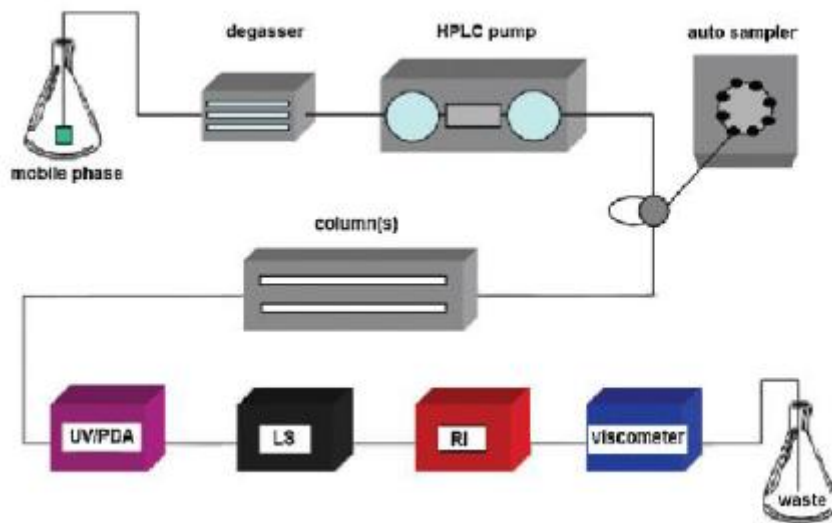
## SEC

- méretkizárásos krom. vagy más néven „géliszűrés”, „nagy hatékonyságú géliszűrés” (azért nagy hatékonyságú, mert a szemcseátmérőt lecsökkentik, viszont így nagyobb nyomást kell alkalmazni, ami nagyobb hőeffektushoz vezet)
- vizes közeg → nem denaturálódik a fehérje (**aktív formában frakcionálható**)
- a hőmérséklet, nyomás (hagyományos rendszerben 125bar) itt is befolyásolja a fehérje konformációját, ami megváltoztathatja itt is a retenciós időt
  - o túl nagy T és p mellett irreverzibilisen aggregálódhatnak is
- szilikagél alapot módosítják (poláris, de nem ionos módosítások), hogy a fent részletezett nem kívánt állófázis-fehérje kölcsönhatásokat kiküszöböljék pl. glicidil-éter
  - o élettartamuk korlátozott
- **a méretkizárás alapja a pórusátmérők és a vizsgált fehérje hidrodinamikai átmérőjének viszonya** (a retenciós idő emiatt nem igazán változtatható → **kisebb szelektivitás**)
  - o BEH 450 SEC kolonna:
    - BEH: ethylene bridged hybrid
    - 450: átlagos pórusátmérő [Å]
  - o  $V_{\text{teljes}} = V_{\text{szemcsék közötti}} + V_{\text{pórus}}$ 
    - a holtidőt a szemcsék közötti térfogat nagysága határozza meg
    - a pórustérfogat adja meg az elúciós tartományt – annak a komponensnek lesz visszatartása, ami bejut a pórusokba



- o a pórusméret ( $d_p$ ) behatárolja, hogy mekkora fehérjét tudunk vizsgálni
  - $d_{M, \text{átlagos}} > d_p$ : teljes kizárás
  - $d_{M, \text{átlagos}} < d_{p, \text{legkisebb pórus}}$ : teljes áteresztés  
→ a pórusátmérő a két érték közé kell hogy essen, különben mindent kizár, vagy mindent átereszt
- o megj.: UHPLC-s 1,7 $\mu\text{m}$ -es töltetek is vannak már (nagy nyomás kell!)
- CSAK **izokratikus** módszer van
- **100-300mmol só** (pl. NaCl) is adnak hozzá, hogy a nem kívánt szilanolos kölcsönhatásokat csökkentsék

- aggregátumok mérésére jól alkalmazható
- felépítése:



- o detektorok:
  - UV/diódasoros
    - legérzékenyebb a 4 közül
  - LS (light scattering, fényszórásos)
  - RI (refractive index, törésmutató)
  - viszkozitás mérése (egy kapillárison mért nyomásesés arányos lesz a fehérje méretével)

### **HIC (hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia)**

- kimondottan fehérjékre (az előzőek más biopolimerekre)
- az állófázis felülete „közepesen” hidrofób (C4, C6)
- gradiens elúció: sókoncentrációt változtatjuk ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ )
  - o kezdetben magas ( $1-4 \text{ mol/dm}^3$ ) → „kisózzuk” a fehérjét az állófázis felületére
    - ha túl magas a sókonc., könnyen kiválhat!
  - o sókoncentrációt csökkentjük → deszorpció → eluálódik a fehérje
    - először a polárisabb fehérjék eluálódnak

### **Egyéb kérdés: HPLC-ről át lehet-e térni UHPLC-re?**

- UHPLC hátránya: a szemcseátmérő csökkenésével nő a nyomás, mi a fent kifejtett problémákhoz vezet!
  - RPLC-nél mindkettőt használják
  - IE: az ioncserélő nyomástűrése nem jó → a HPLC jellemzőbb
  - SEC: mindkettőt használják

### **Kapilláris elektroforézis**

- elválasztási hatékonysága sokkal jobb, mint az LC hatékonysága
- DE kicsi az adagolható mennyiség