

## Tartalom

Bevezető.....	3
Történelmi visszatekintő: .....	3
Kromatográfiai csoportosítás .....	3
A kromatográfia alapegyenlete .....	4
A felbontást meghatározó tényezők (részletesebben).....	5
Elméleti tányérszám (N) – kinetikai hatékonyság.....	5
Szelektivitás ( $\alpha$ ).....	5
Visszatartás (k).....	6
A van Deemter egyenlet .....	6
GÁZKROMATOGRÁFIA .....	8
GC-vel vizsgálható anyagok.....	8
Minőségi meghatározás:.....	8
Adagolás és mintaelőkészítés .....	9
GC- kolonnák.....	9
Vegyületek jellege:.....	10
Kölcsönhatások:.....	10
Vegyület csoportok .....	11
Hőstabilitás és illékonyság növelése:.....	11
DetektorokGC-hez:.....	12
GC-vel meghatározható érdekesebb példák:.....	12
GCxGC.....	13
Példák GC-s mérésekre:.....	15
FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA (LC) .....	16
Áttekintés.....	16
ÁLLÓFÁZIS morfológiája lehet: .....	17
MOZGÓFÁZIS alapján:.....	17
DETEKTOROK: .....	18
Kölcsönhatások.....	19
Ionkizárásos Kromatográfia.....	20
Méret kizárásos Kromatográfia (SEC).....	20
Szuperkritikusfluid kromatográfia (SFC) .....	21
Állófázis: .....	21

Egyéb hasznos információ:.....	23
Összefoglaló a GC, LC, SFC technikákra: mi milyen hatással van a kinetikai hatékonyságra (N), szelektivitásra ( $\alpha$ ), visszatartásra (k) – NAGYON FONTOS!!! .....	23
GC:.....	23
LC:.....	24
SFC:.....	24
Kapilláris elektroforézis.....	25
Kapilláris zónaelektroforézis (CZE).....	27
Micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) .....	28
Kapilláris elektrokromatográfia (CEC) .....	29
Kapilláris gélelektroforézis (CGE) .....	29
DETEKTOROK (opcionális extra).....	30

Felhasznált anyagok:

órai jegyzet, diák

Felhasznált szakirodalom:

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

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

<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=360643-CEPrimer1.pdf> (megtekintés dátuma: 2016. április 16.)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846027/> (megtekintés dátuma: 2016. április 16.)

# BEVEZETŐ

## Történelmi visszatekintő:

1903: Mihail Tsvet: Botanikus – a kromatográfia „feltalálója”

- 2 cm-es üvegcső aljára üveggyapotot tett és  $\text{CaCO}_3$ -t: ez volt az adszorbens. Eluensnek petrolétert használt. Elválasztotta a növényi pigmenteket. ---(normál fázisú krom.)

Horváth Csaba

- Az első HPLC megépítése.
- Fordított fázisú kromatográfia

Halász István

- Gyors folyadék kromatográfia

Ettre László

- Perkin-Elmer műszere (Amerikában 1958-1990-ig dolgozott a Perkin-nél.)

Kováts Ervin

- Kováts index (gázkromatográfiás analitikai kémia területén, az illóolajok szerkezeti vizsgálata kapcsán nevéhez fűződik a retenció index bevezetése.)

## Kromatográfiás csoportosítás

### Mozgófázis állapota szerint:

- Gázkromatográfia (GC)
- Folyadékkromatográfia (LC)
- Szuperkritikus fluidkromatográfia (SFC)

### A komponsek szállítása

- Hidrodinamikai erők
- Elektromos erők
  - kapilláris elektroforézis  
Elektromos erőterben mozognak az ionos és nem ionos vegyületek is, elválasztás eltérő vándorlási sebesség alapján

### Elúciós módszerek feltételei:

1. impulzusszerű adagolás
2. mozgófázis állandó áramlása
3. mozgófázis szorpciója a legkisebb
4. lineáris technológia

A vegyületek retenciójának és csúc szélességének függetlennek kell lennie a koncentrációtól

## A KROMATOGRÁFIA ALAPEGYENLETE

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

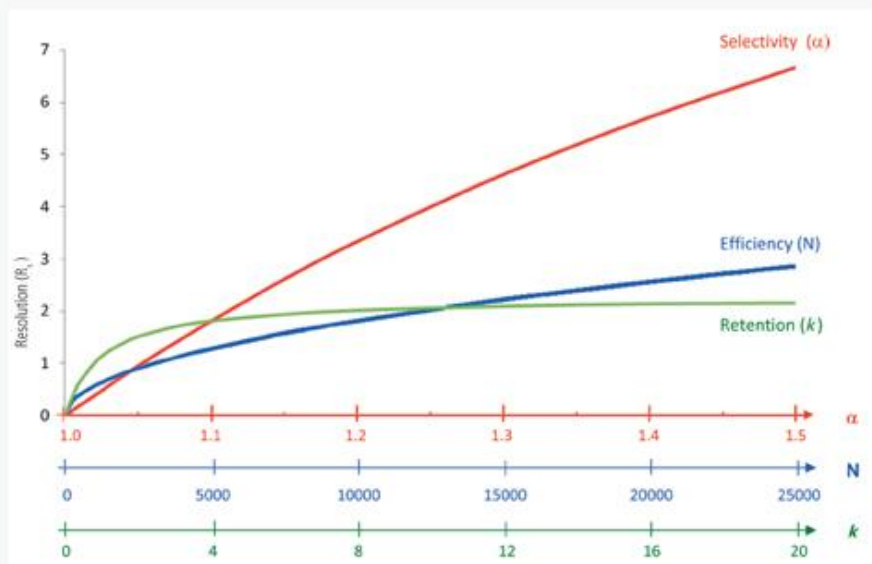
- $R_s$ : a felbontás
- $N$ : elméleti tányérszám
- $\alpha$ : szelektivitás (**FELBONTÁS  $\neq$  SZELEKTIVITÁS**)
- $k$ : visszatartás

### Értelmezés

- $\frac{1}{4} \sqrt{N}$ : kinetikai hatékonyság
- $\frac{\alpha - 1}{\alpha}$ : termodinamikai hatékonyság
- $\frac{k}{k + 1}$ : termodinamikai hatékonyság

**Fig. 1 - The Effect of  $N$ ,  $\alpha$  and  $k$  on Resolution ( $R_s$ )**

For a typical separation where  $N = 10,000$ ,  $k = 4$  and  $\alpha = 1.1$



<http://www.ace-hplc.com/products/product.aspx?id=2913>

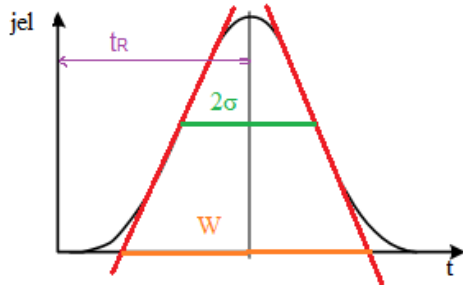
- ahogy az ábrából is látszik a szelektivitás a legmeghatározóbb, aztán a tányérszám és végül a visszatartás

Javasolt értékek:

- $1 < k < 10$  (ha kicsi, interferencia lép fel, ha nagy, túl hosszú lesz a mérés)
- $\alpha > 1,05$  ( $\alpha = 1$  nincs elválasztás)
- $N > 1000$

A felbontást meghatározó tényezők (részletesebben)

Elméleti tányérszám (N) – kinetikai hatékonyság



$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

$w = 4\sigma$  (a csúcs Gauss görbével jellemezhető)

Definíció szerint az elméleti tányérmagasság (H) az elméleti tányérszám (N) és a kolonna hosszától (L) függ. H függését a van Deemter egyenlet írja le (ld. később)

$$H = \frac{L}{N} \rightarrow N = \frac{L}{H}$$

Hatékonynak mondható az az elválasztás, ahol az elválasztás a lehető legrövidebb időt veszi igénybe, és a lehető legtöbb komponens elválasztásra kerül. (A komponensek csúcshélessége legyen minél kisebb.)

**A kinetikai hatékonyság tehát nő:**

- a kolonna hosszának növelésével ( $\leftarrow \rightarrow$  mérési idő) (LGC kolonnák  $\gg$  LLC kolonnák)!
- a retenciós idő növelésével ( $\leftarrow \rightarrow$  mérési idő)
- az elméleti tányérszám növelésével
- elméleti tányérmagasság csökkenésével

Szelektivitás ( $\alpha$ )

$$\alpha = \frac{t_{N2}}{t_{N1}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

ahol

- $t_N$  a nettó retenciós idő
- $t_R$  a bruttó retenciós idő
- $t_0$  a holtidő: az inert anyag retenciós ideje

A szelektivitás attól függ, hogy a különböző komponensek mennyire eltérő időt töltenek el az állófázisban, vagyis a megoszlási hányadostól (K)

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Ahol  $c_s$  a komponensnek az álló-,  $c_m$  a mozgófázisban lévő koncentrációja.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}, \text{ illetve } \alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Elválasztás csak akkor jön létre, ha  $\alpha > 1$ .

Visszatartás (k)

$$k = \frac{t_N}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

ahol

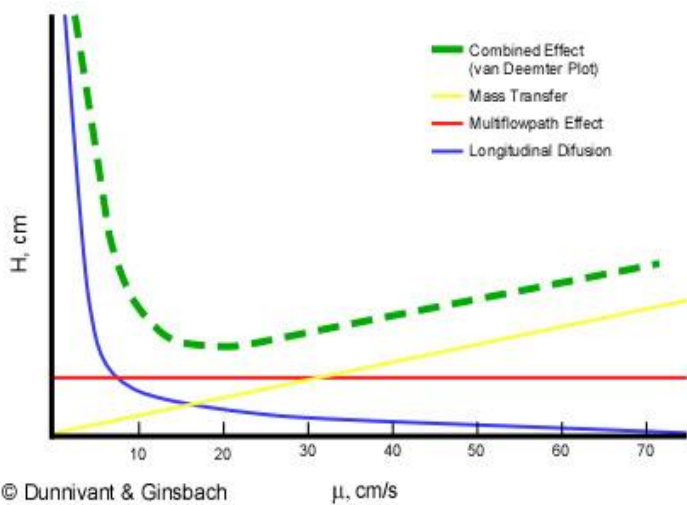
- $t_N$  a nettó retenciós idő
- $t_R$  a bruttó retenciós idő
- $t_0$  a holtidő: az inert anyag retenciós ideje

A vanDeemter egyenlet

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

ahol

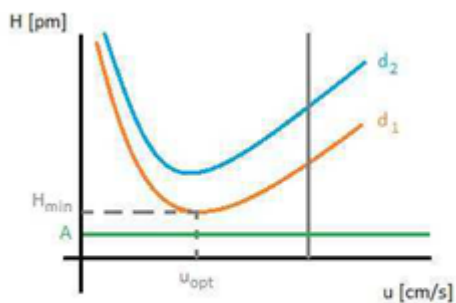
- H: az elméleti tányérmagasság
- A: örvénydiffúzió
- B: hosszirányú diffúzió
- C: anyagátadási ellenállás
- u: lineáris sebesség



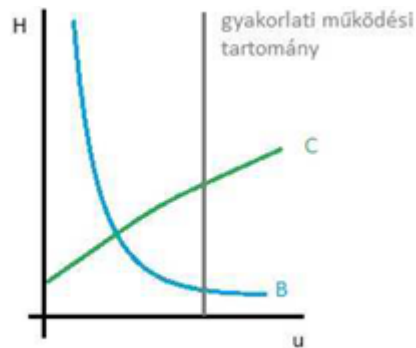
eredő  
anyagátadási ellenállás  
örvénydiffúzió  
hosszirányú diffúzió

© Dunnivant & Ginsbach

$\mu$ , cm/s



$$d_1 < d_2$$



## 1. Örvénydiffúzió (A tag)

A töltött oszlopon az inhomogén szemcseeloszlás miatt a különböző molekulák eltérő utat bejárva, **különböző csatornákon** jutnak végig az oszlopon, ami zónaszélesedést okoz. A **szemcseméret csökkenésével** a csatornák közti különbségek mértéke csökken, így az örvénydiffúzió mértéke is, azonban a **nyomáscsökkenése** szemcseátmérő csökkenésével nő, ami korlátot szab.

$$\text{Darcy – egyenlet alapján: } \Delta p = \frac{L \cdot v \cdot \eta \cdot \phi}{d_p^2}$$

ahol  $\Delta p$  a nyomáscsökkenés,  $L$  a kolonna hossza,  $v$  a sebesség,  $\eta$  a viszkozitás,  $\phi$  a töltetre jellemző ellenállási tényező,  $d_p$  a szemcseátmérő

## 2. Hosszirányú diffúzió (B tag)

Az oszlopon áthaladó minta pusztán a **koncentrációkülönbség** hatására is zónaszélesedést szenved. **Minél kevesebb időt** tölt az oszlopon, annál keskenyebb csúcsot fog adni. A hosszirányú diffúzió mértéke függ még a **diffúziós állandótól** ( $D$ ), ami a **viszkozitással** ( $\eta$ ) fordítottan arányos; tehát minél nagyobb a mozgófázis viszkozitása, annál kisebb a diffúzió mértéke, így annál kisebb a csúcshélesedés mértéke. De ha nagyobb viszkozitású mozgófázis esetén nagyobb a nyomáscsökkenés! (ld. Darcy)

## 3. Anyagátadási ellenállás (C tag)

Az elválasztáshoz az anyagnak el kell jutnia az állófázishoz. Mivel a kromatográfiás eljárásokban mindig **lamináris áramlás** van, ez csak diffúzióval valósulhat meg. Ennek **anyag diffúziós állandó**, azaz **kis viszkozitású** mozgófázis kedvez (ellentétben a B taggal). Ez a mozgófázis által okozott anyagátadási ellenállás ( $C_m$ ). Ezenfelül minél nagyobb az áramlási keresztmetszet, annál több ideig tart a molekulának az állófázisig diffundálnia a főtömegből (és vissza). Tehát **kisebb belső átmérő** esetén a  $C_m$  tag kisebb lesz.

A másik meghatározó tényező az állófázis által okozott anyagátadási ellenállás ( $C_s$ ). Ez a **pórusátmérőtől** függ. A pórusok kis mérete miatt azokban a folyadék nem áramlik, hanem stagnál (áramláshoz hatalmas nyomás kellene), így a molekula itt csak diffúzióval mozoghat. Ahhoz, hogy a molekula bejusson a pórusokba és ott **gátlás nélkül diffundáljon**, a pórus mérete mintegy 10-szer nagyobbnak kell lennie; 1-2000-es molekulatömeg esetén ez 10 nm átlagos pórusátmérőt jelent.

Megjegyzés:

A legnagyobb zónaszélesítő hatása az örvénydiffúziónak van. A kapilláris kolonnák esetében (mivel nincs szemcsés töltet) nincs A tag → nagyobb kinetikus hatékonyság.

# GÁZKROMATOGRÁFIA

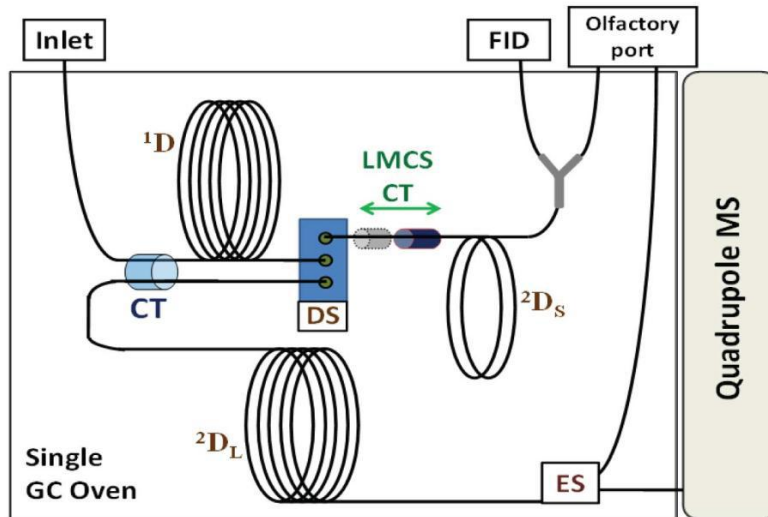
## GC-vel vizsgálható anyagok

- az anyagok vizsgálata forráspont alapján történik
- olyan anyagok vizsgálhatók, melyek a készülék által lehetővé tett maximális hőmérséklet alatt **a mozgófázis állapotába/gőzállapotba vihetők, szerkezeti változás nélkül**
  - a készülék 400-450 °C-ig működik
  - „korrigált forráspont”: **+100-300 °C**-kal magasabb forráspontú anyagok is vizsgálhatóak, mint a készülék által megszabott hőmérséklet (már alacsonyabb hőmérsékleten is jól bepárolgathatóak, mivel a vivőgáz folyamatosan áramlik – szélben is felszárad a vizes padló, nem kell hozzá 100°C)
  - emiatt nem vizsgálhatók: ionos anyagok, komplexek
- **hőstabil vegyületek – nem lehet szerkezeti átalakulás** – NEM ELÉG a bomlás lehetőségét kizárni, mert bomlás nélkül is átalakulhat az anyag szerkezete!
- **a detektor által megszabott koncentrációban kell bevinni a rendszerbe** (kimutatás/mennyiségi meghatározás alsó határánál legyen nagyobb koncentrációban jelen, de ne érje el a telítési tartományt)
- maximális molekulatömeg
  - paraffinoknál még C84-is lehetséges: (~1000-es tömeg).
    - Paraffinok hőstabil vegyületek
  - ha aktív hidrogént (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>) tartalmazó molekula sokkal kevésbé hőstabil

## Minőségi meghatározás:

- **A retenció idő nem elég**, ahhoz hogy beazonosítsuk a vegyületet.
  - a detektorok egy részével pl. FID (Flame Ionization Detector, lángionizációs detektor) nem kapunk a retenció időn kívül más, a minőségre utaló információt
- **NMR, IR**: kapunk információt a szerkezetre nézve, de kis koncentrációk esetén ezek a technikák nem használhatók, **off-line módban használhatók**
- Tömegspektrométerrel (MS) tandembe kapcsolva (**GC-MS**) már használható minőségi analízisre és nagyon kis mennyiségeket is kimutat. **Retenció idő + spektrum információk** is rendelkezésre állnak: → **multidimenzionális**
- Szimultán többféle detektorral is vizsgálhatók az adott anyagok. A különböző detektorok különböző anyag típusokra adnak jelet. T-elágazás osztja el, hogy mindkét detektorba eljusson a vizsgálandó minta)





### Adagolás és mintaelőkészítés

- online módon legyen összekötve, azaz mereven összekötött a mintaelőkészítés és az adagolás a GC-vel.
- Jó, ha kevés oldószert kell használni. – „oldószer mentesség vagy csökkentett oldószer”

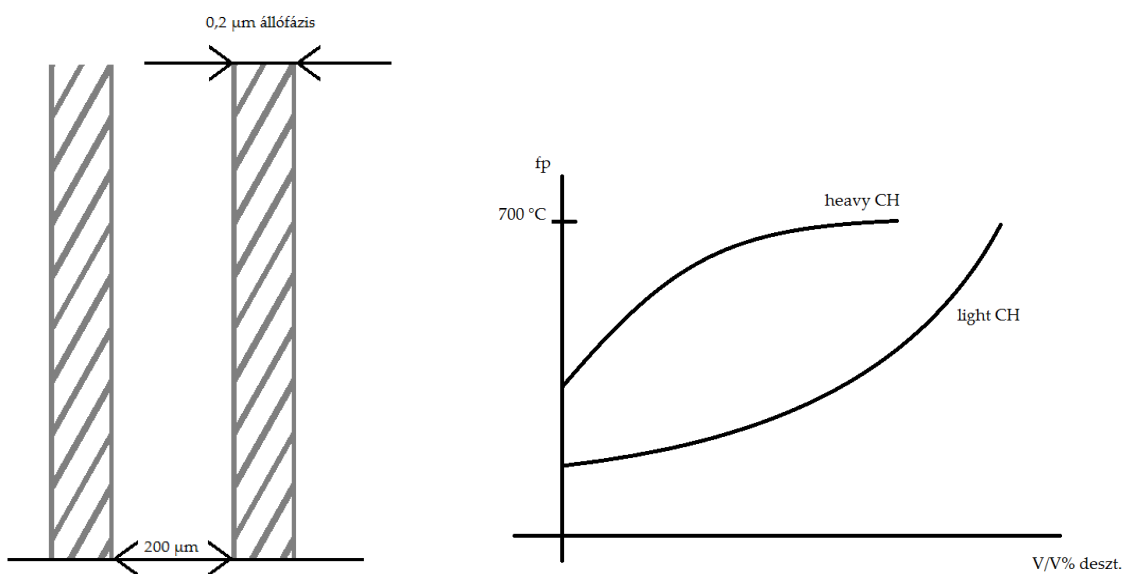
**ATD:** automatikus termodeszorber

**HS:** gőztéranalízis

**SPME:** szilárdfázisú mikroextrakció

- szükséges anyagmenynység: pg-ng → tehát nagyon érzékeny technika

### GC- kolonnák



Nagytisztaságú üvegcsőpoliimid borítással

Belső kialakítás:

- **töltetes kolonnák**
  - 1-4m hosszú
  - töltet:  $Al_2O_3$ , szilikagél (vízérzékenyek, szerves polimer alapúak, a kolonna robosztus, mert nagy az állófázis tömege)
    - szemcseátmérő: 100-200 $\mu$ m
- **kapilláris kolonnák**
  - **PLOT** (Porous Layer Open Tubular), porózus **adszorbens** réteg (**szilárd**)
    - a molekula megkötése adszorpcióval (felületen megkötődik)
    - adszorbensek: szervetlen ( $Al_2O_3$ , szilikagél – vízérzékenyek), szerves (sztirol-divinil-benzol – nem vízérzékeny)
  - **WCOT** (wall-coated open tubular), **foliadékfilm** állófázis („megosztófolyadék”)
    - a molekula megkötése **abszorpcióval** (beoldódik, **gyengébb, mint az adszorpciós kölcsönhatás!!!**)
    - **foliadékfilm**: nagy viszkozitású polimerek pl. PEG (polietilén-glikol); polidimetil-sziloxán, fenil-csoporttal, nitril-csoporttal módosított sziloxán (polaritás nő: polidimetil < fenil < nitril)
- **Minél nagyobb a forráspont **annál RÖVIDEBB és KISEBB FILMVASTAGSÁGÚ** kolonnát kell használni.**

Vegyületek jellege:

- **apolárisak**:
  - C,H,halogén tartalmú vegyületek **hőstabilak**
- apoláris vázon poláris csoport (éterek, észterek) ha nem tartalmaz aktív H-t hőstabil
- **polárisak, aktív H-t** (H-donor-akceptor) tartalmaznak (alkoholok, aminok) → **nem mindegyik hőstabil**, szerkezetileg könnyen megváltozhatnak nagy hőmérsékleten az adagolóban

Kölcsönhatások és forráspont kapcsolata

- apoláris vegyületek: **gyenge diszperziós** kölcsönhatás
  - nagy molekulatömegű anyagok is vizsgálhatók GC-val, például szénhidrogének, klórozott szénhidrogének
  - hőstabilak
  - pl. alkilancok esetén ahogy nő a molekulatömeg, úgy nő a molekula felülete → erősebb a diszperziós kh → nagyobb visszatartás → nagyobb retenciós idő
- poláris, ha nincs aktív H (a forráspontjuk magasabb): ezek a vegyületek vagy **H-akceptorok** vagy **dipól-dipól kölcsönhatásra** képesek
  - **H-hidas** kölcsönhatás
- poláris (aktív H-val rendelkezik) – még kevésbé hőstabil
  - **H-hidas, H-donor, H-akceptorok**, például alkoholok
  - **dipól-dipól**, nitril csoportot tartalmazó vegyületek

Kölcsönhatások: a diszperziós kh. nem szelektív, általános kölcsönhatás.

## Vegyület csoportok

- **gázok:**
  - vannak, amelyek irreverzibilisen adszorbeálódnak
    - CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> : reverzibilis  $\leftrightarrow$  H<sub>2</sub>S: irreverzibilis is lehet
  - mérésük: **töltetes kolonnák, PLOT** kolonnák + hővezetőképességi detektor
    - indok: a gázok csak akkor szeretnek kötődni, ha nagy energia szabadul fel  $\rightarrow$  **adszorpciós kölcsönhatás** kell
- **szobahőmérséklet körüli forrponú oldószer**
  - mérésük: **PLOT**
- **100-300°C körüli forrponúak**
  - mérésük: **WCOT**, kisebb és nagyobb filmvastagság (forrponútól függ – **minél nagyobb a forrponú, annál kisebb filmvastagsággal kell mérni**)
    - PLOT-tal nem lehet mérni, mert a szilárd állófázison az adszorpciós kölcsönhatás sokkal erősebb, mint a megosztófolyadékkal kialakult adszorpciós kh, így az anyag visszatartása nagyon erős lenne a PLOT-on  $\rightarrow$  nagyon sokáig tartana az anyagunk elúciója/a megengedett legnagyobb hőmérsékleten irreverzibilis adszorpció  $\rightarrow$  nincs jel
- **300°C feletti forrponúak**
  - mérésük: **WCOT – kis filmvastagság**
    - ahogy nő a forrponú, annál kisebb filmvastagságú kolonnát kell alkalmazni (minél vastagabb a film, annál nagyobb a visszatartás)  
példa: Trigliceridek

Egy ideig nem lehetett GC-vel mérni, nagy molekulatömegük és magas forrponújuk miatt, de ma már rutinmérésnek számít. A megoldást a nagyon vékonyfilmes állófázis jelentette. (A vékony állófázison sokkal kisebb a retenció, így rövidebb idő alatt végbemegy a mérés, mégis az elválasztás trigliceridekre nézve megfelelő lesz.)

A triglicerideket például a biodízelben vizsgálták, hogy maradt-e.

## Hőstabilitás és illékonyág növelése:

- **Származékképzéssel:** Aktív-H eltüntetése.
  - sav  $\rightarrow$  **metilészter**.
    - Fp.: csökken, kölcsönhatások erőssége csökken, nincs aktív-H
  - R-OH+szilezőszer  $\Rightarrow$  **szililéter**  
(ennek előállításához, teljesen vízmentes közeg kell, mert a víz elreagál a szilezőszerrel)
- -COOH csoportot tartalmazó vegyület: nagyfp. és kis hőstabilitásuk lehetnek, tehát származékképzés itt is szükséges.

## DetektorokGC-hez:

(részletesen a jegyzet végén)

- FID: (FlameIonisationDetector), lángionizációs detektor
  - alifás és aromás szénhidrogének adnak nagy jelet, a halogénezett szénhidrogének azonban kisebb jelet adnak
- ECD (elektronbefogásos)
  - halogén-tartalmú anyagok mérésére
- PID (fotoionizációs detektor)
  - aromás vegyületekre (BTEX) szelektív detektálási módszer
- FPD (láng fotometriás detektor)
  - S- és P-tartalmú vegyületekre
- TID (termoionizációs detektor)
  - N- és P-szelektív detektor
- hővezetési detektor
  - gázokra

## GC-vel meghatározható érdekesebb példák:

- véralkoholszint mérés
- dohányzás: mennyi káros anyagot bocsát ki (pl.: több gyűrűs aromás szénhidrogén (PAH): pl.: benzpirén)
- dopping
- kábítószer meghatározása hajból, (amfetamin)
- Hajból meghatározhatunk még anabolikus szteroidokat is.
- Dioxin, TCDBD (tetra-klór-dibenzo-paradioxin)fp: 446°C
  - nagyon veszélyes apoláris jellege miatt: magas logP
    - logP: n-oktanol – víz közötti megoszlási magas hányados
    - hasonló a sejtfal + sejtvíz közötti megoszlás
- B(A)P, benzo(a)pirén: magas logP

## Megjegyzés:

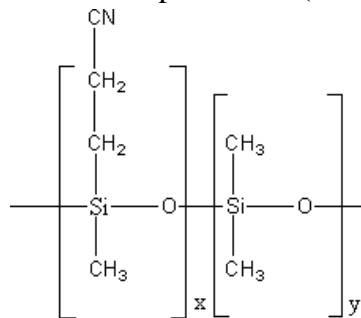
- **GC-vel ionos, sószerű anyagok nem vizsgálhatóak**
  - nem lehet elpárologtatni az ionos anyagokat bomlás nélkül
- atmoszférikus nyomáson mért forráspont → hőstabil, GC
- vákuumban megadott forráspont
  - kis koncentrációban még lehet hőstabil  
→ különleges adagolási technika

## GCxGC

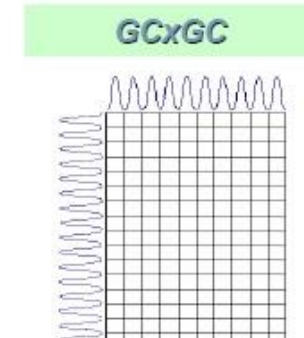
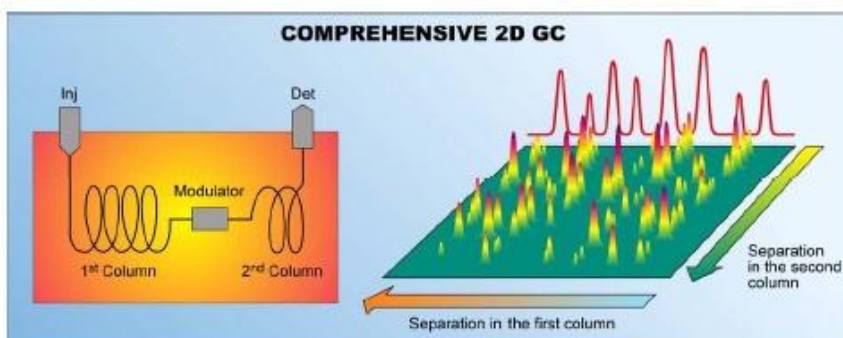
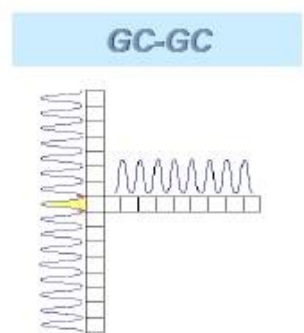
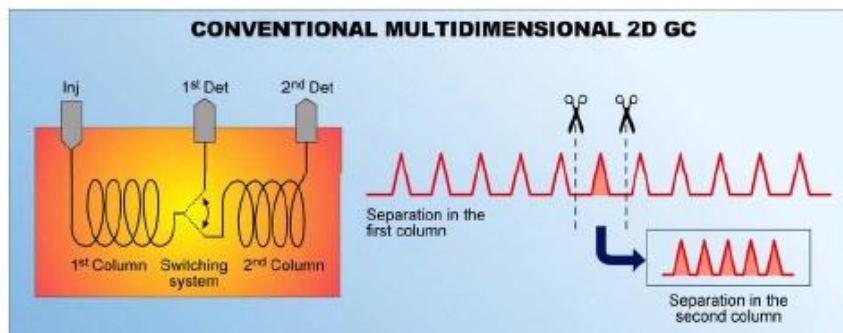
(<https://www.chalmers.se/SiteCollectionDocuments/Centrum/FRIST/Exjobb/ex2005-117.pdf>,  
[http://apps.thermoscientific.com/media/SID/IOMS/PDF/Dioxin\\_Symposium\\_Barcelona\\_2010/19-Cavagnino-Barcelona-2010.pdf](http://apps.thermoscientific.com/media/SID/IOMS/PDF/Dioxin_Symposium_Barcelona_2010/19-Cavagnino-Barcelona-2010.pdf) )

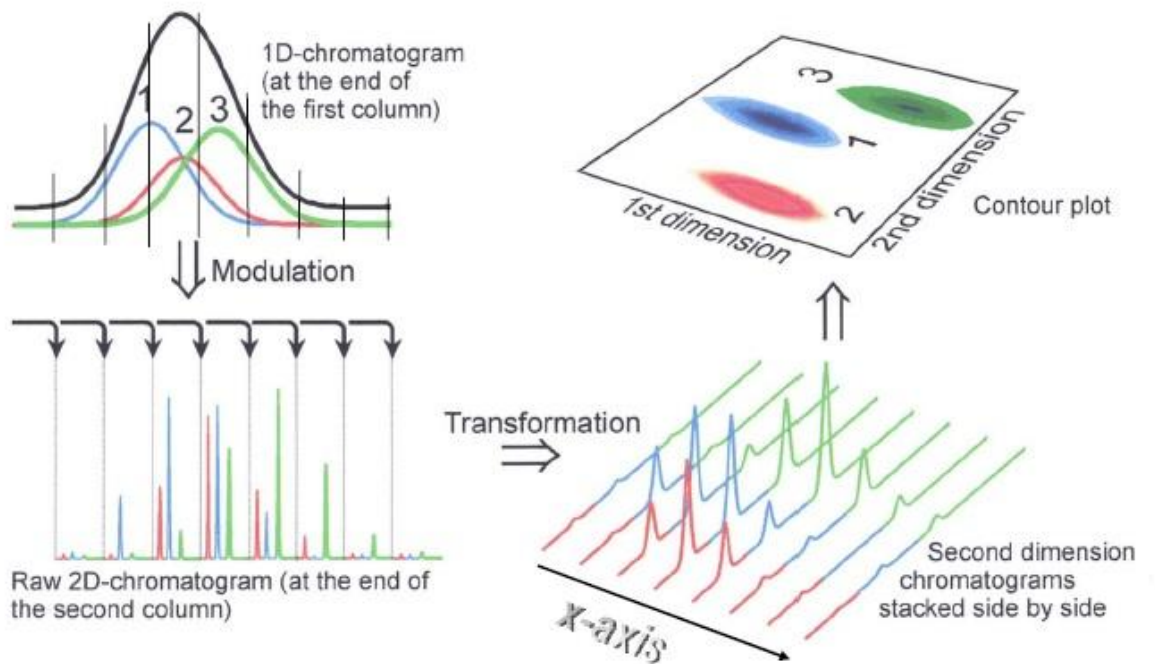
### - a két kolonna polaritása ellentétes

- 1.: hagyományos, **szabványos** kapilláris kolonna (hosszabb, 0,3-0,5mm belső átmérő, 0,1-1 $\mu$ m filmvastagság)
  - apoláris
  - forráspont alapján történik az elválasztás
- 2.: **nagy kinetikai hatékonyságú** kolonna (rövidebb 1-5m, 0,1mm, 0,1 $\mu$ m filmvastagság)
  - az állófázis polárisabb (nitril-csoportos)



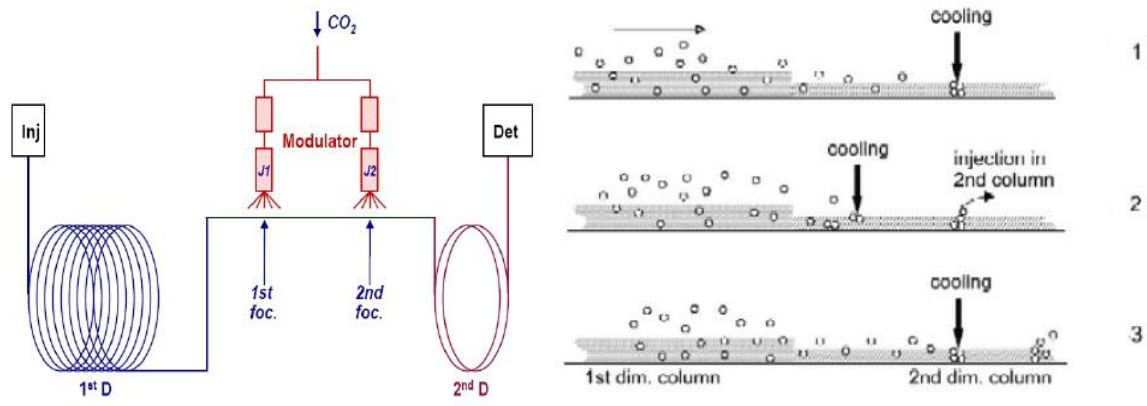
- az elválasztás alapja a polaritás vagy a molekula alakja
- itt sokkal gyorsabb az elválasztás





- baj: a csúcsok nagyon kiszélesednek a végére → fókuszálni kell a csúcsokat 2. GC előtt → ezt egy modulátor teszi meg
  - o **dual-jet CO<sub>2</sub> modulátor**: gyűjti és hűti az első GC-ből érkező frakciókat, mielőtt belép a 2. GC-be

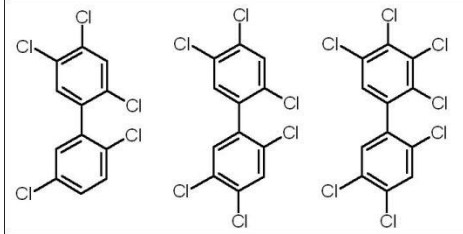
#### GC x GC with dual cryogenic jet modulator



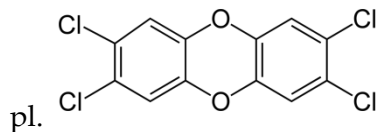
- **nagy szelektivitás** érhető el
- mennyiségi meghatározás kevésbé jó
- nagyon keskeny csúcsokat kapunk a végén → nagyon gyors detektor szükséges (csak 2 ilyen van GC-hez): **FID, TOF**
- felhasználás: petrolkémia

## Példák GC-s mérésekre:

- poliklórozottbifenilek (PCB) mérése:



- o magas forráspont (300°C körüli – ez molekulánként eltérhet), de még mérhető GC-vel
    - a magas forráspont miatt WCOT
      - méghozzá kis filmvastagságú, hogy ne legyen túl nagy a visszatartás  
(a kapilláris, kis filmvastagságú kolonna kinetikai hatékonyság szempontjából is sokkal előnyösebb, mint a többi → ha lehet, mindig a kapillárist érdemes választani)
  - o rendkívül apoláris → apoláris állófázis (polidimetil-sziloxán), vivőgáz H<sub>2</sub>
  - o klórtartalom miatt ECD (elektronbefogásos detektor)
- dioxinok (PCDD – poliklórozottdibenzo-paradioxinok, PCDF – poliklórozottdibenzo-furánok)



- o ld. PCB, kivétel a detektor!
  - o mivel nagyon alacsony koncentrációban vannak jelen, nagy felbontású MS-sel szokták mérni
- BTEX (benzol ~80°C fp., toluol ~110°C, etil-benzol ~130°C, xilol ~140°C):
    - o forráspont alapján mérhető GC-vel
      - kis filmvastagságú, kis belső átmérőjű WCOT
    - o apoláris → apoláris állófázis (polidimetil-sziloxán), vivőgáz H<sub>2</sub>
    - o aromás gyűrűk miatt → PID (fotoionizációs detektor)
  - trihalometánok
    - o halogén elemmel (klór, bróm, jód) szubsztituált metán, melyek a víz klórozása során keletkeznek az ivóvízben, karcinogén anyagok
      - kloroform CHCl<sub>3</sub> (fp. ~61°C), bromoform CHBr<sub>3</sub> (~150°C), jodoform CHI<sub>3</sub> (~218°C)
    - o forráspont alapján mérhető GC-vel
      - WCOT
      - mivel a kloroform már eléggé illékony és minimális visszatartás azért kell ránézve is, nagy filmvastagságú kolonnát kell használni (a visszatartás az állófázis tömegével arányos)
    - o apoláris → apoláris állófázis (polidimetil-sziloxán), vivőgáz H<sub>2</sub>
    - o halogéntartalom miatt ECD (elektronbefogásos detektor)

# FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA (LC)

## Áttekintés

LC-vel vizsgálható anyagok: a vizsgálandó anyag **szerkezetváltozás nélkül oldódik a mozgófázisban detektor által megszabott koncentrációs határok között** (utóbbi általában µg/ml-es nagyságrendet takar).

- vizsgálandó anyag feloldása
  - o ionos → vízben
  - o szerves (polimer) → szerves oldószerben
- mozgófázis viszkozitása nagyobb → kisebb áramlási sebesség érhető csak el

Folyadékkromatográfia esetén (a gázkromatográfiával szemben) szükség van nagynyomású szivattyúra (pumpára), ami egyenletes teljesítménnyel (ill. nyomás és szállítási sebesség mellett) dolgozik.

Nyomáskeresés alapján két technikát különböztetünk meg:

- **HPLC**: High Performance Liquid Chromatography – nagy hatékonyságú
  - o belső átmérő ~4mm, kisebb szemcseméret ~3-10µm, kolonnahossz 15-25 cm
  - o 400 bar nyomáskeresés
- **UHPLC**: Ultra High Performance Liquid Chromatography
  - o **kisebb belső átmérő** (~2mm) és **kisebb szemcseméret** (< 2-3µm) a **jobb kinetikai hatékonyság** érdekében (kisebb zónaszélesedés – ld. van Deemter egyenlet)
    - így rövidebb mérési idő és kisebb kolonnahossz (5-15cm) is lehetséges
  - o a kis szemcseméret miatt viszont 1000-1500 bar nyomáson kell üzemeltetni → nagyobb hőeffektus → a jobb hőátadást a kisebb kolonnaátmérő elősegíti

HPLC és UHPLC **különböző műszerezettséget** igényelnek. Az UHPLC kolonnák jobb kinetikai hatékonyságot biztosítanak, viszont ha ezt a kolonnát egy HPLC készülékre kötöm, elveszti az előnyeit, és még a zónaszélesedés is jelentősebb lehet.

- A **kolonnán kívüli térfogatokat csökkenteni kell** (extra column volume) (megj.: a kolonna nem a készülék része!), pl. az aktív vezetékek keresztmetszetét, hogy elkerüljük a csúcshélesedést.

$$V_E = V_{adagoló} + V_{vezetékek} + V_{detektor}$$

- Az adagolási térfogat is kisebb, emiatt a **detektor cella térfogatának (<1µl!) is kisebbnek kell lennie** az UHPLC esetén (különben a detektorba érve a csúcs kiszélesedik, vagy még keveredik is más csúcsokkal). A kisebb cellaméretből adódóan csúcsok gyorsabban fognak áthaladni a cellán, így **gyorsabb elektronikára** is szükség lesz.

A gyógyszeriparban 50%-ban UHPLC-t használnak, habár az előírt vizsgálati módszerek HPLC-re vonatkoznak. A módszerfejlesztések UHPLC-re történnek.



ÁLLÓFÁZIS morfológiája lehet:

Döntően **töltött** kolonnákat használnak, ahol a töltet lehet:

- **Szemcsés**
  - **Teljesen porózus**
  - **Héjszerű (nem teljesen porózus, csak a külső réteg)** → C-tag kisebb és az A (van Deemter) → ugyanakkora nyomás mellett jobb elválasztás, mint a teljesen porózus szemcsék esetén
    - régi készülékbe is betehetők a nagyobb méretűek
- **Monolit** (egyetlen polimerből áll)
- **nem porózus**

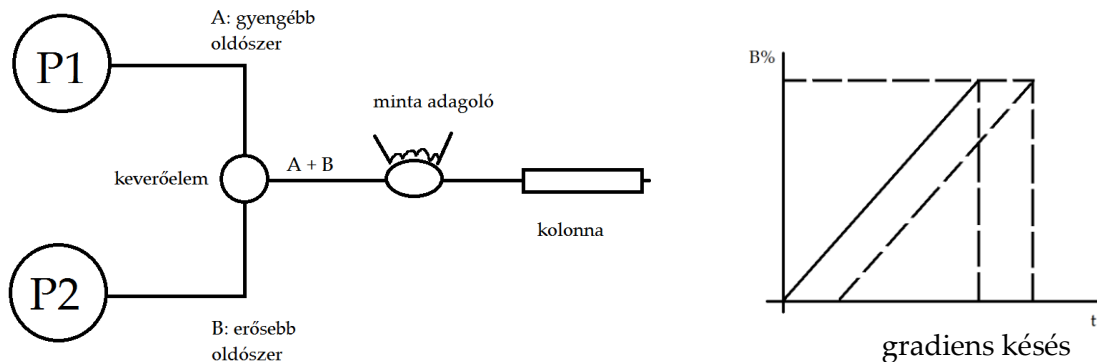
Porózus állófázisokat használnak 90-95%-ban, ez nagy felületet biztosít, ezáltal nagy visszatartást eredményez. (A pórusátmérő szabja meg a felületet.)

- **kis molekulatömeghez kisebb pórusátmérő ~10nm** (általában a folyadékromatográfiánál ezt használják)
- **nagy molekulatömeghez ~30nm** (pl: biotöltetek, polimerek, ezek alkalmasak biomolekuláris elválasztásra)
  - a nagy pórusátmérőt jellemző, azért hogy az elválasztandó anyag be tudjon diffundálni és **ne legyen pórus gátolt diffúzió**, a pórusokban
  - a pórusokban a mozgófázis stagnál, itt csak diffúzió van.
  - ha  $d_p/d_m > 10$  akkor nincs jelentős pórus okozta csúcscsúszélesedés, mert a vizsgálandó anyag szabadon diffundálhat a pórusokban. (nem szorul be). Pár ezres molekulatömegig szabadon diffundál a 10nm-es pórusokban

MOZGÓFÁZIS alapján:

**Izokratikus elúció:** időben nem változik az eluens összetétele, (GC esetén: izoterm: azonos hőmérsékleten végezzük a mérést)

**Gradiens elúció:** időben változik az eluens összetétel. (pl: A: P1 vizes fázis, P2: szerves fázis. Ezek kombinációját változtathatjuk lineárisan, lépcsősen stb.)



- a keveréshez térfogat kell, ez késést okoz („gradiens késés”)
  - o gyorskromatográfiánál (UHPLC, UHP-SFC) ha túl nagy a késés nincs értelme mérni
    - miniaturizálni kell a keverési térfogatot
  - o minden gradiens elúciós módszer izokratikus résszel kezd
    - Probléma: késleltetés akár retenciós sorrendet is változtathat
    - előizokratikus lépés beiktatása, ami nagyobb, mint a gradiens késésből eredő izokratikus rész

#### DETEKTOROK:

- érzékenyebbek: pg-os tartomány
- UV-VIS: ng
- FL (Fluorescens):pg (ultranyomnyi mennyiségű anyaggal is használható, de nagy koncentrációkhoz nem alkalmazható)
- ED (Elektrokémiai Detektor): pg-ng –ultranyomnyi
- MS: pg-ng
- RI (trörésmutató): µg
- ELSD (EvaporativeLightScatteringDetector): ng-µg
- CAD (CoronaChargedAerosolDetector): ng-pg
- MS és MS-MS (ld. később):
  - o **LC-MS:**
    - szerkezeti információt ez sem ad (az LC-hez kapcsolható ionizációs technikákkal legfeljebb csak kis mértékben fragmentálhatóa molekula)
    - DE szelektívebb az UV-nál, mivel az UV-s kromatogramon nem látjuk, ha két molekula csúcsa fedésben van, az MS-nél ezt látjuk
  - o **LC-MS-MS:** szerkezeti információt is nyerhetünk

## Kölcsönhatások

**1: Poláris kölcsönhatások:**(ha szerves oldószerben oldjuk a vizsgálandó anyagokat, akkor nem ionos a kölcsönhatás)

- **NP-HPLC** (normál fázisú): polárisabb állófázis, apolárisabb mozgófázis pl. hexán.
- **HILIC**: (Hydrophilicinteractionchromatography): hidrofil kölcsönhatás, polárisabb felület+ kevésbé poláris mozgófázis – ez az elválasztás nagyon poláris anyagok esetén jó, melyek annyira polárisak, hogy NP-LC-nél már nem oldódnak a mozgófázisban és RP-LC-nél az állófázison (annak apolárisabb jellege miatt) nincs visszatartásuk

**2: Apoláris diszperziós („hidrofób”) kölcsönhatások**

$\log P > 0$

- **RP-HPLC**: fordított fázisú:
  - apolárisabb állófázis, polárisabb mozgófázis (pl. víz, acetonitril, metanol)
- **HIC** (Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia)
  - kis C-atomszámú módosítás (butil, hexil)
  - nagy a sótartalom, (csökken az elválasztás során)
  - vizes mozgófázis
  - Fehérje elválasztásra alkalmazható technika

**3: Ionos (ioncserés kromatográfia: ionos anyagokra, anion- ill. kationcserélő)**

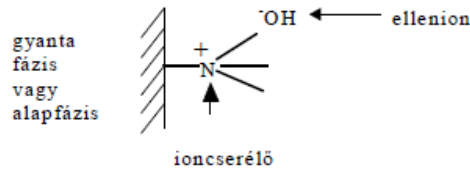
**RP-IP-LC**: fordított fázisú ionpár kromatográfia

- RP állófázis, vizes-szerves mozgófázis
  - a mozgófázisba a vizsgálandó ionnal ellentétes töltésű hidrofób iont teszünk → asszociátum jön létre („ionpár”)
- szerves anionok és kationok, ill. a vízben jól oldódó szerves savak és bázisok kimutatására,
  - detektálás főleg konduktometrián, kis ioncserélő kapacitás jellemző

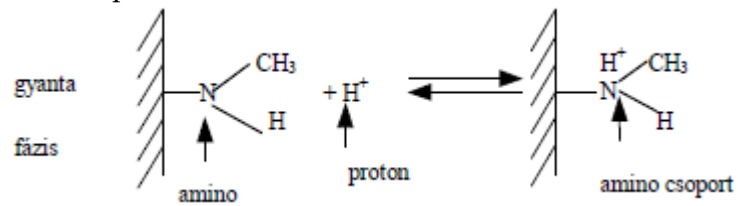
**IE**: ioncserés kromatográfia

- az ioncserés kromatográfiához használt oszloptöltetek egy oldhatatlan hordozó felszínéhez kovalens kötéssel kötött töltött csoportokat tartalmaznak
  - a töltött csoportok körül az ellentétes töltésű ionok ionfelhőt képeznek és ebben az ionfelhőben az ionok reverzibilisen kicserélődhetnek (pl. egy negatív töltésű csoport körüli  $\text{Na}^+$  ion felhő ionjai kicserélődhetnek a mérendő kationjainkkal)

- a töltött csoportok alapján vannak
  - **anioncserélők** (pozitív töltésű a csoport): anionokat köt meg
    - **erős**anioncserélő pl. kvaterner-ammóniumion
      - minden pH értéken megtartja a töltését



- **gyenge** pl. amino-csoport
  - a pH-val változhat a töltése!



- **kationcserélők** (negatív töltésű a csoport): kationokat köt meg
  - **erős** pl. szulfonil-csoporttal ( $-\text{SO}_3\text{H}$ )
  - **gyenge** pl. karboxil-csoport

- mozgófázis: víz, só, puffer

### Ionkizárásos Kromatográfia

- ioncserélőt használ
- fermentációs ipar technológiája
  - cukrok, alkoholok, savak meghatározására egymás mellett
  - vizes oldatban egymás mellett

### Méret kizárásos Kromatográfia (SEC)

- nincs kölcsönhatás
- nagy pórusátmérő
  - szerves/szervetlen állófázis is lehetséges
- mozgófázis:
  - víz + puffer: „gélszűrés”, nagyhatékonyságú gélszűrés
  - szerves: gélpermeációskrom. (GPC)
- szintetikus- és biopolimerekre pl. fehérjék, polipeptidek, szénhidrátok → oldás vízben
- felhasználás: elválasztásra (fő technika)
- biológiai aktivitás megmarad
- szelektivitás kicsi

# SZUPERKRITIKUSFLUID KROMATOGRÁFIA (SFC)

- **milyen anyagok vizsgálhatók:** szerkezeti átalakulás nélkül a mozgófázis állapotába vihető a detektor által megszabta koncentrációban
- **mozgófázis:** szuperkritikus fluidum (leggyakrabban CO<sub>2</sub>)
- mindig kell **segédoldószer**
  - a CO<sub>2</sub> nagyon apoláris ↔ állófázis poláris → a CO<sub>2</sub> nem hozza le a polárisabb anyagokat a kolonnáról  
→ polárisabb oldószert kell hozzákeverni, pl. metanol, acetonitril
- mintaelőkészítés:
  - itt is fel kell oldani a mintánkat oldószerben – a legjobb, ha a mozgófázist alkotó oldószerben tudjuk feloldani a mintát, de a szuperkritikus CO<sub>2</sub> esetén ez nehézkes → pl. hexánban oldják a mintát
- **kinetikai hatékonysága nagyon jó** (HPLC < SFC < GC):
  - lamináris áramlás → mindent a diffúzió határoz meg, ami a mozgófázis viszkozitásával fordítottan arányos
    - szuperkritikus fluidum **viszkozitása kicsi** (gáz < SF < foly.) → **gyors diffúzió → csökken a csúcshélesedés**
- a nyomásesés a viszkozitással arányos (Darcy tv.)
$$\Delta p = \frac{L \cdot u \cdot \eta \cdot \phi}{d_p^2}$$
  - CO<sub>2</sub> viszkozitása kicsi → **nyomásesés kisebb → nagyobb áramlási sebesség** → rövidebb mérési idő
- azújabb fejlesztés: UPC<sup>2</sup>/UHP-SFC
  - hatékonyságban GC felé konvergál
  - váltásnál nem használható a régi készülék!
- **királis** elválasztás fontos felhasználási területe

## Állófázis:

- általában **töltetes kolonnákat** használnak
- **poláris jellegű** (szilikagél + poláris módosítás)
- **királis** elválasztáshoz királis állófázis kell
  - kémiaileg vagy fizikailag immobilizált
    - poliszacharidokkal módosított csak fizikailag  
→ nem megfelelő oldószer tönkreteszi (drága mulatság)

- (fordított fázisú töltet)
  - ezt is hirdetik cégek, de valójában ezeknél nem az apoláris szénláncokat használják ki az elválasztásnál, hanem a sok, módosíthatatlanul maradt szilanol csoportot
  - **embeddedshield** töltet  
-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(P)-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>  
alkil lánc – poláris csoport – alkil lánc
    - ez is „C18-as” kolonna (gyógyszerkönyvi kritérium)
    - ha nagyon hidrofób a töltet, a víz csak nagy nyomásnál megy be és összenyomja a láncokat, a poláris csoport ezt megakadályozza
      - AQ töltet (100% vizes eluent is bír)
- SFC-n sószerű anyagokat nem lehet meghatározni (ezeket GC-vel sem lehet)

részletesebben:

<http://www.chromatographyonline.com/influence-sample-solvent-composition-sfc-separations>

### Egyéb hasznos információ:

- logP: n-oktanol-víz megoszlási arány, a molekula apolaritásának mértékét fejezi ki (minél nagyobb a logP érték, a molekula annál apolárisabb)
- pKa érték (disszociációs állandó)  
bázis konjugált savának pKa értékével jelöljük a báziserősséget, nem pKb-vel  
 $pK_a + pK_b = 14$  (25°C, víz)

Összefoglaló a GC, LC, SFC technikákra: mi milyen hatással van a kinetikai hatékonyságra (N), szelektivitásra ( $\alpha$ ), visszatartásra (k) – NAGYON FONTOS!!!

### GC:

- van Deemter kapilláris GC kolonna esetén:

$$H = \frac{B}{u} + C u$$

- örvénydiffúzió nincs (mivel nem töltetes)
  - a mérési tartományban a  $C_m$  tag a legmeghatározóbb
  - **mozgófázis hatása**
    - N: a  $C_m$  tagot befolyásolja
      - minél nagyobbak a vivőgázmolekulák ( $H_2 < He < N_2$ ), annál többször ütköznek a mérendő molekulák velük → nehezebben diffundálnak az állófázishoz → zónaszélesedés  
→ a  $H_2$  a legjobb
    - $\alpha$ , k: nincs
      - mindhárom vivőgáz apoláris, így  $n_m$  nem lesz eltérő a 3 gáz esetén, ebből adódóan  $\alpha$  sem
- $$k = \frac{n_s}{n_m} \text{ és } \alpha = \frac{k_2}{k_1}$$
- **hőmérséklet:**
    - N: hatással van rá
      - a hőmérséklet növekedésével a diffúzió sebessége exponenciálisan nő
    - $\alpha$ , k: hatással van rájuk, mert a növekvő hőmérséklet elősegíti a deszorpciót ( $n_s$  csökken → csökken a visszatartás, romlik a szelektivitás)
  - **nyomás:** GC esetén N,  $\alpha$  és k-ra sincs hatással

## LC:

- van Deemter LC kolonna esetén:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

- o itt az örvénydiffúzió is jelentőshasználtnak
- **mozgófázis** hatása
  - o N: hatással van rá
    - a mozgófázis viszkozitása befolyásolja a diffúziót
      - minél kisebb a viszkozitása, annál gyorsabb a diffúzió
        - o a hosszirányú diffúziónál ez hátrány (B/u)
        - o a mozgófázisra jellemző anyagátadási ellenállásnál ez előny (C<sub>mu</sub>)
  - o α, k: hatással van rájuk
    - a mozgófázis kémiai jellege (pl. polaritása) befolyásolja az n<sub>m</sub>-t, így k és α is változik
$$k = \frac{n_s}{n_m} \text{ és } \alpha = \frac{k_2}{k_1}$$
  - o megj.: a pH csak a LC-ban játszik fontos szerepet (GC, SFC esetén nincs értelme)
    - a pH a komponensek protonálódását befolyásolja, ami pedig a visszatartásukat
- **hőmérséklet:**
  - o N: hatással van rá
    - a hőmérséklet befolyásolja a mozgófázis viszkozitását, így a diffúzió sebességét is
  - o α, k: hatással van rájuk, mert a növekvő hőmérséklet elősegíti a deszorpciót (n<sub>s</sub>csökken→csökken a visszatartás, romlik a szelektivitás)
- **nyomás:** nincs egyikre sem hatással (megj. fehérjék esetén konformáció változáshoz vezethet, ami a retenciós időre hatással van)

## SFC:

- **mozgófázis** hatása: ugyanolyan, mint az LC esetén, csak kisebb mértékű
- **hőmérséklet:** ugyanolyan, mint az LC esetén
- **nyomás:**
  - o N: hatással van rá – a mozgófázis sűrűségét, így viszkozitását befolyásolja
  - o α, k: hatással van rá – a nyomás növekedésével nő a szuperkritikus fluidum sűrűsége, ami növeli a CO<sub>2</sub> oldóképességét

## Mindhárom esetre igaz:

- **szemcseátmérő:** csak a kinetikai hatékonyságot befolyásolja (ld. van Deemter)
- mozgófázis **áramlási sebessége:** csak a kinetikai hatékonyságot befolyásolja

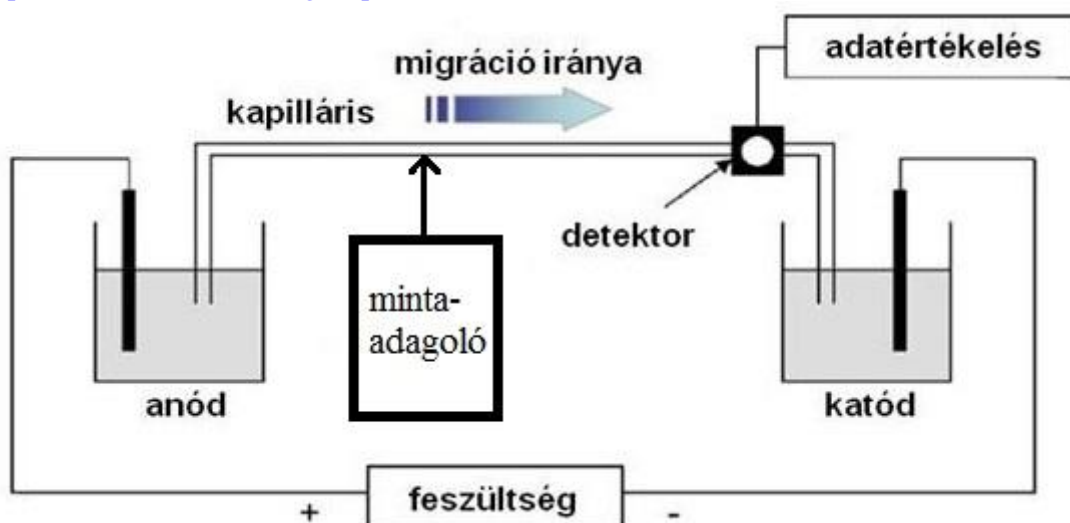


## KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

részletesen:

<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=360643-CEPrimer1.pdf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846027/>



<http://www.doping.chuv.ch/en/lad-ec-zone-eng.jpg>

- típusok:
  - o kapilláris elektroforézis vagy kapilláris zóna elektroforézis: **CE/CZE**
  - o kapilláris gélelektroforézis: **CGE**
  - o elektrokinetikus kromatográfia: **EKC** (amennyiben olyan anyagot teszünk a pufferbe, amellyel a vizsgálandó komponens kölcsönhatásba lép)
    - micelláris elektrokinetikus kromatográfia: **MECK/MECC**
    - kapilláris elektrokratográfia: **CEC**
- összességében jellemző:
  - o **elválasztástechnika**
    - feszültség hatására elektroforetikus és elektroozmotikus vándorlás indul meg, ami a sebességük alapján elválasztja a komponenseket
    - **elektroforézis (EF)**: töltött részecskék vándorlása elektromos erőter hatására
    - **elektroozmózis/elektroendozmózis (EOF)**: töltéssel rendelkező felület mentén elektromos tér hatására kialakuló folyadék áramlás
      - a negatív töltésű felület mentén pozitív ionokból kettősréteg alakul ki, mely a katód felé, hidrátburkával együtt mozog
    - $|EOF| \gg |EF|$
  - o kis és nagy molekulákra is

- szükséges hozzá
  - kapilláris
    - fusedsilica (nagy tisztaságú üveg) kapilláris
    - belső átmérő: 50-150  $\mu\text{m}$
  - két puffertartály (ugyanaz a puffer)
  - mintaadagoló
  - detektor (a kapott jelek kromatogramra hasonlítanak)
    - a kapilláris külső poliimid borítását eltávolítják, és ide helyezik a detektort
    - UV detektor esetén ezért is nagyon fontos, hogy fusedsilica kapillárist használjunk (különben a szilikának jelentős elnyelése lesz)
- nagy egyenfeszültség (20-30 kV)  $\rightarrow$  elektromos térerő  $\rightarrow$  áramlás (nyomáskeresés nélkül)
  - elválasztás a sebesség alapján
- a kromatográfiai módszerek esetén a **legnagyobb kinetikai hatékonysággal** bír (HPLC < SFC < GC < CE), ennek okai:
  - **dugószerű áramlási profil** ( $\leftrightarrow$  a hidrodinamikai áramlás parabolikus)  $\rightarrow$  csúcshélesedés kisebb

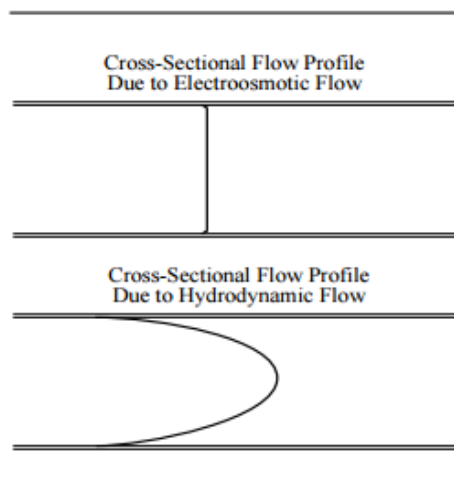


Figure 3. Capillary Flow Profiles

- van Deemter egyenlet:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

- A: örvénydiffúzió
- B: hosszirányú diffúzió
- C: anyagátadási ellenállás
- u: lineáris sebesség
- itt **csak hosszirányú diffúzió** lesz! (B tag)
  - nincs töltet  $\rightarrow$  nincs örvénydiffúzió (van Deemter)
  - nincs megoszlás az álló és a mozgófázis között  $\rightarrow$  C tag nincs
- a lineáris áramlási sebességet (u) feszültségkülönbség határozza meg
  - a feszültség növelésével is csökken a zónaszélesedés, de
  - az ellenállás miatt nagyobb hő fejlődik, ami ellentétes hatású – korlát

- kis áramlási sebesség → **kis átmérő**
  - o DE: a kis átmérő miatt a detektálási úthossz ezzel csökken, kevesebb minta adagolható és könnyebben eldugul
- molekulatömeg hatása
  - o általában: nagyobb → lassabb diffúzió → szélesebb csúcs
  - o itt: lassabb → kisebb hosszirányú diffúzió → keskenyebb csúcs!
    - **biopolimerekre** is jó (sőt, itt előny, ha nagyobb a molekula)
- mintaadagolás:
  - o töltet 1/100 – 1/1000 része között (μl nagyságrend) – nagyon kis mennyiségű mintát tudunk csak adagolni!
    - **nyomnyi mennyiségekre nem jó!**
    - fontos a detektor érzékenységének növelése
  - o általában detektor katód oldalán, adagolás anód oldalán

### Kapilláris zónaelektroforézis (CZE)

- **csak puffer** van a rendszerben (a mintán kívül)
- kis és nagy molekulákra
  - o szervesen anionok, kationok elválasztására is alkalmas (melyeket ionkromatográfián is tudunk vizsgálni)
  - o ionos gyógyszerhatóanyagok vizsgálatára is használható
  - o fehérjék és peptidek elválasztására nagyon jó (nagyon jó a felbontása)
- az elválasztás alapja: **EF, EOF és a molekula tömege**
  - o bizonyos pH mellett az EOF hatás visszاسzorítható teljesen

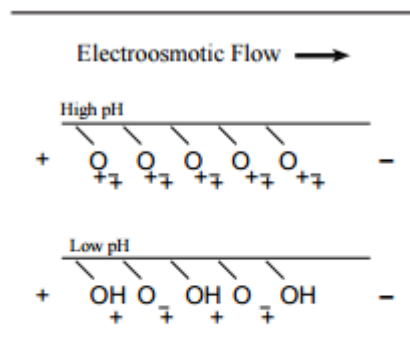
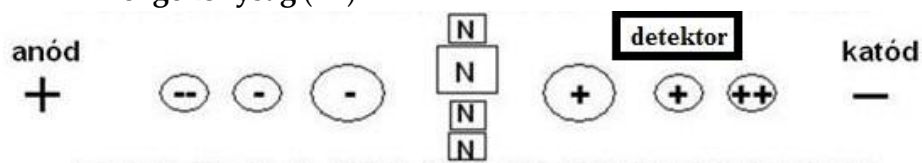


Figure 2. Effect of pH on the Electroosmotic Flow

- amennyiben nincsenek felületi töltések, az EOF megszűnik
- a szilanol-csoportok (-Si-OH) pH < 3 protonálódnak → nincs töltése

- **pH < 3**
  - o ekkor az állófázis (szilika) ionvisszaszorított formában van (Si-OH forma)
    - töltéssel rendelkező anyagok mozognak csak: **elektroforetikus mozgékonyág (EF)**



- o az anionok az anód, a kationok a katód felé mozognak
- o a semleges molekulák nem választhatók szét!

- mivel a detektor felé (a fenti kapcsoláson) csak a pozitív molekulák vándorolnak, ebben az elrendezésben **csak a pozitív töltésű ionok vizsgálhatók**
  - amennyiben megfordítjuk a polaritást (a detektor után lesz az anód), az anionok lesznek mérhetőek
- **pH > 9**
  - állófázis ekkor teljes mértékben ionizált (10 körül teljesen): Si-O<sup>-</sup>
    - pufferkation: Na<sup>+</sup> → rendezett kettősréteg
      - hidrátburkával vándorol → **elektroozmotikus áramlás (EOF)**
      - ez csak a katód felé megy és visz mindent (+, -, semleges molekulát) magával → minden a katód felé megy, csak különböző sebességgel (kationok > semlegesek > anionok)
    - kationok
      - eredő: EOF + EF
    - semleges anyagok
      - eredő: EOF (mivel EF = 0) → azonos sebesség
    - anionok
      - eredő: EOF - EF (hiszen az anionok az anód felé vándorolnak az EF miatt)
  - olyan pH-n érdemes mérni, ahol az anyagunk biztosan ionizált állapotban van
    - pl. gyenge savak esetén (pKa + 2) pH-án

### Micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC)

- ha semleges molekulákat akarunk elválasztani, nem jó a CZE  
→ **pszeudo-állófázis kell**
- a pszeudo-állófázis a **micella**
  - elválasztás alapja: a komponensek megoszlása az „állófázis”, azaz a micellák és az oldat között különböző lesz (az LC is erre az elvre épül)
    - a micellák hidrofób magjához kötődnek a semleges molekulák
  - leggyakrabban használt micellaképzők:
    - anionos pl. SDS (Na-dodecil-szulfát)
    - kationos pl. CTAB
  - megj.: (CMC) kritikus micellaképződési koncentrációban kell adagolni
- működés alapelve az SDS-en keresztül bemutatva
  - EOF visz minden molekulát a katód felé
  - SDS viszi a vele kölcsönhatásba lépő molekulákat az anód felé (hiszen az SDS kívülről negatív töltésű, így a pozitív elektród felé indul) → akik az SDS-micellákhoz kötődnek, lelassulnak a többiekhez képest
  - migrációs sorrend:
    - anionok: hiszen az SDS-sel megegyező töltésük miatt ők nem kötődnek a micellákhoz, ezért a micellák nem lassítják őket
    - semleges molekulák: az SDS lassítja őket és hidrofobicitásuk alapján el is választja őket!

- kationok: azért lesznek ők a leglassabbak, mert a semleges molekulákkal ellentétben ők sokkal több időt fognak eltölteni a pszeudoállófázison
  - a semleges molekula-micella kölcsönhatásnál sokkal erősebb a kation-SDS kölcsönhatás, mivel az utóbbi elektrosztatikus
- Megj.: a semleges molekula-SDS hidrofób kölcsönhatás nagyon erős, a fenti sorrend felcserélődhet
- **királis elválasztás** is lehetséges
  - **királis micellaképző** szükséges
    - királisan szelektív anyag a pufferben (nem a kapilláris falán!!!)pl. ciklodextrin – ez is az SDS-hez hasonlóan lelassítja a molekulát

Probléma: érzékenység

- nincs két azonos felületi kapacitás (azonos mennyiségű –OH)
  - EOF más lesz a különböző felületi kapacitások esetén
    - migrációs idő más lesz

#### Kapilláris elektrokratográfia (CEC)

- **fordított fázisú állófázissal** töltött kapillárisban történik a szétválasztás az állófázissal kialakított kölcsönhatás alapján
  - de itt a hajtóerő a HPLC-vel szemben nem a nyomáskülönbség lesz, hanem a feszültségkülönbség
- 0,1 µm-es töltet (**kis szemcseátmérő**) is használható, hiszen nincs nyomásesés

#### Kapilláris gélelektroforézis (CGE)

- fehérje elválasztás
- poliakrilamid gél → méret szerinti elválasztás is érvényesül

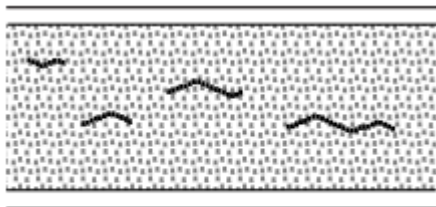


Figure 9. Capillary Gel Electrophoresis

- legelterjedtebb alkalmazása: DNS elválasztás

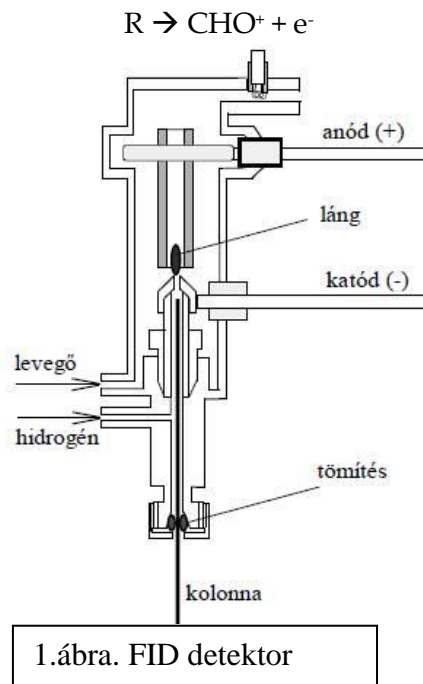
**Table 6. Selecting the Mode of Capillary Electrophoresis**

Small Ions	Small Molecules	Peptides	Proteins	Oligonucleotides	DNA
CZE	MECC CZE	CZE MECC CGE	CZE CGE	CGE MECC	CGE

# DETEKTOROK (OPCIONÁLIS EXTRA)

## 1. FID (flameionisationdetektor) – lángionizációs detektor

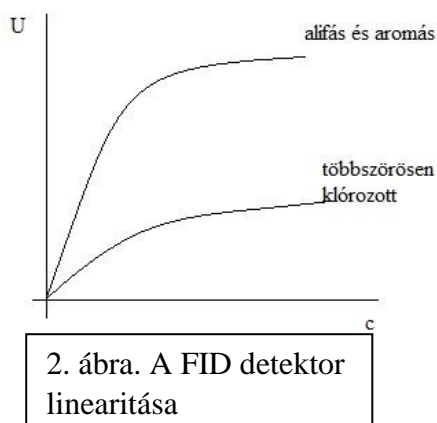
A lángionizációs detektorban a minta (szerves anyag) több lépésben termikusan bomlik (pirolizál), formaldehid gyökionok keletkeznek, melyek az ionizációs lépésben elektront adnak le, ez biztosítja a jelet, szemantikusan:



A mintához hidrogént keverve azt meggyújtjuk, és elektródon mérjük a feszültséget, ami a keletkező elektronok számával arányos. (Jelerősítéshez nagy feszültséget használunk, mivel az Ohm törvényből:  $U = I \cdot R$ )

A detektor előnye, hogy akár 7 nagyságrendes a lineáris tartománya. Az alifás és aromás szénhidrogének adnak nagy jelet, a halogénezett szénhidrogének azonban kisebb jelet

adnak, mivel a keletkező halogének befogják az elektródot, így csökken az érzékenység. Nem mérhető továbbá a hangyasav és a formaldehid, mivel azok az ionizációs lépés előtt elbomlanak.

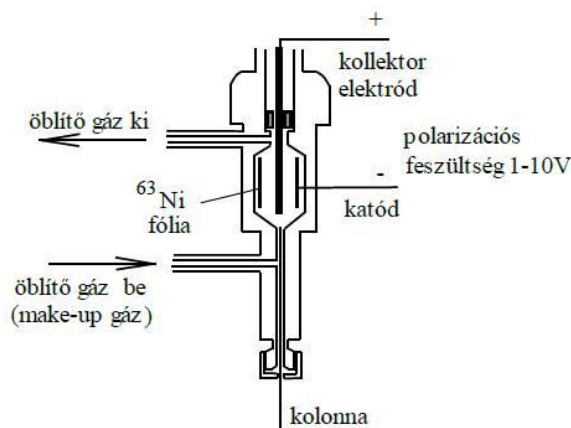


## 2. ECD (electroncapturedetector) – elektronbefogásos detektor

A lángionizációs detektorban zavartak a halogének, mivel befogják az elektronokat, ezen a jelenségen alapulnak az elektronbefogásos detektorok; itt folyamatos elektronáramot állítunk elő, és azt mérjük, hogy a minta milyen mértékben csökkenti azt. Tehát ebben az esetben az áramerősség csökkenése lesz arányos a minta koncentrációjával.

A tetraklór-metán példájával:  $\text{CCl}_4 + e^- \rightarrow \text{CCl}_4^-$

3. ábra. ECD detektor



Az elektronáramot a  $^{63}\text{Ni}$  izotóp (lágy)  $\beta$ -sugárzása biztosítja. Ez az áramkörbe kapcsolva kis intenzitású jelet ad.

Ezzel a módszerrel tehát a halogénezett szerves vegyületek határozhatóak meg, mint például: szén-tetraklorid ( $\text{CCl}_4$ ), diklór-metán ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), poliklórozottbifenilek (PCB) <pl. transzformátor olajban>, BTEX (illékony szerves) vegyületek (benzol, toluol, etil-benzol, xilol származékok).

### Példa: PCB meghatározás

Milyen állófázis használható?

Apoláris, indukciós kölcsönhatásban részt vehet  $\rightarrow$  polisziloxános alapváz, fenil és metil csoportokkal

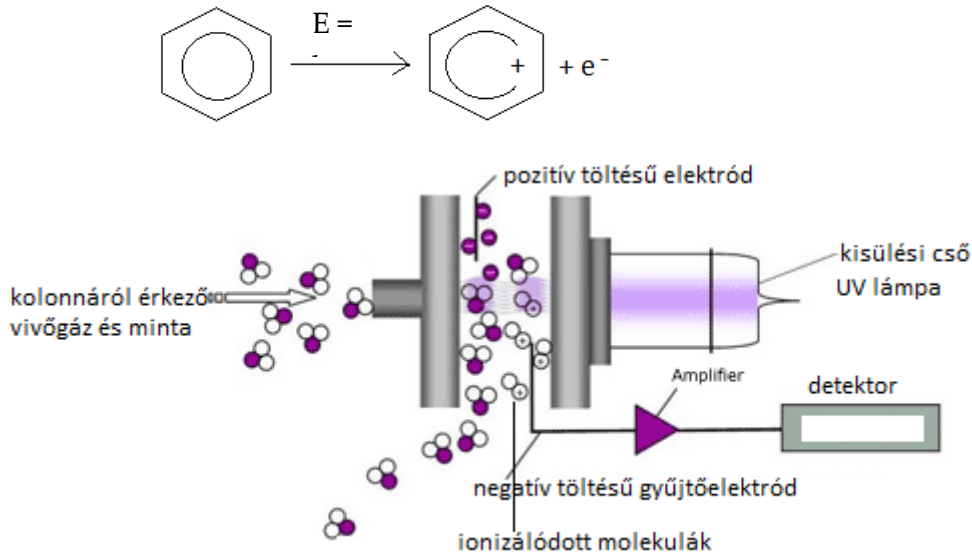
Milyen kolonna használható?

A forráspont magas (a molekulatömeg miatt)  $\rightarrow$  kis átmérőjű és falvastagságú WCOT

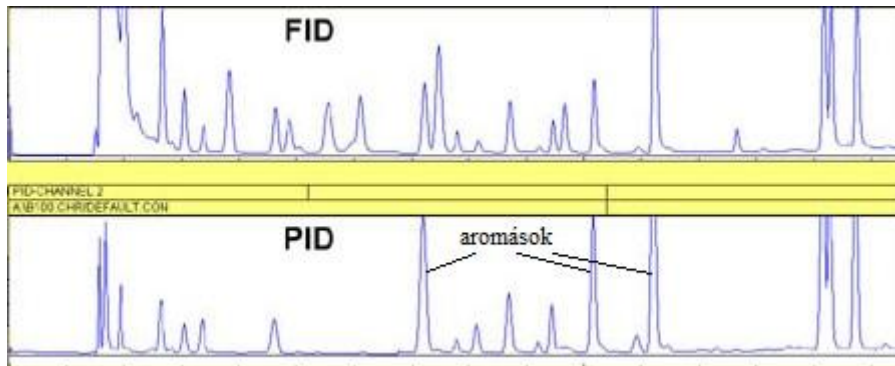
Vivőgáz: hidrogén (a felbontás ezzel a legnagyobb)

### 3. **PID: Fotoionizációs detektor (Photo-ionizationDetector)**

- aromás vegyületekre (BTEX) szelektív detektálási módszer
- a kisülési cső (UV lámpa) emittálja a fotonokat, melyek hatására egyes szerves vegyületek (pl. aromások) ionizálódnak
  - o az ionizáció kismértékű (kb. 0,1%)
- az ionizáció hatására töltéshordozók keletkeznek → áram



forrás: <http://www.equipcervices.com/support/tutorials/introduction-to-photoionization/>



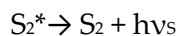
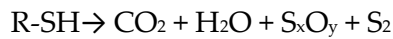


## S-, P-, N-TARTALMÚ NÖVÉNYVÉDŐSZEREK MÉRÉSE

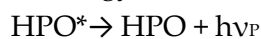
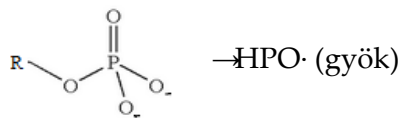
### 4. Láng fotometriás detektor (FPD, FlamePhotometricDetector)

- S- és P-szelektív
- a GC kolonnáról hidrogénnel táplált lángba jut a minta
- a mérendő komponens a lángba kerülve elég, majd termikus hatásra gerjesztődik és fotont ad le → a láng fénykibocsátását mérjük abban a hullámhossz tartományban, mely a mérendő komponensre jellemző ( $\lambda_S, \lambda_P$ )

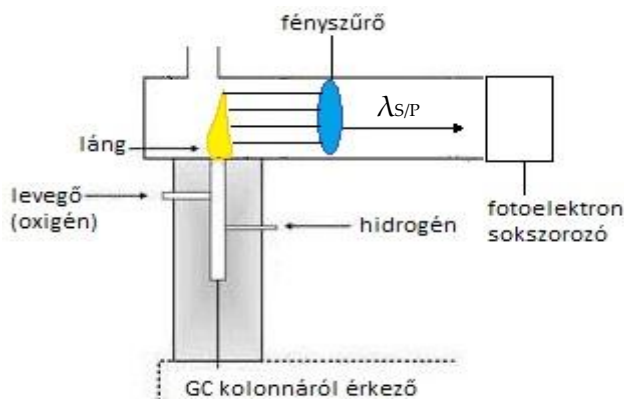
- *kén:*



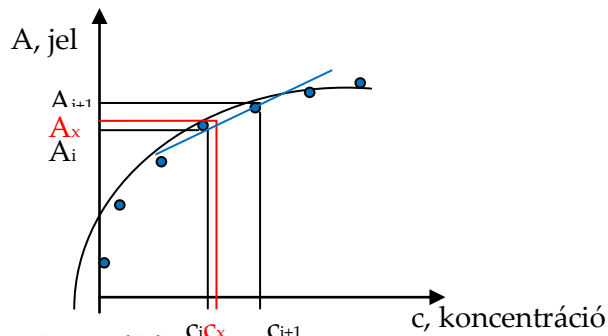
- *foszfor:*



- mivel a láng sokféle hullámhosszú fényt bocsát ki, fényszűrő használata szükséges



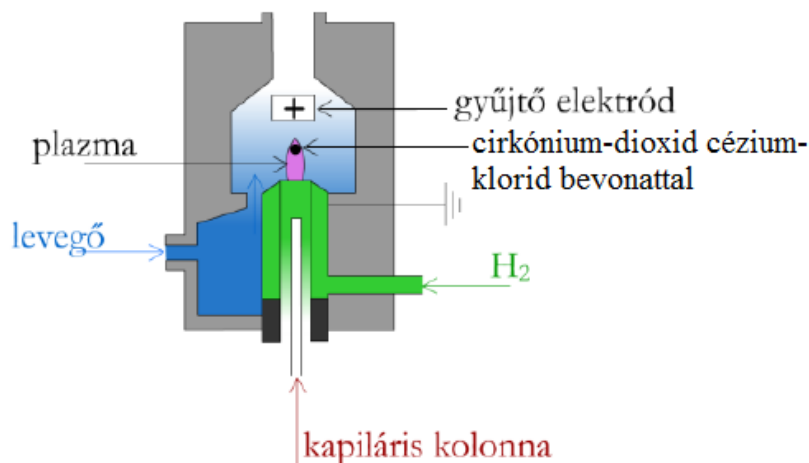
- a kibocsátott fotonokat **fotoelektron sokszorozóval** mérjük
  - o rendkívül nagy érzékenység:  $10^{-12}$ - $10^{-14}$  g kén/perces tömegáramnál már jelet ad
  - o DE nem lineáris jelet ad:  $A = a \cdot c^n$ 
    - több ponttal kell kalibrálni, hogy minél jobban közelítsük a görbét a mérendő koncentráció tartományában
    - a meghatározandó koncentráció előtti és utáni pontokra illesztett egyenes meredekségének segítségével lehet számolni



- használják:
  - o kéntartalmú és foszfoészter kötéseket tartalmazó növényvédőszer mérésére
  - o kéntartalmú vegyületek szelektív mérése szénhidrogén elegyekben (kőolaj)
  - o kénhidrogén (kis koncentrációban is)

### 5. Termoionizációs detektor (TID, ThermoionicDetector)

- N- és P-szelektív detektor
- a lángban korábban már a FID-nél ismertett reakció játszódik le  
 $C_nH_m \rightarrow \text{pirolízis} \rightarrow \text{oxidáció} \rightarrow \text{ionizáció} \rightarrow n \text{ CHO}^+ + n e^-$   
 és N-tartalmú vegyületek esetén emellett nitrogén-oxidok is keletkeznek, melyekből katalizátor hatására elektron szabadul fel:  $N_xO_y + \text{katalizátor} \rightarrow e^-$ 
  - o csak ezeket az elektronokat akarjuk mérni (a fenti reakcióban felszabaduló elektronokat nem!)
- a katalizátor: cézium-klorid (CsCl)
  - o cirkónium-dioxid ( $ZrO_2$ ) kerámia felületét vékonyan befedik CsCl-dal és felfűtik  $800^\circ\text{C}$ -ra, hogy a CsCl egy része a lángba jusson
- a két különböző eredetű elektronáram szétválasztása:
  - o a kerámiaira negatív potenciált kapcsolok, így a szénhidrogénláncok bomlásából keletkező elektronok nem tudnak feljebb kerülni
  - o a nitrogén-oxidból származó elektronok viszont elérik a pozitív töltésű gyűjtőelektrodot



forrás: POKOL

## 6. Hővezetési detektor:

- gázok mérése
- a berendezéshez tartozik egy jó hővezetőképességű blokk, melyet elektromosan fűtünk
- a fűtött elem belsejében állandó áramlási sebességgel, állandó összetételű gázelegy áramlik, így egy idő után beáll a stacioner állapot (állandó hőmérséklet)
  - o általában héliumot használnak vivőgázként, mivel a hővezetőképessége jóval nagyobb, mint a többi gázé
- ha a gázelegy összetétele megváltozik, akkor a hővezetőképessége megváltozik
  - o ha jobban vezeti hőt → a fűtött elem lehül (ugyanolyan teljesítménnyel fűtünk, de több hőt visz el a bevezetett gáz) → az elem ellenállása csökken
  - o ha kevésbé vezeti → felmelegszik → az elem ellenállása nő
- az ellenállásváltozást mérjük: arányosa a koncentrációval
- probléma lehet: az áramlási sebesség ingadozhat
  - megoldás: differenciakapcsolás
  - o két azonos ellenállású vezető vagy félvezető elemet tartalmazó cellát alkalmazunk: az egyik a referencia cella (csak az eluens áramlik), a másik a mérőcella (az eluens mellett a kolonnáról érkező gázminta is)
  - o a két cella jelének különbségét mérjük
- nem szelektív: minden olyan komponenszt érzékelnek, melynek hővezetőképessége eltér a vivőgázétól
- kisebb érzékenység

<b>1. mérés:</b>		
- referencia cella: vivőgáz		
- mérőcella: vivőgáz		
	<i>referencia cella</i>	<i>mérőcella</i>
elszállított hő	$Q_1 = Q_2$	
hőmérséklet	$T_1 = T_2$	
ellenállás	$R_1 = R_2$	
<b>2. mérés:</b>		
- referencia cella: vivőgáz		
- mérőcella: vivőgáz + CO (rosszabb hővezetés)		
	<i>referencia cella</i>	<i>mérőcella</i>
elszállított hő	$Q_1 > Q_2$	
hőmérséklet	$T_1 < T_2$	
ellenállás	$R_1 < R_2$	

