

**Műszeres analitika I.
Folyadékkromatográfia
Egyéb nagyhatékonyságú
elválasztó módszerek**

Dr. Andrási Melinda



**DEBRECENI
EGYETEM**



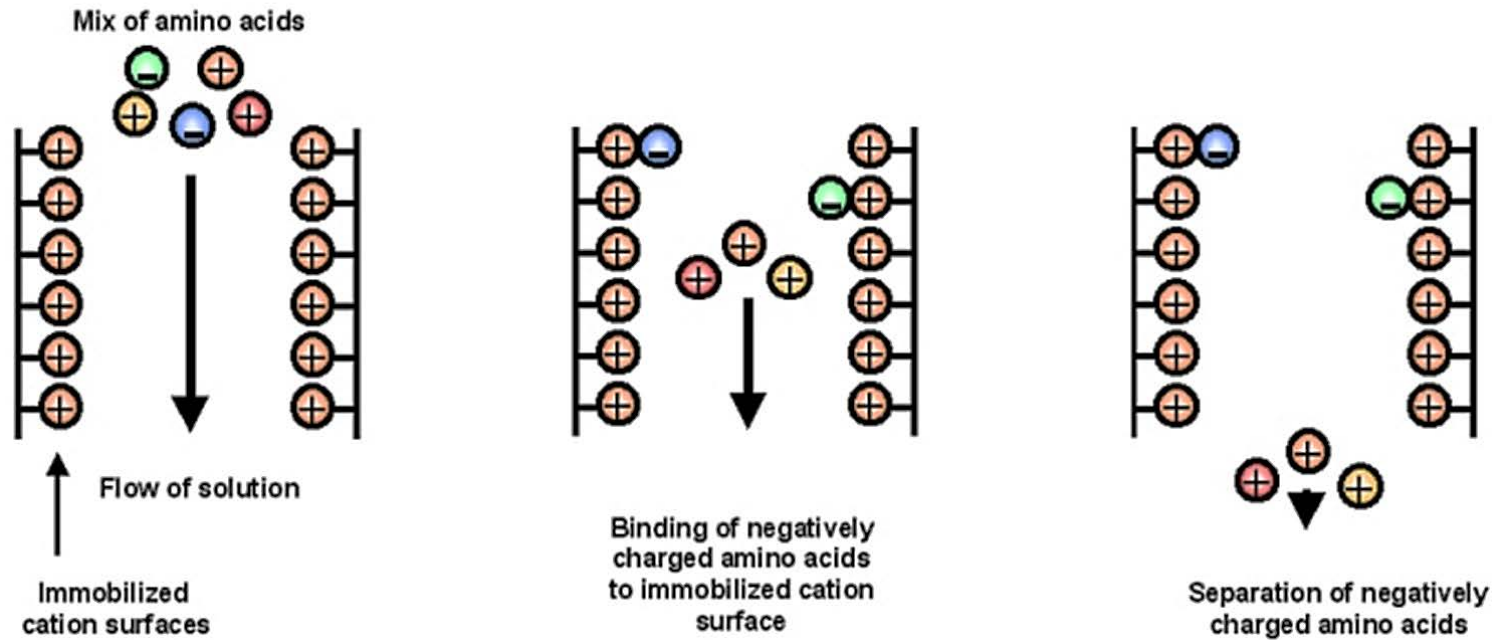
| Álló fázis | Mozgó fázis | Fizikai jelenség | Kromatográfia |
|-------------------|-------------------------|--|--|
| folyadék | gáz | abszorpció | GC |
| szilárd | gáz | adszorpció | GC |
| folyadék | folyadék | megoszlás | HPLC, VRK, PC |
| szilárd | folyadék | adszorpció, ioncsere, méretkizárás, affinitás, hidrofób kölcsonhatás | HPLC, VRK, gélkromatográfia, ionkromatográfia, affinitás kromatográfia, hidrofób kölcsonhatás kromatográfia |
| szilárd | szuperkritikus folyadék | adszorpció | SCF |
| folyadék | szuperkritikus folyadék | megoszlás | SCF |

Ionkromatográfia

- Folyadékromatográfia azon módszere, amelynél az elválasztás az álló- és mozgófázis közötti ioncsere-egyensúlyon alapul.
- Szervetlen és szerves ionok elválasztására egyaránt alkalmas.
- Az állófázis töltéshordozó funkciós csoportokat tartalmaz. A minta komponensei közül csak az állófázis töltésével ellentétes töltésűek kötődnek meg az oszlopon.
- **Anioncserélő kromatográfia:** az állófázis pozitív töltésű, akkor a negatív töltésű molekulák kötődnek.
- **Kationcserélő kromatográfia:** negatív töltésű állófázison pozitív töltésű molekulákat kötünk.

Ionkromatográfia

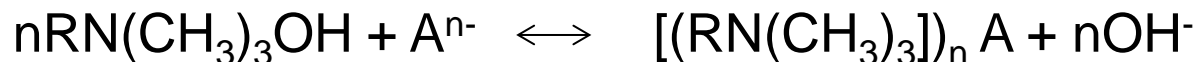
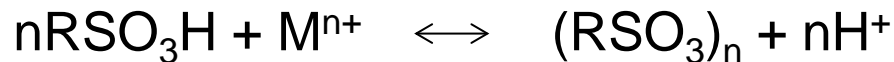
Ion-exchange chromatography (anion exchange)



Ionkromatográfia

- Állófázis: térhálósított műgyanta vázon ioncserélő funkciós csoportok.
- Erős ioncserélők: Jól disszociáló csoportokat tartalmazó oszlop.
- Gyenge ioncserélők: kevésbé jól disszociáló csoportokat tartalmazó oszlop.
- Erős kationcserélő: $-\text{SO}_3\text{H}$ csop.
- Gyenge kationcserélő: $-\text{COOH}$ csop.
- Erős anioncserélő: kvaterner aminosoport
- Gyenge anioncserélő: primer aminocsoport

Elválasztás alapja:



Ionkromatográfia

Kötődött ionok elúciója:

Kationok elválasztására az eluensként híg erős sav.

Anionok elválasztására az eluensként bázisos oldat.

NaCl gradiens.

pH változtatásával.

Detektálás:

Vezetőképesség

Affinitás kromatográfia

Az elválasztás a kromatográfiás állófázishoz kötött molekulák és a mozgófázisban haladó mintakomponensek közötti specifikus kölcsönhatáson alapul.

Állófázis: a vizsgált molekula kölcsönható partnere kémiai kötéssel rögzítve van a kromatográfiás állófázisra (agaróz, cellulóz, dextrán).

Elválasztás alapja:

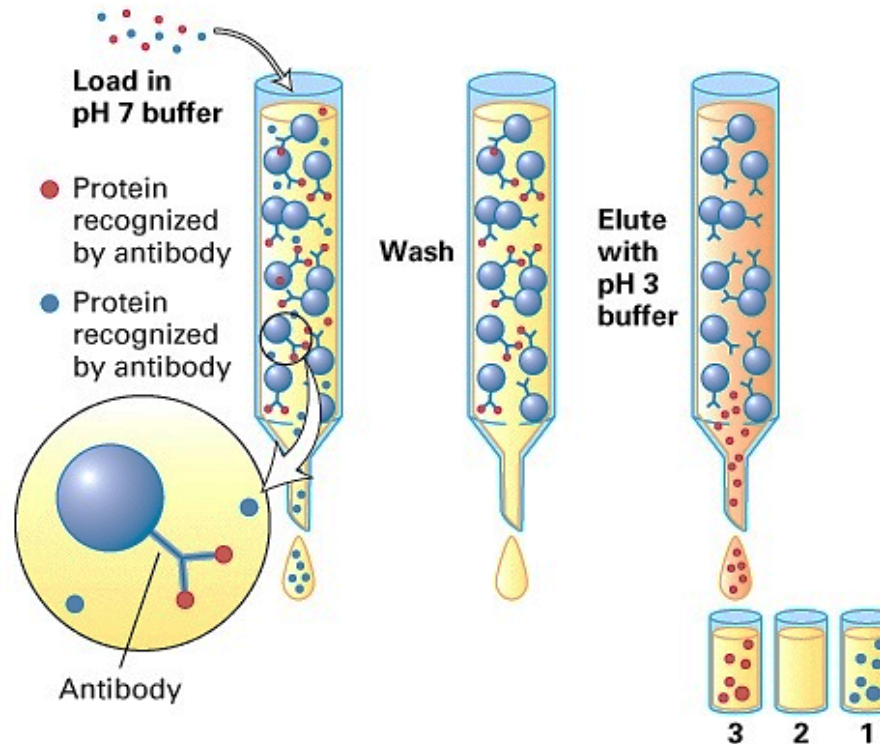
- A specifikus kölcsönhatásban résztvevő komponensek megkötődnek az állófázison.
- A nem kötődő molekulák gyorsan eluálódnak.
- A vizsgálandó komponens eluálása az oszlopról az elválasztás alapját képező kölcsönhatás megszüntetésével (pl. pH változtatás, detergenssel).

Affinitás kromatográfia

Alkalmazott kölcsönhatás típusok:

- enzim-szubsztrát
- antitest-antigén
- nukleinsav-komplementer nukleinsav szekvencia
- nukleinsav-nukleinsav kötő fehérje (hiszton)
- hormon-hormon receptor

Affinitás kromatográfia



- Fehérjeelegyet juttatunk az affinitás állófázisra, minden komponens visszatartás nélkül átfolyik, kivéve azt, amelyik specifikus kölcsönhatás kialakításával képes kötődni a ligandumhoz. → Rendkívül nagy szelektivitás jellemzi.
- A visszatartott fehérje elúciójához olyan eluenst kell alkalmazni, mely megbontja a kölcsönhatásokat (pH változtatás, detergens), vagy kompetitív ligandummal deszorbeálhatják.

Gélkromatográfia, Méretkizárási kromatográfia, (Size exclusion chromatography, SEC)

A minta komponenseinek méret szerinti megoszlása egy adott pórusméret tartományú porózus gél állófázis és egy folyadék mozgófázis között.

Állófázis:

Térhálós szerkezetű oldószerben duzzadó polimer.

Mikroszkópikus méretű pórusokat tartalmazó gömb alakú szemcsék.

Kizárási határértéknél nagyobb méretű molekulák kizáródnak a szemcsékből, a kizárási határértéknél kisebb molekulák bejutnak a pórusokba, lassabban haladnak az oszlopon.

Térhálósítás szabályozható, különböző pórusméretű töltetek létrehozása

- dextrán (Sephadex)
- agar-agar
- poliakril-amid
- Szilikagél
- Sztírol-divinil benzol polimerizátum

Méretkizárási kromatográfia, SEC

Mozgófázis:

- gél duzzadására
- minta oldására
- elúcióra használt
- az elválasztásban nincs szerepe
- mintákat izokratikusan (egy oldószerrel) választjuk el
- hidrofil gélhez poláros eluens
- apoláros gélhez szerves eluens
- mintát akkor juttatjuk géltre , amikor eluens teljesen beszívódott a gélbe (csúcsszélesedés)

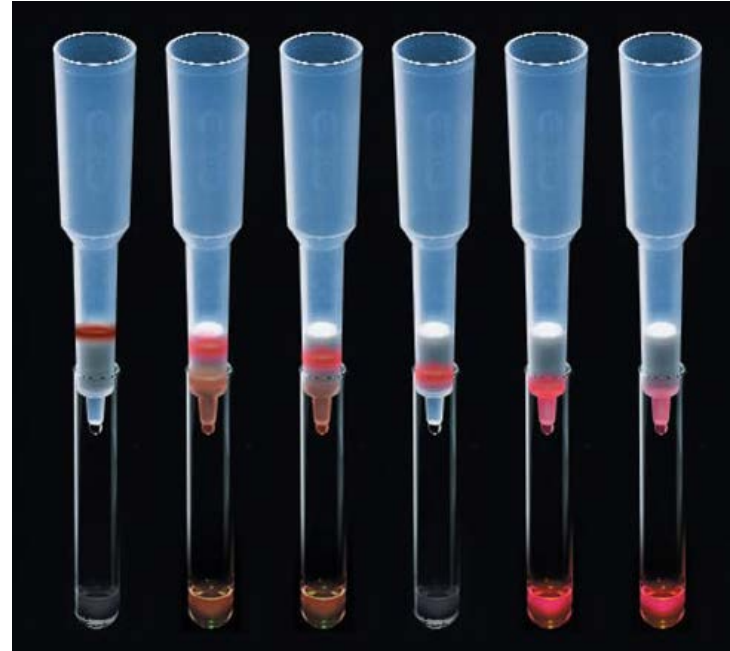
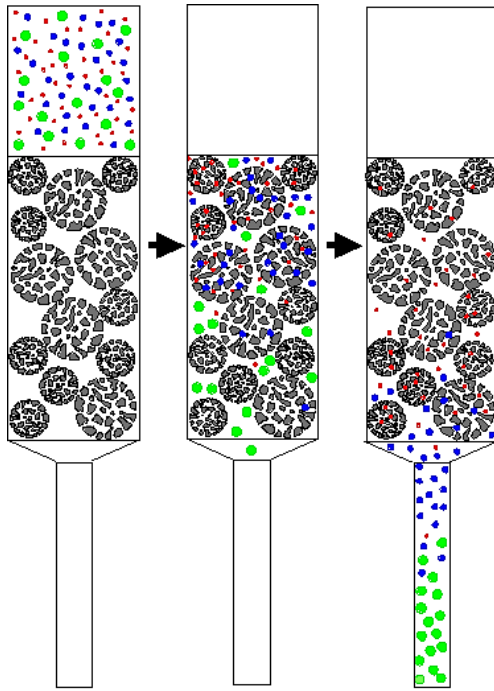
Elválasztás alapja:

A nagy molekulák kizáródnak az állófázis pórusaiból, gyorsan átjutnak a szemcsék között, míg a kisebb molekulák belépnek a pórusokba, lassabban haladnak. Az eluens folyamatos utánpótlásával eluáljuk az anyagokat, a kifolyó frakciókban a komponensek molekulatömegük csökkenő sorrendjében jelennek meg.

Elválasztott komponensek kimutatása:

UV-VIS spektrofotometria, törésmutató mérése

Méretkizárási kromatográfia, SEC

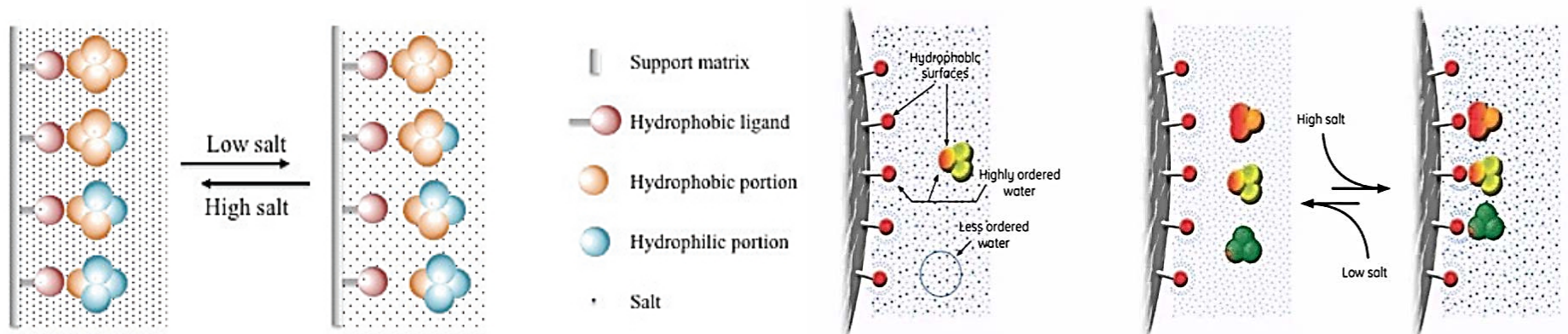


Alkalmazás:

- 1000 Da feletti anyagok: fehérjék, nukleinsavak, enzimek elválasztása
- Makromolekulák elválasztása sóktól, kismolekuláktól (biokémia, gélszűrés)
- Polimerkémiában molekulatömeg eloszlás meghatározása

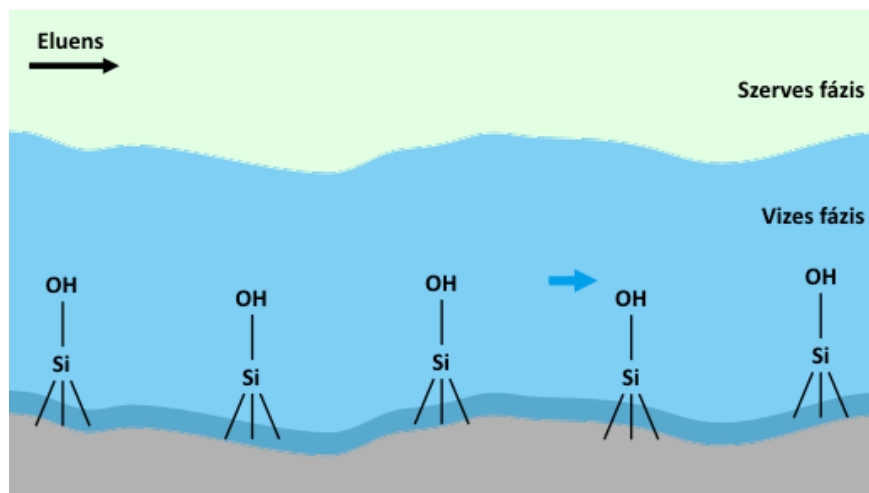
Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC)

- Állófázisa felülethez kötött apoláros (hidrofób) csoportokat tartalmaz.
- Elválasztás alapja hidrofób kölcsönhatás.
- Fehérjéket nagy koncentrációjú sóoldatban viszik fel oszlopra, nagy ionerősség segíti a hidrofób kölcsönhatások kialakulását.
- Só koncentráció csökkentésével az állófázishoz kötődő molekulák növekvő hidrofobicitásuk sorrendjében (először legkevésbé apoláros, legvégül legapolárosabb) távoznak.



Hidrofil kölcsönhatás kromatográfia (HILIC)

- Nagy polaritású és ionos anyagok meghatározása.
- Eluens $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ elegye, víztartalma 2-40%.
- Poláros állófázis felületen kialakul egy vízben gazdag réteg, megoszlás jön létre az állófázis felületén ill. annak közelében elhelyezkedő vizes fázis és az eluens kevésbé poláris (acetonitrilben gazdagabb) poláris fázisa között.



Szuperkritikus folyadékkromatográfia, SFC

Folyadék- és gázkromatográfiának sajátos kombinációja

Eluens: szuperkritikus folyadék (kritikus hőmérséklet és kritikus nyomás felett tartott gáz (CO₂, nitrogén-oxid)).

Nagy diffúziós együttható: kb. százszorosa a folyadékoknak, ezért nagy méretű molekuláknak is jó oldószere, gyorsabb, hatékonyabb elválasztás érhető el.

Kis viszkozitás: hosszabb kolonnákon használható.

CO₂ előnye szuperkritikus folyadékként:

- alacsony kritikus hőmérséklet (31°C) és kritikus nyomás(73 bár) , technikailag könnyen biztosítható a kritikus állapot
- Inert
- minta hőbomlásától nem kell tartani
- nem tűzveszélyes
- nyomás és hőmérséklet változtatásával befolyásolható oldóképesség
- elválasztás hatékonysága nyomásprogramozással javítható (nyomás növelésével fluidum sűrűsége nő, oldóképessége nő, rövidebb t_R , éles csúcsok)

Szuperkritikus folyadékkromatográfia, SFC

Állófázis:

- Folyadék: hordozó felülethez kötött folyadékfilm, HPLC-ben használt megosztófolyadékok
- Szilárd: HPLC-nél megismert töltetek (C18)

Detektorok: UV-VIS spektrofotometria, fluoreszcencia, lángionizációs detektor, MS

Alkalmazás: olyan analitikai problémák, melyekre sem GC, sem HPLC nem ad megoldást, pl. nagy molekulású szénhidrogének meghatározása

