

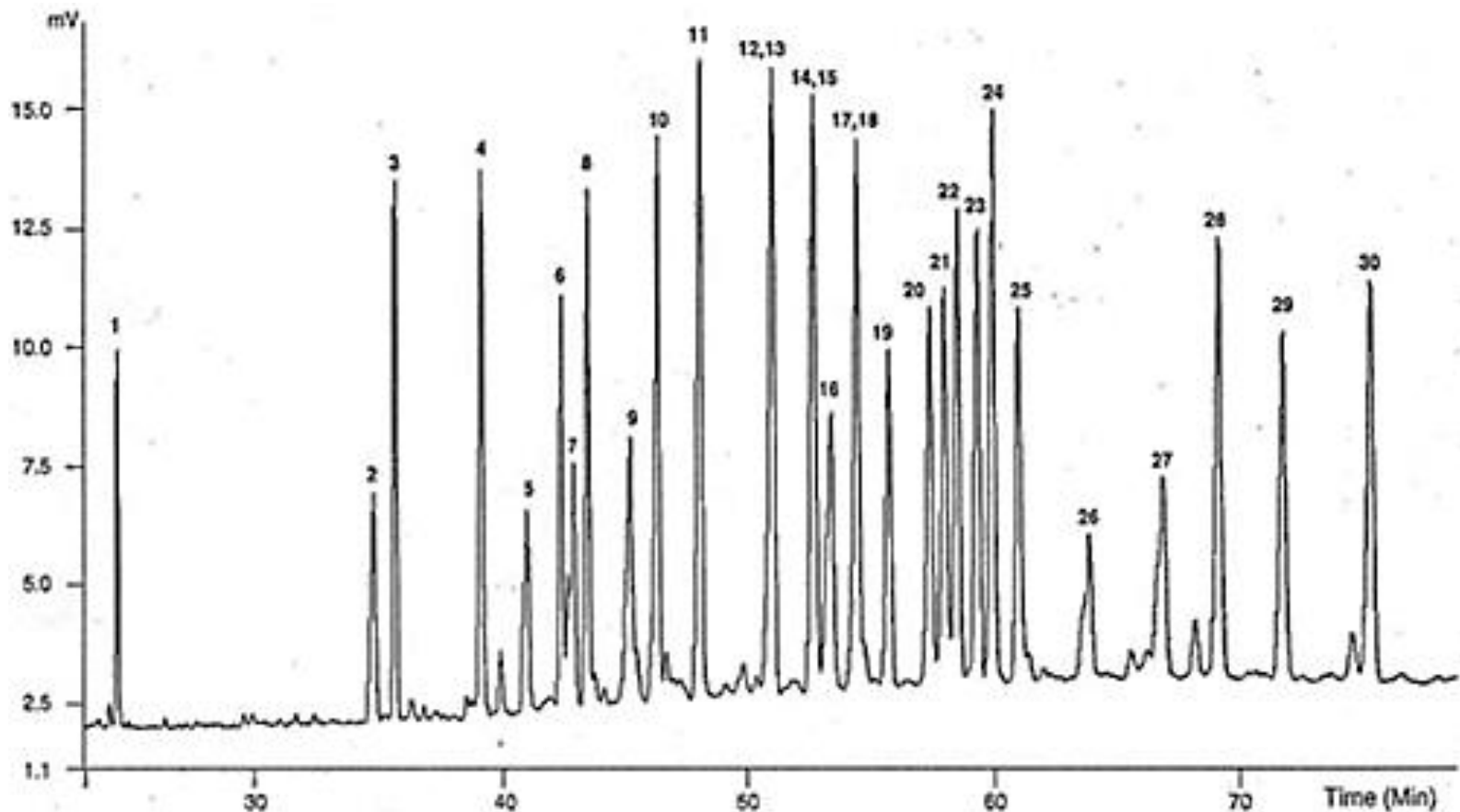
9. Hét

Műszeres analitika
Folyadékkromatográfia
Ionkromatográfia
Gélkromatográfia
Affinitás kromatográfia
Gázkromatográfia

Dr. András Melinda

Kromatográfia

Nagy hatékonyságú, dinamikus elválasztási módszer, mely során az elválasztandó komponensek egymással érintkező két fázis között oszlanak meg, ezek egyike az állófázis, a másik pedig a mozgófázis, amely az állófázison meghatározott irányba halad.



Kromatográfia

A különböző kromatográfiai technikák csoportosítása az álló és mozgó fázis halmazállapota és az elválasztás alapjául szolgáló fizikai jelenség alapján

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

- Folyadékkromatográfia esetén a mozgófázis mindig folyadék, az állófázis lehet folyadék, illetve szilárd halmazállapotú.
- **Izokratikus elúció:** egyetlen oldószerrel
- **Gradiens elúció:** több oldószerrel

Folyadék-kromatográfia

Folyadék-szilárd (adszorpciós) kromatográfia:

- Az állófázis nagy fajlagos felületű, 3-10 μm méretű részecskéket tartalmazó töltet.
- Az elválasztandó komponensek a szilárd fázis felületén eltérő erősséggel kötődnek. A megkötött komponensek alkalmas oldószerekkel eluálhatók az oszlopról, a kötődés erősségétől függően különböző időpontban jelennek meg az oszlopról távozó oldószerben.
- **NORMÁL FÁZIS:**
 - poláris állófázis: szilikagél, alumínium-oxid
 - apoláris, gyengén poláris eluens
- **FORDÍTOTT FÁZIS:**
 - apoláros állófázis: C8 vagy C18 szénhidrogénlánccal módosított szilikagél
 - erősebben poláris oldószer
- Oldószerek eluotróp sora: poláris adszorbensen az oldószerek növekvő polaritás szerinti sora, ami megfelel a növekvő dielektromos állandó sornak.

Folyadék-kromatográfia

Folyadék-folyadék (megoszlásos) kromatográfia:

- Az állófázis dezaktivált, szilárd hordozóra egyenletesen felvitt folyadék.
- A mozgófázis megfelelő polaritású oldószer, ill. oldószerkeverék.
- Az álló- és mozgófázis, illetve a mintakomponensek polaritása határozza meg a komponensek fázisok közötti megoszlását.
- Ha az álló-és mozgófázis polaritása hasonló, a minta mindkettővel azonos erősségű kölcsönhatást alakít ki, ami gyenge felbontást eredményez.
- Poláris komponensek poláris állófázisról apoláris mozgófázissal vizsgálhatók megfelelően. → **NORMÁL FÁZIS**
- Apoláros komponensek apoláros állófázisról poláris eluenssel választhatók el optimálisan. → **FORDÍTOTT FÁZIS**

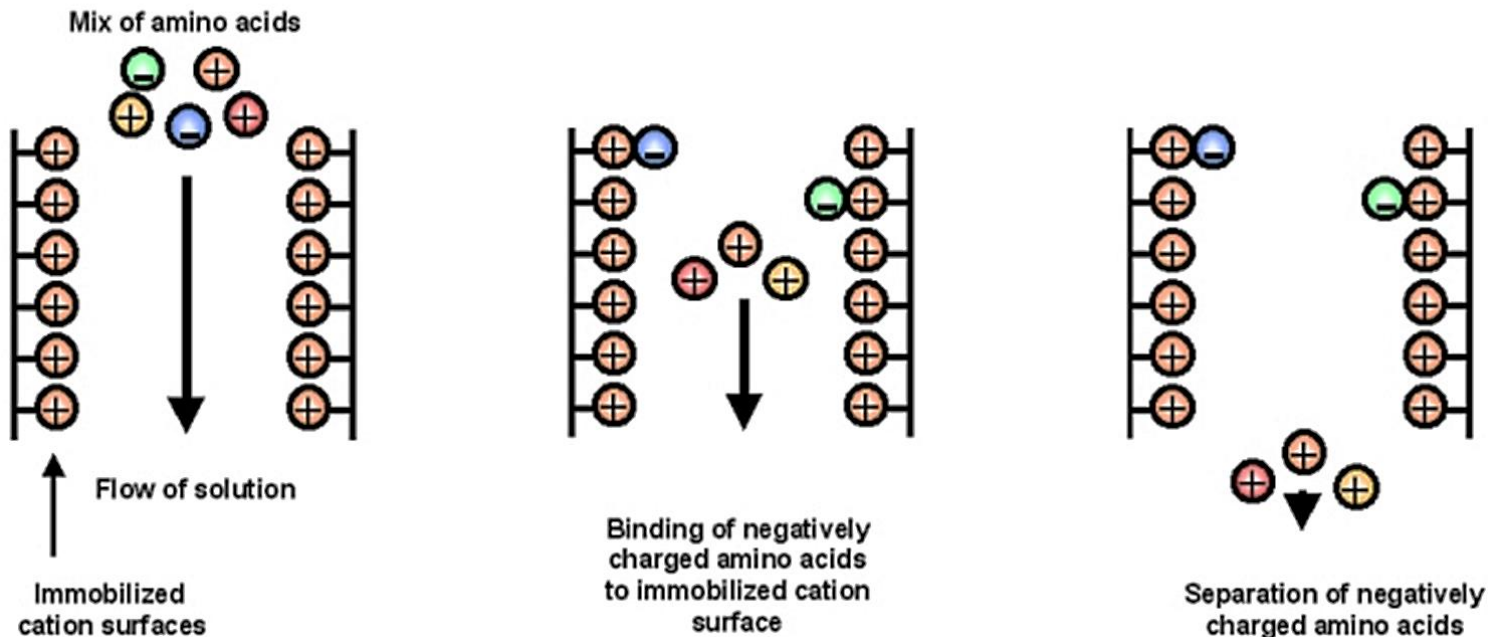
Folyadékkromatográfia

	Normál	Fordított
állófázis polaritása	nagy / poláros	kicsi / apoláros
mozgófázis polaritása	kicsi-közepes / apoláros	közepes-nagy / poláros
tipikus mozgófázis	heptán, kloroform	metanol, víz
elúciós sorrend	legkevésbé poláros először	legpolárosabb először
retenciónövelés módja	csökkenő polaritású mozgófázis	növekvő polaritású mozgófázis

Ionkromatográfia

- 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.
- **Kötődött ionok elúciója:** NaCl gradiens , vagy pH változtatásával.

Ion-exchange chromatography (anion exchange)



Affinitás kromatográfia

A mintakomponens és a kromatográfiás állófázishoz kötött specifikus ligandum közötti reverzibilis kölcsönhatáson alapul.

Állófázis: a vizsgált molekula kölcsönható partnere van rögzítve a kromatográfiás mátrixhoz.

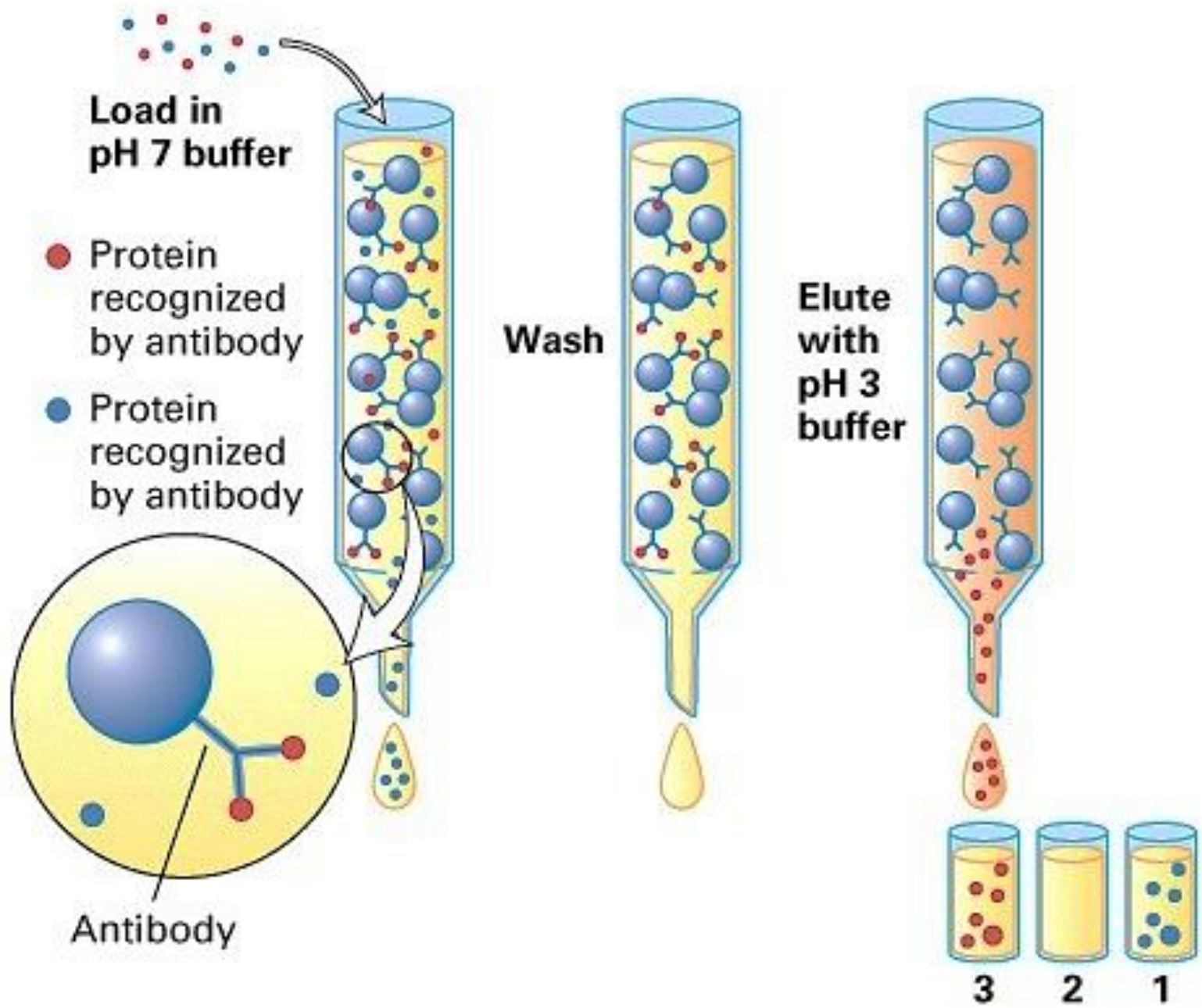
Elválasztás alapja:

- 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.

Alkalmazott kölcsönhatás típusok:

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

Affinitás kromatográfia



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:

- dextrán
- poliakril-amid
- szilikagél

Mozgófázis:

Az elválasztásban nincs szerepe, csak a mintakomponenseket oldja. A mintákat izokratikusan (egy oldószerrel) választjuk el.

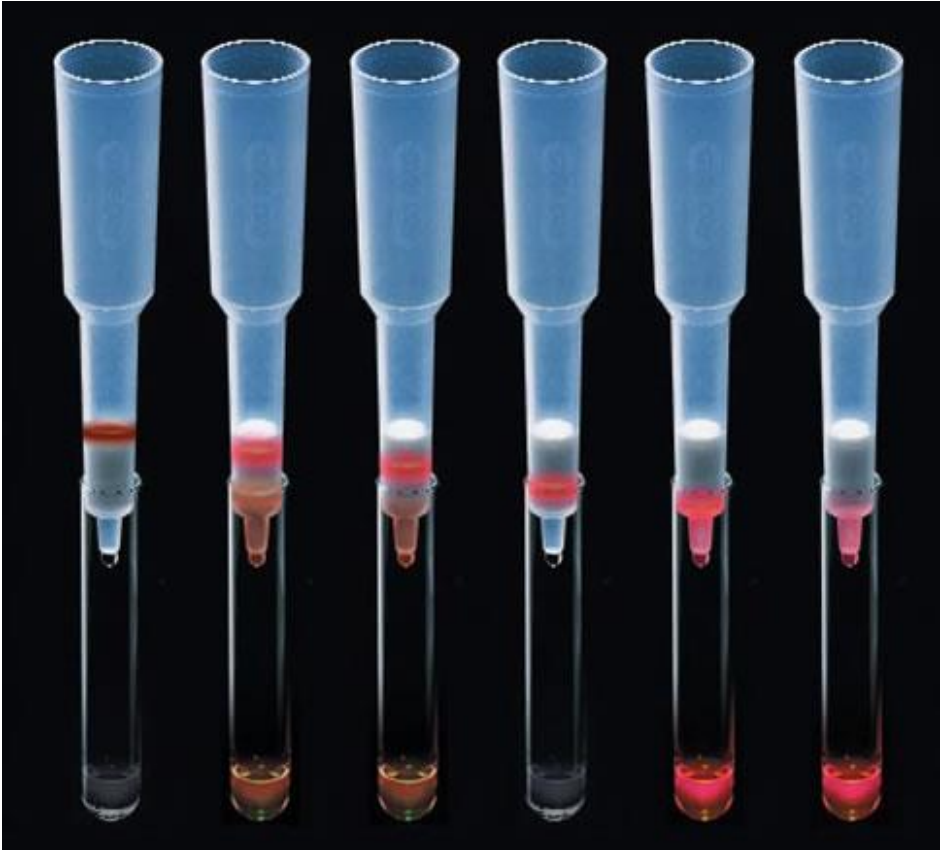
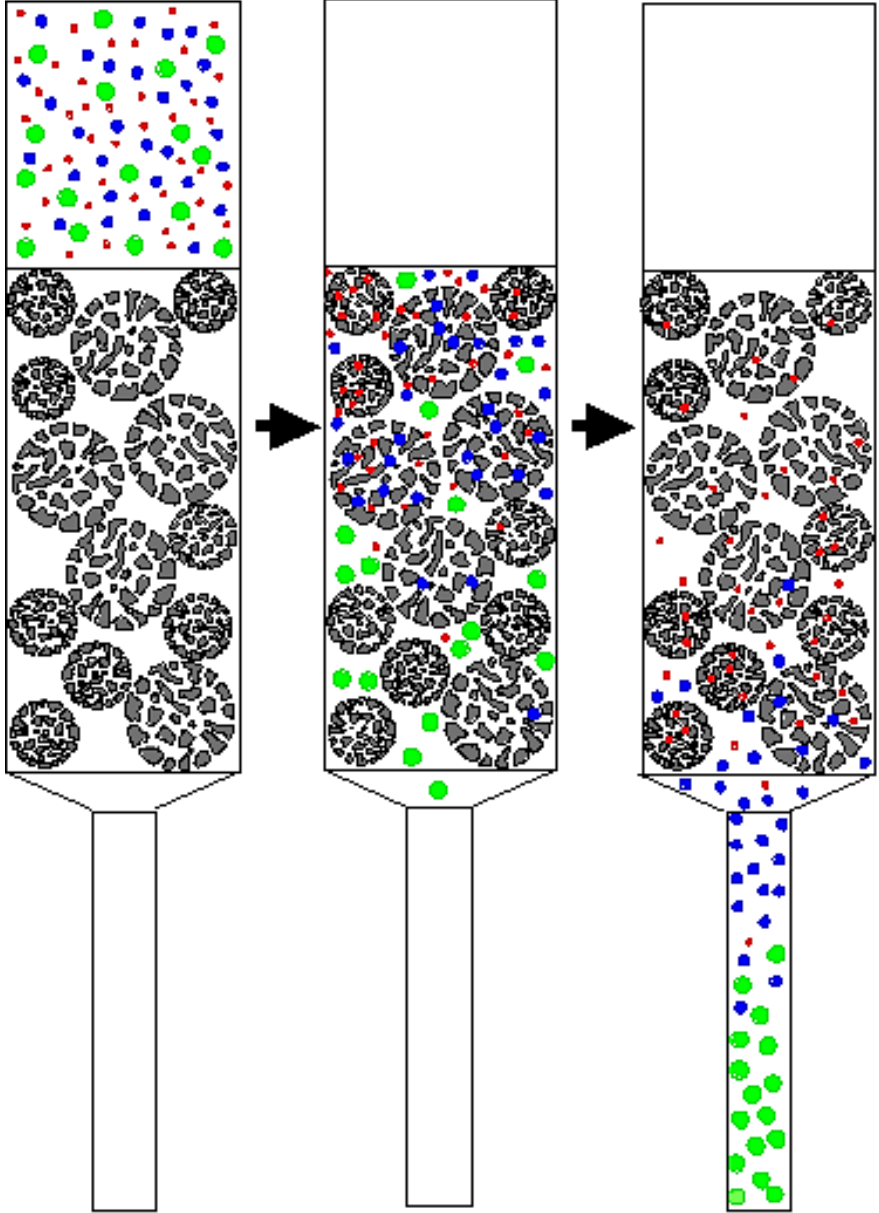
Elválasztás alapja:

A nagy molekulák kizáródnak az állófázis pórusaiból, gyorsan átjutnak a szemcsék között, míg a kisebb molekulák belépnek a pórusokba, lassabban haladnak.

Alkalmazás:

1000 Da feletti anyagok: fehérjék, nukleinsavak, enzimek elválasztása.

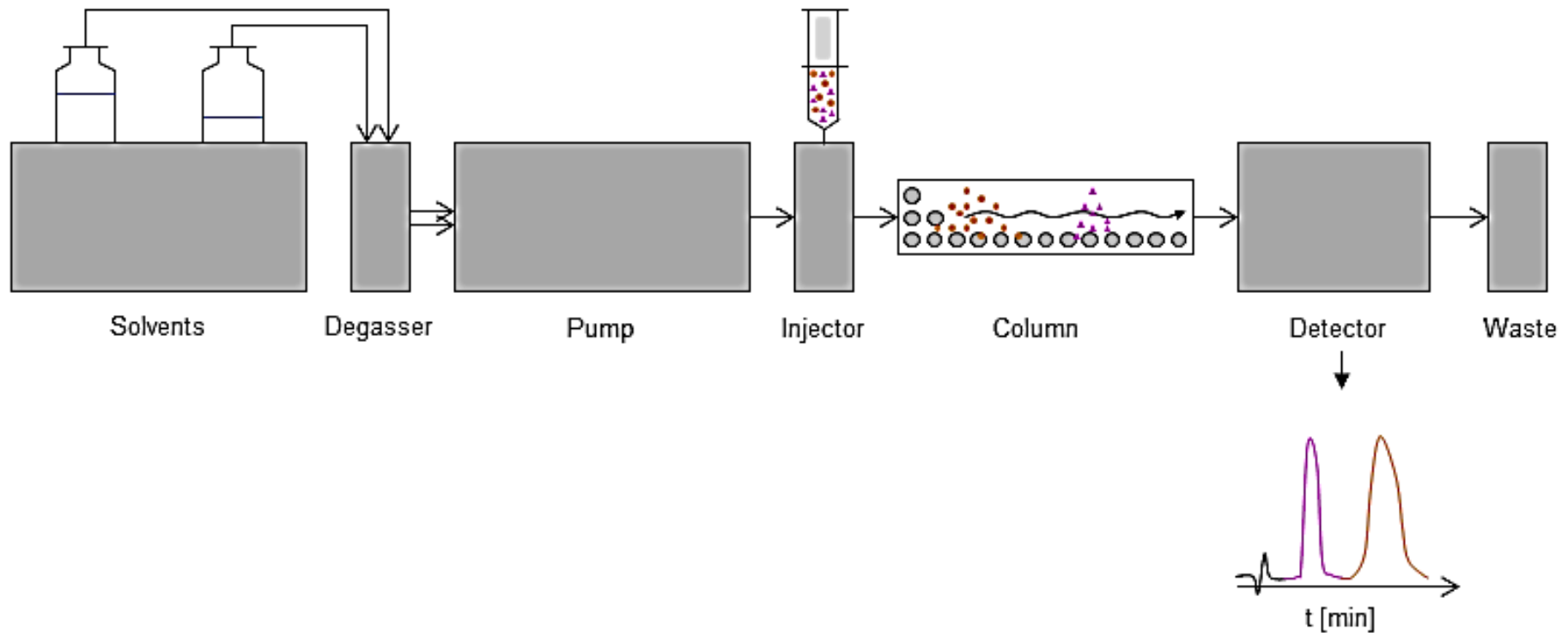
Gélkromatográfia, Méretkizárási kromatográfia, (Size exclusion chromatography, SEC)



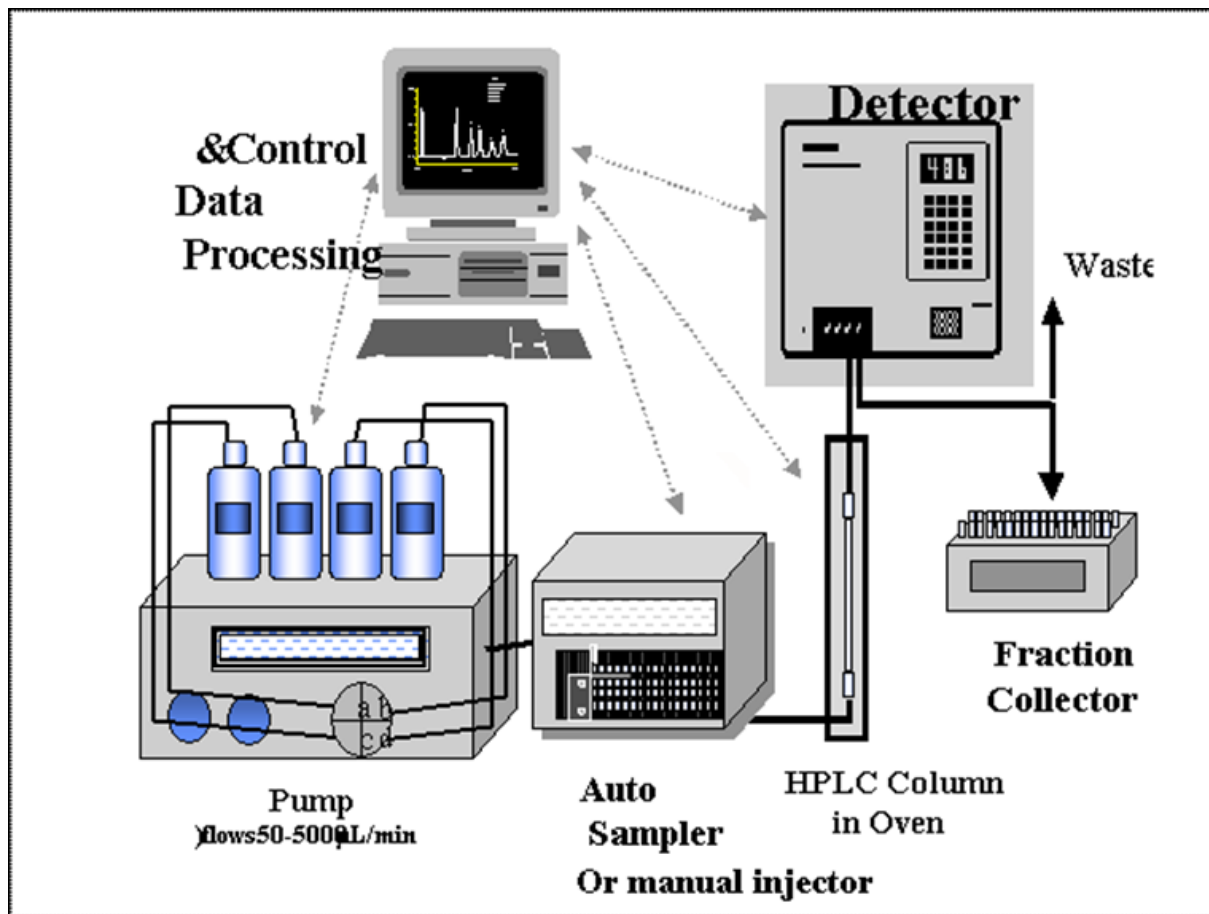
Nagynyomású folyadékkromatográfia, HPLC

- nagynyomású folyadékkromatográfia, vagy nagy teljesítményű folyadékkromatográfia angolul high performance liquid chromatography, vagy high pressure liquid chromatography
- Vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására használt kromatográfiai eljárás.

1. A HPLC készülék felépítése:



HPLC



1. Műszer részei:

1. Oldószertárolók
2. Pumpák
3. Szűrő
4. Előtétkolonna
5. Automata injektor
6. Kolonna
7. Termosztálás
8. Detektorok

Horváth Csaba (1930-2004)

- 1952-ben vegyészmérnöki diploma BME
- 1964 Yale Egyetemen (School of Medicine) **ő építette meg az első nagynyomású folyadékkromatográfot.**
- Elsőként ismerte fel a HPLC egyedülálló jelentőségét a biokémia, a molekuláris biológia és a modern bioanalitika területein.
- A fordított fázis alkalmazása a HPLC-elválasztásokhoz - mely ma a világ leghelterjedtebb analitikai módszere - az első microbore HPLC-oszlop - melyet biológiai minták ioncserélő elválasztásához fejlesztett ki -, valamint a kizsorításos preparatív HPLC egyaránt az ő nevéhez fűződik.



Oldószertárolók:

- Tárolóedények és csövek kémiaailag teljesen inert legyen az oldószerekkel szemben (üveg, PEEK, teflon).
- Az eluentároló zárt legyen, de nem légmentesen zárt.
- Maximum 4 (grádiens elúció).
- Oldószer gázmentesítése, lehet ultrahangos, héliumos, vákuumos.

Pumpák:

- A folyadék szállítását biztosítja, pulzálásmentes, oldószereknek ellenálló.
- Gradiens képzés: az oldószerek meghatározott arányú keverése.

Gradiens elúció: A mozgófázis összetételének mérés közbeni változtatása..

Izokratikus elúció: A mozgófázis összetétele az elválasztás során állandó.

- Szokásos nyomástartomány 0-450 bar
- Térfogati áramlási sebesség: 1-2 ml/perc.
- UPLC (ultrahigh pressure liquid chromatography) 1200 bar (1-2 mm belső átmérőjű, nagyon finom szemcseméretű kolonnákkal végzett munkához).

Szűrő:

- Az oldószervezetékben helyezkedik el.
- A szilárd szennyezők kiszűrésére szolgál, melyek a pumpát károsítják, a kolonnát eltömik.

Előtétkolonna:

- Lazább, darabosabb állófázissal töltött oszlop.
- Analitikai kolonna védelmét biztosítja.
- Megoszlásos kromatográfiában a mozgófázis állófázissal való telítését szolgálja.

Automata injektor (autosampler):

- Mérendő minta bejuttatása a mintabemérő hurokba, ahonnan a mintát veszteség nélkül juttatja a nagynyomású folyadékáramlásba.
- Mintatérfogat: 5-500 μ l.
- Tű és a csövek tisztítása a keresztszennyezés kizárása miatt.

HPLC

Kolonna:

Állófázist tartalmazó 10-30 cm hosszú, 4-10 mm átmérőjű acélcső.

5-10 μm szemcseméretű töltet (40000-60000 tányér/m).

(3 μm -nél kisebb szemcseméret UPLC-nél)

Kolonnatöltetek:

- **Szilikagél (Si):** normál fázisú töltet.
- **Oktil (C8, RP-8), oktadecil (C18, RP-18):** legelterjedtebb fordított fázisú töltetek. Apoláris komponenssel szemben legnagyobb a visszatartás.
- **Fenil (C6H5):** fordított fázisú töltetet, nagy szelektivitás aromás vegyületekkel szemben.
- **Cianopropil (CN):** fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Gradiens elúcióhoz különösen alkalmas.
- **Aminopropil (NH₂):** fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Anioncserélő töltet is. NF-ként szelektivitása hasonló szilikához, előnye, hogy a víz nem dezaktiválja a felületet.

Detektorok:

Legyen univerzális, nagy érzékenységű.

UV-VIS spektrofotometriás detektor, diódasoros detektor:

- Mintán a teljes spektrumú fény áthalad, amelyet rács segítségével a minta után bontanak fel, minden hullámhossz érzékelését más-más dióda végzi.
- Spektrum felvétele.
- 1-5 rögzített hullámhosszon való detektálás.
- Lehetséges minden vegyület saját elnyelési maximumán való detektálása.

Fluoreszcenciás detektor:

- Vegyületet kiválasztott hullámhosszúságú fénnel gerjesztik, és a gerjesztett vegyület által kibocsátott fényt detektálják (a kibocsátott fény hullámhossza nagyobb, mint gerjesztő fényé).
- Érzékenyebb az UV-VIS detektornál.
- Detektorcellát termosztálni kell.

Elektrokémiai detektor, vezetőképességi detektor:

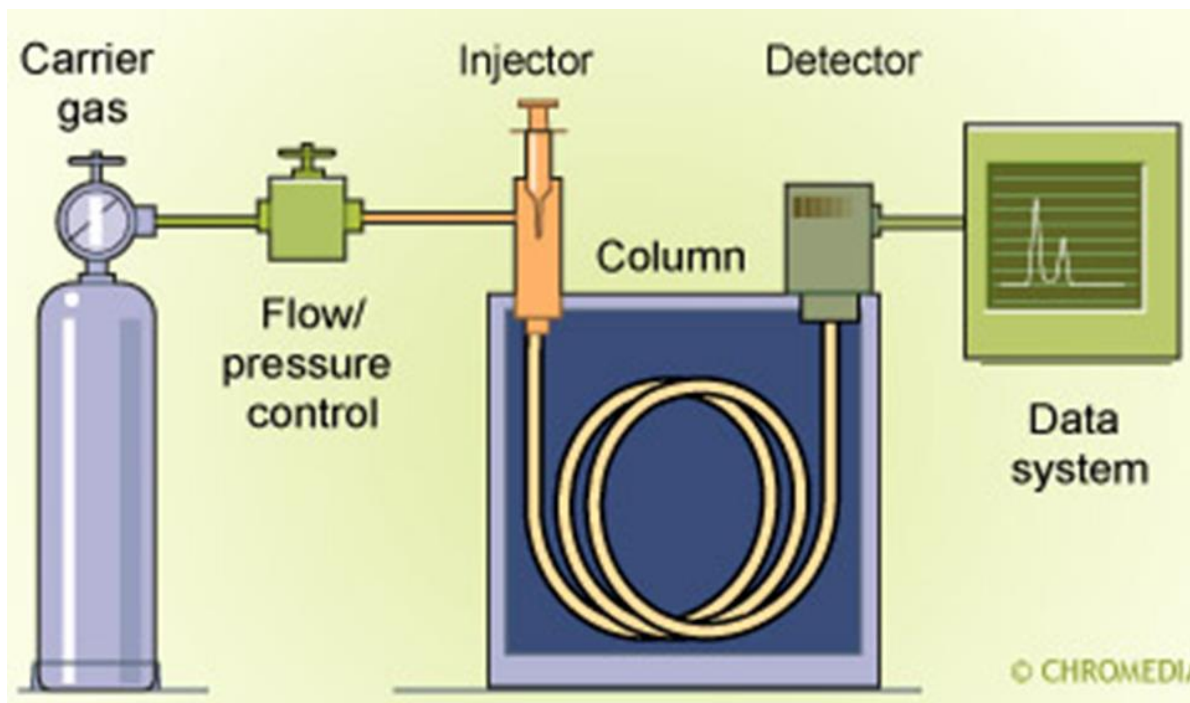
- Áram intenzitása arányos az oldott anyag mennyiségével.
- Gradiens elúció esetén csak akkor lenne használható, ha az eluens vezetőképessége állandó marad a gradiens során, ezért gyakorlatban izokratikus elúcióknál alkalmazzák.

Kapcsolt technika: HPLC-MS, tömegspektrométerrel való kapcsolás:

- A kolonnáról lejövő mintakomponensek az ionforrásban ionizálódnak, a töltött ionok tömeg/töltés (m/z) szerinti szétválasztását az analizátor végzi, végül a detektor az analizátor felől érkező ionokat felfogja.
- Nagyfokú szelektivitás.
- Univerzális (a tömegmérés univerzális detektálást tesz lehetővé).
- Szerkezeti információk szolgáltatása.
- Nagy érzékenység.

Gázkromatográfia, GC

- A gázkromatográfiában a mozgó fázis mindig gáz, az állófázis pedig lehet szilárd (gáz-szilárd adszorpciós kromatográfia) vagy folyadék (gáz-folyadék megoszlási kromatográfia) is.
- Az oszlopról eluálódó komponensek által a detektorban keltett jel intenzitását az idő függvényében ábrázolva kapjuk a kromatogramot.



1. Műszer részei:

1. Gázpalack
2. Nyomás- és áramlásmérő egység
1. Injektor
2. Kolonna
3. Detektor

Gázkromatográfia, GC

Mozgófázis:

- gáz: hélium, argon, nitrogén, hidrogén
- 0,1-0,2 bar túlnyomás
- 10-100 cm³ / min áramlási sebesség

GC esetén **csak illékony anyagok választhatók el**, melyek a nem illékony anyagokat kémiai származékképzéssel (pl. diazometánnal metilészter képzés, trimetil-szilil-imidazollal sziliéter képzés) lehet illóvá tenni.

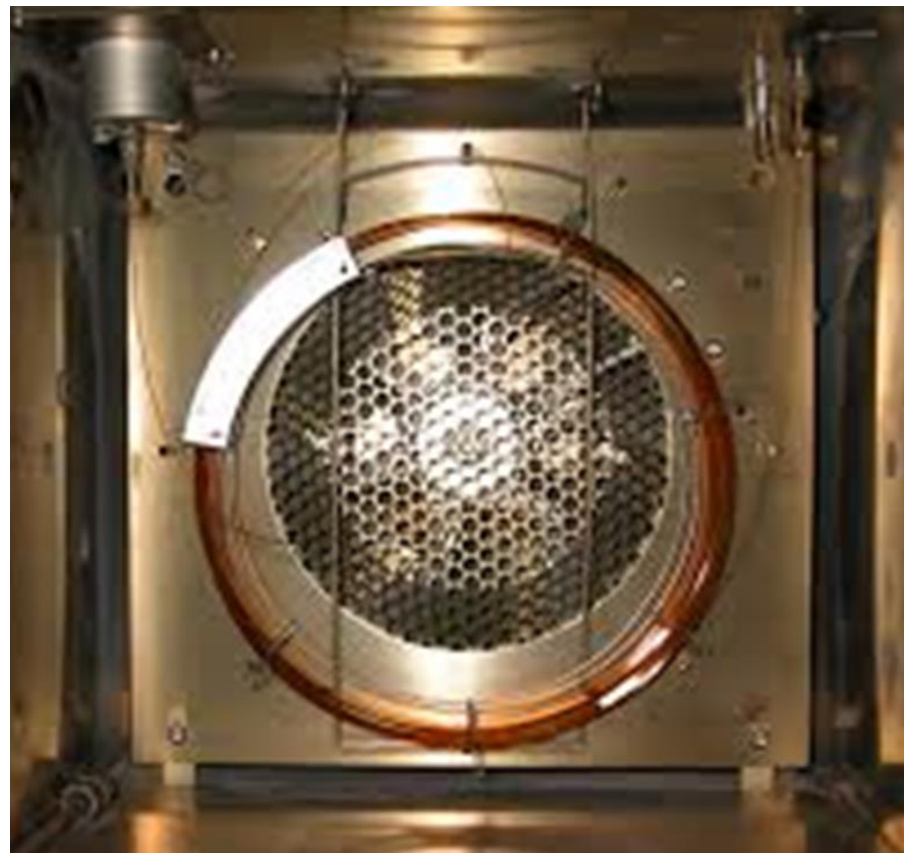
Injektor:

- Szilikongumi szeptum + fecskendő vagy szelep
- Gázminta: 1-2 ml, illékony
- Folyadékminta: 1-2 µl, 300 °C-ig bomlás nélkül gyorsan és teljesen elpárologtatható anyagok elemzése

Gázkromatográfia, GC



mintainjektálás

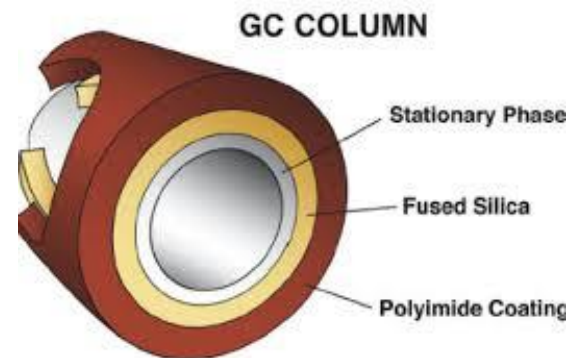


GC kolonna

Gázkromatográfia, GC

Kolonna:

- **Töltetes:** 1-3 m hosszú, 2-4 mm átmérőjű üveg, fém, teflon cső szilárd állófázissal, vagy szilárd hordozóra 0,05-1 μm vastagságban felvitt folyadék állófázis. Elméleti tányér: 500-1000/m.
- **Kapilláris:** 10-100 m hosszú, 0,1-0,5 mm belső átmérőjű kapilláris, melynek belső falára 1 μm vastagságban viszik fel az állófázist. Elméleti tányér: 2000-5000/m.



Kolonnatöltetek:

- **GSC:** Nagy fajlagos felületű adszorbensek: alumínium-oxid, szilikagél, alumínium-szilikátok.
- **GLC:** Nagy felületű inaktív hordozóra (grafit, teflon, diatomaföld) felvitt poláris, vagy apoláris folyadék (glicerin, polietilén-glikol, paraffinok).

A kolonnatér hőmérséklete szabályozható.

A hőmérsékletprogramozás a gradiens elúció speciális esete.

Gázkromatográfia, GC

Detektorok:

A vivőgáz valamely fizikai vagy kémiai tulajdonságát mérik, amelyben a minta komponensei változást okoznak.

Lángionizációs detektor:

- A kolonnáról kilépő szerves komponenseket termikusan ionizálják, és a komponens mennyiségével arányos ionáramot mérnek.
- Szervetlen molekulákat nem érzékeli, érzékenysége: 10^{-12} g/ml.

Termoionizációs detektor:

- Lángionizációs detektorhoz hasonló, de láng nélküli.
- Szerves foszforvegyületekre különösen érzékeny.

Elektronbefogásos detektor:

- A β -sugárzással ionizált vivőgáz elektronáramát az elektronbefogásra képes komponensek csökkentik, ezt méri a detektor.
- Szelektív alkilhalogenidekre, karbonilokra, nitrilekre, fémorganikus vegyületekre, érzékenysége: 10^{-14} g/ml.

Kapcsolt technika: GC-MS, tömegspektrométerrel való kapcsolás