



Fejezetek a műszeres analitikából III.

Műszeres analitikai gyakorlatok

egyetemi jegyzet

A tananyag elkészítését a „A Debreceni Egyetem fejlesztése a felsőfokú oktatás minőségének és hozzáférhetőségének együttes javítása érdekében” az **EFOP-3.4.3-16-2016-00021** számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Összeállították

a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék munkatársai:

Baranyai Edina, Buglyó Péter, Fábián István, Forgács Attila,
Földi-Bíró Linda, Gáspár Attila, Gyémánt Gyöngyi,
Hőgyéné Grenács Ágnes Judit, Kállay Csilla, Kalmár József,
Kecskeméti Ádám, Lázár István, Pokoraczkiné András Melinda,
Szabó Mária, Timári István, Tircsó Gyula, Tóth-Győri Enikő

Kézirat lezárva: 2019. szeptember 10

Előszó

Az analitikai kémia műszeres módszerei az elmúlt években óriási iramban fejlődnek, ezért az új módszerek egyetemi oktatása során az előadások, illetve a műszeres analitikai gyakorlatok folyamatos megújítására van szükség. Intézetünkben a műszeres analitika oktatásába évről évre új módszerek kerülnek be, míg más módszerek jelentősége csökken. Az új ismeretek átadása akkor lehet igazán hatékony, ha megfelelő minőségű és kellően részletes, magyar nyelvű oktatási segédanyagok állnak a hallgatók rendelkezésére, de sajnos a viszonylag ritkán megjelenő oktatási segédanyagok, egyetemi jegyzetek, szakkönyvek nem tudnak lépést tartani az egyre bővülő analitikai információkkal.

E jegyzet kiadásának nem célja, hogy a műszeres analitika teljes területét lefedje. A jegyzet összeállításával a rendelkezésre álló hazai szakirodalmat kívántuk kiegészíteni a nemrégiben megszületett, vagy nagy ütemben fejlődő területek tárgyalásával.

A jegyzetsorozat I. és II. kötete a 2011-ben szervezett Műszeres Analitika tanfolyam előadásanyagát összegzi. Az EFOP EFOP-3.4.3-16-2016-00021 pályázat támogatása révén most kiadott III. kötet az Intézetünkben folyó műszeres analitikai gyakorlatok elméleti anyagát, illetve a feladatok leírását tartalmazza.

A szerzők

TARTALOMJEGYZÉK

GÉLELEKTROFORÉZIS.....	10
1. BEVEZETÉS.....	10
2. AZ ELEKTROFORÉZIS HORDOZÓ ANYAGAI.....	16
2.1 <i>Papír</i>	16
2.2 <i>Keményítőgél</i>	18
2.3 <i>Poliakrilamid-gél</i>	19
2.4 <i>Agarózgélek</i>	24
3. A GÉLELEKTROFORÉZIS GYAKORLATA.....	25
3.1 <i>Hőmérséklet, pH, ionerősség</i>	25
3.2 <i>Elektromos térerő</i>	26
4. FEHÉRJÉK ÉS NUKLEINSAVAK DETEKTÁLÁSA AZ ELEKTROFORETIKUS ELVÁLASZTÁST KÖVETŐEN.....	27
4.1 <i>Színezékek és festékek</i>	28
4.2 <i>Enzimek detektálása szubsztrátjaikkal</i>	31
4.3 <i>A Southern blot eljárás</i>	32
4.4 <i>A Northern blot eljárás</i>	33
4.5 <i>A Western blot eljárás</i>	33
4.6 <i>A DNS fragmentek detektálása a membránon DNS próbákkal</i>	34
5. GYORS, NAGYHATÉKONYSÁGÚ DNS SZEKVENÁLÁSI MÓDSZEREK.....	36
A HUMÁN GENOM PROJEKT (KIEGÉSZÍTÉS).....	41
FELHASZNÁLT ÉS AJÁNLOTT IRODALOM.....	43
ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK A GYAKORLATRA VALÓ FELKÉSZÜLÉSHEZ.....	43
LABORATÓRIUMI GYAKORLATOK.....	44
AZ ELEKTROFEROGRAMOK, KROMATOGRAMOK KIÉRTÉKELÉSE.....	49
1. A CSÚCSOK INTEGRÁLÁSA.....	50
1.1 <i>A csúcsok felismerése</i>	51
1.2 <i>Az alapvonal megszerkesztése</i>	53
1.3 <i>A csúcsterület meghatározása</i>	57
1.4 <i>Integrációs paraméterek</i>	58
2. A CSÚCSOK AZONOSÍTÁSA.....	61
3. MENNYISÉGI KIÉRTÉKELÉS.....	63
4. SPEKTRUMELEMZÉS.....	67
4.1 <i>Csúcstisztasági vizsgálatok</i>	68
4.2 <i>A spektrumkönyvtár használata</i>	72
4.3 <i>Az optimális detektálási hullámhossz meghatározása</i>	73
5. ANALITIKAI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA.....	74
5.1 <i>Zaj meghatározása</i>	74

5.2 Csúcsszimmetria.....	74
5.3 Csúcszélesség.....	76
5.4 Kapacitásfaktor (kapacitástényező).....	76
5.5 Tailing faktor.....	77
5.6 Elméleti tényérszám.....	77
5.7 Felbontás.....	77
KIEGÉSZÍTÉS A MÉRÉSI EREDMÉNYEK ELOSZLÁSÁNAK STATISZTIKAI JELLEMZÉSÉHEZ....	77
GRAFITKEMENCÉS ATOMABSORPCIÓS SPEKTROMETRIA.....	83
1. BEVEZETÉS.....	83
2. AZ ATOMSPEKTROSKÓPIA KIALAKULÁSA.....	83
3. ATOMSPEKTROMETRIÁS MÓDSZEREK.....	84
4. A GRAFITKEMENCÉS ATOMABSORPCIÓS SPEKTROMETRIA.....	86
4.1 Üregkatódlámpa.....	90
4.2 Grafitkemence.....	91
4.3 Háttérkorrekció.....	93
4.4 A fény felbontása.....	95
4.5 Detektor.....	96
5. ZAVARÓHATÁSOK.....	97
6. KIÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK.....	100
7. A GYAKORLATON ELVÉGZENDŐ FELADATOK.....	103
KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS.....	108
ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK.....	108
IRODALOM.....	108
1. A MÓDSZER RÖVID ÁTTEKINTÉSE.....	109
2. TÖRTÉNETI HÁTTÉR.....	111
3. A CE ELMÉLETE.....	112
3.1. Elektroforézis.....	112
3.2. Az elektroosmotikus áramlás.....	114
3.3 Az EOF szabályzása.....	118
3.4 Analitikai paraméterek.....	121
4. A CE MÓDSZEREI.....	123
5. A KAPILLÁRIS ZÓNAELEKTROFORÉZIS (CZE) ALKALMAZÁSI TERÜLETEI.....	125
6. A CE KÉSZÜLÉK FELÉPÍTÉSE.....	130
6.1. Injektálás.....	131
6.2 Elválasztás.....	134
6.3 Detektálás.....	135
7. AZ ELEKTROFEROGRAMOK KIÉRTÉKELÉSE.....	139
7.1 Minőségi analízis.....	139
7.2 Mennyiségi analízis.....	140
8. GYAKORLATOK A CZE ALKALMAZÁSÁHOZ.....	141

8.1 Alkálifém és alkáliföldfém ionok meghatározása	141
8.2 Alkilaminok meghatározása	141
8.3 Nukleotidok meghatározása	142
8.4 Tartósítószer anyagok meghatározása	142
9. A SEGÉDANYAGBAN SZEREPLŐ RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA	144
ATOMSPEKTROMETRIA	145
1. BEVEZETÉS	145
2. AZ ATOMSPEKTROSKÓPIA KIALAKULÁSA	145
3. A LÁNGSPEKTROMÉTEREK FELÉPÍTÉSE	149
3.1 Mintabevitel	150
3.2 Égők és lángok	152
3.3 A lángban végbemenő folyamatok	154
3.4 A fény felbontása	155
3.5 Detektor	158
4. LÁNGEMISSZIÓS SPEKTROMETRIA (FES)	159
5. LÁNGATOMABSORPCIÓS SPEKTROMETRIA (FAAS)	161
6. ZAVARÓHATÁSOK	165
7. KIÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK	166
8. A GYAKORLATON ELVÉGZENDŐ FELADATOK	169
8.1 Lángemissziós spektrometriás elemzések	169
8.2 Lángatomabszorpciós spektrometriás elemzések	171
8.3 Általános utasítások a gyakorlat végrehajtásához, az eredmények kiértékeléséhez:	173
8.4 Útmutató az analitikai gyakorlaton elkészített jegyzőkönyv elkészítéséhez	174
VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA (PAPÍRKROMATOGRÁFIÁVAL KIEGÉSZÍTVE)	177
1. A KROMATOGRÁFIÁKRÓL ÁLTALÁNOSAN	177
1.1 Oszlopkromatográfia, síkkromatográfia	179
2. A VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA ALAPJAI	181
2.1 A vékonyréteg kromatográfia anyagai, eszközei, alapvető technikái	182
3. A VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK MENETE	204
3.1 Oldatsorozatok, minták előkészítése	204
3.2 Lapok levágása, minták felcseppentése	204
3.3 Kifejlesztés, előhívás	207
4. VÉKONYRÉTEG KROMATOGRAMOK ELEMZÉSE	208
4.1 Alapfogalmak	208
4.2 Mennyiségi meghatározás a foltterület alapján	210
4.3 Mennyiségi meghatározás műszeres denzitometriás módszerrel	211
4.4 Minőségi és mennyiségi kiértékelés digitális fényképek alapján	211

5. MÉRÉSI FELADATOK.....	218
5.1 Kokamidopropil-betain kimutatása.....	218
5.2 Édesköményolaj vizsgálata	221
5.3 Aminosavak hidrofób kölcsönhatás kromatográfiája.....	224
5.4 Aminosavak elválasztása papírkromatográfiával	226
5.5 Aminosavak elválasztása cellulóz rétegen	228
5.6 Aminosavak elválasztása szilikagél rétegen.....	230
5.7 Emberi bőr felületén lévő aminosavak azonosítása	232
5.8 Ételfestékek elválasztása papírkromatográfiával.....	234
5.9 Ételfestékek elválasztása cellulóz vékonyrétegen.....	235
5.10 Ételfestékek elválasztása fordított fázisú rétegen	237
NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA (HPLC).....	239
1. A KROMATOGRAMOK JELLEMZÉSÉRE SZOLGÁLÓ PARAMÉTEREK	240
1.1 Alapfogalmak	241
1.2 Egyetlen csúcs jellemzésére szolgáló paraméterek.....	244
1.3 Több kromatográfiás csúcs egymáshoz viszonyított jellemzésére használatos paraméterek	255
2. A KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK ANYAGAI ÉS ESZKÖZEI	257
2.1 Eluens- és mintaelőkészítés	257
2.2 Kolonnák.....	260
2.3 Eluentszűrő edények, HPLC-s szerkezeti anyagok	264
2.4 Gázmentesítés.....	266
2.5 Pumpák	267
2.6 Automata injektorok, mintaváltók	268
2.7 Detektorok.....	269
3. A KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK ÁLTALÁNOS MENETE	273
3.1 Mérési módszer kidolgozása	273
3.2 Mintaelőkészítés	274
3.3 Elúciós technikák	275
3.4 Minőségi azonosítás.....	276
3.5 Mennyiségi meghatározás.....	276
4. MÉRÉSI FELADATOK.....	278
A gyakorlaton elvégzendő feladatok	279
AJÁNLOTT IRODALMAK.....	283
CIKLIKUS VOLTAMMETRIA	284
1. A MÓDSZER LEÍRÁSA	284
2. A MÉRÉSKOR LEJÁTSZÓDÓ FOLYAMATOK	287
3. A GÖRBÉK ÉRTÉKELÉSE ÉS INFORMÁCIÓTARTALMA.....	289
4. A MÓDSZER LEHETSÉGES FELHASZNÁLÁSI TERÜLETEI	292
5. ELVÉGZENDŐ FELADAT	293

IONKROMATOGRÁFIA.....	295
1. BEVEZETŐ	295
2. AZ IONKROMATOGRÁF FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSE	297
3. AZ IONKROMATOGRÁFIA TÍPUSAI.....	298
3.1 Ioncsere kromatográfia (ion-exchange chromatography)	298
3.2 Ionkizárásos kromatográfia (ion-exclusion chromatography).....	298
3.3 Ionpár kromatográfia (ion-pair chromatography).....	299
4. IONELNYOMÁS VEZETŐKÉPESSÉGI DETEKTÁLÁS ESETÉBEN	300
4.1 Ionelnyomósos (szuppresszált/„kétkolonnás”) ionkromatográfia	300
4.2 Nem ionelnyomósos („egykolonnás”) ionkromatográfia.....	301
4.3 Elektrokémiailag regenerált ionelnyomó („háromkolonnás”) ionkromatográfia (Electrically Regenerated Ion-Suppressor, ERIS).....	301
5. ÁLLÓFÁZISOK.....	302
6. MOZGÓ FÁZISOK	305
7. DETEKTÁLÁS	308
8. FELHASZNÁLT IRODALOM	309
9. GYAKORLAT.....	310
FEHÉRJE TISZTÍTÁSA PROTEIN PURIFIER PROGRAM SEGÍTSÉGÉVEL ...	312
1. BEVEZETÉS.....	312
2. FEHÉRJE TISZTÍTÁSI STRATÉGIÁK	312
2.1 Tisztítási protokoll tervezése	313
2.2 Tisztítási lépések kombinálása	314
3. A PROGRAM HASZNÁLATA	317
3.1 Módszerek és stratégiák	317
3.2 Navigáció és kontroll	327
PH-POTENCIOMETRIA	331
1. BEVEZETÉS.....	331
2. PH-METRIÁS MÓDSZEREK	333
3. A PH-METRIÁS BERENDEZÉS	334
4. A PH-METRIÁS BERENDEZÉS KALIBRÁLÁSA	335
5. A GRAN-FÜGGVÉNYEK.....	337
5.1 Egyértékű erős sav - erős bázis titrálási görbe kiértékelése	337
5.2 Egyértékű gyenge sav - erős bázis titrálási görbe kiértékelése	338
6. GYAKORLATI FELADATOK.....	339
6.1 0,05 mol/dm ³ koncentrációjú KH-ftalát törzsoldat készítése.....	340
6.2 Kb. 0,1 mol/dm ³ KOH oldat pontos koncentrációjának meghatározása.....	340
6.3 Kb. 0,1 mol/dm ³ HCl oldat pontos koncentrációjának meghatározása.....	341
6.4 Sósav-ecetsav savkeverék koncentrációjának meghatározása	341
7. ÚTMUTATÓ A PH-METRIÁS MÉRÉSEK KIVITELEZÉSÉHEZ	343

SPEKTROFOTOMETRIA.....	369
1. A FÉNYELNYELÉS RŐL.....	369
2. A SPEKTROFOTOMETRIÁS MÓDSZEREK.....	372
3. A SPEKTROFOTOMÉTER	374
3.1 Egysugaras spektrofotométerek	376
3.2 Kétsugaras spektrofotométerek.....	377
3.3 Diódasoros detektorral rendelkező spektrofotométerek.....	378
4. A SPEKTROFOTOMETRIA FELHASZNÁLÁSI TERÜLETE.....	379
5. DERIVATÍV SPEKTROFOTOMETRIA.....	381
5.1 A módszer elvi alapjai.....	381
5.2 A módszer elvi alapjai.....	383
5.3 A jel a derivatív spektrofotometriában.....	385
6. GYAKORLATOK	386
6.1. Cr(III) és Cr(VI) ionok illetve 6.2. Mn(VII) és Cr(VI) ionok egymás melletti meghatározása	386
6.3. Metilvörös és 6.4. brómkrezolzöld indikátorok koncentrációjának meghatározása	392
6.5. Szalicilsav koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével	400
6.6. A papaverin koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével.....	407
6.7. Kalmopirin tablettá szalicilsav tartalmának meghatározása derivatív spektrofotometriával	411
MÉRÉSEK FLUORIDION-SZELEKTÍV ELEKTRÓDDAL	414
1. BEVEZETÉS.....	414
2. A GYAKORLAT LEÍRÁSA	416
3. GYAKORLATI FELADATOK.....	417

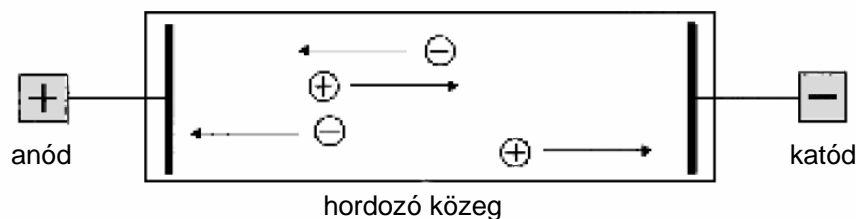
GÉLELEKTROFORÉZIS

1. BEVEZETÉS

Az elektroforézis egy olyan elválasztástechnikai módszer, mely azon alapul, hogy a töltéssel rendelkező részecskék elektromos térő (egyenáramú feszültség) hatására töltésviszonyaiknak megfelelő irányba vándorolnak. Az elektroforézis az egyik legfontosabb bioanalitikai módszer, mivel kiválóan alkalmazható nagy molekulatömegű biomolekulák izolálására és meghatározására, ugyanakkor - elsősorban a kapilláris elektroforézis - kisméretű ionok, molekulák, a legkülönbözőbb analitikai feladatok megoldására is alkalmazható. Ebben a leírásban a hagyományos elektroforézisről (elsősorban gélelektroforézisről) lesz szó, melyet döntően nagy méretű biomolekulák elemzéséhez használnak.

A nagyméretű biomolekulák (pl. a fehérjék és nukleinsavak) elektroforetikus mozgékonyasága a molekula töltésétől, molekulatömegétől és az alakjától (vagyis a harmadlagos és negyedleges szerkezettől) függ. Az elválasztás egy olyan közegben történik, melynek egyik végén a pozitív töltésű anód, a másik végén pedig a negatív töltésű katód van. Az inert, szilárd hordozó (papír vagy gél) folyadékot, általában puffert tartalmaz. A pozitív töltésű részecskék a katód, a negatív töltésű részecskék az anód felé fognak vándorolni. Az elektródok közötti közegben levő folyadék teszi lehetővé az ionok mozgását, míg a szilárd hordozó súrlódási ellenállást biztosít. Amikor feszültséget kapcsolunk az elektródokra, az elektromos térben mozgó ionok hatására elektromos áram folyik át a rendszeren. Az elektromos térerősség (E) határozza meg a részecskék sebességét a hordozó közegben:

$$E = (\text{alkalmazott feszültség}) / (\text{hordozó közeg hossza})$$



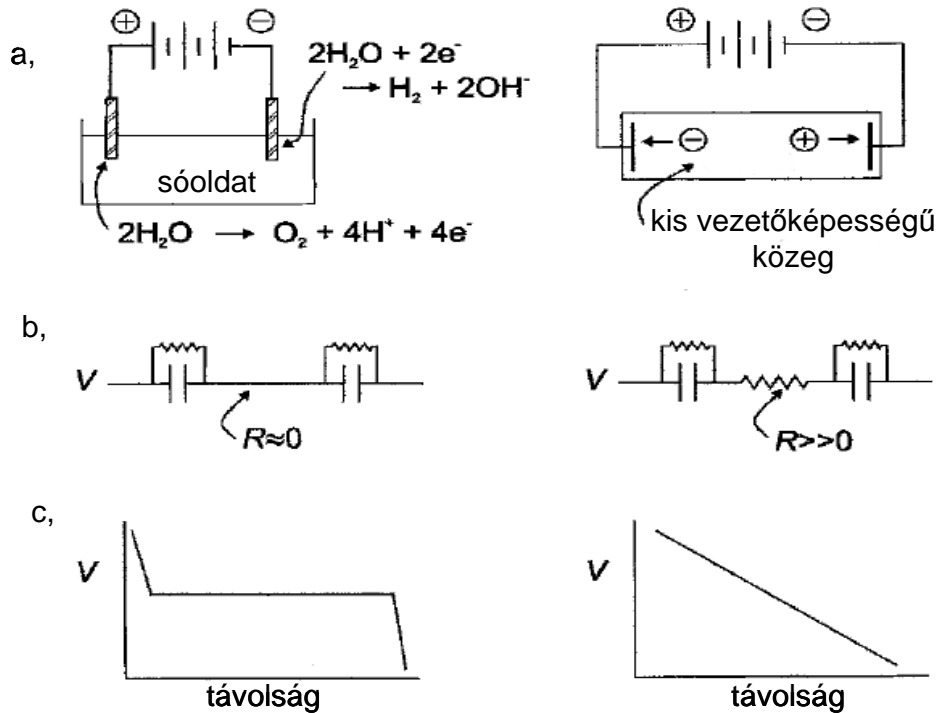
1. ábra Töltött részecskék mozgása elektroforézisnél

Kisfeszültségű elektroforézisnél tipikusan 20 V/cm, míg nagyfeszültségű elektroforézisnél 200 V/cm térerősséget használnak. Ilyen nagy feszültség alkalmazásakor jogosan vetődik fel a kérdés, miért nem számottevőek az elektrokémiai reakciók, hiszen azok lejátszódása <5V-nál ismeretes. Az elektrolízis és az elektroforézis közötti alapvető különbség egy model áramkör ellenállásával demonstrálható (2. ábra). Elektrolízis akkor történik, amikor a két elektród közötti közeg vezetőképessége nagy, ezért az elektród-oldat határfelületek kondenzátorokként viselkednek és a két elektród (ideálisan) zéró ellenállással van összekapcsolva. E kondenzátorokra kapcsolt nagy potenciálkülönbség miatt az elektród-oldat határfelület néhány nanométernyi részében óriási térerő alakul ki, ami elektrokémiai reakciót indít meg, és ezzel a kondenzátorok kisülnek.

Az elektroforézisnél használt közeg vezetőképessége jóval kisebb, és az elektroforetikus cellának megfelelő áramkör ellenállást is tartalmaz a kondenzátorok között az elektród-oldat határfelületeknél. A hordozó közegben a potenciál általában lineáris kapcsolatban van a távolsággal, így az elektromos tér határozza meg az elektroforetikus elválasztások sebességét. Az elektroforézis során az elektródoknál természetesen történik elektroforetikus ionvándorlás, hogy a hordozóban fenntartható legyen az áram, azonban az áramtermeléshez szükséges feszültség (<5V) nagyon kicsi a nagy alkalmazott feszültséghez képest.

Elektrolízis

Elektroforézis



2. ábra Kísérleti elrendezés (a.), elektromos áramkör (b.) és a potenciál (c.) függése az elektródok közötti távolságtól elektrolízis és elektroforézis esetén

Az elektroforetikus vándorlás elméleti leírásához vegyünk egy elektromosan szigetelő közegben q töltéssel rendelkező részecskét, melyet E elektromos erőternek teszünk ki. A részecskére ható elektromos erő egyenlő a közegben fellépő súrlódási erővel:

$$qE = fv$$

ahol f a súrlódási együttható és v a részecske vándorlási sebessége. Légüres térben a súrlódási együttható értéke zéró és a sebesség tart a végtelenhez. Az elektroforetizáló közegben a súrlódási együttható értéke jelentékeny és a töltött részecskék egy jellemző sebességgel haladnak a közegben.

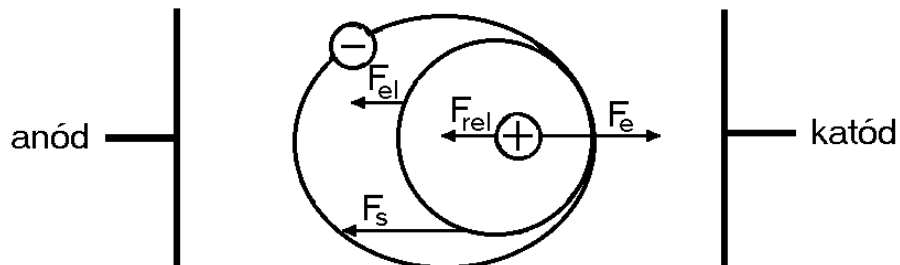
Az elektromos térben történő kísérleti ingadozások kompenzálása céljából az adott kísérleti körülményekre (közeg, pH, ionerősség, hőmérséklet)

bevezették a részecskék elektroforetikus mozgékonyága fogalmát. Az elektroforetikus mozgékonyág a vándorlási sebesség és az elektromos térerő hányadosa:

$$\mu = v/E = q/f$$

Az elektroforetikus mozgékonyág jellemző az adott makromolekulára, és függ a molekulatömegtől, a molekula alakjától (a f súrlódási együtthatón keresztül) és a q nettó töltéstől. Az egyenletből következik, hogy a töltéssel nem rendelkező részecskék mozgékonyága zéró.

A gyakorlatban természetesen vannak olyan jelenségek, melyek ezzel az egyszerű elmélettel nem magyarázhatók teljes körűen. Például, az elektroforetizáló közeg hordozója nem tekinthető teljesen szigetelőnek, és tartalmaz elektrolitot (pufferionokat). Az elektrolitban megtalálható ionok erős hatással vannak a mozgékonyásra. Az elektrolitoldatokban történő elektrosztatikus kölcsönhatásokat Debye, Hückel és Onsager írták le kvantitatíven. Ezeknek a kölcsönhatásoknak az az alapja, hogy egy iont mindig ellentétes töltésű ionok (ellenionok) vesznek körül. Az ellenionok által kialakított ionatmoszféra felelős az ionokat lassító további két hatás, az elektroforetikus (F_{el}) és a relaxációs hatások (F_{rel}) miatt fellépő erőkért (3. ábra).

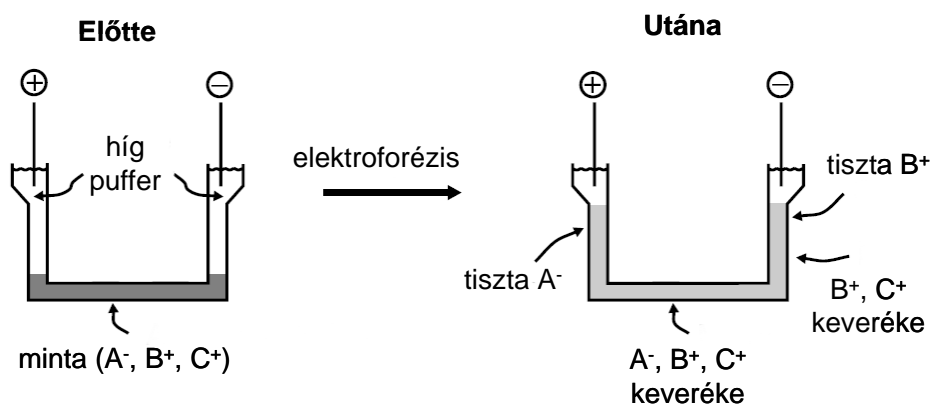


3. ábra. Töltéssel rendelkező részecskére ható erők elektrolitoldatban (F_e : gyorsítóerő az elektromos térben; F_s : súrlódási erő; F_{el} , ill. F_{rel} : az elektroforetikus és a relaxációs hatások miatt fellépő erők)

Az elektroforetikus hatás alapja, hogy a mozgó ion súrlódik az oldószer molekulákon, de ha az ellentétes töltésű ionatmoszféra is jelen van, akkor a súrlódás mértéke tovább növekszik, mert az ellentétes töltésű ionfelhő éppen ellenkező irányba mozog, mint az ion. A relaxációs hatások kialakulásának

az az oka, hogy az ionatmoszférát kialakító ionok nem tudnak pillatszerűen igazodni a mozgó ionhoz, így a töltésfelhő nem tud kialakulni teljes mértékben az ion előtt és nem bomlik el teljesen az ion mögött. Emiatt a töltésfelhő elektromos középpontja nem a mozgó ion helyén lesz, hanem kevésbé mögötte. Mivel az ion és a töltésfelhő középpontjának töltése éppen ellentétes, ez lassítja az ion vándorlását. Minél nagyobb az elektrolit koncentrációja, annál erősebbek az elektrosztatikus kölcsönhatások mind az elektrolit ionjai, mind a vizsgált ion és ellenionjai között.

Az elektroforézisnek 3 alapvető formája ismeretes. Az elektroforézis *mozgó határfelületi* (moving-boundary electrophoresis) módszere egy U-alakú csőben hajtható végre (4. ábra). A vizsgálandó oldatot először az U-cső aljába juttatják, és arra rétegzik a pufferelektrolitot a cső két ágában. Fontos, hogy a vizsgálandó oldat nagy mennyiségben kell, hogy tartalmazzon nemionos komponenseket (cukor, glicerin vagy etilén-glikol) a sűrűség növelése és az elektródoknál jelenlevő híg pufferekkel történő keveredés minimalizálása érdekében. Elektromos térerő alkalmazásakor a komponensek vándorlása mindkét irányba megindul töltésüknek megfelelően, és a vizsgálandó oldat illetve a pufferelektrolitok közötti határfelületek az elektródok felé mozognak. A vándorló komponenseket a cső felső szakaszában detektálják. Ez a módszer volt az első elektroforetikus technika, viszont ma már csak nagyon ritkán alkalmazzák.

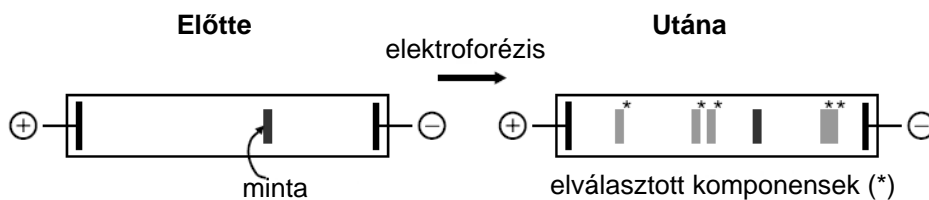


4. ábra. Mozgó határfelületi elektroforézis

A *zónaelektroforézis*t széleskörben használják ma is modern kutatási területeken és a klinikai laboratóriumokban. Ennél a technikánál a vizsgálandó minta komponensei diszkrét zónákba választódnak szét. A mintát egy pontban vagy sávban a közegre juttatják és az alkalmazott

feszültség a kezdeti zóna komponens-zónákká való szétválasztódását eredményezi (5. ábra).

Zónaelektroforézist használnak a biomolekulák komplex keverékeinek analíziséhez, az izolált fehérjék és nukleinsavak molekulatömegének meghatározásához, tisztaságának megállapításához, és egy sor orvosdiagnosztikai teszthez. A hordozó közeg alkalmazása csökkenti a mechanikai és hőmérsékletváltozás miatti konvekciót, illetve a biopolimerek nagy lokális koncentrációja miatti zónakiszéledést. A hordozó lehet adszorbens (pl. papír) vagy molekulaszűrő sajátságú anyag (pl. agaróz- vagy poliakrilamid-gél). Az elektroforézisnél használatos gélek folytonos belső szerkezetű gélek (a gélkromatográfiában szemcsés géleket használnak).



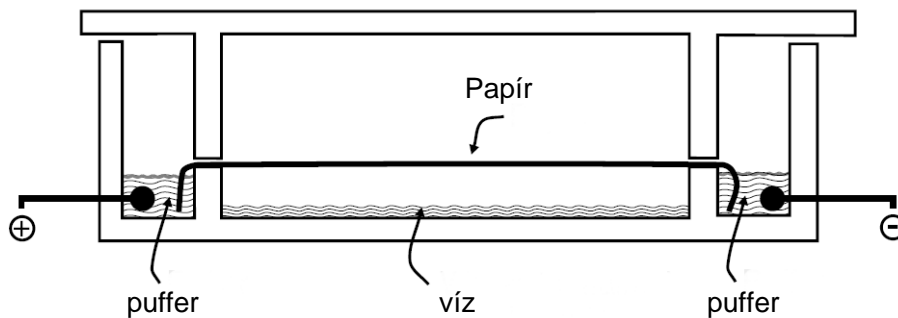
5. ábra. A zónaelektroforézis elve

Stacionárius (steady-state) elektroforézis annyiban tér el a mozgó határfelületi és a zónaelektroforetikus módszerektől, hogy a zónák végső pozíciói (egymáshoz viszonyított helyzetük) nem időfüggőek. Miután egy ideig elektroforetizálunk, egy stacionáris állapot alakul ki, melynél a zónák szélessége és pozíciói állandók. Izoelektromos fókuszálásnál például állandó pH gradienst alakítanak ki a hordozó anódos és katódos végei között, a futtatás során a biomolekula ebben a pH gradiensben vándorol, míg el nem éri azt a pH-t, ahol nettó töltése zéróval lesz egyenlő (fehérjéknél és polipeptideknél ez a pH a komponens izoelektromos pontja).

2. AZ ELEKTROFORÉZIS HORDOZÓ ANYAGAI

2.1 Papír

A papír (cellulóz) elektroforézist az 1950-es évek elején vezették be fehérjék elválasztásához. Az elektroforetikus futtatást megelőzően a papírlapot telítik a futtató pufferrel és egy tankba helyezik (6. ábra). A mintát egy pontban vagy vonalban viszik fel, a tankot lefedik és feszültséget kapcsolnak a papír végeire. Amikor a megfelelő elválasztás megtörtént, a papírt eltávolítják és megszárazítják. Az elválasztott komponensek helyét természetes színük, UV fény alatt mutatott fluoreszcenciájuk, vagy festékekkel történő megszínezésük révén határozhatjuk meg. Ha az elválasztandó komponenseket radioaktív izotóppal jelölük, a papír szeparációs mintázata autoradiográfiásan hívható elő.

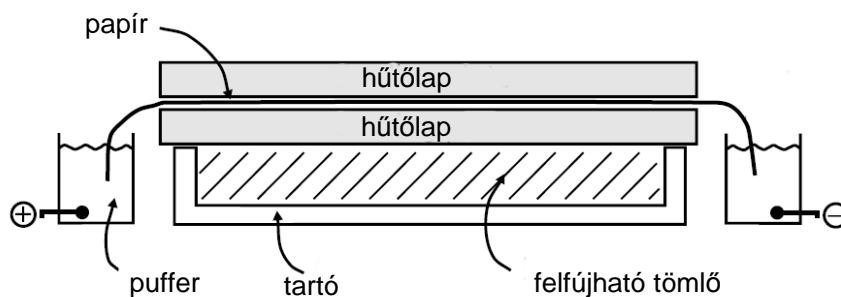


6. ábra Berendezés papírelektroforézishez

A komponensek a papírról egyszerűen eluálthatók további vizsgálatokhoz:

- ki kell vágni a papírból a vizsgálandó zónát és kis térfogatú elúciós pufferbe kell áztatni,
- mossuk a papír háromszög alakú darabkáját az elúciós pufferrel és gyűjtsük a cseppeket a háromszög csúcsánál,
- elektroforetizáljuk a vizsgálandó komponenst a zónájából egy kis térfogatú pufferbe.

Kisfeszültségű papírelektroforézist ma már csak ritkán végeznek, nagyfeszültségű papírelektroforézist viszont még használnak kis molekulák (aminosavak, nukleotidok) elválasztásához, melyek töltése, és így mozgékonyasága kicsi, kis méretük miatt viszont jelentős diffúziójuk, ami zónakiszéledést okoz. A nagyfeszültség alkalmazása gyors elválasztást tesz lehetővé, de mivel a nagy áramerősség jelentős hőt termel (I^2R), hűtőlapokat kell használni a hőmérséklet állandó értéken tartása érdekében és felfújható tömlőt helyeznek a hűtőlapok alá (7. ábra).



7. ábra Berendezés nagyfeszültségű papírelektroforézishez

Az aminosavak vagy nukleotidok teljes elválasztása nem mindig lehetséges egyetlen nagyfeszültségű futtatással, ezért gyakran használatos a 2D technika, ahol egymásra merőlegesen végeznek elektroforetikus futtatásokat (vagy elektroforézist követően kromatográfiás futtatást indítanak merőlegesen). A futtató puffer és a kromatográfiás eluens helyes megválasztásával az átfedő sávok a második dimenziós elválasztásnál felbontódnak.

1957-ben vezették be a cellulóz-acetátot a cellulóz (papír) hordozó egyik alternatívájaként. A cellulóz elektroforetikus és kromatográfiás elválasztási sajátosságokat egyaránt mutat, mivel sok komponens adszorbeálódik vagy kölcsönhatásba lép a cellulóz hidroxil-csoportjaival. Emiatt a foltok alakja elhúzódnak (tailing) és az elérhető felbontás gyenge. A cellulóz-acetát minimalizálja az adszorpciós hatásokat, mivel a legtöbb hidroxil-csoport acetilezett. A cellulóz-acetáton végzett elválasztások gyorsabbak, jobb a felbontás, csekélyebb a tailing hatás. A cellulóz-acetát további előnye a papírral szemben, hogy átlátszó (a zónák optikai detektálása lehetséges) és könnyebben oldódik különféle oldószerekben (az elválasztott komponensek elúciója és izolálása egyszerű).

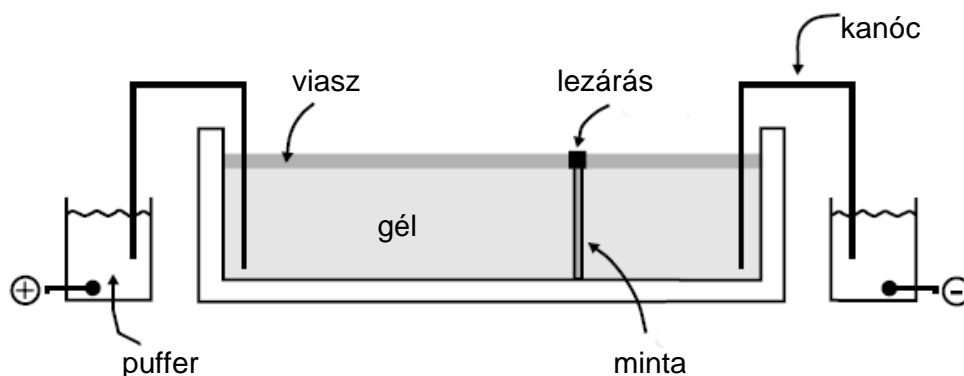
A kapilláris hatás következtében a papírcsík felszívja a puffert, és a puffer a papírcsík közepén találkozik, ahol az áram hatására a legnagyobb a párolgás. A szívóhatás következtében keletkező folyadékáramlás a légtér vízgőzzel való telítődéséig tart. Ez az áramlás megváltoztatja az elektroosmotikus folyadékáramlást, mivel az anód felőli oldalon azzal megegyező, míg a katód felőli oldalon azzal ellenkező irányú. Ezért fontos, hogy a készülék légtere minimális legyen.

2.2. Keményítőgél

Az első géles közegű hordozót elektroforézishez keményítőből csinálták (1958). A gélt burgonykeményítő pépnek elektroforézis pufferben való melegítésével készítették. A keményítőszemcsék szétrepedését követően a heterogén oldat átlátszóvá és homogénné válik. A forró oldatot ezután vízszintes tankba töltik és szobahőmérsékletre hűtik, így egy félkemény gélt kapnak. A gélbe rést vágnak, melybe a mintát keményítővel képzett szuszpenzióként juttatják be (8. ábra). A gél felületét ezután viasszal vagy zsírral zárják le. A gél végeihez szivacsos szövetet (kanóc) helyeznek, hogy biztosítsák az elektromos vezetést az elektródok és a gél között. Az elektroforézist követően a félkemény gélt eltávolítják a tankból és rétegeket vágnak ki belőle a festéshez.

A komponenseknek a keményítőgélben történő vándorlása a komponensek nettó töltésétől és molekulaméretétől függ. A gélnek molekulaszűrő jellege van, így a kisebb molekuláknak nagyobb a mozgékonyosságuk. A molekulaszűrő hatás szabályozható a gél pórusméretével (bizonyos mértékig a keményítő koncentrációjával).

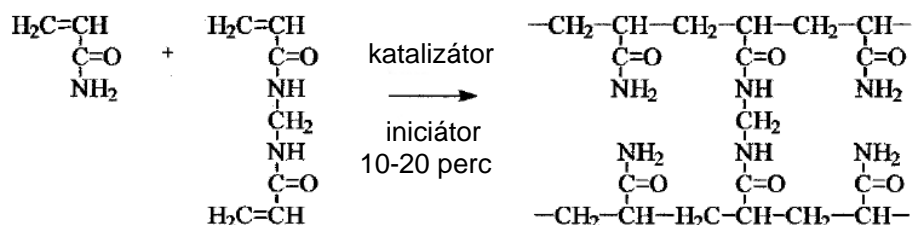
A keményítő polimer negatív töltésű oldalláncokat (karboxilátokat) tartalmaz, melyek kölcsönhatásba lépnek a fehérjékkel, késleltetve azok vándorlását (ioncserés retenciós mechanizmus), így a keményítőgélek, hasonlóképpen mint a cellulóz, elektroforetikus és kromatográfiás sajátságokkal egyformán rendelkeznek. Negatív töltésű géleken kialakul az elektroosmózis jelensége (részletesebben lásd kapilláris elektroforézisnél), ahol a pozitív töltésű ellenionok (H_3O^+) a katód felé mozognak. Valójában a puffer áramlik a katód felé, és a vizsgálandó komponens teljes vándorlási sebességét a gélben az elektroosmózis és az elektroforetikus vándorlás eredője adja. Az elektroosmotikus mozgékonyosság mérhető, ha a mintához kék dextransz adunk. A keményítőgélt ma már csak ritkán alkalmazzák (pl. izoenzimek elválasztásához), és helyette inkább poliakrilamid- vagy agarózgélt használnak.



8. ábra Berendezés keményítőgél elektroforézishez

2.3. Poliakrilamid-gél

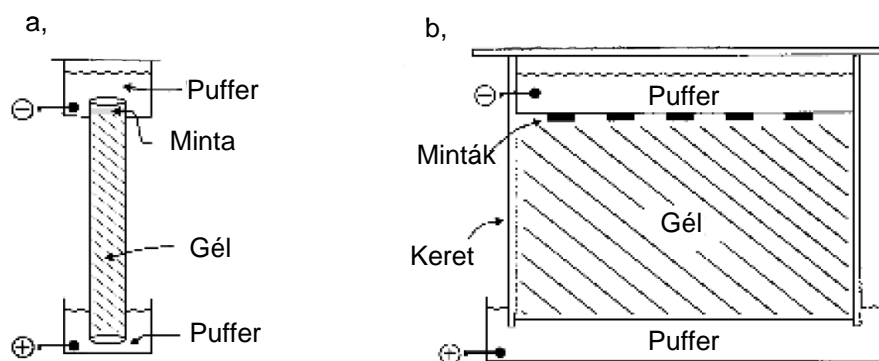
A poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE) a leggyakrabban használatos gélelektroforézis módszer fehérjék, kis RNS és nagyon kis DNS fragmentek elválasztásához. A poliakrilamid-gél előnye a keményítőgélekkel szemben, hogy molekulaszűrő hatása nagyon jól szabályozható és a fehérjék adszorpciója a gélhez elhanyagolható. A poliakrilamid-géleket akrilamid (monomer) és N,N'-metilén-bisz-akrilamid (térhálósító) polimerizációjával állítják elő katalizátor és iniciátor jelenlétében:



Az iniciátorok ammónium-perszulfátot és kálium-perszulfátot tartalmaznak, amelyekben a $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ két SO_4^- gyökké bomlik, míg a katalizátorként általánosan használt tetrametil-etilén-diamin (TEMED, $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) reagál a szulfát-anion gyökkel, hogy hosszabb élettartamú gyök képződjön.

A gélöntésnél használt TEMED koncentráció határozza meg a poliakrilamid láncok hosszát, és így a gél mechanikai stabilitását. A polimerizációval kapott gél átlagos pórusmérete az akrilamid mennyiségétől és a térhálósodás fokától függ. A monomer koncentrációja általában 5-20 tömegszázalék.

A PAGE kivitelezhető oszlopban (pálcika), ha preparatív elválasztás a cél, vagy lapokban, ha több mintát kell azonos körülmények mellett elemezni (9. ábra). A PAGE oszlopot 5-10 mm átmérőjű, legalább 10 cm hosszú csőben készítik el. A mintákat tömény cukoroldatba szuszpendálják és a gél tetejére rétegezik, hogy megakadályozzák a puffer keveredését a felső elektród (általában katód) cellájával. Az elektroforézist először kis áramerősséggel kezdik (kb. 1 mA 30 percig), hogy a teljes minta mennyiség belépjen a gélbe, majd az áramot 2-5 mA-re növelik. A mintához brómfenolkék (anionos) vagy metilénkék (kationos) markert adnak, melyekkel követhető az elválasztás. A puffereket gyakran hűtik, hogy minimalizálják a hőtermelődést (I^2R). Amikor a marker az oszlop aljához ér, a gél eltávolítják és a fehérjék helyzetét rögzítik (triklórecetsavba áztatással), majd megfestik őket a detektáláshoz.



9. ábra Az oszlop (a,) és lap PAGE (b,) kísérleti elrendezései

A lap PAGE egyidejűleg több minta azonos körülmények között végzett elektroforézisét teszi lehetővé. A lapgélben jobb felbontás érhető el, mint az oszlopgélben. Mivel a lapgél viszonylag vékony, a hőelvezetés is hatékonyabb, mint az oszlopnál. A lapgél függőlegesen vagy vízszintesen is használható, de a gyakorlatban a vízszintes lapgél módszert akkor használják, ha a monomer és a térhálósító koncentrációja kicsi, és így a gél lágy. A lapgél ugyanúgy készítik, mint az oszlopgélt, kivéve, hogy egy fűsűt (mintavájak kialakítására szolgáló eszközt) helyeznek a gélbe a polimerizáció előtt, amit később aztán eltávolítanak.

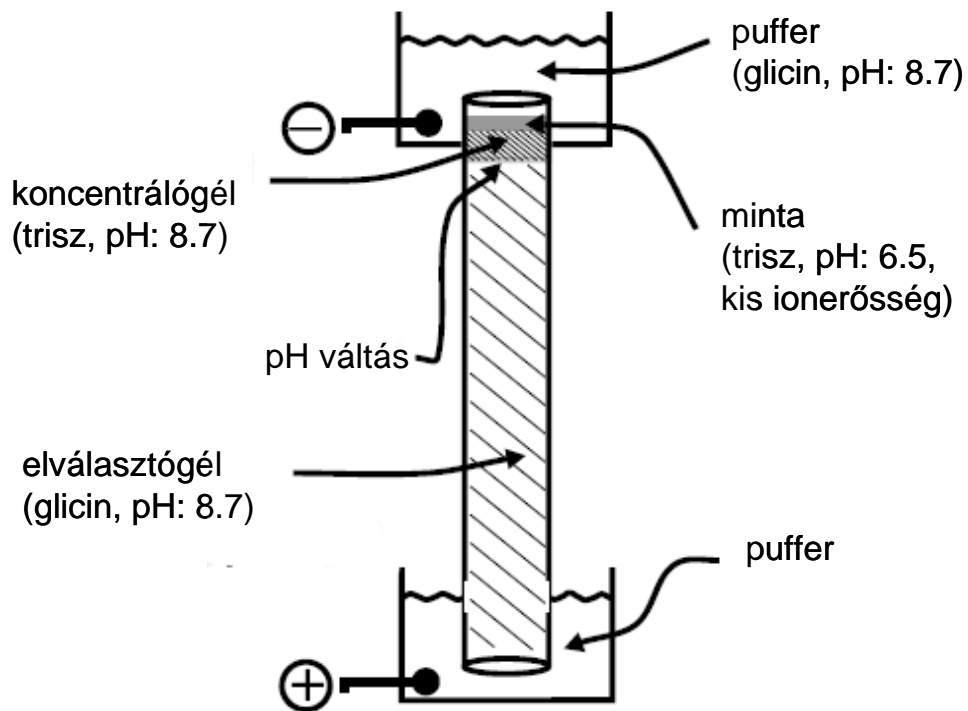
Zónaelektroforézisnél két komponens elválasztását akkor vesszük teljesnek, ha migrációs távolságaik különbsége meghaladja az eredeti mintazóna szélességét. A diffúziós zónakiszélesedés miatt a zónák élessége csökken a migrációs idővel.

Az alkalmazott pufferrendszerek szempontjából a gélelektroforetikus technikákat két nagy csoportba oszthatjuk. Folytonos (kontinuus) puffer rendszerről beszélünk, amikor ugyanazt a puffer rendszert alkalmazzuk a gélben, mint az elektródokat tartalmazó puffertankokban. Ennek a módszernek az előnye az egyszerűségében rejlik, viszont a felbontóképessége valamivel rosszabb, mint a jóval bonyolultabb ún. diszkontinuus puffer rendszereket alkalmazó módszereké (diszkelektroforézis) (10. ábra).

A diszkontinuus elektroforetikus technikák két különböző koncentrációjú gélt, és három különböző puffer rendszert alkalmaznak. Az elválasztógél (futtatógél) fölé egy ún. koncentráló gélt polimerizálunk. Ennek akrilamid koncentrációja az elválasztógélénél jóval alacsonyabb, olyannyira, hogy itt a molekulaszűrő hatás még nem érvényesül. A három különböző puffer rendszerben két különböző aniont alkalmaznak. Mindkét gélben a puffer anion komponense egy erős sav maradéka, melynek disszociáció foka gyakorlatilag nem függ a közeg pH-jától, vagyis töltése széles pH tartományban állandó. Ez a komponens általában a kloridion. Tankpufferként viszont olyan puffer rendszert alkalmaznak, melynek anion komponense egy gyenge sav savmaradéka, pl. glicinát anion. A tankpufferben a pH 8.7. A kis térfogatú fehérje mintát a koncentrálogél felszínére rétegezzük. Feszültség hatására a fehérje ionok és a tank puffer anionjai belépnek a koncentráló gélbe. A koncentráló gélben a pH 6.5. Ilyen pH-n a glicin ikerionos állapotban van, elektroforetikus mobilitása lecsökken így lokálisan csökken a töltéssel rendelkező molekulák koncentrációja. Ez helyileg megnöveli az elektromos ellenállást. Minthogy az elektromos körben az áramerősség állandó kell hogy legyen, Ohm törvényének megfelelően az ellenállással arányosan megnő a térerő is, ezért a fehérjék vándorlása felgyorsul, míg el nem érik az ionokban gazdag klorid ion frontot. Minthogy a klorid ion frontban az ellenállás, és így a térerő kicsi, a fehérjék sebessége csökken, és a front mögött mintegy összetorlódva igen vékony sávban vándorolnak az elválasztógél kezdetéig.

Az elválasztógélben a helyzet megváltozik. Mivel itt a pH 8.7 körül van, a glicin össztöltése itt negatív, ezért mobilitása megnövekedik. Így a töltéshiányból eredő koncentráló hatás megszűnik, a fehérjék a továbbiakban különböző fajlagos töltésük miatt eltérő sebességgel vándorolnak. Ráadásul a futtató gél akrilamid koncentrációját már úgy választjuk meg, hogy a molekulaszűrő hatás is érvényesüljön, és a gél az elválasztani kívánt fehérjék mérettartományában a lehető legnagyobb mértékben szeparáljon.

Az elektroforetikus eljárások többségénél a futtatás során jelzőfestéket alkalmazunk, amit a mintába keverünk. Ez a kis molekulatömegű, negatív töltésű festék gyorsabban vándorol a gélben mint a fehérjék, és mintegy láthatóvá teszi a futási frontot, így egyértelművé válik, mikor tekinthető az elválasztás befejezettnek. A leginkább használatos jelzőfesték a brómfenolkék.

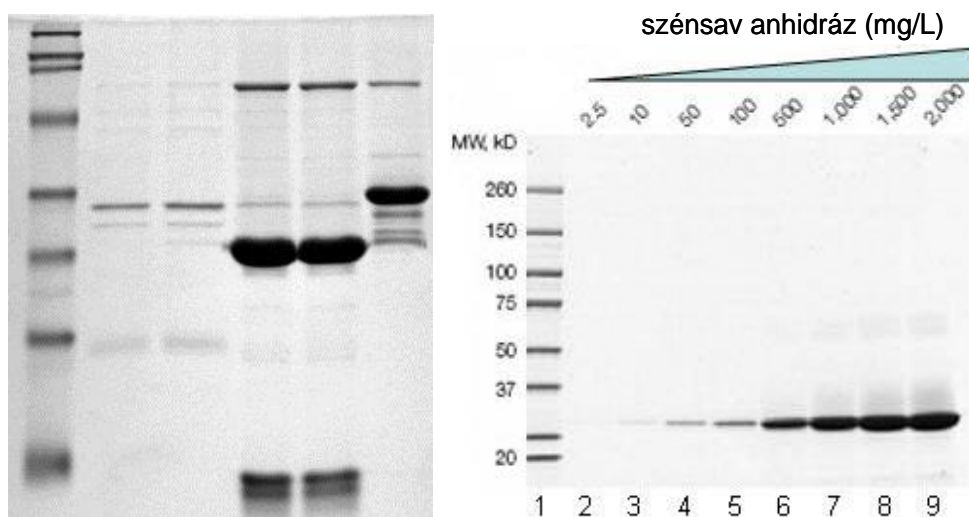


10. ábra A diszk PAGE kísérleti elrendezése (2-4% monomer a koncentrálógélben, 5-20% monomer az elválasztógélben)

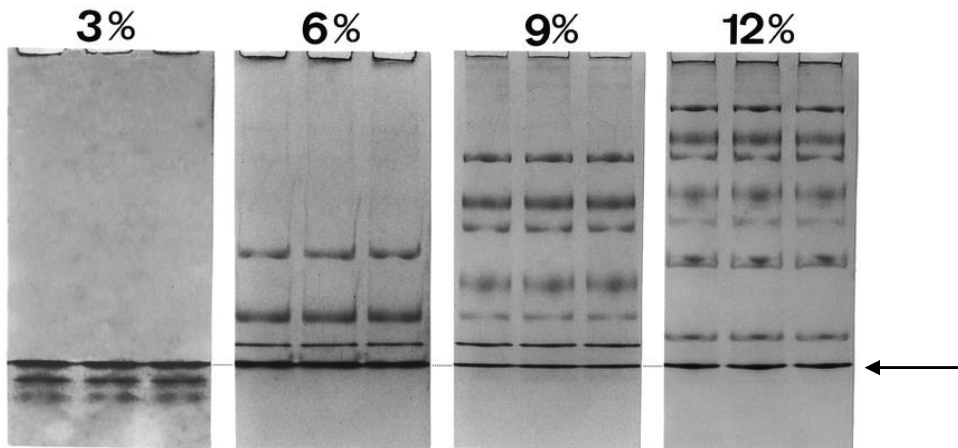
Elválasztást követően a fehérje vándorlását a markerhez viszonyítva mérik és kiszámolják az R_f -et:

$$R_f = (\text{a fehérje migrációs távolsága}) / (\text{a marker migrációs távolsága})$$

Egy fehérje molekulatömege gyorsan meghatározható SDS-PAGE módszerrel. Ekkor a gélt 0.1% SDS-el (Na-dodecilsulfát) öntik, és az SDS jelen van a puffer elektrolitban is. A fehérjemintákat (molekulatömeg markerek és az ismeretlen fehérjék keveréke) 1% SDS-el és 0.1% merkaptóetanollal melegítve előkezelik. A merkaptóetanol redukálja diszulfidhidákat, melyek feladata a fehérje negyedleges és harmadlagos szerkezetének biztosítása, az SDS pedig a fehérje hidrofób részeihez kötődik (1.4 g SDS/ 1 g fehérje). Ez a nonspecifikus kötődési kölcsönhatás konstans töltés/tömeg aránnyal jellemezhető részecskéket eredményez, mivel a fehérjék oldalláncainak töltése elhanyagolható a megkötődött SDS szulfátcsoportjai összes töltéséhez. A migrációs távolságokra csak a molekulaszűrési effektus, és így a fehérje molekulatömege (mérete) van hatással. A migrációs távolságot a molekulatömeg logaritmsa függvényében ábrázolva negatív meredekségű egyenest kapunk, melyet kalibráló diagramnak is használhatunk ismeretlen fehérjék molekulatömegeinek meghatározásához. Az SDS-PAGE segítségével 5%-on belüli pontossággal lehet a fehérjék molekulatömegeit 10^4 - 10^6 Da tartományban.



11. ábra SDS-PAGE elektroforézissel kapott elválasztási mintázatok (a molekula marker a gélek baloldalain láthatóak)



12. ábra Fehérjék vándorlása különböző poliakrilamid tartalmú (%) SDS gélben. A 9 fehérje nagysága 94-14.4 kDa közötti. A nyíl jelzi a pH változását a Gly^-/Cl^- mozgó határfelületnél.

2.4. Agarózgélek

Az agarózt elektroforetizáló közegként először az 1970-es évek elején használták, mely a D-galaktóz és a 3,4 anhidrogalaktóz lineáris polimerje, melyet tengeri moszatokból izolálnak. Az agaróz kb. 0.04% szulfátot tartalmaz, forrásban levő vízben feloldható, majd a folytonos gél akkor kapjuk meg, ha 38°C alá hűtjük vissza. A kapott gél szerkezetét hidrogénkötések biztosítják. Amint a poliakrilamid-géleknél, úgy itt is az agaróz koncentrációja a határozza meg a gél pórusméretét. A pórusméret jóval nagyobb, mint a poliakrilamid-gélnél, így agarózgéllal a nukleinsavak és a nagyméretű fehérjék választhatók el előnyösen. Az agaróz lapgél vízszintes és függőleges elrendezésben is használatosak. A függőleges elrendezésnél az agaróz koncentrációja 0.8% körüli, és ekkor a $5 \cdot 10^7$ molekulatömegű fehérjék és nukleinsavak határozhatók meg, míg vízszintes módban 0.2% agaróz koncentráció mellett $1.5 \cdot 10^8$ molekulatömegű komponensek analizálhatók. Az agaróz és a PAGE elektroforézishez ugyanaz a berendezés használható. Az agarózgélek töltött csoportokat (főleg szulfátokat, kevés karboxil-csoportot) tartalmaznak, melyekkel a fehérjék kölcsönhatásba léphetnek. Az így jelentkező ioncserés effektusok jelentékeny elektroosmotikus folyadékáramlás kialakulásához vezethetnek. Ha az agarózt bázikus oldattal kezeljük, ezen csoportok hidrolízise miatt javulnak a gél molekulaszűrő sajátságai.

3. A GÉLELEKTROFORÉZIS GYAKORLATA

3.1 Hőmérséklet, pH, ionerősség

A hőmérséklet nagysága kritikus a felbontásra nézve. Az elektromos áram által termelt Joule hőt hatékony hűtéssel kell ellensúlyozni. Megfelelő hűtés hiányában sokfajta tényező járul hozzá a felbontás csökkenéséhez. Konvekciós áramok alakulnak ki, mivel a hordozó közepéhez közel a melegebb oldat sűrűsége kisebb, mint a falhoz közeli hidegebb oldatnak. Mivel a víznek 4°C-on maximális a sűrűsége, ezen a hőmérsékleten a legkisebb a sűrűség ingadozása a hőmérséklet változásával, ezért ha lehet 4°C-on kell az elválasztásokat elvégezni. A zónák „elkenődését”, kiszélesedését okozó diffúzió sokkal erősebb magas hőmérsékleten (pl. amikor az elválasztásokat több óráig végzik). A zónák torzulása a nem tökéletes hűtés következménye is lehet, mivel a zóna azon részei, melyek a gél melegebb részein (belül) haladnak, azok gyorsabban vándorolnak a hidegebb (külső) részekben való haladáshoz képest. A nem egyforma sebességgel haladás miatt a zónák görbülnek és átfedődhetnek a szomszédos zónákkal. Nyitott edényekben a párolgás miatt a hordozó felülete dehidratálódhat és ezért az ionerősség lokálisan megváltozhat (emiat kell lefedni az edényeket). A viszkozitás is változik a hőmérséklettel, nagyobb hőmérsékleten a gélek lágyabbak és kisebb a sűrűségi együttható (főleg agaróz géleknél).

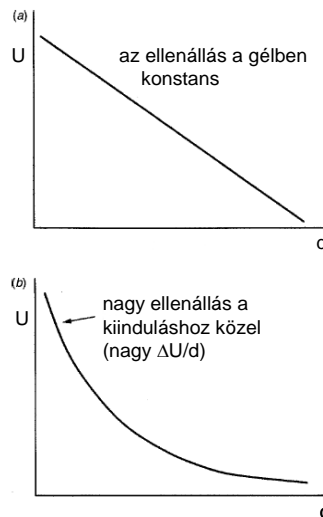
A pufferelektrolit pH-jának drámai hatása van az elválasztásra. A nukleotidok, nukleinsavak nettó töltése mindig negatív, így 4-10 pH-tartományban a pH változtatásának nincs lényeges hatása az elválasztásra. Fehérjék esetében azonban a nettó töltés pH-függő. Az izoelektromos pont (pI) alatti pH értékeknél a fehérje pozitív töltésű és ezért a katód felé fog vándorolni. Mivel lehetséges, hogy két vagy több fehérje egyetlen zónában halad a gélben az azonos mozgékonyaságuk miatt, a fehérjék elválasztását két vagy több pH-n is érdemes elvégezni. Tisztaságvizsgálatok esetén egy mintát mindig több, különböző pH-végzett elemzésnek kell kitenni.

A puffer ionerősségének is van hatása az elérhető elválasztásra. A töltött részecskék felületi csoportjai és a pufferionok közötti kölcsönhatások ionos környezetet alakítanak ki a töltött makromolekula közelében. Az ionerősség mind a nettó töltésre, mind a mozgékonyaságra hatással van. Általános szabály az elektroforézisnél, hogy a pufferelektrolit ionerősségét alacsonyan kell tartani, hogy minimalizálni lehessen az ellenion-hatásokat.

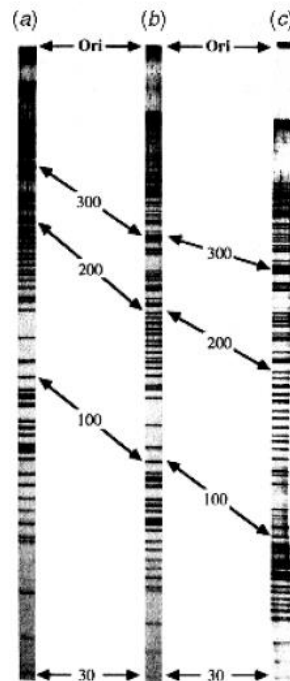
3.2 Elektromos térerő

Az elektromos térerő változása a gélben javítja a lassan mozgó komponensek elválasztását. A standard eljárással készített gélek esetén az elektromos térerő nagysága (feszültség/ távolság) állandó a gél teljes hosszában, ekkor a nagy mozgékonyaságú komponensek jól elválaszthatók, de a lassúbb részecskék egy diffúz zónában csoportosulnak, alig hagyják el a kiindulási pontot. Ezt a kiindulási ponthoz közeli gyenge felbontást lehet javítani térerő-gradiens alkalmazásával a gélben: az alkalmazott nagyobb térerő a kiinduláshoz közel növeli a lassúbb részecskék sebességét. A 13. ábra hasonlítja össze a feszültség-távolság profilokat lineáris és gradiens gélekben.

Ilyen gradienseket lehet kialakítani ék-alakú gélekben, vagy ionerősség gradiens alkalmazásával. Az ék-alakú gélekben az ellenállás nő a keresztmetszet csökkenésével, így a gél a kiindulási pontnál vékonyabb, és a komponensek a vastagabb vég felé mozognak. Ezeket a géleket megdöntött formában öntik ki. Az ionerősség gradiens tartalmazó géleket poliakrilamidból öntik ionerősség gradienst biztosítása során. A gélek híg pufferes végénél, a komponensek kiindulási helyénél nagyobb az ellenállás, így a minta a kisebb ellenállású vég felé halad. A 14. ábrán az egyik DNS szekvenáló reakcióval (T-reakció) elért elválasztások összehasonlítása látható lineáris, ék-alakú és ionerősség gradienst tartalmazó 6% poliakrilamid-gél alkalmazása esetén.



13. ábra Feszültség-távolság profilok lineáris (a,) és gradiens (b,) gélekben. Az Ohm törvényből következően, állandó áramerősségnél a feszültség változásai a gélek ellenállási tulajdonságát tükrözi.



14. ábra. Gélelektroforetikus elválasztások összehasonlítás látható lineáris (a.), ék-alakú (b.) és ionerősség gradienst (c.) tartalmazó gélek alkalmazása esetén. (minta: M13 mp8 DNS szekvenáló kísérletei (T-reakció). Gél: 6%-os poliakrilamid, 40 cm hosszú. Ék-alakú gél: 0.35-0.05 mm. Ionerősség-gradiens: 0.05-0.50 M trisz-puffer.)

4. FEHÉRJÉK ÉS NUKLEINSAVAK DETEKTÁLÁSA AZ ELEKTROFORETIKUS ELVÁLASZTÁST KÖVETŐEN

Egy elektroforetikus elválasztást követően sokszor csupán a markerfesték zónája látható szabad szemmel. Az elválasztott fehérjék és nukleinsavak detektálása az elválasztási mintázat utólagos kezelését, megjelenítését kívánja meg. Ez a kezelés történhet közvetlenül a gélen, vagy használhatunk blotting („átítatásos”) technikát, melynél a teljes elválasztási mintázatot egy vékony membránra viszik át. Az optimális detektálási módszer kiválasztása attól függ mekkora az elválasztott zónában levő komponens koncentrációja és hogy szükség van-e a tiszta komponsek kinyerésére.

4.1 Színezékek és festékek

A leggyakrabban alkalmazott megjelenítési eljárás a teljes gél megszínezése olyan komponensekkel, melyek nem-szelektíven kötődnek a fehérjékhez, vagy a nukleinsavakhoz. A fehérjék elválasztására szolgáló géleket kivesszik az elektroforézis kádból és rögzítik a zónákat 10% triklórecetsavba merítéssel (a fehérjék kicsapódnak, így a diffúziós zónakiszélesedés megszűnik és a fehérje nem oldódik ki a színező oldatba). A gél után leöblítik és belemerítik a színező anyag 0.1-0.2 %-os oldatába, így a színező a gél teljes egészében elnyelődik. Az elszíntelenítő öblítést követően csak ott marad meg a festék, ahol a színezőanyag a fehérjével reagált (15. ábra). Hasonló eljárást használnak a nukleinsavak detektálásánál is. Az 1. táblázat foglalja össze a fehérjék, glikoproteinek és nukleinsavak festéséhez használatos anyagokat.

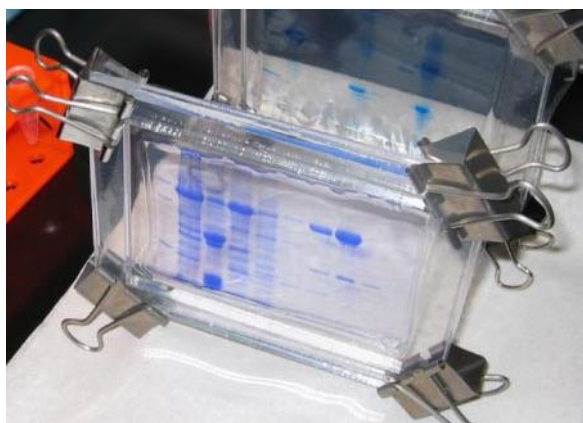
1. táblázat Festékek gélelektroforézishez

Festék	Abszorpciós max. (nm)	Alkalmazási kör
Amidofekete (10B)	620	fehérjék
Coomassie brilliant kék (R-250)	590	fehérjék (10x érzékenyebb az amidofeketénél)
Uniblue A		fehérjék
Metilénkék	665	RNA
Metilzöld	635	natív DNS, neutrális és savas marker
Fast Green FCF	610	fehérjék
Pyronin Y	510	RNS, savas marker
Brómfenolkék	595	neutrális és bázikus marker
Brómkrezolzöld		marker agarózgélnél DNS-hez
Toluidinkék O	620	RNS
Etídium bromid		DNS fluorimetriás detektálásához

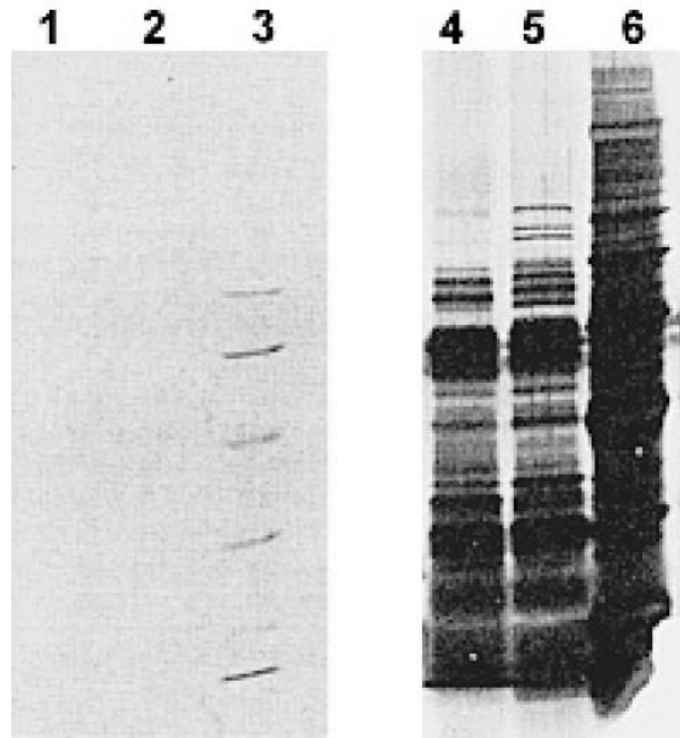
Az ezüstoffestési eljárás 100x érzékenyebb fehérjékre, mint a Coomassie kék, és 4x érzékenyebb a nukleinsavakra, mint az etídium-bromid. Ez a festés azon alapul, hogy a fehérjék tiol-, tirozin- és amino-fukcióscsoportjai, illetve a DNS purinbázisai redukálják az ezüstionokat. A gélben kiváló fémezüst tartósan festi meg a fehérje-nukleinsav zónákat, míg a puffer és a gél anyagai nem redukálják az ezüstionokat, így a háttér elszíneződése minimális. A 16. ábrán hasonlíthatjuk össze a Coomassie kékkel és az ezüsstel megfestett azonos géleket.

Festést követően a gélek fényképezhetők UV vagy láthatófényben, hogy kvalitatív információkat szerezhessünk a zónák számáról és helyzetéről. Kvantitatív információk kinyeréséhez pásztázó denzitométerre van szükség, mely méri a gélen áthaladó fény intenzitását.

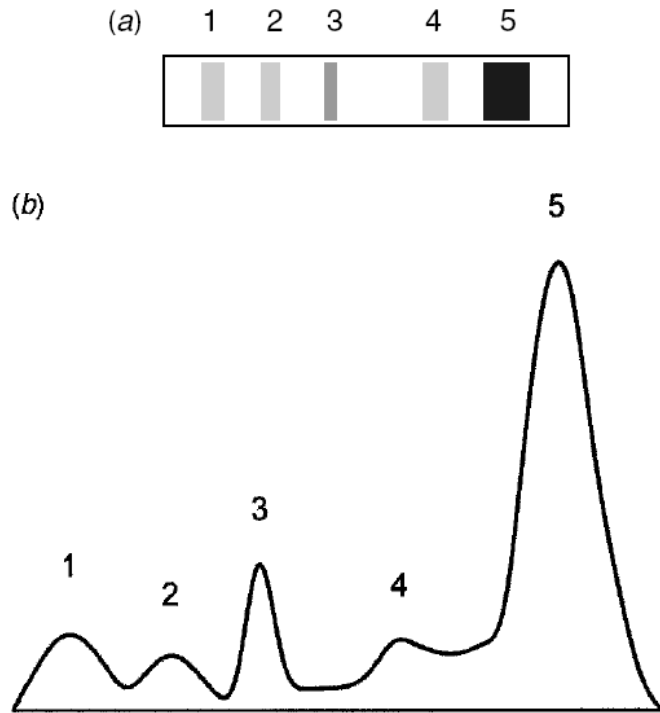
A denzitometriás szkenneléssel lehet a csúcsok pozícióit (migrációs távolság) pontosan megtalálni és a komponensek relatív koncentrációit meghatározni a csúcsalatti területek integrálásával (17. ábra). A modern denzitométerek ezeket a műveletet már automatikusan végzik. Kvantitatív elemzésnél a gélek túlterhelését kerülni kell, mivel a nagyon koncentrált mintazónák megfestődése nem lesz arányos, ezért a mintakonzentrációkat alulbecsüljük.



15. ábra SDS-PAGE gél elektroforetikus futtatást követően (Coomassie kék festést alkalmazva)



16. ábra Coomassie késsel (1-3 sor) és ezüsttel (4-6 sor) festett, azonos poliakrilamid-gélek összehasonlítása. (A kezdeti mintakonzentrációk az 1, és 4; a 2, és 5; illetve a 3, és 6, minták között azonosak)



17. ábra Festett elektroforézis gél denzitometriás diagramja

4.2 Enzimek detektálása szubsztrátjaikkal

Az enzimek aktivitás-festéssel történő detektálása nagyon fontos az elválasztott enzimek közvetlen detektálhatósága miatt, de a nem katalitikus fehérjék is detektálhatók így, ha a meghatározandó fehérjét enzimmel jelölt antitesttel festik. A katalitikus aktivitás detektálásakor kicsi a háttérjel és egy nagyon komplex mintában jelenlevő komponens nagy biztonságú azonosítása válik lehetővé. Az elektroforetikus elválasztást követően a gélt eltávolítják a berendezésből és minimális térfogatú szubsztrát-oldatba merítik. Az enzimet tartalmazó zónákban az enzim a szubsztráttal színes terméket képez.

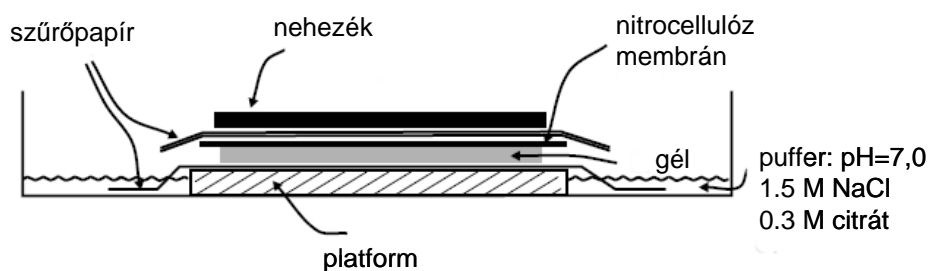
4.3 A Southern blot eljárás

A Southern blot egy olyan eljárás, aminek segítségével az adott DNS mintából specifikus DNS szakaszok kimutatása válik lehetővé. A Southern blot technika során az agaróz gélelektroforézis a DNS szakaszok elválasztását teszi lehetővé, majd a méret szerint elválasztott szakaszok nitrocellulóz filterre kerülnek át, ahol az adott DNS szakaszra specifikus próbákkal jelölik meg őket. A technika kitalálója (Edwin Southern) után kapta nevét, és elvük miatt a további blot mechanizmusokat is hasonló módon nevezték el (western blot, northern blot, northwestern blot), viszont ezekben az esetekben a kimutatandó molekula fehérje vagy RNS.

A blottolási eljárásra a gél a 18. ábrán bemutatott eszközbe teszik át az elektroforetízáló kádból.

Az eljárás lépései:

1. A nagyobb (akár genomi méretű) DNS-t kisebb szakaszokra hasítják restrikciós endonukleázok segítségével.
2. A DNS-t ezután denaturálják NaOH segítségével, melynek következtében a DNS két szála elválik egymástól. A DNS denaturálása fontos a későbbi membránhoz való kötődés és a próbákhoz való kapcsolódás miatt.
3. Nitrocellulóz vagy nylon membránt helyeznek a gél tetejére, amire több rétegben papírtörölköző kerül. A kapilláris hatás miatt a minták felfelé mozdulnak el, kikötődnek a membránra, megőrizve a gélbeli egymáshoz viszonyított helyzetüket. Ez a folyamat kb. 12 óráig tart.
4. Aztán nitrocellulóz membrán esetében száraz hőkezelés (60-100°C), nylonmembrán esetében UV kezelés következik, ekkor történik meg a DNS-membrán kovalens keresztkötése.



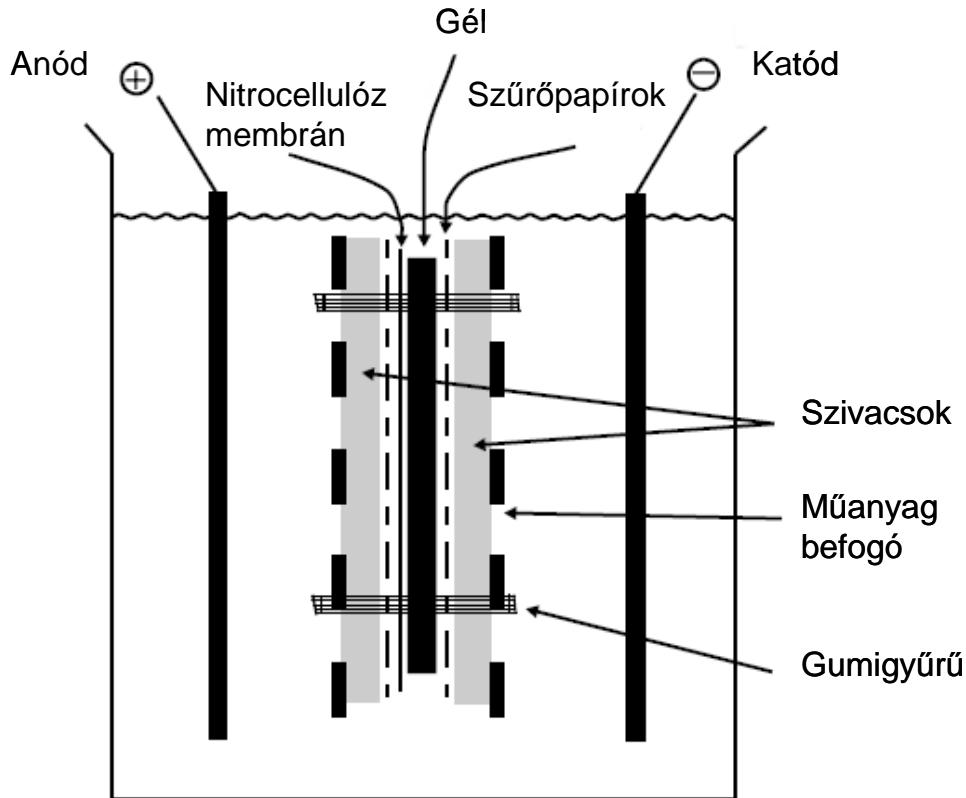
18. ábra A Southern blot készülék

4.4 A Northern blot eljárás

A Northern blot eljárást arra használják, hogy a RNS-t az agarózgélből a nitrocellulóz membránra vigyék át. Az eljárás nagyon hasonló a Southern blottolásnál leírtakhoz, kivéve, hogy a denaturálást NaOH helyett formaldehiddel végzik, mivel a NaOH hidrolizálná az RNS a 2'-hidroxil helyzetben. A formaldehid denaturáló jellege miatt felbomlanak az RNS másodlagos kötése, így kinyújtott alakban, méretüknek megfelelően vándorolnak a gélben. Az RNS-t 80°C-ra kell melegíteni, hogy erősen megkötődjenek a membránhoz.

4.5 A Western blot eljárás

Ez az eljárás elvében hasonló a Southern és Northern blot eljárásokhoz, de ezt a gélben levő fehérjéknek nitrocellulóz membránra való átviteléhez fejlesztették ki. A membránnak fehérje kötő részei vannak, melyek nem specifikusak, minden fehérjét azonos valószínűséggel kötnek. A kötés elsősorban hidrofób kölcsönhatásokon alapul. Kb. 10x-es átviteli sebesség növekedést lehet elérni, ha elektroforetikus technikával gyorsítják a folyamatot (lásd 19. ábra). Az elektroforetikus eljárás miatt nem csak gyorsabb lesz az átvitel, de minimális marad a diffúziós zónakiszéledés.



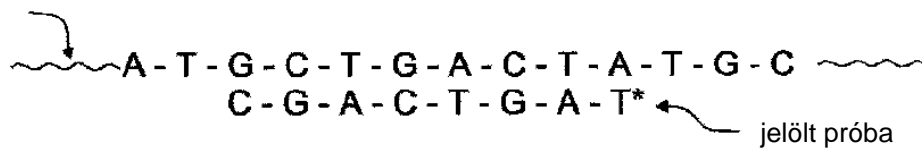
19. ábra A Western blot készülék

4.6 A DNS fragmentek detektálása a membránon DNS próbákkal

A DNS (hibridizációs) próba egy olyan specifikus szekvenciával rendelkező DNS molekula (oligo- vagy polinukleotid), mely a vizsgálni kívánt szakasszal komplementer. A próba jelölve van (radioaktív izotóppal vagy fluoreszcensen, esetleg színes festékkel), hogy a próba bekötési helye láthatóvá váljon. Egyes esetekben, a hibridizációs próbát RNS-ből készítik. A próba hibridizációja a target nukleinsavval a nitrocellulóz membránon A-T és G-C közötti hidrogénkötéseken keresztül történik. Ez a kölcsönhatás viszonylag gyenge, mivel csak két (A-T) vagy három (G-C) hidrogénkötés alakul ki. Ha azonban a hibridizáció nagy számú (>5), egymást követő bázispárokon keresztül történik, a folyamat szobahőmérsékleten exoterm. Az oligonukleotid szekvencia és a DNS próba hossza meghatározza a target

részecske detektálásának szelektivitását. Például elméletileg (statisztikailag) egy 17 bázispárból álló próbát használhatunk arra, hogy egy hatmilliárd bázispárból álló DNS szekvencia (mint a humán genom) egyetlen, egyedi szegmensét lokalizáljuk. A membránon való hibridizációt heteroduplex (kétszálás DNS, melyben mindkét szál más-más DNS molekulából származik) kialakításához használják (20. ábra).

vizsgált DNS

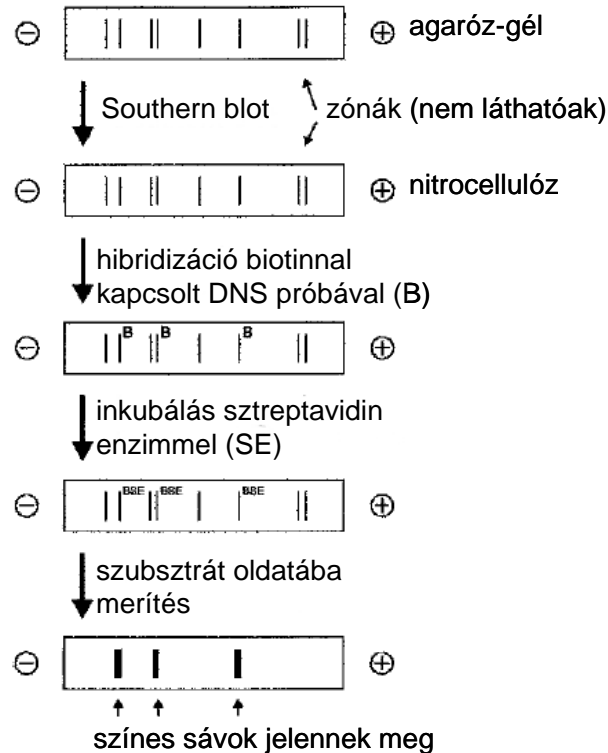


20. ábra Heteroduplex a target DNS és egy jelölt DNS próba között

A heteroduplexek kis ionerősségnél, vagy magas hőmérsékleten disszociálhatók. Azt a hőmérsékletet, ahol a kettős szál - egyes szál átmenet megtörténik, szétválási/kapcsolódási hőmérsékletnek (T_m , melting point) hívják. Nagy G + C tartalomnál a T_m érték nagy, mivel nagyobb számban vannak jelen hidrogénkötések a heteroduplexben.

A DNS próbákat meg lehet jelölni izotópatomokkal, fluorofór funkcióscsoportokkal vagy olyan oldalláncokkal, melyekhez enzimek kapcsolódnak, így detektálhatókká válnak a keresett szekvenciát tartalmazó zónák az elválasztási mintázaton. A DNS próbához kapcsolt jelölő nem szabad, hogy zavarja a próba és a target szekvencia közötti hidrogénkötést. A hibridizációs lépés azzal történik meg, hogy a nitrocellulóz membránt DNS próbát nagy mennyiségben tartalmazó oldatba merítik és a heteroduplex T_m hőmérséklete alatt inkubálják. A próbát később leöblítik és a membránon megvizsgálhatók a jelölt részek.

A DNS próbákat gyakran jelölik hasadás-áthelyezésses (nick-translation) módszerrel, ahol 3 enzim aktivitását kombinálják, vagy biotin-avidinos származékképzéssel. A biotin önmaga ugyan nem jól detektálható jelölőanyag, de irreverzibilis reakcióba vihető avidin vagy sztreptavidin fehérjékkel ($K > 10^{12} \text{ M}^{-1}$), melyek viszont már nagyon érzékenyen detektálhatók, amennyiben ezek a fehérjék megfelelő enzimmel jelöltek és aktivitás festést alkalmaznak. Az 21. ábra foglalja össze egy DNS szekvencia-specifikus detektálását.

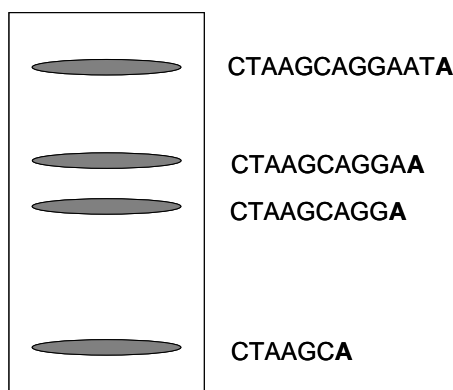


21. ábra DNS szekvencia detektálása elektroforetikus elválasztási mintázatban biotinnal kapcsolt DNS próba alkalmazásával

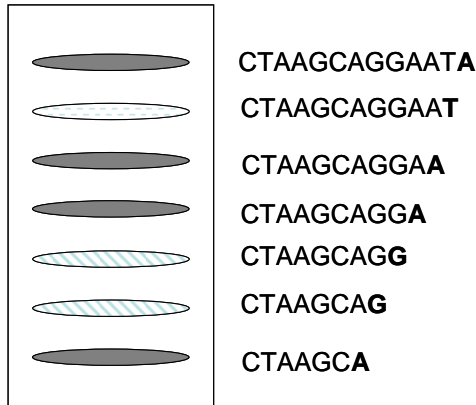
5. GYORS, NAGYHATÉKONYSÁGÚ DNS SZEKVENÁLÁSI MÓDSZEREK

A DNS szekvenálás az az eljárás, aminek során meghatározzák egy DNS-szakasz nukleotidjainak bázissorrendjét. Erre a célra két technikát használnak. A Maxam-Gilbert-módszerben a DNS-t egy restrikciós enzimmel hasítják és a keletkező kisebb fragmentumokat egyik végükön megjelölik ^{32}P -t tartalmazó foszfátcsoporttal. A fragmentumokat ezt követően négy különböző reakciósornak vetik alá; mindegyik specifikusan egy meghatározott bázisnál vagy bázisoknál hasítja el a DNS-t. Az így nyert még kisebb fragmentumokat elektroforézissel elválasztják a lánchosszuk szerint és autoradiográfiával azonosítják. A bázis- (nukleotid-) sorrendet a gélben levő négy futtatás mindegyikében a sávok helyzetéből következtetik ki.

A Sanger-féle módszerben (didezoxi-módszer) egy új DNS-szálat szintetizálnak a szekvenálandó génből származó egyszálú templátot használva. Az új szál szintézise a négy bázis közül akármelyiknél megállítható, ha a dezoxi-ribonukleozid-trifoszfátok megfelelő didezoxi-(dd) származékát adják a rendszerhez (például a ddATP-t adva a rendszerhez a szintézis egy adenozinnál befejeződik, a ddGTP-t adva egy guanozinnál ér véget az új DNS-szál szintézise). A folyamat sok tekintetben hasonló a PCR (polimeráz láncreakció) eljárásokhoz, de a DNS szekvenálásánál a komplementer szál felépítéséhez szükséges négyfajta nukleotid mellett kis mennyiségben (5%-ban) az egyes nukleotidok olyan változatát adják, melynél a 3' hidroxici-csoport helyett hidrogén található (didezoxi-nukleotidok). Így aztán amikor a DNS láncot építő polimeráz például egy T-t lát, akkor a komplementer A-t építi be a láncba és a hibridizációs folyamat folytatódik. Azonban 5%-ban a didezoxi-A-t építi be, de ezt követően a polimeráz képtelen a láncépítés folytatására (természetesen ugyanez történik a többi nukleotid esetén is). Mivel a DNS templátról több milliónyi másolat készül, nagy valószínűséggel minden lehetséges hosszúságú fragment képződik A-, C-, G- vagy T-didezoxi csoportokkal a végükön. Ezeket a láncokat választják szét méretük (nukleotidok száma) szerint gélelektroforézissel. Mivel a didezoxi nukleotidok fluoreszcens festékekkel vannak megjelölve (a négy különböző nukleotid 4 különböző „színnel”), könnyen beazonosíthatók. Például a jelölt A nukleotidok a a gélen a következő zónákat adják:



A rövidebb fragmentek gyorsabban vándorolnak a gélben. Alulról számolva az 1. és 2. fragment között kettő nem A végződésű fragment található (nem látható). Ha a 4 lehetséges különböző végű fragmentet különböző színekkel jelöljük, akkor kaphatjuk meg a következő mintázatot:



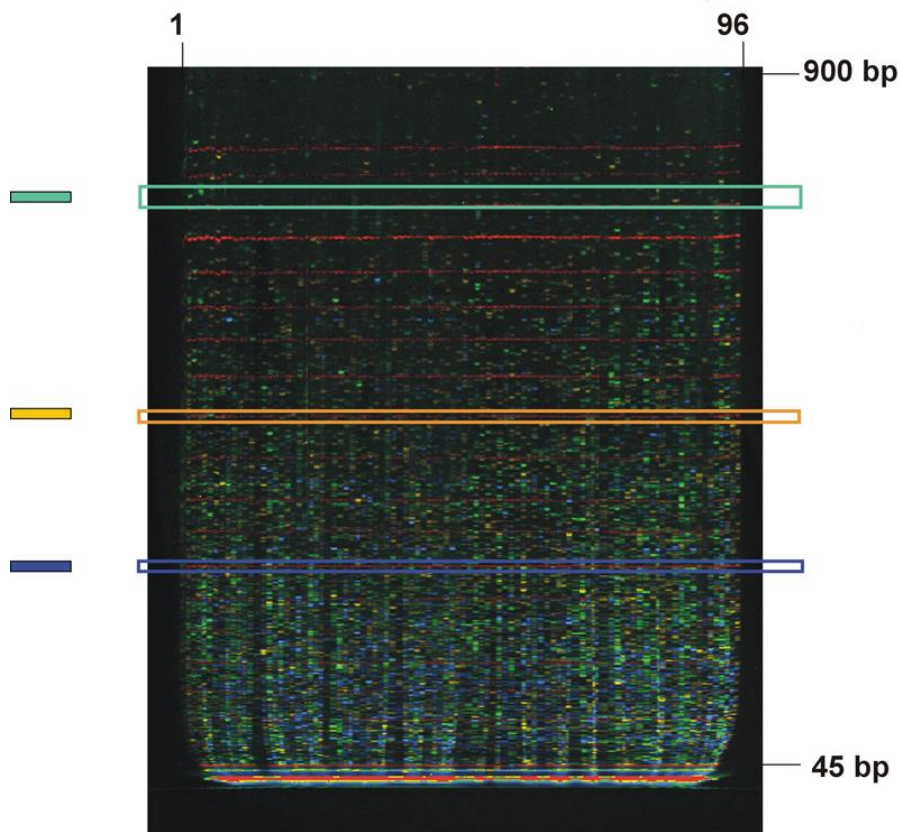
Az adott elektroforetikus mérés alapján a szekvencia **CTTAGCAGGAATA** (a vastag betűk jelzik az így meghatározott tagokat). Más meghatározott fragmentekkel történő átfedéseket figyelembe véve, ha például két fragmens:

CTTAGCAGGAATA
CTTAGCTAGGCCT

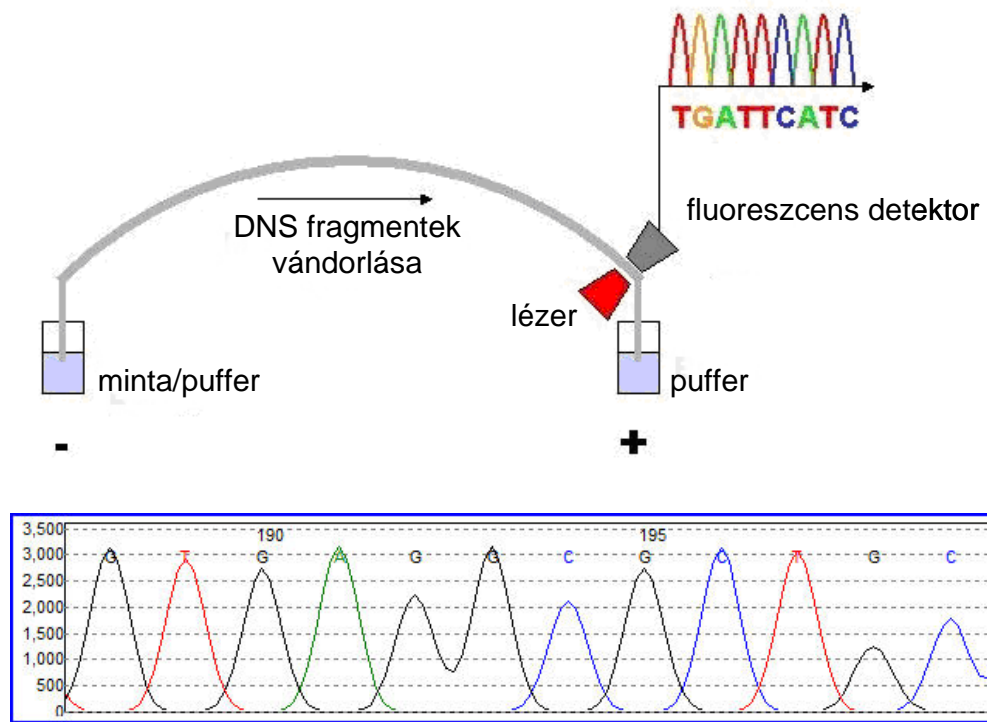
A **TA** bázisok átfedését felismerve a szekvencia **AGGAATAGGCCT**. A gyakorlati elemzéseknél a fragmentek jóval hosszabbak.

A gélelektroforetikus elválasztásokat és meghatározásokat automata DNS szekvenáló berendezésekkel végzik. Sokszor akár 96 mintát futtatnak egyszerre a gélben (22. ábra). UV lézerrel szkennelve a sávokat, a készülék detektálja az egyes nukleotidoktól származó fluoreszcens sugárzást (a négy különböző zárónukleotid emissziós hullámhossza különböző).

Mivel minden egyes fragment detektálható (először a legkisebb majd az egyre nagyobb fragmentek jelennek meg). Az 23. ábrán látható egy olyan elektroferogram részlete, melyet egyetlen minta elemzésével kapott sáv szerkezet szkennelésével kaptak. A készülék szoftvere az egyes komponens-zónák színét felismerve a megfelelő nukleotid jelét a zónának megfelelő csúcshoz rendeli. Az ábrán a teljes elektroferogram viszonylag kis részlete látható, tipikusan több száz (akár 700) nukleotid határozható meg egyetlen mintában. Ma már a teljesen automatizált DNS szekvenálásokat egyre gyakrabban kapilláris gélelektroforézissel (CGE) végzik.



22. ábra DNS fragmentumok nagyhatékonyságú gélelektroforetikus elválasztása. A 96 függőleges sávban a különböző minták méretük (hosszúságuk) szerint válnak el. Minden egyes zóna 4 valamelyik színben látszik, a szín meghatározza a záróbázist.



23. ábra DNS szekvenáló berendezés kapilláris gélelektroforézis alkalmazásával (felső ábra). Elválasztott zónák elektroferogramja (alsó ábra). Az egyes (négy szín valamelyikével jelölt) csúcsok egy-egy zárónukleotidnak felelnek meg.

A HUMÁN GENOM PROJEKT (KIEGÉSZÍTÉS)

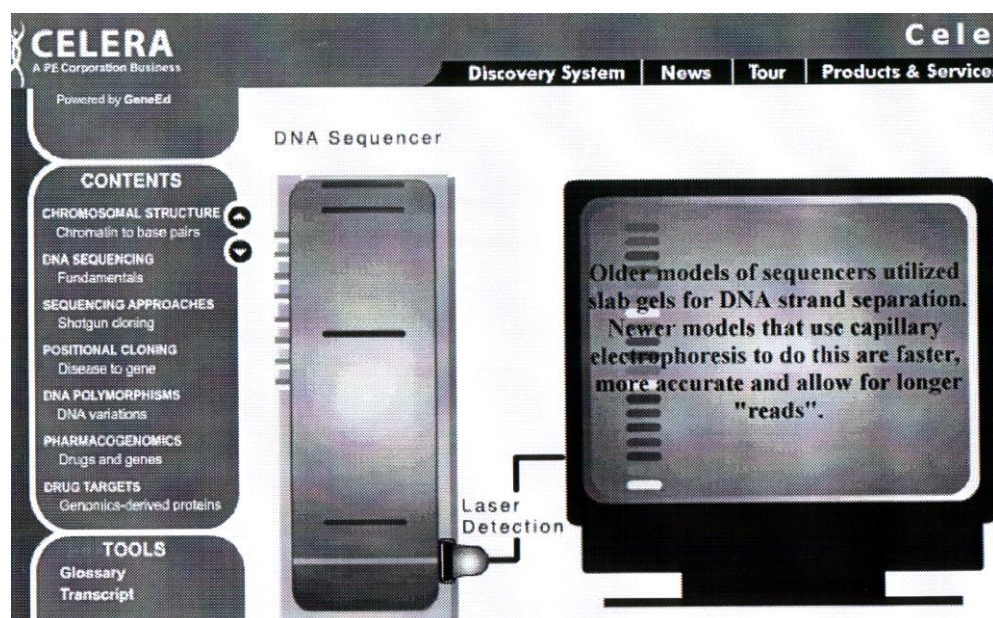
A Humán Genome Projektet 1990-ben indította el egy 20 kutatócsoportból álló nemzetközi konzorcium (USA, UK, Franciaország, Németország, Japán és Kína), melyet elsősorban az amerikai National Institutes of Health (NIH) támogatott. Ennek a nagy nemzetközi programnak végső célja, hogy az emberi kromoszómákon levő közel 100.000 gén pontos helyzetét megadják, továbbá hogy meghatározzák a teljes emberi DNS génszekvenciát is, amely kb. hárommilliárd bázispárból áll.

Eredetileg úgy tervezték, hogy a teljes emberi genom feltárása 2003-ra fog befejeződni. A konzorcium laboratóriumi egységei egyszerre a genom egyetlen kis részleteit elemezték, nagyon módszeresen, klónról klónra (clone-by-clone technique) végezték a szekvenálást. 1998-ban megjelent egy magán cégcsoport, a Celera Genomes Group (alapítója Craig Venter, korábban kutató a NIH-nél), amely bejelentette, hogy ők is elindítják azonos célú projektjüket, de ők (annak ellenére, hogy később indították munkájukat) 3 évvel hamarabb befejezik a projektet. Ez a csoport 13 akadémiai, non-profit és ipari kutatócsoport összefogásával alakult meg. 1999 szeptemberében kezdték meg a munkát és 2000 októberére készen voltak a munka nagyrészeivel. Hogyan tudták ezt véghez vinni? Három dolognak köszönhetően.

1. Felhasználták az akkorra az állami konzorcium által már összegyűjtött óriási adatmennyiséget (teljesen nyitott és ingyenes adatbázis).
2. A szekvenálásnak egy gyökeresen új módszerét, az ún. shotgun (sörétespuska) technikát kezdték el alkalmazni. Míg a „shotgun” módszer lényegében azt jelenti, hogy egy könyv több példányát darabokra tépjük és aztán igyekszünk újra összerendezni egy példányt mondatról mondatra haladva, addig a „klónról klónra” módszernél először egy könyvet több fejezetre bontanak szét (ismert sorrendben), és azután tépik szét darabokra, majd rendezik össze újra a megfelelő fejezetté. A legtöbb kutató akkoriban úgy gondolta, hogy a shotgun módszer nem alkalmazható a nagyméretű humán genom esetén (kisebb élőlények genomjaira korábban már alkalmazták), mivel túl nehéz lenne a megfejtett részletek összerendezése. A Celera nagyteljesítőképességű számítógépei azonban a bázis szekvenciák $5 \cdot 10^{14}$ darab összehasonlítását követően megadták a $3 \cdot 10^9$ bázis hosszúságú humán genom 99.9%-át

3. Egy új, gyors, automatizált analitikai módszert kezdtek el alkalmazni: a hagyományos gélelektroforézis helyett a kapilláris gélelektroforézist, amit a cég egyik leányvállalata gyártott (Applied Biosystem, ABI 3700 modell) (24. ábra).

A humán genom felderítésekor az egyik legmeglepőbb felismerés az volt, hogy csupán 30-35 ezer génünk van, mely részt vesz a fehérjék előállításában, amely a genomnak csupán 1 %-a (nagyjából 80-100 ezer gén meglétét feltételezték korábban). A genom jórésze ugyanis nem-kódoló, nagyban ismétlődő szakaszokból áll.



24. ábra A Celera cég DNS szekvenálást bemutató honlapja

FELHASZNÁLT ÉS AJÁNLOTT IRODALOM

- G.D.Christian: Analytical Chemistry, 6. kiadás, Wiley, 2004,
Wikipedia, a szabad enciklopédia
C.D. Harris: Quantitative Chemical Analysis, 7. kiadás, Freeman, 2007
Gáspár A.: Kapilláris zónaelektroforézis, Egyetemi Kiadó, 2000

ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK A GYAKORLATRA VALÓ FELKÉSZÜLÉSHEZ

1. Az elektroforézis 3 alapvető módszere.
2. Jellemezze tömören az elektroforézis.
3. Hogyan készítik a poliakrilamid-géleket? Milyen elrendezésekben alkalmazhatók?
4. Ismertesse részletesen a diszk PAGE módszert.
5. Az SDS-PAGE eljárás elve és alkalmazási köre.
6. Milyen hatása van a hőmérsékletnek, pH-nak, ionerősségnek, térerőnek a gélelektroforetikus elválasztásra?
7. Hogyan történik a fehérjék és nukleinsavak detektálása az elektroforetikus elválasztást követően?
8. Blottolási eljárások főbb jellemzői.
9. Nagyhatékonyságú DNS szekvenálási módszerek.

4, Az elkészített géloidatot 4-5 percen belül (az APS hozzáadást követően!!!) bele kell juttani a gélagyba (üveglapok közé). Nyomják a műanyag fésűt a gélbe ütközésig.

5, Készítse el az elemzendő mintaoldatokat.

A minták előkészítése során úgy kell eljárni, hogy a gélbe juttatott 20 μ L térfogatú minta ne tartalmazzon 25 μ g-nál több fehérjét.

Minta:

Minták: **1,** fehérjelétra (gyakorlatvezető viszi fel a gélre), **2,** trombin, **3,** albumin, **4,** proteináz K, **5.** 100x hígítású tehéntej, **6,** nyálminta 1. (5x hígítású), **7,** nyálminta 2. (5x hígítású), **8.** vészérum (1000x hígítású), **9,** fehérjelétra (gyakorlatvezető viszi fel a gélre)

(tej 100x-os, illetve a nyál 5x-ös hígítását Eppendorf-csővekbe, 1 mL végtérfogatra készítsék. A szérum mintát már 1000x-re hígítva megkapják.)

Az elemzendő fehérjemintákat a mintapufferrel kell elegyíteni 1:1 arányban.

(A mintapuffer összetétele: 0.125 M tris-HCl, pH: 6.8, 4% SDS, 5% glicerin, 5% merkaptó-etanol, 0.001% brómfenolkék). 20 μ L mintaoldathoz tehát 20 μ L mintapuffert kell adni (Eppendorf-csővekbe készítsék a hígítást), ebből pipettáznak majd ki 20 μ L-t a gél zsebeibe.

6, Készítsék el az 1000 mL futtatópuffert.

Futtatópuffer törzsoldat (30.29 g Tris, 144.13 g glicin, 1000 mL deszt.víz, pH: 8.3): Az elválasztáshoz a puffert 10x-re hígítjuk és annyi 20% SDS-t adunk hozzá, hogy az SDS koncentrációja 0.1% legyen.

Ennek megfelelően az 1000 mL futtatópuffert úgy készítse el egy főzőpohárba, hogy 100 mL futtatópuffer törzsoldathoz 5 mL 20 % SDS oldatot ad, és kiegészíti 1000 mL-re desztillált vízzel.

7, Távolítsák el a fésűt a gélből, és tegyék a gélt a készülékbe, töltsék fel a futtatópufferrel. Pipetázzák be a 20 μ L mintákat a mintazsebekbe.

8, Tegyék helyére a készülék fedőlapját, csatlakoztassák az elektródokat. A tápegységen állítsunk be 30 mA-t és indítsa el az elektroforézist. Ha a marker 1 cm híján eléri a gél alját, kapcsoljuk ki a tápegységet (kb. 1 óra).

9. A készülékből kivett gélt Coomassie kék festékekkel kezelik

Festőoldat (460 mL etanol (96%), 80 mL ecetsav (96%), 460 mL deszt.víz, 2 g Coomassie Blue R250). A gélt műanyag edénybe helyezük és annyi

festőoldatot öntünk rá, ami teljesen ellepi. A festés ideje, az oldat folyamatos mozgatása mellett 15 perc. A festés befejeztével az oldatot a tárolóedénybe visszaöntjük (újra felhasználható).

10. A megfestett géltre színtelenítő oldatot öntünk.

Színtelenítő oldat (50 mL etanol (96%), 75 mL ecetsav (96%), 875 mL deszt.víz): a géltre annyi színtelenítő oldatot öntünk rá, ami teljesen ellepi. A színtelenítés ideje több óra. A színtelenítés befejeztével az oldatot hulladékgyűjtő edénybe gyűjtjük. Szükség esetén 1-2-szer cseréljük a színtelenítő oldatot a gélen. Amennyiben a gyakorlat végére nem színtelenedett el annyira a gél, hogy jól láthatóak legyenek a zónák, következő munkanap reggelén kell megvizsgálni. A gélről digitális fényképezővel készített képet kiértékelő szoftverrel kell feldolgozni.

b, DNS fragmentek meghatározása agarózgél elektroforézissel**Szükséges vegyszerek:**

agaróz,
tris (tris-(hidroximetil)-aminometán), bórsav, EDTA, jégecet, glicin
brómfenolkék, xilén-cianid, Gelstar festék
DNS létra

TBE (Tris-Borát-EDTA) puffer törzsoldat:

108 g tris
55 g bórsav
40 ml 0,5 M-os EDTA
1000 ml-re desztillált vízzel kiegészítve
Fontos, hogy a puffer pH-ja 8 legyen.
(TBE puffer helyett használhatunk TAE (Tris-Ecetsav-EDTA) puffert is:
242 g tris, 57,1 ml jégecet, 100 ml 0,5 M-os EDTA 1000 ml-re desztillált
vízzel kiegészítve)

Mintapuffer:

50 % glicerin, 0,25 % brómfenolkék, 0,25 % xilén-cianid 10x-es hígítású
TBE pufferben
(pl. 5.000 mL glicerin, 5.000 mL 10xhígítású TBE puffer, 0.025 mg
brómfenolkék, 0.025 mg xilén-cianid)

Gyakorlat leírása:

1, Szereljük össze a gélt tartó tálkát.

2, Agaróz gél készítése:

a, 0,8 g agarózt 100 ml 10x hígítású TBE pufferben oldjuk fel. Az agaróz melegítéssel oldódik, az oldatot enyhén forralni kell! Amikor az oldat kihűl, az agaróz megpolimerizál, és szilárdná válik. A gyakorlaton készen kapják az előzetesen felmelegített, még folyékony 0,8 %-os agaróz oldatot.

b, A gélágyhoz 25 ml térfogatú 0,8 %-os agaróz oldat szükséges, ezt a mennyiséget egy főzőpohárba öntjük ki. Megvárjuk amíg a forró gél lehűl kb 40°C-ra, és beleteszünk 2,5 µl Gelstar festéket. (A festék mérgező! A festék hozzákötődik a DNS-hez és UV fényben fluoreszkál.)

c, Ezután az oldatot beleöntjük az előkészített tálkába, beleállítjuk a fésűt, és várjuk, hogy megpolimerizáljon (kb. fél óra). Amikor a gél megkeményedett előbb az oldalsó gumitartókat, majd a fésűt távolítjuk el.

3, A gélt a tálkával együtt a futtatókádba helyezzük és jelig felöntjük szükséges mennyiségű (400 ml) futtatópufferrel. (A futtatópuffer ugyanaz, mint ami a gélben van.) A futtatópuffer 10x-es hígítású TBE puffer, amely hígítással készül TBE puffer törzsoldatból. (40 ml TBE puffer törzsoldat 400 ml-re kiegészítve desztillált vízzel).

4, Mintaelőkészítés: 1. minta: 1 μ l DNS létra + 4 μ l mintapuffer keverékéből, 2. minta: 0,5 μ l DNS létra + 4 μ l mintapuffer keverékéből, 3. minta: 1 μ l DNS létra, 2 μ l mintapuffer, 5 μ l 10x hígítású TBE puffer keverékéből áll. A mintapuffer két kék festéket tartalmaz, amely nem festi meg magát a DNS-t, de segíti az elektroforézis állásának nyomon követését (pl. a xilén-cianid nagyjából a 4000 bázispárú fragmenttel együtt vándorol), továbbá megkönnyítik a zsebek megtöltését.

5, Mintafelvitel: Pipettázunk 2 μ l térfogatú mintákat a mintatartó zsebekbe.

6, A készülék fedőlapját tegyük a helyére, csatlakoztassuk az elektródokat. A tápegységen a feszültséget állítsuk be 100 V-ra.

7, Bekapcsoljuk a tápegységet ügyelve a polarításra, a DNS a pozitív sarkok felé vándorol. A mintákat 100 V feszültségen (kb 90 mA) kb. 1 órán át futtatjuk, amikor a gyorsabbik marker frontja 1 cm híján eléri a gélagy végét, kikapcsoljuk a tápegységet.

8, A gélt tartó tálkát kiemeljük a futtatókádból, Dark Reader készüléken sávokat láthatóvá tesszük, lefotózzuk, kiértékelő szoftverrel (pl. CP-Atlas) feldolgozzuk.

AZ ELEKTROFEROGRAMOK, KROMATOGRAMOK KIÉRTÉKELÉSE

Szükséges előismeret:

- kapilláris elektroforézis (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként),
vagy
- nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként), *vagy*
- gázkromatográfia (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként)

Ezen a gyakorlaton az elektroferogramok/kromatogramok kiértékelésének legalapvetőbb módszereinek, a különböző kiértékelő szoftverek működési elvének tanulmányozására lesz lehetőség. Bár elsősorban a kapilláris elektroforézis (CE) módszerrel kapott elektroferogramok kiértékeléséről lesz szó, az itt szereplő fogalmak, módszerek, matematikai eljárások általánosan használtak más elválasztási módszerek esetén is, és a különböző, modern kromatográfias módszerekkel (HPLC, SFC, GC stb.) nyert kromatogramok kiértékelése is hasonlóképpen történik.

A gyakorlat anyagának összeállításakor a Chemstation 3D CE (Hewlett-Packard) és az Eurochrom 2000 (Knauer) számítógépes elektroferogram/kromatogram kiértékelő programok felépítését és működési sajátosságait vettük alapul.

Minden analitikai elválasztási eljárás célja, hogy választ tudjunk adni a következő kérdésekre:

1. Milyen összetevőkből áll a minta?
2. Milyen koncentrációban vannak jelen az összetevők a mintában?

Míg az első kérdés megválaszolásával a minőségi (kvalitatív) analízis foglalkozik, a második kérdésre a mennyiségi (kvantitatív) analízis ad választ.

A CE-nél a *minőségi analízis* alapja az elektroferogramon található csúcsok azonosítása. Ez egy adott csúcs migrációs idejének vagy mozgékonyságának egy ismert vegyület kísérletileg kapott megfelelő eredményeivel való összehasonlításával történhet. Ha ugyanazokat a migrációs időket, illetve

mozgékonyági adatokat kapjuk, akkor lehet, hogy a két vegyület azonos. A csúcsok nagy biztonsággal való azonosításának eljárása az alábbi:

- Az injektálást megelőzően adjunk a mintához a kérdéses vegyületből. Az elektroferogramon így kapott csúcsnak nagyobbak kell lennie az eredeti csúcsnál, még hozzá váll kialakulása nélkül.
- Hajtsuk végre az előző eljárást más elválasztási módszerekkel is (pl.: micelláris elektrokinetikus kromatográfia, HPLC). Ha nem kapunk más csúcsokat, akkor a csúcs azonosítását már szinte biztosra vehetjük.
- Teljes bizonyossággal akkor azonosíthatunk egy kérdéses csúcsot, ha kémiai szerkezeti információkat is nyerünk a vegyületről (pl.: CZE-MS technikával).

A csúcsoknak a migrációs idejük alapján történő összehasonlítása állandó kísérleti körülményeket feltételez. A működési paraméterek (pl.: hőmérséklet, a puffer pH-ja, puffer ionerőssége, stb.) kis mértékű megváltozása is hatással lehet a részecskék mozgékonyására, és így megbízhatatlanná válhat a csúcs azonosítása.

A *mennyiségi analízis* a minta egy összetevőjének mennyiségéről vagy koncentrációjáról ad információt az elektroferogram egy csúcsának magassága, vagy területe alapján. Míg a csúcsmagasság közvetlenül leolvasható az elektroferogramról, a csúcsterület meghatározásához egy integrálóegység (számítógépes szoftver) szükséges. Az anyag ismeretlen mennyisége vagy c_x koncentrációja az a_x csúcsterület és az ismert koncentrációjú standard minták $a_{1...n}$ csúcsterületeinek korrelációja alapján számolható ki. Ehhez két fő eljárás, a külső standard és a belső standard módszerek ismeretesek. Mindkét módszer széles körben használatos az analitikai kémiában.

1. A CSÚCSOK INTEGRÁLÁSA

Amikor egy elektroferogramot integrálunk, a szoftver

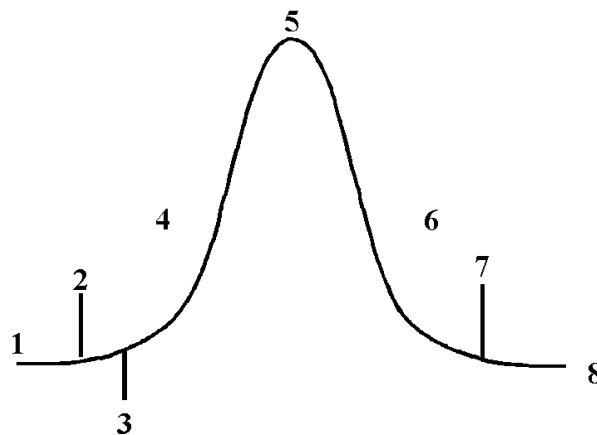
- megkeresi az összes csúcs kezdetét és végét, és azokat egy kis függőleges vonással jelöli meg,
- megkeresi az összes csúcs csúcspontját, vagyis meghatározza a migrációs időket,
- megszerkeszti az alapvonalat,
- kiszámolja az egyes csúcsok területét.

Az integrálási eljárás módját integrációs küszöbértékek határozzák meg. A két legfontosabb küszöbérték a jelmagasságra és csúcsszélességre vonatkozik, melyeket az integrálás előtt meg kell adnunk.

1.1 A csúcsok felismerése

A csúcsok felismerésénél az integrátoregység feltételezi, hogy a csúcs első pontja az alapvonalon van. Ahogy az integrátoregység olvassa az adatokat, folyamatosan ún. mozgóátlagot számol a csúcsszélességi küszöbértéknek megfelelő szakaszra. Ha a jel görbülete eléri a küszöbértékként megadott jelmagasságot, akkor ez egy csúcs kezdetét jelenti. Miután a jel ismét a küszöbértékek alá esik, az integrátor folytatja az adatok „letapogatását” az alapvonalon újabb csúcsokat keresve. Egy pozitív csúcs felismerésének folyamata a következő:

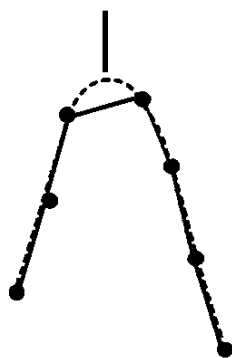
1. A meredekség és a görbület a küszöbérték alatt van: alapvonal követése.
2. A meredekség és a görbület a küszöbérték fölött van: csúcs lehetősége.
3. A meredekség a küszöbérték fölött marad: csúcs azonosítása.
4. A görbület negatívvá válik: elülső inflexiós pont.
5. A meredekség negatívvá válik: csúcspont azonosítása.
6. A görbület pozitívvá válik: hátsó inflexiós pont.
7. A meredekség és a görbület a küszöbérték alatt van: a csúcs végső szakasza.
8. A meredekség és a görbület a küszöbérték alatt marad: a csúcs vége, az alapvonal követése.



1. ábra: Nevezetes pontok egy csúcs felismerésénél (A számok jelentését lásd a szövegben.)

A jelek csúcspontjának (csúcsmagasság és migrációs idő) meghatározásakor az integrátoregység azt használja ki, hogy ott a meredekség pozitív értékről negatívra vált. Az integrátoregység megkeresi a csúc legnagyobbat, majd a mellette levő másikat, és ezekre egy másodfokú egyenlettel leírható görbét illeszt. Az egyenletet megoldva kapjuk meg a csúcsmaximum értékét (1. ábra).

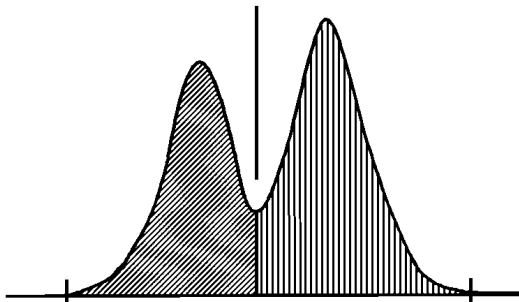
Csúcsmaximum



2. ábra: A csúcsmaximum meghatározása

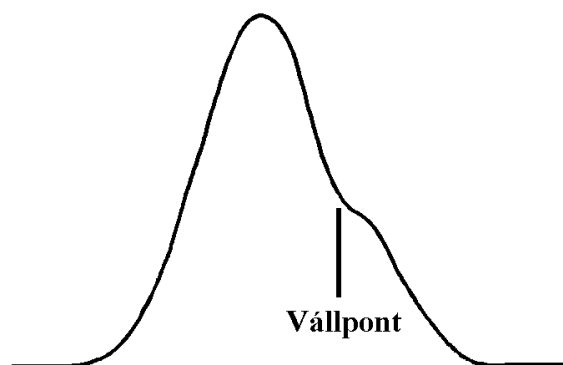
Néha két csúc összeolvad, közöttük nincs alapvonal (3. ábra). Egy alapvonal-völgy (BV) és egy völgy-alapvonal (VB) csúc esetén az integrátoregység a csúcsokat úgy választja szét egymástól, hogy a két csúc közötti völgypontból egy merőleges vonalat húz az alapvonalig. Ezután megkeresi az első csúc elejét és elkezd az adatpontok gyűjtését mindaddig, amíg el nem éri a völgypontot, és ezt követően már a második csúc adatpontjait gyűjti tovább.

Völgypont



3. ábra: Összeolvadt csúcsok

Akadnak olyan csúcsok is melyek oldalán olyan kisebb csúcs (váll) található, melynek felbontása a nagyobb csúcstól nem lehetséges (4. ábra). Ilyenkor nem találunk a főcsúcs és a váll között völgyet abban az értelemben, hogy a negatív meredekség nem vált át pozitívrá. Az integráló szoftverek mindig jelzik, ha egy csúcsnál vállat érzékeltek, ilyenkor figyelemmel kell lennünk arra, hogy a főcsúcs területe tartalmazza a váll(ak) területét is.

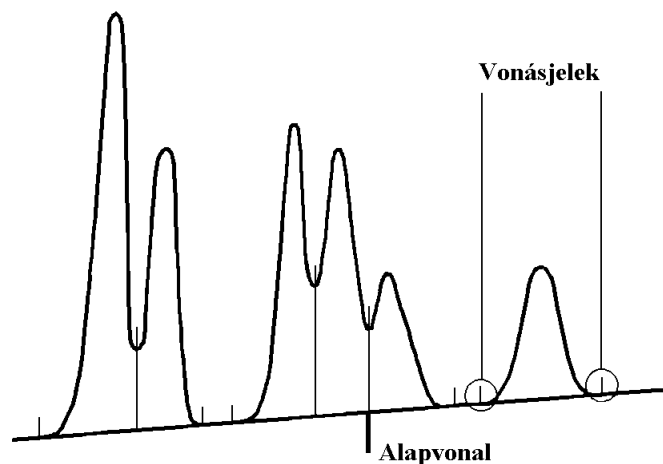


4. ábra: Vállal rendelkező csúcs

1.2 Az alapvonal megszerkesztése

A csúcs felismerését követően az alapvonal megszerkesztését a csúcs végső területének meghatározása követi. Az alapvonal megszerkesztésekor követni kell az elektroforetikus jel futását (5. ábra). Az integrátoregység az alapvonalat egyenes szakaszok sorozataként építi fel, tulajdonképpen a következő pontokat köti össze:

- az elektroforetikus mérés első pontja,
- a függőleges vonásjelek (melyek egy csúcs elejét és végét jelzik),
- az elektroforetikus mérés utolsó pontja.



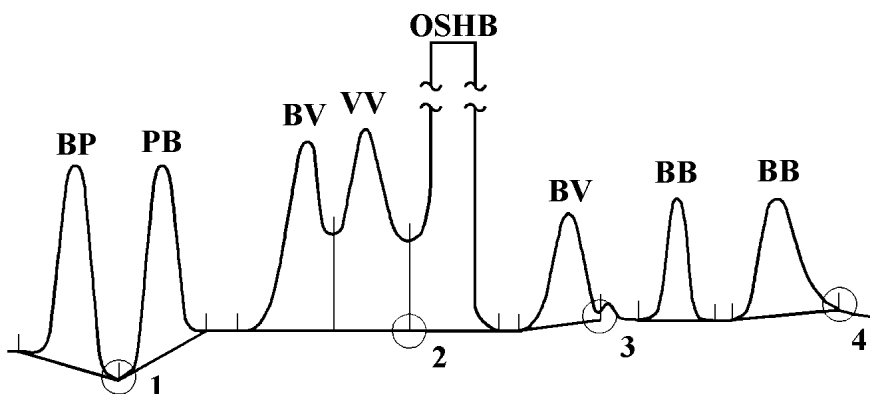
5. ábra: Az alapvonal megszerkesztése

Minden egyes csúcsot egy olyan általánosan használt kétbetűs kóddal lehet jellemezni, amely megadja hogyan lett az elektroforetikus alapvonal megszerkesztve. A kód első betűje a csúcs kezdeténél jellemzi az alapvonalat, míg a második betű a csúcs végénél. A leggyakrabban használt kódjelzések az alábbiak:

B	a csúcs az elektroforetikus alapvonalon (Baseline) kezdődik vagy végződik
H	a csúcs a horizontális (Horizontal) alapvonalon kezdődik vagy végződik
N	negatív (Negative) csúcs
P	a csúcs akkor kezdődött vagy végződött, amikor az alapvonal besüllyedt (Penetrate)
S	az integrátoregység egy kifejezetten nagy csúcsot talált („oldószer-csúcs”, Solvent peak)
T	a csúcs ott kezdődik vagy végződik, ahol érintővonal (Tangent) lett szerkesztve
V	a csúcs egy völgypontnál (Valley point) kezdődik vagy végződik
M	a csúcs integrálása manuálisan (Manually) történt

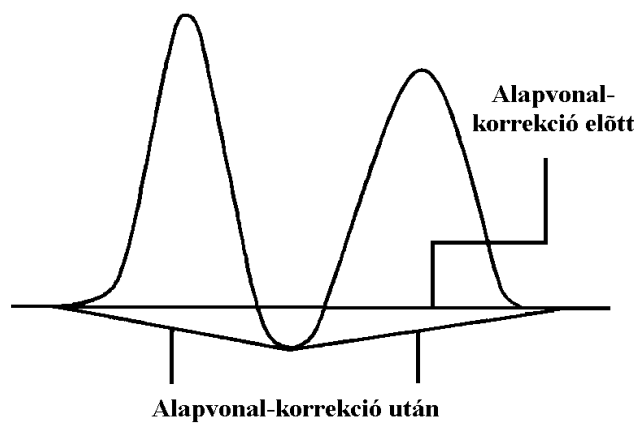
Az integrátoregység bizonyos esetekben módosítja a megszerkesztett alapvonalat. A módosítások a következő szabályok szerint történnek:

- Ha egy csúcsnál besüllyed az alapvonal (BP és PB), akkor az alapvonal is átmegy a csúcs legalsó pontján (6. ábra 1.).
- Ha egy oldószercsúcs nem az alapvonalról indul, akkor az alapvonal megszerkesztése úgy történik, hogy az alapvonal utoljára detektált pontjából az oldószercsúcs kezdetéhez horizontálisan húzunk egyenest (6. ábra 2.). (Az OSHB (Overflow Solvent Horizontal Baseline) jelölés a detektor lineáris tartományán túlérő oldószercsúcsra utal.)
- Ha egy csúcs völgyben végződik, de a völgyet követő csúcs területe nem éri el a beállított küszöbértéket, akkor az alapvonalat a alapvonal következő valódi pontjáiig vetítődik ki (6. ábra 3.).
- Az alapvonalhoz lassan visszatérő (tailing) csúcsok esetén az integrálóegység meghatározza azt az időt ami alatt a csúcs eléri a felmenő, illetve lemenő meredekségi küszöböt, majd ennek az időnek az egynegyedét hozzáadja a csúcsvégéhez (6. ábra 4.).



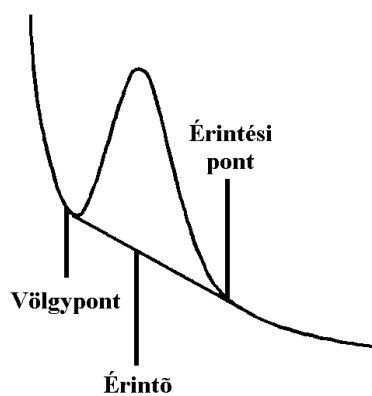
6. ábra: Az alapvonal szerkesztésének módosítása

Az alapvonal süllyedéséről (penetrációjáról) akkor beszélhetünk, ha a jel a megszerkesztett elektroforetikus alapvonal alá esik. Ha valahol alapvonal-süllyedés következik be, akkor azon a helyen alapvonalat újra kell rajzolni.



7. ábra: Alapvonal-süllyedés

Az oldószer-csúcsok lefelé menő szakaszán található csúcsokhoz húzott érintő tekinthető az adott csúcs alapvonalának. Az integrálóegység oly módon húzza meg az érintőt, hogy a csúcs előtti völgypontot köti össze a csúcs utáni érintőponttal, ahol a detektorjel meredeksége megegyezik az érintő meredekségével (8. ábra).

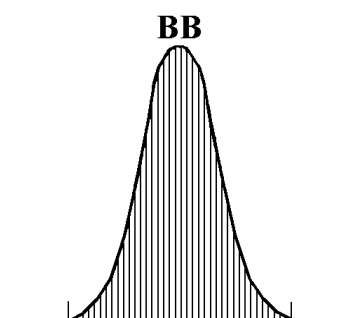


8. ábra: Az oldószer-csúcson található csúcs alapvonalának meghúzása érintőmódszerrel

1.3 A csúcsterület meghatározása

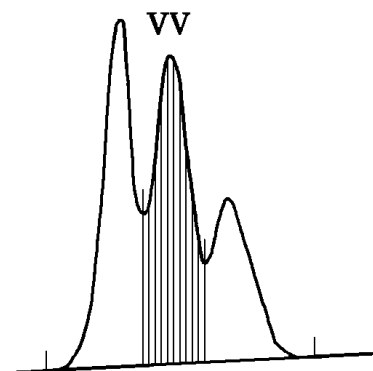
A csúcsok integrálásakor az utolsó lépés a csúcs területének meghatározása.

- Az alapvonal-alapvonal (BB) csúcsok területe a vonásjelek közötti alapvonalszakasz feletti területtel egyezik meg (9. ábra).



9. ábra: Alapvonal-alapvonal (BB) csúcsok területének meghatározása

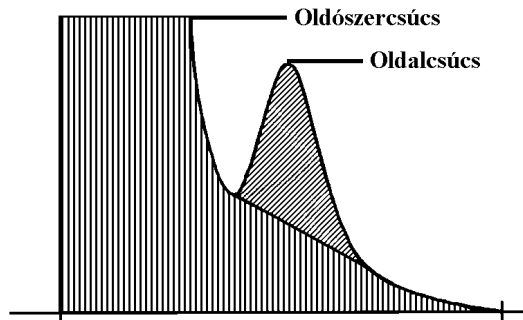
- A völgy-völgy (VV) csúcsok esetén a völgypontokból az alapvonalig húzott merőlegesek és az alapvonal által behatárolt rész területét kell meghatározni (10. ábra).



10. ábra: Völgy-völgy (VV) csúcsok területének meghatározása

- Oldalcsúcsok (T) esetén a terület az érintő segítségével újrarájzolt alapvonal feletti rész területével egyezik meg (11. ábra).

- Az oldószercsúcsok területe az alapvonalnak a csúcs előtti utolsó, valódi pontjának horizontális meghosszabbításával kapott alapvonal feletti, és az oldalcsúshoz húzott érintő alatti területnek felel meg (11. ábra).



11. ábra: Az oldószér- és oldalcsúcs területének meghatározása

1.4 Integrációs paraméterek

A négy leggyakrabban alkalmazott integrációs paraméter a következő:

Csúcsmagasságküszöb	Az ennél kisebb magasságú jeleket az integrátor elveti.
Csúcsterületküszöb	Az ennél kisebb területű jeleket az integrátor elveti.
Csúcsszélességküszöb	Az ennél kisebb félértékszélességű jeleket az integrátor elveti.
Válldetektálás	Váll detektálásának ki/bekapcsolása.

A *csúcsmagasságküszöb* beállításával a kiszűrendő zaj szintjét tudjuk megadni. A küszöb értékénél kisebb magasságú jeleket az integrátoregység figyelmen kívül hagyja. Ez a küszöbérték elsősorban nem a kis csúcsok kizárására szolgál, arra leginkább a csúcsterületküszöb használatos.

A *csúcsterületküszöb* a kis jeleket területük alapján szűri ki. A küszöbértéknél kisebb területű csúcsok nem kerülnek feldolgozásra.

A *csúcsszélességküszöb* beállításával jól szabályozható az integrátor szelektivitása, segítségével megkülönböztethetjük a csúcsokat az alapvonal zajától. A küszöbérték megfelelő beállításával úgy szűrhetők ki zajok, kisebb csúcsok, hogy nem vesznek el hasznos információk. Ha a küszöbértéket túl alacsonyan határozzuk meg, akkor az integrátoregység a zajokat is csúcsokként értelmezheti.

A csúcsszélességküszöböt a legkeskenyebb csúcs szélességéhez kell állítani. Mivel az elektroforetikus mérés során a csúcsok szélessége az idővel általában nő, szükséges lehet a csúcsszélességküszöb időprogramozására, melyre a legtöbb integráló program lehetőséget nyújt. Sőt, sok program automatikusan frissíti (növeli) a kezdeti küszöbértéket (pl. $\text{küszöbérték} = (0,75 \times \text{aktuális küszöbérték}) + (0,25 \times \text{az aktuális csúcs szélessége})$).

Ha a *válldetektálás* aktiválva van, az integrátoregység egy összetettebb csúcsintegrációs algoritmust alkalmaz, mely a vállakat azonosítani képes.

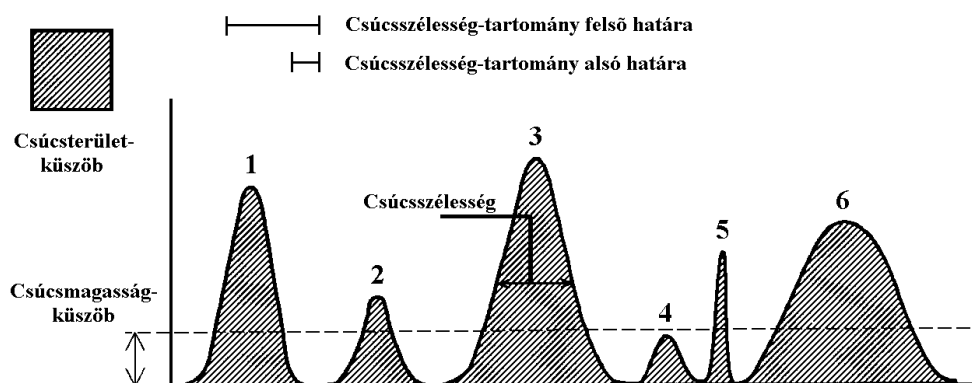
A fenti négy integrációs paraméteren kívül sok más paraméter is ismeretes, ezek közül megemlítjük még a *csúcsszélességi-tartomány küszöböt*, melynek alkalmazásával csak a tartományba eső csúcsszélességgel rendelkező csúcsok lesznek detektálva (lásd 12. ábra).

A csúcsmagasság- és a csúcsmagasságküszöb értékei nagyon fontosak az integrációs eljárás során, változtatásuk különböző eredményekkel járhat:

- A két küszöbérték növelése elsősorban olyan eseteknél hasznos, amikor főkomponenseket kell detektálni és erősen zajos környezetben kell mennyiségi meghatározást végezni. A nagyobb csúcsmagasságküszöb fokozottabb jelszűrést okoz, a nagyobb jelmagasságküszöb pedig a véletlen zajt hagyja figyelmen kívül.
- A két küszöbérték csökkentése az olyan nyomkomponensek detektálásánál és mennyiségi kiértékelésénél hasznos, melyek magassága sokszor alig nagyobb a zaj szintjénél. A csúcsmagasságküszöb hatása kisebb a jelszűrésre, mint a csúcsmagasságküszöb hatása.
- Az olyan esetekben amikor széles és keskeny csúcsokat egyaránt detektálnunk kell, a csúcsmagasságküszöböt a legkeskenyebb csúcsnak megfelelően kell beállítani, míg a csúcsmagasságküszöböt annyira kell csökkenteni, hogy a szélesebb csúcsok is detektálhatók legyenek.

Az integrációs paramétereket gyakran meg kell változtatnunk, kis túlzással azt is mondhatjuk, hogy minden egyes elektroferogramhoz külön paraméterkombinációt kell alkalmaznunk. A 12. ábra a csúcsmagasság-,

csúcsszélesség- és csúcsterületküszöb hatását mutatja be egy elektroferogram öt csúcsának integrálására.



12. ábra: Az integrálási paraméterek használata

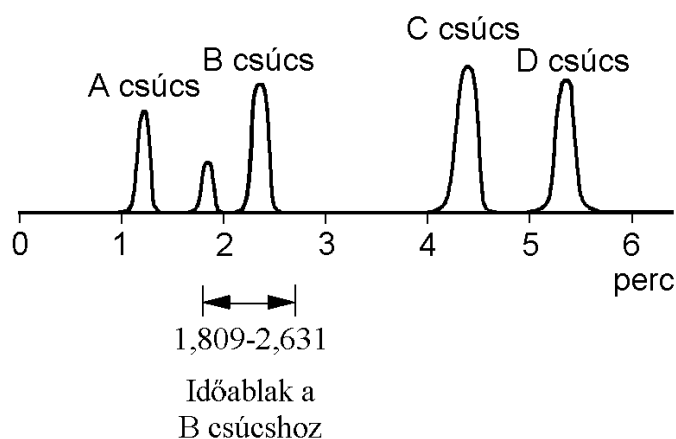
Az integrátoregység egy csúcsot csak akkor fog integrálni, ha a csúcs mindhárom küszöbérték támasztotta követelménynek megfelel. A 12. ábrán látható csúcsokat és küszöbértékeket áttanulmányozva belátható, hogy az integrátornak csupán az 1 és 3 jelű csúcsokat kell integrálnia:

Integrációs paraméter	1. csúcs	2. csúcs	3. csúcs	4. csúcs	5. csúcs	6. csúcs
Csúcsmagasságküszöb	felett	felett	felett	alatt	felett	felett
Csúcsszélesség-tartomány	belül	belül	belül	belül	alatt	felett
Csúcsterületküszöb	felett	alatt	felett	alatt	felett	felett
Csúcsintegrálás?	igen	nem	igen	nem	nem	nem

2. A CSÚCSOK AZONOSÍTÁSA

A csúcsok azonosítása a minta ismeretlen komponenseinek azonosítását jelenti. A legtöbb elektroferogramot kiértékelő program az egyes komponensek elektroforetikus jellemzőit külön táblázatban (Kalibrációs táblázat) tárolja. Ezek a tárolt adatok a komponensek standard oldatainak meghatározásain alapulnak. A csúcsok azonosításakor a program a mintaoldat elemzésekor kapott csúcsokat a Kalibrációs táblázatban tárolt (várható) adatokkal hasonlítja össze. Az összehasonlítás végrehajtásánál 3 fő módszer ismeretes.

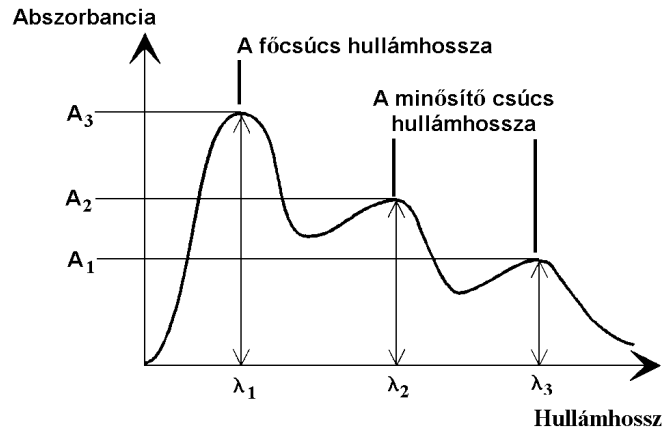
A csúcsok *abszolút migrációs ideje* ún. migrációs időablak segítségével hasonlíthatók össze. Ezek az időablakok az elektroferogramnak egy olyan kis szakaszát jelentik, melyek középpontja az adott csúcs várható (a Kalibrációs táblázatból vett) migrációs ideje. A minta minden olyan csúcsa, amely beleesik ebbe az ablakba, egy lehetséges jelöltnek számít az azonosításnál. A 13. ábra a B csúcs 1,809 perc-től 2,631 percig terjedő migrációs időablakát mutatja, melyben a várható migrációs idő 2,22 perc. Ebben az ablakban a B csúcsnak két lehetséges csúcs felelhet meg. Az egyik migrációs ideje 1,85 perc, a másiké 2,33 perc. Ha a csúcs nem referenciacsúcs, akkor a 2,22 perc várható migrációs időhöz legközelebb eső csúcsot kell kiválasztani. Ha a várható csúcs egy (idő)referencia vagy belső standard csúcs, akkor az ablakban található legnagyobb csúcs kerül kiválasztásra. Mindkét esetben, B csúcsként a 2,33 percnél található csúcsot választja ki a program.



13. ábra: Migrációs időablak

Az ablakok szélességét általában úgy állítják be, hogy az az adott csúcs migrációs idejének körülbelül 5%-a legyen. Az 5%-os migrációs időablak azt jelenti, hogy a kérdéses csúcs migrációs ideje a Kalibrációs táblázatban található, várható migrációs időnél legfeljebb 2,5%-kal kisebb, illetve maximum 2,5%-kal nagyobb. Így például, egy kalibrációs oldat meghatározásakor kapott 2,00 perc migrációs idejű csúcshoz a későbbi mérések során 1,95 perc és 2,05 perc között kell megjelenie.

A csúcsok abszolút migrációs idején alapuló összehasonlítás egyszerű, de nem mindig megbízható. Az egyes migrációs idők csekély mértékben változhatnak az elektroforézis körülményeinek, illetve a készülék működési paramétereinek kis mértékű megváltozása miatt. Emiatt az egyes csúcsok az összehasonlító ablakon kívülre eshetnek, és ezért nem lesznek azonosíthatók. Az abszolút migrációs időknél tapasztalható, elkerülhetetlen ingadozások kezelése érdekében az egyes komponensek migrációs idejét egy vagy több referenciacsúcsához viszonyítva fejezik ki, így kapjuk meg az adott csúcs *korrigált migrációs idejét*. A referenciacsúcsok a Kalibrációs táblázatban vannak megadva. A referenciacsúcsok használatával kompenzálni tudjuk a mintakomponens csúcsok migrációs idejének eltolódását. Ha az adott mérési módszernél nincs referenciacsúcs megadva, vagy egy referenciacsúcsot sem tudunk azonosítani, a program az abszolút migrációs idők alapján végzi el a csúcsok azonosítását. A referenciacsúcs migrációs időablakában talált legnagyobb csúcsot kell a referenciacsúcsnak választani. A Kalibrációs táblázatban szereplő összes többi csúcs várható migrációs ideje módosul a referenciacsúcs várt és tényleges migrációs időinek arányának megfelelően. A migrációs időknél egyetlen referenciacsúccsal történő korrigálása azon a feltételezésen alapszik, hogy a tényleges migrációs idők eltérése a várható migrációs időktől egyformán és lineárisan változik az egész elektroforetikus elválasztás során. Sokszor azonban, különösen hosszabb mérési idők esetén a migrációs idők nem egyformán változnak. Ilyen esetekben több referenciacsúcsot érdemes alkalmazni bizonyos időközönként. Az így felosztott időintervallumokban azt feltételezzük, hogy a migrációs idők közötti eltérés lineárisan változik. Egy komponens több hullámhosszon is detektálható. Általában a legnagyobb elnyelést mutató hullámhosszhoz (λ_1 a 14. ábrán) közel történik a detektálás. Ezenkívül más, a Kalibrációs táblázatban nem szereplő hullámhosszak (λ_2 és λ_3 a 14. ábrán) *csúcsminősítésre* használhatjuk.



14. ábra: Csúcsminősítés

Egy komponensre megadható egy olyan állandó, mely a különböző hullámhosszokon kapott jel nagyságok (abszorbanciák) hányadosa:

$$K = \frac{\lambda_1 \text{ hullámhosszon kapott jel}}{\lambda_2 \text{ hullámhosszon kapott jel}}$$

Ha a K értéke belül van egy adott értéken, akkor ez a komponens azonosításának helyességét erősíti meg.

3. MENNYISÉGI KIÉRTÉKELÉS

Miután a csúcsoakat integráltuk és azonosítottuk, az analízis következő lépése a mennyiségi kiértékelés. A mennyiségi kiértékelésnél a csúcsook területét vagy magasságát használjuk a mintakomponensek ismeretlen koncentrációjának meghatározásához. A mennyiségi kiértékelés 3 fő lépésből áll:

- Az adott komponens ismert mennyiségeit tartalmazó mintaoldatok (standardok) elemzése.
- Az adott komponens ismeretlen mennyiségben tartalmazó mintaoldat elemzése.
- Az ismeretlen és az ismert mennyiségekre kapott válaszjelek összehasonlítása, és így módon a mintakomponens ismeretlen mennyiségének meghatározása. (Természetesen a jelek összehasonlítása

csak akkor végezhető el, ha az elektroforézis, a kapott elektroferogram integrálása, az adatok meghatározása azonos körülmények között történt.)

A mintában található egyes komponensek ismeretlen mennyiségeinek kiszámítása a következő módszerekkel történhet:

- Százalékos összetétel meghatározása
- Normalizálás
- Külső standard módszer
- Belső standard módszer

A *százalékos összetétel meghatározásánál* nem szükséges kalibrációs eljárás végrehajtása. A százalékos összetétel meghatározása vagy csúcsterület, vagy csúcsmagasság alapján történik, ennek alapján beszélhetünk csúcsterület-százalékos, illetve csúcsmagasság-százalékos összetételről. A csúcsterület-százalékos összetétel használatakor minden egyes csúcs területét az elektroferogramon található összes csúcs összterületének a százalékos arányában kell megadni. A százalékos összetétel nem függ a minta injektált mennyiségétől. Csak abban az esetben kapnánk az egyes komponensek mennyiségére egy viszonylag jól közelítő eredményt, ha minden egyes komponens egyformán nyelne el a detektálási hullámhosszon. A területiszázalékot általában akkor használják, ha csak minőségi meghatározás a cél és más kalibrációs módszernél szükséges kalibrációs táblázat elkészítéséhez akarunk információt szerezni. A csúcsmagasság-százalékos összetétel megadásánál az egyes csúcsok magasságát az elektroferogramon található összes csúcs összesített magasságának a százalékos arányában kell megadni.

A detektor az egyes komponensekre általában nem egyformán érzékeny, vagyis azonos mennyiségű komponensek nem azonos nagyságú (területű) csúcsot szolgáltatnak. A különböző mintakomponensek detektálási érzékenységében történő különbségek kompenzálása miatt a *normalizációs módszernél* az egyes komponensek csúcsterületéhez (vagy magasságához) ún. érzékenységi faktorokat (f_i) számolnak ki:

$$f_i = \frac{c_i}{A_i} \quad (1)$$

c_i : az i -edik komponens koncentrációja

A_i : az i -edik komponens területe

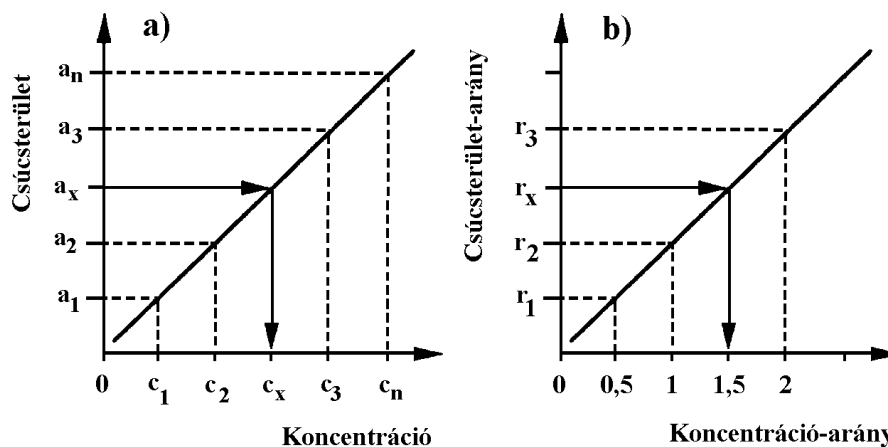
A faktor függ a komponens minőségétől, a detektor típusától, a CE készüléktől és az elválasztás körülményeitől. Az egyes komponensek normalizált százalékos (norm%) összetétele a következőképpen számolható ki:

$$\text{norm}\%_i = \frac{f_i \cdot A_i}{\sum_1^n f_i \cdot A_i} \cdot 100 \quad (2)$$

A *külső standard módszer* a legalapvetőbb mennyiségi meghatározási módszer. A minta ismeretlen mennyisége az ismeretlen mintára és a referencia oldatokra (külső standardok) kapott eredmények összehasonlítása alapján számolható ki. Ideális esetben a standard oldatokat olyan koncentrációban kerülnek elemzésre, hogy a kapott jelek detektor lineáris tartományán belül maradnak. A standard oldatok elemzését követően a mintát injektáljuk a rendszerbe, és elemzését, illetve a megfelelő csúcsok területének meghatározását ugyanúgy végezzük, mint ahogy azt a standardok esetén tettük. A csúcsterületeket a koncentráció függvényében ábrázolva ideális esetben egy egyenest kapunk (15.a, ábra), melyből a minta ismeretlen koncentrációja könnyen számolható. Mivel a külső standard módszernél az egymást követő elemzések csúcsterületeit hasonlítjuk össze, pontos és nagyon jól reprodukálható mintabevitelre van szükség.

A *belső standard módszernél* egy ismert anyagot (belső standard) adnak mind a referencia oldatokhoz, mind a mintaoldathoz. A minta vizsgált komponensének koncentrációját a belső standard és a vizsgált komponens csúcsainak arányának a referencia oldatok megfelelő csúcsainak arányához való hasonlítása alapján kapjuk meg (15.b, ábra). A kicsit bonyolultnak tűnő definíció megértését a következő példával igyekszünk megkönnyíteni. Tegyük fel, hogy egy minta fenilalanin koncentrációjának meghatározása a feladatunk, és ehhez tirozint használunk belső standardként (eredetileg nincs a mintaoldatban). Ekkor a következő lépéseket kell végrehajtanunk:

- Készítsük el a meghatározott koncentrációjú (pl.: 2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM és 10,0 mM) fenilalanin referencia oldatokat.
- Adjunk ismert mennyiségben (pl., hogy 5 mM legyen a végső koncentrációja) tirozint az összes referencia oldathoz.
- Végezzük el az összes referencia oldat elemzését és határozzuk meg mindkét komponens csúcsterületeit. Számoljuk ki a koncentrációk, illetve a megfelelő csúcsterületek arányát és rajzoljuk meg a kalibrációs egyenest (15.b, ábra).
- Adjunk ismert mennyiségben (pl., hogy 5 mM legyen a végső koncentrációja) tirozint a mintaoldathoz és elemezzük.
- Számoljuk ki a fenilalanin és a tirozin csúcsterületeinek arányát.
- Határozzuk meg a mintaoldat koncentráció arányát a kalibrációs egyenes (15.b, ábra) alapján és számoljuk ki a fenilalanin ismeretlen koncentrációját.



15. ábra: Kalibrációs egyenesek megszerkesztése külső standard (a), illetve belső standard (b) módszerek segítségével

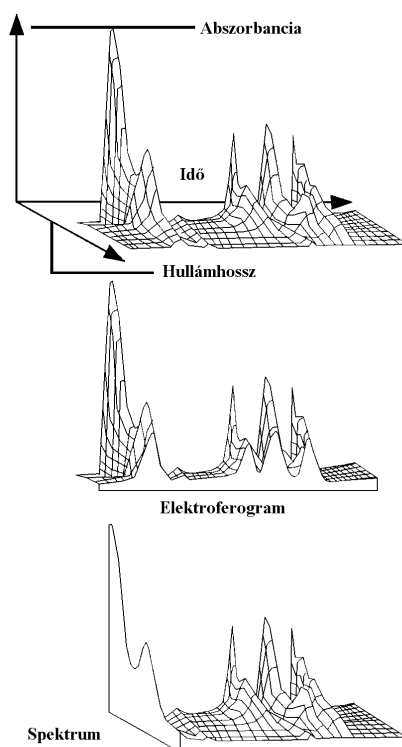
A belső standard módszer használatakor számos követelménynek kell teljesülnie. A belső standard nem lehet jelen az eredeti mintában, másrészt az anyagnak tisztának, jól definiáltnak kell lennie, melynek elektroforetikus és detektálhatósági tulajdonságai hasonlóak a meghatározandó anyag ugyanezen tulajdonságaihoz. Harmadrészt, a belső standardnak a minta egyes komponenseitől jól elválo csúcsot kell adnia. Mivel a belső standardot

az injektált mintához adjuk, az injektálási térfogat kismértékű ingadozásai nincsenek hatással a módszer, illetve a detektálás ismételtetésére.

4. SPEKTRUMELEMLÉZÉS

Spektrumelemzés során az UV-látható tartományban működő diódasoros detektorral kapott spektrumadatok feldolgozása történik. A spektrumadatok analízise a CE elemzésnél kapott elektroforetikus adatokat három dimenzióssá bővíti (16. ábra). A spektrumadatok feldolgozásának célja lehet

- a csúcsok tisztaságának ellenőrzése,
- az egyes komponensek minőségének meghatározása a spektrumkönyvtár segítségével,
- az egyes komponensek optimális detektálási hullámhosszának meghatározása.



16. ábra: A CE analitikai adatok háromdimenziós ábrázolása

4.1 Csúcstisztasági vizsgálatok

Az elektroforetikus elemzéseknél (mint ahogy más elválasztási módszereknél is) az egyik legfontosabb kérdés mindig az, hogy vajon a kapott csúcs egy vagy több komponensnek felel-e meg. A minőségi elemzéseknél a rejtett szennyeződések meghamisítják az eredményt, illetve ha egy csúcsban egy komponens rejtve marad, akkor lényeges információk vesznek el.

A csúcstisztasági vizsgálatoknál tehát azt kell megállapítanunk, hogy az adott csúcs tiszta-e, vagy esetleg szennyeződést tartalmaz. Ennek megállapítása a csúcs elúciója során kapott spektrumok összehasonlítása alapján történik. Általában csúcsonként 3 spektrumot használnak a tisztaság megállapításához. Két spektrumot a csúcs két inflexiós pontjánál, egy spektrumot a csúcs tetőpontján (maximumán) szoktak felvenni. (Ha azonban szükség van rá, akkor a tisztaságvizsgálat több pontban is, akár a csúcs összes pontjában felvett spektrum alapján is történhet.)

Ha ez a három spektrum nem egyforma, akkor a csúcs spektrális szennyeződést tartalmaz, melyet egy vagy több komponens okoz, vagy esetleg háttérabszorpció eredménye. Meg kell még jegyeznünk, hogy ha a spektrumok megegyeznek, attól a csúcsok még tartalmazhatnak szennyeződést. Ez leginkább akkor fordulhat elő, ha a szennyező komponens fényelnyelése kicsi a főkomponens elnyeléséhez képest, vagy a szennyezők és a főkomponens spektrumai közel azonosak. A háttérabszorpció a pufferrendszer megváltoztatásával csökkenthető.

A csúcstisztasági diagram a három spektrumot normalizált és egymással fedésbe hozott formában tartalmazza. A tisztasági faktor a spektrumalakzatok hasonlóságának mértéke. A csúcstisztaság megállapítása a spektrumok vizuális összehasonlítása alapján meglehetősen hosszadalmas eljárás lenne, ráadásul automatizált üzemmódnál nem alkalmazható. A spektrumok automatizált összehasonlítása különféle statisztikai módszerekkel történhet. A legtöbb elektroferogram kiértékelő programnál egyetlen parancs kiadásával matematikai módszerekkel történik két spektrum összehasonlítása, a program kiszámolja a spektrumok hasonlósági fokát, azaz a tisztasági faktort is, amely a következőképpen adható meg:

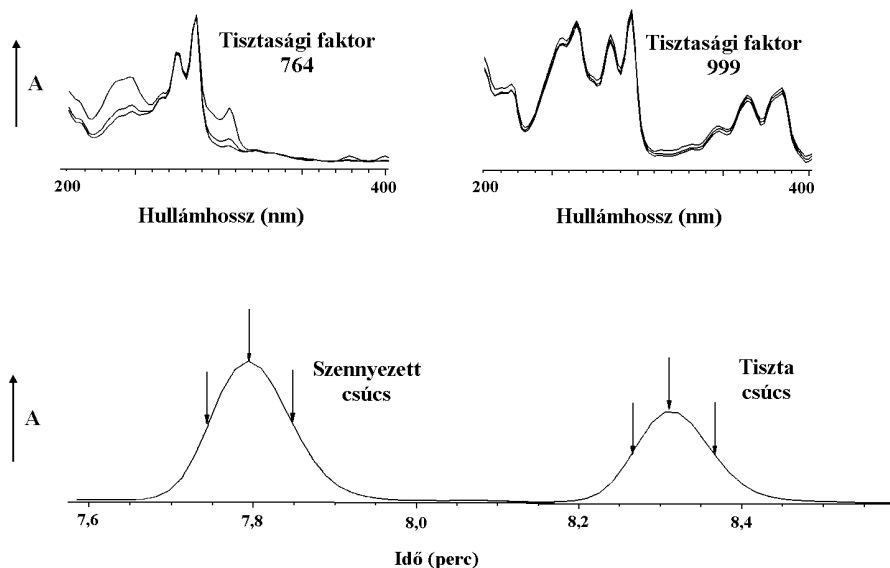
$$\text{tisztasági faktor} = \frac{10^3 \cdot \left[\sum x \cdot y - \left(\frac{\sum x \cdot \sum y}{n} \right) \right]^2}{\left[\sum x^2 - \left(\frac{\sum x \cdot \sum x}{n} \right) \right] \cdot \left[\sum y^2 - \left(\frac{\sum y \cdot \sum y}{n} \right) \right]} \quad (3)$$

Az x és y a két spektrumon az azonos hullámhosszon mért abszorbancia értékek, n az adatpontok száma. A 0 tisztasági faktor azt jelzi, hogy egyáltalán nincs hasonlóság a két spektrum között, míg az 1000-es érték a teljes azonosságról árulkodik. Általában ha a tisztasági faktor 990-nél nagyobb, akkor szinte bizonyosra vehetjük a csúcs szennyeződéstől való mentességét, míg 900 és 990 közötti értékek esetén az eredményeket óvatosan kell kezelni. A 900 alatti értékek a spektrumok egyértelmű különbözőségét jelzik.

A csúcstisztasági vizsgálatok csak alapvonal-alapvonal (BB) csúcsokra végezhetőek el. Ha a csúcsok nem az alapvonalról indulnak, akkor a csúcstisztaság megállapítása komplikáltabb, mert mindegyik csúcs a szomszédját is tartalmazza kis mértékű szennyeződésként. Egy csúcs tisztaságának megítéléséhez többfajta módszert is használhatunk, melyek közül a két leggyakoribb

- a spektrumok normalizálása,
- két vagy több hullámhosszon kapott abszorbancia értékek arányának ábrázolása az idő függvényében.

A *spektrumok normalizálása* kompenzálja a detektoron áthaladó komponensek eltérő koncentrációit. Általában a csúcs két inflexiós pontjánál és a csúcs maximumán felvett spektrumokat hasonlítják össze. A spektrumokat normalizálják és egymásra vetítve ábrázolják. Az egymásra vetített spektrumok mellett a programok gyakran feltüntetik az inflexiós pontokon felvett spektrumok összehasonlításából számolt tisztasági faktorokat is (17. ábra). A spektrumok vizuális összehasonlítása, illetve a program által kiszámolt tisztasági faktor segítségével egyértelmű különbség tehető a tiszta és a szennyezett csúcs között.

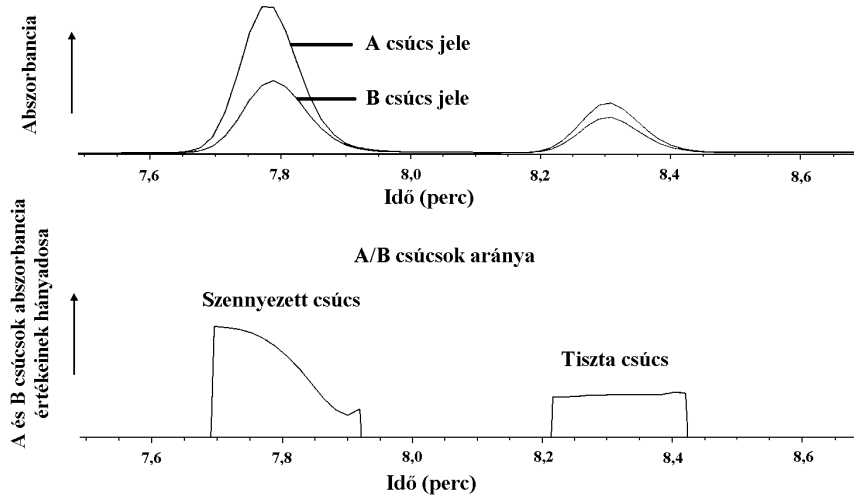


17. ábra: A csúcsok tisztaságának ellenőrzése egymásra vetített spektrumok segítségével

A különböző hullámhosszakon kapott *abszorpciós jelek arányának* idő függvényében történő ábrázolása is hasznos információkat nyújthat egy csúcs tisztaságának megítéléséhez. Egy tiszta vegyület esetén a λ_1 hullámhosszra érvényes A moláris abszorpciós együttható egyenesen arányos egy másik hullámhosszon (λ_2) használható együtthatóval:

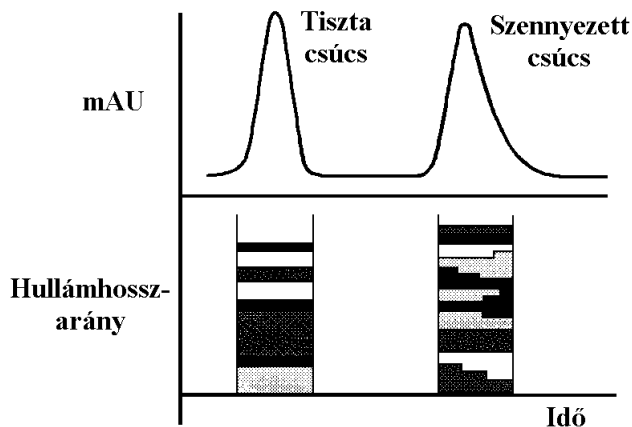
$$A(\lambda_1) = K \cdot A(\lambda_2) \quad (4)$$

ahol a K állandó a kiválasztott hullámhosszakon jellemző az adott vegyületre. Tiszta vegyület esetén a két hullámhossz közötti abszorbanciaarány állandó. Az abszorbanciaarány idő függvényében történő ábrázolásakor tiszta csúcsok esetén lapos vonalat kapunk, míg szennyező komponensek jelenléte esetén a K értékek különbözőek (18. ábra).



18. ábra: Abszorbanciaarányok ábrázolása szennyezett és tiszta csúcsok esetén

Az abszorbanciaarányok számításának és ábrázolásának egy másik módja az aránydiagram (ratiogram) elkészítése. Az aránydiagram elkészítésénél nemcsak két hullámhosszon kapott abszorbanciajelekből képzünk arányszámot, hanem az összes detektálási hullámhosszon kapott jelből és a maximális abszorbanciajelből. Az aránydiagram úgy ábrázolható, hogy a vízszintes tengely az idő, a függőleges tengely pedig a hullámhossz (19. ábra). A színek az abszorbanciaarányokat reprezentálják. Ez a diagram egy elektroferogram csúcsainak tisztaságának egy nagyon gyors áttekintéséhez nyújt lehetőséget. Ha egy csúcs tiszta, akkor az aránydiagramon párhuzamosan futó sávok jelennek meg és ezeknek a sávoknak a színe nem változik a csúcs teljes elúciós időtartamán keresztül. A tiszta csúcsok abszorbanciaaránya állandó a csúcs teljes szélességében. Ha a csúcs szennyeződést tartalmaz, a sávok futása az időben változik, az abszorbanciaarány nem állandó.



19. ábra: Az aránydiagram

4.2 A spektrumkönyvtár használata

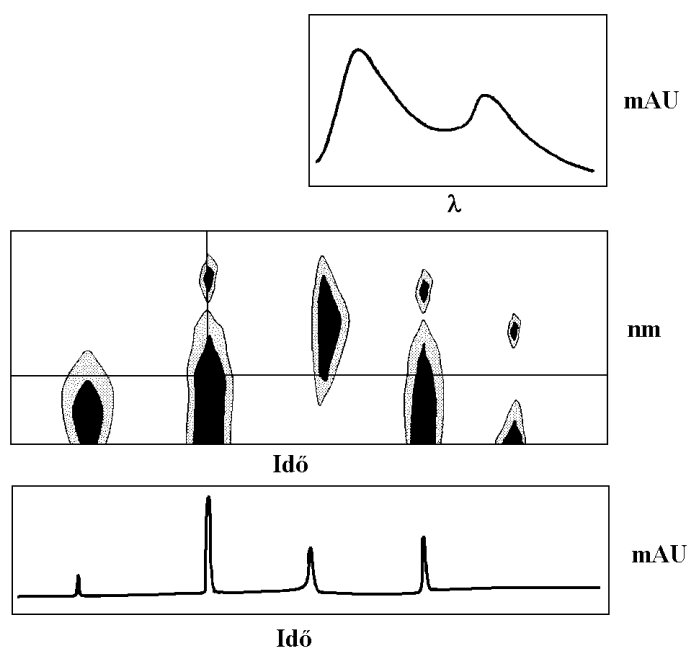
A kapilláris elektroforézisnél a csúcsoknak integrálás vagy mennyiségi meghatározás céljából történő azonosításához az abszolút vagy korrigált migrációs időket lehet alkalmazni. Ez az eljárás azonban nem megfelelő ismeretlen összetételű minták esetén. Ha a minta teljesen ismeretlen, spektroszkópiás módszerek szükségesek a komponensek azonosításához.

A legtöbb elektroferogram kiértékelő program rendelkezik egy ún. spektrumkönyvtárral, mely hasznos segítséget nyújthat a mintakomponensekre kapott csúcsok azonosításához. A spektrumkönyvtárban sok vegyület spektruma megtalálható, és a spektrumok száma növelhető (a felhasználó munkája során folyamatosan bővítheti az azonosított komponensek spektrumának elmentésével). A program képes egy ismeretlen komponens spektrumának a spektrumkönyvtárban található összes spektrummal való gyors összehasonlítására, és így módon lehetséges azonosítására. A spektrumok hasonlósága a hasonlósági faktor megadásával jellemezhető.

Sok mintánál a minta mátrixvegyületei vagy a puffér zavarhatja a kérdéses vegyület azonosítását, mivel e zavaró hatások hatással vannak a spektrumokra. A puffér vagy a mátrixanyag okozta háttér zavaróhatásokat úgy lehet kiküszöbölni, ha a csúcsmaximumon felvett spektrumból kivonjuk az alapvonal spektrumát, és csak ezt követően indítjuk a spektrumkönyvtárban való keresést.

4.3 Az optimális detektálási hullámhossz meghatározása

Az adott analitikai feladat megoldásához szükséges módszer kifejlesztésekor, a csúcsok elválasztásához megfelelő körülmények kidolgozását követően, meg kell találni az egyes csúcsok detektálásához optimális hullámhosszat. Az optimális detektálási hullámhossz meghatározásának egyik módszere az abszorbancia, a hullámhossz és az idő ábrázolása kontúrtérképes, ún. izoabszorpciós grafikonos formában. Ennél a módszernél az izoabszorpciós (azonos abszorbancia értékű pontok alkotta) koncentrikus vonalakat a hullámhossz és az idő függvényében kell ábrázolni (20. ábra középső grafikonja).



20. ábra: Az izoabszorpciós pontok ábrázolása

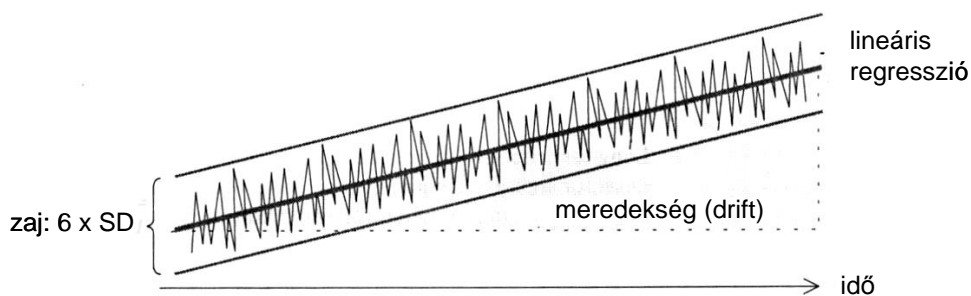
Ez a módszer igen hasznos az egyes csúcsok külön-külön detektálásához optimális hullámhossz megállapításához. A kurzor horizontális helyzete az izoabszorpciós grafikonon a hullámhossznak felel meg. Ha a kurzort a hullámhossz tengely mentén mozgatjuk, az elektroferogram egy másik diagramban újrarajzolódik (20. ábra alsó grafikonja).

5. ANALITIKAI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA

A kiértékelő szoftverekkel különböző analitikai paramétereket számoltathatunk ki, melyek alkalmasak lehetnek a készülék, illetve az alkalmazott módszer megfelelőségének meghatározásához (system suitability). Egy készülék tesztje magában foglalja a detektor érzékenységét, a csúcsok migrációs idejének, illetve integrált területeinek pontosságát (RSD). Az analitikai rendszer tesztje ugyancsak tartalmazhatja a csúcsok migrációs idejének, illetve integrált területeinek pontosságát (RSD), a szelektivitást, alapvonal zaj és drift elemzését, két csúcs közötti felbontást, illetve a módszer robusztusságának, és a csúcsalak elnyúlásának vizsgálatát.

5.1 Zaj meghatározása

A zaj meghatározása egy adott időintervallumban kapott detektorjelekből (adatpontokból) nyerhető, leggyakrabban a jel standard deviációjának 6-szorosának felel meg.



21. ábra: Zaj meghatározása

5.2 Csúcsszimmetria

A kromatográfiás/elektroforetikus csúcsok sokszor nem szimmetrikusak, szabályosak (tailing, leading), ami megnehezítheti a mennyiségi kiértékelésüket. A csúcsok szimmetrikusságának jellemzésére használjuk a csúcsszimmetria faktorokat. A csúcsszimmetria faktor a szoftverek az alábbi összefüggés alapján határozzák meg:

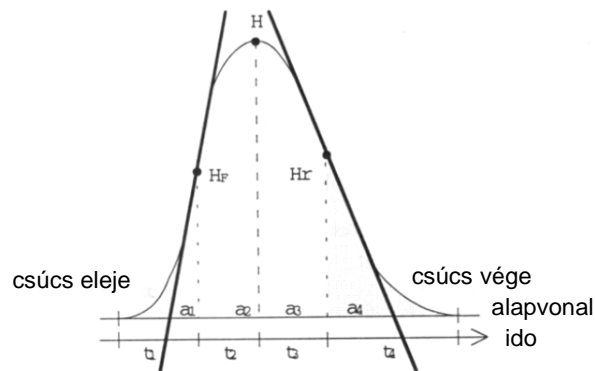
$$f_{\text{szim}} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}} \quad \text{(vagy)} \quad f_{\text{szim}} = \frac{a_1 + a_2}{a_3 + a_4}, \text{ ha inflexiós pont nem detektálható}$$

$$\text{ahol} \quad m_1 = a_1 \left(t_2 + \frac{a_1}{1,5H_f} \right);$$

$$m_2 = \frac{a_2^2}{0,5H_f + 1,5H_f};$$

$$m_3 = \frac{a_3^2}{0,5H_r + 1,5H_r};$$

$$m_4 = a_4 \left(t_3 + \frac{a_4}{1,5H_r} \right)$$



22. ábra: A csúcsszimmetria faktor meghatározása (a_i =csúcsszeletek területei; t_i =időintervallumok, H_f = elülső inflexiós pont magassága, H_r = hátulsó inflexiós pont magassága)

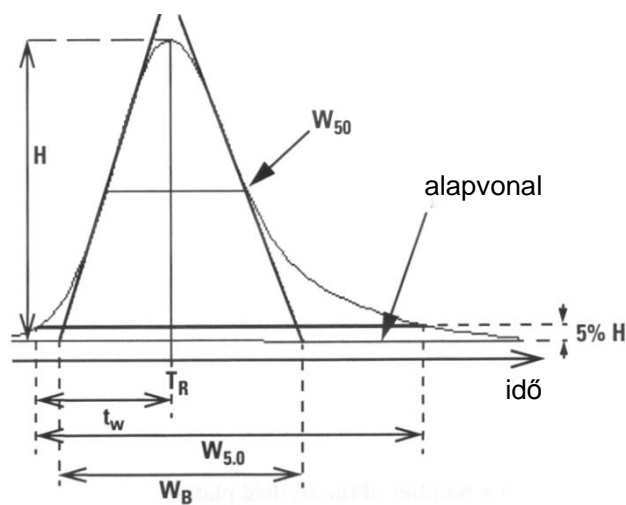
5.3 Csúcsszélesség

A csúcsszélességeket különböző csússmagasságoknál lehet meghatározni:

W_B : alapvonalon vett szélesség (4□), mely az inflexiós pontokra húzott érintők kimetszései az alapvonalból.

$W_{5.0}$: szélesség a csússmagasság 5%-ánál

$W_{50.0}$: szélesség a csússmagasság 50%-ánál



23. ábra: Csúcsszélességek meghatározása

5.4 Kapacitásfaktor (kapacitástényező)

$$k' = \frac{t_x - t_0}{t_0}$$

, ahol t_x a csúcs migrációs (retenciós) ideje, t_0 (holtidő, CE-nél eof vándorlási ideje)

5.5 Tailing faktor

A csúcs elnyúló asszimetriájának (tailing) jellemzésére szolgál

$$t_f = \frac{W_{5,0}}{2t_w}$$

, ahol t_w a csúcs eleje és a migrációs idő közötti idő a csúcsmagasság 5%-ánál mérve; $W_{5,0}$ pedig a csúcsszélesség a csúcsmagasság 5%-ánál mérve (perc).

5.6 Elméleti tényérszám

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_B} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{50}} \right)^2$$

, ahol W_B az alapvonalon mért csúcsszélesség.

5.7 Felbontás

$$R = \frac{2(t_{R(b)} - t_{R(a)})}{W_{B(b)} + W_{B(a)}}$$

, ahol az a csúcs migrációs ideje ($t_{R(a)}$) kisebb, mint a b csúcs migrációs ideje ($t_{R(b)}$).

KIEGÉSZÍTÉS A MÉRÉSI EREDMÉNYEK ELOSZLÁSÁNAK STATISZTIKAI JELLEMZÉSÉHEZ

A valódi érték és a mérési eredmény közötti kapcsolat megvilágítására vezették be a mérési hiba fogalmát. Az analitikai kémiai mérések során fellépő mérési hiba kétféle - az ún. módszeres (szisztematikus) és az ún. véletlen - hiba összegeződésékként adódik. A *véletlen hibák* a mérések korlátozott pontosságából erednek. A véletlen hiba mértéke a mérések többszöri ismétlésével csökkenhet. A *módszeres hiba* a mérési hiba egy állandó arányú része (állandó hiba). Ez a hiba nem csökkenthető a mérések többszöri ismétlésével. A módszeres hiba megállapításához standardokat kell elemezni, így módon a későbbi elemzések korrigálhatók.

Tegyük fel, hogy egy mérési sor eredményeit (pl. párhuzamos spektrofotometriás méréseket, lásd 1. táblázat) csak véletlen hiba terhel, és ábrázoljuk a mérési adatoknak 12 előre meghatározott intervallumra eső gyakoriságát (lásd 2. táblázat). A párhuzamos mérési eredmények grafikus

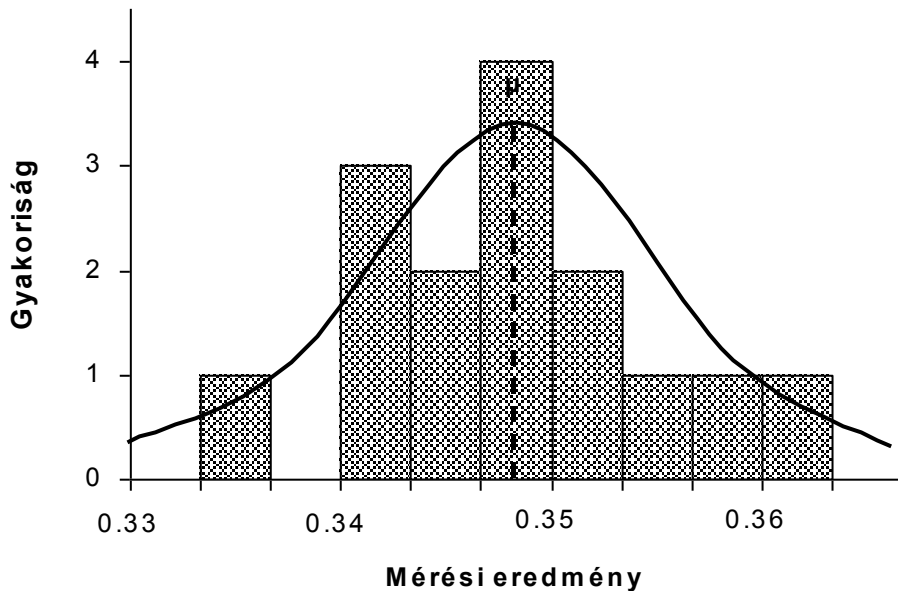
eloszlási diagramjának megrajzolásával információt nyerhetünk a mérési eredmények eloszlásáról (lásd 21. ábra).

1. táblázat: Egy mintaoldat 15 ismétléssel kapott eredményei (abszorbancia értékek)

Mérés	Érték	Mérés	Érték
1.	0,3410	9.	0,3430
2.	0,3350	10.	0,3420
3.	0,3470	11.	0,3560
4.	0,3590	12.	0,3500
5.	0,3530	13.	0,3630
6.	0,3460	14.	0,3530
7.	0,3470	15.	0,3480
8.	0,3460		

2. táblázat: Mérési eredmények eloszlási gyakorisága (mérési adatokat lásd az 1. táblázatban)

Tartomány	Gyakoriság	Relatív gyakoriság (%)
0,3300-0,3333	0	0
0,3333-0,3367	1	6,67
0,3367-0,3400	0	0
0,3400-0,3433	3	20,00
0,3433-0,3467	2	13,33
0,3467-0,3500	4	26,67
0,3500-0,3533	2	13,33
0,3533-0,3567	1	6,67
0,3567-0,3600	1	6,67
0,3600-0,3633	1	6,67
0,3633-0,3667	0	0
0,3667-0,3700	0	0



2

1. ábra: A 2. táblázatban szereplő mérési adatok eloszlási diagramja és az elméleti Gauss-féle eloszlást reprezentáló görbe

Ha a mérések számát a végtelenségig növeljük, az intervallumok nagyságát pedig ezzel párhuzamosan csökkentjük, akkor egy harang alakú eloszlási görbét kapunk, amelyet Gauss- vagy normális eloszlású görbének neveznek. A Gauss-féle eloszlás matematikailag a következőképpen fejezhető ki:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

ahol

$f(x)$ a normális eloszlás eloszlásfüggvénye

σ a mérések standard deviációja

μ a mérések átlaga

x az adott mérési eredmény (változó)

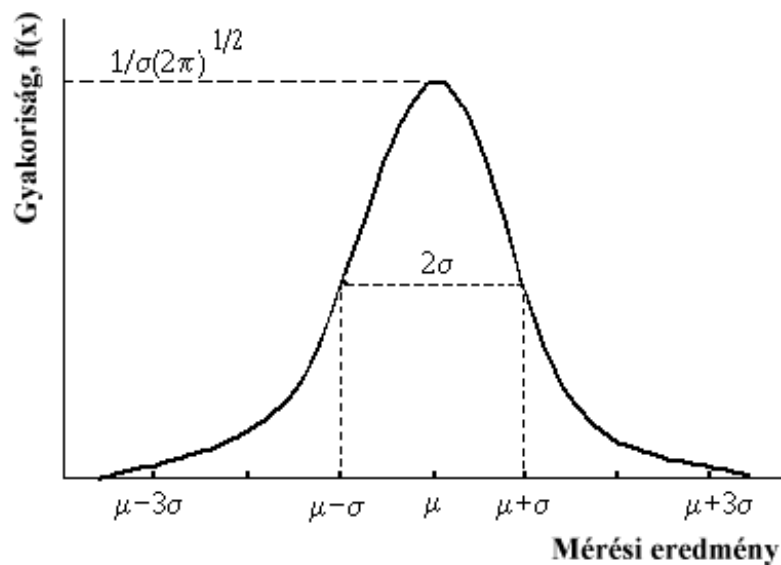
A mérési adatok szóródását az átlag érték körül a standard deviáció (σ) és annak négyzete a variancia (σ^2) írja le (22. ábra). Mivel azonban a valóságban csak véges számú méréseket tudunk elvégezni, az átlagot és a standard deviációt meg kell becsülnünk. A becsült paramétereket tartalmazó Gauss-féle eloszlás így módon a következőképpen alakul:

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2s^2}}$$

ahol

s a standard deviáció becsült (legvalószínűbb) értéke

\bar{x} az átlag becsült (legvalószínűbb) értéke



22. ábra: A Gauss-féle eloszlás valószínűségi sűrűségfüggvénye (μ : az átlag, σ : a standard deviáció)

A mérés legvalószínűbb értékéül az n mérési adat \bar{x} számtani közepét fogadjuk el:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

A standard deviáció becsléséhez pedig az alábbi egyenletet használhatjuk:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

A standard deviáció mellett a mérési pontok szórásának jellemzésére gyakran használják a relatív standard deviációt (s_r):

$$s_r(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

A standard hibán az n mérés átlagának átlagos hibáját értjük:

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Az analitikus célja a valódi érték minél jobb becslése. Azt már megállapítottuk, hogy ha nem lép fel módszeres hiba, akkor a mintaátlaggal becsüljük a valódi értéket. Azt is tudjuk már, hogyha normális eloszlásúnak tekinthető a mérési eredményünk, akkor a mintaátlaggal történő becslés "jó" becslés lesz. Kihhasználva azonban azt a feltételezést, hogy az eredmény eloszlása normális, ennél többet is tehetünk, meg tudunk adni egy intervallumot (megbízhatósági- vagy konfidenciaintervallumot) az átlag érték körül, amelyben adott valószínűséggel ($1-\alpha$) ott lesz a keresett valódi érték. A konfidenciaintervallum kiszámításához a Student-eloszlás t -értéke a mérések száma ($n-1$) és a valószínűségi szint ($1-\alpha$) alapján meghatározható, vagy táblázatokból kikereshető. Az átlagra vonatkozó konfidencia-intervallum:

$$\Delta x = \frac{t_{(1-\alpha; n-1)} \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Vagyis, ha a mérési eredményekről feltételezhető, hogy normális eloszlású, továbbá, hogy nem terheli módszeres hiba, akkor statisztikai szempontból a párhuzamos mérések eredményeként egy

$$\bar{x} \pm \Delta x$$

intervallumot kell megadni, és azt állíthatjuk, hogy $1-\alpha$ valószínűséggel ezen intervallumban helyezkedik el a keresett valódi érték (az intervallum megadáskor fel kell tüntetni α és n értékét is).

GRAFITKEMENCÉS ATOMABSZORPCIÓS SPEKTROMETRIA

1. BEVEZETÉS

A kémiai analízis optikai módszerei nagy módszer családot alkotnak. Közös jellemzőjük, hogy a vizsgálati anyag és az optikai sugárzás (fény) valamilyen kölcsönhatását használják fel az anyagösszetétel megállapítására. Optikai sugárzásnak nevezzük az elektromágneses sugárzás azon részét, amely a fizikai optika eszközeivel és módszereivel vizsgálható. Az optikai módszerek egyik csoportjában a fényt nem bontjuk fel hullámhossz szerint (pl. refraktometria, polarimetria). Az optikai módszerek másik csoportjában azonban a fény hullámhossz szerinti felbontására is sor kerül, ezeket összefoglalóan *optikai spektroszkópiai módszerek*nek nevezzük. Mi most csak az utóbbi módszerekkel kívánunk foglalkozni. Az optikai spektroszkópiai módszereket két fő csoportra oszthatjuk: az *atomspektroszkópiai* és a *molekulaspektroszkópiai* módszerekre. Ezt a felosztást analitikai szempontból az indokolja, hogy az előbbi módszerekkel az anyagok elemi összetétele, az utóbbiakkal pedig a molekulaösszetétel határozható meg. Az ilyen felosztásnak további alapja az is, hogy a kétféle módszer csoportnak meglehetősen eltér az elméleti ismeretanyaga.

2. AZ ATOMSPEKTROSKÓPIA KIALAKULÁSA

Lángszínezést *Marggraf* már 1758-ban alkalmazott a nátrium- és a káliumsók megkülönböztetésére. A 18. század végétől az atomok spektrumának vizsgálata a fizikusok érdeklődését is erősen lekötötte. *Wollaston* 1802-ben figyelt fel arra, hogy a Nap spektrumában fekete vonalak észlelhetők, de ennek a jelenségnek nem tulajdonított különösebb jelentőséget, és nem is foglalkozott vele részletesen. Ezeket a vonalakat ma *Fraunhofer*-féle vonalaknak nevezzük. *Fraunhofer* építette az első mai értelemben vett spektroszkópot, és 1815-től kezdve részletesen vizsgálta a Nap spektrumában észlelhető vonalakat. Mintegy 576 vonalat ismert fel. Ezeket a vonalakat az A, B, C, D, E ... a, b, c, d, e ... betűkkel jelölte. (Ebből a jelölésből maradt ránk például a nátrium közismert sárga vonalának nátrium-D elnevezése.) *Fraunhofer* arra is rájött, hogy az alkohol lángjába

helyezett nátrium spektrumában ugyanott jelenik meg a sárga D-vonal, ahol a Nap színeképében ez a vonal hiányzik. *Herschel* 1822-ben már megállapította, hogy a lángba helyezett különböző sók spektrumának vizsgálata módot ad arra, hogy az anyagot egyértelműen fel lehessen ismerni. Tulajdonképpen ezzel vette kezdetét a spektrálanalízis.

Bunsen az ásványvizek sóinak elemzésére szintén a lángszínezést használta fel. A Bunsen-égőt abból a célból fejlesztette ki, hogy színtelen gázlánggal tudjon vizsgálni. (Bunsen újítása abban volt, hogy levegőt vezetett az éghető gázhoz, mielőtt az égni kezdett.) *Kirchhoff* és *Bunsen* 1859-ben megjelent közös cikke nagy lendületet adott a különböző anyagok spektrumának vizsgálatához, mivel megadták a spektrumra vonatkozó addigi ismeretek értelmezését: ha az egyes gázok vagy gőzök atomjaival energiát közlünk, akkor azok rájuk jellemző vonalas spektrumot bocsátanak ki. Ugyanezek az atomok viszont képesek a kibocsátott fény hullámhosszával egyező hullámhosszal rendelkező fényt elnyelni. Így jelennek meg az izzó szilárd testek és nagynyomású gázok által kibocsátott folytonos színeképben az abszorpciós vonalak (Fraunhofer-féle vonalak a Nap színeképében).

1928-ban készítette el *Lundegardh* azt a lángspektrográfot, mely alkalmas volt az elemek nemcsak minőségi, de mennyiségi meghatározására is. Összekapcsolta illetve továbbfejlesztette a már előtte is ismert porlasztási technikát, acetilén-levegő lángot és spektrográfiát. A fotoelektronsokszorozók megalkotása után (Bay Zoltán, 1938) az 1950-es években megjelentek az első fotoelektromos detektálási rendszerű emissziós spektrométerek. Az első (lángtechnikás) atomabszorpciós spektrofotométert az ausztrál *Walsh* és munkatársai építették meg 1957-ben. A grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria alapjait pedig *L'vov* és *Massmann* dolgozta ki a 60-as évek végén.

Előnyös tulajdonságai – elsősorban kis (jó) kimutatási határainak, kis mintaigényüknek és automatizálhatóságuknak köszönhetően a GFAAS spektrométerek joggal váltak az elmúlt egy-két évtizedben az atomspektroszkópia egyik legelterjedtebb nyomanalitikai eszközévé. Ma ezeket a berendezéseket széles körben alkalmazzák fémek nyomnyi mennyiségének meghatározására elsősorban olyan esetekben, ahol elemeket (főleg fémeket) igen kis koncentrációban kell meghatározni.

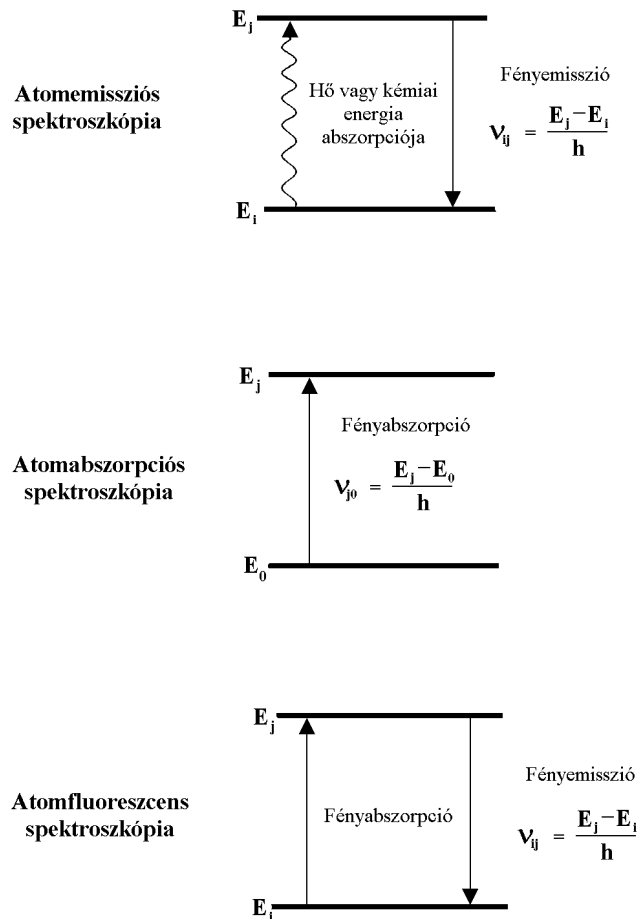
3. ATOMSPEKTROMETRIÁS MÓDSZEREK

Az atomspektrometria három alapvető módszert foglal magába (1. ábra). Amennyiben gerjesztett molekulák, gerjesztett atomok, esetleg gerjesztett

ionok által kisugárzott molekulasávok illetve atom- és ionvonalak intenzitását mérjük, *atomemissziós spektrometriáról* (AES) beszélünk.

Ha az atomizáló cellán olyan hullámhosszúságú fénynyalábot bocsátunk keresztül, melyet az alapállapotú atom képes abszorbeálni, és mérjük az így bekövetkezett fényintenzitás-csökkenést, akkor *atomabszorpciós spektrometriáról* (AAS) van szó.

Ha az alapállapotú atomokat ugyancsak külső fénnel sugározzuk be, de nem a részecskék által abszorbeált, hanem az abszorpciót követően adott hullámhosszon kisugárzott vonalak intenzitását mérjük, akkor ez a módszer az *atomfluoreszcens spektrometria* (AFS).



1. ábra: Az AES, AAS és AFS módszerek elve

A három módszer közül nagy jelentősége van az atomabszorpciós spektrometriának van. Az alkalmazott atomizálási technika alapján kétféle módszert: a *lángatomabszorpciós* (FAAS, lásd. Lángspektrometria silabusz), illetve a kis mintaigényű, érzékeny elektrotermikus atomizáló módszert, a *grafitkemencés atomabszorpciós spektrometriát* (GFAAS) különböztetjük meg.

Az újabb atomspektrométerekben a fény felbontását végző egység (monokromátor) a diffrakciós rács, a fény detektálása pedig fotoelektronsokszorozóval történik. A spektrométerek jelkiolvasó/kijelző egységei nagyon különbözőek lehetnek (analóg vagy digitális kijelzők, grafikus "rekorderek") de az újabb készülékek szinte mindegyike számítógépes jelfeldolgozást és kijelzést alkalmaz.

4. A GRAFITKEMENCÉS ATOMABSORPCIÓS SPEKTROMETRIA

Az atomabszorpciós módszer alapállapotú, szabad atomok fényelnyelésének mérésén alapuló mennyiségi analitikai eljárás. Az alapállapotú atomok elektromágneses sugárzás (fény) hatására gerjesztődnek (elektrongerjesztés), miközben a gerjesztési energiának megfelelő hullámhosszúságú fotont elnyelnek. Az atomok abszorpciós spektruma (amint az emissziós spektruma is) vonalas szerkezetű, a vonalak pontosan meghatározott hullámhossznál jelentkeznek és nagyon kicsi, megközelítőleg 0,001 nm a félértékszélességük. Az atomok ilyen típusú abszorpciós spektruma adja az atomabszorpciós módszer nagy szelektivitását. Egy adott elem legjobb vonalának hullámhosszán a többi atom elnyelésének nagyon kicsi a valószínűsége, ez azt eredményezi, hogy összetett, sok elemet tartalmazó rendszerek is elemezhetők az elemek kémiai elválasztása nélkül. Ez a lehetőség nagy előnyt jelent a molekulák fényelnyelésének mérésén alapuló spektrometriás módszerekkel szemben, ahol a sávós abszorpció következtében nagy az optikai zavarás valószínűsége és általában csak elválasztási módszerek alkalmazásával lehet összetett rendszereket elemezni.

Az atomabszorpciós módszer az atomforrásban kialakuló szabad atomok koncentrációját méri. Az elemzendő fém vonalán észlelt fényintenzitás csökkenés és a fém szabad atom koncentrációja közötti összefüggés a Lambert-Beer törvénnyel írható le.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot c \cdot l$$

ahol A = abszorbancia

I_0 = a fény intenzitása az abszorpció előtt
 I = a fény intenzitása az abszorpció után
 a = abszorpciós koefficiens (anyagi minőségtől függő állandó)
 c = az atomizáló tér (láng) egységnyi térfogatában levő alapállapotú, szabad atomok száma
 l = az az úthossz, amit a sugárnyaláb az atomizáló térben megtesz

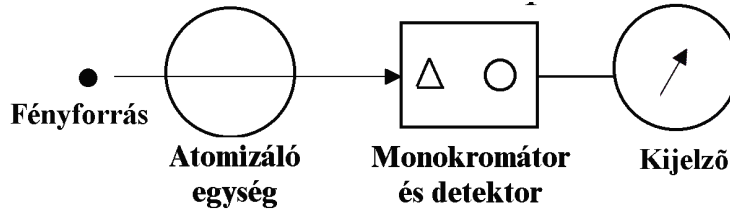
Az abszorbanca tehát lineáris összefüggésben van a térfogategységben jelenlevő alapállapotú, szabad atomok számával. A képződő alapállapotú atomok száma pedig arányos a megfelelő oldatkoncentrációval. Kétszer akkora oldatkoncentráció kétszer akkora alapállapotú atomkoncentrációt szolgáltat az atomizálótérbe. (A helyes elemzés további feltétele persze, hogy a kalibráló oldat és a mintaoldat mintabeviteli és atomizációs körülményei azonosak legyenek.)

Magas hőmérsékleten az atomok egy része gerjesztődik, sőt egy része ionizálódik is. A statisztikus mechanika szerint az alap- és gerjesztett állapotban levő atomok számának aránya a hőmérséklet függvényében a következő összefüggés szerint változik:

$$\frac{N_q}{N_0} = \frac{g_q}{g_0} e^{-\frac{h\nu}{kT}}$$

ahol N_q a gerjesztett, N_0 az alapállapotban levő atomok száma; g_q és g_0 a kétféle állapothoz tartozó statisztikus súly; k a Boltzmann-állandó; T az abszolút hőmérséklet.

Az egyenlet alapján kiszámítható a gerjesztett és az alapállapotban levő atomok számaránya 2000-3000°C-on, s megállapítható, hogy a gerjesztett atomok száma elhanyagolhatóan kicsi az alapállapotban levő atomokéhoz képest. Ez kedvező körülmény az atomabszorpciós mérések szempontjából. Ahhoz, hogy atomabszorpciós méréseket végezhessünk, a mérendő elem karakterisztikus, éles vonalas színeképét létrehozó sugárforrás fényét át kell bocsátani az atomizáló egységen (grafitkemencén). A színeképnek azt a szűk tartományát, amelyben az elem rezonanciavonala van, monokromátorral választjuk el a színekép többi részétől. A kiválasztott rezonanciavonal a fényérzékelő detektorba (pl. fotoelektron-sokszorozóba) jut, amelynek kimenő jelét erősítik. Az atomabszorpciós spektrométer elvi felépítése a 2. ábrán látható.



2. ábra: Az atomspektrometriás módszerekhez használt készülékek elve

A grafitkemencés atomabszorpciós (graphite furnace-AAS, GFAAS) spektrométerek felépítése hasonlít az FAAS készülékekére azzal a jelentős különbséggel, hogy az atomforrás itt egy programozott hevítésű grafitkemence, amelynek működése egy grafitból készült, cső alakú mintatartó elektromos árammal való felizzításán alapul. A grafitkemence elektródáit vízhűtéssel látják el a gyors lehűtés és gyors mintacsere érdekében, a csövet pedig kívülről és belülről is egy lassú inert gázáramlással (argon) védik a levegőn való oxidációtól. A grafitcsőbe annak felső részén egy nyíláson keresztül, mikropipettával vagy automata mintaadagolóval juttathatjuk be a mintaoldatot.

Amikor a felizzó grafitcső belsejében bekövetkezik a kis térfogatú (5-40 μl) minta bomlása és atomizációja, a keletkező atomos gőzök távozása csak a csővégek felé áramolva valósulhat meg, ami a cső hosszában haladó optikai útban relatíve hosszú tartózkodási időt eredményez. Elsősorban ennek, valamint a gyakorlatilag 100%-os hatékonyságú mintabevitelnek köszönhetően a grafitkemence atomforrással megvalósított AAS mérések 2-3 nagyságrenddel kisebb kimutatási határokat biztosítanak (ppb tartomány), mint a lángatomabszorpciós mérések. A mért jel szórása a kis mintamennyiség miatt ugyanakkor lényegesen magasabb (1-10% RSD).

A fűtési program, amelynek teljes hossza általában mintegy 2-5 perc, legalább négy szakaszból áll: szárítás, hamvasztás, atomizálás és tisztítás.

A szárítási szakasz célja az oldószer eltávolítása úgy, hogy a visszamaradó szilárd minta helyzete a kemencében mindig azonos legyen. Vizes oldatok esetén a szárítási szakasz hőmérséklete 105-110°C, míg szerves oldószereknél kb. 5°-kal haladja meg az oldószer forráspontját. A szárítás állandó hőmérsékleten is végrehajtható, de koncentrált oldatoknál, biológiai folyadékoknál célszerű a kemencét lassan, 1-5°C/perc sebességgel felfűteni. Fontos, hogy a mintacsepp mérete a szárítás alatt lassan csökkenjen, mert az

esetleges szétfröccsenése a minta geometriai helyzetét reprodukálhatatlanná teszi.

A hasonlóan viszonylag hosszú hamvasztási (pirolizálás) lépés célja a már oldószermentes szilárd minta előkészítése az atomizálásra. Ebben a szakaszban a kemence hőmérsékletét (kb. 300-1000 °C) úgy kell megválasztani, hogy a vizsgálandó elem még ne párologjon, ugyanakkor a mátrixelemek minél nagyobb része elpárologjon. Ebben a szakaszban a minta szervesanyag-tartalma elbomlik, ami azért fontos, mert az ebből származó illékony molekulák és szemcsék jelentős nonspecifikus abszorpciót produkálhatnak a mérés (atomizációs szakasz) során. Ennek a lépésnek az időtartamát természetesen a mérendő elem illékonyságához kell méretezni, hogy elkerüljük a korai elpárolgásból származó veszteségeket. Az időtartam néhányszor tíz másodperctől akár néhányszor tíz percig is tarthat. A kemence fűtésének sebessége is fontos lehet. A mátrixanyagok túl gyors, heves eltávolítása a meghatározandó elem veszteségét okozza. E veszteségek kiküszöbölésére ún. mátrixmódosító anyagokat adnak a mintához (ezeket az adalékokat részletesebben a Zavaró hatások fejezetben tárgyaljuk).

A gyors, néhány másodperces atomizációs lépésben (1500-2500 °C) következik be a minta maradékának teljes lebomlása, elpárolgása és atomizációja, és ezen lépés során mérjük az atomabszorpciós jelet is.

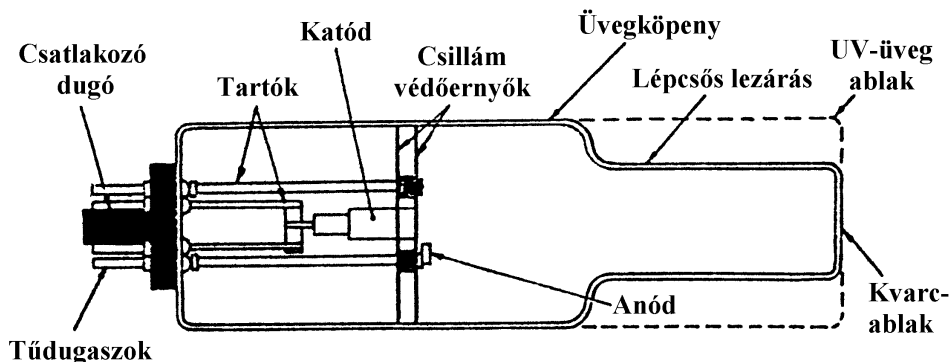
Az utolsó, legnagyobb hőmérsékletű tisztító szakaszban rövid időre a lehető legnagyobb hőmérsékletre (kb 3000°C-ra) hevítjük fel a kemencét a mintamaradványok eltávolítása, az esetleg a következő mérésnél jelentkező memóriahatás kizárása érdekében.

1. táblázat: Néhány elem ajánlott hamvasztási és atomizálási hőmérséklete

Elem	Maximális hamvasztási hőmérséklet, °C	Atomizálási hőmérséklet, °C
Ag	550	2200
Al	1500	2600
B	1300	2600
Ca	1100	2600
Cu	850	2400
Ga	900	1800
Fe	1100	2000
Mg	1100	2600
Mn	1000	2500
Na	1100	2000
Ni	1000	2600
K	1000	2500
Pb	750	1400
Si	1300	2600
Sn	800	2400
Zn	500	1400

4.1 Üregkatódlámpa

Az atomabszorpciós méréshez olyan fényforrásra van szükség, amely intenzív vonalas spektrumot ad, és az emittált vonalak félértékszélessége csekély. Ilyen fényforrás az *üregkatódlámpa*, mely egy speciális kisülési cső. A katód a meghatározandó elemből készült, hengeres alakú test. A kisülés a katód és anód közé kapcsolt kb. 300-400 V feszültség hatására jön létre a katód elektronemissziója révén. Az elektromos erőterben felgyorsuló elektronok a nemesgáz töltőgáz lavinaszerű ionizációját idézik elő. A nagy sebességgel mozgó nemesgáz ionok becsapódnak a katód felületére és fématomokat szakítanak ki a katódból (katódporlasztás). Így keletkeznek a meghatározandó elem szabad atomjai, melyek a nagysebességű nemesgáz ionokkal ütközve gerjesztődnek és az elemre jellemző vonalas spektrumot emittálnak. Az üregkatódlámpák általában egyelemesek, tehát minden újabb elem meghatározásánál cserélnünk kell a fényforrást.

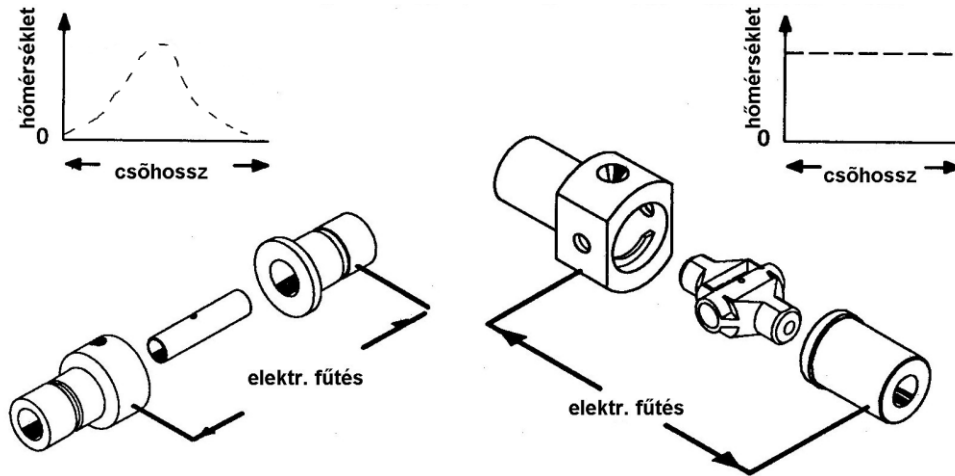


3. ábra: Az üreghatólámpa felépítése

Az atomabszorpciós spektrometriás módszerrel minden olyan elem meghatározható, amelynek rezonanciavonala a spektrum azon területére esik, amelyet a spektrofotométerrel mérni lehet, és amely atomos állapotba hozható az abszorpciós térben. A legtöbb készülék az UV és látható (190-800 nm) tartományban használható. A nemesgázok, halogének és C, H, N, O, S, P nem határozható meg, mivel ezek rezonanciavonala 190 nm-nél kisebb.

4.2 Grafitkemence

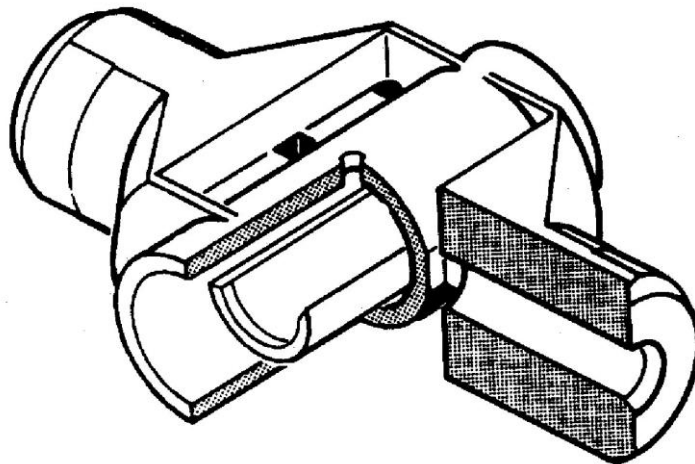
A minta atomizálása, azaz az alapállapotú, szabad atomok előállítása a nagy hőmérsékletre fűtött grafitkemencében történik. A grafitkemencét a megfelelő hőmérsékletre elektromos áram segítségével jól szabályozható módon fűthetjük fel. Az első ilyen elektrotermikus grafitkemence típusokat *L'vov* és *Massmann* az 1960-as években dolgozta ki. Az első kemencék hátránya a csövek hosszában jelentkező egyenetlen hőmérsékleteloszlás (a csövek végeihez illeszkedő érintkezőket a szállított nagy elektromos teljesítmény miatt hűteni kell). Különösen jelentősek voltak a Massmann-típusú kemencében tapasztalt zavaróhatások, memóriahatások, mivel a nehezebben atomizálódó elemek és matrixanyagok az alacsonyabb hőmérsékletű csővégeknél kondenzálódtak. A probléma megoldása érdekében később olyan kemencét konstruáltak, amelynél a csövet a cső teljes hosszában fűtötték (keresztfűtéses kemence), és így a hőmérsékleteloszlás teljesen egyenletes (4. ábra).



4. ábra: Hőmérsékleteloszlás
Massmann típusú kemencében

Hőmérsékleteloszlás keresztfűtésű
kemencében

A mai modern grafitkemencék belsejében egy ún. L'vov-feltét is található. A mintát erre a lapkára kell bejuttatni. Ez a pirolitikus grafitlapka (lásd. 5. ábra) késlelteti a minta atomizációját (kis késéssel melegszik fel a kemence falához képest), hogy a grafitcső és az inert gáz hőmérséklete állandósuljon. Így a minta elpárolgása és atomizációja már a kívánatos, nagy hőmérsékletű térben történik. A keresztfűtéses kemencékben olyan integrált L'vov-feltét található, melynek fűtése kizárólag hőszigeteléssel történik.



5. ábra: A keresztfűtéses, integrált L'vov feltétet is tartalmazó grafitkemence metszeti rajza

A grafitkemence az egymást követő mérések között vízhűtéssel hűthető le gyorsan szobahőmérsékletre. A grafitkemencében történő elemzéseknél a minta atomizációja során inert környezetet kell biztosítani (levegőn az izzó grafitcső elégne!), ezért inert gázzal (többnyire argonnal) kell folyamatosan öblíteni a grafitkemence belsejét és környezetét.

A modern készülékek automata mintaadagolója kényelmesebbé és pontosabbá teszi a méréseket. A néhány mikroliternyi folyadékminta pipettázása egy kis, sötét nyíláson keresztül nehéz, és függ a bemérő személy gyakorlottságától. A mérési eredmények pontossága nemcsak a beadagolt térfogattól, de a kemencébe került folyadéksepp pozíciójától is függ.

4.3 Háttérkorrekció

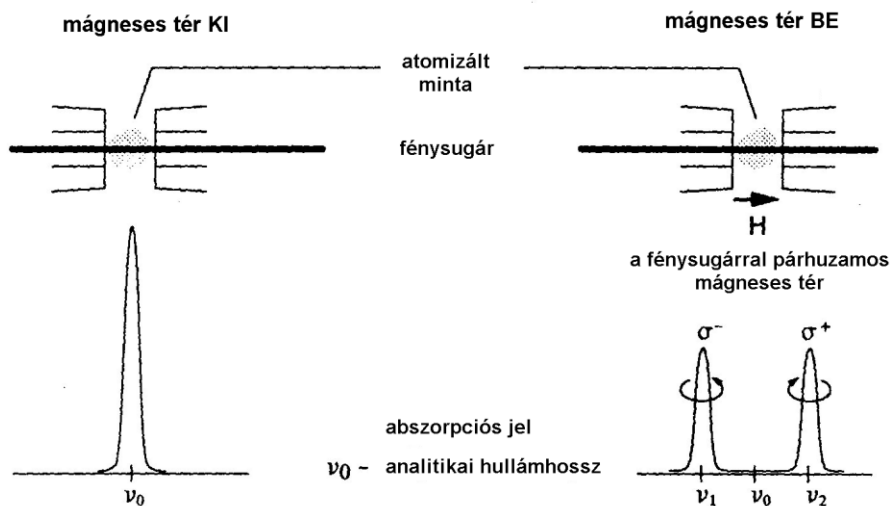
Míg az atomemissziós módszernél az optikai rendszert az bonyolítja, hogy a számos emissziós vonalat egymástól el kell különíteni, addig az atomabszorpció mérését az nehezíti, hogy két eltérő jel (I_0 és I) különbségét (hányadosát) kell mérni. Az AAS spektrométerek optikai rendszerének felépítését tovább bonyolítja, hogy ún. háttérkorrekciós módszereket is alkalmazni kell annak érdekében, hogy a specifikus (atomoktól származó) és

a nem specifikus (nem atomoktól, hanem pl. szerves molekuláktól, koromszemcséktől származó) abszorpciót is el lehessen különíteni.

A háttérkorrekciós rendszer méri a háttér abszorpciós jelet, kivonja azt a teljes abszorpciós jelből, és így megkapjuk a korigált jelet. Leggyakrabban folytonos fényforrású (többnyire deutériumlámpás) háttérkorrekciós vagy újabban a Zeeman-effektuson alapuló háttérkorrekciós rendszereket használják. A *Zeeman-effektuson alapuló háttérkorrekció* alapja, hogy az atomok abszorpciós vagy emissziós vonalai nagy mágneses térben felhasadnak 3 vagy több polarizált komponensre, mivel az atomi elektronenergia-szintek is felhasadnak. Legegyszerűbb esetben a felhasadás 3 színeképvonalat eredményez: a p-komponenst az eredeti hullámhossznál, és a s^+ és s^- komponenseket az eredeti vonal két oldalán szimmetrikusan eltolódva. Az eltolódás mértéke a mágneses tér nagyságától függ, és a jelenséget Zeeman-effektusnak nevezik. Mivel a jelenség csak atomi részecskéknél lép fel, jól felhasználható az atomoktól és a nem atomoktól származó abszorpciós (háttérabszorpciós) jelek elkülönítésére.

A Perkin Elmer Zeeman spektrométerekben kb. 0,9 tesla erősségű mágneses teret alkalmaznak, mely nagyjából 0,01 nm-re tolja el a színeképvonalakat az eredeti hullámhossztól. A lineárisan polarizált p-komponens iránya, míg a körkörösen (ellentétes irányokban) polarizált s-komponensek forgási tengelye a mágneses térrel párhuzamos.

A leggyakrabban a háttérkorrekciós rendszer elrendezése olyan, hogy a mágneses tér és a fénysugár iránya párhuzamos, ilyenkor csak a két eltolódott vonal érzékelhető. Az el nem tolódott p-komponens azért nem látható, mert az elektromos vektor iránya az analitikai fénysugár tengelyébe esik (egy elektromágneses hullám nem terjedhet az elektromos vektorának irányába). Az analitikai hullámhosszon mért jel a mérendő atomtól származó abszorbancia és a háttérabszorbancia összege, míg a mágneses tér bekapcsolásakor (Zeeman-effektusnak köszönhető vonalfelhasadásakor) az analitikai hullámhossznál csak a háttérabszorbancia mérhető. Ily módon a kapott abszorpciós jelből a háttérjel kivonható.



6. ábra: Zeeman-hatáson alapuló háttérkorrekciós rendszer alkalmazásával kapott analitikai jelek

4.4 A fény felbontása

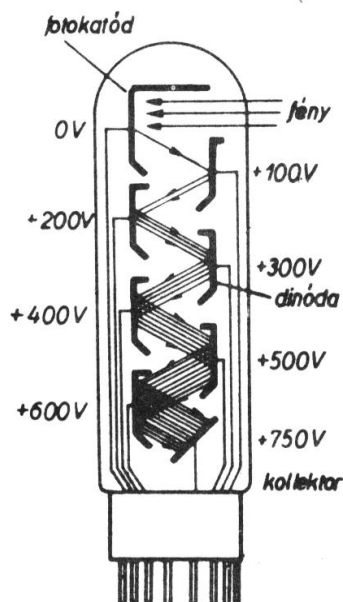
A grafitkemencét elhagyó fényt megfelelő optikai berendezésen keresztül vezetjük a detektáló egységhez. Optikai berendezés segítségével igyekszünk a zavaró sugárzásokat kiiktatni, s csupán a vizsgált fémre jellemző, közel monokromatikus fénysugarat engedjük a detektorba jutni. Míg korábban különböző *színszűrőkkel* igyekeztek megoldani ezt a feladatot, ma már gyakorlatilag csak *monokromátorok*at használnak. A monokromátorok kb. 0,01-1 nm szélességű keskeny hullámhossz-tartományt képesek elkülöníteni egy széles (190-800 nm) színtartományon belül. A monokromátorok fő alkotórésze a GFAAS technikánál az *optikai (diffrációs) rács*. A vizsgálathoz szükséges hullámhosszt a rács mozdításával választják ki. Az optikai rács alaptípusai: a) síkrács lencsékkel vagy tükrökkel kombinálva (pl. Czerny-Turner- vagy Ebert-elrendezés), b) konkáv rács (pl. Paschen-Runge-elrendezés), c) prizma és rács kombinációja. A rés szélességének növelésével a fényintenzitás ugyan nő, de a felbontás csökken.

Az *optikai rács* olyan üveg-, kvarc- vagy tükröző (ún. echelette karcolással készített) fémfelület, amely a különböző hullámhosszú sugarakat különbözőképpen téríti el. Az egyes hullámhosszaknak, vagyis a színeknek más és más irányba eső éles vonalak felelnek meg, azaz a rács - akár a prizma - színekre bontja a fényt.

4.5 Detektor

A monokromátoron keresztüljutott fény erősségét különböző mérőműszerekkel mérhetjük. A lángfotometriás módszerek kialakulásának első éveiben használatos fotográfias fénymérés a gyakorlatból mára már teljesen kiszorult, helyettük manapság kizárólag fotocellát vagy fotoelektron-sokszorozót alkalmaznak. A *fotoelektron-sokszorozók* erősítési faktora (az anódra érkező elektronok száma osztva a katódot elhagyó elektronok számával) a 10^{10} értéket is elérheti. Ez azt jelenti, hogy elektronsokszorozóval olyan kis intenzitású fény is észlelhető, amely a legérzékenyebb fotográfiai emulzió is csak több órás expozíció esetén hoz létre mérhető feketedést.

A fotoelektron-sokszorozók működésének elve az, hogy a fotokatódra érkező fotonok külső fényelektromos hatással elektronokat váltanak ki, amelyek a katód és a D1 dinód közötti feszültségesés hatására a dinód felé áramlanak. A D1 dinód felületén a beeső elektronok szekunder elektronemissziót hoznak létre, amelynek intenzitása nagyobb, mint a primer elektronáramé. Ez a folyamat a következő dinódokon (D2-D7) megismétlődik. Az elektronok száma exponenciálisan növekszik a dinódák számával (7. ábra).



7. ábra: Fotoelektron-sokszorozós detektáló rendszer vázlatja

Újabban elterjedőben vannak más, félvezető alapú elektromos detektorok is az atomspektroszkópiában. Ezek a pl. digitális kamerákban is használt, lapka alakú mikroelektronikai eszközök a töltéscsatolás vagy töltésinjekció (CCD, CID) elvét alkalmazzák. Több millió apró cellára osztott felületük minden egysége egy-egy, számítógéppel kiolvasható memóriacellának tekinthető. Megfelelő optikával kiegészítve kétdimenziós kialakításuk különösen alkalmassá teszi őket a teljes mérhető spektrumtartomány gyors, nagy felbontású elektronikus rögzítésére.

5. ZAVARÓHATÁSOK

A gyakorlatban, többkomponensű valós mintákon kivitelezett mérések során természetesen nem csak a tiszta elmélet érvényesül, hanem különböző zavaró hatások is felléphetnek, amelyek az analízis eredményét befolyásolhatják. A zavaró hatások jelentőségét akkor érthetjük meg igazán, ha belegondolunk, hogy atomspektrométereink kalibrálását szinte minden esetben csak a mérendő elemet tartalmazó híg vizes oldattal végezzük, ezzel szemben a mintaoldatok összetétele ismeretlen, de a legritkábban ilyen egyszerű. Könnyen elképzelhető tehát, hogy a minta valamely, a kalibráló

oldattól eltérő fizikai/kémiai jellemzője a mérendő elem azonos koncentrációja esetén is más jelet fog a spektrométerben szolgáltatni, mint a kalibráló oldatban, vagyis a koncentráció meghatározását mérési hiba fogja terhelni. Zavaró hatások jelenlétének kimutatására többféle módszer létezik. Ezek közül a legegyszerűbb eljárás, ha két különböző vonalon és a minta különböző hígításain is elvégezzük a meghatározást. Amennyiben a két vonalon mért koncentráció jelentősen eltér, illetve a koncentráció nem a minta hígításának megfelelően változik, úgy a mérést minden bizonnyal valamilyen interferencia zavarja. A zavaró hatások, amelyek sokfélék lehetnek és az egyes típusok jelentősége műszerenként is eltérő, általában két csoportra oszthatók: a spektrális és nem spektrális zavaró hatások csoportjára.

A spektrális zavaró hatások (ún. additív zavaró hatások) csoportjába a mérendő komponens spektrumvonalának más összetevőktől származó vonalak általi zavarását soroljuk (vonal-átlapolódás). Az ilyen természetű zavaró hatás elsősorban az atomemissziós spektrometriára jellemző, ahol igen nagyszámú vonalból áll a spektrum. Kiküszöbölése megfelelően nagy felbontású spektrométer használatával illetve az adott elem más, nem zavart vonalain való méréssel lehetséges. Mivel az atomabszorpciós mérések nagyon hullámhossz-specifikusak, csak ritkán fordul elő, hogy egy elem abszorpciós jele átlapolódna egy másik elem emissziós vonalával. Ilyen esettel találkozhatunk azonban például akkor, ha vérben szelént mérünk 196,0 nm-en, mivel itt a vasnak is található emissziós vonala (ezt a zavaró hatást a Zeeman-háttérkorrekciós rendszer korrigálni képes).

A grafitkemencés AAS méréseknél jelentkező zavaró hatások abból erednek, hogy a matrixanyagok nem disszociált molekuláris formáinak sávós abszorpciós spektruma van, vagy a mikroszkópikus méretű szilárd szemcséken szóródhat a fény egy széles hullámhossz tartományban. A környezeti és biológiai mintáknak igen nagy a NaCl vagy KCl tartalma, e mintáknál jelentkező zavaró hatásokat mátrixmódosítók mintákhoz adalékolásával és/vagy háttérkorrekciós rendszer alkalmazásával csökkenthetjük. A matrixanyagoktól származó zavarások úgy is csökkenthetők, ha a minta szervesanyag-tartalmát elroncsoljuk, a szervesanyagokat ioncserés vagy extrakciós módszerekkel leválasztjuk a mérendő komponensről.

A nem spektrális zavaró hatások csoportja lényegében a spektrális hatásokon kívül minden olyan más zavaró hatást magában foglal, ami a mért analitikai jel nagyságát befolyásolja; legyen az a mintabeviteli rendszernek a

minta fizikai tulajdonságai miatt megváltozott működése vagy valamilyen, a mintaösszetevők között az atomforrásban lejátszódó kémiai folyamat. A minta teljes elpárolgása miatt a lángspektrometriában létrejövő zavaróhatások közül a kemencében sok nem jelentkezik. Az alábbiakban csak néhány gyakran előforduló típust sorolunk fel.

Kémiai zavaróhatások akkor jelentkeznek, ha a komponensek folyadék- vagy gőzfázisban kémiai reakcióba lépnek a mintában jelen levő más komponensekkel, és így az atomok nem alapállapotban, szabad atomként vannak jelen az atomizálási lépésben.

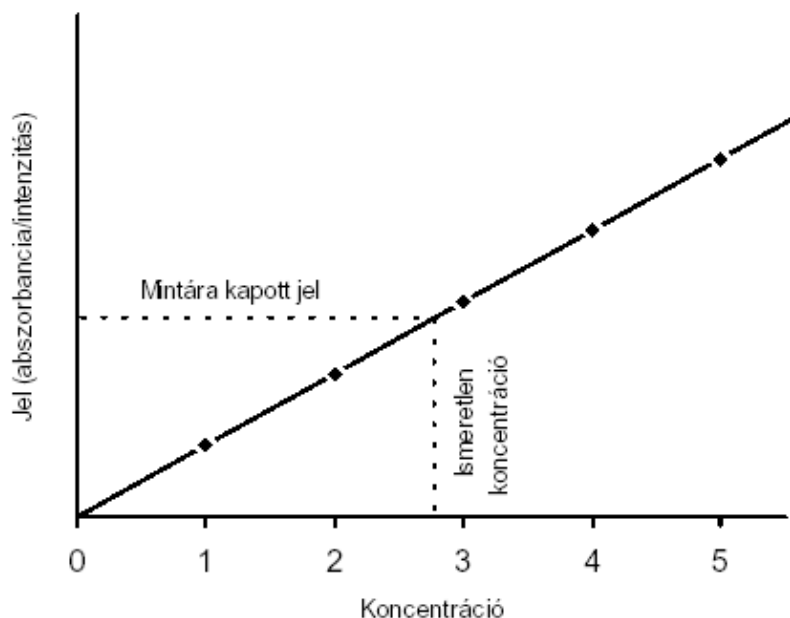
A zavaróhatások egy részéért a mintában jelenlevő mátrixanyagok felelősek, ezek hatását ún. *mátrixmódosító adalékok* alkalmazásával lehet csökkenteni. Ezeket az adalékokat viszonylag nagy koncentrációban adják a mintához, hogy a vizsgálandó elem megfelelő kémiai formába kerüljön a hamvasztási lépésben. Ha egy elem többféle formában (speciesz) van jelen a mintában, akkor több csúcsot is kaphatunk, mivel az egyes formák atomizációs sebessége eltérő. Míg például a klorid fém sók illékonyak, a nitrátok és szulfátok csak magas hőmérsékleten párolognak. A mátrixmódosítók egyetlen formává alakítják a fém-specieszeket, és így csak egyetlen csúcsot kapunk az adott elemre. Más mátrixmódosítók a mátrixanyagokat teszik még illékonyabbá, hogy a hamvasztási lépésben ezen anyagoktól megszabaduljunk, vagy a meghatározandó elemet teszik hőstabilabbá, hogy egy magasabb hamvasztási hőmérsékleten se távozzanak idő előtt (az atomizációs lépést megelőzően) a kemencéből. A leggyakrabban használt mátrixmódosító a palládium vagy a palládium/magnézium-nitrát keverék, lantánsók vagy nikkel.

6. KIÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK

A lángspektrometriában leggyakrabban az összehasonlító és a standard addíciós kiértékelési módszereket használjuk.

Az *összehasonlító módszer* nagyszámú, azonos típusú minta sorozatelemzéséhez alkalmazható. Az összehasonlító oldatsorozat (standardok) a vizsgálandó elemeket növekvő koncentrációban tartalmazza. Emellett a standardok a mintában jelenlevő egyéb komponenseket (kationokat, anionokat, szervesanyagot, oldószert) is tartalmazhatják átlagkoncentrációban. Mivel az így nyert hitelesítő oldatsorozat összetétele körülbelül azonos a mintáéval, a fellépő zavaróhatások is közel azonos mértékűek lesznek. Az oldatsorozat tagjai leggyakrabban egy pontos koncentrációjú törzsoldat megfelelő hígításai.

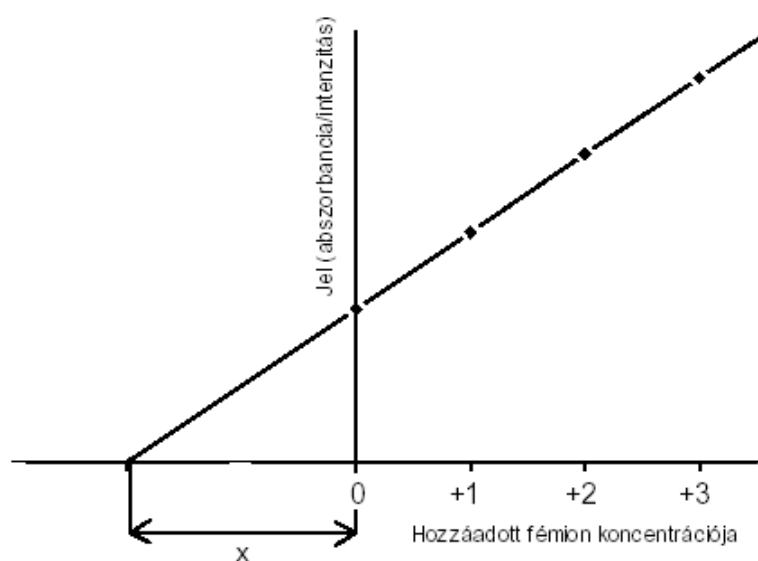
A módszer csak azonos típusú és nem nagyon ingadozó összetételű minták esetén szolgáltat analitikailag megbízható eredményeket. Nagy hibával határoznánk meg pl. kalciumot, ha vérszérumhoz, vízmintához vagy közetből készült oldatokhoz azonos összetételű kalcium hitelesítő oldatsorozatot használnánk. Az említett mintákban nemcsak a kalcium mellett jelenlevő komponensek koncentrációja különbözik szélsőségesen, hanem a fellépő zavaróhatások típusa is más-más lehet. Összehasonlító kiértékelési módszerrel kapott tipikus kalibrációs diagramokat láthatunk a 8. ábrán.



8. ábra: Az összehasonlító kiértékelési módszer

A *standard addíciós módszert* elsősorban az ún. exponenciális zavaróhatások fellépése esetén alkalmazzuk abban az esetben, ha nem tudjuk pontosan a zavaróhatás okát, vagy nem ismerjük a zavaró komponensek minőségét, ill. koncentrációját. A módszer lényege, hogy a mintaoldatot 3-5 egyenlő részre osztjuk. Az egyes részletekhez a vizsgálandó fémion növekvő koncentrációjú részleteit adjuk azonos térfogatban (a különböző mértékű hígulás kiküszöbölése érdekében). Az első részlethez nem adunk fémion tartalmú oldatot, így ez a részlet az eredeti fémion mennyiségét tartalmazza (ez az ismeretlen, az addíciós tagok ún. +0 tagja), a többi tagokhoz ismert növekvő mennyiségű fémion tartalmú oldatot adunk. A kapott értékeket a 9. ábrán látható módon kell ábrázolni. A kapott értékeket (emissziós intenzitás, vagy abszorbancia) összekötő egyenes az origón túl metszi az abszcissa tengelyt. A tengelymetszet és az origótól balra levő távolságot ugyanolyan koncentráció-léptékben ábrázolva, mint a jobb oldalon, a tengelymetszetből megkaphatjuk az ismeretlen minta fémion tartalmát.

A módszer alkalmazhatóságának feltétele, hogy a mérési pontok egyenessel közelíthetők legyenek. A standard addíciós módszernek, azonban sok mintára történő elvégzése a mérést igen munkaigényessé teszi, így sorozatmérésre gyakorlatilag nem alkalmazható. Ugyancsak nehézségbe ütközik a módszer használata, ha a rendelkezésre álló mintaoldat térfogata korlátozott (1-2 mL). Bonyolult (főleg szervesanyag mátrixú) minták esetén azonban gyakran használjuk.



9. ábra: A standard addíció módszere

7. A GYAKORLATON ELVÉGZENDŐ FELADATOK

1. Tejpor réztartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 20 mg/L koncentrációjú Ca^{2+} -törzsoldatból készítsen 15, 30 és 45 $\mu\text{g/L}$ koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba desztillált vízzel. (A hígításhoz használt desztillált víz szolgál majd vakmintaként a méréshez)

Minta: 0,25 g tejporthoz adjon fel kevés desztillált vízben, majd töltse fel 25 mL-re.

Feladat: Adja meg a tejpor réztartalmát mg/g egységben!

2. Tehéntej réztartalmának meghatározása standard addíciós kalibrációs módszerrel

Minta: hígítsa meg tehéntejet 100-szorosára 100 mL mérőlombikba. Az így kapott oldat egy kis részletét fogjuk mintaként ("0 kalibrációs tag") elemezni, a többit felhasználjuk a kalibráló oldatok elkészítéséhez.

Kalibráló oldatsorozat (standard addíciós tagok): A rendelkezésre álló 20 mg/L koncentrációjú Cu^{2+} -törzsoldatból olyan térfogatokat mérjen ki három 25 mL-es mérőlombikba, hogy azok a mintaoldattal való feltöltés után a minta eredeti (ismeretlen) Cu -koncentrációjához képest rendre +10, +20 és +30 $\mu\text{g/L}$ koncentrációnyival tartalmazzanak többet. Ezt követően töltse fel a 25 mL-es mérőlombikokat a 100 mL-es mérőlombik tartalmával (a hígított mintával). A 100 mL-es mérőlombikban megmaradt oldat a meghatározandó minta („+0” tag).

Feladat: adja meg a tehéntej réztartalmát $\mu\text{g/L}$ egységben!

3. Felszínivíz ólomtartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 20 mg/L koncentrációjú Pb^{2+} -törzsoldatból készítsen 15, 30 és 45 $\mu\text{g/L}$ koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba desztillált vízzel. (A hígításhoz használt desztillált víz szolgál majd vakmintaként a méréshez)

Minta: felszínivíz (Pl. Tisza folyóból).

Feladat: Adja meg a felszínivíz minta ólomtartalmát $\mu\text{g/L}$ egységben!

4. Felszínivíz ólomtartalmának meghatározása standard addíciós kalibrációs módszerrel

Minta: felszínivíz (Pl. Tisza folyóból). Az oldat egy kis részletét fogjuk mintaként ("0 kalibrációs tag") elemezni, a többit felhasználjuk a kalibráló oldatok elkészítéséhez.

Kalibráló oldatsorozat (standard addíciós tagok): A rendelkezésre álló 20 mg/L koncentrációjú Pb^{2+} -törzsoldatból olyan térfogatokat mérjen ki három 25 mL-es mérőlombikba, hogy azok a mintaoldattal való feltöltés után a minta eredeti (ismeretlen) Pb-koncentrációjához képest rendre +10, +20 és +30 $\mu\text{g/L}$ koncentrációnyival tartalmazzanak többet. Ezt követően töltsse fel a 25 mL-es mérőlombikokat a mintával.

Feladat: adja meg a felszínivíz minta ólomtartalmát $\mu\text{g/L}$ egységben!

Általános utasítások a gyakorlat végrehajtásához, az eredmények kiértékeléséhez:

1. Az oldatokat elkészítésük után alaposan rázza össze és tartsa a mérőlombikot lezárva. A mérőlombikot újra össze kell rázni közvetlenül azelőtt, hogy az oldatot a spektrométerbe juttatnánk.
2. Az oldatok elemzésének sorrendje: először a vakoldat és a standardoldatok növekvő koncentrációban, majd ezt követően a minták (ha vannak hígítások, először a leghígabbat mérjük).
3. Ne felejtse számolni az esetleges hígításokkal, a megfelelő koncentráció/mértékegységekben adja meg az eredményt!

A jegyzőkönyvre kapott jegyet legalább egy-egy érdemjeggyel csökkentik:

1. a kapott eredmény több, mint 10%-os eltérése a valódi értéktől
2. számítási hiba
3. nem megfelelő mértékegység
4. kalibrációs grafikon tengelyei feliratának hiánya
5. nem megfelelően elkészített jegyzőkönyv (lásd az útmutatót)

Útmutató az analitikai gyakorlaton elkészített jegyzőkönyv elkészítéséhez

Gyakorlat címe
(Név, szak, dátum)

Elméleti összefoglaló

Az a jó elméleti összefoglaló, amit a hallgató a téma részletesebb elméleti leírásának (silabusz) alapos áttanulmányozása után szűr le magának és ír le nagyjából egy oldal terjedelemben. Kevés értelme van egy olyan (akár hosszú oldalakon keresztül hömpölygő) összefoglalásnak, ami csupán néhány válogatott fejezetből kiollózott fontosabb mondatokat, bekezdéseket tartalmazza.

Mivel az analitikai meghatározások végrehajtása általában nagy körültekintést, gondos, precíz munkavégzést kíván meg, elvárható, hogy mindezeket a jegyzőkönyv küllemében is sugározza (füzet, lap minősége, írás olvashatósága, a szöveg stílusa, nyelvtani helyessége). Az elméleti összefoglaló tartalmazhat egymással szorosan össze nem függő témaköröket is, ezért fontos a megfelelő tagolás alkalmazása, a jelentősebb kulcsszavak kiemelése (például nyomtatott betűk használatával, (nem szabadkézi!) aláhúzással, színes ceruza alkalmazásával).

A jegyzőkönyv formátuma legyen könyv- vagy füzet szerű (a széthulló lapok nem megfelelőek erre a célra). Legjobb ha az egy A4 alakú füzet, vagy megfelelően lefűzött lapok gyűjteménye. Tartalmazza a jelen gyakorlat mellett minden korábbi gyakorlat anyagát.

A gyakorlaton elvégzendő feladat

Feladat:

Soroljuk fel a gyakorlaton kapott konkrét feladatokat, kérdéseket. Ezek pontos, szó szerinti rögzítése szükséges. Ha írásban kapjuk a feladatot, azt pontosan másoljuk be a jegyzőkönyvbe.

Mérési paraméterek:

Minden fontosabb mérési paramétert adjunk meg. A GFAAS gyakorlaton ezek az alábbi paraméterek:

Készülék típusa: (pl. Perkin Elmer Analyst 600)

Háttérkorrekció: (pl. Zeeman, hosszirányú elrendezésű)

Kemence: (pl. keresztfűtéses, integrált L'vov feltétellel)

Hullámhossz: (pl. réz esetén 324.8 nm)

Mintabevitel: (pl. automata mintaadagolóval, 20 μ L)

Rendelkezésre álló eszközök, standardok, minták, mintaelőkészítés:

Az oldatkészítésekhez használt mérőlombikok, pipetták, standardok felsorolása. Itt kell szerepelniük az oldatkészítésnél végzett egyszerűbb számolásoknak is.

Mérési eredmények

A mérési adatokat foglaljuk táblázatba, ügyeljünk arra, hogy a mérési eredmények mértékegységeit is mindig feltüntessük.

A kapott eredmények kiértékelése

Ez a rész tartalmazza valamennyi számítást (ne dolgozzunk cetlikre!). A kalibrációs görbét (ha a készülék szoftvere erre nem alkalmas) milliméterpapíron is megrajzolhatjuk, vagy számítógép MS Excel programjával is megrajzoltatható, kinyomtatható (a mérési pontokra húzott egyenes vagy görbe egyenletéből az ismeretlen koncentráció kiszámolható). A kalibrációs görbét tartalmazó lap is legyen egyike a számozott mellékleteknek. Adjunk címet a kalibrációs diagramnak, és pontosan adjuk meg a tengelyeket (pl: „Na koncentráció, mg/L”).

A gyakorlatnál feltett kérdéseket precízen, egész mondattal válaszolja meg, a minta ismeretlen koncentrációját egyértelműen, a kért mértékegységben adja meg. A mellékleteket (kalibrációs diagramok, mérési jelek) a jegyzőkönyv végén kell rögzíteni (ragasztással vagy tűzőgéppel).

Diszkusszió, tapasztalatok

Itt rögzítsük a gyakorlat során fontosnak tartott tapasztalatokat, értelmezzük a kapott eredményt (pl. reális lehet-e?). Itt jegyezzük meg az esetleges rendkívüli eseményeket a mérés során (pl. problémák a készülék valamely egységével, utólagosan észlelt hibák az oldatok elkészítésekor)

Jó jegyzőkönyvnek az tekinthető, amelynek alapján egy mérést akár évekkel később is reprodukálni lehet, s nem csupán a jegyzőkönyv készítője, de mások által is. A jegyzőkönyv elkészítése fontos, elengedhetetlen része az analitikai munkának.

A gyakorlat helye: D-423 labor**ZH kérdések**

1. Atomspektroszkópiai módszerek elve (emisszió, abszorpció, fluoreszcencia). Az egyes módszerek és készülékek általános mérési elve
2. Milyen részekből állnak az AAS készülékek? Mi az egyes egységek funkciója?
3. Jellemezze a grafitkemencét!
4. Mi a célja a háttérkorrekciós rendszereknek a GFAAS technikánál? Hogyan működik a Zeeman-hatáson alapuló háttérkorrekció?
5. Az üreghatódó lámpa felépítése. Hogyan történik a spektrométerekben a fény detektálása?
6. Milyen részfolyamatokból áll az atomizálás a GFAAS technikánál?
7. Milyen zavaróhatások lépnek fel a GFAAS technikánál? Mi a szerepe a mátrixmódosító adalékoknak?
8. Jellemezze a leggyakrabban használatos kiértékelési módszereket!

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK

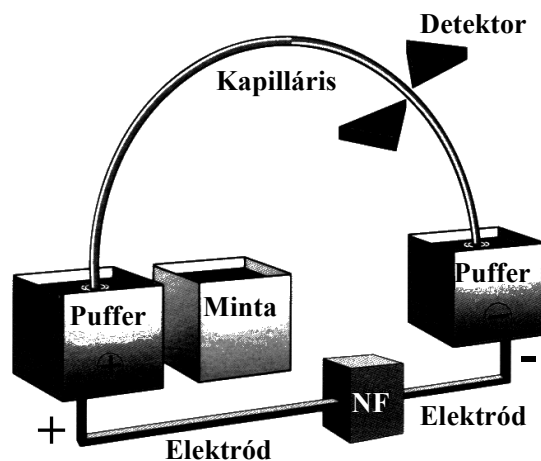
1. Ismertesse a következő fogalmak illetve analitikai paraméterek jelentését: elektroforézis, elektroozmotikus áramlás, migrációs idő, elméleti tányérszám, diszperzió, felbontás
2. Adja meg az elektroozmotikus áramlás szabályozásának lehetőségeit.
3. Ismertesse a kapilláris elektroforézis készülék felépítését.
4. Jellemezze a kapilláris elektroforézisnél használatos két legfontosabb minta injektálási módszert.
5. Mik az UV-látható fényabszorpciós detektálás sajátosságai és problémái kapilláris elektroforézisnél?
6. Ismertesse az elektroferogramok kiértékelésének fontosabb módszereit, lépéseit.

IRODALOM

- H.Engelhardt, W.Beck, T.Schmitt: *Capillary electrophoresis*, Friedr.Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1996 (ISBN 3-528-06668-7)
- R.Kuhn, S.Hoffstetter-Kuhn: *Capillary electrophoresis*, Springer-Verlag, New York, 1993 (ISBN 0-387-56434-9)
- D.N.Heiger: *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, 1992 (ISBN 12-5091-6199E)

1. A MÓDSZER RÖVID ÁTTEKINTÉSE

Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak. A kapilláris elektroforézisnél (capillary electrophoresis, CE) az elektroforézis egy vékony, általában 25-75 μm belső átmérőjű, puffer oldattal töltött kapillárisban történik. A kapilláris alkalmazásának számos előnye van, így például az, hogy a kapilláris nagy elektromos ellenállásánál fogva a rendkívül nagy térerő (100-500 V/cm) alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé. Ezenkívül a fejlődött hő (Joule-hő) a kapilláris nagy felület/térfogat aránya miatt jól eloszlik. A nagy elektromos térerő használata rövid mérési időt, valamint nagy elválasztási hatékonyságot és felbontást biztosít. Az elméleti tényérszám a kapillárison belüli elektroosztatikus áramlás dugószerű profiljának köszönhetően sok esetben meghaladja a 10^5 értéket. Az elektroosztatikus áramlás lehetővé teszi valamennyi oldott részecske egyidejű vizsgálatát, tekintet nélkül a részecske töltésére. A CE minimális mintamennyiséget (1-10 nl) igényel, könnyen automatizálható. A módszer egyik legnagyobb előnye a lehetséges alkalmazások rendkívül széles köre. Míg a kapilláris elektroforézist eleinte csak biológiai makromolekulák vizsgálatához használták, ma már használják aminosavak, királis vegyületek, vitaminok, peszticidek, szervetlen ionok, szerves savak, peptidek és fehérjék, szénhidrátok, oligonukleotidok és DNS részek, de még egész sejtek és vírusok elválasztásához és meghatározásához is. Mivel az elektroforézises, illetve a kromatográfias elválasztások mechanizmusai eltérnek, így e vizsgálatok kölcsönösen kiegészíthetik egymást. Ezenkívül a CE egyszerűbb módszerfejlesztést, minimális oldat mennyiségekkel és gyakorlatilag szerves oldószerektől mentes munkát tesz lehetővé. Ezen előnyök és lehetőségek következtében a CE-nek jó esélye van arra, hogy rövid időn belül az elsőszámú elválasztási technikává váljon. Mindazonáltal, a CE még nem tekinthető teljes egészében kidolgozott módszernek (például a HPLC-hez képest) sem a módszer elmélete, sem az alkalmazási lehetőségek tekintetében.



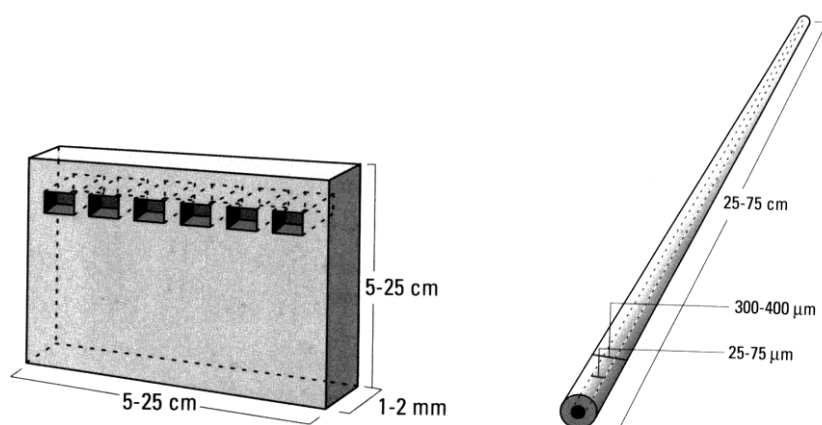
1. ábra A CE készülék vázlatos elrendezése

A CE egyik legfontosabb jellemzője a készülék felépítésének egyszerűsége. Az 1. ábrán egy tipikus kapilláris elektroforézis készülék vázlatos elrendezése látható. Egy vékony, puffer oldattal töltött kvarc kapilláris végei puffer oldatokba merülnek. A puffert tartalmazó edényekben található a nagyfeszültségű tápegység és a kapilláris közötti elektromos vezetést biztosító elektródok is. A minta bevitele a kapillárisba egy (általában az anódnál lévő) pufferes edénynek a mintát tároló edénnyel való kicserélésével és ezt követően külső nyomás vagy elektromos tér egyidejű alkalmazásával történik. A pufferes edény visszahelyezése után elektromos tér alkalmazása miatt a minta egyes komponensei elválnak. A komponensek optikai detektálása leggyakrabban a kapilláris másik vége közelében, közvetlenül a kapilláris falán keresztül történik.

2. TÖRTÉNETI HÁTTÉR

Az elektroforézis a töltéssel rendelkező részecskéknek (ionoknak) az elektromos térben való vonzó és taszító kölcsönhatások által kiváltott különböző mértékű elmozdulásaiként határozható meg. Az elektroforézist, mint elválasztási technikát Tiselius 1937-ben vezette be. Amikor különböző fehérjéket tartalmazó oldatot helyezett egy, a végeinél puffer oldatokkal érintkező csőbe, és elektromos feszültséget kapcsolt a cső végeire, azt találta, hogy a minta komponensei töltésüktől és mozgékonyaságuktól függően különböző sebességgel különböző irányokba vándoroltak. Munkájáért Tiseliusnak később Nobel-díjat adományoztak.

Amint azt Tiselius is tapasztalta, oldatokban az elválasztás hatékonyságát korlátozza a hődiffúzió és a hőátvitel. Ezért az elektroforézist többnyire rossz hőátvitelű közegben (pl. poliakrilamid vagy agaróz gélekben) hajtották végre. A lap vagy cső formájú géleket leginkább a biológiai makromolekulák (nukleinsavak, fehérjék) méretfüggő elválasztásához használták. Bár ez az egyik legszélesebb körben használatos elválasztási technika, a lap gélelektroforézis alkalmazásánál hosszú elemzési idővel, kis elválasztási hatékonysággal, nehézkes automatizálással és detektálással kell számolni. A 80-as évek elején végre elérhetővé váltak $75\ \mu\text{m}$ belső átmérőjű kvarc kapillárisok. Ezek alkalmazásával készítette el Jorgenson és Lukacs az első kapilláris elektroforézis berendezést.



2. ábra A lap gélelektroforézis és a kapilláris elektroforézis méretbeli összehasonlítása

Az első CE-s nemzetközi konferenciát 1989-ben tartották. Azóta évről évre növekszik a módszerrel kapcsolatos közlemények, könyvek és konferenciák száma, és meredeken nő az eladott CE készülékek mennyisége.

3. A CE ELMÉLETE

3.1. Elektroforézis

Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak. Egy ion sebessége a következőképpen adható meg:

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

ahol v = az ion sebessége
 μ_e = az elektroforetikus mozgékonyság
 E = az elektromos térerő

Az elektromos térerő (V/cm) az alkalmazott feszültség és a kapilláris hosszának hányadosa. Egy adott ion és közeg esetén a mozgékonyság állandó, és jellemző az adott ionra. Egy részecske mozgékonyságát a részecskére ható elektromos erő (F_e) és a közeg által kifejtett súrlódási erő (F_s) határozza meg.

Az elektromos erő a

$$F_e = q E \quad (2)$$

a súrlódási erő (ideális, gömb alakú ionokra) pedig a

$$F_s = - 6 \pi \eta r v \quad (3)$$

képletekkel adható meg,

ahol q = az ion töltése
 η = az oldat viszkozitása
 r = az ion sugara
 v = az ion sebessége

Az elektroforézis során e két erő egymással egyenlő, irányuk ellentétes, így felírható, hogy

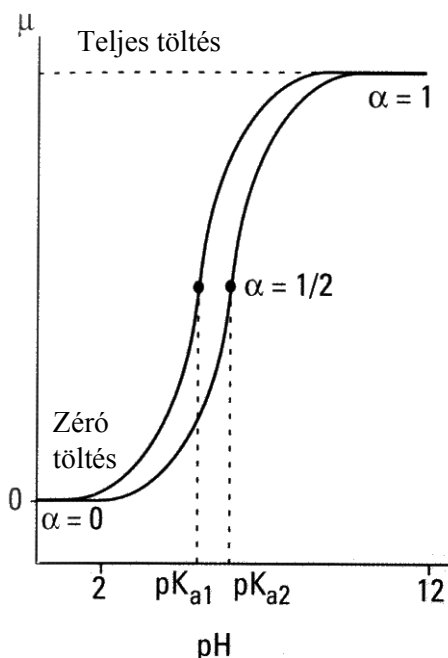
$$q E = 6 \pi \eta r v \quad (4)$$

A (4) egyenletből az ion sebességét kifejezve, s behelyettesítve az (1) egyenletbe kapjuk azt az egyenletet, mely a mozgékonytságot fizikai állandókkal írja le:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Ebből az egyenletből világosan látszik, hogy a kis méretű, nagy töltésű részecskék rendelkeznek a legnagyobb mozgékonytsággal, míg a nagy méretű, de kis töltésű részecskék mozgékonytsága csekély. Az abszolút (elektroforetikus) mozgékonytsági adatok, melyek végtelen híg oldatra és teljes töltésű ($\alpha=1$, lásd 3. ábra) részecskékre vonatkoznak, megtalálhatók a különböző fizikai állandókat tartalmazó táblázatokban. Az abszolút mozgékonytsági értékektől a kísérleti úton kapott relatív (effektív) mozgékonytsági értékek általában eltérnek, mivel ez utóbbi értékek függenek a pH-tól (az oldott anyag pK-jától) és a közeg (puffer) összetételétől.

Az abszolút és relatív mozgékonytság közötti különbséget mutatja be a 3. ábra. Ha két részecske abszolút mozgékonytsága teljes töltés mellett megegyezik, elvileg nem választható el egymástól, holott valójában e részecskék különböző pK értékűk, és pH-juk által megszabott töltésük miatt különböző mozgékonytsággal rendelkeznek.

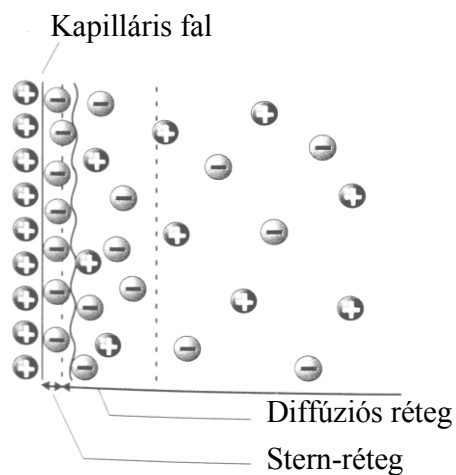


3. ábra Két gyenge sav mozgékonyágának pH-függése

3.2. Az elektroosmotikus áramlás

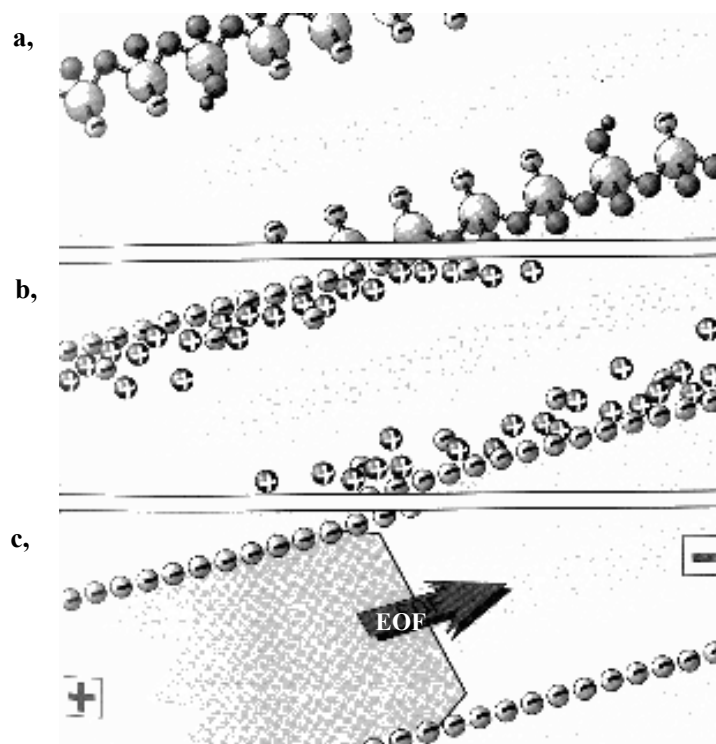
A CE működésének alapja az elektroosmotikus áramlás (electroosmotic flow, EOF). Az EOF a folyadék kapillárisbeli tömegtranszportja, mely a kapilláris belső falán kialakult felületi töltések (kettős réteg) következménye (4. ábra). Az EOF hozzáadódik az oldott anyagok mozgékonyágán alapuló áramláshoz, de nincs hatása az elválasztás szelektivitására.

Vizes oldatok esetén a legtöbb szilárd felületnek fölös negatív töltése van. Ennek oka a felület ionossá válása sav-bázis egyensúly következtében és/vagy ionoknak a felületre való adszorpciója. Kvarc esetén mindkét folyamat végbemehet, bár az EOF-t leginkább a szilanol csoportok (SiOH) anionos SiO^- formája határozza meg (5.a ábra). Az EOF $pH=4$ fölött válik jelentőssé. Nemionos jellegű anyagok (pl.: teflon) szintén kialakíthatnak EOF-t a felületükre adszorbeálódó anionoknak köszönhetően.



4. ábra A kapilláris falán kialakuló kettős réteg ábrázolása

Az ellenionok (általában kationok) a töltésegyensúly fenntartása miatt a felület közelében helyezkednek el, és egy kettősréteget építenek ki, illetve a fal potenciáljához nagyon közeli potenciált (zéta potenciált) hoznak létre (5.b ábra). Ha feszültséget kapcsolunk a kapilláris végeire, a diffúziós kettős réteget alkotó kationok a katód felé mozdulnak el. Mivel e kationok solvatáltak, mozgásukkal az oldószer részecskéket is a katód felé vonszolják (5.c ábra).



5. ábra Az elektroosmotikus áramlás kialakulása
 a, negatív töltésű kvarc kapilláris belső felülete (Si-O⁻)
 b, hidratált kationok gyűlnek össze a felület közelében
 c, tömegáramlás alakul ki az elektromos tér létrehozása miatt

Az EOF mértéke sebességi vagy mozgékonyági értékekkel fejezhető ki:

$$v_{\text{EOF}} = (\varepsilon \xi / \eta) E \quad (6)$$

vagy

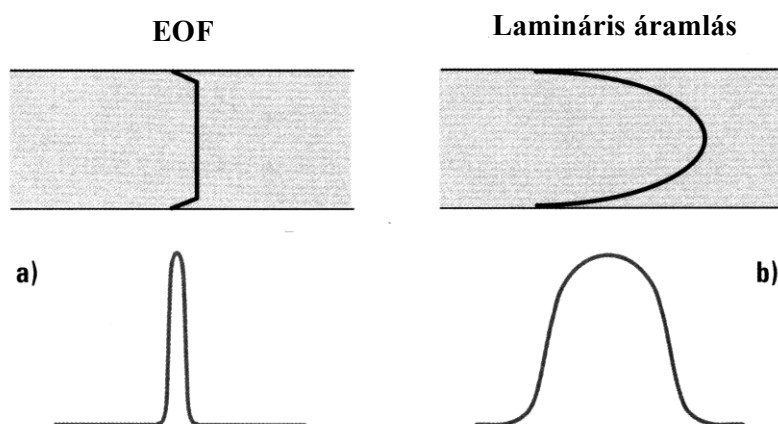
$$\mu_{\text{EOF}} = (\varepsilon \xi / \eta) \quad (7)$$

ahol v_{EOF} = EOF sebessége
 μ_{EOF} = EOF "mozgékonyága"
 ξ = zéta potenciál
 ε = dielektromos állandó

A zéta potenciált a kapilláris falának felületi töltése határozza meg. Mivel ez a töltés erősen pH-függő, az EOF nagysága a pH-val változik. Nagy pH

értékeknél, ahol a szilanol csoportok túlnyomó részben deprotonáltak, az EOF mértéke jóval nagyobb, mint kisebb pH értékeknél, ahol e csoportok protonálódnak. Az EOF pH=2 és pH=12 között akár egy nagyságrendnél nagyobb mértékben is megváltozhat.

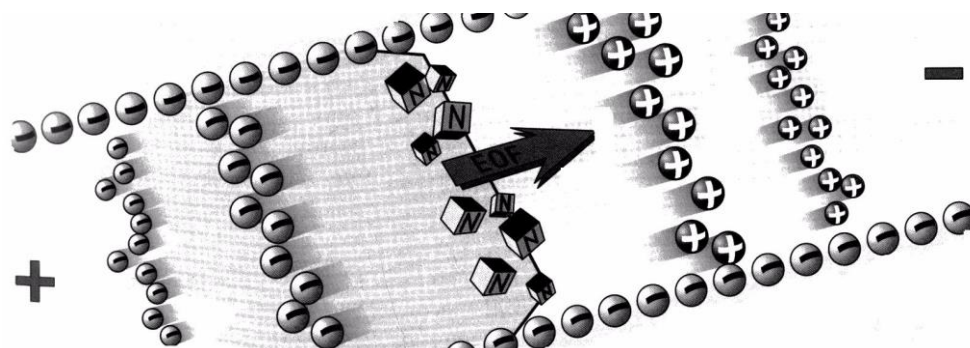
A kapillárisbeli EOF fontos jellemzője a lapos áramlási profil (6.a ábra). Mivel az áramlás hajtóereje egyenletesen oszlik el a kapillárisban, egyáltalán nincs nyomásesés a kapillárison belül, s így az áramlás teljesen egyenletesnek tekinthető. A 6.a. ábrán jól látszik, hogy az áramlási sebesség hirtelen csökken a falnál a súrlódás következtében. A lapos áramlási profil azért előnyös, mert a részecskék zónáinak diszperziója csak kis mértékű. Ennek ellenkezője igaz pumpákkal előállított lamináris vagy parabolikus áramlásokra a cső falánál fellépő deformáló erők miatt (6.b ábra). Az EOF sebessége és profilja általában független a kapilláris belső átmérőjétől, de ha az meghaladja a 200 μm -t, az előnyös áramlási profil megváltozik.



6. ábra Áramlási profilok és részecske zónák

Az EOF egy másik fontos előnye, hogy az gyakorlatilag az összes részecskét, függetlenül azok töltésétől, azonos irányú mozgásban tartja. A szokásos körülmények mellett (vagyis amikor a kapilláris belső felülete negatív töltésű) az áramlás az anódtól a katód irányába történik. A katód felé nemcsak a kationok vándorolnak, de az anionok is, mivel az EOF akár egy nagyságrenddel is nagyobb lehet az anionok sebességénél. Így a kationok, töltés nélküli részecskék és anionok akár egyetlen CE-s futtatással is elemezhetők. A folyamatot a 7. ábra mutatja be. A kationok vándorolnak a

leggyorsabban a katód felé az elektroforetikus vonzóerő és az EOF miatt; a töltés nélküli részecskéket kizárólag az EOF szállítja, így a különböző töltés nélküli részecskék itt nem szeparálódnak; a leglassabban pedig az anionok vándorolnak a katód felé (az EOF-nek köszönhetően), mivel ezekre az anód az EOF irányával ellentétes vonzóerőt fejt ki. Kis méretű ionok (pl. K^+ , Na^+ , Cl^-) vizsgálata esetén az EOF nagysága általában nem nagyobb ezen ionok mozgékonyágánál. Ezenkívül a kapilláris felületi töltésének módosításával elérhető az EOF csökkentése, s így a kationok és anionok akár ellentétes irányba is vándorolhatnak.



7. ábra Különböző részecskéknek az EOF-val szuperponált vándorlása a kapilláris zónaelektroforézisnél

3.3 Az EOF szabályozása

Bár a meghatározásoknál az EOF általában előnyös, gyakran szükséges annak szabályozása. Nagy pH értékeknél az EOF akár olyan gyors is lehet, hogy az még az elválasztás megtörténte előtt a részecskék elúcióját okozza. Kis pH értékeknél viszont a negatív töltésű fal kationos részecskék adszorpcióját okozhatja (ez különösen a bázikus fehérjék elválasztásánál jelenthet problémákat). Az EOF szabályzásához elsősorban a kapilláris felületi töltésének vagy a puffer viszkozitásának megváltoztatása szükséges. Ezek lehetséges módzatait az 1. táblázat foglalja össze.

Az EOF sebességének csökkentése legegyszerűbben az elektromos tér csökkentésével lehetséges a (6) egyenletnek megfelelően. Ennek az alkalmazásnak azonban számos hátránya van az elemzés időtartama, hatékonysága és a felbontás tekintetében. A gyakorlatban a legdrámaibb

változás az EOF-ben a puffer pH-jának megváltoztatásával érhető el. A pH változása azonban hatással lehet az oldott részecskék töltésére és mozgékonyására is. Kis pH-jú pufferek mind a kapilláris felületét, mind az oldott részecskéket protonálhatják, míg nagy pH-jú pufferek mindezeket deprotonálják. A különböző részecskék izoelektromos pontjának ismerete gyakran hasznos lehet a megfelelő pH-jú puffer kiválasztásához. Az EOF szabályozható a puffer ionerősségének és koncentrációjának megváltoztatásával is. A pufferek szokásos koncentrációtartománya 1-500 mM, nagyobb koncentrációk alkalmazását korlátozza a kapilláris belsejében jelentkező hőfejlődés. Ezenkívül az EOF változtatható a kapilláris falának módosításával (stabil réteg kialakításával vagy speciális adalékokkal) is.

1. táblázat Az EOF szabályzásának módszerei

Változó	Eredmény	Megjegyzés
Elektromos tér	Arányos változás az EOF-ben	<ul style="list-style-type: none"> • Csökkentésével az elválasztás hatékonysága és a felbontás csökkenhet • Növelésével jelentős Joule-hő fejlődhet
Puffer pH	Az EOF kis pH-nál csökken, nagy pH-nál nő	<ul style="list-style-type: none"> • A legegyszerűbb és legeredményesebb módszer az EOF szabályzásához • Megváltoztathatja az elválasztandó részecskék töltését vagy szerkezetét
Ionerősség vagy puffer-koncentráció	Növekedésével csökken a zéta potenciál és az EOF	<ul style="list-style-type: none"> • Nagy ionerősség nagyobb áramerősséget (Joule-hőt) eredményez • Kis ionerősség problémákat jelenthet a minta adszorpciója miatt • A kapott jel alakja torzulhat, ha a vezetőképesség eltér a minta vezetőképességétől
Hőmérséklet	A viszkozitás 2-3%-kal változik °C-ként	<ul style="list-style-type: none"> • Változtatása gyakran hasznos, mivel a hőmérsékletet a készülék maga képes szabályozni
Szerves módosító adalék	Megváltoztatja a zéta potenciált és a viszkozitást (általában csökken az EOF)	<ul style="list-style-type: none"> • Komplex változások, hatásukat legegyszerűbben kísérletesen lehet meghatározni • Megváltozhat a szelektivitás
Felületaktív anyag	Hidrofób és/vagy ionos kölcsönhatásokkal a kapilláris falára adszorbeálódnak	<ul style="list-style-type: none"> • Felületaktív anionok növelhetik az EOF-t • Felületaktív kationok csökkenthetik az EOF-t vagy megfordíthatják annak irányát • Jelentősen megváltoztathatja a szelektivitást
Töltés nélküli, hidrofób polimerek	Hidrofób kölcsönhatásokkal a kapilláris falára adszorbeálódnak	<ul style="list-style-type: none"> • Csökkenti az EOF-t a felületi töltések elfedésével és a viszkozitás növelésével
Kovalens kötéssel kötődő anyagok	Kémiai kötés a kapilláris falához	<ul style="list-style-type: none"> • Sokféle módosítás lehetséges (hidrofób jelleg mértéke vagy töltés) • A stabilitás gyakran problémákat okoz

3.4 Analitikai paraméterek

Mozgékonyosság és migrációs idő

A migrációs idő az az időtartam, ami az adott részecskének a detektálás helyéig való vándorlásához szükséges, s ami megadható a migrációs távolság és a részecske sebességének hányadosaként. A migrációs idő és más kísérleti paraméterek alapján számítható ki a látszólagos mozgékonyosság (μ_1):

$$\mu_1 = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \quad (8)$$

ahol $\mu_1 = \mu_e + \mu_{EOF}$
 V = feszültség
 l = a kapilláris effektív hossza (a kapilláris hossza a detektorig)
 L = a kapilláris teljes hossza
 t = migrációs idő
 E = elektromos térerő

Diszperzió

Az elektroforézisnél az elválasztás a részecskék mozgékonyágbeli különbségén alapszik. A zónák jó elválásához rövid zónák előnyösek. A zónák hosszát azonban a különböző tényezők, diszperziós folyamatok (hosszirányú diffúzió, Joule-hő fejlődés, hosszú injektálás, minta adszorpciója a kapilláris falára, a minta és a puffer jelentősen eltérő vezetőképessége, stb.) növelik. Így, a diszperzió forrása a zónán belüli részecskék eltérő sebessége. A diszperzió az alapvonal csúcshélességével (w_a) jellemezhető, mely Gauss-görbe alakú jel esetén

$$w_a = 4 \sigma \quad (9)$$

ahol σ = a jel standard deviációja (időben, hosszúságban vagy térfogatban).

Az elválasztás hatékonyságát az elméleti tényérszámmal (N) fejezik ki:

$$(10)$$

ahol l = a kapilláris effektív hossza, és fordítottn arányos egy elméleti tányérnak megfelelő magassággal (H):

$$H = \frac{l}{N} \quad (11)$$

Ideális körülmények között (vagyis amikor kicsi az injektált minta hossza, nincs kölcsönhatás a részecskék és a fal között, stb.) a hosszirányú diffúzió az egyedüli forrása a részecskék zónakiszélesedésének, mivel a keresztirányú diffúzió a dugószerű áramlási profil miatt általában nem okoz problémát. Így a hatékonyság arányos a kromatográfiában használatos molekuláris diffúzió kifejezéssel, vagyis:

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2Dl}{\mu_e V} \quad (12)$$

ahol D = az adott részecske diffúziós koefficiense.

A (12) egyenletet behelyettesítve a (10) egyenletbe megkapjuk a tányérszám elektroforetikus kifejezését:

$$N = \frac{\mu_e V l}{2Dl} = \frac{\mu_e E l}{2D} \quad (13)$$

Az elméleti tányérszám meghatározható közvetlenül a kapott elektroferogram alapján is:

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (14)$$

ahol t = a migrációs idő

$w_{1/2}$ = a kapott csúcs félértékszélessége

Felbontás

Az elválasztástechnikában a végső cél a mintának komponenseire való bontása. A felbontás a legegyszerűbben a következőképpen adható meg:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (15)$$

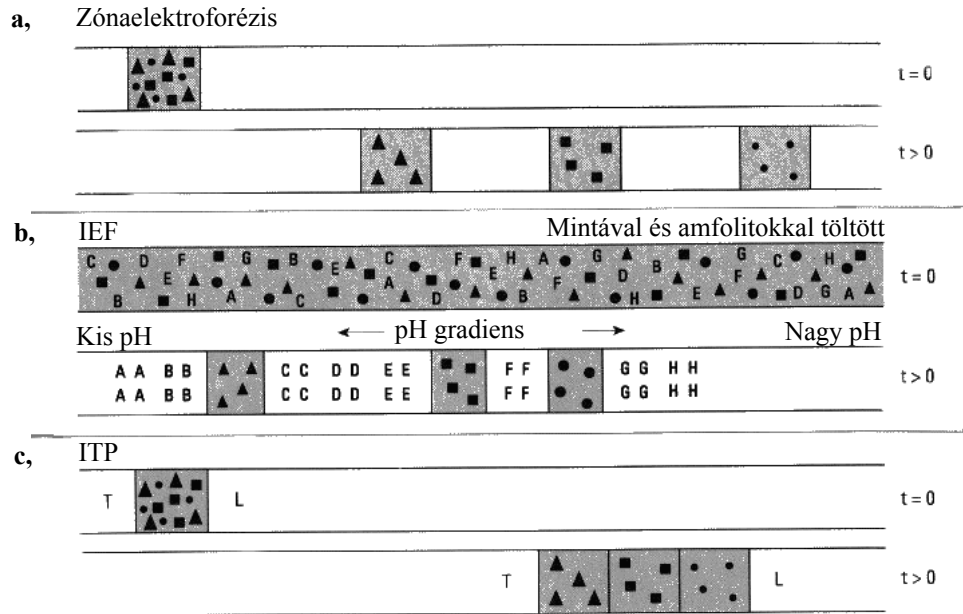
Az egyenlet számlálójában szereplő tagok az elválasztási folyamatot, a nevezőbeli tagok pedig az ez ellen ható diszperziós folyamatokat jellemzik.

4. A CE MÓDSZEREI

A CE alapvető módszerei a *kapillaris zónaelektroforézis* (CZE), a *micellaris elektrokinetikus kromatográfia* (MEKC), a *kapillaris gélelektroforézis* (CGE), a *kapillaris izoelektromos fókuszálás* (CIEF) és a *kapillaris izotachoforézis* (CITP). E különböző elválasztási módszerek mechanizmusait foglalja össze a 2. táblázat és a 8. ábra. Az egyes módszerek használatához többnyire egyszerűen csak a puffer összetételét szükséges megváltoztatni. A felsorolt módszerek közül csak a CZE-t tárgyaljuk részletesebben.

2. Táblázat A CE módszerei

Módszer	Az elválasztás alapja
Kapillaris zónaelektroforézis	Szabad részecskék mozgékonyága
Micellaris elektrokinetikus kromatográfia	Hidrofób/ionos kölcsönhatások micellákkal
Kapillaris gélelektroforézis	Méret és töltés
Kapillaris izoelektromos fókuszálás	Izoelektromos pont
Kapillaris izotachoforézis	Határfelületek mozgása



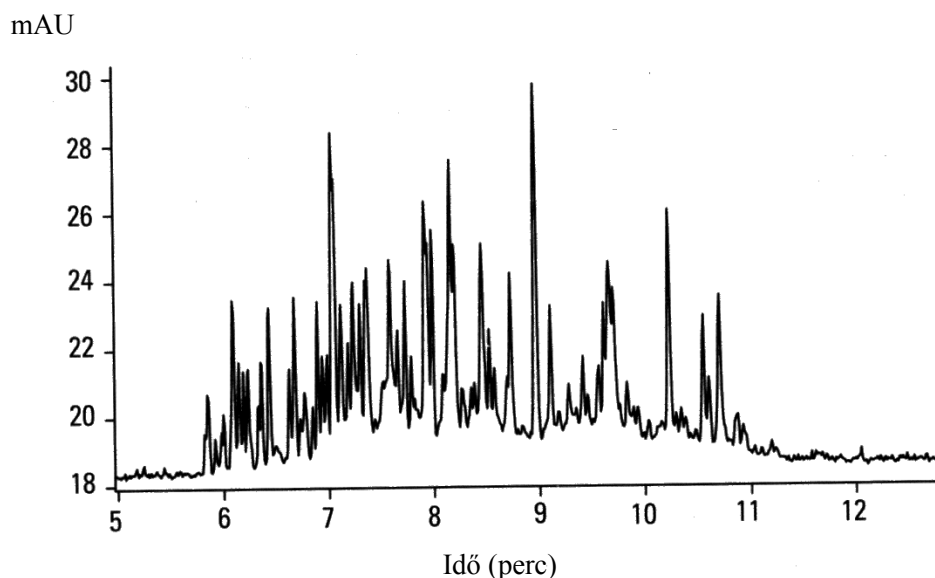
8. ábra A CZE, CIEF és CITP illusztrálása

A CZE egyszerűsége és sokoldalúsága miatt a leggyakrabban használatos CE módszer. A kapilláris csupán a pufferrel van töltve, az elválasztás alapja az, hogy a különböző részecskék diszkrét zónákban más-más sebességgel mozognak. Kationok és anionok elválasztása egyaránt lehetséges az EOF-nek köszönhetően, de az EOF a töltés nélküli részecskéket is mozgatja (eluálja) (7. és 8.a ábra).

5. A KAPILLÁRIS ZÓNAELEKTROFORÉZIS (CZE) ALKALMAZÁSI TERÜLETEI

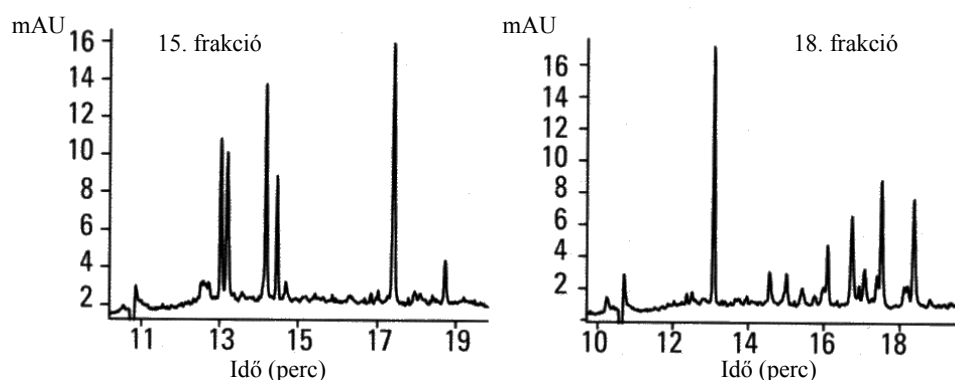
Bár a CZE alig tízéves technika, a megismert alkalmazások köre egyre szélesebb, a közlemények száma jelenleg, a 90-es évek végén exponenciálisan nő. A CZE-nek eddigi rövid "élete" során is már olyan sok alkalmazási területét tárták fel, hogy ezek közül csupán néhány fontosabb terület felvillantására van itt lehetőség.

A CZE-t gyakran alkalmazzák biológiai kutatásoknál, elsősorban peptidok és fehérjék meghatározásánál. Például a cukorfehérjék tipikusan azok a vegyületek, melyeket a hagyományos gélelektroforézis vagy folyadékkromatográfias módszerekkel nehéz elemezni, ugyanakkor a CZE itt előnyösen használható. Jelentős sikereket értek el a "peptid-térképek" CZE-s felvételénél is. A "peptid-térkép" készítésénél a fehérjéket enzimekkel vagy vegyszerekkel kis peptidrészekre tördelik szét, majd a peptidok e keverékét elemzik. E vizsgálat elsősorban minőségi jellegű és a fehérjék közti finom különbségek feltárására jó. Egy, CZE-vel kapott peptid-térkép a 9. ábrán látható.



9. ábra Peptid-térkép. *Körülmények:* minta: BSA standard, puffer: 20 mM foszfát, pH=7, V=25 kV, l=50 cm, belső átmérő: 50 μ m, λ =200 nm

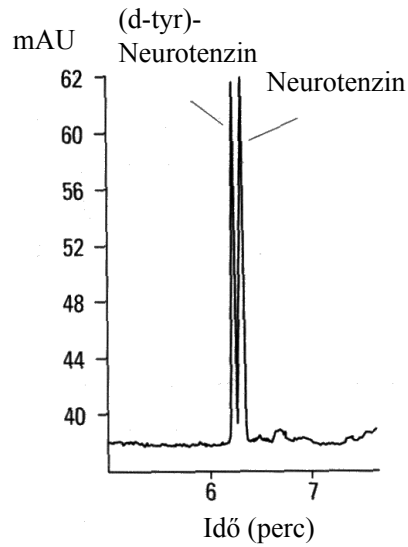
A CZE ugyancsak jól hasznosítható a nagynyomású folyadékkromatográfiásan (HPLC) tisztított fehérjék második dimenziós elemzéséhez (10. ábra).



10. ábra Fordított fázisú HPLC-s technikával elválasztott peptidek CZE elemzése

Körülmények: puffer: 30 mM borát, 17 mM foszfát, pH=8.2, V=25 kV, l=70 cm, belső átmérő: 50 μ m, λ =200 nm

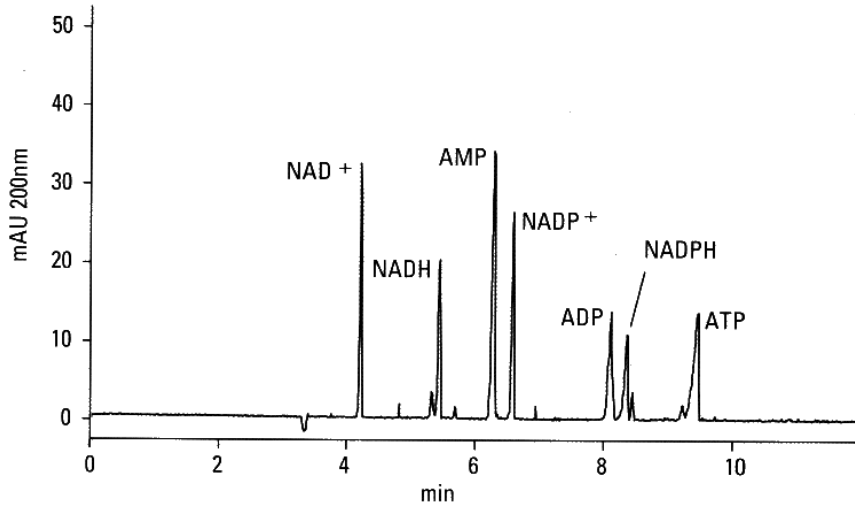
Optimált feltételek mellett, a CZE esetén elérhető nagy elválasztási hatékonyság elegendő lehet két anyag közötti egészen kis szerkezeti különbségek felismeréséhez is. A 11. ábrán látható, hogy még két, olyan 8 aminosav hosszúságú peptid is elválasztható, mely csupán egy aminosav konformációjában (D-tirozin, L-tirozin) különbözik. Ez a példa azt is jelzi, hogy még a konformációs különbségeknek is hatásuk van az anyagok elektroforetikus mozgékonyására.



11. ábra Neurotensin izomerek CZE elemzése (A neurotensin aminosav-sorrendje: pGlu-Leu-Try-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu és pGlu-Leu-Try-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-D-Tyr-Ile-Leu)

Körülmények: minta: 0.025 mM mindkét izomer, puffer: 30 mM borát, pH=8.3, V=18 kV, l=65 cm, belső átmérő: 50 μ m, λ =200 nm

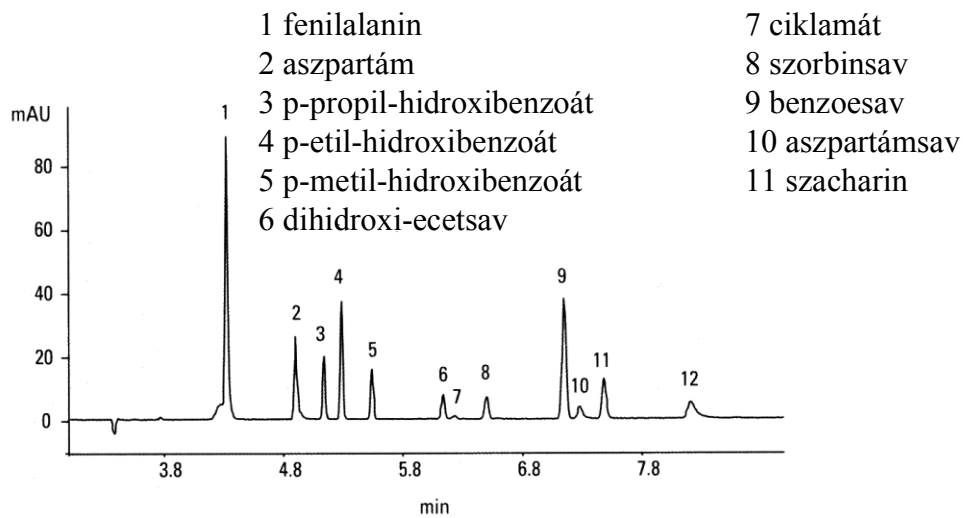
Anionos vegyületek gyakran elemezhetők a szokásos polaritás mellett is, ha a nagy EOF ellensúlyozza ezek negatív elektroforetikus mozgékonyágát. Nukleotidok esetén a CZE elválasztás gyorsabb, mintha gradiens elúciós HPLC-s módszert használnánk (12. ábra).



12. ábra Nukleotidok és koenzimjeik CZE elemzése

Körülmények: puffer: 20 mM foszfát, pH=7.5, V=25 kV, l=56 cm, belső átmérő: 75 μ m, λ =200 nm

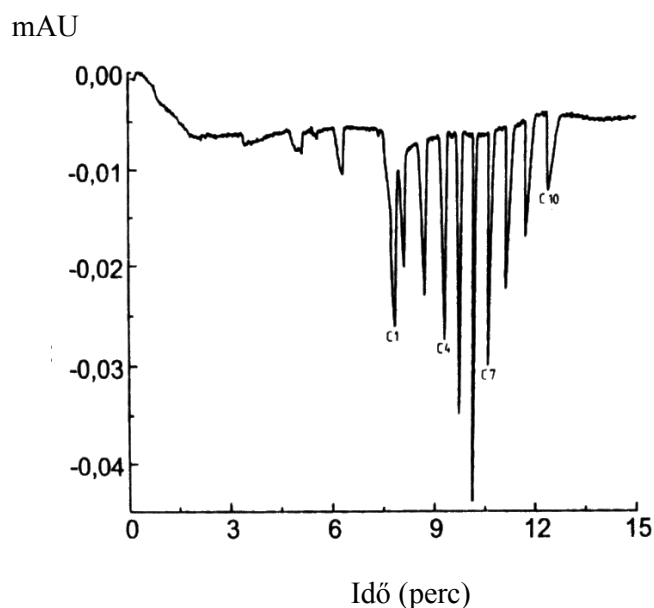
A CZE-vel könnyen azonosíthatók és mennyiségileg is meghatározhatók élelmiszerekhez adalékolt tartósítószer, édesítőszer (13. ábra), szintetikus festékek, vitaminok.



13. ábra Mesterséges édesítő- és tartósítószer CZE elemzése

Körülmények: puffer: 20 mM borát, pH=9.4, V=30 kV, l=56 cm, belső átmérő: 50 μ m, λ =192 nm

A CZE használható szerves kationok, anionok és szerves savak meghatározására is, melyeket hagyományosan ionkromatográfias módszerekkel szoktak elemezni. Mivel ezekben az anyagokban többnyire nincs megfelelő kromofor (színhordozó) csoport, indirekt UV detektálást kell alkalmazni. Indirekt detektálásnál a puffer az adott hullámhossztartományban erősen elnyelő anyagot (pl. kromátot vagy imidazolt) tartalmaz és a detektálás ezen anyagok abszorpciós maximumán történik (pl.: kromát esetén 254 nm-en). Amikor a minta zónái áthaladnak a detektálás helyén, abszorbancia csökkenés következik be, mivel a minta nem kromofor komponensei kiszorítják ("hígítják") a kromofor puffert. A kis méretű kationok nagy mozgékonyasága miatt az EOF nem elég nagy az ellenkező irányba vándorló ionok (anionok) szállításához, így a kationok és anionok egyszerre általában nem vizsgálhatók. A 14. ábrán 1-10 szénatomszámú alifás karbonsavak elektroferogramja látható.



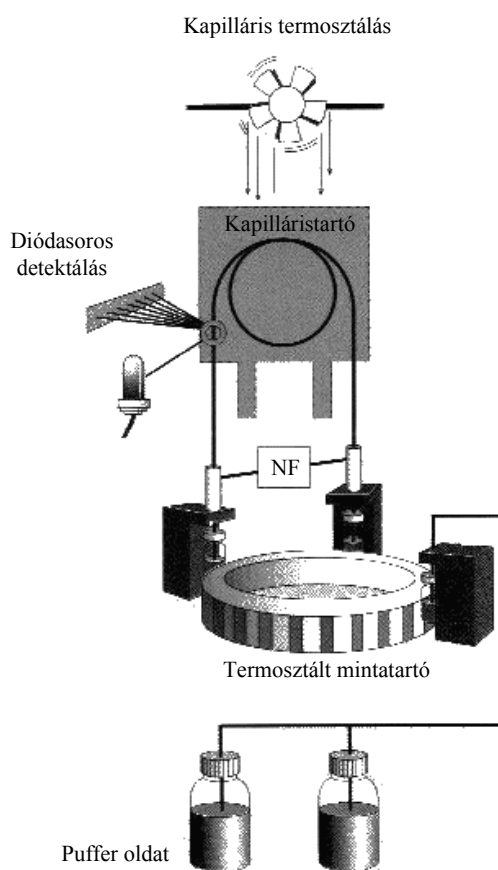
14. ábra Kis szénatomszámú alifás karbonsavak CZE elemzése
Körülmények: minta: C₁-C₁₀ alifás karbonsavak (mindegyik 25 µg/ml),
puffer: 5 mM dinitro-benzoészav, 0,5 mM CTAB, pH=9,0, 40% acetone;
V=25 kV fordított polaritás;
l=50 cm, belső átmérő: 75 µm, λ=214 nm

6. A CE KÉSZÜLÉK FELÉPÍTÉSE

A CE készülék felépítését a 15. ábra mutatja be. Egy CE készülékkel történő mérés 4 egymást követő lépésből áll:

1. bemeneti pufferedényke cseréje a mintát tartalmazó edénykével,
2. a minta bejuttatása a kapillárisba kis nyomás vagy feszültség alkalmazásával,
3. a bemeneti pufferedényke visszahelyezése,
4. feszültség alkalmazása az elválástáshoz.

Ezt követően a minta elváló komponenseinek zónái elérik az optikai ablakot, ahol a spektrometriás detektálás történik. A következőkben a minta injektálásához, elválástáshoz, detektálásához és a folyadékok kezeléséhez szükséges részegységekről, módszerekről lesz szó.

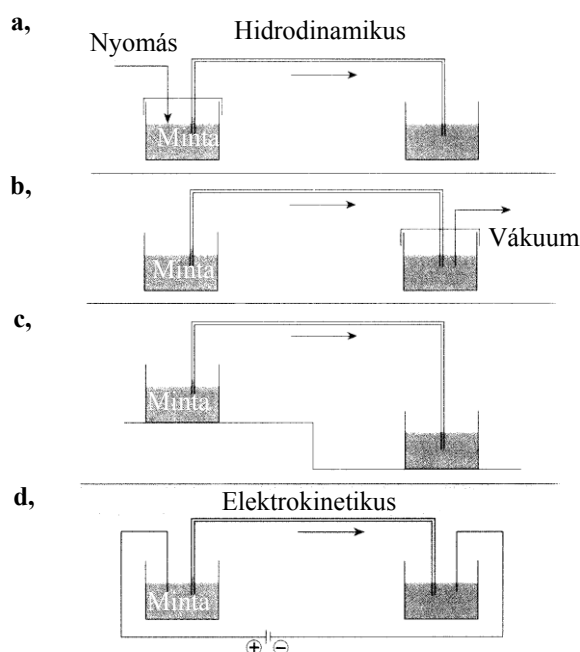


15. ábra A CE készülék vázlatos felépítése

6.1. Injektálás

A nagy elválasztási hatékonyság elérése céljából csak nagyon kis minta mennyiséget szabad a kapillárisba juttatni. A kapillárisba bejuttatott minta (injekciós dugó) hosszának kisebbnek kell lennie a kapilláris hosszának 1-2%-ánál. Ez azt jelenti, hogy az injekciós hossz a kapilláris hosszától és belső átmérőjétől függően csupán néhány mm, vagyis a minta térfogata nem több 1-50 nl-nél. Így, elméletileg egyetlen 5 μ l-nyi mintaoldatból már akár egy sorozatmérésre is lehetőség van. Nagyobb mintatérfogatok alkalmazásának két lényeges hatása van, de mindkettő hátrányos a felbontásra nézve. Egyrészt a diffúzió által megszabott zónaszélességnél nagyobb injekciós hossz arányosan szélesebb csúcsokat eredményez. Másrészt növelheti az elektromos tér inhomogenitását és eltorzult formájú csúcsokat okozhat a minta zónái és a puffer eltérő vezetőképessége miatt.

A két leggyakrabban használt CE minta beviteli módszer a hidrodinamikai és az elektrokinetikus injektálás (16. ábra). Az injektált minta mennyisége egyik esetben sem ismert pontosan, de könnyen kiszámolható. Mintatérfogat helyett, hidrodinamikai injektálásnál a nyomás-idő, elektrokinetikus injektálásnál pedig a feszültség-idő paramétereket szokás megadni.



16. ábra A minta injektálásának módszerei a CE-nél

Hidrodinamikus injektálás

A hidrodinamikus injektálás a legáltalánosabban használatos CE mintabeviteli módszer. Végrehajtható, ha a kapilláris injekciós végénél nyomást, vagy a kapilláris másik végénél vákuumot alkalmazunk, vagy pedig ha az injekciós edénykét megemeljük a kapilláris másik végéhez képest (hidrosztatikus injektálás) (16. a, b, c ábrák).

Az injektált minta térfogata a Hagen-Poiseuille egyenlet alapján számítható:

$$\text{térfogat} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (16)$$

ahol ΔP = nyomáskülönbség a kapillárisban
 d = a kapilláris belső átmérője
 t = idő
 η = a puffer viszkozitása
 L = a kapilláris hossza

A szokásos injekciós nyomás és idő paraméterek 25-100 mbar, illetve 0.5-5 s. A hidrosztatikus injektálásnál a ΔP nyomáskülönbség a (17) képletből számolható. Általában 5-10 cm-re emelik a mintafiólát a kapilláris másik végéhez képest 10-30 másodpercig.

$$\Delta P = \delta g \Delta h \quad (17)$$

ahol δ = a puffer oldat sűrűsége
 g = gravitációs állandó
 Δh = az edények közötti magasságkülönbség

Ha az érzékenység nem különösebben fontos az elemzésnél, akkor a lehető legkisebb injekciós hosszt érdemes használni. Az injekció ismételhetősége azonban romlik nagyon rövid injekciós idők esetén. Bár a készülékek injekciós ismételhetősége általában 1-2 %-nál is jobb, a csúcsterületbeli ismételhetőséget számos tényező ronthatja (pl.: a kapilláris hőmérsékletének változása, a minta kölcsönhatásai a kapilláris falával, a csúcsok integrálása kis jel/zaj viszonynál stb.). A kapilláris hőmérsékletének pontos szabályozása ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) fontos az állandó injekciós térfogat biztosításához is, mivel a migrációs idő, illetve a kapillárisban a puffer viszkozitása, s így az injektált mennyiség 2-3 %-kal változik $^\circ\text{C}$ -onként. Annak érdekében, hogy elkerüljük

a minta oldat nem kívánt felszívódását a kapillárisba, az injektálásnak olyan rövid időtartamúnak kell lennie, amilyen rövid csak lehet.

Elektrokinetikus injektálás

Az elektrokinetikus (vagy más néven elektromigrációs) injektálás esetén a kapilláris bemeneti végét a mintatartó edénykébe helyezik és feszültséget kapcsolnak rá (16.d ábra). Ilyenkor a térerősség 3-5-ször nagyobb, mint amelyet elválasztáskor szokás használni. Elektrokinetikus injektálásnál a részecskék migráció, illetve az EOF szívó hatása révén jutnak be a kapillárisba. Az elektrokinetikus injektálás sajátága, hogy a kapillárisba juttatott mennyiség függ az egyes részecskék elektroforetikus mozgékonyaságától. Egyfajta pozitív diszkrimináció történik az ionos részecskéket illetően, mivel a mozgékonyabb ionok nagyobb mennyiségben jutnak a kapillárisba, mint a kevésbé mozgékonyabb ionok és más részecskék. Az injektált mennyiség (Q) (g vagy mol) a következőképpen számolható ki:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{\text{EOF}})V\pi r^2 C t}{L} \quad (18)$$

ahol μ_e = a részecske elektroforetikus mozgékonyasága
 μ_{EOF} = az EOF mozgékonyasága
 V = feszültség
 r = kapilláris sugara
 C = a részecske koncentrációja
 t = idő
 L = a kapilláris teljes hossza

A (18) egyenlet alapján az injektált minta mennyisége az EOF-tól, a minta koncentrációjától és mozgékonyaságától függ. A vezetőképességben bekövetkező változások, melyek okai elsősorban a mátrix hatások (nagy mennyiségű nem detektált ion, például Na^+ vagy Cl^-), különböző feszültségeséseket, és így különböző injektált mennyiségeket eredményeznek. Emiatt az elektrokinetikus injektálás általában kevésbé reprodukálható méréseket tesz lehetővé, mint amilyen a hidrodinamikus injektálással elérhető. Emellett azonban az elektrokinetikus injektálásnak is vannak pozitív oldalai: nagyon egyszerű, nem igényel külön műszerezettséget, előnyösen alkalmazható viszkózus minták, gélek elemzésénél, amikor a hidrodinamikus injektálás nem használható.

6.2 Elválasztás

Az elválasztási folyamatnál a kapillárist, a CE készüléknek a kapilláris termosztálását végző rendszerét és elektromos tápegységét használjuk.

6.2.1 Kapilláris

A kapilláris anyagának kémiaiailag és elektromosan inertnek, UV és látható fényt áteresztőnek, hajlékonynak, de ugyanakkor kellően szilárdnak és nem túl drágának kell lennie. Ezen követelményeket jelenlegi ismereteink szerint a kvarc elégíti ki leginkább. A kvarcot már régóta használják optikai cellák és gázkromatográfiás (GC) kolonnák anyagául. A GC-s kolonnákhoz hasonlóan, a CE kapillárisokat is poliimid védőréteggel borítják a kapilláris erősítése és könnyebb kezelhetősége miatt. A detektálás helyén, az optikai ablakban ez a műanyag réteg könnyen leégethető, vagy lekapható. A kapilláris lecsupaszított néhány mm-es szakasza azonban igen törékenyvé válik, így óvatosan kell vele bánni. Általában 25-75 μm belső, és 350-400 μm külső átmérőjű kvarc kapillárisok használatosak. A meghatározás idejét tekintve a rövid kapillárisok alkalmazása előnyös. A leggyakrabban használatos effektív kapilláris hosszúság 50-75 cm. Ennél 5-15 cm-rel nagyobb a kapilláris teljes hossza, vagyis a detektor és a kapilláris kimeneti vége közötti távolság. Az előnyös, ha az effektív hosszúság a kapilláris teljes hosszának lehető legnagyobb részét kiteszi a nagy elektromos térerő használata, és a kapilláris kondicionálásához, illetve az elemzéshez szükséges idő csökkentése miatt.

6.2.2 A kapilláris kondicionálása

A jó mérési reprodukálhatóság eléréséhez nagyon fontos a kapilláris kondicionálása, a reprodukálható kapilláris felület kialakítása. Kondicionálásnál a cél a kapilláris belső felületére adszorbeált anyagok eltávolítása és a felület felújítása a szilanol csoportok deprotonálásával. A kondicionálás a kapilláris mosását jelenti előbb 1 M NaOH-val, majd 0.1 M NaOH-val, ezt követően pedig a pufferrel. A meghatározások előtt csak az utóbbi egy vagy két lépést kell végrehajtani. Más mosási eljárások is ismeretesek (pl.: erős savval, metanollal, dimetil-szulfoxiddal vagy különböző detergenssekkel). Az állandó felületi töltés kialakítása történhet a puffer komponenseinek a kapilláris felületére való adszorbciónájával is (pl.: foszfát pufferek esetén).

6.2.3 A kapilláris termosztálása

A reprodukálható mérések végrehajtásához elengedhetetlen a kapilláris hőmérsékletének állandó értéken tartása. ± 0.1 °C pontosságú hőmérsékletszabályzás elsősorban a migrációs idő és a mintainjektálás viszkozitásfüggése miatt szükséges. Ezenkívül a kapillárist el kell szigetelni a környezet hőmérsékleti változásaitól. Bár a folyadéktermosztálás elméletileg hatékonyabb, a légtermosztálás ($\cong 10$ m/s sebességű levegő áramoltatása) általában elegendő a CE-nél képződő viszonylag kis mennyiségű hő elvezetéséhez. A légtermosztálós rendszerek előnye az egyszerű felépítésük és használatuk.

6.2.4 Nagyfeszültségű tápegység

A CE-nél a maximálisan körülbelül 30 kV feszültségű és 200-300 μ A áramerősségű elektromos áram előállításához egyenáramú tápegység használatos. A migrációs idők nagyfokú reprodukálhatóságához (± 0.1 %) jól szabályozott feszültség szükséges. A CE-nél használatos tápegységeknél a polaritás általában megváltoztatható. A szokásos körülmények mellett az EOF a katód felé mozdul. Ebben az esetben az injektálás az anódnál történik. Azonban, ha az EOF-t csökkenteni vagy megfordítani akarjuk, szükség lehet az elektródok polaritásának megfordítására. Bár az állandó feszültségen történő elemzések a leggyakoribbak, néha az állandó áramerősséggel, vagy az állandó teljesítménnyel való munka az előnyös (pl.: izotachoforetikus elemzések). A CE-s tápegység másik sajátága, hogy alkalmas feszültség, áramerősség vagy teljesítmény gradiens megvalósítására a meghatározás időtartama alatt. Ezt a fajta elektromos tér programozást használják a mérések elején esetleg bekövetkező gyors hőtermelés, vagy a bonyolultabb minták meghatározásához szükséges hosszabb mérési idő csökkentése érdekében.

6.3 Detektálás

A CE technikáknál a detektálás egyfajta kihívásnak számít a kapilláris kis átmérője és a felhasznált, csupán nanoliternyi térfogatú minta miatt. Bár a CE egyike a legkevesebb mintamennyiséget felhasználó módszereknek, mégsem tekinthető "nyomanalitikai" módszernek, mivel nagyon kis koncentrációk meghatározására nem alkalmas, vagy pedig elődúsítási eljárás alkalmazása szükséges. Számos, a HPLC-s technikákhoz korábban már alkalmazott detektálási módszert próbáltak ki a CE esetére is, de leggyakrabban az UV-látható fényabszorpciós detektálás használatos. A 3.

táblázat a legfontosabb, CE-vel alkalmazható detektálási módszereket, azok alkalmazásának előnyeit és hátrányait foglalja össze.

3. táblázat Detektálási módszerek

Módszer	Kimutatási határ		Előnyök/hátrányok
	abszolút (mol)	koncentráció (M)	
UV-látható fény elnyelés	10^{-13} - 10^{-16}	10^{-5} - 10^{-8}	<ul style="list-style-type: none"> • univerzális • a diódasor spektrális információkat nyújt
Fluoreszcencia	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}	<ul style="list-style-type: none"> • érzékeny • általában származékképzés szükséges a mintából
Lézer indukált fluoreszcencia	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-14} - 10^{-16}	<ul style="list-style-type: none"> • nagyon érzékeny • általában a minta származékképzése szükséges • drága
Amperometria	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-11}	<ul style="list-style-type: none"> • érzékeny • szelektív, de csak elektroaktív részecskékre jó • speciális elektronikai egység és módosított kapilláris szükséges
Vezetőképesség-mérés	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-7} - 10^{-8}	<ul style="list-style-type: none"> • univerzális • speciális elektronikai egység és módosított kapilláris szükséges
Tömeg-spektrometria	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}	<ul style="list-style-type: none"> • érzékeny és szerkezeti információkat is nyújt • a CE és MS illesztése problematikus
Indirekt UV, fluoreszcencia, amperometria	10-100-szor kisebb mint a direkt módszerek esetén		<ul style="list-style-type: none"> • univerzális • jobb érzékenység mint a direkt módszerek esetén

6.3.1 UV-látható fény abszorpciója

Az UV-látható fény abszorpció elsősorban univerzális detektálási jellege miatt a legszélesebb körben használatos detektálási módszer. Kvarc kapillárisok esetén a detektálás történhet 200 nm-től kezdve a látható fény tartományát felölelve. Nagy hatékonyságú detektálásról azért beszélhetünk, mert a detektálás magán a kapillárison ("on-capillary") történik. Így a detektálási lépés nem okoz zóna kiszélesedést.

Mint minden optikai detektornál, a nagy felbontás érdekében a detektálási hely szélességének a részecskék zónaszélességéhez viszonyítva kicsinek kell lennie. Ez a sajátos kapilláris méretekhez tervezett rés alkalmazásával érhető el. Mivel a CE-nél a csúcsok 2-5 mm szélesek, a réshossz ezen érték legfeljebb egyharmada lehet. A detektor tervezésénél figyelemmel kellett lenni a rövid optikai úthosszra. A fényt közvetlenül a kapilláris belsejébe kell fókuszálni, hogy a résnél maximális áthatolás legyen elérhető, és hogy a lehető legkisebb mértékben jusson a detektorba szórt fény. Mindezek természetesen hatással vannak mind az érzékenységre, mind a lineáris kimutatási tartományra.

Az érzékenység a kalibrációs görbe (egyenes) meredekségeként definiálható. Nagyobb meredekség tehát jobb érzékenységgel egyenlő. Az abszorpciós detektálásnál a részecske abszorbanciája a b abszorpciós úthossztól, a részecske C koncentrációjától és az ε moláris abszorpciós együtthatójától függ (Lambert-Beer törvény):

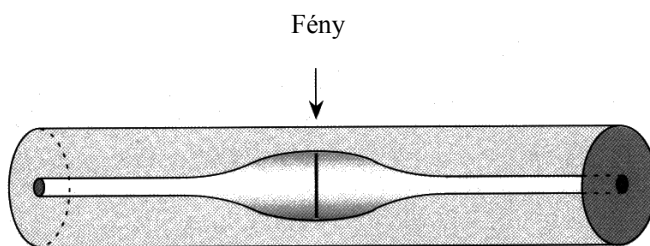
$$A = b C \varepsilon \quad (19)$$

A CE-nél az érzékenységet elsősorban a rövid úthossz korlátozza. A kapilláris görbülete miatt, a tényleges úthossz kisebb, mint a kapilláris belső átmérője, mivel a fénynek csak egy kis része halad át pontosan a kapilláris közepén.

Nagyobb érzékenység gyakran úgy érhető el, ha kis UV-tartományú hullámhosszt használunk a detektáláshoz. Például a peptidek és szénhidrátok nem erős színhordozók (kromoforok), de jól detektálhatók 200 nm-en, vagy az alatti hullámhosszakon. Az ilyen kis hullámhosszaknál történő detektálásnál csak rendkívül kis mértékben elnyelő puffereket szabad használni, mivel a nagy háttérabszorbancia növeli az alapvonal zaját és csökkenti a jelet. E tekintetben a foszfát és borát pufferek használata előnyös, viszont sajnos a legtöbb biológiai puffer (HEPES, CAPS, vagy Tris) használata gyenge eredményekhez vezet 215 nm alatt. A lineáris kimutatási tartományt nagyban korlátozza a detektorba jutó szórt fény. Ideális esetben a teljes fény a kapilláris közepén, és nem a falon keresztül hatol át. A CE-nél a lineáris kimutatási tartomány a kapilláris kis mérete és görbülete miatt általában alacsonyabban van, mint a folyadékkromatográfiás technikáknál (0.4 - 0.7 AU a CE-nél, 1.2-1.5 AU a LC-nél).

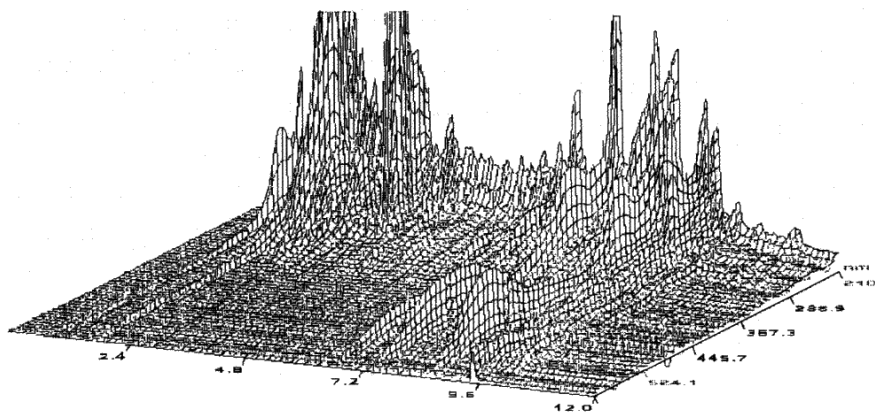
Az érzékenység és a lineáris kimutatási tartomány ugyan javítható a kapilláris belső átmérőjének növelésével, ezt azonban korlátozza az a tény, hogy nagyobb áramerősségek alkalmazása a kapilláris jelentős

felmelegedését vonja maga után. A kapillárisátmérő kétszeres növelése például a jelabszorbanca kétszeres, de az áramerősség négyszeres növekedéséhez vezet. A túlzott áramfelhasználás (és így hőtermelődés) elkerülése érdekében olyan speciális kapillárisokat állítottak elő, melyek átmérőjét csupán az optikai fényút helyén növelték meg. Ilyen kapilláristípust képviselnek a "buborékcellás" (17. ábra) vagy a "Z-cellás" kapillárisok.



17. ábra Megnövelt fényutas (buborékcellás) kapilláris

A diódasoros detektálás lehetővé teszi, hogy csupán egyetlen, vagy egyszerre több hullámhosszon történjen a detektálás. A diódasoros detektor egy olyan akromatikus lencserendszerből áll, mely a fényt a kapillárisba fókuszálja, a fénysugarat ezután diffrakciós rács bontja fel különböző hullámhosszúságú összetevőire, majd ezek a megfelelő elrendezésben lévő fotodiódákra esnek. A fotodiódák száma akár több száz is lehet, és mindegyikük egy keskeny színtartományt ölel fel. A diódasoros detektálás jól használható arra, hogy egy minta összes komponensére megkapjuk, milyen hullámhosszakon érhető el abszorpciós maximumai. Egy megfelelő szoftver automatikusan kiszámolhatja ezen abszorpciós maximumokat és szükség esetén három dimenziós ábrázolásban is képes bemutatni az elemzési idő, hullámhossz és abszorbanca kapcsolatát (18. ábra).



18. ábra Diódasoros detektálás: 3 dimenziós adatanalízis

7. AZ ELEKTROFEROGRAMOK KIÉRTÉKELÉSE

Minden analitikai elválasztási folyamat célja, hogy választ tudjunk adni a következő kérdésekre:

1. Milyen összetevőkből áll a minta?
2. Milyen koncentrációban vannak jelen az összetevők a mintában?

Míg az első kérdés megválaszolásával a minőségi (kvalitatív) analízis foglalkozik, a második kérdésre a mennyiségi (kvantitatív) analízis ad választ.

7.1 Minőségi analízis

A CE-nél a minőségi analízis az elektroferogramon található csúcsok azonosítását jelenti. Ez egy adott csúcs migrációs idejének vagy mozgékonyágának egy ismert vegyület kísérletileg kapott megfelelő eredményeivel való összehasonlításával történhet. Ha ugyanazokat a migrációs időket, illetve mozgékonyági adatokat kapjuk, akkor lehet, hogy a két vegyület azonos. A csúcsok nagy biztonsággal való azonosításának eljárása az alábbi:

- Az injektálást megelőzően adjunk a kérdéses vegyületből a mintához. Az elektroferogramon így kapott csúcsnak nagyobbnak kell lennie az eredeti csúcsnál, még hozzá váll kialakulása nélkül.

- Hajtsuk végre az előző eljárást más elválasztási módszerekkel is (pl.: MEKC, HPLC). Ha nem kapunk más csúcsokat is, akkor a csúcs azonosítását már szinte biztosra vehetjük.
- Teljes bizonyossággal azonosíthatunk egy kérdéses csúcsot, ha kémiai szerkezeti információkat is nyerünk a vegyületről (pl.: CZE-MS technikával).

A csúcsoknak a migrációs idejük alapján történő összehasonlítása állandó kísérleti körülményeket feltételez. A működési paraméterek (pl.: hőmérséklet, puffer pH, puffer ionerőssége, stb.) kis mértékű megváltozása is hatással lehet a részecskék mozgékonyására, és így megbízhatatlanná válhat a csúcs azonosítása.

7.2 Mennyiségi analízis

A mennyiségi analízis információt nyújt a minta egy összetevőjének mennyiségéről vagy koncentrációjáról az elektroferogram egy csúcsának magassága, vagy területe alapján. Míg a csúcsmagasság közvetlenül leolvasható az elektroferogramról, a csúcsterület meghatározásához egy integráló egység (számítógépes szoftver) szükséges. Az anyag ismeretlen mennyisége vagy c_x koncentrációja az a_x csúcsterület és az ismert koncentrációjú standard minták $a_{1...n}$ csúcsterületeinek korrelációja alapján számolható ki. Ehhez két fő eljárás, a külső standard és a belső standard módszerek ismeretesek. Mindkét módszer széles körben használatos az analitikai kémiában.

8. GYAKORLATOK A CZE ALKALMAZÁSÁHOZ

A készülék bekapcsolása és üzemképes állapotba hozása után a kapillárist 10-10 percig 0.1 M NaOH-oldattal, majd a puffer oldattal kell mosatni (kondicionálni). Ezek a szűrt oldatok a gyakorlaton rendelkezésre állnak. A kondicionálási eljárás időtartama alatt kell viszont elkészíteni és 0.45 μm -es szűrőn átszűrni az elemzésre váró oldatokat. A gyakorlat során az alábbi feladatok közül egyet kell végrehajtani.

8.1 Alkálifém és alkáliföldfém ionok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 5 mM imidazol, pH=4.5 kénsavval beállítva

Kapilláris: $l_{\text{eff}} = 56 \text{ cm}$, belső átmérő= 50 μm

Injektálás: 100 mbar \cdot s

Hőmérséklet: 25°C

Feszültség: 25 kV

Detektálás: 214 nm, indirekt ("negatív csúcsok")

Minták: 1. K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Li^+ tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat

2. 10, 30, 50 $\mu\text{g/ml}$ Ca^{2+} -tartalmú oldatok

3. ivóvíz

Feladat:

1. Ca^{2+} migrációs idejének megadása

2. A többi ion migrációs idejének valószínűsítése az elektroferogram és a mozgékonyági adatok alapján (K: 0.68, Na: 0.48, Ca: 0.45, Ba: 0.42 cm^2/kVs)

3. A Ca^{2+} ismeretlen koncentrációjának meghatározása

4. Az ivóvíz fő fémion-tartalmának kvalitatív meghatározása

8.2 Alkilaminok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 5 mM imidazol, pH=4.5 kénsavval beállítva

Kapilláris: $l_{\text{eff}} = 56 \text{ cm}$, belső átmérő= 50 μm

Injektálás: 100 mbar \cdot s

Hőmérséklet: 25°C

Feszültség: 25 kV

Detektálás: 214 nm, indirekt ("negatív csúcsok")

Minták:

1. trimetil-ammónium, tetrametil-ammónium, tetraetil-ammónium és tetrabutil-ammónium ion tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 5, 10, 15 mM tetrabutil-ammónium ion tartalmú oldatok

Feladat:

1. A tetrabutil-ammónium ion migrációs idejének megadása
2. A többi kation migrációs idejének valószínűsítése az elektroferogram és a mozgékonyági megfontolások alapján
3. A tetrabutil-ammónium ion ismeretlen koncentrációjának meghatározása
- 4.

8.3 Nukleotidok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 20 mM foszfát, pH=7.5
Kapilláris: $l_{\text{eff}} = 56$ cm, belső átmérő= 50 μm
Injektálás: 100 mbar · s
Hőmérséklet: 25°C
Feszültség: 25 kV
Detektálás: 200 nm

Minták:

1. NADH, AMP, ADP, ATP tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 5, 10, 15 mM ADP tartalmú oldatok

Feladat:

1. Az ADP migrációs idejének megadása
2. A többi nukleotid migrációs idejének valószínűsítése az elektroferogram és a mozgékonyági megfontolások alapján
3. Az ADP ismeretlen koncentrációjának meghatározása

8.4 Tartósítószer anyagok meghatározása

Körülmények:

Puffer: 20 mM borát, pH=9.4
Kapilláris: $l_{\text{eff}} = 56$ cm, belső átmérő= 50 μm
Injektálás: 100 mbar · s
Hőmérséklet: 25°C
Feszültség: 30 kV

Detektálás: 192 nm

Minták:

1. Benzooesav, szorbinsav és szalicilsav tartalmú, ismeretlen koncentrációjú oldat
2. 5, 10, 15 mM benzooesav tartalmú oldatok

Feladat:

1. A benzooesav migrációs idejének megadása
2. A benzooesav ismeretlen koncentrációjának meghatározása
3. "Coca Cola" konzerválószerének meghatározása

9. A SEGÉDANYAGBAN SZEREPLŐ RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

CE	Capillary electrophoresis	Kapilláris elektroforézis
CGE	Capillary gel electrophoresis	Kapilláris gélelektroforézis
CIEF	Capillary isoelectric focusing	Kapilláris izoelektromos fókuszálás
CITP	Capillary isotachopheresis	Kapilláris izotakoforézis
CZE	Capillary zone electrophoresis	Kapilláris zónaelektroforézis
EOF	Electroosmotic flow	Elektroozmotikus áramlás
GC	Gas chromatography	Gázkromatográfia
HPCE	High performance capillary electrophoresis	Nagyteljesítőképességű kapilláris elektroforézis
HPLC	High performance liquid chromatography	Nagynyomású (nagyteljesítőképességű) folyadékkromatográfia
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography	Micelláris elektrokinetikus kromatográfia
MS	Mass spectrometry	Tömegspektrometria
NF		Nagyfeszültség
RSD	Relative standard deviation	Relatív standard deviáció
UV	Ultra-violet	Ibolyántúli (fény)

ATOMSPEKTROMETRIA

1. BEVEZETÉS

A kémiai analízis optikai módszerei nagy módszer családot alkotnak. Közös jellemzőjük, hogy a vizsgálati anyag és az optikai sugárzás (fény) valamilyen kölcsönhatását használják fel az anyagösszetétel megállapítására. Optikai sugárzásnak nevezzük az elektromágneses sugárzás azon részét, amely a fizikai optika eszközeivel és módszereivel vizsgálható. Az optikai módszerek egyik csoportjában a fényt nem bontjuk fel hullámhossz szerint (pl. refraktometria, polarimetria). Az optikai módszerek másik csoportjában azonban a fény hullámhossz szerinti felbontására is sor kerül, ezeket összefoglalóan *optikai spektroszkópiai módszerek*nek nevezzük. Mi most csak az utóbbi módszerekkel kívánunk foglalkozni. Az optikai spektroszkópiai módszereket két fő csoportra oszthatjuk: az *atomspektroszkópiai* és a *molekulaspektroszkópiai* módszerekre. Ezt a felosztást analitikai szempontból az indokolja, hogy az előbbi módszerekkel az anyagok elemi összetétele, az utóbbiakkal pedig a molekulaösszetétel határozható meg. Az ilyen felosztásnak további alapja az is, hogy a kétféle módszer csoportnak meglehetősen eltér az elméleti ismeretanyaga.

2. AZ ATOMSPEKTROSKÓPIA KIALAKULÁSA

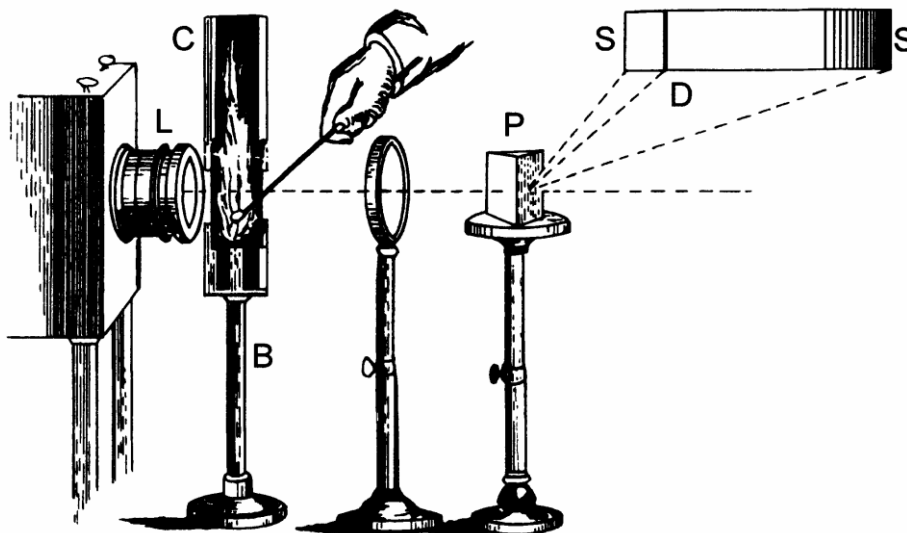
Lángszínezést *Marggraf* már 1758-ban alkalmazott a nátrium- és a káliumsók megkülönböztetésére. A 18. század végétől az atomok spektrumának vizsgálata a fizikusok érdeklődését is erősen lekötötte. *Wollaston* 1802-ben figyelt fel arra, hogy a Nap spektrumában fekete vonalak észlelhetők, de ennek a jelenségnek nem tulajdonított különösebb jelentőséget, és nem is foglalkozott vele részletesen. Ezeket a vonalakat ma *Fraunhofer*-féle vonaloknak nevezzük. *Fraunhofer* építette az első mai értelemben vett spektroszkópot, és 1815-től kezdve részletesen vizsgálta a Nap spektrumában észlelhető vonalakat. Mintegy 576 vonalat ismert fel. Ezeket a vonalakat az A, B, C, D, E ... a, b, c, d, e ... betűkkel jelölte. (Ebből a jelölésből maradt ránk például a nátrium közismert sárga vonalának nátrium-D elnevezése.) *Fraunhofer* arra is rájött, hogy az alkohol lángjába helyezett nátrium spektrumában ugyanott jelenik meg a sárga D-vonal, ahol a Nap színeképében ez a vonal hiányzik. *Herschel* 1822-ben már

megállapította, hogy a lángba helyezett különböző sók spektrumának vizsgálata módot ad arra, hogy az anyagot egyértelműen fel lehessen ismerni. Tulajdonképpen ezzel vette kezdetét a spektrálanalízis.

Bunsen az ásványvizek sóinak elemzésére szintén a lángszínezést használta fel. A Bunsen-égőt abból a célból fejlesztette ki, hogy színtelen gázlánggal tudjon vizsgálni. (Bunsen újítása abban volt, hogy levegőt vezetett az éghető gázhoz, mielőtt az égni kezdett.) *Kirchhoff* és Bunsen 1859-ben megjelent közös cikke nagy lendületet adott a különböző anyagok spektrumának vizsgálatához, mivel megadták a spektrumra vonatkozó addigi ismeretek értelmezését: ha az egyes gázok vagy gőzök atomjaival energiát közlünk, akkor azok rájuk jellemző vonalas spektrumot bocsátanak ki (1. ábra). Ugyanezek az atomok viszont képesek a kibocsátott fény hullámhosszával egyező hullámhosszal rendelkező fényt elnyelni. Így jelennek meg az izzó szilárd testek és folyadékok által kibocsátott folytonos színekben az abszorpciós vonalak (Fraunhofer-féle vonalak a Nap színekében).

Ez a felismerés meggyorsította az új elemek felfedezésének ütemét. 1861-ben ilyen módon fedezték fel például a céziumot és a rubídiumot, valamint 1866-ban a héliumot is a Nap spektrumában. (A Földön ekkor még nem találtak ezzel az elemmel, és ezért is nevezték el a Nap görög neve (helios) után héliumnak.)

1928-ban készítette el *Lundegardh* azt a lángspektrográfot, mely alkalmas volt az elemek nemcsak minőségi, de mennyiségi meghatározására is. Összekapcsolta illetve továbbfejlesztette a már előtte is ismert porlasztási technikát, acetilén-levegő lángot és spektrográfiát. A fotoelektronsokszorozók megalkotása után (Bay Zoltán, 1938) az 1950-es években megjelentek az első fotoelektromos detektálási rendszerű emissziós spektrométerek. Az első atomabszorpciós spektrofotométert az ausztrál *Walsh* és munkatársai építették meg 1957-ben. E készülékek alkalmazása a kutatásban, az iparban, a klinikai, vízügyi és környezetvédelmi laboratóriumokban széleskörű. (Városunkban is több tíz lángspektrométer van jelenleg is használatban.)



1. ábra: Kirchhoff és Bunsen által használt kísérleti összeállítás a nátrium spektrumának vizsgálatához. A folytonos sugárzású fényforrás fényét az L lencse segítségével Bunsen-égő lángjába fókuszálták, a lángba egy spatulával NaCl-ot vittek. A lángot elhagyó fényt a P prizmával bontották összetevőire, majd az S ernyőn figyelték meg a kapott spektrumot. A nátrium D-vonala fekete vonalként jelent meg a folytonos színekben.

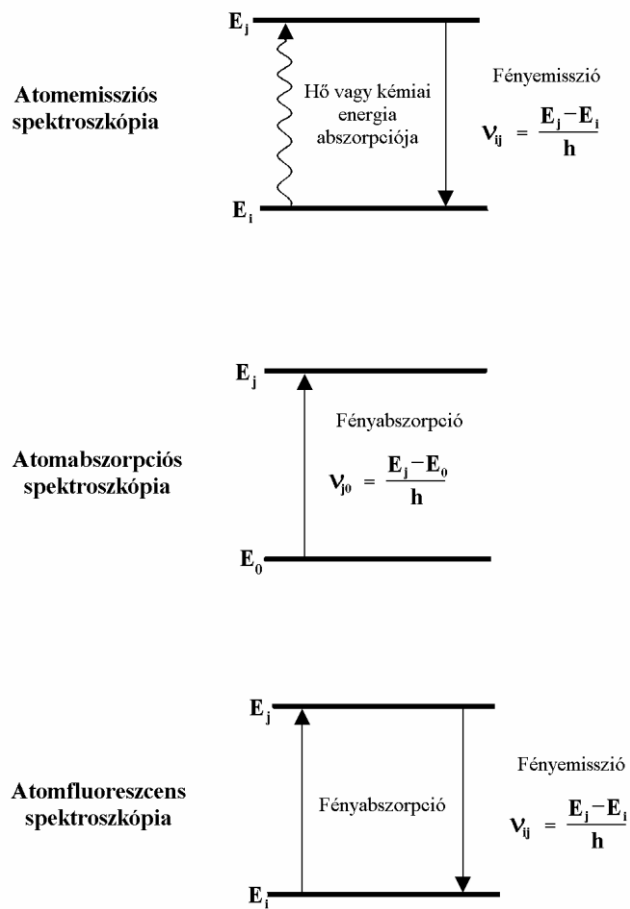
A lángspektrometria három alapvető módszert foglal magába (2. ábra). Amennyiben gerjesztett molekulák, gerjesztett atomok, esetleg gerjesztett ionok által kisugárzott molekulasávok illetve atom- és ionvonalak intenzitását mérjük, *lángemissziós spektrometriáról* (FES) beszélünk.

Ha a lángon olyan hullámhosszúságú fénynyalábot bocsátunk keresztül, melyet az alapállapotú atom képes abszorbeálni, és mérjük az így bekövetkezett fényintenzitás-csökkenést, akkor *lángatomabszorpciós spektrometriáról* (FAAS) van szó.

Ha az alapállapotú atomokat ugyancsak külső fénnel sugározzuk be, de nem a részecskék által abszorbeált, hanem az abszorpciót követően adott hullámhosszon kisugárzott vonalak intenzitását mérjük, akkor ez a módszer az *atomfluoreszcens spektrometria* (AFS).

A három módszer közül a legnagyobb jelentősége a lángatomabszorpciós spektrometriának van. Jóval szűkebb területen alkalmazható a lángemissziós spektrometria. Az atomfluoreszcens módszer ugyan igen érzékeny, de csak

néhány elem meghatározásánál vetekszik a FAAS teljesítőképességével, emiatt viszonylag kevésbé elterjedten használatos. Az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőséget kap viszont a lángnélküli atomizáló módszer (grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GFAAS)), mely nagyon érzékeny és kis mintaigényű.

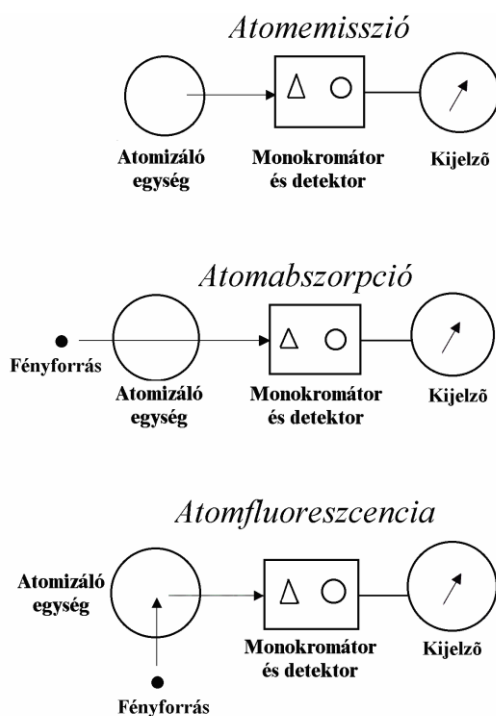


2. ábra: A FES, FAAS és AFS módszerek elve

3. A LÁNGSPEKTROMÉTEREK FELÉPÍTÉSE

A lángspektrométerek legtöbb részegysége azonos vagy igen hasonló, ezért a kereskedelmi atomabszorpciós készülékek használhatók lángemissziós spektrométerként is (3. ábra). A FES-nél a vizsgált részecskéket (gerjesztett atomokat) pusztán a láng segítségével állítjuk elő, de a FAAS-nél és az AFS-nél külső fényforrást használunk az alapállapotú atomok gerjesztéséhez. A FAAS-nél a fényforrás fénye (pontosabban annak az alapállapotú atomok által el nem nyelt része) közvetlenül a fényfelbontó egységre, a monokromátorra jut (a fényforrás, a láng és a monokromátor egy vonalban van), az AFS-nél viszont a fényforrás fénye közvetlenül nem juthat a monokromátorra, és itt csak az "újra" emittált fényt mérhetjük.

Az újabb készülékekben a fény felbontását végző egység (monokromátor) a diffrakációs rács, a fény detektálása pedig fotoelektronsokszorozóval történik. A spektrométerek jelkiolvasó/kijelző egységei nagyon különbözőek lehetnek (analog vagy digitális kijelzők, grafikus "rekorderek") de az újabb készülékek szinte mindegyike számítógépes jelfeldolgozást és kijelzést alkalmaz.

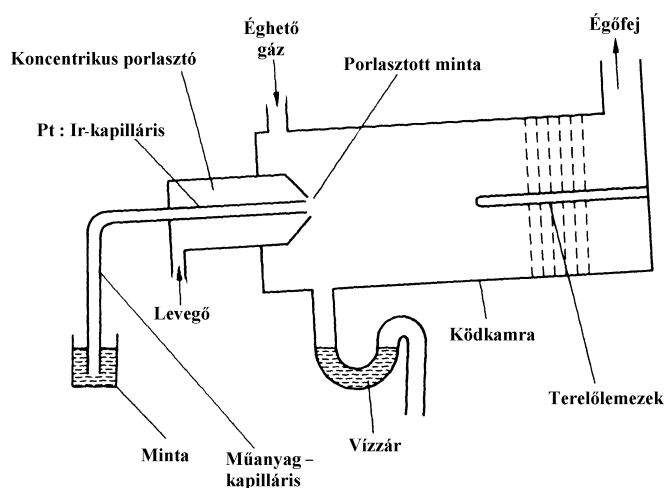


3. ábra: Az atomspektrometriás módszerekhez használt készülékek elve

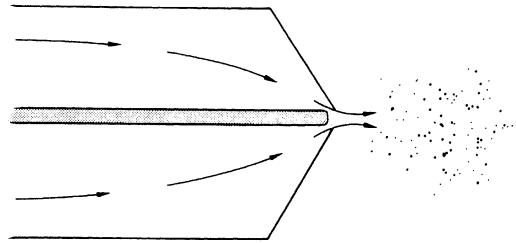
3.1 Mintabevitel

A mintabevitel célja (a többnyire folyadék halmazállapotú) minta jól reprodukálható, nagy hatékonyságú bevitelére a lángba úgy, hogy a zavaró hatások minél csekélyebbek maradjanak (a folyadékot finom aeroszolként kell bejuttatni a lángba). A mintabevitel leggyakrabban porlasztás segítségével történik. A porlasztás során keletkező kis méretű cseppek a láng növekvő hőmérsékletű zónáin áthaladva fokozatosan átalakulnak. Fontos, hogy a kellően kis cseppek ($> 5\mu\text{m}$) lehetőleg azonos méretűek legyenek, hogy a keletkező cseppek minél nagyobb részének deszolvatálódása, és ezt követően az alap-, ill. gerjesztett állapotú atomok képződése a láng azonos magasságú részében történjen.

Az oldatok porlasztására az indirekt *pneumatikus porlasztás* a leggyakrabban alkalmazott módszer, melynek hatásfoka kb. 10 %. A 4. ábrán egy előkevert lángokhoz használt, tipikus pneumatikus porlasztórendszer felépítése látható. A minta egy műanyag kapillárison jut be a porlasztóba. Az ábrán bemutatott koncentrikus porlasztóban a kapillárisból kilépő folyadékmintát körülveszi az égést tápláló gáz (levegő). Ez a nagy sebességű gáz, kilépve a porlasztófej elején található keskeny nyíláson nyomáscsökkenést okoz a kapillárisban, mely a folyadék felszívását eredményezi. A nagy sebességű gáz mellett apró cseppekre tördeli a folyadékot, és így aeroszolt kapunk. Ez utóbbi jelenséget nevezik Venturi hatásnak (5. ábra).

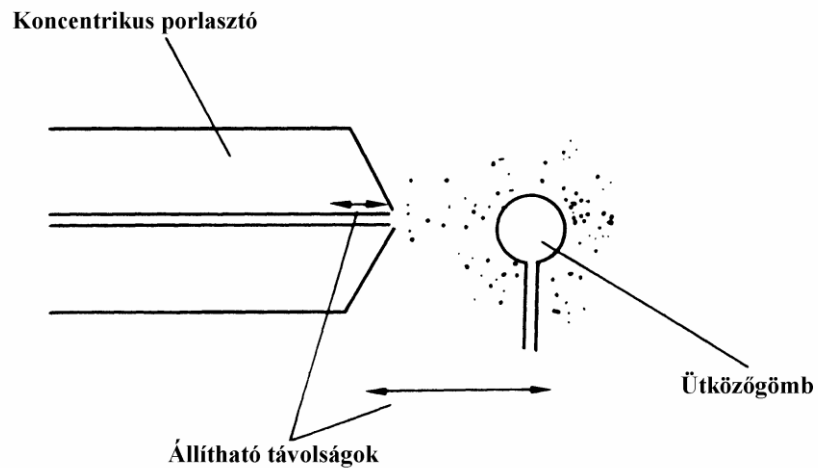


4. ábra: A koncentrikus pneumatikus porlasztórendszer felépítése



5. ábra: A Venturi hatás

A porlasztó kapillárisának helyzete egy csavar segítségével állítható, így módon optimálható a folyadék felszívási sebessége és a képződő cseppek mérete. A képződő primer aeroszol cseppméreteloszlását tovább finomítja a porlasztófejjel szemben elhelyezett ütközőgömb (szekunder aeroszol). Az aeroszol nagyobb cseppjei nekicsapódnak az ütközőgömbnek, a kisebb cseppek viszont ki tudják azt kerülni (6. ábra). Az így kapott aeroszol áthaladva a ködkamrán az égőfejen keresztül jut a lángba. A ködkamrában lecsapódott folyadék egy vízzárral ellátott csövön keresztül távozik el.



6. ábra: Az ütközőgömb szerepe a szekunder aeroszol kialakításában

3.2 Égők és lángok

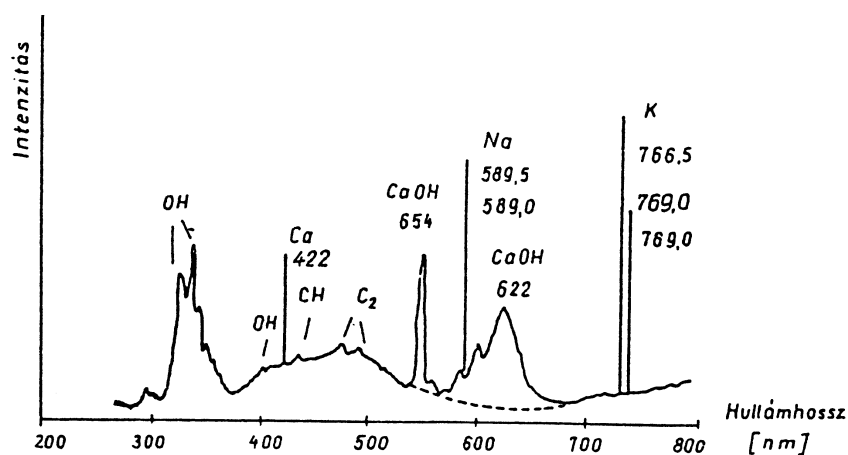
Az első spektrométerek *Meker-égőket* alkalmaztak. Ezek az égők tulajdonképpen olyan csövek, melyek tetejét egy sok lyukból álló lap fedi. Alkalmazásuk kis sebességgel égő lángokhoz megfelelő. Jelenleg a *réses égők* a leggyakrabban használatos égők. A 10 cm hosszú rés különösen a levegő/acetilén lángot alkalmazó abszorpciós mérésekhez előnyös. A réses égők tervezésében a rés szélessége, hossza és a fémtest hővezetése alapvető fontosságú.

A legáltalánosabban használt lángok hőmérséklete 2200-3300 °C tartományba esik (1. táblázat). E hőmérséklettartományban gyakorlatilag csak $E < 4.5$ eV gerjesztési energiájú színeképvonalak gerjeszthetők. A lángszínekben így módon a fémek elemeknek csak a kis gerjesztési energiájú, 275 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú atomvonalai (elsősorban alapvonalak) találhatók meg.

A lángból származó fényemisszió összetett. A leggyakrabban használt acetilén/levegő láng használata esetén az emissziós spektrum a következőkből tevődik össze:

- a láng alapsugárzásából (az oldószerből, általában vízből származó OH gyökök és a lánggázokból keletkező CH, C₂ stb. gyökök sávjaiból),
- a lángban gerjesztett atomok színeképvonalaiból és a molekulák sávjaiból.

A nátriumot, káliumot és kalciumot tartalmazó acetilén-levegő láng egyszerűsített emissziós spektrumát mutatja be a 7. ábra.

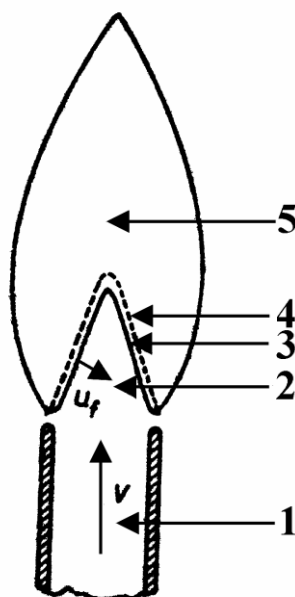


7. ábra: Acetilén-levegő láng emissziós spektruma Na, K és Ca jelenlétében

1. táblázat: A lángspektrometriában alkalmazott, sztöchiometrikus gázelegyű lángokkal elérhető maximális lánghőmérsékletek.

Elegypár	°C
Szénhidrogén (metán, propán-bután) - levegő	1900
Acetilén - levegő	2300
Hidrogén - oxigén	2700
Acetilén - dinitrogén-oxid	3000
Dicián - oxigén	4500
Szénszubnitrid (C_4N_2) - ózon	5300

A lángokat többféle szempont szerint osztályozhatjuk. Az egyik felosztás az éghető és az égést tápláló komponens elegyedési módja szerint történik: ha a gázok az égés előtt összekeverednek, mint pl. a Bunsen égőben, akkor *előkevert* lángokról beszélünk, ha az égést tápláló oxigén a lángot körülvevő levegőből jut be a lángba, akkor a lángot *diffúziós* lángnak nevezzük (ilyen pl. a gyertya lángja).



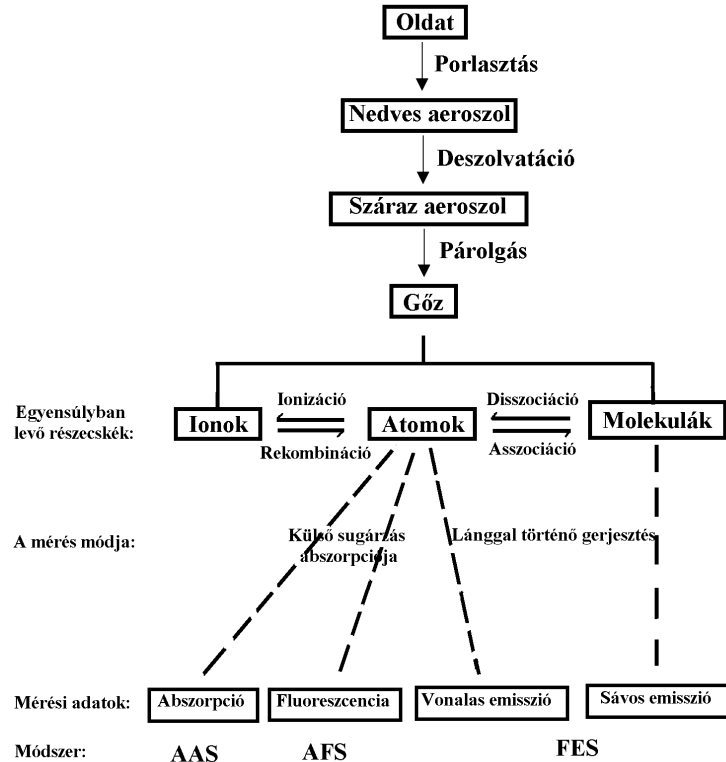
8. ábra: A Bunsen-láng vázlatos rajza

1 az égő szája; 2 az előmelegedési zóna; 3 a reakciózóna; 4 a belső égési zóna; 5 a külső égési zóna, v a gázkeverék áramlási sebessége, u_f a láng égési sebessége

Megkülönböztetjük a lángokat a komponensek áramlási sebessége és az égés sebessége szerint is, így *lamináris* lángoknak nevezzük azokat a lángokat, amelyeknél az áramlást jellemző Reynolds-szám (Re) kisebb mint 2300. Nagyobb Re szám esetén, vagyis nagyobb égési sebesség esetén a láng *turbulens*. Stacionárius, álló láng akkor jön létre, ha a gázok áramlási sebessége (v) azonos az égés ellentétes irányú sebességével (u_f), ha ennél nagyobb, a láng "elszáll", ha kisebb, "visszaég".

3.3 A lángban végbemenő folyamatok

A folyadékcseppből először elpárolog az oldószer, és szilárd aeroszolrészecske (mikrométerű sókristály) keletkezik, mely a következő lépésben elveszíti kristályvizét (ha ezzel rendelkezett), majd megolvad és elpárolog, vagyis molekulagőz képződik. A láng nagyobb hőmérsékletű zónáiban végbe megy a molekulák termikus disszociációja: alapállapotú atomok keletkeznek (az atomabszorpciós elemzésekhez csak ezek a részecskék hasznosak!). Természetesen, ha a lánghőmérséklet lehetővé teszi, a termikus folyamatok tovább mennek, az alapállapotú atomokkal egyidejűleg a lángban gerjesztett atomok, sőt ionok is jelen lesznek (ezek a gerjesztett részecskék csak az atomemissziós elemzésekhez hasznosak!).



9. ábra: A lángban végbemenő folyamatok

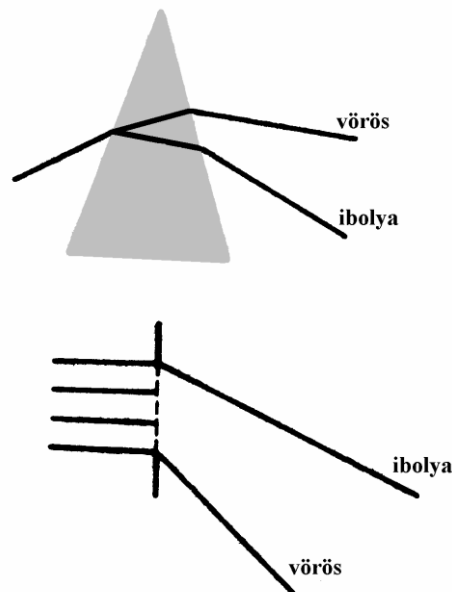
3.4 A fény felbontása

A lángot elhagyó fényt megfelelő optikai berendezéssel keresztül vezetjük a detektáló egységhez. A láng alapsugárzása, illetve a jelenlevő más fémek emissziója miatt ugyanis közvetlen fényméréssel nem kaphatunk helyes eredményeket. Az optikai berendezés segítségével igyekszünk a zavaró sugárzásokat kiiktatni, s csupán a vizsgált fémre jellemző, közel monokromatikus fénysugarat engedjük a detektorba jutni. Míg korábban különböző *színszűrőkkel* igyekeztek megoldani ezt a feladatot, ma már gyakorlatilag csak *monokromátorok*at használnak. A monokromátorok kb. 0.01-1 nm szélességű keskeny hullámhossz-tartományt képesek elkülöníteni egy széles (190-800 nm) színtartományon belül. A monokromátorok két fő típusa a *prizma* és az *optikai (diffrációs) rács*. A vizsgálathoz szükséges hullámhosszt a prizma vagy a rács forgatásával választják ki. A rés

szélességének növelésével a fényintenzitás ugyan nő, de a spektrális tisztasága csökken.

A *prizma* anyaga UV-tartományban kvarc, láthatóban üveg. A prizmás monokromátorok előnye, hogy fénydús spektrumot adnak; hátrányuk viszont, hogy felbontóképességük kicsi.

Az *optikai rács* olyan üveg-, kvarc- vagy tükröző fémfelület, amelyen egymáshoz közel eső, egymástól egyenlő távolságra levő (1000-4800 vonás/mm) párhuzamos rovátkák (karcolatok) vannak. A karcolatok köze fényáteresztő rés, a karcolat maga a fényt át nem eresztő akadály. A nagyszámú karcolat miatt igen éles maximumokkal rendelkező elhajlási interferenciaképet kapunk (Huygens-elv). A fehér (vagyis kevert) fényrel megvilágított rács a különböző hullámhosszú sugarakat különbözőképpen téríti el. Az egyes hullámhosszaknak, vagyis a színeknek más és más irányba eső éles vonalak felelnek meg, azaz a rács - akár a prizma - homogén színekre bontja a fehér fényt. A 10. ábra a prizmával és a ráccsal előállított diszperziós, illetve diffrakciós színek néhány színének sugármenetét mutatja. Optikai rácsként ma már szinte kizárólag tükröző fémfelületet használnak (lásd 11.a és b ábrákban). A 2. táblázat pedig a különböző színekhez tartozó hullámhosszakat tartalmazza.

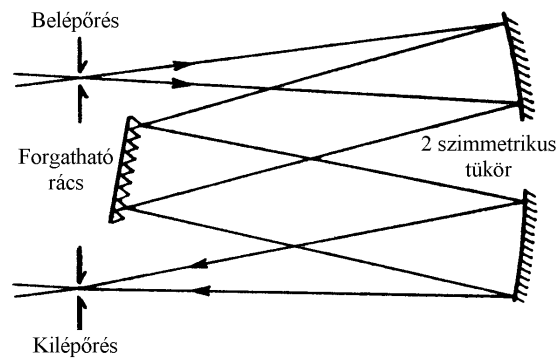


10. ábra: A prizmával és a ráccsal előállított spektrum néhány színének sugármenete

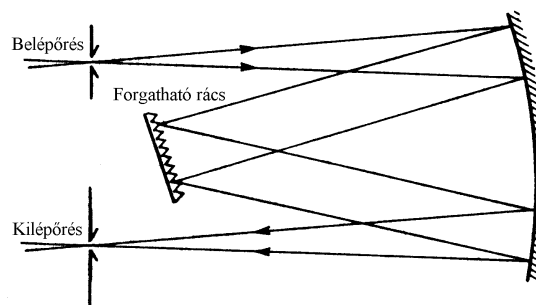
2. táblázat: Különböző színárnyalatokhoz tartozó hullámhosszak

Színárnyalat	Hullámhossz (nm)
Vörös	720
Narancsvörös	656
Narancs	600
Sárga	589
Zöld	495
Zöldeskék	490
Kék	410
Ibolya	396

Ma már az optikai rácsokat többnyire nem szimmetrikus karcolatokkal, hanem ún. echelette karcolással látják el, a fényerősség növelése érdekében. Az optikai rács alaptípusai: a) síkrács lencsékkel vagy tükrökkel kombinálva (pl. Czerny-Turner- vagy az Ebert-elrendezés), b) konkáv rács (pl. Paschen-Runge-elrendezés), c) prizma és rács kombinációja.



11.a ábra: A Czerny-Turner Ebert-elrendezés

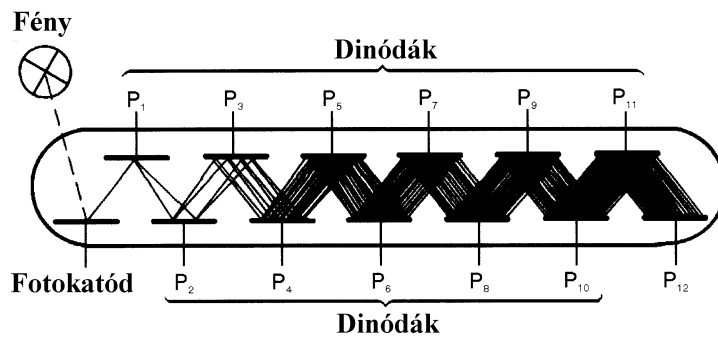


11.b ábra: Az Ebert-elrendezés

3.5 Detektor

A monokromátoron keresztüljutott fény erősségét különböző mérőműszerekkel mérhetjük. A lángfotometriás módszerek kialakulásának első éveiben használatos fotográfias fénymérés a gyakorlatból mára már teljesen kiszorult, helyettük manapság kizárólag fotocellát vagy fotoelektron-sokszorozót alkalmaznak. A *fotoelektron-sokszorozók* erősítési faktora (az anódra érkező elektronok száma osztva a katódot elhagyó elektronok számával) a 10^{10} értéket is elérheti. Ez azt jelenti, hogy elektronsokszorozóval olyan kis intenzitású fény is észlelhető, amely a legérzékenyebb fotográfiai emulzió is csak több órás expozíció esetén hoz létre mérhető feketedést.

A fotoelektron-sokszorozók működésének elve az, hogy a K katódra érkező fotonok külső fényelektromos hatással elektronokat váltanak ki, amelyek a katód és a P1 dinód közötti feszültségesés hatására a dinód felé áramlanak. A P1 dinód felületén a beeső elektronok szekunder elektronemissziót hoznak létre, amelynek intenzitása nagyobb, mint a primer elektronáram. Ez a folyamat a következő dinódákon (P2-P11) megismétlődik, egészen az anódig (A). Az elektronok száma exponenciálisan növekszik a dinódák számával (12. ábra).



12. ábra: Fotoelektron-sokszorozós detektáló rendszer vázlatja

4. LÁNGEMISSZIÓS SPEKTROMETRIA (FES)

A lángemissziós spektrometria tulajdonképpen a minőségi analízisből ismert lángfestési próbának a mennyiségi analitikai alkalmazása. Mint azt korábban említettük, már az alkimisták is tudták, hogy egyes anyagok a színtelen (borszesz) lángot jellemző módon színezik. Egyes elemek atomjai különösen könnyen párologó vegyületük alakjában, már a gázláng néhány száz °C fokos hőmérsékletén gerjednek, ionizálódnak, és a felvett hőenergiát jellemző hullámhosszúságú - tehát jellemző színű - fény alakjában sugározzák vissza. Különösen az alkáli- és alkáliföldfémeknek van meg ez a tulajdonsága, más elemek atomjai azonban csak jóval nagyobb - esetleg csak több ezer fokos hőmérsékleten gerjednek. Ha egy szilárd anyag vizsgálatánál az anyagot sósavval nedvesítjük meg, és kb. 1 mm átmérőjű karikára görbített végű platina huzalra tapasztva nem világító gázlángba helyezük, megfigyelhetünk valamely fellobbanó színt. Sokkal pontosabbá tehetjük a vizsgálatot, ha nem szabad szemmel, hanem kis kézi spektroszkóppal észleljük és figyeljük meg a lángfestést. Ebben az esetben a készülék látóterében megjelenő színes vonalak hullámhossza is megállapítható a látható színek tartományban (400 és 800 nm között).

A lángemissziós vizsgálatok elméleti alapja, hogy amikor egy atom egy energiakvantumot elnyel, *gerjesztett állapotba* kerül. Ha a gerjesztett atom visszatér az alapállapotba, fényt bocsát ki. Amikor például üveget hevítünk gázlángban, a sárga fény úgy jön létre, hogy a gerjesztett nátriumatomok visszajutnak az alapállapotba. A kibocsátott fény energiájából kiszámolható a fény frekvenciája vagy hullámhossza:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

A h arányossági tényező a Planck-féle állandó ($6.63 \cdot 10^{-34}$ Js), ν a fény frekvenciája, λ a fény hullámhossza, c a fény sebessége vákuumban ($\approx 3 \cdot 10^8$ m/s).

Az atomok gerjesztési energiája és a kibocsátott fény hullámhossza az atomok minőségére jellemző. A gerjesztett állapotban levő atomok száma a hőmérséklettel exponenciálisan nő, a nagy gerjesztési energiájú atomok kis hányada lesz csak gerjesztett állapotban a láng hőmérsékletén. A gerjesztett állapot élettartama csupán 10^{-8} s nagyságrendű, ennek elteltével az atom spontán emittál egy fotont. A lángemissziós spektrometriás elemzések során a mintaoldatot lángba porlasztjuk és az emittált fény erősségét (intenzitását)

mérjük. Az így mért emisszió alapján, ismert koncentrációjú oldatokkal nyert összehasonlító görbék segítségével meghatározhatjuk az ismeretlen minta koncentrációját

Nagyobb mintakoncentrációk esetén fellép az önabszorpció jelensége is: a láng belsejében levő atomok által emittált fény egy részét a láng külső (alacsonyabb hőmérsékletű) részén található gerjesztetlen fématomok elnyelik, majd a tér minden irányába kisugározzák, így a detektor irányába kevesebb fény jut, a mért emisszió tehát kisebb.

A lángemissziós spektrometria gyors és olcsó módszer, amely elsősorban a könnyen gerjeszthető alkálifémek, alkáliföldfémek elemzéséhez alkalmas. A többi elem a láng viszonylag alacsony hőmérséklete miatt kevésbé gerjeszthető. Az alacsony hőmérséklet miatt viszont különösen a könnyen ionizálódó alkálifémek esetén ez a módszer igen érzékeny, mivel a nagyobb hőmérsékletű sugárforrásokban (pl. plazmában) a gerjesztett atomhányad csökken a nagymérvű ionizáció hatására. Napjainkban különösen az orvosi diagnosztikában terjedt el, a vér illetve más testnedvek nátrium, kálium tartalmának vizsgálatához. A módszer alkalmazási területe magasabb hőmérsékletű lángok használatával (acetilén/dinitrogén-oxid) jelentősen kiterjeszhető.

5. LÁNGATOMABSORPCIÓS SPEKTROMETRIA (FAAS)

Az atomabszorpciós módszer alapállapotú, szabad atomok fényelnyelésének mérésén alapuló mennyiségi analitikai eljárás. Az alapállapotú atomok elektromágneses sugárzás (fény) hatására gerjesztődnek (elektrongerjesztés), miközben a gerjesztési energiának megfelelő hullámhosszú foton elnyelik. Az atomok abszorpciós spektruma (amint az emissziós spektruma is) vonalas szerkezetű, a vonalak pontosan meghatározott hullámhossznál jelentkeznek és nagyon kicsi, megközelítőleg 0.001 nm a félértékszélességük. Az atomok ilyen típusú abszorpciós spektruma adja az atomabszorpciós módszer nagy szelektivitását. Egy adott elem legjobb vonalának hullámhosszán a többi atom elnyelésének nagyon kicsi a valószínűsége, ez azt eredményezi, hogy összetett, sok elemet tartalmazó rendszerek is elemezhetők az elemek kémiai elválasztása nélkül. Ez a lehetőség nagy előnyt jelent a molekulák fényelnyelésének mérésén alapuló spektrometriás módszerekkel szemben, ahol a sávos abszorpció következtében nagy az optikai zavarás valószínűsége és általában csak elválasztási módszerek alkalmazásával lehet összetett rendszereket elemezni.

Az atomabszorpciós módszer az atomforrásban kialakuló szabad atomok koncentrációját méri. Az elemzendő fém vonalán észlelt fényintenzitás csökkenés és a fém szabad atom koncentrációja közötti összefüggés a Lambert-Beer törvénnyel írható le.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot c \cdot l$$

ahol A = abszorbancia
 I_0 = a fény intenzitása az abszorpció előtt
 I = a fény intenzitása az abszorpció után
 a = abszorpciós koefficiens (anyag minőségétől függő állandó)
 c = az atomizáló tér (láng) egységnyi térfogatában levő alapállapotú, szabad atomok száma
 l = az az úthossz, amit a sugárnyaláb az atomizáló térben megtesz

Az abszorbancia tehát lineáris összefüggésben van a térfogategységben jelenlevő alapállapotú, szabad atomok számával. A lángban képződő alapállapotú atomok száma pedig arányos a megfelelő oldatkoncentrációval. Kétszer akkora oldatkoncentráció kétszer akkora alapállapotú atomkoncentrációt szolgáltat az atomizálótérbe. (A helyes elemzés további

feltétele persze, hogy a kalibráló oldat és a mintaoldat mintabeviteli és atomizációs körülményei azonosak legyenek.)

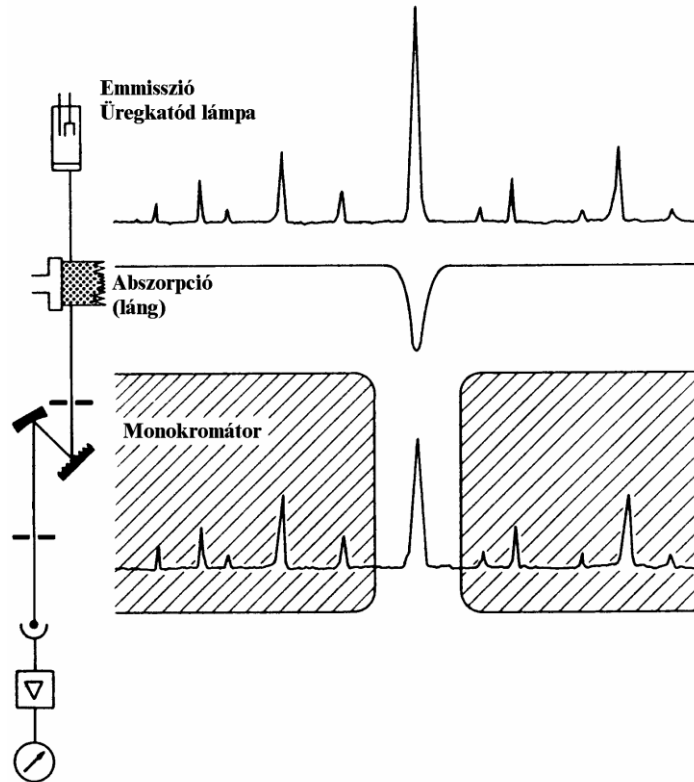
Magas hőmérsékleten az atomok egy része gerjesztődik, sőt egy része ionizálódik is. A statisztikus mechanika szerint az alap- és gerjesztett állapotban levő atomok számának aránya a hőmérséklet függvényében a következő összefüggés szerint változik:

$$\frac{N_q}{N_0} = \frac{g_q}{g_0} e^{-\frac{h\nu}{kT}}$$

ahol N_q a gerjesztett, N_0 az alapállapotban levő atomok száma; g_q és g_0 a kétféle állapothoz tartozó statisztikus súly; k a Boltzmann-állandó; T az abszolút hőmérséklet.

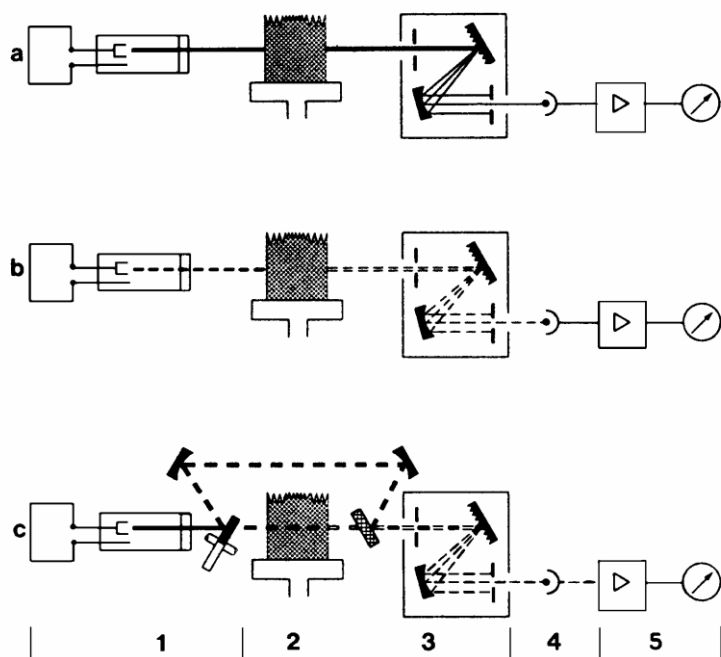
Az egyenlet alapján kiszámítható a gerjesztett és az alapállapotban levő atomok számaránya a lángban 2000-3000°C-on, s megállapítható, hogy a gerjesztett atomok száma elhanyagolhatóan kicsi az alapállapotban levő atomokéhoz képest. Ez kedvező körülmény az atomabszorpciós mérések szempontjából.

Ahhoz, hogy atomabszorpciós méréseket végezhessünk, a mérendő elem karakterisztikus, éles vonalas színeképét létrehozó sugárforrás fényét át kell bocsátani a lángon, amelybe a mintaoldatot finom permet formájában porlasztjuk be. A színeképnek azt a szűk tartományát, amelyben az elem rezonanciavonala van, monokromátorral választjuk el a színekép többi részétől. A kiválasztott rezonanciavonal a fényérzékelő detektorba (pl. fotoelektron-sokszorozóba) jut, amelynek kimenő jelét erősítik. Az atomabszorpciós spektrométer elvi felépítése a 13. ábrán látható.



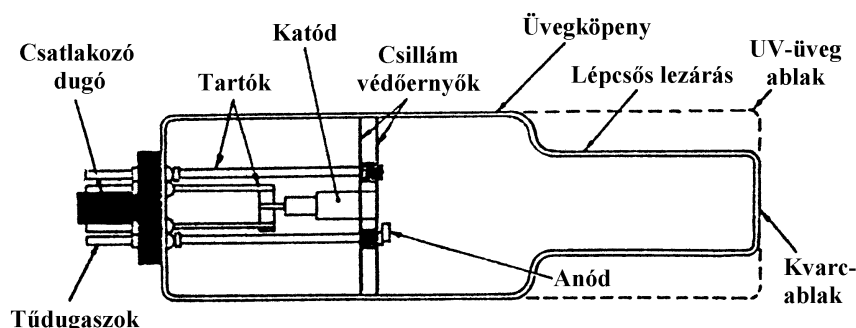
13. ábra: Az atomabszorpciós spektrométerek felépítése

Az abszorpciós mérés során a lángban (atomforrásban) keletkező emissziót célszerű kirekeszteni, ami a fényforrás fényének modulálásával (a fény adott frekvenciával történő szaggatásával, vagy impulzusszerű megvilágítással) és a megfelelő jelfeldolgozással oldható meg (14.b ábra). Így az üregkatódból származó jelet a detektor erősítő rendszerében váltóáramú jelként dolgozhatjuk fel, ellentétben a lángból származó sugárzás egyenáramú jelével. Utóbbi jelet így alkalmas áramköri megoldással (pl. kondenzátorral) elválaszthatjuk, kiszűrhetjük a váltóáramú hasznos jel mellől. Ennek megvalósítása alapján egyfényutas és kétfényutas készülékeket különböztetünk meg (14.b és 14.c ábrák)



14. ábra: Az egy- (a, és b,) illetve kétfényutas (c,) atomabszorpciós spektrométerek felépítése(1: sugárforrás, 2: láng, 3: monokromátor, 4: detektor, 5: adatfeldolgozó, kijelző egység)

Az atomabszorpciós méréshez olyan fényforrásra van szükség, amely intenzív vonalas spektrumot ad, és az emittált vonalak félerőssége csekély. Ilyen fényforrás az *üregkatódlámpa*, mely egy speciális kisülési cső. A katód a meghatározandó elemből készült, hengeres alakú test. A kisülés a katód és anód közé kapcsolt kb. 300-400 V feszültség hatására jön létre a katód elektronemissziója révén. Az elektromos erőterben felgyorsuló elektronok a nemesgáz töltőgáz lavinászerű ionizációját idézik elő. A nagy sebességgel mozgó nemesgáz ionok becsapódnak a katód felületébe és fématomokat szakítanak ki a katódból (katódporlasztás). Így keletkeznek a meghatározandó elem szabad atomjai, melyek a nagysebességű nemesgáz ionokkal ütközve gerjesztődnek és az elemre jellemző vonalas spektrumot emittálnak. Az üregkatódlámpák általában egyelemesek, tehát minden újabb elem meghatározásánál cserélnünk kell a fényforrást.



15. ábra: Az üreghatólámpa felépítése

Az atomabszorpciós spektrometriás módszerrel minden olyan elem meghatározható, amelynek rezonanciavonala a spektrum azon területére esik, amelyet a spektrofotométerrel mérni lehet, és amely atomos állapotba hozható az abszorpciós térben. A legtöbb készülék az UV és látható (190-800 nm) tartományban használható. A nemesgázok, halogének és C, H, N, O, S, P nem határozhatók meg, mivel ezek rezonanciavonala 190 nm-nél kisebb. Azok az elemek, amelyeknek oxidja nem bomlik el a láng hőmérsékletén, illetve amelyeknek a lángban oxidja vagy hidroxidja keletkezik, nehezen határozhatók meg.

6. ZAVARÓHATÁSOK

Spektrális zavaróhatások (ún. additív zavaróhatások). Ide tartoznak a készülék optikai elrendezéséből, felbontóképességének korlátozott voltából, vonal egybeesésből (koincidenciából) származó zavaróhatások. Ezeket a zavaróhatásokat nagyobb felbontóképességű, más optikai elrendezésű, nagyobb teljesítőképességű készülékkel, vagy a módszer megváltoztatásával (Pl. FES helyett FAAS alkalmazásával) lehet csökkenteni, vagy kiküszöbölni.

Fizikai zavaróhatások (ún. arányos zavaróhatások). A mintaoldat fizikai sajátságainak (viszkozitás, felületi feszültség, gőznyomás, hőmérséklet) megváltozása jelentősen megváltoztathatja a mért jelet, mivel ezek a sajátságok hatással vannak a folyadékporlasztásos mintabevitel hatékonyságára. Ugyancsak fizikai zavaróhatásnak számít a lángban keletkező sórézecskeken történő fényszóródás, emiatt kerülendő a nagy (1-2 %-nál nagyobb) összes sókoncentrációval bíró oldatok elemzése.

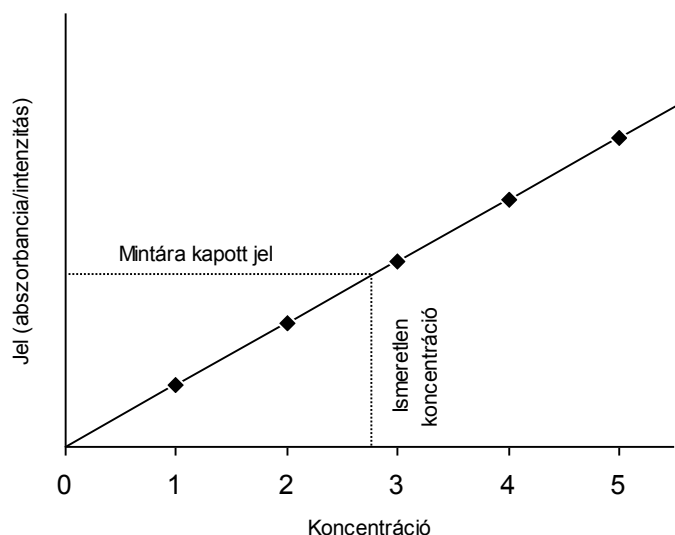
Kémiai zavaróhatások (ún. exponenciális zavaróhatások). Gázfázisú kémiai zavarás akkor jelentkezik ha a komponensek (atomok, ionok, gyökök) gőz, ill. gáz állapotba jutásuk után fejtik ki egymásra hatásukat. Ide sorolható a fémeknek a láng gyökeivel (O, H, OH) történő vegyületképződése, a disszociációs és ionizációs egyensúlyok eltolódása, melyek erősen befolyásolhatják a vizsgált részecsketípus koncentrációját. *Kondenzált fázisú kémiai zavarás* akkor jelentkezik, ha a komponensek közötti kölcsönhatás a minta gőzzé alakulása előtt, már a bepárlódás során a folyadékcseppben, szilárd- vagy olvadékfázisban kialakul. Ennek a zavaróhatásnak tipikus példája a minta komponenseiből nehezen párologó, magas hőfokon disszociáló vegyületek képződése (pl. PO_4^{3-} , Al^{3+} , SiO_3^{2-} , Ti^{4+} ionok zavaróhatása alkáliföldfémekre és ritkaföldfémekre). A kémiai zavaróhatások tehát a fényemisszióra képes gerjesztett ionok (FES-nél), illetve a fényt elnyelni képes alapállapotú atomok (FAAS-nál) koncentrációját csökkentik.

7. KIÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK

A lángspektrometriában leggyakrabban az összehasonlító és a standard addíciós kiértékelési módszereket használjuk.

Az összehasonlító módszer nagyszámú, azonos típusú minta sorozatelemzéséhez alkalmazható. Az összehasonlító oldatsorozat (standardok) a vizsgálandó elemeket növekvő koncentrációban tartalmazza. Emellett a standardok a mintában jelenlevő egyéb komponenseket (kationokat, anionokat, szervesanyagot, oldószert) is tartalmazhatják átlagkoncentrációban. Mivel az így nyert hitelesítő oldatsorozat összetétele körülbelül azonos a mintáéval, a fellépő zavaróhatások is közel azonos mértékűek lesznek. Az oldatsorozat tagjai leggyakrabban egy pontos koncentrációjú törzsoldat megfelelő hígításai.

A módszer csak azonos típusú és nem nagyon ingadozó összetételű minták esetén szolgáltat analitikailag megbízható eredményeket. Nagy hibával határoznánk meg pl. kalciumot, ha vérszérumhoz, vízmintához vagy kőzetből készült oldatokhoz azonos összetételű kalcium hitelesítő oldatsorozatot használnánk. Az említett mintákban nemcsak a kalcium mellett jelenlevő komponensek koncentrációja különbözik szélsőségesen, hanem a fellépő zavaróhatások típusa is más-más lehet. Összehasonlító kiértékelési módszerrel kapott tipikus kalibrációs diagramokat láthatunk a 16. ábrán.

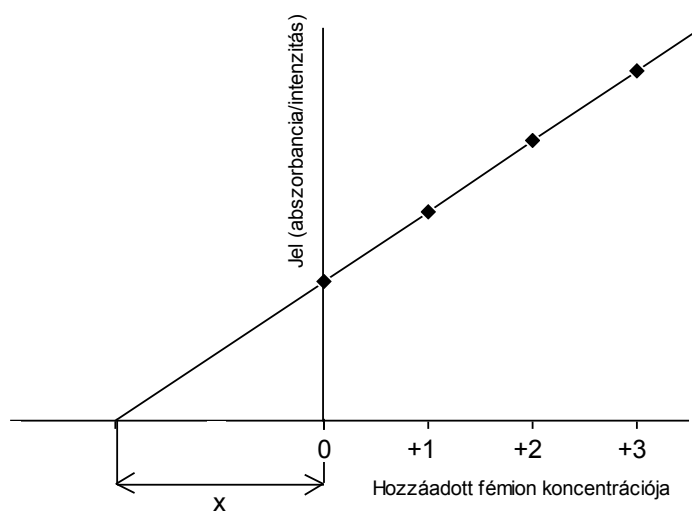


16. ábra: Az összehasonlító kiértékelési módszer

A *standard addíciós módszert* elsősorban az ún. exponenciális zavaróhatások fellépése esetén alkalmazzuk abban az esetben, ha nem tudjuk pontosan a zavaróhatás okát, vagy nem ismerjük a zavaró komponensek minőségét, ill. koncentrációját. A módszer lényege, hogy a mintaoldatot 3-5 egyenlő részre osztjuk. Az egyes részletekhez a vizsgálandó fémion növekvő koncentrációjú részleteit adjuk azonos térfogatban (a különböző mértékű hígulás kiküszöbölése érdekében). Az első részlethez nem adunk fémion tartalmú oldatot, így ez a részlet az eredeti fémion mennyiségét tartalmazza (ez az ismeretlen, az addíciós tagok ún. +0 tagja), a többi tagokhoz ismert növekvő mennyiségű fémion tartalmú oldatot adunk. A kapott értékeket a 17. ábrán látható módon kell ábrázolni. A kapott értékeket (emissziós intenzitás, vagy abszorbancia) összekötő egyenes az origón túl metszi az abszcissza tengelyt. A tengelymetszet és az origótól balra levő távolságot ugyanolyan koncentráció-léptékben ábrázolva, mint a jobb oldalon, a tengelymetszetből megkaphatjuk az ismeretlen minta fémion tartalmát.

A módszer alkalmazhatóságának feltétele, hogy a mérési pontok egyenessel közelíthetők legyenek. A standard addíciós módszernek, azonban sok mintára történő elvégzése a mérést igen munkaigényessé teszi, így sorozatmérésre gyakorlatilag nem alkalmazható. Ugyancsak nehézségbe ütközik a módszer használata, ha a rendelkezésre álló mintaoldat térfogata

korlátozott (1-2 mL). Bonyolult (főleg szervesanyag mátrixú) minták esetén azonban gyakran használjuk.



17. ábra: A standard addíció módszere

8. A GYAKORLATON ELVÉGZENDŐ FELADATOK

8.1 Lángemissziós spektrometriás elemzések

1. Csapvíz Na-ion tartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Na⁺ törzsoldatból készítsen 1, 2, 3, 4 és 5 mg/L koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba.

Minta: 0.5-1 percig engedjen szabadon vizet a csapból, majd egy kisebb főzőpohárba engedjen kb. 20 mL csapvizet. A vízmintából készítsen 10- és 20-szoros hígítást 25 mL-es mérőlombikokba, de őrizze meg elemzéshez az eredeti vízminta maradékát is (hígítatlan minta).

Feladat: Adja meg a csapvíz Na⁺-tartalmát mg/L egységben.

2. Csapvíz Na-ion tartalmának meghatározása standard addíciós kalibrációs módszerrel

Minta: 0.5-1 percig engedjen szabadon vizet a csapból, majd egy kisebb főzőpohárba engedjen kb. 20 mL csapvizet. A vízminta 10-szeres hígítású oldatait használja az elemzésekhez, ezért mérjen be 2.5-2.5 mL térfogatú csapvizet a négy 25 mL-es mérőlombikba (későbbi kalibrációs oldatsorozat).

Kalibráló oldatsorozat (standard addíciós tagok): A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Na⁺-törzsoldatból olyan térfogatokat mérjen ki (az előbb előkészített) három mérőlombikba, hogy azok feltöltés után a minta eredeti (ismeretlen) Na-koncentrációjához képest rendre +1, +2 és +3 mg/L koncentrációnyival tartalmazzanak többet. A negyedik mérőlombikhoz ne adjon Na⁺-ot, így ez lesz maga a meghatározandó minta („+0” tag). Töltse jelig a mérőlombikokat.

Feladat: Adja meg a csapvíz Na⁺-tartalmát mg/L egységben.

3. Béres Csepp[®] Na-ion tartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Na⁺-törzsoldatból készítsen 1, 2, 3, 4 és 5 mg/L koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba.

Minta: A Béres Csepp[®]-ből készítsen 10- és 50-szeres hígítást 25 mL-es mérőlombikokba.

Feladat: adja meg a gyógykészítmény egyetlen cseppjének (55 μL) Na^+ -tartalmát μg egységben.

4. Ismeretlen minta Na -ion tartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Törzsoldat: 25 mg/L Na^+

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Na^+ -törzsoldatból készítsen 1, 2, 3, 4 és 5 mg/L koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba.

Minta: a számozott kémcső teljes (ismeretlen Na^+) tartalmát öntse 100 mL-es mérőlombikba, majd töltsé fel. (Ismeretlent mindenki külön kap, de a kalibráló oldatsorozatot a csoport közösen készíti el.)

Feladat: adja meg a kémcsőben levő oldat összes Na^+ -tartalmát μg egységben.

8.2 Lángatomabszorpciós spektrometriás elemzések

5. Csapvíz Ca-ion tartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 50 mg/L koncentrációjú Ca^{2+} -törzsoldatból készítsen 2, 4, 6, 8 és 10 mg/L koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba.

Minta: 0.5-1 percig engedjen vizet a csapból, majd egy kisebb főzőpohárba engedjen kb. 20 mL csapvizet. A vízmintából készítsen 10- és 50-szeres hígítást 25 mL-es mérőlombikokba, de őrizze meg elemzéshez az eredeti vízminta maradékát is (hígítatlan minta).

Feladat: Adja meg a csapvíz Ca^{2+} -tartalmát mg/L egységben.

6. Ismeretlen minta Cu-ion tartalmának meghatározása standard addíciós kalibrációs módszerrel

Minta: a számozott kémcső teljes (ismeretlen Cu^{2+}) tartalmát öntse 100 mL-es mérőlombikba, majd töltsé jelig.

Kalibráló oldatsorozat (standard addíciós tagok): A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Cu^{2+} -törzsoldatból olyan térfogatokat mérjen ki (az előbb előkészített) három 25 mL-es mérőlombikba, hogy azok a mintaoldattal való feltöltés után a minta eredeti (ismeretlen) Cu-koncentrációjához képest rendre +1, +2 és +3 mg/L koncentrációnyival tartalmazzanak többet. Ezt követően töltsé jelig a 25 mL-es mérőlombikokat a 100 mL-es mérőlombik tartalmával. A 100 mL-es mérőlombikban megmaradt oldat a meghatározandó minta („+0” tag).

Feladat: adja meg a kémcsőben levő oldat összes Cu^{2+} -tartalmát μg egységben.

7. Béres Csepp[®] Cu-ion tartalmának meghatározása standard addíciós kalibrációs módszerrel

Minta: a Béres Csepp[®] minta 100-szoros hígítású oldatait használja az elemzésekhez, ezért mérjen be 0.25-0.25 mL térfogatú Béres Csepp[®]-et a négy 25 mL-es mérőlombikba (későbbi kalibrációs oldatsorozat).

Kalibráló oldatsorozat (standard addíciós tagok): A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Cu^{2+} -törzsoldatból olyan térfogatokat mérjen ki (az előbb előkészített) három 25 mL-es mérőlombikba, hogy azok a mintaoldattal való feltöltés után a minta eredeti (ismeretlen) Cu-koncentrációjához képest rendre +1, +2 és +3 mg/L koncentrációnyival

tartalmazzanak többet. Ezt követően töltsé jelleg a 25 mL-es mérőlombikokat. A negyedik mérőlombikhoz ne adjon Cu^{2+} -t, így a feltöltés után kapott oldat lesz maga a meghatározandó minta („+0” tag).

Feladat: adja meg a készítmény egyetlen cseppjének (55 μL) Cu^{2+} -tartalmát μg egységben.

8. Béres Csepp[®] Cu-ion tartalmának meghatározása összehasonlító kalibrációs módszerrel

Kalibráló oldatsorozat: A rendelkezésre álló 25 mg/L koncentrációjú Ca^{2+} -törzsoldatból készítsen 1, 2, 3, 4 és 5 mg/L koncentrációjú standardoldatokat 25 mL-es mérőlombikokba.

Minta: A Béres Csepp[®]-ből készítsen 20-, 50- és 100-szoros hígításokat 100 mL-es mérőlombikokba.

Feladat: adja meg a készítmény egy cseppjének (55 μL) Mn^{2+} -tartalmát μg egységben.

8.3 Általános utasítások a gyakorlat végrehajtásához, az eredmények kiértékeléséhez:

1. Az oldatok hígítása 0.1 mol/L koncentrációjú salétromsavval történjen. Ugyanez az oldat jelenti az ún. vakoldatot is. Az elemzésnél mérje meg a vakoldatot is, a jel 10 egymást követő leolvasása szükséges a kimutatási határ megadásához (vakoldat szórása).
2. A standardoldatok elkészítéséhez használja az ún. hígítási egyenletet: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$, ahol, c_1 a törzsoldat koncentrációja, V_1 a törzsoldatból bemérendő térfogat, c_2 a készítendő standardoldat koncentrációja, V_2 pedig a készítendő standardoldat térfogata.
3. Az oldatokat elkészítésük után alaposan rázza össze és tartsa a mérőlombikot lezárva. A mérőlombikot újra össze kell rázni közvetlenül azelőtt, hogy az oldatot a spektrométerbe juttatnánk.
4. Az oldatok elemzésének sorrendje: először a vakoldat és a standardoldatok növekvő koncentrációban, majd ezt követően a minták (ha vannak hígítások, először a leghígabbat mérjük).
5. Ne felejtse számolni az esetleges hígításokkal, a megfelelő koncentráció/mértékegységekben adja meg az eredményt!
6. Számolja ki és adja meg a vizsgált elem esetén az analitikai érzékenységet, kimutatási határt, és egy szabadon választott standardoldatra a szórást (a csoport tagjai különböző tagokra számolják ki a szórást).

A jegyzőkönyvre kapott jegyet legalább egy-egy érdemjeggyel csökkentik:

6. a kapott eredmény több, mint 10%-os eltérése a valódi értéktől
7. számítási hiba
8. nem megfelelő mértékegység
9. kalibrációs grafikon tengelyei feliratának hiánya
10. nem megfelelően elkészített jegyzőkönyv (lásd az útmutatót)

Gyakorlati jegy: a ZH-ra, a jegyzőkönyvre és a gyakorlat végrehajtására kapott érdemjegyek közül a legkisebb.

8.4 Útmutató az analitikai gyakorlaton elkészített jegyzőkönyv elkészítéséhez

Gyakorlat címe (Név, szak, dátum)

Elméleti összefoglaló

Az a jó elméleti összefoglaló, amit a hallgató a téma részletesebb elméleti leírásának (silabusz) alapos áttanulmányozása után szűr le magának és ír le nagyjából egy oldal terjedelemben. Kevés értelme van egy olyan (akár hosszú oldalakon keresztül hömpölygő) összefoglalásnak, ami csupán néhány válogatott fejezetből kiollózott fontosabb mondatokat, bekezdéseket tartalmazza.

Mivel az analitikai meghatározások végrehajtása általában nagy körültekintést, gondos, precíz munkavégzést kíván meg, elvárható, hogy mindezeket a jegyzőkönyv küllemében is sugározza (füzet, lap minősége, írás olvashatósága, a szöveg stílusa, nyelvtani helyessége). Az elméleti összefoglaló tartalmazhat egymással szorosan össze nem függő témaköröket is, ezért fontos a megfelelő tagolás alkalmazása, a jelentősebb kulcsszavak kiemelése (például nyomtatott betűk használatával, (nem szabadkézi!) aláhúzással, színes ceruza alkalmazásával).

A gyakorlaton elvégzendő feladat

Feladat:

Soroljuk fel a gyakorlaton kapott konkrét feladatokat, kérdéseket. Ezek pontos, szó szerinti rögzítése szükséges. Ha írásban kapjuk a feladatot, azt pontosan másoljuk be a jegyzőkönyvbe.

Mérési paraméterek:

Minden fontosabb mérési paramétert adjunk meg. A lángspektrometriás gyakorlaton ezek az alábbi paraméterek:

Készülék típusa: (Unicam SP1900)

Láng: (pl. acetilén/levegő, pl. sztöchiometrikus lángösszetétel)

Égőfej: (FES-nél Méker-égő, FAAS-nél réses égő)

Hullámhossz: (pl. réz esetén 324.8 nm)

Égőmagasság: (pl. 15 mm)

Rendelkezésre álló eszközök, standardok, minták, mintaelőkészítés:

Az oldatkészítésekhez használt mérőlombikok, pipetták, standardok felsorolása. Itt kell szerepelniük az oldatkészítésnél végzett egyszerűbb számolásoknak is.

Mérési eredmények

A mérési adatokat foglaljuk táblázatba, ügyeljünk arra, hogy a mérési eredmények mértékegységeit is mindig feltüntessük.

Minta (vak, standard, ism.)	Jel (relatív abszorbancia/intenzitás)						
	1	2	3	4	5	átlag	átlag-vak

A kapott eredmények kiértékelése

Ez a rész tartalmazza valamennyi számítást (ne dolgozzunk cetlikre!). A kalibrációs görbét milliméterpapíron is megrajzolhatjuk, vagy számítógép MS Excel 4.0 programjával is megrajzoltatható, kinyomtatható (a mérési pontokra húzott egyenes vagy görbe egyenletéből az ismeretlen koncentráció kiszámolható). A kalibrációs görbét tartalmazó lap is legyen egyike a számozott mellékleteknek. Adjunk címet a kalibrációs diagramnak, és pontosan adjuk meg a tengelyeket (pl: „Na koncentráció, mg/L”).

Számolja ki és adja meg a vizsgált elem esetén az analitikai érzékenységet, kimutatási határt, és egy szabadon választott standardoldatra a szórását.

$$S = \frac{x_2 - x_1}{c_2 - c_1}$$

Analitikai érzékenység (S):

ahol x az oldatra kapott jel nagysága (abszorbancia/intenzitás)
 c az oldat koncentrációja

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

Szórás (s):

ahol \bar{x} egy c koncentrációjú n ismétléssel kapott oldatra kapott $x_1 \dots x_n$ jelek átlaga

Kimutatási határ (D): $D = \frac{3s}{S}$

A kimutatási határnál szereplő szórás (s) a vakoldatra kapott válaszjelekből számolt szórás.

A gyakorlatnál feltett kérdéseket precízen, egész mondattal válaszolja meg, a minta ismeretlen koncentrációját egyértelműen, a kért mértékegységben adja meg. A melléketeket (kalibrációs diagramok, mérési jelek) a jegyzőkönyv végén kell rögzíteni (ragasztással vagy tűzőgéppel).

Diszkusszió, tapasztalatok

Itt rögzítsük a gyakorlat során fontosnak tartott tapasztalatokat, értelmezzük a kapott eredményt (pl. reális lehet-e?). Itt jegyezzük meg az esetleges rendkívüli eseményeket a mérés során (pl. problémák a készülék valamely egységével, utólagosan észlelt hibák az oldatok elkészítésekor)

Jó jegyzőkönyvnek az tekinthető, amelynek alapján egy mérést akár évekkel később is reprodukálni lehet, s nem csupán a jegyzőkönyv készítője, de mások által is. A jegyzőkönyv elkészítése fontos, elengedhetetlen része az analitikai munkának.

ZH kérdések

(FES, FAAS)

1. Lángspektroszkópiai módszerek elve (emisszió, abszorpció, fluoreszcencia). Az egyes módszerek és készülékek mérési elve
2. Milyen folyamatok játszódnak le, ha egy fémsó-oldatot a lángba juttatunk? Milyen típusú részecskéket használhatunk fel lángemissziós, ill. atomabszorpciós méréshez?
3. Milyen részekből állnak a FES készülékek? Mi az egyes egységek funkciója?
4. Milyen részekből állnak a FAAS készülékek? Mi az egyes egységek funkciója?
5. Jellemezze a lángspektrometriában használatos lángokat!
6. Hogyan történik a folyadékminta bevitele a spektrométerbe?
7. Az üreghatólámpa felépítése, a szaggató szerepe.
8. Hogyan történik a megfelelő hullámhosszúságú fény kiválasztása (fényfelbontás)? Mi a fényfelbontó eszközök működési elve?
9. Hogyan történik a spektrométerekben a fény detektálása?
10. Milyen zavaróhatások lépnek fel a lángspektrometriában?
11. Jellemezze a leggyakrabban használatos kiértékelési módszereket!

VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA (PAPÍRKROMATOGRÁFIÁVAL KIEGÉSZÍTVE)

1. A KROMATOGRÁFIÁKRÓL ÁLTALÁNOSAN

A modern elválasztástechnikai és analitikai eljárások legnagyobb jelentőségű és legszélesebb körben használt változatai a különböző kromatográfiás technikák, amelyek egy anyag összetételére, tisztaságára nézve szolgáltatnak adatokat. Kromatográfiás eljárások nélkül ma már nem képzelhető el a modern vegyipar, az egészségügy, vagy a környezetvédelem egyetlen ága sem.

A kromatográfia olyan eljárások gyűjtőneve, amelyek során egy mozgó hordozóközeggel elegyedő, vagy abban oldódó vizsgálati minta alkotóit a mozgó közeg, a mozgó közeggel érintkező álló közeg valamint a minta komponensei közötti eltérő erősségű, reverzibilis kölcsönhatások alapján választjuk szét.

A minta továbbítását végző mozgó közeget mozgó fázisnak, a szétválasztási művelet során álló közeget álló fázisnak nevezzük.

1. táblázat 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 (kapilláris, vagy nedvesített töltetű)
szilárd	gáz	adszorpció	GC (töltetű)
folyadék	folyadék	megoszlás	LC, HPLC, TLC (fordított fázisú) papírkromatográfia (PC)
szilárd	folyadék	adszorpció, ioncsere, méretkizárás, affinitás, hidrofób kölcsönhatás	LC, HPLC, TLC (normál fázisú), gélkromatográfia (GPC), ionkromatográfia (IC), affinitás kromatográfia, hidrofób kölcsönhatás kromatográfia
szilárd	szuperkritikus folyadék	adszorpció	szuperkritikus folyadékkromatográfia (SCF)
folyadék	szuperkritikus folyadék	megoszlás	SCF

Halmazállapota szerint a mozgó fázis gáz, folyadék, illetve szuperkritikus állapotú folyadék lehet, ennek alapján megkülönböztetünk gázkromatográfiát (GC), folyadékkromatográfiát (LC), illetve szuperkritikus folyadékkromatográfiát (SFC). Az állófázis mindhárom esetben folyékony vagy szilárd halmazállapotú lehet. A folyadékkromatográfia nagy, illetve ultranagy hatékonyságú változatát az alkalmazandó nyomás alapján nagynyomású, illetve ultranagy nyomású folyadékkromatográfiának ((ultra-)high pressure liquid chromatography, HPLC, UHPLC) nevezzük.

Az elválasztás fizikai alapja lehet adszorpció valamilyen porózus szilárd anyag felületén, abszorpció (egy gáz oldódása folyadékban), megoszlás két folyadékfázis között, molekulaméret szerinti eltérő vándorlási sebesség egy gélvázban, ioncsere folyamat az álló és mozgó fázisban lévő ionos specieszek között, speciális affinitás a mintakomponensekkel szemben, illetve vizes oldatokban mutatott hidrofób kölcsönhatás az apoláris molekularészek között.

1.1 Oszlopkromatográfia, síkkromatográfia

Ha az állófázis egy csőben helyezkedik el, akkor valamilyen fajta oszlopkromatográfiáról beszélünk. Az oszlop hosszúsága, átmérője, töltete vagy belső bevonata változó lehet, az alkalmazástól és a minta mennyiségétől függően. A mozgó fázis gáz, folyadék, vagy szuperkritikus folyadék lehet. A különböző oszlopkromatográfias technikákat az ultranagy érzékenységű analitikai kémiától egészen a több kilogrammos minták preparatív elválasztásáig, a laboratóriumoktól a gyógyszeriparig mindenhol elterjedten használják. A hagyományos, kis nyomású oszlopkromatográfias elválasztásokkal (az „oszloposításokkal”) szinte minden szerves kémiai laboratóriumban találkozhatunk.

A síkkromatográfias technikáknál az állófázis egy valamilyen vastagságú porózus réteg, amelyen keresztül a réteg síkjában (és nem a lapra merőlegesen!) áramlik a folyékony mozgófázis. (Síkkromatográfiasban csak folyékony mozgófázist lehet használni.) A réteg anyaga, kiterjedése és vastagsága az alkalmazástól és a minta mennyiségétől függ.

A rétegekromatográfiasban a réteg anyaga lehet természetes vagy kémiaiilag módosított papír (ez a hagyományos papírkromatográfia, PC), illetve valamilyen hordozóra felvitt, minimális mennyiségű inert ragasztóval rögzített porózus anyag (rétegekromatográfia), ami leggyakrabban szilikagél, kémiaiilag módosított szilikagél, alumínium-oxid, cellulóz, kémiaiilag módosított cellulóz, polimer, vagy ioncserélő gyanta.

Amikor a réteg vastagsága néhány tized milliméter, akkor vékonyréteg kromatográfiáról (thin layer chromatography, TLC) beszélünk. Ha nagyon finom és egyenletes szemcseméretű anyagból készül a vékonyréteg lapon az állófázis, akkor a létrehozott vékonyréteg különösen nagy felbontóképességű lesz. Az ilyen rétegeket használó technikát nagy felbontóképességű vékonyréteg kromatográfiának (high performance thin layer chromatography, HPTLC) nevezzük.

Azt a megoldást, amikor jelentős nyomással préselik át a mozgófázist a rétegen túlnyomásos vékonyréteg kromatográfiának (OPLC vagy OPTLC) nevezzük. Ennek a technikának számos előnye van, például nagyon gyors, on-line módban is használható, a vele kidolgozott módszerek könnyen adaptálhatók HPLC készülékekre. Az OPLC készülékek a hozzájuk való

szélezett lapok magas ára, valamint a rugalmatlan lapformátum miatt csak szűk felhasználói körben terjedtek el.

A rétegekromatográfia – az oszlopkromatográfiához hasonlóan – nagyobb anyagmennyiségek szétválasztására is használható, ezt a technikát preparatív rétegekromatográfiának hívjuk. A réteg vastagságát, kiterjedését a minta mennyiségének függvényében csak egy határig növelhetjük. Preparatív célokra sem használunk 5 mm-nél vastagabb és 200 mm-nél hosszabb vagy szélesebb réteget, mert a minta egyenletes felvitelét már nem lehet megoldani, a nagy lapok nehezek, törékenyek, porladnak, rosszul kezelhetők.

A papírkromatográfia az 1950-es években volt nagyon népszerű, de néhány, elsősorban biológiai és biokémiai alkalmazáshoz még ma is széles körben használjuk. Megvalósításához még a vékonyréteg kromatográfiánál is kevesebb eszköz kell. A papírkromatográfiának soha nem volt műszeres változata, de a modern digitális képfeldolgozási módszerekkel lehetőség van a számítógépes kiértékelésre. A professzionális PC vizsgálatokhoz olyan kromatográfiás papírokat gyártanak (ezek lényegében nagyon finom rostozatú, sima felületű szűrőpapírok), amelyekkel meg lehet közelíteni a normál TLC felbontóképességét. A futtatást 10–50 cm-es kifejlesztési távolságon végezzük. A PC-t részben kiszorította a nagyobb felbontóképességet adó, mikrokristályos cellulóz rétegen végzett vékonyréteg kromatográfia. A papírkromatográfiát továbbra is használjuk például a növényi színezékek gyors, olcsó szétválasztására, illetve a pépesített szűrőpapír állófázison végzett preparatív oszlopkromatográfiás elválasztásokhoz szükséges módszerfejlesztésekhez. Olyan esetekben is előnyös lehet, ahol további vizsgálatok végzéséhez (pl. hamvasztáshoz, radioizotópos vizsgálatokhoz) ki kell vágni a foltot anélkül, hogy abból anyagvesztés lenne (a vékonyréteg könnyen porlik, leperreg, nem hamvasztható). Az oktatásban, bemutató kísérletekben is szívesen használjuk a PC-t annak kis költségigénye és egyszerű megvalósíthatósága miatt. A módszer fejlettségének csúcspontján használt eszközök egy része (pl. a spirálkád) jórészt feledésbe merült, mintapéldányaik esetenként kromatográfia történeti kiállításokon láthatók.

2. A VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA ALAPJAI

A vékonyréteg kromatográfia még napjainkban is egyike a legismertebb, legszélesebb körben használt analitikai eljárásoknak. Elterjedtsége főként rendkívüli egyszerűségének, és páratlan olcsóságának köszönhető, ugyanis alapszinten művelve nagyon kicsi az eszközigénye. A preparatív kémiai laboratóriumokban a reakciók nyomon követésére, a termékek tisztaságvizsgálatára, azonosítására folyamatosan használják.

Megfelelő pontosságú eszközökkel kiegészítve azonban a műszeres vékonyréteg kromatográfiát még a legfejlettebb gyógyszergyárakban is használják, elsősorban azért, mert vele gyorsan és költséghatékonyan 15-20 nyers minta egyidejű mérését meg lehet oldani. A műszeres TLC óriási előnye az összes többi analitikai eljárással szemben az, hogy a vékonyréteg lap egy egyszer használatos eszköz, arra *bármilyen szennyezett minta felcseppenthető*, nem kell azzal foglalkozni, hogy egyes komponensek irreverzibilisen kötődnek-e az állófázishoz, vagy vannak-e benne makroszkópikus, lebegő szennyezések. Nem kell a mintaelőkészítés során drága membránszűrőt, esetleg szilárd fázisú extrakciót használni. Az egy minta vizsgálatára felhasznált oldószer mennyisége sokkal kisebb, mint a hagyományos HPLC-nél, és összevethető az UHPLC oldószerfelhasználásával. A felcseppentett minták egymással párhuzamosan futnak, azaz az egy mintára jutó analízis idő kicsi.

Természetesen a vékonyréteg kromatográfia – minden pozitívuma mellett is – nem egy mindenre megoldást kínáló módszer. Érzékenysége, pontossága, felbontóképessége, szelektivitása jelentősen elmarad a HPLC mögött, de a módszer korlátai által biztosított térben lényegében ugyanazokat a feladatokat lehet vele megoldani, ugyanolyan állófázisokon. Gyakori, hogy a gyógyszergyártás során a reakcióelegyeknek a gyártásközi gyors ellenőrzését műszeres TLC-vel végzik, míg a késztermék minősítését, tisztaságvizsgálatát HPLC-vel és/vagy GC-vel. A műszeres TLC nagy felhasználói közé tartoznak a gyógynövény készítményeket előállító laboratóriumok is, amelyek munkájára jellemző, hogy a szezonálisan, nagyon sok egyedi termőterületről begyűjtött alapanyagot minél hamarabb, egymással párhuzamosan minősíteni kell.

2.1 A vékonyréteg kromatográfia anyagai, eszközei, alapvető technikái

Kromatográfias rétegek

A legáltalánosabban használt réteg a szilikagél, amely normál TLC, illetve nagy felbontó képességű HPTLC minőségben is hozzáférhető. Mivel a porózus, nagy felületű anyagok jó adszorbensei a laboratóriumi gőzöknek, a rétegeket a laboratóriumi levegőtől lehetőleg elzárva, tiszta levegőjű helyiségben, szorosan lezárt dobozban tároljuk. Ideális esetben a szilikagélből illetve alumínium-oxidból készült rétegeket az aktivitás minél tökéletesebb megőrzése érdekében ellenőrzött páratartalmú szekrényben tartják.

A hordozó lap anyaga lehet üveg, alumínium, illetve műanyag. A legkönnyebben az alumínium hordozós, a legnehezebben az üveg hordozós lapok vágathatók. Az alumínium hordozó jól bírja az egyenetlen hőterhelést (pl. lángban való hevítést), de korrodeálódik savas és lúgos reagensek, valamint agresszív anyagok (pl. jódgáz) hatására. A műanyag hordozós rétegek sok helyen népszerűek, jó a vegyszerállóságuk, de csak korlátozottan hőállóak. Az üveg hordozó kémiaiilag a legellenállóbb, egyenetlen hőeloszlásban jól melegíthető, de törékeny és a vágása gyakorlatot igényel.

A rétegek tipikus méretei: 20 cm * 20 cm (TLC), 10 cm * 20 cm (TLC, HPTLC), 10 cm * 10 cm (HPTLC), 5 cm * 20 cm (TLC), 5 cm * 7,5 cm (HPTLC, TLC), illetve egyes alumínium hordozós rétegből 20 cm * 10 m-es tekercseket is előállítanak.

A kifejlesztési távolság normál TLC-s analitikai vizsgálatnál 8-16 cm, míg HPTLC esetében 4-8 cm.

Az állófázis lehet szilikagél, alumínium-oxid, cellulóz, szénhidrogén láncokkal kémiaiilag módosított szilikagél (C8, C18, stb.), poliamid, erős vagy gyenge típusú (funkcionalizált polisztirol ill. cellulóz alapú) ioncserélő gyanta.

Polaritásuk alapján két nagy csoportra oszthatjuk az állófázisokat: normál fázisra (ilyen pl. a szilikagél, az alumínium-oxid), illetve fordított fázisra (ilyenek pl. a C8, C18 rétegek).

A normál fázisra az a jellemző, hogy erősen poláris és hidrofil az állófázis felülete, ezért leginkább a poláris anyagok elválasztására használjuk. A teljesen apoláris oldószerek (pl. a hexán) nem tudják a felületen megkötött anyagokat lemosni, a poláris oldószerek azonban a polaritásuktól függően képesek az adszorbeálódott komponensek kiszorítására (deszorpciójára). A legpolárisabb oldószerek (pl. víz, ecetsav) a legerősebbek, ezek gyakorlatilag az összes megkötött anyagot leoldják a normál fázis felületéről.

A leggyakrabban használt kromatográfias normál állófázis a szilikagél, emellett elterjedten használják az alumínium-oxidot. Mivel mindkét anyag erősen hidrofil, a levegőből a nedvességet elnyelik, a relatív páratartalom függvényében folyamatosan változik a felületi aktivitásuk. Reprodukálható mérésekhez ki kell küszöbölni a változó páratartalom okozta bizonytalanságot, ezért először szárítószekrényben aktiválják a rétegeket, majd teljesen száraz, illetve szabályozott páratartalmú kamrákban tárolják azokat a felhasználásig.

A szilikagél felülete mindig savas kémhatású a szilanol csoportok disszociációja miatt. Amennyiben oszlopkromatográfias célra neutrális vagy bázisos szilikagél felületre van szükségünk, a szilikagélt vizes szuszpenzióban NaOH-dal vagy más erős bázissal semlegesíteni kell, utána pedig a kiszűrt szilikagélt szárítószekrényben 110 °C hőmérsékleten legalább 2 órán át szárítani/aktiválni kell. Az aktivált szilikagélt légmentesen záródó dobozban tároljuk felhasználásig. Szilikagél réteg esetén kisebb a mozgásterünk, a pH-t nem tudjuk mérni, de tapasztalati úton kidolgozható olyan mártásos vagy szórásos eljárás, amellyel bázisos felületet hozhatunk létre.

Alumínium-oxidból készen kaphatók a bázisos, semleges ill. savas kémhatású változatok, amelyek aktivitása eredeti állapotban általában Brockmann-II, de más aktivitások is beállíthatók úgy, hogy a réteget ellenőrzött páratartalmú szekrényben hosszabb ideig (esetleg napokig) kondicionáljuk.

A fordított fázis felülete apoláris, ezért az apoláris anyagokat tartja vissza a legerősebben. A visszatartás mechanizmusa fordított fázis esetén megfelel a komponensek két, egymással nem elegyedő folyadék közötti megoszlásának, ugyanis a felületen lévő C18 láncok úgy viselkednek, mintha egy kémiaailag kötött, vékony paraffin olaj film vonná be a szemcsék felületét. A használt eluens ezt a kémiaailag kötött, álló folyadékfilmet nem tudja leoldani, így a minta komponensei a folyamatos folyadék-folyadék extrakciónál ismert módon valamilyen koncentrációarányban, dinamikus egyensúlyban oszlanak meg az álló és a mozgó fázis között. Eluensként az oldószerek közül a kis és közepes polaritású szerves oldószerek (pl. acetonitril, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid) a legnagyobb erejűek, a víz erősen poláris oldószer, ezért eluotróp ereje nagyon kicsi.

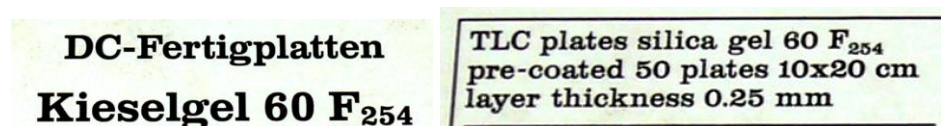
Fontos megjegyeznünk, hogy a fordított fázisú rétegek esetén vizet önmagában nem használhatunk eluensként, ugyanis nem nedvesíti a réteget, hanem leperreg róla. Fordított fázis esetén mindig egy szerves oldószer és egy vizes oldat elegyét használjuk, a víztartalmat szükségtelenül ne emeljük 40% fölé, különben nedvesítési problémák jelentkezhetnek. Általános tapasztalat, hogy a vizes-szerves oldatok viszonylag nagy viszkozitása miatt a rétegek kifejllesztése sokkal tovább tarthat, mint amit normál fázis esetén megszoktunk.

Kevert fázisként viselkednek azok a kémiaailag kötött szorbensek, amelyek apoláris láncot és poláris csoportokat is tartalmaz, ilyenek lehetnek pl. a ciano-propil vagy aminopropil-csoportokat tartalmazó szilikagélek. A kevert fázisok normál és fordított fázisként is használhatók.

Mind a normál, mind a fordított fázis esetén a leggyakrabban nem egy, hanem több komponensű elegyet használunk eluensként, mert így a rétegen a komponensek szétválasztását finomabban szabályozni tudjuk. Az OPLC készülékeken, illetve a legmodernebb automata futtatókádakon kívül nincs mód a kifejllesztés során folyamatosan változó összetételű eluens használatára, azaz gradiens elúcióra.

Az UV-elnyelésre képes komponensek kimutatására előnyösen használhatók a fluoreszkáló adalékot tartalmazó fluoreszcens rétegek, amelyek egy vagy két hullámhosszon történő gerjesztés hatására halványzöld illetve halványkék fényel fluoreszkálnak. A két leggyakoribb hullámhossz a 254 nm és a 366 nm. Ilyen réteget használva a fényelnyelésre képes anyagok világos alapon sötét foltként jelennek meg az UV-lámpa alatt.

A vékonyréteg lapok jelölésére nincs szabvány, de a gyártók többsége nagyjából hasonló gyakorlatot követ. Egy átlagos szilikagél lap példája kapcsán nézzük, hogy mit tüntetnek fel a rétegek dobozán.



A „DC Fertigplatten” ill. „TLC pre-coated plates” a vékonyréteg kromatográfiára használható, gyári készítésű lemezeket jelzi németül ill. angolul, a Kieselgel (Silica gel) = szilika gél németül ill. angolul adja meg a réteg kémiai összetételét, a név utáni 60-as szám a szilikagél pórusméretét adja meg Angströmben ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$). Az F betű a réteg fluoreszkáló tulajdonságát jelzi, a 254 pedig a fluoreszcencia kiváltásához szükséges UV-fény hullámhosszát adja meg nm-ben, ami esetünkben 254 nm. Kovalensen módosított felületű gél esetén az RP betűk a fordított fázisú (reversed phase) tulajdonságot, a betűk után következő szám pedig a kovalensen kapcsolódó szénlánc szénatomszámát (hosszúságát) adja meg. A CN betűk a cianopropil, Diol a dihidroxil-alkil, NH₂ az aminopropil oldalláncokra utalnak. A királis elválasztásokra alkalmas réteget CHIR felirat jelzi. Amennyiben nem üveglap hordozón van a réteg, általában megadják a hordozó minőségét, pl. alufólia hordozó (Alufolien ill. Aluroll). Külön feltüntetik azt is, ha koncentráció zónás a réteg.

Az elmondottak alapján önállóan gyakorolhatjuk a rétegek felismerését a következő címkék felhasználásával:

<p>Art. 13 726 HPTLC-Fertigplatten RP-2 F₂₅₄ S für die Nano-DC</p>	<p>Art. 5547 HP-TLC-Alufolien Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator) für die Nano-DC</p>
<p>Art. 14285 HPTLC-Fertigplatten CHIR mit Konzentrierungszone 25 Platten 10 x10 cm Konz.-Z.: 2,5 cm x 10 cm</p>	<p>DC-Alufolien Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ neutral (Typ E) 25 Folien 20x20 cm</p>

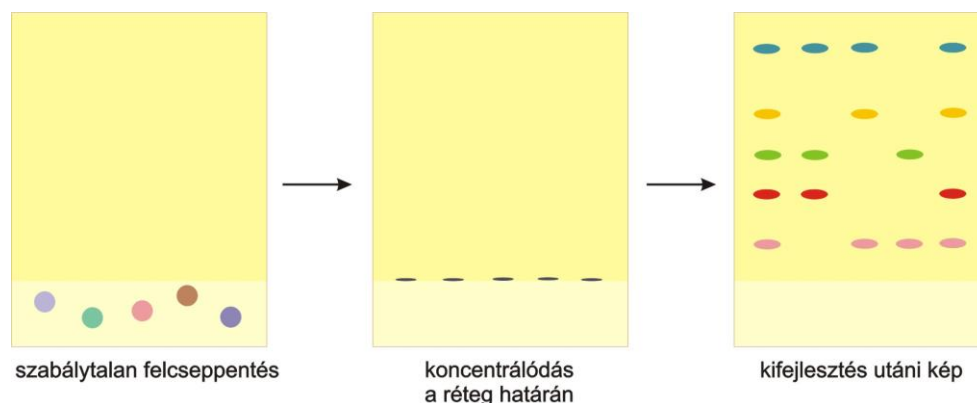
Pontos és reprodukálható vizsgálatokat csak akkor tudunk végezni, ha az általunk használt rétegnek minden vizsgálat megkezdésekor ugyanakkora a felületi aktivitása. A felületi aktivitás fogalmát Snyder vezette be, és a gyakorlatban Brockmann által kidolgozott mérési módszer terjedt el. Mind az alumínium-oxidok, mind a szilikagélek jellemzésére használják. A Brockmann skálán az I. fokozat jelzi a legnagyobb, V. fokozat a legkisebb aktivitást. Az I. fokozat annyira aktív, hogy az ilyen alumínium-oxidot vízgőz nyomok eltávolítására használják különböző gázokból. Normál levegőn néhány tíz másodperc alatt annyi vizet vesz fel, hogy elveszíti az I. aktivitását. A II. aktivitás az első, amely már normál körülmények között kezelhető és még nagyon aktív.

A relatív páratartalmat tömény sóoldatokkal, illetve megadott összetételű tömény kénsav-víz elegyekkel lehet beállítani. A kromatográfiás tárolószekrények aljában elhelyezhető, perforált lappal lezárt tetejű tálcába öntik a nedvességtartalmat szabályozó oldatot, majd ugyanabban a gőztérben tárolják az oldat fölötti zárt térben rétegeket is. A behelyezéstől számítva több óra alatt áll be a gőztéri egyensúly. A következő táblázatban megadjuk néhány telített sóoldat fölötti gőztér relatív páratartalmát.

2. táblázat Telített sóoldatok és az általuk biztosítható relatív páratartalom értékek 25 °C hőmérsékleten

Telített oldat	Relatív páratartalom (%RH) 25 °C-on
LiCl	11,30
CH ₃ COOK	22,51
MgCl ₂	32,78
K ₂ CO ₃	43,16
Mg(NO ₃) ₂	52,89
NaCl	75,29
KCl	84,34
KNO ₃	93,58
K ₂ SO ₄	97,30

A nedvességtartalom ingadozásának hatását a gyakorlatban legkönnyebben úgy tudjuk kiküszöbölni, ha osztott aljú ikerkamrát használunk és a réteget a kifejllesztés megkezdése előtt a kamra gőzterében legalább 10-15 percig kondicionáljuk.



1. ábra Koncentrázó zónás vékonyréteg lap működési elve. Az ilyen lap használata során nem foltokat, hanem sokkal inkább lapos ellipsziseket látunk kifejllesztés után.

A minták minél élesebb sávban történő felvitelét, ezáltal pedig az elválasztóképesség növelését lehet elérni az ún. koncentrázó zónás rétegekkel. A koncentrázó zóna egy olyan, kb. 2,5 cm szélességű, inaktív porózus anyagból (pl. kovaföldből) készült sáv a lapok alsó részén, amelynek az a szerepe, hogy a felpreparált foltokat az aktív réteg szélén egyetlen csíkká tömörítse a futás első pillanataiban. Alkalmazásával le tudjuk csökkenteni a cseppentési hibák egy részét és a kapott kromatogram vékonyabb, élesebb sávokat tartalmaz. A koncentrázó zóna működését az 1. ábra szemlélteti. A normál rétegek közül a legáltalánosabban használt fajták, a HPTLC-s rétegek közül pedig mindegyik fajta kapható koncentrázó zónás kivitelben is.

A koncentrázó zónás lapoknak csak az egyik szélén van zóna, így azok vágása csak egy irányban, a zónára merőlegesen végezhető el a zóna megtartása mellett. Ha pl. egy 20x20-as normál TLC-s lapot mindkét oldalon elfelezünk, akkor két olyan negyedünk lesz, amely koncentrázó zónás, és két olyan, amely semmiben nem különbözik a hagyományos lapoktól.

Kifejlesztő kádak, kifejlesztési technikák

Vékonyréteg kromatográfias célokra általában öntött üvegből vagy ragasztott üveglapokból készült, sima vagy osztott aljú, csiszolt tetejű kádakat használnak, amelyek mérete a kapható TLC lapokéhoz igazodik. A jól záródó tető nagyon fontos része a kromatográfias kádnak, mert ez akadályozza meg az oldószerek elillanását a kádból. A kád geometriai méretei még akkor is jelentősen befolyásolják a futási képet, ha minden egyéb paramétert állandó értéken tartunk. Laboratóriumok között átvihető, reprodukálható eredményeket csak azonos típusú kádak használatával lehet elérni, ezért a kád méretét, típusát mindig meg kell adni.

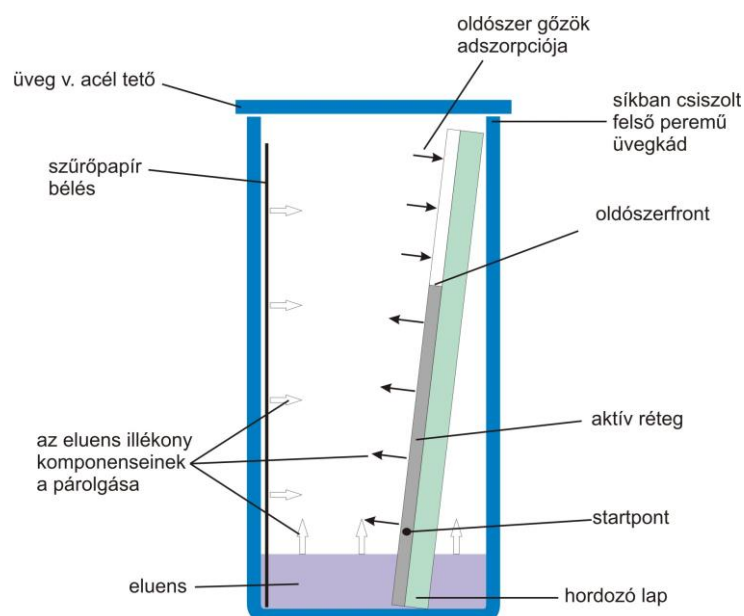


2. ábra Bal oldalon egy osztott aljú, normál típusú professzionális kromatográfias kád látható acél tetővel, a kádban 10x10 cm-es rétegek futtathatók. Jobb oldalon egy kromatográfias kádként használt tárgylemez festő kád látható, amiben maximum 40 mm széles, 66 mm magas lapok futtathatók. Ez utóbbi típust csak magas forráspontú oldószerek esetén célszerű használnunk, ugyanis a tetejükön nincs síkcsiszolat, ezért rosszul zárnak.

Vizes oldatok használata esetén a gőztér telítettségének viszonylag kicsi a jelentősége, de szerves oldószereket használva a kádak gőzterének az adott oldószerelegyre nézve telítettnek kell lenniük. Ezt azáltal tudjuk elérni, hogy a kamra belső falát szűrőpapírral béleljük ki úgy, hogy a papír beleér az eluensbe és legalább a réteg tetejéig felnyúlik. A gőztéri telítéshez normál típusú, 10 cm magas kádak esetén kb. 10-15 perc, a 20 cm magas kádaknál kb. 30-60 perc kell. A normál típusú kádak belső tere kb. 40-50 mm vastagságú, míg az ún. szendvicskádaké (amelyekben a kromatográfias lap

két üveglap között, mintegy szendvicsként helyezkedik el) csupán 2-4 mm. A szendvicskádokban a lokális gőztérelítést maga a réteg is elvégezheti, ekkor az előadszorpció háttérbe szorul, aminek következtében azonban teljesen különböző futási képet kapunk, mint normál kádak esetén.

A kromatográfias kádban lévő TLC lap elhelyezkedése álló (vertikális), illetve fekvő (horizontális) lehet. Fekvő réteg esetén a futásirány nyilvánvalóan csak vízszintes lehet, az eluens előrehaladását csak a kapilláris erők biztosítják, a gravitáció nincs rá hatással. Álló réteg esetén a futásirány (az eluens áramlásának iránya) felszálló, illetve leszálló is lehet.

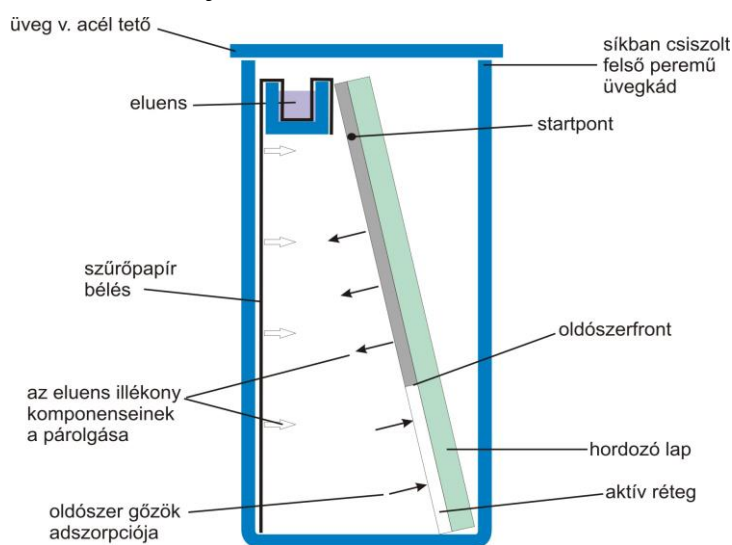


3. ábra Felszálló kromatográfia telített gőzterű normál kádban. Üres nyilak jelzik az eluens párolgását a folyadékfelszínen és a szűrőpapír bélésen, tele nyilak a már átítatott rétegen. A még száraz rétegen megtörténik az oldószer gőzök adszorpciója, előtelítése. A foltok rétegen túli futtatása nem lehetséges.

A felszálló futásirányt használjuk a leggyakrabban, mert ennek legegyszerűbb a megvalósítása. Az eluenst a kapilláriserők szívják fel a rétegben. Mivel a felszívódás iránya a gravitációval ellentétes irányú, felszálló futtatásnál az eluens front haladási sebessége időben folyamatosan csökken. Az áramlás megszűnik, miután a front elérte a réteg felső peremét.

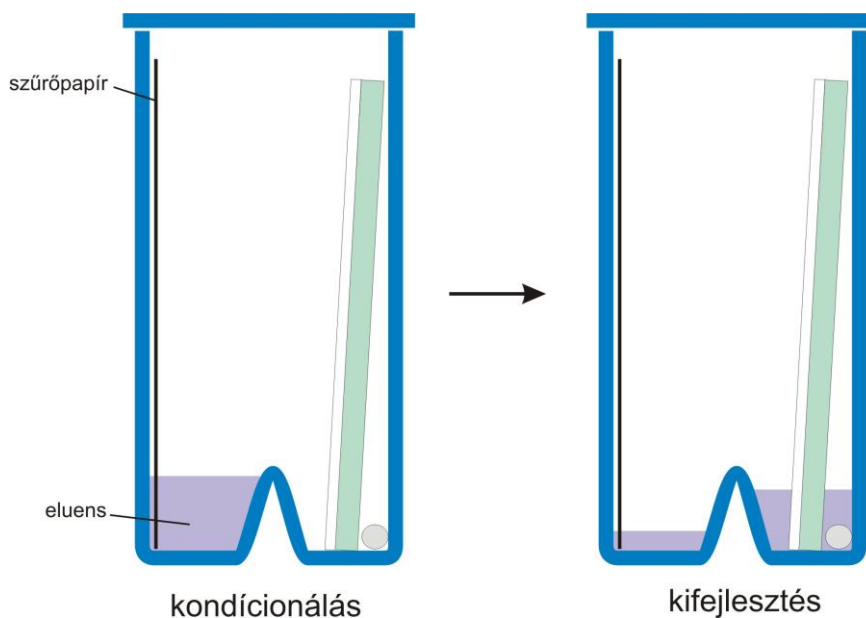
Illékony oldószerek esetén a porózus réteg felületén az oldószerszél megállása után is folytatódik a párolgás. Az elpárolgott térfogat pótlására az alsóbb régiókban továbbra is fennmarad az áramlás, ami egy idő után jelentősen meg tudja változtatni a kromatogramot. Az oldószerszél mellett másik zavaró tényező az, hogy a diffúzió időben fokozatosan szélesíti a foltokat, ezért a felbontóképesség egy határon túl már nem növelhető a réteg hosszúságának a növelésével. A kívánt kifejtési távolság elérése után a vékonyréteget minél hamarabb el kell távolítani a kádból.

Leszálló eluensáramlást valamivel nehezebb megvalósítani, ahhoz általában speciális elrendezés és egyedi készítésű kiegészítő betét szükséges, azt kereskedelmi forgalomban nem lehet beszerezni. Ekkor az eluens egy átmedvesített szűrőpapír csíkból szívódik át a rétegre, felülről lefele halad a rétegben, mozgását a gravitáció is segíti. Ebben az esetben lehetőség van arra, hogy a folyadékáramlást a réteg alsó peremének az elérése után is fenntartsuk, ugyanis a porózus réteggel mint kapillárisrendszerrel összekötött alsó és felső kamra közlekedőedényként működik. A leszálló elrendezést ritkán használjuk.



4. ábra Leszálló kromatográfia telített gőzterű normál kádban. Üres nyilak jelzik az eluens párolgását a folyadékfelszínen, tele nyilak a már átítatott rétegen. A még száraz rétegen megtörténik az oldószergőzök adszorpciója, előtelítése. A kifejtés nem áll meg akkor, amikor az eluens eléri a réteg alját, hanem tovább folytatódhat (azaz a túlfuttatás lehetséges). Ezt az elrendezést nagyon ritkán használják.

Osztott aljú, ún. ikerkádakkal könnyű megvalósítani a gőztéri telítést és a kondicionálást, ennek módját láthatjuk az 5. ábrán. A felcseppentett réteget az ikerkád száraz felébe helyezzük, a szükséges ideig várunk arra, hogy a gőzök előadszorpciója megtörténjen, majd a kádat óvatosan addig döntjük oldalra, amíg az eluens átfolyik a másik téréfélre. Ezután a kádat visszaállítjuk az eredeti állásába, és megvárjuk a futás végét. Az átöntés során gondoskodni kell arról, hogy a réteg ne mozduljon el, vagy ne tapadjon fel a kamra falára. Legegyszerűbb, ha a száraz téréfélben a réteg mögé egy kis üvegrudat fektetünk, ami távtartóként működik. (Egyes kádtípusoknál ez az áttöltés problémás lehet, ilyenkor inkább felnyitjuk a kádat és kézzel áthelyezzük a réteget az eluensbe.)



5. ábra Kondicionálás és kifejlesztés ikerkamrában.

A főként HPTLC rétegekhez használt horizontális futtatókádak olyan felépítésűek, hogy mind szendvicskádként, mind pedig normál kádként használhatók. A vertikális kádakkal összevetve ebben az esetben is más lesz a kapott futási kép, de a határozott geometria, a jól kézben tartható kondicionálási körülmények miatt az eredmények jól reprodukálhatóak. A kád telített és telítetlen gőztérrel történő futtatásra egyaránt alkalmas.

Egyidejűleg két különböző összetételű futtatószer is használhatunk, ugyanis egymással szemben két, teljesen azonos felépítésű eluensstartályt és startlapot tartalmaz. Ugyanazon a lapon egyidejűleg két független mintasorozatot is analizálni lehet, ilyenkor a futtatást egymással szemben végezzük. Egy-egy vizsgálatnak rendkívül kicsi az oldószerigénye, egy 10 cm x 10 cm-es lap teljes kifejlesztéséhez 3-3,5 cm³ eluens elegendő.



6. ábra Horizontális futtatókád.

Az eluens kiválasztása

A megfelelő eluens kiválasztása a folyadékkromatográfia egyik legnehezebb feladata. Az analitikai elválasztások, vizsgálatok legnagyobb része nem végezhető el csupán egyetlen oldószernek a felhasználásával. Az eluens komponenseinek egymással elegyíthetőnek kell lenni. Amennyiben lehetőség van rá, törekszünk az egymáshoz közeli forráspontú oldószerek használatára, hogy a futás közben, illetve a kondicionálás során az illékonyabb komponens kipárolgása miatt lehetőleg minél kevésbé változzon meg az eluens összetétele. Az eluensnek oldania kell a minta összes komponensét. Lehetséges ugyan olyan futtatást is végezni, amikor az eluens egyáltalán nem oldja a minta bizonyos komponenseit, de az lényegét tekintve egy szelektív kicsapással egybekapcsolt, rosszul reprodukálható kromatográfiás vizsgálatnak felel meg. A teljes oldhatatlanság ritka, ezért a csapadékot adó anyag önmaga is lassan, folyamatosan szivárog, rontja a képet. Amennyiben lehetséges, kerüljük az ilyen módszereket. A csapadékot

foltból nehezen oldódnak ki a bezárt anyagok, így előfordulhat, hogy a korábban egy foltot adó komponensek is hosszú, folyamatosan kioldódó csík formájában jelennek meg. Nem tudhatjuk azt sem, hogy a felecseppentési foltnál keletkező csapadék nem torzítja-e a koncentrációkat.

3. táblázat Az oldószerek Snyder-féle eluotróp sorozata

	$\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$	$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2(\text{OH})_2)$	$\epsilon^\circ(\text{C18})$
n-Pentán	0.00	0.00	
n-Hexán	0.00-0.01	0.00-0.01	
i-Oktán	0.01	0.01	
Ciklohexán	0.04	0.03	
Szén-tetraklorid	0.17-0.18	0.11	
Xilol	0.26		
Toluol	0.20-0.30	0.22	
Benzol	0.32	0.25	
Dietil-éter	0.38	0.38-0.43	
Diklór-metán	0.36-0.42	0.32-0.32	
Kloroform	0.36-0.40	0.26	
1,2-Diklór-etán	0.44-0.49		
Metil-etil-ke-ton	0.51		
Aceton	0.56-0.58	0.47-0.53	8.8
1,4-Dioxán	0.56-0.61	0.49-0.51	11.7
Tetrahydro-furán	0.45-0.62	0.53	3.7
Metil-t-butyl-éter	0.3-0.62	0.48	
Etil-acetát	0.58-0.62	0.38-0.48	
Dimetil-szulfoxid	0.62-0.75		
Dietil-amin	0.63		
Acetonitril	0.52-0.65	0.50-0.52	3.1
1-Butanol	0.70		
Piridin	0.71		
2-Metoxi-etanol	0.74		
n-Propanol	0.78-0.82		10.1
i-Propanol	0.78-0.82	0.60	8.3
Etanol	0.88		3.1
Metanol	0.95	0.70-0.73	1.0
Etilén-glikol	1.11		
Dimetil-formamid	nagy	nagy	7.6
Víz	nagyon nagy	nagyon nagy	
Ecetsav	nagyon nagy	nagyon nagy	

Annak eldöntésére, hogy milyen oldószerekből álljon az eluens, próbafuttatásokat végzünk. A próbafuttatásoknak nem kell teljes értékű kromatogramot szolgáltatniuk, csak azt kell megmutatniuk, hogy mely oldószerek eluálják jól, és melyek rosszul a vizsgálati minta komponenseit. A lehető legegyszerűbb vizsgálatot néhány perc alatt el lehet végezni, mert már egy-két foltnyi távolságra való elmozdulás is sok információt szolgáltat.

A megfelelő futtatószer kiválasztása történhet több kis kádban történő egyidejű futtatással, vagy külön erre a célra kidolgozott, sokcsatornás horizontális kifejlesztő kádban (ún. Vario kádban). Ha már ismerjük, vagy eldöntöttük az eluens minőségi összetételét, a mennyiségi arányok beállítása további vizsgálatokat igényel. (A legkevesebb kísérletből a legnagyobb felbontóképesség megtalálását a Prizma modell segítségével végezhetjük, aminek tárgyalása meghaladja a lehetőségeinket, de részletes leírása a szakirodalomban könnyen megtalálható.)

A mindennapi gyakorlatban a legnagyobb segítséget az oldószer kiválasztásához az eluotróp sorozat jelenti. Az egyes oldószerek egymáshoz viszonyított elúciós (leoldó) képességét, azaz az eluotróp erejét (ε^0) egy kísérletileg megállapított ún. eluotróp sorozatban foglalták össze. Ez a sorozat elsőként alumínium-oxid állófázisra lett kidolgozva, de kis módosítással átvihetők az eredmények szilikagélre is a köv. képlet alapján:

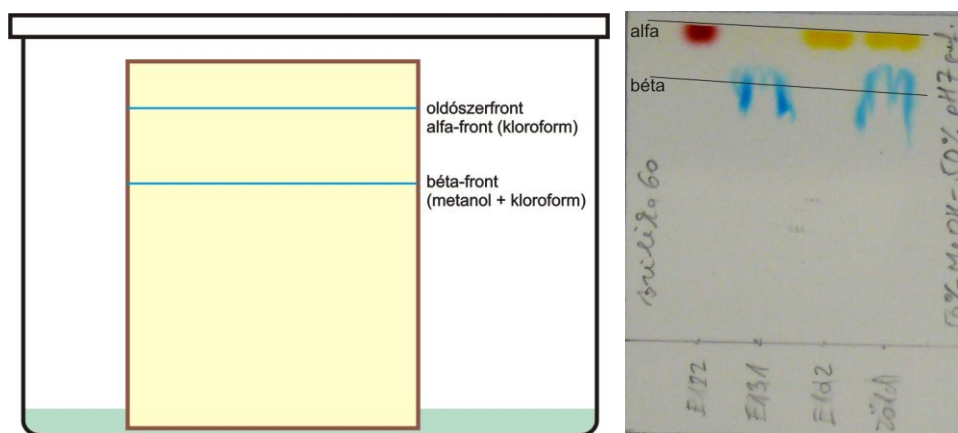
$$\varepsilon_{\text{szilikagél}}^0 = 0,77 \cdot \varepsilon_{\text{alumínium-oxid}}^0$$

Mára már kidolgozták a fordított fázisra vonatkozó, részleges eluotróp sorozatot is. Az eluotróp sorozat ismertebb tagjait a következő táblázatban foglaltuk össze.

Oldószerkegely esetén az eredő ε^0 érték nem lineárisan, hanem logaritmikusan változik az elegy komponenseinek móltörtjeivel.

Ha az eluens alkotóinak nagyon különböző a polaritása (pl. kloroform–metanol elegy), akkor a rétegen a futás közben megtörténik az oldószerkomponensek szétválása (frontális szeparációja) is, ami a fő front (ún. α -front) mellett egy másodlagos oldószerfront (β -front) kialakulását okozza. Ez szemmel gyakran nem látható, de megfelelő festési eljárással

kimutatható. A második front helyzete a használt oldószerkelet összetétele mellett még sok más paramétertől, így a lemez víztartalmától is függ, teljesen reprodukálható kromatogramot csak mindenben azonos körülmények között lehet kapni. Amennyiben mód van rá, érdemes az eluensünket olyan oldószerekből készíteni, amelyek polaritásai nem állnak nagyon messze egymástól.



7. ábra Bal oldalon a másodlagos oldószerszint kialakulása látható erősen eltérő polaritású oldószerkelet használata esetén. A béta-front szabad szemmel gyakran nem látható, de a közelébe eső foltokra jelentős hatása lehet. Jobb oldalon egy olyan kromatogram látható, amelyen a metanol-víz eleggyel ételfestékeket választottunk szét. A metanol alfa-frontja mögött kialakuló vizes béta front nem jól definiált, helyzete a réteg lokális nedvességtartalmától függ, ezért szabályos áramlás helyett kiszámíthatatlan módon fut, a kék színezék foltját örvénylásszerűen összezavarja.

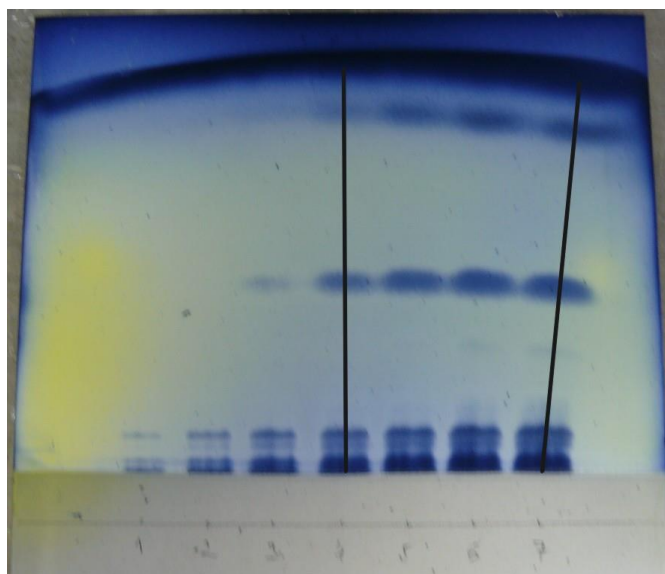
Mintafelvétel

Az egyes mintákat a vékonyréteg lap megadott helyére, az ún. startvonalra, azon belül a startpontokra kell minél pontosabban, minél egyenletesebben felvinnünk.

A kamra típusa, a futtatás módja részben befolyásolhatja, hogy a startvonalat és a startpontokat hová helyezzük. Általános szabály, hogy 20 cm x 20 cm-es normál TLC-s lapnál egyik szélén sem lehet folt a lap szélétől számított 20 mm-en belül és a startvonal 20 mm-re legyen a lap alsó szélétől. A minták nem lehetnek 10 mm-nél közelebb egymáshoz, de vannak

módszerek, ahol akár 20 mm távolságot is előírnak. 10 cm x 10 cm-es HPTLC-s lemeznél a két széltől számítva 10-15 mm-en belül nem lehet folt, és a minták legalább 6 mm-re legyenek egymástól. Álló kádnál a startvonal kb. kb. 15 mm magasan legyen, de horizontális kádnál a 10 mm is megfelelő.

Láttuk, hogy a rétegek teljes felületén párolgás játszódik le. A nem tökéletesen telített gőztérű kamráknál a párolgás különösen jelentős a lemezek széle felé haladva. Ennek következtében az eluens nem csak a startvonalra merőleges irányba mozog, hanem a lap közepe felől is áramlik a lap széle felé. A foltok nem párhuzamos egyenesek mentén fognak elhelyezkedni, hanem valamelyest sugárirányban kifelé tartva. Ezt a jelenséget peremhatásnak nevezzük. Magas forráspontú oldószerek esetén a peremhatást gyakran észre sem lehet venni, de annál erősebben jelentkezik, minél kisebb az eluens valamely komponensének a forráspontja. Nagyon illékony eluens használtakor a gőztér telítése és a lap kondicionálása különösen fontos.

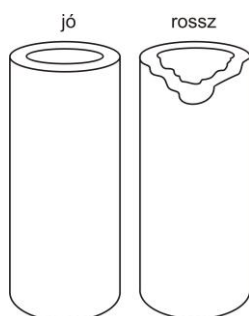


8. ábra Peremhatás jelentkezése 10 x 10 cm-es, koncentráló zónás HPTLC lapon, a réteget 3 mm vastag, telítetlen gőztérű, szendvics elrendezésű horizontális kádnál futtattuk. Az eluens diklór-metán volt, aminek a forráspontja nagyon alacsony, csak 42 °C. Jól látható, hogy az eluensfront nem egyenes, hanem félkörívben hajlott, és az oldalsó minták foltjai a középponthoz képest sugárirányban kifelé sodródnak.

A minta felvitele történhet egy kapillárisból történő felcseppentéssel, vagy szórással. Az automata berendezések csak nagy mintaszámnál használatosak, általában vagy szabadkézi felcseppentéssel, vagy mechanikus kézi felcseppentő berendezéssel dolgozunk.

A kvalitatív analízisekhez elegendő, ha házilag készített kapillárist használunk a minták felcseppentésére. A kapillárisokat egyszer használatos Pasteur-pipettákból (szivornyákból) készíthetjük a legkönnyebben, ugyanis azok alacsony lágyuláspontú üvegből vannak, egyszerű gázégővel is könnyen olvaszthatók. A kapillárisoknak nem szabad sem nagyon vastagnak, sem túlságosan vékonyoknak lenniük, ezért a kihúzott cső két szélé és a közepe sem megfelelő vastagságú. Egy idő után mindenkiben kialakul a tapasztalat és már ránézésre meg tudja állapítani, hogy milyen a jó méret. Olyan hosszúságú kapillárist célszerű használni, amit kézzel kényelmesen meg tudunk fogni. A felcseppentést alapvetően befolyásolja a kapilláris végének az alakja. Merőleges vágással kapott sima él a megfelelő, a kicsorbult peremű kapillárist annyira a réteghez kell nyomni, ami már károsítja a réteget.

Kapilláris vágásához (valójában nem vágjuk, hanem karcoljuk) éles üvegvas pengé, vagy éles peremű kerámialap (pl. törött porcelán tál egy darabja) szükséges. Erdemes a vágandó kapillárist a két körmünk közé csiptetni, majd a vágó pengét a körmünk felületén csúsztatva odavezetni a kapillárishoz, ahol egyetlen mozdulattal, finoman végighúzzuk az üveget. Ne nyomjuk erősen, mert eltöri a csövet! Amennyiben jól karcoltuk meg, a karcolás oldalán finoman megnyomva a kapillárist az minimális erő hatására eltörik és a vágási él szabályos lesz.



9. ábra Jól és rosszul vágott (törött) kapilláris végek.

Kvantitatív, pontos munkához alapvető fontosságú, hogy a kalibráló törzsoldatokból illetve az ismeretlenekből pontosan ismert térfogatot cseppentsünk fel, amire nem alkalmasak a házi készítésű kapillárisok. A legpontosabb eredményt gyári készítésű, állandó térfogatú, kalibrált mintabemérő kapillárisokkal tudjuk elérni, amelyekhez töltőceruzaszerű befogó adaptert is vásárolhatunk. A bemérő kapillárisok hegyét addig tartjuk a mintaoldatba bemártva, amíg színültig megtelnek, majd utána egy vagy több részletben ürítjük ki a lemezre. A 0,5 és az 1 mikroliteres kapillárisokkal akár egy részletben is fel lehet a rétegekre vinni a mintákat, az 1 mikroliternél nagyobb térfogatokat azonban csak a kapilláris többszöri, rövid ideig a réteghez történő érintésével tudunk felcseppenteni úgy, hogy a folt mérete ne legyen túl nagy. Mindig tartsuk szem előtt, hogy azért kell kicsi foltot cseppentenünk, mert a lehető legjobb felbontást szeretnénk elérni. A felcseppentési foltnál lényegesen nagyobbak lesznek a kifejlesztett foltok, kisebbek pedig sohasem!. Figyeljünk arra is, hogy a koncentráció zónára történő cseppentéskor a foltok nagyon szétfutnak, tehát ilyenkor 10 mm távolságra tegyük egymástól a foltokat még akkor is, hogy ha HPTLC-s réteget használunk.



10. ábra Egy doboznyi 1 mikroliteres bemérő kapilláris, valamint a hozzájuk tartozó adapter. A bemérő kapillárisok meglehetősen költségesek, ami korlátozza a használatukat.

Vannak, akik 1-10 mikroliter térfogatú, lapos tővégű Hamilton-fecskendővel viszik fel a mintákat a lapra. Megfelelő gyakorlattal ez az eljárás is ugyanolyan jól használható, mint a bemérő kapilláris, de gyakorlatlan

kézben kisebb pontosságú és több hibalehetőséget rejt. A fecskendő tökéletes elmosásáról minden minta után gondoskodni kell. Semmilyen módon nem javasolható felcseppentésre a műanyag hegyű automata pipetták, ugyanis az azokból történő folyadékkiáramlást nem lehet finoman szabályozni, a pipettahegy vége ritkán egyenes, a nehéz pipettával pedig nagyon könnyen felsérthetjük az érzékenyebb réteget.

Preparatív rétegek használatakor a mintát nem pontokban, hanem egy folytonos vonal mentén visszük fel. Oda kell figyelnünk azonban, hogy ne tömítsük el a réteg pórusait, különben teljesen kiszámíthatatlan, örvénylésszerű képet kapunk a várt szép elválasztás helyett.

Lemezek szárítása, hőkezelése

A lemezek szárításához csak egy hajszáritóra van szükség.

Színreagens alkalmazása esetén gyakran előfordul, hogy a bepermetezés után 10-20 percig megadott hőfokon kell tartani a lemezt. A termosztált hevítőlap professzionális, mennyiségi analízishez nélkülözhetetlen. Kvalitatív vizsgálatokhoz egyszerűbb megoldás is megfelelő lehet, amilyen például a szabályozható hőmérsékletű elektromos rezsó, a fűthető mágneses keverő, vagy egy hőlégfúvó pisztoly. Mivel a lemez felületéről a hevítéskor a reagens oldószere és maga a reagens is párolog, szükség esetén megfelelő szellőztetésről vagy elszívásról gondoskodni kell.

Láthatóvá tétel

Fluoreszcens rétegen az UV elnyelésre képes foltokat UV-fénnyel besugározva láthatóvá tehetjük. Világos alapon sötét színű foltokat láthatunk, a sötétedés mértéke arányos a koncentrációval. Fluoreszcens indikátor nélküli réteget használunk abban az esetben, ha valamilyen kémiai reakcióval egyes komponensek fluoreszkáló származékká alakíthatók. Ilyen esetben UV-fény hatására sötét háttéren világos foltokat látunk, a fénykibocsátás mértéke arányos a koncentrációval.



11. ábra UV-kabinet. Megfelelő adapterrel ellátva az ablakon keresztül le is lehet fényképezni a réteget, vagy a redőny részleges félrehúzása után puha ceruzával körülrajzolhatjuk a foltokat.

Az UV-lámpáknak van kézi változata, vagy vannak dobozba szerelt változatok, ezek az ún. UV-kabinetek. Az ilyen néződobozok elsősorban szabad szemmel történő megtekintésre használatosak. Esetenként meg lehet oldani a rétegek fényképezését is, de a kissé oldalirányú nézőpont következtében a képen a függőleges élek távlatilag egymás felé tartanak. Ez nem zavarja sem a minőségi, sem a félkvantitatív mennyiségi kiértékelést. Professzionális célra olyan UV-VIS-megvilágító dobozok/asztalok is forgalomban vannak, amelyek több oldali lámpát és beépített kamerát tartalmaznak.

Az UV-VIS detektálás egy speciális készüléke a vékonyréteg kromatográfiás szkener, az ún. denzitométer. A denzitométerek olyan reflexiós fotométerek, amelyek néhány század milliméter széles sávokban az egész rétegről teljes spektrumot vesznek fel, amelyek csíkonkénti számítógépes kiértékelésével az egyes foltokban lévő anyagok kémiai minősége és mennyisége is meghatározható.

Előhívás

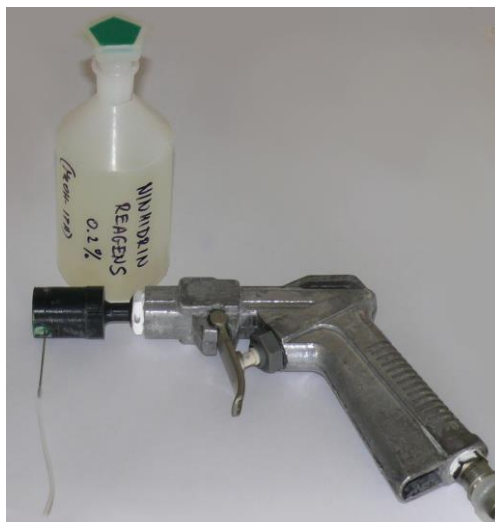
Amennyiben egy vagy több komponens nem tehetővé láthatóvá UV-fénnyel, valamilyen reagens alkalmazásával színes vegyületekké alakítjuk azokat. A reagenst a legáltalánosabban pumpás hajlakkszóróból, vagy sűrített gázos festékszóróból porlasztjuk a rétegre. A porlasztás során mindig gondoskodni kell a megfelelő elszívásról, szellőztetésről! A mindenki által belélegzett laboratóriumi levegőbe nem porlaszthatunk bele irritáló, agresszív, maró vagy toxikus anyagokat! (Alapvető munkavédelmi szabály, hogy a tiszta vízen és a tiszta levegőn kívül minden anyag veszélyesként kezelendő.) Porlasztáskor mindig viseljünk védőszemüveget!

A színreagensok között vannak olyan általánosan használható reagensok, amelyek erősen oxidálnak vagy roncsolnak, különösen hevítés hatására. Ilyen roncsoló reagensok a foszformolibdénsav, a tömény kénsav, tömény kénsav és ecetsav-anhidrid elegye, kénsavban oldott kálium-dikromát vagy kálium-permanganát, tömény kénsav és salétromsav elegye, tömény kálium-hidroxid. Ezekkel különösen vigyázzunk, mert a ruházatot, a bútorokat, jegyzőkönyvet, stb. is pillanatok alatt tönkre tehetik!

Vannak olyan szerves reagensok, amelyek valamilyen funkciós csoporttal színes vegyületet adnak, míg másokkal nem. Ezeket a reagensket specifikusan, bizonyos vegyületcsoportok kimutatására tudjuk felhasználni. Nagyon sok ilyen reagens van, ezek felsorolása is messze meghaladja a lehetőségeinket, ezért csak néhány jellemző példát adunk meg. A következő táblázatban összefoglalóan láthatjuk néhány általánosabban használható színképző reagens összetételét és az alkalmazásuk körülményeit. Gyakran nem csak egy, hanem több módszert v. reagenst is használhatunk egymás után, ezek az ún. előhívási protokollok. A protokollok végrehajtása során kapott kromatogramokat minden lépés után rögzítenünk kell (jegyzőkönyv, fénykép, rajzolás, stb.).

4. táblázat A legáltalánosabban használt színreagensek.

Reagens neve	Összetétel	Használat	Szín	Vegyületek köre
Kénsav	cc. H_2SO_4 vagy 50% kénsav	beszórás hevítés 110- 120 °C-on néhány percig	barna v. fekete foltok	nagyjából univerzális
Kénsav- dikromát	3 g $K_2Cr_2O_7$ 20 ml vízben oldva, majd 20 ml cc. kénsavval hígítva	beszórás hevítés 110 °C-on néhány percig	barna v. fekete foltok	univerzális
Fluoreszcein	50%-os vizes- metanolos nátrium- fluoreszcein oldat (50 mg/100 ml)	beszórás vizsgálat 366 nm UV fényben	fluoreszkáló foltok	sokféle szerves vegyület
Jódgőz	Jód kristályok	a lemezt jódkristályokat tartalmazó kádba állítani	barna foltok	sokféle szerves vegyület
Dragendorff- reagens	$K[BiI_4]$, ecetsavas KI-oldatban	beszórás	narancsbarna v. vöröses foltok	aminok, amidok, nitrogéntartalmú vegyületek
Ninhidrin	95 tf. alkoholos ninhidrin oldat (0,2%- os), és 5 tf. ecetsav (10%)	beszórás hevítés 110 °C-on néhány percig	sárga, rózsaszín v. ibolya színű foltok	aminosavak, aminok
Foszfor- molibdénsav	5% foszfor- molibdénsav etanolban	beszórás hevítés 120 °C, 10-15 perc	kék foltok	nagyon sokféle szerves vegyület



12. ábra Házi készítésű reagensszóró pisztoly, amely 2-3 bar nyomású inert gázzal működtethető. Kereskedelmileg beszerezhető festékszóró aeroszolos flakonok, valamint akkumulátoros, egyedi reagensszóró készülékek is. Szükség esetén pumpás dezodoros flakonból is jól lehet porlasztani a reagenseket.

A rétegek dokumentálásának alapvető feltétele, hogy mind UV-fényben, mind látható fényben felvételt tudjunk azokról készíteni. A normál fényben történő fényképezés nyilvánvalóan nem jelent problémát. Az UV-fényt kézi, illetve dobozba szerelt UV-lámpával biztosítjuk. Az UV-lámpát a réteg fölé helyezük el és célszerű egy állványon rögzíteni. Ahhoz, hogy ne hamis színek legyenek a fényképen, a fényképezőgép optikája elé egy vastagabb üveglapot helyezünk, ami az UV-sugárzást kiszűri. A fotózáshoz akár a mobiltelefonunk kameráját is használhatjuk.

A kapott digitális képeket egyrészt a jegyzőkönyvünk számára kinyomtatjuk, másrészt megfelelő kromatográfiás programmal mennyiségileg és minőségileg ki is tudjuk értékelni. A kiértékeléssel külön fejezetben foglalkozunk.

3. A VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK MENETE

Miután megismerkedtünk a kádák és rétegek alapvető tulajdonságaival, nézzük, hogy hogyan történik egy kromatográfiás vizsgálat elvégzése!

- 1) Kalibráló oldatok elkészítése, ismeretlenek méréshez előkészítése.
- 2) Réteg levágása, minták felcseppentése.
- 3) A réteg kondicionálása, lehetőleg a kádban.
- 4) A réteg kifejlesztése, majd szárítása
- 5) A szemmel láthatató foltok dokumentálása.
- 6) A láthatatlan foltok egy vagy több lépéses láthatóvá tétele, lépésenkénti dokumentálással.
- 7) Mosogatás, takarítás, rendcsinálás, előkészülés a következő méréshez.
(Az analitikában a tisztaság nem fél egészség, hanem alapvető követelmény!)
- 8) A kromatogramok kinyomtatása, jegyzőkönyvben rögzítése.
- 9) A kromatogramok kiértékelése, az eredmények jegyzőkönyvben rögzítése.

3.1 Oldatsorozatok, minták előkészítése

Az általános kémiai gyakorlat szerint járunk el az oldatsorozatok előállításánál. Mivel a vizsgálatoknak nagyon kicsi az oldatigénye, a módszernek pedig relatíve nagy a hibája, általában elegendő, ha automata pipetták használatával végezzük a hígításokat.

3.2 Lapok levágása, minták felcseppentése

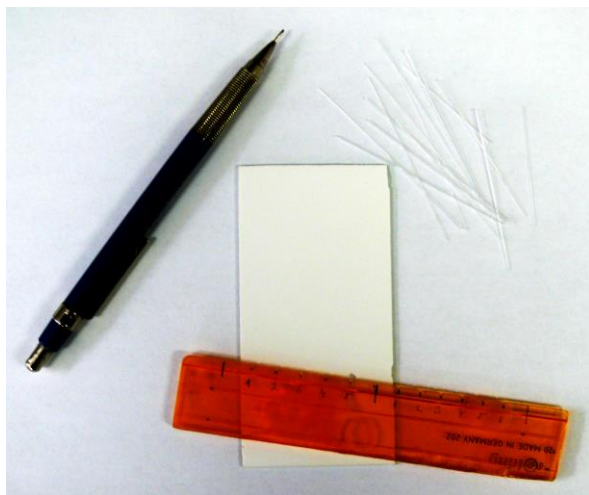
A legelső dolog a vékonyréteg lap előkészítése a minták felcseppentéséhez. A lapokat lehetőleg az élüknél fogva, illetve a hátlapot tartva kezeljük. Az aktív réteget ne fogjuk meg csupasz kézzel, mert az ujjlenyomatunk rajta marad! Ha van rá lehetőség, érdemes vékony gumikesztyűt használni. Ha nem az egész lapot akarjuk felhasználni, úgy le kell vágni belőle a szükséges darabot. Csúnya és pazarló dolog össze-vissza vagdalni egy lapot. A helyes

gyakorlat szerint mindig egy teljes lapszélességű csíkot vágunk le, majd abból szabjuk le a kívánt méretet.

Amikor ollóval vágjuk a lapot, figyeljünk oda arra, hogy bal kezünkben legyen a használni kívánt darab, jobb kezünkben az olló. Ez azért fontos, mert az olló a vágás során enyhén meghajlítja/megtöri a réteget és a hajlásnál az állófázis leválhat a hordozó lemezről. Az alumínium hordozójú lapokat könnyebb vágni, mint egyes műanyag hordozójúakat, amelyekről a réteg kifejezetten könnyen lepattan.

Barkácskéssel úgy vágunk réteget, hogy a vágási vonalhoz illesztünk egy vonalzót (lehetőleg fémvonalzót), stabilan rányomjuk a rétegre, majd a kés hegyével többször is végighaladunk a vágási vonal mentén. Először finoman nyomva lekaparjuk a réteget, majd erősebben nyomva annyszor végighaladunk a vonalon, amíg a vágási vonal mentén elválik a két fél egymástól.

A legnehezebb és a legnagyobb gyakorlatot az üveg hordozójú lapok vágása jelenti, amelyekből 20 mm-nél keskenyebb darabokat vágástechnikai problémák miatt nem készítünk. A vágáshoz sima, tiszta asztalfelületre, alátétnek tiszta papírlapra, vonalzóra, jelölő tollra és egy jó minőségű üvegvágóra van szükség. Kerek üvegvágó is használható, de nagyon finom vágást csak vídia vagy gyémánt hegyű szerszámmal lehet végezni. A nagy lapot réteggel lefelé fordítva letesszük az asztalra helyezett tiszta papírlapra, bejelöljük egy-egy pontban a vágási egyenes két végét. (A bejelöléshez legjobb a finom hegyű táblafilc, az ugyanis szárazon letörölhető a vágás után.) A vonalzót odaillesztjük a vonal mellé (figyelni kell, hogy az üvegvágó fejének megfelelő vastagsággal elcsúsztassuk), majd a lap egyik szélétől a másikig határozott mozdulattal végigkarcoljuk az üvegfelületet. (Több karcolás néha javít, néha ront a helyzeten.) A megkarcolt lap alá egy hurkapálcát helyezünk úgy, hogy a pálcá pontosan a karcolás alatt legyen. Egyik kezünkkel rögzítjük a lemez egyik végét a papíron, majd a túlsó oldalon határozottan lefelé megnyomjuk a lap másik felét. Ha minden rendben megy, akkor az üveg a karcolás mentén könnyen, egyenes vonalban elpattan. Előfordul, hogy bekarcoláskor vagy pattintáskor a lap nem a kívánt helyen törik, hanem valahol máshol. Ennek az oka az üvegben lévő rejtett feszültség, vagy a nem megfelelő vágás lehet.



13. ábra Minimálisan szükséges eszközkészlet a TLC-hez.

A felcseppentés előtt húzzuk meg a startvonalat, jelöljük ki a startpontokat! A foltok alatti részt felhasználjuk a minta azonosítójának felírására, a réteg két oldalán lévő csíkot pedig az eluens összetételének, illetve a réteg típusának a felírására. Ne írjunk semmit sem a futtatási területre. Csak nagyon puha ceruzát használjunk!

A felcseppentést úgy végezzük, hogy a kapillárist belemerítjük az oldatba, majd kivesszük és óvatosan, kis mozdulatokkal, többször egymás után hozzáérintjük a réteghez a kívánt pontban. Két részlet között szükség lehet a folt megszáritására. Igyekezzünk azonos méretű foltokat felcseppenteni! Normál rétegnél a folt átmérője 2-4 mm legyen, HPTLC-s rétegnél a cseppek kétszer olyan közel kerülhetnek egymáshoz, ezért a foltok csak 1-2 mm átmérőjűek lehetnek. Mennyiségi vizsgálatokhoz kalibrált kapilláris használata szükséges, amit a térfogatától és a réteg anyagától, vastagságától függően egy vagy több részletben ürítünk ki.

Tipikus felcseppentési koncentráció: kb. 1-10 mg/ml, tipikus felcseppentett térfogat: 0,50–5,0 mikroliter.

3.3 Kifejlesztés, előhívás

A kádakról szóló fejezetben már részletesen láttuk a telített gőztér jelentőségét. Amennyiben ikerkáddal dolgozunk, lehetőség van a réteg már leírt, kádban történő kondicionálására. Amennyiben egyszerű káddal dolgozunk, béleljük ki a kádnak a réteggel szemközti falát szűrőpapírral, öntsük bele az eluenst, zárjuk le a kádat, rázzuk meg, hogy a fal megnedvesedjen, majd 15 percig hagyjuk állni. Ezután a kádat csak annyi időre nyitjuk fel, amíg a felcseppentett réteget beleállítjuk, majd visszazárjuk. Az időzítő órán beállítjuk a futás idejét. Amennyiben nem ismerjük a szükséges időt, időközönként ellenőrizzük az oldószerfront helyzetét.

Miután elértük a kívánt futási távolságot, kivesszük a réteget és hajszárítóval megszáritjuk.

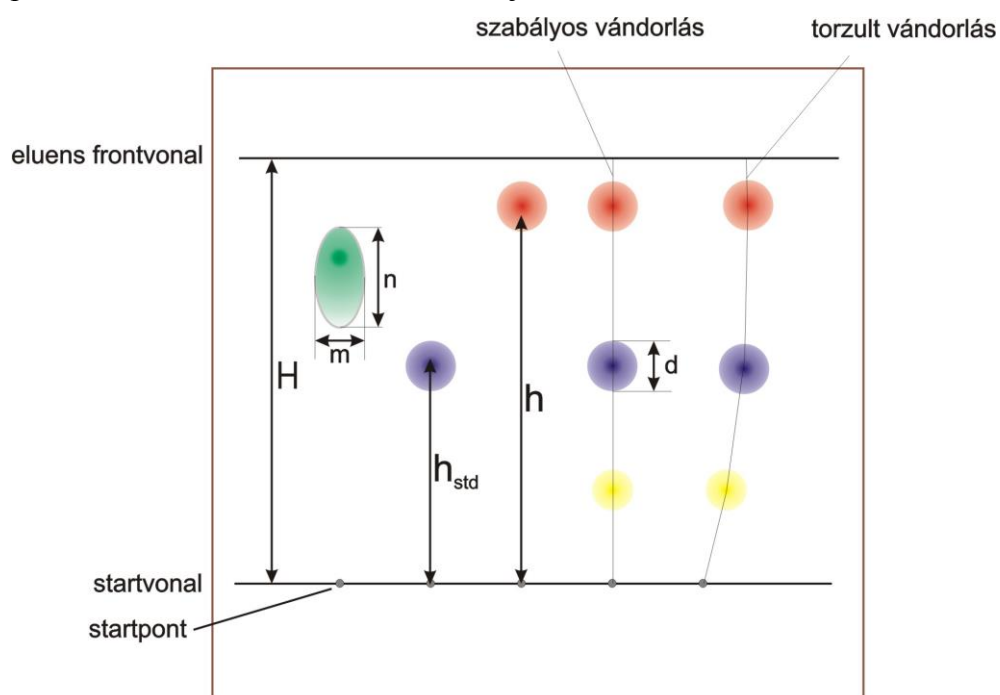
A módszerben előírt előhívási/vizualizációs módot használva láthatóvá tesszük a foltokat és dokumentáljuk a kromatogramot.

Magát a kifejlesztett lemezt nincs értelme a jegyzőkönybe beragasztani, mert a réteg leperreg, üveg hordozó esetén pedig nem fér bele a füzetbe és törékeny is. (Papírkromatogramot be lehet ragasztani.) A vékonyréteg lapok helyett azok kinyomtatott képét ragasszuk be. Nagyon sok esetben a mobil telefonban lévő kamera elegendő a dokumentációra. Ideális esetben természetesen nagy színmélységű fényképezőgépet használunk (lehetőleg RGB 32 bites, vagy 48 bites színmélységgel), de ha az nem áll a rendelkezésünkre, normál digitális kamera is megfelel a célnak. Fényképezőgép és nyomtató híján pedig irodai fénymásolót is használhatunk, de ekkor a másolás előtt tegyünk egy-egy átlátszó fóliát a réteg alá és fölé, nehogy beszennyezzük a fénymásoló belsejét a reagenssel! Amennyiben sem nyomtató, sem fénymásoló nem áll a rendelkezésünkre, akkor marad az a legősibb módszer, amit senki nem használ szívesen. Egy vékony fehér papírlapot a rétegre helyezünk, és ceruzával arra átmásoljuk a réteg és a foltok körvonalait.

4. VÉKONYRÉTEG KROMATOGRAMOK ELEMZÉSE

4.1 Alapfogalmak

A vékonyréteg kromatogramokat kifejlesztésük után minőségileg illetve mennyiségileg ki kell értékelnünk. A kiértékeléshez szükséges alapvető paramétereket a következő ábrán láthatjuk.



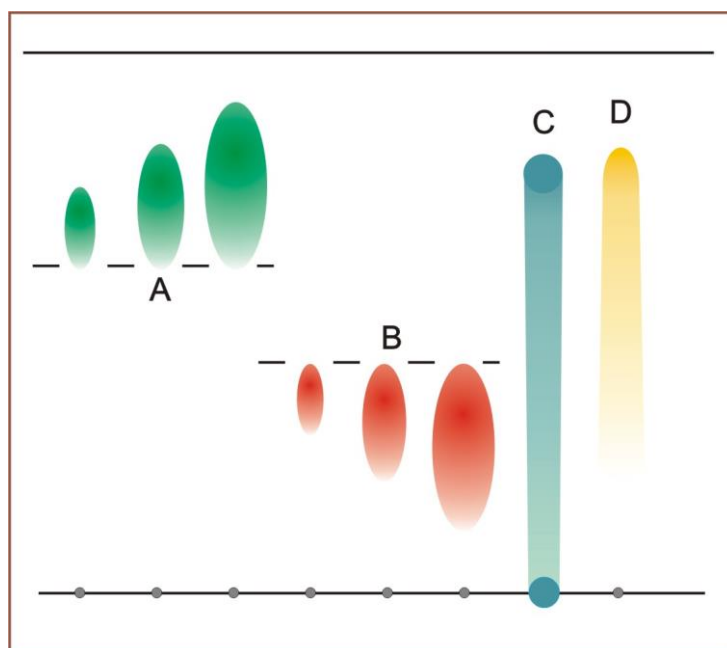
14. ábra Vékonyréteg kromatogram a legfontosabb alapfogalmak és a közvetlenül mérhető paraméterek feltüntetésével.

Két folt azonosságának vagy különbségének az eldöntését a retenciós faktorok (R_f) alapján végezzük. Az R_f értéket a következő képlettel definiáljuk:

$$R_f = \frac{h}{H}$$

ahol h = a kiválasztott folt középpontjának távolsága a felcseppentés helyétől, H = az oldószerfront távolsága a startvonalától számítva.

Az ideális folt tökéletesen kör alakú, míg a reális foltok jelentős hányada inkább ellipszis alakú. Ellipszis alakú folt esetében a mennyiség függvényében változik az R_f érték is, tehát ilyen anyagoknál a minőségi azonosítás önmagában az R_f alapján meglehetősen bizonytalan, vagy nem is lehetséges. A következő ábrán a vékonyréteg kromatogramok esetén leggyakrabban tapasztalható foltalak torzulásokra láthatunk példákat.



15. ábra Jellemző foltalak torzulások a vékonyréteg kromatográfiában.

Az A és B anyagok mennyiségétől függően vagy a foltok alja, vagy a teteje van egy egyenesben. Nyilvánvaló, hogy a foltok középpontjára számított R_f értékek nem állandóak, hanem a koncentrációtól függenek, így minőségi azonosításra nem alkalmasak. A foltípustól függően azonban a folt aljára vagy tetejére számolt R_f értékek nagyjából állandók.

A C típusú folt olyan anyagnál jelentkezik, amelynek egy vagy több komponense csak nagyon gyengén oldódik az eluensben. Az ilyen kromatogramok nem értékelhetők, meg kell változtatni az eluens összetételét. A D típusú folt akkor jelentkezik, ha nagyon erős az adszorpció az állófázison (pl. szilikagélen az aminosavak), vagy ha a rétegen folyamatosan bomlik az anyag.

Az előző részekben láttuk, hogy milyen sok környezeti tényezőre lehet érzékeny egy vékonyréteg kromatográfiás elválasztás. Az R_f értékek szigorúan véve csak az azonos lapon, azonos körülmények között futtatott minták esetében hasonlíthatók össze! Az R_f érték bizonytalanságát úgy lehet csökkenteni, ha a foltok futását egy a vizsgált mintához hasonló kromatográfiás tulajdonságú belső standard futásával hasonlítjuk össze. A belső standard retenciósfaktorára ($R_{f(\text{std})}$) vonatkoztatjuk a vizsgált folt R_f értékét, így kapjuk az R_x relatív futási index értékét, ami stabilabb és reprodukálhatóbb, mint az R_f önmagában.

$$R_{f(\text{std})} = \frac{h_{\text{std}}}{H}$$

$$R_x = \frac{R_f}{R_{f(\text{std})}}$$

4.2 Mennyiségi meghatározás a foltterület alapján

Mennyiségi meghatározást legegyszerűbben a foltterület kézi mérésével (kör vagy ellipszis területének számításával), több ponthoz tartozó kalibráló görbe felvételével, majd abból visszakereséssel végezhetünk.

A foltok területét ideális esetben mint egy kör területét számítjuk ki, a jól ismert képlet felhasználásával:

$$T = \frac{d^2 \pi}{4}$$

Ellipszis esetén a kis és a nagytengely hosszából számítjuk ki a területet:

$$T = \frac{m \cdot n \cdot \pi}{4}$$

A kalibráló egyenest úgy kapjuk, hogy a kalibráló oldat koncentrációjának függvényében ábrázoljuk az adott koncentrációkhoz tartozó foltterületet.

4.3 Mennyiségi meghatározás műszeres denzitometriás módszerrel

A folterület helyett koncentrációmeghatározásra sokkal nagyobb pontossággal lehet alkalmazni a denzitometriás eljárást. Professzionális célokra mennyiségi méréseket csak denzitométeres kiértékeléssel végeznek. Fontos tudnunk, hogy rossz felcseppentési technika, pontatlan oldatok, torzult áramlási viszonyok, nem kellően kontrollált kromatográfiás körülmények esetén a denzitométerrel kapott eredmények az elkövetett kísérleti hibák miatt nem lesznek lényegesen jobbak, mint a szimpla kézi kiértékelés eredményei.

4.4 Minőségi és mennyiségi kiértékelés digitális fényképek alapján

A vékonyréteg kromatogramok költséghatékonyabb, de műszeres jellegű mennyiségi kiértékelésre nagyon sok laboratóriumban igény van. A digitális fényképezés elterjedésével ma már nem jelent problémát a jó minőségű képek készítése. A kiértékeléshez pedig ingyenesen hozzáférhető egy olyan számítógépes program, ami nem csak szürke árnyalatokban képes a fényképek elemzésére, hanem az alap színcsatornák felbontásával olyan képeket is fel tud dolgozni, amelyek más programok esetén értékelhetetlenek (pl. halványzöld háttéren halvány rózsaszínű foltok). A továbbiakban ennek a programnak a használatával ismerkedünk meg.

A CP-Atlas és a Gelanalyzer programok használata

A CP-Atlas célzottan a VRK lapok kiértékeléséhez készült, a Gelanalyzer elsősorban gélelektroforézishez jó, de szükség esetén VRK-ban is használható. A programokat mindenki ingyenesen letöltheti és szabadon feltelepítheti a saját gépére

<https://sites.google.com/site/lazaristvan99/home/CpAtlas.zip>

<https://sites.google.com/site/lazaristvan99/home/GelAnalyzer2010a.zip>

<http://gelanalyzer.com>

A program bármilyen operációs rendszeren fut (Windows, Linux, stb.), csak a Java futtatókörnyezetet igényli, az pedig a legtöbb gépen már

megtalálható. Mindig a legfrissebb Java futtató környezetet célszerű használnunk, amit a Java honlapjáról ingyenesen le lehet tölteni.

Telepítés: nem kell telepíteni. A tömörített fájlt ki kell csomagolni egy könyvtárba, ahonnan a **CpAtlas.exe** fájl, vagy a CpAtlas.jar fájl közvetlenül futtatható. Az első használatkor el kell fogadni a licenz feltételeket az OK megnyomásával. Innentől a program használatra kész.

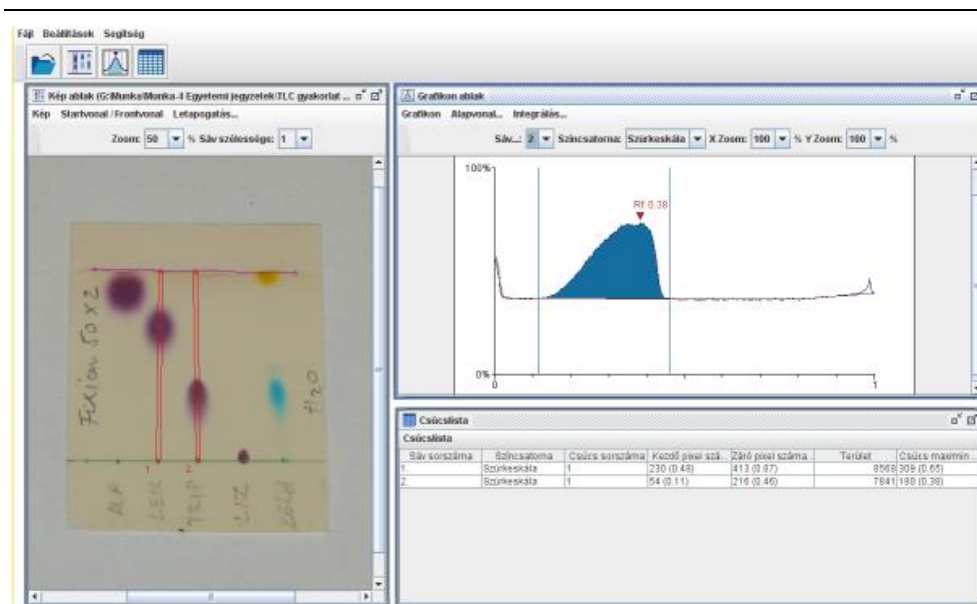
Nyelv beállítása: Ha a magyar nyelvű változatot töltöttük le az internetről, akkor eleve magyarul működik. Hiba esetén a program visszatér az angol alapértelmezéshez. A language.txt fájlt át lehet írni, így a programot minden nemzet anyanyelvére, illetve az egyes laboratóriumok házi használatára is könnyen honosítani lehet!

A program használata

A program nagyon egyszerű felépítésű, három fő ablakban található meg az összes eredmény.

Az ablakok alapértelmezésben egymás alatt találhatók és a bal felső sarokban, a menüsor alatt lévő ikonokra kattintva lehet azokat az előtérbe hozni. A továbbiakban mindenki szabadon áthelyezheti az ablakokat, ahogy az alábbi ábrán is láthatók.

Az analízishez először be kell olvasnunk a kívánt kromatogramot tartalmazó fájlt (csak jpg, png és gif használható). Nyomjuk meg az *Új analízis* gombot, majd keressük meg és nyissuk meg a kívánt fájlt. Ha szükséges, kicsinyítsük vagy nagyítsuk a képet annyira, hogy jól kezelhető legyen.



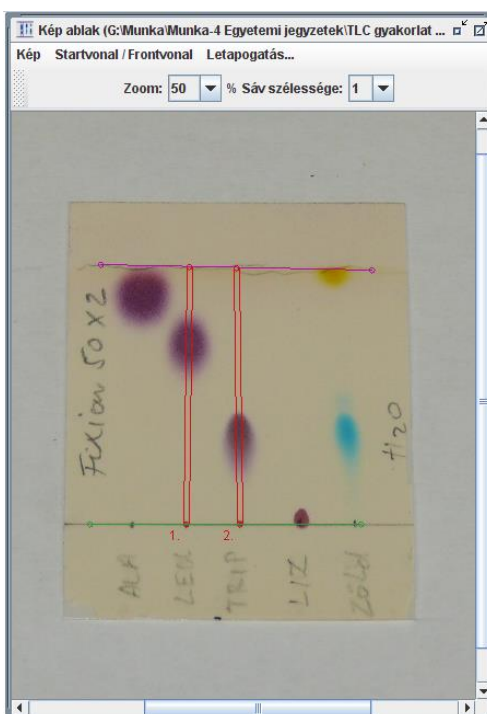
16. ábra A CP-Atlas program képernyőképe.

Következő lépésben ki kell jelölnünk a képen a startvonalat, utána pedig az oldószerfrontot. A *Kép ablak*ban nyomjuk meg *Startvonal/Frontvonal* gombot. A legördülő menüből válasszuk ki a *Startvonal megadása* pontot, majd kattintsunk a kívánt startvonal egyik végére, utána a másik végére. Megjelenik a startvonal a képen. Amennyiben módosítani szeretnénk a startvonalat, kattintsunk valamelyik végpontjára és az egérgombot lenyomva tartva húzzuk a végpontot az új helyzetébe. Hasonlóképpen eljárva hozzuk létre az oldószerfront jelölésére szolgáló frontvonalat, ami a startvonalhoz hasonló módon módosítható. (Csak akkor lehet a startvonalat és a frontvonalat mozgatni, amikor még nincsenek kijelölve a sávok. Ha már létrehoztunk legalább egy sávot, onnantól kezdve csak a sávok pontjai mozgathatók. A startvonal vagy frontvonal későbbi módosításához ki kell törölni a sávokat, amelyekkel egyidejűleg az összes addigi eredmény is törlésre kerül.)

Hozzuk létre azokat a sávokat, amelyek mentén fel szeretnénk venni a denzitogramokat! Ezt úgy tudjuk megtenni, hogy a *Letapogatás* menüből kiválasztjuk az *Új sáv létrehozása* pontot, majd a kívánt startponthoz, utána pedig a kívánt végponthoz kattintunk. A klikkelés után a végpontok automatikusan a startvonalhoz illetve a frontvonalhoz ugranak. A sáv végpontjai az egérrel megfogva a kívánt helyre húzhatók. A két ponttal

jellemzett sáv mellett használhatjuk az *Új törtvonal hozzáadása* pontot is olyan esetben, amikor rossz minőségű, torzult nyomvonalú folt sorozatot kell kiértékelnünk. Ekkor a kívánt pontokba kell kattintani, majd a törtvonalat a jobb oldali egérgombbal való kattintással zárjuk le. (Általában a több pontos/vonalas objektumok lezárása a jobb oldali egérgombbal való kattintással történik.) Ne feledjük: a jó eredmény alapvető feltétele a jó kromatogram! A több pontos törtvonallal megadott sáv csak a kis futási egyenetlenség korrekciójára szolgál! Ha nagy a torzulás, inkább ismételjük meg a futtatást!) A már létrehozott sávok a végpontjuk kijelölése után a menü keresztül törölhetők. Törléskor az összes ahhoz a sávhoz tartozó adat is törlődik. Sávot létrehozni a későbbiekben is lehet.

A sávok szélessége alapértelmezésben 1 képpont, de ettől szélesebb sávot is beállíthatunk úgy, hogy a sáv végpontjára kattintunk, majd a *Sáv szélessége* legördülő listából kiválasztjuk a kívánt szélességet. Több pontos sáv szélesség esetén a párhuzamos kísérleti adatokat átlagoljuk, így a zajszintet csökkenteni tudjuk úgy, hogy megtartjuk a valódi kísérleti adatokat. (Ez nem azonos a görbe simításával, amire a *Grafikon ablakban*, a *Grafikon* menüpont alatt van lehetőség. A simításnál az adott denzitogram szomszédos pontjai kerülnek bizonyos tartományon belül, léptető módban átlagolásra, ami optikailag simábbá teszi a görbét, de a nagyon kis méretű képfájlok esetén módosíthatja az integrál értékeket.)



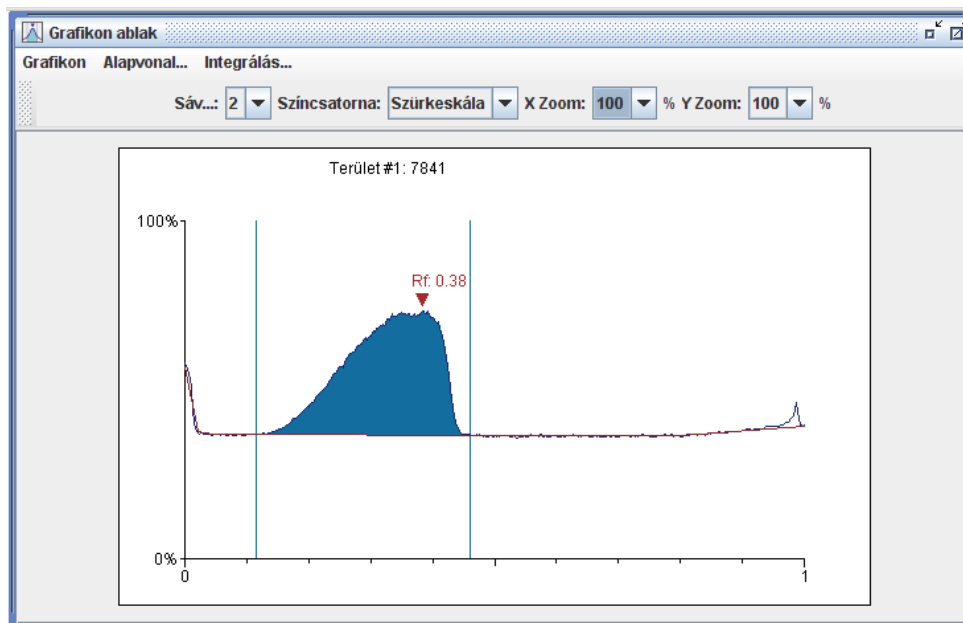
17. ábra A Grafikon ablak. A képen látható a startvonal, a frontvonal, valamint két darab létrehozott sáv.

Miután kijelöltük a sávokat, a Grafikon ablakban megjelenik a legutoljára létrehozott sávhoz tartozó denzitogram. A denzitogramon még nem szerepel az alapvonal, sem pedig a csúcsok, ezeket kézzel kell kijelölnünk. A denzitogramok között a Sáv... legördülő listával választhatunk.

Az *Alapvonal* menüpontban az *Alapvonal hozzáadása* pontot válasszuk ki alapvonal kijelöléséhez. Kattintsunk a denzitogram bal szélén a görbére, majd még annyi helyre, amennyit szükségesnek látunk. Haladjunk a görbe jobb szélé felé, majd a jobb szélén jelöljük ki az utolsó pontot. Jobb oldali klikkeléssel zárjuk le az alapvonal görbét. Az egyes pontok húzásával finoman állítsuk pontos helyére az alapvonalat!

Az *Integrálás* menüpontban válasszuk ki az *Integrál hozzáadása* menüpontot, majd kattintsunk a kívánt csúcs bal, utána pedig a jobb szélére! A denzitogramon színes, árnyékolt területként megjelenik a létrehozott csúcs. A csúcs fölött olvasható a maximális intenzitáshoz tartozó R_f érték (ez lapos tetejű, telítésben lévő csúcsoknál nem mindig használható, de az

esetek többségében jól működik), valamint a csúcsa alatti terület, ami a foltban lévő anyagmennyiséggel arányos. A csúcsot határoló egyenesek az egerrel mozgathatók, így a csúcs kezdete és vége tetszés szerint módosítható.



18. ábra A 2. sáv mentén felvett denzitogram, a kijelölt csúccsal.

A *Színcsatorna* listából kiválaszthatjuk, hogy szűrkeskálás, vagy valamelyik színcsatornás kiértékelést választjuk. A program külön-külön kezeli minden sáv minden színcsatornáját, így akár csúcsokként is más kiértékelést választhatunk!

Sáv sorszáma	Színcsatorna	Csúcs sorszáma	Kezdő pixel szá...	Záró pixel száma...	Terület	Csúcs max/min ...
1.	Szűrkeskála	1	230 (0.48)	413 (0.87)	8568	309 (0.65)
2.	Szűrkeskála	1	54 (0.11)	216 (0.46)	7841	180 (0.38)

19. ábra a denzitogramokban kijelölt csúcsokról készült csúcslista

Minden sávhoz, minden színsatornához, minden csúcsához tartozó adat automatikusan átkerül a *Csúcslista ablak*ba, ahol folyamatosan megtekinthető. Az egérrel kijelölve a csúcslista sorait a Ctrl+C másolás utasítással a vágólapra másolhatjuk az ablak kijelölt tartalmát, majd azt az Excel-ben a Ctrl+V utasítással beilleszthetjük. Az összes további kiértékelést, ábrázolást az Excel-ben végezzük. Az adatok átvitele az OpenOffice táblázatkezelőjébe ugyanezen a módon lehetséges.

Fontos megjegyeznünk, hogy mind a *Kép ablak* tartalma, mind pedig a *Grafikon ablakok* tartalma jpg vagy png formátumú képként elmenthető, és mentés során még további, itt nem tárgyalt grafikus opciók (pl. feliratozás, vonalvastagság választása, stb.) is a rendelkezésünkre állnak. Az elmentett képeket fel tudjuk használni a jegyzőkönyvünkben a csúcsok, a denzitogramok dokumentálására, vagy akár tudományos közlemények illusztrálására is. A kép felbontását úgy tudjuk növelni, hogy először beállítjuk az X és Y zoom értékét 400 %-ra, majd utána exportáljuk a képet.

5. MÉRÉSI FELADATOK

A gyakorlaton arra törekszünk, hogy minél több minta felhasználásával, minél rövidebb idő alatt tanulmányozhassuk a rétegkromatográfiákkal kapcsolatos alapjelenségeket néhány érdekes és látványos kísérleten keresztül. Ahhoz, hogy a céljainkat egyetlen laborgyakorlat időtartama alatt el tudjuk érni, számos kompromisszumos megoldást használunk, amelyek az elméleti részben megadott adatoktól eltérnek. Az eltérés szándékos, így tudjuk biztosítani azt, hogy lehetőleg mindenki saját kezűleg tudjon kísérleteket végezni.

Az alapvető eltérések a következők: Nagyon kis lemezeket használunk, nagyon rövid távon futtatunk. Kis kádban dolgozunk és a kád gőzterét általában nem telítjük. A lap széléhez közel is cseppentünk, és a cseppeket nagyon közel tesszük egymáshoz.

Ugyanazt a kapillárist használjuk a minták felcseppentéséhez, így a cseppek mérete remélhetőleg nagyjából azonos lesz. A kapillárist a minták cseppentése után teljesen ki kell üríteni, majd négyszer ki kell mosni. Ezt úgy végezzük, hogy vízzel teleszívátjuk, utána a végét egy szűrőpapír csíkhöz hozzáérintjük és teljesen leürítjük. Két kis vizes mosóedényt használunk, az első durva mosóból is kétszer, majd a második tiszta mosóból is kétszer szívunk fel vizet. (A nem megfelelő mosogatás a kromatogramból nagyon hamar kiderül...!)

Az elvégzendő feladatok úgy vannak beállítva, hogy a távolról sem ideális kromatográfiás körülmények ellenére is jól látható, jól értékelhető eredményeket adnak.

5.1 Kokamidopropil-betain kimutatása

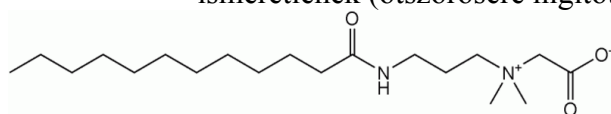
A kokamidopropil-betain zwitterionos felületaktív anyag, amelyet általában 1-2 %-os mennyiségben használnak tusfürdőkben, folyékony szappanokban.

A gyakorlat célja az, hogy lássuk, vékonyréteg kromatográfiás módszerrel gyorsan azonosítani lehet aktív főkomponenseket kereskedelmi

háztartásvegyipari termékekben. Az eljárás megfelelő kalibráló oldatsorozat felhasználásával mennyiségi meghatározásra is alkalmas.

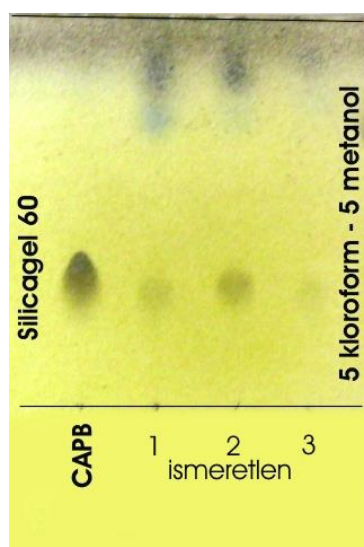
A felületaktív anyagok legnagyobb része nem tartalmaz kromofor csoportot, szintelenek és az UV-elnyelésük is nagyon kicsi, vagy nincs is. Nehéz az előhívásuk, mert kémiaailag nagyon stabilis anyagok, csak nagyon agresszív reagensekkel lehet a túlnyomó részüket láthatóvá tenni.

Minta: kokamidopropil-betain (CAPB) standard (5 mg/ml)
ismeretlenek (ötszörösére hígított tusfürdő és krémszappan)



Réteg: szilikagél 60 F254,
Eluens: 50% kloroform, 50% metanol

Előhívás: 1) UV 254 nm
2) jódgőz
3) 5% foszformolibdénsav, hevítés
4) 50% H₂SO₄, hevítés



20. ábra CAPB tartalmú anyagok mintakromatogramja

Készítsük elő a kádat és egy 4 cm széles szűrőpapír csíkkal borítsuk be a belső felületét. Az eluensből 4-5 ml-t öntsünk a kádba, rázzuk meg körkörösén az üveget, hogy minél jobban nedvesítse meg a papírt az eluens, majd tegyük rá a kádra a tetejét.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. A kiadott standard oldatból ugyanazzal a kapillárisal 1 és 2 cseppet cseppentsük fel, majd az ismeretlenekből cseppentsünk fel 3-5 cseppet. Vigyázzunk arra, hogy lehetőleg egyforma méretű cseppeket tegyünk, mert ettől függ a felvitt anyag mennyisége. Fejlesszük ki a réteget!

Vizsgáljuk meg a réteget UV 254 nm-es fényben! Látunk-e valamilyen komponenst? Látjuk-e a CAPB standardot? Fényképezzük le a réteget UV fényben!

Állítsuk a réteget jódgőzzel teli edénybe néhány percre! Figyeljük meg, hogy mely foltok hívódnak elő!

Fülke alatt szórjuk be a réteget foszformolibdénsavval! Hajszáritó legmagasabb vagy hőlégpisztoly legalsó fokozatával melegítve hívjuk elő a foltokat! Amikor már nem változik a szín és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést. Fényképezzük le a réteget!

Fülke alatt szórjuk be a réteget 50 %-os kénsavval! (Vigyázat, nagyon agresszív és maró!) Hőlégpisztollyal vagy rezsóval hevítve hívjuk elő az eddig láthatatlan foltokat! Ha nem vigyázzunk, nagyon könnyen túlszalad a folyamat, az egész réteg bekékül, majd kifakul. Esetenként csak néhány tíz másodperces hevítés szükséges! Fényképezzük le az előhívott réteget!

A jegyzőkönyvbe kerüljenek be a kifejlesztett lap képei minden egyes előhívási fázisban!

Szoftveresen a denzitometriás integrálok alapján, vagy kézzel a foltterületek alapján értékeljük ki a kromatogramokat! Két pontos kalibráció alapján határozzuk meg, hogy hozzávetőlegesen mennyi lehet a CAPB koncentráció az eredeti termékekben! (Ne felejtjük el a hígításokat és a cseppek számát is figyelembe venni a számítások során!)

Ha csak egyetlen előhívási módot használhatna, melyiket választaná a CAPB tartalom kimutatásához?

5.2 Édesköményolaj vizsgálata

A gyakorlat célja az UV-detektálás és a mennyiségi kiértékelés alapjainak az elsajátítása, valamint színreagensok szelektivitásának vizsgálata

Az édeskömény olajban sok komponenst lehet kimutatni, ezek konkrét kémiai azonosítása nem célja a gyakorlatnak. A legnagyobb mennyiségben lévő komponensek növekvő R_f érték szerint az ánizsaldehid, fenchon és anetol.

Réteg: szilikagél 60 F254, 40 mm x 50 mm

Kád: szűrőpapírral kibélelt vérlemezfestő kád

Minta: kereskedelmi édeskömény illóolaj oldata

Eluens: CH_2Cl_2

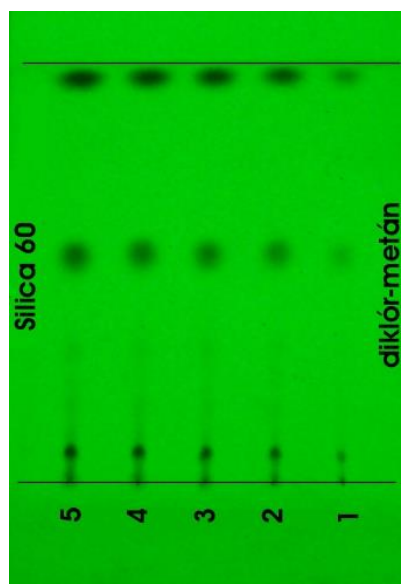
Gőztér telítés: 10 perc (a réteget ezután helyezük bele)

Előhívás: 1) UV-254 nm (sötét foltok fényes világoszöld háttéren)

2) 5% foszformolibdénsav, hevítés 110 °C-on a 1-5 percig
(sötétkék foltok halvány zöldessárga háttéren)

3) 50% H_2SO_4 , hevítés 110 °C-on a szükséges ideig (1-8 perc)

(további sötétkék, illetve szenesedő foltok)



21- ábra Édesköményolaj TLC mintakromatogramja UV 254 nm fényben.

Készítsük elő a kádat és egy 4 cm széles szűrőpapír csíkkal borítsuk be a belső felületét. Az eluensből 4-5 ml-t öntsünk a kádba, rázzuk meg körkörösén az üveget, hogy minél jobban nedvesítse meg a papírt az eluens, majd tegyük rá a kádra a tetejét.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. A kiadott oldatból ugyanazzal a kapillárisal a pontokba 1, 2, 3, 4, ill. 5 cseppet cseppentsük fel, vigyázzunk arra, hogy lehetőleg egyforma méretű cseppeket tegyünk, mert ettől függ a felvitt anyag mennyisége. Fejlesszük ki a réteget!

Kifejlődés után szárítsuk meg hajszáritóval, majd 254 nm-es UV lámpa alatt nézzük meg a réteget! UV-fény alatt fényképezzük le a réteget!

Fülke alatt szórjuk be a réteget foszformolibdénsavval! Hajszáritó legmagasabb vagy hőlégmentesítő legalsó fokozatával melegítve hívjuk elő a foltokat! Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést. Fényképezzük le a réteget!

Fülke alatt szórjuk be a réteget 50 %-os kénsavval! (Vigyázat, nagyon agresszív és maró!) Hőlégpisztollyal vagy rezsóval hevítve hívjuk elő az eddig láthatatlan foltokat! Ha nem vigyázunk, nagyon könnyen túlszalad a folyamat, az egész réteg bekékül, majd kifakul. Esetenként csak néhány másodperc hevítés szükséges! Fényképezzük le az előhívott réteget!

A jegyzőkönyvbe kerüljenek be a kifejlesztett lap képei minden egyes előhívási fázisban!

Az UV-fényben készült képet szoftveresen értékeljük ki. Minden egyes mintára hozzuk létre a szürke színcsatornában a denzitogramot! Jelöljük ki a három legintenzívebb csúcst! A csúcstáblázatban jelöljük ki az összes sort, majd exportáljuk az adatokat az Excel-be (vagy más táblázatkezelőbe)!

Minden egyes csúcsra hozzuk létre a kalibráló görbét!

Vizsgáljuk meg, hogy lineáris-e a kapott csúcsterület-cseppszám görbe! Ha nem, értelmezzük, hogy mi lehet az eltérés oka!

Nyomtassuk ki a kapott grafikonokat mindhárom komponensre (lehet közösen ábrázolva is) és ragasszuk be a jegyzőkönyvbe! Milyen hibalehetőségeket lát a szoftveres kiértékelés esetén?

Manuálisan is határozzuk meg az R_f értékeket, valamint a csúcsterületeket!

Az előzővel azonos módon Excel-ben hozzuk létre a kalibráló görbéket!

Nyomtassuk ki ezeket a görbéket is! Melyik esetben jobb a linearitás?

Melyik módszer szerinti kiértékelés igényelt több időt? Milyen hibalehetőségeket lát a manuális kiértékelés esetén?

5.3 Aminosavak hidrofób kölcsönhatás kromatográfiája

Az aminosavak izoelektromos pontja az a pH érték, amelyen az adott aminosav pontosan a zwitterionos szerkezetben található, és kifele elektromosan semleges. Az attól kisebb pH-n kationos, az attól nagyobb pH-n anionos tulajdonságú. A pH megfelelő megválasztása lehetőséget teremt arra, hogy az aminosavakat jól megválasztott pH-n mutatott töltésük alapján ioncserélő fázisokon szétválasszuk egymástól.

Amikor polisztirol (vagy más hidrofób polimer) vázat tartalmazó ioncserélő rétegen történik az aminosavak elválasztása, nem csak a töltés mennyisége az, ami az elválasztási folyamatot irányítja. Megjelenik az aminosav molekulák apoláris részei és maga a polimer mátrix nem töltött részei között egy nem ionos jellegű, Van der Waals-féle kölcsönhatás, amit hidrofób kölcsönhatásnak nevezünk.

Azt a kromatográfiás eljárást, amely az apoláris molekularészek és az állófázis hasonló jellegű molekularészei közötti kölcsönhatást használja fel a komponensek szétválasztására, hidrofób kölcsönhatás kromatográfiának nevezzük, és nagy a jelentősége a töltéssel rendelkező biomolekulák vises oldatokban történő elválasztásában.

A hidrofób kölcsönhatások rendkívüli szerepet játszanak a biomolekulák közötti kölcsönhatásokban. A nagyon poláris vízben az apoláris molekularészek között fellépő vonzóerőnek az entrópia növekedése a fő hajtóereje. Azzal, hogy két molekula hidrofób része egymáshoz közelít, vízmolekulák szorulnak ki a hidratációs szférából, így az asszociátum létrejöttét entrópiánövekedés kíséri. A hidrofób kölcsönhatások a hidrogénkötések mellett a legjelentősebb irányító erőt képviselik, amelyek meghatározzák egy fehérje molekula térszerkezetét, pl. a hajtogatottságát.

Ahhoz, hogy önmagában a hidrofób kölcsönhatás szerepét lássuk, olyan ioncserélő réteget használunk, amelyen az ioncserélő csoportok már nem aktívak, így zavartalanul láthatjuk a mátrix szerepét. A vizsgálatokhoz nagyon régen (mintegy 30 évvel ezelőtt) gyártott, Fixion 50x2 réteget használunk, ami valamikor kationcserélő tulajdonságú volt, de mára már elvesztette az ioncserélő aktivitását.

Vizsgálati anyag: A) sorozat:
alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin
(0,66%)

ismeretlen oldat

B) sorozat:
glutaminsav (0,66%), prolin (0,66%), szerin (0,66%),
triptofán(0,66%), lizin (0,66%)
ismeretlen oldat

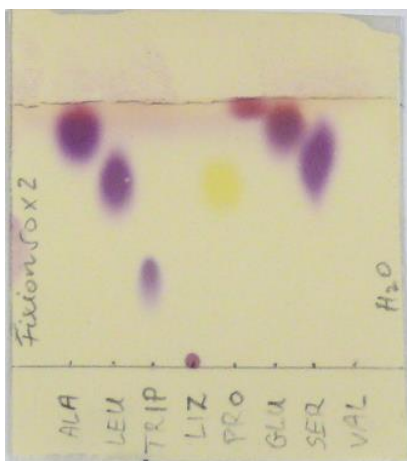
Réteg: régi Fixion 50x2 réteg, 40 mm x 50 mm
Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban, 1-1
csepp

Eluens: H₂O
Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem
kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-
8 perc)

Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba és tegyük rá a kádra a tetejét. Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent, majd fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponens(ek)et tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!



22. ábra Aminosavak mintakromatogramja Fixion 50x2 rétegen.

A 22. ábra alapján adjuk meg, hogy mely aminosavakat nem tudnánk egymástól megkülönböztetni ezzel az eljárással!

5.4 Aminosavak elválasztása papírkromatográfiával

A papírkromatográfia felbontóképessége rosszabb, mint a vékonyréteg kromatográfiáé, ezért közel azonos futási távolságon nem várhatjuk a foltok olyan szétválását, mint a rétegen. A papír rostszerkezetéből következőleg a foltok széle sem olyan éles, mint a rétegen. Mindenképpen érdekes azonban látnunk a futási képet, különösen a vékonyrétegen kapott képpel összehasonlítva.

Vizsgálati anyag: alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)

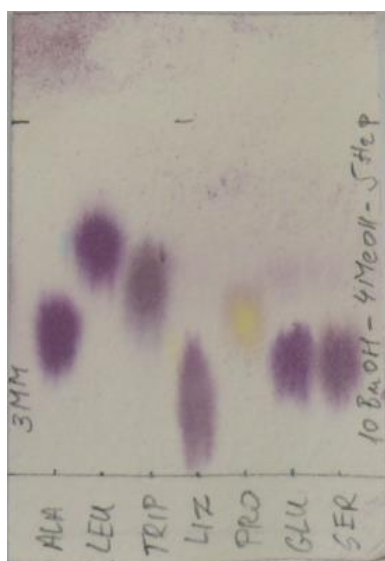
prolin (0,66%), glutaminsav (0,66%), szerin (0,66%)
ismeretlen oldat

Réteg: Whatman 3MM vagy 2CHR kromatográfiás papír
40 mm x 50 mm, vagy 40 mm x 66 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes
távolságokban,

1-1 nagyon kicsi(!) csepp

Eluens:	10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H ₂ O, vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H ₂ O elegye
Kád:	vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell
Előhívás:	0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-8 perc)



23. ábra Aminosava mintakromatogramja papíron.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent. Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba, majd fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve a

szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel ábrázolva!

5.5 Aminosavak elválasztása cellulóz rétegen

Vizsgálati anyag: alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)

prolin (0,66%), glutaminsav (0,66%), szerin (0,66%)
ismeretlen oldat

Réteg: Merck Cellulose 0,1 mm vastag vékonyréteg lap
40 mm x 50 mm

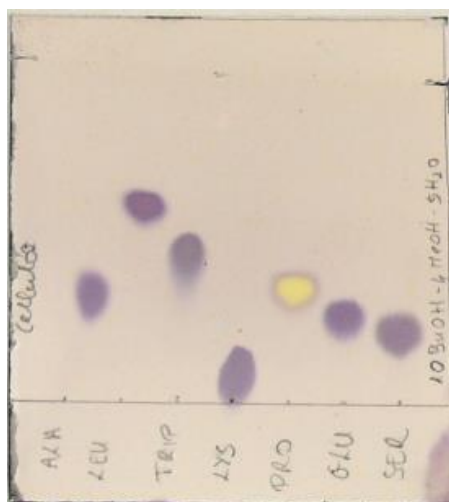
Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes
távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp

Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O

vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye

Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem
kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-
8 perc)



24. ábra Aminosavak mintakromatogramja cellulózon. Figyeljük meg, hogy minden aminosav ibolyáskék foltot ad, kivéve a prolint, ami sárgát.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abba hagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!

5.6 Aminosavak elválasztása szilikagél rétegen

Vizsgálati anyag: alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)

prolin (0,66%), glutaminsav (0,66%), szerin (0,66%) ismeretlen oldat

Réteg: Merck Kieselgel 60, 0,25 mm vastag vékonyréteg lap 40 mm x 50 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,

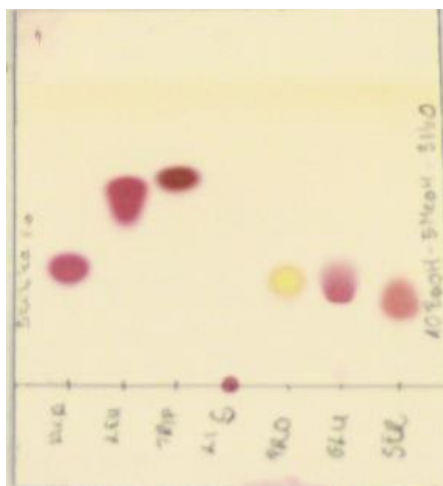
1-1 csepp

Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O

vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye

Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-8 perc)



25. ábra Aminosavak mintakromatogramja szilikagélén.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen

rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlen! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszáritóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszáritóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!

5.7 Emberi bőr felületén lévő aminosavak azonosítása

Az emberi bőr felületét hűtő és a kiszáradástól óvó izzadtság fő komponensei a víz, tejsav, karbamid, ásványi anyagok, nyomelemek, valamint szerves vegyületek, többek között aminosavak. Célunk az, hogy azonosítsuk a bőr felületéről vízzel leoldható aminosavakat a standardokkal összehasonlítva. Bár az aminosavak koncentrációja nagyon kicsi a bőrfelületen, a ninhidrines előhívás már nagyon kis mennyiséget is láthatóvá tesz. (Ne fogjuk meg a réteg felületét csupasz kézzel, mert különben előhíváskor az ujjlenyomatunk is látható lesz!)

Minták: alanin (Ala, 0,66%), leucin (Leu, 0,66%),
 triptofán(Trp, 0,66%)
 lizin (Lys, 0,66%), prolin (Pro, 0,66%),
 glutaminsav (Glu, 0,66%), szerin (Ser, 0,66%)
 bőrfelület lemosásából származó ismeretlen oldat

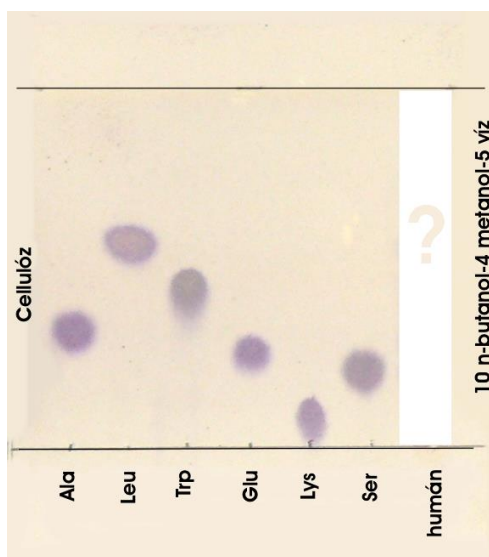
Réteg: Merck Cellulose 0,1 mm vastag vékonyréteg lap
 40 mm x 50 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes
 távolságokban,
 1-1 nagyon kicsi(!) csepp

Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O
 vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye

Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem
 kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-
 8 perc)



26. ábra Humán bőrfelület aminosavjainak meghatározása

Öntsünk 0,5-1 ml vizet a tenyerünkbe és alaposan dörzsöljük szét! Hajlítsuk be a tenyerünket, hogy kb. 50-100 mikroliter víz összegyűljön, majd egy pipettával szívjuk fel és vigyük át egy mintás üvegbe! Ez az oldat lesz a vizsgálati mintánk. Mivel az oldat nagyon híg, legalább 10-15 cseppet fel kell cseppentünk ahhoz, hogy látható eredményt kapjunk. Az oldatban nagyon sok nátrium-klorid és egyéb anyagok vannak, a kifejlesztés során általában nem kapunk ideális foltokat, a sótartalom miatt a foltok közepe esetleg világos lesz.

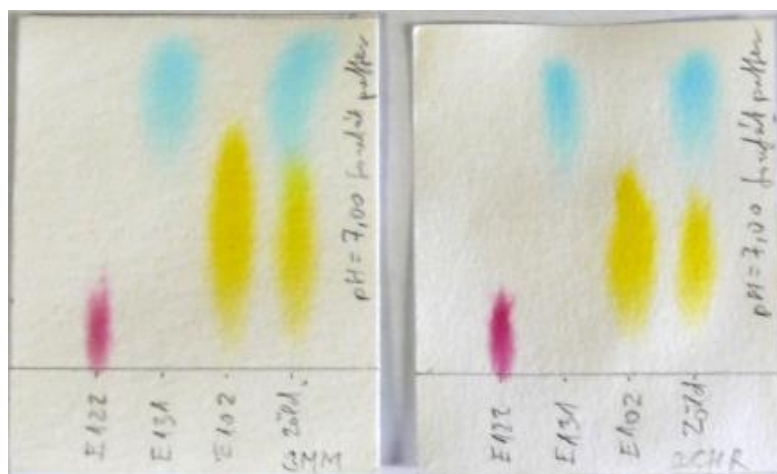
Miután készen van a minta, vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3-4 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen aminosavak voltak a

vizsgált bőrfelületen! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!

5.8 Ételfestékek elválasztása papírkromatográfiával

- Réteg: Whatman 3MM vagy 2CHR kromatográfiás papír
40 mm x 50 mm vagy 40 mm x 66 mm
- Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes
távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp
- Minták: E102, E122, E131 ételfestékek oldatai
ismeretlen (kereskedelmi, ételfestéket tartalmazó oldatok)
- Eluens: pH 7 foszfát puffer
vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye
vagy 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O elegye
- Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem
kell



27. ábra Ételfestékek mintakromatogramja kétfajta típusú kromatográfiás papíron.

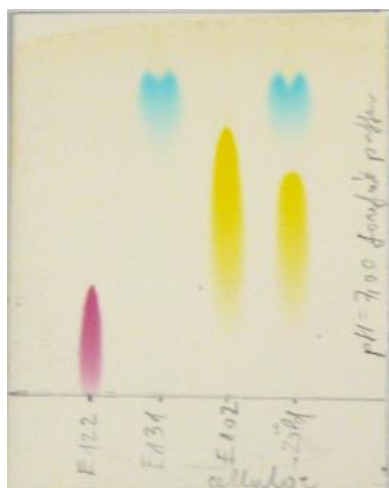
Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlen! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszáritóval!

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel árajzolva!

Hasonlítsuk össze a rétegen és a papíron kapott foltokat saját méréseink, vagy azok hiányában a mintakromatogramok segítségével!

5.9 Ételfestékek elválasztása cellulóz vékonyrétegen

Réteg:	Merck Cellulose réteg, 0,1 mm vastag 40 mm x 50 mm vagy 40 mm x 66 mm
Felcseppentés: távolságokban,	10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes 1-1 nagyon kicsi(!) csepp
Minták:	E102, E122, E131 ételfestékek oldatai ismeretlen (kereskedelmi, ételfestéket tartalmazó oldatok)
Eluens:	pH7 foszfát puffer vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H ₂ O elegye vagy 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H ₂ O elegye
Kád:	vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell



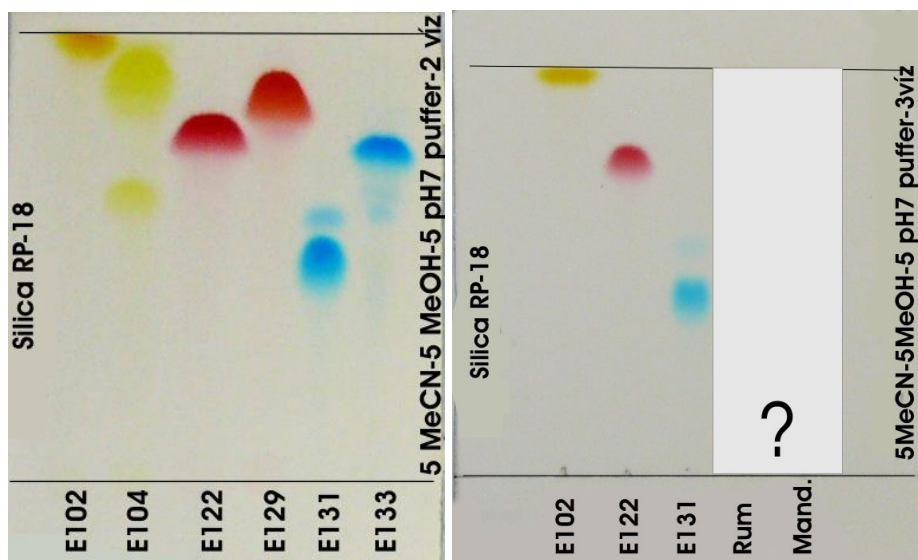
28. ábra Ételfestékek mintakromatogramja cellulóz rétegen.

Vágjunk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg a réteget hajszárítóval!

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel ábrázolva!

5.10 Ételfestékek elválasztása fordított fázisú rétegen

- Réteg: Merck Silica RP-18, 0,25 mm vastag (TLC-s réteg)
40 mm x 50 mm
- Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp (metanolos oldat)
- Minták: E102, E104, E122, E129, E131, E133 ételfestékek metanolos oldatai
ismeretlenek (rum, keserűmandula, bonbon meggy aroma oldatok)
- Eluens: 5 MeCN- 5 MeOH- 5 pH7 foszfát puffer (0,15 M)- 3 víz,
vagy 5 MeCN- 5 MeOH- 5 pH7 foszfát puffer (0,15 M)- 2 víz,
- Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell



29. ábra Ételfestékek elválasztása fordított fázison

Készítsük elő a kádat, a belsejét béleljük ki 4 cm széles szűrőpapír csíkkal. Az eluensből 4 ml-t öntsünk a kádba, majd tegyür rá a kádra a tetejét. Vágjunk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a metanolos standardokat és az ismeretleneket! A standard oldatokból és az ismeretlenekből is legalább 5 cseppet kell használni! Minden csepp után szárítsuk meg a foltokat! Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg a réteget hajszáritóval.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!

NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA (HPLC)

A nagynyomású (vagy nagy teljesítményű) folyadékkromatográfiát, amely mintegy 50 éve ismert, ma az analitikai és a szintetikus kémia egyik legértékesebb elválasztási eljárásának tartjuk. Előnyei közé tartozik, hogy a méréseket szobahőmérsékleten vagy annak közelében végezhetjük, így termikusan érzékeny anyagok is vizsgálhatók vele, megfelelő szerkezeti anyagok felhasználásával pedig biológiai eredetű minták is közvetlenül analizálhatók. A kromatográfiás körülmények (kolonna töltetanyaga, eluens minősége, stb.) megfelelő megválasztásával szinte minden vegyületcsalád és minta vizsgálatára alkalmas, sőt esetenként összetett reakcióelegyek komponenseinek üzemi léptékű szétválasztására is alkalmazzák. Hozzáértő kromatográfus kezében a HPLC olyan eszköz, amellyel a gyógyszerekkel, szerves kémiai vagy biológiai eredetű mintákkal kapcsolatos legtöbb analitikai jellegű probléma nagy pontossággal és nagy megbízhatósággal megoldható. Előnyei mellett nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy még egy alapkiépítettségű HPLC készülék is meglehetősen költséges. A készülék üzemeltetése szintén jelentős anyagi terhet jelent. Ma már elterjed azok a nagyon kis belső átmérőjű, illetve nagyon finom töltetű kolonnák, amelyekkel az analitikai felbontóképesség megtartása, sőt növekedése mellett a felhasznált eluens mennyisége, illetve a szükséges mérési idő a korábbi mennyiség töredékére csökkenthető. Az ilyen kolonnák egy részét csak az ún. ultranagy (1200 bar) nyomású készülékekben lehet használni. Az általános célokra szolgáló kolonnák mellett ma már számos, célzottan csak egy bizonyos vegyületcsalád vizsgálatra kifejlesztett kolonnatípusok is hozzáférhetők.

1. A KROMATOGRAMOK JELLEMZÉSÉRE SZOLGÁLÓ PARAMÉTEREK

A kromatogram és az abban szereplő csúcsok jellemzésére több paraméter szolgál, amelyek kapcsolatát a különféle fizikai és kémiai állandókkal, valamint az elválasztási folyamatban részt vevő komponensek anyagi jellemzőivel a kromatográfia elmélete részletesen tárgyalja. A továbbiakban azokkal a paraméterekkel ismerkedünk meg, amelyeket a folyadékkromatográfia mindennapi gyakorlatában használnak.

Szeretnénk kihangsúlyozni, hogy a paraméterek nem öncélúak. Nem azért vannak, hogy elméleti számításokat lehessen velük végezni. Az elmélet a gyakorlatban használt paraméterek magyarázatára, a mélyebb összefüggések felderítésére szolgál. A modern folyadékkromatográfia elméletét a gyakorlati tapasztalatokkal összevetve az utóbbi években olyan számítógépes programokat fejlesztettek ki, amelyek képesek elfogadható pontossággal előre megbecsülni egy még soha nem vizsgált, új vegyület kromatográfiai tulajdonságait, valamint a környezeti paraméterek hatását az elválasztásra. Az ilyen programok nagy segítséget jelentenek a módszerfejlesztő kromatográfusok számára, hiszen az új vizsgálatok kidolgozásához szükséges időt a töredékére csökkenthetik.

Két nagy gyakorlati probléma körül csoportosulnak a kromatográfiai paraméterek. Az egyik probléma az egyedi csúcsok megtalálása, jellemzése, kiértékelése. Ezek a paraméterek képezik az alapját a minőségi és a mennyiségi meghatározásoknak, így ismeretük elengedhetetlen. Az egyedi csúcsokra vonatkozó paraméterek azonban nem adnak felvilágosítást az egyik csúcshoz viszonyított helyzetére, két vagy több csúcs szétválására vonatkozóan.

A második problémakör, amivel a kromatográfiában foglalkozni kell, a csúcsok egymáshoz való viszonyának, az elválasztás jóságának, szelektivitásának a megadása, a kromatogram egészének a mennyiségi jellemzése. Ezekkel a paraméterekkel tudjuk azt megadni (és bizonyítani), hogy a módszerünk valóban alkalmas a vizsgált komponensek mennyiségi és minőségi vizsgálatára. Minden egyes kromatográfiai módszert (annak publikálásához, vagy az általa nyert adatok bármilyen szinten történő hivatalos elfogadtatásához) ezekkel a paraméterekkel jellemezni kell.

A hivatalos vizsgálatokat általában a különböző nemzeti vagy nemzetközi szabványokban megadott módszerekkel végzik. A szabványosított módszerek nem azt írják elő, hogy konkrétan melyik gyártó milyen készülékén és kolonnáján kell a mérést végezni (bár a teljes mérésre vonatkozólag egy-egy kidolgozott példát általában bemutatnak). Ehelyett azt adják meg, hogy ilyen vagy olyan *típusú* kolonnán végezve a mérést az eljárásnak teljesítenie kell a megadott paramétereket (pl. csúcsfelbontás, kapacitásfaktorok tartománya, a mennyiségi kimutatás alsó határa, szórás, linearitás, stb.) és azokat a módszer laboratóriumi beállításakor megfelelően bizonyítani és dokumentálni kell. Sorozatmérések közben ellenőrző standardok felhasználásával folyamatosan figyelni kell, hogy a mérőrendszerünk teljesíti-e az előírtakat. Míg a gázkromatográfiában egy-egy kolonna élettartama akár tíz év is lehet és egy jól beállított gázkromatográfiás módszer akár hónapokig is stabilan működik, a folyadékkromatográfiában a kolonnák csupán néhány hónap élettartamúak és a kolonna öregedése miatt rövid időn belül is nagyon sokat változhatnak a retenciók paraméterek. Nyilvánvaló, hogy a HPLC-s gyakorlatban különösen fontos a mérések folyamatos ellenőrzése.

1.1 Alapfogalmak

Az alapvonal és a kromatográfiás csúcsok viszonya

Az 1. ábrán azokat a paramétereket tüntettük fel, amelyeket egy kromatogramban szereplő csúcs jellemzésére használunk. A paraméterek többsége közvetlenül a kromatogramból meghatározható kísérleti adat, az inflexiós pontokra illesztett egyenesek által az alapvonalból kimetszett w_B alapvonalon mért csúcshélesség azonban számított érték. Minden kromatográfiás mérés a minta injektálásával kezdődik, az injektálás pillanatához tartozik a $t=0$ időpont. A vizsgálat során a detektorjel időbeli változását rögzítjük, a kapott idő–jelintenzitás görbét kromatogramnak nevezzük. A kromatogramban két tartomány váltakozása figyelhető meg, az egyik az alapvonal, amely jellemzően egy közel vízszintes egyenes, a csúcsok pedig az alapvonalból kiemelkedő hegyek vagy dombok. Az alapvonal a csúcsok alatt is folytatódik, ilyenkor az alapvonalat a csúcs kezdetét és végét jelző pontokat összekötő egyenes határozza meg.

Az alapvonal jelét kinagyítva látható, hogy a kromatogram pontjai nem egy tökéletes egyenes vagy valamilyen szabályos görbe mentén helyezkednek el, hanem egy zajos kísérleti görbét alkotnak. Hogyan lehet azt eldönteni, hogy egy kromatogramban mi tekinthető csúcsnak és mi zajnak? Az alapvonal egy kiválasztott tartományában a zajsztint a tartományon belüli mérési pontok intenzitás maximuma és minimuma közötti különbség. Azokat a pontokat tekintjük csúcsnak, amelyeknek az alapvonalhoz viszonyított intenzitása eléri vagy meghaladja az alapvonal zajsztintjének a háromszorosát. (Van olyan ország, ahol az alapvonal zajsztintjének a kétszerese a határérték.)

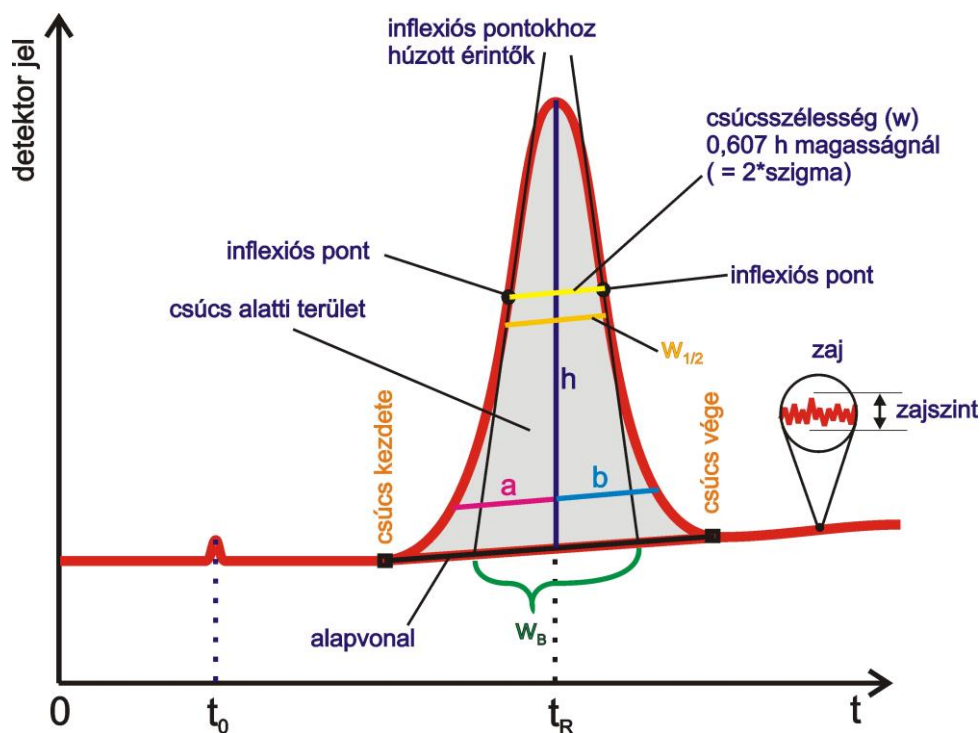
Hogyan határozza meg a számítógép a csúcs kezdetét és végét? A kromatográfiai szoftverek alapértelmezésben olyan adatelemző beállításokat tartalmaznak, amelyek az átlagos csúcsok megtalálását automatikusan biztosítják. (A beállításokat a kromatográfusnak a mérések során a konkrét kromatogram tulajdonságait figyelembe véve pontosítani kell.)

A kromatogramokban általában sok ezer vagy tízezer mérési pont van (másodpercenként 5-20 képződik, a beállítástól függően). Ilyen nagy adathalmaznál lehetőség van arra, hogy pl. ötösével vagy kilencesével csoportokat alkossunk az egymás után következő pontokból és kiszámítsuk a csoportok átlagát. Az átlagul kapott értéket a csoportok közepéhez rendeljük hozzá. Ezután a két egymás után következő középpontra egy egyenest húzunk, és kiszámoljuk az egyenes meredekségét. Amennyiben a meredekség abszolút értéke eléri vagy meghaladja a programban megadott határértéket, akkor azt mondjuk, hogy a második tartomány középpontja lesz a csúcs kezdete (illetve a lefutó ágban ha a határérték alá csökken, akkor a csúcs vége).

Önmagában ez a módszer még rengeteg hamis csúcsot adna, hiszen esetenként az alapvonalnak is jelentős ingadozása van, gyakoriak a rövid élettartamú zajok, amelyek meghaladják az alapvonal zajsztintjének a háromszorosát és a fenti meredekségi kívánalmat, így alkalmasak lehetnek a szoftver megtévesztésére. Éppen ezek kiküszöbölésére egy másik paramétert, az ún. minimális csúcsszélességet is használjuk, ami alapértelmezésben a HPLC-ben kb. 0,1-0,2 perc. A program minden megtalált csúcs-jelölt esetén megvizsgálja annak szélességét, és csak azokat tekinti valódi csúcsnak, amelyek szélessége nagyobb a beállított határértéknél.

Vannak esetek, amikor nem akarjuk a rendkívül kis csúcsokat is kilistázni, mert csak a fő komponenseket keressük. Ilyen esetekre létezik egy harmadik beállítási lehetőség, ez pedig a minimális csúcsterület értéke. Csak azokat a csúcsokat fogja a szoftver az eredmények között felsorolni, amelyek integrálértéke (területe) meghaladja az általunk beállított határértéket.

Az egymással átfedésben lévő csúcsok pontos, hiteles integrálása rendkívül nehéz, problematikus feladat. A kapott eredmények gyakran nem is teljesen egyértelműek. Bár minden kromatográfiás szoftver számos lehetőséget ad az átfedő csúcsok kezelésére, a szabványokban rögzített módszerek többsége csak a teljes alapvonal elválást fogadja el. Ha az nem teljesül, addig kell a kromatográfiás módszert fejleszteni, amíg jó nem lesz.



1. ábra A kromatográfiás csúcsok jellemzésére szolgáló legfontosabb paraméterek.

1.2 Egyetlen csúcs jellemzésére szolgáló paraméterek

A retenciós idő (t_R) az az időtartam, amely a minta injektálásának pillanatától a csúcs intenzitás maximumáig eltelik. A HPLC-s gyakorlatban a retenciós idő fogalmát használjuk a leggyakrabban. Más kromatográfiai technikáknál (pl. gélkromatográfiánál) elterjedt a retenciós térfogat használata (V_R). A retenciós térfogat a mozgó fázisnak az a térfogata, amely az injektálástól a kromatográfiai csúcs maximumának megjelenéséig áramlott át az oszlopon. A retenciós térfogat a retenciós időből és a térfogati áramlási sebességből (F , flow) a következő módon számítható ki (feltéve, ha az áramlás egyenletes volt):

$$V_R = t_R \cdot F$$

Fordított fázisú kromatográfiában egy anyag retenciós térfogata közvetlen kapcsolatban van az anyagnak az álló és a mozgó fázis közötti megoszlási hányadosával (K) a következő egyenletnek megfelelően:

$$V_R = V_m + K \cdot V_s$$

ahol V_m a kolonnán belül a mozgófázis, V_s pedig a kolonnán belül az állófázis térfogata.

Azok a komponensek, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba az állófázissal, gyorsan és akadálytalanul átjutnak az oszlopon. Az ilyen, vissza nem tartott anyagok átjutásához szükséges időt holtidőnek (t_0), a holtidőhöz tartozó elúciós térfogatot holtterfogatnak (V_0) nevezzük. A holtterfogat elméletileg az állófázis szemcséi közötti tér, valamint a szemcsék belsejében lévő üregek és csatornák együttes térfogatát adja meg.

Nyilvánvaló, hogy a kolonna méretei, valamint a töltet porozitása nagyságrendileg alapvetően meghatározzák a holtterfogatot. Minél hosszabb és minél nagyobb átmérőjű a kolonna, annál nagyobb a holtterfogata. Minél kisebb porozitású (minél tömörebb) az állófázis, annál kisebb a hozzájárulása a holtterfogathoz.

A kísérletileg meghatározott holtterfogat az elméletileg várt értéktől kisebb. Azt, hogy a szemcsék belsejében mekkora a valóban hozzáférhető térfogat,

azt az állófázis anyagának pórusméret eloszlása, a pórusok felületének minősége, az eluens minősége, az áramlási sebesség és a holtidő méréshez használt vegyület tulajdonságai együttesen határozzák meg.

A holtterfogat pontos kísérleti meghatározása néha igen nehéz lehet az elválasztásban részt vevő folyamatok sokfélesége következtében. Nem mindegy, hogy kémiaailag milyen tulajdonságú, ill. fizikailag mekkora méretű a holtterfogat méréséhez használt molekula. Nagy molekulák például nem férnek be a nagyon kis pórusokba, így nem is mérhetik azokat. A fordított fázisú folyadékkromatográfiában a holtterfogat közelítő pontosságú mérését deuterált oldószerekkel, tiokarbamidral vagy uracillal végzik. Az ezekkel kapott eredmények a gyakorlat számára már elfogadhatóak. A pontos értéket a homológ sorozatokra kapott kapacitásfaktorok logaritmusának ($\log k'$) nulla szénatomszámra történő extrapolálásával határozzák meg.

Egy komponens retenciójának a valódi mértékét nem a retenció térfogattal v. retenció idővel fejezzük ki, hanem a *kapacitásfaktorral* v. kapacitástényezővel (k'), ami a *redukált retenció térfogata* ($V_R - V_0$) és a holtterfogat (V_0) hányadosa.

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R \cdot F - t_0 \cdot F}{t_0 \cdot F} = \frac{(t_R - t_0) \cdot F}{t_0 \cdot F}$$

A kapacitásfaktor jelölésére a HPLC-s gyakorlatban hagyományosan a k' -t használják. Az IUPAC már hosszú idő óta a vessző nélküli k használatát tartja szabályosnak, de a könyvek, cikkek nagyobbik hányada a régi jelölést alkalmazza. Ebben a jegyzetben éppen a hozzáférhető irodalommal való kompatibilitás miatt meghagytuk a régies jelölést, de legyünk tisztában az új szabályokkal! (Történelmileg azért használták a k' jelölést, hogy ne lehessen összekeverni a K egyensúlyi állandóval, amit akkoriban gyakran kis k betűvel írtak.)

A HPLC-s mérések során a térfogati áramlási sebességet általában állandó értéken tartjuk, így a F térfogati áramlási sebességgel való egyszerűsítés után a képlet a következő módon egyszerűsödik:

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

Ha nagyon egyszerű rendszerrel dolgozunk (pl. 1-3 jól elváló komponens mennyiségi meghatározása, semmi zavaró ismeretlen vegyület) és semmilyen más kizáró okunk sincs, akkor a gyakorlatban általában arra törekszünk, hogy a k' értékek lehetőleg a $k'=2-5$ tartományba essenek. Konkrét példán bemutatva ez azt jelenti, hogy egy 10 cm hosszúságú, hagyományos kolonnán mérve, amelyen a módszer szerinti holtidő $t_0=0,8$ perc, a retenciós időket praktikusán a 2,5–5 perc tartományba érdemes állítanunk.

A k' -re vonatkozó előbbi útmutatás nem azt jelenti, hogy ennél hosszabb retenciós idők feltétlenül rosszak lennének, csupán azt, hogy ha nem szükséges, akkor nem kell hosszú mérési időt használni. Ilyen rövid időnél még gazdaságos az oldószerfelhasználás, a csúcsok már jól szétválnak, a diffúzió okozta sávszélesedés még kicsi, ezért a csúcselbontás általában elegendően nagy.

A kapacitásfaktor közvetlenül az álló és mozgó fázisokban oldott anyagmennyiségekből (n_s ill. n_m), illetve az álló és mozgó fázis térfogataiból (V_s , ill. V_m) származtatható. Amennyiben felhasználjuk a megoszlási hányados ($K=c_s/c_m$) definícióját, a k' a következő képlettel fejezhető ki:

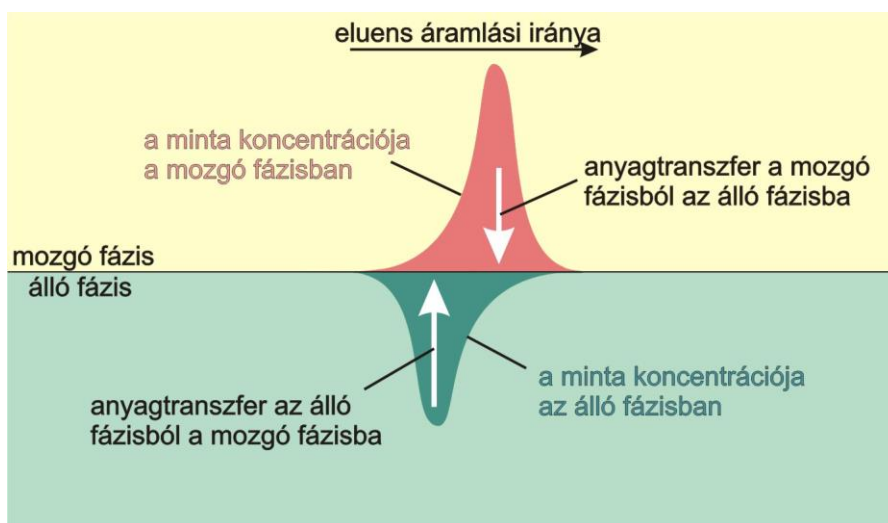
$$k' = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s}{c_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} = K \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

A visszatartott komponens retenciója tehát közvetlen kapcsolatban van a két fázis közötti megoszlási folyamat termodinamikájával. Fontos azonban felfigyelnünk arra, hogy a K -val jellemzett statikus egyensúly beállításához számottevő időre van szükség, ami dinamikus, folyamatosan áramló rendszereknél nem valósul meg, ugyanis a fázisokon belüli, valamint a fázisok közötti közötti anyagátadással kapcsolatban gátlások lépnek fel.

A K értékét legjobban a megoszlási folyamatban részt vevő két fázis anyagi minőségének (azaz a kolonna töltetének és az eluens összetételének) megváltoztatásával érhetjük el. A k' értékét kisebb mértékben az álló és mozgó fázis térfogatarányával is befolyásolni lehet. Minél nagyobb az

állófázis térfogata a mozgófázis térfogatához képest, annál nagyobb a k' értéke.

A fordított fázisú kromatográfiában a kapacitásfaktor értéke a kromatográfiás megoszlási folyamat szabadenergiaváltozásával arányos. A 2. ábrán a két fázis közötti megoszlás révén kialakuló koncentrációprofil látható az áramló mozgó fázisban, illetve az álló fázisban.



2. ábra Az anyagtranszport mechanizmusának és a koncentráció profilok kialakulásának szemléltetése fordított fázisú kromatográfiás elválasztás esetén.

Fizikai-kémiai tanulmányainkból tudjuk, hogy egyensúlyi folyamatoknál az egyensúlyi állandó és a folyamat szabadentalpia változása között a következő összefüggés van:

$$RT \cdot \ln K = -\Delta G^0$$

Adott kolonnán a K megoszlási hányados és a k' kapacitásfaktor csak egy konstans szorzótényezőben különböznek, tehát a kapacitásfaktor egy egyensúlyi állandó jellegű, termodinamikai mennyiség. Az előző egyenletet átírhatjuk a következő formában:

$$RT \cdot \ln k' = -\Delta G^0 - RT \cdot \ln c$$

ebből az $\ln k'$ -t kifejezve:

$$\ln k' = \frac{-\Delta G^0}{RT} - \ln c = \frac{-\Delta H + T\Delta S}{RT} - \ln c = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} - \ln c$$

Az $\ln k'$ hőmérsékletfüggését az egyenlet T szerinti deriválásával kapjuk, így jutunk el az elválasztási folyamat hőmérsékletfüggését leíró van't Hoff egyenlethez:

$$\frac{d \ln k'}{dT} = \frac{\Delta H_{s \rightarrow m}}{RT^2}$$

ahol a $\Delta H_{s \rightarrow m}$ az állóból a mozgó fázisba történő anyagátmenet entalpiaváltozása.

Mivel a folyadékkromatográfiában az álló és mozgó fázis közötti anyagátmenet során az entalpiaváltozás ($\Delta H_{s \rightarrow m}$) viszonylag kicsi, a hőmérséklet kis mértékű megváltozásának csak nagyon kis hatása van az elválasztásra. A gyenge hőmérsékletfüggés ellenére igényes, nagy pontosságú elválasztásoknál ma már elvárás a kolonna termosztátok használata.

Vannak olyan HPLC-s módszerek, amelyek során nem csak szobahőmérséklet közelében, hanem megemelt hőmérsékleten (40-90 °C) dolgoznak. Természetesen csak akkor van lehetőség ezekre a vizsgálatokra, ha a minta komponensei elegendően hőállóak. Legújabban már 100 °C környezetében lévő vízzel is történnek vizsgálatok, szerves módosítók hozzáadása nélkül. A csak vizet használó módszerek környezetbarátok és olcsók, de csak a vegyületek szűkebb köréhez alkalmazhatók és a kolonnákkal szemben is nagy kihívást jelentenek.

A hőmérséklet függvényében a folyadékok viszkozitása és az oldott komponensek diffúziós állandója is nagyon jelentősen változik, ezeken keresztül módosítani (javítani vagy rontani) lehet a kromatográfiás elválasztási folyamatokat. A viszkozitás a hőmérséklet emelésével rohamosan csökken, ami lehetővé teszi, hogy a korábbinál nagyobb áramlási sebességet is használhassunk anélkül, hogy a készülékünk felső nyomáshatárát elérnénk. A hőmérséklet emelkedésével azonban a diffúziós állandó nő, ami szélesíti a csúcokat, rontja az elválasztást. A lecsökkent

viszkozitás által lehetővé tett nagyobb áramlási sebességgel kompenzálni, sőt meghaladni lehet a diffúzió növekedésének a negatív hatását, ezért a kromatográfiás körülmények megfelelő beállításával magasabb hőmérsékleten gyorsabb és élesebb elválasztásokat lehet elérni.

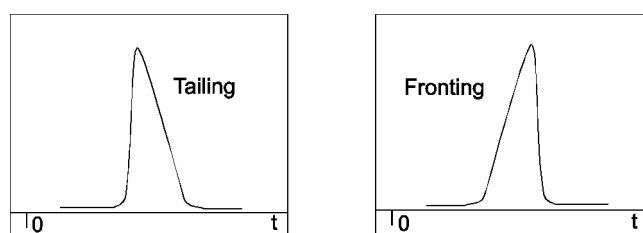
A csúcsmagasság 60,7%-ánál mért szélességet a csúcs szélességének (w), az 50%-nál mért szélességet a csúcs félmagasságban mért szélességének ($w_{1/2}$), a csúcs felfutó és lefutó ágához az inflexiós pontoknál illesztett érintők által az alapvonalból kimetszett szakasz hosszát pedig a csúcs alapvonalon mért szélességének (w_B) hívjuk.

A mennyiségi meghatározás alapja a kromatográfiában általában a csúcs alatti terület (A), ami az alapvonal és a csúcs által bezárt területet jelenti. A terület konkrét mértékegysége a szoftver beállításától és a detektor által kibocsátott jel típusától függően változó, de a dimenziója mindegyiknek jelintenzitás*idő (tipikusan $mV \cdot perc$ vagy $mV \cdot s$). A detektortól függően Egyes esetekben a csúcsok területe helyett a csúcs magasságát használják a mennyiségi meghatározáshoz. Abban az esetben, amikor a detektorjel az anyagi minőségtől függetlenül csak a komponensek koncentrációjától függ (pl. RI detektálás), az összes vizsgált anyag területét összeadva néha a terület százalékos kiértékelést is használják. A legtipikusabb UV detektálásnál az egyes komponensek fényelnyelése a komponens spektrumától és a detektálási hullámhossztól függ, ezért teljes mértékben alaptalan egy termék tisztaságát terület százalékos alapon kifejezni.

Nagyon sokat elárul a kromatográfiás körülmények milyenségéről a csúcsok szimmetriája. Általában a 10% csúcsmagasságnál mért aszimmetria faktort használják, de más magasságban mért aszimmetria faktorok is ismertek. Az As_{10} aszimmetria faktor megadja azt, hogy ha az alapvonalal párhuzamosan, 10%-os magasságnál elvágjuk a csúcsot, akkor ezen az egyenesen mérve a csúcs közepétől a csúcs végéig mért távolság (b) hányszorosa a csúcs közepétől a csúcs elejéig mért távolságnak (a). Az 1. ábrán látható jelölést használva az aszimmetria faktor értéke:

$$As_{10} = \frac{b}{a}$$

Elméleti számítások szerint még ideális körülmények között is van a csúcsonak egy nagyon kis mértékű természetes elnyúlása (azaz $b > a$). A következő ábrán a két tipikus csúcsalak-torzulás látható, ezek a csúcs elhúzódnak (elterjedt angol kifejezéssel: tailing), valamint a csúcs előrenyúlása (angol: fronting). Mindkét esetben valamilyen kinetikai, anyagtranszportbeli probléma van az álló és a mozgó fázis között. Tailing hatás esetén azért nyúlik el a csúcs vége, mert túlságosan lassú az anyagtranszport az álló fázison belül. Ennek a leggyakrabban túlságosan erős kölcsönhatás az oka az analit és az álló fázis, vagy az álló fázist hordozó szilárd anyag között. Tipikusan ilyen alakúak a nagyon bázisos anyagok csúcsai szilikagél hordozós, nem tökéletesen véglezárt fordított fázisú kolonnákon. A fronting hatás leginkább akkor jelentkezik, ha az anyagtranszportot a mozgó fázisból az álló fázisba valamilyen ionos jellegű kölcsönhatás akadályozza. Gyenge savak vagy bázisok esetén például ha az eluens pH-ja nem megfelelő értékű, akkor a fordított fázison a megoszlási egyensúly mellett még egy disszociációs egyensúly is fennáll, ami akadályozza a disszociált és disszociálatlan részecskék szétválását, az ionos jellegű részecskék mintegy előreszaladnak a kolonnán.



3. ábra A HPLC-ben tapasztalható csúcsalak-torzulások

Fontos, hogy az aszimmetria faktor számszerű értéke alapján el lehessen dönteni, mennyire megfelelők a körülmények a mennyiségi vagy minőségi elemzés számára. Tökéletes alakúnak azokat a csúcsokat tekintjük, amelyeknél az $As_{10} = 0,9-1,4$. Az ilyen csúcsok esetén a retenciós idő állandó, nem függ a koncentrációtól, a csúcs minőségi és mennyiségi elemzésre egyaránt felhasználható. Ha az As_{10} az 1,4–2,5 tartományba esik, akkor a koncentrációtól függően a retenciós idő kissé változik, de mennyiségi meghatározásra még lehetőség van. A torzult csúcsalaknak azonban az a következménye, hogy a közeli csúcsok esetleg nem megfelelően válnak szét. Amennyiben az As_{10} eléri vagy meghaladja a 3-at, akkor a retenciós idő a mennyiség függvényében jelentősen változik, minőségi azonosításra már csak szűk koncentráció tartományban alkalmas.

Az integrálást nem lehet pontosan elvégezni, mert annyira elnyúlik a csúcs, hogy nehéz megmondani, hol is végződik valójában. Amennyiben erősen elhúzódó vagy előreszaladó csúcsról van szó, úgy kell megváltoztatni a kromatográfiás körülményeket (eluens összetétele, kolonna), hogy jó szimmetriájú csúcsokat kapjunk, amelyekkel pontos méréseket végezhetünk.

A kolonna adott komponessel szemben mutatott hatékonyságát több módon is jellemezhetjük, ezek között a legegyszerűbben számítható az elméleti tányérszám (N), amely megadja, hogy hány „elméleti tányér” tudna az adott csúcs esetén ugyanakorra elválasztási határfokot biztosítani, mint az adott kromatográfiás kolonna. Az elméleti tányér az kolonnának egy olyan darabja, amelyen dinamikus, áramló körülmények között egyszer beáll a statikus K állandóval jellemzett megoszlási, illetve adszorpciós egyensúly.

Az elméleti tányérszám kiszámítására több képlet is használható, ezek egymással ekvivalensek.

$$N=16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_B} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Az elméleti tányérmagasság (H) az egy elméleti tányérnak megfelelő kolonna hosszúságot adja meg, és könnyen ki tudjuk számítani az elméleti tányérszámból és a kolonna hosszúságából:

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

Az elméleti tányérszám a konkrét kromatográfiás körülmények között egy kiválasztott anyagra vonatkozik, abszolút értékének igazából nincs jelentősége. Az egyik anyagra megállapított elméleti tányérszám nem ad információt egy másik vegyület kromatográfiás viselkedésére vonatkozóan. Ami számít, az a szomszédos csúcsok elméleti tányérszámával történő összehasonlítás, illetve az adott komponens elméleti tányérszámának időbeli változása. Minél nagyobb az elméleti tányérszám, illetve minél kisebb az elméleti tányérmagasság, annál nagyobb a kolonna hatékonysága az adott anyagra nézve.

Mire lehet az elméleti tényérszámot a gyakorlatban felhasználni? Általában arra, hogy a kolonna jóságát valamilyen számszerű módon jellemezni tudjuk. A kolonnákat mindig egy minőségi tanúsítvánnyal együtt szállítják, amelyen feltüntetnek egy olyan kromatogramot, amit az adott kolonnán vettek fel ellenőrzött körülmények között. Ezen általában négy vagy több vegyület csúcsa látható, mindegyikre megadják több más adat mellett az elméleti tényérszám értékét is. Amikor a kromatográfus ellenőrizni szeretné, hogy mennyire használható még a kolonna, akkor a tanúsítványban feltüntetett mintát az eredetivel azonos körülmények között futtatja, majd az újonnan kapott elméleti tényérszám értékeket összehasonlítja a tanúsítványban szereplőkkel. Amennyiben jelentős csökkenést tapasztal, úgy igényes, nagy felbontást kívánó munkához célszerű új kolonnát beállítani. A használt kolonnát nem feltétlenül kell kidobni, mert tájékozódó jellegű vizsgálatokhoz, agresszívabb kromatográfias körülményekhez, kezdeti módszerfejlesztésekhez még sokszor felhasználható.

A kromatográfias gyakorlatban az eluens áramlási sebességét általában a térfogati áramlási sebességgel (F) szokták megadni, de az elméleti számításokhoz, illetve a kromatográfias módszereknek eltérő átmérőjű kolonnára történő átviteléhez, az egyes kolonnák összehasonlításához a lineáris áramlási sebességet (u) használjuk. E két mennyiség között a következő képlettel adhatjuk meg az összefüggést:

$$u = \frac{F}{\varepsilon \cdot A}$$

ahol ε a részecskék közötti porozitás, A pedig a kolonna keresztmetszete.

A lineáris áramlási sebesség és az elméleti tényérmagasság között a van Deemter egyenlet teremt matematikai összefüggést. Az egyenlet egyszerűsített formában a következő alakú:

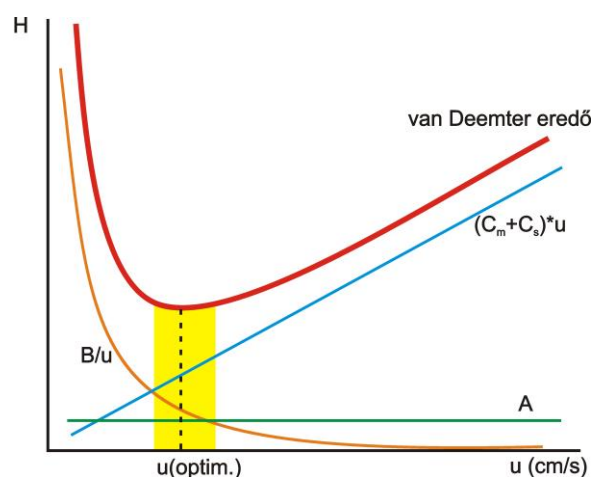
$$H = A + \frac{B}{u} + C_m \cdot u + C_s \cdot u$$

ahol C_m a tömegátadással szembeni ellenállás a mozgófázisban, C_s pedig az állófázisban. Az egyenletben az „ A ” tényező a részecskék átmérőjével és a töltés szerkezetével, a „ B ” a mozgó fázisban mérhető diffúziósebességgel, a „ C_m ” az állófázis vastagságával, az állófázisban mérhető

diffúziósebességgel és a kapacitástényezővel, a „ C_s ” pedig a részecskék átmérőjével, a töltés geometriai szerkezetével, a kapacitástényezővel és a mozgófázisban mért diffúziósebességgel kapcsolatosak.

Ha a H értékét az u (vagy az F) függvényében ábrázoljuk, akkor általában egy minimumgörbét kapunk. Az adott komponensre vonatkozó legjobb lineáris áramlási sebességet (u_{opt}) a görbe minimuma adja meg. Amennyiben a kromatográfiás elválasztást csak erre az egy vegyületre optimalizáljuk, akkor a legjobb eredményt az u_{opt} áramlási sebesség alkalmazásával kapjuk.

Az ábrából láthatjuk, hogy a van Deemter görbe alja meglehetősen lapos, ezért van az, hogy a gyakorlatban szélesebb tartományból választhatunk áramlási sebességet a felbontás észrevehető romlása nélkül.



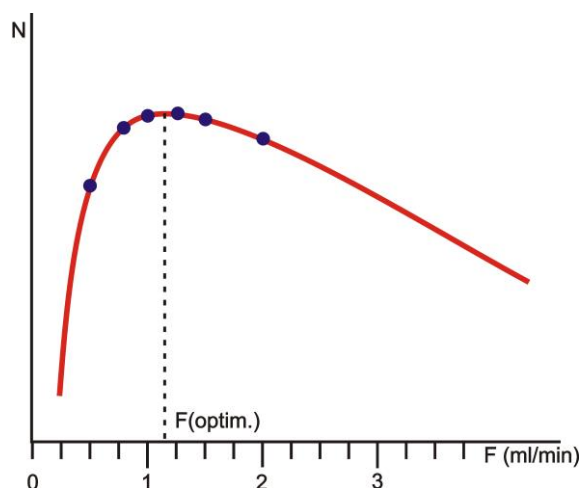
4. ábra A van Deemter egyenlet és az azt alkotó függvények ábrázolása. Az elméleti tányérmagasságot ábrázoljuk a lineáris áramlási sebesség függvényében

Hogyan tudjuk saját magunk meghatározni saját kolonnánk esetén az optimális áramlási sebességet? Először nézzük meg, hogy hogyan változik meg a görbe alakja, ha a van Deemter egyenlet helyett a térfogati áramlási sebesség (F) függvényében ábrázoljuk az elméleti tányérszámot (N)! A vízszintes tengelyen a változás csak egy konstans szorzótényezőt jelent, a függőleges tengelyen pedig egy reciprokos összefüggést, összességében tehát

a van Deemterhez hasonló alakú, de maximummal rendelkező görbéhez jutunk, ahogy az alábbi ábrán is láthatjuk.

A gyakorlatban úgy járunk el, hogy kiválasztunk egy komponenst a vizsgálathoz, a térfogati áramlási sebességet kivéve mindent állandó értéken tartunk, majd több áramlási sebességnél is megfuttatjuk a kiválasztott komponenst. A csúcs paramétereiből kiszámítjuk az elméleti tényezőszámot, és azt ábrázoljuk az áramlási sebesség függvényében. Öt-hat mérési pontból már elegendő pontossággal meg tudjuk becsülni, hogy hol van a görbe maximuma.

A tapasztalat az, hogy a hagyományos 4,6 mm belső átmérőjű kolonnák esetén a gyakorlatban a legtöbbször 1 ml/perc körüli térfogati áramlási sebességet használnak, ez pedig nagyjából megegyezik a kimérhető optimális áramlási sebességgel.



5. ábra Az optimális térfogati áramlási sebesség kísérleti meghatározása során egy kiválasztott anyagot futtatunk azonos körülmények között, csak az áramlási sebességet változtatjuk 5-6 lépésben, kb. a 0,5-2 ml/perc tartományban, majd a mérési pontokból nagyjából megbecsüljük az optimumot.

1.3 Több kromatográfiás csúcs egymáshoz viszonyított jellemzésére használatos paraméterek

Az eddigiekben csak egyetlen kromatográfiás csúcs jellemzőit vizsgáltuk, ugyanakkor a gyakorlatban a standardokat kivéve mindig több anyag van egyszerre jelen, így nagyon fontos a csúcsok egymástól való elválásának problémájával foglalkoznunk.

Két csúcs egymáshoz való viszonyában az elválasztási tényező (α) a legegyszerűbben kifejezhető paraméter, megadja, hogy a második csúcs retenciós ideje (t_{R2}) hányszorosa az első csúcs retenciós idejének (t_{R1}):

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Az elválasztási tényezőt gyakran kiszámolják, de valójában semmilyen információt nem ad arra nézve, hogy szétválnak-e a csúcsok, hiszen nem veszi figyelembe a csúcsok szélességét.

Két csúcs egymáshoz való viszonyát sokkal jobban kifejezhetjük a felbontás v. csúcsfelbontás értékével (R_s) is, amit a következő képlettel számíthatunk ki ($t_{R2} > t_{R1}$):

$$R_s = 2 \cdot \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{B1} + w_{B2}}$$

Ahhoz, hogy két csúcs elváljon egymástól minimálisan az kell, hogy $R_s > 1,5$ teljesüljön.

Az $R_s = 1$ esetén még nem teljes a csúcsok szétválása, hanem az alapvonal közelében átfednek egymással. Annál jobb két csúcs szétválása, minél nagyobb az R_s értéke. A képlet nagyon egyszerű, de nem sok felvilágosítást ad arról, hogy hogyan lehet befolyásolni a csúcsok elválasztását egymástól.

Az R_s kifejezésére még egy másik, az előzővel ekvivalens képletet is használnak:

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right)$$

Ebben az egyenletben egyidejűleg szerepelnek a kinetikai jellegű (N_2) és a termodinamikai jellegű (α , k') paraméterek, felhasználásukkal lehetőség van előre kiszámítani azt, hogy mennyit kell pl. a retenciós időközön vagy az áramláson változtani ahhoz, hogy az elválasztás megfelelő legyen.

Szoftverek

Ma már számos olyan számítási modell, illetve az azokat alkalmazó számítógépes program ismert, amelyek felhasználásával nagyon összeett, sok komponensű minta futási körülményeinek optimalására is lehetőség van. Az ilyen programok túlnyomó része azonban ingyenes változatban nem áll rendelkezésre.

2. A KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK ANYAGAI ÉS ESZKÖZEI

2.1 Eluens- és mintaelőkészítés

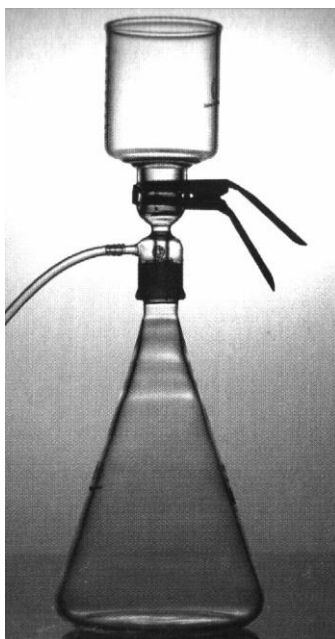
A lehető legritkábban találkozunk olyan feladattal, amelynél kristálytisztá, minden zavaró komponenstől mentes mintát kell vizsgálnunk. sokkal gyakoribbak azok az esetek, amikor a keresett komponenst vagy komponenseket egy sötét színű, zavaros vagy csapadékos oldatból kell meghatároznunk úgy, hogy a készülékünket ne tegyük tönkre már az első injektálással. A három leggyakoribb tisztítási művelet, amivel a gyakorlatban találkozunk, a szűrés, a centrifugálás és a szilárd fázisú extrakció.

Szűrés-Membránszűrés

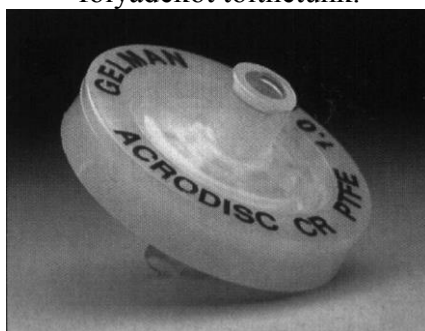
A HPLC-ben különösen nagy a jelentősége annak, hogy mind az alkalmazott oldószerek, mind pedig az injektált minták maximálisan meg legyenek tisztítva mindenfajta lebegő szennyeződéstől. Ezt a legegyszerűbben úgy érhetjük el, ha az oldószereket illetve a mintákat megfelelően kis pórusméretű szűrőn, úgynevezett membránszűrőn átszűrjük. Mivel a membránszűrő lapok nagyon finomak (néhány tized mikronosak) a folyadékok saját súlyuknál fogva már nem képesek ezeken a lapokon a kellő sebességgel átfolyni, a szűrés meggyorsítására ezért vákuumot vagy nyomást alkalmazunk. A következő ábrán olyan, üvegből készült szűrőtölcsért láthatunk, amelyben cserélni lehet a membránszűrő lapokat, így mindig a kellő finomságú lapot választhatjuk ki munkánkhoz.

A membránszűrés közben részlegesen az oldott gázok is eltávoznak, amivel megkönnyíthetjük az on-line gázmentesítő egység munkáját is. A fenti készülék nagy méretei miatt használhatatlannak bizonyulna a kis mennyiségben rendelkezésre álló minták szűrésénél, ezért ilyen célra sokkal kisebb, néhány cm³-es térfogatú szűrőtölcséreket is kifejlesztettek. Gyakran azonban a rendelkezésre álló minta térfogata olyan kicsi, hogy nincs lehetőség a fenti készülék használatára. Ilyen esetekben injekciós fecskendő végére szerelhető, nagyon sokféle méretben és finomságban kapható

membránszűrőket használunk, amelyek esetén az átfolyást nem vákuum, hanem nyomás alkalmazásával érjük el. Ezek a kis méretű szűrőlapok olyan kis belső holtterefogattal rendelkeznek, hogy a folyadékvesztés minimálisnak tekinthető.



6. ábra Nagyobb térfogatú oldószer szűrésére használható, cserélhető szűrőlapos készülék képe. A tölcserbe egyszerre általában 200–300 cm³ folyadékot tölthetünk.



7. ábra. Injekciós fecskendő végére illeszthető membránszűrő, amellyel nagyon kis térfogatú minta is minimális veszteséggel szűrhető meg. A legelterjedtebb pórusméretek a 0,22 μ , és a 0,45 μ , a membrán készülhet szervesetlen anyagból, cellulózból, poliamidból vagy éppen teflonból, a szűrő átmérője néhány mm-től egészen a kb. 4 cm-ig változhat.

Centrifugálás

A legolcsóbb és legáltalánosabban használható eljárás makroszkópikus szennyezők eltávolítására. Előnye az, hogy egy jó minőségű asztali centrifugával kb. 20000 g gyorsulás érhető el, még a sejtalkotók és sejtmembrán töredékek is lecentrifugálhatók, azaz a sterilszűrésnél nagyobb tisztaságot ad. Az egyszer használatos műanyag centrifugacsövek olcsók, a membránszűrők meglehetősen költségesek. Egyszerre akár 50-60 minta is centrifugálható, a készülékbe ezen túl még centrifugális szűrőpatronok is behelyezhetők, amelyekkel ultraszűrést vagy nanoszűrést is végezhetünk. A nagy gyorsulással és hosszabb ideig végzett centrifugálás egy jól használható, költséghatékony alternatívája a membránszűrésnek, a kis gyorsulással rövid ideig végzett centrifugálás után azonban még membránszűrést is használnunk kell.

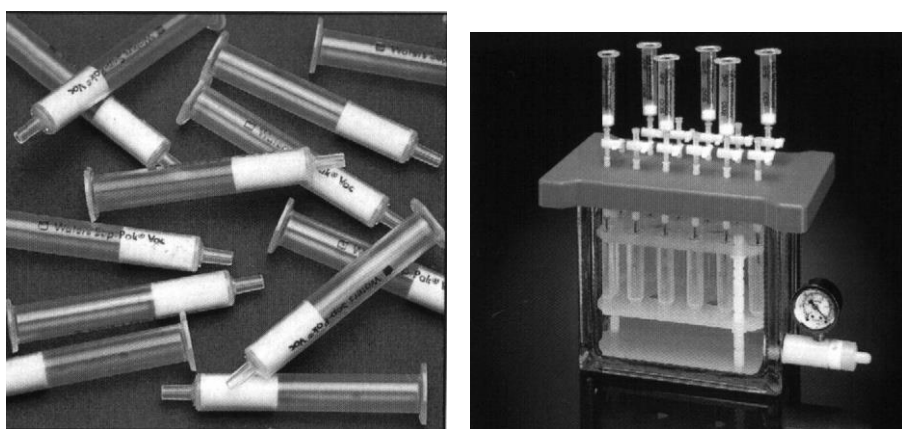
Szilárd fázisú extrakció

Gyakran találkozhatunk azzal a problémával, hogy a vizsgálni kívánt anyag a mintában csak nagyon kis koncentrációban van jelen, vagy nagyon sok, az elválasztást megnehezítő, vagy lehetetlenné tevő komponens van még mellette. Ha a mintából nagyobb mennyiség áll a rendelkezésünkre, akkor hagyományos eljárásokkal (pl. lecsapatás, szűrés, ultracentrifugálás) gyakran meg tudunk szabadulni a számunkra fölösleges anyagoktól, illetve kellő mértékben dúsítani tudjuk a vizsgált komponenst (pl. vizes oldatoknak az extrakciójával). Kis mintamennyiség esetén (ilyenek általában az orvosdiagnosztikai, biológiai eredetű minták) azonban a hagyományos eljárások nem, vagy csak nehézkesen és időt rabló módon használhatók. Ma már széles körben használjuk a *szilárd fázisú extrakciós* (SPE) eljárásokat, amelyek lényege az, hogy a vizsgálni kívánt komponens(ek)e)t egy kis méretű kromatográfiás oszlopon megkötjük, mosással megszabadítjuk a mintát a nem kívánt komponensektől, majd utolsó lépésben leoldjuk a mintánk hasznos részét az oszlopról és most már könnyen és egyszerűen elvégezhetjük annak kromatográfiás vizsgálatát. Az eljárás gyors, egyszerű, hatékony.

Az SPE céljára használt töltetek általában megegyeznek azzal a töltettípussal, amivel később az analitikai elválasztást végezzük, de attól lényegesen nagyobb szemcseméretűek és sokkal olcsóbbak. Olyan műanyag házba vannak betöltve, amilyenekből az egyszer használatos műanyag fecskendők készülnek. A töltetet alul és felül vékony, porózus műanyag

lapocska tartja. Az oldószerek átszívását vákumm segítségével végezzük, az alábbi ábrán néhány szilárd fázisú extrakciós oszlopot láthatunk, mellette pedig a használatukat segítő vákuumkamra képe található.

Az SPE kolonnákat használat előtt általában valamilyen pufferoldattal kondicionálni kell, majd átszívjuk rajtuk a mintákat, lemosuk a maradék oldatot, végül megfelelő oldószerral leoldjuk a kolonnán megkötődött vizsgálandó anyagot, és az így kapott oldatot vizsgáljuk a továbbiakban.



8. ábra Szilárd fázisú extrakcióhoz használatos, gyári készítésű, általában 100–500 mg szilárd szorbenst tartalmazó egyszer használatos oszlopok, valamint a több oszlop befogatására és az oldószer átszívására szolgáló, csapokkal ellátott vákuumkamra képe.

2.2 Kolonnák

Mechanikai kialakítás

A kromatográfokhoz sokáig csak egyetlen fajta mechanikai kialakítású, csavarkulcsok segítségével szerelhető kolonnát használtak. Ezek használata nem volt igazán kényelmes, ezért kidolgozták a csupasz kézzel is szerelhető csatlakozókat, amelyeknél a szokásos méretű csatlakozóelemeket az addigiaknál sokkal nagyobb, bordázott felületű, jól kézbe fogható méretű peremmel látták el. A kolonnákat hagyományosan a két végükön lévő menetes csatlakozókkal együtt árulják, de olyan patronos megoldású

kolonnák (cartridge) is kaphatók, amelyeknél csak a töltött csövet kell kicserélni és a csere kézzel is elvégezhető. A cartridge kolonnák használatához meg kell vásárolni a befogató elemeket, amelyek gyakran csak egy adott gyártó kolonnájához használhatók.

Töltetek

A kromatográfias gyakorlatban nagyon sok fajta töltetanyaggal találkozhatunk, itt sajnos nincs lehetőség a kereskedelmileg hozzáférhető óriási számú szorbens vázlatos ismertetésére sem, csak a legfontosabb típusokat soroljuk fel.

A legegyszerűbb szorbens a szilikagél (normál fázis). A szilikagél kémiai tulajdonságai lehetővé teszik, hogy a felületéhez kovalens kötással rögzítve hosszabb-rövidebb szénláncokat, vagy funkció csoportokkal szubsztituált szénláncokat kapcsoljunk. A kémiailag kötött bevonat alapvetően megváltoztatja a szilikagél tulajdonságait, például alkilcsoportokkal bevonva az addig erősen poláris felületű szilikagél felülete apolárisává válik (fordított fázis). Megfelelően megválasztott funkció csoportokkal teljesen új tulajdonságú, nagy szelektivitású, bizonyos vegyülettípusokra specifikus töltetanyagok állíthatók elő.

A szilikagélen alapuló töltetanyagok csak olyan pH-n használhatók, ahol nem oldódik fel a hordozó szilikát váz, azaz az oldat nem lehet bázisos, sem pedig erősen savas. Véglezárással a pH-tartomány kissé kibővíthető, de semmiképpen sem lehet pH = 9 fölött dolgozni velük. A használható pH-tartomány problémáját úgy oldották meg, hogy a felületi rétegeket nem szilikagélhez, hanem mikroszkópikus üveggyöngyökhöz (nem porózus szerkezetű), kemény polisztirol-szemcsékhez, vagy más polimer hordozókhoz kötötték. A polimer hordozós töltetek a mechanikai igénybevételekkel szemben kevésbé ellenállóak, az oldószer-váltás, pH-változás hatására duzzadhatnak vagy zsugorodhatnak, a hirtelen nyomásváltozásokat pedig nem viselik el, de izokratikus elúció esetén jól használhatónak bizonyultak.

A gyógyszeriparban alapvető fontosságú a királis vegyületek analízise és elválasztás (esetleg ipari méretekben is). Sok gyógyszer-hatóanyagról kimutatták már, hogy (legegyszerűbb esetben) a két optikai izomerjük nem egyforma gyógyító hatással rendelkezik, sőt már arra is volt példa, hogy míg az egyik izomer gyógyított, addig a másik esetleg súlyos elváltozásokat

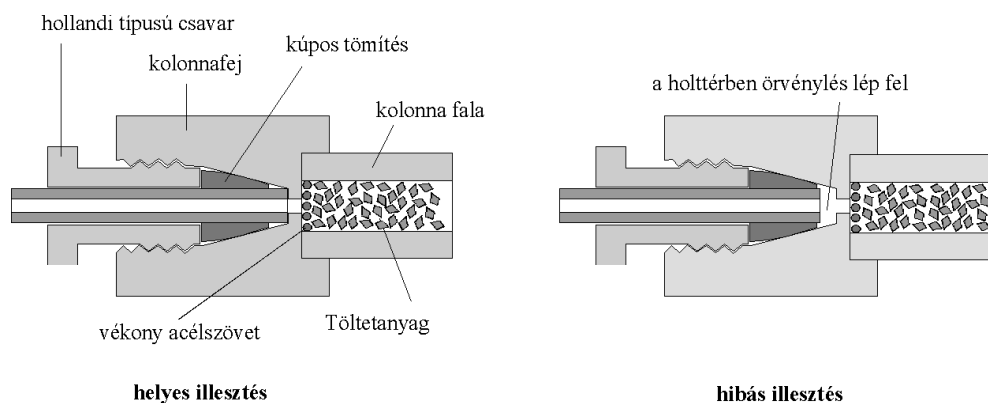
okozott. Az ilyen vegyületek vizsgálatára fejlesztették ki a dextránvázhhoz kémiai kötéssel kapcsolt, királis molekulák alkotta állófázisokat, amelyek szelektíven csak az egyik izomert tartalmazzák és egy racém elegyben lévő különböző izomerekkel eltérő erősségű kölcsönhatást alakítanak ki.

1. táblázat A leggyakoribb töltetanyagok jelölése és tulajdonságai

Jel	Név, jelölés	Jellemzők
Si	szilika	Normál fázisú töltet, különösen poláris, nem ionos vegyületek elválasztására alkalmas. Vízzel, víztartalmú oldószerekkel nem szabad együtt használni, mert a víz dezaktiválja a felületét. A szilikagél-hordozós töltetek mechanikailag meglehetősen erősek, így a kolonnák még néhány nagyobb lökést is elviselnek.
C8, C18	oktil, RP-8, MOS, LC8 oktadecil, RP-18, ODS	A legelterjedtebb fordított fázisú töltetek, apoláris komponensekkel szemben a legnagyobb visszatartással bír. Különösen alkalmasak gyógyszer-hatóanyagok, vitaminok, drogok, környezetvédelmi mérések céljaira.
C6H5	fenil	Az aromás vegyületekkel szemben különösen nagy szelektivitással rendelkező, fordított fázisú töltet, de hidrofób kölcsönhatásos kromatográfiában is alkalmazható.
CN	cianopropil	Vegyes tulajdonságú, enyhén poláris szorbens, fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Gradiens elválasztásokra különösen alkalmas, mert az egyensúlyi helyzetet gyorsan eléri. Bizonyos gyógyszerek analízise során kiterjedten alkalmazzák.
NH2	aminopropil	Fordított és normál fázisú, valamint gyenge anioncserélő töltetként egyaránt alkalmazható. Normál fázisként szelektivitása a szilikához hasonló, nagy előnye azonban, hogy nem dezaktiválja a felületét a víz.
SAX WAX SCX WCX	többféle	Erős vagy gyenge típusú (S vagy W) kation- vagy anioncserő (CX vagy AX) tulajdonságú töltetek, amelyek bázisok, savak, sók nukleozidok, nukleotidok elválasztására használhatók.

Különlegessége miatt említést érdemel még egy porózus szerkezetű, szintetikus előállított grafit szemcsés töltet, amelyek felületére pirolízis során kémiai kötással aromás gyűrűket is felvittek. Ez a kolonna fordított fázisú kolonnaként működik, de emellett alkalmas az enantiomerek szétválasztására is, nem érzékeny a mechanikai igénybevételekkel szemben, és a teljes pH-tartományban használható. Különleges tulajdonságai ellenére csak kevés helyen használják, mert meglehetősen sokba kerül.

A kolonnák és a csövek illesztésénél vigyáznunk kell arra, hogy minél közelebb kerüljenek a csatlakozó végek egymáshoz, hogy közöttük a holttér minimális legyen. A holttér rendkívül káros, mert benne örvénylés alakul ki, aminek következtében a minta sokkal szélesebb fronton halad végig, mint ami szükséges. Ez a csúcok kiszélesedéséhez vezet, aminek következtében a készülék felbontása jelentősen romlik. A kolonna és egy vezeték csatlakozójának vázlatos metszeti képe látható a 13. ábrán.



9. ábra A kolonna és a csatlakozó csövek helyes és helytelen illesztése

Fémből készült cső és fém hollandi csavar esetén a tömítésnek általában fémből kell lennie, míg műanyagcső, műanyag hollandi csavar esetén a tömítés anyaga is műanyag. A tömítés anyagának eltávolítása szivárgáshoz, valamint a csővég károsodásához vezethet. Nagyon gondosan kell eljárni a legelső csatlakoztatás végrehajtásakor (különösen fémből készült szerelvények esetén), mert a tömítés a csavar első meghúzásakor enyhén deformálódik, rápréselődik a csőfalra és az ekkor beállított helyről többé már nem távolítható el!

2.3 Eluenstároló edények, HPLC-s szerkezeti anyagok

A gyakorlatban többféle edényt használnak, a nagyon drága, kifejezetten professzionális célokra készült, törésgátló műanyagréteggel bevont, kúpos aljú, porszűrő ventillel ellátott edényektől kezdve egészen az egyszerű vegyszeres üvegekig. Az eluenstárolók és az eluenssel érintkező szerkezeti anyagok megválasztásakor a következő általános szempontokat kell figyelembe venni:

A tárolóedénynek, a csővezetékeknek és egyéb szerkezeti anyagoknak *kémiaailag teljesen inertnek* kell lenniük az alkalmazott oldószerrel szemben.

Az oldószertároló edényeknek lehetőség szerint *minél zártabbnak* (de nem légmentesen zártak!) kell lenniük. Ezzel megakadályozzuk a por bejutását az oldószerbe, valamint a gyakran egészségre veszélyes oldószergőzőknek a levegőbe kerülését.

Az oldószervezeték(ek)et feltétlenül el kell látni *finom szűrővel*, amely az oldószerbe véletlenül belekerült, szemmel láthatatlan szennyezőket eltávolítja. A rendszerbe került szilárd szennyezők a pumpát súlyosan károsíthatják, a kolonnát pedig eltömik!

A csővezetékekhez, szerkezeti és csatlakoztató elemekhez leggyakrabban a következő táblázatban szereplő anyagokat használják, mindenre egyformán jól alkalmazható, univerzális megoldás még nem létezik.

Milyen átmérőjű csöveket használnak a legtöbb HPLC készülékben? Az általánosan elterjedt gyakorlat szerint a legtöbb esetben a csövek külső és belső átmérőjét inch-ben (1'' = 25,4 mm) adják meg. A legelterjedtebbek az 1/16'' (1,59 mm) külső átmérőjű csövek, ennek belső átmérője 0,01'' (0,25 mm), 0,02'' (0,51 mm) vagy 0,03'' (0,76 mm) lehet. A legvékonyabbat az injektor és a kolonna, valamint a kolonna és a detektor közötti (lehetőleg minél rövidebb) összekötő csőnek ajánlják, hogy a cső okozta sávszélesedést a lehető legkisebbre csökkentsék.

2. táblázat A HPLC készülékeknél alkalmazott szerkezeti és tömítő anyagok jellemző tulajdonságai

Anyag	Tulajdonságok
rozsdamentes acél	A legelterjedtebb anyag. Előnye, hogy minden, a HPLC-ben előforduló nyomással és hőmérséklettel szemben ellenálló, viszonylag jól hajlítható, gyakorlatilag minden oldószer esetén használható. A vassal vagy annak ötvözőivel komplexet képező anyagok, illetve a biológiai minták egy része esetén nem használható. Ilyen anyagok vizsgálata esetén nem csak a csővezetékeknek kell biokompatibilis műanyagból készülni, hanem a mintával érintkező minden szerkezeti elemnek, így a kolonna falának, az injektornak, a mintahuroknak, sőt még a fecskendőnek is.
PEEK	Poliéter-éter-keton típusú műanyag. Kémiai anyagokkal szemben nagyon ellenálló, csak a nagyon agresszív savak támadják meg (pl. tömény kénsav, tömény salétromsav). Néhány szerves oldószerrel nem célszerű a használata, mert ha nem is oldódik fel, de megduzzad (pl. diklór-metán, THF, DMSO). Mivel a PEEK megfelelően rugalmas, ugyanakkor kemény anyag, ezért a csövek mellett tömítések és egyéb szerkezeti darabok is készülnek belőle. Legfeljebb kb. 100 °C-ig használható.
Teflon	Poli-tetrafluor-etilén. Minden oldószerrel szemben tökéletesen ellenálló. Mechanikailag nem elég erős ahhoz, hogy nagyobb igénybevételnek kitett szerkezeti elemeket készítsenek belőle, de a kisnyomású oldószerszállító csövek ma már gyakorlatilag csak Teflonból készülnek.

Hogyan lehet méretre vágni a nagyon vastag falú kromatográfiás csöveket? Semmiképpen sem harapófogóval! Valójában két lehetőség áll a kromatográfus előtt. Ha acél csövet használ, a legköltségesebb, de legjobb módszer az, ha gyári készítésű, méretre előre levágott csövet vásárol. Második lehetőségként vásárolhat gyári készítésű csővágót, ami műanyag csövek esetén nagyon jól, acél csövek esetén elfogadhatóan használható. Műanyag csöveket éles szikével, barkácskéssel, vagy akár ablaktisztító pengével is szépen lehet vágni.

2.4 Gázmentesítés

A levegőben lévő oxigén és nitrogén minden oldószerben oldódik, de eltérő mértékben. Vízből és szerves oldószerből álló elegyek esetén a gázok oldékonysága nem lineárisan változik a szerves komponens térfogattörtjével, hanem minimumot mutat. Ha például vizet és metanolt, akkor az elegy túltelített lesz az oldott oxigénre és nitrogénre, és a főleg buborékok formájában kiválik. Az így keletkező buborékok problémát jelentenek a HPLC-s vizsgálatok során, ezért a használt oldószereket elegyítés előtt meg kell szabadítani a bennük oldott gázoktól. Amennyiben nem gázmentesítjük az oldószereket, akkor egy idő után a kolonnában vagy a kolonna után buborékok képződnek, amelyek eredményeképpen a csúcsok alakja torzul, az oldószeráramlás sebessége ingadozik, a fotometriás detektoron áthaladó buborékok pedig fantom csúcsokat adnak.

Több eljárást is kidolgoztak az oldószerek gázmentesítésére, a gyakorlatban bármelyik módszerrel találkozhatunk. A végeredményt tekintve mindhárom eljárás megbízható eredményt ad.

Ultrahangos gázmentesítés

Az ultrahang által mikroszkópikus méretekben keltett, gyorsan váltakozó nyomás és vákuum hatására az oldószerben oldott gázokból makroszkópikus méretű buborékok képződnek, amelyek eltávoznak az oldatból. Az ultrahangos gázmentesítést sokkal hatékonyabb, ha közben vákuumot is alkalmazunk.

Héliumos gázmentesítés.

A hélium gyakorlatilag elhanyagolható mértékben oldódik az oldószerekben, ezért héliummal alaposan átbuborékolatva az eluentt vele ki

lehet üzni az oldott gázokat. Előnye, hogy nagyon jó minőségű, fluoreszcenciás detektorokhoz is jól használható oldószert állít elő, hátránya, hogy működtetése meglehetősen költséges, ugyanis a hélium meglehetősen drága.

Vákuumos gázmentesítés.

Megvalósítható akár úgy, hogy az oldószereket a mérés megkezdése előtt alacsony nyomáson kevertetve éppen forrásba hozzuk, amikor is az oldott gázok eltávoznak, vagy úgy, hogy az oldószeraamlás útjába (on-line) egy folyamatosan működő, vákuumkamrás gázmentesítő egységet helyezünk, amely mindig csak annyi oldószert gázmentesít, amennyi éppen felhasználásra kerül. A jelenlegi kromatográfias gyakorlatban ez a legelterjedtebben eljárás, az on-line vákuumos gázmentesítőket az új készülékekben már egybeépítik a pumpával.

2.5 Pumpák

A folyadék szállítását a különböző megoldású kromatográfias pumpákkal biztosítjuk. Bár a pumpa szerepe kritikus a vizsgálatok szempontjából, a tapasztalatok szerint a legkevesebb gondot a mérések során éppen a pumpák jelentik.

A pumpák általában ún. pozitív térkiszorítású, két dugattyús folyadék adagoló eszközök. A szokásos nyomástartományuk 0-450 bar, de a legújabb eszközök akár 1200 bar nyomást is biztosíthatnak. A szállított folyadék mennyisége nem túlságosan nagy, általában 1-2 ml/perc, így a nagy nyomás ellenére sem szükséges nagy elektromos teljesítmény vagy méret. A modern HPLC-s pumpák mérete semmiben nem különbözik pl. az UV-detektor méretétől, esetenként pedig közvetlenül a pumpával egy dobozba építik be az on-line gázmentesítőt, a kisnyomású gradiensképzőt és a keverőszelepet is.

Két alapvető kívánalmat kell kielégíteniük a pumpáknak: egyenletesen, pulzálástól mentesen kell az eluent nagy nyomáson is szállítaniuk. Ennek technikai megoldására számos, egymástól csak a részletekben különböző megoldás létezik, de azok részleteivel nem szükséges itt foglalkoznunk. Ma már a pumpák mindegyike alkalmas a hagyományos méretű (4,6 mm belső átmérőjű) kolonnákkal végzett munkákhoz, az ultranagy nyomáson, 1-2

mm-es belső átmérőjű, nagyon finom szemcseméretű kolonnákkal végzett munkákhoz azonban csak néhány készülék alkalmas.

2.6 Automata injektorok, mintaváltók

Bármilyen megoldású injektort használunk is, annak biztosítani kell azt, hogy a mérendő mintánka atmoszférikus nyomáson be tudjuk tölteni egy bemérő hurokba (ami tulajdonképpen egy ismert térfogatú csődarab), majd ezt a mintát veszteség nélkül be tudja juttatni a nagynyomású folyadékáramlásba. Ma már csak a kutató laborokban lehet manuális injektorokkal találkozni, ezért azok részletes tárgyalásától itt eltekintünk. Az automata injektorok automata mintaváltóval vannak egybeépítve (autosampler), amelyek teljes belső tere a bemérő hurokkal és az injektorral együtt termosztálható.

Az automata injektor egy erős tű segítségével átszűrja a vezérlő program által magadott pozícióban lévő mintásüveg kupakján lévő rugalmas membránt, az üvegben lévő folyadékból kiszívja a szükséges mennyiséget, amit aztán a mintahurokba beletölt. A program által adott jelre a készülék a mintahurokot becsatlakoztatja a folyadékáramlásba, és ezzel megtörténik a minta injektálása.

Az automata injektorok a mintavételen túl még elvégzik a tű és a csövek tisztítását is, hogy a minták egymással való szennyeződését megakadályozzák. A különböző automata injektorokban más-más mosási technikát használnak, amelyek mindegyike biztosítja a teljes tisztítást (elméletileg).

A gyakorlat szempontjából kiemelkedő az autosamplerek fontossága. Alapvető kíváncságot, hogy az injektált térfogatoknak minél kisebb legyen a szórása, fontos a szinte veszteségmentes injektálás lehetősége (kis mintamennyiség esetén érdekes), valamint a keresztszennyezés kizárása. Éppen ez utóbbinál jelentkeznek a leggyakrabban a problémák, ezért új készülék vásárlásánál erre különösen nagy gondot kell fordítani.

2.7 Detektorok

Nem elég a komponenseket a kolonnán elválasztani, de valamilyen módszerrel érzékelhetővé, detektálhatóvá („láthatóvá”) is kell tenni azokat. Detektálásra valamilyen olyan anyagi tulajdonságot használunk fel, amely jellemző a vizsgálandó komponensünkre, ugyanakkor nem jellemző az eluensre (pl. fényelnyelés, tömegszám, redoxi reakció), vagy éppen fordítva, az eluensre jellemző, és annak tulajdonságait módosítja a komponens (pl. törésmutató, vezetőképesség). A detektor típusok száma elég nagy, itt csak a leggyakrabban használt detektorokat említjük. Nem térünk ki különböző tömegspektrometriás detektálási lehetőségekre, mert azok csak a nagyon jól felszerelt laboratóriumokban fordulnak elő, üzemeltetésükhöz pedig speciálisabb feltételek szükségesek.

Ultribolya-látható spektrofotometriás detektor

A HPLC-s gyakorlatban a leggyakrabban és legáltalánosabban az UV-VIS fotometriás detektorokat használják. Alkalmazásának feltétele az, hogy a detektálni kívánt vegyületekben legyen kromofor csoport. Ennek a detektornak mára már több, különböző bonyolultsági fokú típusa (működési módja) is kialakult, ezek a következők:

Változtatható hullámhosszon történő detektálás: a spektrofotométert tetszőleges hullámhosszra be lehet állítani és lehetőség van a futtatás közbeni hullámhosszváltásra is.

Scanning detektorok: olyan változtatható hullámhosszúságú detektorok, amelyekkel a kromatográfiás csúcsok maximumához érve lehetőség van egy-két másodperc alatt teljes UV vagy UV-VIS spektrum felvételére és tárolására.

Diódasoros detektorok esetén egy a fentiektől eltérő detektálási módszer használnak, a mintán nem a monokromátor által előállított, kiválasztott hullámhosszúságú fény halad át, hanem a teljes spektrumú fény, amelyet egy rács segítségével a minta után bontanak fel folytonos spektrummá. Ezt a spektrumot vetítik rá egy fényérzékeny diódákból készített lapkára, amelyen minden hullámhossz érzékelését külön-külön dióda végzi. Az eredmény az lesz, hogy minden egyes kromatográfiás ponthoz egy teljes spektrum rendelhető. Egyszerű kétdimenziós kromatogram helyett háromdimenziós

ábra jön létre, amelyből tetszőleges hullámhossznál kivághatunk egy-egy hagyományos kromatogramot, de természetesen számtalan más ábrázolási mód is rendelkezésünkre áll. Csak számítógéppel összekapcsolva használható. A detektort természetesen 1-3 kiválasztott hullámhosszon is lehet használni, ekkor a szokásos kromatogramokat szolgáltatja. Az ilyen detektorokhoz olyan számítógépes programokat is kifejlesztettek, amelyek segítségével spektrum-adatbázisból az egyes csúcsok automatikus azonosítása, illetve a csúcstisztaság vizsgálata megvalósítható.

Hogyan választjuk ki a detektáláshoz használt hullámhosszat UV-detektorok esetén? Lehetőség szerint arra törekszünk, hogy a vizsgálni kívánt anyagunk UV-spektrumában az elnyelési maximumhoz tartozó hullámhosszon végezzük a mérést, hiszen ekkor lesz az adott komponensre nézve a legnagyobb a készülékünk érzékenysége. Változtatható hullámhosszúságú detektorral vagy diódasoros detektorral el tudjuk érni azt, hogy minden vegyületet a saját elnyelési maximumán detektáljunk.

Fluoreszcenciás detektor

A fluoreszcenciás detektorok nagy érzékenységük és szelektivitásuk következtében egyre népszerűbbek, különösen a biológiai és orvosdiagnosztikai vizsgálatokban, mivel a porfirinvázis vegyületek, az aflatoxinok, riboflavinok, vitaminok, gyógyszerek és gyógyszer-metabolitok erősen fluoreszkálnak. Működése azon alapszik, hogy a vegyületeket valamilyen kiválasztott hullámhosszúságú fényel gerjesztik és a gerjesztett vegyület által kibocsátott fényt sötét háttér előtt detektálják. A kibocsátott fény hullámhossza nagyobb, mint a gerjesztő fényé. A fluoreszcenciás detektorok annyira érzékenyek, hogy a kolloid lebegő szilárd anyagok vagy az oldatban képződő, UV-detektorok számára még láthatatlan nagyságú buborékok is jelentős zavarjeleket eredményeznek. A detektor érzékenyen reagál a hőmérséklet és az eluens viszkozitása változására, ezért a detektorcellát termosztálni kell.

Elektrokémiai detektor

Minden olyan anyag detektálható elektrokémiai módszerrel, amely valamilyen elektródreakcióba vihető, oldata vezeti az elektromos áramot (ionos vegyületek). Ezek egy része egyidejűleg UV-aktív anyag is, míg másik részüket fotometriás úton közvetlenül nem lehet kimutatni. Az

elektrokémiai detektoroknak nagy az érzékenysége, nagy a szelektivitása, jól összeférhetők a fordított fázisú kromatográfiás rendszerekkel (hiszen itt az egyik eluens általában a víz) és nagy a lineáris tartományuk. Működési elvüket tekintve két nagy csoportjuk különböztethető meg: a voltametriás és az amperometriás detektorok. A legújabb gyártmányú készülékekkel már minden detektálási mód használható.

Amperometriás detektorok: A cellára kapcsolt egyenfeszültséget egy elektromos stabilizátor egységgel állandó értéken tartják és folyamatosan mérik a cellán áthaladó áram erősségét.

Amennyiben a feszültséget úgy állítják be, hogy az összes áthaladó komponens részt vesz az elektródreakcióban, akkor az eljárást coulometriás detektálásnak nevezik.

Voltametriás detektorok: A cellára adott feszültséget rövid időközön belül folytonosan változtatják és közben mérik az áthaladó áram erősségét. A detektálás megvalósítható mikrométerekben, de makroszkópikus detektoroként is használható. Amennyiben cspegő higanyelektrodát alkalmaznak, akkor a detektort polarográfiás detektornak nevezik.

Az alkalmazott típustól függetlenül általában minden esetben háromelektrodos (munkaelektrod, segédelektrod és referenciaelektrod) átfolyó cellát használnak.

Vezetőképességi detektor

Egy oldat vezetőképességének a folytonos mérésével információt kaphatunk mind az abban oldott szerves, mind a szervetlen vegyületek mennyiségéről. A cella két platinalamezkét tartalmaz, amelyen keresztül váltakozóáramot vezetnek át. A nagyobb frekvenciájú váltakozóáram hatására nem következi be elektródreakció, az áthaladó áram intenzitása arányos lesz az oldott anyag mennyiségével. Amennyiben elektromosan vezető eluens használunk, akkor az elektromosan nem vezető komponensek is kimutathatók, mert ezek „hígítják” az alap elektrolitot, aminek következtében a kromatogramban negatív csúcsként jelentkeznek. A detektor hátránya, hogy csak kis koncentrációtartományban ad a mennyiséggel egyenesen arányos jelet. Gradiens elúció esetén csak úgy használható, ha az eluens vezetőképessége állandó marad a gradiens során (mivel ezt szinte lehetetlen teljesíteni, inkább csak izokratikus elúciónál alkalmazzák).

Törésmutatóindex (RI) detektor

Ez a detektor az ún. tömegérzékes detektorok közé tartozik, automatikusan méri az átfolyó oldat törésmutatóját, amely pedig arányos az oldószerben oldott anyag mennyiségével. Két, egymással sorban kapcsolt cellából áll a detektor, az egyik a referencia cella, a másik pedig a mérőcella. A referencia cellát le lehet választani az áramlásról. Általában a gyakorlatban úgy használják, hogy amikor az alapvonal jön, akkor folyamatosan öblítik a referencia cellát is, majd amikor egy csúcs érkezik, akkor lezárják a referencia cellát, így az tiszta eluenszt tartalmaz, és annak a törésmutatójával hasonlítják össze a mérő cellán áthaladó oldat törésmutatóját. A detektor teljesen általánosan használható minden vegyület esetében, nem szükséges hozzá az, hogy a vegyület fényelnyeléssel rendelkezzen. Igazából azt mondhatjuk, hogy az RI detektor közelíti meg legjobban az ideális detektort. A mai RI detektorok már viszonylag érzékenyek, de számottevően elmaradnak az UV detektorok érzékenysége mögött. Mivel a törésmutató nagyon erősen függ a hőmérséklettől, az RI detektor celláját nagyon gondosan termosztálni kell (legalább 0,001 °C pontossággal!).

3. A KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK ÁLTALÁNOS MENETE

Nem lehet egyetlen olyan általános receptet adni, amely minden kromatográfiás vizsgálathoz egyformán használható lenne. Annál nehezebb a kromatográfus dolga, minél több komponensű az analizálandó minta, és minél több major és minor komponens mennyiségét kell meghatározni.

A legnehezebb feladat az olyan mintának a teljes vizsgálata, amelynek a komponenseiről (azok számáról, kémiai minőségéről, mennyiségéről) semmit nem tudunk. Egy ilyen teljes vizsgálat tökéletesen felszerelt laboratóriumban is több hónapig tarthat és egyáltalán nem garantálható, hogy a végén minden komponenst sikerül beazonosítani. Az ismeretlen vegyületek azonosításáról mindenképpen tudnunk kell, hogy nagyon összetett feladat, rutin szinten megoldani általában nem lehet. A legutóbbi években általánosan elterjedtek a különböző típusú HPLC-MS rendszerek, illetve egyre több helyen találhatók HPLC-NMR rendszerek, amelyek más detektorokkal, illetve kétdimenziós futtatási lehetőségekkel kiegészítve először adnak reményt a legtöbb komponens minőségi azonosítására. Egy teljesen ismeretlen vegyület első körben történő beazonosítását (vagy vélt beazonosítását) csak akkor tekinthetjük biztosnak, ha független forrásból származó standardot találunk, amit azonos körülmények között azonos vizsgálatoknak vetünk alá és azonos eredményeket kapunk. A kromatográfiás azonosságot két eltérő polaritású kolonnán történő futtatás során kapott azonos retenciós idővel igazolhatjuk. Az anyagi minőség azonosságát legjobban nagy felbontású tömegspektrummal lehet igazolni, vagy kis felbontású tömegspektrum fragmentációs mintájával, illetve szelektív reakció nyomkövetéses technikával. Ezek mindegyike nagyon magas szintű szaktudást és speciális műszerezettséget igényel. A legnagyobb problémát a gyakorlatban a független standardok beszerezhetetlensége jelenti.

3.1 Mérési módszer kidolgozása

Amennyiben van információnk a meghatározandó vegyületek köréről, legelső sorban azt kell eldöntenünk, hogy milyen típusú kolonnán végezzük a vizsgálatot (könnyen lehet, hogy egyetlen kolonnával nem is tudjuk

megoldani a feladatot), majd ki kell választanunk a számításba vehető eluenseket. Ehhez nagyon nagy segítséget jelentenek a különböző kromatográfiás katalógusok, azokban ugyanis a legismertebb vegyület esetén gyakran minta módszereket és kromatogramokat is megadnak, amik segíthetnek a saját mérésünk beállításában. Ezután következik tiszta standardok felhasználásával a kromatográfiás körülmények beállítása és optimalizálása, a módszer teljesítményparamétereinek (kimutatási határértékek, szórások, linearitási tartományok) meghatározása, majd az egész dokumentálása.

3.2 Mintaelőkészítés

A gyakorlatban nem a mérési módszer megtalálása jelenti a legnagyobb problémát, hanem a vegyes forrásból származó minták pontos előkészítése a mérésekhez. Nagyon sok ismeretlen komponens szokott a mintákban lenni, amelyek kromatográfiás szempontból rendkívül változatosan viselkednek, sokszor zavarják a mérést, vagy nem is kromatografálhatók a rendszerünkön. Nagyon gyakori, hogy dúsítani kell a mintánkat a meghatározandó komponensre nézve, más esetekben valamilyen szelektív elválasztási módszerrel már előzetesen el kell csoportonként különíteni a komponenseket (pl. vér és vizelet mintából le kell csapatni a fehérjét).

A mintaelőkészítési eljárások legalapvetőbb szabálya az, hogy nem szabad veszíteni a meghatározandó komponensből. Ezt a gyakorlatban csak nagyon nagy gondosság mellett lehet teljesíteni. A mintaelőkészítési lépések ellenőrzése céljából pontosan ismert mennyiségű ún. kísérő standardot adunk az eredeti mintához. A kísérő standard oldékonysági és kromatográfiás szempontból nagyon hasonlóan kell hogy viselkedjen, mint a meghatározandó komponensünk. Együtt mennek végig a teljes előkészítési láncon, majd ismeretlenként kezelve ugyanúgy meghatározzuk a kísérő standard mennyiségét, mint a valódi ismeretlenünkét. A kísérő standard eredetileg bemért mennyiségét ismerjük, így a bemért és a visszamért értékből a mintafeldolgozás/dúsítás hatásfokát ki tudjuk számítani. Általában a szabványok nem fogadják el olyan mérést, aminél a kísérő standard visszanyerési hatásfoka kívül esik a 90-105% tartományon. Tömegspektrometriás detektálás esetén a meghatározandó komponens deuterált származékai a legkézenfekvőbb és legjobb kísérő standardok, de más detektort használva azok nem különböztethetők meg az eredeti

ismeretlentől. UV, RI, fluoreszcenciás, stb. detektoroknál az ismeretlentől elkülönülő kromatográfiás csúcsot adó vegyületet használunk, aminek a kiválasztása még a módszerbeállítás során történik és bizonyítani kell, hogy valóban teljesíti a szabvány által megkívánt visszanyerési hatásfokot.

3.3 Elúciós technikák

A folyadékkromatográfiában a minta komponenseinek elúcióját (a kolonnáról történő leoldását) alapvetően kétfajta módon végezhetjük el, ezek az izokratikus elúció és a gradiens elúció.

Az izokratikus elúció során az eluens összetétele állandó a teljes kromatográfiás eljárás során. Ez a létező legegyszerűbb technika, általában csak kromatográfiásan hasonló tulajdonságú komponensekből álló ismeretlenek mérésére használjuk. Amennyiben a mérési feladatunk megoldható izokratikus elúcióval, nincs okunk gradiens elúciót használni. Az izokratikus elúcióval kapott kromatogramokra az a jellemző, hogy a csúcsok viszonylag közel helyezkednek el egymáshoz képest, nincsenek nagy üres régiók a kromatogramban.

Amennyiben izokratikus elúciót alkalmazva a csúcsok csak a kromatogram elején következnek viszonylag közel egymáshoz, majd a csúcsok közötti távolságok és a retenciós idők is rohamosan nőnek (sok az üres tér), úgy szükség van a kromatogram rövidítésére úgy, hogy a felbontás ne romoljon, sőt lehetőség szerint nőjön. Ezt a gradiens elúció alkalmazásával valósíthatjuk meg. A gradiens elúció azt jelenti, hogy megkezdjük a futtatást egy adott összetételű eluenssel, majd a nagyobb elúciós erejű komponens koncentrációját fokozatosan növeljük a mozgó fázisban, így a távoli csúcsokat egyre gyorsabban mossuk le a kolonnáról. Végeredményül egy rövidebb, tömörebb kromatogramot kapunk, amelynek az eleje olyan, mint amit izokratikus elúcióval kapunk, a távoli csúcsok pedig időben is, és egymáshoz is közelebb kerülnek.

3.4 Minőségi azonosítás

Először a kromatográfiás paraméterek megfelelő változtatásával el kell érni, hogy lehetőleg minden komponens jól elváló, emellett lehetőleg ideális alakú csúcsként detektálható legyen. (Ehhez hozzátartozik az is, hogy meg kell találni a megfelelő detektálási módot, de erről még beszélünk a detektorok kapcsán.)

Az elsődleges minőségi azonosítás a retenciós idő alapján történik, ez azonban egyetlen kolonnán, egyetlen kromatográfiás módszerrel meghatározva nem bizonyítja a minőségi azonosságot. Ahhoz, hogy a retenciós idők alapján a komponensek azonosítását elfogadjuk az szükséges, hogy egy másik típusú (más polaritású) kolonnán, más kromatográfiás körülmények között is retenciós idő azonosságot találjunk a standarddal összehasonlítva. Ezt a másik kolonnát általában konfirmáló (megerősítő) kolonnának nevezzük.

Tömegspektrométer detektort használva a vegyület ujjlenyomatszerű primer tömegspektruma, illetve a különböző szelektív tömegspektrometriás technikákkal nyert származék ionjainak a megjelenése egyetlen kolonnán történő méréssel is bizonyítja a minőségi azonosságot.

3.5 Mennyiségi meghatározás

Külső standard módszer

A folyadékkromatográfiában nagyon gyakran használt, egyszerű és népszerű módszer. Használatát az teszi lehetővé, hogy a detektorok nagyon stabilis, jól reprodukálható, kis hibával terhelt jelet szolgáltatnak. Pontosan ismert koncentrációjú oldatsorozattal kalibrálva a a készülék abszolút koncentrációk mérését teszi lehetővé.

A modern kromatográfiás szoftverek minden nehézség nélkül kezelni tudják a nem lineáris jel–mennyiség kalibráló görbéket is.

Standard addíció

Ezt a módszert akkor használjuk, amikor összetett minták elemzése során felmerül a gyanúja annak, hogy a mintát alkotó egyéb anyagok (a mátrix) aktívan kölcsönhatásba lép a meghatározandó vegyületünkkel (pl. komplexet képez), aminek következtében nem a teljes mennyiségét, hanem annak csak egy hányadát detektáljuk.

Úgy járunk el, hogy a mintához a meghatározni kívánt komponensből ismert mennyiségeket adnak, és minden hozzáadás után elvégezzük a kromatográfias vizsgálatot. Az integrálértékeket ezután a hozzáadott standardmennyiség függvényében ábrázolva egy olyan egyenest kapunk, amely a függőleges tengelyt nem a nulla pontban, hanem egy attól nagyobb értéknél metszi. A nulla hozzáadott mennyiségre extrapolált koncentráció (azaz a meghatározni kívánt ismeretlen koncentráció) az egyenes tengelymetszetéből és a meredekségből kiszámítható.

Belső standard módszer

A vizsgálati mintákat nagyon gyakran extrahálni, szűrni, szárítani, bepárolni kell. Ezek során egyre töményebb (dúsított) oldatokat állítunk elő, amelyek térfogata azonban olyan kicsi, hogy nem tudjuk a dúsítási folyamat végén jelre tölteni, mert például csak 200-250 mikroliter van belőle. A végső térfogat bizonytalansága miatt a koncentrációt meghatározni nem sok értelme van. Ennek a bizonytalanságnak a kiküszöbölésére használjuk a belső standard módszert. Belső standard bármilyen anyag lehet, ami adott körülmények között jól kromatografálható. Közvetlenül a mérés előtt a mintánkhoz ismert mennyiségű (pl. 50 μg) belső standardot adunk, majd elvégezzük a vizsgálatot. Ilyen esetben nem a görbe alatti terület alapján, hanem az ismeretlenünk és a belső standardunk csúcsainak területaránya alapján végezzük a mennyiségi meghatározást. Természetesen ilyenkor a kalibrálást is a területarány alapján végezzük. A mérés során nem az ismeretlen komponens koncentrációját fogjuk megkapni, hanem a mintásüvegben lévő ismeretlen komponensek tömegét. A módszer nagyon jól használható minden dúsítási eljárás során, a végső térfogat ingadozása pedig azért nem zavaró, mert a belemért belső standardot végső soron ugyanígy érinti a hígulás, mint a meghatározandó komponenst, és a csúcsok területaránya ezért állandó.

4. MÉRÉSI FELADATOK

A gyakorlat célja a HPLC elméleti és gyakorlati alapjainak megismertetése szabadforgalmú gyógyszerek és élelmiszerek koffein és paracetamol tartalmának mennyiségi meghatározásával. A két vegyület tulajdonságai a táblázatban láthatók.

A gyakorlat különböző helyszíneken kerül megtartásra, a használt készülék típusa, felépítése, tulajdonságai változóak. A továbbiakban az egyik helyszínen használt készülék tulajdonságait adjuk meg, a többi helyszín sajátosságait a gyakorlatvezető ismerteti.

A gyakorlaton használt Jasco gyártmányú HPLC készülékkel részletesen a gyakorlaton ismerkedünk meg. Fő egységei:

ERC 3315 on-line eluens gázmentesítő

Jasco LG-980-02 kisnyomású gradiensképző egység

a gázmentesített oldószerek megfelelő arányú keverését végzi

Jasco PU-980 pumpa

Az oldószerezrel érintkező részek polírozott rozsdamentes acélból készültek.

A szokásos térfogati áramlási sebesség 0,5-2 ml/perc, a maximális nyomás 300–400 bar.

Jasco AS-1555 automata mintaváltó és injektor

Analitikai kolonna (C18-as fordított fázisú oszlop)

Jasco UV-975 scanning UV/VIS detektor (190-600 nm tartomány)

CromPass számítógépes vezérlő/kiértékelő program

A detektorból kifolyó oldat a többi hulladékkal együtt közös gyűjtőedénybe kerül. A gyakorlat során a hulladék oldószereket nem öntjük a lefolyóba, hanem a fülke alatt található hulladékgyűjtő üvegekbe öntjük. Az edények elmosásakor nem alkalmazunk acetont az edények kiszárítására, mert a legkisebb maradék is óriási csúcsot ad az UV-spektrumban, helyette indokolt esetben metanolt vagy etanolt használunk.

3. táblázat A gyakorlaton használt hatóanyagok tulajdonságainak rövid ismertetése.

Név, képlet	Leírás
Koffein	Gyógyszerkönyve neve: Coffeinum. Mindenki által ismert, élénkítő hatású alkaloid. Ájulás, alacsony vérnyomás, testi és szellemi fáradtság érzése ellen, valamint más gyógyszerekkel kombinálva használatos. Gyógyszerként használva egyszeri adagja 50-300 mg, napi adagja 150-600 mg lehet. Mellékhatásként émelygés, heves szívdobogás, arra érzékenyeknél ritmuszavar, hasmenés, fokozott vizeleti inger jelentkezhet. A kávé és tea jelentős mennyiségben tartalmaz koffeint, de megtalálható számos üdítőitalban, valamint gyógyszerben is. UV maximum: 270 nm (220 nm), minimum: 245 nm
Paracetamol, más néven: acetaminofen.	Szintetikus egyszerűen előállítható. Régóta használják az orvosi gyakorlatban láz és kisebb fájdalmak csillapítására. Szabadforgalmú gyógyszer, de számos (esetenkén súlyos) mellékhatása van. Az előírt adagot soha nem szabad túllépni. UV maximum: 245 nm

A gyakorlaton elvégzendő feladatok

A kiadott eszközök átvétele, szükség esetén mosogatás.

A készülék bemutatása, a szoftver ismertetése.

A rendelkezésre álló törzsoldatokból a kalibráló oldatok elkészítése hígítással (szükség esetén törzsoldat készítése).

Mérőoldat készítése az ismeretlenből.

A készülék kalibrálása, az ismeretlenben a paracetamol és/vagy koffein tartalom meghatározása.

Az eredmények nyomtatása, jegyzőkönyvkészítés, mosogatás, eszközök leadása.

ZH, referálás, a jegyzőkönyv bemutatása, a gyakorlat értékelése.

A gyakorlatra kiadott törzsoldatok koncentrációit, az esetleg szükséges hígítások mértékeit a mérések megkezdése előtt a helyszínen adjuk meg.

Amennyiben a gyakorlaton más utasítást nem kapunk, a következők szerint kell eljárni az oldatkészítések során.

A hígításokat a mérésorozat megkezdése előtt kell elvégezni, a jó időbeosztás nagyon fontos. A mérés során a törzsoldatból történő hígításokat a kis térfogatokra tekintettel nem mérőlombikban, hanem állítható térfogatú digitális pipetták segítségével, 2 cm³-es mintásüvegekben, egyszerű összeméréssel végezzük. A hatóanyagok vízben vannak feloldva, a szükséges hígításokat is vízzel végezzük.

Kalibráló oldatsor készítése

Koffeinre illetve paracetamolra nézve 1000 µg/ml-es illetve 100 µg/ml-es oldatok vannak készen (µg/ml=ppm). Ezekből kell a következő táblázatnak megfelelően összemérni a mérőoldatokat.

Kalibráció szintje	Összemérésre kerülő oldatok (microliter)				Oldószer Víz	Koncentráció a mérőoldatokban (microg/ml)	
	Koffein 1000	Koffein 100	Paracet. 1000	Paracet. 100		Koffein	Paracetamol
Level 1	0	50	0	50	900	5	5
Level 2	0	100	0	100	800	10	10
Level 3	0	250	0	250	500	25	25
Level 4	0	500	0	500	0	50	50
Level 5	100	0	100	0	800	100	100

A kalibrálást öt különböző koncentrációnál végezzük, a vezérlő program ezeket nevezi Level 1Level 5-nek. Célszerű a kalibrációt mindig a leghígabb oldattal kezdeni és haladni az egyre töményebbek felé, hogy a minták közötti esetleges keresztzennyeződés hatását minimalizáljuk. (A keresztzennyeződés akkor következik be, ha a mintavevő túból és a vezetékéből nem sikerül teljesen kimosni az előző oldatot. Még teljesen automata rendszereknél is számolni kell a keresztzennyezéssel, ezért két mérés között minél többször ki kell mosatni a tüt.)

Ismeretlenek készítése

Lehetséges ismeretlenek: szabadforgalmú gyógyszerek, vagy élelmiszerek, amelyek valamelyik vagy mindkét standardot tartalmazzák. Az alábbi eljárások megfelelnek a gyakorlat céljainak, de finomítást igényelnek abban az esetben, ha nagy mennyiségű minta elemzését kellene elvégezni.

Tea

Egy tea filtert 200 ml forró vízben kiáztatunk, a kapott oldatot lehűtjük, majd 0,47 mikronos szűrőn átszűrjük. A tiszta oldatból 700-1500 mikrolitert HPLC-s mintaedénybe mérünk.

Kávé

0,47 mikronos szűrést követő négyszeres hígítás után közvetlenül is mérhető.

Presszókávéból vagy hosszúkávéból 1,00 ml-t bemérünk egy 4 ml-es mintásüvegbe és 3,00 ml vizet adunk hozzá. Az oldatot rázással homogenizáljuk, majd HPLC-s mintásüvegbe 1,50 ml-t bemérünk.

(Vigyázzanak arra, hogy a kávéban nem legyen se tejpor, se tejszín, mert annak zsírtartalma nagyon gyorsan tönkreteszi a kolonnát! Amennyiben sorozatmérést szeretnénk csinálni, gondoskodni kell egy megfelelő clean-up műveletről, ugyanis a kávébabnak saját magának is van jelentős olajtartalma.)

Gyógyszer 1

Az elporított tablettából analitikai mérlegen *pontosan* kimérünk kb. 12-13 mg-ot egy félmikro kémcsőben, majd a kémcső tartalmát kb. 20-40 ml vízzel egy 100 ml-es mérőlombikba mossuk. Az oldatot kb. 5 percig rázogatójuk, majd a lombikot jelre töltjük és az oldatot többszöri átfordítással homogenizáljuk. Több centrifugacsőbe bemérünk 1,50-1,50 ml oldatot és 5 percig centrifugáljuk. A felülúszó tiszta oldatok összegyűjtjük, majd 0,47 mikronos szűrőn átszűrjük. A szűrt oldatot HPLC-s edénybe bemérjük.

Gyógyszer 2

Az elporított tablettából kb. 15 mg-ot analitikai mérlegen pontosan lemérünk, majd 250 ml-es mérőlombikba mossuk és az előző pontban leírtak szerint mintát készítünk belőle.

Cola

Négyszeres hígítás után közvetlenül mérhető.

A Colából kiöntünk egy kémcsőbe néhány ml-t, majd rázogatóással és enyhe melegítéssel kihajtjuk belőle a szén-dioxidot. A már nem buborékoló oldatból 1,00 ml-t bemérünk egy 4 ml-es mintásüvegbe és 3,00 ml vizet adunk hozzá. Az oldatot homogenizáljuk, majd HPLC-s mintásüvegbe visszük.

Energiaital

Tízszeres hígítás után közvetlenül mérhető. A Colánál leírtak szerint buborékmentesítjük az energiaitalt, majd 250 mikrolitert bemérünk egy 4 ml-es mintásüvegbe és 2250 mikroliter vizet adunk hozzá. Az oldatot homogenizáljuk, majd mintásüvegbe visszük.

A mérendő oldatokat a következő sorszámú helyekre kell a mintatartó tálcába helyezni: (Ez csak a Jasco készülékre vonatkozik, más készülék esetén a gyakorlatvezető határozza meg a minták helyét.)

1. oldáshoz használt víz (vak minta)
2. Level 1 kalibráló
3. Level 2 kalibráló
4. Level 3 kalibráló
5. Level 4 kalibráló
6. Level 5 kalibráló
7. Ismeretlen

Mérési paraméterek

A gyakorlaton használt mérési paraméterek a gyakorlat.METH illetve a Paracetamol-Koffein.METH fájlban vannak tárolva. (Jasco)

A méréshez előre elkészített mérési szekvenciát használunk, a minták injektálását az autosamplerben lévő automata injektor végzi.

A gyakorlaton a detektálást 240 nm-en, vagy egymás után 245 és 270 nm-en végezzük. A vizsgálatok során 0,8 cm³/min térfogati áramlási sebességet használunk. Az összes futtatást 40-60 metanol-víz eleggyel végezzük, amelyet tiszta oldószerekből a gradiensképző egység segítségével állítunk elő. Az effektív műszeres mérési idő minden minta esetében 5 perc.

Szoftver

A modern kromatográfias szoftvereknek nemcsak a készülék vezérlését és az eredmények kiszámítását kell biztosítaniuk, hanem azt is, hogy minden felhasználó csak a saját illetékességi körébe tartozó adatokhoz és beállításokhoz férjen hozzá, csak a rá tartozó paramétereket változtathassa meg, a nyers mérési adatokat pedig senki ne tudja módosítani (még a rendszergazda sem!). Ennek a sokféle kívánalomnak elsősorban

minőségellenőrzési és jogi okai vannak, hiszen például egy gyógyszer jóságának bizonyításra nem lehet felhasználni egy olyan kromatogramot, amibe bárki egy egyszerű szövegszerkesztővel bele tud piszkálni. Hogy ezt elkerüljék, minden mérési fájl titkosított formában kerül tárolásra. A feladatok is megkívánják, hogy az ugyanazon a készüléken, de különböző projekteken dolgozó csoportok adatai, mérési módszerei elkülönüljenek egymástól. Mivel az összes kívánalmat kielégítő szoftverek meglehetősen összetettek tudnak lenni, itt most nem foglalkozunk a program felépítésével, hanem a Jasco készülék ChromPass programjának felhasználói szintű ismertetése a gyakorlaton történik. Az angol nyelv alapjainak ismerete feltétlenül szükséges a program kezeléséhez.

(Más készülékeken más szoftvert használnak, azokat a gyakorlatvezető ismerteti.)

A mérési adatokat futtatásonként külön-külön fájlban tároljuk. A készülék automatikusan elvégzi a minták futtatását, a kalibrálást, majd kiértékeli az ismeretlen. Csak az ismeretlenről készített jelentést nyomtatjuk ki, azt be kell ragasztani a jegyzőkönyvbe.

Az elvégzett hígítási feladatok pontossága határozza meg a kalibráló egyenes pontosságát, illetve az ismeretlenre kapott eredményeket. A kalibrálás jóságát a gyakorlatvezető ellenőrzi. A referálás vagy ZH eredménye mellett a kalibráló egyenes R^2 értéke (0–1 közötti érték, minél közelebb van az 1-hez, annál jobb), illetve az ismeretlenekre meghatározott koncentráció érték alkotják a gyakorlatra kapott jegy fő részét.

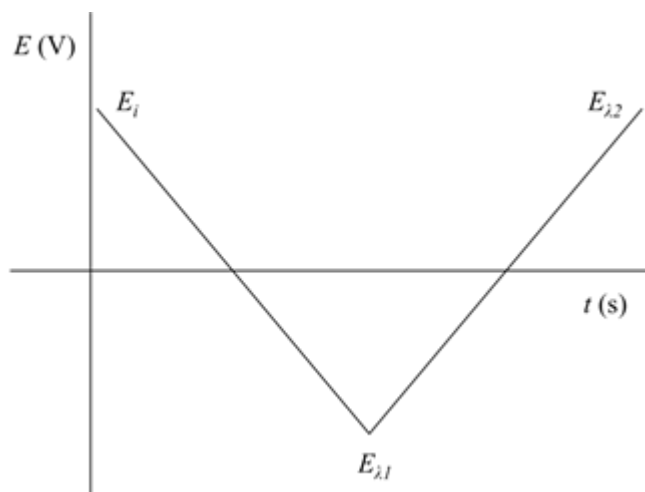
AJÁNLOTT IRODALMAK

- 1) Elválasztástechnika, Tankönyvkiadó, Budapest, 1985., 144-162. oldal
- 2) Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs: Modern folyadékromatográfia, KromKorm Kft., Budapest, 2017, ISBN 978-963-12-8171-2

CIKLIKUS VOLTAMMETRIA

1. A MÓDSZER LEÍRÁSA

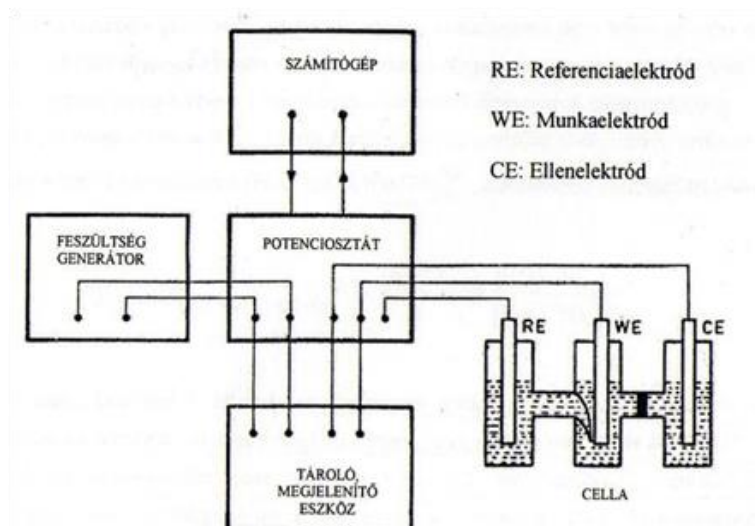
A ciklikus voltammetria is egy feszültség szabályozással működő módszer, stabil referenciaelektrod-rendszert használva a potenciál értéke a mérő- és a referenciaelektrod között a kívánt módon változtatható. Az átfolyó áramot a munka- és az ellenelektrod között mérik. A ciklikus voltammetriás mérésnél a vizsgálandó oldatba merülő megfelelő munkaelektrod potenciálját egy kezdő értékről (E_i) lineárisan változtatjuk a forduló potenciálnak ($E_{\lambda 1}$) nevezett értékig, ahol a potenciálváltozás előjele megfordul és szintén lineárisan halad a második forduló potenciál ($E_{\lambda 2}$), amely általában E_i -vel egyenlő. Ebben a pontban a ciklus véget ér, ha szükséges, megszakítás nélkül újat kezdhetünk (lásd 1. ábrát).



1. ábra: A ciklikus voltammetriánál használt potenciál jelalak, E az alkalmazott potenciál, t az idő

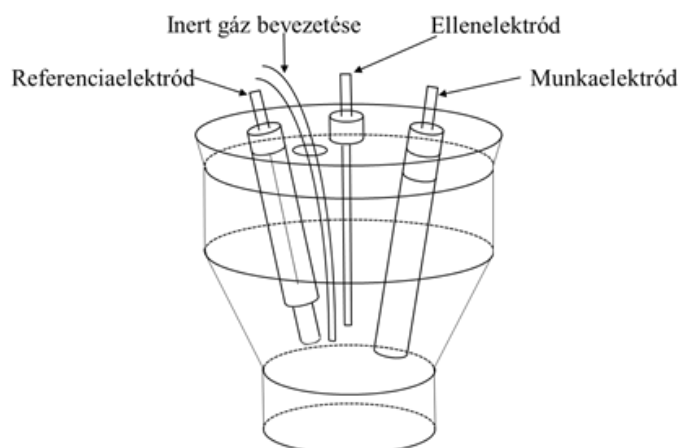
A felfutási periódusok hosszát a felfutási sebesség határozza meg. A mérés folyamán a cellán átfolyó áramot mérjük és ábrázoljuk azt az alkalmazott

feszültség függvényében. Az így kapott görbét ciklikus voltammogrammnak nevezzük. A mérés a következő kísérleti összeállítással valósítható meg.



2. ábra: Kísérleti összeállítás ciklikus voltammetriához

A részegységek lehetnek egy készülékben, de moduláris felépítés is lehetséges. A mérőcella kialakítására több lehetőség van. Mindenképp szükséges azonban a három elektród stabil befogatása és inert- vagy más gáz be- és kivezetésére szolgáló nyílás. A 3. ábrán látható cella előnye, hogy a vizsgálandó oldattal megtöltve, ha elég nagy koncentrációjú alapelektrolitot alkalmazunk, kicsi lesz az ellenállás, így az ohmikus potenciálesés is.



3. ábra: Hagyományos elektrokémiai cella

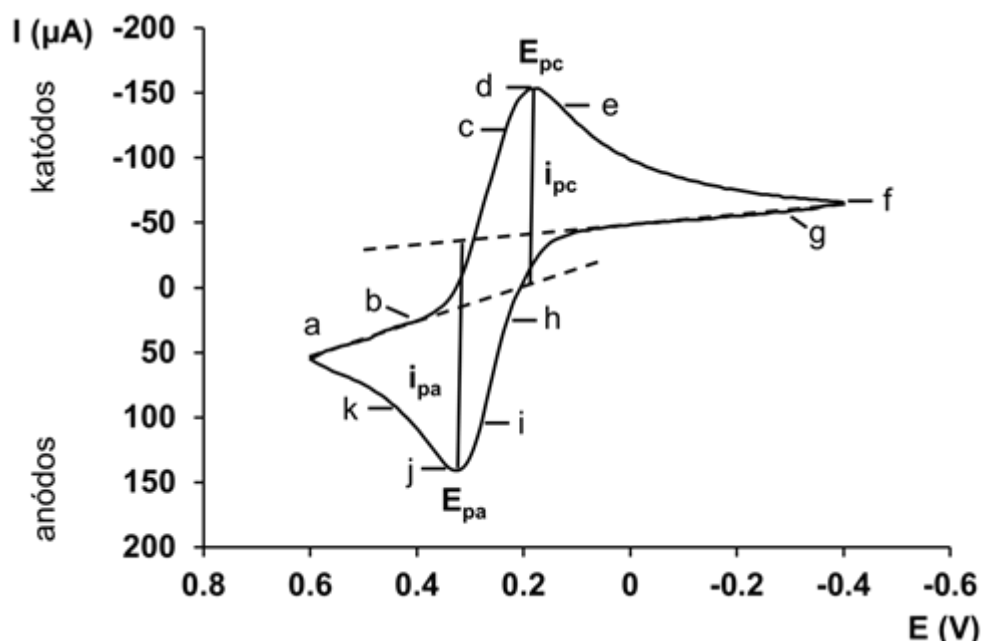
A munkaelektrod minőségét teljes mértékben a vizsgálandó anyag szabja meg. Az ellenelektrod általában platina. A referenciának kalomel vagy Ag/AgCl-elektrodot célszerű használni.

Oldószer	Mérőelektrod	Mérési tartomány (V)	Ionerősség
Víz	Pt	1,00-(-0,200)	1 M HClO ₄
	Pt	0,400-(-1,00)	1 M NaOH
	C	1,10-(-0,900)	1 M HClO ₄
	C	0,900-(-1,50)	1 M NaOH
	Hg	0,450-(-1,00)	1 M HClO ₄
	Hg	0,00-(-2,85)	1 M NaOH
Acetonitril	Pt	1,75-(-1,90)	TEAP
	Hg	0,450-(-2,80)	TEAP
Propilén-karbonát	Pt	1,45-(-2,00)	TEAP
	Hg	0,350-(-2,45)	TEAP
Dimetil-formamid	Pt	1,50-(-2,00)	TEAP
	Hg	0,400-(-3,00)	TEAP
Dimetil-szulfoxid	Pt	1,45-(-2,00)	TEAP
	Hg	0,800-(-2,80)	TEAP
Referencia elektrod: telített kalomel elektrod			
TEAP = tetraetilammónium-perklorát			

4. ábra: A különféle mérőelektrodok használhatósági tartománya

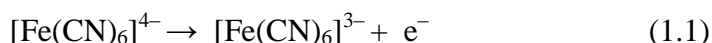
2. A MÉRÉSKOR LEJÁTSZÓDÓ FOLYAMATOK

A jelenségek megértéséhez vizsgáljunk meg egy tipikus ciklikus voltammogramot, mely az 5. ábrán látható.



5. ábra: 20 mM-os $K_3[Fe(CN)_6]$ ciklikus voltammogramja 1 M-os KNO_3 -ban. A felfutási sebesség 100 mV/s, a referenciaelektrod telített Ag/AgCl elektrod, a munkaelektrod $2,54 \text{ mm}^2$ felületű platina

Az E_i kezdőfeszültséget 0,6 V-nak választották (a), hogy elkerüljék a $K_3[Fe(CN)_6]$ elektrolízisét, amikor bekapcsolják az elektródot a ciklus indítása előtt. A potenciál változása először negatív, mikor elegendően negatív lesz ahhoz, hogy redukálja a $[Fe(CN)_6]^{3-}$ iont, katódos áram jelenik meg. Mivel az oldatot nem kevertetjük, az elektród felületén a $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ionok fokozatosan $[Fe(CN)_6]^{4-}$ ionokká alakulnak. Ahogy a $[Fe(CN)_6]^{3-}$ koncentrációja csökken, a felületen a katódos áram csúcsot ér el (c-d), majd csökken (d-e). Az f pontnál a feszültség változás előjelet vált, de a potenciál továbbra is elég negatív, a redukcióhoz tehát az áram továbbra is katódos. Mikor a potenciál elég pozitív lesz, hogy a

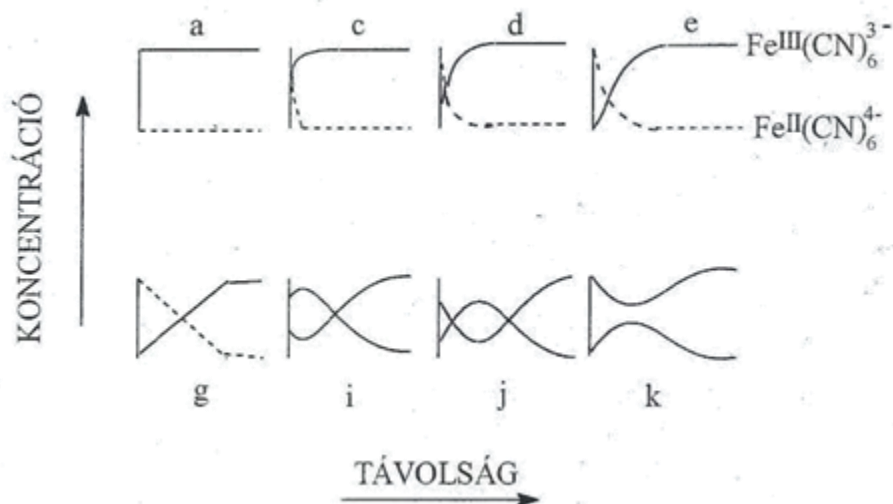


folyamat végbemenjen, az áram előjele megváltozik. Az anódos áram gyorsan növekszik, majd maximumot ér el. Mikor a felületén kezd a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ koncentrációja csökkenni, az áram is csökken (i, j, k szakasz). Összefoglalva, az első fél ciklusban elektrokémiai redukcióval keletkezett $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a második ciklusban visszaoxidálódik $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -dá. Tehát a ciklikus voltammetria képes gyorsan előállítani új oxidációs állapotot és tudja vizsgálni ennek a sorsát a második fél ciklus alatt. A folyamat az előbbieken vázolt módon megy végbe, de egzaktul is leírható a Nernst-egyenlet és a koncentrációviszonyok vizsgálatával.

Az alkalmazott potenciál úgy tudja kielégíteni a reverzibilis rendszerekre érvényes

$$E = E^0(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}) + \frac{0,059}{n} \log \frac{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}}{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}} \quad (1.2)$$

Nernst-egyenletet, ha a felületén a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ arány mindig megfelelően változik. A ciklus kezdetén az alkalmazott E -potenciál sokkal pozitívabb az E^0 -nél, amely a formál redukciós potenciál. Az n az ionként átlépett elektronok száma (itt $n = 1$). Ez esetben főleg $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ionoknak kell jelen lenni, tehát nincs elektronátmenet, így az áram közel nulla. Mikor az E negatív irányb változik, az egyenlőség fenntartásához $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -nak $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -dá kell alakulnia. A logaritmikus összefüggés miatt az áram meredeken emelkedik. Ha az alkalmazott potenciál negatívabb lesz a formál elektród potenciálnál, a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentrációjának gyakorlatilag nullának kell lennie a felületen. Ez a diffúzió miatt nem valósul meg. Továbbra is folyik áram a felülethez vándorolt $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ionok redukciójából kifolyólag. A fordított potenciálfelfutás analóg módon értelmezhető áramot produkál. Érdeemes megvizsgálni még a koncentráció-profilokat. Ezek a görbék a két ion koncentrációját tüntetik fel az elektródfelületről mért távolság függvényében (6. ábra).



6. ábra: A távolság és a koncentráció függése ciklikus voltammetriánál reverzibilis rendszerre.

Ismert az összefüggés, hogy:

$$i = nFAD \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x_0} \quad (1.3)$$

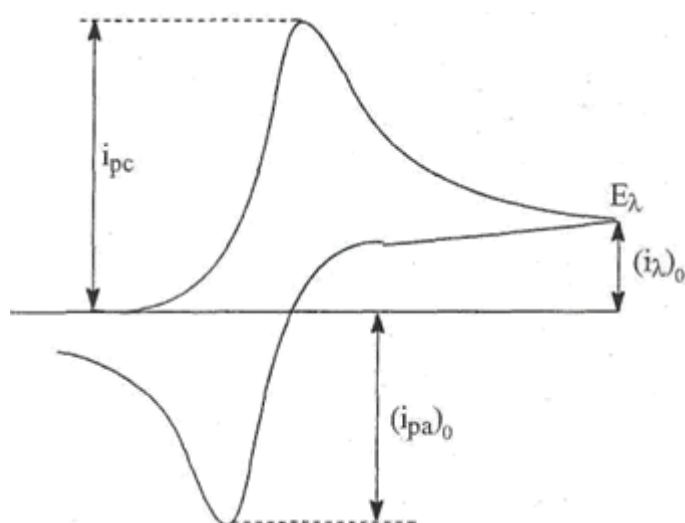
vagyis az áram (I) egyenesen arányos a koncentráció (c) - távolság (x) profil meredekségével a felületnél. (n az iononként átlépő elektronok száma, A a felület, D a diffúziós koefficiens, F a Faraday-féle szám.)

Megfigyelve az 5. és 6. ábrát, látható a koncentráció-profil és potenciál-áram görbe szakaszai közötti összefüggés.

3. A GÖRBÉK ÉRTÉKELÉSE ÉS INFORMÁCIÓTARTALMA

Az 5. ábrán feltüntettük a görbe jellemző adatait. Ezek a következők: i_a az anódos áram maximuma, másnéven az anódos csúcsáram, E_{pa} az anódos csúcs potenciálja, E_{pc} a katódos csúcs potenciálja. Ezek közül problémát egyedül a visszafelé irányuló potenciálváltozáshoz tartozó csúcsáram (jobb esetben ez az anódos) nagyságának meghatározása jelenthet. Ennek ugyanis nem közvetlenül látható az alapvonala. Az 5. ábrán vázolt

módszer a leginkább használatos, miszerint a g szakaszhoz egyenest illesztünk és erre vetítjük le a csúcst. Javasolt módszer még, hogy a fordulópotenciálnál állítsuk meg a feszültséggenerátort, amíg az áram nem stabilizálódik, így vízszintes szakasszal kezdődik a visszatérő szakasz is. Ez esetben azonban megváltozik a koncentráció a felületen, és különféle reakciók is lejátszódhatnak ez idő alatt. Egy harmadik módszer számításon alapul és az 7. ábrán látható értékeket veszi figyelembe.



7.ábra: Az 1.4. egyenletben felhasznált mennyiségek leolvasása a voltammogramról

Eszerint

$$i_{pa} = (i_{pa})_0 + 0,485 \cdot (I_\lambda)_0 + 0,086\lambda \cdot i_{pc} \quad (1.4)$$

Írjuk fel a Nernst-egyenletet a csúcsokhoz tartozó potenciálokra. A pontos koncentrációkat nem ismerjük, így legyen $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} = x$ és $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} = y$. Ekkor

$$E_{pc} = E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{x}{y} \quad (1.5)$$

Adjuk össze az (1.5.) és (1.6.) egyenleteket:

$$E_{pa} + E_{pc} = 2E^0 + \frac{0,059}{n} \left(\log \frac{x}{y} + \log \frac{y}{x} \right) \quad (1.7)$$

$$E^0 = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (1.8)$$

Abban az esetben lesz $E^0 = E_{1/2}$, ha normál hidrogén elektród (NHE) mellett dolgozunk, ez általában nem kivitelezhető, így az 1.8 egyenlet szerint alapvetően a féllépcső potenciál értéke ($E_{1/2}$) lesz egyenlő a két csúcshoz tartozó potenciál számtani közepével. A formál potenciál értékét (E^0) a féllépcső potenciálból kapjuk meg úgy, hogy a referencia elektród standard elektród potenciáljával korrigáljuk azt, így egy NHE-re vonatkoztatott potenciált kapunk. Bebizonyítható továbbá, hogy

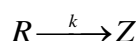
$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,59}{n} \quad (1.9)$$

Vagyis a csúcsok távolsága függvénye a folyamatban átlépő elektronok számának. Egy egyelektronos folyamatban 59 mV a távolság. A csúcspotenciálok mellett információértékű a katódos és anódos csúcsáram aránya is. Amennyiben egy folyamat reverzibilis, a két csúcs aránya egy. Ha a pásztázási sebesség négyzetgyökének függvényében ábrázoljuk a katódos csúcsáramok abszolút értékét és arra egy egyenes illeszthető, akkor az megerősíti, hogy a folyamat reverzibilis. Hangsúlyozni kell, hogy a Nernst-egyenlet csak termodinamikailag reverzibilis folyamatokra érvényes, tehát ha ismerjük az átlépő elektronok számát és a csúcsok távolsága nagyobb az (1.9.) egyenlethez adódónál, az valamilyen irreverzibilitásra utal. Ez azonban nem csak termodinamikai lehet. Okozhatja az is, hogy az elektronátlépés a felületen lassú, így felborulnak a koncentrációviszonyok a felületen. Ez a tény lehetőséget ad az elektronátlépés kinetikájának tanulmányozására, a felfutási sebesség változtatásával. Elég lassú változtatásnál ugyanis közelíteni kell a két csúcshoz az (1.9.) egyenlet által megszabott értékhez. Sajnos a felfutás nem lassítható a végtelenségig, mivel a diffúzió, és a rázkódás miatti keveredés megváltoztatja a felületi koncentrációt.

Az áramcsúcsok magassága arányban van a reaktáns teljes koncentrációjával, de más módszerek (akár elektrokémiaiak is) jobban használhatók ilyen jellegű meghatározásra.

A ciklikus voltammetriás technika fő erőssége, hogy képes vizsgálni az elektrontranszfer után, csatoltan lejátszódó kémiai reakciókat, és azok

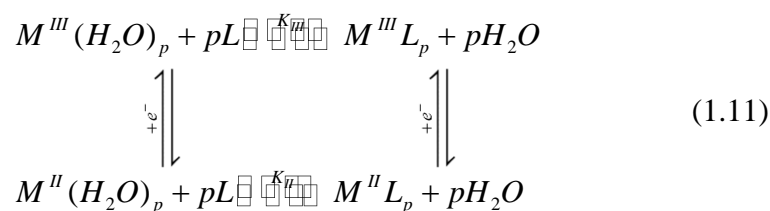
kinetikáját. Erre lehetőséget az anódos és katódos áramcsúcsok magasságviszonyának elemzése ad. Példaképpen vegyük az alábbi egyszerű csatolt reakciót:



Könnyen átlátható, hogy ha a felfutás lassabb az irreverzibilis kémiai reakciónál amelyben Z keletkezik, akkor az R anyag egy része átalakul mielőtt visszaoxidálódhatna, tehát az anódos áram kisebb lesz a katódosnál.

4. A MÓDSZER LEHETSÉGES FELHASZNÁLÁSI TERÜLETEI

A ciklikus voltammetria széles körben használható viszonylag egyszerű és olcsó elektrokémiai módszer. Gyorsan nyerhetők vele mennyiségi és minőségi információk az elektronátmenettel járó folyamatokról. Mint láttuk jó közelítéssel lehet meghatározni formál redukciós potenciálokat. Ennek további jelentősége van, mivel lehetőséget teremt komplex ionok képződési állandóinak meghatározására, ahol E_0 közvetlen potenciometrikus meghatározása a bomlékonyság miatt nem lehetséges. Vegyük pl. a következő egyensúlyt:



Ekkor:

$$E^0(M^{III}L_p / M^{II}L_p) = E^0(M^{III}(H_2O)_p / M^{II}(H_2O)_p) + \frac{RT}{nF} \ln(K_{II} / K_{III}) \quad (1.12)$$

Tehát K_{II} illetve K_{III} a másik ismeretében kiszámolható. Ha megvizsgáljuk a csúcsok távolságainak függését a felfutási sebességtől az elektronátlépési reakció sebességére következtethetünk.

5. ELVÉGZENDŐ FELADAT

1. Koncentráció meghatározás

A mérendő oldat $K_3[Fe(CN)_6]$ oldata, melynek meghatározásához kalibrációs egyenes felvétele szükséges.

- Ehhez kalibráló oldatsort kell készíteni, amely $K_3[Fe(CN)_6]$ -ra nézve 0,006 M, 0,01 M és 0,02 M. A törzsoldatokban lennie kell ionerősségnek is, amely KNO_3 , ez minden egyes mintára 0,5-1,0 M koncentráció-tartományban legyen (ezt a gyakorlatvezető határozza meg). Az oldatok térfogata 25 ml.

- Ciklikus voltammogramok rögzítése 600(-400) mV feszültség tartományban történik, 50, 100 és 200 mV/s sebességgel és 140 μA határáram mellett.

- Kalibráló egyenes : a pontos koncentráció függvényében ábrázolt $|ipc|$ érték.

Előre elvégzendő feladat:

- Számítsd ki a beméréshez szükséges mennyiségeket!

- A lentebbi táblázat előkészítése adatrögzítéshez és a további számításokhoz!

Fájl neve	Komplex koncentráció (M)	Pásztázási sebesség (mV/s)	E_{pc} (V)	i_{pc} (μA)	E_{pa} (V)	i_{pa} (μA)	$E_{1/2}$ (V)	E^0 (V)

2. $K_4Fe(CN)_6$ $\log\beta_6$ értékének kiszámítása az (1.12) egyenlet alapján

A kapott eredmények (formál potenciál) alapján, a $[Fe(CN)_6]^{3-}$ $\log\beta_6$ érték ismeretében a $[Fe(CN)_6]^{4-}$ $\log\beta_6$ értékének kiszámítása.

3. Reverzibilitás vizsgálata

A reverzibilitás négy kritériumának vizsgálata a tanulmányozott rendszeren. A gyakorlatvezető útmutatása szerint elvégzendő feladat!



A gyakorlaton bemutatott és használt EC Epsilon ECLipse ciklikus voltammetriás rendszer a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával került beszerzésre.

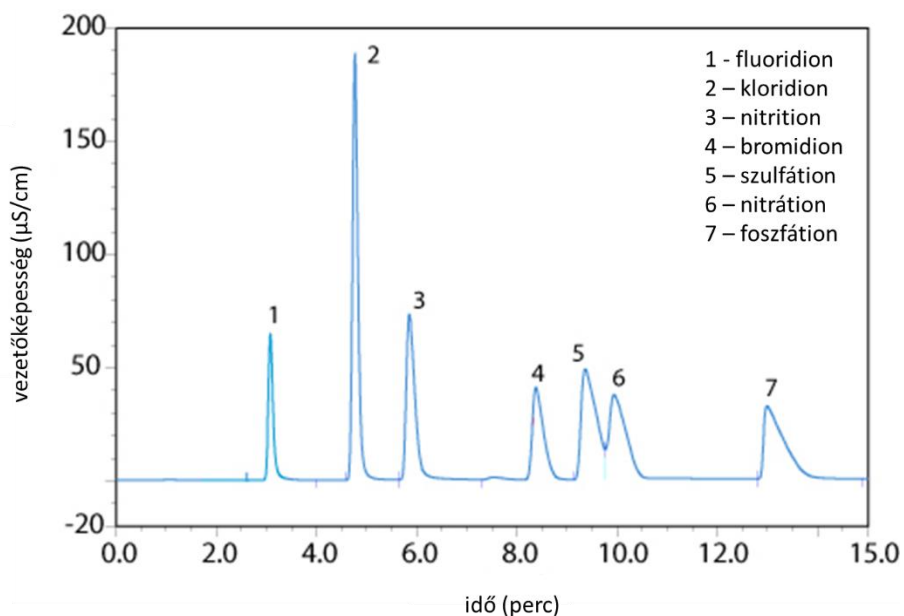
IONKROMATOGRÁFIA

A gyakorlaton bemutatott és használt Dionex ICS-5000+ típusú kétcsatornás ionkromatográf a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával került beszerzésre.

1. BEVEZETŐ

Az ionkromatográfia 1975-től tartozik a folyadékkromatográfias módszerek családjába, mivel mind elvét, mind technikai megvalósítását tekintve hasonló analitikai módszer. A korábban ismert folyadékkromatográfias módszerek nem tették lehetővé kis koncentrációjú ionos komponensek kvantitatív analízisét. Az ionkromatográfia olyan nagyhatékonyságú analitikai módszer, ami az álló- és mozgófázis közötti ioncsere-egyensúly alapján választja el az ionokat. Azt, hogy mennyire fontos nagy pontossággal meghatározni anionokat/kationokat, egy példával szemléltetem: a fluoridion többek között fogkrémekben, ásványvizekben is előfordul, vagyis az élő szervezetbe kerülhet viszonylag könnyen. A fluoridion 0,7 – 1,5 mg/l koncentrációtartományban csont és fogzománc erősítő hatású, azonban 1,5 mg/l feletti koncentrációban csont és fogzománc problémát okoz.

Egy tipikus kromatogramot mutat az 1. ábra, amin vezetőképesség az idő függvényében van ábrázolva.

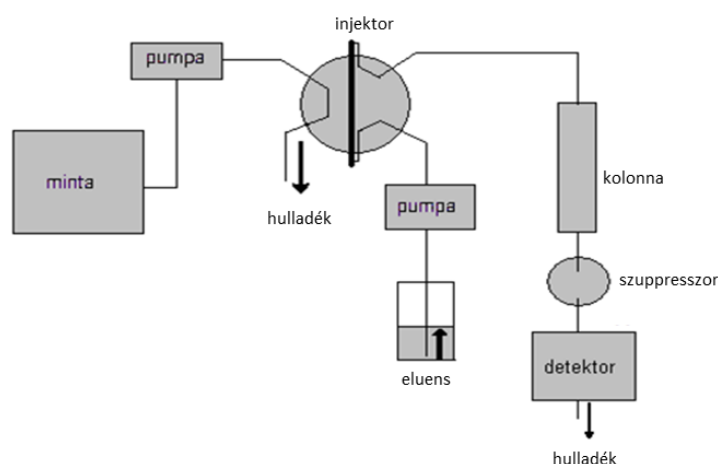


1. ábra: Egy tipikus anionkromatográfiás kromatogram

A jegyzet keretein belül nem térünk ki külön a kromatográfiás alapismeretekre, mivel azok számos előző kurzuson részletekbe menően előkerülnek. Ajánlom ezen ismeretek felfrissítésére Lázár István *Nagynyomású folyadékkromatográfia* jegyzetét (<http://inorg.unideb.hu/download/kurzusok/public/7/hplc%20gyakorlat.pdf>) és Krusper László *A folyadékkromatográfia alapjai, gyógyszeripari alkalmazások* című kurzusának látogatását.

2. AZ IONKROMATOGRÁF FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSE

Az ionkromatográf felépítése alapjaiban megegyezik a HPLC készülékével (2. ábra). Lényeges különbség főként az elválasztás mechanizmusában, az állófázis tulajdonságaiban és a detektálás módjában van.



2. ábra: Az ionkromatográf általános felépítése

A mintákat egy automata mintaadagolóba helyezük, ahonnan egy pulzálás mentesítővel ellátott pumpa kis mennyiségű (10-100 μ l) mintaoldatot juttat a mintahurokba. Injektáláskor a bemérőcsap elfordul és a mintadugó az eluens-áramba kerül. A minta az eluensben áramlik, így a kolonnára jut, ahol a minta ionos komponensei különböző erősségű kölcsönhatást alakítanak ki az álló fázis funkciós csoportjaival. Vannak olyan ionok, amik viszonylag gyengén kötődnek az oszlophoz, vagyis ezek az ionok hamar eluálódnak, hamarabb jutnak a detektorba, azaz a kromatogramon kis retenciós időnél jelenik meg a mért jel. Vannak azonban olyan ionok is, amik erős kölcsönhatást alakítanak ki a kolonnával, így hosszabb idő elteltével eluálódnak és a kromatogramon nagyobb retenciós idővel jelentkeznek a rájuk jellemző csúcs. Az elválasztott ionok ezt követően a detektorba jutnak, ami leggyakrabban vezetőképességi detektor.

3. AZ IONKROMATOGRÁFIA TÍPUSAI

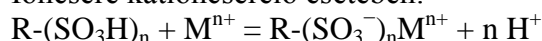
Ionkromatográfia alatt azon módszerek összességét értjük, amelyekkel anionokat, kationokat, hidrophil savakat és bázisokat választunk el.

A *retenció mechanizmusa alapján* három különböző ionkromatográfias módszerről beszélhetünk, amelyek a következők:

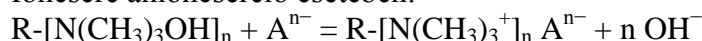
3.1 Ioncsere kromatográfia (ion-exchange chromatography)

Az ioncsere kromatográfia az egyik legrégebben ismert elválasztási mechanizmuson alapul. Az álló fázis ioncserélő csoportokkal módosított sztírol-divinil-benzol kopolimer vagy szilikagél, ami anionok elválasztására kvaterner ammónium csoportokat, míg kationok elválasztására szulfons csoportokat tartalmaz. Ez a módszer erős savak, bázisok, illetve szerves ionok, vagyis állandó töltéssel rendelkező vegyületek elválasztására alkalmas. Az elválasztás alapja az, hogy az egyes ionok és az állófázison elhelyezkedő ellentétes töltésű funkcionális csoportok között kölcsönhatás alakul ki, például kationcserélő oszlop esetében az állófázis felületén lévő funkcionális csoportok ($R-SO_3^-$) elektrosztatikus kölcsönhatás révén megkötik a minta ellentétes töltésű kationjait, majd az elúció során a mozgófázis protonjai leszorítják az állófázisról a megkötött kationokat. Az elválasztás befolyásolható az ioncserélő anyagi minőségének illetve az eluens pH-jának a változtatásával.

Ioncsere kationcserélő esetében:



Ioncsere anioncserélő esetében:



3.2 Ionkizárásos kromatográfia (*ion-exclusion chromatography*)

A módszer alkalmazásához az állófázis sztírol-divinil-benzol alapú, nagykapacitású, erős anion- vagy kationcserélő. Az ioncsere kromatográfiával ellentétben ezen módszer esetében az anionok elválasztására kation-, míg a kationok szeparálására anioncserélő töltetet alkalmaznak. Az állófázis töltésével azonos töltésű komponensek az elektrosztatikus taszítás miatt nem tudnak kölcsönhatást kialakítani, visszatartás nélkül haladnak át a rendszeren. Például anionok elválasztása

esetén az erős savak retenciót nem szenvednek, a holtidővel eluálódnak az oszlopról, vagyis a kromatogramon az erős savakat alkotó ionok nem jelennek meg. Gyenge szerves és szervetlen savak elválasztása és meghatározására alkalmas ez a módszer. Használható továbbá kisebb méretű molekulák, mint például kis szénatomszámú karbonsavak, gyenge bázisok vagy hidrofil vegyületek kvantitatív meghatározására. A megfelelő pH beállításával elérhető, hogy az elválasztandó komponensek semleges állapotba kerüljenek és így az állófázis pórusaiba bejutnak. Apolárisabb minták esetében az ioncserélő gyanta anyagával hidrofób-hidrofób vagy akár van der Waals kölcsönhatás is ki tud alakulni.

3.3 Ionpár kromatográfia (ion-pair chromatography)

Az elválasztás során lipofil kationos (pl.: kvaterner aminok) vagy anionos (pl.: alkánszulfonsavak) módosító komponensek adnak az eluenshez. Az adalékkal ellentétes töltésű ionok elválasztása a fordított fázisú (apoláros, hidrofób) állófázison történik meg. Az elválasztás mechanizmusa pontosan nem tisztázott, korábban lényegében két határesetnek tekinthető modellt javasoltak a kísérleti tapasztalatok értelmezésére.

Az egyik feltételezés szerint az elválasztandó ionos komponensek semleges ionpárt képeznek a lipofil módosítóval. A semleges ionpárok ezt követően kötődnek az állófázison és az elválasztást lényegében két tényező, a képződő ionpárok stabilitása és az állófázison történő megkötődés erőssége határozza meg. A másik modell azt feltételezi, hogy a lipofil ionos vegyület először megkötődik az állófázison. Ezzel lényegében az állófázison egy ioncserélő alkalmas felület alakul ki és az elválasztás hasonló módon értelmezhető, mint az ioncsere kromatográfia esetében. Lényeges különbség azonban, hogy az ioncserélő csoportok nincsenek kovalens módon rögzítve az állófázison, azaz onnan visszakerülhetnek a mozgófázisba.

Az elválasztás értelmezéséhez egy bonyolult egyensúlyi rendszerből kell kiindulni, ami figyelembe veszi az összes kölcsönhatást az elválasztandó komponensek, a lipofil módosító és az állófázis között. A teljes retenciós modellből mindkét határeset levezethető és valójában az adott rendszer sajátosságai határozzák meg, hogy ténylegesen miként történik az elválasztás.

4. IONELNYOMÁS VEZETŐKÉPESSÉGI DETEKTÁLÁS ESETÉBEN

4.1 Ionelnyomósos (szuppresszált/„kétkolonnás”) ionkromatográfia

Vezetőképességi detektálás esetén az eluens vezetőképessége nagyon nagy lenne, ha közvetlenül a detektorba vezetnénk, így a mintát alkotó ionokat nem tudnánk detektálni azok eluenshez viszonyított kis koncentrációja, azaz vezetőképessége miatt. Ennek a problémának a kiküszöbölésére az eluent és az elválasztott ionokat az analitikai oszlopon történő áthaladás után egy nagy ioncsere kapacitású oszlopra juttatják. Ezt a nagy ioncsere kapacitású oszlopot ionelnyomó kolonnának vagy szuppresszornak nevezzük, ami kationkromatográfia esetén anion-, anionkromatográfia esetén kationcserélő oszlop. A szuppresszor az eluens kationjait protonokra vagy anionjait hidroxidionokra cseréli le (attól függően, hogy anion vagy kationkromatográfiáról van szó), így egy gyengén disszociáló sav képződik, melynek a háttérvezetése már jelentős mértékben lecsökken az eredeti eluenséhez képest. Az analizálandó anionok ellenionjai szintén protonra vagy hidroxidionokra cserélődnek, így az eredeti mintához képest jóval nagyobb vezetőképességű oldat jön létre, vagyis növeljük a detektálás érzékenységét is. Például ha NaOH-t használunk eluensnek anionkromatográfiában, a mintánk pedig NaCl-t és Na₂SO₄-et tartalmaz, akkor a szuppresszoron történő áthaladást követően a mozgó fázisban lévő eluensből H₂O lesz a Na⁺ ionok H⁺ ionokra történő cseréjével, a minta komponenseiből pedig HCl és H₂SO₄ lesz.

A szuppresszor oszlop felületét folyamatosan regenerálni kell, mivel az ioncserekapacitása ugyan nagy, de nem végtelen. A lecserélt anionok és kationok a szuppresszor oszlopon maradnak az ioncsere után, ezeket onnan anionkromatográfiában kénsavval, kationkromatográfiában tetrametilammónium-hidroxiddal tudjuk leszorítani, ami biztosítja a reakcióhoz szükséges protonokat, illetve hidroxidionokat és így egy vízzel történő mosatási fázist követően újra alkalmassá válik a szuppresszor a kémiai ionelnyomásra.

4.2 Nem ionelnyomósos („egykolonnás”) ionkromatográfia

Időben később fejlesztették ki a nem ionelnyomósos módszert, hiszen meg kellett oldani a mozgó fázis nagy háttérvezetésének problémáját. Ebben az esetben nem használnak szuppresszorokat, az elválasztott ionok az állófázisról közvetlenül a detektorba jutnak. Ehhez az kell, hogy az állófázis kis ioncserélő kapacitású legyen és a mozgófázis is lehetőleg minél kisebb vezetőképességű legyen.

4.3 Elektrokémiaailag regenerált ionelnyomó („háromkolonnás”) ionkromatográfia (Electrically Regenerated Ion-Suppressor, ERIS)

1997-ben publikálták az ERIS módszert, aminek az alapja az, hogy két szuppresszor oszlopot helyeznek az analitikai oszlop után, amik mintánként váltakozva végzik a kémiai ionelnyomást. Míg az egyik dolgozik, addig a másikat elektrolízissel előállított hidrogénionokkal regenerálják, így mindig frissen regenerált ionelnyomó oszlopot használhatunk az elválasztás után.

5. ÁLLÓFÁZISOK

Az ionkromatográfiában ioncserélő kolonnákat használunk állófázisként. Ezek csoportosítása:

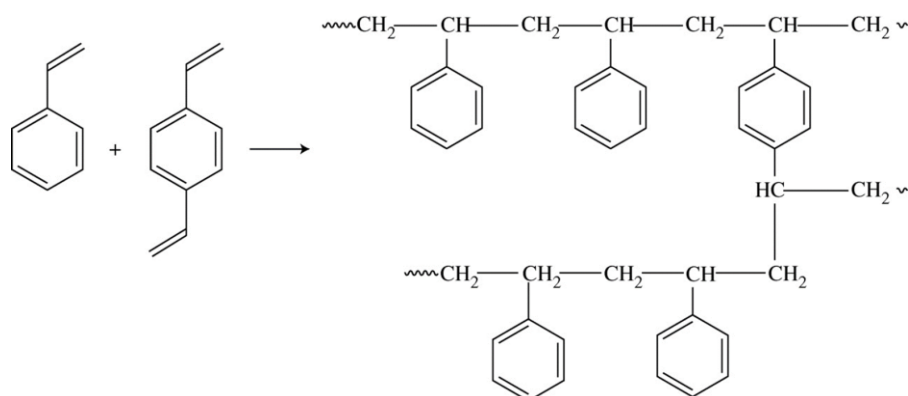
- Töltet szerint
 - anioncserélő: pozitív töltésű funkciós csoportokat tartalmaznak (kvaterner amin, protonált aminocsoport)
 - kationcserélő: negatív töltésű funkciós csoportjuk van (deprotonált szulfonsav, karboxilcsoport)

- pH-függés szerint
 - erős ioncserélő: ioncsere kapacitása nem függ a pH-tól (kvaterner amin, szulfonsav)
 - gyenge ioncserélő: ioncsere kapacitása pH függő (karboxilcsoport)

- Anyagi minőség szerint

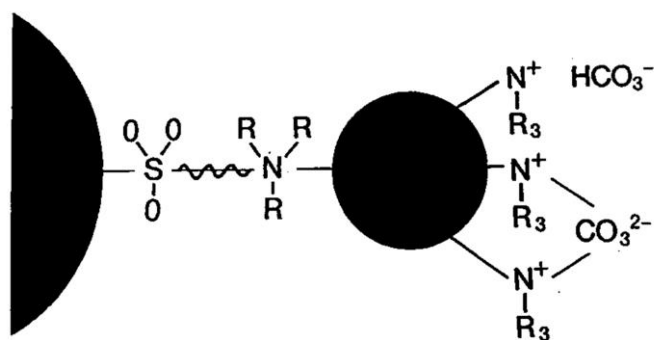
- **Szerves polimer alapú ioncserélők**

Sztirol-divinil-benzol, polimetakrilát és polivinil alapú ioncserélők a legfontosabb szerves polimer alapú állófázisok az ionkromatográfiában. Ezek közül is a sztirol-divinil-benzol alapúak a legelterjedtebbek, mivel pH = 0 – 14 tartományban stabilak. A sztirol kopolimerizációja divinil-benzollal szükségszerű a gyanta megfelelő mechanikai stabilitásának biztosításához. A divinil-benzol két funkciós csoportjának köszönhetően, összeköt két polisztirén láncot, így az állófázist térhálóssá teszi (3. ábra). Az ioncserélők térhálósságát az előállításukhoz felhasznált divinil-benzol százalékos mennyisége határozza meg. A térhálósság befolyással van többek között a gyanta porozitására, szelektivitására, mechanikai stabilitására, ioncserekapacitására is. Az ioncsere-kapacitás az egységnyi tömegű vagy térfogatú gyantán található aktív funkciós csoportok számát jelzi.



3. ábra: A sztírol és a divinil-benzol kopolimerizációja

A *latex agglomerált* állófázisok a szerves polimer alapú anioncserélők egy speciális csoportját alkotják. A latex alapú anioncserélők szulfonált sztírol-divinil-benzol kopolimerből és az erre felvitt, elektrosztatikusan kötött, teljesen aminált pórusos anioncserélő gyöngyökből állnak (4.ábra). Az utóbbi ún. latex részecskék átmérője kb. 0,1 nm. Ezek alapján a latex alapú állófázisok három részre bonthatók: egy inert és mechanikailag ellenálló hordozóra, egy vékony szulfonsav borításra a hordozó felületén, valamint egy külső aminált latex rétegre, ami az anioncserélő csoportokat hordozza.



4. ábra: A latex agglomerált állófázis szerkezete

Habár a latex réteg önmagában véve nagy ioncsere kapacitással rendelkezik, a kisméretű gyöngyök mégis kis ioncsere kapacitású állófázist eredményeznek. A gyantaszemcséken található szulfonsav csoport réteg megakadályozza az anionok gyanta belsejébe jutását, valamint a latex részecskék kis mérete miatt a mintakomponenseknek csak kis távolságot

kell megtenni diffúzióval az elúció során. Így számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a latex típusú ioncserélők:

- jó mechanikai stabilitás
- nagy hatékonysága
- kémiailag nagyon stabilak. Még 4 mol/l koncentrációjú NaOH sem képes megbontani a

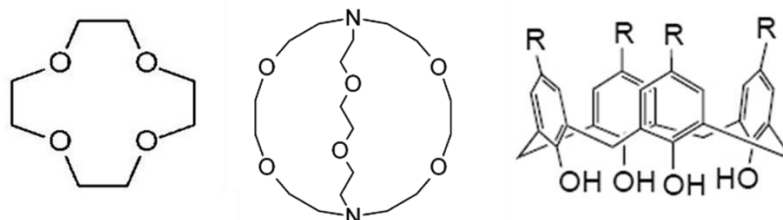
szulfonált felület és a latex részecske közti kötést.

➤ Szilikagél alapú anioncserélők

A klasszikus szerves polimerekkel szemben a szilikagél alapú fázisok mechanikai stabilitása és hatékonysága lényegesen jobb. A szilikagél alapú ioncserélők esetén nem kell számolni az állófázis duzzadásával illetve zsugorodásával eluensváltás és szerves módosító használata esetén sem. Legnagyobb hátránya ezeknek az álló fázisoknak, hogy csak $\text{pH} = 2 - 8$ tartományban használhatók. Ennek a hátrálynak köszönhetően használatuk nem terjedt el széles körben az ionkromatográfia területén, annak ellenére sem, hogy akár 15 – 20 ezres elméleti tányérszám érték is elérhető szilikagél alapú álló fázisok használatával.

➤ Makrociklikus állófázisok

Szerves és szervetlen anionok elválasztása nem kizárólag szerves polimerre, vagy szilikagél állófázisra kötött erősen bázikus jellegű funkciós csoportok segítségével lehetséges. A töltéssel nem rendelkező makrociklikus vegyületek is alkalmasak anionok elválasztására. A makrociklikus vegyületek, úgymint a koronaéterek, kriptandok, kalixarének (5. ábra) jellemző tulajdonsága, hogy képesek fémionokat szelektíven megkötni. Ionkromatográfias állófázisként ezért kationok ligandum cserés elválasztására használhatók, ahol az eltérő átmérőjű fémek eltérő mértékben szenvednek visszatartást az oszlopon. Alkáli-hidroxid (LiOH, NaOH, KOH) eluenst használva anionok is elválaszthatók egymástól makrociklikus állófázison ioncserés mechanizmussal, ugyanis miközben a mozgófázis fémionja komplexet képez a makrociklikus vegyülettel, pozitív töltésű anioncserélő funkciós csoportok alakulnak ki az oszlopon, amin megtörténik a minta anionjainak elválasztása.



5. ábra: Makrociklusos vegyületek: koronaéter, kriptand, kalixarén

➤ Alumínium-oxid alapú anioncserélők

A szilikagél mellett az alumínium-oxid (Al_2O_3) az egyik legerjedtebb adszorbens a folyadékkromatográfiában. A szilikagél fázisokhoz hasonlóan az Al_2O_3 -fázisok is mechanikailag és termikusan meglehetősen stabilak, nem duzzadnak, nem zsugorodnak. Alkalmazásuk azonban kevésbé elterjedt, mivel ioncserélő kapacitásuk kicsi és csak szűk pH tartományban használhatók.

6. MOZGÓ FÁZISOK

Az ionkromatográfiában használt mozgó fázisok általában szerves oldószert tartalmazó pufferek. Több szempontot is figyelembe kell venni a megfelelő eluens kiválasztásakor, mint például a mozgó fázis pH értékét, a pufferkapacitást, az eluenserősséget, a komplexképzésre való affinitást, az ellenion minőségét és koncentrációját, valamint fontos, hogy a mozgó fázis kompatibilis legyen a detektálási móddal.

Anionok meghatározásakor többértékű gyenge savakat, kationok elválasztásakor többértékű gyenge bázisokat teszünk a mozgó fázisba. A mozgó fázis pH értékének növelésével nő a negatív töltések száma a deprotonálódás miatt. Ez egyben a mozgó fázisba tett puffer anion egyre erősödő kölcsönhatását is jelenti az álló fázis felületén, és így az elválasztandó ionok kiszorulnak az ioncserélő helyről.

Kationok meghatározásakor többértékű gyenge bázisokat teszünk a mozgó fázisba. Minél több hidrogéniont vesz fel a többértékű bázis, annál nagyobb mértékű a kötődése a kationcserélő felületén. A növekvő protonálódás, növekvő mértékű eluenserősséget jelent. A mozgó fázis pufferkapacitása a puffert alkotó gyenge sav (bázis) pK_a értéke körül a legnagyobb. Ha ettől

eltérő pH értéken dolgozunk, akkor a mozgó fázis pufferkapacitása kicsi. A minták pH értéke általában nem egyezik meg a mozgó fáziséval. Lehetőleg tehát a puffer összetevőit úgy válasszuk meg, hogy a mérés körülményei között legnagyobb legyen a pufferkapacitása. Ha növeljük a puffer koncentrációját, ez csökkenti a mintaösszetevő megkötődési lehetőséget, így a visszatartását. Emellett a mozgó fázis komplexképző sajátossága különösen fontos, ha többértékű fémionok elválasztását akarjuk megoldani. A többértékű fémionok erősen kötődnek a kation-cserélő felületén és ez nagy visszatartást eredményezne. Ezt csökkentjük az eluenshez adott komplexképzővel. A visszatartás és a szelektivitás befolyásolására metanolt, etanolt, butanolt, glicerint és acetonitrilt adnak a pufferhez. Ezek a szerves oldószerek adszorbeálódnak az álló fázis felületén. Mindazon ionok visszatartása és szelektivitása változni fog, amelyeknél a retenciót az álló fázis hidrofób részével történő kölcsönhatás befolyásolja. Például vízben oldódó szerves anionokét, ilyenek a formiát, acetát, propionát stb. Mivel az ioncsere egyensúlyi folyamat, amelyben a meghatározandó összetevő verseng a mozgó fázisban található ellenionnal ennek a folyamatnak az eredménye megszabja a visszatartást és a szelektivitást.

Az anionkromatográfiában használt eluensek típusát főként a használt detektálási módszer határozza meg. Mivel a leggyakrabban használt detektálási forma szerves és szervetlen ionok meghatározásában a vezetőképességi detektálás, a felhasználható mozgófázisokat két nagy csoportra oszthatjuk:

- kémiai szuppresszálas mellett használható mozgófázisok,
- elektromos háttérvezetés kompenzálas esetén használható eluensek.

A mozgó fázisok fenti módon történő csoportosításának természetesen csak vezetőképességi detektálás esetén van jelentősége. A megfelelő eluens kiválasztása spektrofotometriás, vagy amperometriás detektálás esetén lényegesen egyszerűbb. Előbbi esetben főként foszforsav alkáli sói, kénsav és perklórsav alkalmazható sikeresen, ami nagymértékű fényáteresztő képességüknek köszönhető az UV tartományban. Amperometriás detektálás esetén alkálifémek klorid, klorát és perklorát sói, valamint alkáli-hidroxidok és karbonátok jöhetnek szóba.

Kémiai szuppresszálas mellett használható mozgófázisok

Ebbe a csoportba a gyenge szervetlen savak sói, és az erős alkáli-hidroxidok tartoznak, melyek a szupresszoron keresztül haladva kis vezetőképességű oldattá alakulnak. Változó összetételű nátrium-karbonát és nátrium-bikarbonát oldatok széleskörűen alkalmazott mozgófázisok szupresszált

vezetőképességi detektálás esetén, mivel ezen eluensek szelektivitása könnyen befolyásolható a mozgófázis pH-jával és koncentrációjával. A szupresszálas melléktermékeként kevésbé disszociált szénsav oldat keletkezik, melynek kis vezetése érzékeny detektálást tesz lehetővé. A karbonát/bikarbonát rendszerek alternatívájaként szóba jöhetnek olyan aminosav eluensek is, melyek izoelektromos pontja (pI) semleges pH-n található. Bázikus pH-n az aminosavak főként ionos formában vannak jelen, így anion-kromatográfiás mozgófázisként használhatók, a szupresszálas után pedig, ikerionos formájuknak köszönhetően, kisebb vezetéssel rendelkeznek, mint a karbonát/bikarbonát eluensek. Hasonlóan kis háttérvezetés érhető el N-szubsztituált amino-alkilszulfonsavak használatával is. A nátrium-hidroxid eluensként való felhasználása esetén érhető el a legkisebb háttérvezetés, így a legnagyobb érzékenység, mivel a szupresszálas eredményeként tiszta víz keletkezik. Viszonylag gyenge hajtóereje miatt meglehetősen nagy koncentrációban kell alkalmazni (10–100 mM), ezért nem tudta teljes mértékben kiszorítani a többi eluens használatát, bár kétségtelen, hogy a karbonát/bikarbonát eluensek mellett a legelterjedtebben használt eluens.

A nátrium-tetraborátot, a tetraborát anionok állófázishoz való kis affinitása miatt elsősorban fluorid ionok és kis szénláncú karbonsavak analízise esetén használják. Mivel a szupresszálas során keletkező bórsav semleges pH-n csak kismértékben disszociál, a nátrium-tetraborát mozgófázis szintén használható gradiens elúcióra.

Az 1. táblázat összefoglalóan mutatja a kémiai szupresszálas mellett leggyakrabban használt mozgófázisokat.

1. táblázat: Kémiai szupresszálas mellett leggyakrabban használt mozgófázisok

Eluens	Eluens ion	Szupresszor termék	Elúciós erő
Na ₂ BO ₄	BO ₄ ²⁻	H ₃ BO ₃	nagyon gyenge
NaOH	OH ⁻	H ₂ O	gyenge
NaHCO ₃	HCO ₃ ⁻	CO ₂ +H ₂ O	gyenge
NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	HCO ₃ ⁻ /CO ₃ ²⁻	CO ₂ +H ₂ O	közepesen erős
H ₂ NCH(R)COOH/NaOH	H ₂ NCH(R)COO ⁻	H ₃ N ⁺ CH(R)COO ⁻	közepesen erős
RNHCH(R')SO ₃ H/NaOH	RNHCH(R')SO ₃ ⁻	RN ⁺ H ₂ CH(R')SO ₃ ⁻	közepesen erős
Na ₂ CO ₃	CO ₃ ²⁻	CO ₂ +H ₂ O	erős

Elektrokémiailag regenerált ionelnyomás esetén használható eluensek

Az ebbe a csoportba tartozó mozgófázisok eleve kis vezetéssel kell, hogy rendelkezzenek az érzékeny detektálás biztosítása miatt. Benzoát, ftalát, és o-szulfobenzoát a leggyakrabban használt komponensek, mivel megfelelően erős affinitásuk van az állófázis funkciós csoportjai felé, ugyanakkor a vezetőképességük viszonylag kicsi. Használatuk esetén az eluens pH-ját 4–7 értékre célszerű beállítani, ugyanis ezen a pH-n a savak disszociált formában vannak jelen. A felsorolt mozgófázisok háttérvezetése lényegesen nagyobb, mint a hasonló elúciós erővel rendelkező karbonát/bikarbonát mozgófázisé. Ennek megfelelően elektromos háttérvezetés kompenzálás esetén a kimutatási határok és a detektor lineáris tartománya lényegesen kisebb, mint szuppresszált vezetőképességi detektálás alkalmazásakor. Semleges pH-jú eluens használatával ugyanakkor a mozgófázis hidrogénion koncentrációja által okozott háttérvezetés növekedés is kiküszöbölhető.

7. DETEKTÁLÁS

Az ionkromatográfiás gyakorlatban leggyakrabban **vezetőképességi detektorok**at alkalmaznak. Az oldatok vezetőképessége additív tulajdonság, függ az ionok minőségétől (mozgékonyosság) és az ionok számától (koncentráció). Elvben a vezetőképességi detektor néhány nemvizes eluens esetén is alkalmazható. Ezeknek a detektoroknak az érzékenysége a hőmérséklettől függ; az elválasztás és detektálás során tehát a hőmérsékletet szigorúan állandó értéken kell tartani. Szuppresszált rendszer esetében a zajsztintnek 4 nS/cm alatt kell lennie, a hőmérséklettartomány pedig általában 25 – 55 °C.

Ezen kívül gyakran használnak detektálásra **UV-látható spektrofotometriás** elven működő **detektorok**at is. Ez azokban az esetekben használatos, ha az adott komponens elnyel az UV-látható tartományban. Ilyenek például a jodid-, nitrit-, nitrát-, jodát- vagy kromát ionok. Itt a detektor fotodióda, a cella pedig kvarc küvetta. Fényforrásként deutérium-, illetve wolfram lámpákat használnak. Emellett alkalmazható diódasoros detektor is, ha a célunk különböző hullámhosszúságon mért fényabszorpció egyidejű detektálása. Ebben az esetben spektrumokat tudunk felvenni egy polikromátor segítségével.

A fluoreszkáló anyagok detektálása **fluoreszcencia mérésen alapuló detektorok** segítségével történhet. A detektálás elve, hogy adott

hullámhosszúságú fényel gerjesztik a minta komponenseit, amik ennek hatására fényt emittálnak, és ezt a fényt tudjuk detektálni. Biológiai minták esetében gyakori ez a fajta detektálási módszer.

Elektrokémiai detektálásra is számos esetben szükség lehet. Vannak olyan ionok, amik elektrokémiaileg oxidálhatók, mint például az arzenid, azid, bromát, bromid, klorid, klorát, cianid, jodát, jodid, nitrit, nitrát, szulfid, szulfid, tetracionát, tiocianát vagy tioszulfát ionok. Az **elektrokémiai detektorok**nak két típusa van: az amperometriás (állandó feszültség alkalmazása mellett mérik a cellán áthaladó áramerősséget) és a voltometriás detektorok (időközönként változó feszültség alkalmazása mellett mérik a cellán áthaladó áramerősséget). Ez a detektálási mód abban az esetben lehet releváns, amikor a mintakomponensek elektródreakcióba vihetők. Az alkalmazott típustól függetlenül általában minden esetben háromelektrodos (munkaelektrod, segédelektrod és referenciaelektrod) átfolyó cellát használnak.

Egyéb detektorok:

- atomabszorpció (AAS)
- induktívan csatolt plazma atomemissziós spektrométer (ICP)
- tömegspektrometria (MS)

8. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Joachim Weiss: IonChromatography, 2nd Edition, 2008.
- Fekete Jenő, Hete Gabriella, Ritz Ferenc: Ionok meghatározásának korszerű eszközei, Műszerügyi és Méréstechnikai Közlemények, 67, 2001.
- Galbács Gábor: Ionkromatográfia, Illusztrált segédanyag a modern műszeres analitikai kémia oktatásához, Digitális Tankönyvtár, 2013.
- Horváth Krisztián: Ionkromatográfia, Oktatási segédanyag, Veszprém, 2013.

9. GYAKORLAT

A gyakorlat első feladataként multipontos kalibrációt végzünk klorid-, bromid-, nitrát-, szulfát-, nátrium-, kálium-, ammónium-, és kalciumionokra nézve. Ezt követően mindenki kap egy saját ismeretlen mintát, ami tartalmazza a felsorolt ionok valamelyikét, vagy akár több iont is. A gyakorlat célja ezen ismeretlen minták kvalitatív és kvantitatív meghatározása vezetőképességi és UV-detektálás alapján.

A jegyzőkönyv egy maximum fél oldalas bevezetővel indul, amiben saját szavainkkal megfogalmazzuk mi az ionkromatográfia, miért használjuk és mik a legfontosabb ismeretek egy ionkromatográfiás mérésrel kapcsolatban. Ennek már készen kell lennie a gyakorlat kezdetére.

A jegyzőkönyv többi részét a gyakorlaton írjuk. A jegyzőkönyvet még a gyakorlat napján, legkésőbb délután 17:00-ig le kell adni a D524-es laboratóriumban a gyakorlatvezetőnek.

A gyakorlaton egy Dionex ICS-5000+ típusú kétcsatornás ionkromatográfot (6. ábra) fogunk használni, ami a következő részekből épül fel:

- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| - kétcsatornás pumpa | - kolonnatér |
| - automata mintaadagoló egység | - vezetőképességi detektor |
| - UV-látható detektor | - elektrokémiai detektor |



6. ábra: Dionex ICS-5000+ típusú ionkromatográf

Ellenőrző kérdések:

1. Mit nevezünk ionkromatográfiának?
2. Milyen részei vannak egy ionkromatográfnek?
3. Mi az általános működési elve az ionkromatográfnek?
4. Milyen módszereket ismer a retenció mechanizmusát tekintve?
5. Mit az elve az ioncsere kromatográfiának?
6. Mit nevezünk szuppresszált ionkromatográfiának? Milyen előnye van a módszernek?
7. Sorolja fel, milyen anyagú állófázisokat ismer? Az egyiket jellemezze néhány mondattal!
8. Milyen szempontokat kell figyelembe venni a mozgófázis kiválasztását illetően?
9. Mi a leginkább előnyös mozgó fázis szuppresszált anionkromatográfiában és miért?
10. Milyen detektálási módokat ismer? Jellemezze 1-2 mondattal ezeket!

FEHÉRJE TISZTÍTÁSA PROTEIN PURIFIER PROGRAM SEGÍTSÉGÉVEL

1. BEVEZETÉS

A biotechnológiai fejlesztések legtöbbször nélkülözhetetlen a fehérjék tisztítása. A fehérje tisztítást egy lépésben, vagy több lépéses tisztítási folyamatként is elvégezhetjük, sőt nagy mennyiségű fehérje tisztítására alkalmas módszerek is léteznek.

A következőkben megpróbálunk útmutatót adni a megfelelő tisztítási stratégia kialakításához. A különböző kromatográfiás technikák eltérő szelektivitást biztosítanak, így a fehérjéket a háromfázisú fehérje tisztítási stratégia alapján izolálhatjuk, elválaszthatjuk és tisztíthatjuk, hogy maximális kitermelést érjünk el minimális lépésben. Bemutatjuk a különféle kromatográfiás technikák lényegét és útmutatót adunk a sikeres tisztítási protokoll kidolgozásához.

2. FEHÉRJE TISZTÍTÁSI STRATÉGIÁK

A fehérje tisztítás során általános kromatográfiás technikákat használunk, hogy eltávolítsuk a szennyező fehérjéket a célfehérje mellől. A tisztítás hatásfokát elsődlegesen a független szelektivitású módszerek megfelelő kombinációja határozza meg. A 2D elektroforézis jól példázza ezt az elvet, hiszen két egymástól teljesen független fehérje tulajdonságon (az izoelektromos pont és a méret) alapuló módszert használ az elválasztáshoz. Ez az elv elegendő nagy teljesítőképességgel rendelkezik több mint ezer fehérje egyetlen, két dimenziós elektroforézissel való elválasztásához.

A fehérje tisztítási protokollok három fizikai fehérje tulajdonságot kombinálnak - a töltést, a hidrofóbicitást és a méretet - ami legtöbbször elegendő 90 % vagy jobb tisztaság eléréséhez. Ezek a protokollok az elválasztás célját tekintve három fázisra bonthatók: dúsítás, közbelső tisztítás és finomítás (Capture, Intermediate Purification, Polishing CIPP).

A protokollt úgy tervezzük meg, hogy kezelni tudjuk az olyan meglehetősen komplex és gyakran híg kiindulási anyagokat, mint a sejt lizátumok, így a dúsítási fázis fő célja, hogy a háttér fehérjék mennyiségét csökkentse és koncentrálja a célfehérjét.

A közbülső tisztítási fázis célja, hogy a lehető legtöbb, a célfehérjéhez hasonló szennyezőt eltávolítsa.

Végül a finomítási fázis arra szolgál, hogy specifikus szennyezőket és a célfehérje rendellenes formáit (polimerek, alegységek, amelyek a tisztítási folyamatban is keletkezhetnek) is eltávolítsuk.

2.1 Tisztítási protokoll tervezése

A módszer kifejlesztés négy alapfázisra bontható:

2.1.1. Információk a mintáról

- A végtermék megkívánt tisztasága és mennyisége.
- A célfehérje elérhető fizikai tulajdonságai.
- Információk a kiindulási anyagról: típus, célfehérje koncentrációja, szennyezők minősége.
- A minta stabilitási tartománya, kompatibilitás (minta stabilitási ablak).

2.1.2. Kezdő tisztítási kísérlet elvégzése

A Standard Tisztítási Protokoll jó kiindulási alap, legtöbbször megfelelő tisztaságot eredményez. Számos esetben azonban további optimalizálásra lehet szükség.

2.1.3. Tisztítási protokoll optimalizálása

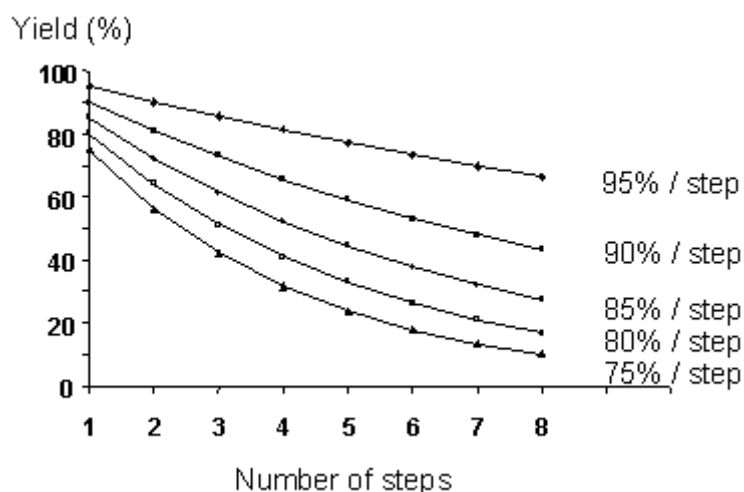
A Standard Tisztítási Protokoll alkalmazásának eredményei alapján a tisztítási lépéseket optimalizáljuk, vagy további lépésekkel egészítjük ki, esetleg másként kombináljuk, amíg megfelelő tisztaságot kapunk.

2.1.4. A végleges tisztítási méretre való adaptálás.

Általában az optimalizálási kísérleteket HiTrap kis méretű oszlopokkal végezzük. Ha ez a méret nem szolgáltat megfelelő mennyiségű anyagot, méretnövelést végzünk.

2.2 Tisztítási lépések kombinálása

A tervezésnél figyelembe kell venni, hogy semmilyen kromatográfiás lépés sem eredményez 100 % kitermelést. Ezért a tisztítási folyamat végső kitermelése a lépések számától függ. Az 1. ábra mutatja, hogy a még viszonylag jónak mondható 80 % lépésenkénti kitermelés is 20 % összkinyerést eredményez, ha 8 tisztítási lépést használunk. Ezért a lépések számának minimalizálása nagyon fontos.



1. ábra

A lépések számának minimalizálásában segíthet a különböző módszerek által igényelt kiindulási körülmények és az elválasztás után elérhető végállapot ismerete, amiket az 1. táblázatban foglaltunk össze.

1. táblázat

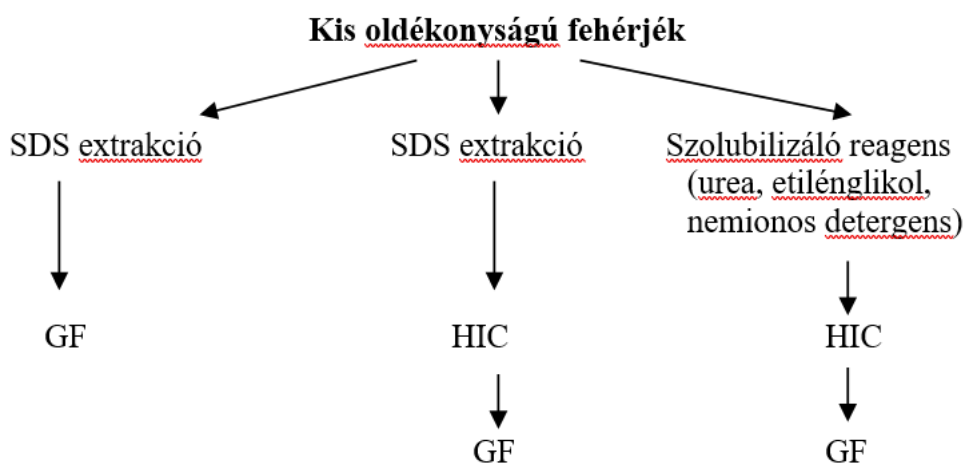
Start állapot jellemzője	Módszer	Végállapot jellemzője
Kis minta térfogat	Méretkizárási kromatográfia	Hígított minta, puffer csere
Alacsony ionerősség	Ioncserélő kromatográfia	Nagy ionerősség, pH változás
Nagy ionerősség	Hidrofób kromatográfia	Alacsony ionerősség
Specifikus kötődési körülmények	Affinitás kromatográfia	Specifikus elúciós körülmények

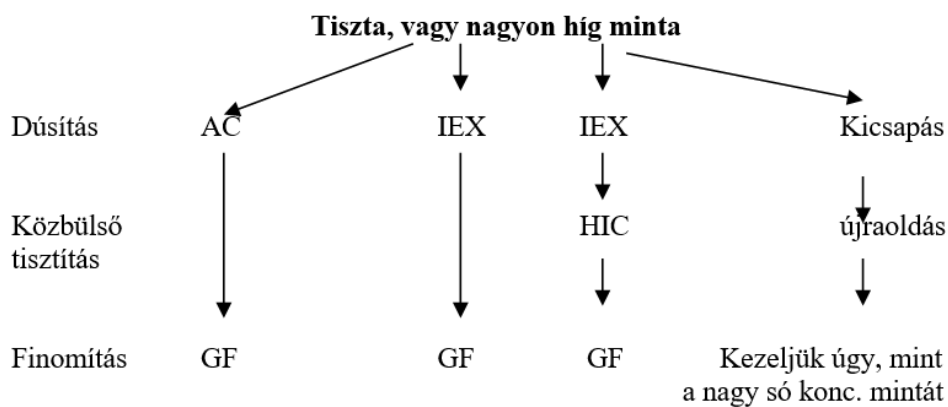
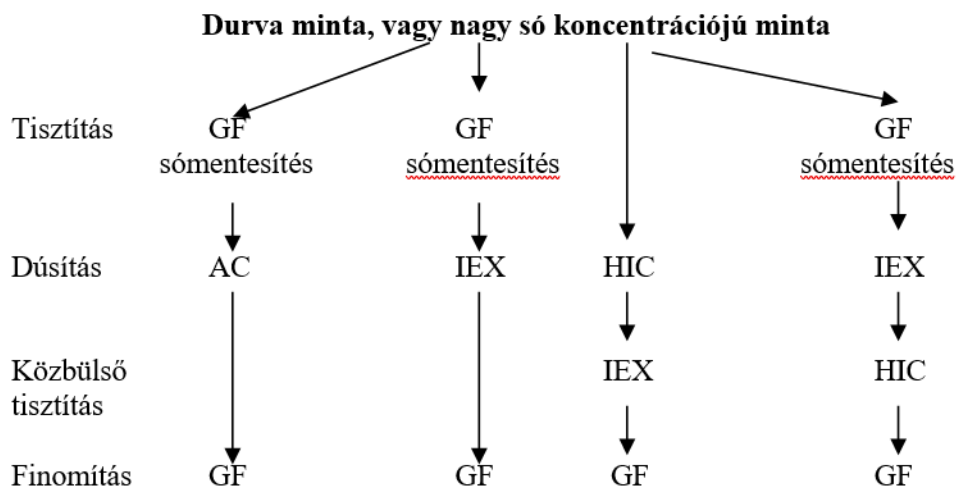
2.2.1. Tisztítás a célmolekula szennyezők mellőli kinyerésével

Az affinitás kromatográfia nagyon specifikus a célmolekulára és a hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkező molekulák csoportjára. Ez alkalmas a célmolekula (vagy molekulacsoport) kihalászására a szennyezők közül. Ha lehetséges ezt a technikát kell alkalmazni, mert drasztikusan lecsökkenti a szükséges tisztítási lépések számát. Figyelembe kell venni az állófázis kapacitását, és az elúció hatékonyságát, mert a kitermelés alacsony lehet, ha ezek nem megfelelőek.

2.2.2. Tisztítás a szennyezők célmolekula mellőli eltávolításával

Ha nincs megfelelő affinitás kromatográfiai módszer, akkor a hozzáférhető módszerek meghatározott szekvenciáját kell alkalmazni a szennyezők eltávolításához. Ha a célfehérjéről semmit sem tudunk, a Standard Tisztítási Protokoll: IEX-HIC-GF. A következő sémák a különböző mintakezelési stratégiákra adnak javaslatot.





3. A PROGRAM HASZNÁLATA

A súgó (Help) bemutatja a Protein Purification program működését és a használható módszerek, kiválasztható közegek fő jellemzőit. Átolvasása hasznos lehet a program használata előtt, de használata közben is a választás segítésére.

3.1 Módszerek és stratégiák

3.1.1. Frakcionált kicsapás ammónium szulfáttal (AS)

Az ammónium-szulfátos frakcionált kicsapást gyakran használják labor méretekben kis mintatérfogatból való szennyező eltávolításra. A fehérjék só oldatokban való oldékonysága különböző. Ha növeljük a só koncentrációt, megnőnek a hidrofób kölcsönhatások a fehérjemolekulák között, és elegendően nagy koncentráció esetén a fehérjék kicsapódnak. Mivel a fehérjék hidrofóbicitása eltér, ezért különböző só koncentrációval csaphatók ki. Az 2. táblázat a kicsapás lehetséges stratégiáit foglalja össze.

2. táblázat

Tisztítás: a szennyezőket csapjuk ki, a felülúszót használjuk tovább.
Extrakció, tisztítás, koncentráció: A célfehérjét csapjuk ki, a csapadékot használjuk tovább.
Extrakció, tisztítás: a szennyezőt kicsapjuk, a felülúszót visszük tovább.
Koncentráció: A célfehérjét csapjuk ki a felülúszóból, a csapadékkal dolgozunk tovább visszaoldás után.
Ha a só zavar, használjunk GF oszlopot a sómentesítéshez, vagy puffer cseréhez.

A kicsapást befolyásolja a pH és hőmérséklet, valamint a minta fehérje koncentrációja, ezért ezeket a paramétereket kontrolálni kell, hogy reprodukálható eredményt kapjunk. Nem minden fehérje oldható könnyen vissza, ez csökkentheti a kitermelést.

3.1.2. Hő denaturáció

A fehérje tisztítási eljárásokat általában alacsony hőmérsékleten végzik (0-4 °C), mivel a legtöbb fehérje alacsony hőmérsékleten stabilabb. Ahogy a hőmérsékletet 0 °C-tól 37-40 °C-ra növeljük, a fehérjék stabilitása jelentősen csökken. 40 °C fölött a fehérjék egyre jobban destabilizálódnak, denaturálódnak, és semleges pH-n a denaturálódott fehérjék gyakran kicsapódnak.

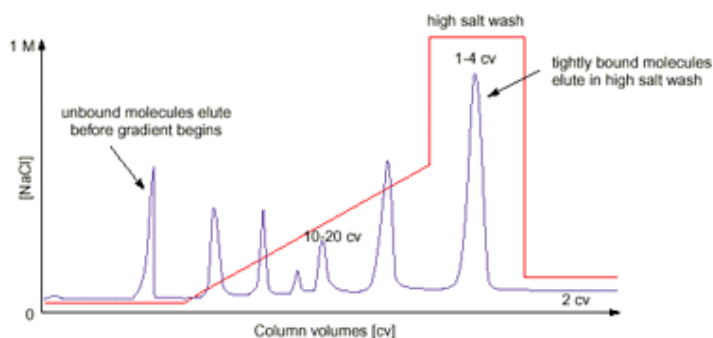
Egyes fehérjék hőstabilitása eltér egymástól, amit felhasználhatunk a fehérjetisztítás során. A vizsgált fehérje hőstabilitása meghatározható olyan előkísérletekkel, ahol a fehérjét adott ideig különböző hőmérsékleten inkubáljuk és mérjük az enzimaktivitásban bekövetkező változásokat, majd feljegyezzük azt a hőfokot, ahol a teljes inaktiváció bekövetkezik. Ha ismerjük ezt a hőmérsékletet, a kevésbé stabil fehérjéket inaktiválhatjuk a meghatározott hőmérsékleti maximumnál 5-10 °C-kal alacsonyabb hőmérsékleten való 15-30 perces inkubálással. Az így kicsapott fehérjéket ezután centrifugálással eltávolíthatjuk.

Meg kell jegyezni, hogy az enzim hőstabilitása a hőkezelés során növelhető szubsztrátja, terméke vagy egy kompetitív inhibitor jelenlétében, ami az aktív helyre kötődve stabilizálja a fehérje szerkezetét. Mivel a fehérjék denaturációja bizonyos fokig minden hőmérsékletnél bekövetkezhet és a hőmérséklet növelésével ez fokozódik, gyakran a vizsgált enzim aktivitása is bizonyos mértékű csökkenést mutat a hődenaturációs lépés után. Ez a folyamat viszonylag érélyes, viszont hőstabil fehérjék tisztítási folyamatánál hasznos kezdeti lépés lehet.

3.1.3. Ioncserélő kromatográfia (IEX)

Az ioncserélő kromatográfia a töltéssel rendelkező fehérjéket választja el. Az elválasztás alapja, a töltéssel rendelkező fehérje és az ellentétes töltésű ioncserélő közötti reverzibilis kölcsönhatás. A fehérjék úgy kötődnek, ahogy az oszlopra jutnak. A körülményeket úgy változtatjuk, hogy a kötődő komponensek különböző módon eluálódnak. Az elúciót általában növekvő só koncentrációval vagy a pH változtatásával tudjuk befolyásolni. A NaCl

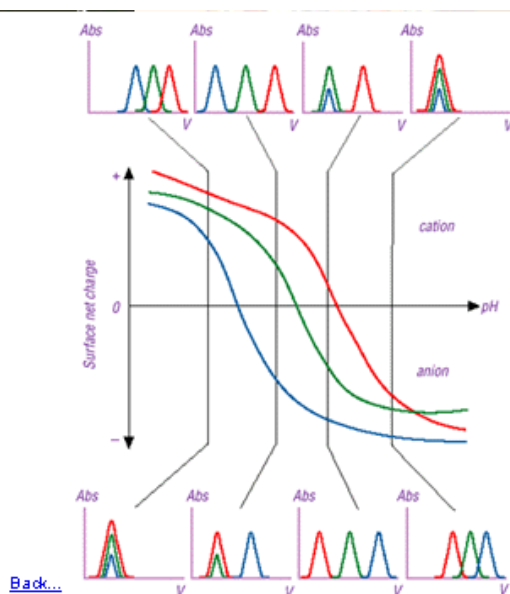
koncentráció gradiens a leggyakoribb elúciós technika, amint azt a 2. ábra mutatja



2. ábra: Ioncserélő kromatográfiai fehérje tisztítás elúciós profilja só gradiens (piros) alkalmazása mellett

A célfehérje a kötődéskor koncentráldódik és tisztított, koncentrált formában összegyűjthető.

A fehérje nettó töltése az aminosav összetételtől függ, és a közeg pH-jával változtatható, ahogy azt a 3. ábra egy 3 komponensű, eltérő izoelektromos ponttal rendelkező fehérjéket tartalmazó elegy példáján bemutatja.



3. ábra: Háromkomponensű elegy elválasztási lehetőségei kation és anioncserélő kromatográfiaival

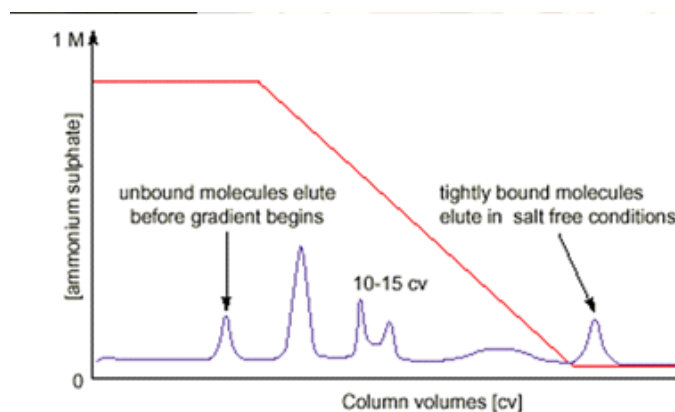
Ioncserélők típusai:

Egy ioncserélő lehet anion cserélő, ha pozitív töltéseket tartalmaz a felületén vagy kation cserélő, negatív töltésekkel. A fehérje tisztításhoz leggyakrabban használt ioncserélő gyanták a karboximetil-cellulóz (CM-cellulose) és a dietilamino-etil-cellulóz (DEAE-cellulose). Ezek kémiaiilag módosított szemcsés cellulózok. A CM-cellulóz olyan gyanta, amin a szénhidrát CH₂OH csoportja CH₂OCH₂COOH csoportra lett módosítva. Semleges pH-n ez a csoport ionizált (CH₂OCH₂COO⁻), vagyis a CM-cellulóz negatív töltésű, ebből következik, hogy ez a gyanta kationcserélő. A DEAE-cellulóz egy ionizálható tercier-amin csoportot tartalmaz, ami semleges pH-n pozitív töltésű, vagyis anioncserélőként alkalmazható. Szoros hasonlóságot mutatnak ezekhez az ioncserélő gyantákhoz a DEAE-Sephadex és CM-Sephadex töltetek, melyekben ugyanazok az ionizálható csoportok Sephadex gyöngy mátrixhoz kapcsolódnak kovalensen; illetve a kovalensen keresztkötött agaróz alapú ioncserélők, a DEAE Sepharose és CM-Sepharose. A DEAE-cellulóz önmagában is elérhető, DEAE-Sephacel néven. A Sephadex és Sepharose típusok különösen hasznosak a nagy molekulatömegű fehérjék elválasztásánál. A gyakorlatban, mivel ezek a mátrixok nagyon hasonlóak azokhoz, amiket a gélszűrésnél használnak, bizonyos mértékű molekulaszűrő hatás is társulhat az ioncserélő folyamat melle. Ez javíthatja és csökkentheti is az elválasztás hatékonyságát, ha egy cellulóz alapú ioncserélő töltettel hasonlítjuk össze. Az egyszerűség kedvéért ebben a számítógépes szimulációban figyelmen kívül hagyjuk az elválasztás során fellépő esetleges molekulaszűrő hatást. Más ioncserélő gyanták, más-más ionizálható csoportokat tartalmaznak, melyek az itt leírtakon kívül kereskedelmi forgalomban elérhetőek. A számítógépes szimuláció az alábbi ioncserélő gyantákat tartalmazza: CM-cellulóz, DEAE-cellulóz, Q-Sepharose Fast Flow és S-Sepharose Fast Flow. A Q-Sepharose esetében a töltéssel rendelkező csoport egy kvaterner-amin, ami egy állandó pozitív töltést hordoz. Ennél fogva ez a mátrix alkalmazható lúgos pH-n, ahol a DEAE-csoport pozitív töltése megszűnik. Az S-Sepharose esetében a töltést hordozó csoport egy szulfonil csoport (SO₃⁻).

3.1.4. Hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (HIC)

A HIC segítségével a fehérjéket hidrofóbicitásuk különbsége alapján választjuk el. Az elválasztás alapja a fehérje és a kromatográfias közeg hidrofób felülete közötti reverzibilis kölcsönhatás. Ez a kölcsönhatás növekszik nagy ionerősségű pufferben, így a HIC ideális ammónium szulfátos kicsapással, vagy nagy só koncentrációjú IEX segítségével

elválasztott fehérjék további tisztítására. A nagy ionerősségű oldatban levő minták (pl. 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) megkötődnek az oszlopon. Néhány fehérje kicsapódhat ilyen nagy ionerősségnél, ebben az esetben ezeket a fehérjéket centrifugálással el kell távolítani, mielőtt a mintát felvinnék az oszlopra. Az elúció általában a só koncentráció csökkentésére következik be. Leggyakrabban a minta komponenseket csökkenő só gradienssel eluáljuk. Az elválasztás kulcs fázisai a 4. ábrán láthatóak.



[Back...](#)

4. ábra: Hidrofób kölcsönhatási kromatográfia elúciós profilja csökkenő só koncentrációjú gradiens mellett

Ligand és közeg kiválasztásának szempontjai:

A fehérje hidrofóbicitását nehéz meghatározni. A legmegfelelőbb közeg kiválasztásához célszerű próbafuttatást végezni valamennyi állófázison. Különböző hidrofóbicitású ligandok hozzáférhetőek.

A hidrofóbicitás a következő sorrend szerint változik:

éter < izopropil < butil ~ fenil < oktil

Kezdjük az alacsony hidrofóbicitású liganddal, ha tudjuk, hogy a mintának van hidrofób csoportja. Válasszuk azt a közeget, ami alacsony só koncentráció mellett a legjobb elválasztást adja.

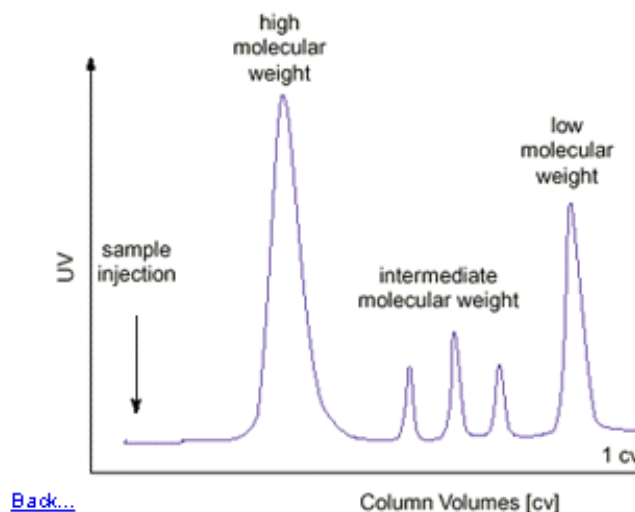
HIC közegek:

Phenyl Sepharose 6 Fast flow 6 % agarózt tartalmaz éter kötésű fenil ligandokkal. Kezdeti, vagy közbülső tisztításra ideális közepes hidrofóbicitású fehérjékre.

Octyl Sepharose 4 Fast Flow 4 % keresztkötött agarózt tartalmaz éter kötésű alifás liganddal. Kezdeti vagy közbülső tisztításra ajánlott alacsony hidrofóbicitású fehérjére.

3.1.5. Méretkizárási kromatográfia (GF)

A gélszűrés (méret kizárási kromatográfia) eltérő molekulaméretű fehérjéket választ el. A mintákat izokratikusan (egy pufferrel, gradiens nélkül) választjuk el. Mivel a puffer összetétele nem befolyásolja a felbontást, a puffer összetétele szabadon variálható a minta igényei szerint, vagy a következő tisztítás, analízis vagy tárolás kívánalmainak megfelelően. Az 5. ábra egy jellegzetes GF kromatogramot mutat, a nagy molekulatömegű fehérje kizáródik, a kis molekulatömegű a teljes térfogattal eluálódik.



5. ábra

Gél kiválasztása:

A megfelelő gél kiválasztásához két dolgot kell figyelembe venni; a kísérlet célját és az elválasztani kívánt molekula méretét. Néhány esetben fontos lehet a minta és a molekula más tulajdonságait is szem előtt tartani.

Általában jó megközelítés a minta ismert szennyezői és a célfehérje közötti maximális felbontásra törekedni. A különböző állófázisok szelektivitásának kis különbségei is lényeges eltérést jelenthetnek a felbontásban, így szükség lehet előzetes analízisekre az optimális gél kiválasztásához a rendelkezésre álló közegek közül.

A legelterjedtebb kereskedelmi forgalomban kapható gél mátrixok a Sephadex (dextrán gyöngyök), Sepharose, BioGel A (agaróz) és BioGel P (poliakrilamid), de emellett más anyagokat (poliakriloil morfolin és különféle polisztirolak) is használnak. A dextrán, agaróz és poliakrilamid gélek mindegyike elkészíthető különböző koncentrációban és az így kialakuló eltérő porozitásnak köszönhetően széles mérettartományban alkalmazhatók frakcionáláshoz. A Sephadex dextrán és a BioGel P poliakrilamid gélek globuláris fehérjékre kb. 800000 Da molekulatömegig alkalmazhatóak, míg az agaróz gélek, nagyobb pórusméretüknél fogva, egészen milliós molekulatömegig képesek a fehérjéket és makromolekuláris komplexeket elválasztani. Legutoljára a keresztkötött dextrán gélek kerültek forgalomba (Sephacryl), melyek rendkívül szilárd és stabil mátrixok és emellett egészen 8 millió daltonos molekulatömegig alkalmazhatóak. A poliakrilamid gélek szilárdsága és stabilitása növelhető a mátrixba épített agaróz segítségével. Az ilyen típusú poliakrilamid/agaróz gélek szinten elérhetőek kereskedelmi forgalomban (Ultrogel). A felsoroltak mellett folyamatosan dolgoznak új típusú mátrixok kifejlesztésén is. A lent látható táblázat összefoglalja a programban használható mátrixok főbb tulajdonságait.

A szimulációban használt mátrixok tulajdonságai

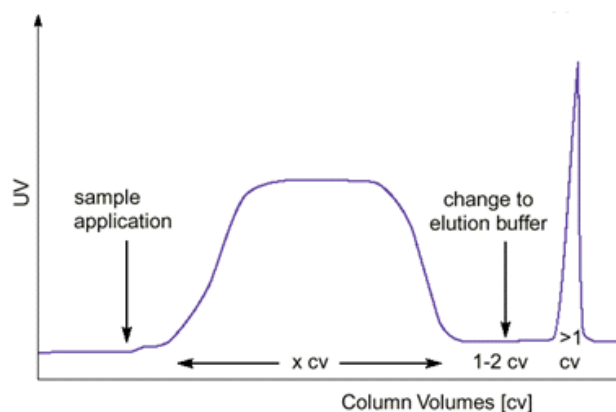
Név	Gyöngy típusa	Frakcionálási tartomány
		peptidekre és globuláris fehérjékre (Mt: Da)
Sephadex G50	dextrán	1500-30000
Sephadex G100	dextrán	4000-150000
Sephacryl S-200 HR	dextrán/akrilamid	5000-250000
Ultrogel AcA 54	poliakrilamid/agaróz	6000-70000
Ultrogel AcA 44	poliakrilamid/agaróz	12000-130000
Ultrogel AcA 34	poliakrilamid/agaróz	20000-400000
Bio-Gel P60	poliakrilamid	3000-60000
Bio-Gel P150	poliakrilamid	15000-150000
Bio-Gel P300	poliakrilamid	60000-400000

A Sephadex® és Sephacryl® a GE Healthcare Bio-Science bejegyzett márkái.

Az Ultrogel® a BF Biotechnics Inc. bejegyzett márkája. A Bio Gel® a Bio-Rad Inc bejegyzett márkája.

3.1.6. Affinitás kromatográfia (AC)

Az affinitás kromatográfia a fehérje (vagy a fehérje egy csoportja) és a kromatográfias mátrixhoz kötött specifikus ligand közötti reverzibilis kölcsönhatást kihasználva választja el a fehérjéket. AC akkor használható, ha hozzáférhető olyan ligand, ami többé-kevésbé specifikusan kötődik a célfehérjéhez. A mintát olyan körülmények között visszük az oszlopra, ami a ligandhoz való specifikus kötődésnek kedvez. A nem kötődő anyagokat lemoszuk és a kötődő célfehérjét a körülmények deszorpciót előidéző megváltoztatásával nyerhetjük ki. A deszorpciót előidézhethetjük specifikusan, kompetitív ligand alkalmazásával, vagy nem specifikusan a pH, ionerősség vagy polaritás változtatásával. A fehérjék koncentrálnak a kötődés során és tisztított koncentrált formában kinyerhetők. Az elválasztás kulcslépései a 6. ábrán láthatóak.



6. ábra: Affinitás kromatográfia elúciós profilja

Ligand kiválasztása:

Az affinitás kromatográfiára alkalmas ligandnak két feltételnek kell megfelelni. Először, a ligandnak specifikusan és reverzibilisen kell kötődni a tisztítandó anyaghoz. Másodszor, kémiaiilag módosítható csoportot kell tartalmaznia, amivel a mátrixhoz köthető anélkül, hogy a specifikus kötési aktivitása sérülne.

Affinitás kromatográfiához alkalmas közegek:

Csoport specifikus adszorbensek a fehérjék egy bizonyos csoportját képesek megkötni. Ily módon ugyanaz az általános ligand használható néhány fehérje (pl. egy enzim osztály) tisztítására, anélkül, hogy minden tisztítandó anyagra új adszorbenst kellene készíteni. Az adszorbeálódó anyagok minden egyes csoportján belül szerkezeti és funkcióbeli hasonlóságok vannak. A módszer specifitása a ligand szelektivitása és a szelektív elúciós körülmények együttesének köszönhető. Néhány csoport specifikus ligand kötött formában is hozzáférhető az Amersham Biosciences katalógusából.

Blue Sepharose Fast Flow erősen keresztkötött 6 % agaróz gélhez triazin kapcsolással kovalensen kötött Cibacron Blue F3G festéket tartalmaz. A festék molekulák a fehérjék széles körét képesek megkötni, mint pl. a NAD^+ vagy NADP^+ kofaktorral működő enzimek, albumin, koagulációs faktorok és interferon. Ez egy tipikus csoport specifikus ligand. Eluensként leggyakrabban kompetitív anyagot (pl. NADH) alkalmaznak. Nem specifikus eluensek akkor használhatók, ha a fehérje stabilitása ezt lehetővé teszi.

Immuno-affinitás kromatográfia a monoklonális és poliklonális antitestek specifitását használja fehérje tisztításra. Az immunoadszorbensek antitestek Sepharose mátrixhoz történő kovalens kötésével állíthatók elő. Az elúció általában alacsony pH-t igényel. Néha az antitest olyan erősen kötődhet, hogy a fehérje nem nyerhető vissza.

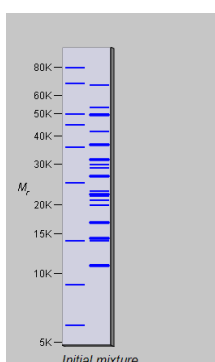
Mátrixok és módszerek kaphatóak különféle ligandok egy megfelelő funkciós csoporton keresztül történő gyors immobilizálásához. A kötési módszer kiválasztása mindig az immobilizálni kívánt molekula sajátosságaitól függ.

3.1.7. Nátrium-dodecilszulfát - poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS PAGE)

A nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis olyan elektroforetikus módszer ami a polipeptideket molekulatömegük szerint választja el. Az elválasztás poliakrilamid gélen történik nátrium-dodecilszulfát (SDS) jelenlétében, A diszulfid hidak redukáló ágenssel (ditioeritrol DTT) történő hasítása után.

Az SDS egy olyan anionos felületaktív anyag, ami a polipeptid lánchoz kapcsolódva denaturálja a fehérjéket (1,4g SDS/g fehérje). A kötődő SDS elfedi a fehérje saját töltéseit és nettó negatív töltést biztosít, aminek a

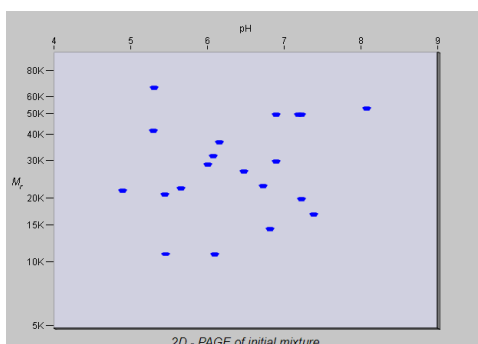
nagysága a fehérje molekulatömegétől függ. Az SDS a hidrogén híd kötések is megszünteti, blokkolja a hidrofób kölcsönhatásokat elősegítve a fehérje kitekeredését és így a másodlagos és harmadlagos szerkezetből adódó különbségeket megszünteti. A redukáló körülmények között végzett SDS PAGE után a polipeptidek festéssel tehetők láthatóvá a gélben pl. Coomassie Blue segítségével. A megjelenő sávok a fehérje molekulatömegének megfelelő pozícióban lesznek, ami standard eleggyel kalibrálható.



7. ábra: Minta elegy és kalibráló fehérje elegy SDS PAGE képe

3.1.8. Kétdimenziós elektroforézis (2DE)

A két dimenziós elektroforézis (2DE) fehérje elegyek analízisére széles körben alkalmazott módszer. A módszer a fehérjéket két független tulajdonságuk alapján két lépésben választja szét. Az első lépés az izoelektromos fókuszálás (IEF) az izoelektromos pont szerint választja el a komponenseket. Az izoelektromos fókuszáló lépésben a fehérjék elektromos térben mozognak egy immobilizált pH gradienst tartalmazó gélben. Ha a fehérje eléri az izoelektromos pontjának megfelelő pH értéket, nem mozog tovább, mert nettó töltése nullává válik. A második lépés az SDS PAGE molekulatömeg szerint rendezi az előzőleg már elválasztott fehérjéket.



8. ábra: 20 komponensű fehérjeeleg 2D PAGE képe

3.2 Navigáció és kontroll

3.2.1. Bevezetés

A Protein Purification egy szoftver alapú oktatási segédlet, ami szimulálja azokat a feladatokat, amivel egy fehérje tisztítás közben találkozhatunk, miközben számos elválasztási technikát és analitikai módszert alkalmazunk. A program gyakorlati betekintést nyújt a fehérje tisztításhoz általában alkalmazott stratégiákba anélkül, hogy időt és anyagot pazarolnánk. A program Dr. A. G. Both elgondolása alapján készült, on-line hozzáférhető illetve letölthető az alábbi helyről:

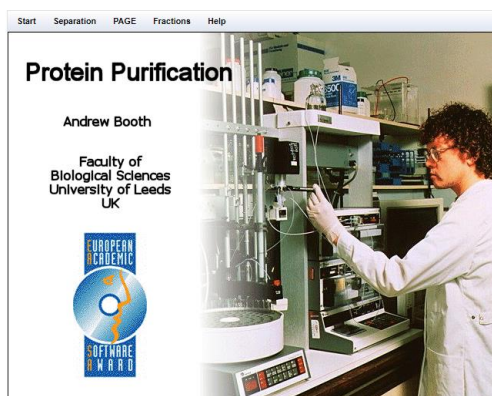
http://www.agbooth.com/pp_ajax/

vagy

http://www.agbooth.com/pp_web/

A programon belüli navigálás egyrészt a legördülő menük, másrészt a képernyőn látható ablakok segítségével történik. A két programverzió között főként navigálásban van eltérés, az elérhető funkciók azonosak.

A programnak létezik iPhone vagy Android telefonokon használható verziója is, kissé eltérő felülettel, de szintén azonos funkciókkal.



10. ábra: Az on line program kezdő oldala

A menü változik attól függően, hogy a program melyik részét használjuk, mindig csak a hasznos felületek érhetők el. Az *OK* gomb a következő lépést hajtja végre, vagy a program következő részére juttat. A választó ablakból az *Info* gomb a módszer használatához szükséges háttér információkhoz vezet. A megfelelő eredmény elérése érdekében általában szükség van néhány változtatásra az értékekben az *OK* használata előtt.

A legtöbb képernyőn látható egy *Cancel* gomb, amit akkor célszerű használni, ha valamilyen hibás lépést választottunk. Ez visszaléptet az előző képernyőre. Ha a választott módszer nem megfelelő van lehetőség kihagyni a *Quit* legördülő menü *Abandon this step and continue* utasítását választva.

A *Help* menü elérhető a legördülő menüből.

Minden lépés és eredmény automatikusan tárolódik, de a kromatogramokat az on- line verzióban csak a lépés után tudjuk megjeleníteni. A véglegesnek választott módszernél ezeket a *Print screen* billentyűvel képként menthetjük és megfelelő kivágás (pl. *Paint*) után beilleszthetjük a jegyzőkönyvbe.

3.2.2. Kezdés

A program on line verziójában rendelkezésére áll a labor teljes felszerelése, de szakmai segítsége nincs, minden döntést egyedül kell meghoznia. A kiválasztott enzim tisztításával bátran kísérletezhet, a jegyzőkönyvbe a legjobbnak gondolt tisztítási protokollt rögzítse. Az eredményeket a tisztítás során megjelenő kromatogramokkal, elektroferogramokkal támassza alá. Ezeket a *PrtScr* billentyűvel rögzítheti és a *Ctrl v* gombok együttes használatával egy dokumentum fájlba illesztheti, vagy tetszés szerint szerkesztheti.

Új feladat kiválasztásához klikkeljen a *Start, Start from beginning* a régi folytatásához a *Start from stored material* sorra. A következő ablakban választhat a *Default mixture 20* vagy *Complex mixture 60* fehérje közül. A kapott feladatban a fehérjék jelölése ennek megfelelően D1-20 vagy C1-60. Az új ablakban jelennek meg a fehérjével kapcsolatos alap információk, amik segítenek a tisztítás során, ezt rögzítse a jegyzőkönyvben. A fehérje kiválasztása után kezdheti a munkát, és kiválaszthatja a használni kívánt módszert. A módszer kiválasztásához klikkeljen arra legördülő menüre, amit használni akar.

A kisózás, hő denaturálás, IEX, GF, AC és HIC használatához a *Separation* feliratra kell kattintani. Elektroforézis indításához a *PAGE* feliratra klikkeljen.

Az elválasztás előtt célszerű a 2D PAGE futtatása a molekulaméret és izoelektromos pont megállapításához. Ehhez a *PAGE, 2 dimensional PAGE*, majd *PAGE, Immunoblott* feliratokkal hívhatja elő a célfehérjét. Rögzítse az y tengelyről leolvasható molekulatömeg (kDa) és az x tengelyről leolvasható izoelektromos pont (pH) értékeket. Az elválasztáshoz a *PAGE, Hide immunoblott* utasítással jut vissza.

Ezután választhat az elválasztási módszerek közül, a *Separation* menüből.

Ammónium szulfát:

A módszer az ammónium szulfát telítési érték (5-100%) bevitelével indítható. Az eredmény ismeretében dönthet, hogy mivel dolgozik tovább a csapadékkal (precipitate), a felülúszóval (soluble material), vagy megismétli (Cancel) a kicsapást, esetleg kihagyja ezt a lépést. *OK* a folytatáshoz.

Hődenaturáció

Erre elsősorban akkor van lehetőség, ha a fehérje hőstabilitása jó. Próbálgathatja, hogy milyen hőmérséklet és idő beállítással marad meg a teljes enzim aktivitás és csapódik ki a legtöbb szennyező fehérje.

Kromatográfia

Először válassza ki a használni kívánt LC technikát a megjelenő módszerek közül. Valamennyi kromatográfias módszernél több oszlop közül választhat a kinyíló ablakban. A választáshoz többlet információkat az *Info* gombra kattintva, vagy a jegyzet korábbi pontjaiból kaphat. Az oszlop kiválasztása után a szükséges kiindulási oldószer összetételt és gradienst meghatározó végső értéket a következő ablakban adhatja meg. Az eredmény kromatogram formában jelenik meg, ahol az enzim azonosításra a *Fractions* menü *Assay enzyme activity* végezhető el és kiválaszthatóak a célfehérjénket

tartalmazó frakciók. Ezek kijelölhetők az összegyűjtéshez a *Fractions, Pool fractions* utasítással. A frakciók számának kiválasztása után a *Check* utasítással ellenőrizhető a lépés.

Egy lépés után a tisztaság ellenőrizhető, illetve a további lépések tervezéséhez adatok nyerhetők újabb 2D PAGE futtatással.

A feladat végén ideális esetben csak a célfehérje látható a 2D PAGE futtatás után.

Néhány feladat esetében előfordul, hogy az immunoblott után nem jelenik meg folt a 2D PAGE képen. Ennek oka lehet, hogy a fehérje izoelektromos pontja kívül esik a vizsgált tartományon. Ilyenkor az 1D PAGE segíthet a tisztítás követésében, a tervezésnél pedig tételezzük fel, hogy az izoelektromos pont nagyobb mint 9.

A lépések és eredmények összefoglalásáról kapott táblázatot és a tisztaságot igazoló PAGE eredményt mindenképpen illessze be a jegyzőkönyvbe.

A cél tehát minél kevesebb lépésből megtisztítani a fehérjét, ezért ne elégedjen meg részleges elválasztásokkal, igyekezzen optimalizálni a módszert a teljes elválásig.

P_H-POTENCIOMETRIA

1. BEVEZETÉS

A **potenciometria** olyan elektroanalitikai módszer, amely során egy elektrolitoldatba merülő két elektródból összeállított elektrokémiai cella elektródjai között fennálló potenciál-különbséget mérjük. Az elektródok felületén kialakuló elektródpotenciálok közvetlenül nem határozhatók meg, csak a két potenciál különbségének a regisztrálására van lehetőségünk. Az elektródpotenciál (E) és az azt kialakító elektroaktív komponens koncentrációja (c) (pontosabban aktivitása (a)) közötti összefüggést a Nernst-egyenlet írja le:

$$E = E_o + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}}$$

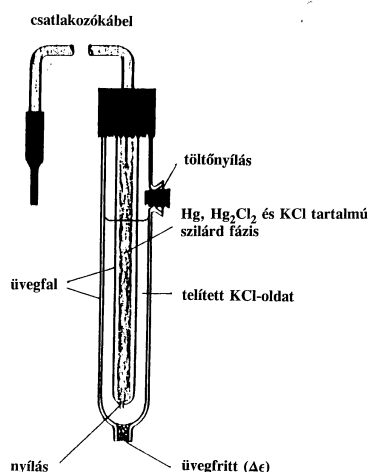
ahol E_o a standard elektródpotenciál, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, z az oxidált és redukált formák oxidációszámának a különbsége, F a Faraday-féle szám, míg c_{ox} illetve c_{red} a komponens oxidált illetve redukált formáinak a koncentrációja, ugyanis híg vizes oldatok esetén $c \approx a$ a feltételezésével a koncentráció értékek használhatók. Egy elsőfajú fémelektrod esetén (M fém merül M^{n+} ionokat tartalmazó oldatba) $c_{red} = 1$. Megállapodás alapján a hidrogénelektrod potenciálját 0,000 V-nak tekintjük, így elvileg bármelyik elektród potenciálja számszerűsíthető a megfelelő elektródokból összeállított elektrokémiai cella feszültségének a mérésével.

Ha a mérés során az egyik elektród potenciálját állandó értéken tartjuk és a másik elektród potenciálja a Nernst-egyenlet szerint függ a mérni kívánt komponens koncentrációjától, akkor az elektrokémiai cellán mért feszültség felhasználásával a keresett komponens koncentrációja meghatározható. Az állandó potenciálú elektródot referencia- (vonatkoztatási, viszonyító) elektródnak, míg a másikat indikátor- (mérő) elektródnak nevezzük.

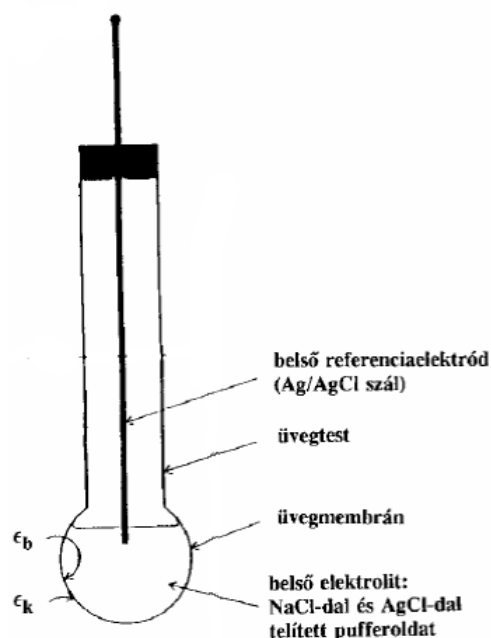
Referenciaelektrodként gyakran használnak ún. másodfajú fémelektrodot, amely egy fémből áll, amely rosszul oldódó sóját és a só anionjának egy jól oldódó sóját tartalmazó oldatba merül. Ilyenek például az **ezüst/ezüst-klorid** ($Ag/AgCl/KCl$) vagy a **kalomel** ($Hg/Hg_2Cl_2/KCl$) elektród (1. ábra). Ezeknek a másodfajú elektródoknak a potenciálja állandó (ha $[Cl^-] =$ állandó és $T =$ állandó).

Az **indikátorelektrod** fontos tulajdonsága, hogy gyorsan és reverzibilisen tudja változtatni a potenciálját a mérni kívánt ion koncentrációjának a változásával. Az indikátorelektrodok egyik fontos csoportját a **membránelektrodok** egy másikat pedig az *inert (nemes)fém* elektrodok alkotják.

A **membránelektrodok** ideális esetben csak egy adott ion vagy molekula mennyiségével arányos potenciált hoznak létre. Ez úgy alakul ki, hogy a membrán belső oldalán egy zárt térben referenciaoldat van, míg a membrán külső része a vizsgált oldattal érintkezik. A membrán belső és külső részén eltérő töltés alakul ki amely az ún. **membránpotenciált** eredményezi.



1. ábra: Kalomel elektrod



2. ábra: Hidrogénion-szelektív elektrod

Például a hidrogénion-szelektív elektrod (2. ábra) vékony üvegmembránt tartalmaz, amely belülről egy adott pH-jú referenciaoldattal érintkezik. Az elektrodot eltérő hidrogénion koncentrációjú (pH-jú) oldatokba helyezve a membrán külső oldalán eltérő potenciálok alakulnak ki, így az elektrod – mivel potenciálja megváltozik – felhasználható pH mérésre.

A potenciometriás méréseknek két területe ismert. Az ún. **direkt potenciometria** során a mérendő feszültség pontos értékére vagyunk kíváncsiak (amelyből a Nernst-egyenlet alapján a keresett mintabeli komponens koncentrációja közvetlenül meghatározható; pl. egy minta pH-jának közvetlen mérése). A **potenciometrikus titrálás** során a keresett

komponenst ismert koncentrációjú reagenssel visszük kémiai reakcióba és a titrálás során a mért feszültség értékeket a titrálószer térfogatának a függvényében ábrázolva titrálási görbét veszünk fel. A direkt potenciometria esetén fontos a mérőrendszer kalibrációja, amely általában kalibrációs egyenes felvételét jelenti a mérendő komponens koncentrációjának a meghatározása előtt. pH közvetlen mérésekor ($[H^+]$ meghatározása) ezt ismert pH-jú pufferoldatokkal végezzük. A potenciometrikus titrálások esetén az ekvivalenciaponthoz tartozó mérőoldat térfogatot keressük (a titrálási görbe inflexiós pontja), amelynek helyzete azonban nem függ a kalibrálástól, így itt a mérőrendszer külön hitelesítése nem szükséges.

2. PH-METRIÁS MÓDSZEREK

A pH az egyik leggyakrabban használt fogalom a kémiában. Az analitikai kémiában számos feladat során a pH beállítása és szabályozása alapvető fontosságú, ami szükségessé teszi a pH kellő pontosságú mérését. Ezen túlmenően, a savak, illetve bázisok koncentrációjának meghatározására gyakran a potenciometrikus titrálási módszerek csoportjába tartozó pH-metriás eljárást alkalmazunk. A pH-metriás titrálások során a titrált oldat pH-változását mérjük a titráló oldat térfogatának függvényében.

A pH-metriás módszer számos előnnyel rendelkezik a klasszikus, valamely indikátor színváltozásán alapuló sav-bázis meghatározásokkal szemben. Ez elsősorban arra vezethető vissza, hogy a pH-metriában általában a teljes titrálási görbe alapján történik a kiértékelés, míg a klasszikus módszerek esetében a görbe egy adott pontjához az ekvivalenciaponthoz tartozó térfogatot kívánjuk meghatározni. Az indikátorok alkalmazása szinte mindig elvi hibát okoz, mivel a színátcsapás pH-ja csak a legritkább esetben egyezik meg az ekvivalenciapont pH-jával. További gond, hogy az alkalmazott „detektorok” (szem) sokfélesége miatt a szubjektív hiba is jelentős lehet. Az ekvivalenciapont pontosabb meghatározásán túl a pH-metria a további előnyöket kínálja:

1. Ideális esetben a titrálási görbék jól definiált összefüggésekkel írhatók le. Az elméletileg várható görbealaktól való eltérés jelezheti egyrészt sav-bázis szennyeződések jelenlétét, másrészt a titrálás során valamely hiba bekövetkezését.

A titrálási görbék megfelelő matematikai eljárásokkal történő kiértékelésével többkomponensű sav-, illetve báziselegyek egyes komponenseinek koncentrációja meghatározható.

Szintén a numerikus feldolgozás előnyeit kihasználva (általában valamilyen módon a göbék deriváltjait előállítva) a viszonylag rosszul definiált inflexiós pontok is meghatározhatók. Azaz, viszonylag gyenge elektrolitok, illetve híg oldatok koncentrációja is meghatározható.

Gyenge elektrolitok esetében ugyanazon titrálási görbéből nemcsak a koncentráció, hanem a savi disszociációs állandó (pK_a) is meghatározható.

A módszer automatizálható. A gyakorlati élet különböző területein működő - ipari, orvosi, mezőgazdasági, stb. - laboratóriumok igényeit szem előtt tartva számos sorozatanalízisre alkalmas pH-metriás rendszert dolgoztak ki.

3. A PH-METRIÁS BERENDEZÉS

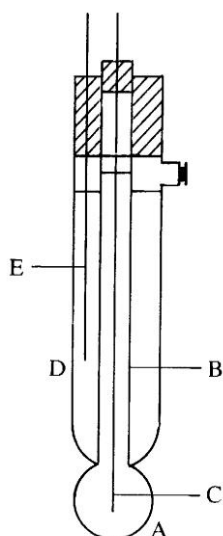
A legegyszerűbb pH-metriás mérőrendszer három fő alkotója a **pH-mérő**, a **hidrogénion-szelektív elektród** és egy **referenciaelektród**. A **pH-mérő** legegyszerűbb esetben egy voltmérő (vagy feszültségmérő), mely alkalmas a két elektród közötti elektromotoros erő megfelelő pontosságú mérésére. Igényesebb mérések esetén elvárás, hogy a pH-t legalább három tizedesjegy pontossággal tudjuk mérni. Miután a Nernst-egyenlet alapján a pH egységnyi változása kb. 59 mV-nak felel meg, ez azt jelenti, hogy a pH-mérőnek ~0,06 mV pontossággal kell mérnie. A pH-metria során a mérőrendszer ellenállását kellően nagyra tervezik (10^{12} - 10^{14} ohm), így az átfolyó áram mennyisége minimális, és jó közelítéssel az egyensúlyi potenciált mérjük.

Hidrogénion-szelektív elektródként általában üvegelektrodot használunk (2. ábra). Az elektród a speciális üvegmembrán két oldala közötti potenciálkülönbséget méri. A belső elektródtér pufferoldatot tartalmaz, így a belső felület potenciálja állandó. A pH-metriás titrálás során az üvegelektrodon mért potenciálváltozás a külső elektródfelületen kialakuló potenciálváltozással egyezik meg.

Referenciaelektródként másodfajú elektródot alkalmazunk. Az 1. ábra egy kalomel elektródot mutat be. A belső elektródtérben a szilárd felületen kialakuló potenciál mindaddig állandó, amíg az anion koncentrációja és a hőmérséklet állandó. Az elektród belső tere és a vizsgált oldat közötti elektromos vezetést egy porózus üvegfritt biztosítja, mely telítődik a belső elektrolitoldattal, valamint a vizsgált mintával. Gyakorlati szempontból ez az üvegfritt számos hiba forrása lehet. Amennyiben a titrálás során az oldat ionerőssége számottevően változik, az elektród ellenállása is változik és a vonatkoztatási elektród potenciálja nem tekinthető állandónak. Az ebből

fakadó hiba háttélelektrolit hozzáadásával, azaz állandó ionerősség beállításával küszöbölhető ki.

Az előzőekben leírtaknak ellentmondani látszik, hogy a pH-metriás mérések során a legtöbb esetben kettő helyett csak egy, úgynevezett kombinált üvegelektrodot használunk (3. ábra). Itt egy elektrodtestbe van beépítve az indikátor- és a referenciaelektrod. E megoldás vitathatatlan hátránya hogy törés esetén mindkét elektrod egyaránt használhatatlanná válik. Előnyt jelent viszont a kisebb helyigény és az elektrodok állandó geometriájú elrendezése.



3. ábra. Kombinált üvegelektrod

A – üvegmembrán;

B – Belső üvegszár, klorid tartalmú puffer oldattal

C – Ag/AgCl fémszál;

D – Külső üvegszár, kerámia csonkkal, AgCl-al telített KCl-oldattal;

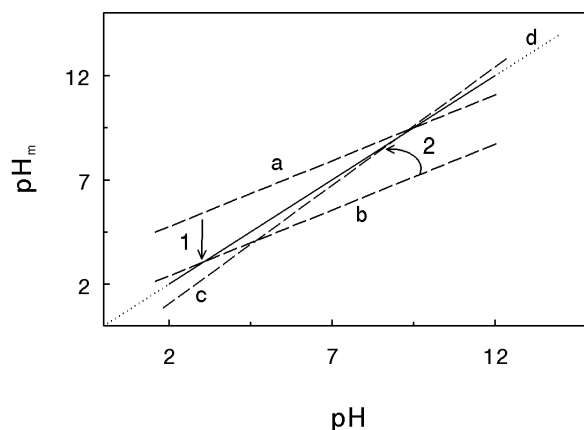
E – Ag/AgCl referenciaelektrod

4. A pH-METRIÁS BERENDEZÉS KALIBRÁLÁSA

A pontos pH-mérés alapfeltétele a mérés során alkalmazott elektródpar megbízható kalibrációja. A kalibráció célja annak elérése, hogy az elektród válaszfüggvénye minél szélesebb pH-tartományban 1-es meredekségű egyenes legyen (4. ábra). Egy jobbfajta elektród esetében ez a linearitás a

pH = 2,0 - 12,0 tartományban várható el. A kisebb és nagyobb pH-jú oldatokban számottevővé válik a sav-, illetve alkáli-hiba.

A gyakorlatban az egyik legelterjedtebb kalibrációs módszer az ún. kétpontos kalibráció. Ehhez két ismert pH-jú pufferoldatra van szükség. A puffereket úgy célszerű kiválasztani, hogy minél szélesebb pH-tartományt fogjanak át. Az egyik puffer gyakran $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ KH-ftalát oldat (pH=4,008, 25 °C-on). A másik puffer lehet például $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ bórox oldat (pH= 9,170, 25 °C-on). A kalibráció során előbb az első pufferoldatba merítjük az elektródot, és a pH-mérő megfelelő szabályozó-gombjával (általában PUFFER 1-nek jelölik) a kijelzőn beállítjuk az oldat pH-ját. Ilyenkor a válaszfüggvényt a függőleges tengely mentén toljuk el (4. ábra). Ezt követően az elektródot a második pufferbe merítjük és a második szabályozó gombbal (jelölése általában PUFFER 2, SENSITIVITY vagy SLOPE) beállítjuk a megfelelő pH-t a kijelzőn. Ez a művelet a válaszfüggvényt egy adott pont körül forgatja el.



4. ábra. Az üvegelektrod válaszfüggvényei
 a: kalibrálatlan üvegelektrod, b: a kalibrációs ciklus első lépése után
 c: a kalibrációs ciklus második lépése után, d: optimális válaszfüggvény
 (folytonos vonal)

A kalibráció két lépését mindaddig ismétljük, amíg az első pufferre történő beállítást követően a második puffer mért pH-ja megegyezik a várt értékkel. Modernebb készülékekben már automatikus a kalibráció, amikor a fenti kalibrációnak csak az első ciklusát kell elvégezni. A két pufferre mért adatokból a készülék automatikusan számítja, és beállítja az elméleti válaszfüggvénynek megfelelő paramétereit.

5. A GRAN-FÜGGVÉNYEK

A Gran-módszer a pH-metriás titrálási görbék egyenessé alakításán (linearizálás) alapuló kiértékelési eljárás. A kísérleti adatok transzformációját követően két egyenest kapunk melyek a vízszintes tengelyt az ekvivalenciapontban metszik. A levezetésekben alkalmazott jelölések:

C_S	a titrált oldat savkoncentrációja
V_0	a titrált minta térfogata
C_B	a titráló lúgoldat koncentrációja
V_B	a titráló lúgoldat térfogata
V_E	az ekvivalenciaponthoz tartozó térfogat

5.1 Egyértékű erős sav - erős bázis titrálási görbe kiértékelése

Ekvivalenciapont előtti tartomány

Az ekvivalenciapont előtti savfelesleg a következő összefüggéssel adható meg:

Figyelembe véve, hogy $[H^+] = 10^{-pH}$:

$$(V_0 + V_B) \cdot 10^{-pH} = (V_E - V_B) \cdot C_B$$

Amennyiben a fenti függvény bal oldalát a V_B függvényében ábrázoljuk egyenest kapunk, mely a vízszintes tengelyt V_E -ben metszi.

Ekvivalenciapont utáni tartomány

Ekvivalenciapont utáni lúgfelesleg a következőképpen adható meg:

Figyelembe véve, hogy $[\text{OH}^-] = K_v/[\text{H}^+]$ azaz $[\text{OH}^-] = 10^{\text{pH}-\text{p}K_v}$:

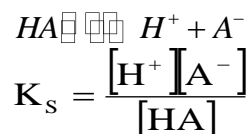
$$(V_0 + V_B) \cdot 10^{\text{pH}-\text{p}K_v} = (V_B - V_E) \cdot C_B$$

ahol K_v a vízion-szorzat.

Amennyiben a fenti függvény bal oldalát a V_B függvényében ábrázoljuk egyenest kapunk, mely a vízszintes tengelyt V_E -ben metszi.

5.2 Egyértékű gyenge sav - erős bázis titrálási görbe kiértékelése

A titrálás ekvivalenciapont előtti szakaszában a puffer-rendszerekre vonatkozó összefüggéseket kell alkalmaznunk. A gyenge sav disszociációja:



A savi és bázikus forma koncentrációja:

$$[\text{A}^-] = \frac{C_B V_B}{V_0 + V_B}$$

Az egyensúlyi koncentrációkat az előző összefüggésbe behelyettesítve és figyelembe véve, hogy $[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$:

$$V_B 10^{-\text{pH}} = (V_E - V_B) \cdot 10^{-\text{p}K_s}$$

Amennyiben a fenti függvény bal oldalát a V_B függvényében ábrázoljuk egyenest kapunk, mely a vízszintes tengelyt V_E -ben metszi.

Az egyértékű gyenge sav - erős bázis titrálási görbe ekvivalenciapont utáni szakaszának kiértékelése megegyezik az erős sav titrálási görbéjének kiértékelésével.

A Gran-függvények segítségével sokkal pontosabban meghatározható a titrálási görbék inflexiós pontja (az ekvivalenciapont), mint grafikus szerkesztéssel. Ezen túlmenően a kísérleti adatokból számolt Gran-függvények egyenestől való eltérése szennyeződések jelenlétét, illetve a pH-

metriás rendszer hibás működését jelezheti. A savas és lúgos ágból meghatározott ekvivalenciapontok hibahatáron túli eltérése szintén szennyeződések jelenlétére utal (pl. a KOH mérőoldat jelentősebb karbonát-szennyeződésére).

A Gran-függvények igen jól használhatók akkor, amikor a titrálási görbe teljes felvételére valamilyen ok miatt nincs lehetőség. Erre egy konkrét példa a fémionok oldataiban lévő szabad savtartalom meghatározása. Ekkor a titrálás előrehaladtával a fémion hidrolízise miatt csapadékleválás történik és a savtartalmat a titrálási görbe kezdeti szakaszából, az erős savakra vonatkozó Gran-függvényt alkalmazva extrapolálással határozzuk meg.

6. GYAKORLATI FELADATOK

Kötelezően elvégzendő gyakorlat előtti feladatok

a, Nézzen utána a KH-ftalát szerkezeti- és összegképletének, illetve keresse meg és a jegyzőkönyvébe jegyezze fel a KOH-dal lejátszódó reakció rendezett egyenletét.

b, Számítsa ki a bemérendő KH-ftalát mennyiségét.

c, Számítsa ki, hogy az egyes törzsoldatokból hány cm^3 -t kell bemérnie a titrálásokhoz.

d, A gyakorlatra készítse elő a jegyzőkönyvet, amely tartalmazza az elméleti bevezetőt, a gyakorlatok leírását/receptjét, azokhoz tartozó rendezett egyenleteket, a titráláshoz szükséges számításokat levezetve.

Megjegyzés: Amennyiben a hallgató felkészületlenül érkezik a gyakorlatra, tehát nincs előkészített jegyzőkönyve vagy a zh-t elégtelenre írja meg, abban az esetben a gyakorlatról a hallgató elégtelen gyakorlati jeggyel elküldhető.

6.1 0,05 mol/dm³ koncentrációjú KH-ftalát törzsoldat készítése

A szekrényben található egyik fiolából a pontosan bemért mennyiségű KH-ftalátot 100 cm³-es mérőlombikban kb. 70 ml desztillált vízzel feloldjuk, és a lombikot desztillált vízzel jelig töltve az oldatot 100 cm³-re hígítjuk majd homogenizáljuk. Az így készített 0,05 mol/dm³ koncentrációjú KH-ftalát törzsoldat kettős célt szolgál:

- 1.) Az elektród kalibrációjánál ez lesz az egyik standard puffer: **pH-ja pontosan 4,008** 25°C-on.
- 2.) Az oldat ismert térfogatú részletét lúggal titrálva határozzuk meg a titráló KOH oldat pontos koncentrációját.

6.2 Kb. 0,1 mol/dm³ KOH oldat pontos koncentrációjának meghatározása

A titráló lúg koncentrációját a KH-ftalát törzsoldat segítségével határozzuk meg. A rendelkezésre álló oldatokból 150 cm³-es főzőpohárban 100 cm³ mintát állítunk össze, melynek összetétele a következő:

KH-ftalátra legyen **0,005 mol/dm³** (A törzsoldat **0,05 mol/dm³** koncentrációjú.)

KCl-ra legyen **0,2 mol/dm³** (A törzsoldat **2 mol/dm³** koncentrációjú.)

Számolja ki, hogy az egyes törzsoldatokból hány cm³-t kell bemérnie. Ezután desztillált vízzel 100 cm³-re egészítse ki a mintát. A szükséges mennyiségű desztillált vizet mérőhengerrel mérje, hiszen a direkt potenciometriával ellentétben, titrálásnál nem az oldat abszolút koncentrációja fontos, hanem az edénybe bemért sav mennyisége.

Ezután gyakorlatvezető útmutatása alapján hozzuk kiinduló állapotba az automata bürettát, majd tegyük a főzőpoharat a mágneses keverő lapjára, helyezzük bele a lemosott keverőt és kombinált elektródot, valamint a bürettavéget úgy, hogy kb. 1 cm-re az is merüljön az oldatba, és indítsuk el a keverést. Néhány perc várakozás után, ha a kijelzőn stabilizálódott a pH értéke, jegyezzük azt le.

A mintát folyamatos kevertetés mellett KOH oldattal titráljuk. A titráló oldat adagolását a következők szerint végezzük:

0 - 3 ml között 0,5 ml-ként

3 - 6 ml között 0,2 ml-ként

6 - 8 ml között 0,5 ml-ként

Előbb a jegyzőkönyvben, majd egy számítógépes állományban is rögzítsük a cm^3 - pH adatpárokat (két oszlopban). Végül a számítógépes program (Gran-féle linearizáció) segítségével állapítsuk meg az ekvivalenciapontot. Az ehhez tartozó cm^3 érték a fogyás, aminek segítségével számoljuk ki a **titráló KOH oldat pontos koncentrációját** a tizedes vessző után négy értékes jeggyel.

6.3 Kb. $0,1 \text{ mol/dm}^3$ HCl oldat pontos koncentrációjának meghatározása

A rendelkezésre álló oldatokból 150 cm^3 -es főzőpohárban 100 cm^3 mintát állítunk össze, melynek összetétele a következő:

HCl: kb. $0,005 \text{ mol/dm}^3$

KCl: $0,2 \text{ mol/dm}^3$

Ezután az előbb ismertetett módon végezzük el a titrálást, de most más adagolási menetrend szerint:

0 - 4 cm^3 között $0,5 \text{ cm}^3$ -ként

4 - 6 cm^3 között $0,2 \text{ cm}^3$ -ként

6 - 8 cm^3 között $0,5 \text{ cm}^3$ -ként

Rögzítsük a cm^3 - pH adatpárokat, és számítsuk ki a fogyást, majd abból a titráló KOH oldat pontos koncentrációjának ismeretében **a palackban lévő ismeretlen koncentrációjú sósav törzsoldat pontos koncentrációját** négy értékes jeggyel.

6.4 Sósav-ecetsav savkeverék koncentrációjának meghatározása

A rendelkezésre álló oldatokból 150 cm^3 -es főzőpohárban 100 cm^3 mintát állítunk össze, melynek összetétele a következő:

HCl: kb. $0,003 \text{ mol/dm}^3$

Ecetsav: kb. $0,003 \text{ mol/dm}^3$

KCl: $0,2 \text{ mol/dm}^3$

A mintát folyamatos kevertetés mellett KOH oldattal titráljuk. A titráló oldat adagolását a következők szerint végezzük:

0 - 8 cm^3 között $0,2 \text{ cm}^3$ -ként

Ábrázoljuk a titrálási görbét. Határozzuk meg a két komponens koncentrációját egyrészt a megfelelő Gran-függvények segítségével, másrészt a differenciagörbe felvételével. A differenciagörbe felvételéhez számítsuk ki a szomszédos titrálási pontokhoz tartozó $\Delta pH/\Delta V_B$ -értékeket, valamint a titráló lúg szomszédos pontokhoz tartozó átlagtérfogatát (\bar{V}_B). Ábrázoljuk, és értelmezzük a $\Delta pH/\Delta V_B - \bar{V}_B$ függvényt.

7. ÚTMUTATÓ A PH-METRIÁS MÉRÉSEK KIVITELEZÉSÉHEZ

Mindegyik készüléknél hárompontos kalibrációt végzünk az európai szabványnak megfelelően **4,01** ; **6,86** és **9,18**-as pH-jú pufferekkel. Az első puffer a hallgatók által elkészített $0,05 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú KH-ftalát oldat, a másik kettő külön edényben rendelkezésre áll.

ABU büretta + Thermo Orion 2 Star pH-mérő



1. ábra: Készülék felépítése

Az elektród használatával kapcsolatos tudnivalók

- Az elektród mérésen kívül 1 M-os KCl-oldatban áll, így az üvegmembrán két oldalán ugyanaz az oldat található. Ebben az esetben ugyanis nincs ionvándorlás, az üvegmembrán „nyugalmi” állapotban van.
- Az elektród szárának felső részén **töltőnyílás (2. ábra)** található, amit a mérések kezdetén ki kell nyitni és csak a gyakorlat végén visszazárni a gumidugóval.



2. ábra: töltőnyílás

- Az elektród tisztítása bő, folyó desztillált vizes mosással történik, majd szűrőpapírral való törléssel, a membrán felületén óvatos mozdulatokkal, inkább leitatva a nedvességet, a dörzsölést kerülnék.
- A Thermo Orion 2 Star pH-mérő elektródja szárának alsó részén található **üvegfritt (3. ábra)** biztosítja az átjárást a külső és belső oldatok között (fehér kis pötty), ennek kell feltétlenül a mintaoldatba érni. Új mintába helyezés előtt az elektródot le kell tisztítani.



3. ábra: üvegfritt

- Kerüljük el, hogy az elektród a levegőn álljon, ezáltal kiszáradjon és az üvegfrittre szilárd KCl só üljön ki. Szintén kerüljük el, hogy a titrálás végén, az erősen lúgos oldatban álljon az elektród hosszabb ideig.
- Titrálás előtt a berendezés összeállítása során ügyeljünk rá, hogy a főzőpohár belső falához a keverőmagon kívül semmi ne érjen, az elektród, a lúgbevezető kapilláris és a mágneses keverőmag se érintkezessen egymással.

Kalibrálás

- Az elektród lemosása és törlése után a Thermo Orion 2 Star pH-mérőt (**4. ábra**) bekapcsoljuk (**felső középső gomb**), a 4,005-ös pH-jú pufferrel kezdjük a kalibrálást, a **Calibrate** gomb megnyomásával, ha már nem villog a *pH* kijelzés (egyensúly beállítását jelenti), akkor ugyanezzel a gombbal el kell fogadni a kijelzett pH-értéket. Ezután a sorban a következő pufferekbe merítjük a letisztított elektródot és ugyanígy járunk el.



4. ábra : Orion 2 Star pH-mérő (**bekapcsoló gomb**, **Calibrate**)

- A kalibrálás végén a műszer kijelzi a Slope (SLP) értékét, aminek 100%-hoz közeli értéknek kell lennie, valamint a pH(0) értékét. Az érzékenység (SLP) értékét fel kell jegyezni, pár pillanat múlva eltűnik a kijelzőről.

Bürettahasználat

- A készülék (5. ábra) jobb alsó részén található **billenő kapcsolóval** bekapcsoljuk a készüléket.
- A **Closed** gomb kiengedésével kezdjük. Ha a készüléken a READY lámpa világít, akkor a készülék mérésre készen áll.
- A fekete színű **Refill** gomb rövid ideig tartó megnyomásával feltölti a bürettát (lehetséges némi fáziskésés, türelemmel várjunk kb. 20-30 másodpercet). A fogaskerekes szelep ekkor átáll töltő állásba, azaz a lúgtartály és a büretta van összekötve, a dugattyú lefelé mozog. Ha megtelt a büretta, a szelep újra visszaáll adagoló állásba, ekkor a büretta az adagoló kapillárisal van összeköttetésben, a dugattyú felfelé fog mozogni.
- Ezt követően a szürke színű **Tit.** feliratú gomb nyomva tartásával lehet az üvegkapillárison át adagolni a lúgoldatot. A gyakorlat elején a bürettát levegőmentesíteni kell, tehát a bürettát az adagolóval összekötő vezetékben nem lehet buborék (a vezeték nem jól átlátható, minimum 4 ml lúgoldatot kell kiengedni a bürettából).
- A bürettát újból feltöltjük, a számlálót nullázzuk a **Counter Reset** gombbal, leöblítjük és letöröljük a lúgadagoló kapillárist és a végét az oldatba helyezzük 1 cm mélyen.



5. ábra : ABU buretta (bekapcsoló billenő kapcsoló, Closed, Refill, Titr., Counter Reset)

- A készülék összeállítása során ügyeljünk rá, hogy a főzőpohár belső falához a keverőmagon kívül semmi ne érjen, az elektród, a lúgbevezető kapilláris és a mágneses keverőmag egymással se érintkezhessen.
- A keverőt áram alá helyezzük és elindítjuk a kevertetést (intenzív legyen, de ne keltsen örvényt az oldatban).
- A kiindulási pH ($V = 0$ mL) leolvasását követően hozzáadjuk az első, *gyakorlati leírásban feltüntetett* térfogatú mérőoldatot: az előírt térfogathoz minél közelebbi mennyiséget engedünk a mintánkba. A számlálón a piros háromszög jelzi a tizedesvesszőt. Kerüljük el a rövid, szakaszos lúgadagolást, helyett **egyetlen hosszú gombnyomással** engedjük ki a mérőoldat-adagot. A **pontosan leolvasott** térfogat feljegyzése a fontos, nem a jól megközelített előírt térfogat. A számlálón két tizedesjegyre szereznek a számjegyek, azonban a harmadik tizedesjegyet is meg kell becsülni az alapján, hogy a második tizedesjegy két számjegye között hol állt meg az adagolás.
- A titrálás egy szakaszán az egyensúly beállása lassabb, ekkor 2 perc várakozás után le kell olvasni a kijelzett értéket és folytatni a következő lúgtérfogat hozzáadásával.
- A titrálás befejezésével feltöltjük a bürettát.
- A gyakorlat végén benyomjuk a **Closed** gombot is, a letisztított elektródot visszatesszük az 1 M-os KCl oldatba, visszazárjuk a töltőnyílást, az üvegapillárist a lúgtartály folyadékszintjéig emeljük és főzőpoharat teszünk alá, kikapcsolunk minden készüléket és áramtalanítjuk a keverőt.

Dosimat büretta + Metrohm pH-mérő

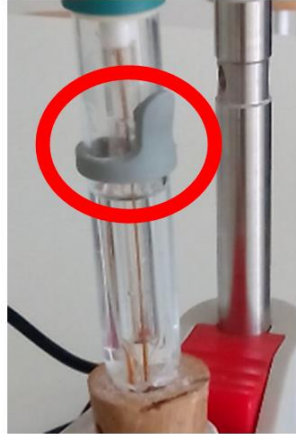
Az elektród használatával kapcsolatos tudnivalók

- Az elektród mérésen kívül 1 M-os KCl-oldatban áll, így az üvegmembrán két oldalán ugyanaz az oldat található. Ebben az esetben ugyanis nincs ionvándorlás, az üvegmembrán „nyugalmi” állapotban van.



1. ábra: Készülék felépítése

- Az elektród szárának felső részén **töltőnyílás (2. ábra)** található, amit a mérések kezdetén ki kell nyitni és csak a gyakorlat végén visszazárni a gumidugóval.



2. ábra: Töltőnyílás

- Az elektród tisztítása bő, folyó desztillált vizes mosással történik, majd szűrőpapírral való törléssel, a membrán felületén óvatos mozdulatokkal, inkább leitatva a nedvességet, a dörzsölést kerüljük.
- A Metrohm pH-mérő elektródja szárának alsó részén található **üvegfritt (3. ábra)** biztosítja az átjárást a külső és belső oldatok között (fehér kis pötty), ennek kell feltétlenül a mintaoldatba érni. Új mintába helyezés előtt az elektródot le kell tisztítani.



3. ábra: üvegfritt

- Kerüljük el, hogy az elektród a levegőn álljon, ezáltal kiszáradjon és az üvegfrittre szilárd KCl só üljön ki. Szintén kerüljük el, hogy a titrálás végén, az erősen lúgos oldatban álljon az elektród hosszabb ideig.
- Titrálás előtt a berendezés összeállítása során ügyeljünk rá, hogy a főzőpohár belső falához a keverőmagon kívül semmi ne érjen, az elektród, a lúgbevezető kapilláris és a mágneses keverőmag se érintkezessen egymással.

Kalibrálás

- Metrohm pH-mérőknél (4. ábra): A **piros gomb** megnyomásával történő bekapcsolás után a **CAL** gomb megnyomásával elkezd a kalibrálást. Rákérdez, hogy az elektródot belemerítettük-e a pufferbe – **OK**. Ezután a hőmérsékletet lehetne állítani, az alapértelmezett 25,0 °C-t fogadjuk el – **OK**. Ezt követően kiírja a pH-értéket, amire kalibrál, az ajtó felőli készülék *növekvő pH sorrendjében* kéri a pufferoldatokat. Az egyensúly beállítását (a *drifting* felirat és a függvény eltűnését) követően **OK** gomb megnyomásával fogadjuk el. A pH-mérő ekkor kéri a következő puffereket, melyekkel hasonlóan kell eljárni. Ebben az esetben az egyes pufferekre mért feszültség (mV) értékeket is feltünteti a készülék.



4. ábra : Metrohm pH-mérő (bekapcsoló gomb, CAL, OK)

- A kalibrálás végén a műszer kijelzi a Slope (SLP) értékét, aminek 100%-hoz közeli értéknek kell lennie, valamint a pH(0) értékét. Az érzékenység értékét fel kell jegyezni, pár pillanat múlva eltűnik a kijelzőről.

Bürettahasználat

- A készülék (5. ábra) elején található piros **Fill** feliratú kapcsolóval bekapcsoljuk a készüléket.



5. ábra: Dosimat büretta

- A készülék automatikusan feltölti a bürettát, melyet a büretta előtti szelep mozgása mutat. A szelep ekkor ugyanis átáll töltő állásba, azaz a lúgtartály és a büretta van összekötve, a dugattyú lefelé mozog. Ha megtelt a büretta, a szelep újra visszaáll adagoló állásba, ekkor a büretta az adagoló kapillárisal van összeköttetésben, a dugattyú felfelé fog mozogni.
- Ezt követően a zöld színű **GO** feliratú gomb nyomva tartásával lehet a lúgbevezetőn keresztül adagolni a lúgoldatot. A gyakorlat elején a bürettát levegőmentesíteni kell, tehát a bürettát az adagolóval összekötő vezetékben nem lehet buborék. Előfordulhat, hogy több ml mérőoldat hozzáadása és többszöri „megpöccentés” után a vezeték falán mégis marad pici buborék, ami nem mozdul, ekkor a titrálást elkezdhetjük, de folyamatosan figyelni kell, hogy nem került-e a mintába a buborék.
- A bürettát feltöltjük a **Fill** feliratú gomb megnyomásával, a feltöltés befejezése után még egyszer megnyomva a **Fill** gombot a számláló

nullázódik, majd leöblítjük és letöröljük a lúgadagoló kapillárist és a végét az oldatba helyezzük 1 cm mélyen.

○ A készülék összeállítása során ügyeljünk rá, hogy a főzőpohár belső falához a keverőmagon kívül semmi ne érjen, az elektród, a lúgbevezető kapilláris és a mágneses keverőmag egymással se érintkezessen.

○ Elindítjuk a kevertetést (intenzív legyen, de nem keltsen örvényt az oldatban).

○ A kiindulási pH ($V = 0$ mL) leolvasását követően hozzáadjuk az első, a *gyakorlati leírásban feltüntetett* térfogatú mérőoldatot: az előírt térfogathoz minél közelebbi mennyiséget engedünk a mintánkba. Kerüljük el a rövid, szakaszos lúgadagolást, ehelyett **egyetlen hosszú gombnyomással** engedjük ki a mérőoldat-adagot. A **pontosan leolvasott** térfogat feljegyzése a fontos, nem a jól megközelített előírt térfogat.

○ A titrálás egy szakaszán az egyensúly beállása lassabb, ekkor 2 perc várakozás után le kell olvasni a kijelzett értéket és folytatni a következő lúgtérfogat hozzáadásával.

○ A titrálás befejezésével feltöltjük a bürettát.

○ A gyakorlat végén visszazárjuk az elektród töltőnyílását, a letisztított elektródot visszatesszük az 1 M-os KCl oldatba, a lúgadagoló vezetékét a műanyag tokjába, és kikapcsolunk minden készüléket. A titrátort a **Fill** gomb hosszan történő megnyomásával kapcsoljuk ki.

Titrino buretta + Metrohm pH-mérő

Az elektród használatával kapcsolatos tudnivalók



1. ábra: Készülék felépítése

- Az elektród mérésen kívül 1 M-os KCl-oldatban áll, így az üvegmembrán két oldalán ugyanaz az oldat található. Ebben az esetben ugyanis nincs ionvándorlás, az üvegmembrán „nyugalmi” állapotban van.
- Az elektród szárának felső részén **töltőnyílás (2. ábra)** található, amit a mérések kezdetén ki kell nyitni és csak a gyakorlat végén visszazárni a gumidugóval.



2. ábra: Töltőnyílás

- Az elektród tisztítása bő, folyó desztillált vizes mosással történik, majd szűrőpapírral való törléssel, a membrán felületén óvatos mozdulatokkal, inkább leitatva a nedvességet, a dörzsölést kerüjük.
- A Metrohm pH-mérő esetén az elektród műanyag bevonattal és „lábakkal” van ellátva, ami a tisztítást megnehezítheti, így körültekintőbben kell eljárni; az üvegmembrán és a lábak között is ki kell öblíteni az előző mintából származó maradékot és szűrőpapírral kiitatni a vízcseppeket.
- A Metrohm pH-mérő esetén a műanyag lábacsok feletti fekete sávnak kell feltétlenül a mintaoldatba érni. Új mintába helyezés előtt az elektródot le kell tisztítani.
- Kerüjük el, hogy az elektród a levegőn álljon, ezáltal kiszáradjon és az **üvegfrittre (3. ábra)** szilárd KCl só üljön ki. Szintén kerüjük el, hogy a titrálások végén, az erősen lúgos oldatban álljon az elektród hosszabb ideig.



3. ábra: Üvegfritt

- Titrálás előtt a berendezés összeállítása során ügyeljünk rá, hogy a főzőpohár belső falához a keverőmagon kívül semmi ne érjen, az elektród, a lúgbevezető kapilláris és a mágneses keverőmág se érintkezessen egymással.

Kalibrálás

- Metrohm pH-mérőknél: A **piros gomb** megnyomásával történő bekapcsolás után a **CAL** gomb megnyomásával elkezdődik a kalibrálás. Rákérdező, hogy az elektródot belemerítettük-e a pufferbe – **OK**. Ezután a hőmérsékletet lehetne állítani, az alapértelmezett 25,0 °C-t fogadjuk el – **OK**. Ezt követően kiírja a pH-értéket, amire kalibrál, az ablak felőli készülék **csökkenő pH sorrendjében** kéri a pufferoldatokat. Az egyensúly beállítását (a *drifting* felirat és a függvény eltűnését) követően **OK** gomb megnyomásával fogadjuk el a kiírt pH-értéket. A pH-mérő ekkor kéri a

következő puffereket, melyekkel hasonlóan kell eljárni. Ebben az esetben az egyes pufferekre mért feszültség (mV) értékeket is feltünteti a készülék.

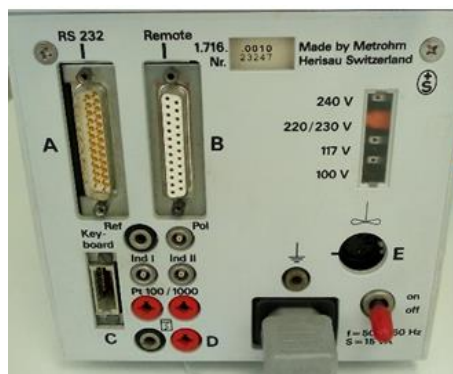
○ A kalibrálás végén a műszer kijelzi a Slope (SLP) értékét, aminek 100%-hoz közeli értéknek kell lennie, valamint a pH(0) értékét. Az érzékenység (SLP) értékét fel kell jegyezni, pár pillanat múlva eltűnik a kijelzőről.



4. ábra : Metrohm pH-mérő (bekapcsoló gomb, CAL, OK)

Bürettahasználat

○ A készülék hátulján található **piros billenő kapcsolóval** (5. a ábra) bekapcsoljuk a készüléket.



5.a ábra: Titrimetric burette

- A készülék automatikusan feltölti a bürettát, melyet a büretta alatti szelep mozgása mutat. A szelep ekkor ugyanis átáll töltő állásba, azaz a lúgtartály és a büretta van összekötve, a dugattyú lefelé mozog. Ha megtelt a büretta, a szelep újra visszaáll adagoló állásba, ekkor a büretta az adagoló kapillárisal van összeköttetésben, a dugattyú **DOS** felfelé fog mozogni.
- Ezt követően a készüléken (**5. b ábra**) feliratú gomb nyomva tartásával lehet a lúgbevezető kapillárison keresztül adagolni a lúgoldatot. A gyakorlat elején a bürettát levegőmentesíteni kell, tehát a bürettát az adagolóval összekötő vezetékben nem lehet buborék. Előfordulhat, hogy több ml mérőoldat hozzáadása és többszöri „megpöccentés” után a vezeték falán mégis marad picit buborék, ami nem mozdul, ekkor a titrást elkezdhetjük, de folyamatosan figyelni kell, hogy nem került-e a mintába a buborék.




5. b ábra: Titrino büretta

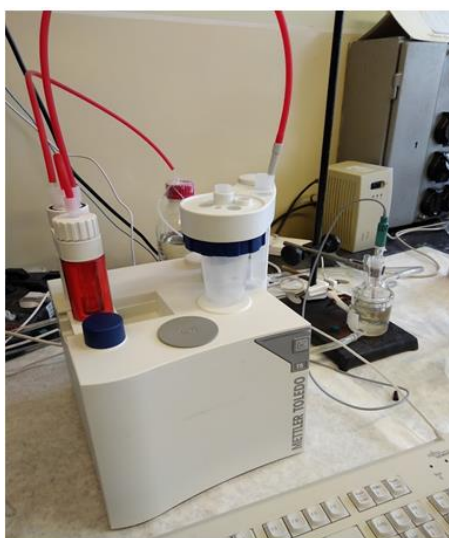
- A bürettát **STOP/FILL** feltöltjük a feliratú gomb megnyomásával, a számláló automatikusan nullázódik, majd leöblítjük és letöröljük a lúgadagoló kapillárist és a végét az oldatba helyezzük 1 cm mélyen.
- A készülék összeállítása során ügyeljünk rá, hogy a főzőpohár belső falához a keverőmagon kívül semmi ne érjen, az elektród, a lúgbevezető kapilláris és a mágneses keverőmag egymással se érintkezessen.
- Elindítjuk a kevertetést (intenzív legyen, de nem keltsen örvényt az oldatban).
- A kiindulási pH ($V = 0$ mL) leolvasását követően hozzáadjuk az első, a gyakorlati leírásban feltüntetett térfogatú mérőoldatot: az előírt

térfogathoz minél közelebbi mennyiséget engedünk a mintánkba. Kerüljük el a rövid, szakaszos lúgadagolást, ehelyett **egyetlen hosszú gombnyomással** engedjük ki a mérőoldat-adagot. A **pontosan leolvasott** térfogat feljegyzése a fontos, nem a jól megközelített előírt térfogat. Az **adagolás** sebességét 2-3 mL/perc közé kell állítani, míg a **feltöltés** sebessége 7-9 mL/perc közötti érték legyen, ezt a dV/dt alatti gomb segítségével kell szabályozni.

- A titrálás egy szakaszán az egyensúly beállása lassabb, ekkor 2 perc várakozás után le kell olvasni a kijelzett értéket és folytatni a következő lúgtérfogat hozzáadásával.
- A titrálás befejezésével feltöltjük a bürettát.
- A gyakorlat végén visszazárjuk az elektród töltőnyílását, a letisztított elektródot visszatesszük az 1 M-os KCl oldatba, a lúgadagoló vezetékét a műanyag tokjába, és kikapcsolunk minden készüléket.

Mettler T5 készülék (1. ábra)**Bekapcsolása:**

1. A számítógépen a LabX 2017 megnyitása, meg kell várni amíg, betölt.
2. Ezután a Mettler T5 titrátoron megnyomni a  bekapcsoló gombot.
3. A vezérlő panelen (2. ábra) a buretta felismerő ablak felugrásánál megnyomni az **OK** gombot.

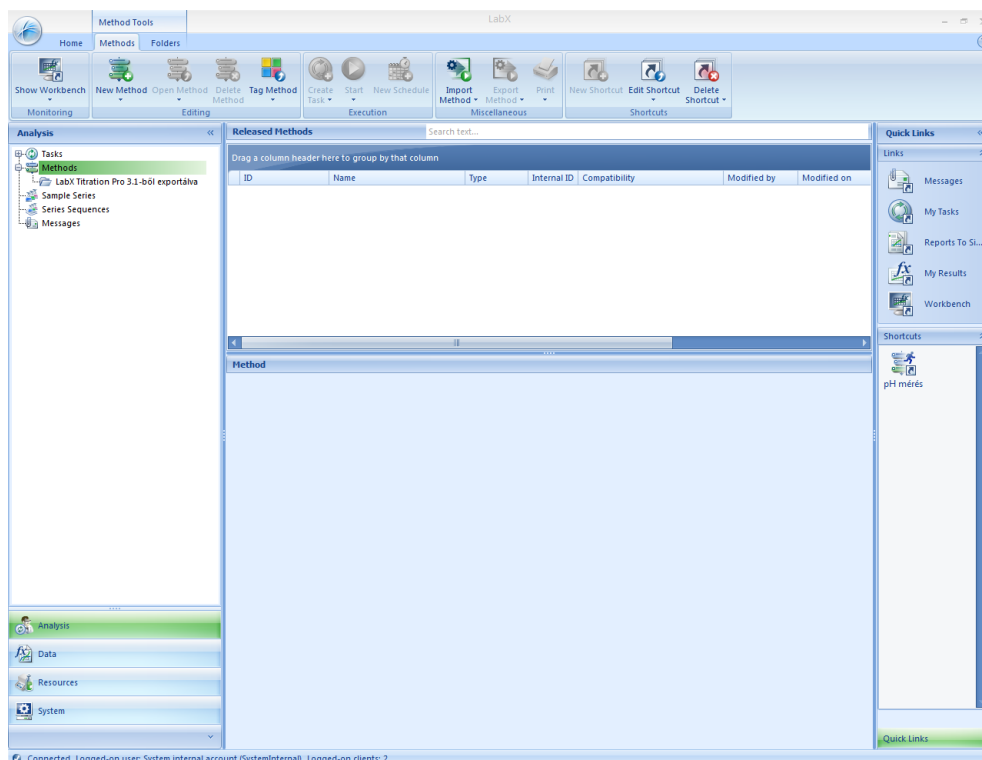


1. ábra: Mettler T5 titrátor





2. ábra: Mettler T5 titrátor vezérlő panele

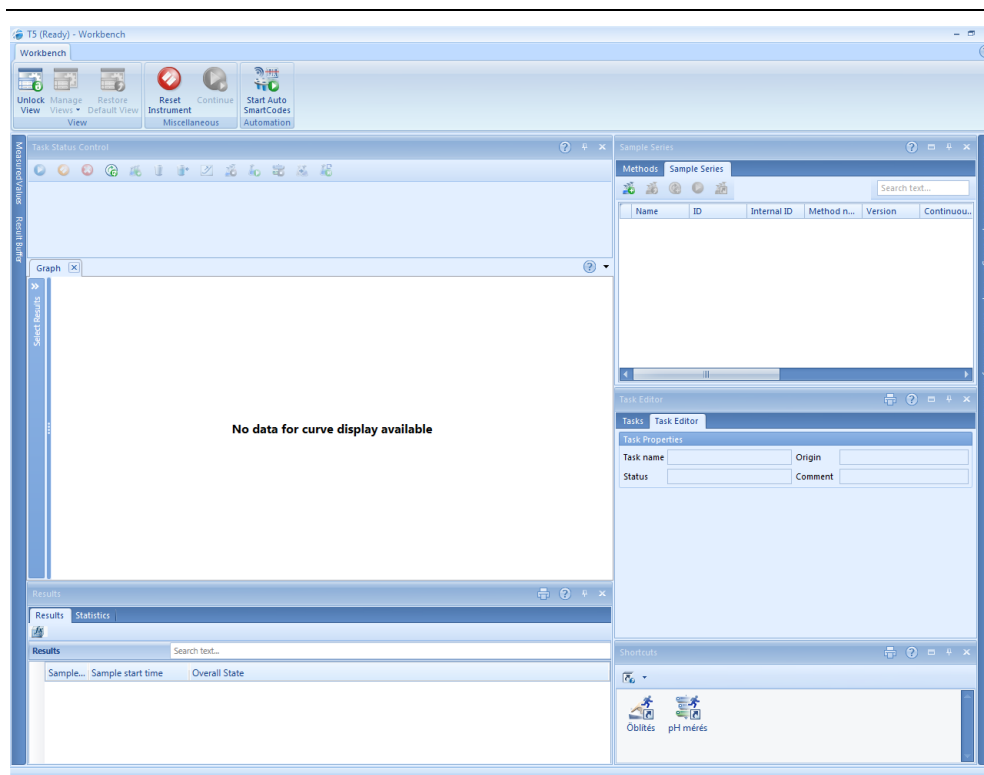
A szoftver megnyitása után megjelenik a **Method Tools** (3. ábra) ablak.



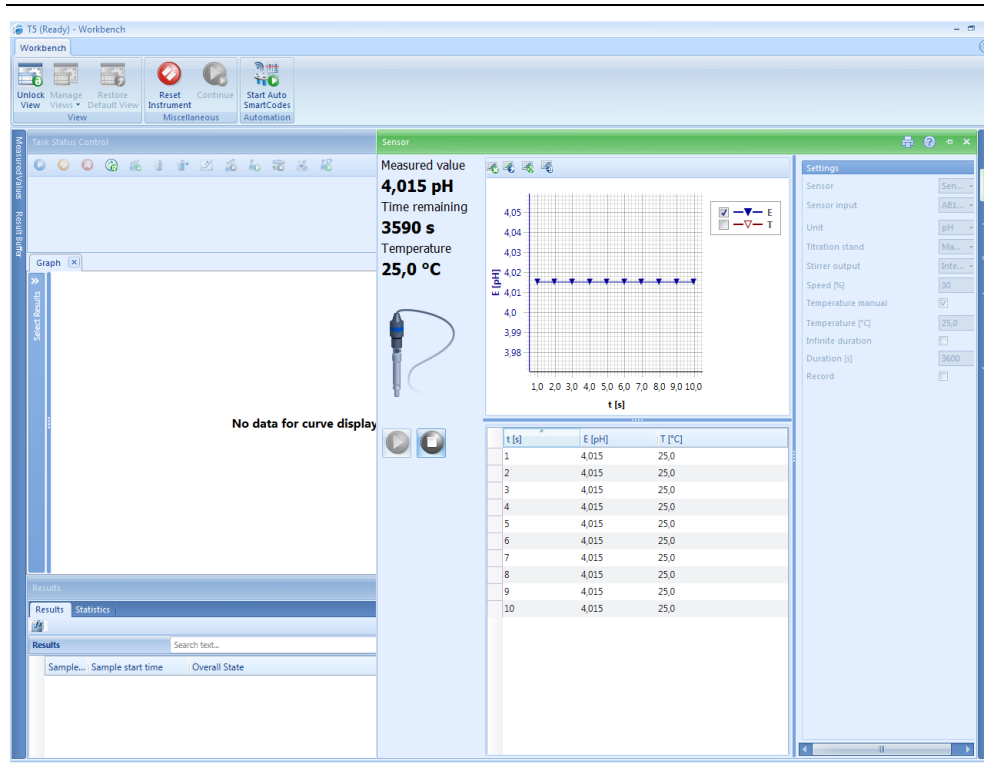
3. ábra: Method Tools

Kálium-hidrogén-ftalát (Ø) puffer oldat pH-jának mérése:

Show workbench-re egyszer kattintani bal egér gombbal, majd a legördülő menüben T5-re kattintani egyszer. Ekkor megjelenik a **Workbench** (4. ábra) ablak. Ezen az ablakon belül a jobb oldali függőleges menüsorból ki kell választani a Sensor-t. Ezen a fülön belül meg kell nyomni a -gombot, ekkor elkezd mérni a pH-t (5. ábra). A vezérlő panelen és a számítógépen is mutatja a pH-mérést. 20 perc elteltével le lehet állítani a pH-mérést a -gombbal.



4. ábra: Workbench

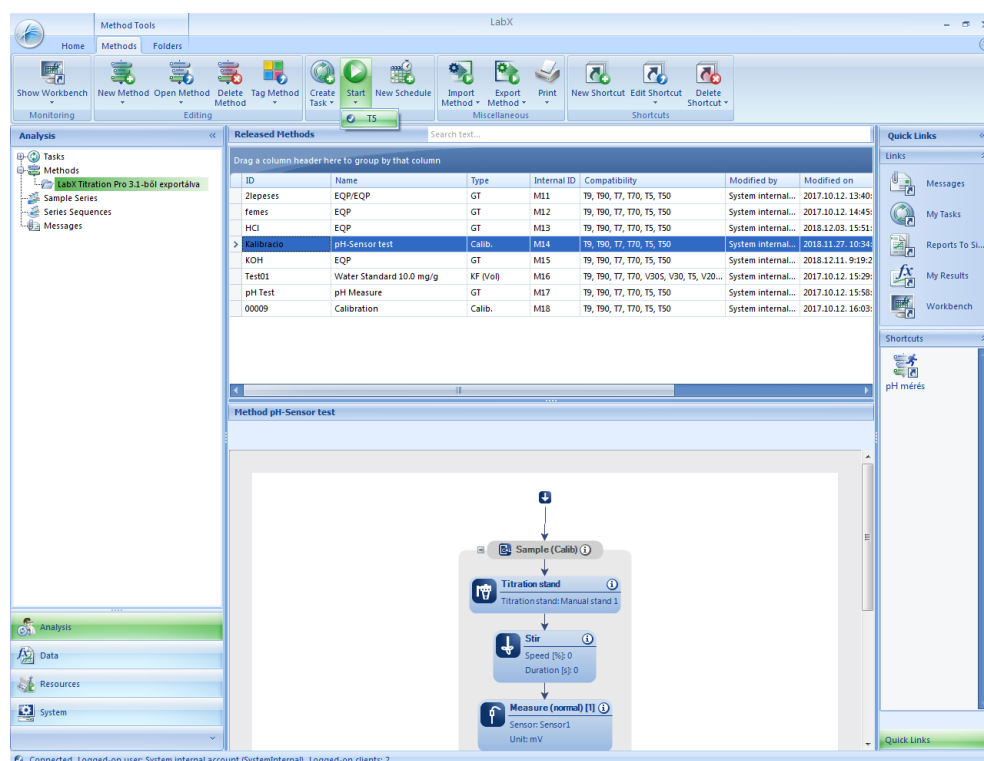


5. ábra: pH mérése a Workbench-ben a Sensor fülön

Elektród kalibrálása:

Method Tools ablakban

Methods/LabX Titration Pro 3.1-ből exportálva fülre kattintani, ekkor megjelenik a mérési módszerek, ezek közül a *kalibráció* nevűt kell választani vagyis egyszer kell rá kattintani, hogy ki legyen jelölve, majd a Start gombra kattintani, ezután T5-re (6. ábra). Felugrik egy Task Editor ablak és itt is meg kell nyomni a Start gombot ezután OK. 1,5 percig méri a feszültséget/potenciált. A mérés végén felugrik egy Sample Completed ablak, ezt le kell OK-ni. Vissza lehet mérni a pH-t hogy tényleg 4,008. Ezt a Sensor fülön (lásd pH-mérés) lehet megtenni, elég csak egy ellenőrzés erejéig megnézni.



6. ábra: Kalibráció

Titrlás menete:


1. lépés: Ki kell cserélni a mintát a mérendő komponensre (ez lehet, sav, lúg, ligandum, fémek rendszer).
2. Lúgbevezető buborékmentesítése

Workbench/Burette

Itt kétféleképpen lehet: a, Rinse: Az a beállítási lehetőség, ahol azt lehet megadni, hogy hányszor ismétlje az adagolást és a buretta térfogatának hány %-át adagolja.

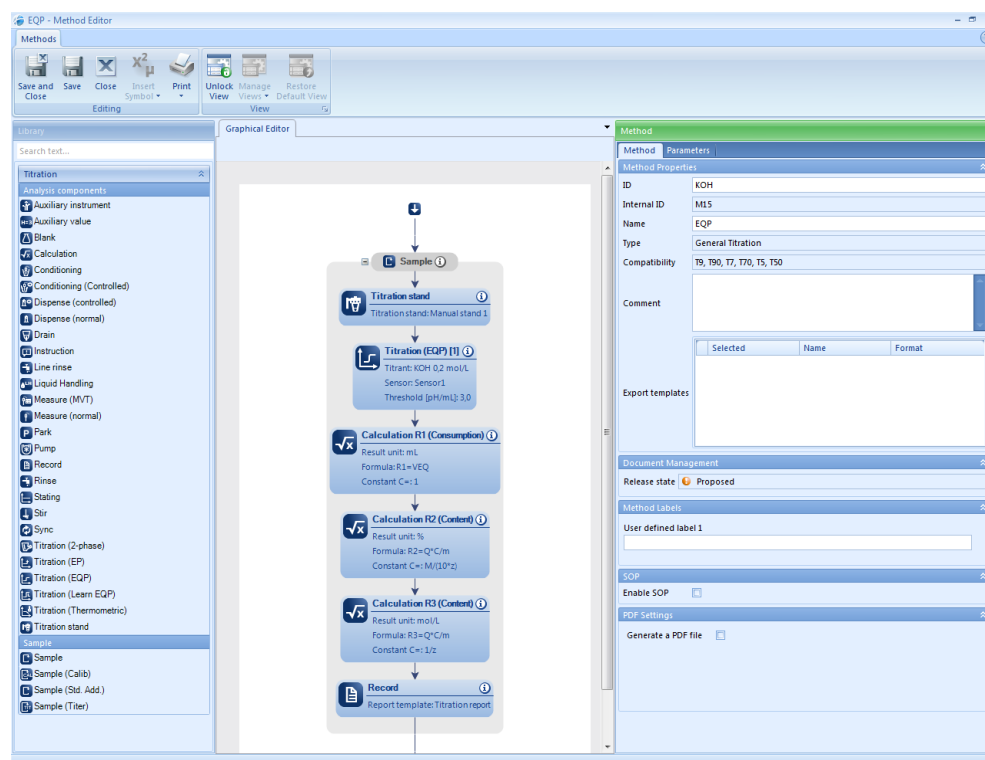
b, Dispense: Itt az adagolt térfogat mennyiségét lehet beállítani.

Adagolás közben a buborékok eltávolítását szakszerű pöcögtetéssel kell eltávolítani. Ezután a lúgadagolót a mintába kell helyezni és ki lehet támasztani egy gumidugóval, hogy titrálás közben ne mozduljon el. Ezután csatlakoztatni kell a gázbevezető csövet.

3. pH-mérés újra a Sensor fülön (lásd pH-mérésnél), 10-15 percig mérni a pH-t, közben míg a rendszernél beáll az egyensúly be lehet állítani a méréshez a paramétereket. Ha letelt a 10-15 perc, akkor le lehet állítani a pH-mérést a -gombbal.

4. Mérési paraméterek beállítása a **Method Tools** ablakban lehetséges.

Duplán kell kattintani arra a Method-ra, amit használni akarunk. Ezután látható a Method Editor folyamatábra (7. ábra).



7. ábra: Method Editor folyamatábra

A Titration (EQP) [1] buborékra kell egyszer kattintani, ekkor az zöld színűre vált. Ilyenkor lehet jobb oldalon a Parameters fülön (8. ábra) elvégezni a beállításokat.

The screenshot displays the EQP Method Editor interface. The central graphical editor shows a sequence of steps: 'Sample', 'Titration stand' (Manual stand 1), 'Titration (EQP) [1]' (highlighted in green), 'Calculation R1 (Consumption)' (Formula: $R1 = VEQ$, Constant $C = 1$), 'Calculation R2 (Content)' (Formula: $R2 = Q \cdot C / m$, Constant $C = M / (10^2)$), 'Calculation R3 (Content)' (Formula: $R3 = Q \cdot C / m$, Constant $C = 1/2$), and 'Record' (Report template: Titration report).

The 'Parameters' panel on the right is active, showing the following settings:

- Temperature acquisition:** Temperature acquisition (checkbox), Stir (checkbox), Speed [Hz] (0)
- Predispense:** Mode (None), Wait time [s] (0)
- Control:** Control (User), Titrant addition (Incremental), dv [mL] (0,05), Mode (Fixed time), dt [s] (90)
- Evaluation and Recognition:** Procedure (Standard), Threshold [pH/mL] (3,0), Tendancy (None), Ranges (0), Add. EQP criteria (No)
- Termination:** At V_{max} [mL] (5,0), At potential (checkbox), Potential [pH] (11,5), Termination tendency (None), At slope (checkbox), After number of recognized EQPs (checkbox), Combined termination criteria (checkbox)
- Accompanying Stating:** (checkbox)

8. ábra: Parameters fül

1. táblázat: Paraméterek beállítása a titrálás megkezdése előtt

		KOH ($V_{\text{össz}}=25$ ml, $c(\text{O})=0,01$ M)	HCl ($V_{\text{össz}}=25$ ml, $c(\text{HCl})=8 \cdot 10^{-3}$ M)	Ligandum	Fémes rendszernél
Mehtod		KOH	HCl	HCl	femes
Control					
Adagolás	dV [ml]	0,05	0,05	számítani!	számítani!
	Mode	Fixed time	Fixed time	Fixed time	Equilibrium controlled
	dE [mV]	-	-	-	0,1
Várakozási idő	dt [s]	90	120	120	90
	t(min) [s]	-	-	-	120
	t(max) [s]	-	-	-	300-1800 (rendszerfüggő)
Termination					
	Potential [pH]	11,5	11,6	11,5	11,0

Ha változtattunk a módszerben, akkor a végén a Save and Close gombra kattintani.

- Mérés elindítása: A beparaméterezett módszer ki legyen jelölve, ez úgy tehető meg, hogy egyet kattintunk a módszerre. Ezután Start/T5, Task Editor ablak felugrik, majd Start/OK. Mérés követése a **Workbench** ablakban lehetséges, de a panelen is követhető.

Adatmentés:

LabX 2017 programban a mérés végén megjelenik az Enter Sample Size, ide 1-et beírni, majd Enter és még egyszer Enter (Ezt be lehet írni a panelen, de a számítógépen lévő szoftverben is.)

Ezután: LabX/Data/My Latest Results, duplán kell kattintani a kívánt adatsor mentéséhez, ekkor megjelenik egy Results Editor ablak, Measured Values fülre kattintani, adatsor kijelölése Ctrl+A-val, Ctrl+C és bemásolni Ctrl+V-vel egy üres Excel fájlba. Csak a V, pH egységekre van szükség, a többit lehet törölni, majd mentés másként a pendrive-ra. Ha kész be kell zárni a Results Editor-t a Close gombbal.

Készülék kikapcsolása:

A vezérlő panelen kell leállítani az alábbi menüpontokon keresztül:

1. A titrálás befejezésével a panelen kétszer meg kell nyomni az OK gombot.
2. Ezután önmagától visszalép a fő menübe, ahol az alábbi gombokat kell megnyomni a kilépéshez: Exit/Offline/Shut down

Útmutató a pH-metriás mérések kiértékeléshez

A fentebb leírt mérések kiértékelése és az ábrázolások számítógép segítségével történnek. A programot kimondottan erre a célra írták MATLAB programnyelven. A mérőrendszer és a számítógép között sajnos nincs on-line kapcsolat, ezért a méréseket a hagyományos módon el kell végezni, és az eredményeket lejegyezni.

A programot a „*pH-metria Windows*” feliratú Matlab ikonnal indíthatjuk el. A program nem csak DOS alatt futó .ph kiterjesztésű fájlt, hanem Excelt is be tud olvasni. Az adatrögzítés az Excel-fájl legelső munkalapján (worksheet, fül) a bal felső sarokban kezdve kell rögzíteni a titrálási adatokat két oszlopban. A cellákba számokat kell írni (a Windows alapbeállításától függően tizedesvesszőt illetve tizedespontot használva). Az egyes titrálási pontok között nem lehet üres vagy érvénytelen sor, mert az a titrálás végét jelezné a programnak.

	Például:		illette:	
		A B		A B
V_0	1 100 akármi		1 100 akármi	
v1 pH1	2 0 4,014		2 0 4.014	
v2 pH2	3 0,5 4,262		3 0.5 4.262	
stb...	

Itt V_0 a kezdeti oldattérfogat cm^3 -ben kifejezve, v1, v2, .. a bürettafogyás, pH1, pH2, ... pedig a mért pH-érték.

A titrálási adatok beolvasása:

1.) Először válassza a "Load the data of titration" menüpontot.

2.) Válassza a "from Excel-file" almenüt.

3.) A navigáló ablakban keresse meg, és nyissa meg a kérdéses fájlt.

Ennek hatására bezárul az Excel-állomány, a titrálási adatok bekerülnek a programba, megjelennek a képernyő jobboldalán, továbbá a titrálási görbe és differencia-hányadosának rajza is láthatóvá válik. Ha az ábrán kiugró pontot lát, akkor hasonlítsa össze a beolvasott és a jegyzőkönyvében rögzített adatokat. Az esetek többségében ezt elgépelés, hibásan lejegyzett vagy kihagyott számjegy okozza. Javítsa az Excel-fájlban a hibás adatot, mentse a változásokat, majd a "Delete or Exit" és "Delete the data of titration from memory" menüpontokat választva a programot alapállapotba hozva megismételheti a beolvasást.

Az ekvivalencia-pont meghatározása:

Az ábra felett található legördülő menüből kiválaszthatja a három Gran-függvényt (1-2-3) – az első függvény az erős sav-erős bázis titrálásra vonatkozó Gran-függvény ekvivalenciapont előtti szakasza, a második erős bázissal történő titrálások ekvivalenciapont utáni szakasza, a harmadik gyenge sav-erős bázis titrálások Gran-függvényének ekvivalenciapont előtti szakasza –, a differencia-hányadost (5), annak reciprokát (4) vagy a savas és lúgos tartományra levezetett Gran-függvények kombinációját erős illetve gyenge sav esetére (6-7). Kiválasztásuk után az ábrán ezek grafikonjai is megjelennek (skálafelirat nélkül).

1. $(V_0+V) \cdot 10^{-pH}$ a hozzáadott titrálószer térfogatának (V) függvényében

$(V_0+V) \cdot 10^{pH}$ a hozzáadott titrálószer térfogatának (V) függvényében

$V \cdot 10^{-pH}$ a hozzáadott titrálószer térfogatának (V) függvényében

dV/dpH a hozzáadott titrálószer térfogatának (V) függvényében

dpH/dV a hozzáadott titrálószer térfogatának (V) függvényében

Ha Gran-függvényt választott, akkor a legördülő menü felett egy vagy két "nyomógomb" is megjelenik. Ha ráklikkel, majd az egeret mozgatva az ábra felé viszi a kurzort, akkor a kurzor nagy szátkeresztté válik, aminek segítségével egy intervallumot jelölhet ki a megfelelő Gran-függvényen (az X-tengelyen). Az intervallumot úgy jelölheti ki, hogy a megfelelő szélső pozíciókban lenyomja az egér valamelyik gombját.

Ha legalább két titrálási pont található a kiválasztott intervallumban, akkor a Gran-függvény kiválasztott pontjait kitöltött markerek jelzik. A Gran-függvény megfelelő pontjaira egyenest illeszt a program, aminek zérushelyét (tengelymetszetét) tekinti ekvivalencia-pontnak. Ha ez a titrálási tartományba esik, akkor az illesztett egyenest és az ekvivalencia-pont helyét

is megjeleníti, és értékét kiírja a képernyő jobb felső sarkába, viszont ellenkező esetben nem történik semmi. Persze az intervallumot helyesen kell megválasztania, hogy reális becslést kapjon.

A nyomógombra klikkelve a kiválasztást többször ismételheti. Az elfogadhatónak tartott ekvivalencia-pont értékeket jegyezze le a jegyzőkönyvébe. Ha az ábrát is meg kívánja őrizni, akkor a Windowsban megszokott módon az "Alt+PrintScreen" billentyűkombinációval az aktív ablak képét vágólapra viheti, és Excelbe vagy Wordbe másolhatja.

Ha befejezte a munkát, akkor a "Delete or Exit" menüpont segítségével törölheti a memóriából a titrálási görbe adatait, vagy kiléphet a programból. Ha véletlenül bezárja a program ablakát, vagy megszakad a program futása, akkor a Matlab interpreter aktív marad, ezért annak ablakát is be kell még zárnia, vagy a ">>" prompt után beírva a "granwin" szót, az Enter lenyomásával újraindítható a program:

SPEKTROFOTOMETRIA

A gyakorlaton bemutatott és alkalmazott Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotometriás készülék a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával került beszerzésre.

1. A FÉNYELNYELÉSRŐL

A spektroszkópia és azon belül a spektrofotometria az egyik legelterjedtebb anyagvizsgálati módszer. Elterjedtségét elsősorban a viszonylag egyszerű és könnyen hozzáférhető műszerezettségének köszönheti, hiszen napjainkban már alig képzelhető el olyan laboratórium ahol ne lenne legalább egyszerűbb spektrofotométer.

Az elektromágneses sugárzás, legyen szó akár a nagy energiájú γ -sugarakról vagy a kis energiával rendelkező rádióhullámokról, kölcsönhatásba léphet az adott anyaggal. Ez a kölcsönhatás abszorpción (az elnyelt fény hozza létre a gerjesztett állapotot) vagy sugárzáson egyaránt alapulhat (emisszió - a gerjesztett atomok bocsátanak ki energiát). Az elektromágneses sugárzás és a különböző anyagi részecskék kölcsönhatásán alapuló spektroszkópiai módszereket az alábbi táblázatban tüntettük fel:

Táblázat 1. Spektroszkópai módszerek.

Hullámhossz-tartomány		Sugárzás és anyag kölcsönhatása	Analitikai módszer
Gamma	0,5 – 10 pm	Magátmenetek	Mössbauer-spektroszkópia
Röntgen (X-ray)	0,01 – 10 nm	Belső elektronátmenetek (ionizáció)	Röntgenspektroszkópia
Távoli ultraibolya (FUV)	10 – 180 nm	Vegyértékelektronok gerjesztése	Spektrofotometria
Ultraibolya (UV)	180 – 350 nm		
Látható (VIS)	350 – 780 nm		
Közeli infravörös (NIR)	780 – 1000 nm	Rezgési és forgási átmenetek	IR-spektroszkópia
Infravörös (IR)	1 – 30 μ m		
Távoli infravörös (FIR)	30 – 300 μ m	Forgási átmenetek	
Mikrohullámok	0,3 mm – 1 m	Forgási átmenetek, elektronspin átmenetek	Mikrohullámú spektroszkópia
Rádióhullámok	1 – 300 m	Magspin átmenetek	NMR

A fényelnyelés a régebbi megfogalmazás szerint a két Bohr-féle posztulátummal értelmezhető. Az atom ill. molekula stacionáriusan csak meghatározott energiájú állapotokban lehet. Amíg a részecske ezen állapotok egyikében van, fényt nem bocsát ki és nem nyel el. Fénykibocsátás vagy elnyelés csak a két stacionárius állapot közti átmenetnél lehetséges. A kisugárzott vagy elnyelt foton rezgésszáma és a molekula ill. atom két energiaállapota közötti összefüggés az Einstein-féle ekvivalencia elvben jut kifejezésre:

$$E_1 - E_2 = h\nu = hc/\lambda \quad (h - \text{Plank állandó, } \nu - \text{frekvencia, } \lambda - \text{hullámhossz})$$

A Bohr-féle elmélet az energia változásokat önkényesnek látszó posztulátumokkal magyarázta meg. A később kifejlődött kvantummechanikai tárgyalásmód jelentősége abban van, hogy az elektronpályák kvantálásának Bohr-féle posztulátumait matematikailag megalapozta.

Az atomok spektrumánál a molekulák spektruma lényegesen bonyolultabb, mivel ez utóbbiak elektronjai két vagy több mag erőterében mozognak. A molekula energiaállapotát az elektronok energiaállapota (E_{el}) az atomok rezgési (E_v) és forgási állapota (E_r) együtt szabja meg.

$$h = E_1 - E_2 = (E_{el,1} - E_{el,2}) + (E_{v,1} - E_{v,2}) + (E_{r,1} - E_{r,2})$$

A molekulák haladó mozgása nem kvantált így ez figyelmen kívül hagyható. A három fenti energiaérték közül az elektron energiaváltozása a legnagyobb, nagyságrendileg 1 – 10 eV, azaz 125 nm – 1250 nm hullámhosszúságú fotonnak felel meg. A rezgési és forgási energia változásának megfelelő frekvencia az infravörös (1 – 50 μm) ill. a távoli infravörös és mikrohullámú (> 50 μm) tartományba esik. Ezek az energiaértékek nem függetlenek egymástól, az elektron energiaváltozása megváltoztatja a rezgési és forgási energia értékét is.

Az abszorpciós színeképeket az esetek túlnyomó többségében híg oldatban vizsgáljuk. Ez közelíti meg legjobban a kölcsönhatásmentes és így ideálisnak tekinthető kisnyomású gáz állapotát. Ilyen körülmények között folytonos spektrum keletkezik, a különböző kölcsönhatások eredményeként egymáshoz képest igen sűrűn elhelyezkedő vonalak összemosódnak. A spektrumban jelentkező maximumok egy-egy sávrendszernek felelnek meg, kivételes esetekben egyes sávok külön maximumként is jelentkezhetnek.

A sávok és sávrendszerek helyéből a vegyület ill. kötéstípusokat lehet azonosítani, az abszorpciós sávok intenzitásából pedig a fényútba eső molekulák számára, illetve koncentrációjára lehet következtetni. Az abszorpció értékéből a koncentrációt a Lambert-Beer törvény alapján lehet kiszámítani.

Ha I_0 intenzitású monokromatikus fénynyaláb a közeg l cm vastagságú rétegén áthaladva I intenzitásra csökken, akkor a Lambert-féle törvény értelmében: $I/I_0 = 10^{-\beta l}$ vagy más alakban írva: $\beta = 1/l \cdot \log(I_0/I)$, ahol β a közeg Bunsen-féle abszorpciós (régébbi szóhasználat szerint extinkciós) koefficiense; ami annak a rétegvastagságnak a reciprok értékével egyenlő, amelyen áthaladva a fényintenzitás eredeti értékének tizedrészére csökken. A kifejezésben l a rétegvastagságot jelöli. Beer törvénye szerint, ha az oldószer nem mutat szelektív abszorpciót, az abszorpciós koefficiens a következő összefüggésben van a koncentrációval: $\beta = \varepsilon \cdot c$, ahol ε a moláris abszorbancia (extinkciós koefficiens), ha az l értékét cm-ben, a koncentrációt mól/dm^3 -ben adjuk meg. A moláris abszorbancia adott hullámhosszon független a koncentrációtól és az anyag minőségére jellemző állandó. A fenti összefüggések alapján a Lambert-Beer törvény a következő alakú:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

2. A SPEKTROFOTOMETRIÁS MÓDSZEREK

Az egyik legrégebbi fényelnyelésen alapuló analitikai módszer a kolorimetria. A módszer fényfelbontást nem igényel, a referenciát és a mintát polikromatikus fényvel világítjuk meg. Az ismeretlen koncentrációjú színes anyag adott rétegvastagságú oldatát ugyanazon anyag ismert koncentrációjú oldatával hasonlítjuk össze. Ez utóbbinak a rétegvastagságát vagy a koncentrációját addig változtatjuk, míg a két oldat „optikai sűrűsége” azonos lesz. Pl. ha a két oldat különböző koncentrációjú, akkor a rétegvastagságot addig kell változtatni, amíg azonos fény mennyiség abszorbeálódik a két rétegben. A Lambert-Beer törvény érvényessége esetén a rétegvastagságok a koncentrációval fordítva arányosak.

A legegyszerűbb fotometriás módszer esetében fényszűrővel szűrt, közelítőleg monokromatikus fény halad át a vizsgálandó oldaton, valamint a tiszta oldószeren. Az abszorbanciát a két intenzitás összevetéséből kapjuk.

Ma már a legtöbb esetben a teljes spektrum felvételére alkalmas spektrofotométereket használnak.

A spektrofotometria módszerénél a fényt egy monokromátor – prizma vagy rács – segítségével bonthatjuk színeképre. A monokromatikus fénysugarat az oldaton illetve az oldószeren engedjük át, az áthaladt fény intenzitását valamilyen detektorral (fotoelektron-sokszorozó, diódasor stb.) mérjük. Az abszorpciós spektrumból az anyag szerkezetére, az atomok és molekulák sajátosságaira, komplexek szerkezetére stb. kapunk információt.

Az abszorpciós spektrum felvételét analitikai célból a következő szempontok indokolják:

1. Kvalitatív vizsgálatok:

a) Azonosítást végezhetünk a spektrum alapján. Két anyagot akkor tekintünk azonosnak, ha abszorpciós színeképük teljes egészében megegyezik egymással.

b) A abszorpciós színekép alapján igen egyszerűen eldönthető egy-egy anyag tisztasága ill. szennyezettsége. A szennyezettség meghatározásánál ügyelni kell arra, hogy nem minden szennyezőre egyforma a kimutathatóság határa. A szennyező szelektív abszorpciójának a mértéke a vizsgált hullámhossz tartományban meghatározza a kimutathatóság értékét.

2. Kvantitatív vizsgálat:

a) Abszorpciós mennyiségi meghatározások kidolgozásánál igen fontos a mérés hullámhosszának helyes megválasztása. Az abszorpciós sávnak (maximumnak) nem az emelkedő vagy csökkenő szakaszán, hanem a maximumán kell mérnünk. Itt ugyanis a legkisebb a rendszeres hibának az a része, amely a hullámhossz pontatlan beállításából és a résszélesség változásából ered. Kis koncentrációjú anyagok, ún. nyomszennyezők vizsgálatánál nagy abszorbanciát mutató sávhelyet választunk ki, így nagyobb érzékenységet érhetünk el. A differenciálspektrofotometria-módszer esetében viszont „széles, lapos” maximumot ill. elnyelési sávot választunk ki a főkomponens meghatározására.

b) Ha több anyag keverékéből valamelyik komponens meghatározása a cél, a zavaró hatások kiküszöbölésénél nagy segítségünkre lehet az egyes komponensek abszorpciós spektrumának ismerete.

c) Több komponensű rendszer mennyiségi meghatározását is elvégezhetjük az abszorpciós spektrumok intenzitásának mérése alapján. A klasszikus spektrofotometria módszerének relatív hibája 1 – 5%, így elsősorban a kis koncentrációban jelenlevő ún. nyomszennyezések meghatározására használják. Az utóbbi időben kidolgozták a differenciál spektrofotometria

módszerét, amivel egy nagyságrenddel nagyobb pontosságot lehet elérni. Ez a módszer már főkomponensek meghatározására is alkalmas. A módszer relatív hibája 0,1 – 0,5%.

A spektrofotometria módszerének előnye nagy érzékenysége, nagy pontossága, rendkívüli egyszerűsége, gyorsasága, kis anyagigénye. A módszer általában még akkor is alkalmazható, ha az anyag egy adott spektrális területen nem mutat szelektív abszorpciót, mert redukálva, oxidálva, vagy komplexet képezve vele már szelektív abszorpciót mutathat.

A módszer hátránya, hogy hozzávetőlegesen tudnunk kell, mik a meghatározandó komponensek. Adott spektrofotometriás módszer alkalmazhatóságát más analitikai módszerekkel kell ellenőrizni. Így a spektrofotometria használata akkor előnyös, ha sorozatmérésekre alkalmazzuk.

3. A SPEKTROFOTOMÉTER

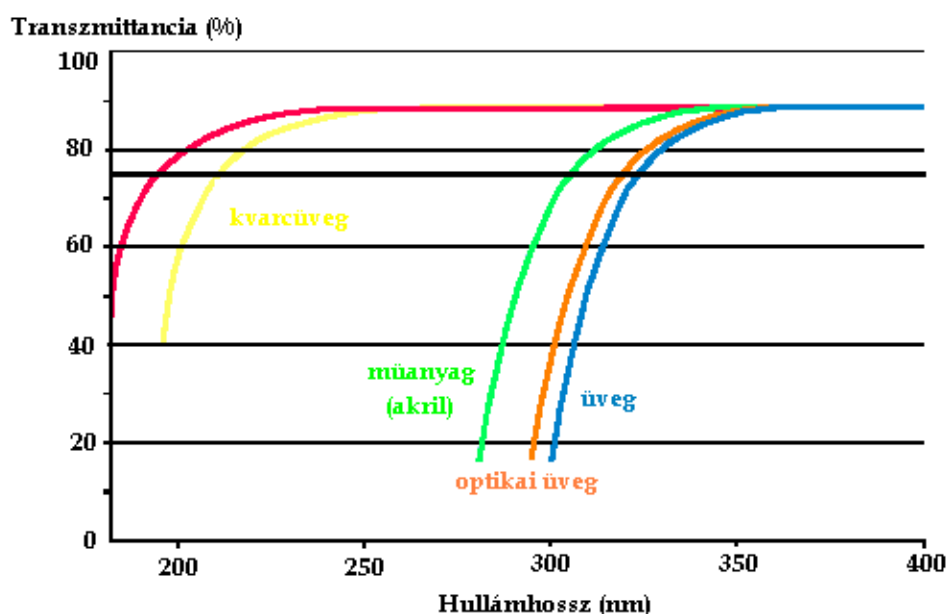
A spektrofotométer olyan optikai berendezés, amellyel a gyakorlatilag monokromatikus fény intenzitását illetve az intenzitás változását nagy pontossággal mérni lehet. A spektrofotométereket több szempontból osztályozhatjuk. Az egyik felosztás, a mérés hullámhossz tartománya szerint ismerünk ultraibolya, látható és infravörös tartományban mérő spektrofotométereket. A másik felosztás, a fényelbontás módja szerint prizmás és rácisos spektrofotométereket. További felosztás, a működési elv illetve a felépítés szerint megkülönböztetünk egysugaras, kétsugaras, valamint szakaszosan működő és folyamatosan működő automatikusan regisztráló spektrofotométereket. A mindennapi gyakorlatban a leggyakrabban kétsugaras és diódasoros fotométerekkel találkozhatunk.

A spektrofotométer fő részei:

- sugárforrás
- mintatér
- monokromátor
- detektor, erősítő
- kijelző rendszer (számítógép)

A sugárforrás a látható fény tartományában wolfram lámpa, az UV tartományban általában hidrogén (újabbán deutérium) lámpa, az infravörös tartományban globár izzó (SiC) vagy Nernst izzó (ritkaföldfémoxid keverék). Nagyon fontos a fűtőáram feszültségének stabilitása, különösen az egysugaras készülékeknél (lásd később).

Mintatérként különböző hosszúságú (0,1 – 10 cm) és kialakítású üveg, kvarc, ritkábban műanyag küvettákat használnak. Érdeemes megjegyezni, hogy némely műanyagból készült küvetta egész jó optikai tulajdonságokkal rendelkezik (pl. áteresztés) így alkalmas a közeli UV-tartományban spektrofotometriás mérések kivitelezésére (1. ábra) mindemellett az ilyen küvetták ára több nagyságrendekkel lehet olcsóbb (pl. egy jó minőségű kvarc küvetta ára 25.000 – 35.000 forint körül van, de 100 darab műanyag küvetta ára mindössze csak 1800 – 2500 forint). Lényeges, hogy a küvetták fény útjába kerülő oldalai egymással párhuzamosak, a fénynyalábra merőlegesek legyenek, egymástól mért távolságuk pontosan meghatározott legyen (a Lambert-Beer törvényben ez utóbbi az úthossz, l).



1. ábra. Különböző anyagból készült küvetták transzmittanciája a hullámhossz függvényében.

A monokromátor a fényforrás összetett fényének felbontására ill. a kívánt hullámhosszúságú (közel) monokromatikus fény kiválasztására szolgál. A prizmás készülékek a fénytörés hullámhosszfüggésén (a prizma a fehér fényt elemeire bontja, a prizma kismértékű forgatásával elérhetjük, hogy a kívánt hullámhosszúságú fény jusson ki a kilépő résen), míg a rácsos monokromátorok a diffrakció ill. interferencia jelenségén alapulnak. Az optikai rácsról visszaverődő fénysugarak interferenciájának következtében

minden hullámhosszra más szögben lesz erősítés, így a prizmahoz hasonló színfelbontást kapunk. A különbség annyi, hogy a ráccsal előállított spektrum egyenletes lépésközű, míg a prizmánál a felbontás a kék tartomány felé nagyobb, a vörös felé kisebb. A kiválasztott hullámhosszúságú fényt itt is a rács elfordításával juttathatjuk a kilépő részre (pl. egészen jó optikai rács a CD vagy DVD felülete). A prizmás készülékek általában fényerősek, de hátrányuk, hogy a különböző hullámhossztartományokban a felbontóképességük nem azonos, így a mai modern készülékekben már ritkán használják. Monokromatikus fény előállítására interferenciaszűrő is használható. Az ilyen szűrő lehet pl. üvegre párologtatott vékony dielektrikumréteg-rendszer, amelyen a rétegvastagságtól függő interferencia következtében szűk hullámhossztartományra van áteresztés a többi visszaverődik.

Detektorként fotocellát, fotoelektronsokszorozót, diódasort használhatnak. A fotocellát napjainkban inkább hordozható vagy egyéb műszerekhez detektorként kapcsolt spektrofotométerekben használják. A fotomultiplierek általában széles hullámhossztartományban használhatók, és a zajszintjük is kedvezőbb. A diódasoros detektor előnye a gyorsaság és széles tartományban érvényes linearitás. Hátrány viszont a kisebb érzékenység.

3.1 Egysugaras spektrofotométerek

Ezek a készülékek is alapvetően két típusra oszthatók: közvetlen kitérésű és kompenzációs elven működő berendezésekre. A közvetlen kitérésű egysugaras készülékeknél (pl. Spekol) a fényintenzitással arányos elektromos jel elektronikus erősítés után közvetlenül kerül kijelzésre. A referencia-oldatot a fényútba helyezve kell nullázni a műszert ($T\% = 100$, $A = 0$), majd a mintát helyezve a fényútba ehhez képest mérjük a fényintenzitás csökkenését. E készüléktípus előnyei az olcsóság, egyszerű felépítés, legtöbb esetben kis méret, kevés hibaforrás. Sorozatelemzésekhez, gyári, gyártásközi elemzésekhez jól használható.

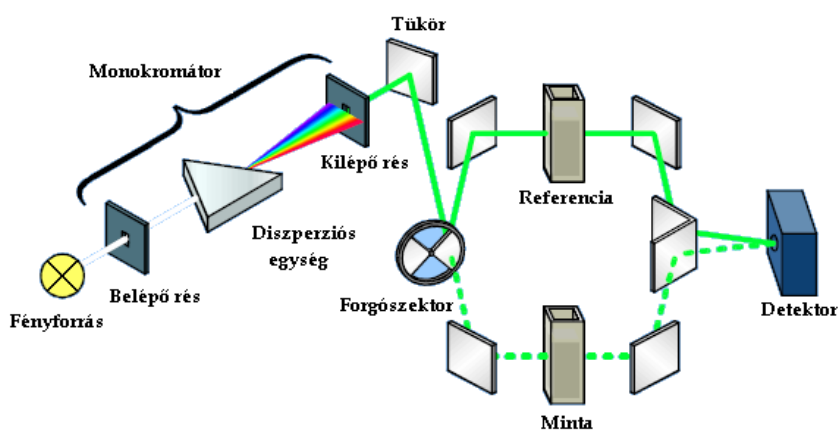
Hátrányai, hogy érzékenyek a tápfeszültség változására, a sugárforrás és a detektor időbeli változásaira stb.; ezek a hibák a nullpontstabilitásban, érzékenységben, reprodukálhatóságban, linearításban jelentkeznek.

A kompenzációval működő egysugaras készülékek az előbbi készüléktípus hibáinak jó részét kiküszöbölik. A detektorból kikerülő elektromos jel egy kompenzációs áramkörre kerül, amelyben az egyensúlyi helyzetet egy nullműszer jelzi. Itt a mérés a következő lépésekből áll: a mintatárba a

referenciaoldatot helyezük és a kompenzációs áramkört egyensúlyba hozzuk, ill. ezt egy automata elektronikus vezérlőrendszer végzi. E készüléktípusok igen pontos mérést tesznek lehetővé, ugyanakkor használatuk kissé nehézkes, különösen több hullámhosszon történő mérésnél (spektrum felvétel).

3.2 Kétsugaras spektrofotométerek

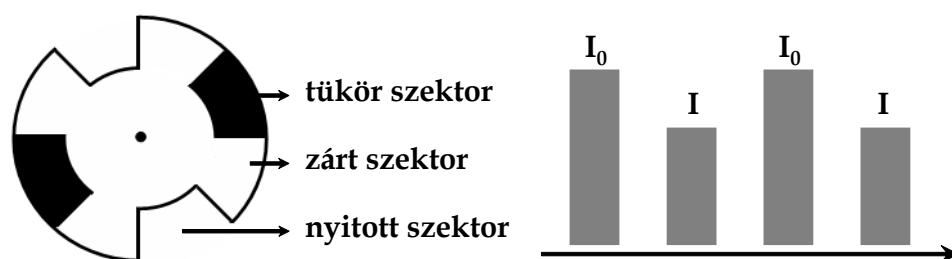
A kétsugaras készülékeknél a sugárforrásból kilépő fényt két fényútra bontják fel, amelyekből az egyik a referenciaoldaton, a másik a mintán halad keresztül (2. ábra). Így gyakorlatilag a két fényintenzitás (I_0 , I) azonos időben hasonlítható össze. Ezzel kiküszöbölődik a tápfeszültség, az elektronika, a sugárforrás esetleges ingadozásából származó hiba.



2. ábra Hagyományos UV-vis készülék vázlatos rajza (ilyen készülék például a Varian Cary 1E vagy a Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotométer is).

Ritkábban alkalmaznak a fényintenzitás mérésére két detektort, mivel nehéz két teljesen azonos jellemzőkkel rendelkező érzékelőt készíteni. Gyakrabban a mintater után a két fényutat egyesítik, és a fényt egy detektorral alakítják elektromos jellé. Ezt úgy valósítják meg, hogy a két fényjel (I_0 és I)

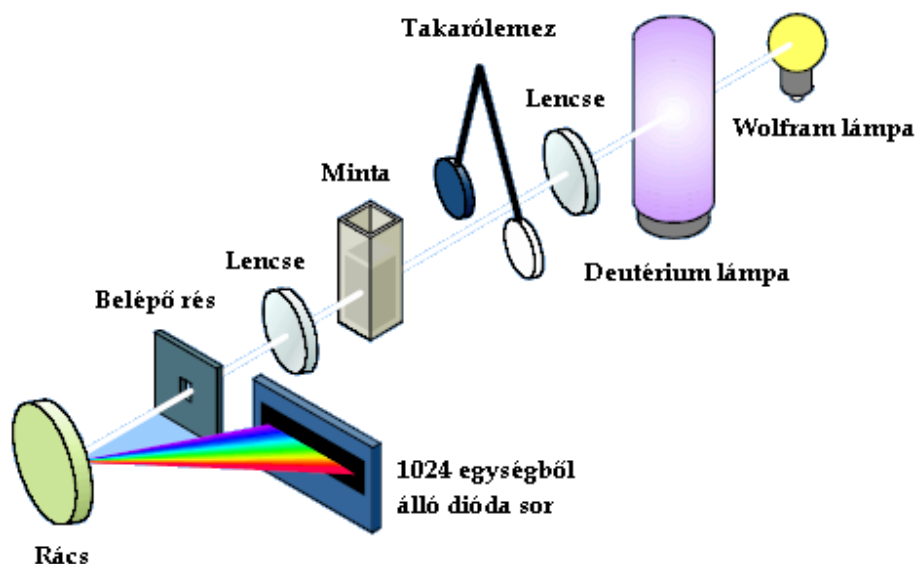
felváltva jelenik meg a detektoron, és a feldolgozó elektronika ezt a periodikus jelet demodulálva képi az abszorbanca jelet ($A = \lg I_0/I$). Ehhez a fényfelbontásra általában forgószektort („chopper”-t) alkalmaznak (3. ábra). Így elérhető, hogy megfelelő frekvenciával hol az egyik, hol a másik fényútba jut a lámpa fénye. E készülékek biztosítják a lehetőséget az automatizálásra, spektrumok széles hullámhossztartományban történő regisztrálására, mert kiküszöbölik az egysugaras készülékeknél jelentkező hibák zömét. Az újabb típusoknál szinte már természetes tartozék a számítógép, ami gyorsabbá és kényelmesebbé teszi a méréseket és az adatfeldolgozást.



3. ábra. A forgószektor („chopper”) vázlatos rajza, illetve a detektorba érkező fény intenzitása az idő függvényében.

3.3 Diódasoros detektorral rendelkező spektrofotométerek

A félvezető fotodetektorok olcsóbbá válása tette lehetővé egy új spektrofotométer típus kialakítását. Ebben egy (jellemzően 512 vagy 1024 elemből álló) sor érzékeli a kilépő fényt, amely az ún. polikromátorból érkezik (4. ábra). Azaz a rács / prizma felbontja a fényt, de nem kell kiválasztani egy hullámhosszt, hanem a diódasor, és a hozzá kapcsolt elektronika egyszerre elemezheti a teljes áteresztési spektrumot. Az ilyen elven működő spektrofotométerekben meglehetősen nagy energiájú fény halad át a mintán ezért könnyen előfordulhat, hogy a nagy energiájú fény fotokémia reakciókat indít be amit érdemes szem előtt tartani. A műszer nagy előnye viszont a gyorsasága, ugyanis egy teljes spektrum felvétele nem tart tovább 0,5 – 1 másodpercnél (a kétsugaras spektrofotométereknél ez az idő a hullámhossztartomány függvényében 60 – 90 másodperc) illetve a mintateret nem kell a külső fény hatástól elzárni.



4. ábra Diódasoros spektrofotométer vázlatos rajza (ilyen készülék például a Hewlett-Packard / Agilent 8453 spektrofotométer)

4. A SPEKTROFOTOMETRIA FELHASZNÁLÁSI TERÜLETE

A spektrofotometriának, mint analitikai módszernek igen nagy jelentősége van mind a szerves, mind a szervetlen kémiai gyakorlatban.

Elvileg minden olyan anyag vizsgálható, amelynek elnyelése van a látható, UV (közeli IR) tartományban. Általában érvényes, hogy teljesen ismeretlen összetételű vagy túlságosan sok komponensből álló mintáknál csak korlátozottan használható. Igen sok mintatípusra és komponensre dolgoztak ki analitikai eljárást, de számos esetben az előkészítő műveletek bonyolultak és a paraméterek igen pontos betartását igénylik. Így is számos esetben léphet fel valamilyen zavaróhatás, pl. komplexképződés, mellékreakció, nem szelektív színreakció stb. Ugyanakkor éppen ezekre a paraméterekre való érzékenység teszi alkalmassá a módszert a különböző oldategyensúlyi, reakciókinetikai stb. vizsgálatokhoz.

Eltérés a Lambert-Beer törvénytől

A Lambert-Beer törvény híg oldatokra érvényes, a gyakorlatban 10^{-2} – 10^{-3} mol/cm³-nél nincs jelentős eltérés. Töményebb oldatok esetén a törésmutató változása miatt az abszorpciós koefficiens állandósága helyett az alábbi kifejezés konstans:

$$\frac{a \cdot n}{(n^2 + 2)^2}$$

ahol a: az abszorpciós koefficiens, n: a törésmutató

Emellett tömény oldatokban asszociációs és szolvatációs jelenségek is eltérést okozhatnak a törvénytől. Híg oldatok esetében is tapasztalhatunk eltérést a Lambert-Beer törvénytől, ezek fizikai és kémiai okokra vezethetők vissza.

A fizikai okok közül a legfontosabb az, hogy a mintába lépő fény nem teljesen monokromatikus. Ekkor a kalibrációs görbe a koncentráció tengely felé hajlik. A résszélesség csökkentésével ezt a hatást mérsékelhetjük, de ekkor csökken a detektorra jutó fénymennyiség is, amelyet az erősítés növelésével tudunk kompenzálni. Ez viszont együtt jár a zajszint növekedésével, így a mérés pontosságának romlásával.

Kémiai okokra vezethetjük vissza az eltérést, ha a vizsgálni kívánt komponens koncentrációváltozása nem egyenesen arányos a mérni kívánt forma koncentrációváltozásával. Azaz, ha az oldatban asszociáció, disszociáció, szolvatáció, komplexképződés stb. megy végbe. Ezenkívül hatása lehet az oldószer összetételének, a pH-nak, a hőmérsékletnek, egyéb mátrixanyag koncentrációváltozásának.

Jellegzetes példa a gyakorlatban vizsgált indikátor koncentráció meghatározása (lásd később). Különböző pH-nál a disszociált és a disszociálatlan forma aránya más-más, így természetesen változik a spektrum is. A két forma abszorpciós sávjának viszont van egy közös pontja, izobesztikus pont, ahol az abszorpciós koefficiensük azonos. Itt megvan a lehetőség a pH-tól (általánosan, mint körülménytől) független koncentráció meghatározásra.

Több komponens egymás melletti meghatározása

Az elegyek abszorpciós spektruma a komponensek spektrumából additíve tevődik össze.

$$A_{\text{össz.}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

Így elvileg lehetőség van legalább n különböző hullámhosszon mérve n komponens meghatározására, mivel

$$A_{\text{össz.}} = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \dots + \varepsilon_n c_n l$$

felírható az összes hullámhosszon.

Mérve a tiszta komponensek abszorpciós spektrumát, a koncentráció ismeretében $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots$ abszorpciós koefficiensek minden hullámhosszon számolhatók. Így a keverék minta abszorpciójából egy n ismeretlenes egyenletrendszerrel a koncentrációk számolhatók. Két komponens esetén (A, B anyag és λ_1, λ_2 hullámhosszakon):

$$A_{\text{össz.}}(\lambda_1) = \varepsilon_{A(\lambda_1)} c_A l + \varepsilon_{B(\lambda_1)} c_B l$$

$$A_{\text{össz.}}(\lambda_2) = \varepsilon_{A(\lambda_2)} c_A l + \varepsilon_{B(\lambda_2)} c_B l$$

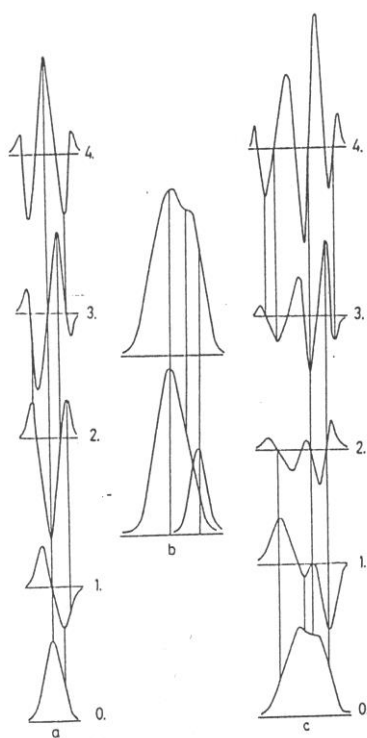
5. DERIVATÍV SPEKTROFOTOMETRIA

5.1 A módszer elvi alapjai

Mind a háttérkorrekció, mind az átfedő sávok kvalitatív és kvantitatív elemzésre történő alkalmazhatósága szempontjából az utóbbi évtized legfontosabb fejleménye volt a derivatív spektrofotometria bevezetése. A módszer elve (az abszorbancia hullámhossz szerinti deriválása) korábban is ismert volt, azonban csak a legutóbbi években váltak hozzáférhetővé azok a spektrofotométerek, amelyek mikroszámítógép segítségével képesek a spektrum felvételével egyidőben a derivált spektrumokat is regisztrálni.

Az ábra a része az idealizált Gauss-görbe típusú abszorpciós sávot, és annak 1.-4. deriváltjait szemlélteti. A b ábrán az átfedő abszorpciós sáv kialakulását láthatjuk két különböző intenzitású Gauss-görbe alakú sávból. A c ábra pedig ezen összetett sáv 0.-4. deriváltjait mutatja be.

Mivel a deriválás során az eredeti függvény maximum- ill. minimumhelyei zéró értéket vesznek fel, az inflexiókból pedig maximum- ill. minimumhelyek lesznek, a derivált spektrumok sokkal strukturáltabbak, mint az eredetiek. Az első deriváltak és általában a páratlan számú deriváltaknak kisebb a jelentősége, a gyakorlatban inkább a második és negyedik derivált spektrumokat használják, de van példa magasabb rendű deriváltak alkalmazására is. A főcsúcs a második deriváltban negatív, a negyedikben pozitív irányú, és mindkettőt a rendűség növekedtével egyre bonyolultabbá váló mellékcsúcs-rendszer kíséri.



5. ábra Az abszorpciós spektrum deriválása.

5.2 A módszer elvi alapjai

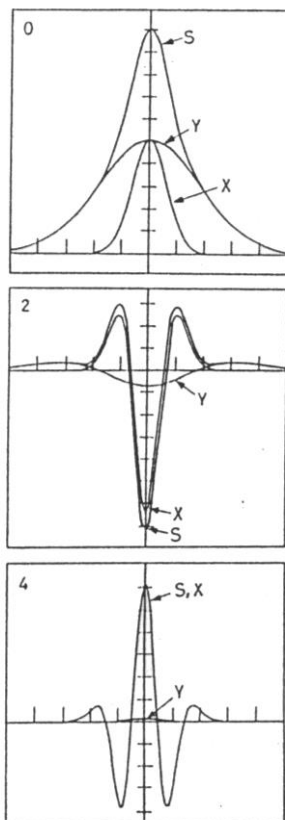
A derivatív spektrofotometria a hagyományos spektrofotometriához viszonyítva négy területen jelent előrelépést:

Kvalitatív analízis. A derivatív spektrumok alkalmasak az alap spektrumban mutatkozó minimális különbségek kiemelésére. Különösen vonatkozik ez az izolált aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek finomszerkezetű sávjaira.

Monoton háttérpektrum kiejtése a kvantitatív analízisben. A deriválás szabályaiból következik, hogy a konstans háttér már az első derivált eliminálja: Amennyiben a háttér lineáris függvénye a hullámhossznak, a második derivált lesz zéró. A negyedik derivált esetében magasabb rendű függvénynek megfelelő monoton háttér spektrumok is kiejthetők.

Az egyszerűbb háttérproblémák megoldására gyakran az első derivált is elegendő, mert rövidebb hullámhossz tartományra vonatkoztatva a háttér közelítőleg állandónak vehető. A háttér eliminációnak ez a lehetősége nemcsak a fényabszorpcióból, hanem a fényszórásból eredő hátterekre is vonatkozik, vagyis a derivatív spektrofotometria opálos oldatok analízisére is alkalmas.

Átfedő széles sáv eliminálása keskeny sávval rendelkező anyag mennyiségi analízise során. A derivatív spektrofotometria egyik alapvető egyenlete összefüggést állapít meg az n -ed rendű derivatív spektrum sávintenzitása (A_n), a zéró-rendű spektrum (abszorpciós spektrum) sávintenzitása (A_0) és sáv szélessége (W), valamint a derivált rendűsége (n) között. Az egyenlet azt fejezi ki, hogy a sáv szélesség növekedtével a derivált görbe sávjainak intenzitása rohamosan csökken. Ebből következik, hogy a deriválással a széles és éles sávok közötti különbség nő.



6. ábra Széles sáv eliminálása a vele egybeeső keskeny sáv (X) mérése során a 2. és 4. derivált spektrumok alkalmazásával ($S = X+Y$).

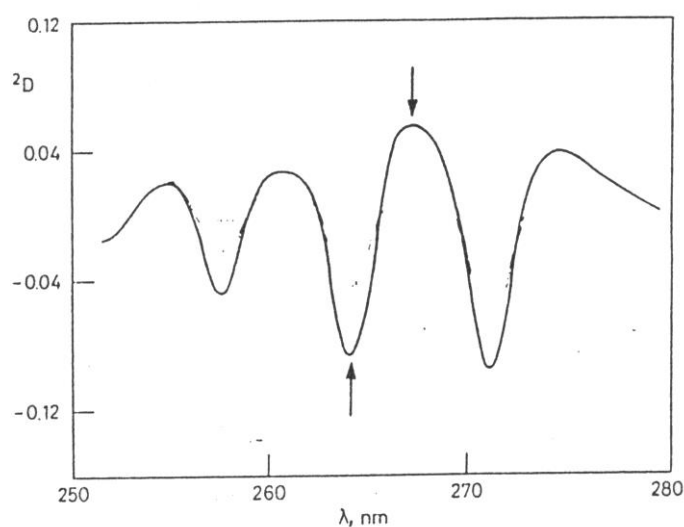
Az ábrán látható **S** abszorpciós spektrum két pontosan egybeeső, de sáv szélességben jelentősen különböző **X** és **Y** komponensből áll ($W_Y = 3W_X$). **Y** intenzitása már a 2. derivált esetében az eredeti 1/7-ére csökken, a 4. derivált pedig csaknem beleolvad az alapvonalba. Ugyanakkor az **X** komponens és az eredő **S** görbe deriváltja 2. deriváláskor csaknem, 4. deriváláskor pedig teljesen egybeesik.

Két- vagy többkomponensű rendszerek analízise derivatív spektrofotometria és algebrai módszerek kombinációjával. A derivált spektrumok (különösen a magasabb rendűek) erősen strukturált voltukból következően számos pozitív és negatív maximumhellyel rendelkeznek. Így könnyen lehet találni olyan hullámhosszakat, ahol a meghatározni kívánt komponens derivált jele maximális, a másiké pedig minimális. Az algebrai módszerek ismertetése az anyag kereteit meghaladja, az érdeklődők számára jó összefoglalás található

Görög Sándor: *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis* c. könyvében (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993.).

A magasabb rendű deriváltak felvétele és alkalmazása az előnyök mellett számos nehézséggel is jár. Egyrészt a deriválás rendűségének növelésével a jel/zaj arány csökken, másrészt az egyre bonyolultabbá váló mellékmaximum-rendszer zavarhatja a szomszédos csúcsok kiértékelését.

5.3 A jel a derivatív spektrofotometriában



7. ábra. A derivatív spektrofotometriás jel.

A kvantitatív analízis alapja a derivált spektrum amplitúdója, amely általában egyenesen arányos a koncentrációval, ezt azonban új mérési feladat beállításakor mindig ellenőrizni kell!

Az amplitúdót meghatározhatjuk:

- a derivált spektrum zéróvonalától számítva;
- a sáv két kiindulási pontjában meghúzott alapvonalától számítva;
- egy szomszédos maximum és minimum magasságának különbségeként.

6. GYAKORLATOK

A gyakorlatok során elkészített oldatok abszorpciós spektrumait az alábbi képen látható Jasco V-770 típusú UV-Vis-NIR spektrofotometriás készülék segítségével vesszük fel.



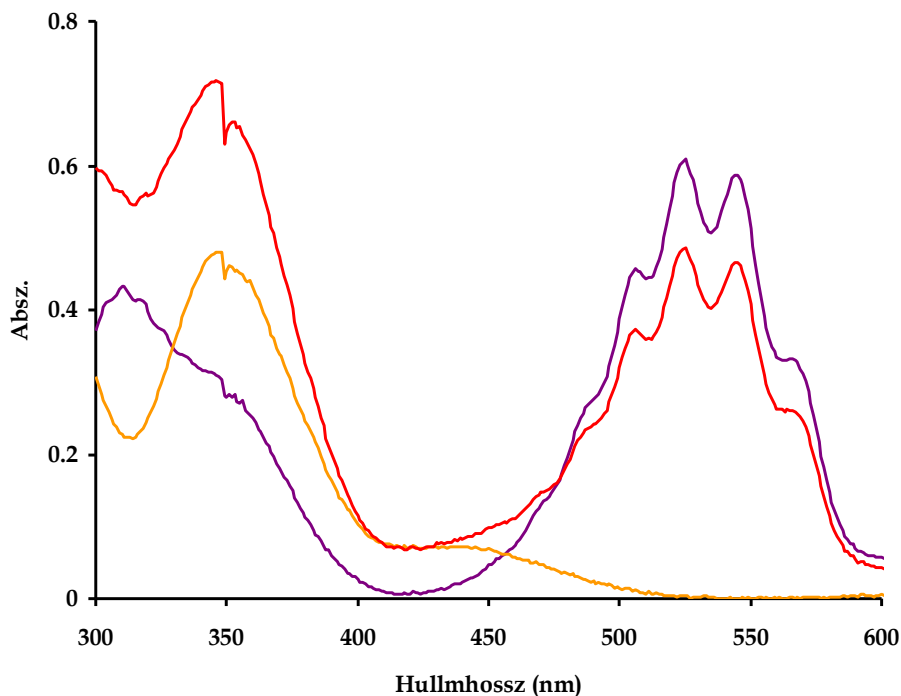
Jasco V-770 UV-Vis-NIR spektrofotométer

6.1. Cr(III) és Cr(VI) ionok illetve 6.2. Mn(VII) és Cr(VI) ionok egymás melletti meghatározása

Az a tény, hogy elegyek esetében a minta abszorpciós spektruma a komponensek spektrumából tevődik össze lehetőséget biztosít koncentráció meghatározásra többkomponensű rendszerben. Erre több gyakorlat is épülhet, és a leggyakoribbak közé tartozik a Cr(III) és Cr(VI) ionok illetve Mn(VII) és Cr(VI) ionok egymás melletti közvetlen meghatározása. A gyakorlaton elkészítendő oldatokat az alábbi képen láthatjuk (a képen balról jobbra haladva $2,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³ KMnO₄ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 2×10^{-4} mol/dm³ K₂Cr₂O₇ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 0,1 M H₂SO₄ oldat (vak) és egy ismeretlen amely mindkét komponenst tartalmazza (0,1 M H₂SO₄-ra nézve)). Ezeket az oldatokat a gyakorlat során is el kell készíteni és felvenni a minták abszorpciós spektrumait 300 – 650 nm között.



8. ábra A gyakorlaton elkészítendő egyik oldatsorozat (balról jobbra haladva: $2,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³ KMnO₄ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 2×10^{-4} mol/dm³ K₂Cr₂O₇ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), 0,1 M H₂SO₄ oldat (vak) és egy ismeretlen amely mindkét komponenst tartalmazza (0,1 M H₂SO₄-ra nézve)).



9. ábra. A gyakorlaton elkészítendő egyik oldatsorozat abszorpciós spektrumai (lila – $2,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³ KMnO₄ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), narancssárga – 2×10^{-4} mol/dm³ K₂Cr₂O₇ oldat (0,1 M H₂SO₄-ra nézve), és piros – egy ismeretlen amely mindkét komponenst tartalmazza (0,1 M H₂SO₄-ra nézve).

A spektrumokat elemezve elmondható, hogy az ismeretlen minta K₂Cr₂O₇ – koncentrációja gyakorlatilag megegyezik a standard kromát-oldat koncentrációjával oldat (a 420 nm körüli abszorbancia adatokból következtethetünk erre, mivel ezen a hullámhosszon gyakorlatilag csak a kromátion nyel el). Az előző esethez hasonlóan, az 550 nm körül csak a permanganátionnak van elnyelése, így az ezen a hullámhosszon mért abszorbancia adatok összehasonlításával elmondható, hogy az ismeretlen minta KMnO₄ koncentrációja kb. a 80%-a a standard oldat koncentrációjának. Az így leolvasott adatok, csak tájékozássul szolgálhatnak, de az eredmény leellenőrzésére használható. A gyakorlaton ennél pontosabban kell a koncentrációkat megadni (négy értékes jeggyel).

A gyakorlat célja:

Az UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése, a Lambert–Beer törvény alkalmazása, az abszorbancia additivitásának alkalmazása kétkomponensű rendszer esetére.

Feladat:

- 6.1. Ismeretlen oldat Cr(III) és Cr(VI) tartalmának meghatározása
- 6.2. Ismeretlen oldat Cr(VI) és Mn(VII) tartalmának meghatározása

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

Törzsoldatok (0,1 mol/dm³ koncentrációjú CrCl₃ vagy 0,0382 mol/dm³ koncentrációjú Cr₂(SO₄)₃ króm(III) törzsoldatokat lehet használni, 2,5×10⁻³ mol/dm³ koncentrációjú Mn(VII) törzsoldat és 1×10⁻³ mol/dm³ koncentrációjú Cr(VI) törzsoldat)
0,25 M H₂SO₄ oldat

Folyadéküveges leosztó (diszpenzer) a savoldat adagolásához

A savoldat készítéséhez balesetvédelmi szempontból sokkal kisebb veszélytényezővel járó térfogatmérő eszközt, a diszpenzert, használunk. Az eszköz szabályos használata a következő.

1. *távolítsuk el a védőkupakot a diszpenzer kifolyó nyílásáról.*
2. *a diszpenzer csapját állítsuk „nyit” pozícióba*
3. *állítsuk be a megfelelő térfogatot a diszpenzer felső részének óvatos eltekerésével*
4. *óvatosan töltsük fel a diszpenzert a felső egység óvatos emelésével*
5. *helyezzük a diszpenzer kifolyó nyílása alá a lombikot és lassan engedjük bele a kívánt mennyiségű savat.*
6. *zárjuk el a diszpenzer fő csapját és helyezzük vissza a védőkupakot a kifolyónyílásra.*

Figyelem: a diszpenzer nem szakszerű használatából eredő károkért az anyagi felelősség a hallgatót terheli.

3 db 25 cm³-es mérőlombik
3 db 1 cm-es kvarc küvetta küvettatartóban
1db 1-5 cm³-es automata pipetta
200 cm³-es főzőpohár mosogatóhoz
Papírtörő

Előkészítés:

6.1. A rendelkezésre álló $0,1 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(III) oldatból 25 cm^3 $2 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ oldatot, az $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(VI) törzsoldatból pedig 25 cm^3 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ oldatot készítünk, melyeknek kénsav koncentrációja $0,1 \text{ mol/dm}^3$ legyen. A spektrofotometriás méréshez összehasonlító oldatként $0,1 \text{ mol/dm}^3$ kénsavat készítünk.

6.2. A rendelkezésre álló $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Mn(VII) oldatból 25 cm^3 $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ oldatot, az $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Cr(VI) törzsoldatból pedig 25 cm^3 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ oldatot készítünk, melyeknek kénsav koncentrációja $0,1 \text{ mol/dm}^3$ legyen. A spektrofotometriás méréshez összehasonlító oldatként $0,1 \text{ mol/dm}^3$ kénsavat készítünk.

Mérés:

Az előkészített Cr(III), Cr(VI) illetve a Mn(VII), Cr(VI) és az ismeretlen oldatok spektrumát 300-650 nm között regisztráljuk kvarc küvetták segítségével.

Értékelés:

Válasszuk ki a spektrumból a két komponens méréséhez legmegfelelőbb hullámhosszakot és határozzuk meg a Cr(III) és Cr(VI) moláris abszorpciós koefficienseit ($\varepsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{III}})$, $\varepsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{VI}})$, $\varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{III}})$ és $\varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}})$) illetve a Mn(VII) és Cr(VI) moláris abszorpciós koefficienseit ($\varepsilon^{\lambda_1}(\text{Mn}^{\text{VII}})$, $\varepsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{VI}})$, $\varepsilon^{\lambda_2}(\text{Mn}^{\text{VII}})$ és $\varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}})$). A kapott értékek segítségével határozzuk meg az ismeretlen oldat Cr(III) és Cr(VI) illetve Mn(VII) és Cr(VI) koncentrációját az alábbi két ismeretlenes egyenletrendszer megoldásával (az egyik egyenletből fejezzük ki az egyik koncentrációt, majd helyettesítsük be azt a másik egyenletbe. Az így kapott egyenletet oldják meg, majd a kapott eredményt helyettesítsék vissza az elő egyenletbe).

$$A^{\lambda_1} = \varepsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) l + \varepsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{VI}}) \times c(\text{Cr}^{\text{VI}}) l$$

$$A^{\lambda_2} = \varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) l + \varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}}) \times c(\text{Cr}^{\text{VI}}) l$$

A feladat megoldása bizonyos esetekben egyszerűsíthető, ha létezik olyan hullámhossz ahol csak az egyik komponens nyel el (tehát a másik komponens moláris abszorpciója nullával egyenlő). Tétélezzük fel, hogy a Cr^{VI} esetére létezik ilyen tartomány (pl. 550-600 nm között). Ebben az esetben az első egyenlet egyszerűsödik és a következő egyenletrendszert kapjuk:

$$A^{\lambda_1} = \varepsilon^{\lambda_1}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) \cdot l$$

$$A^{\lambda_2} = \varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{III}}) \times c(\text{Cr}^{\text{III}}) \cdot l + \varepsilon^{\lambda_2}(\text{Cr}^{\text{VI}}) \times c(\text{Cr}^{\text{VI}}) \cdot l$$

Az első egyenletből a Cr^{III} -koncentrációja közvetlenül számolható. Majd ezt a koncentrációt és a meghatározott moláris abszorbancia adatokat a második egyenletbe helyettesítve a Cr^{VI} koncentrációja is könnyen számítható.

Beadandó eredmények:

- A $\text{Cr}(\text{III})$ -, a $\text{Cr}(\text{VI})$ és az ismeretlen oldat abszorpciós spektruma
 - Az ismeretlen oldat $\text{Cr}(\text{III})$ -, és $\text{Cr}(\text{VI})$ koncentrációja
- illetve
- A $\text{Cr}(\text{VI})$ -, a $\text{Mn}(\text{VII})$ és az ismeretlen oldat abszorpciós spektruma
 - Az ismeretlen oldat $\text{Cr}(\text{VI})$ -, és $\text{Mn}(\text{VII})$ koncentrációja

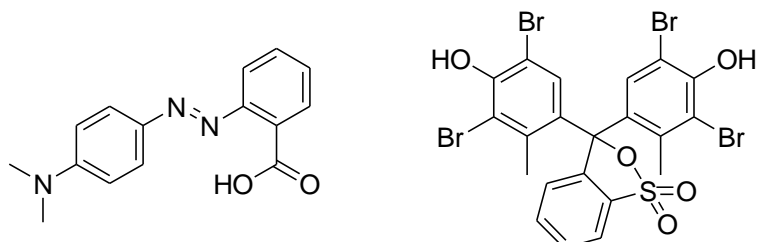
6.3. Metilvörös és 6.4. brómkrezolzöld indikátorok koncentrációjának meghatározása

A sav-bázis indikátorokat sokat használunk analitikai kémiai gyakorlatokon hiszen a sav-bázis titrálások végpontjelzésére alkalmas vegyületekről van szó. Az ilyen indikátorok olyan szerves molekulák amelyek képesek a közeg pH-jának a változását színreakcióval kíséni, azaz a protonleadásuk vagy protonfelvételük után bekövetkező molekulán belüli kötésátrendeződésük színváltozással jár. Így a molekula savi vagy bázikus formája a más-más komponensét nyeli el. A színváltozás egy adott pH-tartományban játszódik le amit az indikátor átcsapási tartományának nevezünk. A teljes pH skála lefedhető különböző indikátorokkal erre példát az alábbi táblázat tartalmaz:

Táblázat 2. Néhány indikátor átcsapási pH-tartománya, ill. a savi és bázis formáinak színe.

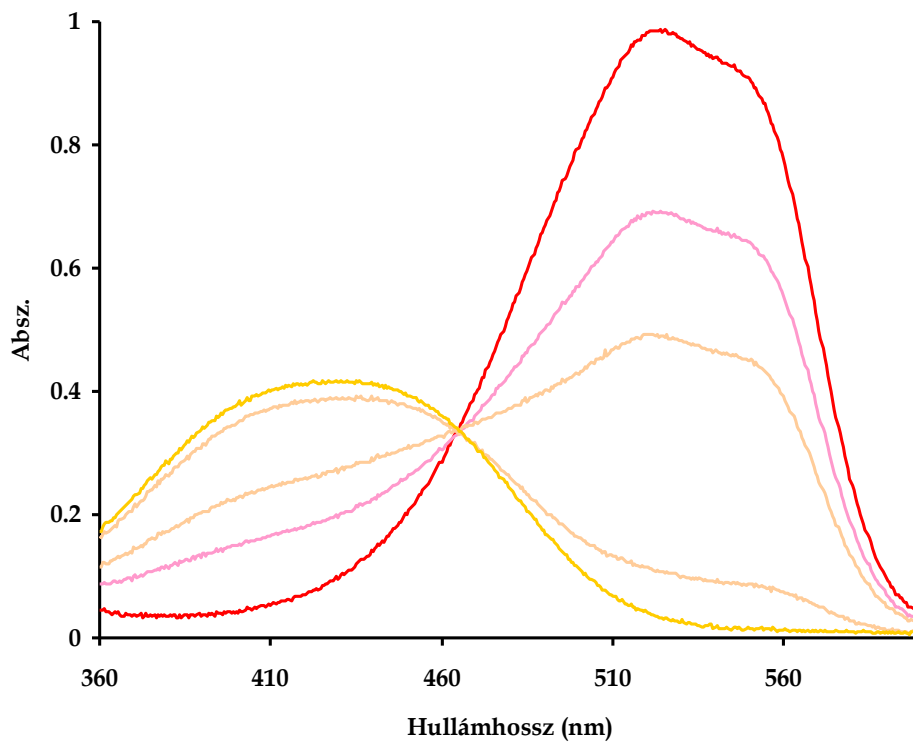
Indikátor	Átcsapási tartomány	Sav	Bázis
Malahit zöld	0,2-1,8	sárga	kékes-zöld
Timol kék	1,2-2,8	vörös	sárga
Metil sárga	2,9-4,0	vörös	sárga
Metil narancs	3,1-4,4	vörös	sárga
Brómfenol kék	3,0-4,6	sárga	ibolyás kék
Brómkrezol zöld	4,0-5,6	sárga	kék
Metil vörös	4,4-6,2	vörös	sárga
Brómkrezol bíbor	5,2-6,8	sárga	bíbor
Brómfenol kék	6,2-7,6	sárga	kék
Fenol vörös	6,4-8,0	sárga	vörös
Krezol vörös	7,2-8,8	sárga	vörös
Fenolftalein	8,0-10,0	színtelen	rózsaszín
Timolftalein	9,4-10,6	színtelen	kék
Alizarin sárga	10,0-12,0	sárga	lila
Trinitrobenzoesav	12,0-13,4	színtelen	vénarancs

A gyakorlaton vizsgált két indikátor szerkezeti képlete az alábbi ábrán látható:



10. ábra A metilvörös (bal) és bromkrezolzöld (jobb) indikátorok szerkezete.

A talán leggyakrabban használt sav-bázis indikátor a metil vörös savas közegben piros színű (az elnyelési maximuma $\lambda_{\max} = 522$ nm), bázis jelenlétében pedig sárga színű ($\lambda_{\max} = 419$ nm). Savas környezetben az egyik nitrogénatom protonálódása miatt a konjugált rendszer megszakad, ami lúg hozzáadásával könnyen visszaalakítható. Ez a szerkezeti átalakulás okozza a színváltozást is. Az 11. ábra a metilvörös különböző pH-jú oldatait mutatja be. Az ábrán jól látható, hogy az abszorbancia nem csak a koncentráció, de pH függvénye is. Tehát különböző pH-jú oldatokra, ha az abszorbanciát a csúcsmaximumokon mérnénk nem lenne igaz a Lambert–Beer törvény, azaz a módszer nem lenne alkalmazható. A görbéknek van azonban egy közös metszéspontja, amely a pH-tól független abszorbanciát ad. Ez az úgy nevezett izobesztikus pont, ahol a két egymással egyensúlyban lévő részecskék (formák) moláris abszorpciós koefficiense megegyezik. Erre a pontra már alkalmazható a Lambert–Beer törvény, tehát ennek az ismeret lehetővé válik a színezék koncentrációjának a meghatározása.

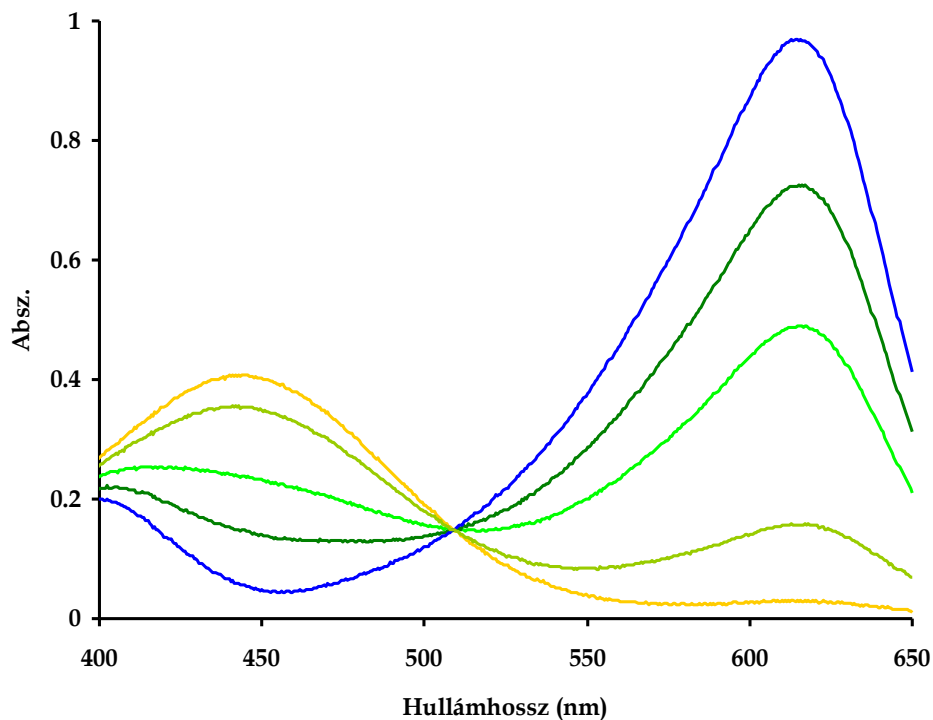


11. ábra. A metilvörös abszorpciós spektruma különböző pH-jú oldatokban.

A brómkrezolzöld indikátor esetében a savas közegben lévő, fenolos O-atomon protonált vegyület sárga színű ($\lambda_{\text{max}} = 442 \text{ nm}$), ami lúg hatására kék színű ($\lambda_{\text{max}} = 613 \text{ nm}$) deprotonált formába megy át amint azt az alábbi ábra is szemléltet.



12. ábra. A brómkezzöld indikátor különböző pH-jú oldatai



13. ábra. A brómkrezolzöld abszorpciós spektruma különböző pH-jú oldatokban.

A gyakorlat célja:

Az UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése, a Lambert–Beer törvény alkalmazása, koncentráció meghatározás moláris moláris abszorpciós koefficiensek ismeretében.

Feladat:

6.3. Metilvörös indikátor moláris abszorpciós koefficiensének és koncentrációjának a meghatározása

6.4. Brómkrezolzöld indikátor moláris abszorpciós koefficiensének és koncentrációjának a meghatározása

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

Indikátor törzsoldatok ($5,0 \times 10^{-4}$ mol/dm³ koncentrációjú metilvörös és brómkrezolzöld törzsoldat)

0,2 mol/dm³ koncentrációjú ecetsav és nátrium-acetát oldatok puffer készítéshez

5 db 50 cm³-es mérőlombik
2 db 1 cm-es műanyag küvetta küvettatartóban
1db 1-5 cm³-es automata pipetta
1db 0,1-1 cm³-es automata pipetta
200 cm³-es főzőpohár mosogatóhoz
Papírtörő

Feladat:

Az izobesztikus pont hullámhosszának, és ezen a hullámhosszon a metilvörös (illetve brómkrezolzöld) moláris abszorpciós koefficiensének meghatározása ismert koncentrációjú, de különböző pH-jú oldatsorozat segítségével.

Ismeretlen koncentrációjú metilvörös (illetve brómkrezolzöld) oldat koncentrációjának meghatározása.

Előkészítés:

50 cm³-es mérőlombikokba mérjük be rendre 2,5 – 2,0 - 1,5 - 0,5 - 0 cm³ 0,2 mol/dm³ koncentrációjú ecetsavat és 0 - 1 - 2 - 4 - 5 cm³ 0,2 mol/dm³ nátrium-acetát oldatot. A lombikok tartalmát töltjük fel desztillált vízzel kb. 40 cm³-ig, majd a rendelkezésre álló 5x10⁻⁴ mol/dm³-es metilvörös (a 6.4 gyakorlat esetében brómkrezolzöld) oldatból adjunk hozzá 2 – 2 cm³-t. A lombikok tartalmát töltjük jelig desztillált vízzel és a lombik tartalmát homogenizáljuk.

Mérés:

Vegyük fel az elkészített oldatsorozat és az ismeretlen metilvörös illetve oldat spektrumát összehasonlítóként desztillált vizet használva 350-600 (metilvörös) illetve 400 – 650 (brómkrezolzöld) nm tartományban műanyag küvettában (a műanyag küvetták ebben a tartományban a üveg vagy speciális üveg küvettákhoz hasonlóan jól fényáteresztő képességgel rendelkeznek (lásd az 1. ábrát).

Értékelés:

Ha pontosan dolgoztunk, az azonos koncentrációjú metilvörös illetve brómkrezolzöld oldatok spektrumai egy pontban metszik egymást (u.n. izobesztikus pont). Határozzuk meg a metszésponthoz tartozó hullámhosszat és abszorbanca értéket. Az abszorbanca és a koncentráció segítségével

(vigyázat mert itt már nem a törzsoldat koncentrációval kell számolni hiszen az 25×-ére hígult) számítsuk ki a színezék moláris abszorpciós koefficiensét a következő összefüggés alapján (az összefüggésben a λ jelzés az izobesztikus pont hullámhosszát jelöli):

$$A^{\lambda} = \varepsilon^{\lambda} \times c(\text{sz}) \times l$$

Az ismeretlen oldatra olvassuk le az abszorbancia adatot a spektrumból az izobesztikus pont hullámhosszán és az előző lépésben kiszámolt moláris abszorpciós koefficiens segítségével számoljuk ki az ismeretlen oldat koncentrációját ($c(\text{sz})$).

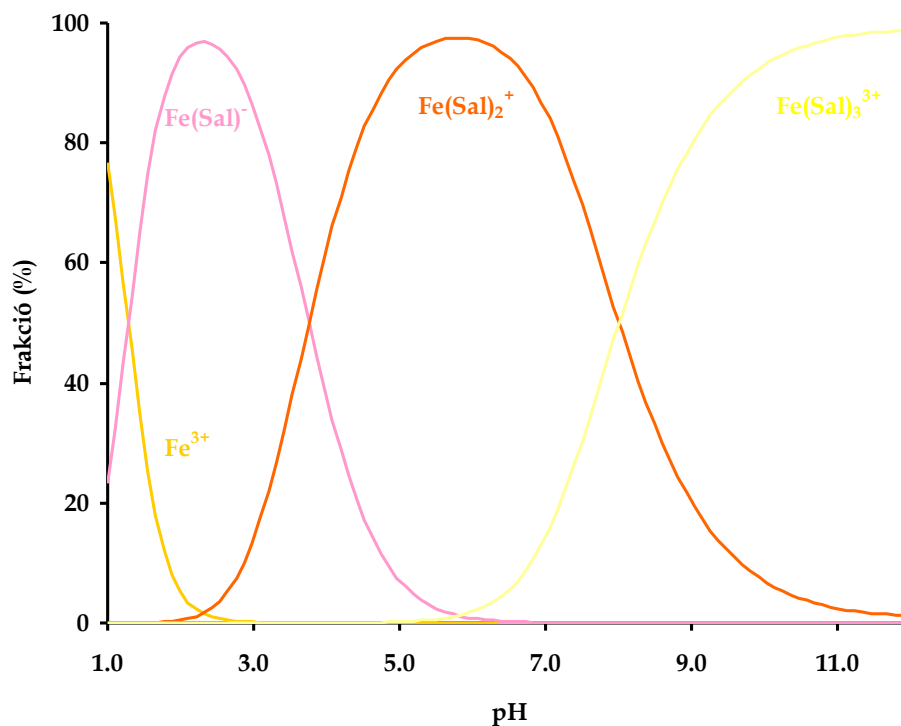
Beadandó eredmények:

- A színezékek abszorpciós spektruma különböző pH-jú oldatokban
- A színezék moláris abszorbanciája az izobesztikus pontban
- Az ismeretlen oldat koncentrációja

6.5. Szalicilsav koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével

A hidroxilcsoportot tartalmazó szerves vegyületek jól ismert és széles körben elterjedt komplexképzők. Nagy jelentősége van azoknak, amelyek egymáshoz közel lévő -OH csoportokat (pirokatechin) vagy egy -OH és egy -COOH csoportot tartalmaznak (szalicilsav, szulfoszalicilsav). Ezek számos fémrel nagy stabilitású belső komplex vegyületeket alkotnak, így azok mennyiségi meghatározására is alkalmasak. A vas(III)-ion híg fenol (C_6H_5OH), hidrokinon ($C_6H_4(OH)_2$), pirogallol ($C_6H_3(OH)_3$), szalicilsav ($C_6H_4OH-COOH$ ($M_r=138,10$ g/mol)) illetve szulfoszalicilsav ($SO_3H_2-C_6H_3OH-COOH$) ligandumokkal intenzív színnel rendelkező komplexeket képez.

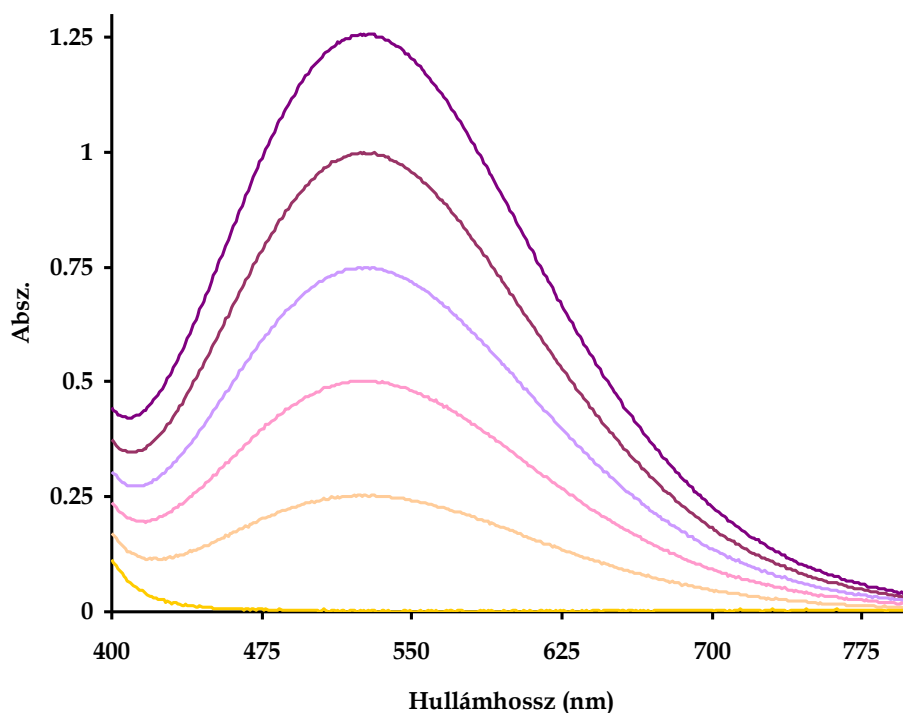
Érdemes megjegyezni, hogy a Fe^{3+} -ion a felsorolt ligandumokkal többféle stöchiometria szerint reagálhat. A szulfoszalicilsavval például savas közegben $pH = 1,8 - 2,5$ között lila $[Fe(Sal)]^+$ komplex kation képez. A pH -t $4 - 8$ közé állítva vörösbarna $[Fe(Sal)_2]^-$ -komplex, míg magasabb pH -n ($pH = 8 - 11,5$ között) sárga színű $[Fe(Sal)_3]^{3-}$ -komplex anion keletkezik (ahol a Sal^{2-} a szulfoszalicilsav anionját jelenti), ami az alábbi koncentráció eloszlási görbén ez jól látható is (14. ábra). Fémion felesleg alkalmazásával viszont elérhető, hogy a $Fe(III)$ -ionok $[Fe(Sal)]^+$ -komplex formában legyenek jelen az oldatban ezáltal lehetőséget biztosítva a szulfoszalicilsav mennyiségi meghatározására (a példa szulfoszalicilsavra vonatkozik, de az egyensúly, a szerkezetileg analóg gyógyszerhatóanyag hidrolízis termékeként ismeretes szalicilsav esetére is nagyon hasonló).



14. ábra. Koncentráció eloszlás a Fe^{3+} – Sal^{2-} – H^+ rendszerben $c(\text{Fe}^{3+}) = 1.0$ mM és $c(\text{Sal}^{2-}) = 3.0$ mM koncentrációknál (az eloszlás számolásához használt protonálódási állandókat (ligandum) és Fe(III)-komplexek stabilitási állandóit a A. E. Martell, R. M. Smith, M. R. J. Motekaitis, szerzők által szerkesztett „Critically Selected Stability Constants” adatbázisból vettük (Texas A&M University, Ver 8., 2004)).



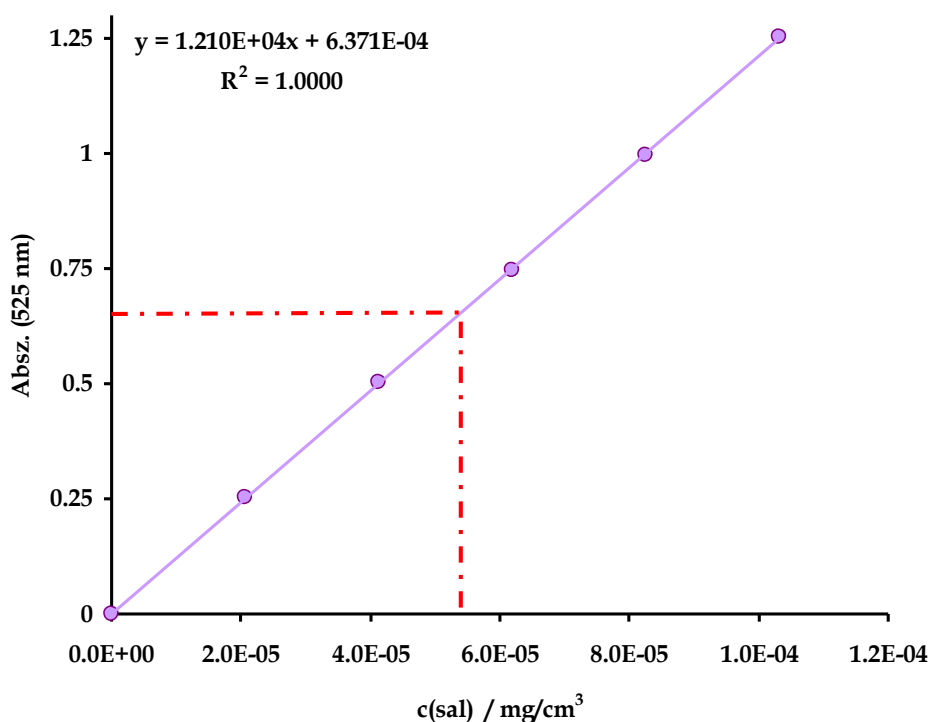
15. ábra. A $\text{Fe}(\text{Sal})^+$ -komplexből készített különböző koncentrációjú oldatok. ($\text{pH} = 2,0$, $c(\text{FeCl}_3) = 9,98 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ a szalicilsav koncentrációja pedig jobbról balra haladva a következők voltak: $2,06 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $4,13 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $6,19 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ és $1,03 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$).



16. ábra. A $\text{Fe}(\text{Sal})^+$ -komplex abszorpciós spektrumai a koncentráció függvényében ($\text{pH} = 2,0$, $c(\text{FeCl}_3) = 9,98 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ a szalicilsav koncentrációja pedig rendre, 0 g/cm^3 ; $2,06 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $4,13 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $6,19 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ és $1,03 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$).

A $\text{Fe}(\text{Sal})^+$ -komplex elkészített oldatai ($\text{pH} = 2,0$, $c(\text{FeCl}_3) = 9,98 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ a szalicilsav koncentrációja pedig rendre, 0 g/cm^3 ; $2,06 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $4,13 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $6,19 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ és $1,03 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$) a 15. ábrán láthatók, az oldatsorozat spektrumait pedig a 16. ábra tartalmazza. A 16. ábrán látható spektrumokból, 525 nm-en kiolvastva az abszorbancia adatokat és azt a szalicilsav koncentrációjának a függvényében ábrázolva az alábbi kalibrációs egyenest kapjuk (17. ábra). Excel program segítségével a kalibrációs egyenes egyenlete $y = 12100 + 0,00064$ melynek segítségével az ábrán piros szaggatott vonallal jelölt ismeretlen oldat szalicilsav koncentrációja könnyen számolható (jelen esetben a tengelymetszet olyan kis érték, hogy annak elhagyása nem okoz semmiféle hibát, a jelenléte pedig az adott hullámhosszon FeCl_3 oldat elhanyagolhatóan kis elnyelésének

tudható be). Az itt bemutatott ismeretlen oldat 525 nm-en mért abszorbanciáját felhasználva ($A = 0,683$) az ismeretlen oldat koncentrációja $5,64 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ -nek adódik, amely koncentráció egységet a szalicilsav moláris tömege felhasználásával átalakítható anyagmennyiség (mol/dm^3) koncentráció egységbe.



17. ábra. Kalibrációs görbe a szalicilsav koncentrációjának a meghatározásához.

A gyakorlat célja:

Az UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése és a Lambert–Beer törvény alkalmazása. Szalicilsav koncentrációjának meghatározás kalibrációs egyenes alapján, vizes oldatból.

Feladat:

Szalicilsav koncentrációjának meghatározás kalibrációs egyenes alapján, vizes oldatból.

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

Szalicilsav törzsoldat (1,0 mg/cm³ koncentrációjú standard szalicilsavoldat 1:10 metanol:víz FeCl₃ vagy Fe₂(SO₄)₃ törzsoldat (1,0 v/m %-os standard oldat 0,1 M savra nézve

Desztillált víz

8 db 50 cm³-es mérőlombik (a kalibrációs görbéhez illetve az ismeretlenhez)

2 db 1 cm-es műanyag küvetta küvettatartóban

1db 1-5 cm³-es automata pipetta (vagy 1 db 5,0 osztott pipetta a kalibráló oldatsorozat készítéséhez)

10 cm³-es mérőhenger (a Fe³⁺ sóoldat adagolásához)

3 db 50-100 cm³-es és 1 db 200 cm³-es főzőpohár a pipettázás elősegítésére illetve a küvetták öblítéséhez

Pumpett (pipettázó labda)

Papírtörő

Feladat:

A kalibráló oldat sorozat elkészítése és azok illetve a három párhuzamos ismeretlen spektrumainak a felvétele 400 – 600 nm intervallumban. Ezt követően ki kell választani a megfelelő hullámhosszat és kigyűjteni a kalibrációs egyeneshez szükséges adatokat (igyekedni kell mindig az elnyelési sáv maximumán vagy lehetőség szerint annak közvetlen közelében dolgozni).

Előkészítés:

Először kapcsoljuk be a spektrofotométert, hiszen annak a munka végzés előtt legalább 30 perccel már üzemelnie kell a fényforrás üzemi hőmérsékletére való bemelegedéséhez. 50 cm³-es mérőlombikokba a szalicilsav törzsoldatból olyan térfogatokat mérünk be, hogy szalicilsavra 0,00 – 0,07 mg/cm³ koncentráció tartományban egy öt pontból álló kalibráló oldatsorozatot kapjunk. A lombikokba kb. 25 cm³ desztillált vizet öntünk majd az oldatok mindegyikéhez mérőhengerrel 5,0 cm³ FeCl₃ vagy Fe₂(SO₄)₃ törzsoldatot (1,0 m/v%-os) adunk. Ezt követően a lombikokat desztillált vízzel jelre állítjuk majd alaposan homogenizáljuk. A kiadott ismeretlen szalicilsav tartalmú oldatot kvantitatíven egy 50 cm³-es mérőlombikba mossuk majd azt desztillált vízzel jelre állítjuk. Ebből a törzsoldatból kell 10 cm³-es részleteket újabb tiszta 50 cm³-es mérőlombikba mérni (3 párhuzamos) amit a kalibráló oldatsorozatnál leírtak szerint kezeljük (25 cm³ desztillált víz majd 5,0 cm³ Fe³⁺ törzsoldat hozzáadását követően jelre állítjuk a lombik tartalmát és homogenizáljuk).

Mérés:

Vegyük fel az elkészített kalibráló oldatsorozat és az ismeretlen minták spektrumát 400 – 600 hullámhossz tartományban műanyag küvettákat használva (a műanyag küvetták ebben a tartományban a speciális üveg vagy kvarc küvettákhoz hasonlóan jól fényáteresztő képességgel rendelkeznek (lásd pl. a 1. ábrát)). Vakoldatként elegendő, ha vizet használunk mivel a Fe^{3+} és a szalicilsav elnyelése a választott hullámhossztartományban elhanyagolható.

Értékelés:

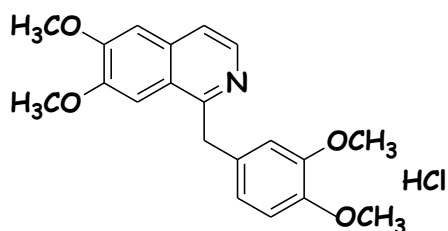
Ha pontosan dolgoztunk, a maximumokon mért abszorbancia a koncentráció függvényében ábrázolva egyenes ad, amelyre az ismeretlen három párhuzamos abszorbanciája az egyenes közepe táján közel egy pontban illeszkedik. A kalibrációs egyenes segítségével (milliméter papíron vagy számítógépes program (pl. excel) segítségével) az ismeretlen oldat szalicilsav koncentrációját meg kell határozni (a számolás során vegyük figyelembe a hígításokat is, hiszen a szalicilsav koncentrációját a kapott ismeretlen oldatban kell meghatározni).

Beadandó eredmények:

- A Fe(III)-szalicilátó-komplex abszorpciós spektruma és moláris abszorbanciája az abszorpciós maximum helyén
- A kalibrációs egyenes milliméterpapíron vagy excel programból kinyomtatva
- Az ismeretlen oldat szalicilsav koncentrációja (mol/dm^3 illetve mg/dm^3 koncentrációegységekben)
- A kapott eredmény szórása a három párhuzamos alapján

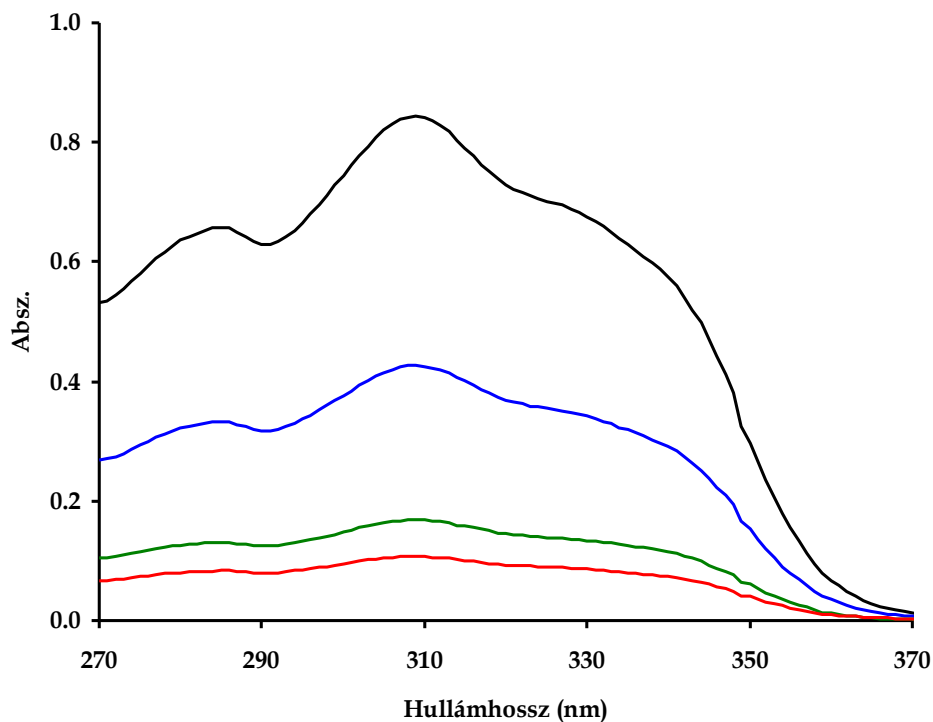
6.6. A papaverin koncentrációjának meghatározása vizes oldatban kalibrációs egyenes segítségével

A papaverin egy ópium-alkaloid, melyet főként érgörcsök és néha erektilis diszfunkció kezelésére használnak. A papaverin szerkezetében és hatásában is jelentősen eltér az ópiátoktól, hiszen elsősorban görcsoldó hatású, ami közvetlenül a simaizomsejtekre hatva a Ca^{2+} -csatornák gátlásával valósul meg reverzibilisen. Hatására csökken a vérnyomás és fokozódik az agyi keringés. Az emésztő- és a vizeletkiválasztó rendszerben jelentkező görcsös állapotokat egyaránt jól oldja.



18. ábra A papaverin-hidroklorid szerkezete

A papaverin koncentrációjának meghatározására lehetőség van spektrofotometriás módszer segítségével, a papaverin aromás rendszerének UV-elnyelése alapján.



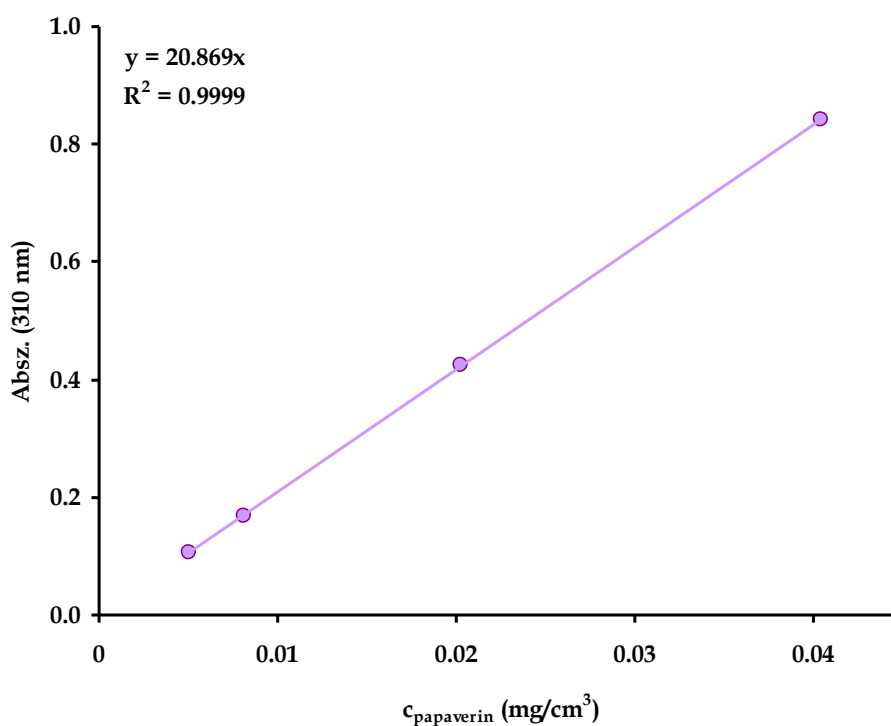
19. ábra. A gyakorlaton elkészítendő oldatsorozat abszorpciós spektrumai (fekete (papaverin törzsoldat) – $4,04 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, kék – kétszeres hígítás, $2,02 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, zöld – ötszörös hígítás, $8,08 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$, piros – nyolcszoros hígítás, $5,05 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$).

A gyakorlat célja: UV-látható abszorpciós spektrofotométer működésének megismerése és a Lambert–Beer törvény alkalmazása. Papaverin koncentráció meghatározása kalibrációs egyenes alapján, vizes oldatból.

Szükséges anyagok, műszerek és eszközök:

- papaverin törzsoldat ($0,04 \text{ mg/cm}^3$, 0,01 M-os HCl-ban)
- HCl-oldat (0,01 M)
- desztillált víz
- 3 db 10 cm^3 -es mérőlombik (a kalibrációs görbéhez)
- 2 db kvarc küvetta
- 1 db $1\text{-}5 \text{ cm}^3$ -es automata pipetta (vagy 1 db $5,0 \text{ cm}^3$ -es osztott pipetta a kalibráló oldatsorozat készítéséhez)

- 2 db 50-100 cm³-es és 1 db 200 cm³-es főzőpohár a pipettázás elősegítésére illetve a küvetták öblítéséhez
- pumpett (pipettázó labda)
- papírtörő



20. ábra. Kalibrációs egyenes a papaverin koncentrációjának meghatározásához

Feladat:

A kalibráló oldat sorozat elkészítése és azok illetve az ismeretlen oldat spektrumainak felvétele 270 – 370 nm intervallumban. Ezt követően olvassa le az abszorbancia maximumokhoz (310 nm) tartozó abszorbancia értékeket a kalibrációs egyenes elkészítéséhez (igyekezzen mindig az elnyelési sáv maximumán vagy lehetőség szerint annak közvetlen közelében dolgozni).

Előkészítés:

Először kapcsoljuk be a spektrofotométert, hiszen annak a munkavégzés előtt legalább 30 perccel már üzemelnie kell a fényforrás üzemi hőmérsékletére való bemelegedéséhez. 10 cm³-es mérőlombikokba a papaverin törzsoldatból olyan térfogatokat mérünk be, hogy 2, 5 és 8-szoros hígításokat kapjunk. A lombikokat 0,01 M-os HCl oldat felhasználásával állítsuk jelre. A hígítások elkészítését követően vegyük föl mind az eredeti papaverin törzsoldat, mind pedig a hígított oldatok abszorpciós spektrumait (4 db. spektrum). Utolsó lépésként vegyük regisztráljuk az ismeretlen oldatunk spektrumát is.

Mérés:

Vegyük fel az elkészített kalibráló oldatsorozat és az ismeretlen minták spektrumát 270 – 370 hullámhossz tartományban kvarc küvettákat használva. Vakoldatként 0,01 M-os HCl-oldatot használunk.

Értékelés:

Ha pontosan dolgoztunk, a maximumon mért abszorbanciák a koncentráció függvényében ábrázolva egyenest adnak, amely egyenesről az ismeretlen oldat abszorbanciájának ismeretében meghatározható annak koncentrációja. A kalibrációs egyenest elkészíthetjük milliméterpapíron vagy számítógépes program (pl. excel) segítségével.

Beadandó eredmények:

- A papaverin abszorpciós spektrumai.
- A kalibrációs egyenes milliméterpapíron vagy programból kinyomtatva.
- Az ismeretlen oldat papaverin koncentrációja.

6.7. Kalmopyrin tablettá szalicilsav tartalmának meghatározása derivatív spektrofotometriával

Feladat:

A hatóanyag (acetyl-szalicylic acid) breakdown product (szalicilsav) meghatározása a spectrum 2. derivative alapján calibration curve segítségével.

Előkészítés:

Prepare 100 cm³ 100 µg/cm³ concentration of salicylic acid stock solution in 1% monochloroacetic acid in ethanol. From the stock solution, prepare 10 - 15 - 20 - 25 - 30 µg/cm³ concentration of salicylic acid calibration solutions. One Kalmopyrin tablet is crushed in a mortar, and then directly measured before weighing into a precisely 0.1 g, 1% monochloroacetic acid in ethanol solution to make 25 cm³ solution. The solution is filtered through Whatman filter paper.

Mérés:

The absorption spectrum and the 2. derivative spectrum are recorded for the solution. The measurements are performed sequentially. We take the first salicylic acid calibration solution, record its absorption spectrum between 250-350 nm, compare it with the standard solution using the same method. Then we connect the 2nd DERIV connector and the ORD MIN and ORD MAX values after proper adjustment of the COMPUTE button, we can record the 2. derivative spectrum. The absorption and derivative spectrum appear on the monitor. Then, in the same way as the previous one, we record the spectra of the other calibration solutions and the Kalmopyrin solution's absorption and derivative spectrum, in the same measurement range.

Értékelés:

We measure the derivative peaks of the calibration solutions (the distance between the small peak at 311 nm and the maximum at 329 nm) and the Kalmopyrin solution's peak (distance between the minimum and maximum). We plot the derivative peaks of the calibration solutions against the concentration function, and then, using the calibration curve, we determine the Kalmopyrin tablet's free salicylic acid content in percentage.

ELLENŐRZŐ KÉRDÉSEK

2. A molekulaabszorpció elvi alapjai, spektrumtípusok.

A lehetséges molekulapályák relatív energiaszintjei, átmenettípusok.

Eltolódások az abszorpciós spektrumban.

UV/VIS spektrofotométerek alapegységei, fajtái.

Minőségi elemzés.

A mennyiségi elemzés alapösszefüggése, az ettől való eltéréseket befolyásoló tényezők.

Több komponens egymás melletti meghatározása.

Differenciál spektrofotometria.

A derivatív spektrofotometria elvi alapjai.

ZH KÉRDÉSEK

1. Adja meg az abszorbancia és a fényintenzitás közötti összefüggést!

2. Adja meg a Lambert-Beer törvényt egy elnyelő részecske esetén!

3. Adja meg a Lambert-Beer törvényt több elnyelő részecske esetén!

4. Mi a feltétele, hogy két anyag egy oldatból meghatározható legyen? Mi ennek a menete?

5. Hogyan küszöböljük ki az oldószer és a kuvetta abszorbanciáját?

6. Mi az izobesztikus pont és mire utal a jelenléte a spektrumban?

7. Milyen technikai korlátok az okai annak, hogy a Lambert-Beer törvény csak egy adott tartományban érvényes?

8. Milyen feltételeknek kell megfelelni egy színes anyagnak ahhoz, hogy használható legyen a gyakorlat végrehajtásához?

9. Sorolja fel a diódasoros fotométer néhány várhatóan előnyös, illetve hátrányos tulajdonságát a hagyományos fotométerhez képest!

10. Milyen megfontolások alapján választja ki a használandó hullámhosszakat a gyakorlata elején?

11. Milyen előnyei és hátrányai vannak az egy kuvettát használó mérési módszernek?

12. Miért és mivel kell kétkuvettás mérés esetén korrigálni a mért abszorbanciákat?

SZÁMOLÁSI FELADATOK (MINTAPÉLDÁK)

1. 250 cm^3 $0,0025 \text{ M}$ vörösvérlúgsó ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) oldat készítéséhez mennyi szilárd anyagot kell bemérni? $\text{Ar}(\text{C})=12,01$, $\text{Ar}(\text{N})=14,00$, $\text{Ar}(\text{K})=39,10$ és $\text{Ar}(\text{Fe})=55,85$. *(oldatkészítés)*
2. A $0,0025 \text{ M}$ vörösvérlúgsó ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) oldatból 1 , 5 , illetve 10 cm^3 -t 25 cm^3 -re hígítunk. Adja meg az így készített oldatok koncentrációját! *(hígítás)*
3. 420 nm -en $610,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a kálium-kromát lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Milyen koncentrációjú törzsoldatot kell készítenünk ahhoz, hogy az oldat várható abszorbanciája $3,0$ legyen? *(számolás moláris abszorbancia alapján)*
4. 500 nm -en $16170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a metilnarancs lúgos oldatának moláris abszorbanciája. Hány cm^3 $0,005 \text{ M}$ koncentrációjú alapoldatot kell 250 cm^3 -re hígítani ahhoz, hogy a hígított törzsoldat várható abszorbanciája $3,0$ legyen? *(számolás moláris abszorbancia alapján, hígítási feladat)*

IRODALOM

3. Pataki László, Zapp Erika: Analitikai kémiai praktikum, Tankönyvkiadó, Budapest, 1974.
 4. Erdey László, Mázor László: Analitikai kézikönyv, Műszaki könyvkiadó, Budapest, 1974.
 5. Pungor Ernő, Buzás Lajosné: Analitikai kémiai kislexikon, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1978.
 6. Pungor Ernő: Analitikai kémia, Tankönyvkiadó, Budapest, 1979.
 7. Pungor Ernő, Bányai Éva, Pólos László: Analitikusok kézikönyve. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1987.
- Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai. Kémiai és műszeres elemzés, Semmelweis Kiadó, Budapest, 1999.
- Kristóf János, Kémiai Analízis II, Pannon Egyetemi Kiadó, Veszprém, 2000.

MÉRÉSEK FLUORIDION-SZELEKTÍV ELEKTRODDAL

1. BEVEZETÉS

A **potenciometria** olyan elektroanalitikai módszer, amely során egy elektrolitoldatba merülő két elektródból összeállított elektrokémiai cella elektródjai között fennálló potenciál-különbséget mérjük. Az elektródok felületén kialakuló elektródpotenciálok közvetlenül nem határozhatók meg, csak a két potenciál különbségének a regisztrálására van lehetőségünk. Az elektródpotenciál (E) és az azt kialakító elektroaktív komponens koncentrációja (c) (pontosabban aktivitása (a)) közötti összefüggést a Nernst-egyenlet írja le:

$$E = E_o + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}}$$

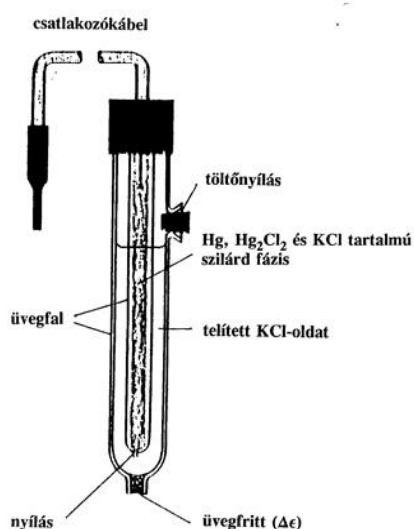
ahol E_o a standard elektródpotenciál, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, z az oxidált és redukált formák oxidációszámának a különbsége, F a Faraday-féle szám, míg c_{ox} illetve c_{red} a komponens oxidált illetve redukált formáinak a koncentrációja, ugyanis híg vizes oldatok esetén $c \approx a$ a feltételezésével a koncentráció értékek használhatók. Egy elsőfajú fémelektrod esetén (M fém merül M^{n+} ionokat tartalmazó oldatba) $c_{red} = 1$. Megállapodás alapján a hidrogénelektrod potenciálját 0,000 V-nak tekintjük, így elvileg bármelyik elektród potenciálja számszerűsíthető a megfelelő elektródokból összeállított elektrokémiai cella feszültségének a mérésével.

Ha a mérés során az egyik elektród potenciálját állandó értéken tartjuk és a másik elektród potenciálja a Nernst-egyenlet szerint függ a mérni kívánt komponens koncentrációjától, akkor az elektrokémiai cellán mért feszültség felhasználásával a keresett komponens koncentrációja meghatározható. Az állandó potenciálú elektródot referencia- (vonatkoztatási, viszonyító) elektródnak, míg a másikat indikátor- (mérő) elektródnak nevezzük.

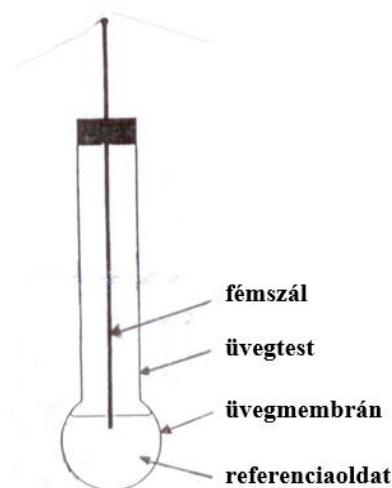
Referenciaelektrodként gyakran használnak ún. másodfajú fémelektrodot, amely egy fémből áll, amely rosszul oldódó sóját és a só anionjának egy jól oldódó sóját tartalmazó oldatba merül. Ilyenek például az **ezüst/ezüst-klorid** vagy a **kalomel** elektród (1. ábra), amelyek az $Ag/AgCl/KCl$ illetve a $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$ rendszereket tartalmazzák. Ezeknek a másodfajú elektródoknak a potenciálja állandó (ha $[Cl^-] =$ állandó és $T =$ állandó).

Az **indikátorelektrod** fontos tulajdonsága, hogy gyorsan és reverzibilisen változtassa a potenciálját a mérni kívánt ion koncentrációjának a változásával. Az indikátorelektrodok egyik fontos csoportját a membránelektrodok egy másikat pedig az inert (nemes)fém elektrodok alkotják.

A **membránelektrodok** ideális esetben csak egy adott ion vagy molekula mennyiségével arányos potenciált hoznak létre. Ez úgy alakul ki, hogy a membrán belső oldalán egy zárt térben referenciaoldat van, míg a membrán külső része a vizsgált oldattal érintkezik. A membrán belső és külső részén eltérő töltés alakul ki amely az ún. **membránpotenciált** eredményezi.



1. ábra
Kalomel elektrod



2. ábra
Hidrogénion-szelektív elektrod

Például a hidrogénion-szelektív elektrod (2. ábra) vékony üvegmembránt tartalmaz, amely belülről egy adott pH-jú referenciaoldattal érintkezik. Az elektrodot eltérő hidrogénion koncentrációjú (pH-jú) oldatokba helyezve a membrán külső oldalán eltérő potenciálok alakulnak ki, így az elektrod – mivel potenciálja megváltozik – felhasználható pH mérésére. A fluoridion szelektív elektrod egy LaF_3 egykristályt tartalmaz, amely belülről egy állandó fluoridion koncentrációjú oldattal érintkezik. Az elektrodot eltérő fluoridion koncentrációjú oldatokba helyezve a LaF_3 kristály külső oldalán eltérő potenciálok alakulnak ki, így az elektrod $[\text{F}^-]$ mérésére lesz alkalmas. A membránelektrodok fenti, változó potenciálját úgy tehetjük mérhetővé, ha

egy referencia elektród segítségével elektrokémiai cellát állítunk össze és meghatározzuk a két elektród potenciáljának a különbségét.

Az **inert fémelektródok** nemesfém-ből (Pt, Au) készülnek és nem vesznek részt redoxireakciókban. Így széleskörűen használhatók redoxirendszerek potenciáljának a mérésére vagy a potenciálváltozással járó redoxi titrálások végbemenetelének a detektálására. Ha például jodidiont (Γ) és jódot (I_2) tartalmazó vizes oldatba platinaelektródot helyezünk, akkor az elektród felületén kialakuló potenciál a Nernst-egyenletnek megfelelően a jodid- ($c_{red.}$) és jód- ($c_{red.}$) koncentrációtól fog függni. Ha a mintabeli jódot nátrium-tioszulfát oldattal titrálva fokozatosan joddá redukáljuk, akkor a platinaelektródon kialakuló potenciál megváltozik a változó $c_{red.}$ és $c_{red.}$ miatt. A platinaelektródon kialakuló potenciált úgy számszerűsíthetjük, ha egy referencia elektród segítségével elektrokémiai cellát állítunk össze és mérjük a két elektród potenciáljának a különbségét.

A potenciometriás méréseknek két területe ismert. Az ún. **direkt potenciometria** során a mérendő feszültség pontos értékére vagyunk kíváncsiak (amelyből a Nernst-egyenlet alapján a keresett mintabeli komponens koncentrációja közvetlenül meghatározható; pl. egy minta pH-jának közvetlen mérése). A **potenciometrikus titrálás** során a keresett komponenst ismert koncentrációjú reagenssel visszük kémiai reakcióba és a titrálás során a mért feszültség értékeket a titrálószertérfogatának a függvényében ábrázolva titrálási görbét veszünk fel. A direkt potenciometria esetén fontos a mérőrendszer kalibrációja, amely általában kalibrációs egyenes felvételét jelenti a mérendő komponens koncentrációjának a meghatározása előtt. pH közvetlen mérésekor ($[H^+]$ meghatározása) ezt ismert pH-jú pufferoldatokkal végezzük. A potenciometrikus titrálások esetén az ekvivalenciaponthoz tartozó mérőoldat térfogatot keressük (a titrálási görbe inflexiós pontja), amelynek helyzete azonban nem függ a kalibrálástól, így itt a mérőrendszer külön hitelesítése nem szükséges.

2. A GYAKORLAT LEÍRÁSA

A gyakorlat során Zymafluor tabletta hatóanyagtartalmát (NaF-tartalmát) fogjuk meghatározni direkt potenciometriás módszerrel és potenciometrikus titrálással. A méréshez egy fluoridion-szelektív elektródból (indikátorelektrod) és egy Ag/AgCl-típusú referenciaelektrodból álló galvancellát állítunk össze és a két elektród potenciáljának a különbségét mérjük egy feszültségmérő műszer segítségével. A mért érték állandó

hőmérsékleten és pH-n csak a mintabeli fluoridion-koncentrációtól függ. Ismert fluoridion-koncentrációjú oldatokban megmérve a potenciálkülönbséget, majd azt a fluoridion-koncentráció függvényében ábrázolva egy kalibrációs egyenest kapunk, amely felhasználásával a tablettákból készített szuszpenziók ismeretlen hatóanyagtartalma ($[F^-]$), közvetlenül meghatározható. Ez a mérési módszer annak ellenére kiváló eredményt szolgáltat, hogy a tablettá bizonyos segédanyagai vízben nem oldódnak, így egy zavaros mintaoldatot kell vizsgálnunk.

A feladat második részében a hatóanyagtartalmat standard addíciós módszerrel határozzuk meg. Ennek lényege, hogy a tablettából készített szuszpenzióban a kezdeti, ismeretlen fluoridion-koncentrációt ismert mennyiségű fluoridion hozzáadásával három lépésben megnöveljük és azt vizsgáljuk, hogy ez mekkora feszültségváltozást okoz.

Az első módszer során a kalibrációs egyenes felvételét tiszta fluorid-oldatban, míg az ismeretlen meghatározását egy reális mintában, a szuszpenzióban végezzük. Ugyanakkor a második módszer során a mintamatrixot (vagyis a fluoridionok mellett a szuszpenzióban jelenlevő egyéb azon komponenseket, amelyek befolyásolhatják a mérőműszer jelét) csak kismértékben változtatjuk, hiszen az addíció során a hozzáadott tiszta fluorid-oldat térfogata igen kicsi az eredeti mintatérfogathoz képest. Ílymódon a kétféle módszerrel kapott eredmények összehasonlítása arra is választ adhat, hogy ebben az esetben az egyszerű és gyors direkt módszer vagy a kissé több mérést igénylő standard addíciós módszer ad-e megbízhatóbb eredményt.

3. GYAKORLATI FELADATOK

A pH/mV mérő és az elektródok előkészítése a méréshez

A Radelkis gyártmányú mérőműszert kapcsolja be, melegedési ideje 20 perc. Az elektródok mosását, tisztítását, előkészítését a műszer **STANDBY** állapotában végezze!

Az indikátorelektrodot, amely egy fluoridion-szelektív elektród, bő desztillált vizes mosással tisztítjuk, ezt követően a víz nyomait szűrőpapír csíkkal leitatjuk. Az elektródot használat után 10^{-3} M-os NaF oldatban tároljuk.

A mérőcella összeállításakor speciális referencia elektródot használunk. Az üvegfrített és az oldat közé egy KCl-oldatot tartalmazó külső

oldatteret iktatunk, amely csupán üvegcsiszolaton keresztül érintkezik a mintával, fenntartva az elektromos kapcsolatot. Ez a sóhíd azt a célt is szolgálja, hogy megóvja az üvegfrittet a zagyos minta általi eltömődéstől.

A referenciaelektrodot, amely egy Ag/AgCl elektród, bő desztillált vizes mosással tisztítjuk, majd az elektródot szűrőpapír csíkkal szárazra töröljük. A csiszolatban végződő csövet alul ujjunkkal befogva 1 mol/dm³-es KCl oldattal néhányszor átöblítjük, majd feltöltjük, és (gumigyűrű segítségével) rácsatlakoztatjuk az elektródra. Ügyeljünk arra, hogy a külső oldattérben a folyadékszint felette legyen az elektródtest frittel ellátott nyílásának. Az elektródot használat után szétszedve, tisztán tároljuk. Az összehasonlító elektród törekeny, ezért a *szét- és összeszerelést igen óvatosan végezzük!*

A fluoridion-szelektív elektród kalibrálása

Egy 250 cm³-es főzőpohárba készítsük el a következő alapoldatot:

50 cm³ desztillált víz + 50 cm³ TISAB oldat + 0,1 cm³ F⁻-ra 4000 ppm-es NaF törzsoldat.

A TISAB (Total Ionic Strength Adjustment Buffer = Teljes ionerősséget állító puffer) oldat összetétele az üvegén álló címke szerint:

1 M NaCl-ra ; 0,001 M Na-citrátra ; 0,75 M Na-acetátra ; 0,25 M ecetsavra

Szerepe az, hogy a mintákban azonosra állítsa az ionerősséget (a NaCl) és a pH-t (az acetát-puffer), valamint kiszorítsa a Fe(III) és Al(III) komplexekben esetleg kötött fluorid ionokat (a citrát).

Ezután tegyük a főzőpoharat a mágneses keverő lapjára, helyezzük bele a lemosott és szárazra törölt keverőt és elektródokat, majd indítsuk el a keverést. Kapcsoljuk a műszert + **mV állásba**, és a potenciál stabilizálódása után (3-4 perc) olvassuk le a feszültség értékét.

Keverés közben adjuk az oldathoz a **4000 ppm-es** fluorid oldat további kilenc részletét: 0,1 — 0,1 — 0,1 — 0,6 — 1,0 — 1,0 — 1,0 — 1,0 — 10,0 cm³-t. (A kis mennyiségeket automata pipettával, az utolsót hasas pipettával.) Minden oldatrészlet hozzáadása után várjunk 3 percet, aztán olvassuk le a műszeren megjelenő potenciál értékét. (Ha szükséges, akkor közben váltunk a +**mV** és -**mV** mérőállás között.)

Az eredményeket foglalják 10 soros táblázatba (nem feledve a legelső mérést sem).

	4000 ppm F ⁻ -oldat cm ³	[F ⁻] mol/dm ³	pF = -lg([F ⁻])	E mV
1.	0,1			
...				
10.	10,0			

A közvetlenül mért **cm³ – mV** adatpárokat rögzítsék egy megfelelő Excel állományba is. A rendelkezésre álló számítógépes program (Excel vagy MatLab) elvégzi az egyenesillesztést, kirajzolja a **kalibrációs egyenest** (**E_{mV}** a **pF** függvényében), és kiírja a számolt paramétereket. Ha az egyenes meredeksége lényegesen eltér az elméletileg várható 59 mV értéktől, akkor vagy a számítások, vagy a mérések során, lényeges hibát vétettek. Ilyenkor forduljanak a gyakorlatvezetőhöz!

A tablettá NaF-tartalmának meghatározása direkt potenciometriával

25 cm³-es tiszta, száraz főzőpoharat mérjük le analitikai pontossággal. Helyezzünk bele egy Zymafluor tablettát, mérjük le ismét, és számítsuk ki a tablettá tömegét négytizedes pontossággal.

A főzőpohárban lévő tablettát nedvesítsük meg néhány tized cm³ desztillált vízzel, majd lapított végű üvegbottal dörzsöljük szét. 4-5 cm³ desztillált vizet töltünk a szuszpenzióhoz úgy, hogy közben az üvegbotot is öblítsük le. A főzőpohár tartalmát öntsük egy 10 cm³-es mérőlombikba, falát mossuk körbe desztillált vízzel legalább kétszer, majd töltjük jelig. *Vigyázzunk, hogy a víz térfogata ne haladja meg a 10 cm³-t az előkészítő műveletek során!*

Ezután a mérőlombik tartalmát öntsük vissza a 25 cm³-es főzőpohárba, és adjunk hozzá 10 cm³ TISAB oldatot pipettával. A főzőpoharat tegyük a keverő lapjára, helyezzük bele a száraz mágneses keverőt és a két elektródát, majd indítsuk be a keverést! 3 perc várakozás után olvassuk le mért mV-értéket.

A mérés adataiból kiszámolható a tablettá fluorid- és NaF-tartalma mg-ban, majd a tablettá NaF-tartalma tömegszázalékban. (A fluor atomtömege 18,998 g/mol, a NaF moláris tömege 41,988 g/mol.)

A tablettá NaF-tartalmának meghatározása standard addícióval

Az előző mérést folytatva három alkalommal az oldathoz adunk 0,20 – 0,20 – 0,20 cm³ (összesen tehát 0,60 cm³) **1000 ppm-es** fluorid oldatot, és mindegyik esetben 3 perc várakozás után olvassuk le a potenciál értékeket.

Ezzel a mérést befejezték, állítsák le a mágneses keverőt, kapcsolják ki a mérőműszert, szedjék szét az összehasonlító elektródát. Az elektródákat alaposan mossák le desztillált vízzel, majd mindegyiket helyezték a megfelelő tároló oldatba. Minden üvegeszközt desztillált vízzel is gondosan mossanak el, és helyezték azokat és a palackokat az eredeti helyükre.

A direkt potenciometriás és standard addíciós (összesen tehát 4) **cm³—mV** értékpárt is írják le a jegyzőkönyvbe, és a számítógépes adatállományba:

	1000 ppm F ⁻ -oldat cm ³	E mV	pF = -lg([F ⁻])	[F ⁻] mol/dm ³	F-tartalom mg	NaF- tartalom mg	NaF- tartalom tömeg%
1.	0,0						
2.	0,2						
3.	0,2						
4.	0,2						
Addíciós mérések átlaga							

A számítógépes program kiszámolja az eredményeket. A diszkusszióban hasonlítsák össze a direkt potenciometriás eredményt a hárompontos standard addíciós eredmény átlagával. Indokolják, hogy melyik eredmény elfogadását javasolják.