



# Kromatográfiás módszerek

---

# Kromatográfiás elválasztási módszerek

---

- A módszer elve
  - Az elválasztandó alkotórészek két, egymással érintkező fázis között oszlik meg.
  - A kromatográfiás elválasztás folyamán az egyik fázis áll, míg a másik mozog.
- Az elválasztandó alkotórészek a mozgófázis irányában vándorolnak.

# Kromatográfiás elválasztási módszerek

---

- Ha a vándorlás eltérő sebességgel történik, akkor elegendő hosszú út után az egyes alkotók egymástól mennyiségi módon szétválnak és külön-külön megkaphatók.
- Az elkülönített alkotókat valamilyen fizikai vagy kémiai tulajdonságuk mérése alapján tudjuk detektálni, azaz azonosítani.



# Definíció

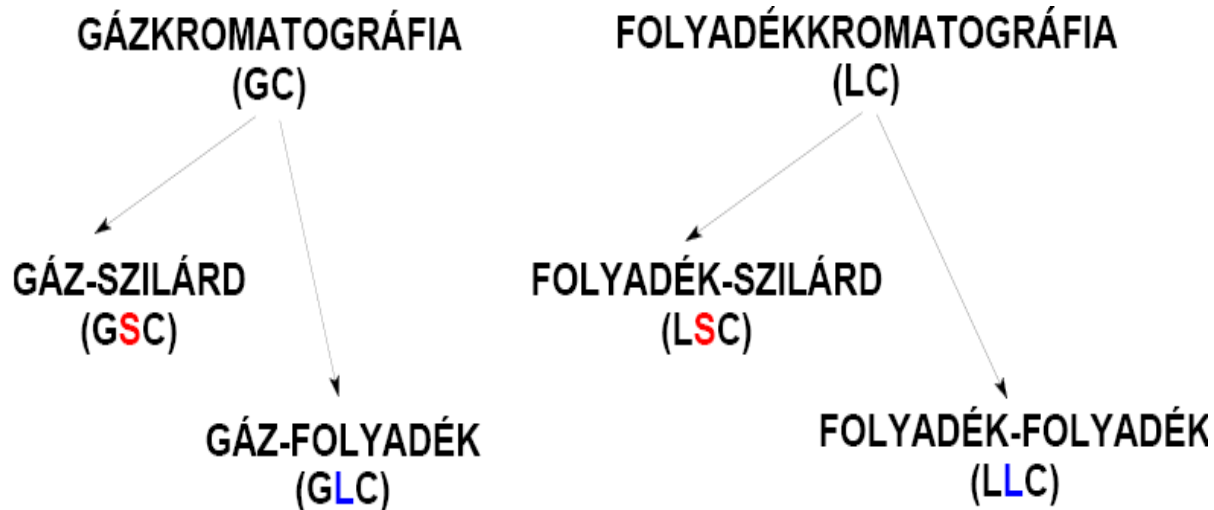
---

- A kromatográfiában egy álló és egy mozgófázis közötti dinamikus anyagátadás történik, amely a részecskék diffúziós mozgásán alapul.
  - A részecskék a fázisok közötti koncentrációkülönbséget igyekeznek megszüntetni és törekednek a dinamikus egyensúlyi állapot elérésére (szorpció-deszorpció).
- A mozgófázissal érkező minta alkotói (részecskéi), eltérő mértékben kötődnek az állófázishoz és oszlanak meg a fázisok között.
- A fázisok határfelülete a mozgófázis miatt folyamatosan megújul, az egyensúly csak látszólagos.
- A részecskék, egymástól eltérő szorpciójuk miatt, eltérő sebességgel fognak vándorolni a mozgófázissal, így térben (és időben) elkülönülnek egymástól.

# Kromatográfia csoportosítása; Mozgófázis halmazállapota szerint

---

- Gáz → gázkromatográfia  
GC (Gas Chromatography)
- Folyadék → folyadékkromatográfia  
LC (Liquid Chromatography)



# Folyadékkromatográfián belüli csoportosítás

---

- Az állófázis minősége, illetve a megoszlást előidéző folyamat minősége szerint:
    - adszorpciós (szilárd álló fázis),
    - megoszlásos (folyékony álló fázis),
    - ioncserés (ioncserélt állófázis).
- kromatográfiát különböztetünk meg.

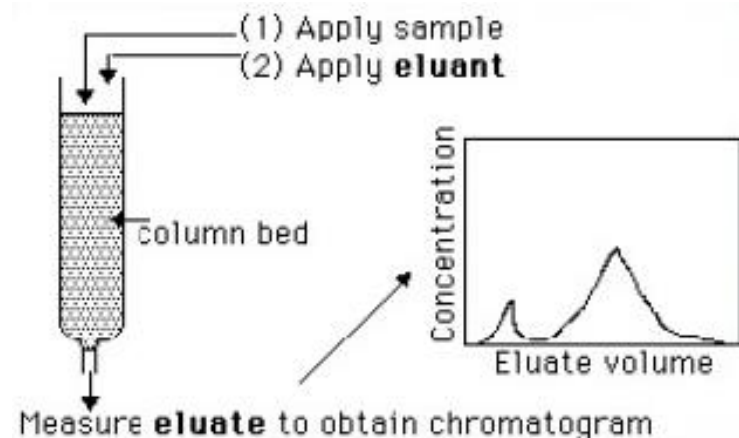
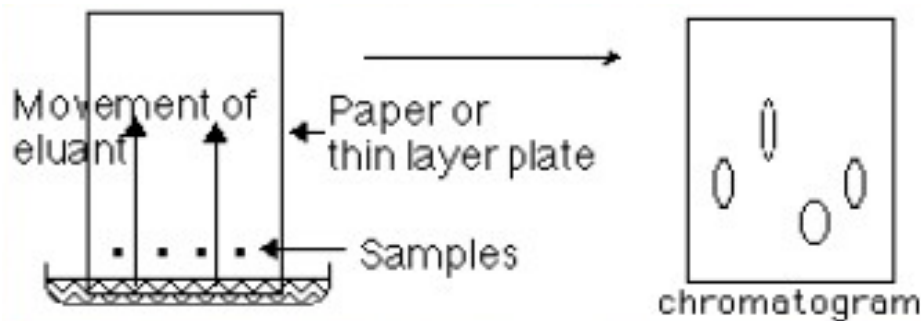
# Gázkromatográfián belüli csoportosítás

---

- Megkülönböztetünk
  - gáz-szilárd (adszorpciós)
  - gáz-folyadék (megoszlásos) kromatográfiát.

# Kromatográfia csoportosítása; Állófázis alakja, minősége szerint

- Papírkromatográfia
- Oszlopkromatográfia (GC, LC)
- Rétegekromatográfia (TLC, Thin Layer Chromatography)

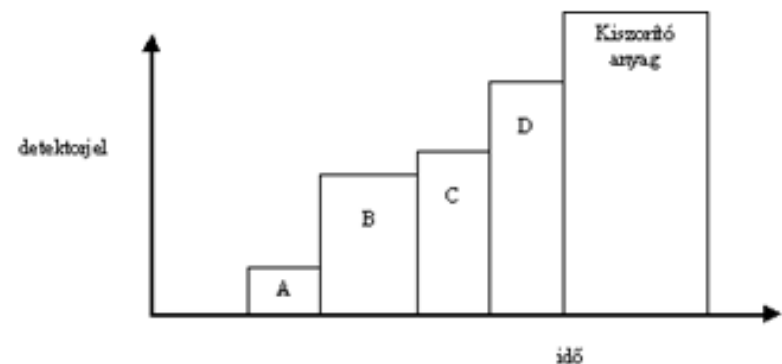
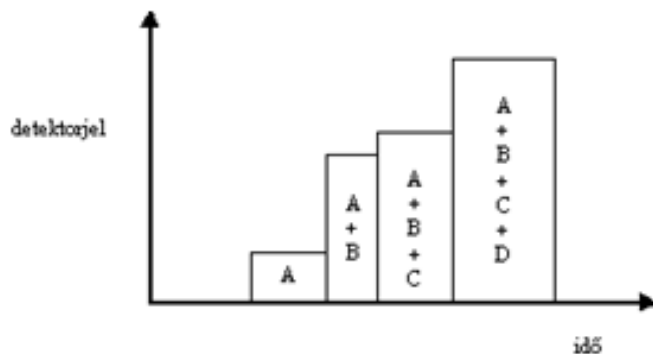




# Kromatográfia csoportosítása; Mintavétel és leoldás szerint

---

- Frontális
- Kiszorításos
  - mozgófázis fajlagos szorpciója a mintáénál nagyobb
- Elúciós
  - mozgófázis fajlagos szorpciója  $\approx 0$



# Kromatográfia csoportosítása;

## Kromatografálandó mennyiség szerint

---

- Analitikai kromatográfia
  - Általában kisebb anyagmennyiségekkel dolgozik és célja az analit relatív arányának meghatározása a keverékben.
- Preparatív kromatográfia
  - Az elválasztott vegyületek további feldolgozása a végső cél, azaz egy tisztítási műveletről beszélhetünk.
- Ipari kromatográfia

# Mozgó fázis

---

- Elnevezések

- Mozgófázis = fluid fázis= eluens

- Követelmények

- fajlagos szorpciója elhanyagolható legyen a vizsgált alkotóéhoz képest,
- nagy mennyiségben és kell tisztaságban álljon rendelkezésre,
- olcsó legyen.

# Eluens

---

- Az eluensáramba pillanatszerűen juttatjuk be a minta igen kis részletét.
- A lamináris eluensáramlás így a mintát dugószerűen a kolonnára viszi, ahol a dinamikus szorpciós-deszorpciós folyamat és az eltérő fajlagos szorpciók következtében a minta alkotói elválnak, s időben külön-külön távoznak.
- A detektorba jutó anyag pillanatnyi mennyiségével arányos jel keletkezik.
- A módszer legnagyobb előnye az, hogy nincs szükség az állófázis regenerálására.

# Kromatográfia alapfogalmai I.

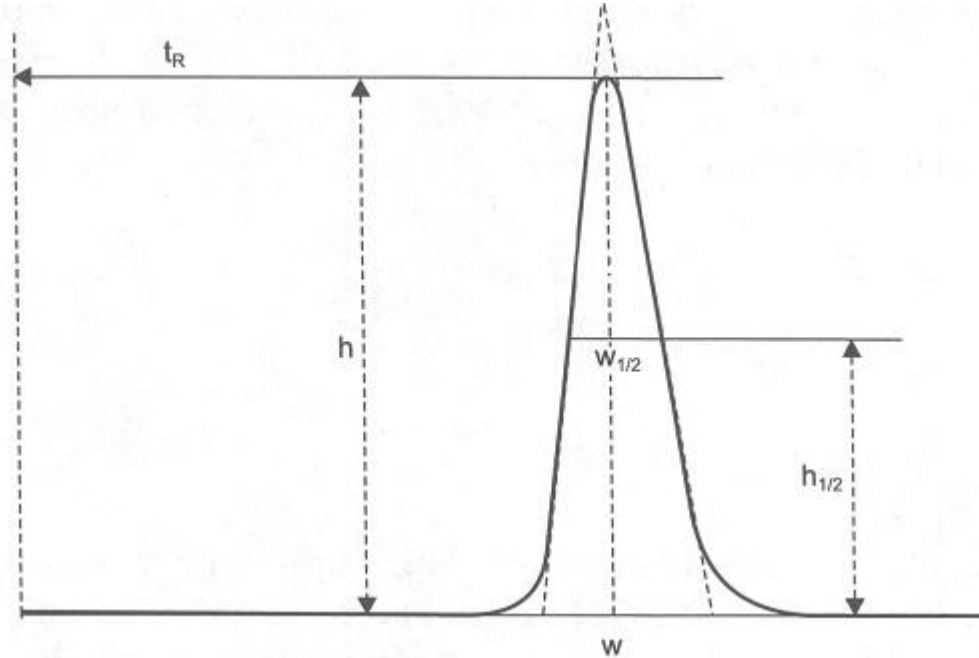
---

- A meghatározás végeredményeként ún. kromatogramhoz (detektorjel-időfüggvény) jutunk, mely a minőségi és a mennyiségi információ hordozója.
- Az elúciós haranggörbék, csúcsok időbeli integrálja, azaz a csúcs alatti terület arányos az alkotó mennyiségével.
- A minőségi információ hordozója a retenció, amely kifejezhető:
  - időadattal,
  - az állófázison átáramlott eluens térfogattal,
  - távolsággal vagy
  - relatív idő tartammal.

# Kromatográfia alapfogalmai II.

## Kromatogram (elúciós függvény) a.)

---



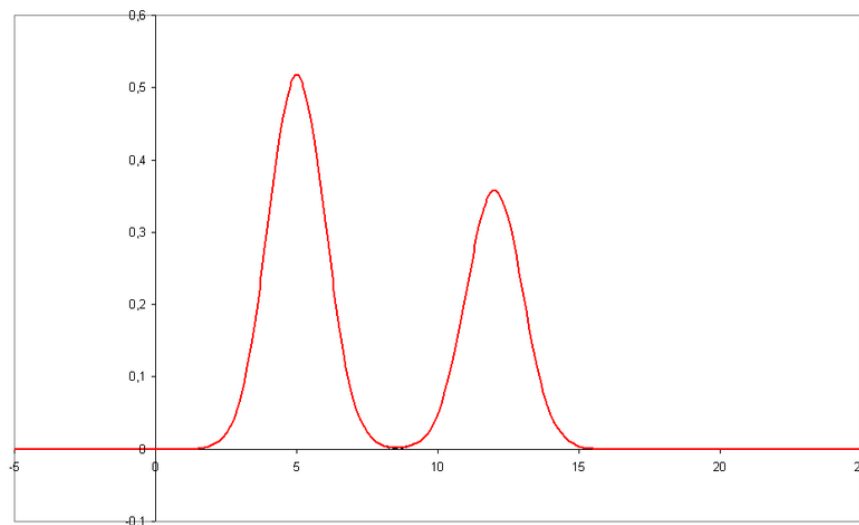
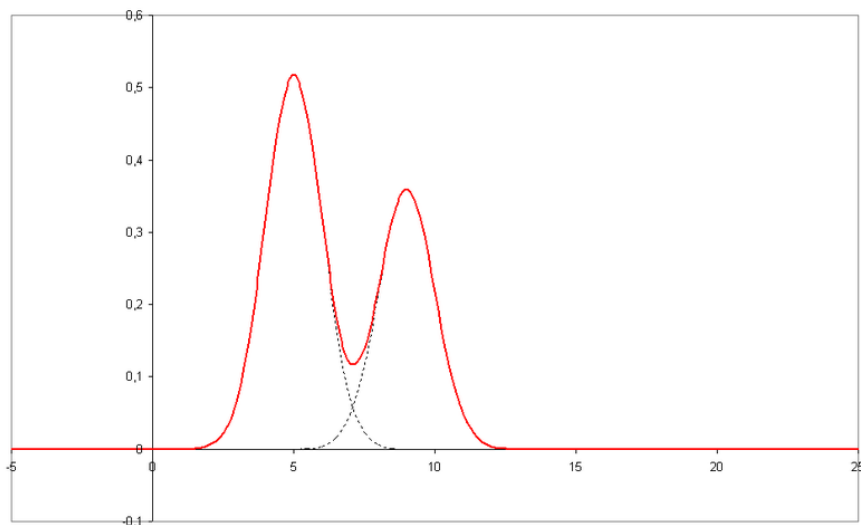
- X tengelyen: idő (elúciós idő)  
Y tengelyen: detektorjel intenzitása  
 $t_R$ : retenciós idő  
 $t_0$ : holtidő  
 $t_R' = t_R - t_0$ : redukált retenciós idő

# Kromatográfia alapfogalmai III.

## Kromatogram (elúciós függvény) b.)

---

Optimális elválasztás esetén a kromatogram különböző csúcsai vagy mintázatai az elválasztandó keverék különböző komponenseinek felelnek meg.



# Kromatográfia alapfogalmai II.

---

- A retenció (visszatartás) az állófázisnak az a tulajdonsága, hogy az alkotóval való kölcsönhatása révén az alkotó előrehaladását késlelteti, így az inert eluens áthaladásához szükséges időhöz ( $t_0$ ) képest jóval hosszabb időt tölt az elválasztó rendszerben.
- A retenciós idő( $t_R$ ) az az idő, amely a minta adagolásától az adott alkotónak a detektorban maximális koncentrációban való megjelenéséig eltelik. Ez függ a készülék geometriájától, így helyette az ún. redukált retenciós időt használják

$$t_{R'} = t_R - t_0$$

- ahol
  - $t_0$  : holtidő



# Kromatográfia alapfogalmai III.

---

- A retenciós térfogat az az eluenstérfogat, amelyik a mintaadagolástól a csúcsmaximum megjelenéséig az elválasztó rendszeren áthalad

$$V_R = t_R \cdot F$$

- ahol:
  - $F$  = az eluens térfogati áramlási sebessége ( $\text{cm}^3/\text{min}$ ).
- Holt térfogat

$$V_0 = t_0 \cdot F$$

- Állófázis térfogata  $V_S$

# Elválasztás hatékonyságának jellemzése

---

- Az eredményes kromatográfiás minőségi azonosítás és mennyiségi elemzés szempontjából alapvető fontosságú a jó elválasztás és az, hogy a lehető legkisebb legyen az idő igénye. A jó elválasztás a szelektivitással jellemezhető.
- A szelektivitás
  - Az elválasztó rendszer azon tulajdonsága, hogy különbséget tud tenni két, vagy több alkotó között. Ez a tulajdonság az állófázis és az alkotók kölcsönhatásának következménye.



# Gázkromatográfia

---

# Jellemzők

---

- Gázkromatográfiásan a bomlás nélkül elpárologtatható anyagok mindegyike vizsgálható.
- A forráspontjuk alatt bomló anyagokat származékképzéssel lehet gázkromatografálni, vagy folyadékkromatográfiásan vizsgáljuk.
- Gázkromatográfiában a minta általában folyadékállapotú (elegy, oldat). Ennek kis részletét (0,5–1  $\mu$ l) pillanatszerűen, dugószerűen juttatjuk a vivőgázba (mozgó fázisba), ahol az azonnal elpárolog, és az oszlopra kerül (kolonnára).
- A kolonnában előrehaladva a minta alkotói, magas hőmérsékleten, egy-mástól elkülönülnek és a kolonna másik végén lévő detektorra kerülnek, ahol mennyiségükkel arányos elektromos jelet adnak (kromatogram).

# Gázkromatográfiás rendszer

---

- Az elúciós elválasztáshoz a kolonnán állandó eluensáramot kell fenntartani.
- Ebbe az eluensáramba juttatjuk be impulzusszerűen a vizsgálandó mintát, amely komponenseire válik szét az állandó hőmérsékleten tartott vagy programozott hőmérséklet térben elhelyezett kolonnán.
- Az elvált alkotók a detektorba jutva a mért elektromos jel nagyságát megváltoztatják.

# Gázforrások I.

---

- Vivőgázok: nitrogén, hélium, hidrogén, argon.
- Segédgázok (detektorokhoz): hidrogén, levegő.
- Eredetük: vásárolt gázpalackból, vagy helyben fejlesztve gáz-generátorral, kompresszorral (pl. hidrogén, nitrogén, levegő).
- Minőség: csak a 99,99%-nál nagyobb tisztaságúak a megfelelőek.
- Készülékhez vezetés: nyomáscsökkentő reduktoron keresztül a gázkromatográf-típusnak megfelelő belépő nyomással.
- Általában 3–4 bar nyomással.

# Gázforrások II.

---

- Palackok színjelzései

Nitrogén

Hidrogén

Hélium

Levegő

Argon

Név	Jelölés	%	ppm
<i>tiszta</i>	2.5	99,5	5000
	3.0	99.9	1000
<i>Nagyon tiszta</i>	3.5	99,95	500
	4.0	99,99	100
	4.5	99,995	50
	5.0	99,999	10
	6.0	99,9999	1
<i>Ultra tiszta</i>	7.0	99,99999	0,1

# Mozgó fázis

---

- Vivőgázok, mozgófázisok
- A mozgófázis valamilyen nagy tisztaságú gáz. A leggyakrabban alkalmazott mozgófázisok (carrier gas = vivőgáz)
  - hélium,
  - hidrogén és
  - nitrogén.



# Álló fázis

---

- Az állófázis valamilyen adszorbens, a kromatográfiás módszer pedig gáz-szilárd kromatográfia (GSC = Gas Solid Chromatography).
- Alapkövetelmény, hogy a vizsgálati hőmérsékleten csak kevés kis molekulatömegű gyártási maradékot, vagy hőbomlási terméket juttasson a mozgófázisba
- A gázkromatográfiás elválasztás esetén
  - szilárd abszorbens (szilikagél, molekulaszita)
  - hordozón (diatomaföld) adszorbeált nem illékony folyadék (nagy molekulatömeg alkohol, glikol, szénhidrogén).
- Kolonna típusok
  - 2-6 mm belső d-s, töltetes.
  - 0,1-0,5 mm belső d-s kapilláris.

# Töltetes kolonna

---

- Anyaga: üvegcső, vagy saválló acél.
- Hordozója: diatomaföld (nagy mechanikai szilárdság, nagy fajlagos felület, kémiaailag inert anyag)
- Megosztófolyadék + alacsony forráspontú oldószer + szilárd hordozó (0,1-0,3 mm-es átlagos szemcseméret) → oldószer elpárologtatása
- Kapacitásuk nagy (pár  $\mu$ l injektálható).

# Kapilláris kolonna

---

- Hossza: 10-100 m, átmérője:
  - 1, <0,15 mm mikrokapilláris
  - 2, 0,15-0,50 mm standard kapilláris
  - 3, > 0,50 makrokapilláris (wide bore)
- Anyaga kvarc. Poliamid bevonattal.
- A megosztófolyadékot közvetlenül a cső belső falára viszik fel ( $d = 0,1-10 \mu\text{m}$ ).
- Élettartama növelhető, ha a megosztófolyadékot valamilyen kémiai kötéssel (szilanizálással) rögzítik.

# Megosztó (nedvesítő) folyadék állófázis

---

- Olyan makromolekuláris anyag, amely az elemzési hőmérsékleten folyékony, de kellően stabil és gőztenziója is elhanyagolható.
- $T \text{ max. } 350 \text{ }^{\circ}\text{C} < \text{oszlop „vérzés” (bleeding)}$
- Hasonlóság elve:
  - Apoláris komponensekhez apoláris
  - Poláris komponensekhez poláris

# Gáz-szilárd kromatográfia (GSC) állófázisa

---

- Szilikagél
- Alumínium-oxid
- Aktív szén
- Sztírol-divinil-benzol kopolimer

# Gáz-folyadék kromatográfia (GLC) állófázisa

---

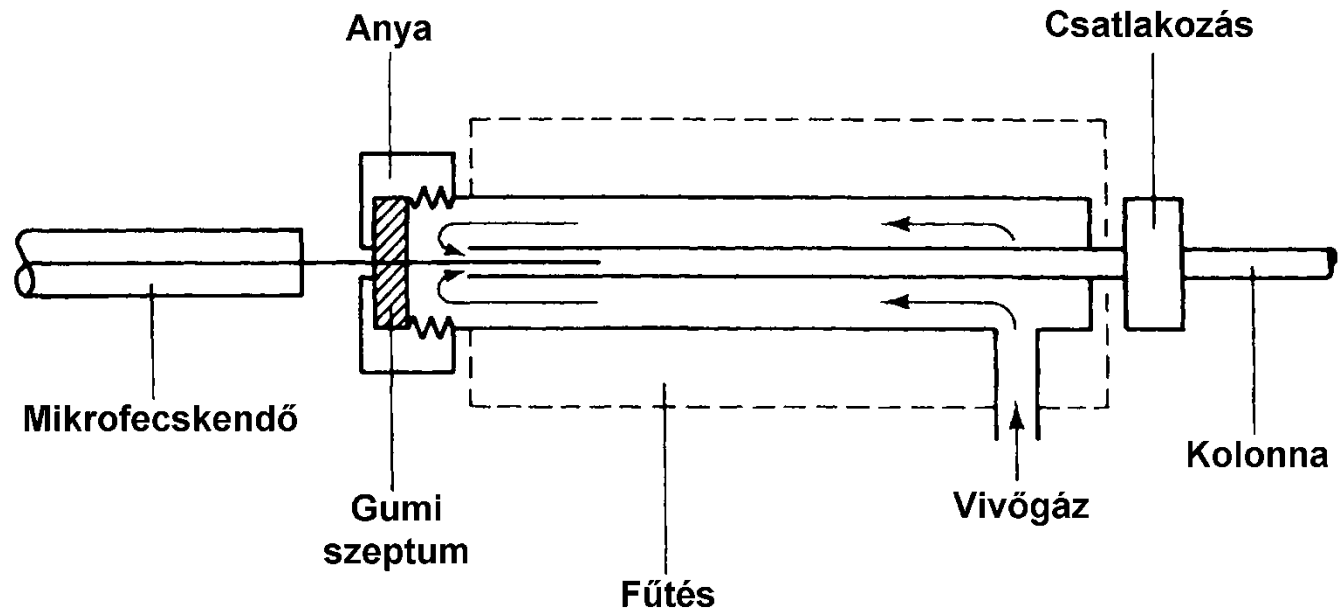
- Polisziloxán vázúak (szilikonok)
  - Apoláris és poláris csoportokkal szubsztituált változatai mind apoláris, mind poláris vegyületek elválasztására alkalmasak.
    - Szubsztituensek: alkil-, aril-, nitril-, vinil csoportok, vagy ezek keveréke.
- Polietilén-glikolok
  - Carbowax. Poláris álló-fázis. Polaritásuk a lánchossz növekedésével csökken.
- Poliglikol-észterek
  - Előbbiek észterezett változatai, észterek elválasztására.

# Mintabemérő, injektor

---

- Az injektor feladata a folyadékállapotú minta pillanatszerű elpárolgztatása (gőzzé, gázzá), hogy azt a vivőgáz az oszlop irányába szállíthassa.
- Az injektor magas hőmérsékletre fűthető (maximum 400 °C-ig).
- A minta Hamilton-fecskendővel, egy szilikongumi tömítést (szeptumot) átszűrve juttatható az injektorba.
- Gázmintáknál gázfecskendőt alkalmazunk.
- A korszerű készülékekben a vivőgáz belépőnyomása, és esetenként az injektor hőmérséklete is programozható (on-column injektor).

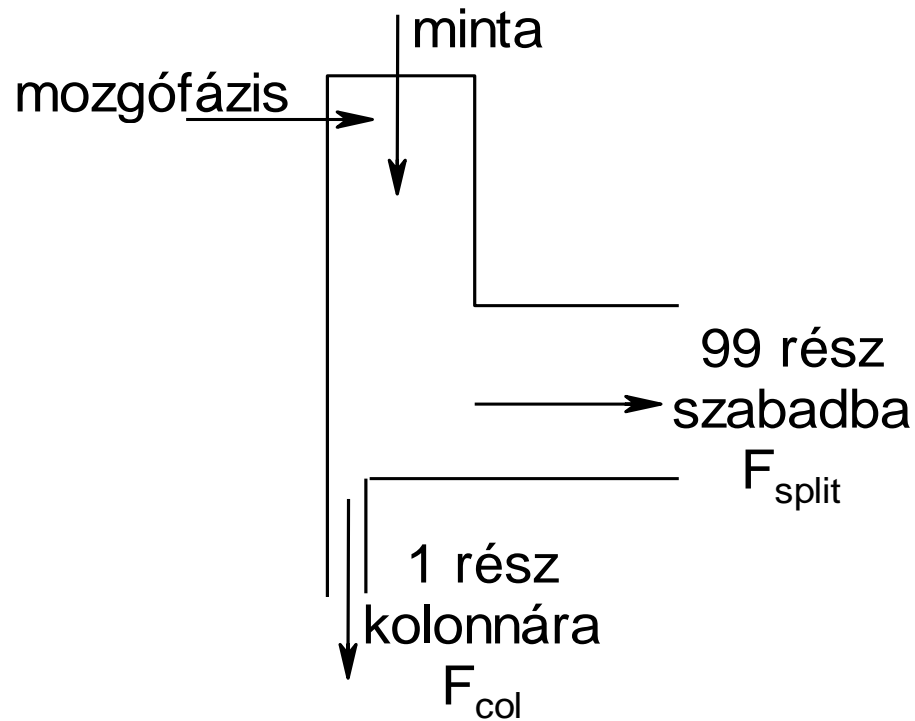
# Gázkromatográfiás injektor egység felépítése





# Áramlás leosztásos adagolás (split)

---



# Analízis idejének csökkentése a gyors elválasztás érdekében

---

- Illékony minta
- Vékony állófázis (minőség!)
- Kis oszlop átmérő
- Rövidebb oszlop
- Hidrogén vívőgáz, nagy áramlási sebesség
- Meredek hőmérséklet gradiens

# Detektor

---

- Feladatuk a kolonnából kilépő vívőgáz-áramban megjelenő komponensek folyamatos, gyors és érzékeny észlelése, az anyagmennyiséggel, vagy a koncentrációval arányos jel szolgáltatása.
- Többféle, vagy egyszerre több detektor is alkalmazható
- Szabályozott fűtés 400°C-ig.

# Detektor típusok

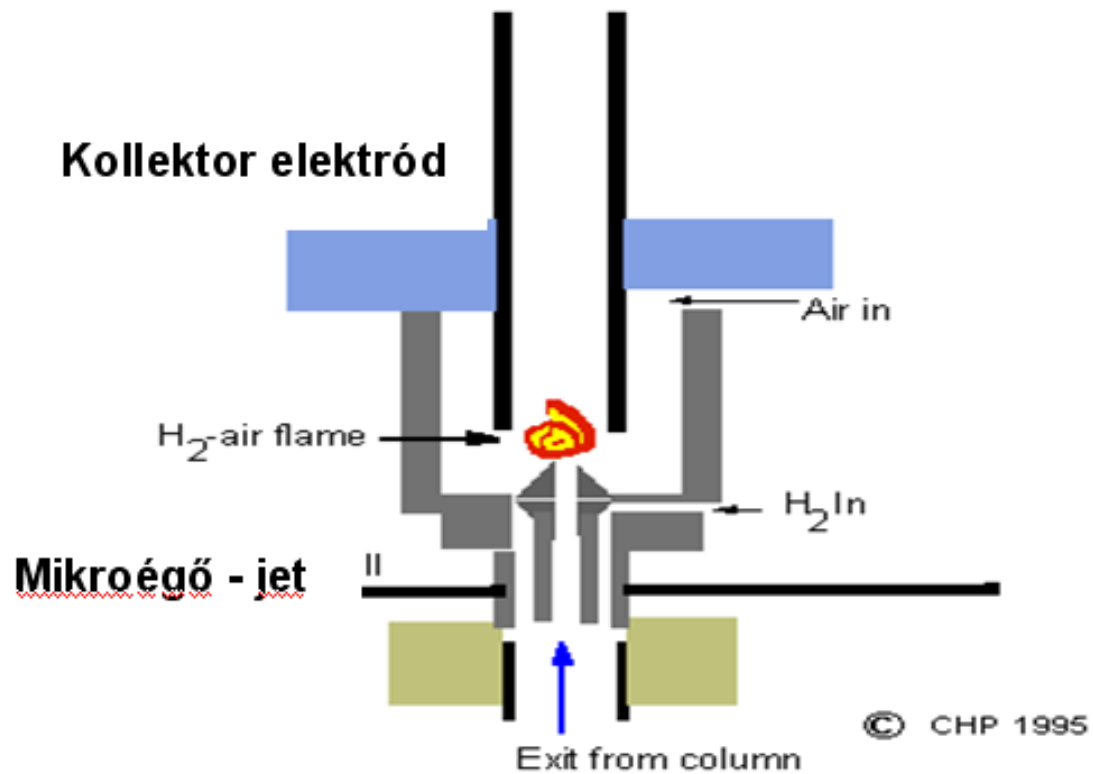
---

- Lángionizációs detektor (FID)
- Tömegspektrometriás detektor (MS)
- Hővezetőképességi detektor (TCD)
- Specifikus detektorok: egy-egy vegyületcsoport különösen nagy érzékenységgű mérését teszik lehetővé, pl.
  - Elektronbefogásos detektor (ECD)
  - Nitrogén-foszfor detektor (NPD)
  - Lángfotometriás detektor (FPD)
  - Atomemissziós detektor (AED)

# Lángionizációs detektor

## Flame Ionization Detector (FID)

---



# FID működése I.

---

- A lángionizációs detektor egy kisméretű  $\text{H}_2$ /levegő gáz-eleggyel táplált láng, amely fölé elektródpárt kapcsolnak. Az égés során a lángba bejutó szerves anyag először termikusan bomlik (pirolízis), utána oxidálódik, majd ionizálódik, mely lépésben a molekulák C atomszámával arányos számú  $e^-$  keletkezik.
- Érzékeny –  $10^{-12}$  g/anyag
- Széles linearitási tartomány:  $10^7$
- 1. Pirolyízis:  $\text{C}_n\text{H}_m \rightarrow n \text{CH}\cdot + (m-n) \text{H}\cdot$
- 2. Oxidáció:  $n \text{CH}\cdot + n \text{O}\cdot \rightarrow n \text{CHO}\cdot$
- 3. Ionizáció:  $n \text{CHO}\cdot \rightarrow n \text{CHO}^+ + n e^-$

# FID működése II.

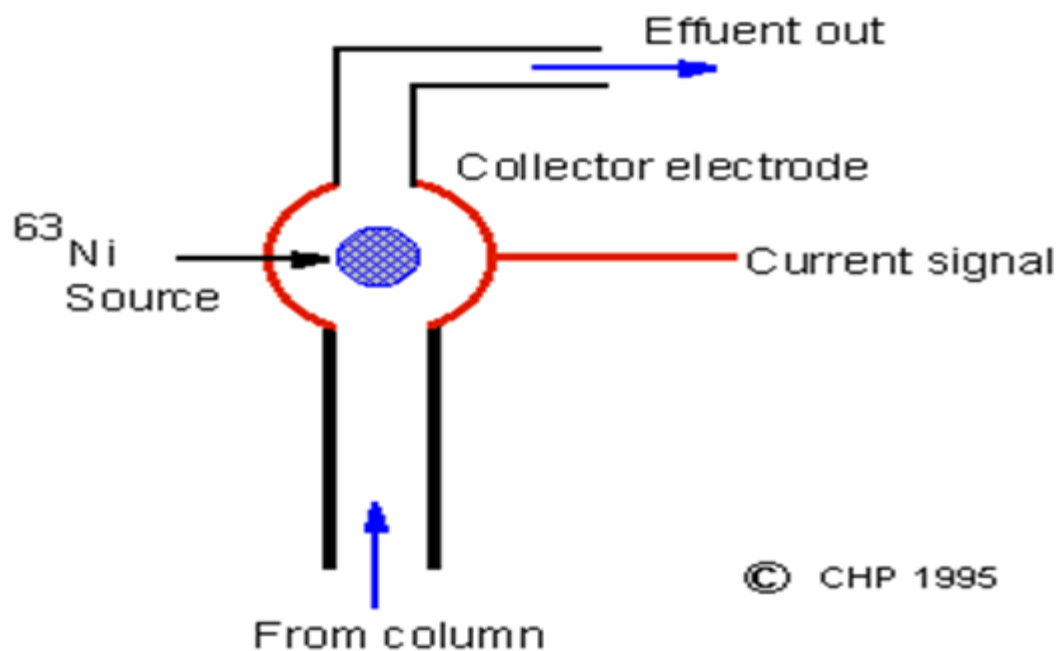
---

- Kapilláris oszlopok esetén make-up gázt kell keverni a hidrogénhez (vivőgáz), hogy nagyobb jelet kapjunk, ez általában  $N_2$ .
- Ideális esetben - hidrogén:
  - (vivőgáz+make-up gáz) = 1:1
- Nagyon széleskörben alkalmazott detektor.
- Majdnem univerzális, kivételek:
  - Formaldehid, hangyasav,  $N_2$ ,  $O_2$ , nemesgázok,  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$ ,  $SO_3$ ,  $H_2S$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ,  $NH_3$ ,  $HX$  és  $H_2O$ .

# Elektronbefogási detektor

## Electron Capture Detector (ECD)

---





# ECD alkalmazása

---

- Specifikus ionszelektív detektor, mely a halogéntartalmú (F, Cl, Br) növényvédő- és rovarirtószer maradványok meghatározásában nélkülözhetetlen.
- Lehetővé teszi a halogéntartalmú gázkromatográfián vizsgálható vegyületek mérését  $10^{-12}$ - $10^{-15}$  g-ig. A detektor szénhidrogénekre gyakorlatilag érzéketlen, nagy elektronvonzó-képességű csoportot (pl.  $-\text{NO}_2$ , konjugált rendszerek) tartalmazó vegyületek specifikus mérésére alkalmas.
- Linearitási tartománya 3-4 nagyságrend fluor és klór tartalmú vegyületekre.
- Make-up gáz használata szükséges, hogy gyorsabban kiürüljön a detektor tér ( $\text{N}_2, \text{Ar} + \text{CH}_4$ ).
- Halogénmentes oldószerek használata kötelező!

# Minőségi mennyiségi elemzés

---

- Az elválasztott anyag minősége a kromatogramban elfoglalt helye (retenciós idő) szerint azonosítható.
- A mennyiségi elemzés a csúcs alatti terület integrálásával végezhető el. A terület és az anyagmennyiség összefüggése a választott detektor minőségétől, a koncentráció-tartománytól függ en a legkülönbözőbb lehet. Ideális esetben az összefüggés lineáris.



# Folyadékkromatográfia

---

# Módszerek

---

- A folyadékkromatográfián belül az állófázis minősége, illetve a megoszlást el idéző folyamat minősége szerint:
  - adszorpciós,
  - megoszlásos,
  - ioncserés.kromatográfiát különböztetünk meg.
- A folyadékkromatográfiás módszerek közül a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiának (HPLC) van kiemelkedő jelentősége.
- Az adszorpciós módszerek közé tartozik
  - állófázis: szilárd,
  - mozgófázis: folyadék.
- A gázkromatográfiával összevethet gyorsaság biztosítása érdekében a vivőfolyadékot (mozgófázist) 10-500 bar nyomással áramoltatják.

# Folyadékkromatográfiás analízis paramétere

---

- Állófázis
- Mozgó fázis
- Elúció
- Detektálás (analitikai jel)
- Minőségi azonosítás
- Mennyiségi kiértékelés

# Detektálás

---

- Analitikai jel érzékelése. Az oszlopról távozó mozgófázisban oldott komponensek észlelése azok valamely specifikus tulajdonsága alapján ún. „átfolyó cellás” detektorban.
- Nem destruktív detektálás
  - törésmutató változás (pl. szénhidrátok)
  - fényabszorpció (UV, VIS, legtöbb szerves vegyületre alkalmazható)
  - vezetőképesség mérése
  - fluoreszcencia stb alapján.
- Destruktív érzékelés (komponensek szabályozott átalakítása, roncsolása)
  - Oszlop után vagy előtt történő on-line vagy off-line származékképzés
  - MS-detektálás (ionizáció, fragmentáció, majd tömegszelektív detektálás)

# HPLC alkalmazási területei



## Chemical

polystyrenes  
dyes  
phthalates



## Bioscience

proteins  
peptides  
nucleotides



## Pharmaceuticals

tetracyclines  
corticosteroids  
antidepressants  
barbiturates



## Consumer Products

lipids  
antioxidants  
sugars



## Environmental

polyaromatic hydrocarbons  
Inorganic ions  
herbicides



## Clinical

amino acids  
vitamins  
homocysteine



# Vékonyrétegkromatográfia

---

TLC



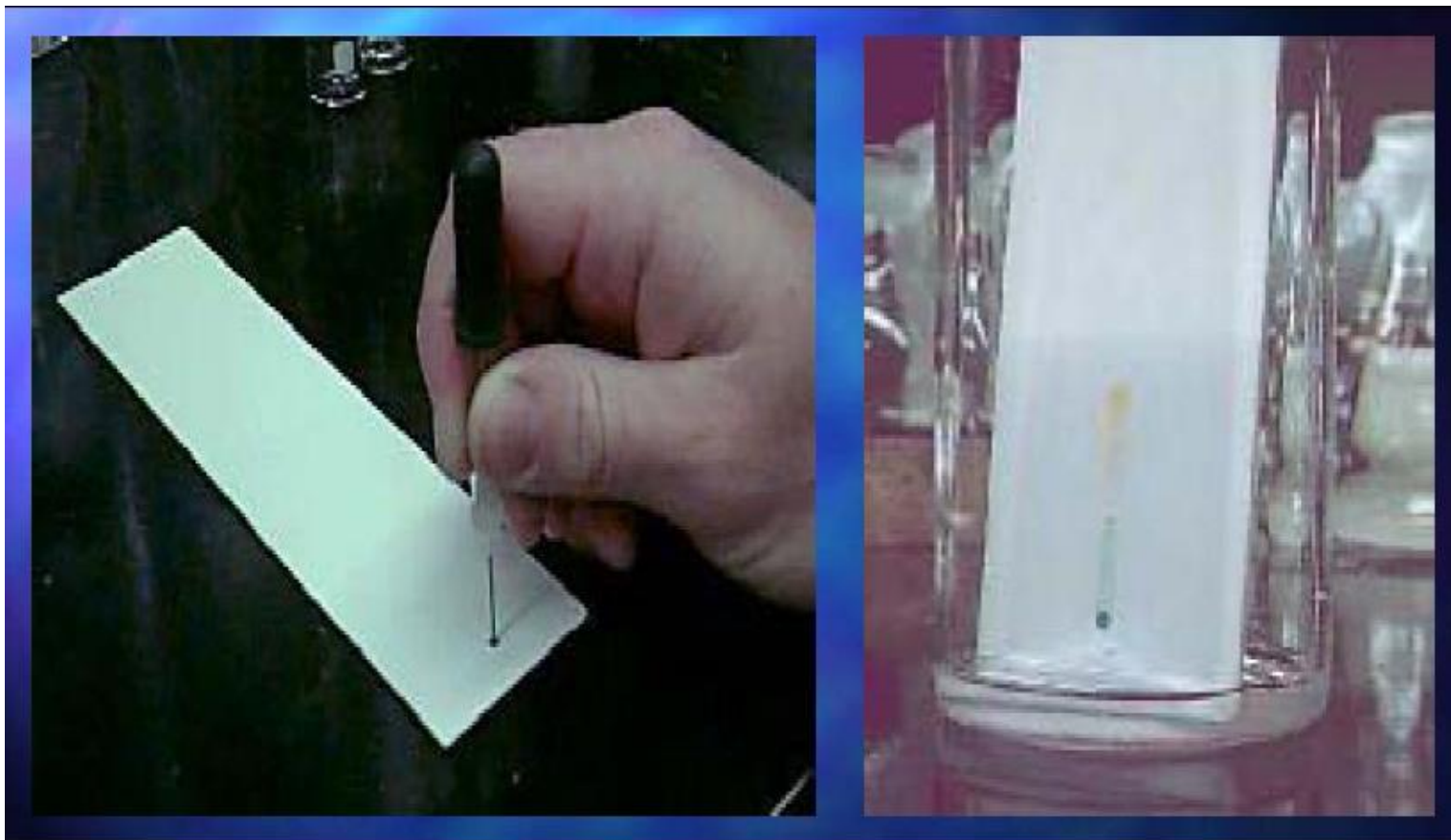
# Menet

---

- A szétválasztandó alkotórészeket tartalmazó oldatot a lap szélétől 1-2 cm-re cseppentjük fel. A kromatogram kifejlesztése egyszerűen történik, mégpedig a réteggel befedett lemezt oldószert tartalmazó tálkába helyezzük.
- Az oldószer a kapilláris erők hatására a rétegben egyenletesen emelkedik, közben az alkotórészek a megoszlástól függő mértékben elmozdulnak.
- A kifejlesztett kromatogramot megszáritjuk, majd az elválasztott anyagokat szín-reagenssel (alkoholos jóddoldat, cc. kénsav), vagy más módon (UV-lámpa) láthatóvá tesszük (a kromatogramot előhívjuk). A foltok helyzetét meghatározzuk

# Réteggkromatográfia

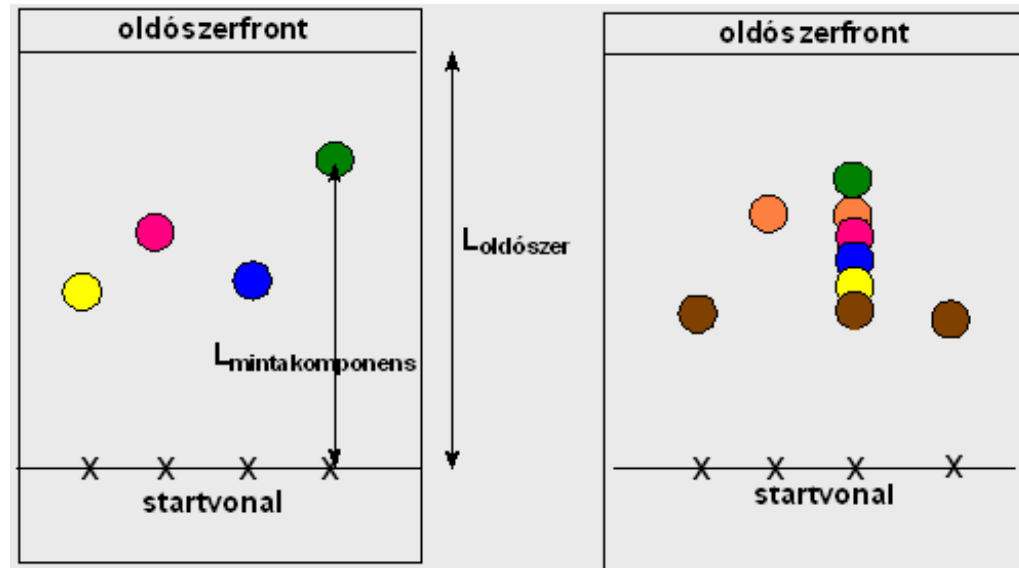
---



# Nejlon- és selyemfestékek elválasztása papírkromatográfiával

$$R_f = \frac{L_{\text{mintakomponens}}}{L_{\text{oldószer}}}$$

$$R_f < 1$$

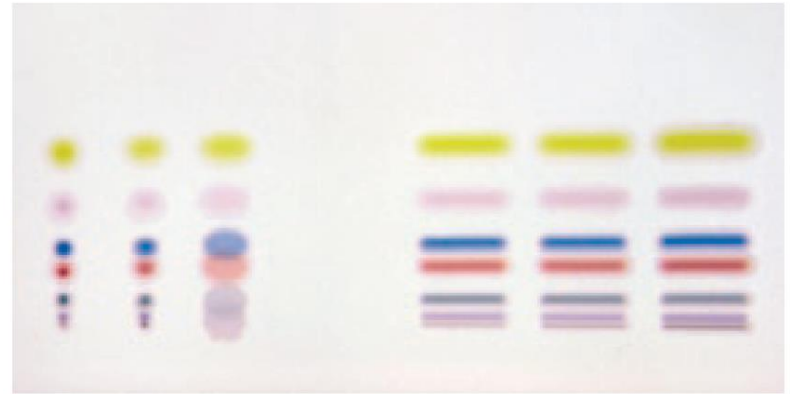


# Mintafelvitel

---



Felvitel

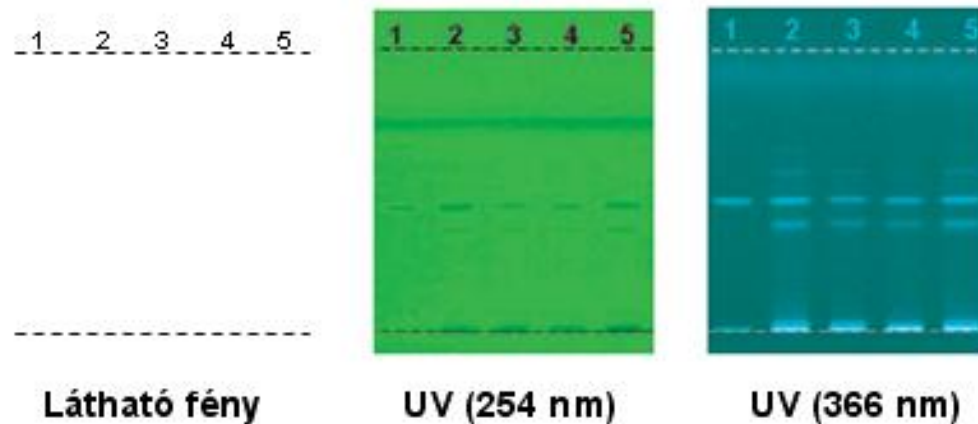


Kifejlesztés után

# Megjelenítés I.

---

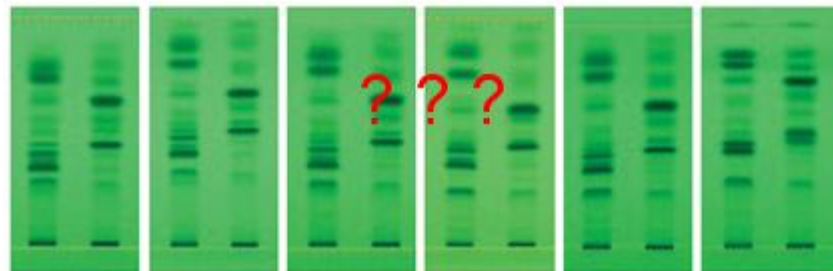
- A vizsgált komponensek láthatók (pl. festékelegy).
- A legtöbb komponens azonban nem színes. Ezek megjelenítésére a szilikagél állófázis néhány százalékban tartalmaz  $\text{ZnSiO}_3$ -t (cink-szilikát), amely 254 nm-es UV fénnel megvilágítva fluoreszkál. A komponensek elfedik a réteget és sötét foltként láthatók. Több vegyület 366 nm-es UV fénnel megvilágítva önmaga is fluoreszkál.



# Megjelenítés II.

---

- Az esetek többségében azonban a vizsgált komponensek nem láthatók (nem színesek) illetve nem különíthetők el azonnal a többi anyagtól (mátrixtól).



- Szelektív megjelenítés származékképzéssel
  - A kifejlesztett réteg lefújása vagy bemerítése olyan anyaggal amely csak a vizsgálni kívánt komponensekkel képez lehetőleg színes vagy fluoreszkáló terméket.

# Minőségi azonosítás

- Retenciós faktor ( $R_f$ ) és
- Szín vagy egyéb optikai információ összevetése (pl. fluoreszcencia, reflexiós spektrum, stb.) alapján

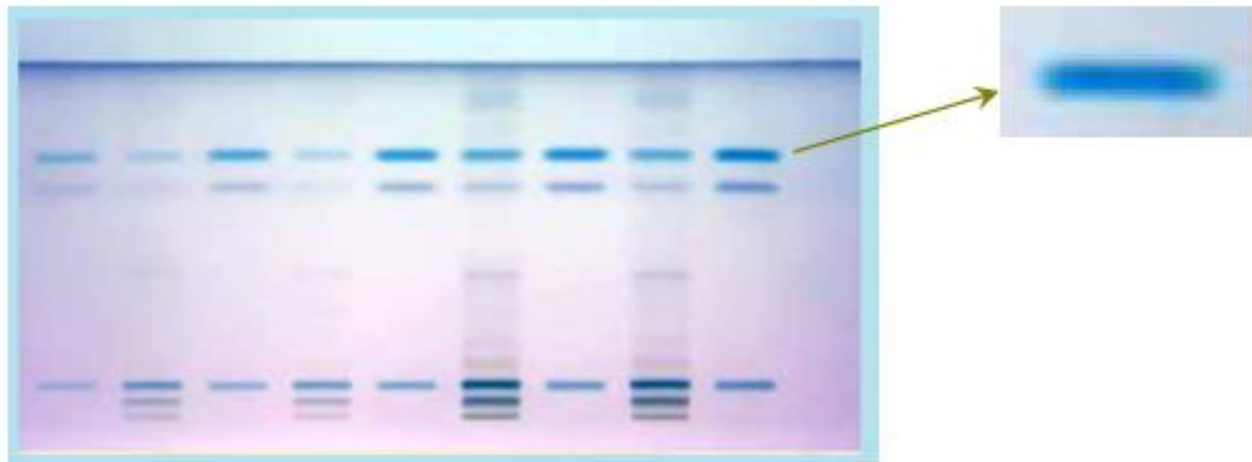


*A retenciós faktor értékének kiszámítása adott kromatográfiás sávra*

# Mennyiségi elemzés

---

- Mennyiségi információ: a foltok mérete és optikai sűrűsége (színintenzitás) alapján.
- Denzitometria: a kromatográfiás foltok optikai sűrűségének mérése
  1. Pásztázó denzitometria (diffúz-reflexiós spektrofotometria).
  2. Videodenzitometria (digitális képalkotás a rétegről).







# Papírkromatográfia

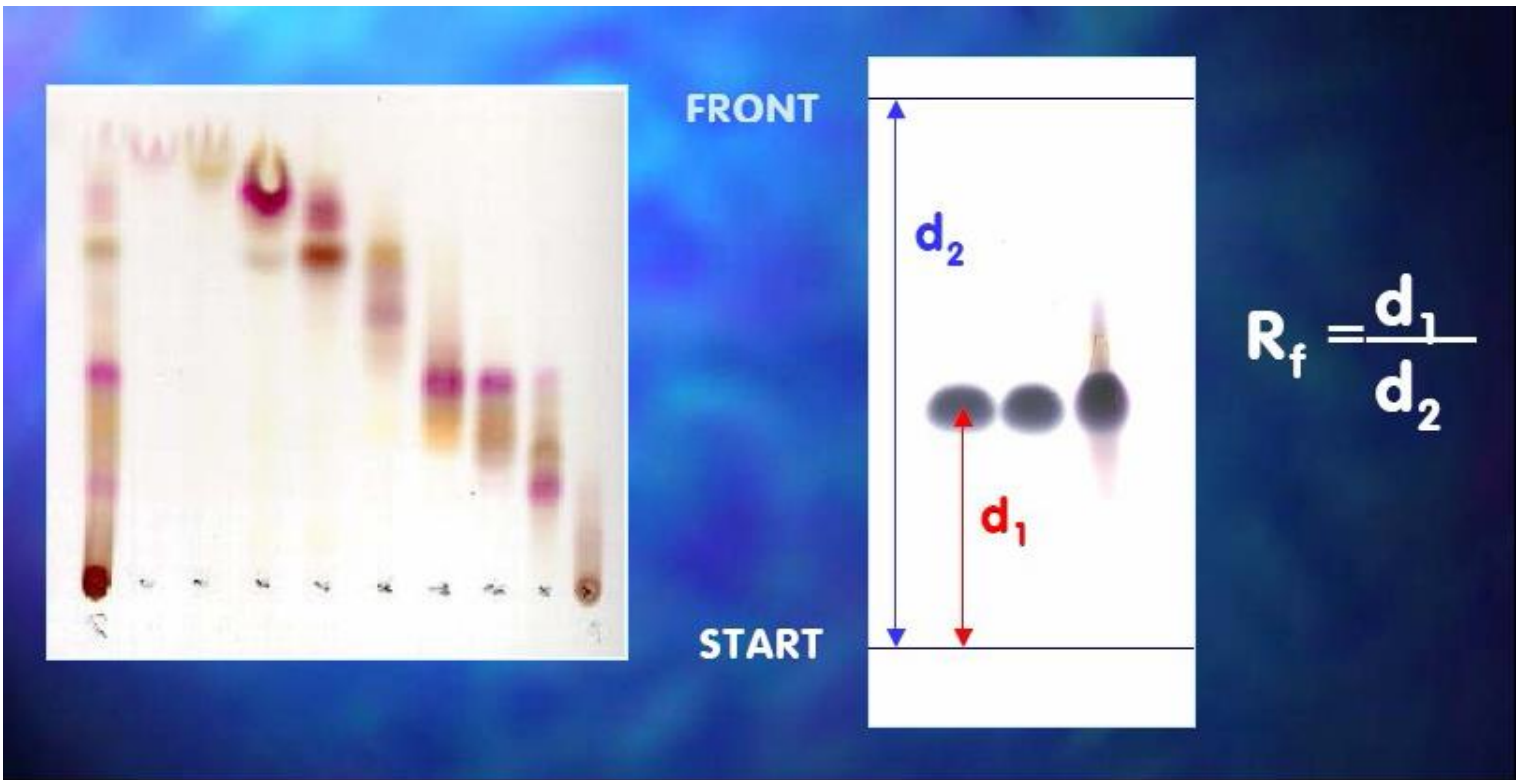
---

PC

# Menet

---

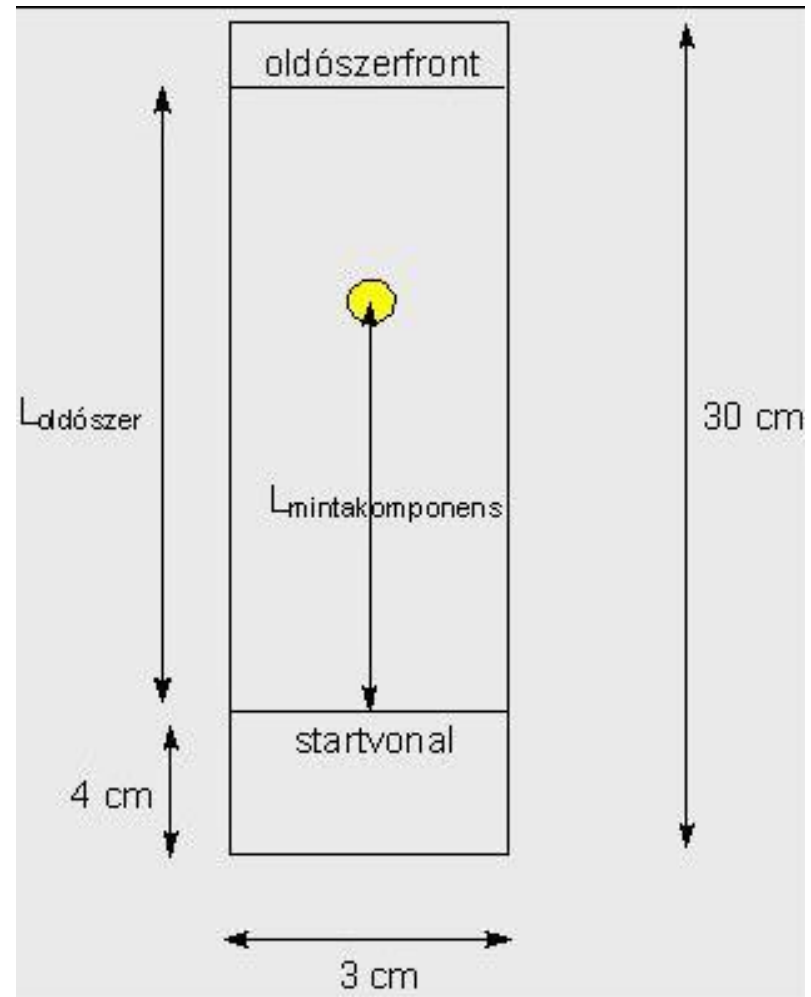
- A papírcsík végét az eluensbe (oldószer vagy oldószerelegy) mártjuk. A folyadék felszívódása megindul, és a minta komponenseit különböző sebességgel viszi előre.
- Megfelelő kísérleti körülmények mellett egy idő után a minta komponensei az oldószer elmozdulásának irányában különböző távolságokban, egymástól elválasztva, foltokban helyezkednek el. Az előhívás a rétegekromatográfiánál említett módon végezhető el.
- Előnye, hogy a módszer egyszerű, a kromatogram kifejlesztését üveghengerben vagy kádakban végzik, mely zárható kell, hogy legyen, hogy az oldószer ne párologjon el.
- A legkülönbözőbb anyagok (szervetlen ionok, szerves anyagok, aminosavak) elválasztására alkalmas.



# Élelmiszerszínezékek elválasztása papírkromatográfiával

$$R_f = \frac{L_{\text{min takomponens}}}{L_{\text{oldószer}}}$$

$$R_f < 1$$





Köszönöm a figyelmet!

---