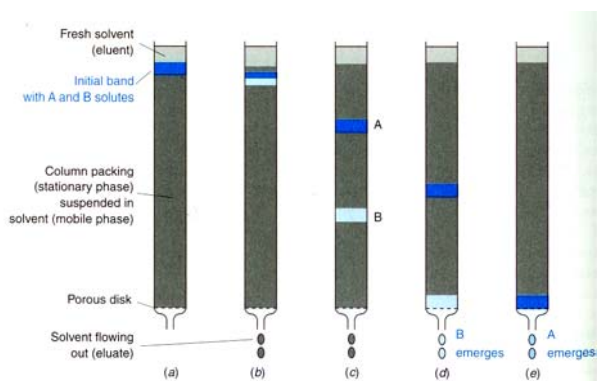


Kromatográfiai módszerek

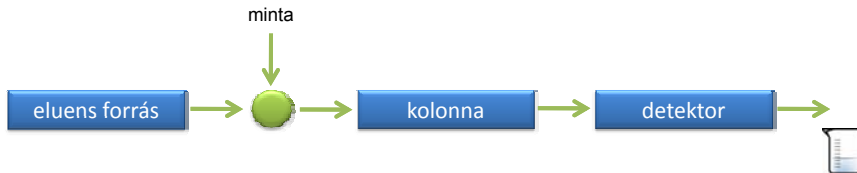
Mi a kromatográfia?

Kromatográfia ugyanazon az elven működik, mint az extrakció, csak az egyik fázis rögzített („**állófázis**”) és a másik elhalad mellette („**mozgófázis**”). Az elválasztást tipikusan egy csőben („**kolonna**”) valósítjuk meg.



A kromatográfok általános felépítése

Könnyen elgondolható, hogy ezen konstrukcióban egyaránt megvalósítható a mintakomponensek tényleges elválasztása szedőedényekkel („**preparatív kromatográfia**”), vagy a komponensek minőségi és mennyiségi műszeres elemzése detektorok segítségével, amit a kolonna végén helyezünk el („**analitikai kromatográfia**”).



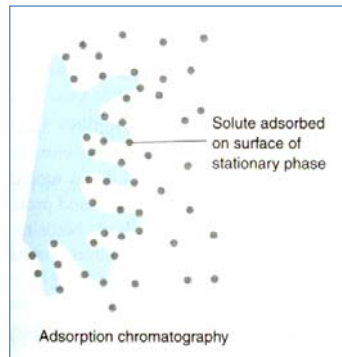
A kromatográfias módszerek típusai

A kromatográfias módszerek egyik lehetséges csoportosítása az oldott anyag és az állófázis közötti kölcsönhatás jellege szerint szokásos. Eszerint az öt fő típus:

- adszorpciós kromatográfia (*adsorption chromatography*)
- megoszlási kromatográfia (*partition chromatography*)
- ioncsere kromatográfia (*ion-exchange chromatography*)
- méretkizárásos kromatográfia (*size-exclusion chrom.*)
- affinitás kromatográfia (*affinity chromatography*)

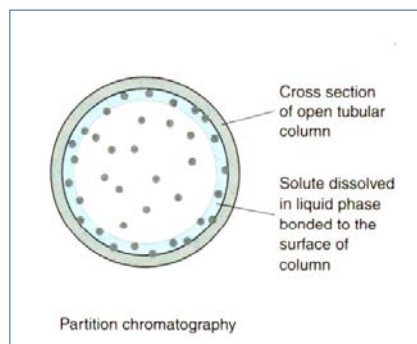
A kromatográfias módszerek típusai

Az adszorpciós kromatográfiára jellemző kölcsönhatás:



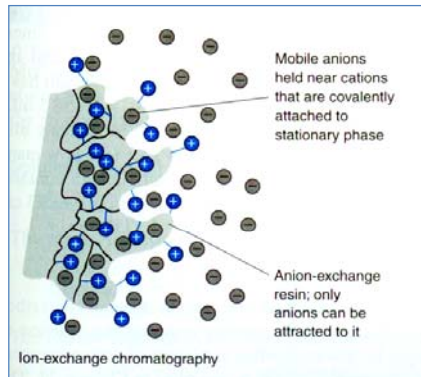
A kromatográfias módszerek típusai

A megoszlási kromatográfiára jellemző kölcsönhatás:



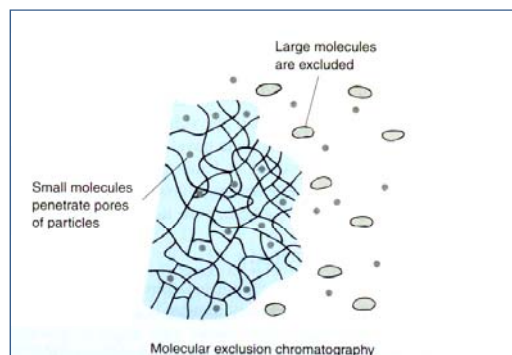
A kromatográfias módszerek típusai

Az ioncsere kromatográfiára jellemző kölcsönhatás:



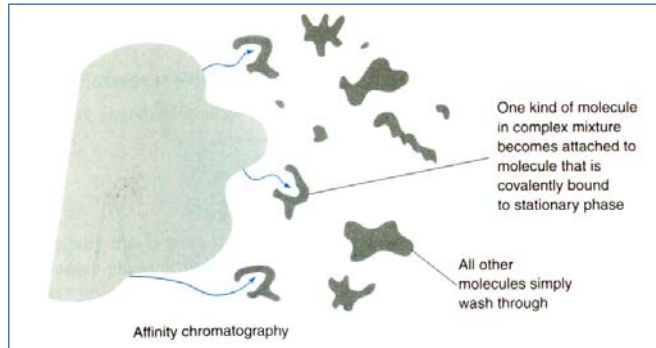
A kromatográfias módszerek típusai

A méretkizárásos kromatográfiára jellemző kölcsönhatás:



A kromatográfias módszerek típusai

Az affinitás kromatográfiára jellemző kölcsönhatás:



Kromatogramm kifejlesztési módok

A kromatogramm kifejlesztésének módszerei közül három fontosabb különböztethető meg:

- frontális elválasztás
- kizorításos elválasztás
- elúciós elválasztás

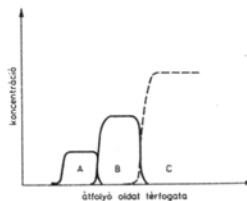
Ezek közül messze a leggyakoribb az elúciós elválasztás, ezért ez az „alapértelmezett” módszer.

A frontális elválasztás módszere



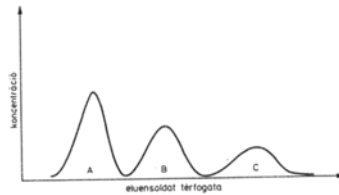
Frontális elválasztás: Pl. egy minta komponensei az $A < B < C$ erősségi sorrendben kötődnek az állófázishoz. Ekkor a mintát lassan beadagolva a komponensek egymást szorítják le az állófázisról. Hátránya, hogy tisztán csak az A komponens nyerhető ki és a kolonnát regenerálni kell.

A kiszorításos elválasztás módszere



Kiszorításos elválasztás: Pl. egy minta A, B komponenseit leszorítjuk egy náluk jobban megkötődő C komponenssel. A komponensek a kötődés erősségének növekedésének sorrendjében jönnek le. Minden komponens többé-kevésbé tisztán kinyerhető. A kolonnát itt is regenerálni kell.

Az elúciós elválasztás módszere

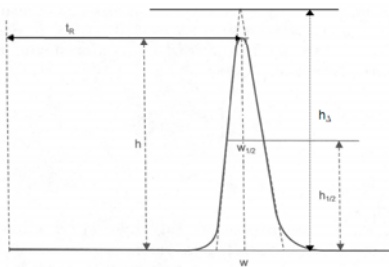
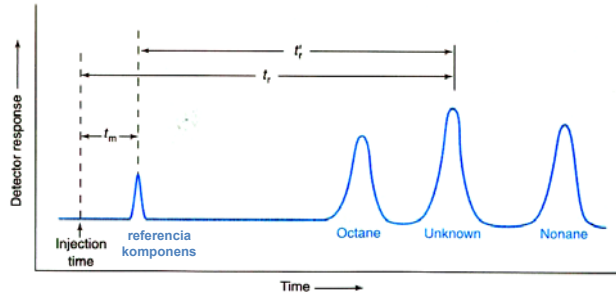


Elúciós elválasztás: Itt olyan mozgófázist (eluent) alkalmazunk, amely megkötődése csekély. Ha ebbe az áramlásba kevés mintát juttatunk, akkor annak komponensei megkötődési hajlamuknak megfelelő sebességgel fognak előre haladni, így zónákra bomolva. Ha elég hosszú a kolonna, akkor a komponensek a végén elkülönülten jelentkeznek. Nem kell regenerálás sem.

Kromatográfia a mozgófázis szerint

A sokféle kromatográfiai módszer egy másik, gyakori csoportosítási módja a mozgófázis halmazállapota szerint való megkülönböztetés: **gázkromatográfia** (GC), **folydékkromatográfia** (LC, illetve HPLC). A harmadik, nagy jelentőségű kromatográfiai módszer az **elektroforetikus módszer**.

A kromatogramm és jellemzői



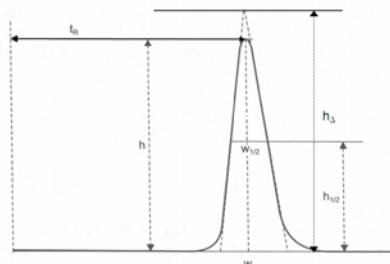
t_r	retenciós idő
t_m	holtidő
t'_r	redukált retenciós idő
w	talpszélesség
h	csúcsmagasság
$w_{1/2}$	félérték-szélesség
$h_{1/2}$	félérték-magasság
h_{Δ}	extrapolált magasság

A kromatogramm és jellemzői

Az anyagi minőségre a kromatográfiás csúcs retenciós ideje (redukált retenciós ideje) jellemző, míg a csúcs alatti terület a koncentrációval arányos. A komponensek minőségi azonosítása retenciós idő, vagy szelektív detektorjel alapján történik.

A csúcs alatti terület (A vagy T) pontos meghatározása az időfüggő detektorjel integrálásával lehetséges, de közelíthető is:

$$A \approx h_{1/2} \cdot w \approx h_{\Delta} \cdot w_{1/2}$$



A kromatogramm és jellemzői

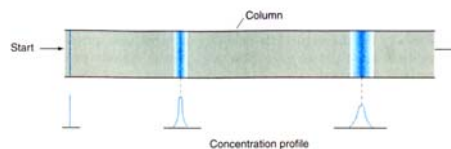
A kolonna hatékonyságát mérő elméleti tányérszám (N):

$$N = \frac{16 \cdot t_r^2}{W^2} = \frac{5.55 \cdot t_r^2}{W_{1/2}^2}$$

és az elméleti tányérmagasság (H), a kolonna hosszával (L) kifejezve:

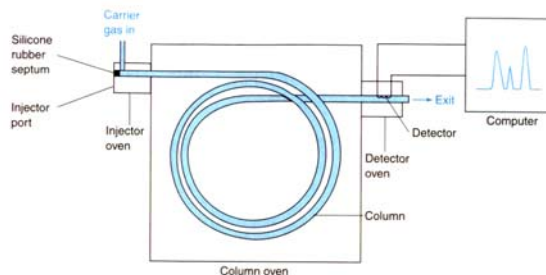
$$H = \frac{L}{N}$$

Mivel a retenciós idővel a csúcsok talpszélessége nő a diffúzió miatt, ezért N és H értéke hasonló (nagyságrendileg) minden csúcsra egy kromatogrammon belül.



Gázkromatográfia (GC)

Gázkromatográfiában leginkább gáz, vagy enyhe melegítéssel (max. kb. 250°C) bomlás nélkül gázzá alakítható folyadék mintákat vizsgálhatunk. A mintát egy fecskendővel egy gumi vagy Teflon membránon („**szeptum**”) keresztül juttatjuk be egy fűtött mintatérbe, ahol az elpárolog és a gáz halmazállapotú mobilfázis, amit itt **vivógáznak** hívnak, rásöpri a kolonnára. A kolonnát is folyamatosan fűteni szükséges, hogy a mintakomponensek gőznyomása megfelelő szinten maradjon az áthaladás során.

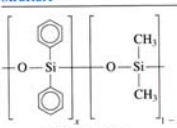
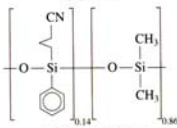
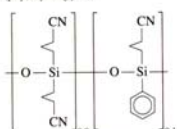


Gázkromatográfia (GC) kolonna típusok

Az állófázis (megosztó fázis) jellegzetes kémiai összetételei:

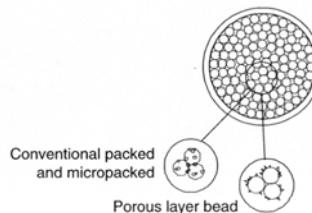
GC kolonnák két fő típusra oszthatók: **töltetes** (*packed*) és **kapilláris** (*open tubular*) kolonnákra.

Table 24-1 Common stationary phases in capillary gas chromatography

Structure	Polarity	Temperature range (°C)
 <p>(Diphenyl)_{1,1}(dimethyl)_{1,2} polyoxane</p>	$x = 0$ Nonpolar $x = 0.05$ Nonpolar $x = 0.35$ Intermediate polarity $x = 0.65$ Intermediate polarity	-60° – 320° -60° – 320° 0° – 300° 50° – 370°
 <p>(Cyanopropyl)phenyl(1,1,4,4-dimethyl)_{1,2} polyoxane</p>	Intermediate polarity	-20° – 280°
$\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{-O)}_n\text{-}$ Carbowax (poly(ethylene glycol))	Strongly polar	40° – 250°
 <p>(Biscyanopropyl)_{1,1}(cyanopropyl)phenyl(1,1,4,4-dimethyl)_{1,2} polyoxane</p>	Strongly polar	0° – 275°

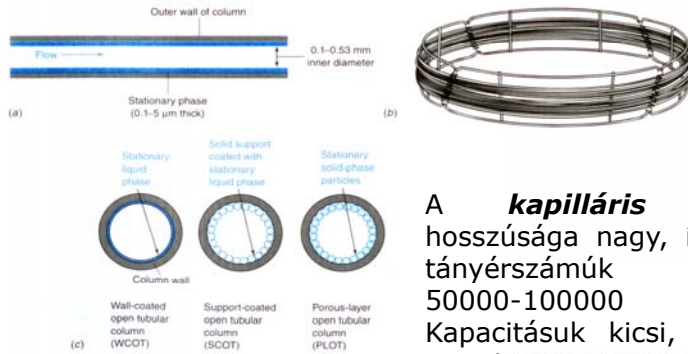
Gázkromatográfia (GC) kolonna típusok

A **töltetes oszlopok** hordozó töltete megfelelő mechanikai szilárdságú, nagy fajlagos felületű és kémiailag inert szilárd anyag (pl. diatómaföld, polimerek, aktív szén, alumina, szilikagél, stb.), amelynek a felületén jól megtapad a megosztó folyadék (megosztási krom.) illetve adszorbeálódnak a mérendő komponensek (adszorpciós krom.) A töltetes kolonnák tipikus átmérője 2-6 mm, hosszuk 1-5 m.



Felbontásuk és kapacitásuk nagy, de ellenállásuk is nagy a vivőgáz áramlással szemben.

Gázkromatográfia (GC) kolonna típusok



A **kapilláris kolonnák** hosszúsága nagy, így elméleti tányérszámuk kimagasló, 50000-100000 is lehet. Kapacitásuk kicsi, ezért csak igen kis mintamennyiség (a μL törtrésze) adagolható be rájuk.

Gázkromatográfia (GC) – a hőmérséklet

Hőmérséklet programozás

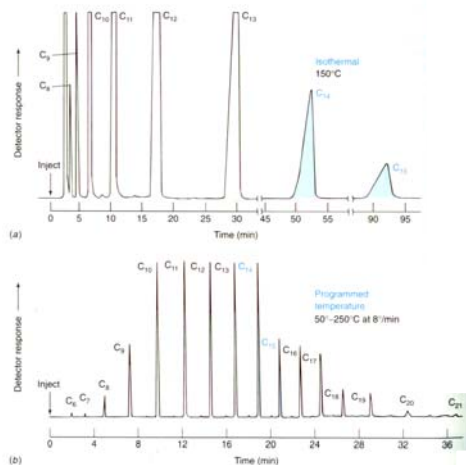
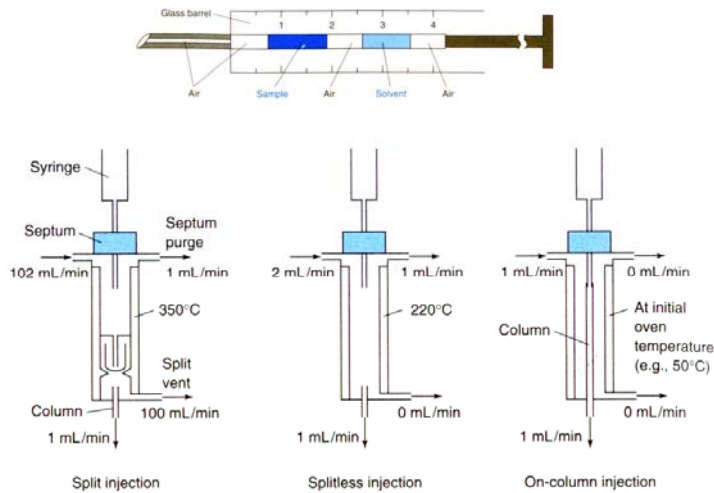


Figure 24-10 Comparison of (a) isothermal (constant temperature) and (b) programmed temperature chromatography. Each sample contains linear alkanes run on a 1.6-mm-diameter \times 6-m-long packed column containing 3% Apiezon L (liquid phase) on 100/120 mesh VarAport 30 solid support with He flow rate of 10 mL/min. Detector sensitivity is 16 times greater in panel a than in panel b. [From H. M. McNair and E. J. Bonelli, *Basic Gas Chromatography* (Palo Alto, CA: Varian Instrument Division, 1968).]

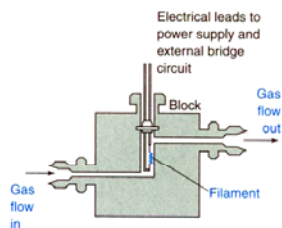
Gázkromatográfia (GC) - mintabevitel

A minta befecskendezésének módjai:



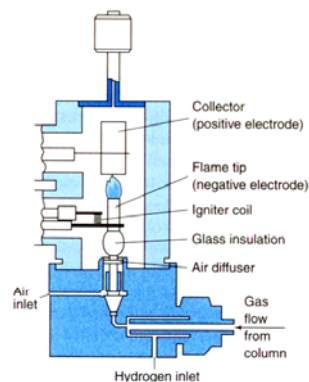
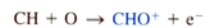
Gázkromatográfia (GC) - detektorok

Detector	Approximate detection limit	Linear range
Thermal conductivity	400 pg/mL (propane)	$>10^3$
Flame ionization	2 pg/s	$>10^7$
Electron capture	As low as 5 fg/s	10^4
Flame photometric	<1 pg/s (phosphorus)	$>10^4$
	<10 pg/s (sulfur)	$>10^3$
Nitrogen-phosphorus	100 fg/s	10^5
Sulfur chemiluminescence	100 fg/s (sulfur)	10^5
Photoionization	25 pg to 50 pg (aromatics)	$>10^5$
Fourier transform infrared	200 pg to 40 ng	10^4
Mass spectrometric	25 fg to 100 pg	10^5



Hővezetőképességi (TCD) detektor

A vezető szál ellenállását mérjük, ami a hőmérsékletétől függ, ezt viszont az azt körülvevő gáz hővezetőképessége határozza meg



Lángionizációs (FID) detektor

A hidrogén lángban a szerves vegyületek lebomlanak és ionizálódnak, ezért a két elektród között a koncentrációval arányos áram fog folyni

Folyadékkromatográfia (LC)

A legtöbb vegyület nem eléggé illékony ahhoz, hogy GC-vel mérni lehessen, ezért fontos a HPLC (**high pressure/high performance LC**). Ez nagy nyomást (akár 400-500 bar) alkalmazva folyadékfázist képes áthajtani elválasztás céljából egy apró szilárd szemcsékkel ($\mu\text{-es}$ szemcseméretű állófázis) töltött oszlopon.

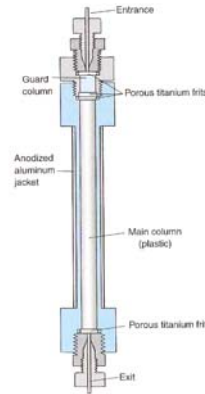
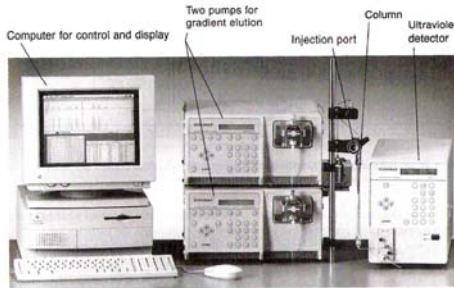
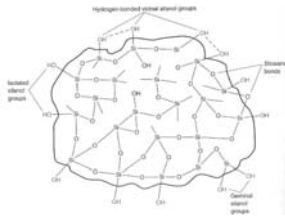


Figure 25-4 HPLC column with replaceable guard column to collect irreversibly adsorbed impurities. Titanium frits distribute the liquid evenly over the diameter of the column.

HPLC – állófázis tipikus összetétele

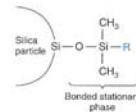
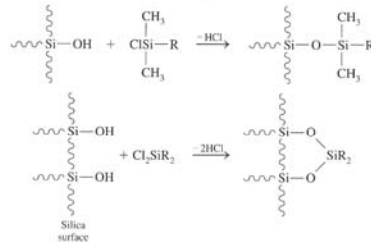


Normál fázisú HPLC:

- poláris állófázis
- apoláris (gyengén poláris) oldószer/oldott anyag

Fordított fázisú HPLC:

- apoláris állófázis
- poláris (erősebben poláris) oldószer/oldott anyag

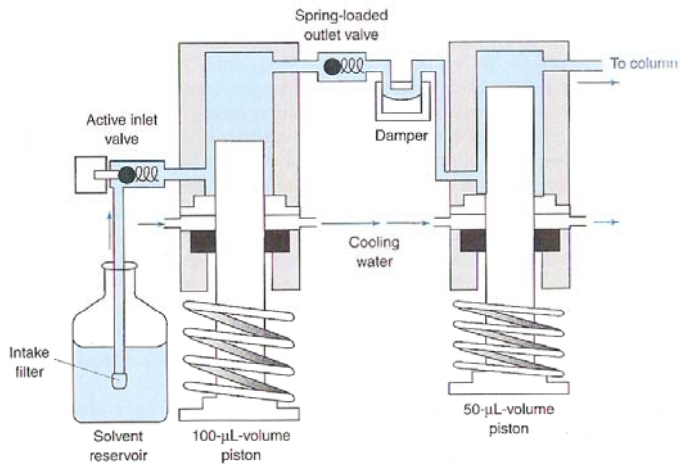


Residual silanol groups on the silica surface are capped with trimethylsilyl groups by reaction with $\text{ClSi(CH}_3)_3$ to eliminate polar adsorption sites that cause tailing.

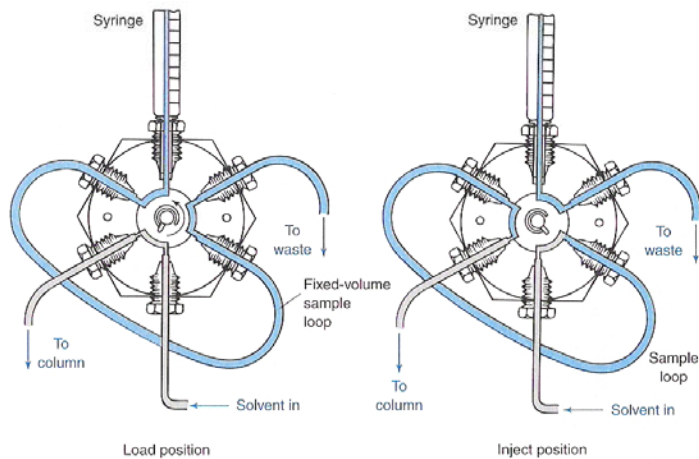
Common polar phases		Common nonpolar phases	
R = $(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$	amino	R = $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	octadecyl
R = $(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{N}$	cyano	R = $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	octyl
R = $(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{OH}$	diol	R = $(\text{CH}_2)_6\text{C}_6\text{H}_5$	phenyl

The octadecyl (C_{17}) stationary phase is by far the most common in HPLC. It is frequently designated ODS, for octadecylsilane.

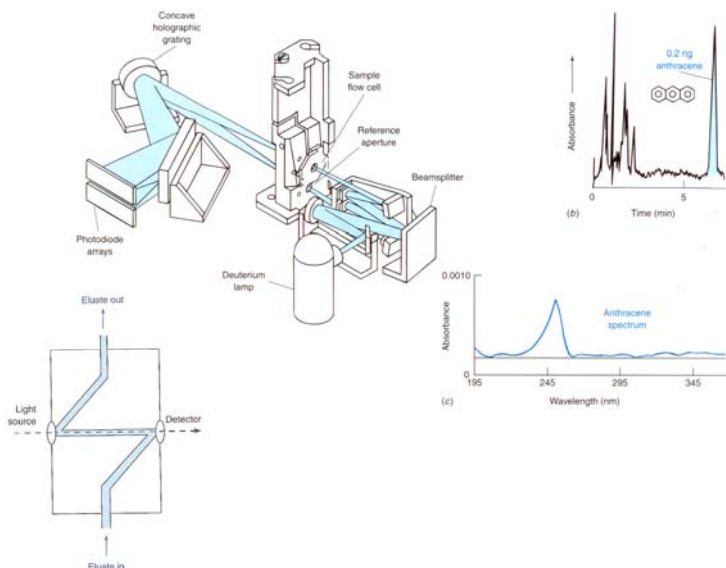
HPLC – folyadékpumpa



HPLC – mintabevitel adagolószelleppel



HPLC detektorok – UV-Vis spektrométer



HPLC detektorok – törésmutató index

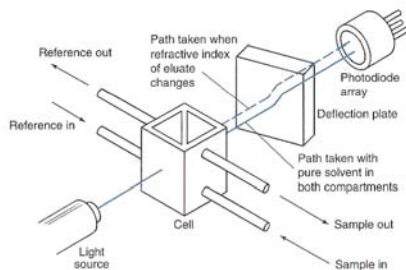


Table 25-3 Comparison of commercial HPLC detectors

Detector	Approximate limit of detection ^a (ng)	Useful with gradient?
Ultraviolet	0.1–1	Yes
Refractive index	100–1 000	No
Evaporative light-scattering	0.1–1	Yes
Electrochemical	0.01–1	No
Fluorescence	0.001–0.01	Yes
Nitrogen ($N \xrightarrow{\text{combustion}} NO \xrightarrow{O_2} NO_2 \rightarrow hv$)	0.3	Yes
Conductivity	0.5–1	No
Mass spectrometry	0.1–1	Yes
Fourier transform infrared	1 000	Yes

A kromatográfia alkalmazásai

A kromatográfiai módszereket igen elterjedten alkalmazzák, túlnyomórészt szerves, kisebb mértékben szervetlen komponensek (pl. ionok) elválasztására, azonosítására, koncentrációjuk meghatározására. Az itt röviden tárgyalt GC és HPLC típusokon túl nagy jelentőségűek az ionkromatográfiai és kapilláris elektroforézis módszerek is.

A vizsgált minták halmazállapota főként folyadék (HPLC és GC), ritkábban gáz (GC), igen ritkán szilárd (GC).

A minta térfogata általában igen kicsi, általában az 1-100 μL tartományba esik, és ebben a kis térfogatban a detektortól függően ppm-ppb szintű kimutatási határok (pg-ng anyagmennyiség kimutatása) érhető el.