

KÖRNYEZETI ANALITIKA I.

DR. FEKETE JENŐ

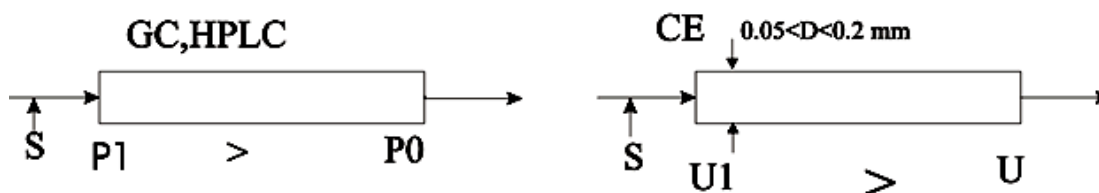
JEGYZET A 2003/04 –ES TANÉV ŐSZI FÉLÉVÉNEK 3. ELŐADÁSÁHOZ. (02. 24)

KÉSZÍTETTE: KELEMEN PÉTER, KORDA ANDRÁS

1. KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS (CE)

A korábbi előadások alapján tudjuk, hogy a műszeres analitika gázkromatográfiás (GC) és folyadékkromatográfiás (HPLC) módszereinél az állófázist tartalmazó kolonnán nyomáskülönbség hatására halad át a mozgófázis.

A kapilláris elektroforézis, vagy angol elnevezése alapján rövidítve a CE technika ebben az alapvető pontban tér el a fentebb említett analitikai módszerektől. A CE esetén ugyanis a kolonna két vége között létrejövő feszültség-különbség hatására vándorol a minta a kapilláris egyik végétől a másikig.



1. ábra: Átviteli módok HPLC, GC ill. CE technikák esetén

A feszültségkülönbség hatására két erő ébred, amely részt vesz a minta összetevőinek szállításában.

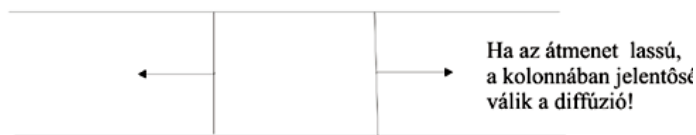
1. Elektroforetikus vándorlás
2. Elektrooszmózis (elektroendoozmózis)

1. ELEKTROFORETIKUS VÁNDORLÁS

A kapillárisban a feszültségkülönbség hatására létrejövő elektromos tér térereje mozgatja az ionokat a kapilláris két végpontja között. Az elektroforetikus vándorlás sebessége arányos a kapilláris két vége között létrehozott feszültségkülönbséggel.

$$v_{EF} \sim \Delta U$$

A kapillárisba a mintát szűk zónában juttatjuk be. Minél nagyobb a mérés során alkalmazott feszültségkülönbség annál kisebb lesz a vándorlási idő a kapillárisban. Ez a mérési eredményben úgy jelentkezik, hogy a kis vándorlási idővel keresztül jutó minta kevésbé terül szét a kapillárisban, és szűkebb csúcsot eredményez a kromatogrammon. Hosszabb vándorlási idő esetén a kezdetben, szűk zónában jelenlevő minta, a mérés végére szétterül, és a kromatogrammon szélesebb csúcsot kapunk. 2. ábra.



Ha T(vándorlási) nagy a csúcs széles lesz.



Ha T(vándorlási) kicsi a csúcs keskenyebb lesz



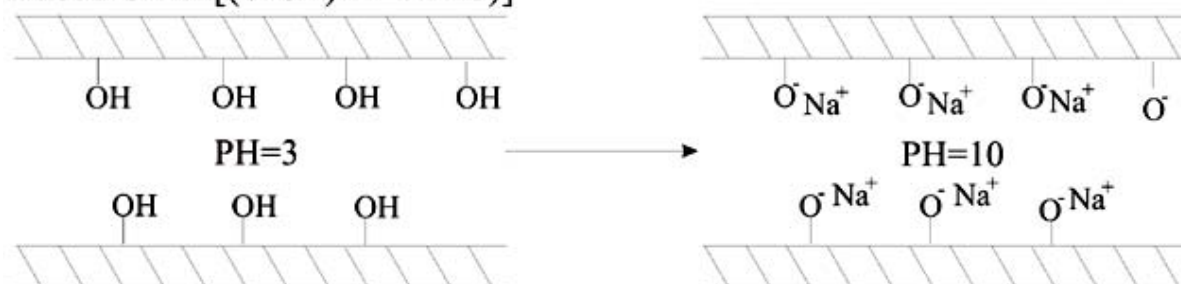
2. Ábra: A vándorlási idő szerepe a mérési eredmény alakulásában

A feszültségkülönbségnek felső korlátot szab a disszipációs hő. A kapillárist oly módon kell kialakítani, hogy a 20-30 kV-os általános működési feszültségek mellett le tudja adni a képződő hőt. A rendkívül vékony csőfal segíti a hőleadást.

2. ELEKTROOZMÓZIS, MÁ S NÉVEN ELEKTROENDOZMÓZIS JELENSÉGE

A kapillárisunk szerkezeti anyaga angol elnevezéssel ún. fused silica. Ez gyakorlatilag nagy tisztaságú szilícium dioxidot jelent. $(\text{SiO}_2)_x \cdot \text{YH}_2\text{O}$.

Fused Silica $[(\text{SiO}_2)_x \cdot \text{YH}_2\text{O}]$



3. ábra CE kapilláris falának szerkezete (fused silica)

A kapilláris két vége között pufferekkel pH különbséget hozunk létre. A kapillárisban így juthatunk el a pH=3 értéktől a pH=10 értékig (3. Ábra). A lúgos pH tartományban a kvarc üveg falán található szilanol csoportok ionizálódnak, és helyhez kötött töltések (O^-) jönnek létre a cső falán. A pufferekből felszabaduló Na^+ és K^+ ionok ezek köré a helyhez kötött anionok körül rendezett réteget alkotnak. Ezek fogják adni a rendszer ún. mozgékony ionjait. Ennek a rendszernek a kialakulása után kapcsoljuk rá a feszültséget a kapillárisra. A Na^+ vagy K^+ ionok körül hidrátburkok jönnek létre, a feszültség hatására ezek a hidrátburkok a mozgékony kationokkal együtt elmozdulnak és egy mikroszkopikus áramlás jön létre. Ez a nagy feszültség hatására kialakuló mikroszkopikus áramlás az elektroforézis jelensége.

Az elektroforetikus vándorlási sebességét a következő tényezők befolyásolják.

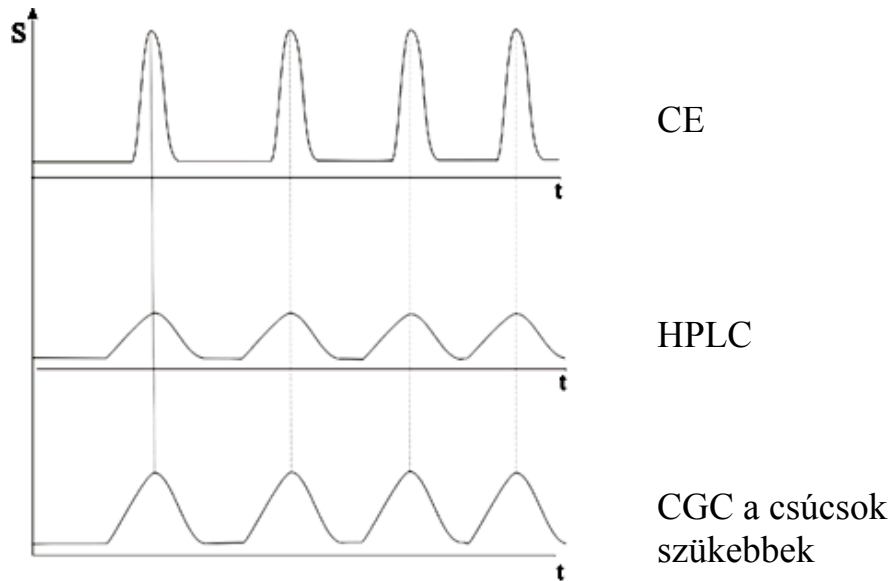
- az áramló ionok töltése (z)
- ionrádiusz (r)

$$v \sim z/r \text{ (töltés/ionrádiusz)}$$

A módszer működésének alapja az, hogy két eltérő z/r értékkel rendelkező ion eltérő sebességgel ér oda a detektorunkhoz, így azokat külön képesek vagyunk detektálni.

Méréseink eredménye az ún. elektroferogram lesz a korábbi technikáknál megismert kromatogram elnevezés helyett.

Figyeljük meg, hogy a HPLC, CGC, ill. CE technikával végzett mérések eredménye között



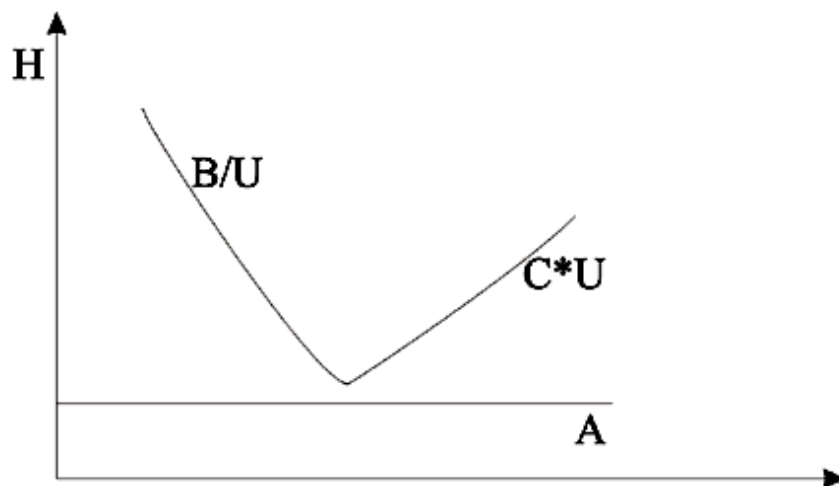
milyen különbség jelentkezik, ha a retenciós időket azonosra... (.....),

4. ábra CE, HPLC, CGC mérési eredmények összehasonlítása

Látható a csúcsok szélességében jelentkező különbség. Sorrendben a CE, CGC, HPLC irányban szélesednek a csúcsok. Ezek alapján a következő megállapítást tehetjük: a kapilláris elektroforézis (CE) módszerét nagy, a kapilláris gáz-kromatográfiát (CGC) közepes, míg a nagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) mérési módszert kis kinetikai határfok jellemzi.

A Van-Deemter összefüggés:

Az elválasztás technikákban a kromatogramok szélességének megadására szolgál a Van-Deemter összefüggés. Minden zónaszélességet ehhez az összefüggéshez viszonyítunk. Ha U lineáris áramlási sebesség függvényében ábrázoljuk a H elméleti tányérmagasságot, akkor a következő jellegzetes ábrát kapjuk.



5. ábra

Az elméleti tányérmagasság:

$$H = L/N \quad (\text{ahol } L \text{ a kolonna/kapilláris hossza, } N \text{ az elméleti tányérok száma})$$

Elméleti tányérszám: $N = 16 \cdot (T_r/w)^2$ (T_r és w értelmezése a 8. Ábrán)

HPLC technika esetében: $H = A + (B/U) + (C \cdot U)$

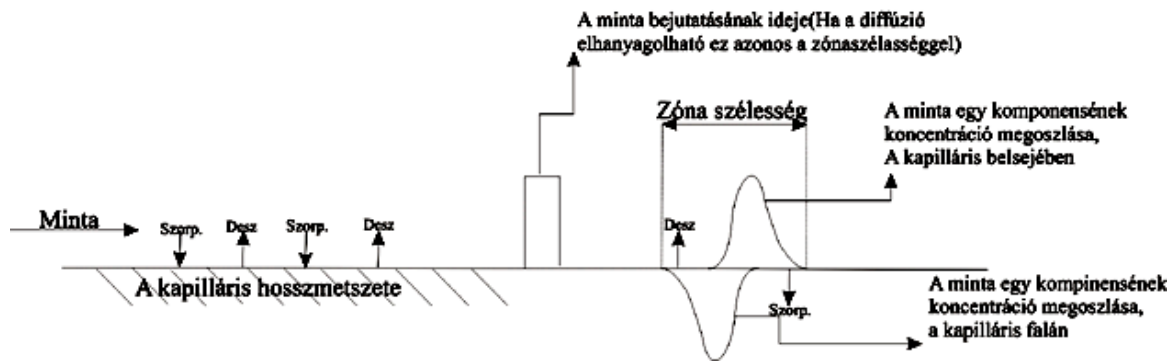
A képlet „A” tagja csak töltetes oszlopok esetén jelentkezik. „A” értéke függ a töltet részecskéinek d_p szemcseátmérőjétől.

CGC technika esetében: $H = (B/U) + C \cdot U$

Mivel CGC technika esetén nincs töltet a kolonnában, ezért „A” értéke nem szerepel a képletben. Ez a H elméleti tányérmagasság értékének csökkenését, míg a tányérszám növekedését eredményezi. Hozzávetőlegesen a tányérszám 10^5 értékű.

CE technika esetében: $H = B/U$

A „ $C \cdot U$ ” tag tűnik el a képletből. A C az anyagátadás (szorpció-deszorpció) miatti zónaszélesítő hatást fejezi ki (7. Ábra). A B/U tag a hosszirányú diffúzió zónaszélesítő hatását értelmezi. Gyors U lineáris áramlási sebesség esetén a B/U szerepe kisebb, azaz a zóna keskenyebb, míg lassabb U sebességeknél, a tag szerepe megnő, ezt tapasztalhatjuk a csúcsok szélességének növekedésében. CE technika esetében az elméleti tányérszám hozzávetőleg 10^6 értékre növekszik.



7. ábra A szorpciós-deszorpciós folyamatok és a zónaszélesség

Hogyan fejezhető ki az elválasztás technikák felbontóképessége?

A felbontóképességet az R_s -el jelölt mennyiséggel fejezzük ki. R_s értékét két módon írhatjuk fel. Az egyik felírási mód az ún. alapadatokból történik, az elektroferogram alapján.

$$R_s = 2 \cdot (t_{r2} - t_{r1}) / (w_1 + w_2)$$

Az elválasztás felbontóképességének számítása más jellemző adatok alapján is történhet:

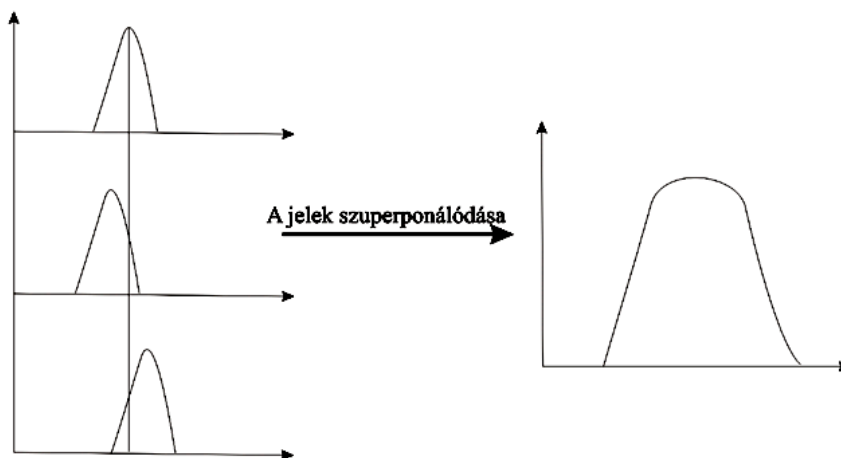
Elméleti tányérszám: $N = 16 \cdot (t_r/w)^2$

Szelektivitás, relatív retenció: $\alpha = k_2/k_1$ ahol k az ún. retenciófaktor $k = (t_r - t_m)/t_m$

$$R_s = 1/4 \cdot \sqrt{N} \cdot \alpha / (\alpha - 1) \cdot k / (k + 1)$$

Az így kapott képlet/szorzat első tényezője fejezi ki a kinetikai hatékonyságot, a második tényező a termodinamikai hatékonyságot, míg az utolsó tag a visszatartással kapcsolatos.

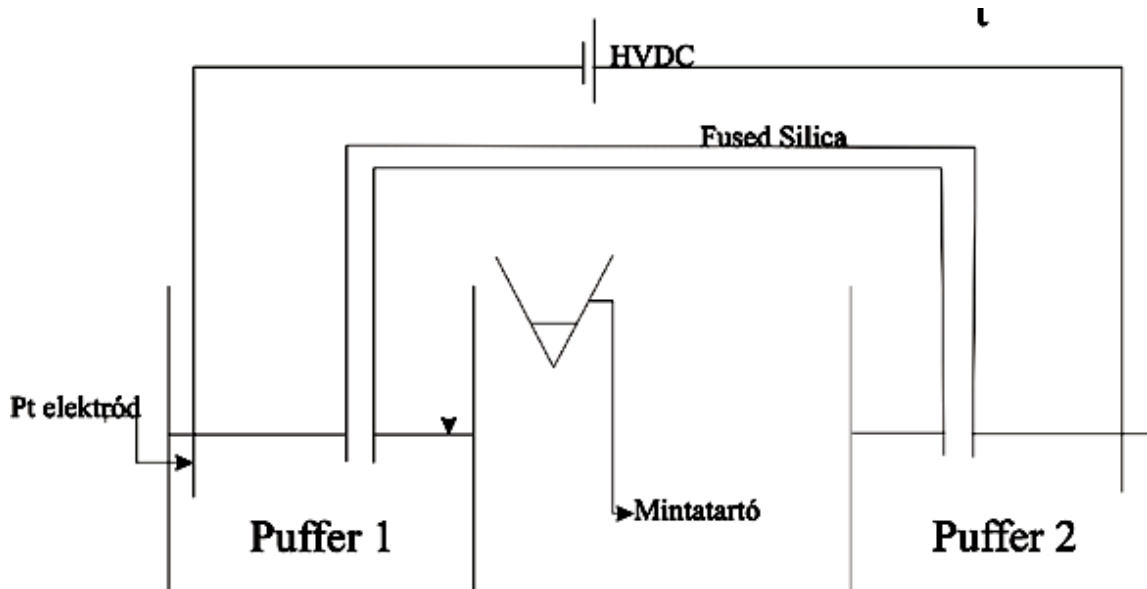
Méréseink során ki kell kötnünk azt, hogy a k értéke 1 és 10 értékek közé essen. Erre azért van szükség, hogy az interferencia jelenségét elkerüljük. Pl. ha 3 különböző anyagot külön-külön mérünk azok diszkrétan jelentkeznek, viszont a retencióidők közelségéből adódóan együttes mérés esetén a 3 anyag csúcsa egy csúcsként jelentkezik. Ez az interferencia jelensége, amely nemkívánatos méréseink során (8. Ábra)



8. ábra: Az interferencia jelensége

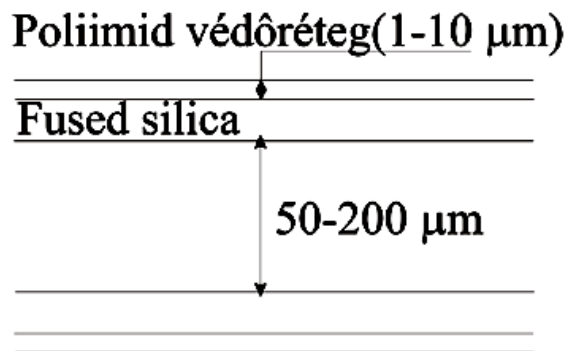
A nagy elméleti tényérszám a csúcsfelbontást növeli meg, ill. lehetővé teszi kis szerkezeti különbséggel rendelkező anyagok elválasztását. A CE és CGC esetén az elválasztás-technika elméleti tényérszám kontrollált.

A HPLC szelektivitás kontrollált. Ennek oka az, hogy a szelektivitást mind az álló, mind a mozgófázis tulajdonságai megszabják.



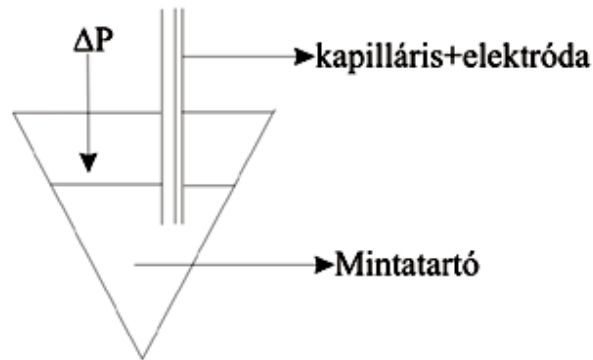
Hogyan épül fel egy ilyen kapilláris elektroforézis rendszer?

9. ábra. Kapilláris elektroforézis rendszer mérőelrendezésének vázlata.



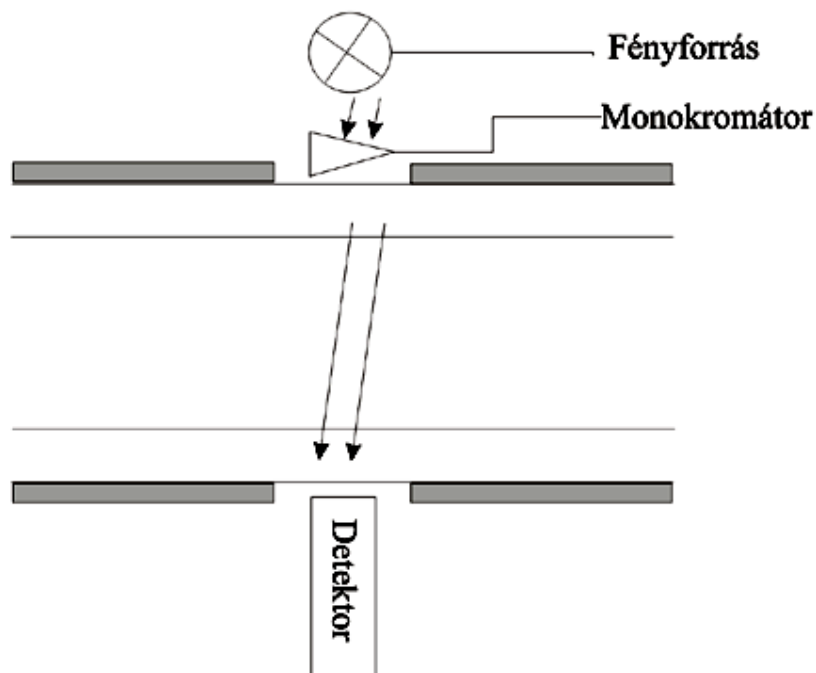
10. ábra. Fused silica szerkezete

Az adagolás alatt egy mechanika átemeli a Pt elektródot és a nagy tisztaságú szilikát csövet az egyes puffertartályból a mintatartályhoz. Hogyan lehetséges nanoliteres nagyságrendű mintát venni? Erre az egyik lehetőség a nyomáskülönbség létrehozása. Ezt elérhetjük a mintatartályra gyakorolt nyomással, ill. ettől jobb eredmények érhetőek el akkor, ha a 2. Puffertartály oldalán alkalmazott vákuum veszi a mintát (11. Ábra). A nyomáskülönbség mellett a másik mintavételi mód az elektrokinetikus mintavételezés. A felvett mintából a visszaemelés miatt nem veszítünk anyagot, mivel a felületi feszültség a mintát a kapillárisban tartja.



11. ábra Mintavétel nyomáskülönbség létrehozásával

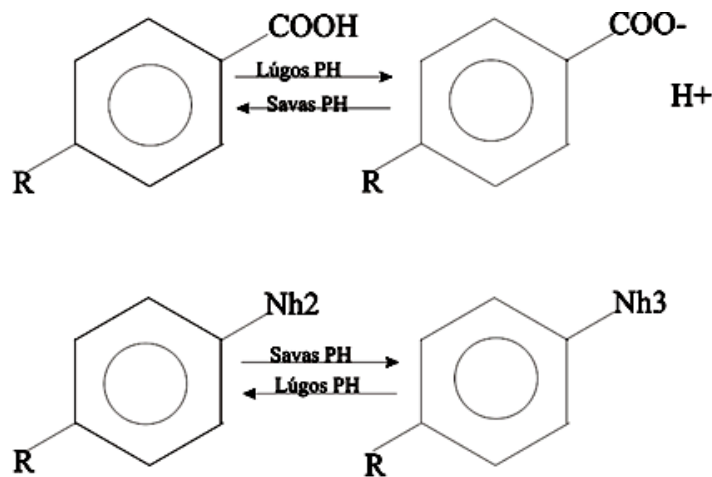
Detektálás: Spektrofotometria. Monokromatikus fényt bocsátunk a kapilláris egy olyan szakaszára, ahol a poliimid réteget eltávolítottuk, így a küvetta anyagát maga a kapilláriszolgáltatja. A fény átbocsátását követően fotodiódával detektálunk. (12. Ábra)



12. Ábra Detektálás spektrofotometriás módszerrel

Milyen anyagok elválasztására alkalmas egy kapilláris elektroforetikus elválasztó rendszer?

Pufferrel töltött kapilláris esetén szabad elektrolitos- vagy másnéven kapilláris zóna CE (CZE) technikáról beszélünk. Ez a technika csak töltéssel rendelkező anyagok elválasztására alkalmas. Tehát minden anion és kation elválasztható ezzel a műszeres analitikai módszerrel. Továbbá képes minden olyan anyag elválasztására, amely pH változás hatására ionizálódik. (13. Ábra)



13. ábra A CE módszer alkalmas a pH hatására ionizálódó szerves molekulák mérésére

Mint az az ábrán látható a méréssel pl. karbonsavak és aminok is mérhetők, ez lehetőséget ad növény-védőszeres ill. toxikus aminok mérésére.

Az amin-csoportok ionizáló képessége miatt a módszer a fehérjék, peptidek egyik fő elválasztó technikája.



A CE technika alkalmas többgyűrűs aromás szénhidrogének elválasztására. Hogy lehetséges ez, amikor ezeket a molekulákat nehéz ionizálni? A többgyűrűs aromás szénhidrogének mérésekor felületaktív anyagot adnak a mintához olyan mennyiségben, hogy az micellákba beoldja a PAH-ot. A szénhidrogén felületén kialakuló tenzid molekula réteg, már képes ionizálni, így lehetőségünk nyílik ezeknek a rendkívül veszélyes anyagoknak a mérésére is.

A CE módszer, ma az optikai izomer elválasztás legfontosabb módszere.