

# Kromatográfiás módszerek a környezetvédelmi analízisben

Juvancz Zoltán

# Kromatográfia előnyei a környezeti analízisekben

- Pontos meghatározás nyomnyi mennyiségekre
- Mátrixkomponensek zavaró hatása kiküszöbölhető
- Kicsiny mintaszükséglet
- Széles lineáris meghatározási koncentráció tartomány
- Több meghatározás egy analízis során
- Gyors módszer
- Jól kapcsolható anyag meghatározási technikákhoz (MS, UV-VIS, IR).
- Fejlett műszerezettség, automata üzemmód

# Nyomnyi mennyiségek kimutatása nagy mennyiségű mátrixban

A többdimenziós,  
sorba kapcsolt oszlopok  
használata előnyös  
a nyomnyi anyagok  
kimutatásánál.  
A rendszerben a második  
oszlopra csak szűk, kivágott  
frakciót engedtek át.

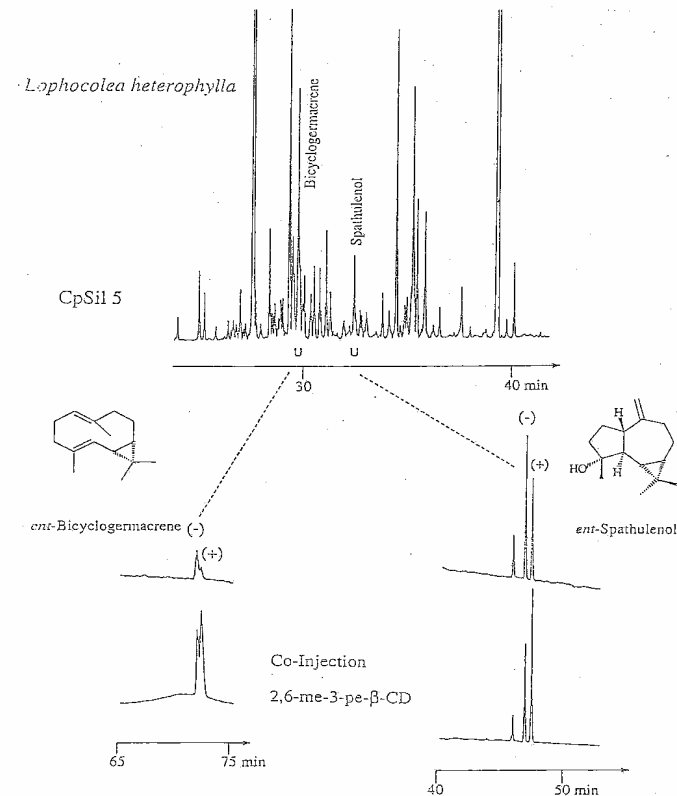
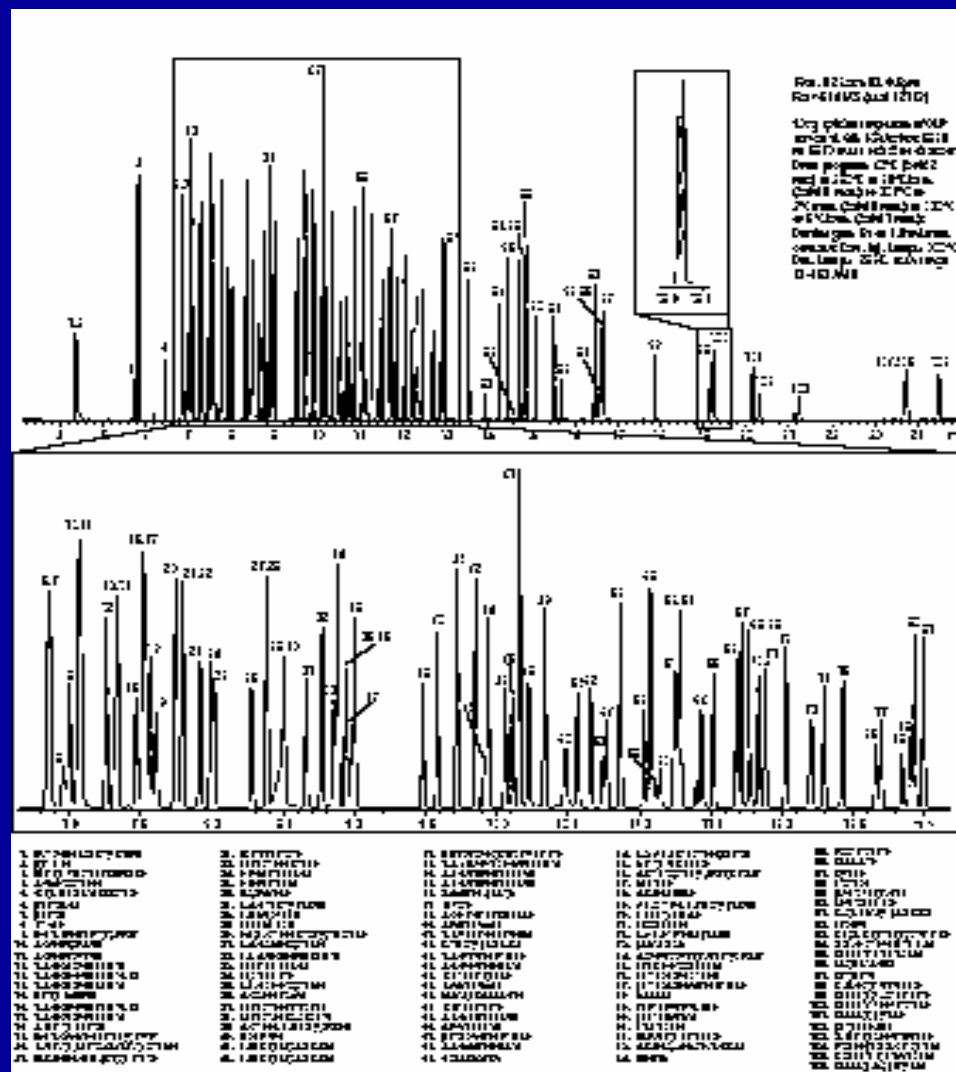


Figure 7  
Determination of the enantiomeric composition of bicyclgermacrene (column temp. 100°C) and spathulenol (column temp. 145°C) in the essential oil of *Lophocolea heterophylla* on a 25 m heptakis(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)-β-cyclodextrin capillary column (50 % in OV-1701); Preseparation on a 25 m CpSil 5 capillary column, 80°C, 3°C/min up to 200°C.

# Egy analízis alatt számos komponens meghatározása megoldható

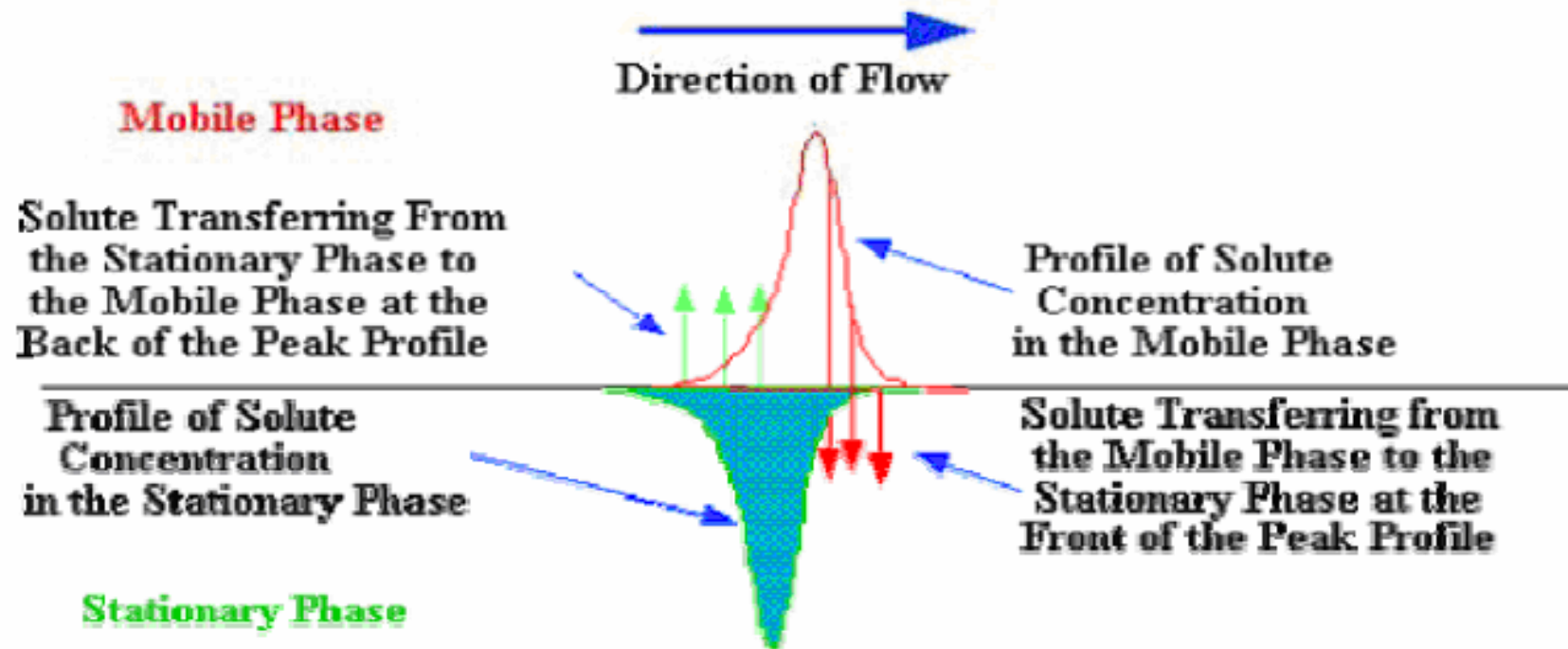
106 közepesen illékony szennyező anyag GC-MS analízise



# Kromatográfiás folyamat

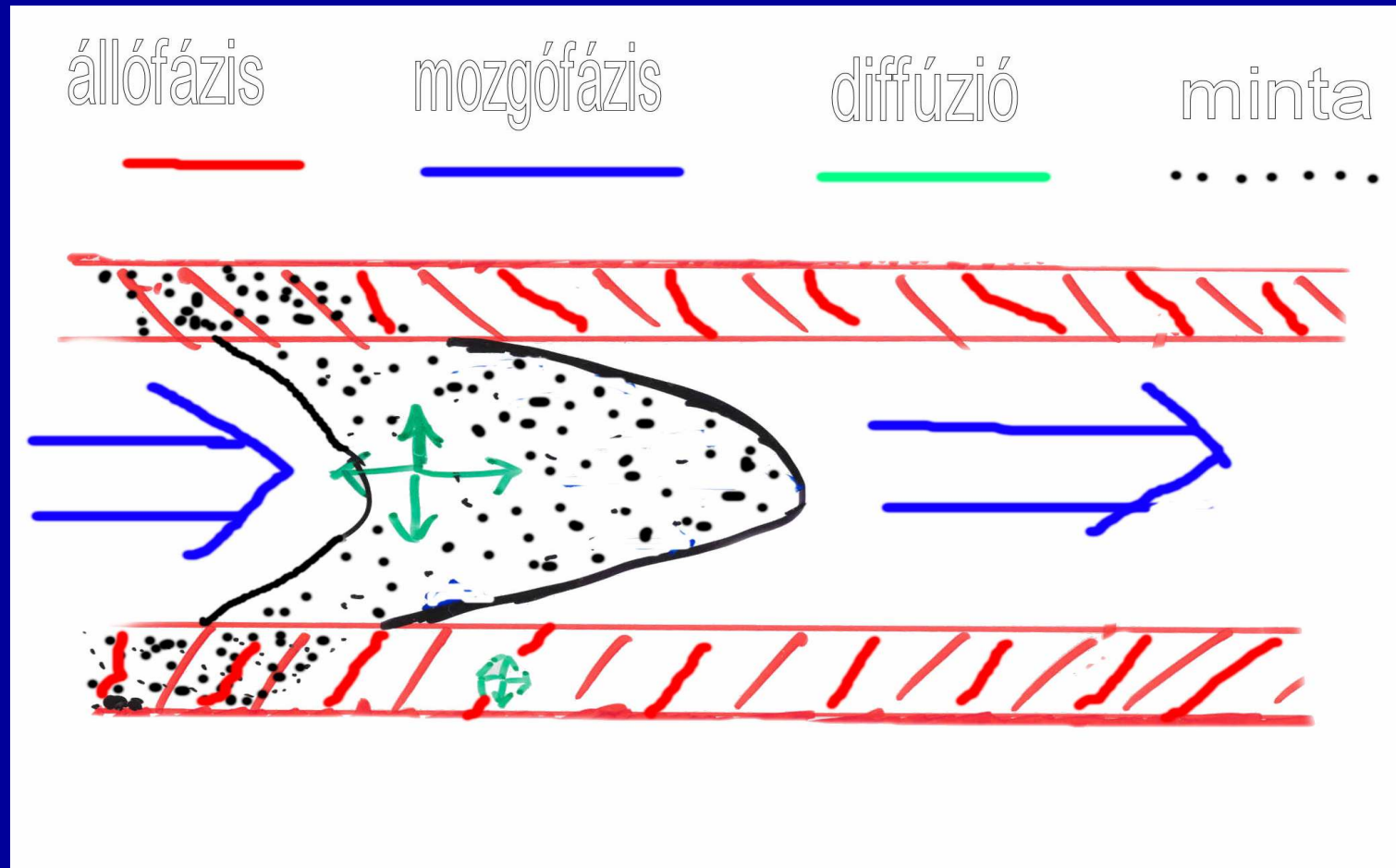
- Kromatográfia elválasztási módszer.
- Kromatográfiában az állófázis és a mozgófázis között megoszlának az anyagok megoszlának egyensúlyi állandójuk szerint.
- A mozgófázis magával ragadja a vizsgálandó anyagot, amely így a beinjektálási ponttól a detektorig jut.
- Az állófázissal erősebb kölcsönhatással rendelkező anyagok később eluálódnak mint a gyengébb kölcsönhatással rendelkezők.
- Az anyagok vándorlásuk során egyre szélesebb tartományt foglalnak el.

# Egy csúcs megoszlása az állófázis és mozgófázis között



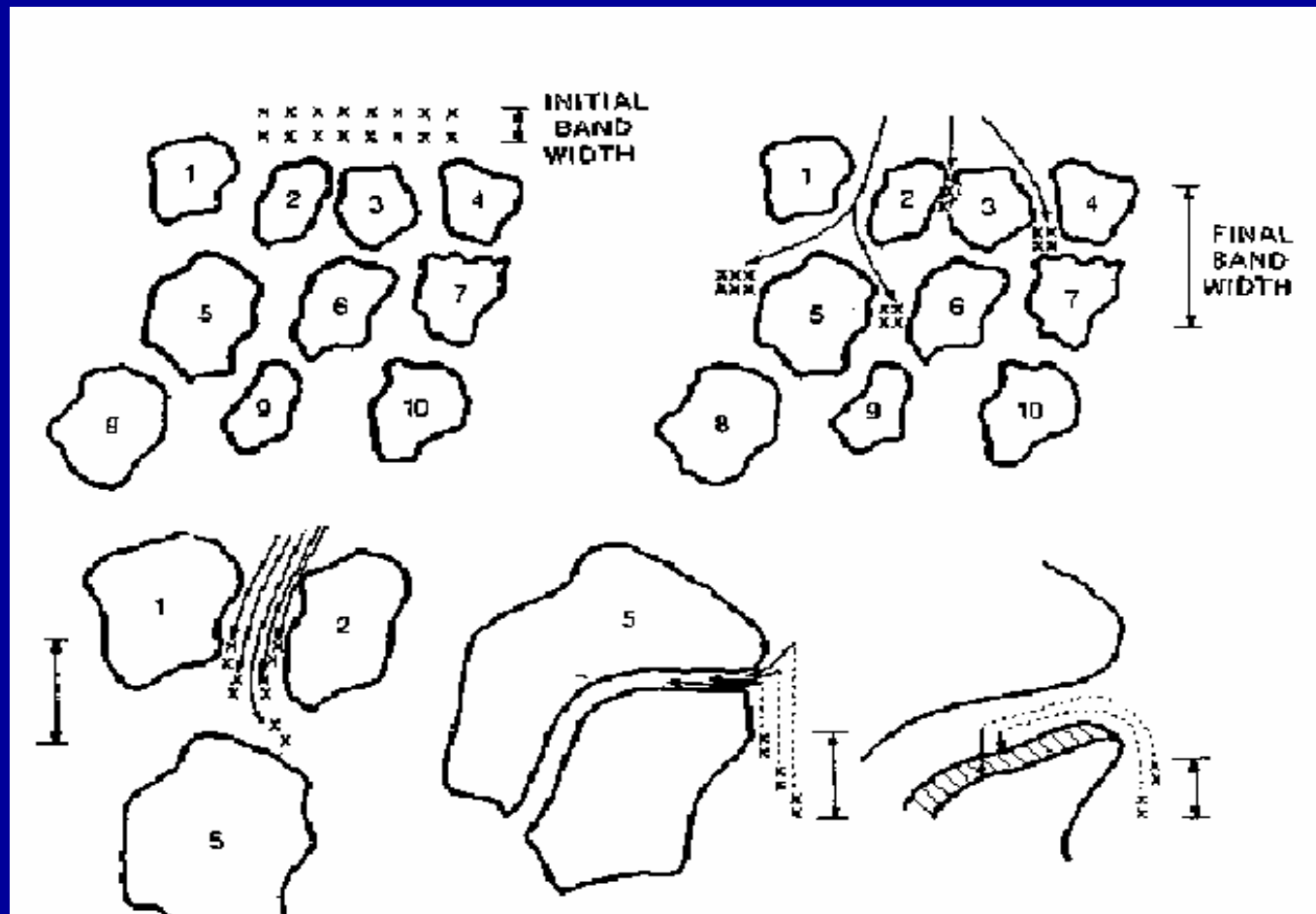
A mozgófázis magával ragadja a minta molekuláit.  
Az állófázisban lévő anyag lemarad a mozgófázisban lévőtől  
A lassú anyagátadás (anyagátadási ellenállás) miatt.

# A csúcsok szélesedése a diffúzió miatt



Az anyag kromatográfia során egyre szélesebb tartományt foglal el a diffúzió és az egyenlőtlen V alakú áramlás miatt.

# Csúcsok szélesedése az egyenlőtlen áramlás és az anyagátadási ellenállás miatt



Okok: zergugos egyenlőtlen áramlás, lassú diffúzió az üregekből, lassú anyagátadás a fázisok között



# Kromatográfia felosztása mozgófázis szerint

- Gázkromatográfia, (GC)
- Folyadékkromatográfia (LC),  
nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)
- Szuperkritikus oldószeres kromatográfia (SFC)
- Elektrokinetikus kromatográfia (EKC)  
kapilláris elektrokinetikus kromatográfia (CEC)

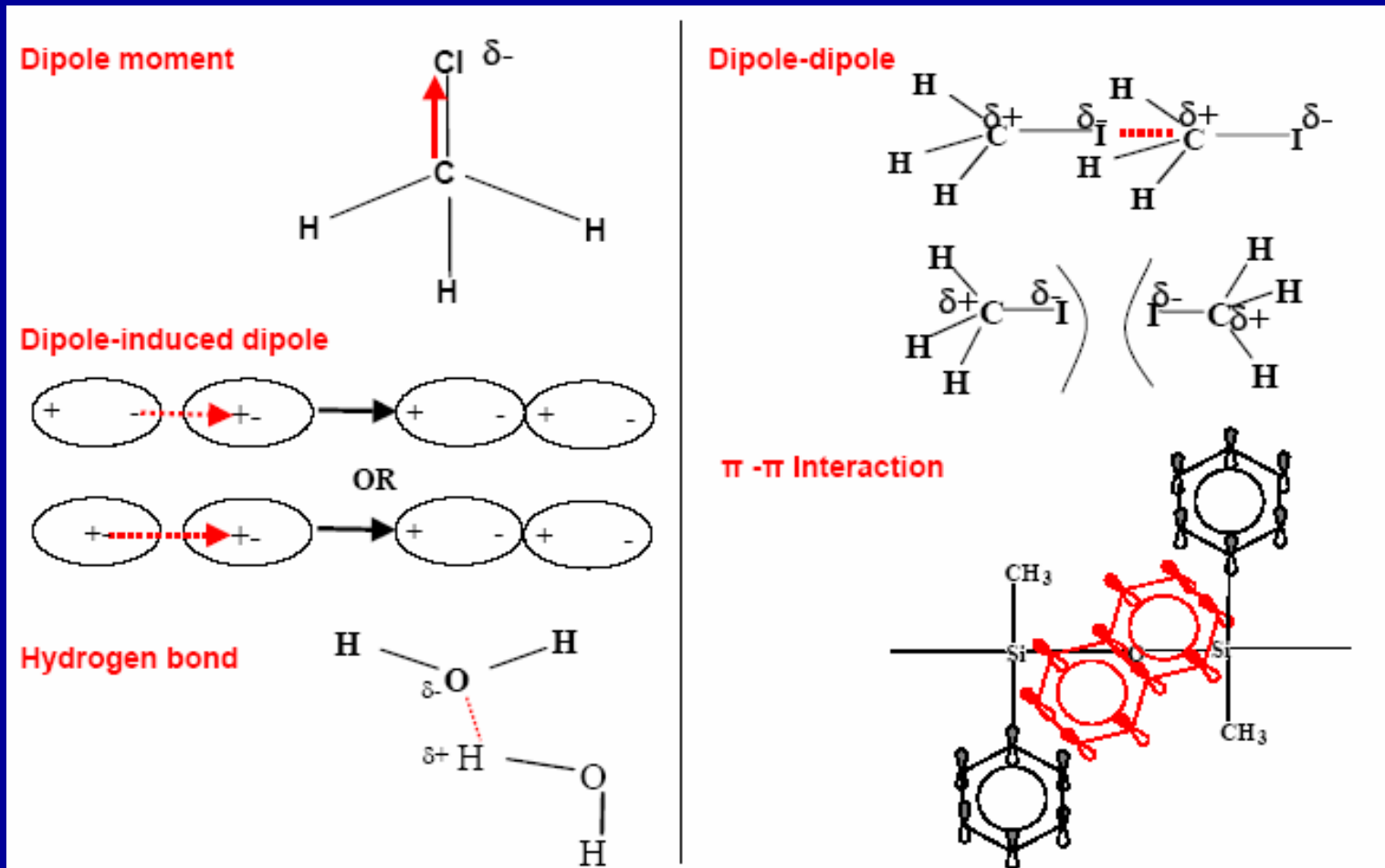
## Kromatográfia felosztása oszlop szerint

- Töltetes oszlop kromatográfia
- Kapilláris oszlop kromatográfia
- Chip kromatográfia
- Vékonyréteg kromatográfia (TLC)

## Kromatográfia felosztása kölcsönhatások szerint

- Megoszlásos kromatográfia
- Adszorpciós kromatográfia
- Kizárásos, gél (exclusion) kromatográfia
- Ioncserés kromatográfia

# Kölcsönhatások típusa



Diszperziós erők is fontosak, főleg apoláris vegyületeknél.

# Kromatográfiás kifejezések

## Elméleti tányérszám

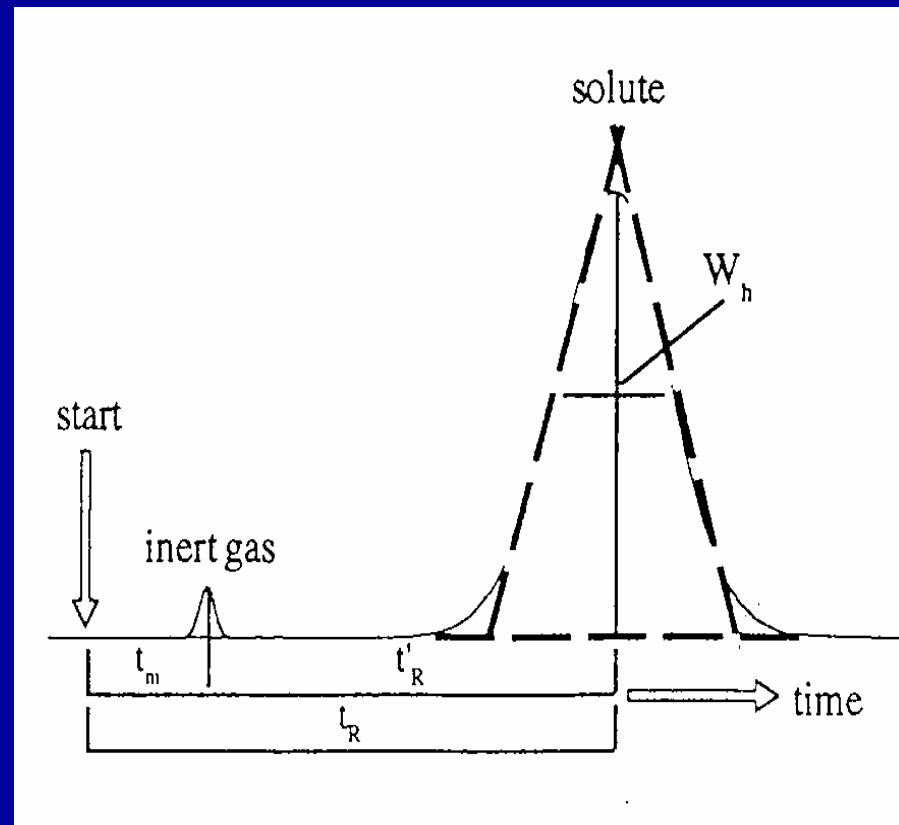
$$N = 5,54 (t_R/w_h)^2$$

## Kapacitás arány

$$k = t_R'/t_0$$

$t_R$ : retenciós idő

$w_h$ : csúcs félérték szélessége



A csúcs Gauss görbe alakú

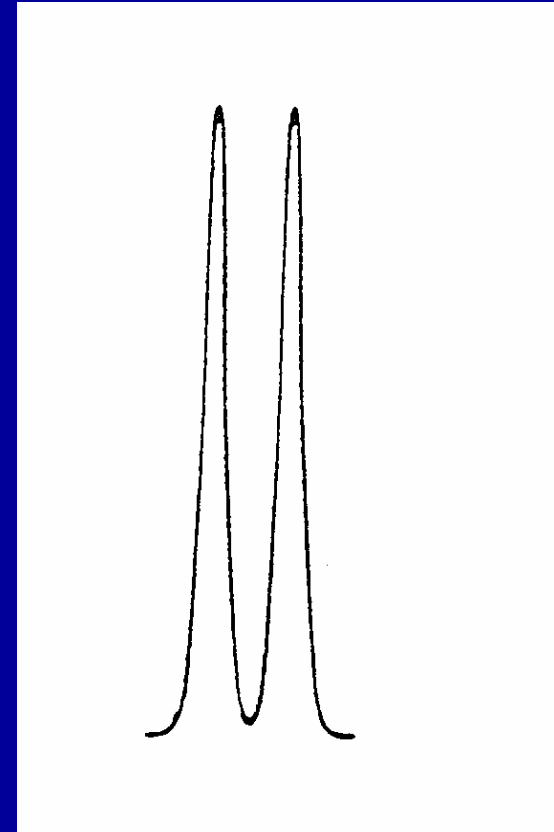
# Kromatográfiás kifejezések

## Szelektivitás

$$\alpha = t_{R2}' / t_{R1}'$$

## Felbontás

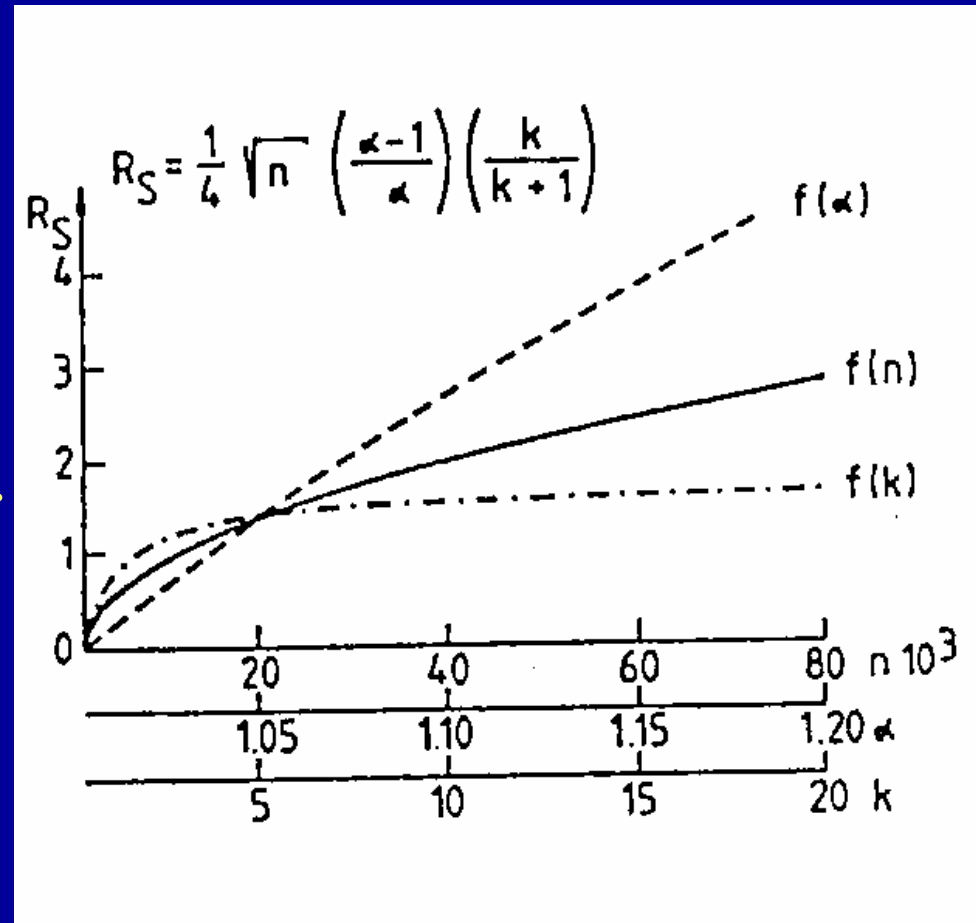
$$R_s = 1,177 (t_{R1} - t_{R2}) / (W_{h1} + W_{h2})$$



$R_s$  : 1,5 alapvonal felbontás

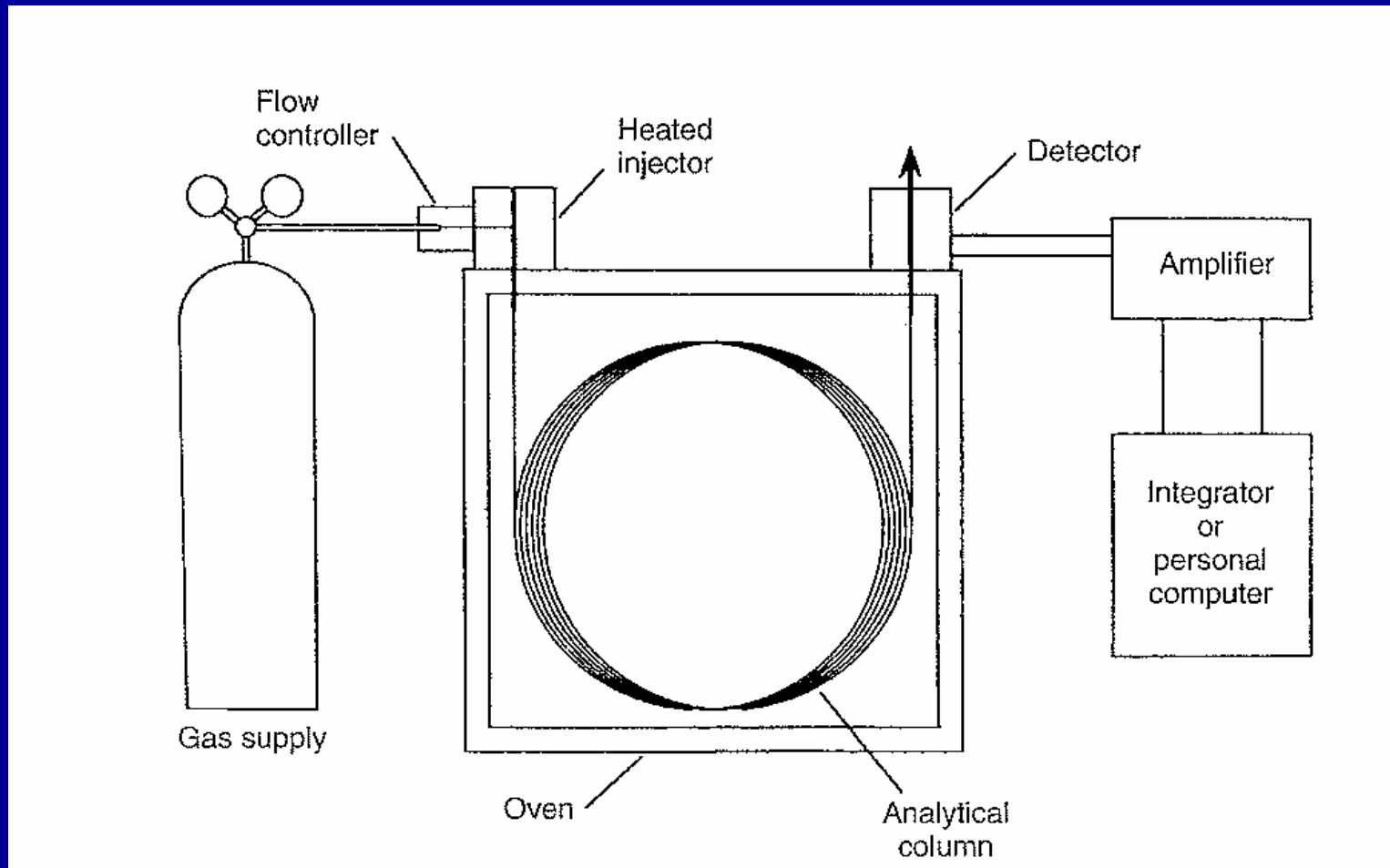
# Felbontás függése k, n és $\alpha$ értékétől

A mindennapi gyakorlatban fontos szerepet játszik felbontás növelése mellett az analízis idő csökkentése és a túlterhelés elkerülése is.



**Az ideális kromatográfiás paraméterek kompromisszumok eredménye.**

# Gázkromatográf (GC) vázlat



Gázipalack helyett lehet H<sub>2</sub> generátor is.

## GC automata injektor

Az automata injektor nem csak az emberi felügyelet nélküli munkát teszi lehetővé, de a pontosságot is nagy mértékben javítja.

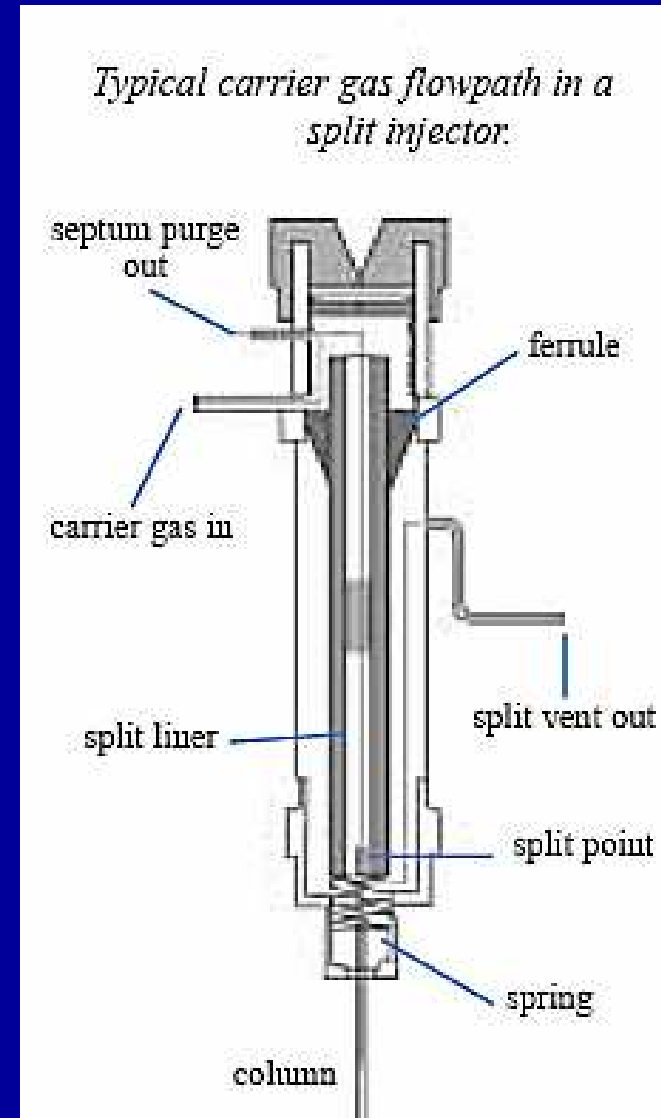




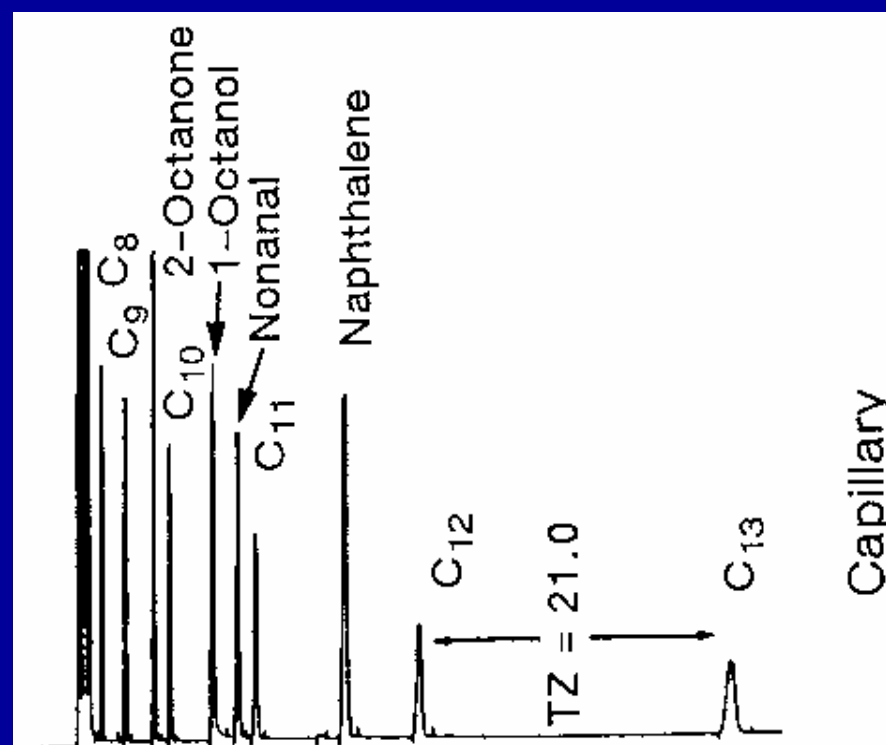
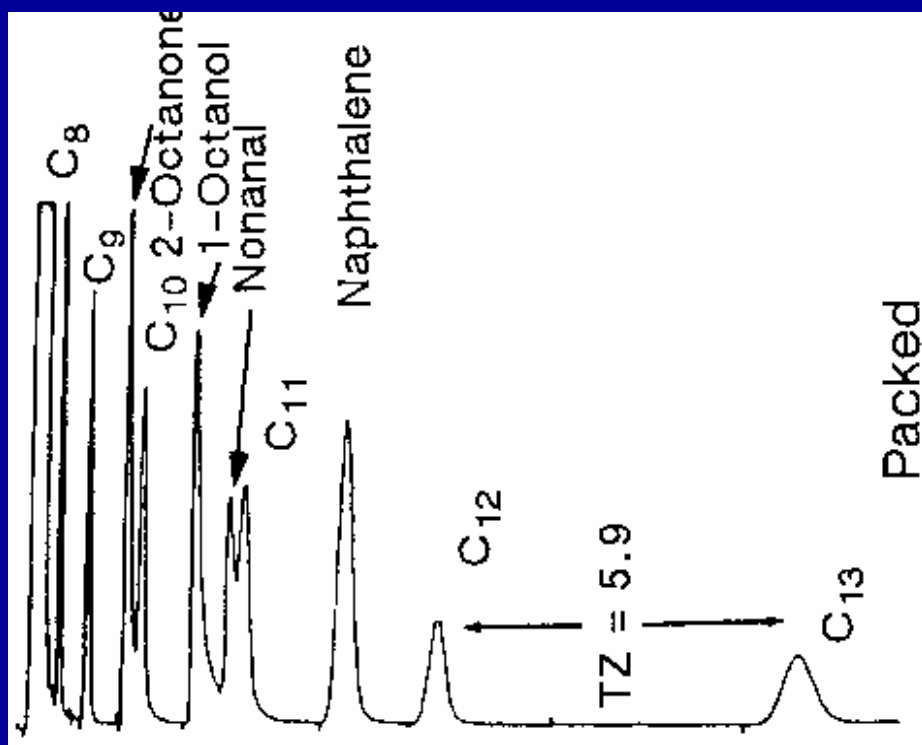
# Split/splitless injektor

Beinjektáláskor a minta elpárolog a forró injektorban.

A felesleget a split szelepen lefúvatjuk, hogy elkerüljük a túlterhelés és a hosszan elnyúló oldószercsúcsot.



# Töltetes és kapilláris oszlopok összehasonlítása GC-ben



A kapillárisok kisebb áramlási ellenállása miatt sokkal hosszabb oszlopokat használatát teszi lehetővé, ami nagyobb hatékonyságot és ezért jobb felbontást biztosít.

# GC-s kapilláris keresztmetszete

Általános paraméterek

Hossz, 5-50 m

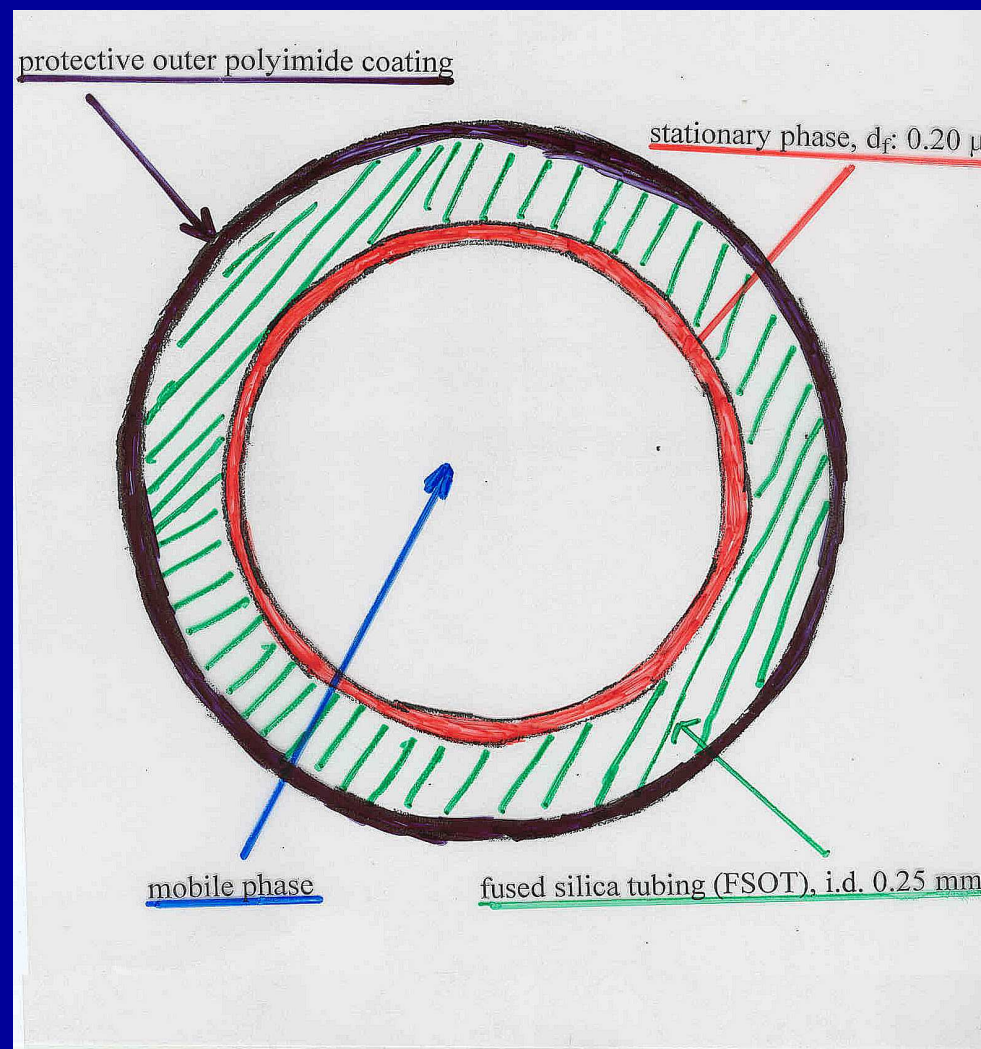
Átmérő: 0,1-0,5 mm

Filmvastagság: 0,1-5  $\mu\text{m}$

Oszlop anyaga: kvarc

Állófázis: hőstabil

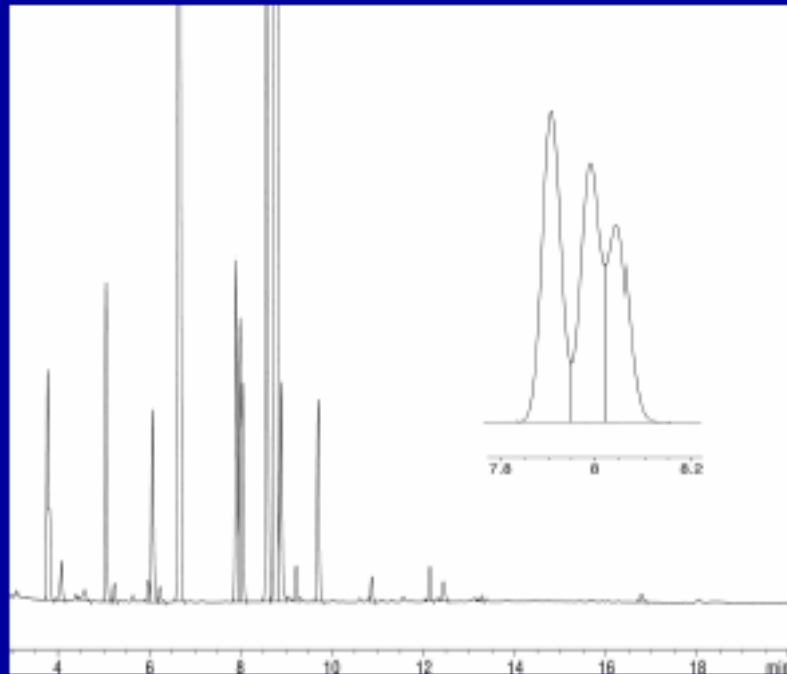
szilikon vagy PEG polimer



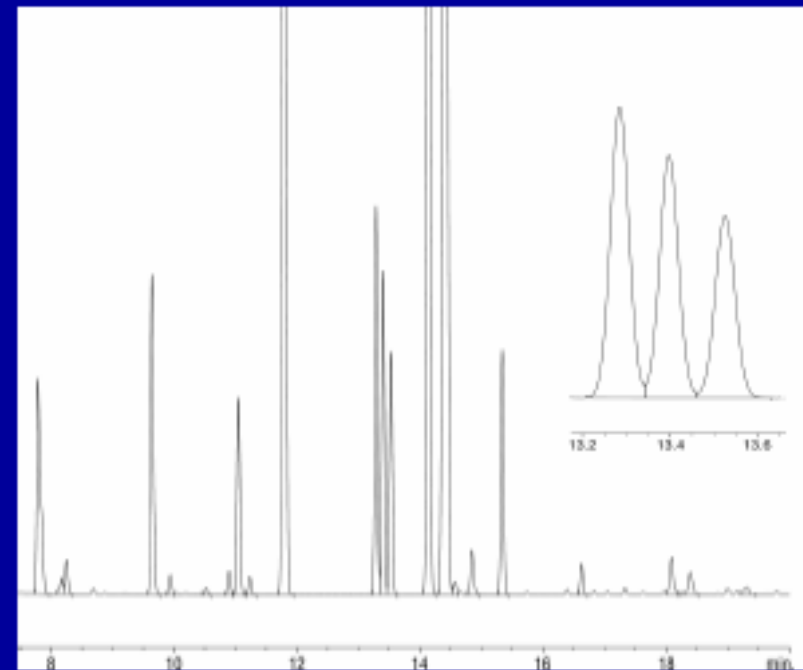
Ma már jóformán csak kapilláris oszlopot használnak GC-ben.

# Oszlophossz hatása

Rtx-1, 30m x 0.25mm x 1 $\mu$ m



Rtx-1, 60m x 0.25mm x 1 $\mu$ m



Sample: 500 $\mu$ g/mL Aviation Gas Standard in methanol

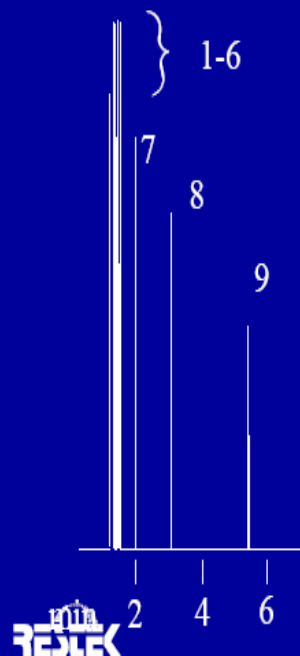
Hosszabb oszlopon jobb a felbontás, de időigényesebbek az analízisek.

# Állófázis filmvastagságának hatása

## 0.25 $\mu$ m Rtx<sup>®</sup>-1

30m, 0.32mm ID, 0.25 $\mu$ m

McReynolds probes



1. 1-butanol
2. benzene
3. 2-pentanone
4. C<sub>7</sub>
5. 1-nitropropane
6. pyridine
7. C<sub>8</sub>
8. C<sub>9</sub>
9. C<sub>10</sub> 5.5 min

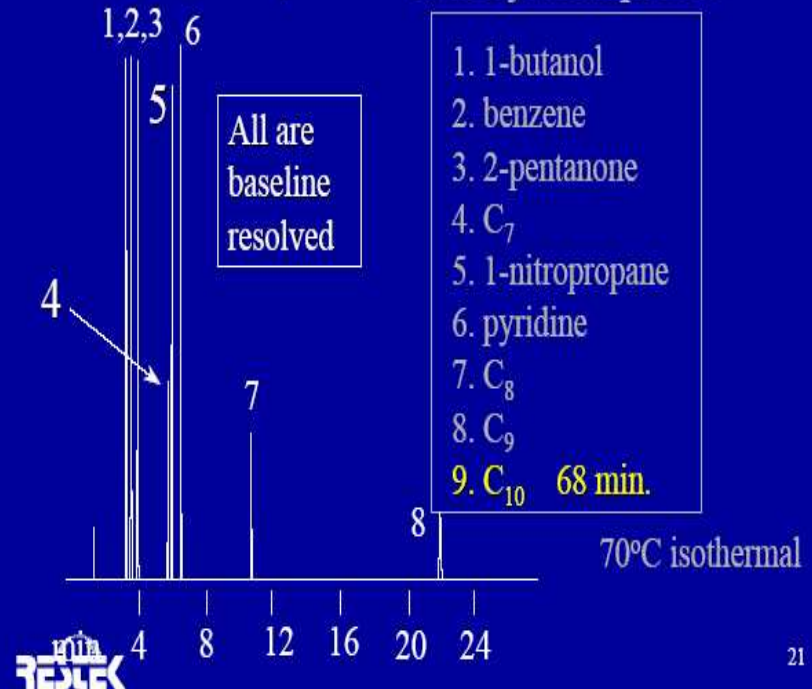
70°C isothermal

19

## 3.0 $\mu$ m Rtx<sup>®</sup>-1

30m, 0.32mm ID, 3.0 $\mu$ m

McReynolds probes



1. 1-butanol
2. benzene
3. 2-pentanone
4. C<sub>7</sub>
5. 1-nitropropane
6. pyridine
7. C<sub>8</sub>
8. C<sub>9</sub>
9. C<sub>10</sub> 68 min.

70°C isothermal

21

Vastag filmvastagságú oszlopokat illékony komponensek (benzin, formaldehid, VOC) analízisére használjuk.

# Csomagoló anyagokból származó szennyeződések élelmiszerekben

## GC Parameters

**Column:** Rtx<sup>®</sup>-5MS, 30m x 0.25mm x 1.0 $\mu$ m  
(cat.# 12653)  
**Inj.:** 250°C, 20:1 split  
**Carrier gas:** helium, 1mL/min., constant flow  
**Oven:** 50°C to 92°C @ 3°C/min, to 220°C @  
20°C/min. (1 min. hold)

## MSD Parameters

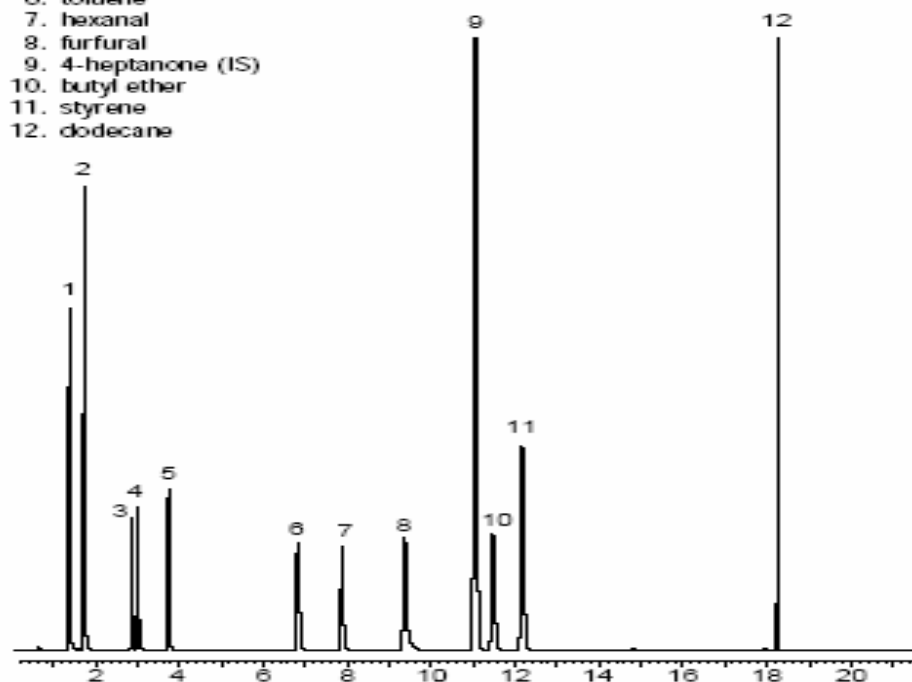
**Temp.:** 280°C  
**Scan range:** 35-260, 1 min. solvent delay  
**Ionization:** EI @ 70eV

## Purge & Trap Parameters

**Concentrator:** Tekmar LSC-3100 with Vocarb<sup>®</sup> 3000  
(type K) trap  
**Transfer line:** Silcosteel<sup>®</sup>-treated stainless steel tubing  
**Purge:** 10 min. at 40mL/min., 60°C  
**Dry purge:** 3 min. at 40mL/min.  
**Desorb:** 2 min. at 40mL/min., 245°C

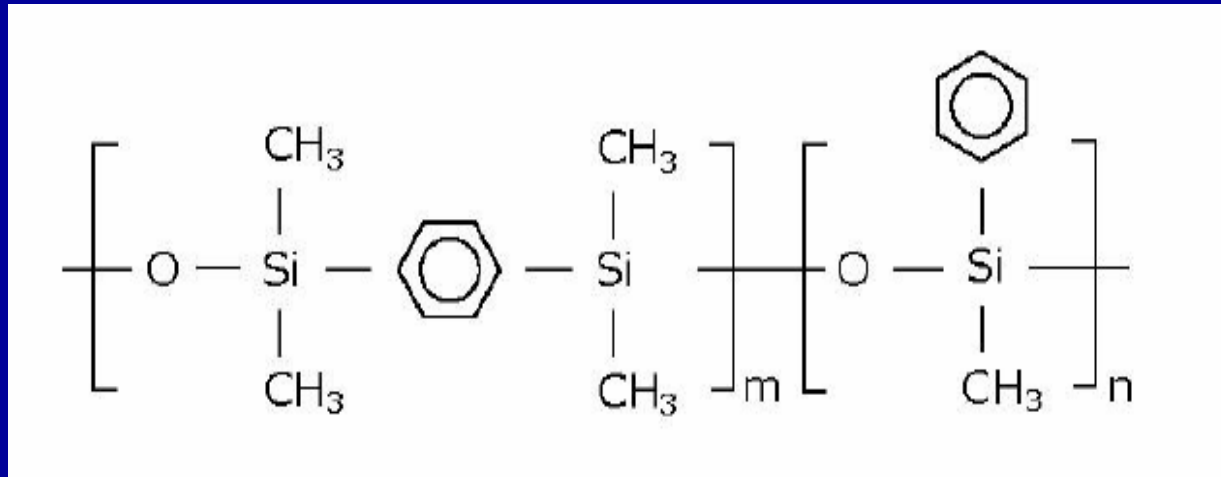
1. isopropanol
2. methylene chloride
3. 2-methyl-1-propanol
4. tetrahydrofuran
5. benzene
6. toluene
7. hexanal
8. furfural
9. 4-heptanone (IS)
10. butyl ether
11. styrene
12. dodecane

See Table I, back page,  
for analysis conditions.



A komponensek nagy illékonysága miatt vastag filmű oszlopot kell használni.

# Környezetvédelemben leggyakrabban használt GCs állófázisok



**A lánc lehet tiszta metilszilikon is.**

100% metil: olajszennyezések

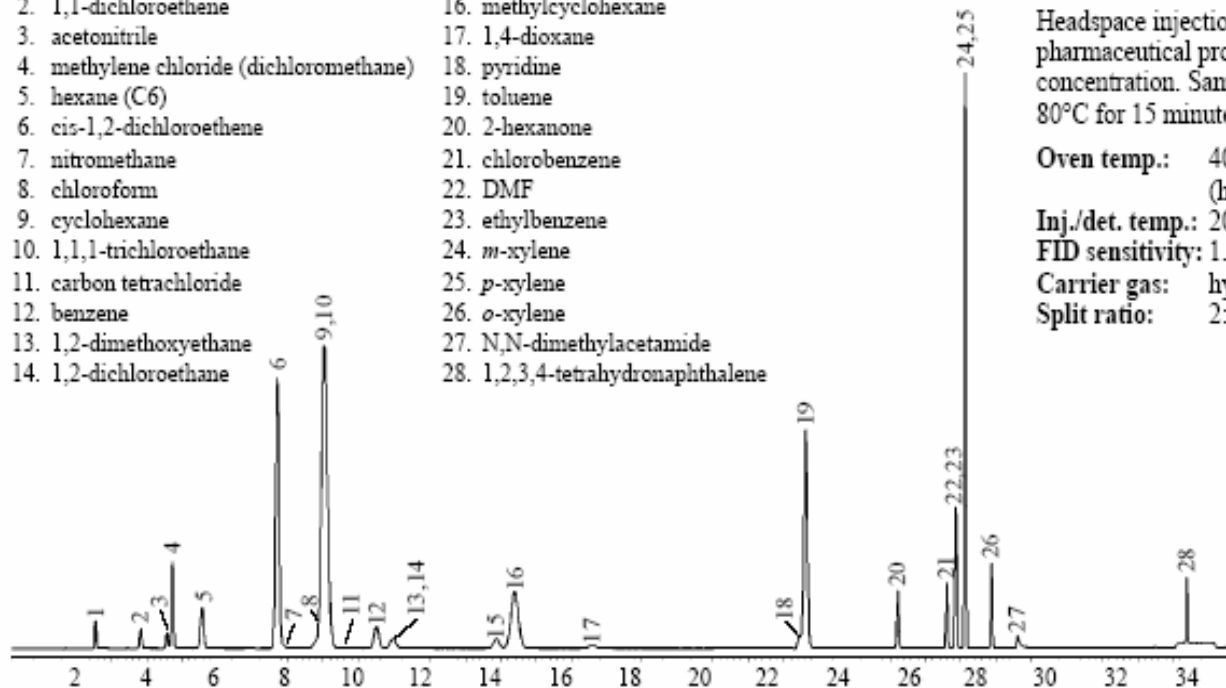
5% fenil: PAH, PCB, semivolatile, ftalátok

35% fenil: VOC, ipari oldószerek

20% trifluoropropil: oxigenátok, oldószerek, peszticidek

# Ipari oldószerek GC analízise

- |   |   |
|---|---|
| 1. methanol                             | 15. trichloroethylene (1,1,2-trichloroethene) |
| 2. 1,1-dichloroethene                   | 16. methylcyclohexane                         |
| 3. acetonitrile                         | 17. 1,4-dioxane                               |
| 4. methylene chloride (dichloromethane) | 18. pyridine                                  |
| 5. hexane (C6)                          | 19. toluene                                   |
| 6. cis-1,2-dichloroethene               | 20. 2-hexanone                                |
| 7. nitromethane                         | 21. chlorobenzene                             |
| 8. chloroform                           | 22. DMF                                       |
| 9. cyclohexane                          | 23. ethylbenzene                              |
| 10. 1,1,1-trichloroethane               | 24. <i>m</i> -xylene                          |
| 11. carbon tetrachloride                | 25. <i>p</i> -xylene                          |
| 12. benzene                             | 26. <i>o</i> -xylene                          |
| 13. 1,2-dimethoxyethane                 | 27. N,N-dimethylacetamide                     |
| 14. 1,2-dichloroethane                  | 28. 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene             |



30m x .53mm ID x 3.0mm Rtx®-1301 (cat.# 16085-126)

Headspace injection of 28 Class 1 and 2 residual solvents for pharmaceutical processing. Prepared at the regulatory limit concentration. Samples shaken and heated at 80°C for 15 minutes, 1mL headspace injection.

Oven temp.: 40°C (hold 20 min.) to 240°C @ 10°C/min. (hold 20 min.)

Inj./det. temp.: 200°C/250°C

FID sensitivity:  $1.1 \times 10^{-11}$  AFS

Carrier gas: hydrogen @ 35cm/sec.

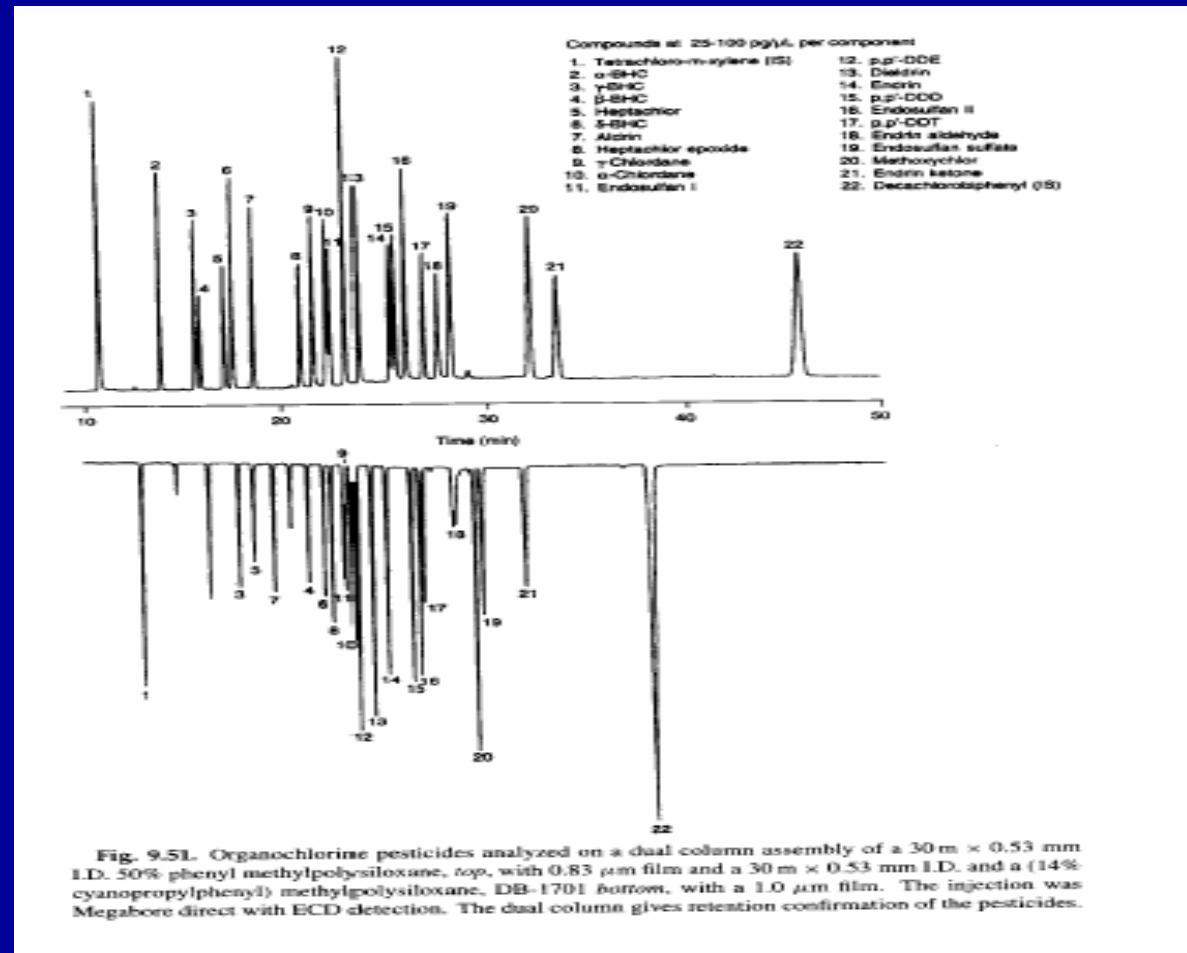
Split ratio: 2:1

Speciális feladatra tervezett állófázisokat is árulnak



# Klórozott növényvédő szerek elválasztása párhuzamosan kötött oszlopokkal

A koelució  
Kétdimenziós  
(párhuzamosan  
kapcsolt oszlopok)  
megoldással  
kiküszöbölhető



# Klórozott peszticidek GC x GC analízise

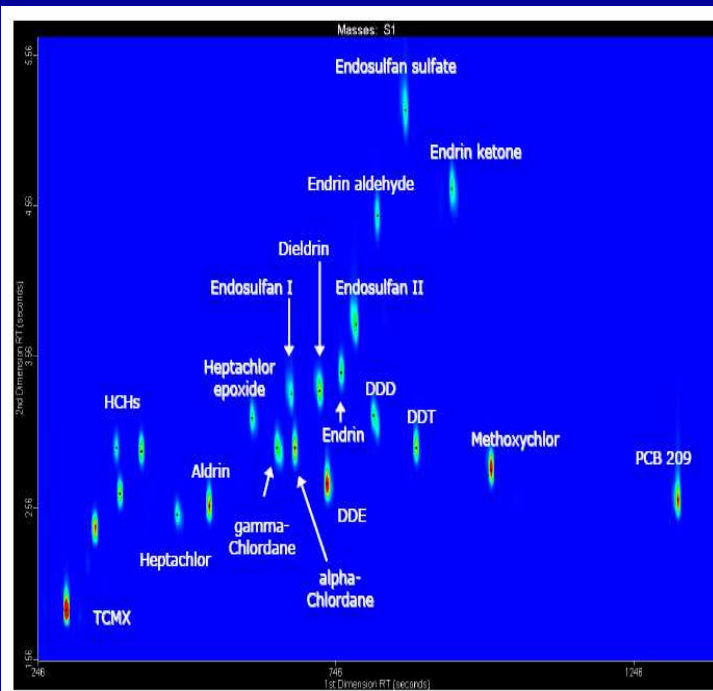


Figure 1. Contour plot (GCxGC chromatogram) of organochlorine pesticide mix. Note the separation of compounds in two dimensions with the Rtx-5 separation (and retention time) on the X-axis, and the Rtx-200 separation occurring along the Y-axis.

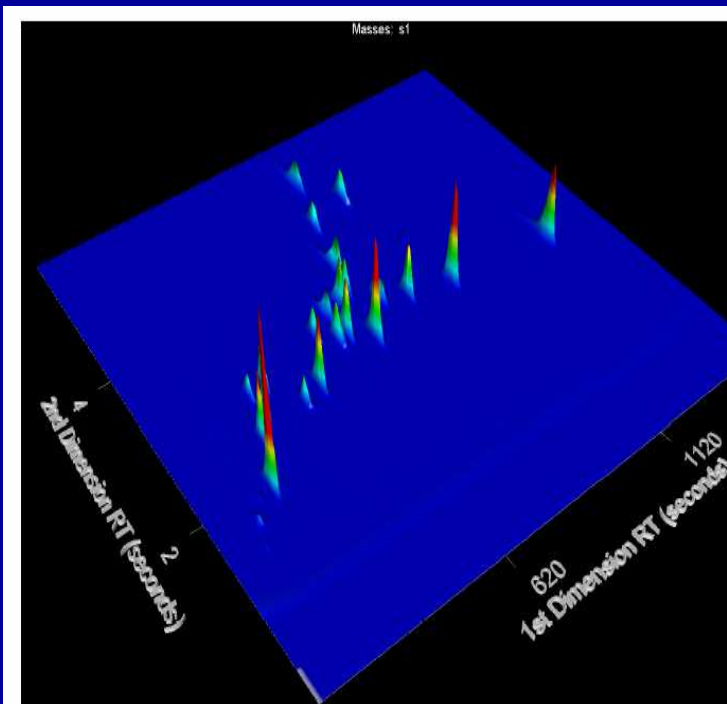
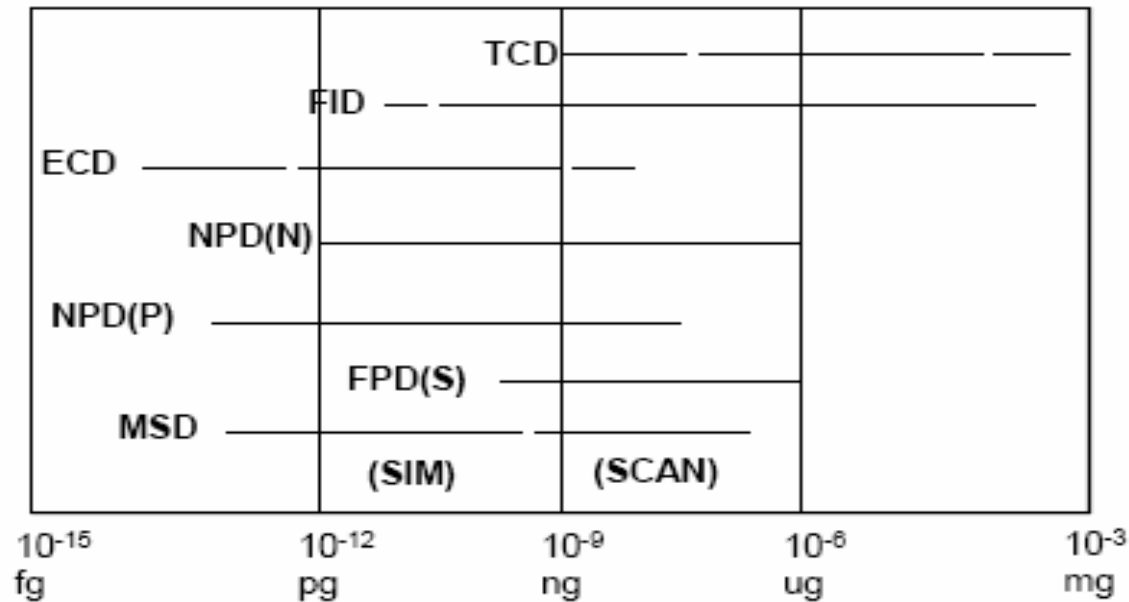


Figure 3. Surface plot of organochlorine pesticide mix analyzed with GCxGC-ECD. The first dimension retention time is for the Rtx-5 separation, and the second dimension retention time is for the Rtx-200 separation. In addition, there is a Z-axis which represents ECD response for the pesticides.

# GC detektorok érzékenységének összehasonlítása

## Comparison of GC Detectors



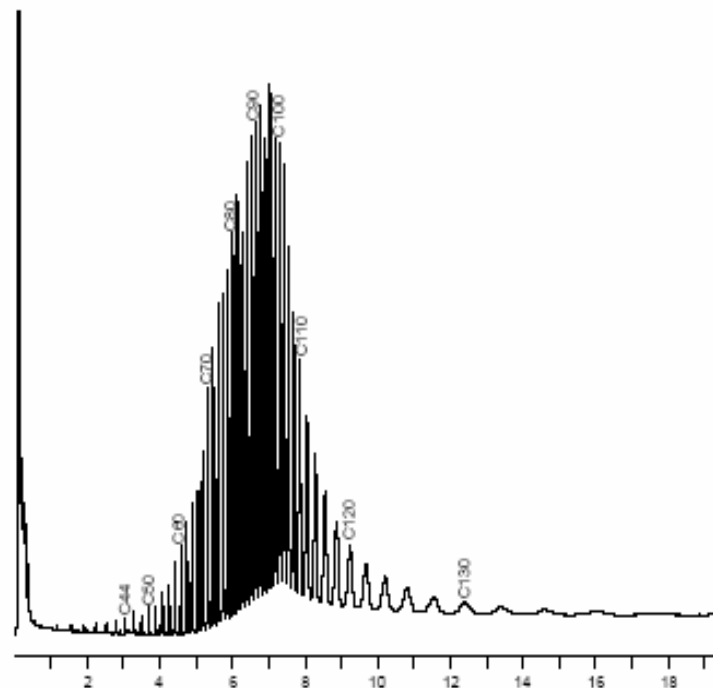
1 ng in 1 uL Liquid (sg = 1) is 1 ppm Concentration

Mass Selective Detector is both:  
**Specific and Universal**

# GC analízis C130 szénatomszámig lángionizációs detektor (FID) használatával

**Achieve the separation of C40–C130 hydrocarbons  
in 15 minutes by using a GC Racer and a  
60°C/min. temperature program rate.**

**Column:** 5m, 0.53mm ID, 0.10µm MXT®-1HT Sim Dist (cat.# 70100)  
**Sample:** Polywax® 1000 (cat.# 36227) in carbon disulfide  
**Inj.:** 0.2µL, on-column (track oven)  
**GC:** Agilent 5890 GC w/ GC Racer system  
**Carrier gas:** hydrogen, constant pressure @ 1.0 psi  
**Detector:** FID @ 430°C  
**Oven Temp.:** 40°C to 430° C @ 60°C/min.



# Polibrómozott difenil éterek kimutatása PCB háttérben gázkromatográffal összekötött (GC-MS) módszerrel

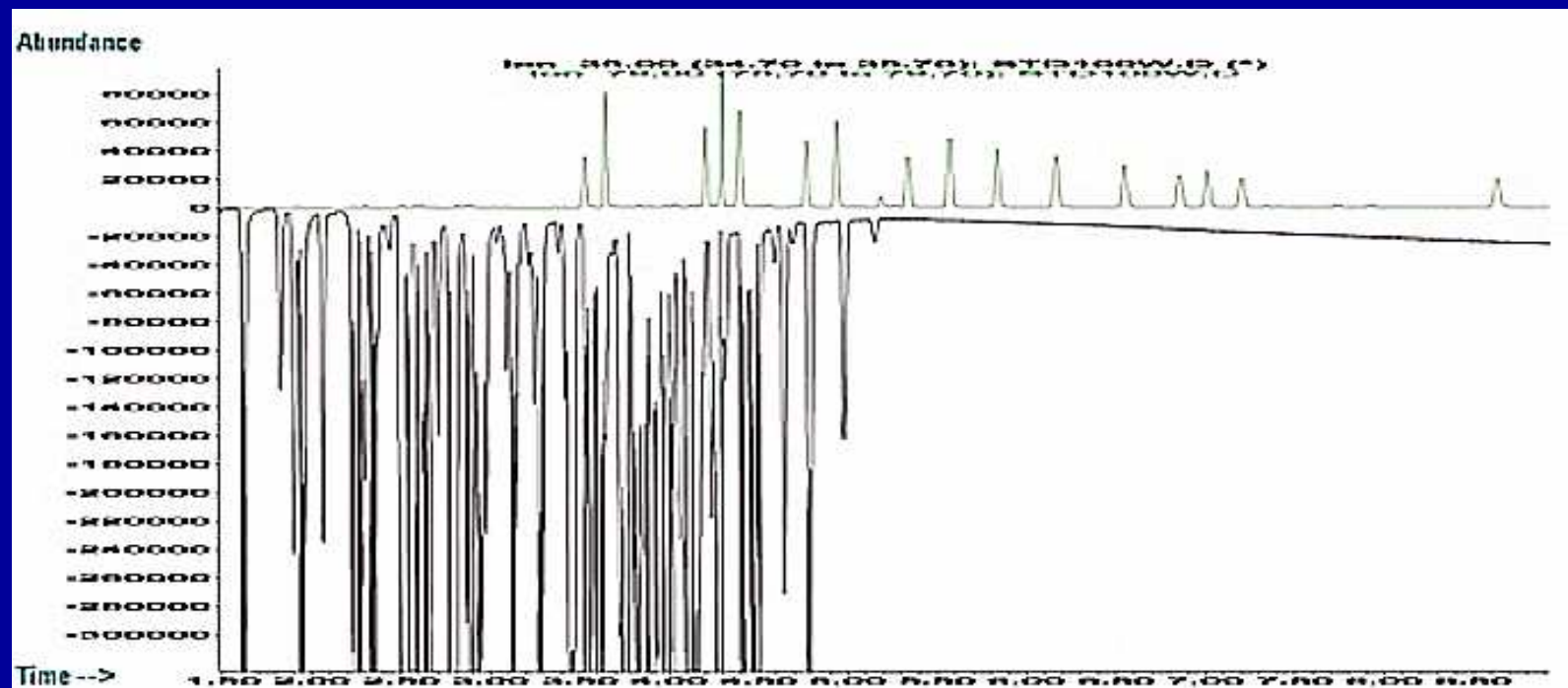
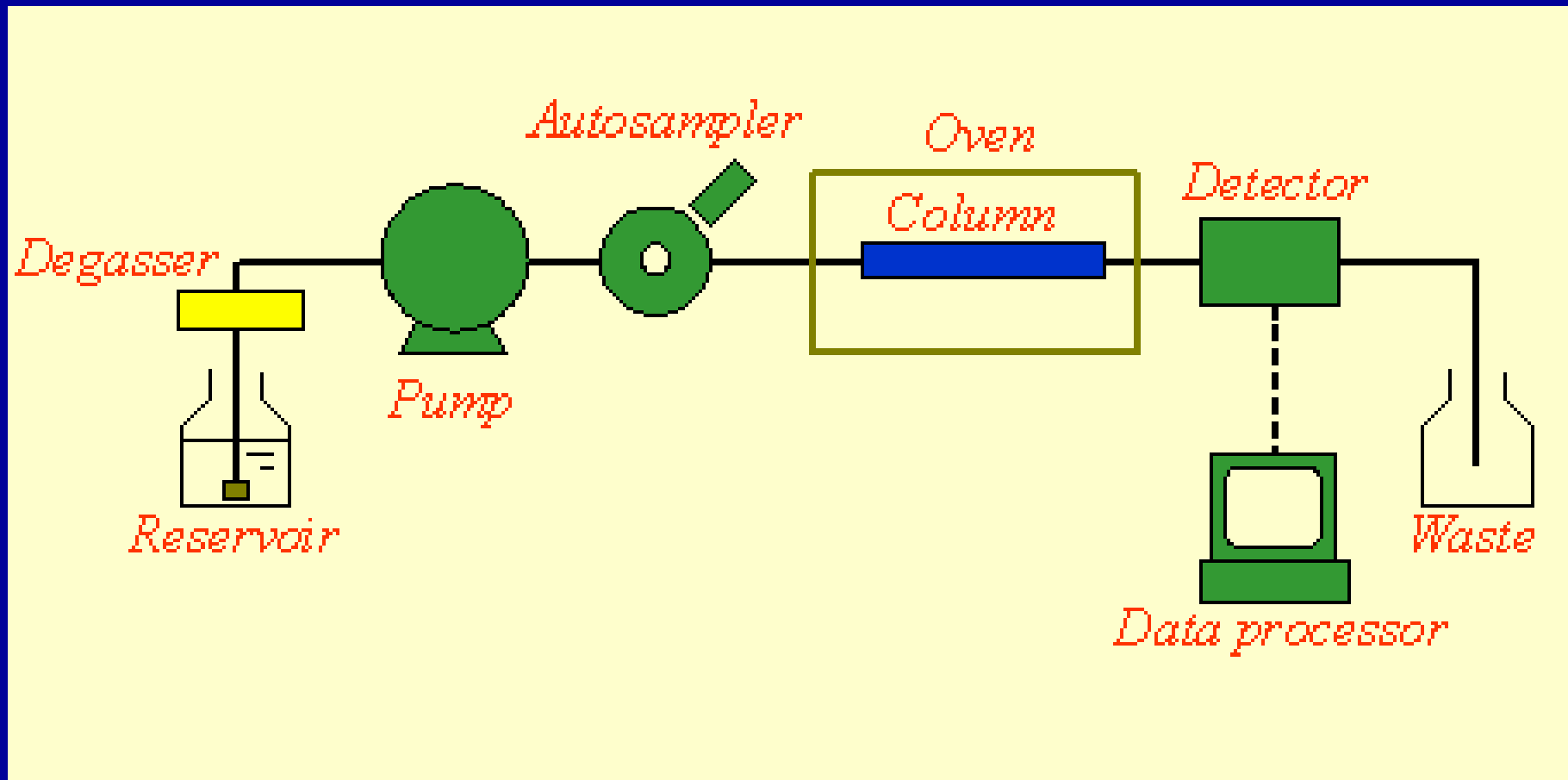


Figure 1. Extracted ion chromatogram, m/z 79 (Br) and 35 (Cl, inverted) of a mixture of PBDEs at 50 ppb each spiked into 500 ppm total PCB as Aroclors 1016 and 1260, total retention time < 10 minutes. Hydrogen carrier gas.

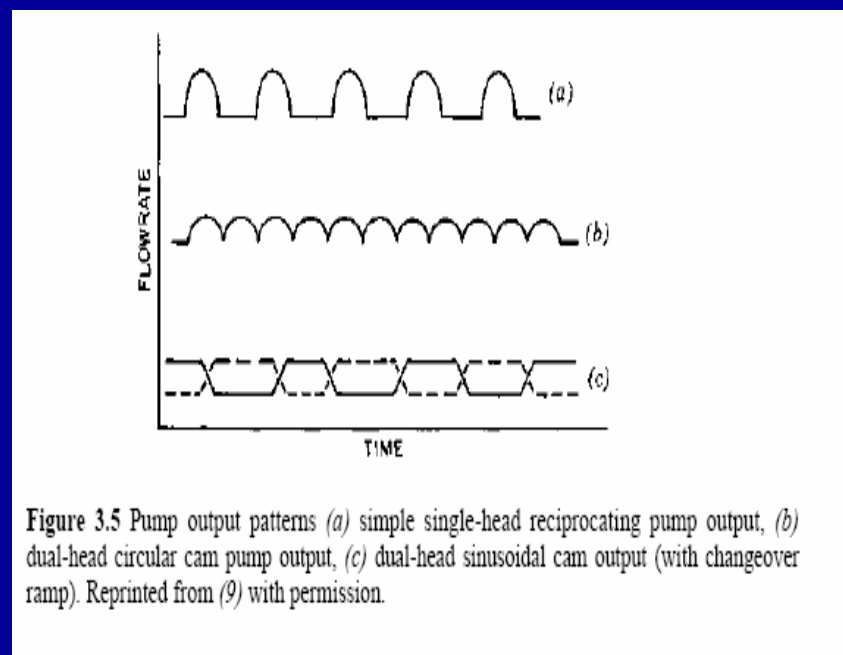
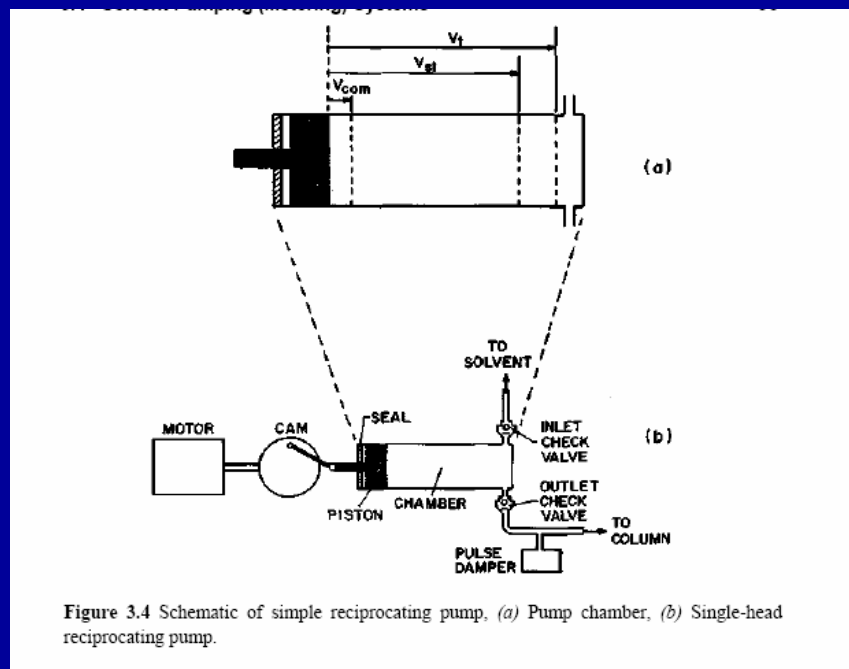
A monitorionok helyes megválasztása érzékeny,  
szelektív eljárást biztosít.

# Nagyhatékonyságú kromatográf (HPLC) vázlat



A gázmentesítés (degasser) fontos, hogy a pumpa folyadékot tudjon felszívni, és csökkenjen az alapvonal zaj (noise).

# Folyadékromatográf pumpája



A folyadékáram pulzálását, és evvel együtt a detektorzajt két pumpával csillapítják.

# Gradiens elúciós folyadékkromatográfia

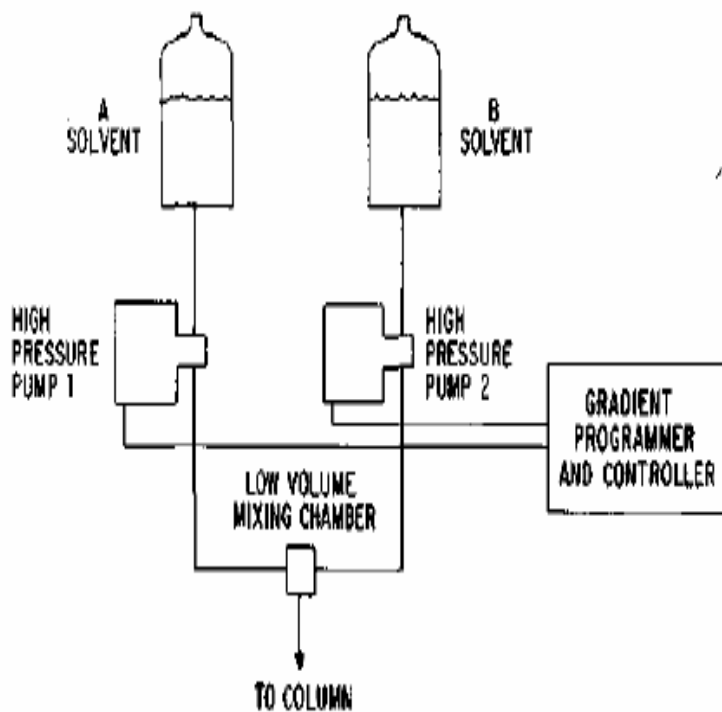


Figure 3.12 High-pressure gradient mixing with two programmed pumps.

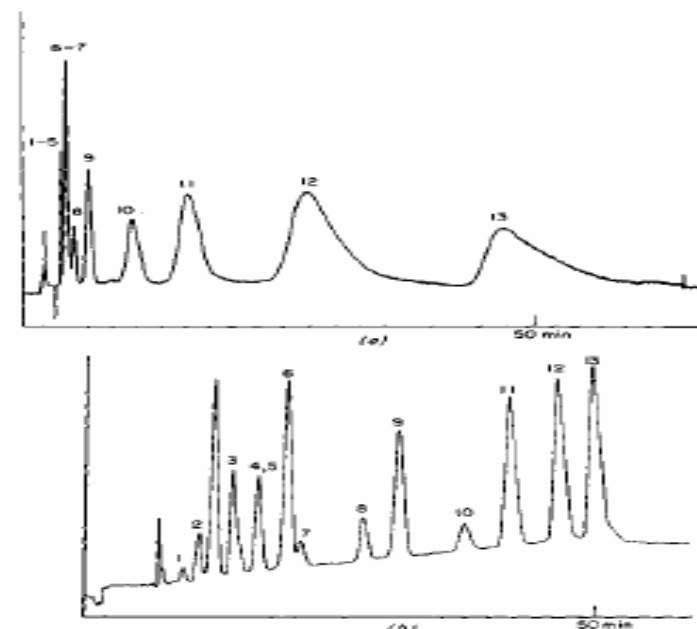
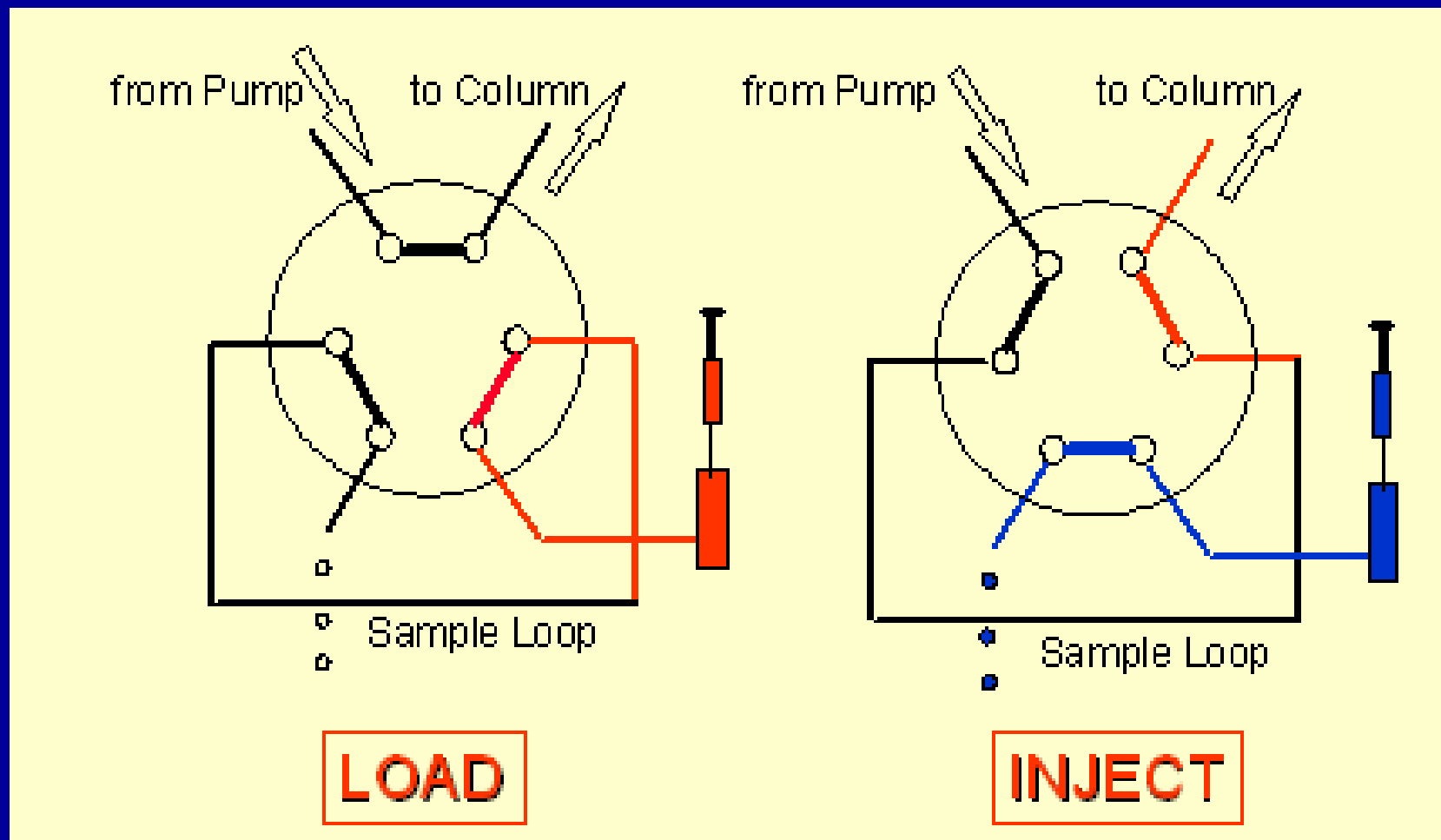


Figure 16.3 Separation of carboxylic acid mixture by (a) isocratic ion-exchange separation, (b) gradient elution, and (c) GE with steeper gradient. Bands are following acids: 1, o-toluic; 2, benzoic; 3, maleic; 4, phthalic; 5, fumaric; 6, terephthalic; 7, isophthalic; 8, 1,2,3-tricarboxybenzene; 9, 1,2,4-tricarboxybenzene; 10, 1,3,5-tricarboxybenzene; 11, 1,2,4,5-tetracarboxybenzene; 12, pentacarboxybenzene; 13, hexacarboxybenzene. Column, DuPont SAX Permaphase; mobile phase, 0.01 M borate buffer at pH 9.7 in water; temp., ambient; UV, 254 nm; 5- $\mu$ l sample, 1% each compound. (a) Mobile phase also contains 0.055 M NaNO<sub>2</sub>. (b) Mobile phase gradient from 0.01-0.1 M NaNO<sub>2</sub> at 2%/min. (c) Same at 5%/min. Reprinted from (9) with permission.

Folyadékkromatográfiában a mozgófázis összetételének változtatásával szabályozzuk a mozgófázis erősségét. A gradiens gyorsabb analíziseket és jobb kimutatást biztosít.



# Forgócsapos (rotary valve) injektálás HPLCben



A hurok (loop) pontos mennyiségű, áramlás megzavarása nélküli beinjektálást biztosít.

# On-line SPE-HPLC analízis elrendezés

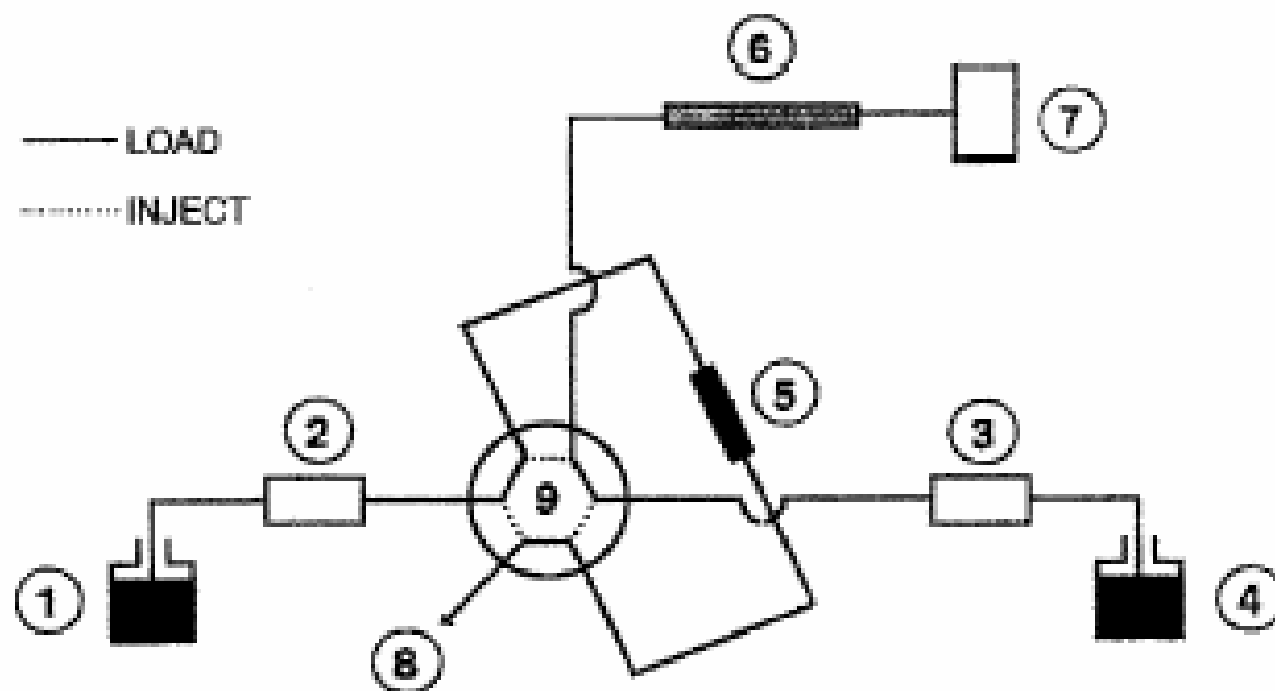
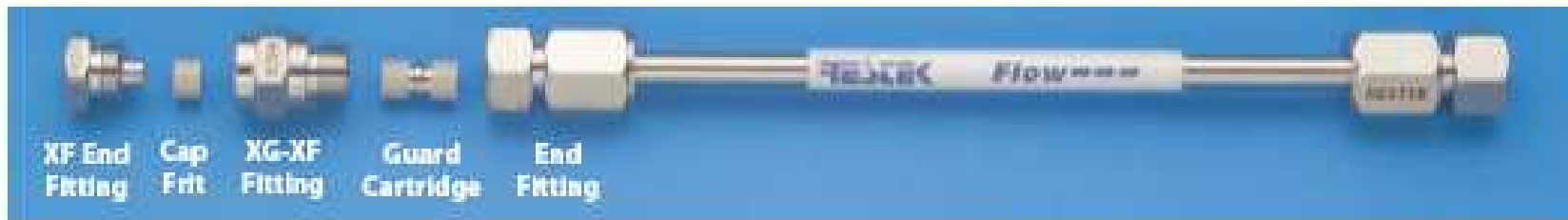


Fig. 6.1. Scheme of an on-line SPE-LC system: (1) water sample; (2) pump delivering sample; (3) mobile phase pump; (4) mobile phase; (5) SPE column; (6) analytical column; (7) detector; (8) waste.

A hurok szolgálhat minta-előkészítésre is. A nagyfokú automatizáltság, gyors jól reprodukálható analíziseket eredményez.

# Integrált előoszlop HPLCben



Column with Trident™ Integral Inlet Fitting (to order add "-700" to catalog number of column) and guard cartridge, XG-XF fitting, cap frit, and XF end fitting.



Remove the XF end fitting and install the guard cartridge in the end of the column.



Add the XG-XF fitting (order cat.#25026 for 10mm guard cartridges, cat.#25062 for 20mm guard cartridges).



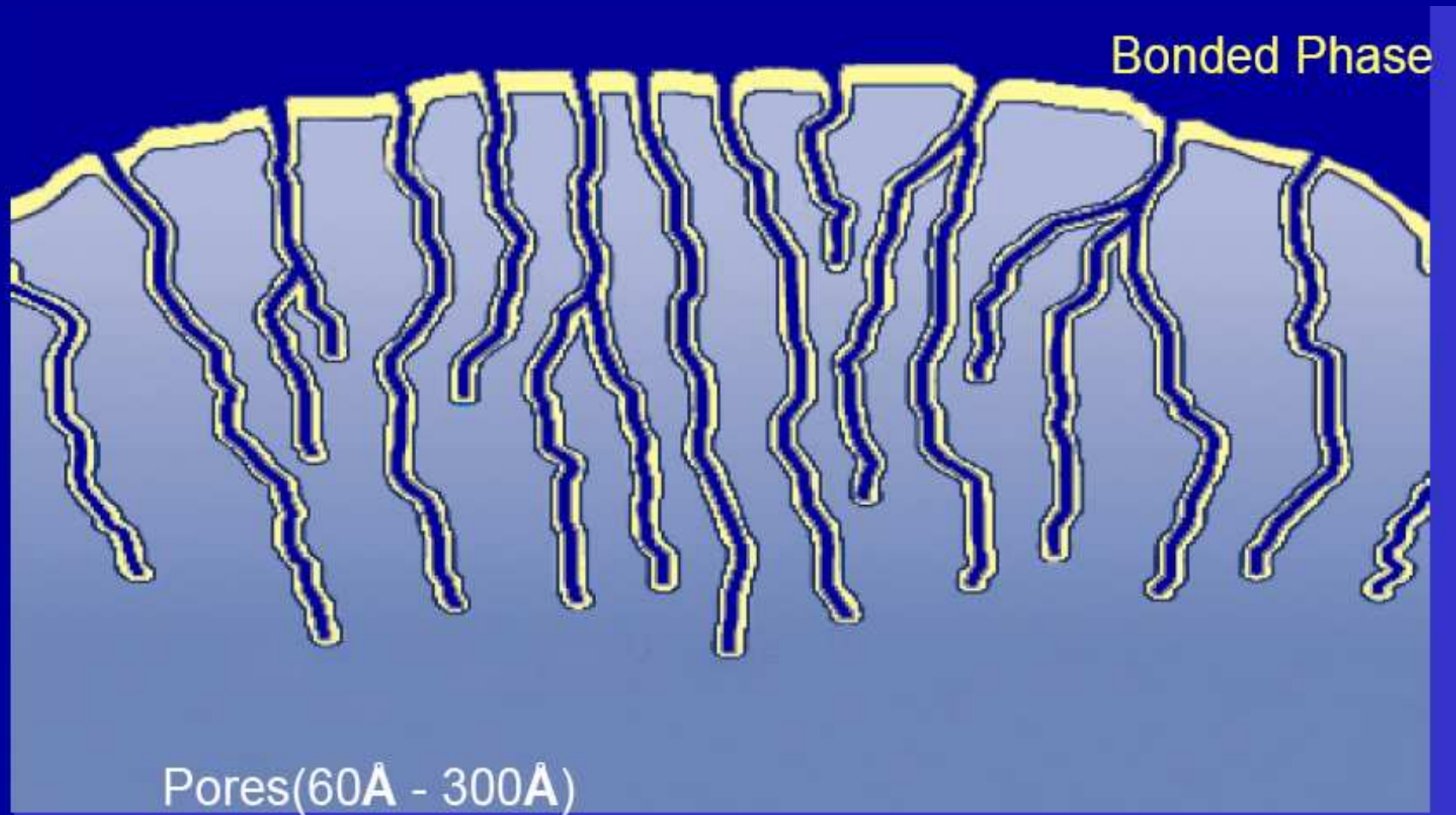
Re-install the XF end fitting with cap frit.



The cap frit can be easily replaced if it becomes contaminated/plugged.

Az előoszlop megvédi a fő oszlopot az elkoszolódástól, és a kioldódástól.

# Borított szilika szemcse szerkezete



## Javasolt pórusátmérő különböző molekulasúlyú mintákhoz

<u>Pore Size (Å)</u>	<u>MW* Range</u>
50	< 1000
100	< 3000
500	500 - 20,000
1000	1,000 - 40,000
10,000	4,000 - 400,000
100,000	40,000 - 4,000,000
1,000,000	400,000 - 40,000,000
Mixed	500 - 10,000,000

Nagyobb molekula súlyú anyag nagyobb pórusátmérőt igényel, hogy a lukba beleférjen.

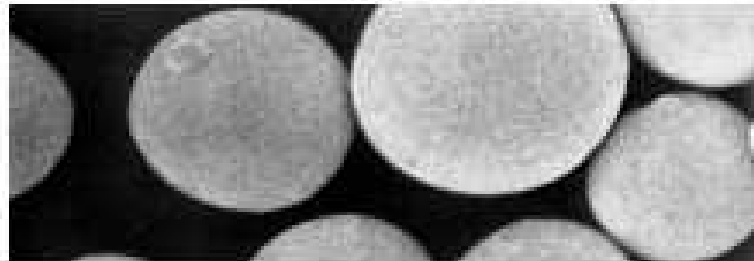
# Különböző HPLC töltetek összehasonlítása

LiChrosorb®



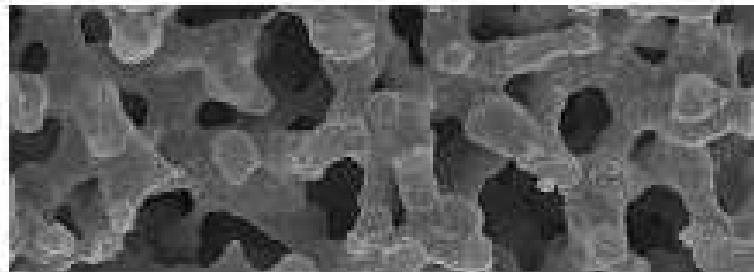
irregulär

LiChrospher®  
Superspher®  
Purospher®  
Purospher® STAR



spherisch

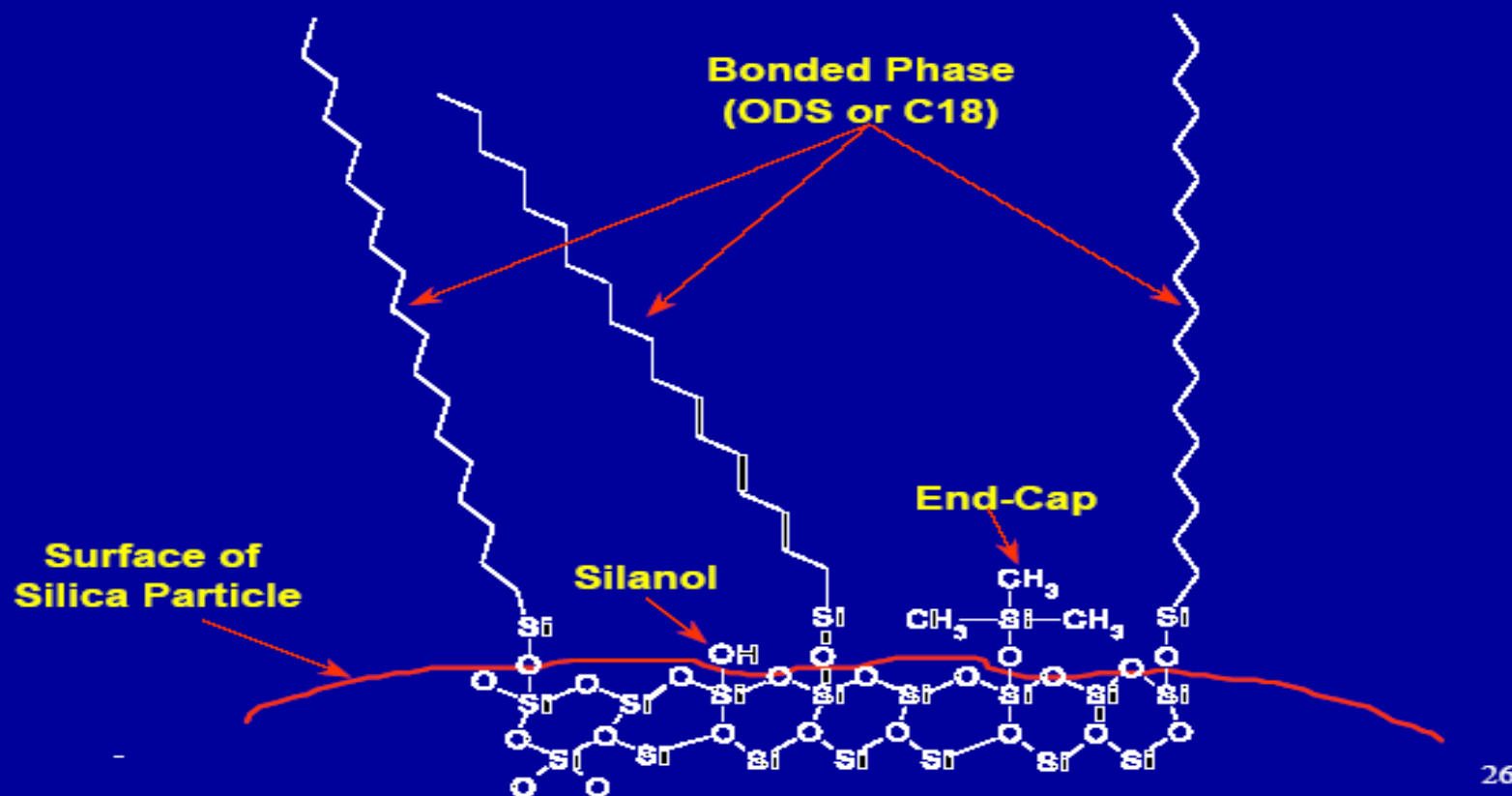
Chromolith®



monolithisch

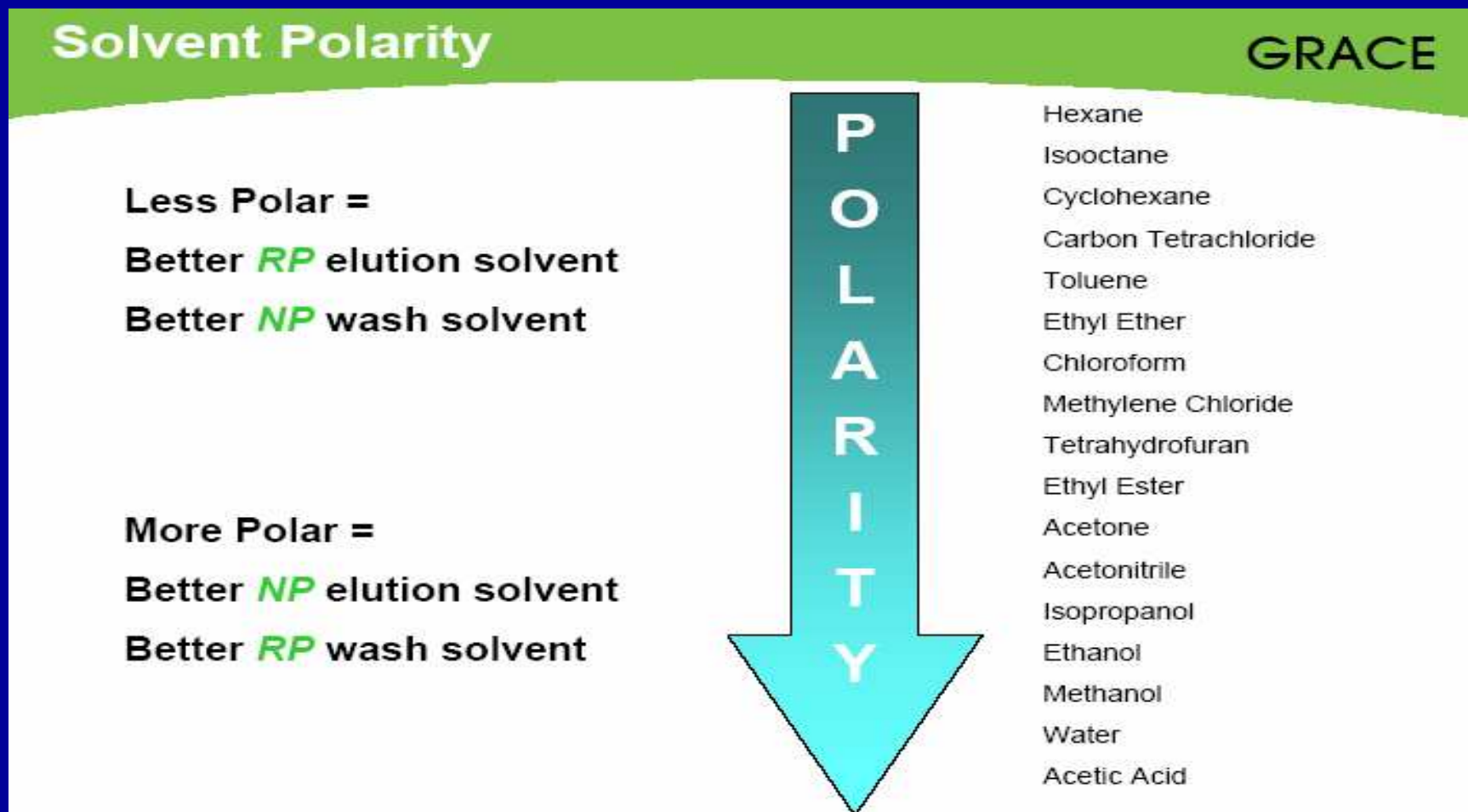
Előnyök: monolit > gömbalakú > szabálytalan

# A leggyakrabban használt C<sub>18</sub> HPLCs állófázis szerkezete



Apoláris anyagoknak nagyobb a retenciója.  
Mozgófázis poláris oldószer (víz, metanol, acetonitril).

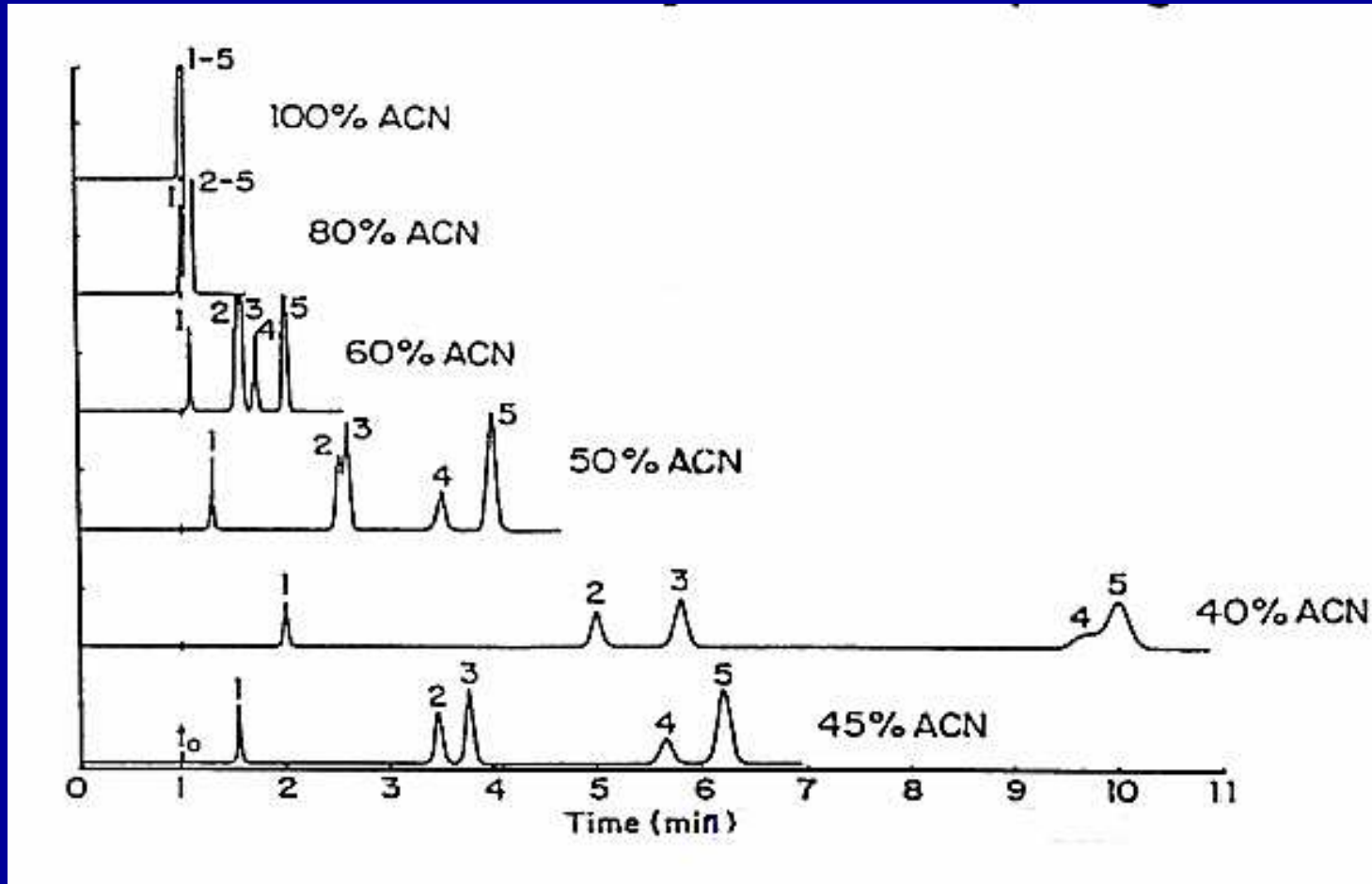
# Oldószerek polaritási sora



A polaritás összege lefelé növekszik a nyíl mentén.

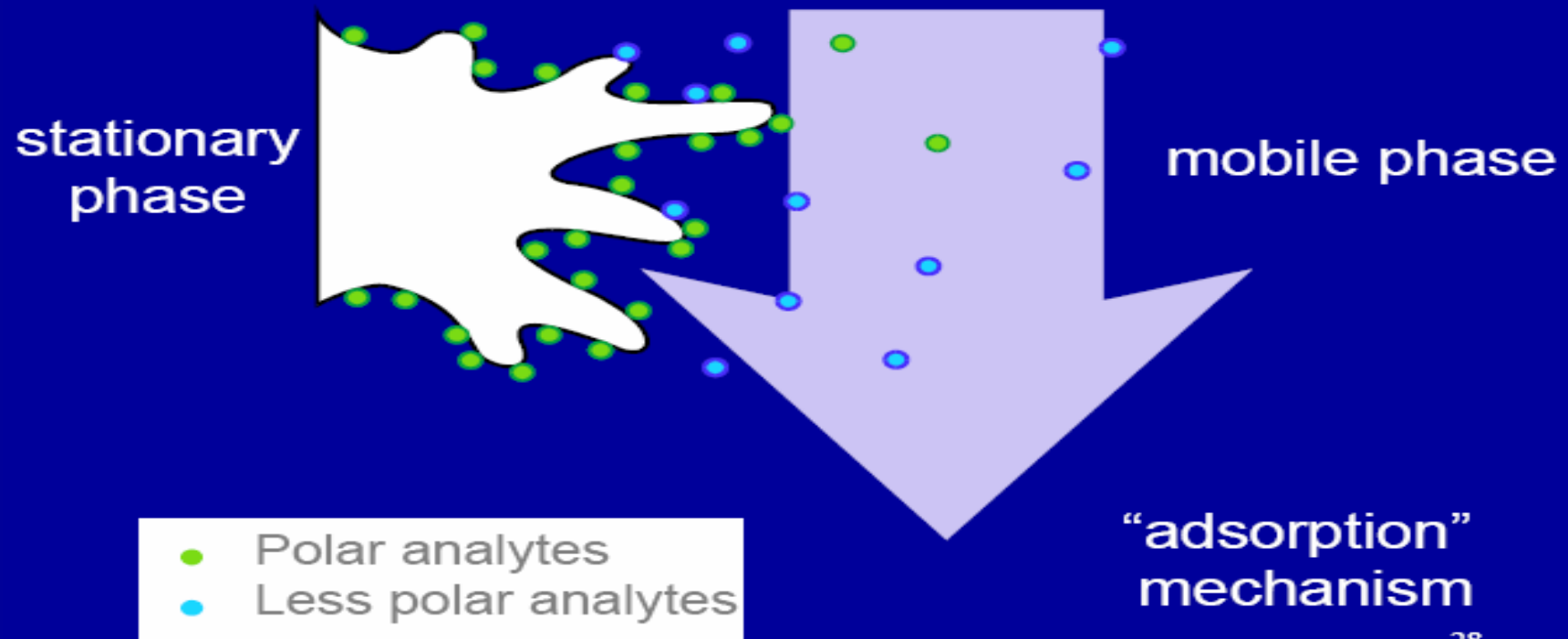


# Oldószererősség hatása fordított (C<sub>18</sub>) HPLCs állófázison



Az oldószererősség csökkenésével nő a retenció, felbontás és az analízis időszükséglete.

# A normál fázisú , szilika HPLCs állófázis működése



28

Polárosabb anyagoknak, nagyobb a retenciója. A mozgófázis apoláris oldószer (hexán, tetrahydrofuran, dichlorometán stb.).

# Karbamát rovarölő szerek HPLC-UV analízise speciálisan kifejlesztett állófázison

## Fast LC Separation of 11 Carbamates on Ultra Carbamate

### Peak List:

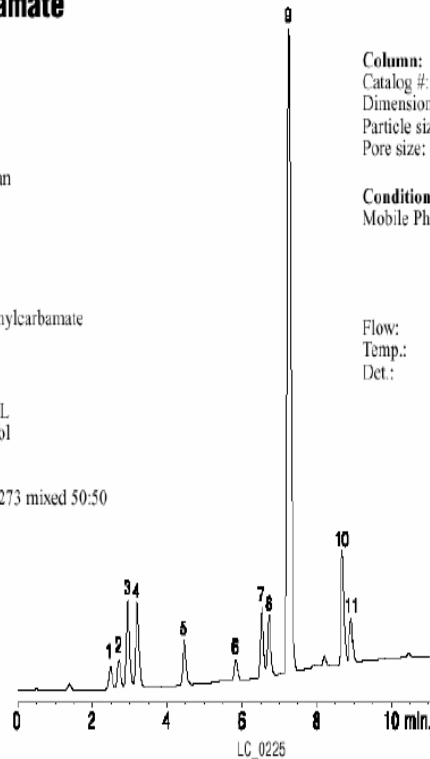
1. Aldicarb sulfone
2. Aldicarb sulfoxide
3. Oxamyl
4. Methomyl
5. 3-hydroxycarbofuran
6. Aldicarb
7. Propoxur
8. Carbofuran
9. Carbaryl
10. Methiocarb
11. 4-bromo-3,5-dimethylcarbamate

### Sample:

Inj.: 5µL  
Conc.: 50µg/mL  
Solvent: methanol

### Restek standards:

Catalog# 32274 and 32273 mixed 50:50

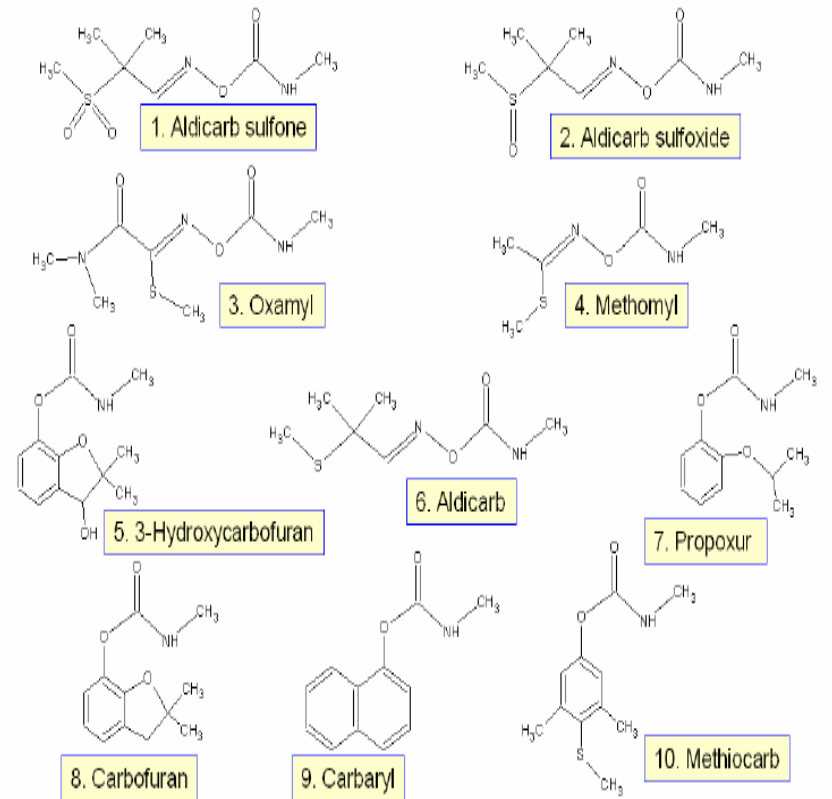


### Column: Ultra Carbamate

Catalog #: 9177355  
Dimensions: 50 x 4.6mm  
Particle size: 3µm  
Pore size: 100Å

### Conditions:

Mobile Phase: A: 90:10 water:methanol  
B: 90:10 methanol:acetonitrile  
Time (min): %B  
0 10  
10 90  
Flow: 1.5mL/min  
Temp.: 27°C  
Det.: UV @ 220nm



Az anyagok hőbomlásuk miatt nem alkalmasak  
GCs elemzésekre.

# Gélkromatográfia (méretkizárásos, size exclusion), alapja

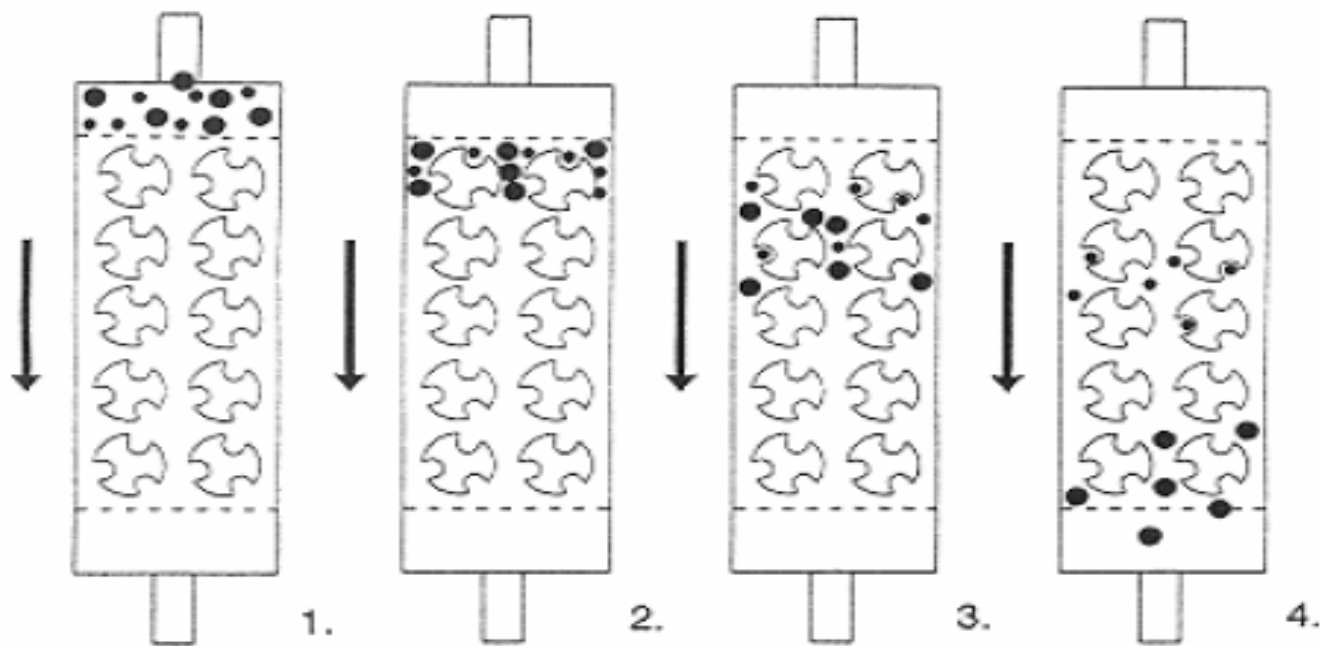
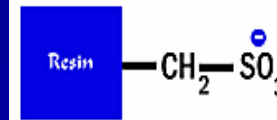
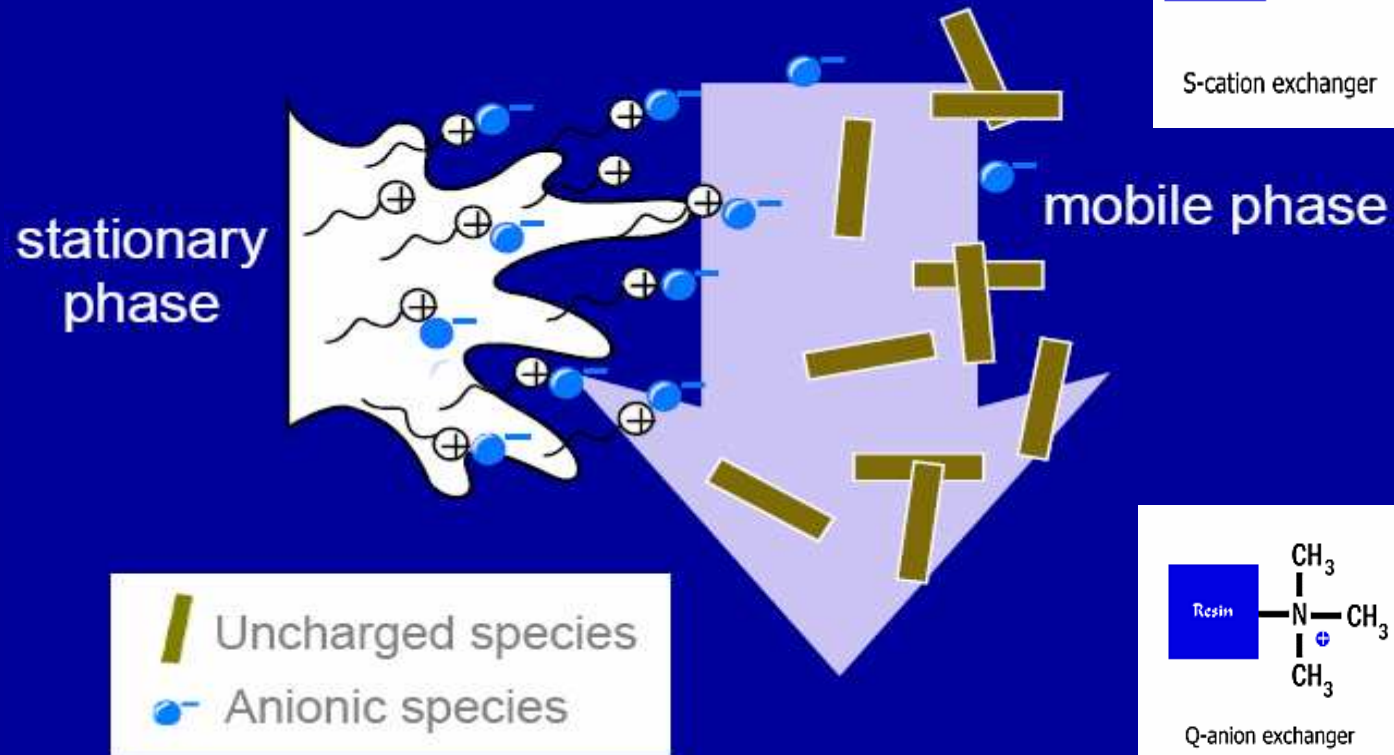


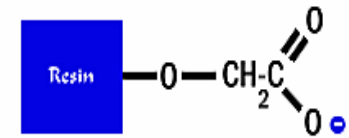
Figure 1.  
SEC separation of two macromolecular sizes: (1) sample mixture before entering the column packing; (2) sample mixture upon the head of the column; (3) size separation begins; (4) complete resolution.

A nagy molekulák mivel nem férnek be a kis csatornába kisebb kölcsönhatással bírnak, ezért hamarabb eluálódnak.

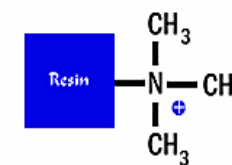
# Ioncserés kromatográfia elve



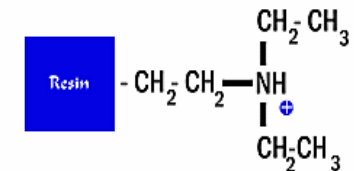
S-cation exchanger



CM-cation exchanger



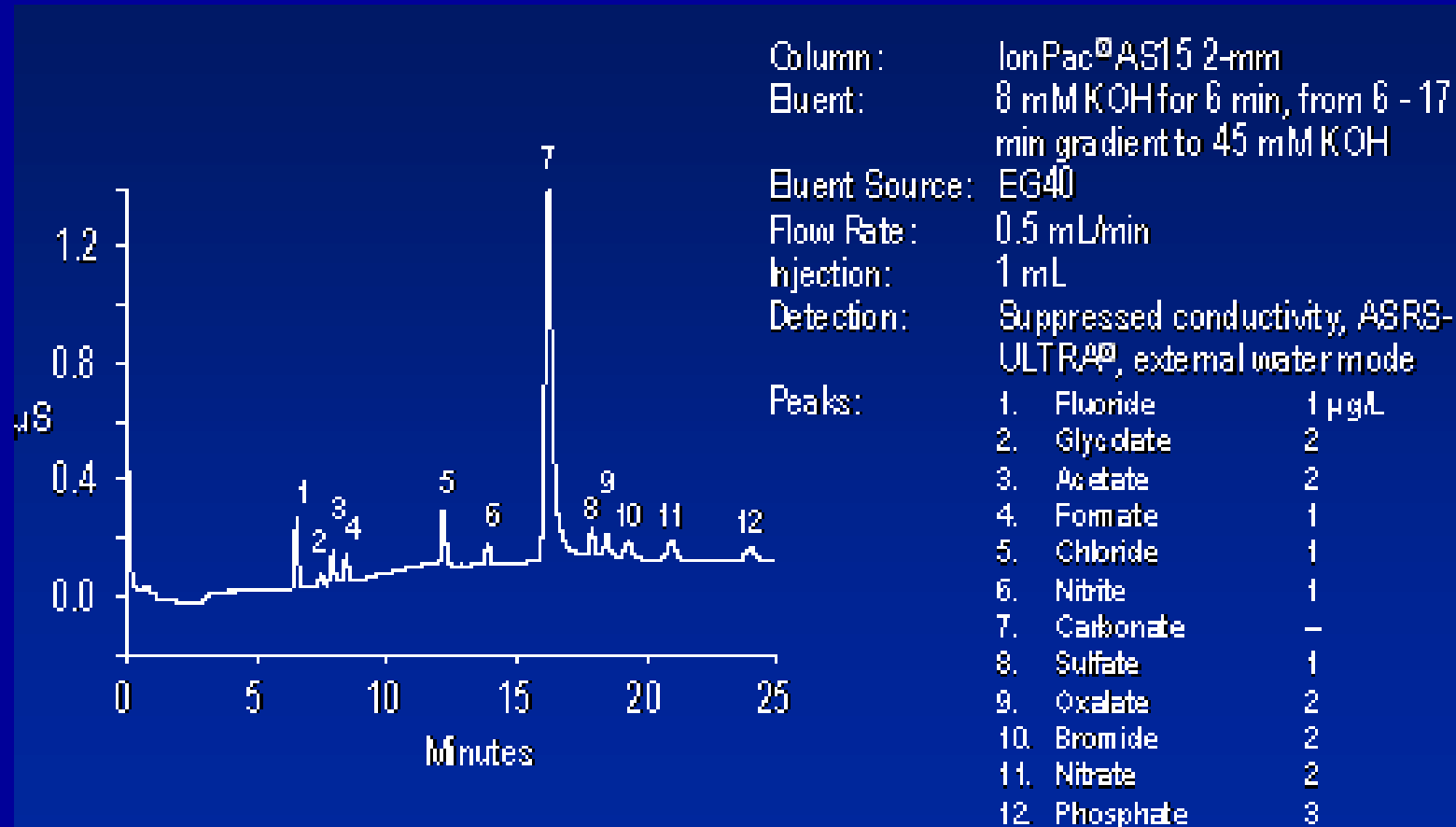
Q-anion exchanger



DEAE-anion exchanger

Az állófázis ionjai visszatartják az ellentétes töltésű ionokat.  
Az erősebb ionoknak ( $\text{Cl}^- > \text{CO}_3^{2-}$ ) nagyobb a retenciója.

# Anionok analízise ppb szinten ionkromatográffal szupresszor segítségével



A szupresszor az elválasztás után az ellenionokat eltávolítja, ezért az oldat vezetőképességében a minta ionjainak megnő a szerepe.

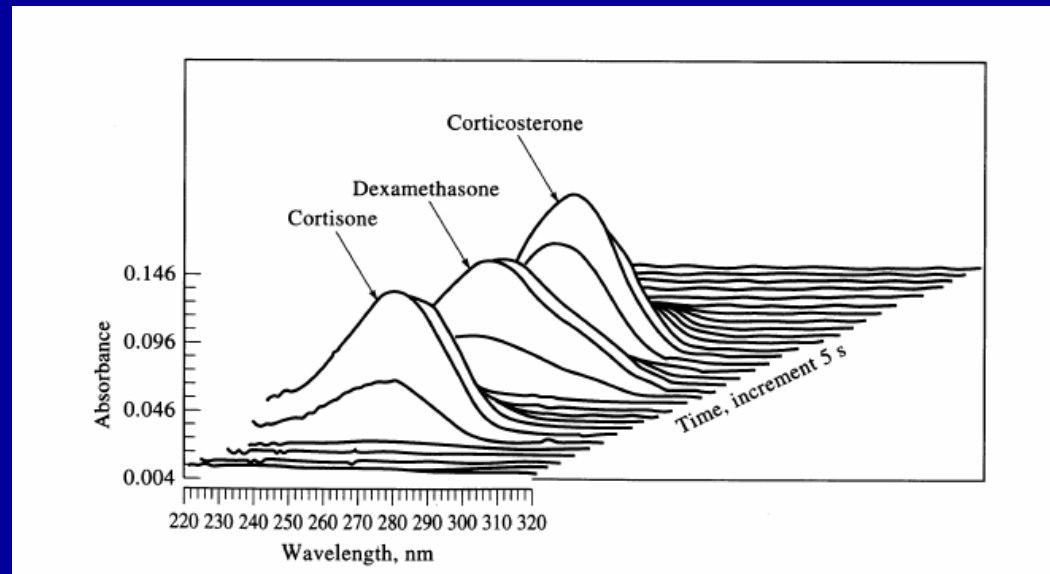
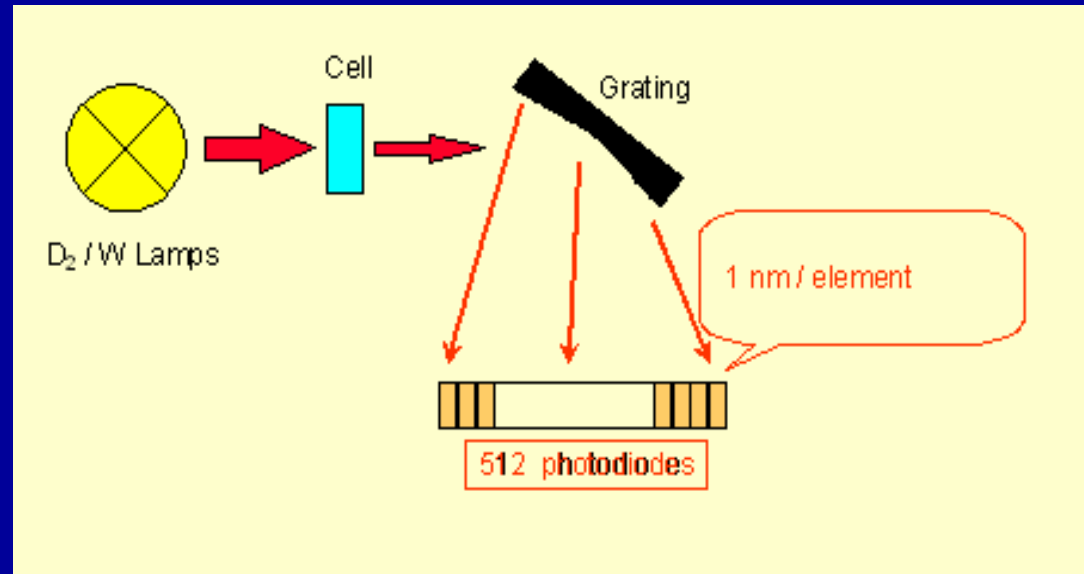
# Különböző detektorokkal elérhető kimutatási határ, és szelektivitásuk jellemzése

Elektrokémiai	Sz	■ EC	$10^{-12}$
Tömeg spektrométer	U	■ MS	$10^{-11}$
Fluoreszcens	Sz	■ FL	$10^{-11}$
Ultraibolya	Sz	■ UV	$10^{-10}$
Törésmutató	U	■ RI	$10^{-7}$
Fényszórás	U	■ ELS	$10^{-7}$

Sz, szelektív; U, univerzális

# Diodasoros (DAD) UV-VIS detektor vázlat

Az UV-VIS detektálás mérsékelten érzékeny, univerzális módszer.





# Karbamát peszticidek HPLC-MS analízise

Table II. Experimental conditions for the LC/MS analysis of carbamate compounds.

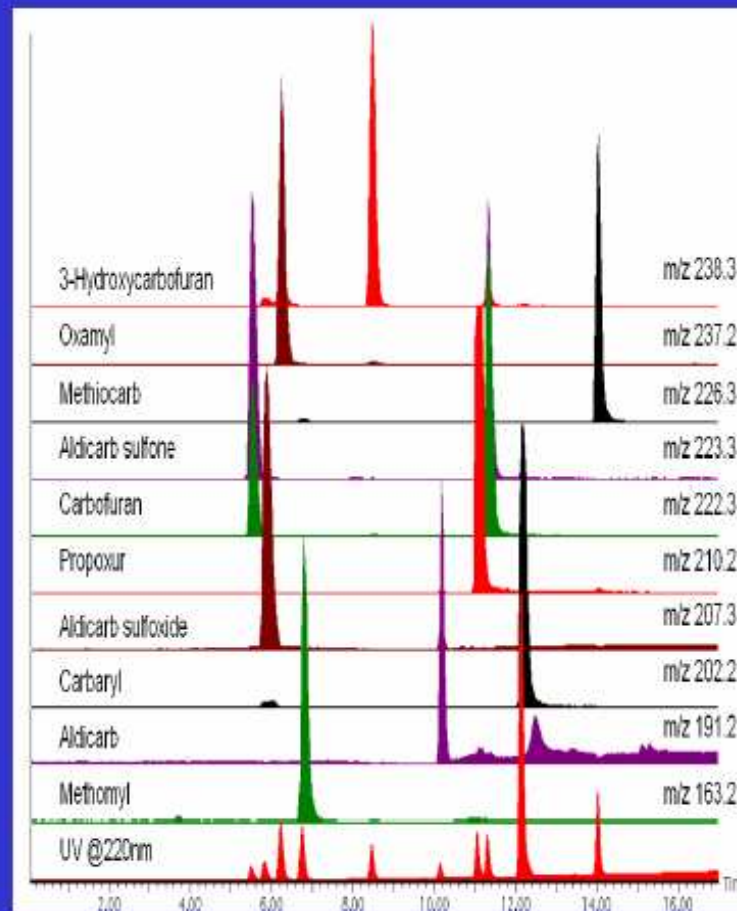
## HPLC Conditions

Column: Ultra Carbamate, 100 mm x 4.6 mm, 3  $\mu$ m  
 Mobile Phase A: 90% water:10% methanol with 10mM ammonium formate  
 Mobile Phase B: 10% acetonitrile:90% methanol with 10mM ammonium formate  
 Gradient: 90%A:10%B to 10%A:90%B from 0-15 minutes  
 Inj. Volume: 10  $\mu$ L  
 Flow Rate: 0.75 mL/min to UV detector, 0.25 mL/min to MSD

## MSD Conditions

		Compound	Ion	Cone V
Detector:	Micromass ZMD	1	223.3	25V
Mode:	ESI+	2	207.3	18V
Capillary V:	3.50	3	237.2*	10V
Extractor:	4.0	4	163.2	15V
Ion Energy:	0.4	5	238.3	15V
Multiplier:	650	6	191.2	8V
Source Temp:	100°C	7	210.2	18V
Desolv. Temp:	250°C	8	222.3	22V
Gas Flow:	490 L/hr.	9	202.2	18V
		10	226.3	19V

\*Ammonium adduct (all other are [M+H]<sup>+</sup> ions)



## Ajánlott irodalom

- Balla József: A gázkromatográfia analitikai alkalmazásai, Abigél Bt., Budapest, 1997.
- Fekete Jenő: Folyadékkromatográfia, BME jegyzet, Budapest, 2003.
- Gáspár Attila: Kapilláris zónaelektroforézis, DTE, Debrecen, 2000.