



DEBRECENI EGYETEM

Debreceni Egyetem

Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar

Élelmiszertudományi Intézet

Szerzők:

Prof. Dr. Kovács Béla

Debreceni Egyetem, Élelmiszertudományi Intézet

Prof. Dr. Csapó János

Debreceni Egyetem, Élelmiszertudományi Intézet

Az élelmiszervizsgálatok műszeres analitikai módszerei

Lektor:

Prof. Dr. Posta József

2015

ISBN 978-963-473-831-2

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014

Élelmiszerbiztonság és gasztronómia
vonatkozású egyetemi együttműködés, DE-
SZTE-EKF-NYME

SZÉCHENYI 2020



Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Az analitikai módszerek csoportosítása	10
3. Az analitikai módszerek teljesítményjellemzői	12
3.1. Szelektivitás, specifikusság	12
3.2. Zavartűrés	12
3.3. Méréstartomány	13
3.4. Linearitás	13
3.5. Érzékenység	14
3.6. Kimutatási határ	15
3.7. Meghatározási határ	16
3.8. Pontosság	18
3.9. Precizitás, megismételhetőség, reprodukálhatóság	18
4. Szervetlen komponensek vizsgálati módszerei	21
4.1. Kalibráció, standard addíció, belső standard	21
4.1.1. Kalibrációs módszer	21
4.1.2. Standard addíciós módszer	25
4.1.3. Belső standard módszer	26
4.1.4. Izotóphígítási eljárás	28
4.2. Az optikai spektroszkópiai módszerek csoportosítása	30
4.3. Ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometriai módszer	34
4.3.1. Elméleti háttér	34
4.3.2. A berendezés fő részei	44
4.3.3. A sugárforrás	44
4.3.4. Mintatartó (küvetta)	45
4.3.5. Optikai rendszer	46
4.3.6. Detektor	46
4.3.7. Az UV-VIS spektrofotométerek különböző típusai	47
4.4. Atomabszorpciós spektrometria	52
4.4.1. Az atomabszorpciós spektrometria elve	52
4.4.2. Az atomabszorpciós spektrométerek felépítése, működése	53
4.4.3. Fényforrás	54
4.4.4. Mintabetáplálás	56

4.4.5. Atomizálási módszerek	57
4.4.5.1. Láng mint atomizáló tér	58
4.4.5.2. Grafitkemence mint atomizáló tér	63
4.4.5.3. Az FAAS és a GF-AAS kimutatási határának összehasonlítása	65
4.4.6. Optikai rendszer	67
4.4.7. Detektor	72
4.4.8. Az AAS mérésben jelentkező zavaró hatások	72
4.4.9. A zavaró hatások kiküszöbölési módszerei	74
4.5. Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria	76
4.5.1. Az induktív csatolású plazma történeti áttekintése	76
4.5.2. Az ICP-OES mérés elvi alapjai	78
4.5.3. Az ICP-OES készülék felépítése	84
4.5.4. Az ICP-OES technikában alkalmazható mintabeviteli módszerek	86
4.5.4.1. Porlasztásos módszerek	86
4.5.4.2. Egyéb mintabeviteli módszerek	96
4.5.4.3. Porlasztókamrák	101
4.5.5. Optikai rendszerek	103
4.5.6. Detektorok	108
4.5.7. Zavaró hatások és kiküszöbölésük lehetőségei	108
4.6. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria	112
4.6.1. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria elve	112
4.6.2. Az ICP-MS készülék felépítése	113
4.6.3. A plazma, mint ionforrás	114
4.6.4. Analizátor típusok	116
4.6.5. Zavaró hatások és kiküszöbölésük lehetőségei	122
4.7. Az atomspektroszkópiai módszerek fontosabb jellemzői összehasonlítása	129
5. Elválasztási módszerek élelmiszerek analízisében	133
5.1. Kromatográfia	133
5.1.1. A kromatográfia elvi alapjai	133
5.1.1.1. A kromatográfiás módszerek csoportosítása	133
5.1.1.2. A kromatografálás mechanizmusa	134
5.1.1.3. Oszlopkromatográfia	135

5.1.5.2. Gél típusok és a dextranszét	161
5.1.5.3. A gélkromatográfiás eljárás	162
5.1.5.3.1. Gél oszlop-kromatográfia	163
5.1.5.3.2. Gél réteg-kromatográfia	163
5.1.5.4. A gélkromatográfia alkalmazása	164
5.1.5.4.1. Gél szűrés	164
5.1.5.4.2. Molekulatömeg meghatározás	164
5.1.6. Gázkromatográfia	165
5.1.6.1. A gázkromatográfia elmélete	166
5.1.6.2. Gázkromatográfiás készülék működése	166
5.1.6.2.1. A vivőgáz	166
5.1.6.2.2. Előmelegítő, minta adagoló	167
5.1.6.2.3. Oszlopok	168
5.1.6.2.4. Töltetek	168
5.1.6.2.5. Termosztát	169
5.1.6.2.6. Detektorok	170
5.1.6.2.7. Regisztráló berendezések	171
5.1.6.3. A gázkromatográfia néhány alkalmazása az élelmiszer analitikában	171
5.1.6.3.1. A zsír zsírsav-összetételének meghatározása gázkromatográfián	172
5.1.6.3.2. Az illósavak (illó zsírsavak) meghatározása gázkromatográfián	173
5.1.6.3.3. Antioxidánsok (BHT) meghatározása	175
5.1.6.3.4. Az aminosav-tartalom gázkromatográfiás meghatározása	177
5.1.7. Élelmiszerek aminosav-tartalmának, valamint a fehérje aminosav-összetételének meghatározása	180
5.1.7.1. A vizsgálati anyag előkészítése a meghatározás előtt	180
5.1.7.1.1. A minta hidrolízise	180
5.1.7.1.2. Deproteinizálás	188
5.1.7.2. Az aminosavak meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával	188

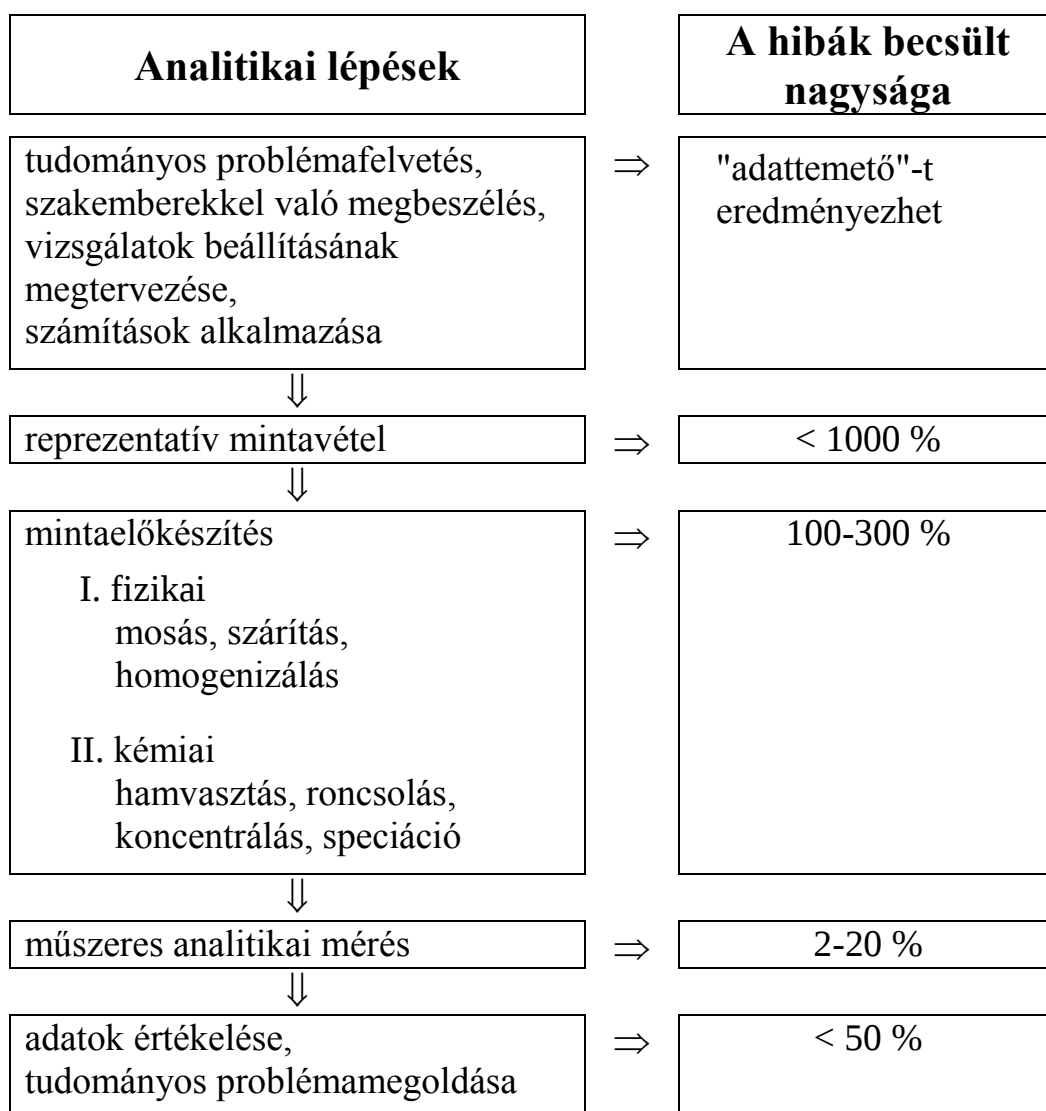
5.1.7.2.1. Az ioncsere mechanizmusa	188
5.1.7.2.2. A kromatografálás feltételei	190
5.1.7.3. Speciális kromatografálási technikák	197
5.1.7.4. Rövidített meghatározások néhány aminosav elemzésére	203
5.1.7.4.1. Gyors módszer a mezionin és a lizin meghatározására	203
5.1.7.4.2. Gyors módszer a cisztin meghatározására	204
5.1.7.5. A triptofántartalom meghatározása	204
5.1.7.5.1. Fehérjehidrolízis módszerek a triptofántartalom meghatározására	205
5.1.7.5.2. Triptofántartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával	208
5.1.7.5.3. Triptofántartalom meghatározása spektrofotometriával	209
5.1.7.5.4. A kéntartalmú aminosavak mennyiségének meghatározása	210
5.1.8. Az aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	212
5.1.8.1. Származékképzés	213
5.1.8.2. A fehérjealkotó aminosavak meghatározása oszlop előtti származékképzéssel	214
5.1.8.3. Származékképzés 9-fluorenil-metil-kloroformáttal (FMOC)	216
5.1.8.4. Származékképzés dabzil-kloriddal (DABS-Cl)	216
5.1.8.5. Származékképzés danzil-kloriddal (DNS-Cl)	217
5.1.8.6. Származékképzés fenil-izo-tiocianáttal (PITC)	217
5.1.8.7. Az aminosavak HPLC-s meghatározására alkalmazott származékképzési módszerek összehasonlítása	217
5.1.8.8. A D- és L-aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	218
5.1.8.8.1. A minimális racemizációval járó fehérjehidrolízis	219
5.1.8.8.2. A fehérjehidrolízis és a racemizáció	219

5.1.8.8.3. A D- és az L-aminosavak elválasztására és meghatározására kifejlesztett módszerek	221
5.1.9. Réteg- és papírkromatográfia	228
5.1.9.1. A rétegkromatográfia alapjai	228
5.1.9.2. A rétegkromatográfia alkalmazása élelmiszerfehérjék vizsgálatára	231
5.1.9.3. Az aminosavak rétegkromatográfiája	233
5.1.9.3.1. Az aminosavak elválasztása szervesetlen alapanyagú rétegen	233
5.1.9.3.2. Az aminosavak elválasztása cellulózártétegen	233
5.1.9.3.3. Aminosavak elválasztása ioncserélő rétegen	234
5.1.9.3.4. Az aminosavak kimutatása a rétegkromatogramokon	234
5.1.9.3.5. Az aminosavak félkvantitatív és mennyiségi meghatározása	235
5.1.9.4. Papírkromatográfia	236
5.1.9.4.1. Minőségi és mennyiségi meghatározás	239
5.2. Elektroforézis és izoelektromos fókuszálás	240
5.2.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása	240
5.2.2. A poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)	244
5.2.2.1. A fehérjeminták előkészítése, géltre vitele és az elektroforézis folyamata	246
5.2.2.2. Speciális alkalmazások az élelmiszerfehérje kutatásban	247
5.2.3. Különféle fehérjék szétválasztása és meghatározása izoelektromos fókuszálással	249

1. Bevezetés

Az élelmiszer analitika célja olyan információ-szerzés, mely folyamat során az élelmiszer vagy élelmiszer alapanyag minta összetételéről ad információt. Ezt az információ-szerzést különböző szinteken lehetséges kivitelezni. Ezek a szintek a következők lehetnek: elemi, molekuláris és szerkezeti. A kémiai elemek (elemi) szintje azt jelenti, hogy választ adhatunk arra a kérdésre, hogy az adott mintában milyen elemek vannak (minőségi elemzés) és azokból mennyi van (mennyiségi elemzés) az élelmiszerben. Ennek a feladatnak a kivitelezése során szerencsére teljes bizonyossággal ismerjük azt a kört, melyre a vizsgálat elvégezhető. A kémiai elemeket vizsgálva tudjuk, hogy a Földön stabilisan csak 89 kémiai elem van, valamint összesen 118 ismert elem létezik. A molekuláris szinten viszont arra a kérdésre keressük a választ, hogy a mintát felépítő elemek, milyen vegyületeket, kristályformákat alakítanak ki. Ebben az esetben viszont sem elvileg, sem gyakorlatilag nem tudjuk meghatározni a vizsgálandó komponensek körét. Ennél a feladatnál a lehetőségek száma szinte végtelen, jelenleg mintegy 12 millió vegyület ismert. Ezekből kb. 1,5 millió a szerves, a többi szervetlen vegyület. A szerkezet vizsgálata jelentheti a molekulák rendeződését is (pl. az aminosavak sorrendjének meghatározása egy fehérjében). Az analitikai feladat nehézsége a különböző szinteken nem egyforma. Gondoljunk például arra, hogy egy elemet, amely gyakorlatilag nem bomolhat el, általában könnyebb meghatározni, mint egy molekulát vagy szerkezetet, mivel az elemzés kivitelezése során, a mintaelőkészítő lépésekben nehéz biztosítani a szerkezet és a molekuláris összetétel állandóságát. Míg a kémiai elemek mennyiségének változása csak veszteség vagy szennyezés esetén léphet fel, addig a szerkezeti és a molekuláris átalakulások sokkal könnyebben következhetnek be. Amíg a szerves vegyületek változatos világának alapját csupán hat elem (C, H, N, O, S, P) képviseli, addig ezen változatos vegyületek esetén elemi szinten csupán hat elem meghatározását jelenti. A gyakorlatban szerencsére általában rutin elemzések megoldása az analitikai feladatok célja. Sok esetben tehetünk olyan egyszerűsítést, mely többé-kevésbé szerves komponensek vizsgálatára csoportosítja az elvégzendő analitikai feladatot. Az előbbi kvalitatív (minőségi) megfontolások mellett a kvantitatív (mennyiségi) viszonyokat is figyelembe kell vennünk, mert ezen ismeretek birtokában tudjuk felelősséggel kiválasztani a legalkalmasabb mintaelőkészítő és mérési módszereket az analitikai feladatok kivitelezéséhez. Amennyiben ezeket az

információkat nem ismerjük, akkor lépésről-lépésre, elővizsgálatok elvégzésével tudunk eljutni a szükséges adatok megszerzéséhez, amely egyrészt többlet költséget, másrészt több mérési időt jelent. Természetesen meg kell említenünk, hogy a fenti információ-szerzési folyamatot csak abban az esetben tudjuk megfelelő pontossággal és precizitással elvégezni, amennyiben a mintavételünket megfelelő reprezentativitás jellemzi. Az 1. ábra azt mutatja, hogy milyen nagyságú hibát tudunk elkövetni abban az esetben, ha az analitikai vizsgálat valamelyik lépését nem kielégítően végezzük. Látható, hogyha a reprezentatív mintavételt, vagy a mintaelőkészítést nem megfelelő módon végezzük, abban az esetben már a műszeres analitikai méréssel nem javíthatunk a mérési eredmények pontosságán, vagy precizitásán.



1. ábra A multielemes kémiai analízis egyszerűsített folyamatábrája

(Markert, 1992)

Az 1. ábrából az is látható, hogy a műszeres analitikai mérés hibája a legkisebb a mérési folyamat során, ebben a jegyzetben viszont éppen ennek a pontnak a részletezését vállaltuk az élelmiszer vagy élelmiszer alapanyag minták vizsgálatához. Ezenkívül azt is meg kell említenünk, hogy ebben a jegyzetben, a gyakorlati jelentőségét tekintve, csupán a fontosabb rutin módszerek tárgyalására van lehetőségünk kitérni.

2. Az analitikai módszerek csoportosítása

Az alkalmazott analitikai módszer esetén első körben azt kell eldöntenünk, hogy klasszikus vagy műszeres analitikai módszert szeretnénk alkalmazni. A klasszikus analitikai módszerek, más néven a nedves-kémiai módszerek, a műszeres analitikai módszereket időben közel egy évszázaddal vagy még többel előzték meg.

Klasszikus analitikai módszerek

Az analitikai kémia korai időszakában, a legtöbb elemzést a minta analizálandó komponenseinek (analitoknak) az elválasztásával végezték, mely során csapadékképződést, extrakciót vagy desztillációt alkalmaztak. Az elválasztott komponenseket ezután, a kvalitatív elemzések kivitelezéséhez, valamilyen egyéb reagenssel kezelték, amely segítségével olyan kémiai reakciót alkalmaztak, mely vagy színes vegyületet eredményez, vagy a forráspontját vagy az olvadáspontját, vagy éppen azok oldhatóságát változtatja meg, továbbá olyan reakciókat is alkalmaztak, melyek különbözőképpen érzékszervekkel (pl. szag alapján) azonosítható gázokat érzékelhető gázokat eredményeznek, vagy éppen azok optikai sajátságát, vagy forgatóképességét tudják megváltoztatni. Az analizálandó komponensek kvantitatív elemzéséhez (relatív vagy abszolút koncentrációjának a meghatározásához), amennyiben klasszikus analitikai módszerrel szeretnénk megelemezni, úgy gravimetriás (tömegszerinti) vagy térfogatos (térfogatszerinti) elemzési módszert alkalmazhatunk. A gravimetriás méréseknél, az adott minta analizálandó komponense koncentrációjának meghatározását, a vizsgálandó komponens tömegváltozására vagy az adott komponenssel képzett csapadék tömegének mérésére vezetjük vissza. A térfogatos, más néven titrimetriás eljárások esetén, az analizálandó komponenst (analitot) oldat fázisban reagáltatjuk a mérőoldatban lévő reagenssel és a mintában lévő komponens összes mennyiségével való reakció után a mérőoldat fogyásából (sztöchiometriai mennyiségével arányos értékből) számoljuk ki a koncentrációt. Ezeket a klasszikus analitikai módszereket mind a vizsgálandó komponensek elválasztására, mind azok meghatározására egyaránt, még a mai napig használják számos laboratóriumban. E módszerek általános alkalmazása azonban egyre inkább csökken és az egyre fejlettebb, egyre kényelmesebben alkalmazható műszeres analitikai módszerek fokozatosan kiszorítják azokat.

Műszeres analitikai módszerek

A huszadik század elején, a tudósok egyre inkább elkezdték kihasználni a különböző, a mérendő komponensek főként fizikai tulajdonságaiban rejlő lehetőségeket, amelyekkel egyre fejlettebb műszeres analitikai módszereket dolgoztak ki és ezek segítségével számos, a klasszikus módszerek analitikai problémájára találtak sikeres megoldásokat. Ilyen fizikai tulajdonságok például, melyeket a mennyiségi analízisekre kezdtek használni, a vezetőképesség, az elektród potenciál, a fényabszorpció vagy a fényemisszió, a fluoreszcencia és a tömeg-töltés arány. Továbbá, nagyon hatékony kromatográfiás és elektroforetikus technikákkal kezdték helyettesíteni a desztillációs, az extrakciós és a csapadékképzésen alapuló, nagyon komplex mátrixszal rendelkező élelmiszer és élelmiszer alapanyag minták, analizálandó komponensei keverékének, minőségi vagy mennyiségi meghatározását megelőző elválasztását. A fentiekben megfogalmazott új módszereket, melyek a különböző komponensek elválasztására és meghatározására egyaránt alkalmasak, összefoglaló néven műszeres analitikai módszereknek nevezzük. Meg kell említeni még, hogy az utóbbi időben a számítógép- és az elektronikai-ipar nagyarányú fejlődése nagymértékben hozzájárul a modern műszeres analitikai módszerek jelentős fejlődéséhez, elterjedéséhez.

3. Az analitikai módszerek teljesítményjellemzői

Az analitikai módszerek teljesítményjellemzői közül a legfontosabbak a szelektivitás, specifikusság, a zavartűrés, a méréstartomány, a linearitás, az érzékenység, a kimutatási határ, a meghatározási határ, a pontosság és a precizitás.

3.1. Szelektivitás és specifikusság

Egy analitikai módszer szelektivitása, amely kvalitatív fogalom, azt jelenti, hogy az analitikai módszer milyen mértékben képes az adott komponens meghatározására, a mintamátrixban található egyéb zavaró alkotók jelenlétében. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy akkor szelektív egy módszer, ha a mért jel többnyire az analizálandó komponensből származik és a mintamátrix egyéb komponensei csak kisebb mértékben járulnak hozzá a mért válaszjelhez. Abban az esetben, ha az analitikai mérés nem megfelelően szelektív, úgy az alkalmazott mintaelőkészítő módszerrel lehetséges a mintamátrix zavaró hatását csökkenteni és szelektívebbé tenni. Az ásványvizek összes sótartalom mérésére alkalmazott vezetőképesség mérés például nem nevezhető közel sem szelektívnek, viszont egy atomspektrometriás (pl. atomabszorpciós spektrométer) mérés viszonylag jó szelektivitásúnak nevezhető.

Azt a módszert, amely egy meghatározandó komponensre, vagy a komponensek egy csoportjára tökéletesen szelektív, specifikusnak nevezzük. Ebben az esetben a szelektivitásnak egy ideálisan szélsőséges esetével van dolgunk, ezt nevezzük specifikusságnak. Mivel a gyakorlatban a mintamátrix kisebb-nagyobb mértékben mindig befolyásolja a mérendő komponens válaszjelét, így kijelenthetjük, hogy teljesen specifikus analitikai módszer nem létezik.

3.2. Zavartűrés

Az analitikai módszernek az egyik legfontosabb sajátossága a zavartűrés, más néven az eszköz- és környezetállósága.

Az analitikai módszer zavartűrését (eszközállóságát) úgy állapítjuk meg, hogy szándékosan megváltoztatjuk a mérés körülményeit és számítjuk a pontosságot és a

precizitást. Majd ezek után meghatározzuk az egyes paraméterek azon alkalmazhatósági tartományait, amelyeknél a pontosság és a precizitás gyakorlatilag változatlan.

Az analitikai módszer zavartűrését (környezetállóságát) úgy határozzuk meg, hogy a vizsgált módszert használjuk több laboratóriumban, ahol kisebb-nagyobb mértékben eltérő mérési körülményeket alkalmazunk (pl. a vizsgálatot végző eltérő személy, eszköz, hőmérséklet stb.), majd meghatározzuk a mérési eredmény reprodukálhatóságát, (lásd később) szórását. A szórás értékéből következtethetünk arra, hogy a vizsgált analitikai módszer zavartűrése (környezetállósága) megfelelő-e.

3.3. Méréstartomány

Az analitikai módszer méréstartománya, a mérendő komponens azon koncentráció tartománya, amely zárt intervallumban az adott komponens kielégítő (előírásokban rögzített) pontossággal és precizitással elemezhető. A módszer méréstartományát a mérendő minták komponensei várható koncentrációja alapján kell meghatároznunk, azaz úgy kell meghatároznunk a kalibrációs tartományt, hogy az alkalmazott kalibrációs pontok fogják át, fedjék le a mért minták koncentrációját (a kalibrációs módszer részletezését lásd a későbbiekben).

3.4. Linearitás

A kalibrációs görbe linearitásán azt értjük, hogy a koncentráció és az analitikai válaszjel között, az adott koncentrációtartományban, az összefüggés egyenessel közelíthető. Ezt a koncentrációtartományt a mérőgörbe ún. lineáris tartományának nevezzük. A lineáris méréstartományt standard minták elemzésével határozzuk meg. A koncentráció-válaszjel adatpárookra, a legkisebb négyzetek módszerével számítjuk az illesztett kalibrációs egyenes egyenletét (1).

$$y=m \cdot x+b \quad (1)$$

ahol

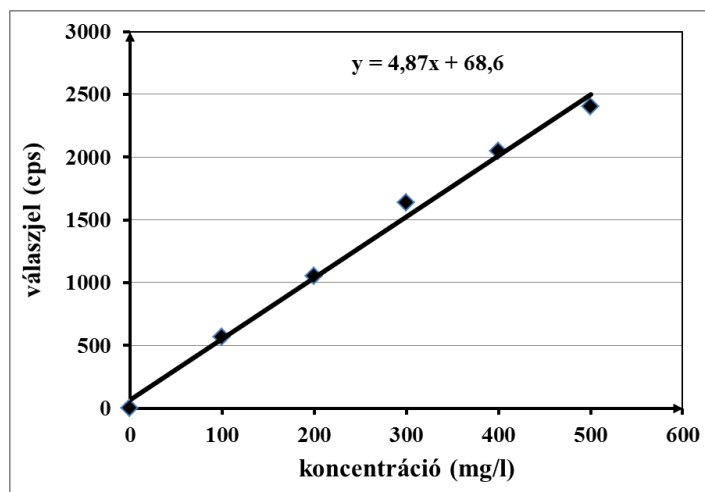
y: válaszjel

m: meredekség

x: koncentráció

b: tengelymetszet

A 2. ábrán az $m=4,87$ és a $b=68,6$.



2. ábra Kalibrációs egyenes illesztése

(megjegyzés az ábrához: a válaszjel mértékegységének jelentése: cps=counts per second, azaz beütésszám per másodperc)

Végül meghatározzuk, hogy mely koncentrációtartományban tekintjük lineárisnak a kalibrációt. Általában abban a koncentrációtartományban tekintjük lineárisnak az összefüggést, ahol az illesztett és mért értékek eltérése nem nagyobb mint 10%. A lineáris méréstartomány felső határát a nemzetközi szakirodalom LOL mozaikszóval jelöli (4. ábra). Az LOL mozaikszó a Limit of Linearity angol kifejezést jelöli.

3.5. Érzékenység

Az érzékenység (S =sensitivity) a kalibrációs egyenes meredeksége (a 2. ábrán, mint példán, az érzékenység $S=m=4,87$), másként megfogalmazva az érzékenység az egységnyi koncentrációváltozásra eső válaszjel változás. Ha általánosságban szeretnénk definiálni az érzékenységet, akkor az érzékenység az analitikai válaszjel koncentráció szerinti deriváltja (2. egyenlet). Ezek szerint, ha a kalibrációs görbe egyenes, akkor a mérés érzékenysége a kalibrációs görbe meredeksége. Abban az esetben, ha a kalibrációs görbe nem egyenes, akkor nem egy tartományra, hanem csak egy pontra tudjuk megadni az érzékenységet, mégpedig az érzékenység az ahhoz a ponthoz húzott érintő egyenes meredeksége ($\tan \alpha$) (2) (3. ábra).

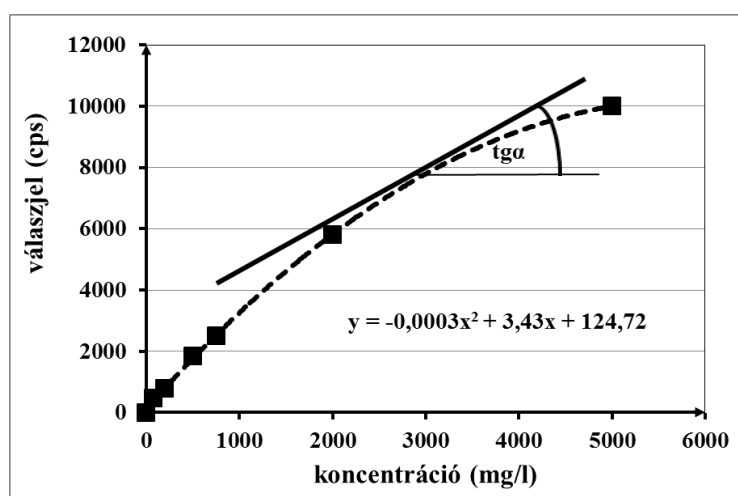
$$m = \operatorname{tg} \alpha = S = \frac{dV}{dc} \quad (2)$$

ahol

S: kalibrációs görbe adott ponton való érzékenysége

V: válaszjel (a 2. ábrán y)

c: koncentráció (a 2. ábrán x)



3. ábra Az érzékenység meghatározása nem lineáris összefüggés esetén

3.6. Kimutatási határ

A kimutatási határ számításának kétféle megközelítési módja létezik mind a hazai, mind a nemzetközi szakirodalomban. Az egyik megközelítés szerint, egy analitikai módszer kimutatási határ (DL vagy LOD vagy c_k) (DL=Detection Limit, LOD=Limit of Detection) az a koncentráció érték, amelynek mérésekor kapott válaszjel már egyértelműen megkülönböztethető a háttér válaszjelétől. Más szavakkal megfogalmazva, a vakminta szórásának háromszorosához tartozó koncentráció érték (3).

$$c_k = \frac{3 \cdot s_{vak}}{S} \quad (3)$$

ahol

c_k : kimutatási határ

s_{vak} : vakminta (a mérendő komponenst nem tartalmazó minta) jelének szórása

S: érzékenység

Ez utóbbi megfogalmazás viszont csak abban az esetben igaz, ha vakérték korrekciót alkalmazunk a kalibrációs görbe megszerkesztése előtt. A másik megközelítés szerint viszont, ha nem használunk vakérték korrekciót, ezt nevezhetjük általános megfogalmazásnak is, akkor az elméleti kimutatási határ (c_k) egy adott komponens azon koncentrációja, amelyhez tartozó válaszjel értéke megegyezik a vakminta válaszjelenek és a vakminta válaszjel háromszoros tapasztalati szórásának (3σ) ($\sigma=s_{vak}=SD$) összegével (4).

$$V_k = V_v + 3 \cdot s_{vak} \quad (4)$$

ahol

V_k : a kimutatási határhoz (c_k) tartozó válaszjel

V_v : a vakminta válaszjele

s_{vak} : a vakminta (a mérendő komponenst nem tartalmazó minta) jelének szórása

Abban az esetben viszont, ha a kalibrációs görbe tengelymetszete elhanyagolható, akkor a 3. egyenlet alapján számolhatjuk a kimutatási határt.

3.7. Meghatározási határ

A meghatározási határ (QL vagy LOQ) (QL=Quantitation Limit, LOQ=Limit of Quantitation) az a legkisebb koncentráció érték, amely az adott módszerrel még elfogadható precizitás és pontosság mellett határozható meg. A 3.6. Kimutatási határ fejezetben megfogalmazott ismereteket itt is alkalmazhatjuk a meghatározási határ számítása során, viszont a gyakorlatban, ebben az esetben az „elfogadható” szintet, a kimutatási határ 3. egyenletben alkalmazott 3σ helyett, a meghatározási határ egyenletéhez 10σ -t alkalmazunk (5):

$$c_m = \frac{10 \cdot s_{vak}}{S} \quad (5)$$

ahol

c_m : meghatározási határ

s_{vak} : vakminta (a mérendő komponenst nem tartalmazó minta) jelének szórása

S: érzékenység

A 3.6. fejezet végén tárgyalt megfontolások figyelembe vételével, ha a kalibrációs görbe tengelymetszete nem hanyagolható el, akkor nem az 5. egyenlet alapján számoljuk a meghatározási határt, hanem a kimutatási határ számolásának 4. egyenletéhez hasonlóan, egy adott komponens meghatározási határa azon koncentráció érték, amelyhez tartozó válaszjel értéke megegyezik a vakminta válaszjelenek és a vakminta válaszjel tízszeres tapasztalati szórásának (10σ) összegével (6).

$$V_m = V_v + 10 \cdot s_{vak} \quad (6)$$

ahol

V_m : a meghatározási határhoz (c_m) tartozó válaszjel

V_v : a vakminta válaszjele

s_{vak} : a vakminta (a mérendő komponenst nem tartalmazó minta) jelének szórása

A fentiekben tárgyalt információk néhány pontjának illusztrálását mutatja a 4. ábra, melyen egy kalibrációs görbe legfontosabb jellemző pontjai láthatók.

A 4. ábrán található angol mozaikszavak jelentése:

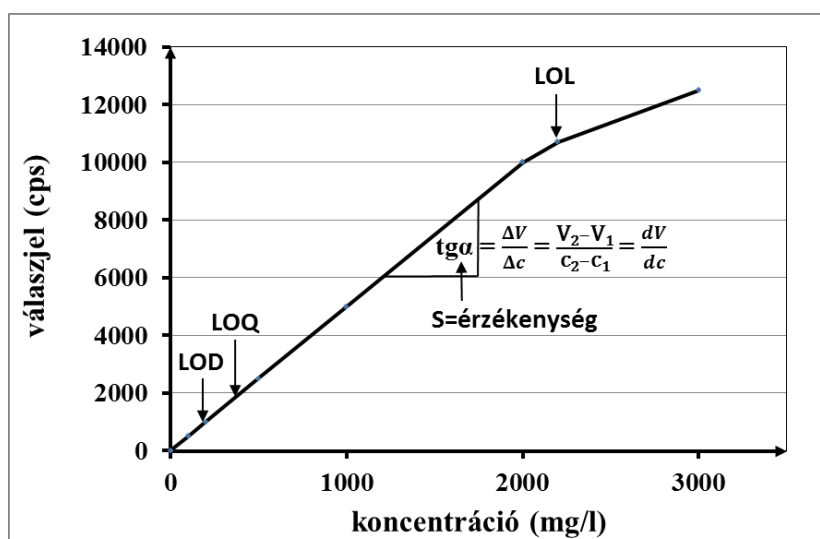
DL: Detection Limit

LOD: Limit of Detection

QL: Quantitation Limit

LOQ: Limit of Quantitation)

LOL: Limit of Linearity



4. ábra A kalibrációs görbe legfontosabb jellemző pontjai

3.8. Pontosság

A módszer pontossága (más néven helyessége vagy torzítatlansága) azt fejezi ki, hogy a mérési eredmény a mérendő mennyiség valódi értékéhez milyen közel esik. Meghatározása olyan anyaggal történhet, mely mérendő komponensének a koncentrációját ismerjük, például egy megbízható referenciaanyag analízisével végezhetjük. Ha megfelelő referenciaanyag nem áll rendelkezésre, akkor a pontosság értékét úgy is közelíthetjük, hogy a mintához a mérendő komponens, mint standard anyag ismert mennyiségét adjuk (a komponens koncentrációjával megegyező nagyságrendben) és meghatározzuk az addíció előtti és utáni koncentráció értéket, majd számítjuk a várt koncentráció különbséget. Ezt a módszert nevezzük spiking-nak (magyarul esetleg nevezhetjük „adalékolásnak”), melyet végezhetünk a mintaelőkészítés előtt és a mintaelőkészítést követően, azaz az analitikai mérést megelőzően. Első esetben a mintaelőkészítés és a mérés pontosságát együtt tudjuk becsülni, míg a második esetben csupán az analitikai mérőmódszerünk pontosságára tudunk következtetni.

A pontosság becslésének egy másik elfogadott módszere, hogy vagy más analitikai eljárás(ok) eredményével hasonlítjuk össze, vagy laboratóriumok közötti körvizsgálatok eredményei összehasonlításával számítjuk a vizsgált analitikai módszer pontosságát. A pontosság a rendszeres hiba kifejezője.

Természetesen egy módszer eredménye annál pontosabb minél kisebb hibával terhelt. A pontosság mennyiségi megadásakor általában a valódi értékre vonatkoztatott relatív hibát (%) adunk meg. Nézzünk egy példát: ha a valódi koncentráció érték például 10 mg/l, az analízis átlageredménye pedig 11 mg/l lenne, akkor a relatív pontosság 10% lenne.

3.9. Precizitás, megismételhetőség, reprodukálhatóság

Precizitás

A módszer precizitása az egymásután, viszonylag rövid időtartamon belül megismételt (párhuzamos) vizsgálatok eredményei közötti eltérés mértéke, amelyet rendszerint a tapasztalati szórással (7) fejezünk ki. Ez az érték számolható Microsoft Excel szórás (s) függvényével a következők szerint (7):

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (7)$$

ahol

s: szórás

x: egyes mérési adatok

$\bar{x}$: mérési adatok átlagértéke

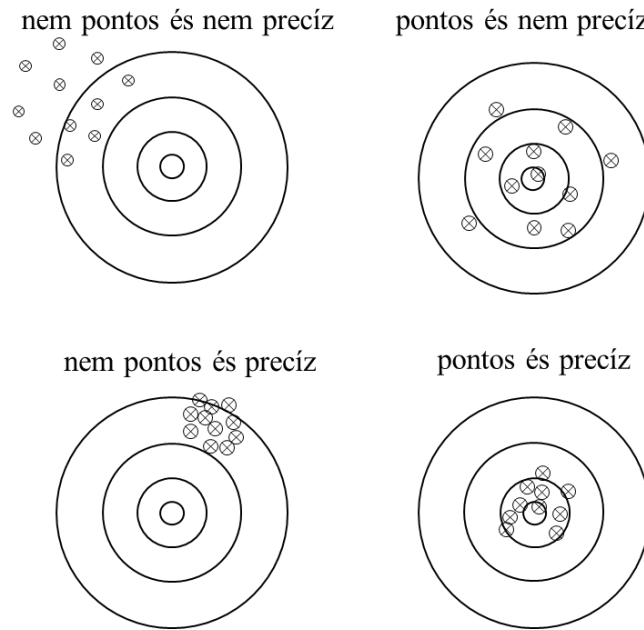
n: mérések száma

A 7. egyenletből látható, hogy a mérések számának növelésével csökkenthető a tapasztalati szórás értéke.

Mivel a szórásadatokat vizuálisan is könnyebb összehasonlítani/átlátni, ha azok relatív szórását (s%) adjuk meg, ezért a kísérletek kiértékelésekor a legtöbb esetben azokat használjuk és a következő módon számítjuk (8):

$$s\% = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \quad (8)$$

Az 5. ábra a pontosság és a precizitás fogalmának megértését segíti, ahol a céltáblába lövés példáját szokás említeni. Az alábbi 4 db céltábla azt illusztrálja, hogyan helyezkedhetnek el a mérési adatok (lövések) a valódi érték (a céltábla közepe) környezetében.



5. ábra Egy mérési módszer pontosságának (accuracy) és precizitásának (precision) illusztrálása céllövésen keresztül

Megismételhetőség

A mérési eredmények megismételhetősége a precizitás azon fajtája, amely a mérendő mennyiség ugyanazon feltételek között (mérési elv, mérési módszer, mérőszemély, mérőeszköz, helyszín, idő, használati feltételek) megismételt mérései során kapott eredmények közelsége.

Reprodukálhatóság

A mérési eredmények reprodukálhatósága a precizitás azon fajtája, amely a mérendő mennyiség legalább egy megváltozott feltétel mellett (mérési elv, mérési módszer, mérőszemély, mérőeszköz, helyszín, idő, használati feltételek) megismételt mérései során kapott eredmények közelsége.

4. Szervetlen komponensek vizsgálati módszerei

4.1. Kalibráció, standard addíció, belső standard

4.1.1. Kalibrációs módszer

A klasszikus analitikai módszerek abszolút elemzési módszerek (tehát nem igényelnek előzetes standard minták alkalmazását), a műszeres analitikai módszerek többsége (a jegyzetben alkalmazott összes részletezett módszer) viszont relatív módszernek tekinthető. Ez utóbbi azt jelenti, hogy a minták analitikai mérését minden esetben meg kell, hogy előzze egy kalibrációs tevékenység, mely folyamat során, (a meghatározandó komponens fizikai és fizikai-kémiai sajátosságainak köszönhetően), a mérendő komponens koncentrációja és a műszer válaszejele közötti összefüggést határozzuk meg.

Tehát, ismert koncentrációjú standard oldatokat készítünk, majd ezeket ugyanúgy, ugyanolyan körülmények között mérjük meg, azaz határozzuk meg a fenti összefüggést és alkotjuk meg a kalibrációs görbét, amely az analitikai készülék válaszejelét, vagy egy abból közvetlenül származtatott mennyiséget ábrázolja a mérendő komponens koncentrációja vagy anyagmennyisége függvényében. A kalibrációs görbe felvételét általában öt-tíz ismert koncentrációjú kalibrációs minta használatával végezzük. A kalibrációs görbe alakja az alkalmazott analitikai műszertől függően különböző lehet. A kalibrációs megfeleltetésnél a legfontosabb, hogy egyértelmű legyen az összefüggés, amely azt jelenti, hogy a vizsgálandó komponens egyre növekvő koncentrációjához egyre nagyobb, monoton növekvő válaszelet kapjunk, valamint egy koncentráció értékhez csak egy válaszelet tartozzon. Amennyiben a gyakorlatban széles koncentráció tartományt kívánunk felölelni (praktikus okok miatt), úgy telítési jellegű görbét fogunk kapni. Mivel bizonyos műszeres módszereknél a görbe kezdeti (relatív kis koncentrációknál) és a telítési szakaszán (relatív nagy koncentrációknál) az érzékenység kisebb (egyre csökken), ezért rutin elemzési módszereknél, nem szabad túlzottan nagy koncentráció tartományt választanunk.

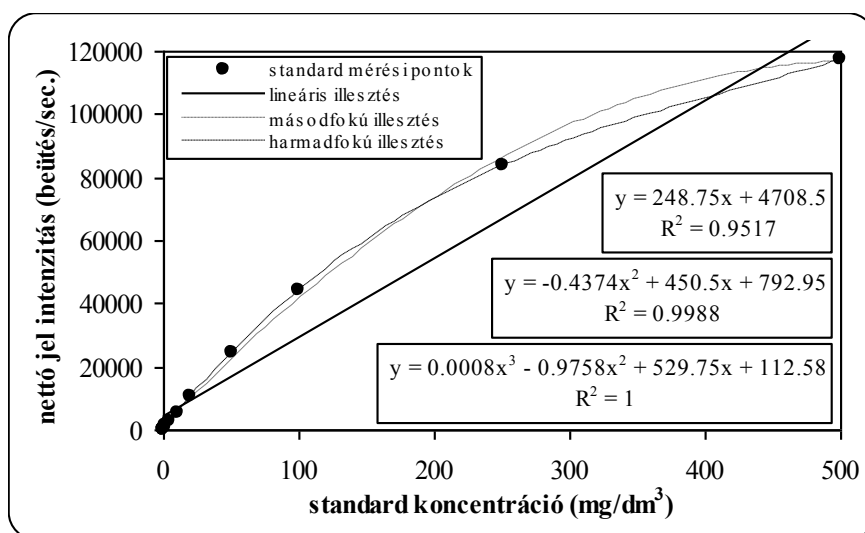
A különböző készülékforgalmazók a mérési módszerek több nagyságrendnyi (3-10) lineáris méréstartományát szokták előadások alkalmával bemutatni és előnyben részesíteni. Ez viszont sok esetben félrevezető, mert a bemutatott

koncentrációtartományban, lineáris egyenlet illesztésével, nem érhető el kielégítő helyesség és precizitás. Ez viszont nem jelenti azt, hogy ezek a műszeres analitikai mérőmódszerek ne lennének alkalmasak több nagyságrend egyidejű átfogására, csupán azt kell megértenünk, hogy nem feltétlenül kell elsőfokú egyenletet alkalmaznunk, hanem különböző fokú polinomok (másodfok, harmadfok) illesztése jobb illeszkedésű kalibrációs görbét eredményez. A különböző analitikai készülékek számos vezérlő és kiértékelő szoftvere lehetőséget teremt arra is, hogy ne csak lineáris, vagy másodfokú görbét lehessen illeszteni a mért standard pontokra, hanem egyéb matematikai összefüggés (pl. logaritmikus, exponenciális stb.) is alkalmazható. Miután ábrázoltuk a kalibráló görbét és kiszámítottuk a korrelációs koefficiens (r), eldönthetjük, hogy ez-e a legjobban illeszkedő görbe, amit választhatunk/használhatunk. A mért standard pontokra legjobban illeszkedő kalibráló görbe annak alapján választható ki, hogy melyik illesztett egyenlet korrelációs koefficiense (r) (vagy annak négyzete: r^2 , 6. ábra) közelíti meg leginkább az 1 értéket. Általában a másod- vagy harmadfok elegendő a megfelelő illeszkedésű görbe kiválasztásához. Más típusú görbe alkalmazása általában nem indokolt.

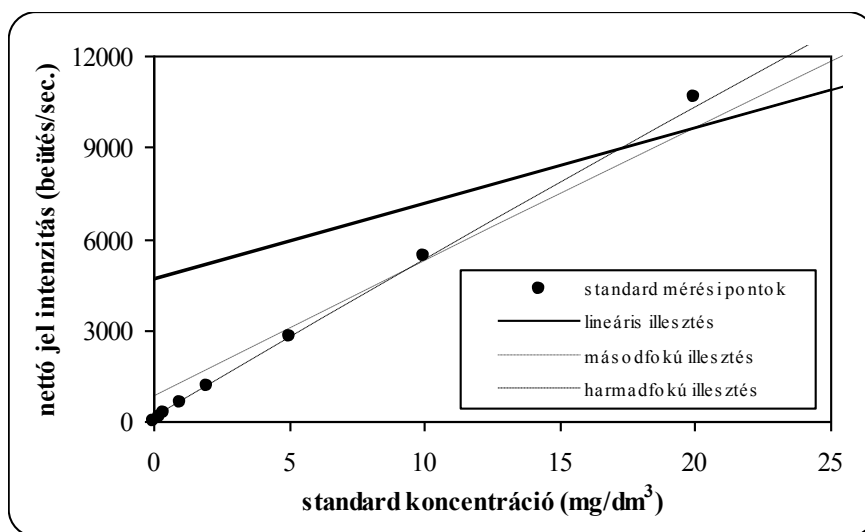
A korábbi vizsgálatok tapasztalatai alapján megállapíthatjuk, hogy az élelmiszer és élelmiszeralapanyag minták különböző komponensei széles koncentráció tartományban találhatók, ez alapján elmondható, hogy a rutinmódszerekben mért szervesetlen komponensek vizsgálatára általában minimum három nagyságrendet átfogó kalibráció szükséges. A kalibrációs standard oldatok koncentrációjának és számának az eldöntéséhez a következő megfontolásokat vehetjük figyelembe:

- minél több mérési pontból áll a kalibrációs görbe, annál pontosabb a koncentráció-válaszjel közötti összefüggés
- mivel a koncentráció csökkenésével exponenciális függvény szerint romlik a mérés precizitása, ez azt sugallja számunkra, hogy a kalibrációs görbe leírására nem az ekvidisztáns standard oldat koncentrációk (pl. 0, 10, 20, 30, 40, 50) a legmegfelelőbbek
- a kalibrációs görbe pontosságát javíthatjuk, ha a kisebb koncentrációk felé végezzük a kalibrációs mérési pontok számának a növelését (6-7. ábra)

- mivel előtanulmányok alapján megállapítottuk, hogy több nagyságrenden keresztül általában nem az egyenes egyenlete a legmegfelelőbb a kalibrációs görbe illesztésére. Következésképpen az elemtartalmak meghatározásához az első-, másod- és harmad-fokú polinomok vizsgálata után a legjobban illeszkedő polinomot kell kiválasztani a minták rutin analíziséhez (6-7. ábra).



6. ábra A magnézium kalibrációs pontok mérési adatai (ICP-OES) és azok különböző tagú polinommal való illesztése (0-500 mg/dm³ koncentráció tartomány)



7. ábra A magnézium kalibrációs pontok mérési adatai (ICP-OES) és azok különböző tagú polinommal való illesztése (0-25 mg/dm³ koncentráció tartomány)

A fenti megállapítások igazolására mutatjuk be példaként a magnézium kalibrációs görbét, mely 12 különböző koncentrációjú kalibrációs standard oldat mérését tartalmazza (6-7. ábra). A 12 kalibrációs standard koncentrációját a fenti megfontolások

figyelembe vételével a következőképpen állítottuk össze: meghatároztuk a kalibrációs görbe legnagyobb koncentrációjú pontját (ezt az értéket nevezzük 100 %-nak), majd a fenti szempontok, továbbá a standard oldatok elkészítéséhez rendelkezésre álló kalibrált laboreszközök (pl.: lombikok, pipetták) térfogatának figyelembe vételével a következő százalékban kifejezett hígításokat számítottuk ki: 0 % (standard vak oldat), 0,04 %, 0,08 %, 0,2 %, 0,4 %, 1 %, 2 %, 4 %, 10 %, 20 %, 50 %, 100 %. A „vak oldat” kifejezést újabban „háttéroldat”-ként is szokták nevezni.

Ennek megfelelően a 6-7. ábrán példaként bemutatott magnézium kalibrációs görbe standard oldatai mg/dm^3 mértékegységben kifejezett valós koncentrációi a következők voltak: 0, 0,2, 0,4, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500 mg/dm^3 .

A 6. ábra a magnézium 0-500 mg/dm^3 koncentráció tartományban való kalibrációját mutatja be. A 7. ábrán pedig ugyanennek a kalibrációs görbének az alsó része látható „kinagyított” formában. Az ábrákon a fekete pontok a mérési eredményeket jelzik. A 6. ábrán az első-, másod- és harmadfokú polinomokat, a 6. és 7. ábrákon pedig az illesztett egyeneseket/görbéket tüntettük fel.

Mind vizuálisan, mind az R^2 értékéből jól látható az illeszkedés jósága. A 7. ábrán szemmel is jól látható: a kalibrációs pontokra egyenes illesztése komoly hibával terhelt, a kis koncentrációk felé haladva a kalibrációs görbe illesztésének hibájából adódóan akár több száz százalékos hibát is okozhatunk. Az elemek kalibrációs pontjaira azonban nem minden esetben a harmadfokú görbe a legmegfelelőbb. A legjobban illeszkedő kalibrációs egyenletek kiválasztása alapos vizsgálatot igényel.

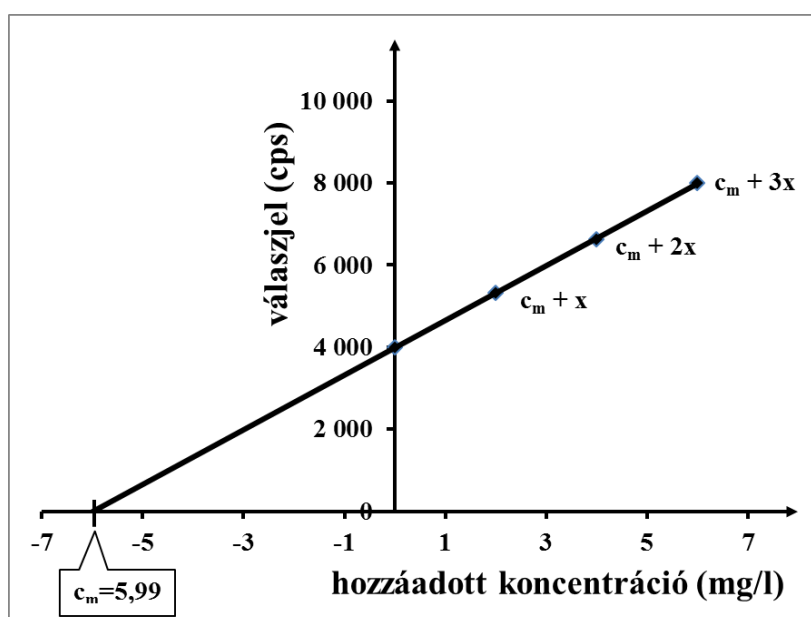
Megjegyezzük, hogy a vizsgálandó elem és a detektálható fény intenzitása között, – az analitikai kézikönyveknek és tankönyveknek megfelelően – nagy valószínűséggel közel lineáris az összefüggés a különböző optikai és főként elektronikai elemek azonban jelentősen befolyásolják a „detektált” fény intenzitását. A kalibrációs görbe felső tartományában, a nagy intenzitások vizsgálatánál a fotoelektron-sokszorozó telítődése léphet fel. Az alsó tartományában, a kis fény intenzitásoknál viszont nagy valószínűséggel a fényszóródás ill. a kis vonalintenzitással összemérhető háttér nem kielégítő korrekciója játszat szerepet, továbbá az, hogy a fotoelektron-sokszorozók kvantum hasznosítási tényezője is megváltozik az intenzitás csökkenésével.

A minták mérésekor akkor várható megfelelő pontosságú eredmény, ha a fentiekben részletezett kalibrációs standard oldatokat a mátrixillesztés (matrix matching) módszerével készítjük. Ez azt jelenti, hogy igyekszünk biztosítani azt, hogy az alkalmazott standard oldatok mátrixa a lehető legnagyobb mértékben egyezzen meg a vizsgálandó minta mátrixával. Ezt úgy érhetjük el leginkább, ha mind a mérendő komponensek koncentrációját, mind a mintaelőkészítés során kapott minta mátrixát próbáljuk „utánozni” a standard oldatok mátrixa kialakítása során. Ez vonatkozik az alkalmazott oldószer (sav) minőségének és koncentrációjának azonosságára, vagy az élelmiszer minták mátrixában található nagyobb koncentrációban lévő elemek koncentrációjára (pl. sok esetben nagy mennyiségű Ca, Mg, K, Na stb.). Bonyolult vagy ismeretlen mátrix, mint a legtöbb élelmiszer minta esetén viszont nem lehetséges a tökéletes mátrixillesztés megvalósítása.

4.1.2. Standard addíciós módszer

Ha az analitikai mérés során, valamilyen jelenlévő komponensnek jelcsökkentő vagy jelnövelő zavaró hatása van, akkor alkalmazhatunk egy olyan ún. standard addíciós módszert, amely ezt a zavaró tényezőt megszüntetni (eliminálni) vagy legalábbis nagymértékben csökkenteni képes. A standard addíciós eljárás is egy lehetséges kalibrációs módszer. Ezt a módszert akkor alkalmazhatjuk, ha pontosabb eredményt szeretnénk elérni, mint amit a minta mátrixa normál (külső) kalibráció esetén lehetővé tesz. A minta mátrixának tekintünk minden a mérendőn kívüli összes komponenst. Ha ezek az egyéb komponensek összessége, vagy csupán egynéhány komponense valamilyen módon növeli vagy csökkenti (azaz zavarja) a mérendő komponens mért jel nagyságát, akkor lehetőségünk van a standard addíciós eljárás alkalmazásával pontosítani a mérés eredményét. Ilyen módszer használatakor fontos feltétel, hogy a mért jel lineárisan változzon a mérendő komponens koncentrációjával, anyagmennyiségével, továbbá több mint 20%-kal ne változzon a kalibrációs görbe meredeksége (azaz az érzékenység), valamint spektrális zavaró hatásoktól (interferenciáktól) mentes legyen. A módszer kivitelezése során, először megmérjük a minta komponensének a koncentrációját és jelét, majd a minta oldathoz, a mérendő komponens koncentrációjának kb. 33%-át, 66%-át és 100%-át adjuk (8. ábra) és azok válaszjelét is meghatározzuk az alkalmazott készülékkel. A kapott koncentráció-válaszjel adatpárokat ábrázoljuk a 8. ábrának megfelelően, ahol az x-tengelyen a mintához hozzáadott elemtartalmak találhatók, míg az y-tengelyen az addíciót

megelőzően és az addíciót követően kapott válaszjelek. A normál mérési módszerhez képest pontosabb koncentráció értéket az x-tengely és a kalibrációs egyenes metszete adja, amely egyenest a legalább 3 vagy 4 mért pont összekötésével kapjuk. A kivitelezés során ügyelni kell, hogy a mért oldatok ne híguljanak nagymértékben, amelyet például úgy küszöbölhetünk ki, hogy viszonylag tömény standard oldatot használunk a komponens addicionálásához, így csak igen kis (a minta térfogatához képest elenyésző) térfogatok hozzáadására van szükség. Természetesen ez a módszer mind előnyökkel, mind hátrányokkal rendelkezik. Előnyként kell megemlíteni, hogy használatával bizonyos zavaró hatások kiküszöbölésén keresztül pontosabb koncentrációt eredményez



(ez volt a célunk), míg több hátrány is felmerül a használatával. Ilyen például, hogy a fentiek miatt idő- és mintaigényes, továbbá az elemzési költségek miatt jelentős költségtöbblet (3 minta háromszoros, 4 minta négyszeres költség) jellemzi. Ezért a felhasználók a legtöbb esetben csak kis mintaszám esetén élnek a standard addíciós eljárás lehetőségével.

8. ábra Egy standard addíciós módszer kalibrációs görbéje

A fentiekben részletezett eljárás végén úgy történik az eredmény (az x-tengely és a kalibrációs egyenes metszete) kiszámítása, hogy a legkisebb négyzetek módszere segítségével egyenest ($y=m \cdot x+b$) illesztünk a mért adatpárokra, meghatározzuk annak meredekségét (lásd a 4. ábránál), majd az $y=0$ értéket (mivel a tengelymetszetenél $y=0$) behelyettesítjük a kapott egyenes egyenletébe és kiszámítjuk a koncentrációt.

4.1.3. Belső standard módszer

A belső standard módszer valójában nem egy külön kalibrációs módszerként használatos, a jegyzetben viszont itt a kalibrációs technikák között tárgyaljuk, mivel a normál kalibrációval mérhető eredmények pontosságát tudjuk nagymértékben javítani a technika használatával. Az alkalmazásával mind a minta mátrixától mind a készülék paramétereinek változásából eredő ún. „készülék csúszásból” eredő hibákat tudjuk csökkenteni. Ezek között a mátrixhatástól származó hibák között kell megemlíteni a mintabeviteli határfok, a transzport folyamatok és az ionizációs folyamatokat befolyásoló (pl. a könnyen ionizálható elemek) hatások változásától származó zavaró tényezőket.

A belső standard módszer folyamata a következő: minden egyes oldathoz (standard- és mintaoldatokhoz, a vak mintához is) hozzáadunk egy vagy több olyan anyag, elem (ezt nevezzük belső standardnak) ismert és megfelelően nagy mennyiségét, amelyet a mintánk vagy nem, vagy elhanyagolható mennyiségben tartalmaz. Lényeges szempont, hogy a választott belső standardként használt oldattal ne szennyeződhesse el a minta, a mintaelőkészítésnél ne kerülhessen bele a belső standardként választott elem(ek), ne okozzon spektrális zavarást a mérendő elemeken és rajta se lépjen fel spektrális zavarás, továbbá ne idézzünk elő káros kémiai reakciót.

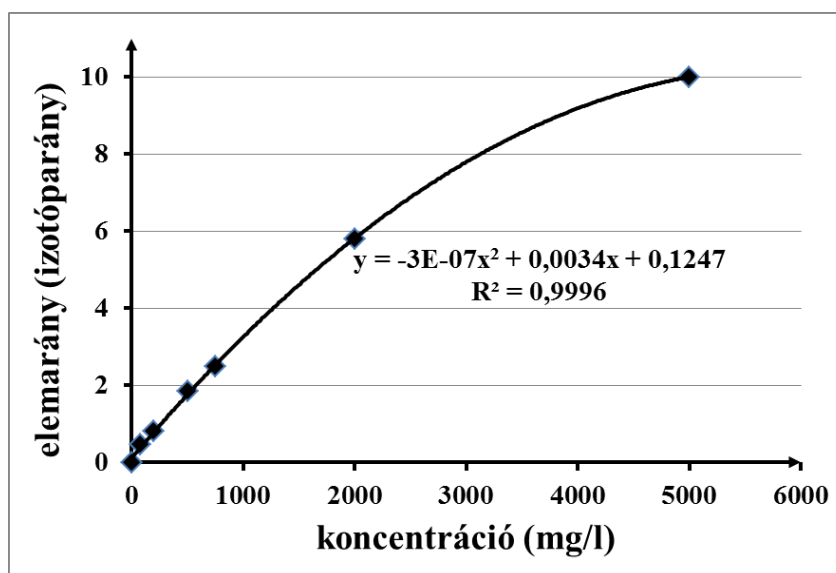
A készülékek és a mérést vezérlő szoftverek általában lehetőséget nyújtanak minden egyes mérendő elem - belső standard pár beállítására. Egyes vezérlőszoftverek (pl. ICP-MS szoftverek, lásd később) lehetővé teszik azt is, hogy egy mérendő elem meghatározása során több belső standardot (izotópot) is figyelembe vehessünk egyszerre. Abban az esetben, ha a mérendő izotóp tömeg/töltés (m/z) értéke a két választott belső standard m/z értéke közé esik, akkor a szoftver interpolál, tehát a korrekció során attól függően, hogy melyikhez van tömeg szerint közelebb, azzal arányosan nagyobb mértékben, súlyozottan korrigálja az intenzitásváltozást. Olyan esetben, ha nem a két belső standard elem m/z értéke közé esik a mérendő elem adott izotópjának m/z értéke, csak azzal a belső standarddal korrigál, melyhez közelebb esik.

A megfelelő mérendő elem - belső standard pár kiválasztása rendkívül fontos, mivel ha nem jól választjuk ki, akkor szélsőséges esetben még ellenkező irányú eredmény (még kisebb pontosság) is elérhető. A legfontosabb szempont, hogy a választott párok

viselkedésükben hasonló sajátságúak legyenek. Feltételezzük, hogy a vizsgálandó mintákban, a választott párokra vonatkozó érzékenység hányadosa (a relatív érzékenység) állandó. Az ICP-MS kivételével viszonylag egyértelmű, hogy milyen belső standard kiválasztása mutatkozik megfelelőnek, viszont az ICP-MS-nél több nézetet is vallanak a szakmában járatosak. Vannak, akik úgy gondolják, hogy a közeli tömeg/töltés értéken túlmenően fontos a hasonló ionizációs potenciál és kémiai viselkedés is a megfelelő korrigáláshoz, vagy van, aki fontosnak tartja az első és második ionizációs potenciál, entalpia, szabad energia, entrópia, elektronegativitás és az oldatbeli töltés kapcsolatát a mérendő elem és a belső standard között.

Összefoglalva, a belső standard kiválasztásánál a mérendő elemmel való hasonlóságot kell figyelembe venni, különben nem megfelelő mértékben, legrosszabb esetben rossz irányba korrigál.

A kalibrációs görbe ábrázolása során az y-tengelyen a mérendő elem és a belső standard válaszcéljának hányadosa szerepel, az x-tengelyen pedig a mérendő elem (izotóp) koncentrációja található (9. ábra). A továbbiakban a mérés és az eredmények kiértékelése a 4.1.1. fejezetben részletezett elveknek megfelelően történik.



9. ábra Kalibrációs görbe illesztése belső standard alkalmazásával

4.1.4. Izotóphígítási eljárás

Az ICP-MS technikában (részletesen lásd később) alkalmazható izotóphígítási eljárást úgy tekinthetjük, mintha egyszerre, egy tevékenységben ötvöznénk a standard addíció

és a belső standard módszereket, ugyanis az addicionált komponens (izotóp) a mérendő elem mérésére használt izotópjához képest, egy másik tömegszámú izotópja. Mivel ennél a módszernél különböző izotópokat alkalmazunk, ezért ez a technika csak akkor működik, ha a detektor alkalmas izotópok szelektív meghatározására (pl. az ICP-MS).

A mintában meghatározzuk a mérendő elem két izotópjának mennyiségét és arányát, majd a mintához az egyik izotóp ismert mennyiségét addicionáljuk. Mivel ismerjük az addicionált mennyiséget (tömegek), a koncentrációkat és az izotóparányokat, az addíció előtt és után, a mérendő elem koncentrációja számítható.

A hazai gyakorlatban viszont ennek alkalmazása viszonylag korlátozott, amely főként az addícióra alkalmas izotóp standard oldatok beszerzésének költségéből származik.

4.2. Az optikai spektroszkópiai módszerek csoportosítása

Az optikai spektroszkópiai módszereket két nagy csoportra oszthatjuk:

1. Atomspektroszkópiai módszerek
2. Molekulaspektroszkópiai módszerek.

A 3. táblázatban található számos molekulaspektroszkópiai módszer is, melyek közül az élelmiszer és élelmiszeralapanyag minták komponensei minőségi és főként mennyiségi meghatározására leggyakrabban alkalmazott ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometriai módszer a jegyzet 4.3. fejezetében kerül részletesen tárgyalásra. Mivel a jegyzet terjedelmi korlátai nem teszik lehetővé az analitikai módszerek széles körének a tárgyalását, így csupán a leggyakrabban alkalmazott mérési módszerek bemutatását végezzük el.

Az optikai spektroszkópiai módszerek másik nagy és gyakorta használt csoportját az atomspektroszkópiai módszerek képviselik. Az atomspektroszkópiai módszercsoportra az jellemző, hogy az analitikai információt a szabad atomok és szabad ionok elektrongerjesztésétől származó, éles vonalakból álló atomspektrum hordozza.

Az atomspektroszkópiai módszercsoportba szorosan háromféle típusú analitikai mérés technika tartozik (1. táblázat).

1. táblázat Atomspektroszkópiai módszerek

<u>Atomspektroszkópiai módszerek</u>	<u>A mérés elve</u>
1. Atomemissziós módszer	fénykibocsátás
2. Atomabszorpciós módszer	fényelnyelés
3. Atomfluoreszcens módszer	a megvilágító fény hatására kibocsátott sugárzás

Mivel az 1. táblázatban található atomspektroszkópiai módszerek majdnem lefedik a mostanában rutin eljárásban alkalmazott elemtartalmi vizsgálati módszerek nagy részét, csupán az induktív csatolású plazma tömegspektrometria marad ki ezáltal a csoportosítás alapján, amelyet egyébként egyre inkább alkalmaznak mind hazai, mind nemzetközi élelmiszervizsgáló laboratóriumok, ezért a tömegspektrometriát is ide

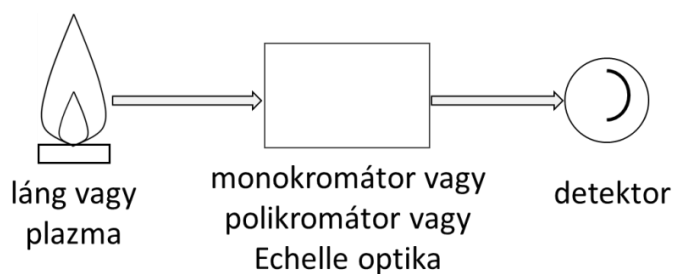
csoportosítjuk, egy csokorban tárgyaljuk. Természetesen meg kell jegyeznünk, hogy addig, amíg az atomspektroszkópai módszercsoportra az jellemző, hogy az analitikai információt a szabad atomok és szabad ionok elektrongerjesztésétől származó, viszonylag éles vonalakból álló atom-, vagy ionspektrum hordozza, a tömegspektrometriában viszont az elemzendő izotópok tömeg szerinti elválasztását követő, izotópok mennyiségének megszámlálása történik. Tehát a tömegspektrometria szorosan nem tartozik, nem tartozhat az atomspektroszkópai módszerek közé. A fenti megfontolás szerint az 1. táblázatot, logikailag módosítva, a 2. táblázat mutatja be, mely már tartalmazza a tömegspektrometriát is. A jegyzetben, a tömegspektrometria egyre növekvő elterjedésének, valamint jelentőségének köszönhetően, az atomemissziós és atomabszorpciós analitikai módszerekkel együtt kerül tárgyalásra.

2. táblázat Atomspektroszkópai módszerek, kibővítve a tömegspektrometriával

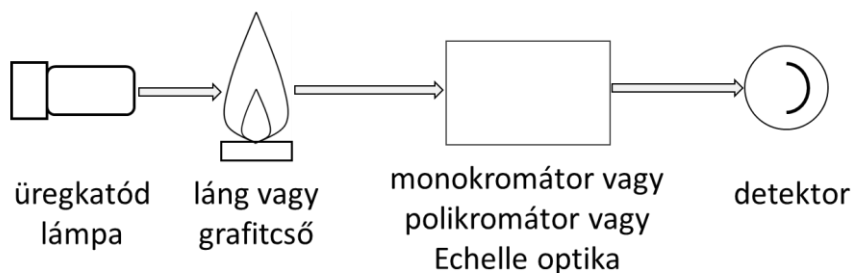
<u>Atomspektroszkópai módszerek</u>	<u>A mérés elve</u>
1. Atomemissziós (AES) módszer	fénykibocsátás
2. Atomabszorpciós (AAS) módszer	fényelnyelés
3. Atomfluoreszcens (AFS) módszer	a megvilágító fény hatására kibocsátott sugárzás
(Tömegspektrometriai módszer)	
4. Tömegspektrometria (MS)	tömeg/töltés

Az atomemissziós spektrometriában (AES) (10. ábra) termikus vagy elektromos energia segítségével állítunk elő gerjesztett atomokat, vagy gerjesztett ionokat, amelyek alacsonyabb energiaállapotba kerülve fényt bocsátanak ki, amely fénysugár hullámhossza jellemző a meghatározandó elem minőségére, míg ugyanezen fény relatív intenzitásából következtethetünk az analizálandó elem koncentrációjára.

Az atomabszorpciós spektrometriában (AAS) (11. ábra) az analizálandó elemet energiaközléssel (lángban, vagy grafitkemencében) alapállapotú szabad atomokká alakítjuk, mely atomgőzön a vizsgálandó elemre jellemző hullámhosszú fényt bocsátunk át és mérjük a fényintenzitás csökkenését. Az alkalmazott fény hullámhossza az elem minőségét határozza meg, míg a fényintenzitás relatív csökkenése pedig jellemző az analizálandó elem relatív, vagy abszolút mennyiségére.

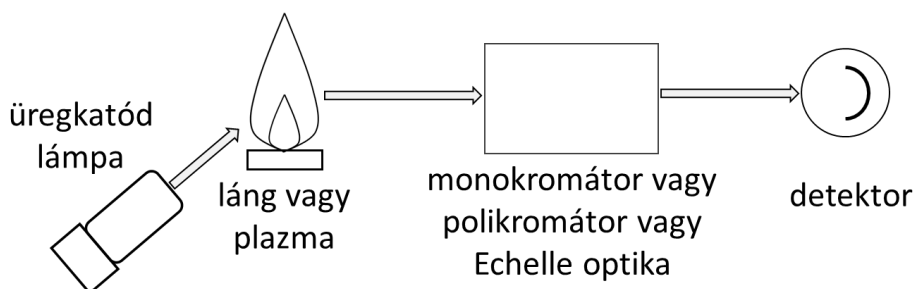


10. ábra Az atomemissziós spektrométerek elvi felépítése



11. ábra Az atomabszorpciós spektrométerek elvi felépítése

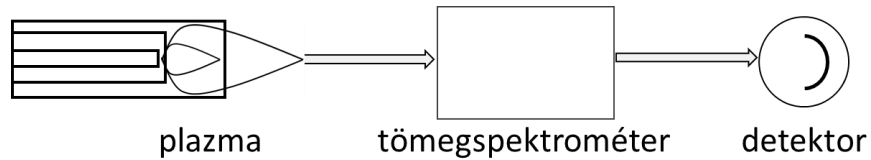
Az atomfluoreszcens spektrometriában (AFS) (12. ábra), hasonlóan az atomabszorpciós spektrometriához, szintén alapállapotú szabad atomokat állítunk elő. Továbbá ezeket az atomokat szintén a vizsgált elemre jellemző hullámhosszú fénnel világítjuk meg, viszont ebben az esetben, ezt a sugárzást nem a fényelnyelésre használjuk, hanem ezzel a fénnel gerjesztjük a mérendő atomot, majd a gerjesztett atomok által kibocsátott fluoreszcens fény relatív intenzitását mérjük, amely arányos a mérendő elem koncentrációjával. A gerjesztett atom által kibocsátott fluoreszcens fény hullámhossza jellemző a meghatározandó elem minőségére.



12. ábra Az atomfluoreszcens spektrométerek elvi felépítése

Az elemtartalmi vizsgálatok területén 30 éve jelent meg elsőként az induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS), mely manapság az egyik legnagyobb

érzékenységgel bíró analitikai módszer. Az ICP-MS technikában a vizsgált elem (izotóp) ionjait állítjuk elő, amelyeket a tömegspektrométerbe vezetve, mágneses vagy elektromos térben az ionok tömeg/töltés (m/z) szerint különülnek el egymástól. Az adott izotóp tömeg-töltés aránya jellemző az elem minőségére, míg a létrehozott ionnyaláb relatív intenzitása arányos a meghatározandó elem relatív vagy abszolút mennyiségével.



13. ábra Az induktív csatolású plazma tömegspektrométer elvi felépítése

4.3. ULTRAIBOLYA-LÁTHATÓ ABSZORPCIÓS SPEKTROFOTOMETRIAI MÓDSZER

4.3.1. Elméleti háttér

A molekula vagy az atom alapállapota azt jelenti, hogy az elektronjai a legalacsonyabb energiaszinten tartózkodnak és akkor kerül gerjesztett állapotba (nagyobb energiaszintre), ha megfelelő energiájú elektromágneses sugárzást abszorbeál (nyel el). A gerjesztett molekula vagy a gerjesztett atom energiaszintjét pedig energia (foton) kibocsátása (emittálása) közben képes csökkenteni (nem feltétlenül az alapállapotig). Az abszorbeált, vagy emittált sugárzásnak a hullámhossza jellemző az anyagi minőségre (minőségi analitikai információ), míg annak intenzitás változása jellemző a vizsgált komponens relatív vagy abszolút mennyiségére (mennyiségi analitikai információ).

A hétköznapiakban alkalmazott fehér fény különböző hullámhosszúságú sugárzás (fény) keveréke. A spektroszkópiai vizsgálatoknál használt fényt előzőleg, hullámhossz szerint, komponenseire kell bontanunk azért, hogy az analitikai vizsgálatokban alkalmazható monokromatikus fényhez jussunk. A monokromatikus fény gyakorlatilag egy nagyon szűk hullámhossz tartományú fotonokat tartalmazó fénynyaláb.

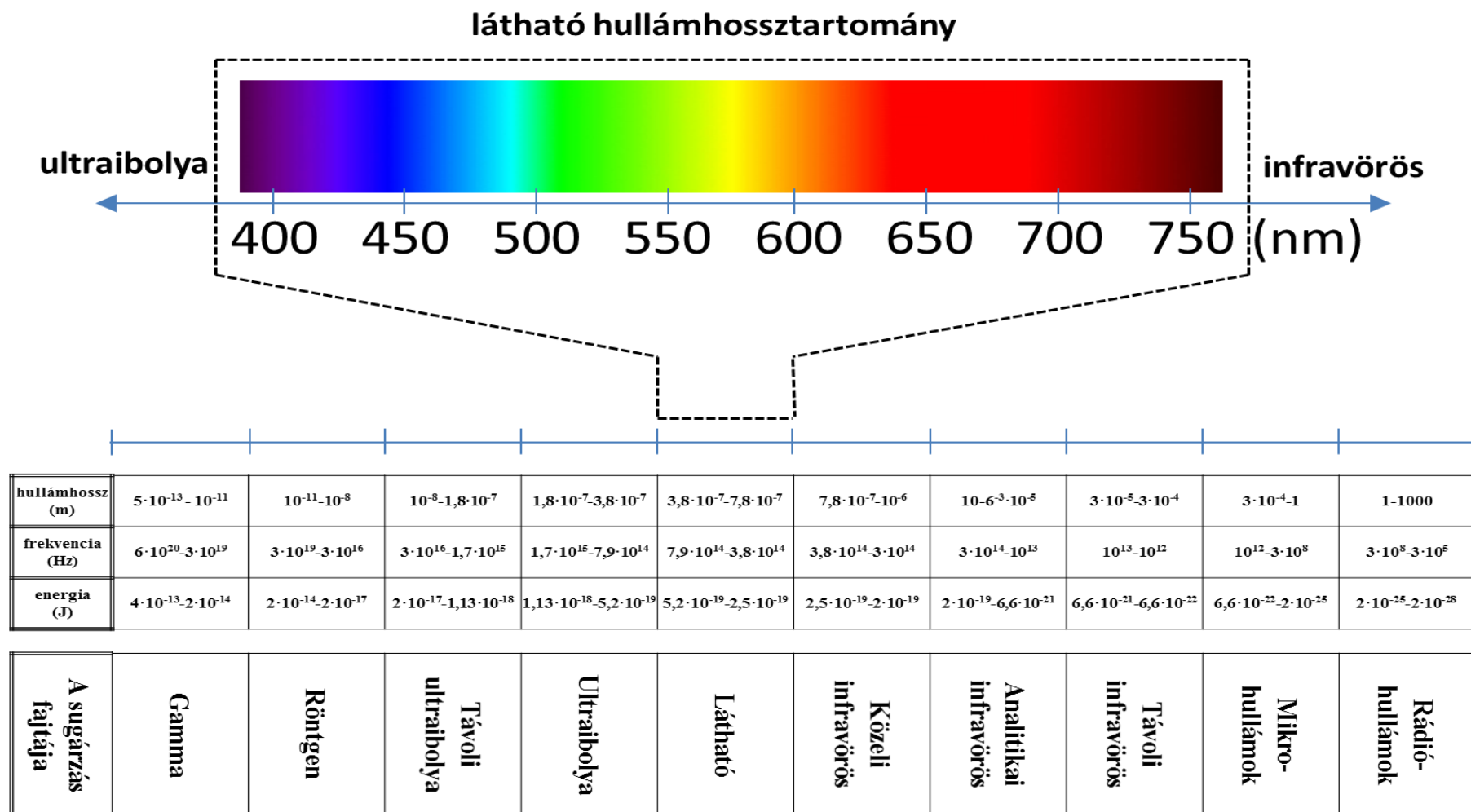
A mai rutin analitikai vizsgálatok között a spektroszkópiai módszereket és azon belül az ultraibolya-látható (UV-VIS=Ultraviolet-Visible) abszorpciós spektrofotometriai módszereket, széles körben elterjedt, sőt a legelterjedtebb vizsgálati módszereknek tekinthetjük. A rutin és kutató laboratóriumokban egyaránt megtalálhatók az ultraibolya-látható spektrofotométerek, mivel elterjedésüket elősegíti, hogy az alkalmazásukhoz nélkülözhetetlen szakértelem viszonylag egyszerűen és könnyen megszerezhető, továbbá a mintaelőkészítéshez, valamint az analitikai vizsgálatokhoz szükséges műszerezettség viszonylag alacsonyabb költségek mellett beszerezhető.

Az elektromágneses sugárzás (3. táblázat), – amely hullámhosszát tekintve a gamma sugárzástól indul és az ultraibolya-látható spektrofotométerek számára használható ultraibolya, látható és közeli infravörös sugárzáson keresztül, egészen a rádióhullámokig tart – kölcsönhatásba léphet a mintával. Ez a kölcsönhatás lehet abszorpció (a vizsgálandó komponens fényt nyel el) vagy lehet emisszió (azaz a

gerjesztett atomok vagy ionok energiát bocsátanak ki). Az elektromágneses sugárzás típusa, hullámhossza és a kölcsönhatás folyamatán alapuló spektroszkópai módszerek a 3. táblázatban találhatók.

3. táblázat Hullámhossztartományok és a spektroszkópai módszerek

Hullámhossztartomány			Folyamat	Spektroszkópai módszer
Gamma		$5 \cdot 10^{-13}$ - 10^{-11} m (0,5-10 pm)	magátmenetek	Mössbauer vagy gammafluoreszcens spektroszkópia
Röntgen	X-ray	10^{-11} - 10^{-8} m (0,01-10 nm)	belső elektronátmenetek	röntgen-emissziós, röntgen-abszorpciós, röntgen-fluoreszcenciás, elektronmikroszondás módszerek
Távoli ultraibolya	FUV	10^{-8} - $1,8 \cdot 10^{-7}$ m (10-180 nm)	vegyértékelektronok gerjesztése: külső elektronátmenetek	atomabszorpciós, atomemissziós, atomfluoreszcenciás, molekulaabszorpciós, molekulaemissziós, lumineszcenciás módszerek
Ultraibolya	UV	$1,8 \cdot 10^{-7}$ - $3,8 \cdot 10^{-7}$ m (180-380 nm)		
Látható	VIS	$3,8 \cdot 10^{-7}$ - $7,8 \cdot 10^{-7}$ m (380-780 nm)		
Közeli infravörös	NIR	$7,8 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-6} m (780-1000 nm)	elektronátmenetek	
Analitikai infravörös	IR	10^{-6} - $3 \cdot 10^{-5}$ m (1-30 μ m)	rezgési és forgási átmenetek	infravörös spektroszkópia
Távoli infravörös	FIR	$3 \cdot 10^{-5}$ - $3 \cdot 10^{-4}$ m (30-300 μ m)	forgási átmenetek	távoli infravörös spektroszkópia
Mikrohullámok		$3 \cdot 10^{-4}$ -1 m (0,3-1000 mm)	elektronspin átmenetek	mikrohullámú spektroszkópia, elektronspin-rezonancia spektroszkópia
Rádióhullámok		1-1000 m	magspin átmenetek	magmágneses rezonancia spektroszkópia



14. ábra Az elektromágneses spektrum tartományai és azok főbb jellemzői

Az elektromágneses sugárzás hullámhossza és az energiája között az alábbi összefüggés írható fel (Planck egyenlet):

$$E_2 - E_1 = \Delta E = h \cdot \nu \quad (9)$$

mivel

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (10)$$

ezért

$$E_2 - E_1 = \Delta E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (11)$$

ahol

E_1 : kezdeti állapot energiaszintje (J)

E_2 : végállapot energiaszintje (J)

ΔE : kezdeti és a végállapot energiaszintje közötti különbség (J)

h : Planck-állandó ($6,624 \cdot 10^{-34}$ J·s)

ν : elektromágneses sugárzás frekvenciája (Hz=)

c : fény sebessége (levegőben $3 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$)

λ : fény hullámhossza (nm)

A fenti összefüggés azt jelenti, amennyiben ismerjük az elektromágneses sugárzás (fény) hullámhosszát, abban az esetben a fenti egyszerű egyenletek segítségével számítható elektromágneses sugárzás frekvenciája, valamint az energiaváltozás nagysága.

A spektroszkópai módszereket egyrészt atom- és molekulaszpektroszkópai módszerekre csoportosíthatjuk, annak megfelelően, hogy az analitikai információ atomoktól vagy molekuláktól származik, másrészt az elektromágneses sugárzás hullámhossza szerint is csoportosíthatjuk. A spektrumot (színképet) akkor kapjuk, ha a hullámhossz függvényében ábrázoljuk az analitikai válaszjelet (intenzitást vagy abszorbanciát). Az ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria esetén az abszorbanciát ábrázoljuk a hullámhossz függvényében. A színkép (spektrum) jellege lehet vonalas (atomspektroszkópia, a válaszjel félértékszélessége: 0,005-0,03 nm), lehet sávós (UV-VIS-spektrofotometria, a válaszjel félértékszélessége 10-50 nm) és lehet folytonos,

amikor a spektrum strukturáltsága eltűnik és folytonos spektrum keletkezik, azaz a spektrumban a vonalak és sávok elmosódnak. Vonalas jellegű spektrum származik az atomoktól, sávok jelennek meg a spektrumban a molekulák gerjesztéséből adódóan (szervetlen és szerves oldószerek felhasználása esetén például OH-gyökök és C₂-gyökök), míg folytonos sugárzást bocsát ki egy izzó szilárd test, de folytonos sugárzás keletkezik rekombináció esetén is. Ilyen rekombinációs sugárzás jön létre az argonplazmákban, amikor elektronok és ionok kölcsönhatása révén semleges atomok keletkeznek és ezzel egyidejűleg a kölcsönható részecskék energiájától függően különböző energiájú fotonok emittálódnak. Az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométerekben ezáltal megnő a háttérintenzitás (lásd később az ICP-OES-nél).

Az ultraibolya és látható fény elnyelésekor (abszorpciójakor) a molekulák elektroneloszlása megváltozik, az elektronjaik kisebb energiájú pályákról nagyobb energiájú pályákra ugranak, azaz gerjesztődnek. Egy molekula azon részét/részeit, amely(ek)ben az elektronátmenet(ek) létrejön(nek) (azaz a fény elnyelődik), kromofór(ok)nak nevezzük. Azt az energiatartományt pedig, amelynél az adott kromofór elnyel, elnyelési sávnak nevezzük. Mivel az elnyelési sáv hullámhossz tartománya (vagyis a gerjesztés energiája) legfőképpen a kromofór anyagi minőségétől függ (megjegyzendő: a kromofórral kölcsönhatásban levő egyéb funkciós csoportok is hatással vannak rá), ezért ez az anyagi sajátosság jellemző a vizsgálandó komponens minőségére. A minőségi információk mellett, fontos hogy azok mennyiségét is meg tudjuk határozni. A vizsgálatokhoz általában valamilyen folyékony halmazállapotú mintát állítunk elő. Amikor ezt a folyékony halmazállapotú oldatot fénnel átvilágítjuk és a mérés eredményeként kapott fényelnyelést ábrázoljuk a megvilágító fény hullámhosszának függvényében, akkor az ún. abszorpciós spektrumot kapjuk. Mint a fentiekben is említettem, az abszorpciós spektrum minőségi információkat hordoz. Ezenkívül mennyiségi információkkal is rendelkezik, mivel ha a vizsgálandó mintát átvilágítjuk egy I_0 intenzitású, adott hullámhosszú (monokromatikus), azaz egy szűk hullámhossz tartományú fénnel, annak fényintenzitása a fény abszorpciója miatt lecsökken I -re. Az abszorpciót (fényelnyelést) egy mértékegység nélküli mennyiség, az abszorbancia jellemzi. Az abszorbancia (fényelnyelés) kiszámítását a 12. egyenlet mutatja.

Az UV-VIS tartomány csak kevésbé alkalmas minőségi elemzésre (kvalitatív analízisre), mivel a színek tartomány abszorpciós sávjai nagyon szélesek, sőt a

különböző atomcsoportokra jellemző sávok egymással átfedésben is lehetnek és ezáltal nehezen rendelhetők az adott atomcsoportokhoz (funkciós csoportokhoz). Az előbbieket alapján megállapíthatjuk, hogy az UV-VIS abszorpciós spektrofotometria nem alkalmas minőségi azonosításra, viszont kvantitatív analízisre az egyik legszélesebb körben használt módszer. A mennyiség meghatározás alapja a Lambert-Beer törvény (nevezik Bouguer-Lambert-Beer törvénynek is), amely a meghatározandó komponens koncentrációja (c) és a fényelnyelés, azaz az abszorbancia (A) közötti összefüggést írja le (13).

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (12)$$

ahol

A : abszorbancia

I_0 : a megvilágító fény kezdeti intenzitása

I : a megvilágító fény végső intenzitása

$$A = a \cdot l \cdot c \quad (13)$$

ahol

A : abszorbancia

a : abszorpciós koefficiens

l : optikai úthossz, jelen esetben a kűvetta szélessége

c : a mérendő komponens koncentrációja (a mért kromofór koncentrációja)

Korábban a Lambert-Beer törvényben az abszorbanciát (A) extinkciónak (E) nevezték, melyben a moláris abszorpciós koefficiens (a) helyett a moláris extinkciós koefficiens (ϵ) használták, mely egyenlet ezáltal a következőképpen nézett ki (14):

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (14)$$

ahol

I_0 : a megvilágító fény kezdeti intenzitása

I : a megvilágító fény végső intenzitása

E : extinkció

ϵ : extinkciós koefficiens

l : optikai úthossz, azaz a kűvetta szélessége

c : a mérendő komponens koncentrációja (a mért kromofór koncentrációja)

Az abszorpciós koefficiens (extinkciós koefficiens) annak a valószínűségnek a mértéke, amely valószínűséggel a fényútba eső molekulák a fotonokat elnyelik. Az abszorpciós koefficiens (extinkciós koefficiens) az anyagi minőségre jellemző állandó, független a koncentrációtól. Az abszorpciós koefficiens (extinkciós koefficiens) az analitikai vizsgálat alatt konstansnak (állandónak) tekinthetjük, viszont valójában nem egy állandó, hanem értéke a mérendő komponens minőségén és állapotán kívül általában az alkalmazott fény hullámhosszának a függvénye. Mivel a vizsgálatok kivitelezése során ugyanazt a monokromatikus fényt alkalmazzuk, így a fenti Lambert-Beer törvényben lévő abszorpciós koefficiens (extinkciós koefficiens) gyakorlatilag állandónak tekinthetjük.

Az I/I_0 viszonyt transzmittanciának (T) (más néven átérésztésnek) nevezzük (15) és annak százszorosa, a T% százalékos fényátbocsátó képesség (transzmisszió %). A vizsgált oldat transzmittanciája (T) a beeső elektromágneses sugárzás (monokromatikus fény) azon részét adja meg, amely a mintán áthalad. Ennek értéke 0 és 1 (vagyis 0 és 100 %) között változhat. Abban az esetben, ha az alkalmazott monokromatikus fény az oldaton áthaladva teljes mértékben abszorbeálódik (elnyelődik), akkor a transzmittancia értéke 0-nak (T% esetén 0%-nak) adódik.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (15)$$

ahol

T: transzmittancia

I_0 : a megvilágító fény kezdeti intenzitása

I: a megvilágító fény végső intenzitása

Figyelembe véve a 12. egyenletet és a fenti 15. egyenletet, adódik, hogy a transzmittancia az abszorbancia negatív logaritmusa (16):

$$A = -\lg T \quad (16)$$

Egy adott hullámhosszú és adott intenzitású monokromatikus fénnel a vizsgálandó mintát átvilágítva, az alkalmazott fény részben a mintában elnyelődik (abszorbeálódik), részben áthalad rajta (transzmittálódik) és a maradék része visszaverődik (reflektálódik). Az intenzitásokra (abszorpció, transzmisszió, reflexió) tehát igaz az alábbi egyenlet (17):

$$I_0 = I_T + I_A + I_R \quad (17)$$

ahol:

I_0 : a megvilágító fény intenzitása

I_T : a transzmittált (a minta által átengedett) fény intenzitása

I_A : az abszorbeált (elnyelt) fény intenzitása

I_R : a reflektált (visszavert) fény intenzitása

Olyan mintát vizsgálunk abszorpciós módszerrel, amelynek elhanyagolható a reflexiója, tehát általában a folyadékok, az oldatok és a gázok vizsgálata lehetséges UV-VIS abszorpciós spektrofotometriával. Csak ritkábban szoktuk szilárd anyagok vizsgálatát végezni, mivel a szilárd anyagok a fényt nem engedik át, ezért azokat csupán reflexiós módon vizsgálhatjuk.

A transzmittancia (T =átbocsátó képesség) és annak százszorosa, a százalékos fényátbocsátó képesség ($T\%$ =transzmisszió %) azt fejezi ki, hogy az abszorbeáló közeg a rajta keresztülhaladó fény intenzitásának hányadrészét, illetve hány százalékát engedi át. Ehhez hasonló fogalom az α abszorpciófok, mely azt fejezi ki, hogy az abszorbeáló közeg a rajta keresztülhaladó fény intenzitásának hány százalékát abszorbeálja (nyeli el). Tehát a relatív fényintenzitás csökkenésére ugyancsak használható mennyiség az abszorpciófok (α).

Normál esetben, ha elhanyagolható a tükrözési veszteség (reflexió), az áteresztés (transzmittancia) és az abszorpciófok összege 1 (18):

$$T + \alpha = 1 \quad (18)$$

A Lambert-Beer törvényt csak akkor alkalmazhatjuk, ha a következő feltételek is teljesülnek:

1. Csak viszonylag híg oldatokra ($< 10^{-3}$ mol/dm³ koncentráció) alkalmazható. Nagyobb koncentrációjú oldatoknál az oldat törésmutatója is megváltozik. Ez esetben az abszorpciós koefficiens értéke is megváltozik, amelyet ekkor korrigálni szükséges az egyenletben.
2. A kromofór csoportot tartalmazó molekula kémiai reakciói (adott molekulák disszociációja, asszociációja, protonálódása, vagy komplexképződése stb.) is okozhatnak a Lambert-Beer törvénytől való eltérést.

3. Az oldószercsere a molekulák energiaállapotait megváltoztatja, mivel különböző energiaszinteket vesznek fel a meghatározandó kromofór molekula alap és gerjesztett állapotai. Ezáltal a 9-11. egyenleteket figyelembe véve megváltozik az abszorpcióhoz szükséges energia nagysága is, azaz megváltozik az abszorpciós spektrum (hullámhossztartomány) is.
4. A Lambert-Beer törvény csak szűk sáv szélességű fény alkalmazására érvényes. Amennyiben az abszorpciós spektrum emelkedő vagy lezálló szakaszán végezzük a mérést, valamint a monokromatikus fény a normál sáv szélességtől nagyobb sáv szélességgel rendelkezik, akkor ez a Lambert-Beer törvényben eltérést okozhat. Mivel ez a jelenség csak az elnyelés meredek szakaszán okoz jelentősebb eltérést, ezért a hiba kiküszöbölésére célszerű az elnyelési spektrum abszorpciós maximumánál (azaz a lapos szakaszon) végezni a mérést.
5. A Lambert-Beer törvény nem alkalmazható abban az esetben, ha a vizsgálandó oldat jelentős mennyiségű kolloid részecskét tartalmaz. Ez esetben a kolloid méretű (0,5-500 nm) részecskék által okozott fényszóródás jelentős mértékű mérési hibát okoz.
6. A vizsgálandó oldat hőmérsékletének változása is befolyásolhatja az energiaszinteket, ennek megfelelően az elektronátmenetek energiájának nagysága is megváltozik. Ez az abszorpciós sávok helyének, esetleg alakjának, sőt még intenzitásának megváltozásával is járhat. Csak a közel megegyező hőmérsékleten végzett mérések adatait hasonlíthatjuk össze.
7. A Lambert-Beer törvény alkalmazásához fontos tudnunk, hogy az abszorbancia additív tulajdonság. Ez azt jelenti, ha az alkalmazott hullámhossznál, a vizsgált oldatban több, egymás mellett előforduló kromofórt tartalmazó komponens található, úgy azok fényabszorpciója összeadódik.

Az ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria mind szervetlen (4. és 5. táblázat), mind szerves összetevők (6. táblázat) vizsgálatára alkalmas. Mivel ezek száma szinte végtelen, ezáltal elkerülhetetlen, hogy az elsősorban folyadék halmazállapotú mintákban lévő különböző kromofór csoportok sávátfedési problémákat okozzanak. Ez a mérési módszer ezen ok miatt nem használható minőségi analitikai célra. Ha az elemzendő komponensnek van elnyelése az UV-VIS tartományban, amely nem rendelkezik jelentős zavaró tényezővel (pl. sávátfedés), akkor közvetlenül vizsgálható. Ezt az esetet

képviseli a lila színű permanganát ion (MnO_4^-) mennyiségének a meghatározása is. Ha viszont nincs olyan elnyelése a meghatározandó komponensnek, amely közvetlenül elemezhető, akkor keresnünk kell egy olyan fényelnyelést mutató kromofór csoportot, amely sztöchiometriai reakcióba tud lépni a meghatározni kívánt komponenssel és ezáltal egy spektrofotometriásan elemezhető vegyületet képez (4. táblázat). Ez a vegyületképzés arra is lehetőséget biztosít, hogy eltolhassuk a meghatározandó komponens fényelnyelését, ha zavaró spektrum átfedés lépne fel.

4. táblázat Néhány kation ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometriás meghatározásánál alkalmazandó paraméterek

Kation	Reagens	Közeg	Hullámhossz (nm)	Vizsgálható koncentráció tartomány (mg dm^{-3})
Al(III)	oxin	kloroform pH=5	390	2-120
Ca(II)	murexid	vizes pH=12	506	0,5-2
Co(II)	1-nitrozo-2-naftol	vizes pH=8	365	0,01-1
Cu(II)	ditizon	kloroform pH=2	545	0,01-1
Fe(III)	KSCN	vizes pH=1	490	0,1-5
Fe(III)	szulfoszalicil-sav	vizes pH=1-4	500	0,04-5
Ni(II)	dimetil-glioxim+ Br_2	vizes pH=4	530	0,1-1,2
Pb(II)	ditizon	kloroform pH=9	520	0,05-0,4
Zn(II)	ditizon	kloroform pH=8	530	0,1-1

5. táblázat Néhány anion ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometriás meghatározásánál alkalmazandó paraméterek

Anion	Reagens	Szín	Hullámhossz (nm)	Kimutatási határ (mg dm^{-3})
NO_2^-	Griess-Ilosvay reagens	vörös	530	0,01
NO_3^-	Cd-os redukció után NO_2^- -ként	vörös	530	0,01
NO_3^-	nincs reagens	színtelen	214	
NO_3^-	2,4-fenil-diszulfonsav	sárga	540	0,05
SO_4^{2-}	p-amino-dimetil-anilin	kék	662	0,01

PO_4^{3-}	ammónium-molibdenát	kék	780	0,01
CrO_4^{3-}	difenil-karbazid	ibolya	540	0,05

6. táblázat Néhány gyakori szerves kromofór csoport abszorpciós jellemzői

Kromofór	Példa	Oldószer	$\lambda_{\max}$ (nm)
alkén	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	n-heptán	177
konjugált alkén	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	n-heptán	217
alkin	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	n-heptán	178
alkin	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	n-heptán	196
alkin	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	n-heptán	225
karbonil	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$	n-hexán	280
karbonil	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{H}$	n-hexán	180
karbonil	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{H}$	n-hexán	293
karboxil	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{OH}$	etanol	204
amido	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$	víz	214
azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	etanol	339
nitro	CH_3NO_2	izooktán	280
nitrozo	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	etiléter	300
nitrozo	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	etiléter	665
nitrát	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	dioxán	270
aromás	benzol (C_6H_6)	n-hexán	204
aromás	benzol (C_6H_6)	n-hexán	256

4.3.2. A berendezés fő részei

Az UV-VIS spektrofotométer fontosabb részei: sugárforrás, optikai rendszer, detektor és vezérlő-értékelő egység.

4.3.3. A sugárforrás

A sugárforrás az alkalmazott hullámhossz tartományban biztosítja a megfelelő fényintenzitású fénysugárzást. Minden műszeres analitikai alkalmazás során az egyik legfontosabb követelmény a stabilitás. Ez elvárható követelmény ennél az analitikai módszernél is (az alkalmazott sugárforrásra is), hogy az analitikai vizsgálatok teljes időtartama alatt stabil (minél kevésbé változó) fényintenzitást biztosítson.

Az UV-VIS spektrofotométereket 160-1100 nm hullámhossz tartományban használjuk analitikai vizsgálatok kivitelezésére. Ennek a hullámhossz tartománynak az alsó részén, a vákuum ultraibolya és az ultraibolya tartományban (160-380 nm) deutérium lámpát, míg a felső részén és az infravörös tartomány alsó részében is (350-2500 nm) volfrám

lámpát szoktunk használni. Mivel 350 nm hullámhossz alatt az üveg elnyeli a sugárzást, ezért a deutérium lámpához kvarc kilépőablakot használunk. A lámpa 30-70 Pa nyomáson és relatíve kis feszültségen (kb. 40 V feszültségű egyenáram) működik.



15. ábra Deutérium lámpák

A 350 nm fölötti hullámhossz tartományban izzószálas lámpát használunk, amely az egész tartományban folytonos spektrumot ad. Az izzószálas lámpáknál egy lezárt és evakuált üveggömbbe spirállá tekert volfrám izzószálat helyeznek, melyet működés közben izzásig hevítenek elektromos árammal. Az izzószálas lámpákon belül, a volfrám halogénizzók egy speciális típusú lámpát jelentenek, mivel a közönséges töltőgázhoz jódot adnak, amely reakcióba lép a lámpa falán szublimált volfrámmal. A keletkező volfrám-jodid szublimálódik újra és az izzószálon elbomlik. Majd az izzószálon a volfrám újra kiválik. Ez a tevékenység azt eredményezi, hogy az ilyen típusú lámpák a teljes élettartamuk alatt a fénykibocsátásuk 90%-át képesek megőrizni. A volfrám halogénizzók búróját is kvarcból készítik, de ebben az esetben a lámpában uralkodó 3500 K-es hőmérséklet indokolja, nem az, hogy UV átlátható legyen.

4.3.4. Mintatartó (küvetta)

A mintatartó (más néven a küvetta) a fentiekben részletezett fényforrás és a detektor között helyezkedik el. A küvetta a legtöbb esetben megközelítően egy centiméter szélességű négyzetalapú hasáb. Mivel a mérés alkalmával fényt kell át bocsátanunk a küvettákon, ezért fényáteresztő anyagból készítik, amely a legtöbbször kvarc, üveg, esetleg műanyag lehet. Attól függően kell kiválasztanunk az alkalmazandó küvetta anyagát, hogy mely hullámhossz tartományban szeretnénk a mérést kivitelezni. A

kvarcküvettát 190 nm-től megközelítően 4000 nm hullámhosszig, az üvegeküvettát 350 nm-től megközelítően 3000 nm-ig használhatjuk. Az üvegből készült eszközök – amennyiben átbocsátjuk rajtuk – az ultraibolya sugárzást (<350 nm) elnyelik, más szavakkal megfogalmazva, nem UV átláthatók. A műanyag küvettákat főként a látható tartományban használjuk. A küvetták szemközti oldalai tökéletesen párhuzamosak, amelyek a fénysugárral derékszöget zárnak be. Mivel bármely anyag (szennyezés), amely a fényútba esik, megghamisít(hat)ja a mérést, ezért a küvetta mérésre használt szembenlévő oldalait kézzel nem szabad megérinteni. A küvetta mérésre nem használt, másik két szemközti oldala matt. Azért, hogy az előbbieken részletezett zavaró szennyező anyagok jelenlétét elkerüljük, a küvetták tisztítására a legmegfelelőbb a salétromsav vagy a királyvíz. A savas mosást követően, desztillált vízzel kell, teljesen alaposan, eltávolítani a savat, majd meg kell szárítani. A szárításhoz viszont nem szabad túl nagy hőmérsékletet (izzítókemence, láng) alkalmazni, mivel az esetben a fényút hossza megváltozik.

4.3.5. Optikai rendszer

Az optikai rendszer feladata a fenti típusú lámpákkal kisugárzott fény felbontása.

Mivel az UV-VIS spektrofotometriás mérésnél a fényelnyelést meghatározott hullámhossz tartományban mérjük, ezért szükség van egy olyan eszközre, amely az adott hullámhosszú fényt elkülöníti a sugárforrás fényének többi alkotójától. Fényfelbontó egységként általában monokromátort, vagy színszűrőket használunk. Általában az egyszerűbb készülékek (pl. a mobil analitikai berendezések) használnak színszűrőket. A színszűrőknek két fő típusát ismerjük: az abszorpciós és az interferencia szűrők. Az abszorpciós szűrők készülhetnek zselatinból, üvegből, folyadékból, vagy műanyagból. A szűrős spektrofotométerek egy szűrő sorozatot tartalmaznak, amellyel kiválaszthatjuk a megfelelő hullámhossz értéket (tartományt). Az ilyen típusú készülékek főként a szélesebb sávok használatára alkalmasak.

4.3.6. Detektor

A spektrofotométerben a detektornak az a feladata, hogy megmérje a sugárforrásból kibocsátott fény intenzitását, az abszorpciót megelőzően (I_0) és azt követően (I). A különböző gyártók különféle típusú detektorokat alkalmaznak, mint pl. fotodiódák,

fotoemissziós csövek, fotoelektron-sokszorozó (PMT) csövek és szilárdtest detektorok (CCD vagy CID). Az előbbi angol mozaikszavak a következőket jelentik: PMT=Photomultiplier Tube, CCD=Charge Coupled Device, CID=Charge Injection Device.

A fotodióda a rá eső fényt alakítja át elektromos árammá. Az elektromos áram nagysága arányos a beeső fény intenzitásával. Léteznek olyan detektorok is, ahol több lineárisan kapcsolt fotodióda található. Ezek száma lehet 128-4096 db. Ezeket úgy nevezett diódasoros detektoroknak hívjuk.

A fotoemissziós csövek evakuált burkolatban található fotokatód-fotoanód kombinációk. A fotodiódához hasonlóan a beeső fény hatására elektromos jelet állít elő, az elektromos jel nagysága arányos a beeső fény intenzitásával. A fotoemissziós csövekben a fotokatódot olyan anyagból készítik, mely felületébe becsapódó fotonok hatására, a fotonok számával arányosan fotoelektronok lépnek ki, amelyek a fotoanód felé vándorolnak, elektromos áramot hozva létre.

A fotoelektron-sokszorozó csövek és a szilárdtest detektorok is szintén a fényintenzitással arányos elektromos jelet adnak a beeső fény hatására, viszont míg a fotoelektron-sokszorozó csövek egy viszonylag szűk hullámhossztartomány detektálására képesek, addig a szilárdtest detektorok, szimultán módon, számos hullámhossztartomány detektálását képesek elvégezni. A diódasoros detektorokhoz hasonlóan, ezáltal a fény nemcsak egy hullámhossz tartománya intenzitásának mérésére alkalmasak, hanem vagy több egyedi hullámhossz tartomány egyidejű mérését, vagy a vizsgált minta fényelnyelésének spektrumát is képesek detektálni.

4.3.7. Az UV-VIS spektrofotométerek különböző típusai

A spektrofotométereket több szempont szerint is csoportosíthatjuk:

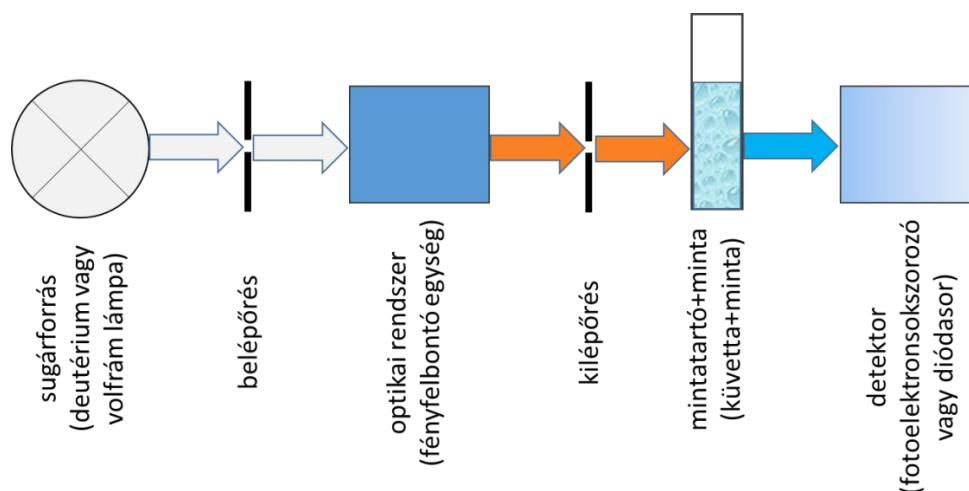
- a) a vizsgálatához alkalmazható hullámhossz tartomány szerint:
 - ultraibolya hullámhossz tartományban működő
 - látható hullámhossz tartományban működő
 - infravörös hullámhossz tartományban működő
 - ezek bizonyos kombinációja
- b) az optikai rendszerben alkalmazott fényfelbontás típusa szerint:

- prizmás
 - rácsos
 - szűrős
- c) a spektrométer felépítése, más néven a működési elve szerint:
- egyfényutas készülékek
 - kétfényutas készülékek

A normál rutin laborvizsgálatok során általában folyékony halmazállapotú (oldat) formában vizsgáljuk a mérendő mintákat. A mérés alkalmával megközelítően 10^{-5} - 10^{-3} mol/dm³ koncentrációjú oldatokat használunk. A folyékony halmazállapot eléréséhez a mérést megelőzően valamilyen típusú mintaelőkészítő tevékenység szükséges, mely lépés a jegyzet korlátait figyelembe véve, nem ennek a jegyzetnek a tárgyalása során kerül kifejtésre.

Egyfényutas spektrofotométerek

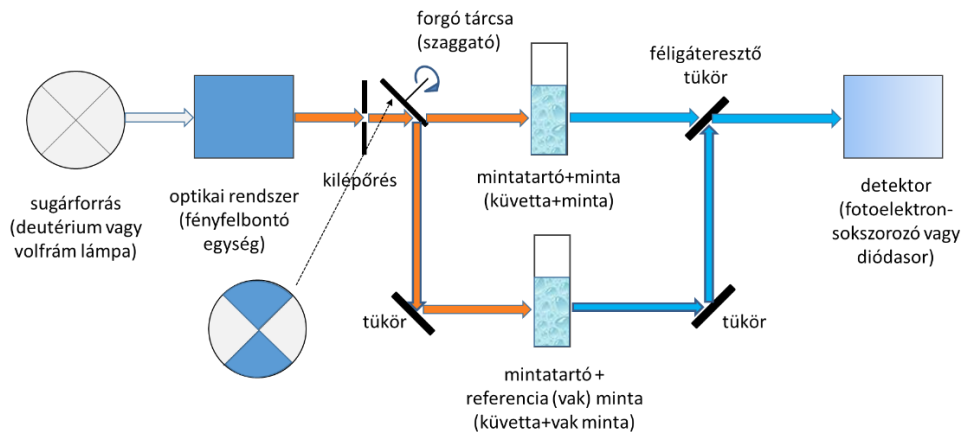
Az analitikai mérés kivitelezésekor vagy egy egyfényutas (16. ábra) vagy egy kétfényutas (17. ábra) készüléket szoktunk alkalmazni, melynél mindenképpen szükséges referencia anyag alkalmazása. Referencia anyagként tiszta oldószert vagy minta nélküli oldatot (vakoldat) szoktunk alkalmazni. Az egyfényutas készüléknél az oldatokat (referencia és mérendő oldatok) egymásután mérjük meg, míg kétfényutas készüléknél, a spektrofotométer, a fénysugarat felváltva vezeti át a minta- és a referenciaoldaton (gyakorlatilag egyidőben végzi a mérést), kiküszöbölve az alapoldat (vakoldat) elnyelését. A legmodernebb készülékek holografikus homorúrácsos polikromátort és diódasoros detektort alkalmaznak. A diódasoros detektor, amely pl. 1024 pixellel rendelkezik, megközelítően 10-20 msec felvételi idő alatt elvégzi a mérést a teljes spektrumra vonatkozóan. Általában hosszútávú stabilitással és hullámhossz reprodukálhatósággal rendelkeznek.



16. ábra Egyfényutas spektrofotométer elvi felépítése

Kétfényutas spektrofotométerek

A 17. ábrán egy kétfényutas spektrofotométer elrendezése látható. A berendezésben egy deutérium vagy egy volfrám lámpát használunk. A fénysugár fénye az optikai rácstra vetődik, amely forgatható, így tudjuk kiválasztani az alkalmazandó hullámhosszt. A



17. ábra Kétfényutas spektrofotométer elvi felépítése

fényútban általában elhelyeznek egy színszűrőt a nem kívánt színek predek kirekesztésére. Egy szaggató (chopper) kettéválasztja a fénysugarat (a fény egyik része áthalad, a másik része visszaverődik). Az egyik (áthaladó) fénysugarat a mintát tartalmazó küvettán vezetjük át, míg a visszaverődő fénysugár a referencia küvettán (vakoldaton) halad át. A referencia küvetta csak oldószert (pl. extraháló oldat vagy nagy tisztaságú víz) tartalmaz. Majd általában ugyanazzal a detektorral (vagy két különálló detektorral) mérjük meg a fénysugarak intenzitását.

Az egy- és kétfényutas UV-VIS készülékek közül a kétfényutas műszerek képviselik a modernebb spektrométereket.

A sugárforrás fényét a szaggató (chopper) egy másodperc alatt többnyire néhányszor szaggatja, ezáltal váltogatja a fényút menetét és a két fényúton történő elemzéssel automatikusan külön-külön való elemzéssel hasonlítja össze a mért abszorbancia (vagy transzmittancia) értékeket.

A kétfényutas spektrofotométerek az egyfényutas készülékekhez képest a következő előnyökkel rendelkeznek:

- Az egyfényutas készülékekbe a mintát és a referencia oldatot felváltva kell behelyeznünk, amely nem teszi túl „kényelmessé” a mérést.
- Amennyiben több hullámhossz alkalmazásával szeretnénk elvégezni a mérést, akkor az oldatok vizsgálatát egymás után tudjuk csak megtenni minden egyes hullámhossz beállításával.
- A kétfényutas spektrofotométerekben a minta oldat automatikus korrekciója, a referencia oldat mérésével egyidőben történik, ezáltal a vizsgálatok pontosabb, precízebb eredményeket tesznek lehetővé.
- A kétfényutas spektrofotométerekben automatikusan változtathatjuk az alkalmazott hullámhosszat, valamint a minta és a referencia oldat mérése egyidőben történik, ezáltal a vizsgálatok szintén pontosabb és precízebb eredményeket fognak szolgáltatni.
- A kétfényutas spektrofotométerekkel automatikus hullámhossz pásztázás (scanning) és folyamatos spektrum analízis is megoldható.

Az UV-VIS molekulaabszorpciós spektrofotometria a következő alkalmazási lehetőségekkel rendelkezik:

- Az ultraibolya és látható tartományba tartozó fénysugár alkalmazásával lehetőségünk van az élelmiszer és élelmiszeralapanyag minták különböző szervetlen és szerves komponensei azonosítására és

- ezeket az elemzéseket főként ezen komponensek mennyiségi meghatározására alkalmazhatjuk.
- Az UV-VIS spektrofotometria, összehasonlítva más analitikai mérőmódszerekkel, valószínűleg sokkal szélesebbkörű elemzést tesz lehetővé, mint bármely más analitikai módszer, azaz az élelmiszer és élelmiszeralapanyag minták legnagyobb számú komponensének analízisét tudjuk ezzel a mérési módszerrel kivitelezni.
- A 10^{-6} - 10^{-4} M koncentrációtartományban viszonylag nagy érzékenység jellemzi.
- Viszonylag jó szelektivitás és pontosság, valamint megközelítően 1-3%-os precizitás jellemzi.
- Könnyű a kezelhetősége és könnyen megoldható adatgyűjtés jellemző a spektrofotométerekre.

4.4. Atomabszorpciós spektrometria (FAAS)

4.4.1. Az atomabszorpciós spektrometria elve

Mint ahogyan a 4.2. fejezetben is említettük, az atomabszorpciós spektrometriában (AAS), ezen belül is a lángatomabszorpciós spektrometriában (FAAS), a vizsgálandó elemmel energiát kell közölnünk. Jelen esetben a láng biztosítja azt az energiát, amely segítségével alapállapotú szabad atomokat hozunk létre, melyen keresztül a vizsgálandó elemre jellemző hullámhosszú fényt bocsátunk és mérjük a fényintenzitás csökkenését. A fényintenzitás csökkenésének mértékét az abszorbancia (A) jellemzi, melyet a következőképpen lehet definiálni. Az abszorbancia (A) az adott λ hullámhosszon mért kezdeti I_0 (a fény intenzitása abszorpció előtt) és az atomgőzön való áthaladás után mért I (a fény intenzitása abszorpció után) hányadosának tízes alapú logaritmus (19).

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (19)$$

ahol

A: abszorbancia

I_0 : a megvilágító fény abszorpciót megelőző kezdeti intenzitása

I : a megvilágító fény abszorpciót követő intenzitása

Az abszorbancia mérését a következő egyenlet (20) alkalmazása mellett használhatjuk mennyiségi meghatározásra. Az abszorbancia egyenesen arányos a vizsgált elem koncentrációjával és azzal a távolsággal, melyben az abszorbancia megvalósul. A 20. egyenletet Lambert-Beer-törvénynek (Bouguer-Lambert-Beer törvénynek is) nevezzük.

$$A = a \cdot c \cdot l \quad (20)$$

ahol

A: abszorbancia

a: abszorpciós koefficiens

c: a mérendő atom koncentrációja az atomizáló térben

l: optikai úthossz, jelen esetben a láng szélessége

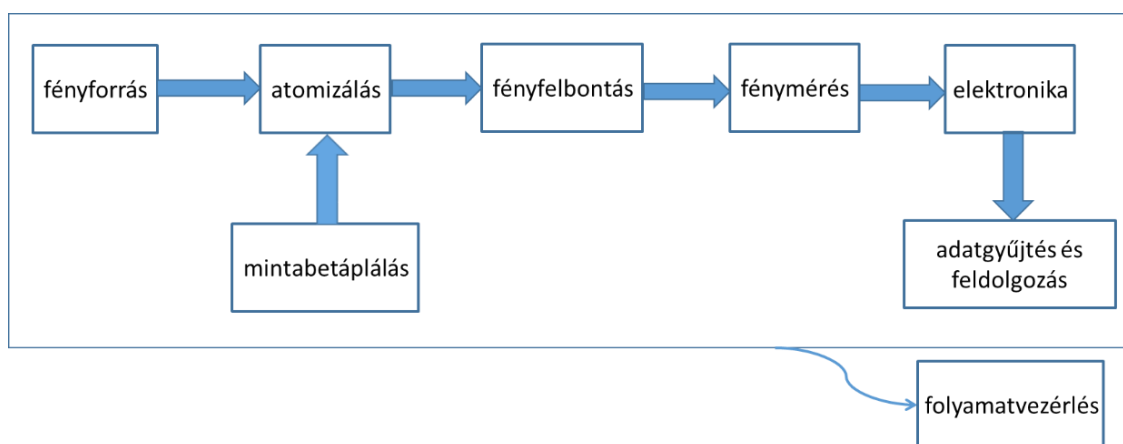
A mérési módszerünk annál érzékenyebb, ha azonos koncentrációjú oldatra, minél nagyobb abszorbanciát (A) tudunk elérni. Ezt úgy tudjuk elérni, ha a szorzat tagjait –

normál értékek között – a lehető legnagyobbra tudjuk növelni. Mivel a 20. egyenletben az „a” abszorpciós koefficiens közel állandó, így ennek nagyságát befolyásolni nem tudjuk. Az elnyelő közeg rétegvastagságát (l) az atomizáló rendszer geometriai elrendezésével adott határok (5-10 cm) között változtathatjuk. Az abszorbancia nagyságát legnagyobb mértékben az alapállapotú atomok koncentrációjának változtatásával befolyásolhatjuk. Az atomabszorpciós módszerek kimutatási képességének növekedését éppen azzal érjük el, hogy egy adott koncentrációjú minta atomizálása során a fénypátyban minél nagyobb atomkoncentrációt hozunk létre.

Az abszorbanciával kapcsolatos további információkat az UV-VIS abszorpciós spektrofotometria tárgyalása során részletezett 14-18. egyenletek, míg a már abszorbeált fénnyel gerjesztett atomok fénykibocsátását a 9-11. egyenletek tartalmazzák. Itt kell megjegyezni, hogy a gerjesztett atom ebben a gerjesztett állapotban rövid ideig, megközelítően 10^{-9} másodpercig tartózkodik, majd visszaugrik az alappályára.

4.4.2. Az atomabszorpciós spektrométerek felépítése, működése

Egy atomabszorpciós spektrométer sematikus felépítése a 18. ábrán látható. Mivel az atomabszorpciós technika fényelnyelésen alapul, így az AAS rendszer működéséhez megvilágító fényforrás szükséges. A fényforrás fénye az atomizáló téren halad keresztül, onnan jut a fényfelbontó egységbe, ahol megtörténik az adott elem adott hullámhosszú vonalának kiválasztása. Az elemző vonal innen a detektorra esik, ahol a fény intenzitásának mérése történik meg. Az atomabszorpciós spektrométerek vezérlését, az adatgyűjtést és kiértékelést egy számítógép végzi.

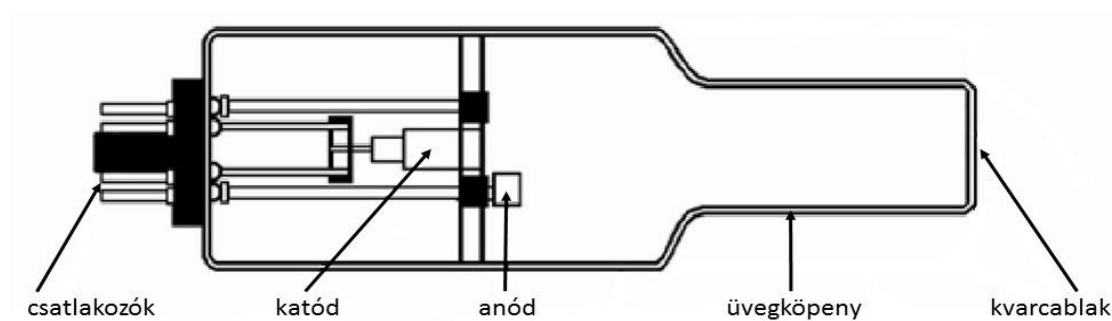


18. ábra Az atomabszorpciós spektrométerek egységei

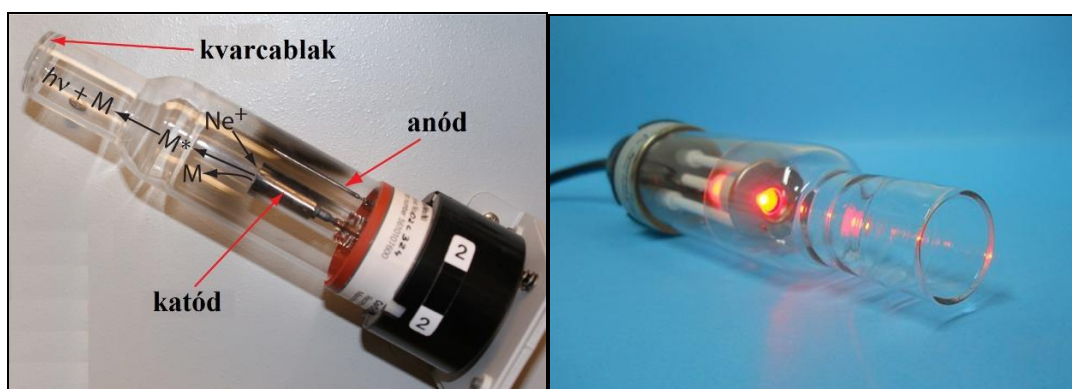
4.4.3. Fényforrás

Az atomabszorpciós készülékhez olyan fényforrás alkalmazása szükséges, mely ugyanazt a hullámhosszúságú fényt bocsátja ki, mint amelyet a meghatározandó szabad alapállapotú atom képes elnyelni. Ennek a feltételnek kétféleképpen tudunk eleget tenni. Az egyik lehetőség, hogy üregkatód lámpát (HCL=Hollow Cathode Lamp) (régebbi nevén vájtkadót lámpát) alkalmazunk, melynek a vonalszélessége 0,01-0,001 nm. A másik megoldás, hogy ugyanilyen vonalszélességű fényintenzitást tudunk előállítani, a 200-800 nm tartományban, intenzív folytonos sugárzású nagynyomású xenonív lámpával. Mivel ennek a sugárzása folytonos, így ebben az esetben a megfelelően keskeny vonalszélességet egy nagy felbontóképességű echelle-rácsos spektrométerrel tudjuk elérni. Mindkét technikai megoldással elegendően keskeny hullámhosszat, jobban mondva hullámhossztartományt tudunk előállítani az abszorpciót megelőző (I_0) és a fényabszorpciót követő (I) fényintenzitások méréséhez.

A manapság beszerezhető üregkatód lámpák, zárt hengeres alakú üvegcsövek, amelyek átmérője 3-6 cm. A bennük található töltőgáz 100-500 Pa (0,001-0,005 bar) nyomású nemesgáz. Többnyire argon vagy neon gázt szoktak alkalmazni. Az üregkatód lámpa (19. ábra, 1-2. képek) üvegből készül, viszont ha az analizálandó elem hullámhossza az ultraibolya tartományba esik, akkor a lámpa végére, ahol a fény kilép az üregkatód lámpából, kvarcablakot alkalmaznak. A lámpa anódja volfrám lemezből készül, míg a hengeres furatos katódot abból az elemből készítik (ha az elem mechanikailag jól megmunkálható), vagy beleépítik, amely elemet vizsgálni akarunk. A katód belső átmérője 2-5 mm. Az atomabszorpciós technikában többnyire egyelemes lámpákat alkalmazunk, de léteznek többelemes lámpák is. Ezek a multielemes lámpák 2-6 elemet tartalmazhatnak. Mivel a multielemes lámpák beszerzési ára az egyelemes lámpákhoz képest nagyobb (akár kétszerese), az élettartamuk viszont inkább kevesebb, így akkor kifizetődő a multielemes lámpák használata, ha azokat elemenként viszonylag kevesebb időtartamig akarjuk használni. Ez azt jelenti, hogy minden elem analíziséhez külön lámpára van szükség. Az üregkatód lámpáknál általában 100-300 volt feszültséget és 5-20 mA fűtőáramot alkalmazunk, melynek élettartama 1000-2000 üzemóra.



19. ábra: Az üregkatód lámpa



1. kép

Üregkatód lámpa részei

2. kép

Üregkatód lámpa világítás közben

Számos elem analízisre szánt vonalának hullámhossza az ultraibolya tartományba (200 nm közelébe vagy az alá) esik (ilyen elemek például az arzén, a cink, a higany, a kadmium és a szelén). Ebben a tartományban az üregkatód lámpák fénye általában már kis fényintenzitású lesz, mivel a levegő molekuláris oxigénje a kisugárzott fény jelentős részét elnyeli. Ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki az elektród nélküli kisülési lámpákat (EDL=Electrodeless Discharge Lamp). Az EDL lámpa legfontosabb eleme egy zárt kvarcból készült ampulla (2-3 cm hosszú, 1 cm átmérőjű). Az elemnek ebben az ampullában található illékony vegyületét, például halogenidjét kis nyomású (100 Pa) nemesgáz térben, nagyfrekvenciás generátorral (27,12 MHz frekvencia) gerjesztik, mely eredményeként a kibocsátott fény intenzitása az üregkatód lámpához képest megközelítően 6-10-szerese lesz.

4.4.4. Mintabetáplálás

Az atomspektrometriai módszereknél általában lehetséges gáz, folyadék és szilárd halmazállapotú minták vizsgálata is, viszont leggyakrabban folyékony halmazállapotú

minták analízisét szoktuk végezni. Ezért abban az esetben, ha nem folyékony halmazállapotú mintával van dolgunk, akkor többnyire olyan mintaelőkészítő módszert alkalmazunk, mellyel a mintát oldatba visszük. Ezek közé tartoznak főként a különböző roncsolási és extrakciós módszerek. A vizes oldatok használatát azok könnyű kezelhetősége és homogenitása indokolja, valamint fontos, hogy a vizes oldatú mintát egyenletes sebességgel, ellenőrizhető és reprodukálható módon lehessen bevinni az atomizáló térbe. Továbbá ezekhez tudunk egyszerűbben kalibráló sort készíteni, valamint a folyékony halmazállapotú minták automatikus mérése, automata mintaváltók segítségével megoldható. Ezáltal az analitikai berendezés kényelmesebb kezelhetőségét eredményezi, valamint a mérő személy számára kedvezőbb időbeosztást tesz lehetővé.

Az atomabszorpciós spektrometriában számos mintabeviteli módszer áll rendelkezésre, amelyek közül, a fenti megfontolások miatt, az élelmiszer minták vizsgálatára a porlasztásos technikák terjedtek el széleskörűen. Az oldatok porlasztásánál a folyadékokból mikroméretű cseppeket hozunk létre. Általában pneumatikus porlasztót, ritkábban ultrahangos porlasztót (USN=Ultrasonic Nebulizer) és nagyon-nagyon ritkán hidraulikus nagynyomású porlasztót (HHPN=Hydraulic High Pressure Nebulizer) használunk. A pneumatikus porlasztóval történő mintabevitelnél szinte minden esetben a láng égését tápláló gázt (általában levegőt) használjuk porlasztógázként is. A különböző porlasztásos technikákat (pneumatikus porlasztás, ultrahangos porlasztás és hidraulikus nagynyomású porlasztás) a 4.5.4. fejezetben részletezzük.

A folyadékok porlasztásánál a két legfontosabb paraméter a mintabevitel sebessége és a porlasztási hatásfok. A mintabevitel sebessége a porlasztó által időegység alatt felszívott, elporlasztott oldat térfogata, többnyire cm^3/perc (mL/perc) mértékegységben. Az atomabszorpciós porlasztók esetén a mintabeviteli sebesség átlagban $4\text{-}6 \text{ cm}^3/\text{perc}$.

A mintabevitel (porlasztás) hatásfoka azt fejezi ki, hogy a porlasztott oldatból hány százalék jut be az atomizáló térbe, a lángatomabszorpciós spektrometria esetén a lángba. A lángok alkalmazásakor a pneumatikus porlasztók hatásfoka általában $5\text{-}10\%$.

A hazai és nemzetközi szakirodalmak szerint a porlasztott cseppek megközelítően $10 \mu\text{m}$ alatti frakciója jut be a lángba. Ezen frakció mennyisége, pneumatikus porlasztók esetén, a Nukiyama-Tanasawa empirikus összefüggés segítségével határozható meg.

$$d_s = \frac{585}{v_g - v_l} \cdot \left(\frac{\gamma}{\rho}\right)^{0,5} + 597 \cdot \left(\frac{\eta}{(\gamma \cdot \rho)^{0,5}}\right)^{0,45} \cdot \left(\frac{1000 \cdot F_l}{F_g}\right)^{1,5} \quad (21)$$

ahol

d_s : a cseppek Sauter átlagos átmérője (a csepp térfogat/felület aránya)

v_g : a porlasztó gáz lineáris áramlási sebessége

v_l : a porlasztott folyadék lineáris áramlási sebessége

γ : a mintaoldat felületi feszültsége

ρ : a mintaoldat sűrűsége

η : a mintaoldat viszkozitása

F_l : a mintaoldat térfogati áramlási sebessége

F_g : a porlasztógáz térfogati áramlási sebessége

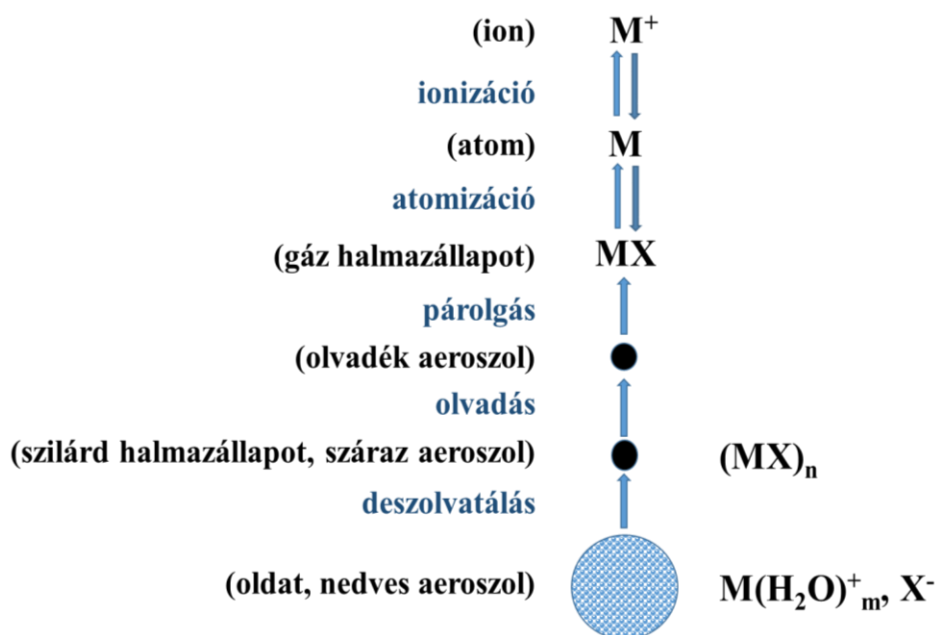
Minden analitikai technikában, így az atomabszorpciós technikában is az egyik legfontosabb elvárás, hogy a mérés alatt, az összes paraméter, így a porlasztási sebesség és hatásfok is állandó legyen. A Nukiyama-Tanasawa egyenletben részletezett paraméterek (a vizsgált oldatok felületi feszültsége, sűrűsége, viszkozitása, áramlási sebessége) figyelembevételével már előre vetíthetjük számunkra, hogy a műszeres analitikai módszerekben nagy jelentőséggel bír, hogy a kalibráló és a minta oldatok minél teljesebb hasonlóságot (Matrix Matching) megoldjuk, biztosítsuk.

4.4.5. Atomizálási módszerek

Az atomabszorpciós spektrometriai méréseket három típusba sorolhatjuk: 1.) lángatomabszorpciós spektrometria (FAAS=Flame Atomic Absorption Spectrometry), 2.) grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GF-AAS=Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry), 3.) hidrid és hideggőz technikás atomabszorpciós spektrometria (HG-AAS=Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, CV-AAS=Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry). A hidrid és hideggőz technikás atomabszorpciós spektrometriát a 4.5.4.2. fejezetben fogjuk bővebben tárgyalni, mely technika az induktív csatolású spektrométereknél is alkalmazható speciális mintabeviteli technikaként.

4.4.5.1. Láng mint atomizáló tér

A 4.4.4. fejezetben részletezett mintabetáplálás segíti elő, hogy egyenletes sebességgel, reprodukálható módon juttassuk be a mintát a lángatomabszorpciós spektrométer atomizáló terébe, ahol megtörténik a vizsgálandó elem alapállapotú szabad atomokká alakulása. Ezt a folyamatot, azaz a porlasztóból a lángba bejutó nedves aeroszol fontosabb átalakulási lépéseit mutatja be a 20. ábra.



20. ábra A lángba belépő nedves aeroszol legfontosabb átalakulási folyamatai

A 20. ábra alsó részén látható aeroszol részecske 10 µm alatti méretű, melyet azért hívunk nedves aeroszonnak, mivel vizes oldat esetén hidratált (egyéb oldószer esetén szolvatált) állapotban található, melynek deszolvatálása már megkezdődik az égőfejbe lépésekor, ugyanis az atomabszorpciós méréseknél használt acetilén-levegő láng réses égőfejének üzemi hőmérséklete 110-120°C. Amikor az aeroszol részecskék bepárlódása megtörténik, akkor a szilárd halmazállapotú száraz aeroszol részecskék vagy megolvadnak és aztán párolognak el, vagy közvetlenül szilárd halmazállapotból gázhalmazállapotba mennek, azaz szublimálódnak. A gáz halmazállapotú molekulák homolitikus bomlás következtében szabad, alapállapotú atomokká alakulnak. Az atomabszorpciós spektrometriával foglalkozók az ebben az állapotban lévő frakció arányát próbálják mindinkább növelni, ugyanis az üregkatód lámpából származó karakterisztikus sugárzást (az adott elemre jellemző hullámhosszú) a szabad, alapállapotú atomok tudják abszorbeálni. Ezáltal vagyunk képesek az analitikai mérést

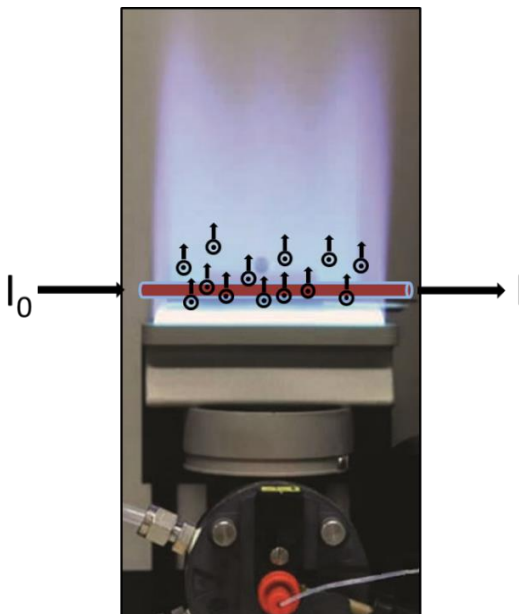
kivitelezni. Mivel a lángban egyszerre különböző állapotú részecskék fordulnak elő, mint például szabad, alapállapotú atomok (ez számunkra a lényeges), nem szabad atomok (molekulák), gerjesztett atomok, ionok, gerjesztett ionok, ezért nagyon fontos kiválasztani azt a kompromisszumos paraméteregyüttest, amely alkalmazásánál a szabad, alapállapotú atomok minél nagyobb hányadát tudjuk előállítani a fényabszorpcióhoz. Például, ha a láng hőmérséklete nem elegendően nagy, akkor az adott elem nem képes atomizálódni, fémoxidok, fémhidroxidok formájában marad. Ha viszont a láng hőmérséklete túl nagy, akkor az atomizációs lépés utáni ionizációt, vagy gerjesztést segítjük elő, mellyel viszont csökkentjük a szabad, alapállapotú atomok arányát.

7. táblázat A lángatomabszorpciós spektrometriában használt lángok és azok paraméterei

éghető gáz	oxidáló gáz	reakcióhő (kJ)	gyulladás hőmérséklet (K)	égési sebesség (cm/s)	láng-hőmérséklet (K)
acetilén (C ₂ H ₂)	levegő	1260	620	160	2500
acetilén (C ₂ H ₂)	dinitrogén-oxid (N ₂ O)	1680		180	3100
hidrogén (H ₂)	levegő	250	800	310	2300
hidrogén (H ₂)	oxigén (O ₂)	250	720	1400	3000
propán (C ₃ H ₈)	levegő	2220	510	80	2200
bután (C ₄ H ₁₀)	levegő	2890	490	80	2200

Az atomabszorpciós spektrometria elmúlt 60 éve során főként acetilén-levegő lángot alkalmaztak, mely gázelegy égetésével mindig azonos hőmérsékletű, kémiai összetételű lángot tudunk előállítani, azaz megfelelően tudjuk reprodukálni. Az égéshez egy éghető és egy oxidáló (az égést tápláló) gázra van szükségünk, melyek arányát gáz-áramlásmérővel tudjuk szabályozni. Az atomabszorpciós spektrometriában különböző összetételű lángokat próbáltak ki, viszont manapság nagyrészt az acetilén-levegő lángot, másodsorban az acetilén-dinitrogén-oxid lángot használják. A többi lángtípus gyakorlatban való alkalmazása elenyészőnek mondható. Az acetilén-dinitrogén-oxid

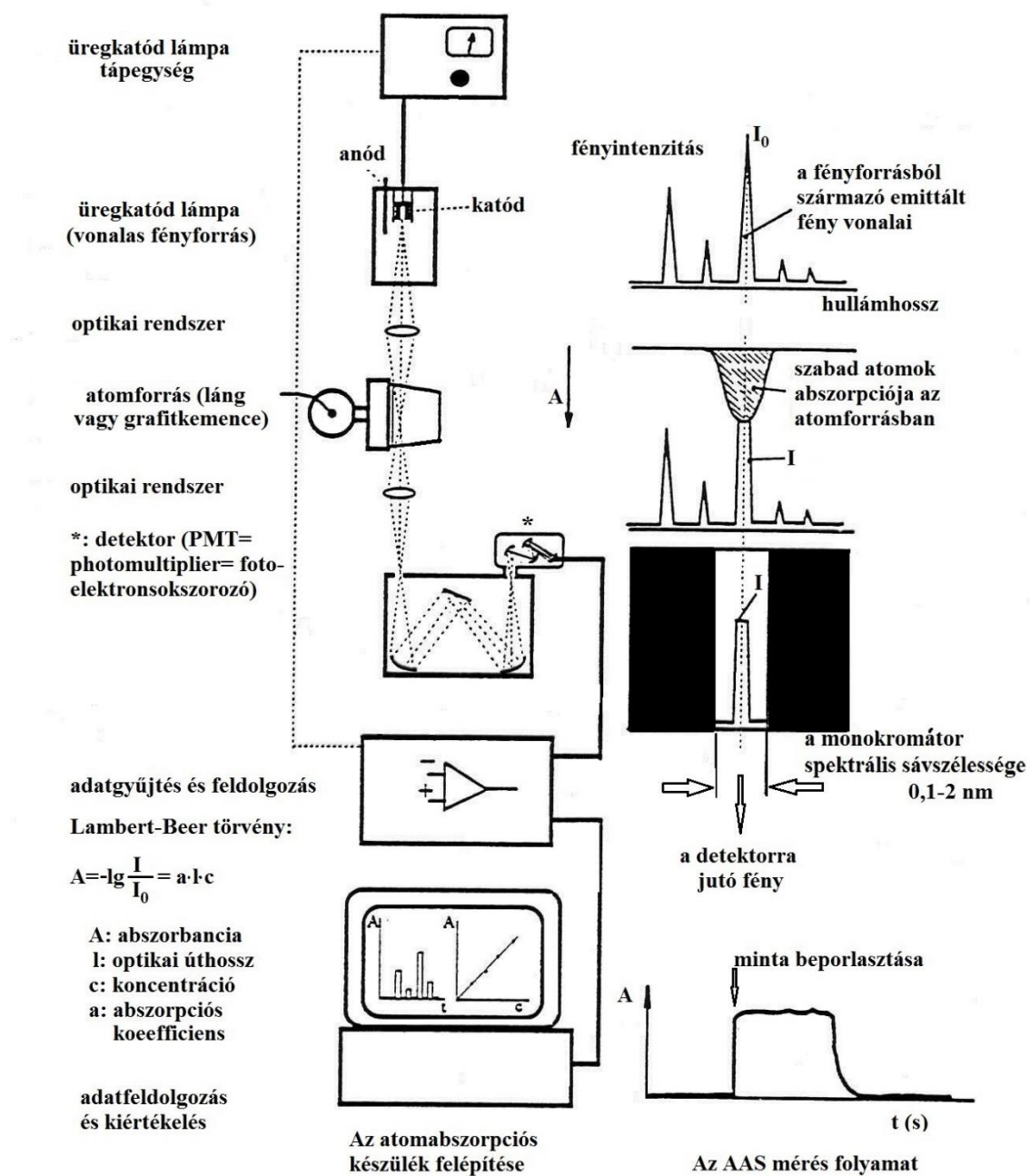
előforduló gyököket, valamint azok térbeli eloszlását, a láng kémiai jellegzetességét, redukáló vagy oxidáló tulajdonságát. A 22. ábrán egy égőfejet és a mérés során kialakuló acetilén-levegő lángot vehetjük szemügyre.



22. ábra Az FAAS égőfej és az acetilén-levegő láng

A 23. ábra bal és jobb oldalán párhuzamosan láthatjuk, hogy egy atomabszorpciós spektrométer milyen egységekből épül fel, valamint hogy azokban milyen fizikai folyamatok játszódnak le. Az ábra bal oldalán lévő üregkatód lámpa karakterisztikus fényt bocsát ki, amelyek közül, lehetőség szerint, a legintenzívebb hullámhosszú vonalat választjuk ki, amely az ábra jobb oldalának közepén található. A következő lépésben a minta beporlasztása történik meg az atomizáló térbe, amely lángatomabszorpció esetén láng, grafitkemencés atomabszorpció esetén pedig grafitkemence. Az atomforrásban képződő szabad alapállapotú atomok fényt abszorbeálnak, mely fénygyengülés gyakorlatilag az oldatbeli koncentrációjukkal arányos. Az optikai rendszer segítségével választjuk ki az elemzésre legalkalmasabb (a legnagyobb fénygyengülést adó) vonalat. Az elem legérzékenyebb vonala abszorpciót megelőző (I_0) és az azt követő intenzitásának (I) ismeretében képezzük az abszorbanciát (A), amely a Lambert-Beer törvénynek (20. egyenlet) megfelelően egyenesen arányos a meghatározandó elem (az analit) koncentrációjával (c). Az atomabszorpciós spektrometria relatív mérési módszer, amely azt jelenti, hogy a mérést megelőzően ismert koncentrációjú standard oldatokkal kalibrálni szükséges a készüléket. Majd az

ismeretlen koncentrációjú oldat mérésekor adódó abszorbanciát behelyettesítjük az illesztett kalibrációs görbébe és megkeressük az abszorbanciához tartozó koncentrációt.

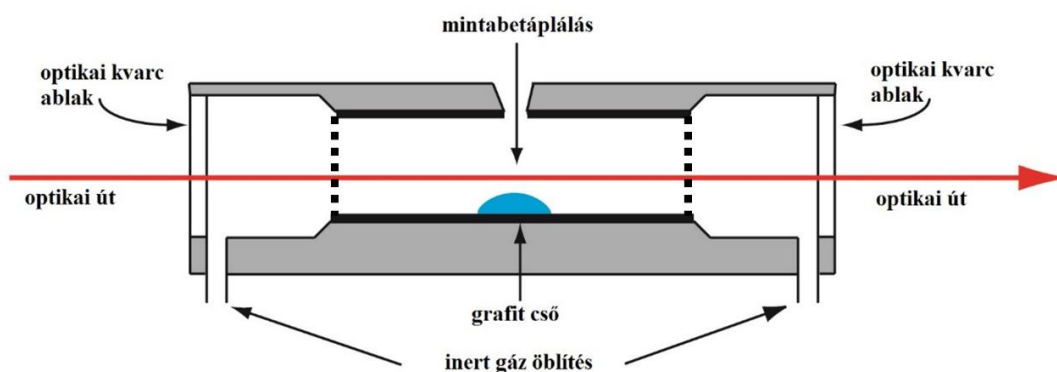


23. ábra Az atomabszorpciós spektrométer felépítése és az abban lejátszódó fényabszorpcióra alapuló mérési folyamat

4.4.5.2. Grafitkemence mint atomizáló tér

A szabad alapállapotú atomok előállítását nemcsak láng segítségével lehet megvalósítani, hanem a 20. ábrán bemutatott folyamatok kivitelezéséhez szükséges

hőmérsékletet (mint a lángoknál lévő 2500-3000 K), termikus energiát, grafitcsőben is biztosíthatjuk, melyhez az energiát elektromos áram szolgáltatja. A grafitkemence egy 20-30 mm hosszúságú 5-8 mm belső átmérőjű vízszintesen elhelyezkedő grafitcső (24. ábra). A grafitcső felső részén, hosszanti dimenzióját tekintve a közepén, egy 1-1,5 mm átmérőjű lyukon lehet a csőbe bejuttatni az 5-50 μL térfogatú mintát. A grafitcsövet két szénrúd fogja közre. Manapság a cső fűtését többnyire keresztirányú fűtésűre alakítják ki, mivel ez jobb megoldású, mint a hosszantiirányú fűtés. A keresztirányú fűtéssel a grafitküvetta felfűtése során egyenletes, azaz ugyanolyan hőmérsékletű lesz a grafitcső a cső teljes hossza mentén. A grafitkemence alsó része környékén vezetik be a grafitcső védelmét biztosító argongázt, amely áramlásával végeredményben kívül-belül körbeveszi a grafitcsövet, ezáltal megvédi a levegő oxigénjétől. A meghatározandó oldatot, vagy közvetlenül a grafitcsőbe (24. ábra) tesszük bele, vagy egy úgynevezett L'vov platformba (3. kép), amelyet a grafitcső aljába helyezünk. A L'vov platform úgy van kialakítva, hogy beilleszthető legyen egy grafitcső alsó részébe (3. kép). A L'vov platform alkalmazásával elérhetjük, hogy az atomizáló tér hőmérséklete elegendően magas legyen a minél teljesebb atomizáció kialakulásához. Ehhez hőmérséklet késleltetést kell alkalmazni, amit a L'vov platformmal meg tudunk valósítani. A L'vov platformmal, amely egy kis peremmel ellátott pirolitikus grafitlap, tehát mind analitikailag, mind élettartamát tekintve kedvezőbb körülményeket tudunk elérni. Ugyanez a megállapítás igaz a pirolizált grafitcsővekre (4. kép) is, melyek alkalmazásával megakadályozhatjuk az oldatok beszívódását a grafitcső falába. Egy modern grafitcső élettartama megközelítően 200-1000 felfűtés, mely értéket a vizsgált minta összetétele, valamint az alkalmazott maximális hőmérséklet határoz meg.



24. ábra A grafitkemencés atomabszorpciós spektrométerben használt grafitcső

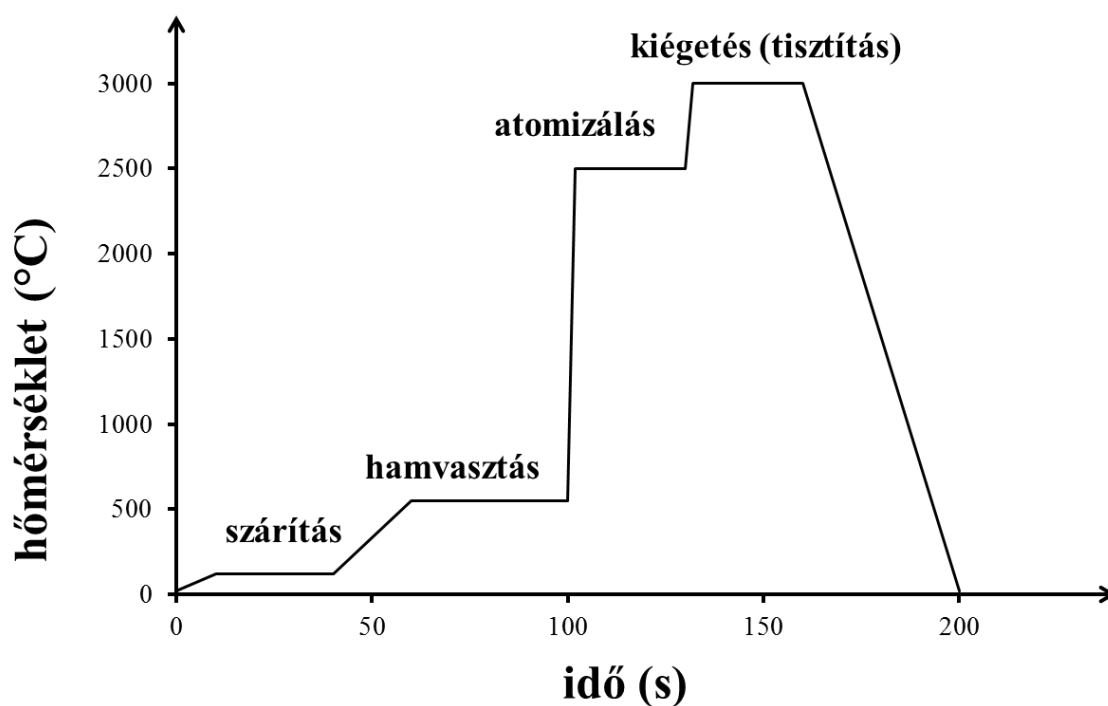


3. kép
L'vov platform



4. kép
Pirolizált grafitcső

Miután a folyékony halmazállapotú mintát becsöppentjük a grafitcsőbe, akkor egy felfűtési programot alkalmazunk a grafitkemencés atomabszorpciós készülékben, mely hőmérsékletlépcsőit a 25. ábra szemlélteti.



25. ábra A grafitkemence fűtési programja

A becsöppentés után az első lépés a szárítás (105-150°C). A szárítás folyamán a minta bepárlódik. Az oldószer (többnyire a víz) elpárolog, a szárazanyag pedig a grafitcső belső falán marad. A szárítási hőmérsékletet az oldószer forráspontjához kell igazítani. Ha ez a hőmérséklet magasabb, mint az oldószer forráspontja, akkor a forrásban lévő

minta szétfröcsög és szétkenődik a csőben. Ha viszont túl alacsony, akkor nem történik meg a minta beszáradása.

A második lépcső a hamvasztási lépés (300-1500°C). Ebben a lépcsőben történik meg a minta hamvasztása, hőbontása, amely során az összes kísérő anyag, főként szerves anyag elbomlik és szervesetlen anyaggá alakul. Ezáltal olyan illékony, szervesetlen komponenseket tartalmazó mintát hozunk létre, amelynek a következő lépésben történő atomizációjával minél kisebb zavaró hatást tudunk elérni. Olyan hőmérséklet értéket érdemes beállítanunk, amely során a kísérő anyag eltávozik, viszont az analizálandó elem teljes mennyisége a grafitcsőben marad.

A harmadik lépés az atomizálás (1200-2700°C). Ebben a lépésben az összes szilárd anyag elpárologtatása, majd az analízishez szükséges atomgőz (szabad alapállapotú atomok) kialakítása történik. Ebben a lépésben a vizsgált elem tulajdonságai figyelembevételével kell megválasztanunk az optimális hőmérsékletet.

A következő fűtési lépcsőben (2000-2800°C) a grafitcső tisztítása történik meg, mely során az összes visszamaradó terméket eltávolítjuk a csőből. Ezáltal felkészítjük a csövet a következő minta mérésére (memóriaeffektus elkerülése).

A fűtési program utolsó lépése a grafitcső lehűtése, mely során a grafitcsövet megközelítően szobahőmérsékletre hűtjük vissza, azért hogy a következő mintát becsöppenthessük.

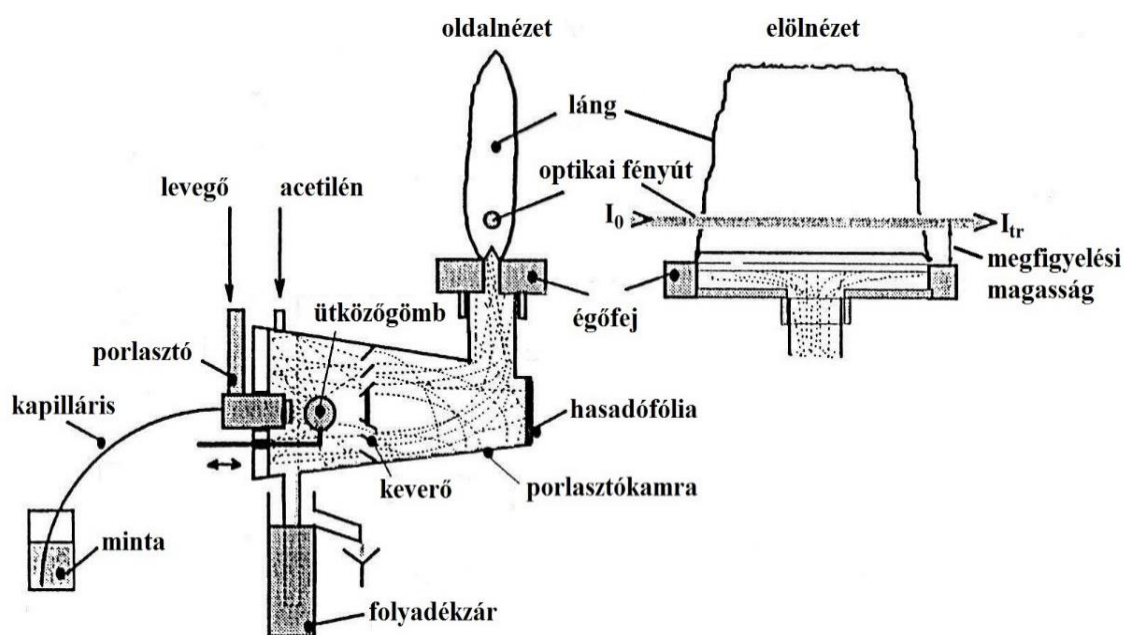
4.4.5.3. Az FAAS és a GF-AAS kimutatási határának összehasonlítása

A grafitkemencés atomabszorpciós spektrométerek (GF-AAS) megközelítően három nagyságrenddel kisebb koncentrációk meghatározására alkalmasak, mint a lángatomabszorpciós spektrométerek (FAAS). Ennek kialakulásához a következő fő tényezők játszanak szerepet:

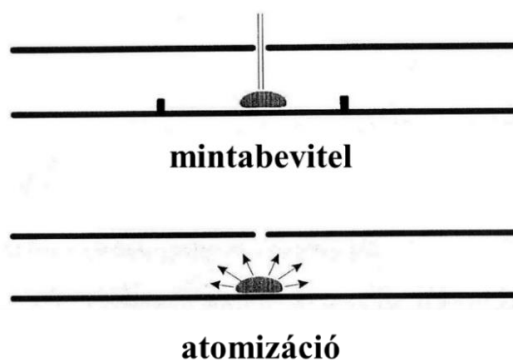
- A grafitcsőben és a lángban az üreghatózó lámpa fénynyalábja egyaránt egy szűk csatornát világít át. Viszont, amíg a lángban a szabad alapállapotú atomok nagy sebességgel áramlanak el ebben a csatornában, ahol az atomok tartózkodási ideje csupán 10^{-5} - 10^{-4} s (22. ábra), addig a grafitcsőben a szabad

alapállapotú atomok tartózkodási ideje másodperces időtartamú. Ez a tényező jelentősen növeli az abszorbancia nagyságát (20. egyenlet).

- Mivel a grafitcső (24. ábra, 4. kép) egy kisebb méretű atomizáló teret képvisel (hosszúsága: 20-30 mm, belső átmérője: 5-8 mm), mint amit egy széles (szélessége: 5-10 cm) égőfejen kialakított keskeny keresztmetszetű (mélysége: 1-3 cm) láng (26. ábra) képvisel, így a lángba beporlasztott minta nagyobb hígulásával kell számolnunk, mint grafitcső esetén.
- A grafitkemencében a mintabevitel hatásfoka megközelítően 100%, mivel az atomizációkor a becseppentett minta közel 100%-a a csőben fog tartózkodni (27. ábra). A lángba viszont, a porlasztási hatásfok miatt, csak a beporlasztott minta maximum 10%-a fog bejutni (28. ábra).
- Az összehasonlítás előbbi pontjához tartozik még, hogy az FAAS esetén percenként néhány milliliter (4-6) mintából fog beporlasztódni a 10%-a, a GF-AAS esetén pedig az 5-50 μL mintának marad bent a közel 100%-a. Ez a tény a láng esetén biztosít nagyobb minta hányadot az atomizáló térben.



26. ábra Az FAAS készülék porlasztó-égő rendszere

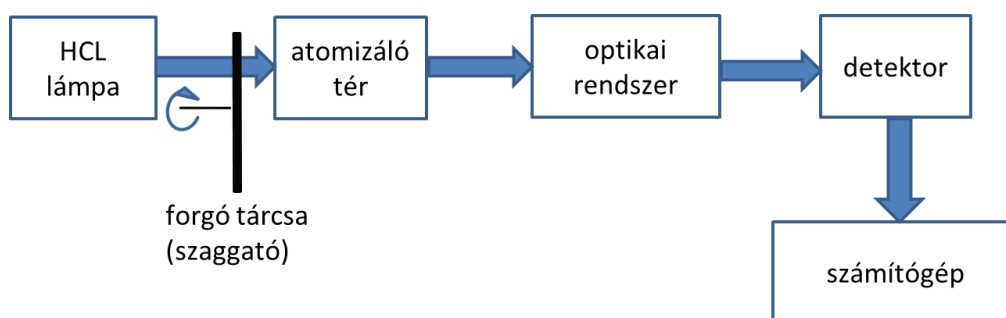


27. ábra A grafitkemence mintabeviteli hatásfoka megközelítően 100%

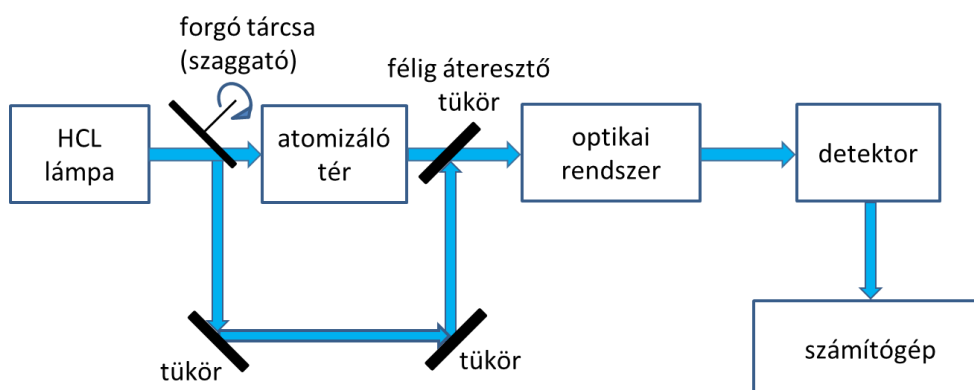
4.4.6. Optikai rendszer

Egy- és kétfényutas atomabszorpciós készülékek

A különböző készülékgyártók, optikai elrendezés szerint, forgalmaznak egyfényutas és kétfényutas, valamint egysatornás és többcsatornás atomabszorpciós készülékeket. Az egyfényutas készülék sematikus egységeit a 28. ábrán, míg a kétfényutas készülék egységeinek elrendezését a 29. ábrán láthatjuk.



28. ábra Az egyfényutas atomabszorpciós spektrométer sematikus vázlata



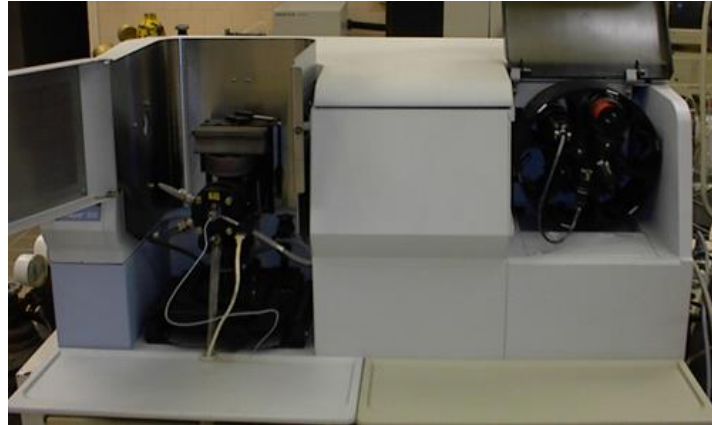
29. ábra A kétfényutas atomabszorpciós spektrométer sematikus vázlata

Az egyfényutas elrendezés (28. ábra) esetén az üregkatód lámpa fénye közvetlenül az atomizáló téren keresztül jut be az optikai rendszerbe, majd a detektorba. A minta atomizáló térbe vezetése előtt mérjük az I_0 kezdeti fényintenzitást. Erre az értékre történik a készülék nullázása. Majd a mérés közben ehhez a kezdeti fényintenzitáshoz hasonlítjuk az abszorpciót követő fényintenzitást (I). A mérés alatt viszont ha megváltozik a lámpa fényintenzitása (pl. bármely elektromos ingadozás miatt), akkor ezáltal hibával terhelt eredményt kapunk, mivel a kezdeti (korábbi) fényintenzitáshoz hasonlítjuk. Ezt a hibát a kétfényutas atomabszorpciós készülékkel (29. ábra) tudjuk kiküszöbölni, melyben egy forgó tárcsát (chopper) alkalmazva, az abszorpciót megelőző és az azt követő intenzitást egyidőben mérjük és az aktuális fénygyengülést a kettő különbsége fogja adni. A forgó tárcsa forgatásával (17. és 29. ábra) a mérés alatt másodpercenként 50-100-szor felváltva méri a készülék mindkét fényintenzitást. Amikor a forgó tárcsa nyílására esik az üregkatód lámpa fénye, akkor a fény közvetlenül az atomizáló téren (láng vagy grafitkemence) halad keresztül és megtörténik a fényabszorpció. Amikor a forgó tárcsa tükör része kerül a fényútba, akkor innen tükrök segítségével kikerülve éri el a detektort fényabszorpció nélkül.

Míg az előző ábrákon az AAS készülékek sematikus egységeit láthattuk, addig az 5. és a 6. képeken vehetjük szemügyre, hogy hogyan is néz ki a valóságban egy lángatomabszorpciós készülék. Az 5. képen egy Zeiss, míg a 6. képen egy Perkin-Elmer gyártmányú (kinyitva az atomforrás és az üregkatód lámpa tartó része, hogy megfigyelhessük alaposan) lángatomabszorpciós készülék képe látható.



5. kép Zeiss gyártmányú AAS készülék



6. kép Perkin-Elmer gyártmányú AAS készülék

Egy- és többcsatornás atomabszorpciós készülékek

Ezen túlmenően léteznek egy- és többcsatornás atomabszorpciós készülékek. Az AAS készülékek ilyen besorolása alatt azt értjük, hogy egyszerre hány elemet tudunk mérni a készülékünkkel. A manapság kereskedelmi forgalomba kerülő AAS készülékek, anyagi megfontolások miatt, többnyire csupán egycsatornásak. Ez azt jelenti, hogy az AAS készülék egyszerre egy lámpa alkalmazásával egy időben egy elemet képes csak mérni.

Mivel az elemzés egy hullámhosszon történik, amely a 23. ábra jobb oldalán is látható, ezért az üregkatód lámpa fényéből, lehetőleg a legalkalmasabb (a legnagyobb abszorbanciát eredményező) fénysugarat érdemes kiválasztanunk, amelyet az optikai rendszer segítségével tudunk elvégezni. A vizsgálatra szánt vonal (hullámhossz) kiválasztását monokromátor segítségével végezzük. A monokromátor szó mono előtagja „egy”-et jelent, míg a görög chromos szó „szín”-t jelent. Tehát szó szerinti fordításban „egy szín”, azaz egy adott hullámhossz kiválasztását jelenti, melyben a fő szerepet az optikai rács, a szűrő, vagy a prizma látja el. A szűrő lehet festékszűrő, vagy interferencia-szűrő. Ezek közül a legmodernebbnek, leginkább használt eszköznek az optikai rács számít. A manapság alkalmazott reflexiós optikai rácsokon nagyszámú (70-4800 vonal/mm) ugyanolyan alakú, egyforma távolságra lévő, párhuzamos barázdát alakítanak ki, amelyre beeső fényt onnan visszaverődve, a rács különböző hullámhosszúságú komponensekre bontja. Minél nagyobb számú barázdát tartalmaznak, annál nagyobb azok fényfelbontó képessége. Az optikai rácsról visszaverődő adott hullámhosszú fénynek, a fényfelbontást követően, egy irányban nemcsak egy

hullámhosszúságú fénye jelenik meg, hanem annak többszöröse ($n \cdot \lambda$) is, amelyeket színképrendeknek nevezünk.

Tíz évvel ezelőtt jelent meg a piacon a nagyfelbontású, folytonos sugárforrással rendelkező AAS, melyben xenonív-lámpát alkalmaznak. Hullámhossztartománya 185-900 nm. A fényfelbontást Echelle optikával (lásd részletesen a 4.5.5. fejezetben) végzik, melynél a megfelelő fényfelbontást úgy érik el, hogy a vizsgálatra alkalmazott hullámhosszat a színkép 50-150. színképrendjében használják. Emellett kell megemlítenünk, hogy a fenti megfelelő fényfelbontást az Echelle optikában prizma és optikai rács egyidejű alkalmazásával érik el. A nagy felbontású AAS készülékben a fényintenzitás detektálása szilárdtest detektorral történik, mely a kereskedelmi forgalomban kapható készülékben CCD (Charge Coupled Device) detektor. A gyári készülékek detektálást végző felülete 1024X1024 pixelből áll, amelyben az egyes pixelek mérete 24X24 μm . Az Echelle optikának és a folytonos sugárforrásnak köszönhetően az egyes pixeleket egyidejűleg tudják megvilágítani és azokból kiolvasni a mérési eredményeket. Ezáltal lehetővé válik a szimultán multieleemes AAS mérés megvalósítása.

Háttérkorrekciós módszerek

Az atomabszorpciós mérésben a fénygyengülést nemcsak fényabszorpció eredményezi, hanem fényszóródás is. (Megjegyzés: ha egy lámpa elé tesszük a kezünket, akkor fénygyengülést tapasztalunk, viszont ez közel sem nevezhető abszorpciónak.) Az atomabszorpciós spektrometriában ilyen jelentős zavaró hatást akkor tapasztalunk, ha nagy koncentrációjú mintaoldatot vizsgálunk lángban, vagy még inkább jelentkezik, ha grafítkemencét használunk. Ez esetben a fényútba kerülő szilárd részecskéken történő fényszóródás is fénygyengülést eredményez, amelyet a készülékkel látszólagos fényabszorpciónak érzékeljük. A nettó fényabszorpciót akkor kapjuk meg, ha valamilyen típusú háttérkorrekciós módszert alkalmazunk az optikai zavaró hatás kiküszöbölése céljából.

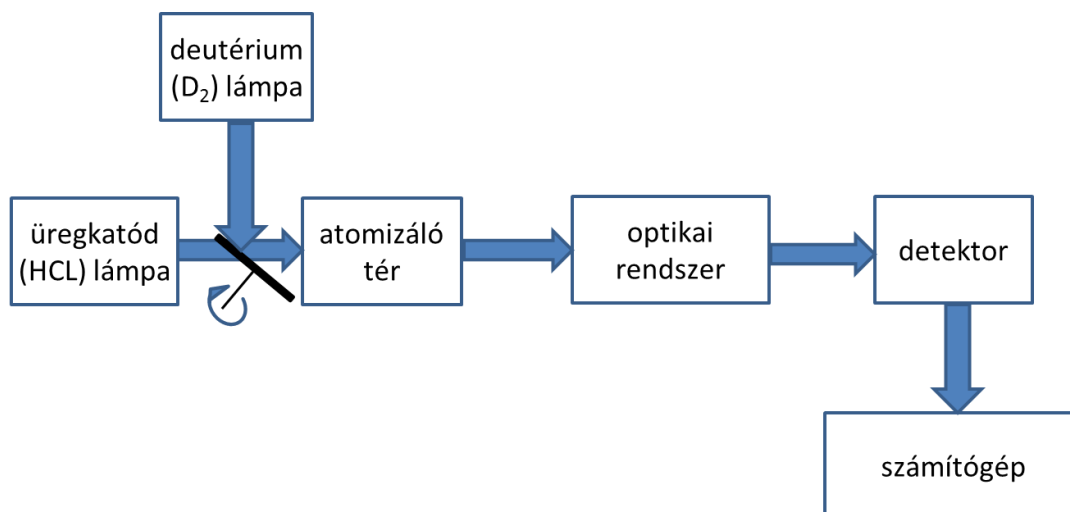
A háttérkorrekciós módszerek:

- Kétvonalas módszer
- Deutérium lámpás háttérkorrekció
- Zeeman háttérkorrekció

- Smith-Hieftje háttérkorrekció

A kétvonalas módszer esetén a mintát két színekvonalon mérjük. Az egyik a vizsgált elem elemzővonala, a másik egy olyan (közeli), amely nem a vizsgált elemtől származik.

Mivel a fényszóródás hullámhosszfüggő jelenség, ezért főként az ultraibolya színek tartományban szükséges háttérkorrekciót alkalmazni. Erre az egyik legmegfelelőbb a deutérium lámpás háttérkorrekció. A D_2 lámpa 180-400 nm tartományban folytonos színekpet szolgáltat. A magasabb hullámhossz tartományban ugyanez wolfram lámpával oldható meg. Az üreghatód lámpával és a deutérium lámpával külön-külön (gyakorlatilag egyidőben) végzett mérési eredmény különbsége eredményezi a nettó abszorbanáciát.



30. ábra A deutérium lámpás háttérkorrekció sematikus elrendezése

A Zeeman háttérkorrekciós módszer a Zeeman effektuson alapul, mely során a vizsgált vonal mágneses térben szimmetrikusan felhasad (a vizsgált vonal bal és jobb oldalán jelenik meg két vonal). Amikor be van kapcsolva a mágneses tér, akkor ezeken csak fényszóródás van, ha nincs bekapcsolva, akkor abszorpció és fényszóródás is van. A kettő mérés különbsége adja a nettó intenzitást.

A Smith-Hieftje háttérkorrekciós módszer az emissziós színek elemzésben jól ismert önabszorpción, más néven vonal-visszaforduláson alapul. A Smith-Hieftje háttérkorrekció alkalmazása esetén az üreghatód lámpát egyik pillanatban a normál üzemi áramerősséggel, a másik pillanatban pedig nagy árammal fűtjük. Ebben az

esetben is képezzük a két mérés különbségét. Ez viszont csak akkor lehetséges, ha olyan elemeknél használjuk, amelyeknél teljes vonal-visszafordulás következik be.

4.4.7. Detektor

A mérésekben a detektor feladata, hogy a fényintenzitást (fényabszorpciót) elektromos jellé alakítsa. Az AAS technikában általában fotoelektron-sokszorozót (PMT=Photo Multiplier Tube) használnak. A fotoelektron-sokszorozóban egy fotokatód, egy anód és köztük dinódok találhatók. A fotokatódot ha fény éri, elektronok lépnek ki belőle.

A katódból kilépő elektronok a legközelebbi dinódba ütköznek, majd innen kétszeres-ötszörös mennyiségű szekunder elektron lép ki a következő dinódba. Ez folytatódik így tovább addig, míg mérhető jel nem keletkezik.

A legújabb fejlesztésű AAS készülékekbe a fentebb tárgyalt szilárdtest detektorokat építik be, melyek között a CCD (Charge Coupled Device = töltés csatolt), illetve a CID (Charge Injection Device = töltés injektálásos) detektorokat kell megemlíteni.

4.4.8. Az AAS mérésben jelentkező zavaró hatások

Az atomabszorpciós spektrometriát kezdetben úgy mutatták be, mint zavaró hatásoktól mentes módszert. A későbbiekben viszont kiderült, hogy ugyan spektrális zavaró hatás tényleg kevés jelenik meg, viszont számos egyéb zavaró hatással kell számolnunk.

Lángban fellépő zavaró hatások

A zavaró hatásokat korábban spektrális, fizikai, gázfázisú, valamint kondenzált fázisú kémiai zavaró hatásokra csoportosították. Manapság viszont a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry = Alap és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója) által elfogadott nevezéktan van érvényben, mely szervezet csupán két fő zavaró tényező csoportot hozott létre: spektrális és nem-spektrális zavaró hatások.

Spektrális zavaró hatások

Spektrális zavaró hatást akkor tapasztalunk, ha a vizsgált komponens által elnyelt, ill. kibocsátott sugárzást nem tudjuk teljesen elkülöníteni egyéb sugárzásoktól, vagy fénygyengüléstől.

Az atomabszorpciós spektrometriában a vonalegybeesés nagyon ritka. Annak az esélye, hogy a lángban vagy a grafitcsőben az atomizáció során képződő sávós színeképek közel essenek vagy egybeessenek a vizsgált elem abszorpciós vonalával, annak már nagyobb a valószínűsége. Ezek kiküszöbölésére vagy egy másik alkalmas hullámhossz megválasztásával van lehetőségünk, vagy a fentiekben tárgyalt Zeeman vagy a Smith-Hieftje háttérkorrekciós módszer lehet nagy segítségünkre. A fényszóródás okozta zavaró hatás kiküszöbölésében a fentiekben tárgyalt (4.4.6. fejezet) háttérkorrekciós módszerek játszhatnak nagy szerepet.

Nem-spektrális zavaró hatások

A nem-spektrális zavaró hatások közé azokat soroljuk, amelyek a szabad atomok képződését befolyásolják. Ezeket aszerint csoportosítjuk, hogy a zavaró hatás a szabad atomok előállításának mely lépésében jelentkezik. Ezek alapján a következő nem-spektrális zavaró hatásokkal kell számolnunk:

- Transzport zavarások: ebbe a csoportba azok tartoznak, amelyek befolyásolják a vizsgálatra bevont megfigyelési magasságnál az időegység alatt megjelenő minta mennyiségét. Ebben a csoportba tartoznak a porlasztási sebességet, porlasztási hatásfokot és a bepárlódott (deszolvatált) frakciót befolyásoló tényezők.
- Oldott anyagok párolgási zavarása: a vizsgált elem párolgását befolyásoló zavaró hatások tartoznak ide, például azok, amelyek a száraz aeroszol részecskék párolgási sebességének megváltozásából erednek.
- Gázfázisú zavaró hatások: amelyeket a vizsgálandó elem gőzfázisbeli disszociált vagy ionizált hányadában történt változások okoznak.
- Térbeli eloszlás zavarása: amelyek akkor jelentkeznek, ha a zavaró anyag koncentrációjának változása befolyásolja a vizsgálandó anyag tömegáramlási sebességét vagy tömegáramlási eloszlását a lángban.
- Ionos újraeloszlás zavaró hatása: amennyiben a különböző méretű cseppekben eltér az ionok koncentráció aránya.

4.4.9. A zavaró hatások kiküszöbölési módszerei

Fenti zavaró hatások közül a gyakoriságát és nagyságát tekintve legfontosabbak a nem-spektrális zavarások, azok közül is elsősorban az oldott anyag párolgási és a gőzfázisú zavaró hatások. A nem-spektrális zavaró hatások által okozott mérési hibák csökkentésére, ill. kiküszöbölésére több eljárást alkalmaznak. A leggyakoribbak a következők:

- Standard addíciós eljárás: a módszer részletezése a 4.1.2. fejezetben található.
- Szimulációs technika: minél inkább hasonló sajátságú standard oldatot készítünk, mint a minta oldatunk, így a zavaró hatások mindkét oldatban hasonlóak lesznek.
- Puffer-addíciós technika: valamilyen spektrokémiai puffert adunk mind a minta-, mind a kalibráló oldathoz azért, hogy a mérés kevésbé legyen érzékeny a zavaró elemek koncentrációjának változására. Ezek az úgynevezett spektrokémiai pufferek.
 - felszabadító adalék, amely csökkenti a vizsgált elem párolgását zavaró hatásokat azáltal, hogy vegyületet képez a zavaró ágenssel. Erre jó példa, amikor kalciumot szeretnénk mérni és az alkálifém-foszfátok okozta zavaró hatást kiküszöböljük lantan-klorid hozzáadásával.
 - védő adalék, amely kémiaiilag vegyületet képez az analizálandó anyaggal, így gátolva meg a zavaró anyag hatását. Például a különböző komplexképző ligandumok gyakran zavarják az átmenetifémek mérését. Ezeket a zavaró hatásokat kálium-cianid hozzáadásával lehet kiküszöbölni, ugyanis az átmenetifémek a cianiddal adják a legstabilisabb komplexet.
 - ionizációs puffer, amely növeli a szabad elektronkoncentrációt a lánggázokban, így visszaszorul az ionizáció vagy stabilizálódik az ionizáció foka.
 - párolgást elősegítő adalék, amely növeli a kísérő komponensek illékonyágát, vagy illékonyabb vegyületet képez a vizsgálandó anyaggal.
 - telítő adalék, a mintaoldatokhoz nagy koncentrációban adott zavaró ágens, amellyel a zavaró hatás állandó szintjét lehet beállítani.

-Grafitkemencében fellépő zavarások kiküszöbölése mátrixmódosítókkal: A grafitkemencében lejátszódó atomizációs folyamatokat úgy kell befolyásolnunk, hogy minél kedvezőbb atomizációs körülményeket teremtsünk, valamint kiküszöböljük, vagy legalábbis csökkentjük, főként a kondenzált és gázfázisú zavaró hatásokat. Ennek érdekében különböző adalékanyagokat használunk. Ezek között kell megemlíteni az ammónium-nitrátot (réz elemzésénél), nikkel-sókat (arzén, szelén és tellúr elemzésénél), ammónium-hidrogén-foszfátot (kadmium elemzésénél), valamint alkalmaztak sokféle elem analízisének molibdén vegyületeket, kálium-bikromátot és magnézium-nitrátot is, mint mátrix módosítókat. Továbbá univerzális mátrixmódosítóként tartják számon a palládium-sók és a magnézium-nitrát elegyét.

4.5. Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria

4.5.1. Az induktív csatolású plazma történeti áttekintése

Az első atomemissziós megfigyelés 1752-ben Glasgowban történt, amely Thomas Melville nevéhez fűződik. Tapasztalatai szerint az alkohol és tengeri só keverékével előállított láng fényes sárga fényt bocsát ki. A só hiányában viszont nem tapasztalható sárga fény. A spektrokémiai módszerek hódító útja minden bizonnyal sokkal korábban kezdődött volna el, ha Thomas Melville egy évvel később 27 éves korában nem halálozott volna el.

1776-ban Alessandro Volta szikra készüléket alkalmazott kémiai analízisre. Kísérletei alapján megállapította, a különböző szilárd anyagok használatával eltérő színű szikrákat állíthat elő.

A 18. század végén 19. század elején Fraunhofer és más kutatók a lángok és szikrák emissziós spektrumát a Nap és a bolygók színekéhez hasonlították. Talbot 1826-ban közölte a különböző ásványi sók színfestését a lángban.

1859-ben Kirchhoff és Bunsen feltételezték, hogy a lángokból származó éles színeképvonalak nem a molekulákhoz, hanem az atomokhoz rendelhetők. Ez volt az első alkalom, hogy megpróbálták értelmezni a színeképek természetét. Az emissziós spektroszkópia alkalmazásával, Kirchhoff és Bunsen 1860 és 1864 között, több elemet, például a céziumot, a rubídiumot, a talliumot és az indiumot fedezte fel.

A XX. század közepéig a legjobb analitikai eszközként az ív és szikra gerjesztést alkalmazták. Sajnos főként szilárd anyagok vizsgálatára volt alkalmas, az előkészítés elektromosan nemvezető minták esetén kissé nehézkes és időigényes volt. Az eredmények 5-10 % szórása pedig elfogadott eredménynek minősült. Míg az ív és szikra gerjesztéses emissziós technikákat főleg a szilárd fém minták vizsgálatára alkalmazták, addig a lángspektroszkópiát csupán az alacsony gerjesztési energiájú elemek (pl. alkáli fémek) analízisére. Megjegyzendő, hogy történetileg az ív- és a szikragerjesztés volt az első két multieleemes meghatározási módszer, melyek közül főként a szikra gerjesztést még manapság is széleskörűen alkalmazzák a fémiparban.

Az 1960-as évektől jelentősen csökkent az ív és szikra atomemissziós alkalmazása, mivel az atomabszorpciós spektrometria (AAS) kezdett egyre inkább teret nyerni a színeképanalitikai módszerek között. Az AAS technika a fenti módszerekhez képest kevesebb zavaró hatással rendelkezik, valamint a mérés nagy precizitással (0,2-2 %) végezhető. Nagy hátránya azonban, hogy míg az emissziós módszerek szimultán multielemes módszerek, addig az AAS szekvens monoelemes. Az AAS és számos analitikai módszer folyékony halmazállapotú minták elemzésére alkalmas. A szilárd halmazállapotú minták előkészítéséhez vagy egy megfelelő oldási vagy egy roncsolási módszer alkalmazása szükséges.

A grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GF-AAS) bevezetésekor nagyon sok zavaró hatással rendelkezett, s a reprodukálhatósága is messze elmaradt az FAAS technikában megszokott értékektől. A deutérium és a Zeeman háttérkorrekció kidolgozásával és alkalmazásával azonban a GF-AAS módszer mind a két említett hátránya csökkent, továbbá kimutatási határa is jelentős mértékben javult.

A későbbiekben mind a láng, mind a grafitkemencés atomabszorpciós spektrometriát széleskörűen alkalmazták elemek vizsgálatára, néhány kivételtől eltekintve azonban az AAS készülékek csak monoelemes meghatározásra alkalmasak. Az analitikai méréstartományuk csupán kettő vagy három nagyságrend, ezért számos esetben meghatározás előtt hígítanunk kell a mintákat.

1964-ben Stanley Greenfield elsőként adott hírt egy új típusú atomemissziós spektrometriai sugárforrásról, az atmoszférikus nyomású induktív csatolású plazmáról (ICP). Munkájukban összehasonlították az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) előnyeit az ív, a szikra és a láng sugárforrásokkal:

- Az új típusú plazma sugárforrás nagy stabilitással rendelkezik, ezért a hátrányos zavaró hatások kiküszöbölhetők.
- A periódusos rendszerből a hagyományos kémiai lángokhoz képest jóval több elem meghatározására alkalmas az ICP-OES technika.
- A kimutatási képességében felülmúlja az előbb említett módszereket.
- A plazma működtetése sokkal egyszerűbb, mint a hagyományos ív és szikra módszerek kezelése, különösen oldatok, folyékony halmazállapotú minták esetén.

- A plazma előállítása elektródot nem igényel, ezáltal szennyeződésmentesen, továbbá nagyon alacsony zavaró háttér mellett valósítható meg az elemzés.

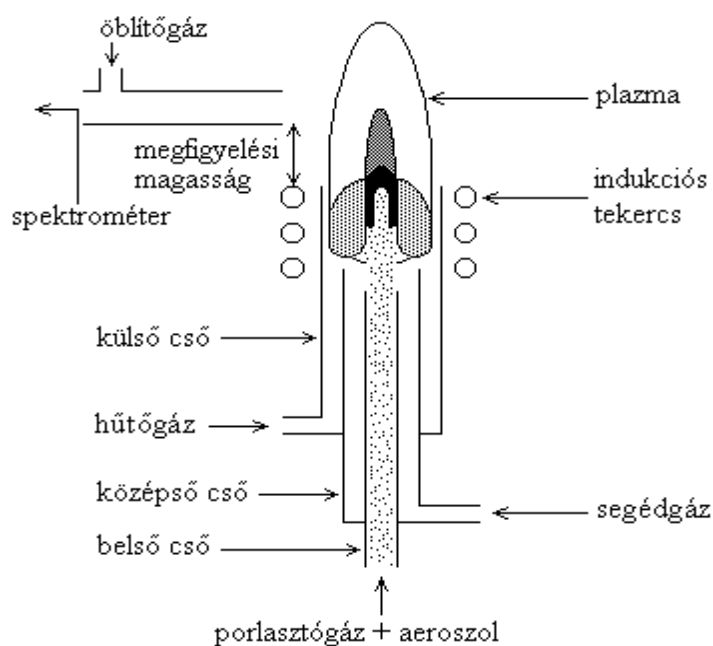
Kezdetben az ICP-OES módszer nem mutatott jelentős áttörést az elemek koncentrációjának meghatározása terén, mivel csak néhány elem esetén adott többlet lehetőséget az analitikusok számára. Velmer Fassel azonban Greenfield munkái továbbfejlesztésével optimalta, finomította az ICP-OES módszer paramétereit. Megkereste és kiküszöbölte az ICP-OES készülékben keletkező lehetséges zajforrásokat, továbbá új típusú plazma torchot (más néven plazmaégőt) hozott létre. A 70-es évek elejére Fassel kutatómunkája következtében az ICP-OES technika felülmúlta minden addig ismert analitikai módszer teljesítőképességét. Az optimált körülmények között működő ICP-OE spektrométer igen kedvező kimutatási határokkal rendelkezett, amely mentes volt zavaró hatásoktól, továbbá tág dinamikus kalibrációs tartomány használatát tette lehetővé. Az első korszerű induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométer (ICP-OES) elsőként 1974-ben vált beszerezhetővé a kereskedelmi forgalomban.

Manapság az ICP-OES technika a rutin elemanalitika területén a leggyakrabban használt mérési eljárás. Emellett a hazai és nemzetközi gyakorlatban az ICP-OES készülékek mellé egyre gyakrabban beszereznek egy induktív csatolású plazma tömegspektrométert is (ICP-MS). A két mérési módszerrel a szerves elemek nagyrésze meghatározható a mintákban, nagyon jó kimutatási határok ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$) mellett. Továbbá az ICP-MS berendezés az elemek különböző izotópjainak meghatározására is alkalmas. A Magyarországon való nagyobb elterjedésének sajnálatos módon a beszerzési ára és fenntartási költségei szabnak határt.

4.5.2. Az ICP-OES mérés elvi alapjai

A 70-es években kidolgozott ICP berendezés megközelítően 70 elem rutin meghatározására alkalmas. A mai napig a Fassel által kifejlesztett plazmaégő elrendezést használjuk a plazmaemissziós spektrometriában. A plazmaégő 3 koncentrikus kvarc (vagy egyéb megfelelő anyagú) csőből áll, amint a 31. ábrán látható. A külső cső felső része körül egy 2-4 menetes réz tekercs található, amely rádiófrekvenciás (RF) generátorhoz csatlakozik. A kereskedelmi forgalomban kapható ICP-k rádiófrekvenciás (RF) generátora 27 (27,12 MHz) vagy 40 MHz-es (40,68 MHz),

bár készítettek már kísérleti jelleggel 56 és 78 MHz-es ICP-eket is. A plazma indításakor Tesla-, vagy piezoelektromos szikra alkalmazása szükséges, hogy az argon atomokból bizonyos mennyiségű elektront tegyünk szabaddá, majd az RF generátorból származó energiát (kicsatolt teljesítményt) a réz tekercs az argon gáz szabad atomjainak adja át, ezáltal nagy energiájú elektronok képződnek. A nagysebességű elektronok az argon atomok ütközésével újabb elektronokat tesznek szabaddá, s ezáltal nagy hőmérsékletű plazmaállapot alakul ki. Ezt a folyamatot induktív csatolásnak nevezzük.



31. ábra A plazmaégő részei

Az ICP készülékek általában argon gázzal működnek, bár léteznek hélium gázzal működő plazmák is. Gazdaságossági okok miatt viszont ezek a plazmák nem terjedtek el.

A 31. ábrán is látható, hogy a külső cső és a középső cső között áramlik a hűtőgáz, vagy más néven plazmagáz. A nevéből is adódóan kettős funkciója van:

- plazmagáz: fenntartja a plazma működését (az egyetlen gáz, amely nélkül nem lehetséges plazmát előállítani),
- hűtőgáz: ellátja a plazma és a külső cső közötti térrész hűtését, nem megfelelő beállítás esetén összeolvad (megolvad) a külső cső.

A középső és belső cső között áramlik a segédgáz, melynek szintén két funkciója van:

- a megfelelő nagyságú áramlási sebességgel megemeli a plazmát, amely alkalmazásával azt érjük el, hogy nem ég össze a plazmaégő vége, vagyis nő az élettartama,
- stabilizálja a plazma működését, ezáltal stabilabb plazmát (eredményt) kapunk.

A belső csőben áramlik a mintagáz, vagy más nevén porlasztógáz (van olyan készülék, ahol ez ténylegesen két külön gázt jelent), nevéből adódóan ennek is két funkciója van:

- porlasztógáz: elvégzi a folyékony halmazállapotú minta porlasztását, az aeroszol képzését,
- mintagáz: a már porlasztott minta azon részének szállítását látja el a plazmába, amely finom aeroszol részecskékből áll.

Néhány ICP-OES készüléknél a plazma és a spektrométer között öblítőgázt alkalmaznak, melynek az oxigén molekula kizárása a szerepe, ugyanis a 200 nm (pontosabban a 194 nm) alatti hullámhosszú emissziós vonalak intenzitása jelentős mértékben csökken, mivel a levegőben lévő oxigén abszorbeálja az ebben a hullámhossztartományban lévő vonalak jelentős mértékű intenzitását. Ebben a hullámhossztartományban található pl. az arzén, higany, kén és foszfor érzékeny vonala is. A jellemző áramlási sebessége kisebb, mint 0,5 L/perc.

Vannak viszont olyan készülékek, melyeknél vagy vágógázt (shear gas), vagy az ICP-MS technikában is használt kónuszokhoz hasonló formájú (csak nagyobb lyukátmérőjű) kónuszt alkalmaznak, mellyel egyrészt elkerülik, hogy a levegő oxigénje abszorpciót vagy a plazma hidegebb részein lévő atomos állapotú atomok önabszorpciót okozzanak.

A fenti gázok jellemző áramlási sebessége:

hűtőgáz (plazmagáz): 10-20 L/perc

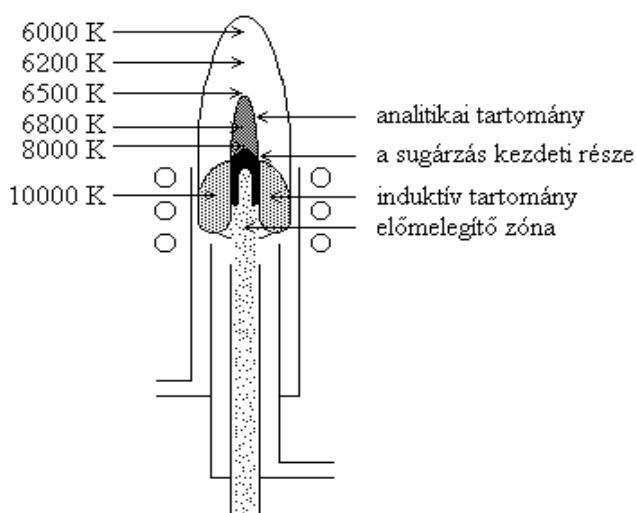
segédgáz: 0,5-2 L/perc

mintagáz (porlasztógáz): 0,8-2 L/perc

vágógáz (shear gas): 30-40 L/perc

Amint a 32. ábra mutatja, a plazma különböző részekre osztható: alsó része a vizsgálandó aeroszol előmelegítését végzi el, s feljebb haladva, egyre nagyobb hőmérsékletű reakciótér található. A 32. ábrán a plazma különböző részeinek az

elméleti elkülönítése és azok elnevezése látható. A 32. ábrán jelölt induktív tartomány a 10000 K hőmérsékletével a plazma legmelegebb része. A réz tekercs ebbe az induktív tartományba táplálja be az energiát, ahonnan az továbbterjed, valamint a fehér fény nagyrésze – argon kontinuum – is ebben a tartományban jelentkezik. Analitikai célra, közvetlenül a plazmamag (a 32. ábrán a fekete rész) fölötti kiváló tulajdonságokkal rendelkező részt használhatjuk.



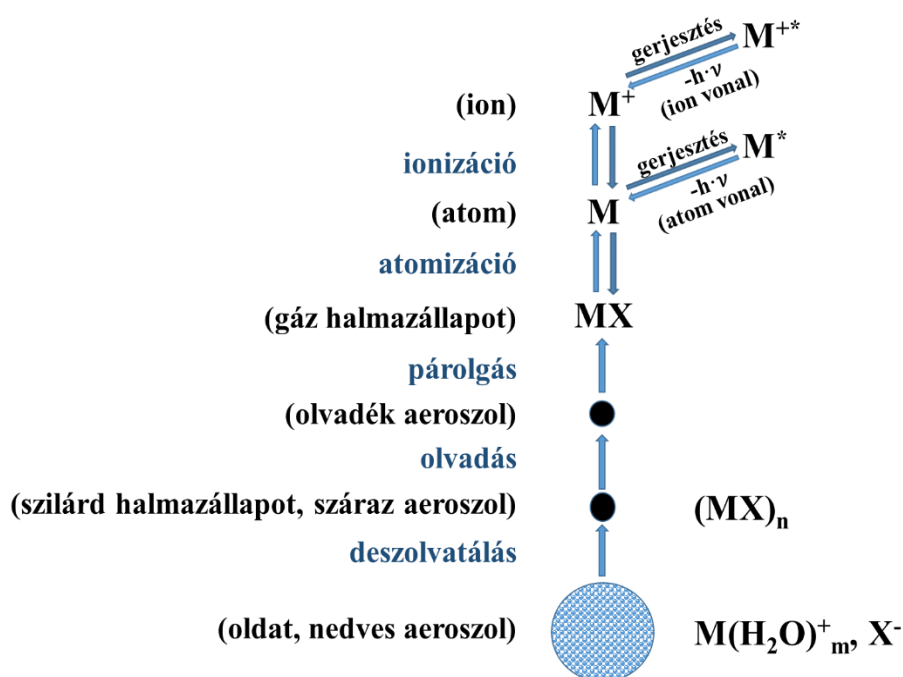
32. ábra A plazma különböző részei elnevezése és a középső csatornájának hőmérséklet változása

Az induktív csatolású plazmában lejátszódó atomok és ionok gerjesztésével foglalkozó számos publikáció jelent meg a nemzetközi szakirodalomban. A plazmában végbemenő folyamatok pontos leírása azonban a mai napig nem tisztázott.

Mint említettük, az ionizációhoz és a gerjesztéshez szükséges energiát a plazmába táplált rádiófrekvenciás energia (kicsatolt teljesítmény) szolgáltatja. (Az ICP technikában általában 1000-1600 W kicsatolt teljesítményt alkalmazunk.) Az RF energia átadását négy lépésre különíthetjük el:

1. Az RF energia betáplálása a plazma külső részébe.
2. Az energia továbbadása a plazma belsejébe. Ebben a tartományban található az analizálandó komponensek.
3. Az aeroszol részleges atomizálása és ionizálása.
4. Az atomok és ionok gerjesztése.

Emissziós színek csak abban az esetben keletkeznek, ha az atomok/ionok megfelelően nagy energiát vesznek fel, azaz gerjesztett állapotba kerülnek. Az atomok/ionok gerjesztése azáltal valósul meg, hogy legalább egy elektronjuk az alapállapothoz képest, energiafelvétellel, egy magasabb energiával rendelkező elektronpályára kerül. Gerjesztésen általános értelemben azt az egész folyamatot értjük, melynek végén az adott vizsgálati elem a rá jellemző hullámhosszúságú sugárzást bocsátja ki. A vizsgálandó minta a következő folyamatokon megy keresztül, míg eléri a jellemző fény kibocsátását (33. ábra):



33. ábra A vizsgálati minta gerjesztési folyamata

A 33. ábrán látható, hogy a minta aeroszol alakjában jut a reakciótérbe, az oldószer elpárolog, majd a vizsgálati minta gázállapotba kerül, atomjaira esik szét és ionizációs energiájától függően ionizálódhat is. A képződő atomok/ionok energia felvételével gerjesztett állapotba kerülnek, majd energia leadással a rájuk jellemző hullámhosszúságú fény kisugárzása közben egy alacsonyabb energiaállapotot érnek el. Az alacsonyabb energiaállapotba való kerüléssel kisugárzott fény lehet atomvonal (gerjesztett atom sugározza ki) és lehet ionvonal (gerjesztett ion sugározza ki).

A vizsgált mintában az adott elem mennyiségére az emittált fény intenzitása ad felvilágosítást számunkra. A kisugárzott fény intenzitása (I) és a gőztérben található mérendő elem koncentrációja (c) közötti összefüggést az emissziós színeképelemzésben korábban ismert Scheibe-Lomakin-egyenlet fejezi ki:

$$I_{\text{rel}} = K \cdot c^m \quad (22)$$

A 22. egyenletben a K és m konstansok, a kísérleti körülményektől függő állandók. A felírt egyenlet látszólag egyszerű, azonban mint a 33. ábrán is látható, számos fizikai és kémiai folyamat megy végbe, míg a vizsgálati mintától származó, a mennyiségi elemzés számára nélkülözhetetlen fényemissiót kapjuk. Ezek a folyamatok természetesen sem a vizsgált elemek koncentrációjától, sem egymás kimenetelétől nem függetlenek. Ennélfogva a K és m valójában nem állandók, így az értéküket meghatározni sem lehet. A K a gerjesztési és egyéb paramétereket foglalja magában, az m mint exponenciális tag a kisugárzott fénynek a kisebb hőmérsékletű gőztérben történő abszorpciójára utal.

A T hőmérsékletű termikus egyensúlyban lévő rendszerben a p atomi szinten található részecskék sűrűségének ($n(p)$) kiszámítására a Boltzmann-eloszlás alkalmazható:

$$n(p) = n_a \cdot \left[\frac{g_p}{Z_a(T)} \right] \cdot e^{\left(\frac{-E_p}{k \cdot T} \right)} \quad (23)$$

ahol

n_a : az a atom összkoncentrációja

g_p : a p szint statisztikus súlya

$Z_a(T)$: az a atom eloszlási függvénye

E_p : a p szint gerjesztési energiája

k : Boltzmann-állandó ($k=1,380622 \cdot 10^{23}$ J/K)

T : abszolút hőmérséklet

Azt a hőmérsékletet, amely az $n(p)$ értékét alapvetően meghatározza, gerjesztési hőmérsékletnek (T_g) nevezzük.

A klasszikus Rutherford-Bohr atomelmélet, valamint a hullámelmélet szerint az atomok elektronhéjában az elektronoknak diszkrét energiaértékei vannak. Energia felvétel/elnyelés (abszorpció) vagy energia leadás (emisszió) is csak diszkrét energia mennyiségek alakjában lehetséges. Az alapállapotnál magasabb energia szinten lévő atomok vagy ionok állapotát gerjesztett állapotnak nevezzük. A gerjesztett állapotban lévő részecskék instabilak, energia leadással kerülnek stabilabb energia állapotba. Az energia leadás egyik lehetséges módja, hogy a gerjesztett részecskék ütközések közben nem gerjesztett állapotban lévő atomoknak, ionoknak adják át fölösleges energiájukat.

Ilyenkor az energia hővé alakul. Az emissziós technikákban az energia leadás egy másik lehetséges módját hasznosítjuk az elemek koncentrációjának meghatározására: a gerjesztett részecskék elektromágneses sugárzás formájában bocsátják ki a felvett energiát. A fénykvantum emittálásával járó p és q energiaszintek közötti átmenet energiaváltozása és a fény frekvenciája, hullámhossza közötti összefüggést fejezi ki a Planck-egyenlet (24. egyenlet):

$$E_q - E_p = \Delta E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (24)$$

ahol

E_p : kezdeti állapot energiaszintje (J)

E_q : végállapot energiaszintje (J)

ΔE : kezdeti és a végállapot energiaszintje közötti különbség (J)

h : Planck-állandó ($6,626196 \cdot 10^{-34}$ J·s)

ν : elektromágneses sugárzás frekvenciája (Hz=)

c : fény sebessége (levegőben $2,997925 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$)

λ : fény hullámhossza (nm)

Mivel minden elem adott energiaszintekkel és ennél fogva energia átmenetekkel rendelkezik, így az emittált fény hullámhossza (24. egyenlet) az illető elem minőségére jellemző, míg a kisugárzott fény intenzitása a 22. egyenletnek megfelelően a koncentrációval arányos.

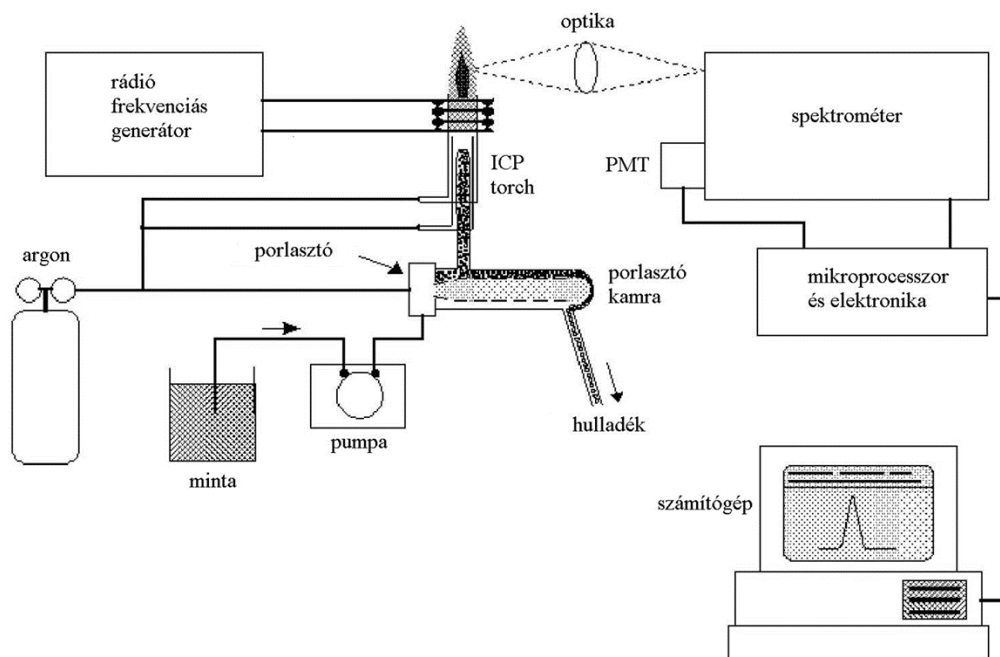
4.5.3. Az ICP-OES készülék felépítése

Az ICP-OES berendezés fő egységei (34. ábra): az argon gáz, perisztaltikus pumpa, a mintabeviteli egység, a fényfelbontó egység, a plazmaégő (torch) (sugárforrás), az optikai rendszer, a detektor és a számítógép. Korábban fizikailag nagyobb méretű berendezéseket gyártottak (7. kép), mivel csak abban volt biztosítható a megfelelő optikai felbontással rendelkező mérés, továbbá számos nagyméretű elektronikus egység, panel látta el a készülék működését, vezérlését. Mostanában viszont már a kor előrehaladtával kisebb méretű elektronikus egységeket állítanak elő, valamint kisebb

méretű (desktop) ICP-OES készülékekben is képesek megfelelő optikai felbontást elérni (8. kép).

A készülékben alkalmazott gázok és a plazmaégő felépítése a 4.5.2. fejezetben már részletesen tárgyalásra került.

A folyékony halmazállapotú minta plazmába viteléhez egy perisztaltikus pumpára, a porlasztáshoz pedig porlasztógáz alkalmazására van szükség. Egy perisztaltikus pumpa látható a 9. kép bal oldalán, míg ugyanennek a perisztaltikus pumpa fejének a hátoldala látható a 9. kép jobb oldalán, melyen az ICP kezelője éppen beállítja a szorító pofák szorítóerősségét. A perisztaltikus pumpa segítségével vagyunk képesek a pumpacső belső átmérőjétől és a fordulatszámtól (100-1000 fordulat/perc) függően beállítani a szállított folyékony minta térfogatáramát. A pumpacsövek színjelölése jelenti a belső átmérőjüket.



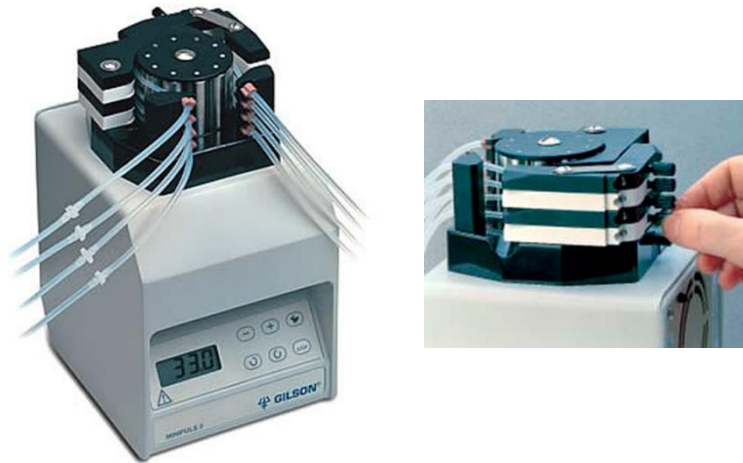
34. ábra Az ICP-OES készülék fontosabb részei



7. kép Perkin-Elmer gyártmányú ICP-OES készülék



8. kép Thermo Fisher Scientific gyártmányú ICP-OES készülék



9. kép Gilson gyártmányú perisztaltikus pumpa

4.5.4. Az ICP-OES technikában alkalmazható mintabeviteli módszerek

4.5.4.1. Porlasztásos módszerek

Már a 4.4.4. fejezetben is említettük, hogy az atomspektrometriában lehetséges ugyan gáz, folyadék és szilárd halmazállapotú élelmiszer minták vizsgálata, ugyanakkor a pontosság, precizitás, automatizálhatóság (a mérési idő minél kedvezőbb kihasználása) érdekében leggyakrabban a folyékony halmazállapotú minták analízisét szoktuk előnyben részesíteni. Ugyanez a helyzet az ICP-OES technikában is, ahol a folyékony halmazállapotú minták elemzéséhez általában valamilyen porlasztásos módszert, azon belül is főként valamilyen pneumatikus (sűrített gázzal működő) porlasztót szoktunk alkalmazni. A porlasztórendszerek két alapvető egységből állnak (34. ábra közepén), a porlasztóból és az ehhez csatlakozó porlasztókamrából. Működés szerint háromféle porlasztási technikát különböztetünk meg (8. táblázat): pneumatikus, ultrahangos és hidraulikus nagynyomású porlasztást.

8. táblázat A porlasztásos mintabeviteli technikák felsorolása

1. Porlasztásos mintabevitel

1.1. Pneumatikus porlasztó

Koncentrikus porlasztó

Mikrokoncentrikus porlasztó

Keresztáramú (cross-flow) porlasztó

Babington-porlasztó

V-bevágatú (V-groove) porlasztó

Szögporlasztó (conespray)

GMK porlasztó

„Mist” (Burgener) porlasztók

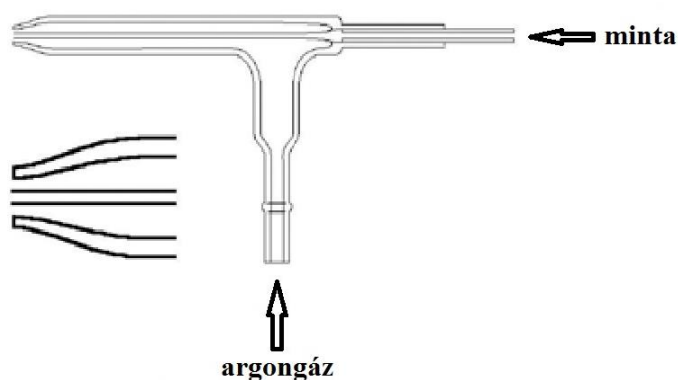
1.2. Ultrahangos porlasztó

1.3. Nagynyomású porlasztó

Az ICP technikában hasonló pneumatikus porlasztókat alkalmaznak, mint amelyeket az FAAS módszerekben használhatunk, viszont ahogyan a 4.4.4. fejezetben is tárgyalásra került, a folyadékok porlasztásánál a két legfontosabb paraméter a mintabeviteli sebesség és a mintabevitel határfoka. Ez a két paraméter az AAS-technikában szokásos 8-10 L/perc levegőáramnál 4-6 mL/perc és 5-10%, viszont ugyanezen adatok az ICP technikánál, ahol csupán 1-2 mL/perc porlasztógáz (argon) térfogatáramot használunk, általában 1 mL/perc és megközelítően 1%.

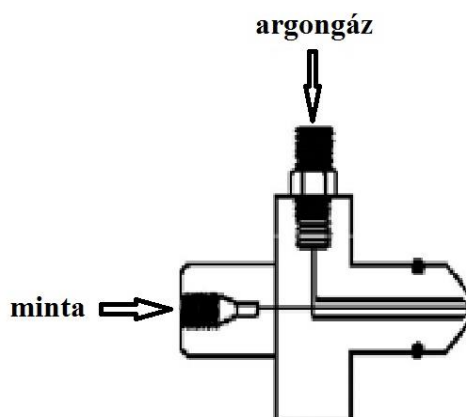
Pneumatikus porlasztás

A pneumatikus porlasztók (8. táblázat) közül leggyakrabban a koncentrikus porlasztókat (35. ábra) használjuk, ahol a megközelítően 200-400 μm átmérőjű folyadékapilláris körül nagy sebességgel áramló argongáz a kapilláris végén a Bernouille-egyenlet értelmében szívóhatást hoz létre, amely a folyadék folyamatos porlasztását eredményezi. A koncentrikus porlasztók általában 1%-os, maximum 2%-os porlasztási hatásfokkal rendelkeznek és többnyire megközelítően 1 mL/perc mintabetáplálási sebességet használnak.



35. ábra Koncentrikus porlasztó

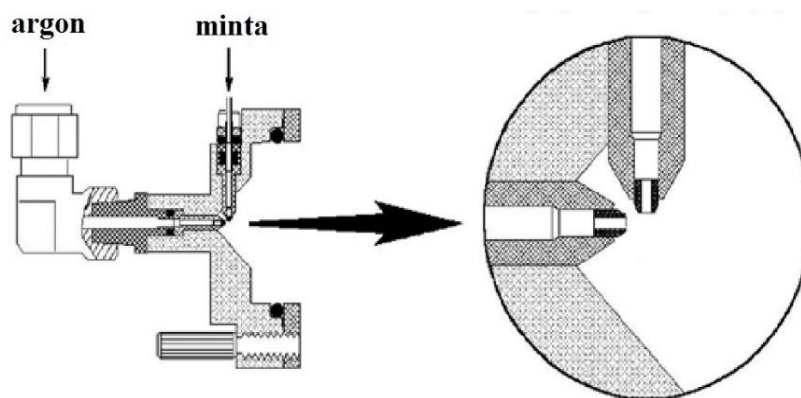
Abban az esetben, ha mindezt kisebb méretek mellett állítják elő, akkor beszélünk mikrokonzentrikus porlasztóról (36. ábra). Ebben az esetben a kisebb folyadékapilláris belső átmérő (megközelítően 100 μm) kisebb aeroszol részecskeméretet eredményez, ezáltal a mintabeviteli hatások a 10-20%-ot is eléri. A mikrokonzentrikus porlasztók 10-100 μL /perc folyadék áramot igényelnek.



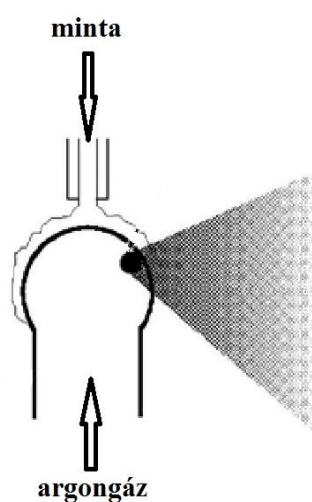
36. ábra Mikrokonzentrikus porlasztó

A keresztáramú porlasztók (37. ábra) is hasonló adatokkal jellemezhetők, mint a koncentrikus porlasztók. Talán a sótoleranciájuk jobb, azaz kissé nagyobb oldott szilárd anyag mennyiséget képesek elviselni, mint a koncentrikus porlasztók.

Ezután a következő porlasztó a Babington-porlasztó (38. ábra), majd az ún. Babington-család (38-40. ábrák). A Babington-porlasztóról elmondhatjuk, hogy ilyen porlasztó manapság már nem létezik, viszont történetileg szükséges a tárgyalása, ugyanis az azt következő porlasztókat pedig módosított Babington-porlasztóknak nevezzük. Tehát a Babington-porlasztó elvileg a következőképpen működik: az üveggömbön van egy lyuk, mely előtt csak a véletlenül eláramló folyadék fog porlasztódni. Emiatt aztán semmilyen egyéb adat említése nem értelmezhető vele kapcsolatban.

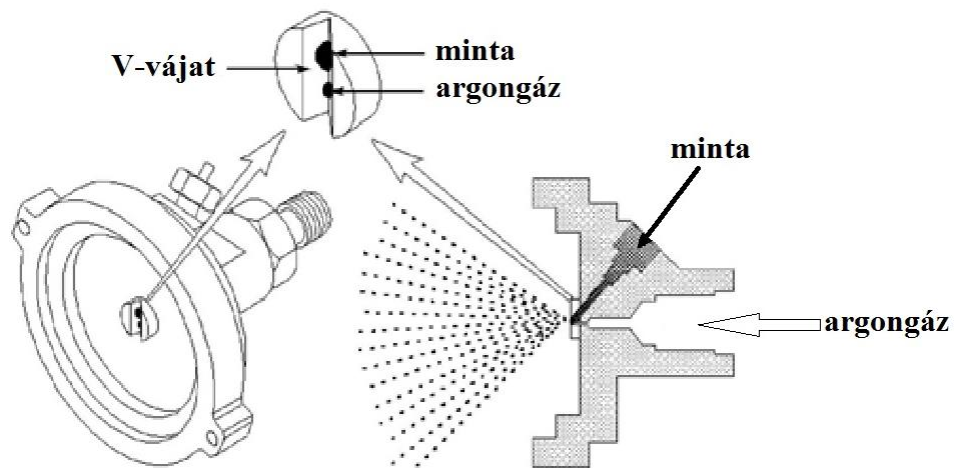


37. ábra Keresztáramú (cross-flow) porlasztó

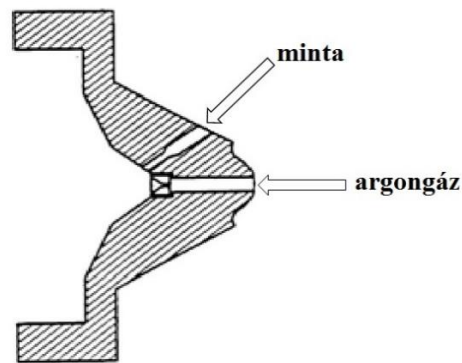


38. ábra Babington porlasztó

A V-vájtatos (V-bevágatú) porlasztóba (39. ábra) megközelítően 1 mL/perc minta áramlási sebesség szükséges és a hatásfokuk kedvezőbb, mint a koncentrikus porlasztóké (nagyobb mint 1%, akár 2% is lehet). A V-vájtatos porlasztóban, a Babington-porlasztóhoz képest már nemcsak véletlenül áramlik el a gázbevezetés előtt a folyadék, hanem kialakítottak egy V formájú mélyedést, melyben a lefelé áramló folyadékot argongáz porlasztja el. A 39. ábrán is jól látható, hogy a mintabevezető cső nagyobb átmérőjű, mint az alatta található argongáz cső. Ezért ez a porlasztó alkalmas egyrészt nagyobb sótartalmú oldat (20%) porlasztására, másrészt ezzel a típusú porlasztóval biológiai és ahhoz hasonló típusú minták is hatékonyan, dugulásmentesen porlaszthatók. Még szuszpenziók porlasztására is lehetőség van ezzel a porlasztóval.

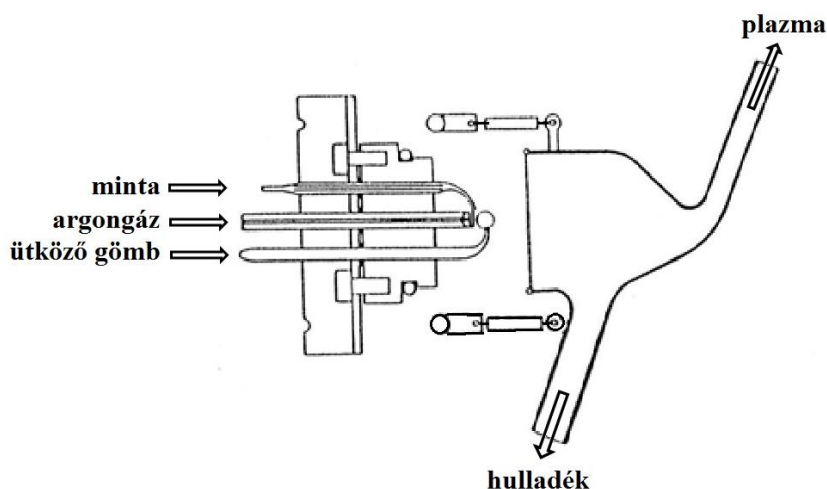


39. ábra V-bevágatú (más néven V-vájos=V-groove) porlasztó (módosított Babington porlasztó)



40. ábra Szögporlasztó (módosított Babington porlasztó)

A szögporlasztók (40. ábra) és a GMK porlasztók (41. ábra) is módosított Babington-porlasztóknak minősülnek, ahol „kényszerítjük” a folyadékot, hogy az argon gáz bevezetőcsőve előtt áramoljon el a minta. Ezen porlasztók működéséhez megközelítően 1 mL/perc áramlási sebesség szükséges és 1-2% porlasztási hatásfok jellemzi őket.



41. ábra GMK porlasztó (módosított Babington porlasztó)

Az utóbbi években alakították ki a különböző Burgener gyártmányú porlasztókat (10. és 11. kép). Burgener, mint a cég vezetője termékei a különböző porlasztó paraméterek széles lehetőségeit fedi le. A cégtől beszerezhető porlasztók a pontos típustól (OpalMist, VeeSpray, SeaSpray, MicroMist, MiraMist, Conikal, DuraMist, AriMist) függően 0,05-2,5 mL/perc mintabetáplálási sebességtartományban állnak rendelkezésre, a porlasztási hatásfokuk 1-10% között található és akár HF-ot tartalmazó oldat és akár 30%-os összes szilárd anyag beporlasztására is képesek. Működésükben, elrendezésükben, a fenti porlasztók közül, leginkább a V-vájatos porlasztókhoz hasonlítanak abban a sajátosságukban, hogy egy kisebb (az argongáz bevezetésére) és fölötté egy nagyobb átmérőjű csővel rendelkeznek a minta bevezetésére (a 42. ábra bal alsó részén látható szemből és oldalról). Ezáltal, típustól függően, csupán kisebb mértékű eldugulás veszélye állhat fenn. Kijelenthetjük, hogy a pneumatikus porlasztók között, hasonló áramlási sebesség mellett az egyik legkisebb eldugulási hajlammal rendelkeznek (például a MiraMist porlasztó). Az anyaguk lehet üveg, PEEK, vagy PFA.



10. kép MiraMist porlasztó



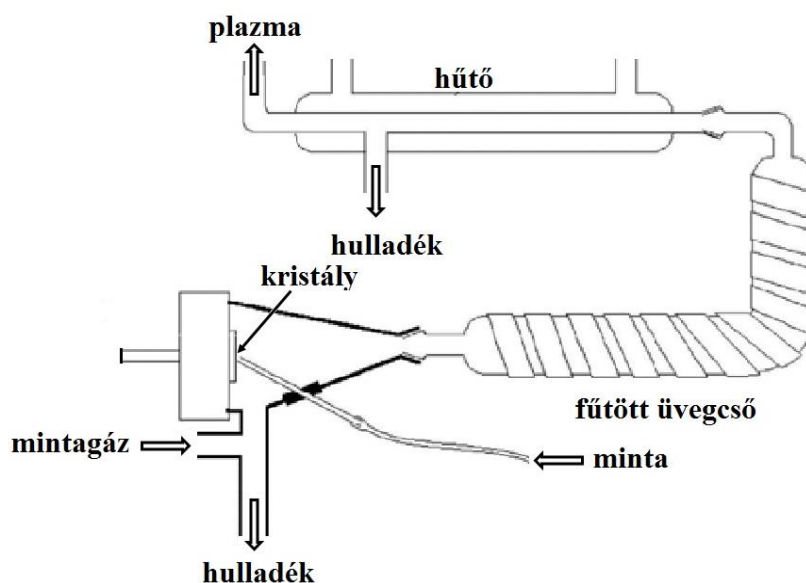
11. kép DuraMist porlasztó



42. ábra A MiraMist porlasztó sematikus elrendezése

Ultrahangos porlasztás

Az előbbieken látható volt, hogy a pneumatikus porlasztás kis mintabeviteli hatásfokkal rendelkezik. Az analitikusok az összes klasszikus és műszeres analitikai lépést folyamatosan próbálják fejleszteni, az analitikai lehetőségek kihasználásával, a kisebb kimutatási határok irányába kiterjeszteni. Ennek egyik lehetőségét jelenti a mintabeviteli hatásfok növelése. Ezt segíti elő a további két porlasztásos mintabeviteli technika alkalmazása (8. táblázat), nevezetesen az ultrahangos porlasztás (USN=Ultrasonic Nebulization) és a hidraulikus nagynyomású porlasztás (HHPN=Hydraulic High Pressure Nebulization) használata. A 43. ábrán láthatjuk az ultrahangos porlasztó egységeit, valamint egy kereskedelmi forgalomban kapható ultrahangos porlasztót a 12. képen, melynek fő eleme egy piezoelektromos kristály. Erre a kristályra elektromos energiát kapcsolva nagyfrekvenciával (>500 kHz) rezeg. Ha erre a kristályfelületre (transzducer) folyamatos áramlási sebességgel (0,5-2,5 mL/perc) oldatot viszünk, a kristály rezgése következtében az oldat aeroszollá alakul. Mivel ezek az aeroszol cseppek kisebb átmérőjűek, mint a pneumatikus porlasztókban, ezért a porlasztási hatásfok megközelítően 10-20%.



43. ábra Az ultrahangos porlasztó egységei

Mivel ebben a rendszerben a porlasztást a kristály rezgése végzi, a képződött aeroszol plazmába való szállításához mintagázra van szükség. Az alkalmazott mintagáz áramlási sebessége általában 0,5-1,5 mL/perc. Mivel a mintabeviteli hatások megközelítően tízszerese a pneumatikus porlasztókhoz képest, így ezt a folyadékmennyiséget már a plazma kapacitása nem képes elviselni, kialszik a plazma. Ezt elkerülendő a minta plazmába kerülése előtt, deszolvatálni (az oldószert eltávolítani) szükséges.



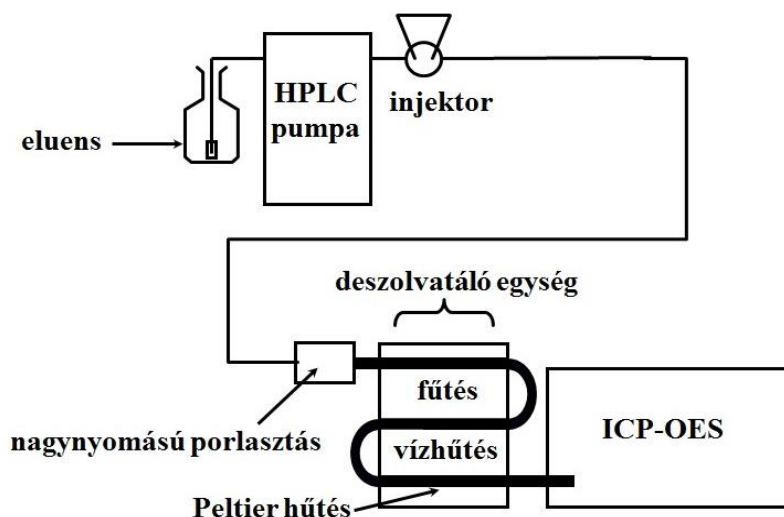
12. kép Cetac gyártmányú ultrahangos porlasztó

A deszolvatáló berendezéssel az aeroszorból el tudjuk távolítani az aktuális oldószert, többnyire a vizet. A nedves aeroszolt fűtött üvegcsőn keresztül vezetjük, melyben a hőmérséklet 120-160°C. Ebben az egységben az oldószert gáz halmazállapotba kerül,

majd az oldószer nagy részét kondenzáltatjuk egy hűtött szakaszon, mely hőmérséklete $(-20^{\circ}\text{C})-(+10^{\circ}\text{C})$. Végeredményben a plazmába az oldószerből nem jut be relatíve nagy mennyiség (sőt kevesebb, mint a pneumatikus porlasztóknál), ezáltal a plazma lehűlése kisebb lesz (előnyös), míg az elporlasztott aeroszorból a meghatározandó elem anyagárama megközelítően egy nagyságrenddel (azaz tízszeresére) javul. Ezáltal elemtől függően megközelítően tízszer kedvezőbb (kisebb) kimutatási határokat tudunk elérni (elemtől függően 2-100-szoros javulás érhető el).

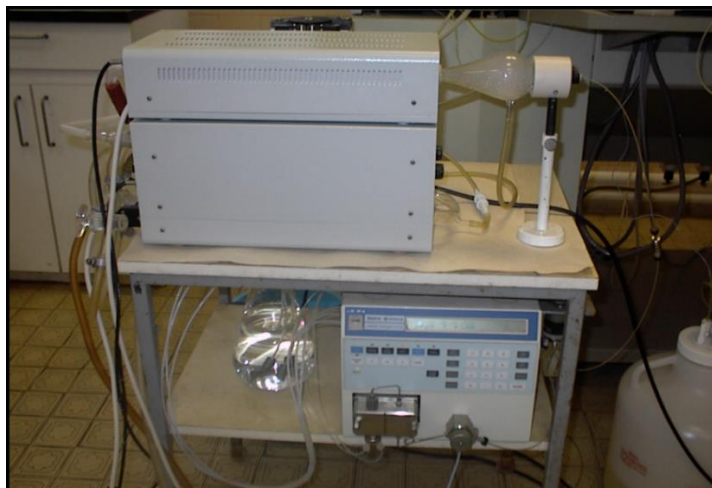
Hidraulikus nagynyomású porlasztás

A porlasztásos technikák közül a legnagyobb porlasztási hatásfokkal az 1988-ban bevezetett hidraulikus nagynyomású porlasztás (HHPN) (44. ábra) rendelkezik, megközelítően 40-50%-os lehet vizes oldatok esetén, míg szerves oldószeres minták esetén elérheti akár a 90%-ot is. A módszer azon alapszik, hogy nagynyomással (40-200 bar) préseljük át a mintát egy 10-30 μm átmérőjű furaton, amely eredményeként egy folyadékszálat kapunk. Hogyha ennek a folyadékszálnak az útjába egy ütközőtestet (6-8 mm átmérőjű üveggömböt) teszünk, az oldatunk nagy része igen kis részecske átmérővel rendelkező aeroszol cseppekké alakul. Egy házi készítésű hidraulikus nagynyomású porlasztó képét figyelhetjük meg a 13. képen, míg a 14. képen ugyanennek a HHPN rendszernek a porlasztókamráját és az abban képződött finom aeroszol képződését figyelhetjük meg.



44. ábra Hidraulikus nagynyomású porlasztó egységei

A 13. kép alján és a 44. ábra felső részén láthatjuk, hogy a folyékony mintát egy nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) pumpával préseljük a rendszerbe. A pumpa által előállított folyamatosan áramló vivőfolyadékba injektáljuk bele egy bemérőcsap segítségével a 100-1000 μl térfogatú mintát. A tényleges porlasztó egy fémfoglalatban elhelyezett 2 mm átmérőjű ipari gyémánt, vagy rubin lapka, amelyben a porlasztó frontja felé szűkülő kúpos furat található. A furat szűk részének átmérője a fentiekben említett 10-30 μm .



13. kép Hidraulikus nagynyomású porlasztó



14. kép A hidraulikus nagynyomású porlasztó porlasztórendszere

A HHPN rendszert az ultrahangos porlasztóval összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy ehhez a porlasztáshoz sem szükséges porlasztógáz. A plazmába való bejuttatáshoz mintagázra van szükség. Mivel ebben a rendszerben a mintabeviteli hatásfok még nagyobb, mint az ultrahangos porlasztásnál, és már annál is kioltotta volna a plazmát a túl sok oldószer mennyiség, ezért természetesen itt is még inkább deszolvatálni

szükséges a porlasztott aeroszolt. A deszolvatáló berendezéssel az aeroszorból el tudjuk távolítani az aktuális oldószert. A nedves aeroszolt szintén fűtött üvegcsövön keresztül vezetjük be, melyben a hőmérséklet 120-300°C lehet, többnyire 140°C elegendő. Ebben az egységben az oldószer gáz halmazállapotba kerül, az oldott sórészecskék pedig természetesen szilárd halmazállapotban maradnak. Majd az oldószer nagy részét kondenzáltatjuk egy kétlépcsős hűtő egységben. Az első lépcsőben egy normál folyadékhűtőt alkalmazunk, a második lépcsőben pedig akár -40°C-os hűtést is alkalmazhatunk. Ezzel még a szerves oldószerek nagy részét is kifagyaszthatjuk. Szerves oldószereket gyakorta használunk speciációs (módosulat analitikai) elemzésekben. A kifagyasztási eljárás után gyakorlatilag közel száraz aeroszol jut be a plazmába. Ezzel a porlasztási technika alkalmazásával kissé még tudjuk javítani az időegység alatti anyagáramot, mellyel ezáltal elemtől függően még kedvezőbb (kisebb) kimutatási határokat tudunk elérni, mint az ultrahangos porlasztóval.

4.5.4.2. Egyéb mintabeviteli módszerek

A porlasztásos mintabeviteli technikák, melyeket az ICP-OES, vagy az ICP-MS készülékben való analízisekhez használunk, azaz a 4.5.4.1. fejezetben felsorolt technikák nagyrészt lefedik az élelmiszerminták (és egyéb típusú minták) mintabeviteli

9. táblázat Mintabeviteli technikák felsorolása

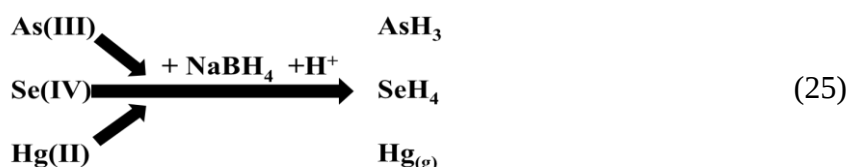
1. Porlasztásos mintabevitel
2. Hidridgenerálásos mintabevitel
3. Elektrotermikus atomizálásos mintabevitel
4. Direkt behelyezéssel mintabevitel
5. Közvetlen befecskendezéssel porlasztás
6. Ablációs (elpárologtatásos) mintabevitel
 - 6.1. Ív ablációs mintabevitel
 - 6.2. Szikra ablációs mintabevitel
 - 6.3. Lézer ablációs mintabevitel
7. Slurry technika (szilárd minták szuszpenzió formájában történő analízise)

lehetőségeit, viszont a minta elemzési céljától, a meghatározandó elemek koncentrációjától, a minta halmazállapotától, mennyiségétől, valamint fizikai és kémiai tulajdonságaitól függően egyéb mintabeviteli technikák is léteznek.

A 9. táblázatban tüntettük fel azokat a mintabeviteli módszereket, amelyeket általánosságban tudunk alkalmazni a különböző típusú minták nagyműszeres elemtartalmi vizsgálatához.

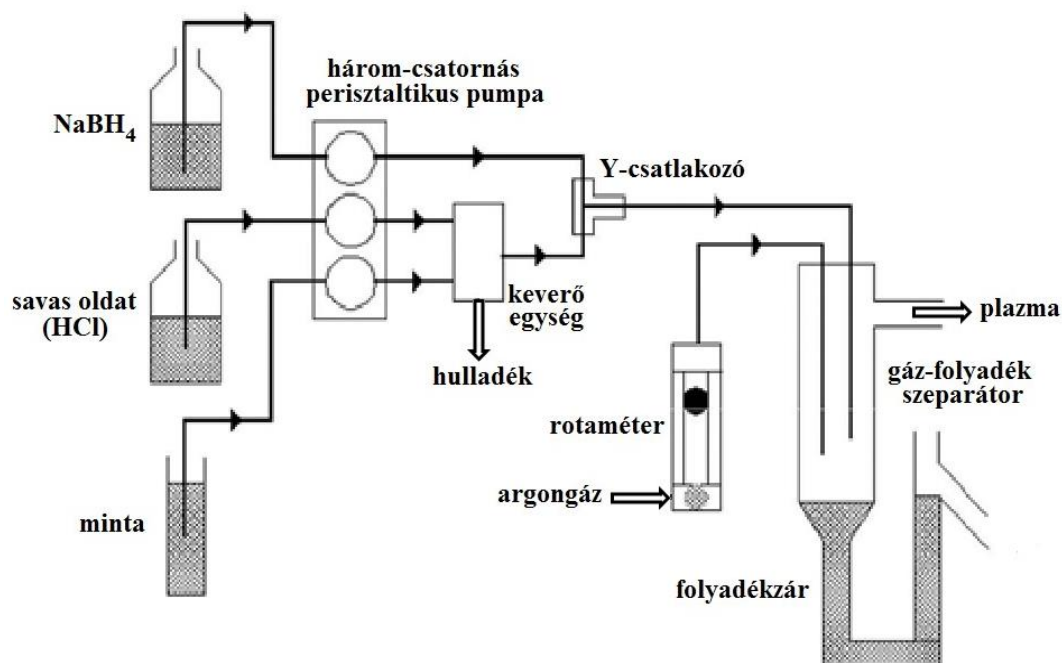
Hidridgenerációs mintabevitel

Az élelmiszerminták atomspektrometriai módszerekkel való vizsgálatában, a porlasztásos mintabeviteli technikák mellett, a második leggyakrabban alkalmazott mintabeviteli módszer a hidridgenerációs technika (45. ábra). A hidridgenerálást (HG=Hydride Generation) a következő elemek tudják kisebb-nagyobb mértékben teljesíteni: As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn és Te. Ezen kívül, ugyanilyen körülményeket igényel a Hg elemzése is, de a higanynál nem hidridképzés valósul meg, hanem elemi gázhalmazállapotú higany keletkezik. Ezért a higany esetén hideggőz technikának hívjuk (CV=Cold Vapor). Ezek az elemek az alábbi reakcióegyenletnek megfelelően képzik a hidrideket:



A képződött hidridek gázhalmazállapotúak, melyek képződésének hatásfoka és sebessége az alkalmazott savtól, a sav és a tetrahidroborát koncentrációjától függ, továbbá befolyásolja a hidridképző elem oxidációs állapota is. A hidridképzésnek két előnye van. Az egyik, hogy mivel a hidridek gázok, így azokat elkülönítve a mintaoldattól, gyakorlatilag 100%-ban bevihetők a plazmába. A másik előnye, hogy számos bonyolult mátrix esetén, melyek nagymértékben hátrányosan befolyásolják a minta mérését, a hidridképzés eredményeként azoktól elválaszthatók. Ezáltal az As, Se és Hg elemek megközelítően százszor-ezerszer kedvezőbb, azaz kisebb kimutatási határ mellett mérhetők.

Tehát a 25. egyenlet szerint képződött gázok, a 45. ábra jobb oldalán látható gáz-folyadék szeparátorban elválasztásra, továbbá a mátrixtól elkülönítésre kerülnek, ahonnan argongáz öblítéssel közvetlenül az ICP-be juttat.



45. ábra Hidridgenerálásos mintabevitel

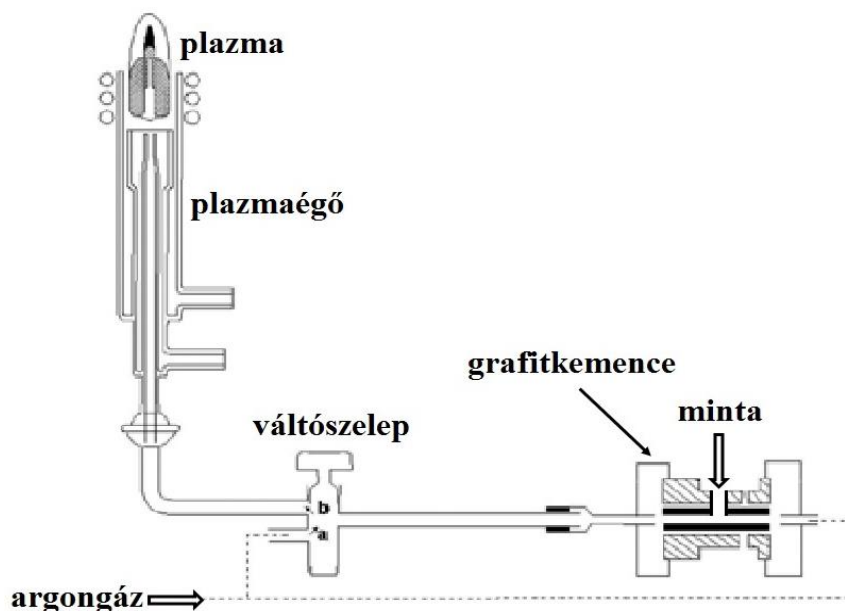
Elektrotermikus atomizálásos mintabevitel

A szilárd, vagy folyadék halmazállapotú mintának, a grafitkemencés atomabszorpciós technikához hasonlóan, grafitkemencében végezzük a minta elektrotermikus elpárologatását (46. ábra), majd az így keletkező atom- és molekulagőzök a hideg argon gáz hatására mikrokristályokká kondenzálódnak. Ezeket az aeroszoloikat vezetjük a plazmába. A plazma magas hőmérsékletén (32. ábra) pedig minden szükséges fizikai folyamat megtörténik (33. ábra), amely a minta atomemissziós elemzéséhez szükséges.

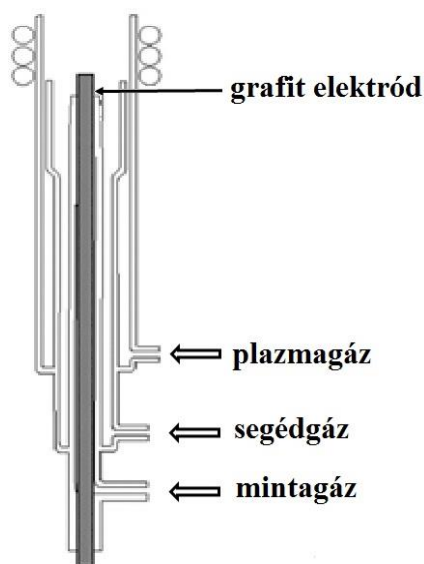
Direkt behelyezéssel mintabevitel

A direkt behelyezéssel mintabevitel egyáltalán nem terjedt el az atomspektrometriában. Ezt az elrendezést akkor alkalmazhatjuk, amikor nem szeretnénk mintaelőkészítést alkalmazni az adott élelmiszermintánk előkészítésénél, hanem közvetlenül kívánjuk elvégezni a mintánk mérését. Ez főként szilárd minták elemzésére ajánlott. A 47. ábrának megfelelően a plazmaégő közepén van egy grafitrúd, melyre rá tudjuk helyezni

az elemzendő mintát, majd feltoljuk a plazmába és a plazma 6000-10000 K hőmérsékletén itt is megtörténik minden szükséges fizikai folyamat (33. ábra), amely a szilárd minta fénykibocsátásához szükséges.



46. ábra Elektrotermikus atomizálásos mintabevitel

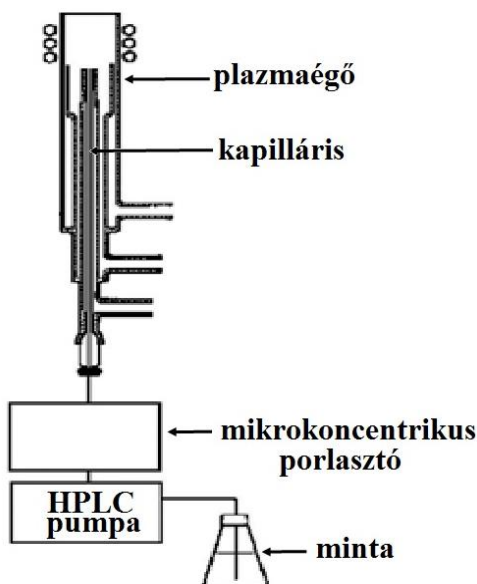


47. ábra Direkt behelyezéssel mintabevitel (Direct Insertion Device)

Közvetlen befecskendezéssel porlasztás

Az ICP vizsgálatok területén olyan mintabeviteli technika is létezik, ahol a mikrokonzentrikus porlasztón keresztül (porlasztókamra nélkül), nagynyomású

folyadékkromatográfiás pumpával a mintát közvetlenül a plazmába irányítják. A közvetlen befecskendezéses porlasztóval (DIN=Direct Injection Nebulizer) (48. ábra) a mintabeviteli hatásfok 100%. Ezt a technikát olyan elemeknél alkalmazták sikerrel, ahol jelentős memóriaeffektusok léptek fel. Ilyen elemek a jód, a higany és a bór.



48. ábra Közvetlen befecskendezéses porlasztás (Direct Injection Nebulization)

Ablációs mintabevitel

Az ablációs (elpárologtatásos) mintabevitelt, általánosságban, kivitelezhetjük ív, szikra és lézersugár alkalmazásával. Mivel az ív- és szikraporlasztás használata csak elektromos áramot vezető szilárd minták esetén lehetséges, ezért az élelmiszerek vizsgálatára nem alkalmas. Leginkább fémötvözetek gyors elemzésére szokták alkalmazni (49. ábra).



49. ábra Lézer ablációs készülék

Az ablációs (elpárologtatásos) mintabevitel megoldható lézersugár alkalmazásával is. Ennek előnye, hogy a lézersugár jól fókuszálható, mely lehetővé teszi olyan felületi mikroanalízis elvégzését, amely a korábbi módszerekkel nem volt megoldható. Egyes esetekben előnyös, más esetekben viszont hátrányt jelent, hogy a lézersugár alkalmazásával roncsolásmentesen igen kis (10-100 µg) anyagmennyiséget párologtatunk el.

Slurry technika

A slurry technika (a szilárd minták szuszpenzió formájában történő porlasztása) szilárd minták roncsolásmentes vizsgálatánál egy lehetséges mintabeviteli technika. Ebben az esetben olyan pneumatikus porlasztót és porlasztókamrát kell használni, amely nagyobb részecskék beporlasztását is lehetővé teszi. Például V-vájatos vagy MiraMist típusú porlasztók használhatók Scott-féle ködkamrával. A megfelelő állagú, homogén szuszpenzió eléréséhez a különböző szilárd minták megfelelő őrlésére van szükség, amelyben a szemcseméret kisebb, mint 5 µm. Manapság ezt a legtokéletesebben a folyékony nitrogénben történt fagyasztást követő őrléssel tudjuk kivitelezni. A porlasztás közben a szuszpenziót mágneses keverővel, vagy ultrahangos mosóban folyamatosan homogenizáljuk.

4.5.4.3. Porlasztókamrák

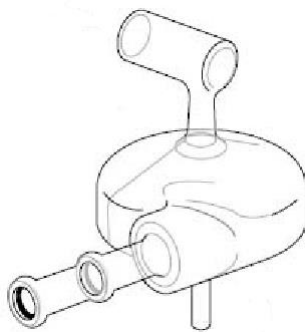
A pneumatikus porlasztókban előállított aeroszol részecskéket egy porlasztókamrán (más néven ködkamrán) visszük keresztül. A porlasztókamrának kettős szerepe van. Az egyik szerepe, hogy csupán a megközelítően 10 µm-nél kisebb átmérőjű részecskéket engedje be a plazmába, a másik pedig, hogy a porlasztókamra közbeiktatásával csökkenti a porlasztott részecskék térfogatáramának pulzálását. Ezáltal stabilizálja a plazma működését. Az ICP technikában háromféle típusú porlasztókamra terjedt el (10. táblázat). Az ICP-OES technikában leginkább a Scott-féle kétutas és a ciklonrendszerű ködkamrákat, míg az ICP-MS technikában a kúpalakú (Conical) egyutas, legtöbbször hűtött ködkamrákat alkalmazzák, melyben ütközőgömb is található. A porlasztókamrák hűtésével az oldószer (például a víz, de főként az illékony szerves oldószerek) mennyisége csökkenthető a keletkező gőzök kondenzáltatásával, mellyel egyrészt a

plazma terhelését, másrészt a képződő oxidok, hidroxidok mennyiségét tudjuk csökkenteni. A porlasztókamrák alján összegyűlő folyadékcseppekből, amelyek túl nagy méretűek, hogy bejussanak a plazmába, folyadékzárát alakítunk ki, ezáltal megakadályozzuk, hogy az argon gáz azon a nyíláson távozhasson el.

10. táblázat Porlasztókamra típusok

1. Ciklonrendszerű
 - egyutas
 - kétutas
2. Kúp alakú (Conical) (egyutas)
3. Scott-típusú
 - egyutas
 - kétutas

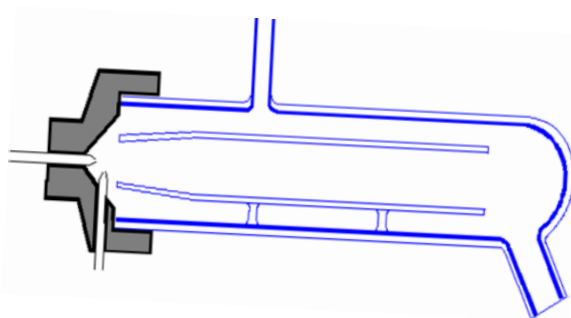
A ciklonrendszerű (50. ábra) és a kúp alakú porlasztókamrákat (51. ábra) boroszilikát üvegből és valamilyen típusú műanyagból is készítik, amely viszonylag kisebb sótartalmú minták vizsgálatára alkalmasak, a Scott-féle ködkamrákat (52. ábra) viszont egyaránt készítik üvegből, de tömény savaknak és lúgoknak ellenálló anyagból is (Ryton polimer).



50. ábra Ciklonrendszerű egyutas ködkamra



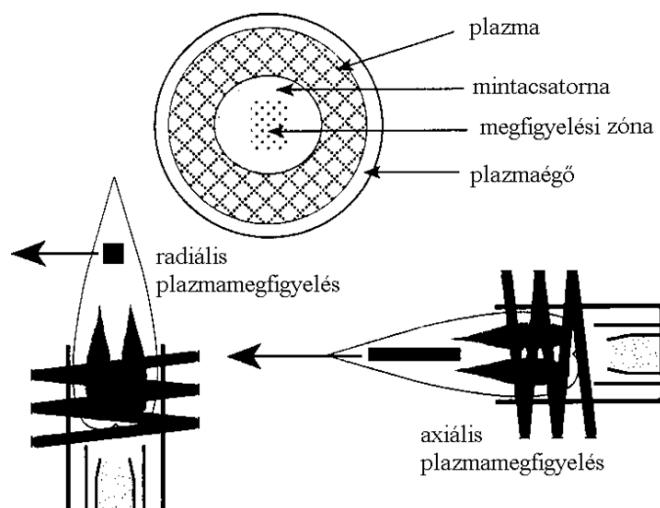
51. ábra Kúp alakú porlasztókamra (egyutas)



52. ábra Scott-típusú kétutas ködkamra

4.5.5. Optikai rendszerek

Az ICP-OES technikában lehetőség van mind axiális, mind radiális plazmamegfigyelésre (53. ábra). Az axiális plazmamegfigyelésnél a plazma magjában keletkező fényemissziót tudjuk vizsgálat céljára használni, ahol a plazma hőmérséklete megközelítően 8000 K.



53. ábra Radiális és axiális plazmamegfigyelési módok

A radiális plazmamegfigyeléssel viszont a 6000 K hőmérsékletű térrészhez férünk hozzá. Minél melegebb a plazma, annál nagyobb arányban keletkeznek atomok és ionok, valamint annál hatékonyabban tudja gerjeszteni az atomokat és ionokat. Ennek megfelelően megközelítően tízszeres fényintenzitást kapunk axiális megfigyelésnél, mint amelyet radiális plazmamegfigyeléssel érhetünk el. Ezért az axiális megfigyeléssel, az elemek átlagosan tízszer kedvezőbb (kisebb) kimutatási határait tudjuk elérni, mint radiális megfigyeléssel. Abban az esetben viszont, ha nagyobb sótartalmú mintában, relatíve kisebb elemtartalmak meghatározását akarjuk megvalósítani, akkor axiális megfigyelés esetén számolnunk kell a megközelítően tízszeres intenzitású elemzavarások megjelenésével is. Ha el akarjuk kerülni a nagyobb elemzavarások megjelenését, valamint a mérendő koncentrációk is lehetővé teszik, akkor ajánlatos a radiális plazmamegfigyelési mód alkalmazása.

Az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriában három plusz egy féle optikai elrendezésű készülékek közül választhatunk (11. táblázat). A legegyszerűbb optikai rendszert a monokromátor jelenti, mely rugalmas, de lassú módszernek tekinthető. A monokromátor használata rugalmas, mert a 160-850 nm hullámhossztartományban a bármely ICP-vel vizsgálható elem közül, bármely hullámhosszú vonala elemezhető. De lassúnak is nevezhető, mivel a működése szekvens, azaz az egyes elemek adott vonalait egymásután tudja megmérni.

A polikromátor alkalmazásával gyors (de rugalmatlan) vizsgálat valósítható meg, mivel egyszerre, szimultán módon nagyon sok (általában maximum 60 elem, vagy különböző hullámhosszú vonal) analízise valósítható meg. A módszer rugalmatlansága annak tudható be, hogy a polikromátorral csupán azok az emissziós vonalak elemzése végezhető el, amelyek beállítása a gyárban megtörtént. A fejezet elején említett plusz egy típust azért említettük, mert az ICP készülékünk beszerzésekor úgy is dönthetünk, hogy egy kombinált, azaz egy monokromátorral és egy polikromátorral egyaránt rendelkező készüléket vásároljunk meg, amely ötvözheti a fenti típusok előnyeit, azaz rugalmas és gyors módon is képes a vizsgálatokat kivitelezni. Ennek beszerzési ára viszont költséges.

Költséghímélőbb megoldásnak nevezhető az az ICP-OES készülék, mely Echelle-optikai elrendezéssel rendelkezik. Ezzel a berendezéssel gyakorlatilag mi választhatjuk meg akár napról-napra, hogy mely elem mely hullámhosszú vonalát használva végezzük a vizsgálatainkat. Ennek beszerzésével tehát rugalmas és gyors mérési módszert kapunk.

11. táblázat Optikai elrendezések

1. Monokromátor (rugalmas, de lassú)

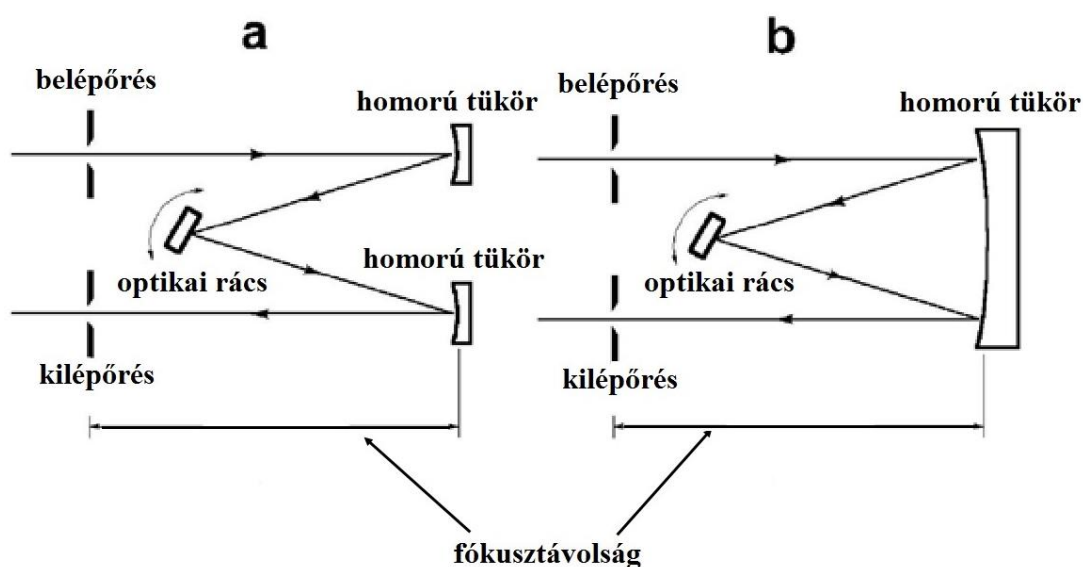
- Czerny-Turner rendszerű
- Ebert rendszerű

2. Polikromátor (gyors, de rugalmatlan)

- Paschen-Runge elrendezés
- Rowland-kör

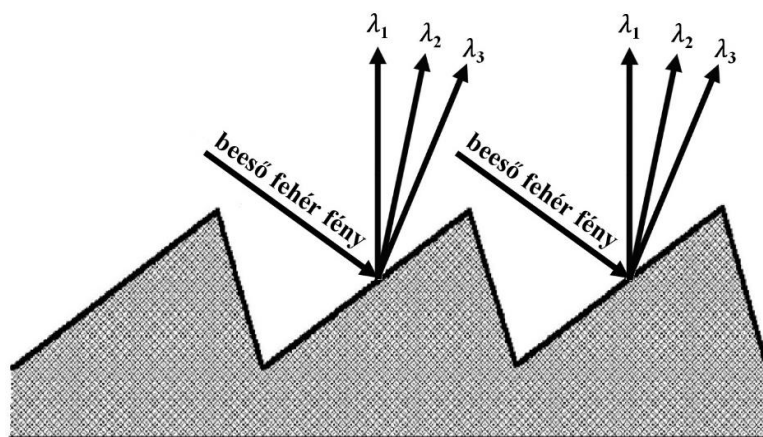
3. Szilárdtest detektor (rugalmas és gyors)

Az ICP-OES készülékekben Czerny-Turner vagy Ebert rendszerű monokromátorokat alkalmaznak.



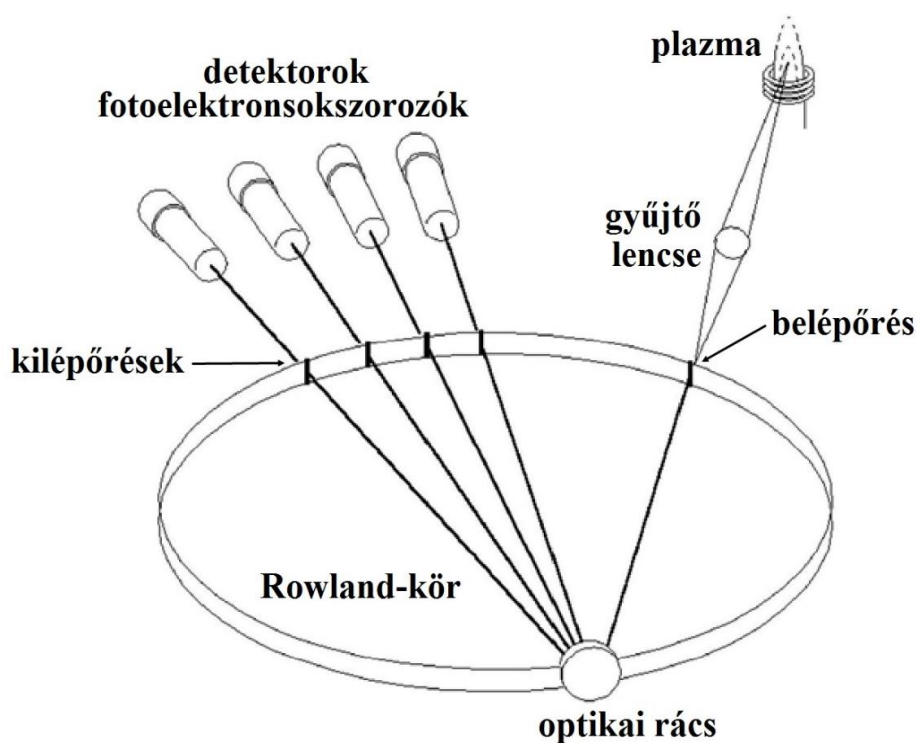
54. ábra Czerny-Turner (a) és Ebert rendszerű (b) monokromátorok

A monokromátorba a belépőrésen bejutó fehér fényből a homorú tükör párhuzamos sugárnyalábot állít elő, mely az optikai rácstra (diffrakciós rácstra) kerül. Az optikai rácson megtörténik a fehér fény különböző komponensekre való bontása (55. ábra). Az optikai



55. ábra Diffrakciós optikai rács

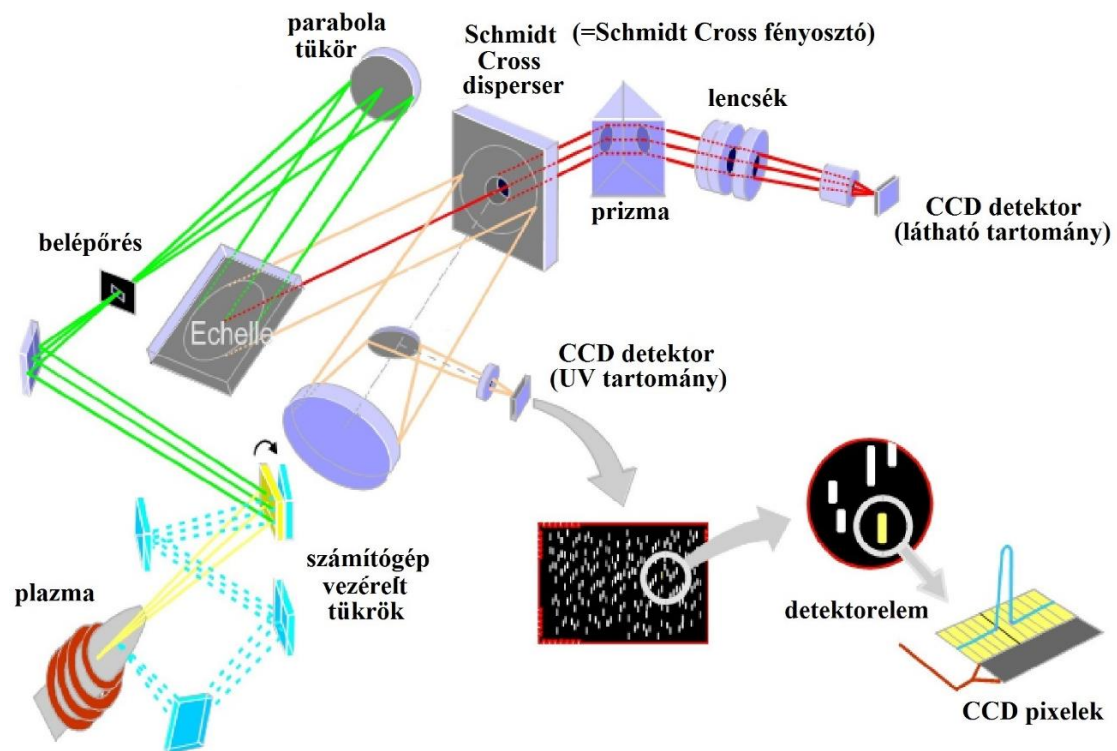
rács léptető motorral való forgatásával választjuk ki a mérendő elem adott hullámhosszú vonalát és ez azután szintén egy homorú tükör segítségével kerül a kilépőre. Természetesen az optikai rács és a kilépőres együttes használatával tudjuk meghatározni azt a hullámhosszt, jobban mondva azt a szűk hullámhossztartományt, amellyel mérhető az analizálandó elem fényemissziója. A Paschen-Runge elrendezésű polikromátor minden egyes optikai egységét (belépőres, optikai rács, kilépőres) egy körívre kell elhelyezni, amelynek a neve Rowland-kör (56. ábra). Ezzel szimultán módon több hullámhossz elemzése lehetséges, amely a fentiekben részletezett okok miatt relatíve gyors mérést tesz lehetővé.



56. ábra Paschen-Runge elrendezésű polikromátor

A harmadik lehetséges optikai elrendezés, az Echelle-rendszerű optika (57. ábra). A készülékgyártók manapság forgalmaznak olyan modern induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométereket, amelyek egyrészt mind radiális mind axiális plazmamegfigyelésre alkalmasak (az 57. ábrán számítógépvezérelt tükrök végzik el a megfigyelési mód kiválasztását), másrészt választható módon nagyon sok hullámhossz egyidejű vizsgálatát teszik lehetővé.

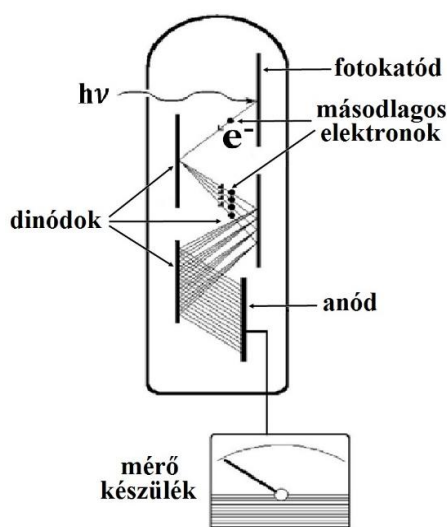
Az Echelle-rendszerű készülékekben az optikai rácsról reflektált sugárzás fényhasznosítása nagyon jó, így az elemzéshez szükséges jó fényfelbontást úgy érik el, hogy az 50-150. rendű spektrumok fényintenzitását használják az elemek koncentrációjának a meghatározására. Az optikai elemekkel úgy végzik a fény felbontását, hogy a spektrumszeletek egymás mellé kerülnek és kétdimenziós spektrum keletkezik a detektoron. A kétdimenziós spektrumot úgy lehet elképzelni a 2x2,5 cm dimenziójú szilárdtest detektoron (CCD vagy CID), hogy a különböző rendű spektrumok növekvő hullámhossztartományú sorai jelennek meg egymás alatt. Ezáltal a detektor bal felső sarkára esik a legkisebb vizsgálható hullámhossz, mely érték a sorokban balról-jobbra és felülről lefelé egyaránt növekszik. Az ICP-OES berendezésekben töltés csatolt (CCD=Charge Coupled Device), vagy töltés injektálásos (CID=Charge Injection Device) szilárdtest detektorokat használnak. Az Echelle-rendszerű ICP-OES készülékek egyidejűleg minimum 250 különböző emissziós vonal (szűk hullámhossztartomány) egyidejű vizsgálatára alkalmasak. Mivel az ICP-OES berendezésekkel 72-74 elem szimultán mérése lehetséges egyszerre, így szélsőséges esetben, azt is megtehetjük, hogy az ismeretlen minták elemtartalmának meghatározásához minden elemnél egy nagyon érzékeny, egy közepes érzékenységű és egy kevésbé érzékeny vonalat állítsunk be. Ezáltal kis, közepes és nagy koncentrációk érzékeny mérése is megoldható egy mérésen belül.



57. ábra Echelle-rendszerű optikai elrendezés

4.5.6. Detektorok

A monokromátoros és polikromátoros induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométerekben az ultraibolya és látható tartományban leggyakrabban fotoelektronsokszorozó csövet (58. ábra) (PMT=Photomultiplier Tube) alkalmaznak. Az ábráról is látható, hogy az adott hullámhosszú fény ($h\nu$) a fényérzékeny fotokatódra beesik és ez az elektródfelületből elektront tesz szabaddá, amely a dinódok közötti szabályozható potenciálkülönbség hatására felgyorsul és becsapódik a dinódba, ahonnan megsokszorozódva (négy-szer-hatszor) lépnek ki elektronok, amely folyamat a további dinódokon is folytatódik (az elektronsokszorozó lépés ismétlődik). A legújabb készülékekben pedig félvezető alapú érzékelőket, CCD és CID detektorokat alkalmaznak. Ezekkel a detektorokkal egy készüléken belül, vagy egy detektorral tudják lefedni a 160-850 nm analitikai hullámhossztartományt, vagy 2 különálló detektorral. Az utóbbi esetben egy mérésen belül, időben (egymásután) két lépésben végzi a minta elemzését UV és látható tartományban.



58. ábra Fotoelektronsokszorozó cső (Photomultiplier tube)

4.5.7. Zavaró hatások és kiküszöbölésük lehetőségei

Az induktív csatolású plazma emissziós sugárforrásként való bevezetése (1964.) után a korai irodalmak, mint zavaró hatásoktól mentes módszerről számoltak be. Később, az alaposabb vizsgálatok során viszont kiderült, hogy az analízis eredményét számos

effektus nagymértékben befolyásolja. Az ICP-OES technikánál jelentkező zavaró hatásokat négy csoportba sorolhatjuk:

1.) Fizikai zavaró hatások

- a. A porlasztandó oldat fizikai tulajdonságaitól függő hatások (az oldat sűrűsége, viszkozitása, felületi feszültsége, illékonysága, hőmérséklete, stb.).
- b. A porlasztandó oldatban található elemek minőségétől és mennyiségétől függő mátrixhatások (a plazma hőmérsékletének csökkenése).
- c. A különböző berendezések szerkezeti sajátosságaitól függő zavaró hatások (a porlasztók típusa és méretezése, a porlasztókamrák felépítése, a plazmaégő konstrukciója, az indukciós tekercs hőmérséklete, stb.).

2.) Spektrális zavaró hatások

- a. Vonalkoincidencia, vagy vonal egybeesés, amely nemcsak a plazmába táplált oldat elemtartalmától származhat, hanem a plazmában lévő argon vagy a plazmaégőből kioldódó szilícium elemektől is.
- b. Sávkoincidencia, amely nagymértékben megváltoztathatja a mérendő elem háttérét. Számos esetben a plazmába jutó disszociálatlan molekulák (N_2 , C_2 , CN, CH, OH, stb.) emissziója okozza.
- c. Vonalkiszélesedés, amelyek között a Doppler kiszélesedés mértéke megközelítően egy nagyságrenddel nagyobb, mint az összes többi hatása együttvéve.
- d. Háttérnövekedés, melyet okozhat a szórt fény, valamint a mintában található viszonylag nagy koncentrációban lévő elemek (Ca, Mg, K, stb.) ion-elektron rekombinációjából származó folytonos sugárzás.

3.) Könnyen ionizálódó elemek hatása, melyet a kis ionizációs potenciállal rendelkező elemek (K, Na, Cs) nagy koncentrációja idéz elő.

4.) Memória effektus akkor jelentkezik, amikor a standard vagy minta oldatot viszonylag nagy koncentrációban juttatjuk be a készülékbe.

Az ICP-OE spektrometriában ismertté vált fent említett zavaró hatások számos veszélyforrást jelentenek a gyakorlati analitikusok számára. Rutin mérések alkalmával néhány egyszerű szabály figyelembevételével azonban a zavaró hatások nagy része kiküszöbölhető.

A vizsgálandó és kalibráló oldat sűrűsége, viszkozitása, felületi feszültsége, illékonyága, valamint hőmérséklete közötti különbségből származó zavaró hatás (1a.) nagymértékben csökkenthető, amennyiben a mintaelőkészítéshez alkalmazott típusú savat ugyanabban a koncentrációban tartalmazzák a kalibráló oldataink is. Az oldatokat pedig a mérés előtt a kalibráló oldatokkal együtt ugyanazon a helyen vagy megközelítően ugyanolyan hőmérsékletű helyen tároljuk.

Az 1b. zavaró hatásokat a leginkább úgy tudjuk kiküszöbölni, ha minél inkább olyan elemtartalmú (mind az elemek minőségében, mind azok mennyiségében) standard oldatokat készítünk az ICP-OES készülék kalibrálásához, mint amilyen elemtartalmú minták vizsgálatát végezzük.

A fizikai zavaró hatások közül a különböző berendezések szerkezeti sajátosságaitól függő zavaró hatások (1c.) nem játszanak jelentős szerepet, amennyiben vizsgálataink közben nem változtatjuk meg a készülékünk különböző szerkezeti elemeit (például a porlasztó, valamint a plazmaégő típusát és méretét).

A készülékgyártók ugyan az ICP-OES berendezés összeállítása előtt a mindig jelenlévő argon és szilícium, valamint a vizsgálandó minták nagy koncentrációban található mátrix elemeitől származó vonalegybeesései (2a.), továbbá a sávkoincidenciák (2b.) ismeretében választják ki az elemek analitikai hullámhosszát – ezáltal számos vonal- és sávkoincidenciától származó zavaró hatást kiküszöbölnék –, az ICP-OES használatakor mégis a spektrális zavaró hatások jelentik a legtöbb problémát a gyakorlati analitikusok számára. Az interferencia kalibráció, vagy más néven a zavaró elem kalibráció alkalmas a viszonylag nem túl nagy zavaró hatások csökkentésére. (Nem nagy zavaró hatásról beszélünk abban az esetben, ha a vizsgált elem intenzitása nem összemérhető a zavarásból származó intenzitással.) Az interferencia kalibráció, továbbá az elemek valós koncentrációja az utóbbi időben előállított ICP-OE spektrométerek vezérlő és értékelő számítógépével, az iterációk megfelelő számának beállításával számítható. Az ICP-OES készülékek többnyire rendelkeznek olyan adatbázissal, amelyben feltüntették a lehetséges vonalegybeeséseket, amelyek segítségével a zavaró ionok megjósolhatók. A zavaró effektusok nagyságát az ICP-OES készülékek sajátosságai nagymértékben meghatározzák. Ezért a vizsgálandó minta elemtartalmától függően viszonylag nagy koncentrációban található zavaró elemek interferencia kalibrációját az új mérőmódszer bevezetésekor el kell végeznünk. Ha viszont túl nagy spektrális zavarás lép fel, akkor a

modern ICP készülékekben lehetőségünk van egy másik olyan vonal kiválasztására, amelyen az adott típusú mintánál nem tapasztalunk elemzavarást.

A vonalkiszélesedés (2c.) jelensége a kalibrációs görbe elhajlásánál (telítési effektushoz hasonló) játszik szerepet, amely jelenség a fotoelektronsokszorozók (fotomultiplierek) feszültségének, erősítésének, azaz a kalibrációs görbe dinamikus méréstartományának megfelelő megválasztásával kerülhető el. Továbbá helyes kalibrációs tevékenység (polinom illesztése) is elősegíti a minél pontosabb mérési eredmény elérését.

A spektrális zavaró hatások között feltüntetett háttérnövekedés (2d.) szintén automatikusan küszöbölhető ki az utóbbi időben előállított ICP-OE spektrométerek segítségével. A háttérnövekedést a vonal közvetlen környezetében végzett háttérmérésének a bruttó jelből történő levonásával tudjuk kiküszöbölni. A háttér mérésénél megkülönböztetünk bal-, jobb- és kétoldali háttérkorrekciót. A megfelelő oldalon végzett háttérkorrekció megfelelő mértékben képes kiküszöbölni a háttérnövekedésből származó zavaró tényezőt. Az elemző vonalak bal (kisebb a hullámhossza, mint a vonalnak) vagy jobb oldalán (nagyobb a hullámhossza, mint a vonalnak) a disszociálatlan molekuláktól (N_2 , C_2 , CN , CH , OH , stb.) vagy számos elemtől származó zavaró emissziót tapasztalhatunk. Ezek ismeretében kell kijelölnünk a vonalak háttérmérésének a helyét.

Az induktív csatolású plazma sugárforrásként való alkalmazása kapcsán számos kutató foglalkozott a könnyen ionizálódó elemek (Li , Na , K) hatásával (3.). Ezek vizsgálatát egyrészt az atomabszorpciós készülékek lángjában lejátszódó fizikai folyamatok folytatásaként, másrészt a nagy sótartalmú tengervíz vizsgálata céljából végezték el. Ezek hatását a legjobban úgy tudjuk kiküszöbölni, ha minél inkább olyan minőségű és elem koncentrációjú standard oldatokat készítünk, mint a vizsgálandó minták.

Az atomspektrometriai módszerekben memória effektust tapasztalhatunk a porlasztórendszerben, vagy például az ICP-MS kónuszain, ha a beporlasztott oldat viszonylag nagy koncentrációban tartalmazza a meghatározandó elemet. Kiküszöbölését a minták között alkalmazandó mosóoldat mosási időtartamának növelésével, valamint a minta hígításával és olyan porlasztórendszer megválasztásával tudjuk csökkenteni, mely kisebb memória effektust eredményez.

4.6. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria

4.6.1. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria elve

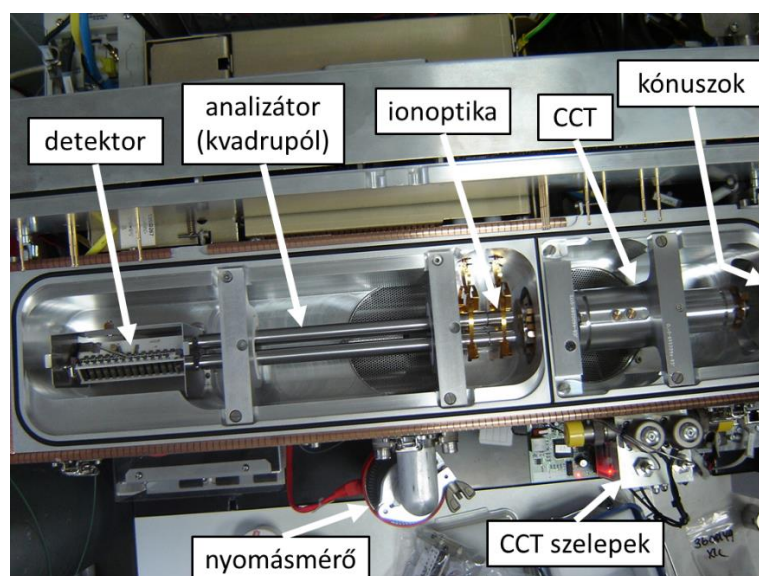
1975-ben az első olyan cikket Alan Gray publikálta, az angliai Lutonban, az egyenáramú ívplazmával végzett vizsgálatokról, melynek során izotóparányokat határozott meg tömegspektrometriás detektálás alkalmazásával. Három évvel később Alan Gray és Velmer Fassel közösen kezdtek el kutatásokat folytatni, mely kutatómunkáról 1980-ban jelent meg az első induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS) foglalkozó cikkük, több társszerzővel együtt. További három évre volt szükség, hogy 1983-ban bemutatásra kerüljön az első kereskedelmi forgalomban kapható ICP-MS készülék.

Az induktív csatolású plazma tömegspektrometria, a nevéből is adódóan két fő részből áll. Az első része az induktív csatolású plazma, míg a második, az elválasztást és az azt követő detektálást végző rész, a tömegspektrométer. Amit az előző fejezetben részletesen bemutatunk az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométerrel kapcsolatban, annak nagy részét, mint ismeretanyagot ennél a résznél is felhasználhatjuk, ismételt tárgyalását nem tartjuk indokoltnak. Mivel mindkét mérési módszer (ICP-OES és ICP-MS) esetén gyakorlatilag szinte ugyanarról az ICP-ről van szó (34. ábra), így az ICP-OES ismeretanyaga a „plazma végéig” megegyezik az ICP-MS használatához nélkülözhetetlen ismeretek első részével, azaz az ICP résszel.

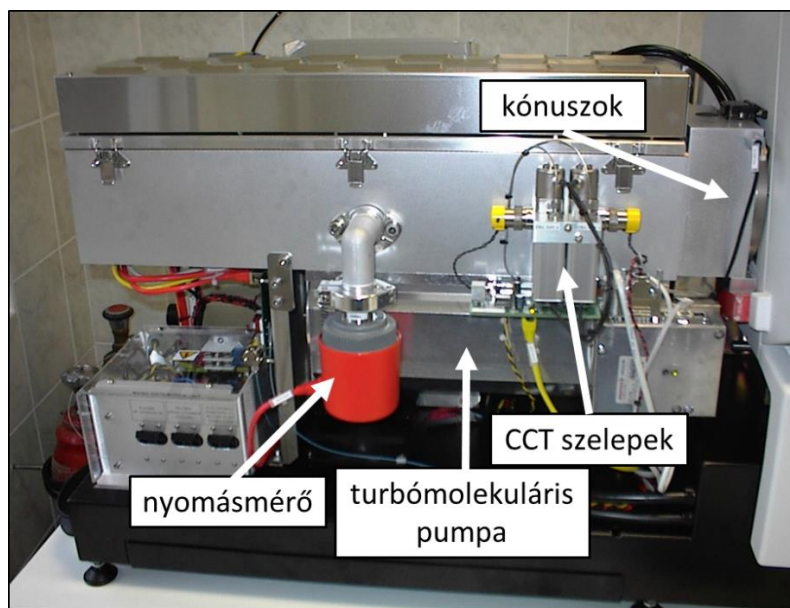
Az ICP-MS mérésben a plazma viszont már nem sugárforrásként játszik szerepet, hanem ionforrásként. A 33. ábrán bemutatott folyamat természetesen az ICP-MS plazmájában is végbemegy, viszont ebben a rendszerben a fénykibocsátás csak mint mellékfolyamat játszódik le. Az ICP-MS plazmájának az a legfontosabb feladata, hogy – lehetőség szerint egyszeresen pozitív töltéssel rendelkező – ionokat képezzen, amelyeket a tömegspektrométer a későbbiekben szétválasztani és detektálni képes. A képződött kationok elkülönítése és detektálása tömeg/töltés (m/z) szerint történik, melynek a mértékegysége amu (Atomic Mass Unit=atomi tömegegység).

4.6.2. Az ICP-MS készülék felépítése

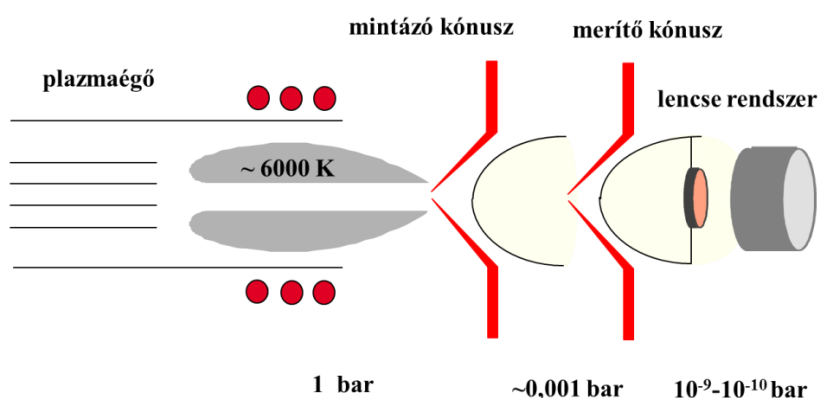
Az ICP-MS fő részei bemutatására is használhatjuk a 34. ábrát, azzal a különbséggel, hogy az ICP-OES készüléknél az optika, a spektrométer és a detektor helyett, az ICP-MS berendezésben a tömegspektrométer található, amely tartalmazza az ionoptikát, az analizátort és a detektort (59. és 60. ábra). A tömegspektrométer működéséhez továbbá nélkülözhetetlenek még az ionforrás (plazma) után található kónuszok (mintázó és merítő), majd az ütközési és reakció cella (ez nem feltétlenül szükséges egység, nem is tartalmazza minden ICP-MS) az analizátor előtt. A tömegspektrométer megfelelő működéséhez nélkülözhetetlen a nagyvákuum elérése, amely akár a 10^{-9} - 10^{-10} bar nyomású is lehet. Ezt kétlépcsős nyomáscsökkentéssel érjük el. A készülék külső terében természetesen 1 bar uralkodik, a mintázó és merítő kónuszok között 10^{-3} bar, míg az ionoptikát és a kvadрупólt, valamint a detektort tartalmazó térrészben 10^{-9} - 10^{-10} bar nyomás található (61. ábra). Ezt a nagyvákuumot egy rotációs és legalább egy turbómolekuláris pumpával érjük el (60. ábra). A nagyvákuumot azért kell biztosítanunk, hogy elkerüljük a részecskék (ionok, molekulaionok) másodlagos ütközését (káros mellékreakciók). Az ionoptika egyrészt eltéríti az ionnyalábot, másrészt fókuszálja az ionokat az analizátor belépőréseire.



59. ábra Az ICP-MS berendezés tömegspektrométer részének sematikus felépítése (felülről) (CCT=Collision Cell Technology, lásd részletesen a 4.6.5. fejezetben)



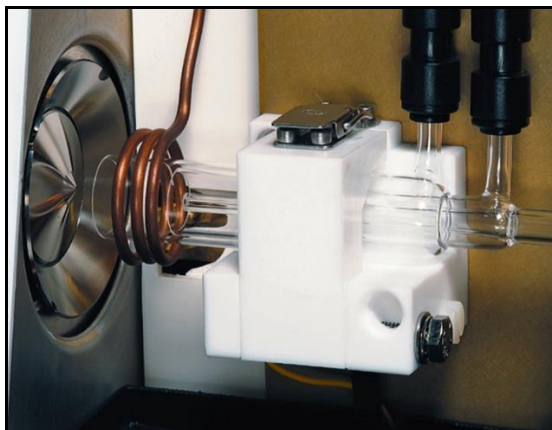
60. ábra A tömegspektrométer egységei (oldalról)



61. ábra A nyomások alakulása az ICP-MS-ben

4.6.3. A plazma, mint ionforrás

Az ICP készülék plazma részét, az axiális elrendezésű ICP-OES berendezésekhez hasonlóan vízszintesen helyezik el (15. kép). A plazma azért szolgálhat ionforrásként, mert az argon ionizálódásával (az argon első ionizációs energiája 15,76 eV), a plazma olyan potenciált képvisel, amelybe a bekerülő elemek jelentős része (több mint 50 elem) 90%-ban, vagy még nagyobb mértékben ionizálódni képes ilyen potenciál mellett. Ez annak tudható be, hogy az elemek többségének az ionizációs potenciálja kisebb, mint az argoné, azaz a plazma hőmérséklete (6000-8000 K) biztosítja az elemek ionizációját.



15. kép A mintázó kónusz, az indukciós tekercs és a plazmaégő bemutatása

A plazmába bekerülő atomok termikus ionizációjának mértéke a Saha-egyenlettel írható le (26).

$$\frac{n_{i+1}}{n_i} = \frac{(2 \cdot \pi \cdot m \cdot k \cdot T)^{\frac{3}{2}}}{n_e \cdot h^3} \cdot \frac{2 \cdot g_{i+1}}{g_i} \cdot e^{\left(\frac{-V}{k \cdot T}\right)} \quad (26)$$

ahol

n_{i+1} : i+1-edik ionizációs szinten lévő részecskék száma

n_i : i-edik ionizációs szinten lévő részecskék száma

m_e : az elektron tömege ($9,1095 \cdot 10^{-31}$ kg) (a proton tömegének 1836-od része)

k : Boltzmann-állandó ($k=1,380622 \cdot 10^{-23}$ J/K)

T : abszolút (elektron) hőmérséklet

n_e : az elektron sűrűsége

h : Planck-állandó ($6,626196 \cdot 10^{-34}$ J·s)

g_{i+1} : az i+1-edik szint statisztikus súlya

g_i : az i-edik szint statisztikus súlya

V : az ionizációs potenciál

A plazmából az ionok a mintázó kónuszon (16. kép) és a merítő kónuszon (17. kép) keresztül jutnak be a tömegspektrométerbe. Ezek a kónuszok jó hővezető fémekből kell hogy készüljenek, mivel a kónuszok intenzív vízűtést igényelnek. Ezért ezeket többnyire nikkelből, néha platinából, alumíniumból, vagy rézből készítik. A mintázó kónuszon (Sampler Cone) lévő furat átmérője megközelítően 1 mm (általában 0,8-1,2 mm). A második kónusz, azaz a merítő kónusz (Skimmer Cone) kisebb átmérőjű furattal rendelkezik, többnyire 0,4-0,8 mm.

Amennyiben viszonylag nagyobb sótartalmú minták elemzését végezzük az ICP-MS készülékkel, úgy számos esetben a hidegebb merítő kónuszon jelentős sókirakódás figyelhető meg (18. kép) (akár el is tömődhet teljes mértékben), míg a melegebb állapotú mintázó kónuszon szinte semmilyen szemmel látható sókirakódás nem jelenik



meg.

16. kép Nikkel mintázó kónusz



17. kép Platina merítő kónuszok



18. kép Merítő kónuszok tisztán és sókirakódással

4.6.4. Analizátor típusok

Az analitikában többféle analizátor használatos különféle analitikai célokra, viszont az elemanalitika területén csupán háromféle tömegspektrométer terjedt el, amely végeredményben négyféle analizátort jelent.

12. táblázat Tömegspektrométer típusok

1. Kvadrupól (Q=Quadrupol)
2. Repülési idő analizátor (TOF=Time of Flight)
3. Kettős fókuszálású (nagy felbontóképességű) (HF=High Resolution, SF=Sector Field)

Az élelmiszervizsgálatok kutatási és rutin elemtartalmi vizsgálatai során leggyakrabban a kvadrupól, kisebb mértékben a nagy felbontóképességű és még ritkábban a repülési idő tömegspektrométereket alkalmazzák az ionnyaláb ionjai szétválasztására és detektálására.

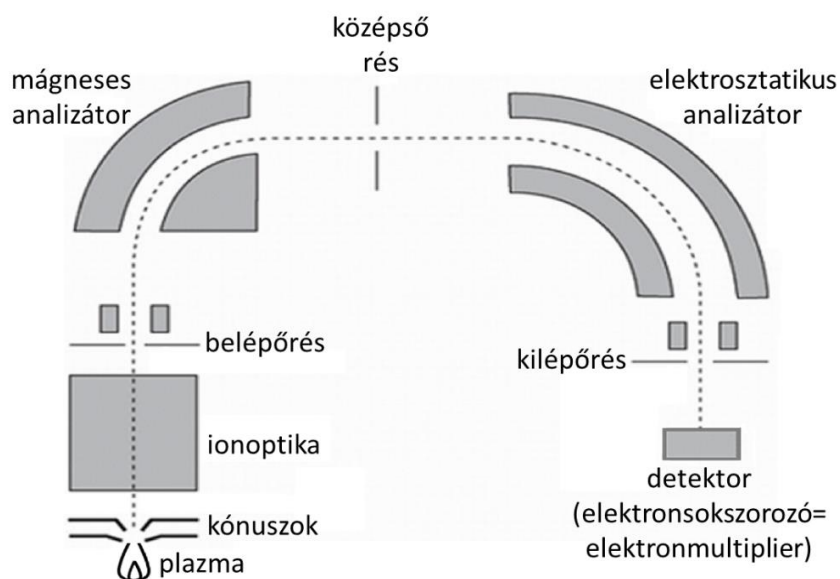
Kettős fókuszálású (nagy felbontóképességű) ICP-MS

A kettős fókuszálású, más néven nagy felbontóképességű ICP-MS berendezéseket a hazai és nemzetközi szakirodalomban mozaikszóval rövidítve HR-ICP-MS (High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, vagy ICP-HR-MS) és SF-ICP-MS (Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, vagy ICP-SF-MS) névvel is illetik.

A kettős fókuszálás elnevezés onnan származik, hogy két analizátort alkalmaznak benne, az első a mágneses, a második az elektrosztatikus analizátor (62. ábra).

A mágneses analizátor esetén a plazmából származó egyszeresen pozitív ionokat nagyfeszültségű térben gyorsítják, ezáltal közel azonos kinetikus energiájuk lesz. Az ionok a tömegspektrométer belépőrésén lépnek be a mágneses térbe, amelyek a tömeg/töltésük (m/z) szerint eltérülnek. A kationok ezáltal szeparálódnak, a kisebb tömegűek kisebb sugarú körpályán haladnak, mint a nagyobb tömegűek.

A második analizátor az elektrosztatikus analizátor, mely egy pozitív (külső ívű lemez) és egy negatív (belső ívű lemez) elektródból áll. Különböző sebességű és azonos m/z értékű ionok lépnek ki a mágneses analizátorból és a résen keresztül lépnek be az elektrosztatikus analizátorba. Az elektrosztatikus analizátor a kinetikus energiájuk alapján szeparálja és fókuszálja az ionokat, amely ionok végül becsapódnak a detektorba. Ezzel az elrendezéssel a legjobb (nagy) felbontóképesség 10000. A HR-ICP-MS készüléken további két felbontóképesség állítható be; az egyik a közepes, amely 4000 és a kislebontású mód, amely 300. Mivel a felbontóképességet a ki- és belépőrések szélességének állításával lehet változtatni, ezért a felbontóképesség növelésével egyre kevesebb ion jut be a detektorba, amely ezáltal a készülék érzékenységét megközelítően tized-század részére csökkenti. A nagyfelbontás alkalmazásával jelentős mértékben romlik (nő) a módszer kimutatási határa.



62. ábra A kettős fókuszalású ICP-MS rendszer felépítése

A nagyfelbontású tömeganalizátorban a felbontóképességet (R =Resolution) az ún. 10% völgy definícióval szokás megadni, amely azt fejezi ki, hogy milyen tömegkülönbséggel tud szétválasztani két kationt. Ez alapján két egyenlő intenzitású csúcs akkor válik szét, ha a völgy a két csúcs között a csúcsmagasság 10%-ánál nem nagyobb. Az R felbontóképességet a 27. egyenlet szerint kell kiszámítani, ahol a 63. ábrán is láthatóan az m az adott ion tömegét, míg a Δm a két kation tömegének különbségét adja meg. A felbontóképességet a kvadrupól készülékeknél a csúcsmagasság 50%-ánál mérik (64. ábra).

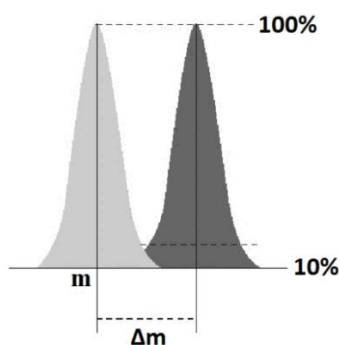
$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (27)$$

ahol

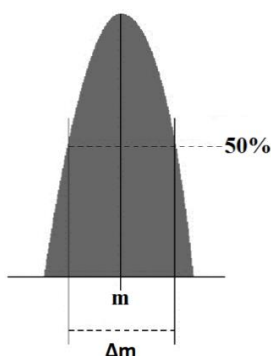
R : felbontóképesség

m : az ion tömege

Δm : a két közeli kation tömegének különbsége



63. ábra A felbontóképesség számítása nagyfelbontású ICP-MS rendszerénél



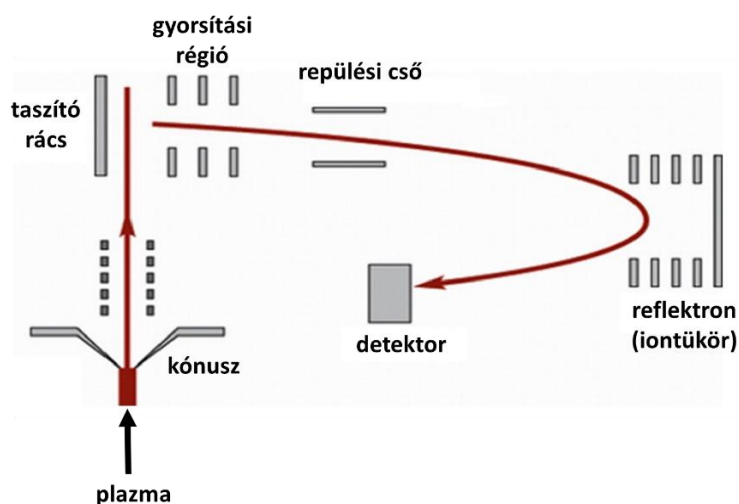
64. ábra A felbontóképesség számítása kvadrupól ICP-MS készüléknél

Repülési idő analizátor

A plazmából a kónuszon keresztül az ionok bekerülnek a taszító rácshoz, ahol a gyorsító feszültség alkalmazásával azonos kinetikai energiájú ionokat hozunk létre. Az ionforrásban keletkezett különböző m/z hányadosú kationokat elektromos erőterrel gyorsítjuk a gyorsítási régióban, majd az ionok becsapódnak a vákuum alatt lévő repülési csővön keresztül a detektorba (65. ábra). Mivel az összes ion egyszerre azonos kinetikus energiával lép be a repülési térbe, ezért a detektorig tartó repülési idejük a tömegüktől fog függni. Az azonos töltésű, kisebb tömegű ionok sebessége nagyobb lesz, ezért rövidebb idő alatt érik el a detektort. A legnehezebb ionok maximum 50 μs alatt érik el a detektort, ezután vezethetünk be újabb ionokat a rendszerbe. Ez az ICP plazmájánál problémát jelent, mivel az egy folytonos ionforrás.

Az ICP-TOF-MS készülékeknél többnyire az ortogonális elrendezést alkalmazzák, amelyben az ionnyaláb haladási irányára merőlegesen alkalmazzák a gyorsító feszültségimpulzust. Amíg az összes ion el nem éri a detektort, addig nem indítanak újabb impulzust. Tehát a plazmából származó folyamatos ionnyalábot diszkrét

ioncsomagokra bontják. Ezáltal az ICP-TOF-MS berendezés egy másodperc alatt megközelítően 30ezer komplett spektrum kivitelezésére képes. Az ortogonális elrendezésnél az ionok behatolnak a reflektornba, míg kinetikus energiájuk nulla nem lesz, majd megállás után visszafelé kezdenek gyorsulni (visszaverődnek), miközben újrafókuszálódnak és így csapódnak bele a detektorba. Az iontűkőr homogén elektrosztatikus terű növekvő feszültségű dróthálógyűrűk sorozata.



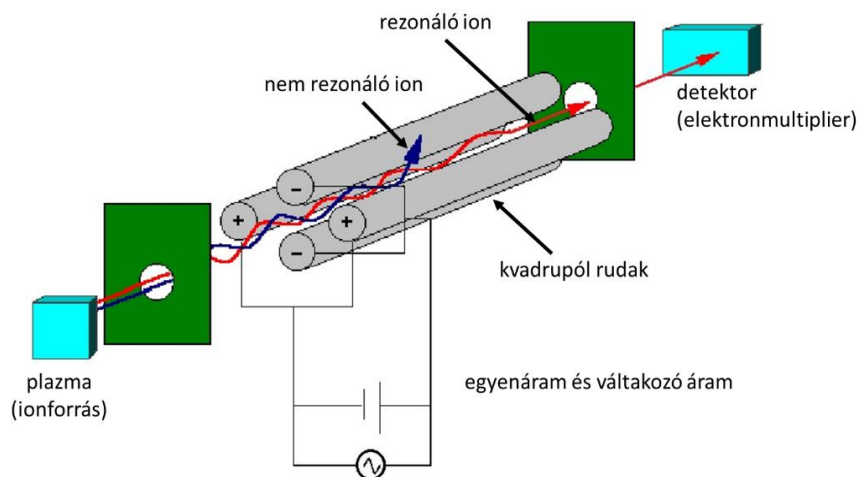
65. ábra Az ortogonális elrendezésű ICP-TOF-MS készülék

Amennyiben 10%-os völgy definícióval akarjuk megadni az ICP-TOF-MS felbontóképességét, akkor megközelítően 450-500 tartományba esik, míg az 50%-os számítás használatával 1200-1300 tartományba esik.

Kvadrupól analízátor

A kvadrupól analízátorban (a nevéből adódóan is) négy párhuzamosan elrendezett fém (például molibdén) rúd végzi az ionok elválasztását, az m/z értéknek megfelelően. A rudak 40 cm, vagy attól kisebb hosszúságúak. A két-két szemben lévő rúdon egyenáramot és váltakozó nagyfeszültséget hoznak létre (66. ábra). A szemben lévő váltakozó feszültséggel, az adott m/z értékkel rendelkező ionok rezonálni fognak és szinusz görbe mentén haladnak a detektor felé. Azon ionok, melyek nagyobb vagy kisebb m/z értékkel rendelkeznek, azok egyre nagyobb amplitúdóval rendelkező mozgást írnak le (nem tudnak rezonálni) és végül kiesnek az ioncsatornából. Ugyanez a jelenség történik a másik két szemben lévő rúd között is. Az előbbi két-két rúd közötti szinusz görbék mentén történő mozgás eredőjeként a kvadrupólban vándorló ionok egy

spirális pályán vándorolnak a detektor felé. A feszültség értékének változtatásával tudjuk meghatározni azt a tömeg/töltés értéket, azt a megközelítően 1 amu tömegtartományt, amelyet detektálni szeretnénk. Ezek az ionok fognak becsapódni a detektorba.



66. ábra A kvadrupól tömeganalizátor vázlatos rajza

A kvadrupól tömegspektrométerrel általában a 2-260 amu tömegtartományban végezhetjük a vizsgálatokat. Mivel a kvadrupól ICP-MS készülékek megközelítően egységnyi tömegek elválasztására alkalmasak, ezért kis felbontóképességgel rendelkeznek ($R=m/\Delta m=300$). Relatív nagyobb felbontóképesség alkalmazására is van lehetőség, de ebben az esetben megközelítően 0,5 amu egységek különíthetők el egymástól.

Mivel a kvadrupól tömegspektrométerrel az adott tömegben való elemzési módszer, valamint a tömegpásztázásos (Scanning) módszer is gyors, így az ICP-MS-módszerrel nagyszámú elem határozható meg viszonylag rövid idő alatt, amely így a minták mérésidejét figyelembe véve (mintaszámban és elemszámban) teljesítménye összevethető a szimultán multieleemes induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriai módszerekével.

A kvadrupól tömegspektrométernél lehetőség van, a plazma kezelését, hőmérsékletét tekintve, háromféle mérési mód alkalmazására. Ezek a következők: normál mód, forró plazma és hideg plazma. A hideg- és forróplazma használatánál egy árnyékoló nikkelgyűrűt illesztünk be a plazmaégő külső kvarccsőve és az indukciós tekercs közé. Emellett ha a mintagáz áramlási sebességét növeljük, valamint a kicsatolt teljesítményt

jelentős mértékben csökkentjük (550-700 W értékre), úgy a plazma hőmérséklete 2000-3000 K-nel csökken, vagyis hidegplazmát hozunk létre. Ez esetben, figyelembe véve a Saha-egyenletet (26), a kisebb ionizációs potenciállal rendelkező elemek (főként az alkáli és alkáliföldfémek) 2-3 nagyságrenddel kedvezőbb (kisebb) kimutatási határ mellett vizsgálhatók. A gyűrű alkalmazásával egyrészt kedvezőbb ionizációs hatások érhető el bizonyos elemeknél, valamint a hőmérséklet jelentős csökkenésével, nagymértékben csökken a plazmában megjelenő molekulaion zavarások nagysága. Amennyiben a normál plazma paraméterek mellett viszont alkalmazzuk a nikkelgyűrűt, akkor forró plazma módot tudunk elérni. Ezáltal a háttér intenzitások nem változnak, viszont a jelintenzitások jelentős emelkedése figyelhető meg. Így általánosságban, megközelítően kétszeresére nő a mérési módszerek érzékenysége. Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a nikkelgyűrű alkalmazása mind a hideg, mind a forró plazma esetén pozitív hatásokat eredményez. Nagyon fontos viszont kiemelni, hogy mindez csak az elemek bizonyos csoportjaira teljesül, nem az összesre.

4.6.5. Zavaró hatások és kiküszöbölésük lehetőségei

Mint ahogyan a fentiekben már többször is említettük, az induktív csatolású plazma tömegspektrometria ugyanazokat a jegeket hordozza számos esetben, mint az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria, mivel ennél a módszernél is az analitikai jel forrása egy induktív csatolású plazma. Ezért ebben a fejezetben sem kívánjuk még egyszer részletezni a 4.5.7. fejezetben már tárgyalt közösnek nevezhető zavaró tényezőket. Az ICP-OES és az ICP-MS technikáknál közösen jelentkező zavaró hatásokat négy csoportba sorolhatjuk:

- 1.) Fizikai zavaró hatások (a., b. és c. típusok)
- 2.) Spektrális zavaró hatások
- 3.) Könnyen ionizálódó elemek hatása
- 4.) Memória effektus

Az 1., 3. és 4. pontokban részletezett zavaró tényezők egyaránt előfordulnak mindkét technikában, továbbá a kiküszöbölésük, vagy csökkentésük is hasonló módszerekkel lehetséges. A 2. pontban található spektrális zavaró hatások is természetesen mindkét technikában előfordulnak, viszont amíg az ICP-OES technikánál ezek optikai jellegű zavaró tényezőket jelentenek, addig az ICP-MS-ben ezek a tömegmérésből adódó

zavaró tényezőket fog képviselni. Az ICP-MS technikában, spektrális zavaró hatást bármely olyan egy vagy több atomból álló (molekula) ion okozhat, amelynek a tömeg/töltés értéke annak az ionnak a tömeg/töltés értékével egyezik meg, mely az elemzésünk célja. Ennek megfelelően megkülönböztetünk izobár elemzavarást és izobár molekulazavarást.

Akkor beszélünk izobár elemzavarásról, ha olyan zavaró hatás lép fel, mely esetén egy atomos ion m/z értéke egyezik meg a meghatározandó elem adott izotópjának a tömegével. A zavaró elem kationja lehet egy, kettő, sőt három pozitív töltésű is.

Egyszeresen pozitív kationok zavaró hatása jelentkezhet titán, króm vagy vanádium mérésekor, ha az említett másik két kation a mérést zavaró koncentrációban van jelen. Ezek m/z értéke sorban: $^{50}\text{Ti}^+=49,9447921$; $^{50}\text{Cr}^+=49,9460464$ és $^{50}\text{V}^+=49,9471609$. Ugyanerre példa a $^{87}\text{Sr}^+=86,9088841$ és $^{87}\text{Rb}^+=86,909187$. Kétszeresen pozitív kation zavaró hatása jelentkezhet a $^{44}\text{Ca}^+$ izotóp mérésekor, ha a $^{88}\text{Sr}^{2+}$ a kalcium izotóp mérését zavaró koncentrációban jelenik meg a plazmában. Továbbá ugyanígy gondot jelent a $^{45}\text{Sc}^+$ izotóp mérésekor megjelenő $^{135}\text{Ba}^{3+}$ kation is.

A fenti izobár elemzavarásokat a következő eljárásokkal lehet kiküszöbölni:

- Amennyiben a vizsgálandó elemnek létezik másik izotópja (amelynek a természetes gyakorisága lehetővé teszi az elemzést), úgy érdemes másik izotópot választani az elem vizsgálatához.
- Kettős fókuszálású ICP-MS készülékkel, ha a 27-es egyenletnek megfelelően a pontos tömegek különbségéből kiszámolt felbontóképesség kisebb, mint 10000. A fenti egyszeresen pozitív kationok egyik zavaró hatása sem küszöbölhető ki ezzel a módszerrel.
- Matematikai korrekciós módszer alkalmazásával, ha a zavaró elem egy másik izotópjának elemzésével kiszámítjuk a zavaró hatás nagyságát és azzal korrigáljuk a mérést.
- Többszörös töltésű kation képződését megakadályozhatjuk, ha kisebb hőmérsékletű plazmát állítunk be, alacsonyabb kicsatolt teljesítmény megválasztásával. Itt kell megemlíteni a hidegplazma alkalmazásának lehetőségét is.

Izobár molekulazavarásról akkor beszélünk, ha a zavaró hatást többatomos ionok okozzák. A többatomos részecskéket nevezhetjük molekuláknak, vagy adduktumoknak is. Ezek lehetnek dimer, trimer vagy tetramer adduktumok is (13. táblázat). Ezek az atomok származhatnak a vizsgálandó oldat komponenseitől (például: ha nagy a Ca, a Na, vagy a Cl), a mintamátrixtól (például H vagy O), a plazmagázból (Ar) és a készüléket környező levegőből (például N vagy O) is, mely bediffundálhat a plazmába. Ezen zavaró anyagok atomjai összekapcsolódásával keletkeznek a fenti adduktumok.

13. táblázat Néhány zavaró adduktum

A meghatározandó elem izotópja	Tömeg (amu)	Az egyszerűen pozitív töltésű zavaró részecske
Mg	24	CC
Si	28	N ₂
S	32	O ₂
K	39	ArH
V	51	ClO
Cr	52	ArC
Fe	56	ArO
Cu	63	ArNa
Zn	66	ArMg
As	75	ArCl
Se	80	ArAr
Se	82	ArHArH

A fenti izobár molekulazavarásokat a következő eljárásokkal lehet kiküszöbölni:

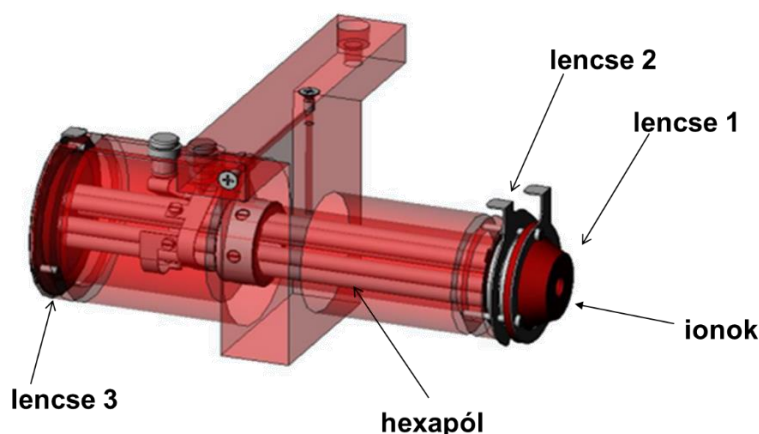
- Amennyiben a vizsgálandó elemnek létezik másik izotópja (amelynek a természetes gyakorisága lehetővé teszi az elemzést), úgy érdemes másik izotópot választani az elem vizsgálatához.
- Kettős fókuszálású ICP-MS készülékkel, ha a 27-es egyenletnek megfelelően a pontos tömegek különbségéből kiszámolt felbontóképesség kisebb, mint 10000. A 13. táblázatban található összes zavaró kation zavaró hatása elválasztható a meghatározandó elem izotópjától, azaz zavarásmentesen elemezhető, legalábbis ezektől a zavarásoktól mentesen. A nagyfelbontás

alkalmazásával viszont egy-két nagyságrenddel nő (romlik) a módszer kimutatási határa, a kislebontáshoz képest.

- Matematikai korrekciós módszer alkalmazásával, ha a zavaró részecske mennyiségét meg tudjuk becsülni egy másik tömegszámon való elemzésből.
- A mérendő minta mátrixának kifagyasztásával jelentősen csökkenthető a mintaoldattól (például a víztől és a savtól) származó zavarás.
- A hidegplazma alkalmazásával, mely csökkenti számos molekulaion képződését.
- Olyan kvadрупól tömegspektrométerrel, mely rendelkezik ütközési és/vagy reakciócellával.

Ütközési és/vagy reakciócellák működése

Az ütközési/reakciócella (CCT=Collision Cell Technology) (59. és 67. ábra) egy olyan hexapól, oktapól vagy kvadрупól rendszer (a készülékgyártóktól függően), mely használatával az induktív csatolású plazmából a tömegspektrométerbe jutó molekulaionok nagyrésze eliminálható az ionnyalábból. A CCT egységet a kónuszok után helyezik el (59. ábra), melybe ütközési- és reakciógázt vezetnek, mely a különböző kölcsönhatások révén eliminálja a zavaró poliatomos részecskék jelentős részét. Ütközési- és reakciógázként főként H_2 , He, NH_3 , CH_4 , vagy ezek keveréke (például 7-8% H_2 + 92-93% He, 1% NH_3 + 99% He), valamint egyéb gáz is alkalmazható, például CO, vagy még vízgőz is, sőt más cél miatt ugyan, de még O_2 -t is bevezethetünk a CCT szelepen.

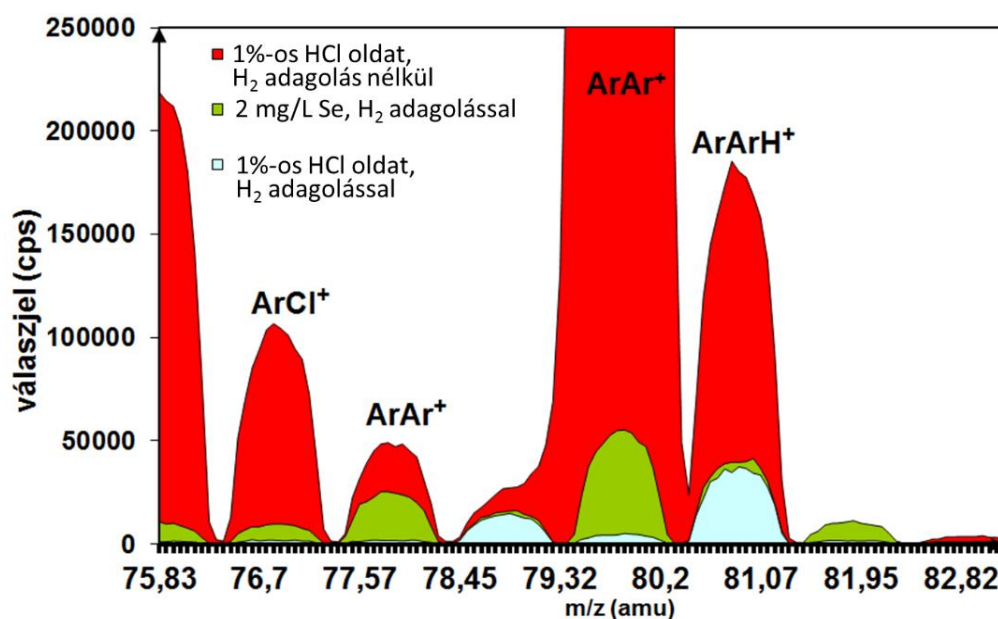


67. ábra Ütközési/reakciócella vázlatos rajza

A molekulaionok eliminációját a CCT egység 99,99%-os hatékonysággal végzi, azaz 10000 db zavaró részecskéből csupán egyetlen marad változatlan formában.

A 13. táblázat utolsó előtti sorában találjuk a ^{80}Se izotópot, melynek a természetes gyakorisága a szelén izotópjai között a leggyakoribb, megközelítően 50%. Ennélfogva a szelén elemzésénél a legkedvezőbb (legkisebb) kimutatási határt ennek az izotópnak az alkalmazásával érjük el. Ez viszont csak abban az esetben igaz, ha ezen az izotópon nem kell jelentősebb spektrális zavaró tényezővel számolnunk. A 13. táblázatban és a 68. ábrán is látható, hogy a ^{80}Se izotópon jelentős molekulaion zavarás ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) jelenik meg. A szelén izotópon ($^{80}\text{Se}^+$), a jelen példában a $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ (poliatomos részecske) zavarás eliminációjának/csökkentésének 4 különböző mechanizmusa ismert, melyek a következők:

1. ütközési disszociáció
pl. $\text{ArAr}^+ + \text{He} = \text{Ar} + \text{Ar}^+ + \text{He}$
2. kémiai reakció
pl. $\text{ArAr}^+ + \text{H}_2 = \text{ArH} + \text{ArH}^+$
3. töltésátvitel
pl. $\text{ArAr}^+ + \text{H} = \text{ArAr} + \text{H}^+$
4. ütközés után fellépő visszatartás/energia szűrés
pl. $\text{ArAr}^{+*} + \text{He} = \text{ArAr}^+ + \text{He}^*$



**68. ábra A 2 mg/L koncentrációjú szelén elemzése hidrogén, mint reakciógáz
használatával és anélkül**

Az ütközési disszociáció esetén a hélium gáz (az ütközési gáz), találkozik a dimer részecskével, nekiütközik és szétüti a dimert egy semleges atomra, mely a vákuumot előállító pumpák segítségével kiszívásra kerül, valamint egy 40-es m/z értékű ionra, amely nem okoz zavarást a $^{80}\text{Se}^+$ izotópon.

A kémiai reakció során a molekulaion reakcióba lép a hidrogénnel (a reakciógázzal) és hasonló eredménnyel jár, mint amit az előző pontban részleteztünk, csak egy amu egységgel nagyobb tömeg/töltés részecskék keletkeznek.

Az argon-argon dimer reagál a hidrogén atommal és elektronátmenet (töltésátvitel) játszódik le. A reakció végén keletkező 80-as tömegszámú molekulával viszont a kvadrupól analizátor nem képes rezonálni, mivel semleges részecske. Ezért nem jelent a szelén elemzésénél a továbbiakban zavarást.

A 4. mechanizmus a kinetikus energia szűrés (KED=Kinetic Energy Discrimination). Mivel az $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ dimer egy nagyméretű részecske, a $^{80}\text{Se}^+$ kationhoz képest, ezért az argon-argon dimer ütközési hatáskeresztmetszete sokkal nagyobb, mint a szelén kationé. Ebből következően a CCT egységbe bevezetett ütközési- és reakciógáz gázmolekulákkal sokkal gyakrabban ütköznek a nagyobb részecskék (poliatomos részecskék), mint a jóval kisebbek (egyatomos kationok). A sok ütközés következtében a nagyobb méretű részecskéknek nagymértékben lecsökken a kinetikus energiájuk. Ha az ionnyaláb haladása mentén beállítunk egy energiagátat, akkor a nagyobb részecskék ezen az energiagáton már nem tudnak átjutni, míg a kisebbek, melyeknek elegendő kinetikus energiája marad, át tudnak jutni a megfelelően beállított energiagáton (potenciálgáton).

A 68. ábrán vizuálisan is belátható a CCT technika hatékonysága: ha nem alkalmazunk CCT gázt az elemzéshez, akkor egy rendkívül nagy argon-argon dimer háttérrel (piros csúcs) kapunk a 80-as tömegszámon. Abban az esetben viszont, ha ütközési/reakciócellát alkalmazunk a kvadrupól tömegspektrométerünkben, akkor ezt a zavaró háttérrel megközelítően tízezred részére (99,99%-os hatékonyság) tudjuk lecsökkenteni. Amint a fentiekben is kiderült, a kettős fókuszálású tömegspektrométerrel, nagyfelbontás alkalmazásával ($R=10000$) elválasztható a fenti

$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ dimer és a $^{80}\text{Se}^+$ kationok csúcsa. Ezáltal a szelén zavarásmentesen elemezhető. Viszont ezért szó szerint nagy árat kell fizetnünk: egyrészt a módszer kimutatási határa egy-két nagyságrenddel nő (romlik), azaz tízszeresére-százszorosára nő, másrészt a készülék beszerzési és üzemeltetési költsége is közel 2-2,5-szeres. A kvadрупól készüléknek pedig a CCT módszer alkalmazásával lényegesen nem változik az elemek kimutatási határa.

4.7. Az atomspektroszkópiai módszerek fontosabb jellemzői összehasonlítása

Mint azt az 1. fejezetben is részleteztük, a minta mérésekor először azt kell eldöntenünk, hogy szervetlen, vagy szerves komponens meghatározását szeretnénk elvégezni. Amennyiben szervetlen komponens meghatározását szeretnénk elvégezni, úgy többnyire a 4.2. fejezetben felsorolt, az ICP-MS technikával kibővített rutin atomspektrometriai mérési módszereket szoktuk alkalmazni az élelmiszer és élelmiszeralapanyag minták elemtartalmának a meghatározására.

Ezután el kell döntenünk, hogy melyik atomspektroszkópiai módszer az optimális az elemtartalmi vizsgálataink elvégzéséhez. Ezek során figyelembe kell vennünk a minta mennyiségét, valamint típusát (amely tartalmazza a mintamátrixot, valamint az azoktól származó zavaró tényezőket is), a meghatározandó elem minőségét és mennyiségét (figyelembevéve az alkalmazható módszerek kimutatási határát), továbbá az optimális mérési módszer kiválasztásánál nem elhanyagolható szempont a mérésnél felmerülő költségek figyelembevétele is. Esetleg más a végeredmény attól függően is, hogy a kiválasztás az analitikai laboratóriumon kívüli megrendelő számára, vagy a laboratóriumban dolgozó analitikus szempontjából végezzük. Például a laboratóriumban a mérést végző analitikus számára fontos szempont lehet a fentiekben túlmenően, hogy az egyes mérési módszerekhez milyen mintaelőkészítő módszerek alkalmazása szükséges, valamint a használható analitikai technikák közül mennyi azok mintaátbocsátási képessége, vagy lineáris dinamikus tartománya.

A célnak legmegfelelőbb vizsgálati környezet (mérési és mintaelőkészítő módszer) kiválasztásához nélkülözhetetlen az előző fejezetekben tárgyalt atomspektroszkópiai módszerek fenti paraméterei (14. táblázat) összehasonlításának megfelelő szintű ismerete.

A 14. táblázat adataiból látható, hogy a fentiekben tárgyalt mérési módszerek közül a lángatomabszorpciós spektrométer rendelkezik a legnagyobb (legkevésbé kedvező) kimutatási határokkal, míg a grafitkemencés atomabszorpciós spektrometriával az elemeket közel hasonló kimutatási határok mellett vizsgálhatjuk (bár csupán megközelítően 50 elem esetén), mint az induktív csatolású plazma optikai emissziós

spektrometriával. A jelenleg rendelkezésre álló rutin elemtartalmi mérési módszerek közül viszont, az induktív csatolású plazma tömegspektrometria képes az élelmiszer és élelmiszeralapanyag mintákban a legkisebb elemkoncentrációk meghatározására. Az ICP-MS nagy kimutatási képessége mellett, ez a mérési módszer képes a legtöbb elem (megközelítően 80) vizsgálatára és ez az egyetlen technika, mellyel az elemek egyes izotópjai koncentrációja, valamint aránya is meghatározható.

14. táblázat A fentiekben tárgyalt elemtartalmi mérési módszerek fontosabb paraméterei összehasonlítása

	FAAS	GF-AAS	ICP-OES	ICP-MS
Mérés elve	fényelnyelés (abszorpció)	fényelnyelés (abszorpció)	fénykibocsátás (emisszió)	tömeg/töltés mérés
Kimutatási határ	µg/L-mg/L (ppb-ppm)	<µg/L-µg/L (<ppb-ppb)	<µg/L-µg/L (<ppb-ppb)	pg/L-ng/L (ppq-ppt)
Mintaátbocsátási képesség	néhány száz mérés	100-150 mérés	100-150 minta	100-150 minta
Méréshez szükséges mintamennyiség	1-2 mL	5-50 µL	1-5 mL	1-5 mL
Dinamikus méréstartomány (nagyságrend)	3	2	5	8
Precizitás	< 1 %	< 5 %	< 2 %	< 3 %
Mérhető elemek száma	~68	~50	~74	~80
Izotópok mérése	nem	nem	nem	igen
Anyagár	100-200 Ft/elem + minta-előkészítés	500-1000 Ft/elem + minta-előkészítés	1000-2000 Ft/minta	2000-4000 Ft/minta
Szolgáltatási ár	1000-2000 Ft/elem + minta-előkészítés	3000-4000 Ft/elem + minta-előkészítés	10000-15000 Ft/minta (20 elem)	>20000 Ft/minta (6-8 elem)
Készülékár	8-15 millió Ft	10-15 millió Ft	15-40 millió Ft	40-200 millió Ft

Az élelmiszer és élelmiszeralapanyag minták vizsgálatai során általában megfelelő mintamennyiség áll rendelkezésre, de számos esetben mégis előfordul, hogy bizonyos okok miatt, csak kevesebb minta előkészítését tudjuk elvégezni. Ez esetben vagy a GF-AAS alkalmazása a megfelelő választás, ha csupán néhány elem mérése a cél, mivel elemenként 5-50 μL minta elegendő a vizsgálatok kivitelezéséhez. Vagy választhatjuk az ICP-MS technikát is, mivel annak kimutatási határa lehetővé teszi, hogy a minták megfelelő hígításával állítsuk elő azt az 1-5 mL térfogatot, melyből már akár multielemes mérés is a kivitelezhető.

A mintaátbocsátási képesség azt fejezi ki, hogy adott időtartam alatt (általában egy napot, vagy egy napi 8 órás munkaidőt foglal magában) hány elem, vagy hány minta mérését tudjuk végrehajtani az adott módszer segítségével. A 14. táblázatban napi 8 órás munkaidőt alapul véve részleteztük, hogy megközelítően hány elemzés végezhető el. Mivel az atomabszorpciós technikák (FAAS és GF-AAS) alapvetően egyelemes mérések, így azoknál mérési darabszámot tüntettünk fel, míg az induktív csatolású plazmán alapuló méréstechnikáknál (ICP-OES és ICP-MS) minta darabszám található. Ha figyelembe vesszük, hogy az utóbbi ICP technikák multielemes módszerek, ezért azoknál a valódi mérési darabszámot úgy tudjuk kiszámolni, ha a 100-150 mintát megszorozzuk a mintánkénti akár 70-80 elemszámmal. Így az ICP technikákkal naponta (8 óra alatt) akár 5000-10000 meghatározás is elvégezhető.

A dinamikus méréstartományt gyakorta lineáris dinamikus méréstartománynak is nevezik, véleményünk szerint nem helyesen. A dinamikus méréstartomány azt a nagyságrendben ($1 \text{ nagyságrend} = 10^1 = 10$; $2 \rightarrow 10^2 = 100$; $3 \rightarrow 10^3 = 1000$) kifejezett koncentráció tartományt jelenti, amelyen belül a meghatározandó komponens koncentrációja és annak válaszjele között egyértelmű a megfeleltetés, azaz minél nagyobb a koncentráció, az arra adott válaszjel monoton növekszik. Ez alapján már könnyen belátható, hogy miért is nem helyes a lineáris dinamikus méréstartomány kifejezés, ugyanis nem szükséges, hogy lineáris legyen ez a monoton koncentráció-válaszjel összefüggés. A mai modern összes készüléknél lehetőségünk van arra, hogy polinomot (másod- és harmadfokú kalibrációs görbét) illesszünk a kalibrációs pontjainkra. Amennyiben csak lineáris kalibrációs illesztést (egyenest) akarunk megvalósítani, az esetben a módszerek dinamikus méréstartománya a 14. táblázatban feltüntetett (3; 2; 5 és 8) nagyságrend helyett megközelítően csupán a fele (1,5; 1; 2,5 és 4). A készülék operátora számára azért kedvezőbb a minél nagyobb méréstartomány

alkalmazása, mert minél szélesebb ez a tartomány, annál biztosabb, hogy a mérés során a komponens koncentrációja beleesik ebbe a tartományba, tehát nem kell újabb mérést elvégezni, amely pénz és időmegtakarítást eredményez.

A 14. táblázat utolsó három sorában található költség adatok figyelembevétele szorosan nem az analitika tárgykörébe tartozik, de a különböző elemzések kivitelezésekor ezeknek az adatoknak a megfontolása az utóbbi időben egyre fontosabb kérdéssé válik/vált. Az anyagár akkor fontos számunkra, ha rendelkezünk az adott készülékkel és csupán az azok működéséhez nélkülözhetetlen anyagköltséget kell előteremtenünk. A szolgáltatási árakkal a megrendelőknek kell teljesen tisztában lenniük, hogy mérlegelni tudják, melyik technika alkalmazását szeretnék megigényelni. Egy új készülék (FAAS) beszerzéséhez pedig megközelítően 8 millió Ft, míg a legköltségesebb ICP-MS beszerzéséhez körülbelül 200 millió Ft-ra van szükség. Meg kell jegyeznünk, hogy mind az anyagár, mind a szolgáltatási ár esetén figyelembe kell vennünk, hogy míg az atomabszorpciós technikáknál a költség egy elemzésre és csak az elemzésre, azaz egy adat megszerzésére vonatkozik (mintaelőkészítés nélkül, amely anyagára hozzávetőleg 200-500 Ft), addig az ICP technikáknál az adatok egy minta mérésére, azaz a mintaelőkészítéssel együtt, akár 70-80 adat egyidejű vizsgálatára vonatkoznak. Tehát a minták vizsgálatánál figyelembe kell vennünk a meghatározandó elemek számát.

5. Elválasztási módszerek élelmiszerek analízisében

5.1. Kromatográfia

5.1.1. A kromatográfia elvi alapjai

A kromatográfiás módszerek kialakulása a múlt század elejére tehető, amikor Tswett orosz analitikus növényekből szerves oldószerekkel extrahált egyneműnek hitt festékanyagokat mészkővel töltött oszlopon négy különböző színű vegyületté tudott szétválasztani. Módszerét színírásnak nevezte el, mely a továbbiakban kromatográfia néven vonult be az analitikai kémiába. A kromatográfia egy olyan fizikai elválasztási módszer, melynek során a különböző, de nagyon hasonló tulajdonságú komponensek egy álló fázis és egy mozgó fázis között oszlanak meg, mely megoszlás az alapja a szétválasztásnak. Az álló fázis lehet szilárd anyag vagy nagy viszkozitású, szilárd hordozóra felvitt folyadék, míg a mozgó fázis folyadék vagy gáz.

5.1.1.1. A kromatográfiás módszerek csoportosítása

A kromatográfiás módszerek csoportosíthatók az elválasztás mechanizmusa szerint amely azt mutatja, hogy az elegy komponensei milyen erő hatására kötődnek fokozatosan az álló fázishoz. A kötődést okozhatja az adszorpció, a megoszlás, az ionok kicserélődési képessége, a molekulaszűrőn való áthatolóképeség és a biokémiai affinitás. A kötődéskor többféle erőhatás is jelentkezhethet: az adszorpció mellett ioncsere, a gélszűrés mellett pedig pl. az adszorpció. **Az álló fázis alakja** szerint háromdimenziós oszlopkromatográfia, és kétdimenziós (réteg- és papír-) kromatográfia különböztethető meg. **A fázisok halmazállapota szerint** a kromatográfiás eljárások lehetnek gáz–szilárd (angol rövidítése GSC), folyadék–szilárd (LSC), gáz–folyadék (GLC) és folyadék–folyadék (LLC) kromatográfia.

Az adszorpciós kromatografáláskor a szétválasztandó elegy egyes komponensei a nyugvó adszorbens felületén megkötődnek, a továbbvándorló oldószertől, a kevésbé erősen adszorbeálódó oldott anyagoktól elkülönülnek. **A megoszlásos kromatográfiában** az álló fázis felületén adszorbeált folyadék van. A mozgó fázis az adszorbeált folyadékkal nem vagy csak kevésbé elegyedik. Az elválasztandó oldott

anyagok, különböző mértékű oldhatóságuknak megfelelően megoszlanak a nyugvó és mozgó fázis között. Az az oldott anyag, mely a nyugvó fázisban sokkal jobban oldódik, mint a mozgóban, teljesen átmegy a mozgó fázisból az álló, adszorbeált fázisba.

Az ioncserélő kromatográfiánál a nyugvó és a mozgó fázis ionjai egymás között kicserélődnek. A megkötött anyagok az ioncserélő oszlopról az ionkoncentráció és a pH-változásával eluálhatók. **A gélkromatográfiában** a különböző méretű komponenseket duzzasztott gélszemcsékből álló molekulaszűrő segítségével választjuk szét. **A gázkromatográfiában** a légnemű állapotban lévő vizsgálati elegyet semleges vivőgáz segítségével visszük be a kromatográfiás kolonnába, ahol a gázmolekulák az adszorbens felületén más-más időtartamig kötődnek, majd szétválnak.

Összefoglalva tehát a kromatográfiás elválasztási módszerek csoportosíthatók az álló fázis alakja szerint (oszlopkromatográfia, vékonyréteg kromatográfia), a mozgó fázis halmazállapota szerint (gázkromatográfia, folyadékkromatográfia, szuperkritikus folyadék kromatográfia), illetve mindkét fázis alapján (folyadék-szilárd-, folyadék-folyadék-, gáz-folyadék-, gáz-szilárd kromatográfia). Az elválasztás elve alapján ismert adszorpciós kromatográfia, megoszlásos kromatográfia, ioncserés kromatográfia, méret kizárásos kromatográfia és affinitás kromatográfia.

5.1.1.2. A kromatografálás mechanizmusa

A különböző komponensek szétválasztása során azok az álló és a mozgó fázissal szemben tanúsított tulajdonságaik alapján, a szétválasztani kívánt komponensek a kromatografálási eljárás során különböző sebességgel haladva, az álló fázist különböző időben hagyják el, ill. különböző távolságra jutnak el a kiindulási ponttól. A komponensek koncentráció viszonyait a két fázis között a megoszlási állandóval lehet kifejezni, mely a fázisok anyagi minőségétől független, csak a hőmérséklettől függ.

A kromatográfia tehát szorpción és deszorpción alapuló elválasztástechnikai módszer, melynek során az elválasztandó anyagok egy keskeny kezdeti zónáról különféle adszorbenseken, folyadék- vagy gázáramlás hatására, eltérő sebességgel mozdulnak el. Az élelmiszer analitikában és a preparatív elválasztás-technikában az oszlopkromatográfia kiemelkedő jelentőségű, melynek segítségével hasonló szerkezetű frakciók választhatók el egymástól, preparatív oszlopkromatográfiával pedig **egy-egy**

anyag igen nagy tisztaságban izolálható. A különböző élelmiszer komponensek szétválasztására és meghatározására mind a folyadék-szilárd, mind a folyadék-folyadék kromatográfia elterjedt. Az elválasztást előidéző hatások alapján az adszorpció, a megoszlásos és az ioncserés elválasztások a legjelentősebbek. Mindhárom esetben követelmény, hogy az állófázis oldhatatlan legyen a mozgófázisban, az állófázis irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat, ne bontsa el azokat és ne lépjen reakcióba a mozgófázis komponenseivel.

Az eljárás során az oszlopon az elválasztandó anyagok különböző erővel kötődnek, majd a mozgófázis áramoltatásával kötődésük erősségétől függően deszorbeálódnak, az oszlop további részében pedig ismét adszorbeálódnak az állófázisra. Ez a folyamat folytatódik az oszlop teljes hosszában, melynek során jelentős eltolódások jönnek létre a szétválasztani kívánt komponensek között, melynek következtében az elválasztandó komponensek különböző időpontban elkülönülve jelennek meg az oszlop végén. E fejezet végén az oszlopkromatográfiáról található összeállítás, hogy a tisztelt Olvasó lássa, hogy a kromatográfiás elválasztási folyamatok rendkívül bonyolultak, munkaigényesek, és hogy kivitelezésük nagy tudást és gyakorlatot igényel. A további fejezetek az egyéb kromatográfiás módszereket is részletesen tartalmazzák.

5.1.1.3. Oszlopkromatográfia

A szétválasztás háromdimenziós oszlopon történik. A fázisok halmazállapota szerint az oszlopkromatográfiás eljárások lehetnek gáz–szilárd, folyadék–szilárd, gáz–folyadék és folyadék–folyadék kromatográfia.

Az oszlopkromatográfia eszközei üvegből, fémből vagy műanyagból készült csövek, kapillárisok, melyben a beforrasztott porózus üvegre rétegezzük az adszorbenst, az acélcsövekbe préseljük azt, vagy maga a cső fala szolgál az álló fázis megtartására. Az oszlopkromatográfiás eljárások felölelik a kromatográfiás eljárások mindazon területét, ahol a töltet háromdimenziós oszloppal kombinálható, tehát a kromatográfiás módszerek nagy része manapság már oszlopkromatográfia. A vizsgálandó komponensek az oszlopon különböző erők hatására jutnak át, mely lehet a mozgó, folyadék fázis fázis pumpákkal, nagy nyomáson történő áramoltatása, vagy gázadagolás palackból, ahonnan kontrollált nyomású gázhoz lehet jutni. Normál vagy kis nyomáson végzett eljárásnál a mozgó fázis önként átszivároghat az oszlopon, melyet vákuummal

kell (lehet) elősegíteni, vagy túlnyomásos eljárást lehet alkalmazni. A kromatografáló csövek változatos átmérőjűek és hosszúságúak, ezért a méreteket a vonatkozó speciális fejezetben tárgyaljuk. Az oszlopok hőmérsékletét vízköpennyel vagy termosztáttal lehet szabályozni.

A kromatográfiás oszlopok töltete (álló fázis) a kromatográfiás céltól függően nagyon sokféle lehet, az oszlop töltése pedig lehet száraz és nedves. **Száraz töltéskor** az adszorbenst lassanként, rétegezve szórjuk az oszlopba, és az oszlopot vibrátorral vagy döngöléssel tömörítjük. **Nedves töltéskor** az oszlopot félig megtöltjük oldószerrel, és az adszorbenst ugyanezzel az oldószerrel feliszapolva töltjük az oszlopba. A különféle kromatográfiás oszlopoknál speciális eljárásokat alkalmaznak az oszlop töltetének kialakítására.

Az oszlopból távozó **frakciókat** folyadék mozgó fázis esetében frakciószedő berendezések **segítségével kémcsövekbe szedhetjük**. A kör alakú, kémcsöveket tartalmazó frakciószedő elforgatható, időkapcsoló és térfogat-szabályzó berendezéssel, esetleg cseppszámlálóval ellátott, és mintegy 20-200 kémcső található benne.

Az oszlopkromatográfia metodikája. Folyadékkromatográfia esetén a kromatografálandó anyagokat tömény oldattá alakítjuk, de ha az elválasztandó anyagokat az oszlop erősen adszorbeálja, hígabb oldatokkal is dolgozhatunk. A szétválasztandó anyagok oldatát óvatosan öntve töltjük be az oszlopba, hogy az adszorbens ne keveredjen föl, ügyelve arra, hogy az oszlopnak nem szabad kiszáradnia. **A kromatogram kifejlesztése** során az oszlopon tiszta oldószert vagy oldószer elegyet engedünk át. A kifejlődést befolyásolja az oldószer átfolyási sebessége, ezért az optimális szétválasztáshoz be kell állítani az oldószer átfolyásának megfelelő sebességet. **A színes anyagok szétválasztásának** figyelemmel kísérése a legegyszerűbb, a **színtelen anyagok elválásának észlelése** ibolyántúli fényben, fluoreszkáló adszorbensek használatával, a színtelen anyagok színes származékokká alakításával, a kiválasztandó anyaghoz megközelítően azonos tulajdonságú színes indikátorokkal, vagy a vizsgált anyag színreakcióba vitelével lehetséges.

Preparatív oszlopkromatográfia esetében a keverékek alkotóit elválaszthatjuk, ha az egész oszlopot rövid korongokra vágjuk, és a kis egységeket külön-külön eluáljuk, majd az anyagok elhelyezkedéséről a bepárlási maradék alapján győződünk meg. A

poláros adszorbensek eluálása történhet etil- vagy metil-alkohollal, ecetsavval vagy piridinnel, az aktív szén eluálása benzollal vagy kloroformmal. Oldható adszorbens használatakor a vizsgálandó anyagot oldószeres kirázással különíthetjük el.

A gázkromatográfiás eljárások során alkalmazandó lépéseket a vonatkozó fejezet tartalmazza.

Az oszlopkromatográfiás elválasztások során általában az **elúciós kromatográfiát** alkalmazzuk, melynek során a kromatogram kifejlesztését nem fejezzük be a sávok szétválasztásával, hanem az oszlop oldószeres mosását tovább folytatjuk, melynek során az egyes anyagok folyamatosan a szüredékbe kerülnek, és külön-külön fogjuk fel őket. Az eluotrop sor szerint egyre polárosabb oldószereket alkalmazva a szüredéket szakaszosan felfogjuk, a kromatografálás lefolyását pedig grafikusán ábrázoljuk. Ennek során a vízszintes tengelyre az átfolyt oldószer térfogata, a függőleges tengelyre pedig a bepárlási maradék tömege kerül. Szükség esetén a sűrűség, a törésmutató, az optikai forgatóképesség és egyéb tulajdonságok is kerülhetnek az ordinátára.

A kromatogramokkal, a mennyiségi és a minőségi értékeléssel kapcsolatos tudnivalók a vonatkozó fejezetekben találhatók.

5.1.2. Adsorpció kromatográfia

5.1.2.1. Adsorpció

A heterogén rendszerek határfelületén működő erők hatására az egyik fázis a felületén a vele érintkező másik fázis molekuláit kisebb-nagyobb mértékben képesek megkötni. A fázis felületén a komponens koncentrációja nagyobb, mint a folyékony fázisban: a jelenség az **adszorpció**. Az az anyag, amelynek felülete a másik fázis molekuláit megköti az **adszorbens**, a felületen megkötött anyag pedig az **adszorptívum**.

Az **adszorpció** során az adszorbens felületén lévő molekulák és az adszorptívum molekulái között erők hatnak, melyek az adszorptívum molekuláinak egy részét az adszorbens felületére vonzzák. **Adszorpciókor** az erők az adszorptívum molekuláinak hőmozgása ellenében munkát végeznek, ami az **adszorpció hő** alakjában szabadul fel. Az adszorbeált molekuláknak az adszorbens felületéről való eltávolítása, a **deszorpció**, lehűléssel jár, az adszorpció tehát exoterm, a deszorpció pedig endoterm folyamat.

Az adszorpció **dinamikus jelenség**, melynek során az adszorbeált felületi réteg és az adszorbeálatlan molekulák között kicserélődés megy végbe. Az adszorptívum molekulái a hőmozgás következtében részben deszorbeálódnak, az adszorbeálatlan molekulák pedig az adszorpciós erők hatására megkötődnek. Bekövetkezik az **adszorpciós egyensúly**, melynek során az időegységenként megkötött molekulák száma azonos a felületről leváló molekulák számával.

5.1.2.1.1. Adszorpció szilárd–gáz-halmazállapotú határfelületen

Gáz halmazállapotú anyagok adszorbeálására használják a faszenet, a különféle aktív szénfajtákat (csont-, vér-, cukor-, benzoésav-, mogyoró-, és dióhéjszén), az alumínium-hidroxidot és a különböző természetes derítószerkeket. Az adszorbeált anyag mennyisége annál nagyobb, minél nagyobb az adszorptívum koncentrációja, gázoknál pedig minél nagyobb a gáz nyomása. Az adszorbeált gázmennyiség annál kisebb, minél magasabb a rendszer hőmérséklete, ezért a rendszer kellő hőmérsékletre való hevítésével az adszorpció megszüntethető, és a magas hőmérséklet alkalmas az adszorpcióra alkalmatlan adszorbensek felújítása.

Egy rendszer adszorpciós viszonyai az adszorpciós izotermával jellemezhetők, mely adott hőmérsékleten az adszorptívum nyomása és az adszorbeált mennyiség közötti összefüggést mutatja. A diagram abszcisszáján a gázfázis nyomását, ordinátáján az egységnyi tömegű adszorbens által megkötött normálállapotú gáz térfogatát (fajlagos adszorpció) ábrázolják. Kis nyomásokon a nyomás fokozásának hatására az adszorbeált gázmennyiség rohamosan növekedik, melynek során a nyomás és a megkötött mennyiség közötti összefüggés lineáris. Nagyobb nyomásértékeken a görbék az abszcissza felé hajlanak, később pedig majdnem párhuzamosak lesznek vele, tehát a gáznyomással az adszorbeált mennyiség nem nő tovább, ugyanis nagy nyomásokon az adszorbens felülete telítődik adszorptívummal, az adszorbeált molekulák az adszorbens felületét molekula vastagságú monomolekuláris réteggel teljesen bevonják.

Egy adszorbens a különböző összetételű légnemű anyagokat különböző mértékben adszorbeálja. A nagyobb molekulatömegű anyagok jobban adszorbeálódnak, mint a kisebbek, és minél magasabb egy légnemű anyag normális forráspontja, annál könnyebben kötődik meg szilárd testek felületén.

5.1.2.1.2. Adszorpció szilárd–folyadék határfelületen

A nagy fajlagos felületű szilárd testek egyes folyadékokat és oldott anyagokat is adszorbeálnak. A tiszta folyadék adszorpciója a **lioszorpció**, melynek során az adszorbens felületén folyadékmolekulák kötődnek meg, amik a **lioszférának** nevezett adszorpciós réteget hozzák létre. Ha az adszorbeált réteg vízmolekulákból áll, akkor a lioszféra neve hidroszféra, a létrejött burok pedig a hidrátburok.

A **folyadékadszorpció** a szilárd és folyékony fázis anyagi természetétől függ. A folyadékok, amelyek nedvesítik az adszorbens felületét jól, amelyek nem nedvesítik rosszul, vagy egyáltalán nem adszorbeálódnak a szilárd fázison. A folyadékok **nedvesítőképessége** a **határfelületi feszültségtől** függ, ugyanis minél nagyobb a határfelületi feszültség, annál kevésbé nedvesedik az adszorbens.

A **szén és a víz** közötti viszonyokat vizsgálva megállapítható, hogy az adszorbens hidrofób, apoláros jellegű, melyen csak az apoláros oldott anyagok adszorbeálódnak jó. Az apoláros szénen tehát a poláros víz nem kötődik meg. A **szilikagél és a víz közötti** viszonyokat elemezve megállapítható, hogy kicsi a határfelületi feszültség, a szilikagél kiválóan nedvesedik, vízzel érintkezve vastag hidrátburok jön létre, tehát a szilikagél hidrofil, illetve poláros adszorbens.

Az adszorbensek felületére mind az oldott anyag, mind az oldószer adszorbeálódhat, amely **adszorpciós viszony** attól függ, hogy az oldószer és az adszorbens között milyen a határfelületi feszültség, és hogy az oldószer nedvesíti-e az adszorbens felületét. Az adszorbenst rosszul nedvesítő oldószerekben oldott anyagok adszorpciója izotermákkal jellemezhető. Az oldott anyagok adszorpciójának mértéke fordítottan arányos a rendszer hőmérsékletével és egyenesen arányos az oldat koncentrációjával. A nagy molekulatömegű anyagok jobban adszorbeálódnak, míg az oldószer kisebb-nagyobb mértékben adszorbeálódik az adszorbens felületén, kiszorítva az oldott anyag molekuláit. Az adszorbens akkor telítődik, ha felületét monomolekuláris adszorptívum réteg fedi be.

Az oldatokban lejátszódó adszorpció **reverzibilis folyamat**. Az adszorpciós egyensúly beállása után, ha az oldatot hígítjuk, részleges deszorpció következik be, melynek során csökken az adszorbens felületén megkötött anyag mennyisége. **Ha az oldószer a szilárd fázist jól nedvesíti**, akkor alkalmatlan vízben oldott anyagok adszorpciójára. Ha

az oldószer nagymérvű adszorpciója miatt az adszorbens felületéről az oldott anyagok teljesen kiszorulnak, **negatív adszorpció** következik be. Az adszorbens és az adszorbeált anyag molekulái között a határfelületi erőkön kívül kémiai kölcsönhatás is kialakul. A **kemoszorpció** nem reverzibilis folyamat.

5.1.2.2. Adszorpciós kromatográfia műveletei

Az adszorpciós kromatográfia során alkalmazhatunk **elúciós módszert, frontális kromatográfiát, vagy kiszorításos módszert**. Az adszorbens elrendezése szerint alkalmazhatunk **oszlopkromatográfiát**, amikor egy megfelelően kialakított csőben a por alakú adszorbenst oszlop alakúra tömörítve használjuk, és **vékonyréteg-kromatográfiát, vagy rétegekromatográfiát**, amikor a por alakú adszorbenst üveg-, műanyag- vagy fémlapra rétegezve használjuk fel.

Az **elúciós módszer műveletei a következők**: az oldat betáplálása és az oldott anyag adszorbeálódása (zónaképzés), a tiszta oldószer vagy oldószerkelet betáplálása, a zónát alkotó anyagok sávokra való különítése (kifejlesztés), a sávok kioldása az adszorbensből (elúció). A **zónaképzés** során az oldott anyagok egymástól függetlenül adszorbeálódnak. Három (A, B, C) összetevő esetén a zónák első részében mindhárom anyag jelen van, később kettő, és végül egy összetevő zónája figyelhető meg. A **kifejlesztés** az adszorbeált zónában található komponensek szétválasztását célozza. Ennek során az oszlopra megfelelő oldószert öntünk, a tiszta oldószer a zónában az adszorbeált anyag egy részét deszorbeálja, az erősebben adszorbeálódott anyag lassabban halad előre, a kevert zónából egymástól mindig jobban elkülönülő sávok alakulnak ki, melyek a teljes elválás után egy-egy tiszta anyagot tartalmaznak.

Az oldat áthaladása közben az adszorpció és a deszorpció folyamata automatikusan ismétlődik, így az egyes komponensek adszorbeáló képességüktől függően elkülönülnek egymástól. A komponensek szétválasztásának sikere függ az adott rendszeren belül az egyes komponensek adszorpciós tulajdonságaitól, a jellemző izotermáktól. Ha a kifejlesztés közben más oldószert használunk, mint zónaképzéskor, a zóna szélessége megváltozik. A gyengébben adszorbeálódó anyag előrehaladási sebessége nagyobb, az erősebben adszorbeálódóé kisebb. Ezért eredményes kifejlesztés után a zóna anyagai teljesen elkülönülnek egymástól, azaz mindegyik sáv csak egy oldott anyagot tartalmaz.

Az adszorpciós kromatográfia legáltalánosabban használt elmélete a **tányérelmélet**, a kromatográfiás elválasztás hatékonyságának jellemzésére pedig az **elméleti tányérszám** használatos, mely szerint a kromatográfiás oszlop több olyan rétegből épül fel, amelyekben létrejön a szétválasztandó komponens egyensúlyi eloszlása a mozgó és a stacioner fázis között. Egy-egy ilyen réteg az **elméleti tányér**, melynek értelmében minél nagyobb az elméleti tányérszám, annál tökéletesebb a vonatkozó anyagokra a szétválás.

Összefoglalva tehát az adszorpció során **a folyadék vagy gázfázisban lévő komponensek egy nagy fajlagos felületű adszorbensen megkötődnek**, melynek során a megkötődött és a szabad molekulák között folyamatos kicserélődés megy végbe, és kialakul a dinamikus egyensúlyi állapot. Ez az egyensúly akkor következik be, ha az időegység alatt megkötött és az adszorbensről távozó molekulák száma azonos. A szétválasztani kívánt komponensek arányát az álló és a mozgó fázisban, az idő függvényében, az adszorpciós izoterma írja le.

5.1.2.3. Adszorbensek és minősítésük

A kromatográfiában használt adszorbensek nagy fajlagos felületű, szemcsés szerkezetű, hidrofób vagy hidrofil tulajdonságú anyagok. Tulajdonságaikat alapvetően meghatározza a szelektivitás, a kapacitás és az aktivitás. A **szelektivitás** azt jelenti, hogy az adszorbens képes a komponensek szelektív adszorpciójára, a **kapacitás** az egységnyi tömegű adszorbens által megkötött anyagmennyiséggel, az **aktivitás** pedig a kötőképesség erősségével jellemezhető. Az ideális adszorbentől elvárható, hogy szelektivitása és kapacitása legyen minél nagyobb, ugyanakkor aktivitása csak a közepeshez közelítsen, mert a nagy aktivitású adszorbensről nehéz a szétválasztani kívánt anyagokat eltávolítani, a gyenge aktivitású adszorbens pedig nem ad számottevő szeparációt.

Az adszorbensek aktivitása kémiai szerkezetüktől és felületük morfológiájától függ. Empirikusan az adszorbenseket növekvő kapacitás, valamint aktivitás szerint sorba lehet állítani, amely sorrend csak egy adott rendszeren belül érvényes. Az ideális adszorbens szelektivitása és szelektív adszorpciós kapacitása nagy, aktivitása közepes. Az elválasztás sikerét nagymértékben befolyásolja a **szemcsenagyság**. Kisebb részecskék estén gyorsabban áll be az egyensúly és kevésbé zavar a diffúzió hatása. A túl finom

részecskék alkalmazásakor nagyon megnő az oszlop ellenállása a folyadék áramlásával szemben. Az előzőek miatt legmegfelelőbb szemcsenagyság 2-15 μm .

Adszorbensek aktivitási, illetve kapacitási sorozatát a következő összeállítás mutatja.

15. táblázat Adszorbensek aktivitási, illetve kapacitási sorozata

Lefelé növekvő aktivitás	Lefelé növekvő kapacitás
Szacharóz	Kalcium-oxid
Keményítő	Kalcium-fluorid
Inulin	Alumínium-oxid
Talkum	Cukorszén
Nátrium-karbonát	Cink-szulfid
Kalcium-karbonát	Króm-oxid
Kalcium-foszfát	Bázisos alumínium-oxid
Magnézium-foszfát	Savas alumínium-oxid
Magnézium-oxid	Floridin
Kalcium-hidroxid	Franconite
Magnézium-szilikát	Aktív szén
Alumínium-oxid	
Aktív szén	
Aktív magnézium-oxid	
Fuller-föld	

Az adszorbenseket minősíteni lehet az adszorbens kapacitása, aktivitása, és egy anyagpárra vagy csoportra vonatkozó szelektivitása alapján. Közvetett tájékoztatás kapható **az adszorbens kapacitásáról** a kálium-jodidos jódoldat, a kálium-permanganát-oldat, a metilénkék vagy a szudánvörös adszorpciójának vizsgálata alapján. A **szelektivitás** elemzése során a vizsgálandó adszorbenst szerves színezékpárral hozzuk össze, majd szelektálóképességét a színezékek eluálhatósága alapján minősítjük. **Az aktivitás** azzal a hőmennyiséggel jellemezhető, amely felszabadul, ha az adszorbens 50 g-ját 65 cm³ petroléterrel 0°C-on összekeverjük.

A kromatográfiában adszorbensként alkalmazhatók az alumínium-oxid, a szilikagél, a magnézium-oxid, a kalcium-oxid és -hidroxid, a kalcium- és magnézium-karbonát, a

kalcium-szulfát, a természetes szilikátok, a keményítő, a cellulóz, az aktív szenek különböző fajtái és a kémiaiilag módosított (decil-, oktadecil-, alkán) szilikagélek.

Az adszorpciós kromatográfiában leggyakrabban alkalmazott adszorbens a hidrofílszilikagél, mely a különböző anyagokat azok polaritása sorrendjében köti meg. Az analitikai elválasztást befolyásolja a szemcseméret és a szilikagél felületén megkötött ciano-, amino-, nitro-, hidroxil- stb. csoportok, melyek nagymértékben befolyásolják mind a polaritást, mind a szelektivitást. Ha hosszú szénláncú szénhidrogének vannak a felülethez kötve, annak polaritása jelentősen megváltozik, amikor is a mozgó fázis polárosabb lesz, mint az álló fázis (**fordított fázisú kromatográfia**). Ha az álló fázis polárosabb, mint a mozgó fázis, **normál fázisú kromatográfiáról** beszélünk.

5.1.2.4. A mozgó fázis összetétele

Az oszlop mellett az elválasztást döntően befolyásolja a mozgó fázis összetétele is. Alapvető, hogy a mozgó fázisban a szétválasztani kívánt komponensek oldódjanak, és tegye lehetővé a komponensek optimális adszorpcióját. A poláros adszorbensen a szétválasztani kívánt komponensek akkor adszorbeálódnak erősebben, ha a mozgó fázis polaritása kisebb.

Az adszorbens felületén az oldószer molekulái (**eluálószer**) és az adszorptívum molekulái versengenek a megkötődésért, így az a komponens adszorbeálódik jobban, amelyiknek nagyobb az affinitása az adszorbenshez. Az oldószer **eluotrop sorba** állíthatók. Ennek első tagjai vagy ezek keverékei a kromatográfiás szétválasztáshoz alkalmas zónaképző oldószer, futtatószer, az elutrop sor utolsó tagjai pedig a legjobb eluensek. Apoláris adszorbenseknél az elutrop sor fordítva érvényes.

A poláris oldószer eluáló képessége tehát nagyobb, amiről az eluotrop sorba rendezett oldószer adnak tájékoztatást. A hidrofílszorbenseknél az elutrop sor tagjai növekvő polaritásuk sorrendjében a következők: pentán, hexán, toluol, benzol, etanol, metanol, hangysav és víz. Az eluotrop sor tagjainak elegyítésével az analitikai feladat szempontjából optimális polaritású eluent lehet előállítani.

A legjobb oldószer kiválasztásakor a következőkre kell figyelemmel lenni: Az oldószerben a szétválasztandó minta oldható legyen. Az a legmegfelelőbb oldószer, amelyből az elegy közepes erősséggel adszorbeálódik, és az egyes alkotók különböző

adszorptivitása megfelelően érvényesül. Az elutrop sor egyes tagjai közötti különbséget csökkenteni kell, ha közeli adszorptivitású anyagokat akarunk szétválasztani. Ilyenkor a sor két-három szomszédos oldószerének keverékét használjuk.

5.1.2.5. Az alkalmazott kromatográfiás eljárások

Az elúciós kromatográfia mellett a gyakorlatban még a frontális kromatográfia és a kiszorításos kromatográfia terjedt el. A **frontális kromatográfia** esetén a több oldott anyagot tartalmazó elegy átfolyik az előzőleg tiszta oldószerrel átnedvesített adszorbens oszlopon. Ezt követően először a tiszta oldószer jelenik meg az oszlop végén, majd az adszorptivitásuktól függően egymást követően az adszorbeált anyagok. A leggyengébben adszorbeálódó anyag jelenik meg először, majd a többi. A kifejlesztés alatt az egyes komponensek csak részlegesen különülnek el egymástól, részben egyidejűleg lépnek ki az oszlopról.

A **kiszorításos kromatográfia** esetén az oldott anyagok az oszlop felső részén zónát képeznek. A kiszorítóoldatot (erősebben adszorbeálódik, mint a zóna anyagai közül bármelyik) áramoltatása következtében a kiszorítóanyag elmozdítja az egyik komponenst, és ugyanezt teszi a kevésbé adszorbeálódóval. A kiszorítás folyamán lefolyó oldatban először az első anyag jelenik meg tisztán, majd a második anyag ugyancsak tisztán, és aztán következik a kiszorítóanyag.

5.1.2.6. Nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia (HPLC)

A **nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia** (angol rövidítése: HPLC) egy olyan automatizált elválasztási eljárás, melynek során a nagy hatékonyságot az oszloptöltet szemcseméretének csökkentésével, a töltet fajlagos felületének növelésével és az alkalmazott nagynyomású mozgófázis áramoltatásával érték el. A berendezés részei az eluens tárolók, a pufferek elegyítésére szolgáló keverő berendezés, a manuális vagy automata mintadagoló, a származékképző egység, a nagy nyomás kifejtésére alkalmas szivattyúk, a szétválasztást végző nagyhatékonyságú oszlop, a különféle detektorok és frakciószedők, a jelerősítők, a regisztráló berendezések és a vezérlő számítógép.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia tehát automatizált, nagynyomású kromatográfiás eljárás, melyre mind a „nagy nyomású”, mind a „nagy hatékonyságú”

kifejezést használja a szakirodalom, de valójában nem a nyomáson, hanem főleg a hatékonyságon van a hangsúly, ezért a továbbiakban ezt az elnevezést használjuk. A mozgó fázis folyadék, a gyakorlatban használt töltet pedig legtöbbször nagyfokú keresztkötésekkel készített polimerek (sztirol-divinilbenzol kopolimerek, polimetakrilátok), vagy szilikagél alapú mikroszemcsék, esetleg kemény gélek.

5.1.2.6.1. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográf felépítése

Puffertárolók. Az oszlopra felvitt minta komponenseire bontása eluálóoldat folyamatos, nyomás alatti bevezetésével történik. Az eluensek gáztalanítását a tartály légterének ritkításával és az eluensek kiforrálásával oldják meg. Szükségessé válhat, hogy az eluens polaritását, pH-ját, illetve ionerősségét folyamatosan változtassuk, amit két vagy több egymással elegyedő, de eltérő tulajdonságú oldószer összekeverésével lehet elérni. Az **izokratikus** eljárás során a puffer összetétele nem változik, **gradienselúciókor viszont** az eluens összetételét előzetesen meghatározott program szerint változtatják az analízis során.

Szivattyúrendszer. A töltet nagy hidrodinamikai ellenállású, ezért 10-50 MPa (100-500 bar) nyomásra van szükség a mozgó fázis áramoltatásához, az újabb készülékek pedig 50-70 MPa nyomáson is dolgozhatnak. Az **optimális szivattyú** pulzálás mentesen szállít, lehetővé teszi a gradiens elúcióhoz szükséges gyors folyadékcserét, és minimálisak a belső holtterek. A **HPLC-szivattyú** lehet alternáló dugattyús szivattyú és membrán szivattyú, melyek pulzáló folyadékáramot hoznak létre, injekciós rendszerű szivattyúk, melyek lüktetésmentesen áramoltatnak, és pneumatikus szivattyú, melynél gáznyomással működő kisnyomású hengerhez egy nagynyomású henger csatlakozik.

A **mintaadagolók** lehetnek fecskendős injektálásúak, vagy mintabemérő mikroszelepek, melyeknél a mintát fecskendővel juttatjuk a szelep külső csőspirálisába, majd egy határozott mozdulattal beforgatjuk a feltöltött csőszakaszt az eluensáramba.

Oszlopok és töltetek. Az oszlopok biztosítsák a tökéletes elválasztást minimális sáv (csúcs) szélességgel. Nyomásálló, rozsdamentes acélból készülnek, hosszuk 15-50 cm, belső átmérőjük 2,5-4,0 mm. Az analitikai elválasztások során a leggyakrabban a 25 x 4 mm-es oszlopokat használják. Az elválasztás legnagyobb hatékonysággal porózus felületű gyöngyökkel, vagy porózus réteggel bevont gyöngyökkel valósítható meg. A legszélesebb körben alkalmazott töltet a módosított szilikagél, ill. az alumínium-oxid.

Az **oszlop töltése** 40 μm -nél nagyobb átmérőjű, gömb alakú és 20 μm -nél nagyobb átmérőjű porózus felületű szemcsék esetén történhet **száraz töltési módszerrel, tömési eljárással**, melynek során az adagokat teflon végű dugattyúval tömörítjük, vagy **zagy formájában**, nagynyomású folyadék segítségével, melynek során tömör töltetté nyomják össze.

A **mozgó fázis** komponenseinél a legfontosabb tulajdonságok a forráspont és a viszkozitás, valamint hogy ne mutasson az ultraibolya (UV) tartományban abszorpciót, mert nagyon sok vegyület detektálása az UV tartományban történik. Mivel a nagyhatékonyságú oszlopok nagy hidrodinamikai ellenállásúak, ezért a szivattyúktól elvárjuk az áramlási sebesség állandósága mellett az 1-70 Mpa nyomást. A mintadagolótól elvárjuk, hogy a minta éles sávban kerüljön az oszlopra, melynek a fecskendő injektorok, ill. a mintabemérő mikroszelepek felelnek meg. Ez utóbbinál a mintát egy külső csőspirálba juttatják, majd egy határozott mozdulattal beforgatják az eluens áramba.

Detektorok és regisztráló berendezések. Az oszlopot elhagyó eluensben az elválasztott komponensek koncentrációja detektorral folyamatosan követhető, melyek leggyakrabban UV-VIS spektrofotométerek, fluorométerek vagy refraktométerek. A detektorok fontos tulajdonsága a detektorzaj, mely adódhat a műszer elektronikájából, a hőmérséklet és a hálózati feszültség ingadozásából, az áramlási sebesség változásból, és a szivattyú pulzálásából. A kis koncentrációban jelenlévő komponensek kimutatási határának meghatározása miatt ismerni kell a detektor-alapvonal eltolódását. A **kimutatási határ** meghatározása a 3.6. fejezetben kerül részletesen ismertetésre.

Lineáris dinamikus tartomány az a koncentráció-intervallum, amelyen belül a detektor a koncentrációval arányos nagyságú jelet szolgáltat. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfok általában UV-VIS spektrofotométerrel, fluorométerrel, differenciál refraktométerrel, vagy diódasoros detektorral működnek. Az **UV és látható tartományban működő spektrofotométerek** viszonylag érzéketlenek az áramlási sebesség változására, a hőmérséklet-ingadozásra, és több vegyület érzékeny detektálását teszik lehetővé. A detektálás során a mintáknak az ultraibolya vagy látható tartományban abszorbeálniuk kell. A deutérium lámpa fénye résen keresztül a monokromátorházba jut, homorú tükör optikai rácstra vetíti, és a kívánt hullámhosszú monokromatikus fény kiválasztható. A **látható hullámhossztartományban dolgozó**

spektrofotométerek alkalmazása esetén az oszlop után a komponenseket színreakcióba visszük, a reakcióterméket pedig fotometriásan mérjük. Jó példa erre a ninhidrinreakció aminosavakkal, melynek során a képződött kékes-ibolya színű vegyületet (a prolin és hidroxiprolin esetében sárgát) 570 (ill. 440) nm-en fotometráljuk.

A **differenciálrefraktométer** esetén az érzékelő folyamatosan méri a referenciacellában lévő tiszta és az analizátorcellában lévő, az elválasztott komponenst is tartalmazó eluens törésmutatója közötti különbséget. A **fényelhajlós törésmutató-mérő** lineáris dinamikus tartománya nagyobb, mint a differenciál refraktométereké. A **fluorimetriás detektorok** az elválasztott komponensek ultraibolya sugárzással keltett fluoreszcens sugárzását mérik. Nem fluoreszkáló vegyületből származékképzéssel fluoreszcenciára képes vegyület készíthető. (Aminosavak o-ftáldialdehiddel és merkaptó-etanollal adnak ilyen típusú vegyületeket). A **voltammetriás és a konduktometriás detektálás** igen érzékeny és jól használható ionos komponenseknél.

5.1.2.6.2. A kromatogramok értékelése

A kromatogram egy diagram, melynél az idő függvényében olvasható le a minta koncentrációjával arányos detektorjel. Ideális esetben minden komponens szimmetrikus, haranggörbe vagy Gauss-görbe alakkal jellemezhető csúcs formájában lép ki az oszlopból. Minden csúcs a komponens anyagi minőségének jellemzésére alkalmas, amely meghatározott idő eltelte után hagyja el az oszlopot. A minta injektálása és az oszlop végén, a csúcsmaximum megjelenése között eltelt időt **retenciós időnek** nevezzük (t_R), mely adott kromatográfias viszonyok között jellemző az egyes komponensekre, és amellyel a **minőségi analízis** elvégezhető. Ha az adott retenciós időnél nincs jel, a kérdéses komponens nincs jelen a mintában. Az elválasztásra jellemző a szomszédos csúcsok retenciós idejének különbsége, mely minél nagyobb, annál könnyebben választható el a két komponens egymástól. Minden komponensre jellemző a sávszélesség, mely minél kisebb, annál keskenyebbek a csúcsok, és annál jobb az elválasztás. A **menyiségi értékelés** a csúcsmagasság, illetve a csúcsterület mérésével lehetséges. A csúcsmagasságnak az alapvonalától a csúcs legmagasabb pontjáig terjedő távolságot tekintjük. A csúcsterület mérésekor a csúcs magasságát szorozzuk a csúcs félmagasságánál mért szélességével. A csúcs magassága, illetve annak területe egyenesen arányos a koncentrációval, ezért ismert koncentrációjú komponens csúcsmagasságához hasonlítva az ismeretlen koncentrációjú komponens

csúcsmagasságát, az ismeretlen csúcsnak megfelelő koncentráció számolható. **Belső standard alkalmazásakor** az ismeretlen keverékhez adott koncentrációban ismert vegyületet adunk, így azt belső jelzőként használva függetleníjük az elemzés pontosságát pl. az injektálás reprodukálhatóságától és egyéb kísérleti paraméterektől.

5.1.2.7. Az adszorpció kromatográfia alkalmazása fehérjék analízisére

Az adszorpció kromatográfiában alkalmazott adszorbensek közül csak kevés alkalmazható fehérjék elválasztására, mert ezen adszorbensek **hidrofil aktív centrumain a kötődés adszorpcióval megy végbe**, kapacitásuk nagy molekulájú anyagokkal szemben viszonylag kicsi, így a fehérjék csak kis hatásokkal választhatók el ezzel a módszerrel. Az ilyen típusú kromatográfiás körülmények között a fehérjék denaturálódhatnak és biológiai aktivitásukat is elveszíthetik, ennek ellenére számos alkalmazást írtak le fehérjék szétválasztására ezzel a módszerrel. Hidroxi-apatiton például elemezték az albumin- és a γ -globulin-frakciókat, a tojássárgája lipoprotein- és kromoprotein-frakcióit, meghatározták a lizozim és az ovalbumin mennyiségét, és szétválasztották a szérumprotein-frakciókat. Ritkán ugyan alkalmazták adszorbensnek a fehérjeanalitikában az alumínium-oxidot, a cellulózt, a kaolint és a szilikagélt, azonban ezek jelentősége a gyakorlatban minimális. A felületén módosított szilikagél alkalmazása az élelmiszer analitikában viszont széles körben elterjedt.

5.1.3. Megoszlásos kromatográfia

A megoszlásos kromatográfia során **az elválasztás alapja az elválasztandó anyag ellenáramú ismételt megoszlása egy álló- és egy mozgófázis között, melynek során a minta komponensei egymással nem elegyedő folyadékokban (álló fázis és mozgó fázis) különböző mértékben oldódnak**. Az állófázis egy szemcsés hordozóra felvitt nagy viszkozitású folyadék, a mozgófázis pedig gáz, vagy vizes oldatok és szerves oldószerek különböző összetételű elegyei. A fázisok közötti egyensúlyi koncentráció-megoszlás elsősorban a mozgófázis polaritásától függ, ezért a megoszlási hányados a mozgófázis összetételének változtatásával módosítható.

5.1.3.1. Megoszlás, megoszlási törvény

A **megoszlás** az a folyamat, amikor valamely anyag egyidejűleg, két egymással érintkező, de nem elegyedő oldószerben oldódik, akkor az egyensúly beálltával, a két

oldatban észlelt koncentráció viszonya, nem túl nagy koncentráció esetén, független a koncentráció abszolút értékétől, állandó. Ha az egyik oldószerben az oldott anyag koncentrációja c_1 , a vele egyensúlyban lévő másik oldószerben c_2 , akkor a megoszlási hányados (K): $K=c_1/c_2$, függetlenül a c_1 , illetve a c_2 abszolút értékétől. A **megoszlási hányados** híg oldatokban csak a résztvevők anyagi minőségétől és a hőmérséklettől függ, független a koncentrációtól.

A **megoszlási törvény akkor érvényes**, ha az adott anyag molekuláris állapota mindkét oldószerben ugyanaz, sem a disszociációs, sem az asszociációs viszonyok nem változnak. A **molekuláris állapot változása** módosítja az összefüggést, ugyanis ha a második oldószerben az oldott anyag molekulái két új molekulára disszociálnak, a megoszlási hányados: $K=c_1/c_2^2$. Ha n molekula asszociál, akkor $K=\frac{c_1}{\sqrt[n]{c_2}}$.

A **mozgó fázis halmazállapotától függően** ismert gáz-folyadékkromatográfia (a mozgó fázis gáz), vagy folyadék-folyadék kromatográfia (a mozgó fázis folyadék). Mindkét elválasztási eljárás alapja az a tény, hogy két egymással nem elegyedő oldószer (vagy gáz) rendszerben egy komponens oldódása során beálló egyensúly esetén a megoszlási hányados értéke független a koncentrációtól, és csak a hőmérséklet befolyásolja azt.

5.1.3.2. A megoszlásos kromatográfia elmélete

Az alkalmazott adszorbens a szilárd hordozó, a rajta megkötött folyadék az álló fázis, a másik oldószer a mozgó fázis. Az elválasztandó elegy összetevői e két fázis között oszlanak meg. A szilárd hordozó lehet oszlopba töltött porszerű adszorbens, üveglapra felkent vékonyréteg, szűrőpapírlap, vagy -csík. Ez alapján az eljárás lehet megoszlási oszlopkromatográfia, rétegekromatográfia és papírkromatográfia.

Az elválasztandó anyagok azonosítása a **retenciós faktor** (R_f) vagy visszatartási tényező alapján történik:

$$R_f = \frac{\text{a sáv elmozdulása}}{\text{a folyadékfront elmozdulása}} \quad (28)$$

A **papírkromatográfia esetében az R_f értéke függ** a papír minőségétől, a papírostok irányától, a kifejlesztés módjától (leszálló, felszálló, körkörös stb.), az oldat töménységétől, a zavaró anyagok jelenlététől és a kifejlesztés hőmérsékletétől. Adott

oldószerkelegyekre, meghatározott papírral, kísérleti körülmények között, az R_f -értékek viszonylag állandók.

A megoszlási kromatográfiában alkalmazott szilárd fázisú **hordozóanyagok** a két oldószer közül az egyiket adszorbeálják. Ha az álló fázis vizes rendszer, akkor az adszorbens a vizet nagymértékben képes megkötni a felületén. Hidrofób anyagok kromatografálása esetén az álló folyadékfázis apoláros oldószer, ezért ilyenkor csökkentett hidrofilitású hordozóanyagot kell használnunk. A hidrofób adszorbensen, hidrofób álló és hidrofil mozgó fázissal végzett megoszlási kromatográfia a **fordított fázisú kromatográfia**.

Az újonnan **kifejlesztett stacioner fázisoknál** a funkciós csoportokat stabil kémiai kötéssel rögzítik a szilárd hordozó felületére. A hordozó általában szilikagél, melynek felületi OH-csoportjai lépnek reakcióba különböző funkciós csoportokkal. A kémiaiilag kötött fázisú töltetek szinte teljesen átvették a stacioner folyadékfázisok szerepét, melyek három méretben készülnek: Porózus, preparatív célra: 25-40 mikrométeresek; porózus, felületi töltetlen: 25-50 mikrométeresek; porózus, analitikai célra: 5-11 mikrométeresek.

Egyfázisú oldószerkelegyként vízzel korlátlanul elegyedő szerves folyadékok (pl. aceton, metil-alkohol, etil-alkohol, hangyasav, piridin stb.) használatosak. Eredetileg vízzel korlátozottan elegyedő folyadékok esetében, hidrofilező komponensek (ecetsav) alkalmazásával, vízzel minden arányban elegyedő 3-4 komponensű elegyeket (pl. etilacetát–jégecet–víz 3:2:3) hoztak létre. **Kétfázisú oldószerkelegyként** kiválóan alkalmasak a butanol–víz, butanol–ecetsav–víz és a fenol–víz különböző arányú elegyei.

5.1.3.2.1. Rétegekromatográfia

A rétegekromatográfiát, melynek során az adszorbenst vékony rétegben lemezre visszük, kis mennyiségű anyagok keverékének gyors elválasztására használhatjuk. **Előnyei** a kifejlesztés rövid időtartama, a foltok jó szétválasztási lehetősége, és hogy a kémiaiilag ellenálló hordozóanyagon agresszív szerves oldószerek is felhasználhatók. **A rétegekromatográfia eszközei** a rétegekromatográfias lemez, az adszorbens, és a kötőanyag. **A rétegekromatográfiára történő előkészítés során** az adszorbenst és a kötőanyagot a szükséges mennyiségű vízzel szuszpenzióvá elegyítjük, a lemezre (üveg,

műanyag vagy fémlemez) felkenjük, szobahőmérsékleten szárítjuk, 100-105°C-os szárítószekrényben 30-45 percig aktiváljuk, majd az aktivált lemezeket exsikkátorban tároljuk. A réteget kromatografálás közben csiszolt fedővel ellátott üveg futtatókamrában (üvegkádak) légmentesen lezárjuk, melynek következtében a lemezek az oldószergőzökkel telített térben vannak.

A rétegekromatográfia gyakorlati kivitelezése során először kiválasztjuk a réteget, majd a vizsgálandó oldatot mikropipettával egymástól 20-30 mm-re lévő pontokra felvisszük ügyelve arra, hogy egy-egy folt 6-8 mm-nél ne legyen nagyobb átmérőjű, majd a lemezt a futtatószer gőzeivel előzetesen telített futtatókamrába helyezzük. A rétegre felvitt anyag foltjának előrehaladását a vonatkozó adszorpciós izoterma határozza meg. A kromatogram kifejlesztését akkor fejezzük be, ha az oldószer frontja megközelíti a lemez felső szélét. Szervetlen adszorbensek esetén előhívásra agresszív anyagokat (tömény kénsav, perklórsav, antimon-klorid) is lehet alkalmazni.

A **nagy teljesítményű rétegekromatográfia (HPTLC)** esetén az álló szilárd fázis kisebb részecskemérete (5-7 μm átmérő) és a réteg tömör kialakítása az elválasztási teljesítményt növeli. A **lineáris HPTLC-technika** alkalmazása 10x10 cm-es rétegen 30-50 minta eredményes, mennyiségileg is jól értékelhető vizsgálatát teszi lehetővé.

A **túlnyomásos rétegekromatográfia (OPTLC)** növeli a rétegekromatográfia teljesítőképességét, mert a mozgó fázis áramlási sebessége az egész szétválasztás alatt állandó.

5.1.3.2.2. Papírkromatográfia

A **papírkromatográfiában** alkalmazott kromatográfiás papír nagy nedvszívó képességű, az álló fázis kialakulásához elegendő oldószert tud adszorbeálni, és nedves állapotban is kielégítő szilárdságú. A papír vastagsága folyadékfelszívó képességét határozza meg. A megoszlási kromatográfia folyadékfázisa víz vagy több, vízzel korlátozottan vagy korlátlanul elegyedő folyadék, de lehet meghatározott pH-jú pufferoldatot is lehet használni. Az oldószerek használatánál figyelemmel kell lenni arra, hogy az **R_f -érték függ az oldószer polaritásától**, ugyanis a hidrofил anyagok R_f -értéke az oldószer polaritásával együtt nő.

A papírkromatográfia eszközei a kromatografáló szekrény, mely 50-80 cm magas és 30x60 cm alapterületű saválló acél vagy üveg, a kromatográfiás papír, a mintafelvívő mikropipetták, a futtatószer, az előhívó reagensek, és egy szárítószekrény.

A megoszlási papírkromatográfia lehet leszálló-, felszálló-, vízszintes csík- és körpapír-kromatográfia. Az elválasztandó elegy koncentrációja az oldatban mindegyik esetben 0,5-2,0% közötti. A felcseppentéshez mikropipettát, szűk kapillárist használunk ügyelve arra, hogy a szétválasztandó oldat foltja kb. 5 mm átmérőjű legyen, és mintegy 0,01-0,3 mg anyagot tartalmazzon. A felcseppentés során töményítést végezhetünk a papíron a felvitt csepp óvatos beszárításával.

Leszálló kromatográfia esetén a papír végétől 8-10 cm-nyire, egymástól 2-4 cm távolságban helyezünk el az egyes anyagkeverékek cseppjeit, nagyobb mennyiségek kromatografálása esetén viszont sávos felvitelt alkalmazunk. A futtatószer tartalmazó edény a kromatografáló-berendezés felső részében van, ebbe merül bele a papír vége. Az oldószer részben a kapilláris erő, részben a nehézségi erő hatására lefelé halad a papírban. A kromatogramot addig futtatjuk, amíg a folyadékfront meg nem közelíti a papír végét. Ha az oldószer tovább futtatjuk a papíron, túlcsepegő futtatás hajtunk végre.

Felszálló kromatográfia esetén az elrendezés a leszálló módszer fordítottja. A papírcsík megcseppentett vége a berendezés alján elhelyezett oldószerbe merül, a futtatószer pedig a kapilláris erők hatására fölfelé halad.

Vízszintes kromatográfia esetén a kiszabott papírcsíkokat vízszintesen helyezünk el, az oldószer pedig papírnyelv segítségével közvetítjük hozzá. A **körpapír-kromatográfiában** a kromatográfiás papírból 8-10 cm-es sugarú kört vágunk, és az oldószer a megcseppentés helyétől, a középponttól vízszintesen halad a papírban a kerület felé, és az anyagkeverékek egyes alkotói koncentrikus körök alakjában válnak szét.

Nyújtott papírkromatográfia esetén ha az oldószerfront eléri a papír szélét, a futtatást megszüntetjük, a kromatogramot megszáritjuk, és hasonló oldószerrel újra futtatjuk.

A kétdimenziós papírkromatográfiát sok komponensű keverék szétválasztására használjuk, ha R_F -értékeik egymáshoz közel esnek, és egydimenziós futtatással nem

érhető el a kívánt elválasztás. Az elválasztani kívánt oldatok elegyét a papír bal alsó sarkába cseppenjük, az első futtatószerrel megfuttatjuk, majd szárítás után 90 fokkal elforgatva ismételten ugyanazzal, vagy másik futtatószer eleggyel újabb futtatást végzünk. A futtatás iránya a második esetben tehát az elsőre merőleges.

A papírkromatogramok értékelése során a kromatogramot kiemeljük a berendezésből, ha a színes anyagok közvetlenül megfigyelhetők, még nedvesen megjelöljük az oldószerfrontot, a foltok súlypontját becsléssel meghatározzuk és grafit ceruzával megjelöljük. Színtelen anyagok esetén ultraibolya fényben végzett megfigyeléssel, alkalmas előhívó szer segítségével, vagy a komponenseket színes származékokká alakítva lehet a kromatogramot értékelni. Az előhívó szer a papírra gáz, gőz vagy folyadékpermet alakjában vihető fel. Leggyakoribb mód a reagens oldat rápermetezése a kromatogramra, melyet követően az előhívást gyakran melegítéssel kell összekapcsolni. A színes foltokat is körülrajzoljuk és megjelöljük a súlypontjukat, hogy amennyiben később a színükből veszítenének, vagy az teljesen eltűnne, további értékelést is tudjunk végezni. .

5.1.3.3. Minőségi és mennyiségi meghatározás

Mind a rétegekromatográfiánál, mind a papírkromatográfiánál a **minőségi analízis** az R_f -értékek megállapításával, összehasonlító, azonosító anyagok együttfuttatásával történik. A **mennyiségi analízis** hígítási sorral történő együttfuttatással, denzitométerek segítségével történik. A **denzitométerek** spektrofotométerek, melyek a megvilágított kromatogramon áteső vagy arról visszavert fény intenzitását mérik, regisztrálják. E mellett az értékelés lehetséges kioldás, elúció után is. A **futtatáshoz használt oldószereket** úgy kell megválasztani, hogy a vizsgált anyagok R_f -értékei 0,3-0,7 közé essenek. A **kétdimenziós kromatogramoknál** minden egyes komponens modelloldatából, egydimenziós futtatással, külön-külön mindkét oldószerben meghatározzuk az R_f -értékeket, és kiszámítjuk az illető anyag foltjának várható helyét.

A megoszlásos kromatográfia az adszorpciós kromatográfiához hasonlóan a fehérjekutatásban nem tudott igazán nagy jelentőségre szert tenni, melyet magyarázni lehet azokkal a bonyolult viszonyokkal, melyek az álló- és mozgófázis, valamint a fehérjék kölcsönhatása következtében kialakulnak.

5.1.4. Ioncserés kromatográfia

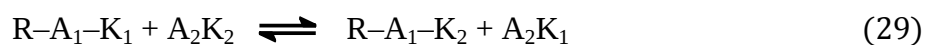
5.1.4.1. Az ioncsere mechanizmusa

Az ioncserélő kromatográfia álló fázisa egy olyan ioncserélő anyag, amelynek mátrixához elektrolitos disszociációra képes csoportok kötődnek kovalens kötéssel. Azokat az ioncserélőket, amelyek mátrixán **a fix ion negatív töltésű savmaradék, kationcserélőknek, a pozitív töltésű fix iont** tartalmazókat pedig **anioncserélőknek** nevezzük. A fix ionok ellenionjai ugyanolyan töltésű más ionokkal kicserélhetők. Az ioncserés kromatografálás során a szorbens ellenionjait először az oszlopra adagolt minta ionjai váltják fel, majd ezeket, töltéseik nagyságával ellenkező sorrendben, az eluáló pufferoldat ionjai fokozatosan kicserélik. A kicserélés, illetve elválasztás függ a kromatografálás hőmérsékletétől, valamint a mozgófázis ionkoncentrációjától és a pH-tól.

Az ioncserés kromatográfia esetén tehát az álló fázis egy polimer szerkezetű szerves vagy szervetlen anyag, amelyen aktív csoportok vannak. Az aktív csoportok a vázról leszakadni nem tudnak, ellenionok is tartoznak hozzájuk, amelyek a mozgó fázis hasonló jellegű ionjaival kicserélődhetnek.

A **kationcserélő polimer** aromás gyűrűhöz kötött disszociáló (protonleadó) csoportot tartalmaz. Ezek lehetnek $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_4\text{H}_2$ vagy fenolos $-\text{OH}$, a kicserélhető kation pedig lehet H^+ vagy Na^+ .

A **kationcserélők működését** az alábbi összeállítás mutatja:



ahol

R = az ioncserélő szervetlen vagy szerves polimerváz,

A₁ = az el nem mozdítható aktív anioncsoport,

A₂ = a mozgó fázis anionja,

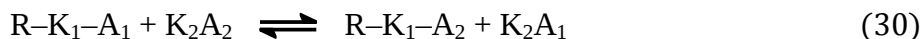
K₁ = a polimerváz eredeti kationja,

K₂ = a mozgó fázisban kicserélt kation.

Az anioncserélő anyagok disszociációra képes különböző rendű kationokat

($-\text{NH}_3\text{OH}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$) tartalmaznak, melyekhez anionként OH^- és Cl^- is kapcsolódhat.

Az anioncserélő működését az alábbi összeállítás mutatja:



ahol

R = az ioncserélő szervesetlen vagy szerves polimerváz,

K_1 = a gyantavázhoz kötött kationcsoport,

K_2 = a folyadékfázisban lévő kation,

A_1 = a gyanta eredeti anionja,

A_2 = a folyadékfázisban lévő és kicserélt anion.

A folyékony mozgó fázisban oldott ionoknak az álló, szilárd fázis disszociációjára képes, funkciós csoportjairól származó ionokkal való reverzibilis kicserélődése sztöchiometrikus, amely a tömeghatás törvénye alapján játszódik le. Az ioncserélő **az aktív helyek disszociációs foka** szerint lehet erősen savas, gyengén savas, erősen bázisos és gyengén bázisos. Az ioncserélő kromatográfiában, **több oldott ion esetén**, az ioncserélő gyanta az egyik iont jobban megköti, mint a többi; a **folyamat szelektív** lehet. Az egyensúly eléréséhez szükséges időtartam hosszabb az adszorpciós kromatográfiánál.

A többértékű ionok erősebben kötődnek a gyantához, az azonos töltetű ionok között a sorrendet pedig a hidratált ion átmérője szabja meg, és az elválasztást befolyásolja a hőmérséklet is. Az oszlopon megkötött ionokat eluálhatjuk olyan oldattal vagy pufferral, amely olyan kicserélhető ionokat tartalmaz, amelyeknek affinitása az oszlopon lévő rögzített ionokhoz nagyobb, mint a megkötött anyagé. A kötött ionok kicserélődési állandóik sorrendjében hagyják el az oszlopot. Két ion jól elválasztható, ha a kicserélődési állandóik értéke 20%-kal különbözik egymástól.

5.1.4.2. Az ioncserélő gyanták és tulajdonságaik

Az ioncserés kromatográfia legfontosabb eszközei a szerves, szintetikus műgyanták, amelyeknél legelőnyösebb, ha egyféle aktív csoportot tartalmaznak. A kationcserélő és anioncserélő műgyanták szilárd váza leggyakrabban vinil-benzol–divinil-benzol

kopolimer. A legfontosabb **szintetikus ioncserélő gyantákat** a következő 16. táblázat mutatja.

16. táblázat A legfontosabb szintetikus ioncserélő gyanták

Ioncserélő gyanta	Funkciós csoport	Kereskedelmi elnevezés
Erősen savas kationcserélő gyanta	Aromás-SO ₃ H	Amberlite IR 120 Amberlite CG 120 Dovex 50 Zerolit 225 Permilit Q
	Aromás-SO ₃ H + -COOH	Zeokarb
	Aromás-SO ₃ H + Fenolos-OH	Zeorex Duolit C
Gyengén savas kationcserélő gyanta	-COOH	Amberlite IRC-50 Amberlite XE-64 Zerolit 225
Erősen bázisos anioncserélő gyanta	Kvaterner bázis	Amberlite IRA-400 Amberlite IRA-401 Amberlite IRA-411 Dovex 1 Dovex 2 Zerolit FF De Acidite
Gyengén bázisos anioncserélő gyanta	Poliamin	Amberlite IR 4-B Amberlite IR 45 Dovex 3 Zerolit G Zerolit H Duolit A
Kevert kation- és anioncserélő gyanta		Amberlite MB-1 Amberlite MB-2 Amberlite MB-3 Biodeminrolit

Az ioncserélő gyanta **kapacitása** megmutatja, hogy a száraz ioncserélő egységnyi mennyisége hány mol oldott iont tud kicserélni. A kapacitást egységnyi tömegű (g) műgyantára vonatkoztatva milligramm-ekvivalensben adják meg.

Az ioncserélő gyanták a különböző futtatószerekben **duzzadnak**. A polárosabb oldószeres erősebb duzzadást okoznak, a kevésbé poláros oldószerre való áttérés viszont az oszlop összeesését, csatornaképződést, a polaritás növelése pedig az oszlop

eltömődését okozhatja. A duzzadóképeséget a térhálós szerkezet változtatásával befolyásolni lehet.

Az analitikai kémiában igen gyakran alkalmazzák a **DOVEX 50 kationcserélő** műgyantát, mely szulfonált polisztirol láncokból áll, és divinil-benzol-hidakkal keresztkötésszerűen van térhálósítva. A térháló sűrűségétől függ, hogy az ioncserélő gyanta funkciós csoportja milyen nagy molekulákkal reagál. A divinil-benzol mennyisége 1-2-4-8-16% lehet, amit gyanta minőségi mutatói sorában feltüntetnek. Minél sűrűbb a térháló annál lassúbb az ionok diffúziója, és a kromatográfiás egyensúly kialakulása is függ az ioncserélő gyanták részecskenagyságától.

5.1.4.3. Az ioncserés kromatográfia metodikája

Ioncserés oszlopkromatográfia esetében az oszlop homogén méretű szemcsékből áll. Az ioncserélő oszlopot nedves, iszapolós módszerrel töltjük, a gyantát használat előtt az előírt oldószerben duzzasztjuk, a kromatografálást vizes oldatban, elúciós vagy kizsorításos módszerekkel végezzük. Az ioncserélő műgyanta regenerálása az aktív helyre bekötendő iont nagy koncentrációban tartalmazó oldat segítségével történik. A kationcserélő műgyantákat savas oldatokkal (ritkábban Na-ionokkal), az anioncserélőket többnyire lúggal vagy kloridionokkal regeneráljuk. (Az aminosavak szétválasztását és meghatározását a vonatkozó fejezet tartalmazza).

Ioncserés rétegekromatográfia esetén általában ioncserés készrétegeken történik az elválasztás. Alkalmazzuk fehérjehidrolizátumok aminosav-összetételének kvalitatív és szemikvantitatív megállapítására, melynek során az egyes aminosavelegek szétválasztására különböző Na-citrát-pufferoldatok használandók. A 17. táblázatban e pufferek összetétele látható.

A B-puffer segítségével 16 aminosav egydimenziós elválasztására van lehetőség. Az aminosavak **R_f-értékei növekvő sorrendben:** arginin, lizin, hisztidin, fenil-alanin, tirozin, leucin, izoleucin, metionin, valin, prolin, alanin, glicin, glutaminsav, szerin, treonin, aszparaginsav. (A szerin és a treonin foltja rosszul válik el.). A C-pufferrel az aromás és bázikus aminosavak különíthetők el, a D-puffer a lizin és az ornitin elválasztását teszi lehetővé, az E-puffer pedig a triptofán kimutatására és elválasztására használható.

17. táblázat Az aminosavak Fixion-réteges elválasztásához használható Na-citát-pufferek (1000 cm³ végső térfogatra)

Jellemzők, illetve adalékok	EP	A	B	C	D	E
pH	3,28	3,28	3,30	5,23	4,25	6,00
Na ⁺ -koncentráció (M)	0,02	0,20	0,400	0,325	0,40	1,50
Citrát-koncentráció (mol·l ⁻¹)	0,067	0,067	0,400	0,117	0,067	0,30
Citromsav H ₂ O (g)	1,4	14,1	84,0	24,6	14,1	7,0
NaOH (g)	0,8	8,0	16,0	14,0	8,0	4,0
NaCl (g)	-	-	-	-	11,7	81,9
HCl, 37%, d:1,19 (g/cm ³)	1,2	12,3	5,9	6,5	8,4	-
Glicerín (cm ³)	-	100	-	-	-	-
Metil-celloszolv*	-	-	-	-	-	100

*etilénglikol-monometil-éter. EP = egyensúlyba hozó (ekvilibráló) puffer.

5.1.4.4. Az ioncserés kromatográfia gyakorlati alkalmazásai

5.1.4.4.1. Fehérjék elválasztása ioncserélő műgyantákon

Az ioncserélő szorbenseken a fehérjék főként Coulomb-féle erőkkel kötődnek, az elektrosztatikus kölcsönhatásokon kívül azonban apoláros adszorpcióval és hidrogénhidakkal való kötődéssel is számolhatunk. A nagy molekulatömegű fehérjék esetében a töltést nem csak az őket alkotó aminosavak aránya határozza meg, hanem jelentősen befolyásolja azt az oldószer pH-ja is. Az izoelektromos pontnál kisebb pH-jú oldatban a fehérjemolekulák pozitív, nagyobb pH-jú oldatban pedig negatív töltésűek lesznek, ezért **a pozitív töltésű anyagok szorpciójához kationcserélő, a negatív töltésűekéhez pedig anioncserélő szorbenst kell alkalmazni.** Az izoelektromos pont felett és alatt egy-egy pH-tartományban a fehérjék mind kation-, mind anioncserélő gyantán kromatografálhatók, az izoelektromos pontban viszont az ikeriont nem köti meg sem a kation-, sem az anioncserélő szorbens. Fehérjék oszlopkromatográfiás

elválasztásához ioncserélő műgyantákat, cellulóz alapú ioncserélőket vagy ioncserélő-géleket alkalmaznak.

A **fehérjék ioncserés oszlopkromatográfiás** vizsgálatakor ügyelni kell arra, hogy a nagy molekulatömegű, erősen differenciált térszerkezetű anyagok a szorpció következtében könnyen denaturálódhatnak, mások pedig az ioncserélő gyanta funkció csoportjaira irreverzibilisen kötődhetnek. A feladat megoldásához szükséges optimális ioncserélő kiválasztását elősegíti, ha ismerjük az elválasztandó anyagok **izoelektromos pontját**, biológiailag aktív anyagok esetében pedig azt a pH-tartományt, melyben stabilitásukat nem veszítik el. A fehérjeanalitikában leggyakrabban divinil-benzollal különféle mértékben térhálósított szulfonált polisztirol, valamint polimetakrilsav műgyanták kerülnek felhasználásra. A kationcserélő műgyantákon kromatografálható fehérjék általában kisebb molekulatömegűek, és bázikus jellegűek.

Szulfonált polisztirol műgyantán sikerült szétválasztani olyan fehérjét, mint a *citokrom c*, a *ribonukleáz*, a *dezoxiribonukleáz*, a *lizozim*, az *inzulin*, a *prolaktin*, a *pektináz*, a *celluláz*, a *papain*, a növekedési hormon, a *hisztionok*, a *hemoglobin*, a *tripszinogén*, a *kimotripszinogén* és a *kimotripszin*. Nagy számú publikáció jelent meg a peptidek ioncserés oszlopkromatográfiás szétválasztásáról és meghatározásáról is. Vizsgálták egyes fehérjék enzimhasítása után kapott fragmenseinek mennyiségét is, és így ez az eljárás is hozzájárult a fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározásához.

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiájának leírása a vonatkozó fejezetben található.

5.1.4.4.2. Fehérjék elválasztása cellulóz alapú ioncserélőkkel

Igen jó hatásfokkal használhatók fehérjék és peptidek elválasztására az erősen hidrofíl, cellulóz alapú ioncserélők és gél ioncserélők. Az ioncserélő cellulózzármazékok aktív csoportjai a cellulóz felületén helyezkednek el, de ezek mellett a cellulóz hidroxil csoportjai is megkötik a bonyolult szerkezetű fehérjét anélkül, hogy azok a szorpció következtében denaturálódnának. A leggyakrabban használt cellulózzármazékok a karboxi-, a metil- és a foszforilált-cellulóz kationcserélők, a dietil-amino-etil-, az amino-etil- és az epiklór-hidrinezett, valamint trietil-aminozott cellulóz anioncserélők.

Az ioncserélő cellulózszármazékok igen hamar elterjedtek, és nagy jelentőségre tettek szert a fehérjeanalitikában. Ezek az anyagok a cellulóz rostos szerkezete és a cellulózmolekula hidroxil csoportjai miatt nagy mennyiségű vizet tudnak felvenni, ezért a duzzadt cellulóz tömege 7-10-szerese lehet a száraz cellulóz tömegének. A száraz ioncserélő cellulóz előkészítésének első lépése ezért a cellulóz hidratálása, majd az első eluáló pufferrel történő szuszpendálást követően a kromatografáló oszlopba való töltése. A szétválasztani kívánt fehérjeoldatot az oszlop felett lévő puffer alá rétegezhetjük, vagy pedig az oszlop feletti puffer leengedése után az oszlop felszínére engedhetjük a kromatografálandó oldatot. Ezt követően növekvő pH-jú és ionkoncentrációjú pufferekkel, gradiens elúcióval választjuk szét a frakciókat. Miután a fehérjefrakciók elhagyták az ioncserélő oszlopot, az oszlop töltetét 1M NaOH-dal regeneráljuk, a lúgot az oszlopról desztillált vízzel kimossuk, majd a következő elválasztás előtt az első puffer oldatával addig mossuk, amíg az oszlopról távozó pufferoldat pH-ja azonos nem lesz az eredeti pufferével.

Az ioncserélő cellulózok felhasználása fehérjék kromatografálására szinte áttekinthetetlenül bőséges. Az ioncserélő cellulóz és a pufferek összetételének változtatásával szinte valamennyi jelenleg ismert fehérje izolálása, a többi fehérjefrakciótól történő elválasztása és meghatározása megvalósítható.

5.1.4.4.3. Elválasztások ioncserélő gélekkel

Térhálósított dextránalapú és a poliakrilamid-alapú gélek mind ioncserélő, mind gélzsűrő tulajdonsággal rendelkeznek, a kromatográfias elválasztás során azonban mégis inkább az ioncsere kerül előtérbe. Az ioncserélő gélek különösen előnyösen alkalmazhatók biológiailag aktív, labilis anyagok elválasztására illetve tisztítására. Alkalmazásuk során célszerű figyelembe venni mind az ioncserélőkre, mind a gélzsűrőkre vonatkozó elveket és technikai megoldásokat.

5.1.5. Gélkromatográfia

5.1.5.1. A gélkromatográfia elmélete

A gélkromatográfia, vagy méretkizárásos kromatográfia, a molekulatömegkülönbségeken alapuló egyik legelterjedtebb elválasztási módszer. A módszert hívják még gélzsűrésnek és molekulaszűrésnek is. A molekulaméret szerinti elválasztás jól

illeszthető az előzőekben ismertetett kromatográfiás módszerekhez. A gélkromatográfiás elválasztás során a mozgó fázis valamilyen folyadék, a töltet pedig finom eloszlású gél, megfelelő pórusmérettel, ezért **a gél belsejébe csak azok a molekulák tudnak behatolni, amelyek mérete a gél pórusméreténél kisebb.** Amely molekulák behatolnak a gélszemcsék belsejébe, azok tovább maradnak az oszlopon, nagyobb oldószertérfogattal eluálódnak mint a gélbe behatolni képtelen, a gél pórusainál nagyobb molekulák. Mivel egy gél pórusai mindig inhomogének, a gélkromatográfia során a gél pórusainál kisebb és nagyobb molekulatömegű tartományba tartozó komponensek egymástól elválaszthatók.

5.1.5.2. Géltípusok és a dextrángél

A kromatografálást háromdimenziós rácsot alkotó, térhálós szerkezetű géleken végzik. A térháló mechanikai stabilitást nyújt a gélnek, és a háromdimenziós térháló a gél pórusméretét is meghatározza. A gél mátrixának inertnek kell lenni, azon ioncsoportok nem vagy csak kismértékben lehetnek jelen. A gélnek mechanikailag és kémiaiilag stabilnak kell lenni, a gél és az elválasztani kívánt anyagok között legfeljebb gyenge, reverzibilis, hidrofób kölcsönhatások alakulhatnak ki. A gél szemcsemérete lehetőleg homogén legyen, hogy az eltérő méret miatt a részecskék közötti csatornák inhomogenitása ne következzen be. A kromatográfiás műveletekhez használt gélek kereskedelmi forgalomban kaphatók, és szinte minden elválasztáshoz megtalálható az optimális géltípus.

Kromatográfiás célra csak a pontosan ismert pórusnagyságú és duzzadt állapotban is megfelelő szilárdságú gél használható. Az e követelménynek megfelelő dextrángéleket ismert szemcsenagysággal és vízfelvevő képességgel hozzák forgalomra, ahol előre lehet tudni a gélágy térfogatát, illetve a szétválasztandó frakciók molekula tömegét. A szemcsenagyság 40-300 μm között, a vízfelvevő képesség pedig 1-20 g/cm^3 között változik. A gélágy térfogata 2-40 cm^3/g közötti, a szétválasztandó frakciók molekula tömege pedig elérheti a 800 ezret. Négyszázezeres molekula tömegig a dextrán és a poliakrilamid géleket, e fölött pedig szefaróz géleket használják.

A gélkromatográfiás eljárás során a gélszemcsék pórusnagysága pontosan ismert és állandó érték, a gélképző anyag pedig nem lép kölcsönhatásba a szétválasztandó komponensekkel. A dextrángél kialakulását a 69. ábra mutatja.

Analitikai elválasztásra a 10-50 cm hosszú, és az 1-2 cm belső átmérőjű oszlopokat, míg preparatív célokra akár több méteres, 10-20 cm belső átmérőjű oszlopokat is használnak. A mozgó fázis speciális oldat vagy puffer rendszer, melynek oszlopon keresztül történő áramoltatását speciális szivattyúk biztosítják.

A gékromatográfiás analízis során az első lépés a gélágykészítés, melynek során a száraz géleket a megfelelő oldószerben duzzasztják. A duzzasztás ideje szobahőmérsékleten akár 24 óra is lehet. Az oszlopkészítés során a duzzasztott gél az eluáló szerrel homogénen elkeverjük, buborékmentesen oszlopba töltjük, ülepítjük, majd néhány órán át a mozgó fázissal átmossuk. A mintafelvételnél ügyelünk arra, hogy a gélágyat ne keverjük fel, és hogy a minta térfogata ne legyen nagyobb a gélágy térfogatának 5%-ánál.

5.1.5.3.1. Géloszlop-kromatográfia

A **géloszlop-kromatográfiás eljárás** során a duzzasztott gélanyagot a megfelelően előkészített oszlopba töltjük, és az alkalmazni kívánt oldószerrel többször átmossuk. Az oldószer folyamatos felvitele vagy szivattyúval vagy az oldószertartály megfelelő magasba helyezésével, gravitációs úton valósítható meg. Ennek során szükség van összekötő csővezetésekre, és az eluátum gyűjtéséhez frakciószedő berendezésre. Az elúció során általában perisztaltikus pumpával áramoltatjuk a mozgófázist, az oszlopról távozó eluátumot pedig frakciószedő segítségével üvegcsövekbe gyűjtjük. Az oszlopról távozó anyagok mennyiségét legtöbbször átfolyó küvettás spektrofotométerrel az UV tartományban mérjük. A detektor a vizsgált oldat jellemző tulajdonságát automatikusan méri és regisztrálja.

5.1.5.3.2. Gélréteg-kromatográfia

A **gélréteg-kromatográfiás eljárás** során csak különlegesen finom szemcsézettségű Sephadex-készítmények használhatók. Az elválasztás szempontjából a 0,5 mm vastagságú gélrétegek bizonyultak a leghasználhatóbbnak. Ügyelni kell arra, hogy a kromatografálás alatt a réteg nem száradhat ki, valamint gondoskodni kell a futtatószer be- és kivezetéséről, és a réteg megfelelő dőlésszögének kialakításáról.

5.1.5.4. A gélkromatográfia alkalmazása

A gélkromatográfia legfőbb alkalmazási területei a gyors molekulatömeg-mérés, a molekulatömeg alapján történő preparatív csoport szeparálások, az egyes csoportok preparatív frakcionálása, és a peptidek, valamint a fehérjék gélkromatográfiás tisztítása. Aminosavak is szétválaszthatók gélkromatográfiával, azonban e módszer pontossága, illetve hatékonysága meg sem közelíti az ioncserés oszlopkromatográfiás vagy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározását. A gélkromatográfia alkalmazható tehát géliszűrésre, fehérjék és aminosavak kromatográfiás szétválasztására, molekulatömeg meghatározásra és a fehérjék sótalanítására.

5.1.5.4.1. Géliszűrés

A **géliszűrés** során a gélrendszerre anyagok elegyét visszük fel, ahol az egyik komponens kis molekulából, a másik komponens rendkívül nagy molekulából áll. A nagy molekulák a szemcsék közötti térben gyorsan haladnak át a gélágyon, a kis molekulák pedig behatolnak a gél szemcsék belsejébe. A módszer alkalmas kolloidok sótalanítására és molekulacsoportok molekulatömeg szerinti szétválasztására.

A **kromatográfiás alkalmazás** során a szétválasztandó elegy komponenseinek molekulái között csak csekély különbség van. Az elválasztás annál sikeresebb lesz, minél hosszabb az oszlop. A módszer alkalmas fehérjék és nagyobb molekulatömegű zsírsavak trigliceridjeinek szétválasztására.

5.1.5.4.2. Molekulatömeg meghatározás

A **molekulatömeg-meghatározás** esetében a duzzadt géloszlopok pórusain keresztül az **azonos molekulatömegű (méretű) anyagok hasonló módon haladnak keresztül**. Ha az ismeretlen anyag ismert molekulatömegű komponenssel azonos módon halad át az oszlopon, **következtetést vonhatunk le az ismeretlen anyag molekulatömegére vonatkozóan**. Ehhez szükség van ismert molekulatömegű anyagokra, melyek lehetnek természetes vagy mesterséges **azonosítóanyagok**. A **természetes anyagok** általában jól definiált molekulatömegű és tisztán előállítható fehérjekészítmények, a **mesterséges hitelesítőanyagok** polivinilszármazékok, melyek különböző molekulatömegű polisztirol molekulákból állnak. A 18. táblázat a molekulatömeg meghatározáshoz szükséges fehérjesorozatot mutatja.

18. táblázat Gélkromatográfia molekulatömeg-meghatározáshoz használható fehérjesorozat

Fehérje	Molekulatömeg (Dalton)
Citokrom c	13000
Ribonukleáz-A	13600
Mioglobin	17000
Tripszininhibítor (szójabab)	21500
Alfa-kimotripszin	22500
Tripszin	24000
Kimotripszinogén A	25000
Pepszin	35500
Tojásalbumin	45000
Szérumalbumin (monomer)	67000
Glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz	117000
Szérumalbumin (dimer)	134000
Aldoláz (élesztő)	137000
γ -globulin (humán)	140000
Alkoholdehidrogenáz (élesztő)	150000
Kataláz	230000

5.1.6. Gázkromatográfia

A gázkromatográfias elválasztások során **a mozgó fázis gázhalmazállapotú, az álló fázis pedig lehet folyadék- vagy szilárd halmazállapotú.** Az elválasztás a vizsgálati anyag komponenseinek két különböző fázis közötti megoszlásán vagy adszorpcióján alapul. Ennek alapján két különböző eljárást különböztetünk meg: Az adszorpciós gázkromatográfiát, ahol az álló fázis szilárd (GSC), és megoszlásos gázkromatográfiát, ahol az álló fázis folyékony halmazállapotú (GLC). A szétválasztás az adszorpció esetén az adszorbeáló közeg szilárd töltetének felületén, megoszláskor a szilárd hordozón lévő, nehezen illó folyadékokból álló nagy felületű filmben játszódik le. A gázkromatográfia esetén a gyakorlatban szinte kizárólag az elúciós eljárásokat alkalmazzuk.

5.1.6.1. A gázkromatográfia elmélete

Az adszorpciós illetve megoszlási egyensúly dinamikus jellege következtében különféle gázok molekulái adott hőmérsékleten és adott gázkoncentráció esetén különböző átlagidőtartamig tartózkodnak a szilárd vagy folyékony adszorbens felületén, majd a gázmolekulák szerkezetüktől függően különböző időtartam után deszorbeálódnak. Ha az adszorbenssel töltött kromatográfias oszlopon gázelegyet áramoltatunk át, a csőből először a leggyengébben adszorbeálódó komponens lép ki, majd a növekvő erősségű adszorpció sorrendjében a többi. Az egyes komponenseknek különböző a tartózkodási idejük a kromatográfias oszlopban, ezért különböző idő (retenciós idő) elteltével jelennek meg az oszlop végén. A retenciós időt az oszlop hőmérséklete, az oszlop töltetaktivitása, a készülék méretei és a vivőgáz sebessége befolyásolja.

5.1.6.2. Gázkromatográfias készülék működése

A kromatográfias oszlopban állandó sebességgel semleges gázáramot, vivőgázt vezetünk, és a vivőgázáramba mérjük és adagoljuk be a vizsgálandó anyagot gáz- vagy elgőzöltetett folyadékminta alakjában. A vizsgálandó elegy a vivőgázzal a kolonnába jut, ahol komponensei a vivőgáz eluáló hatására, kötőképeségüktől függően, különböző sebességgel haladnak előre. Megfelelő töltet és elegendő hosszú oszlop esetén a minta teljesen szétválik, alkotórészei egymás után jelennek meg a vivőgázban. A kolonnából kilépő vivőgázt detektoron vezetjük át, ami az egyes komponensek megjelenésekor az alkotórészek mennyiségével arányos jelet ad. A detektorban kapott jel regisztrálóberendezés segítségével grafikusán ábrázolható, melynek során megkapjuk a szétválasztásra jellemző kromatogramot. A gázkromatogramon látható csúcsok helyéből a komponensek minőségi azonosításához kapunk segítséget, míg a csúcsmagasság és a haranggörbe alatti terület alapján mennyiségi értékelést végezhetünk.

A gázkromatográf részei a vivőgázrendszer, a mintaadagoló berendezés, a kromatografáló oszlop (kolonna), a kromatográfias érzékelő berendezés (detektor), és a regisztrálóberendezés.

5.1.6.2.1. A vivőgáz

A **vivőgáz** sem a vizsgálati anyaggal, sem az oszlop töltetével nem léphet kémiai kölcsönhatásba, mely célnak leggyakrabban a nitrogén, a hidrogén, a hélium, az argon,

a szén-dioxid, és speciális esetekben néha a levegő vagy az oxigén felel meg. Ezek közül a hidrogén és a hélium rendelkezik a legnagyobb hővezető képességgel. A hidrogén esetében rendkívüli módon előny, hogy a kis viszkozitás miatt kicsi az oszlop nyomásesése, viszont nagyobb az elillanási veszély, és fennáll a robbanás lehetősége. A hélium előnye, hogy nem tűzveszélyes, de rendkívül drága. A nagy tisztaságú nitrogen használata igen elterjedt, mert nagyobb molekulatömege miatt jobb az elválasztás, viszonylag olcsó, egyszerűen tisztítható, és kezelése biztonságos. Az argon kémiai semlegessége és nagy tisztasága miatt rendkívül kedvelt vívőgáz. A szén-dioxidot jobbára csak a preparatív gázkromatográfiában alkalmazzuk.

A vívőgázt leggyakrabban palackból, nyomáscsökkentő szelepen keresztül nyerjük, melyhez tartozék egy gáztisztító feltét is, mely megköti a nedvességet, az oxigént és más nem kívánatos anyagokat. A vívőgáz áramlási sebességének állandó értéken tartása alapvető a gázkromatográfiás elemzés szempontjából. Az áramlási viszonyokat műszerekkel, a nyomást manométerrel, az áramlási sebességet szakaszosan használható szappanhártyás sebességmérővel mérik. Ennek során egy kalibrált üvegcsőben a gázáram hatására szappanhab képződik, és a szappanhártya előrehaladását stopperórával mérve a gáz minőségétől függetlenül a térfogati sebességet kapjuk.

5.1.6.2.2. Előmelegítő, mintaadagoló

A vizsgálandó anyagot gáz, folyadék vagy szilárd halmazállapotban tápláljuk a készülékbe, mert a kromatografáló oszlopba csak légnemű mintát lehet bejuttatni. Az adagoló és az oszlop közé **előmelegítőt kell iktatni**, melynek segítségével a minta elpárolgatható. Ennek hőmérséklete 30-50°C-kal magasabb, mint az oszlopé. Az adagolt minta térfogata legyen a lehető legkisebb. A gáznemű minták térfogata 0,1-5 cm³, folyékony minták térfogata 1-10 µl, a nagyon ritkán alkalmazott szilárd betápláláskor maximum 1-10 mg legyen. A gáznemű minták adagolására injekciós fecskendő, bemérőpipetta, higanyos gázbüretta, a folyékony minták adagolására különleges fecskendők használhatók, ahol mikrométer csavarral lehet a térfogatot szabályozni. A tüvel egy szilikongumiból készült réteget (szeptum) kell átszúrni, mely ezt követően összezáródva megakadályozza a betáplált anyag visszaáramlását. Sorozatvizsgálatok céljaira különböző rendszerű automatikus mintaadagolókat is szerkesztettek, mellyel a vizsgálati anyagot a gázkromatográf kellően felmelegített adagolóterébe kell fecskendezni.

5.1.6.2.3. Oszlopok

A gázkromatográf lelkét a **kromatografálóoszlopok** alkotják, melyek lehetnek **töltött oszlop, kapilláris** (üres cső), vagy **töltött kapilláris kolonnák**. A töltött kolonnák üvegcsőből, alumíniumból, rézből, saválló acélból készülnek, belső átmérőjük 2-4 mm, alakjuk egyenes, U, W, spirál vagy lapos spirál, hosszuk pár meter. A kapilláris kolonnák alumínium-, réz-, saválló acél-, üveg- vagy műanyag- (poliamid, nylon) csövek, melyek bírják a magas hőmérsékletet. A csövek belső felületét felmaratással, vagy vékony, szilárd hordozóréteg felvitelével növelik. Belső átmérőjük 0,2-1 mm közötti, hosszuk 10-100 m, kivételes esetben több száz méter, melyet orsóra vagy egyéb tartóra tekernek fel. A kapilláris kolonnák előnye a jobb elválasztóképesség, a lerövidíthető analízisidő, és hogy a mérés alacsonyabb hőmérsékleten is elvégezhető. A kapilláris kolonnák hátránya kis kapacitásuk, hogy a szokásos mintamennyiségnek tizedrészét tudják feldolgozni, és hogy speciális gázelosztót kell beépíteni a készülékbe, hogy a kolonnán a gáz áramolni tudjon. A kolonnák belépőnyílása a mintaadagolóhoz, kilépő vége pedig a detektorhoz csatlakozik. Egy gázkromatográfiás készülékbe többféle különböző típusú töltettel ellátott kolonna is beépíthető, és a különböző kolonnákat lehet sorba vagy párhuzamosan kapcsolni.

5.1.6.2.4. Töltetek

A **kromatografáló oszlop töltete** az adszorpciós gázkromatográfiában felületaktív, rendszerint szemcsés anyag, mely nagy fajlagos felületű és kémiaiilag indifferent. Apoláros töltőanyag az aktív szén, mely különböző molekulaméretű gázok, vagy különböző szénhidrogének szétválasztására alkalmas. A poláris adszorbensek közül említést érdemelnek a szilikagél, az alumínium-oxid, a különféle alumínium-szilikátok, melyek a molekula aszimmetriája, polaritása által meghatározott belső energiáknak megfelelően választják szét a gázokat.

A **megoszlási gázkromatográfiában** (folyadék-gáz rendszer) a kapilláris kromatográfiás oszlopok hordozóanyag nélkül tartalmazzák az álló folyadékfázist, mely a cső belső felületéhez tapad, a töltött oszlopokban pedig szemcsés hordozóanyag van, melyet a megfelelő folyadékkal nedvesítenek. A nedvesítőfolyadék az álló fázis, amelyben a szétválasztás lejátsszódik. Ennek a kromatografálás hőmérsékletén folyékonnak kell lennie, legyen kémiaiilag közömbös, tartósan megmaradjon a hordozó

felületén, illékonyága lehetőleg minél kisebb, oldóképessége pedig minél nagyobb legyen. A különböző szilikonolajok különösen széles hőmérséklet-tartományban használhatók gázkromatográfiás állófázisként.

Az **álló fázis** (hordozó) bármilyen szemcsés anyag lehet, mely mechanikailag elég szilárd és kopásálló, nagy fajlagos felületű és pórusos szerkezetű. Leggyakrabban 0,10-0,25 mm-es szemcsézettségű hordozóval dolgozunk. A folyékony álló fázis felvitele illékony szerves oldószeres oldatból történik állandó keverés, majd elgőzölögtetés, esetleg vákuumos elpárologtatás segítségével. A kialakuló folyadékfilm vastagsága 0,1-0,5 μm .

5.1.6.2.5. Termosztát

A rendszert szobahőmérséklettől 400°C-ig temperálhatjuk a termosztáttal, melynek során a kiválasztott hőmérsékletet $\pm 0,5^\circ\text{C}$ pontossággal be kell tartani. Termosztálni kell az oszlopot, a mintaadagoló berendezést és a detektort. A mai készülékek légtermosztáttal, vagy fémtömb-termosztáttal működnek. A légtermosztátok egyszerű szerkezetűek, gyorsan felfűthetők és lehűthetők, különböző térfogatúak, spirálkolonnák esetén 3-5 literesek, a beépített fűtőteljesítményük 800-2000 W. A fémtömbtermosztátok (általában alumíniumtömbből készülnek) izoterm munkamódszereknel használhatók előnyösen. A kromatografálóoszlop a fémtömb furatában, két tömb között helyezkedik el, vagy fémhengerre van tekercselve. Nagy hőkapacitása miatt a hőmérsékletingadozás csekély.

A programozott fűtés kromatogramjavító hatású, ezért a korszerű készülékekben a hőmérsékletet a vizsgálat alatt meghatározott program szerint lehet változtatni, mely kis hőkapacitású légtermosztátokkal valósítható meg. A hőmérséklet-változtatás általában 0,2-20°C/perc sebességgel végezhető. Néhány újabb készüléktípusnak mély hőmérsékletű termosztátja is van, mellyel -100 és -180°C között is végezhető elemzés.

5.1.6.2.6. Detektorok

A detektorok feladata a kolonnából kilépő vivőgázáramban megjelenő komponens folytonos, gyors és érzékeny észlelése. A detektor a komponens megjelenésekor valamilyen **fizikai vagy kémiai tulajdonság megváltozását érzékelve elektromos jelet ad, mely regisztrálható és értékelhető**. A detektorok nagyobb része csak a

kolonnából kilépő komponens mennyiségéről ad tájékoztatást, míg a specifikus detektor egyes elemeket (N, P, S) tartalmazó vegyületekre szelektívek. Egyes készülékeknél egyidejűleg két, esetleg három detektor párhuzamos működtetése is lehetséges.

A detektorok működése lehet „pillanatnyi” (differenciális), vagy „összegző” (integráló) jellegű. A differenciális detektor a komponensek által okozott pillanatnyi változást méri, míg az integráló típusú érzékelő a detektorba addig belépett összes minta mennyiségét adja meg. Manapság már csak a pillanatnyi változásokat észlelő detektorokat alkalmazzák, melyek jele a kromatogramon egymás utáni csúcsok sorozatából áll (differenciálkromatogram). **A négy legfontosabb detektortípus a hővezetőképesség-mérő-, a lángionizációs-, az elektronbefogási- és a lángfotometriás detektor.**

A **hővezetőképesség-mérő detektor** mérőcellája furatokkal ellátott fémgömb, amelyen a vivőgáz áramlik keresztül. A furatokon volfrámszál van kifeszítve, amit elektromos árammal fűtenek. A huzalok ellenállása a hőmérséklettel erősen változik; ha a vivőgázban komponens jelenik meg, a gázáram hővezetőképessége csökken, és a fűtött szál hőmérsékletének és ellenállásának növekedése jól mérhető. Az egyik furaton a palackból származó tiszta, a másikon a kolonnából érkező, komponenseket tartalmazó vivőgáz áramlik, melyek közötti hővezetőképesség változását differenciális módszerrel mérjük.

Az **ionizációs detektor** működésének alapja a gázok villamos vezetőképessége. Közöséges hőmérsékleten és nyomáson a gázok tökéletes szigetelők, azonban ha elektromos töltésű atomokat, molekulákat vagy szabad elektronokat hozunk létre a gázban, azok a külső elektromos erőter hatására elmozdulnak, a gáz vezetővé válik. Lángionizációs érzékelő (FID) egy utánkeveréses hidrogénégő, melynél a láng két elektród között alakul ki, amelyre 100-300 V feszültséget kapcsolnak. A hidrogénláng 2000-2200°C hőmérsékletén kismértékben a hidrogén is ionizálódik, ami állandó alapáramot ad. Ha a kolonnából szerves anyag jut a detektorba, akkor a hidrogénlángban eléggé ionok keletkeznek, melynek hatására a gáz vezetőképessége, az ionáram jelentősen megnő. A lángot határoló két elektród között keletkező ionáram megfelelő erősítés után regisztrálható. A lángionizációs detektorok érzékenyek szinte minden szerves vegyületre. A nitrogén- és foszfor-érzékeny detektorok speciális feladatok megoldására alkalmasak.

A gázkromatográfiában a radioaktív sugárzással működő **elektronbefogási detektor** (elektroncsapda, ECD) alkalmazása a legelterjedtebb. A detektorban lévő sugárforrás hatására a vivőgázban szabad elektronok és nagy tömegű pozitív ionok keletkeznek, melyek a megfelelő elektród felé vándorolnak. Ha a detektorba olyan vegyület jut, ami képes anionná alakulni, az az elektronokat negatív ionok képződése közben befogja, az ionáram csökken, a detektor pedig az eredeti ionáram csökkenését jelzi. Sugárforrásként általában β -sugárzó izotópokat (^{63}Ni vagy trícium) használnak, melyek aktivitása $4 \cdot 10^8$ - $70 \cdot 10^8$ Bq.

A **lángfotometriás detektor** (FPD) a foszfor- és kéntartalmú vegyületek szelektív kimutatására alkalmas. A lángban gerjesztett minta által kisugárzott fényből interferenciaszűrővel kiválasztja a foszforra (526 nm) vagy a kénre (394 nm) jellemző hullámhosszú sugarat, melynek intenzitását fotometriás úton, elektronsokszorozó segítségével méri.

5.1.6.2.7. Regisztrálóberendezések

A gázkromatográfiában korábban alkalmazott regisztrálóberendezések vonalíró elektronikus potenciométer voltak, melyek kétcsatornás változata kétdetektoros értékelést tett lehetővé. Ma már kizárólag elektronikus integrátorokat, vagy megfelelően megválasztott számítógépes szoftvereket alkalmazunk az értékelésre, melyek összegzik a görbe alatti területet, mérik a csúcs retenciós idejét, és regisztrálják az eredményeket.

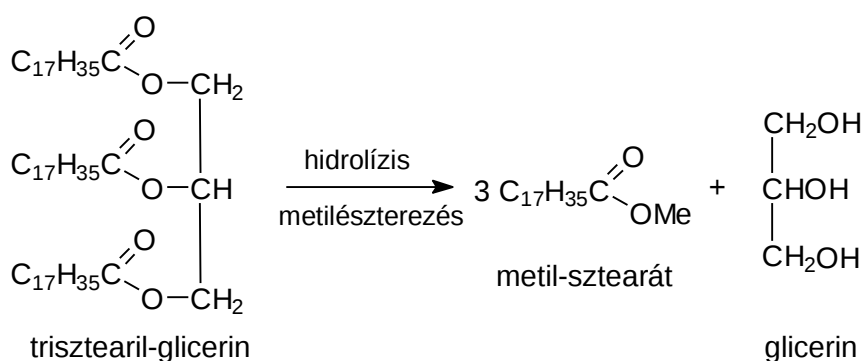
5.1.6.3. A gázkromatográfia néhány alkalmazása az élelmiszer analitikában

A gázkromatográfias módszereket ma már az élelmiszer-analízis sok területén alkalmazzák. Így többek között gázkromatográfiával határozzák meg az antioxidánsokat, a tartósítószerket, a szermaradványokat, az íz- és aromaanyagokat, valamint az illó vagy illóvá tehető komponenseket (alkoholok, aldehidek, zsírsavak, észterek), valamint újabban használható aminosav-meghatározásra is az aminosavak észterszármazékainak analízise során. A gázkromatográf nehezen illó, illó származékká nem alakítható és hőlabilis anyagok (szénhidrátok, egyes vitaminok) vizsgálatára nem alkalmas. Ezen utóbbi komponensek analízisét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával lehet elvégezni.

5.1.6.3.1. A zsír zsírsav-összetételének meghatározása gázkromatográfián

A napraforgóolaj és a disznózsír zsírsav-összetételének meghatározása

A módszer alkalmas a napraforgóolaj, valamint a disznózsír és az egyéb növényi és állati zsiradékok zsírsav-összetételének meghatározására. Gázkromatográfiás módszerrel elsősorban azok a komponensek vizsgálhatók, amelyek illékonyak vagy 300 °C-ig illékonyra tehetők. A triacil-glicerinek ennek a követelménynek nem felelnek meg, és alkalmatlanok erre a szabad, hosszú láncú zsírsavak is. Ezeknél a triacil-glicerinek észterkötésének hidrolízise után szabaddá váló zsírsavakból **zsírsav-metilésztereket szintetizálunk**, majd a kapott vegyületet vizsgáljuk gázkromatográfián. A hidrolízis, illetve az észterezés folyamatait a 70. ábra mutatja be.



70. ábra A triglicerid hidrolízisének, illetve észterezésének folyamata

A meghatározás során 0,2 g napraforgóolajat vagy disznózsírt feloldunk 2 cm³ n-heptánban, és víztelenítés céljából kevés kiizzított nátrium-szulfátot adunk hozzá. A víztelenített heptános oldatból 0,5 cm³-t fiolába pipettázunk, és hozzáadunk 0,5 cm³ nátrium-metilát reagenst, majd 60 °C-on, egy órán át melegítjük, 10 percenként összerázzuk. Ezt követően hozzáadunk 1 cm³ n-heptánt és 1 cm³ desztillált vizet, majd 1–2 percig rázzuk. A reagens feleslegének eltávolítása után a felső szerves fázisból injektálunk a gázkromatográfba. A kapott kromatográfiás csúcsok alatti területek a zsírsav-metilészterek mennyiségével arányosak (71. ábra). Az eredményeket ennek megfelelően a zsírsav-metilészterek relatív tömegszázalékában adjuk meg.

$$Rel\% = \frac{T_{zsírsav}}{\Sigma T_{zsírsav}} \cdot 100 \quad (31)$$

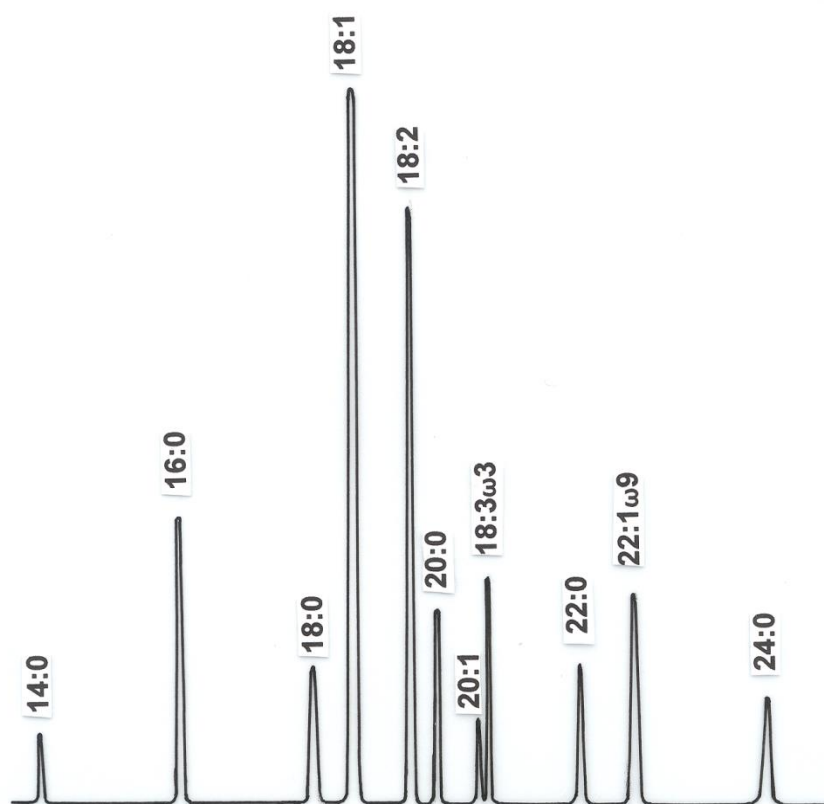
ahol

$Rel\%$ = a zsírsav-metilészter relatív mennyisége,

$T_{zsírsav}$ = a zsírsav-metilészter kromatográfiás csúcsa alatti terület,

$\Sigma T_{zsírsav}$ = a zsírsav-metilészterek kromatográfiás csúcsai alatti területek összege.

Azonos mintából két, párhuzamos mérés közötti eltérés az eredmény 5%-a.



71. ábra A telített és telítetlen zsírsavak standard kromatogramja

5.1.6.3.2. Az illósavak (illó zsírsavak) meghatározása gázkromatográfián

Illósavaknak hívjuk a 2–6 szénatomszámú monokarbonsavakat (ecetsav, propionsav, vajsav, izo-vajsav, valeriánsav, izo-valeriánsav, kapronsav és izo-kapronsav). Ezek az „illósavak” vizes oldatukból melegítéssel könnyen elillannak, tehát kidesztillálhatók. Illékonyáguknak köszönhetően szaguk is intenzív; az ecetsavé kis koncentrációban

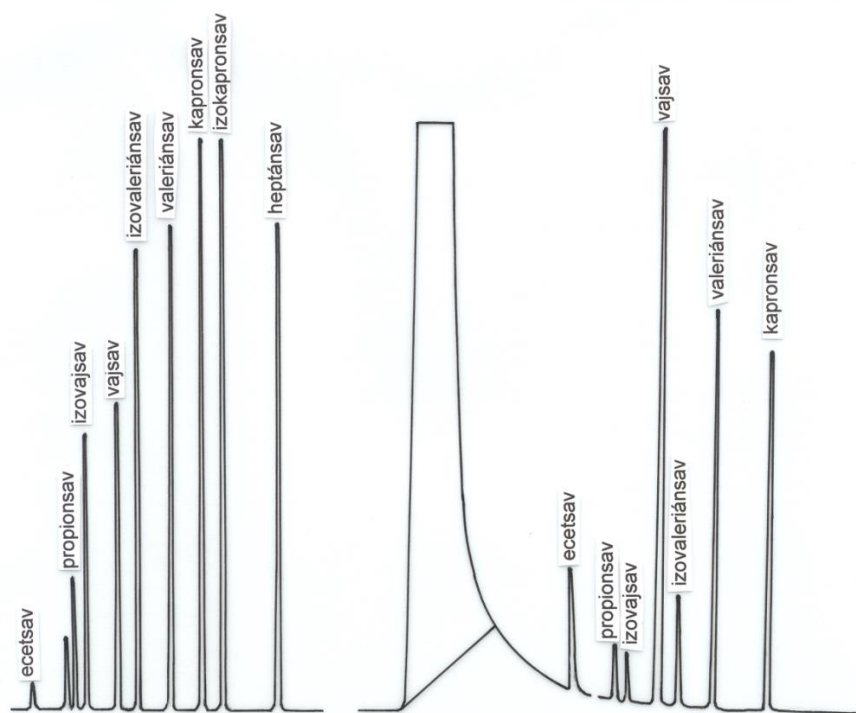
kellemes, de a többi kellemetlen. Gyakorlati szempontból az erjesztett élelmiszerek illósavtartalmának meghatározása a legjelentősebb. Az erjesztéssel való tartósítás során a cukortartalom anaerob bomlás következtében tejsavvá alakul. A folyamattal párhuzamosan végbemenő erjedések során ecetsav, propionsav, vajsav, valamint a fehérjebomlás következtében nagyobb molekulájú illózsírsavak is előfordulhatnak az élelmiszerekben. Az erjesztéssel készített táplálékokban 1–1,5% körüli tejsavkoncentráció kívánatos; a propionsav jelenléte nem káros, sőt hozzájárul az élelmiszer tartósításához. A vajsav jelenléte önmagában nem káros, de rontja az organoleptikus tulajdonságokat, és ártalmas folyamatokra, illetve rosszul végrehajtott erjedésre utal. Izovajsav, illetve nagyobb molekulájú illózsírsavak az aminosavbomlás eredményeként jelennek meg.

Az illózsírsavak mennyiségét korábban frakcionált desztillálással, újabban viszont gázkromatográfiás eljárással határozzák meg. Az első eljárás szerint a különféle savakat a vizes oldatból kidesztillálták, szedőkben forráspont alapján elkülönítve felfogták, és mennyiségüket lúgos titrálással határozták meg. A desztillálás során a különböző savak nem váltak el tökéletesen egymástól, ezért ezzel a módszerrel csak az ecetsav-, a propionsav- és a vajsavtartalmat vizsgálták, a többi illósavat pedig figyelmen kívül hagyták.

Napjainkban az illózsírsavak meghatározása gázkromatográfiás módszerrel történik. Ennek első lépésében 100 g erjesztéssel tartósított élelmiszert mérünk egy 1000 cm³-es mérőlombikba, ráöntünk 900 cm³ desztillált vizet, egy napot állni hagyjuk, időnként összerázzuk. A szűrletből 4 cm³-t centrifugacsőbe mérünk, hozzáadunk 0,2 cm³ foszforsavat, és 8000 g-n 10 percig centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, és ebből injektálunk 1 µl-t a gázkromatográfba. Az illózsírsavak elválasztása 120 °C-on, 2 m-es töltött oszlopon történik, ahol az álló fázis kovaföld hordozóra felvitt szilikonolaj.

Minden elemzés előtt általában naponta injektálunk standardoldatot, amely az összes, meghatározni kívánt komponenst ismert koncentrációban tartalmazza. Megállapítjuk a retenciós időket, meghatározzuk a koncentráció számításához szükséges faktorokat. A hitelesítő kromatogram elkészülte után injektálunk a vizes kivonatból, az integrátor vagy a komputer segítségével megállapítjuk, hogy mely savak találhatók benne, és a hitelesítő kromatogramhoz való hasonlításal kiszámítjuk azok koncentrációját. A 72.

ábra bal oldalán egy hitelesítő kromatogram, a jobb oldalán pedig egy savanyítással készült élelmiszer illózsírsavainak kromatogramja látható.



72. ábra Az illózsírsavak meghatározása gázkromatográfiával

5.1.6.3.3. Antioxidánsok (BHT) meghatározása

A butil-hidroxi-toluol (BHT) alacsony forráspontja miatt könnyen gáz állapotúvá alakítható, ezért gázkromatográfiás módszerrel meghatározható. Az eljárás során az antioxidáns tartalmú vizsgálandó anyagból, elsősorban zsírból, margarinból, olajból oldatot készítünk, amelyet közvetlenül injektálunk a gázkromatográfba. A gázkromatográfiás elválasztás viszonylag magas hőmérsékletén (200–300 °C) mind az oldat, mind az oldott anyagok gáz állapotúvá válnak, és megfelelően megválasztott gázkromatográfiás oszlopon szétválaszthatók.

A vizsgálati eljárás során a disznózsírból, margarinból vagy étolajból 100 mg vizsgálati anyagot oldunk 10 cm³ hexánban, és az így elkészített oldatból 1 µl-t injektálunk a gázkromatográfba. A gázkromatográf injektorának hőmérséklete 250 °C, a vivőgáz hélium, az injektorban a nyomás 180 kPa, a kolonna 10 m hosszú és 0,25 mm átmérőjű kvarckapilláris szilikonolaj töltettel, a kolonnatér hőmérséklete 220 °C, detektorként pedig ITD-800 tömegspektrométert használunk, 220-as tömegszámú üzemmódra

beállítva, 220 °C-on. A BHT csúcsának azonosítása után az eredmény kiszámításakor felhasználjuk azt, hogy a mérések során a BHT mennyiségével arányos területű kromatográfiás csúcsot kapunk. A BHT-tartalmat mg/kg-ban adjuk meg, a következő képlet (32) szerint:

$$BHT = \frac{T_{minta}}{T_{standard}} \cdot 100 \quad (32)$$

ahol

T_{minta} = a mintából származó BHT csúcs területe,

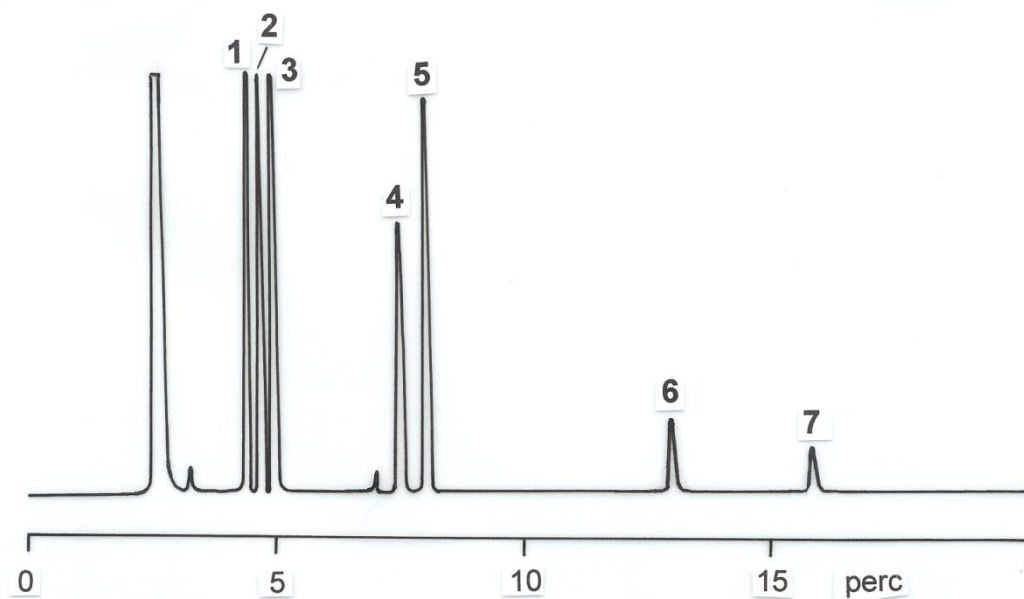
$T_{standard}$ = a standardból származó BHT csúcs területe.

Két, párhuzamos mérés között a megengedett legnagyobb eltérés az eredmény 5%-a lehet.

A különféle antioxidánsokat a megfelelő kromatográfiás körülmények betartásával egy lépésben is szét lehet választani és meg lehet határozni. A 73. ábrán látható szétválasztás különféle antioxidánsok meghatározására irányul. A kromatogramon az első csúcs a butil-hidroxi-anizol, a második csúcs a butil-hidroxi-toluol, az utolsó csúcs pedig a propil-gallát mennyiségét mutatja. A 3–6 csúcsok különféle antioxidánsokhoz tartoznak.

A gázkromatográfiás elválasztás körülményei a következők (mindegyik antioxidáns 200 µg/cm³ koncentrációjú oldatából 2 µl-t táplálunk be a gázkromatográfba):

- 30 m x 0,25 mm SAC-5 oszlop,
- 200°C-os hőmérséklet,
- 30 cm/sec áramlási sebességű héliumgáz,
- lángionizációs detektor 200°C-on.



73. ábra A különféle típusú antioxidánsok szétválasztása és meghatározása gázkromatográfiával

(1. BHA, 2. BHT, 3. TBHQ, 4. etoxiquin, 5. ionox 100, 6. THBP, 7. propil-gallát)

5.1.6.3.4. Az aminosav-tartalom gázkromatográfiás meghatározása

Az aminosav analízis „hagyományos” módja az ioncserés oszlopon (IEC) végzett elválasztás, melyet oszlop utáni ninhidrines származékképzés és spektrofotometriás detektálás követ. Bár ez a technika elterjedt és megbízható, előnytelen tulajdonságokkal is rendelkezik. Az analízis költségei viszonylag nagyok, az érzékenység korlátozott, az analízis hosszú időt vesz igénybe, és az IEC készüléke nem túl flexibilis: csak néhány analízis-típus végezhető el vele. Hogy e hátrányokat kiküszöböljék, már a hatvanas évek végén kísérleteztek a gázkromatográfiás (GC) aminosav analízis megvalósításával. A gázkromatográfiás technika lehetőségei révén kapilláris GC-vel kitűnő felbontás érhető el, a megfelelő detektorok kiválasztásával pedig nagy érzékenység biztosítható. A ninhidrin-származékok 10 ng feletti mennyiségben, az o-phtálaldehid-származékok HPLC elválasztás után fluorescens detektorral 1 ng felett mutathatók ki, míg **a gázkromatográfiás származékok elektron-befogási detektorral már 10-100 pg mennyiségben észlelhetők**, és ez az érzékenység tömegspektrométer (MS) csatolásával, megfelelő üzemmódban még tovább javítható.

Az aminosavak gázkromatográfiás analízise csak akkor kivitelezhető, ha azt megelőzően az aminosavakból olyan származékokat képezünk, melyek illékonyak és

kevésbé polárosak, mint az eredeti aminosavak. Ezért a GC rendszer paramétereinek optimalizálásán kívül megfelelő származékképzési eljárásokra is szükség van az aminosavak gázkromatográfiás analízise érdekében. Mikor alkalmazható az ioncserés folyadékkromatográfia alternatívájaként a gázkromatográfiás technika? Általánosságban elmondható, hogy azokat a származékképzési technikákat érdemes alkalmazni, melyekkel kiaknázhatók a gázkromatográfiás analízis előnyei, miközben az eredmények jó összhangban vannak az IEC analízissel nyert adatokkal.

A teljes aminosav-tartalom vizsgálata mellett lehetőség van az aminosav enantiomerek illékony származékainak gázkromatográfiás meghatározására is. Utóbbi esetben a királis szelekció megvalósítására két lehetőség kínálkozik: királis állófázisú oszlop alkalmazása, vagy az aminosav enantiomerekből királis reagenssel diasztereomer párok létrehozása, melyek akirális oszlopon is elválnak egymástól. Mivel a mozgó fázis ebben az esetben nem manipulálható, a folyadékkromatográfiában alkalmazott harmadik lehetőség – királis mozgó fázis használata – itt nem jöhet szóba.

Olyan származékképzési módszert kell alkalmazni, mellyel egy adott reagens használatával, azonos reakció-körülmények között, egyszerre mindegyik aminosav teljes mértékű átalakítása megvalósítható, és minden aminosavból csak egy termék keletkezik. Ezt a feladatot a mai napig sem sikerült minden esetben maradéktalanul megvalósítani. **Az akirális származékok képzése során** az aminosavak poláros csoportjait kevésbé poláros csoportokká kell alakítani, hogy illékonyabbá váljanak, és kémiai reakciókra kevésbé legyenek hajlamosak. Az egyik lehetőség, hogy **a karboxil-csoportot rövid szénláncú alkohollal észteresítik, és az amino-csoportot halogénezett savanhidridekkel acilezik.** A halogén-atomok bevitelével lehetőség nyílik az elektron-befogási detektor (ECD) használatára, amely nagyfokú érzékenységnövekedést jelent. A másik megoldás az aktív csoportok egy lépésben, egy reagenssel történő blokkolása trimetilszilil-származékok képzésével.

Összességében elmondható, hogy a biológiai minták analízisében a TFA (***N(O,S)-trifluorecetsav(N-TFA)-n-butil-észter***) és HFB (***N-heptafluorobutiril(N-HFB)-izobutil-észter***) származékok alkalmazásáról sok tapasztalat gyűlt össze, azonban a származékképzési eljárások végrehajtása sok esetben bonyolult, mivel vízmentes közeget, magas hőmérsékletet igényel, és az amidok (aszparagin, glutamin) átalakulásával jár, és némely aminosav alkoholban való kismértékű oldékonysága is

problémát okozhat. A trimetilszililezett aminosavak alkotják az akirális származékok másik fő csoportját. Az egyszerű szililszármazékok, mint a **trimetilszilil-** és az **N(O)-terc-butildimetilszilil-** (terc-BDMS) származék képzése egy lépésben zajlik, de vízmentes közeget, magas hőmérsékletet és hosszú időt igényel. Egyes aminosavaknál több származék is keletkezhet, és így a kromatogramon több csúcs jelentkezhethet, és bizonyos magas forráspontú molekulák részlegesen elbomolhatnak a CG analízis magas hőmérsékletén. Ezzel szemben az izo-BOC **((O,S)-izobutiloxikarbonil-metilészter)** származékok ígéretesnek mondhatók, mivel szintézisük nem igényel vízmentes közeget, magas hőmérsékletet, és hosszú időt.

A **királis származékok képzését** követően mód van az aminosav enantiomerek diasztereomer formában történő elválasztására. Ennek során vagy a karboxil-csoporttal reagáltatnak királis amint vagy alkoholt; vagy királis savval acilezik az aminos-csoportot. Az első csoportba tartozik az **N(O,S)-TFA(+)-2-butil észterek** és a **(+)-3-metil-2-butil észterek** képzése, a másodikba a **N-TFA-L-prolil klorid**, az **N- α -kloro izovaleril-** és a **N- α -kloro propionil-** reagensekkel végzett származékképzés. Az aminosav karboxil-csoportjának reakciója révén létrehozott diasztereomerek illékonyasága jobb, mint az aminos-csoport acilezésével kialakított molekuláké, ugyanis a bevitt királis csoportok mérete kisebb. A létező legillékonyabb származék a 2-butil csoport kapcsolásával alakítható ki.

Az aminosav enantiomerek elválasztása királis származékképzés nélkül is lehetséges, amennyiben rendelkezésre áll a célnak megfelelő optikailag aktív vegyületet tartalmazó oszlop. Az **enantiomerek direkt elválasztásánál nincs szükség királis reagensre**, így a nem megfelelő optikai tisztaság, és a származékképzési reakció során bekövetkező esetleges racemizáció nem okozhat problémát. A királis állófázisok kifejlesztésének a fő célja olyan fázis létrehozása, amely az összes aminosavra megfelelő enantiomer-szelektivitást biztosít, és használható a gázkromatografálás magas hőmérsékletén is. A nagy enantiomer-szelektivitású **L-valin-t-butil-amid** csoportot **karboxi-szilikonhoz** kapcsolták, mely állófázis (Chirasil-Val) 30-250 °C-ig használható, ami fél óra alatt lehetővé tette az összes aminosav izomer elúcióját.

5.1.7. Élelmiszerek aminosav-tartalmának, valamint a fehérje aminosav-összetételének meghatározása

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiája lehetővé teszi, hogy egy fehérjeminta aminosav-összetételét vagy egy fiziológias oldatban jelen lévő szabad aminosavak mennyiségét igen nagy pontossággal meg tudjuk határozni. Alapvető kutatási eredményeket e területen MOORE, STEIN és SPACKMAN munkacsoportja ért el, akik a RUHEMANN által 1909-ben felfedezett, **a ninhidrin és az aminosavak közötti kvalitatív reakciót kvantitatív meghatározássá fejlesztették**, majd 1951-ben közölték az **aminosavak ioncserés oszlopkromatografálásának módszerét**. 1958-ban MOORE, STEIN és SPACKMAN együtt publikálták az első **automatikus analizátor leírását és működési elvét**. E területen végzett munkásságukért, az elért eredményekért 1972-ben Nobel díjat kaptak. A XX. század 60-as és 70-es éveiben az ioncserés oszlopkromatográfia elvén működő automatikus aminosav-analizátorok világszerte elterjedtek, a 80-as évektől pedig egyre jobban **tért hódítottak a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerek**. Jelenleg még a legtöbb helyen ioncserés oszlopkromatográfiával (IEC) határozzák meg az aminosavakat, de a jövőben valószínűleg a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerek – gyorsaságuknál és egyszerűségükénél fogva – ki fogják szorítani az egyéb módszereket. Jelenleg pontosság és reprodukálhatóság tekintetében az IEC még felülmúlja a HPLC-t.

5.1.7.1. A vizsgálati anyag előkészítése a meghatározás előtt

A vizsgálati anyagot a kromatografáláshoz elő kell készíteni. Az előkészítés függ attól, hogy tiszta fehérje, élelmiszer, esetleg egy fermentációs termékben lévő szabad aminosavak mennyiségét akarjuk-e meghatározni. Az aminosav-összetétel meghatározásakor a fehérjét hidrolizálni kell, a fiziológias oldatokat, szervkivonatokat, tejet, pedig deproteinizálni kell a szabad aminosavak meghatározása előtt.

5.1.7.1.1. A minta hidrolízise

A fehérjék és peptidek aminosav-összetételének megállapításához a polipeptidláncot alkotó aminosavakat kötéseikből a 74. ábra szerint fel kell szabadítani. A meghatározás

során alkalmazott **hidrolízis-módszereknek az alábbi követelményeknek kell megfelelni:**

- Legyen teljes a hidrolízis, tehát az összes aminosav váljon szabaddá még a legstabilabb peptidkötésekből is.
- A lehető legkisebb mértékben károsítsa az egyes aminosavakat. Amennyiben mégis bekövetkezik a károsodás, akkor az mind kvalitatíve mind kvantitatíve konstans legyen, lehessen korrigálni vele az eredményeket, és azonos körülmények esetén azonos ismert termékek keletkezzenek, amelyek koncentrációjából az eredeti aminosav-összetételre lehet következtetni.
- Az alkalmazott reagens ne hozzon létre mellékreakciókat, például új peptid- vagy egyéb kötéseket.

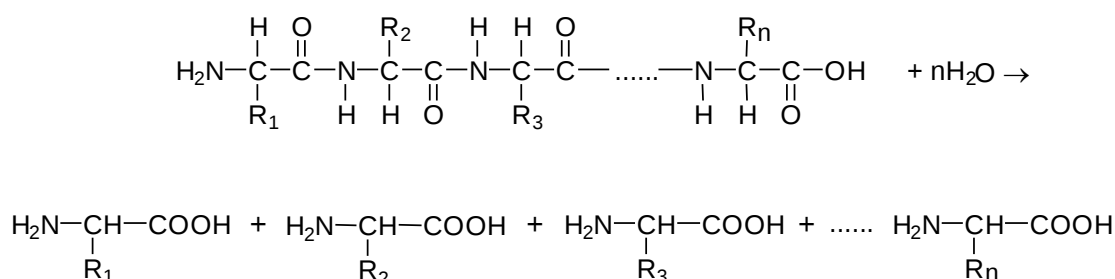
Hidrolízis előtt meg kell határozni a vizsgálati anyag szárazanyag- és nitrogéntartalmát, esetenként hamutartalmát is. Ezekre az adatokra a bemérés helyes megválasztása, a kísérőanyagok mennyiségének ismerete, azok mellékhatásainak kiküszöbölése, valamint az aminosav-meghatározásból adódó eredmény realitásának ellenőrzése szempontjából van szükség. Nagymennyiségű vizet tartalmazó minták esetén – a bomlások megakadályozása miatt – a tárolást mélyhűtőben kell végezni. A fehérje hidrolízisekor a minta víztartalmát a hidrolizáló ágens koncentrációjának megállapításakor figyelembe kell venni. Nagy víztartalmú minták esetében célszerű a mintákat úgy megszáritani, hogy aminosav-összetételük a szárítás közben ne változzék. A szárítási módszerek közül legmegfelelőbb a liofilezés, amelynek során a minta vízmentes része gyakorlatilag nem változik.

A fehérje teljes hidrolízisére leggyakrabban a **savas hidrolízismódszereket** alkalmazzák, a fehérje triptofántartalmának meghatározása során viszont rendszerint **lúggal hidrolizálják a fehérjét**. Az aminosav-meghatározáskor általában nem alkalmazunk enzimes hidrolízist, mivel az enzimek aminosav-tartalma megváltoztathatja a minta aminosav-összetételét. Ezek az enzimes eljárások a gyakorlatban nem terjedtek el, speciális analitikai eljárás esetén azonban lehetőség van alkalmazásukra.

A fehérje savas hidrolízise

A különböző peptidkötések a savas hidrolízisnek különböző mértékben állnak ellent attól függően, hogy milyen két aminosav közötti peptidkötésről van szó, illetve hogy milyen aminosavak vannak a peptidkötés közvetlen környezetében. Sokan vizsgálták a savas hidrolízis paramétereit, beszámoltak az elektrosztatikus és szterikus hatások érvényre jutásáról a különféle peptidkötések felbomlása esetén, az egyes peptidkötések különleges stabilitásának okairól, valamint a különféle és különböző koncentrációjú savaknak, a hőmérsékletnek, a hidrolízis időtartalmának befolyásáról.

A peptidkötések szétbontására sokféle savat, többféle koncentrációban alkalmaztak, azonban egészen napjainkig **a sósavas hidrolízis bizonyult a legcélszerűbbnek.** 1963-ban használták először a 6 mólos sósavat, és azóta ennek a koncentrációnak (21,88 vegyes%) az alkalmazása általános lett. Ennek egyik oka az, hogy **a 6 mólos sósav azeotróp oldat,** tehát forrás esetén koncentrációváltozástól nem kell tartanunk, a másik ok pedig az, hogy a sósav desztillálással való tisztítása után kapott tiszta anyag a fehérje hidrolízisére azonnal alkalmazható. A sósavas hidrolízis alatt lejátszódó folyamatokat a 74. ábra mutatja.



74. ábra A fehérje sósavas hidrolízise alatt lejátszódó folyamatok

Az aminosavak jelentékeny része a 6 mólos sósavas hidrolízis alatt kisebb-nagyobb százalékban bomlik, illetve átalakul. A bomlás, illetve átalakulás intenzitása függ a hidrolízis időtartalmától, a mintában, a sósavban vagy a hidrolizálóedényben lévő oxigén jelenlététől, az evakuálás mértékétől, a sósav tisztaságától, a hidrolízis hőmérsékletétől, illetve a hidrolizátum sósavtartalmának eltávolítási módjától is. **A savas hidrolízis során a triptofán szenved a legnagyobb veszteséget,** amely tiszta állapotban sósavval 105°C-on, 22 órán át kezelve 40–60%-ban, szénhidrátok jelenlétében pedig teljesen elbomlik. A triptofán a sósavban oldott vagy a levegő oxigénjének hatására, valamint szénhidrátok, egyes aminosavak, piroszőlősav és nehézfémek katalizáló hatására huminná bomlik le. A triptofán az indolgyűrű

felhasadásának következtében bomlik, a bomlási termékeket, azok összetételét, valamint a bomlás mechanizmusát és a triptofántartalom meghatározására kidolgozott módszereket a későbbiek során részletesen ismertetjük.

Az aszparagin- és a glutaminmolekuláról sósavas hidrolízis során **leszakad az amidgyök**, aszparaginsavvá, glutaminsavvá és ammóniává alakulnak, amelyek a mintában jelen lévő aszparaginsavval és glutaminsavval együtt eluálnak az ioncserélő oszlopról. A hidrolízis elején felszabaduló ammónia az aszparagin és glutamin amidgyökéből származik, ennek mennyiségéből a fehérjében lévő aszparagin és glutamin mennyiségére lehet következtetni. A későbbiekben megjelenő ammónia az aminosavak bomlásából származik. A kromatografálás során célszerű a hidrolízis alatt keletkezett ammónia mennyiségét is pontosan meghatározni, hisz ebből az aszparagin és a glutamin mennyiségére, a fehérje bomlására, igen magas ammóniatartalom esetén pedig a minta ammónia- vagy karbamidtartalmára tudunk következtetni, amely utóbbi szintén ammóniára bomlik a sósavas hidrolízis alatt.

Többen beszámoltak a két, alkoholos hidroxilcsoportot tartalmazó aminosav, **a treonin és a szerin hidrolízis közbeni elbomlásáról**, illetve átalakulásáról. A β -laktoglobulin aminosav-összetételének meghatározása során a szerin 11–14%-os, a treonin 5–7%-os bomlását tapasztalták a hidrolízis folyamán. A *papain* hidrolízisét tanulmányozva megállapították, hogy a treonin és a szerin bomlása az idővel lineáris, bár a lebomlási folyamatok metodikáját a különböző szerzők más és más módon ítélik meg. Szerin- és glutaminsav-veszteség a hidrolizátum sósavtalanítása közben is előfordulhat, amikor is a szerin hidroxilcsoportja és a két savas aminosav, az aszparaginsav és a glutaminsav karboxilcsoportja észterkötést létesít egymással.

A fehérjékben viszonylag kis mennyiségben előforduló **három, kéntartalmú aminosav**, a cisztin, a cisztein és a metionin, a sósavas hidrolízis során, különösen szénhidrátok jelenlétében **bomlik, oxigén jelenlétében pedig különböző oxidációs származékok keletkeznek**. A ciszteinből a sósavas hidrolízis során alanin és szerin, szénhidrátok jelenlétében glicin képződhet, oxigén jelenlétében pedig cisztein-szulfinsavvá, majd cisztein-szufonsavvá oxidálódik. A metionin nyomnyi oxigén jelenlétében metionin-szulfoxiddá, illetve metionin-szufonná alakul, de elbomolhat homocisztinné, homociszteinné és glicinné is.

Az érzékeny aminosavak (triptofán, metionin, cisztein, cisztin, szerin, treonin) mellett **a tirozin, a glutaminsav, az aszparaginsav, a prolin és az arginin bomlásáról is beszámoltak**. Az előzőekkel szemben az aminosav-meghatározások valin-, izoleucin-, esetleg leucin- „vesztése” nem az elbomlásból vagy átalakulásból, hanem az elégtelen hidrolízisből adódik. Ugyanis bizonyos **valil- és izoleucil-kötések nagyon stabilisak**. A valin–valin kötések hidrolízise még 150 óra után sem teljes, és ugyancsak **rendkívül stabil az** inzulinban előforduló **izoleucin–valin kötés** is, amelyet csak 96 órás hidrolízissel sikerült teljes mértékben megbontani. Az irodalomban a fentiekén túl nagyon sok tanulmány jelent meg a hidrolízis közbeni bomlásra vonatkozóan, amelyek sokszor ellenmondó adatait vissza lehet vezetni az eltérő mintára, a különböző kísérleti feltételekre és körülményekre, valamint az alkalmazott módszerekre. Egy kísérletben az *ATP-transzfoszforiláz* aminosav-összetételének meghatározása során a fehérjét 110°C-on, 20, 40, 70 és 140 órán keresztül hidrolizálták 6 mólos sósavval, majd az ioncserés oszlopkromatográfiás meghatározás eredményeiből az alábbi következtetéseket vonták le.

- A glutaminsav, a prolin és a fenilalanin 20 órás hidrolízis során teljes mértékben felszabadulnak a peptidkötésből, és a 140 órás hidrolízis alatt sem szenvednek számottevő veszteséget.
- A valin és az izoleucin teljes hidrolíziséhez legalább 70 órára van szükség, további 70 órás hidrolízis alatt mennyiségük változatlan marad, tehát a valin és az izoleucin mennyisége nem változik a 140 órás hidrolízis során.
- A metionin, a lizin és az arginin teljes hidrolízisének optimális ideje 40–70 óra között van, bár a 20 órás hidrolízissel nyert értékek is a kísérleti hibák határain belül maradnak.
- Az ammónia gyors növekedése a hidrolízis idejének növelésével nagyjából a treonin és a szerin, kisebb részben más aminosavak elbomlásából adódik.
- Az aminosavak legnagyobb mennyiségét a valin, az izoleucin, a metionin, a lizin és az arginin kivételével a húszórás hidrolízisekből kapták, a hidrolízis idejének növelésével mennyiségük folyamatosan csökkent.

- Végző megállapításuk az, hogy az aminosavaknak a mintában lévő tényleges mennyiségét a különböző ideig végzett hidrolízis értékeiből zéró időre való extrapolálással lehet meghatározni.

A hidrolízishez alkalmazott sósav mennyiségét mindig a minta összetétele határozza meg. A *ribonukleáz* aminosav-összetételének meghatározásakor, 5 mg fehérjéhez 1 cm³ 6 M HCl-at használtak, a hidrolízist 110°C-on 22 és 70 óráig végezték. Többen a fehérje–sósav arányát a mintában lévő kísérőanyagok minőségétől és mennyiségétől függően 1:500–1:5000 között javasolják. A kísérőanyagok közül különös figyelmet kell szánni a szénhidrátoknak, ezek ugyanis az aminosavakkal MAILLARD-reakcióban humint, melanoidot és más termékeket képeznek. **A sósavas hidrolízis közbeni huminképződés, valamint az azzal járó aminosavbomlás a sósav arányának növelésével csökkenthető.** A szakirodalomban számos közlemény jelent meg a nagymennyiségű kísérőanyag destruktív hatásának csökkentésére. Ez különösen akkor fontos, ha nem tiszta vagy tisztított fehérjék, hanem élelmiszerek vagy takarmányok aminosav-összetételét határozzuk meg. Ilyenkor az aránylag kis mennyiségben jelen lévő fehérje mellett nagymennyiségű szénhidráttal, elsősorban keményítővel és cellulózzal kell számolni, amelyek a sósavas hidrolízis alatt glükózra bomolva elősegítik a MAILLARD-reakciót. A huminképződés kiküszöbölésére a 6 mólos sósavhoz adtak fenolt, 1,4-bután-ditiolt, tioglikolsavat, amellyel külön-külön csökkenteni tudták a huminképződést.

A tioglikolsavat, a merkaptó-propionsavat, a merkaptó-szukcinsavat és az oxálsavat ebben a sorrendben felváltva adagolva a 6 mólos sósavhoz a huminképződést meg tudták akadályozni. Eredményes kísérleteket végeztek Na₂SO₃-tal, amelyet 0,1%-ban alkalmazva a huminképződést gátolni tudták. Ezekkel a módszerekkel nemcsak a huminképződést gátolták, hanem több-kevesebb sikerrel próbálták ezeket a triptofán meghatározására is alkalmazni. A kapott eredményeket a triptofánmeghatározás során ismertetjük.

A hidrolízis precíz, pontos kivitelezését MOORE és STEIN közölte először a szakirodalomban, de az általuk kidolgozott, optimálisnak nevezhető fehérjehidrolízis egyes laboratóriumokban esetenként nem valósítható meg, mert vagy nincs megfelelő üvegcső, vagy hiányzik a szárazjég, esetenként nem tudják a vákuumot 10 Pa alá csökkenteni. Ilyen esetekben a módszert módosítani kell, lehetőleg úgy, hogy a lehető

legkisebb mértékben legyen kihatással az analízis eredményeire. Egyik megoldás lehet például, hogy **a hidrolíziscsövet a lezárás előtt nitrogénnel többször átöblítjük**, több ízben vákuumot állítunk elő az edénykében, majd ismételten nitrogénnel töltjük meg. A többszöri ismétlés után az edénykéket evakuált állapotban zárjuk le. Többen hangsúlyozzák az üvegben átdesztillált sósav tisztaságának fontosságát, mert az oldatban lévő fémek a hidrolízis alatt több aminosav elbomlását katalizálják. Különösen a sósav vasszennyezettségének veszélyére hívják fel a figyelmet. Élelmiszerek és takarmányok aminosav-összetételének meghatározásakor, mivel ezek jelentős mértékben tartalmaznak kationokat, esetenként sokkal nagyobb koncentrációban, mint az analitikai tisztaságú sósavban visszamaradt fémszennyeződés, ezért a megbízható cégtől származó, analitikai tisztaságú sósav desztillálás nélkül is felhasználható ilyen minták analízisére.

Jelentős hibaforrás lehet a sósavas hidrolízis utolsó lépése, **a sósav eltávolítása** is. A rotációs gyorsbepárló elterjedése előtt a hidrolizátumot P_2O_5 -ot és KOH-ot tartalmazó exszikkátorba helyezve, az exszikkátort $30^\circ C$ -ra melegítve, annak evakuálásával távolították el a sósavat. Ez az eljárás hosszú időt vesz igénybe, amelynek során a szerin és a treonin jelentős bomlást szenved, és a cisztin, a metionin, valamint a triptofán bomlása következtében új csúcsok jelenhetnek meg a kromatogramon. A sósav bepárlása során a glutaminsav karboxilcsoportja észterkötést létesíthet a szerinnel vagy a treoninnal, ezért a sósav gyors eltávolítása a hidrolizátumból rotációs gyorsbepárlóval vagy liofilezással, alapvető fontosságú.

A sósavas hidrolízis technikai könnyítésére a hidrolízist n-butanolban oldott 6 mólos sósavban, $145 \pm 2^\circ C$ -on négy órán át végezve nem találtak jelentős eltéréseket a MOORE–STEIN-féle hidrolízishez képest. Az élelmiszerek fehérjetartalmát 6 mólos sósavban 20 órán keresztül, $137^\circ C$ -on hidrolizálták, melyet megelőzően a sósavon nitrogént buborékolattak keresztül. A nyitott üvegben való hidrolízisek során nagyobb sósavmennyiségeket alkalmaznak, elsősorban a huminképződés megakadályozása céljából. Az aminosav-destrukció további csökkentésére a sósavas hidrolízis mellett különféle **szulfonsavas hidrolizáló ágenseket is alkalmaztak**. Így például használták a fehérje hidrolízisére a 3 mólos para-toluol-szulfonsavat, a 4 mólos metán-szulfonsavat és a 3 mólos merkaptó-etán-szulfonsavat is. A szulfonsavas módszerek célja egyrészt az aminosav-destrukció visszaszorítása, másrészt a triptofántartalom meghatározása volt,

ezért ezeket a módszereket A triptofántartalom meghatározása című fejezetben ismertetjük részletesen.

A fehérjehidrolízis során fellépő oxidáció, különösen az oxidációra rendkívül érzékeny, kéntartalmú aminosavak esetében okozhat jelentős hibát, hisz a cisztein és cisztin elsősorban cisztein-szulfinsavvá és cisztein-szulfonsavvá, a metionin pedig metionin-szulfoxiddá és metionin-szulfonná alakul, amely átalakulások csökkentik a kéntartalmú aminosavak kitermelését.

Az oxidációs hibák kiküszöbölésére HIRS dolgozott ki módszert, amelynek lényege az, hogy a fehérje hidrolízise előtt a mintát perhangyasavval oxidálja, miközben a cisztin és cisztein ciszteinsavvá, a metionin pedig metionin-szulfonná alakul.

Az előzőek alapján **a fehérjék sósavas hidrolízisére vonatkozó követelményeket** a következők szerint lehetne összefoglalni:

- A hidrolízishez bemérendő minta mennyiségét az szabja meg, hogy a vizsgálati anyagnak milyen kis mennyisége azonos összetételű még az egész anyaggal. Homogén fehérjéből mikroanalitikai mérlegen 1–5 mg körüli mennyiséget mérünk be, és 1–5 cm³ 6 M sósavat öntünk rá. Élelmiszerek esetében a minta fehérjetartalmától függően 20–200 mg (magas zsírtartalmú mintáknál szükség szerint zsírtalanított) anyagot mérünk be, és 1000–5000-szeres mennyiségű 6 M sósavat használunk a minta hidrolíziséhez.
- A hidrolízist 6 M sósavval végezzük (21,83 vegyes%-os azeotróp oldat), amely lehetőség szerint ne tartalmazzon fémionokat.
- A hidrolízis előtt gondoskodni kell az oxigén teljes eltávolításáról, amit a lefagyasztott folyadék feletti tér evakuálásával, nitrogéngázzal való átöblítéssel vagy e kettő kombinációjával lehet elérni.
- A hidrolízis optimális hőmérséklete 110±1°C, amelynek ingadozása kerülendő, ugyanis alacsonyabb hőmérsékleten (105°C) végzett hidrolíziseknél a peptidkötések felbomlása már nem kvantitatív, magasabb hőmérsékleten pedig az érzékenyebb aminosavak bomlásával lehet számolni.

- Amennyiben csak egy hidrolízis elvégzésére van lehetőségünk, akkor annak optimális ideje 110°C-on 24 óra. Ha pontosabb vizsgálatokat szeretnénk végezni, akkor a hidrolízis alatti aminosavbomlások következtében adódó veszteségek korrekciójára a 20 és a 70 órás hidrolízisek eredményeiből a nullaórás hidrolízis időre extrapolálunk.
- A hidrolízisedény anyagából aminosavakat károsító ionok – elsősorban vas – ne oldódjanak ki.
- Hidrolízis után a sósavat rotációs vákuumdesztillálóval vagy liofilezéssel távolítsuk el.
- A kéntartalmú aminosavakat az oxidációs veszteségek elkerülése érdekében oxidált formában, perhangyasavas oxidáció után határozzuk meg.
- A szulfonsavas hidrolízismódszerek nagyobb részét, valamint a lúgos hidrolízismódszereket a fehérje triptofántartalmának meghatározására dolgozták ki. E hidrolízisek során a triptofán melletti egyéb aminosavak károsodhatnak, ezért, különösen a lúgos hidrolízist követően, a triptofánon kívül más aminosavat nem határozzunk meg.

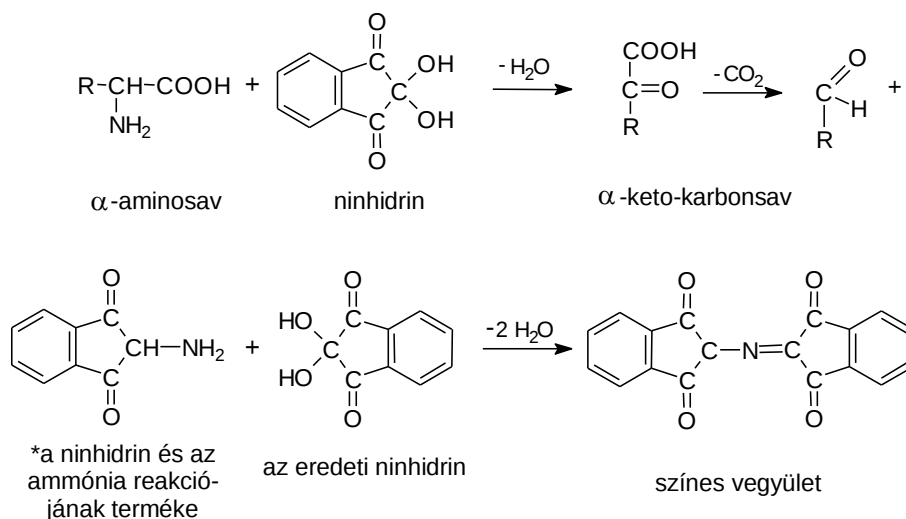
5.1.7.1.2. Deproteinizálás

Fiziológiás oldatok, szövetnedvek, szervkivonatok, kóros vizelet, tej, emésztőnedvek szabadaminosav-tartalmának meghatározásakor az oldatot nemcsak az alakos elemektől, hanem az oldatban lévő **fehérjéktől és peptidektől is meg kell tisztítani**, mert ezek a kromatografálást nagymértékben zavarják. A fehérjék és peptidek a gyantát szennyezve egyrészt eltömik a gyantaoszlopot, aminek következtében megnő a gyantaoszlop ellenállása az áramló pufferekkel szemben, másrészt a gyanta funkciós csoportjain kötődve gátolják az aminosavak ioncseréjét. A különböző időben eluálódó ninhidrin-pozitív peptidek a kromatogramon kisebb csúcsokat adnak, amelyek zavarják a kromatogram értékelését. A különféle oldatok fehérjéktől és nagymolekulájú peptidektől való megtisztítását **kémiai anyagokkal való kicsapással, ioncserés kromatográfiával való tisztítással** vagy **ultraszűréssel** végezzük el.

75. ábra Az ioncsere mechanizmusa a műgyantán

Az aminosavak ioncsérés kromatográfiás szétválasztása, illetve az elúció sorrendje a hőmérséklettel, az eluáló pufferek pH-jának, ionkoncentrációjának, esetleg szervesoldószer-tartalmának változtatásával befolyásolható. Az aminosavak mennyiségi meghatározását a ninhidrinnel való színreakció segítségével tudjuk elvégezni, amelynek vázlatát, az aminosavakkal létrejött színes terméket, a 76. ábra mutatja.

Az aminosavak ioncsérés kromatografálásához automatikus analizátorokat használunk, amelyeknél az elúció, a ninhidrinreakció, a fotometrázás, a mért extinkció regisztrálása, a koncentráció kiszámítása automatizálva van.



76. ábra Az aminosavak és a ninhidrin reakciója

5.1.7.2.2. A kromatografálás feltételei

Az ioncserélő oszlop készítése

Az aminosavak ioncsérés oszlopkromatográfiáját **4–8%-ban divinil-benzollal** térhálósított, **szulfonált polisztirol műgyantán végezzük**. A gyanta mátrixa a keresztkötésekkel térhálósított polisztirol, aktív csoportjai pedig a szulfonsavak, amelyek lehetnek hidrogén, nátrium vagy lítium formában. A **kromatografálás minőségét befolyásolja a divinil-benzol koncentrációja**, a gyanta **szemcsemérete**, illetve az **oszlop mérete**, amelyről megállapítható, hogy minél kisebb az átmérő és

minél hosszabb az oszlop, annál hatékonyabb a szétválasztás. A szférikus gyanták megjelenése lehetővé tette az oszlop hosszának rövidítését. Ma már olyan, igen jó minőségű szulfonált polisztirol gyantákat hoznak forgalomba az aminosavak kromatografálására, amelyek mérete rendkívül homogén (eltérés az átlagtól $\pm 10\%$). Ez azért fontos, mert a nagy méretkülönbségű gyantaszemcsékből álló oszlop felbontóképessége rossz, a treonin- és a szerincsúcsok a kromatografálás során összemosódnak. Amennyiben nagy méretkülönbség van a gyantaszemcsék között, a heterogén összetételű készítményt az oszlopba töltés előtt hidraulikus frakcionálással szeparálják. A gyantát általában már nátrium formában hozzák forgalomba, ha azonban nekünk kell a gyantát nátrium formába hozni, akkor MOORE és STEIN eljárása szerint járunk el. Erőteljes szennyezéskor a gyantát az oszlopról kinyomjuk, 6 M HNO_3 -val kimossuk, a nehézfémek eltávolítására EDTA-val kezeljük, majd az előzőek szerint nátrium formára hozzuk, és visszatöltjük az oszlopba.

Pufferoldatok készítése

MOORE és STEIN a fehérjehidrolizátumban lévő aminosavak szétválasztására nátrium-citrát puffereket alkalmazott. A savanyú és semleges aminosavakat az általuk szerkesztett aminosav-analizátor 150 cm-es törmelékgyanta oszlopán 0,2 M nátriumion-koncentrációjú, 3,25-ös és 4,25-ös pH-jú pufferekkel választották szét, a bázikus aminosavak elemzését pedig 15 cm-es oszlopon, 5,28-as pH-jú, 0,35 M nátriumion-koncentrációjú pufferrel végezték. Fiziológias oldatokból a bázikus aminosavakat 50 cm-es oszloppal, 0,38 M nátriumion-koncentrációjú, 4,25-ös pH-jú citrátpufferrel választották el. Szférikus gyanta használata esetén ugyanazokat a puffereket használhatjuk. A citrátpuffer nátriumion-koncentrációjának és pH-jának növelésével elérhető, hogy a savanyú és semleges aminosavak után a bázikus aminosavakat is 55 cm hosszú szférikus gyantaoszlopon eluálják. A különféle típusú feladatokhoz felhasználható **pufferek összetételét a KERESE által készített összeállítás szerint a 19. táblázat** tartalmazza.

- Az A, B és C oszlopban a hagyományos MOORE és STEIN-féle pufferek találhatók a kétoszlopos eljáráshoz.
- A D oszlopban MOORE és STEIN pufferének összetétele található fiziológias oldatok bázikus aminosavainak meghatározásához.

- Az E, F és G oszlopban DÉVÉNYI pufferei találhatóak az összes aminosav egyoszlopos eluálásához.
- A H oszlopban a fenilalanin és a hisztidin gyors eluálásához,
- az I oszlopban a cisztin, a valin és a metionin gyors eluálásához,
- a K oszlopban pedig a lizin nagy sorozatban való gyors meghatározásához szükséges pufferek összetétele található.

19. táblázat Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiájához szükséges pufferoldatok összetétele

[illegible]

A ninhidrinoldat készítéséhez szükséges 3,7 M nátrium-acetát puffer (pH=5,5) készítése során 2500 g kristályos nátrium-acetátot oldunk 3 dm³ desztillált vízben, hozzáadunk 445 cm³ ecetsavat, majd az oldatot desztillált vízzel 5 dm³-re egészítjük ki.

SPACKMAN, STEIN és MOORE szerint a ninhidrinoldat készítésénél a következőket kell szem előtt tartani. Az oldószerül használt metilcelloszolv (etilénglikol-monometil-éter) levegőn kisebb-nagyobb mértékben peroxidálódik, ezért ha nem frissen beszerzett metilcelloszolvvval dolgozunk, mindig meg kell győződni arról, hogy mennyi a metilcelloszolvunk peroxidtartalma.

Az analitikai tisztaságú ninhidrin minőségi ellenőrzését metilcelloszolvvval készült 1%-os oldata abszorpciójának mérésével, spektrofotométerrel, 1 cm-es küvettában végezzük. A jó minőségű ninhidrin extinkciós értékei 430 nm-en 0,280, 460 nm-en 0,040, 570 nm-en pedig 0,006.

Az aminosav-analizátor felépítése

A SPACKMAN, MOORE és STEIN által publikált első automatikus aminosav-analizátor legfontosabb részei az ioncserélő gyantaoszlop, a puffereket és a ninhidrint szállító szivattyú és a kompenzográf. A különféle pufferek pufferváltó szelepek segítségével a pufferszivattyú hatására a gyűjtőtömbbe kerülnek, majd a pufferpumpa a kromatografálóoszlopba nyomja azokat. A kromatografálóoszlopról távozó aminosavak oldata a keverőtömbben találkozik a ninhidrinszivattyú által a ninhidrintartályból szállított ninhidrinoldattal. A ninhidrin és az aminosavak keveréke a forró vízbe merülő csőkígyóba kerül, ebben a reaktorban a ninhidrin és az aminosavak között végbemegy a színreakció, amelynek intenzitását spektrofotométer segítségével mérjük és kromatogram formájában jelenítjük meg. A számszerű adatokat integrátorral vagy komputerrel kalkuláljuk.

A különféle cégek által gyártott analizátorok automatizáltsága és programlehetősége különböző, ez azonban nem csökkenti a meghatározás pontosságát. Az aminosavak ioncserés kromatográfiája terén járatos szakember egy jó puffer- és ninhidrinszivattyú, ioncserélő gyanta, kompenzográf, integrátor vagy komputer és egy jó szoftver birtokában már maga is elő tud állítani egy rutinfeladatokat ellátó automatikus aminosav-analizátort. A kereskedelemben kapható nagyszámú különböző típusú

analizátorról azért nehéz áttekintést adni, mert a nagyobb műszergyártó cégek különböző műszerezettségű készülékeket hoznak forgalomba.

Kromatografálás

Az elválasztandó aminosavakat olyan koncentrációban kell felvinni az ioncserélő oszlopra, hogy azokat az analizátor detektora lehetőség szerint az optimális mérési határokon belül mérje mind a hidrolizátumok, mind a szabad aminosavakat tartalmazó oldatok kromatografálása esetén. Az ioncserélő oszlopra adagolt **minta optimális pH-ja az aminosavak kötődése miatt pontosan 2,20**. A megfelelő koncentrációra beállított **hidrolizátumot legcélszerűbb -25°C alatti hőmérsékleten tárolni**, hisz a 4°C -on tárolt hidrolizátumokban már 24 óras tárolás után lizinveszteség mérhető. Ez a tény erősen korlátozza a többnapos kromatografáláshoz szükséges mintákat tartalmazó, drága mintaadagolók jelentőségét is. **Az automatikus mintaadagolás a standardizálás szempontjából viszont nagy jelentőségű**, hisz a hidrolizátum oszlopra adagolásának precizitása kihat a meghatározás végeredményére.

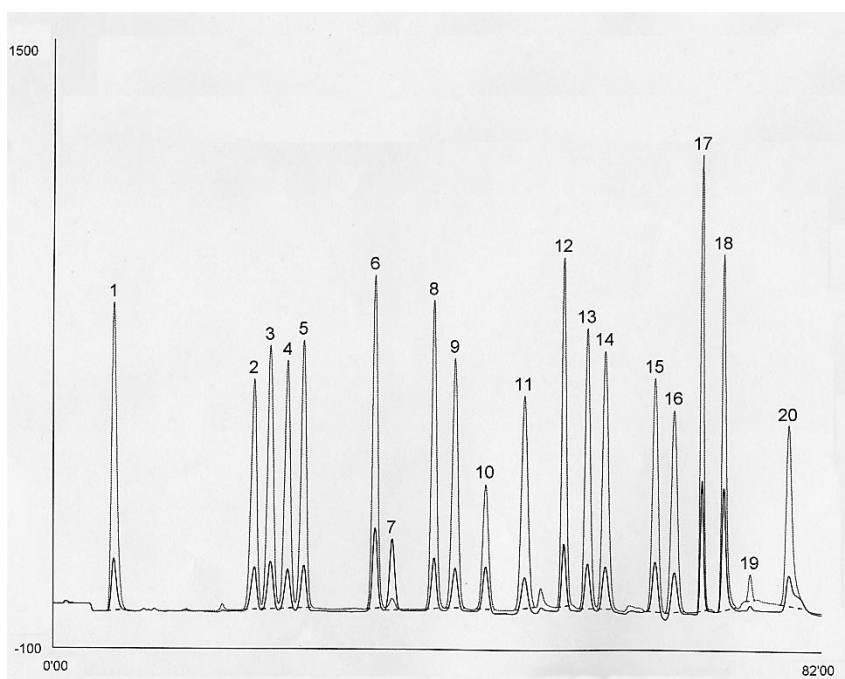
Az aminosavak kromatografálásának két módszere ismert:

- a kétoszlopos eljárás
- és az egy oszlopon végzett teljes kromatografálás.

A XX. század 50-es éveinek végén, 60-as éveiben, illetve a 70-es évek elején használták a kétoszlopos módszert, de a 60-as évek végétől egyre inkább áttértek az egyoszlopos eljárásra. Az elválasztás élessége nagymértékben függ az első eluáló puffer pontosságától. 3,25-ös pH-nál a ciszтин pontosan az alanin és a valin között középpont található a kromatogramon, nagyobb pH-jú pufferrel a ciszтин előbb, az alaninhoz közelebb, kisebb pH-jú pufferrel később, a valinsúcsához közel eluálódik. A ciszтин kromatogramon elfoglalt helyéből a puffer pH-jára lehet következtetni. A 77. ábra a fehérjealkotó aminosavak kromatogramját mutatja perhangyasavas oxidáció után. A kromatogram a jobb összehasonlítása miatt a kéntartalmú aminosavak oxidált és nem oxidált formáit is tartalmazza.

Az eluálás hőmérsékletének emelésével a kromatografáláshoz szükséges idő csökken, a hőmérséklet növelése azonban néha rontja a szelektivitást. Az eluáló puffer átfolyási

sebességének növelésével ugyancsak gyorsítani lehet az analízist. A pufferek átfolyási sebességét $60 \text{ cm}^3/\text{órától}$ $120 \text{ cm}^3/\text{óra}$ ra növelve az analízis idejét jelentős mértékben csökkenteni lehet, azonban az idő csökkentése növeli az analízis hibáját.



Amennyiben növeljük az eluáló puffer átfolyási sebességét, akkor ezzel arányosan csökkentjük a reaktorban, illetve a stabil hosszúságú coilban a folyadék átfolyási idejét. Amennyiben a puffer átfolyási sebességét $65 \text{ cm}^3/\text{órától}$ $80 \text{ cm}^3/\text{óra}$ ra növeljük, akkor a ninhidrinoldat adagolását $32,5 \text{ cm}^3$ -ről $40 \text{ cm}^3/\text{óra}$ ra kell növelni, aminek következtében a tefloncoilban a folyadék átfolyási ideje 15 percről 12,2 percre csökken. A ninhidrinreakció tökéletes lefolyásához szükséges optimális idő ilyen mérvű csökkentése kihat az analízis eredményére.

77. ábra A fehérjealkotó aminosavak kromatogramja perhangyasavas oxidáció után

A számokhoz tartozó aminosavak a következők: 1. ciszteinsav, 2. metionin-szulfon, 3. aszparaginsav, 4. treonin, 5. szerin, 6. glutaminsav, 7. prolin, 8. glicin, 9. alanin, 10. cisztin, 11. valin, 12. metionin, 13. izoleucin, 14. leucin, 15. tirozin, 16. fenilalanin, 17. hisztidin, 18. lizin, 19. ammónia, 20. arginin

A kromatogramok értékelése

Az ioncserélő oszlopról származó, aminosav-tartalmú oldat a ninhidrinnel a reaktor teflon csőspiráljában reagál, majd **a színes oldat a spektrofotométer átfolyóküvetáján halad át**, a spektrofotométer által érzékelt fényabszorpciót pedig a kompenzográf regisztrálja, amelynek eredménye a kromatogram. Az elkészült kromatogram csúcsainak nagysága, illetve **a csúcs alatti terület arányos az illető aminosav koncentrációjával**, belőlük tehát kiszámítható az aminosavak mennyisége. Az aminosavak mennyiségének értékelése során megállapítjuk az egyes csúcsok tényleges magasságát, kiszámítjuk a félmagassághoz tartozó csúcs szélességét, majd a csúcs magasságának és a csúcs félmagasságánál mért szélesség szorzásával számítjuk a csúcs alatti területet. Ezt követően az egyes csúcsok értékeinek megfelelő mennyiségeket a standard kromatogram megfelelő csúcsainak értékeihez viszonyítva kiszámoljuk az aminosav-mennyiségeket, általában mikromólban kifejezve, végül az aminosavakat az eredeti bemérésre vonatkoztatva, az eredeti minta aminosav-összetételét tömegszázalékban adjuk meg. Ha szükséges, az adatokat átszámoljuk fehérjére, illetve nitrogénre is megadjuk a vizsgált fehérje összetételét. Az adatokat

$$\frac{\text{g aminosav}}{100 \text{ g minta}} \text{ vagy } \frac{\text{g aminosav}}{16,0 \text{ g nitrogén}} \text{ egységben adjuk meg.} \quad (34)$$

Korábban, megbízható aminosav-standardok hiányában, **a különböző aminosavakra színkonstansokat számoltunk**, majd az ismert mennyiségben adagolt belső standard csúcsának értékét használtuk a tényleges mennyiségek kiszámítására. A ninhidrinoldat öregedésének, valamint a kromatografálás egyéb technikai feltételeinek (puffer-, ninhidrinoldat adagolása, a spektrofotométer lámpáinak öregedése, a kompenzográf működése) ellenőrzése céljából is célszerű a vizsgálati anyaggal együtt **belső standardot** adagolni az oszlopra, valamint időként teljes standard aminosav oldatot kromatografálni. Belső standard céljára az irodalomban számos javaslatot találni, amelyek közül a norleucin bizonyult legalkalmasabbnak, mert csúcsa a kromatogramon a nagyon stabilis leucin után jelenik meg, és jelenléte nem zavarja a többi aminosav elválasztását.

A belső standard alkalmazása azért rendkívül előnyös, mert az aminosav-analitikában a színreakciót legáltalánosabban a ninhidrin reagenssel hozzák létre, a ninhidrin pedig érzékeny a fényre, a levegő oxigéntartalmára és a felhasznált vegyszerek tisztaságára. Az aminosavakkal létrehozott szín intenzitása az előző okok

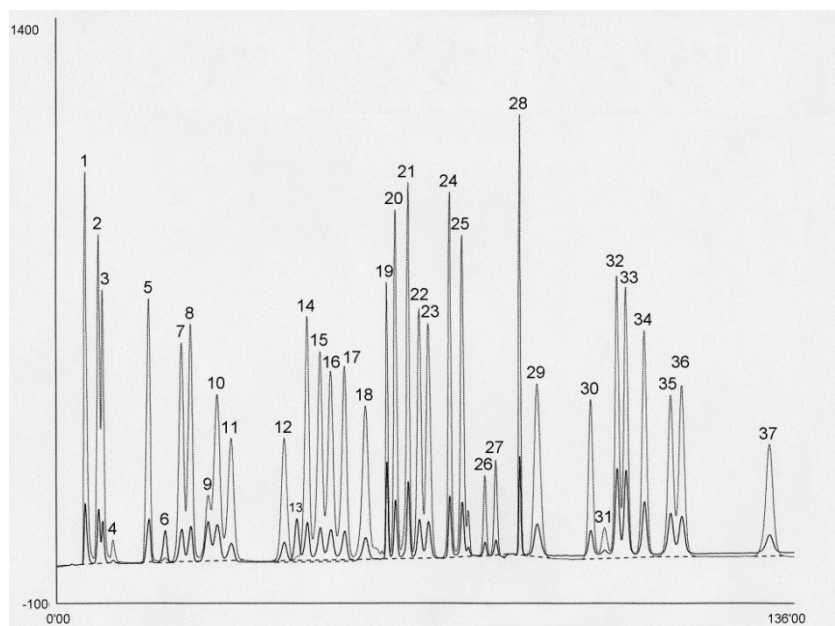
miatt csökken a ninhidrinoldat készítése óta eltelt idő függvényében. Ha nagyon pontosan akarjuk meghatározni egy minta aminosav-összetételét, akkor célszerű standardoldatot analizálni a minta előtt, és a minta után, a két standardból pontosan számíthatjuk mintánk tényleges aminosav-összetételét. A gyakori kalibrációs standard futtatástól el lehet tekinteni belső standard alkalmazásával, amely mint az összes aminosav vonatkoztatási alapja, a ninhidrinnel létrejött színreakció-változásokat követi, mivel az ismert koncentrációjú belső standard analízise együtt történik a többi aminosavval. A norleucin belső standardot azoknál az aminosav-analizátoroknál, illetve pufferrendszereknél, ahol az izoleucin-, leucin-, norleucin-elválás nem tökéletes, nem lehet alkalmazni, mert a norleucin az izoleucin után rosszul értékelhető ikercsúcsként jelenik meg a kromatogramon. Ezen elválasztási nehézségek miatt CSAPÓ és mtsai a **ciszteinsav belső standardként** való alkalmazására tettek kísérletet.

5.1.7.3. Speciális kromatografálási technikák

Fiziológiás oldatok szabadaminosav-tartalmának meghatározása. A fehérjehidrolizátumok kromatografálása már évtizedek óta a rutin eljárások közé tartozik, ezzel szemben a fiziológiás oldatok, szövetkivonatok, vér, tej kromatografálása szabad aminosav és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületek meghatározására **az előkészítő műveletek bonyolultsága miatt még ma is nehéz feladat** az analitikusok számára. A leggyakoribb probléma a zavaró anyagok eltávolítása, amelyek a legtöbb esetben kisebb-nagyobb molekulatömegű fehérjék, élelmiszerek analízisekor pedig esetenként nagy koncentrációban jelen lévő ásványi anyagok. A fehérjéktől különböző fehérjekicsapó szerekkel lehet megszabadulnunk, az ásványi anyagokat pedig csapadék formájában, dialízissel vagy ultraszűrővel lehet a mintából eltávolítani. Mind a fehérjék, mind az ásványi anyagok csapadék formában való eltávolításakor potenciális veszélyforrás, hogy a szabad aminosavak egy része adszorbeálódhat a csapadék felületén, ami ronthatja a meghatározás pontosságát.

A fehérjealkotó aminosavak mellett jelen lévő egyéb ninhidrin-pozitív csúcsok nehezé teszik a beazonosítást, és speciális probléma a savas és a hidrox-aminosavak mellett az aszparagin és a glutamin szelektív elválasztása.

A 78. ábra egy fiziológiás oldat szabad aminosavainak meghatározását mutatja lítium pufferek alkalmazásával.



78. ábra. Egy fiziológiás oldat szabad aminosavainak meghatározása lítium tartalmú pufferek alkalmazásával

A számokhoz tartozó aminosavak a következők: 1. ciszteinsav, 2. taurin, 3. foszfoserin, 4. karbamid, 5. aszparaginsav, 6. hidroxiprolin, 7. treonin, 8. szerin, 9. aszparagin, 10. glutaminsav, 11. glutamin, 12. α -amino adipinsav, 13. prolin, 14. glicin, 15. alanin, 16. citrullin, 17. α -amino vajsav, 18. valin, 19. cisztin, 20. metionin, 21. cisztation, 22. izoleucin, 23. leucin, 24. tirozin, 25. fenilalanin, 26. β -alanin, 27. β -amino-izovajsav, 28. γ -amino-vajsav, 29. klórfenilalanin (belső standard), 30. etanolamin, 31. ammónia, 32. ornitin, 33. lizin, 34. hisztidin, 35. 1-metil-hisztidin, 36. 3-metil-hisztidin, 37. arginin.

Amint a 78. ábra is mutatja a Li-pufferes eljárások alkalmazásával rendkívül jó elválasztást lehet elérni. A Na-pufferekről Li-pufferekre való átállást az alábbiak szerint kell végrehajtani. A Na-formában lévő gyantát 6 M salétromsavval mossuk, 0,3 M Li-hidroxiddal Li formába hozzuk, majd elvégezzük az ekvilibrálást az első Li-pufferrel. A minta oldására és oszlopra vitelére célszerű pH=2,20, 0,3 M Li-citrát puffert használni, az eluálás pH=2,80, 0,3 M Li-citrát pufferrel kezdődik 39°C-on, majd 70 perc múlva pH=4,10, 1,2 M Li-citrát pufferrel folytatódik 60°C-on. Ezzel a pufferrendszerrel az eluálás mintegy 450 percig tart, de ennek eredményeként mintegy

100 ninhidrin-pozitív vegyületet lehet azonosítani, illetve meghatározni. A 20. táblázat a növényi extraktumból, a plazmából, a vizeletből és egyéb fiziológiás anyagokból **nagyobb koncentrációban** kimutatható, a 21. táblázat pedig az **igen kis koncentrációban** előforduló aminosavakat, azok származékait és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületeket mutatja az ioncserélő oszlopról való elúció sorrendjében.

20. táblázat A növényi extraktumból, a plazmából, a vizeletből és egyéb fiziológiás anyagokból kimutatható, nagyobb koncentrációban előforduló aminosavak, azok származékai és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületek

- | | |
|-------------------------------|----------------------------|
| 1. Ciszteinsav | 20. Metionin |
| 2. Taurin | 21. Izoleucin |
| 3. Karbamid | 22. Leucin |
| 4. Hidroxi-prolin | 23. Fenilalanin |
| 5. Aszparaginsav | 24. β -amino-vajsav |
| 6. Treonin | 25. Etanol-amin |
| 7. Szerin | 26. γ -amino-vajsav |
| 8. Glutamin | 27. Ammónia |
| 9. Szarkozin | 28. Hidroxi-lizin |
| 10. Glutaminsav | 29. Allo-hidroxi-lizin |
| 11. Prolin | 30. Ornitin |
| 12. Citrullin | 31. Lizin |
| 13. Glicin | 32. 1-metil-hisztidin |
| 14. Alanin | 33. Anszerin |
| 15. α -amino-izovajsav | 34. Hisztidin |
| 16. Glükózamin | 35. 3-metil-hisztidin |
| 17. Valin | 36. Karnozin |
| 18. Homocitrullin | 37. Triptofán |
| 19. Cisztin | 38. Arginin |

21. táblázat A növényi extraktumból, a plazmából, és egyéb fiziológiás anyagokból kimutatható ritka aminosavak, azok származékai és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületek

1.	Penicillaminsav	25.	Etionin-szulfon
2.	O-foszfo-4-hidroxi-prolin	26.	Aszparagin
3.	O-foszfo-szerin	27.	2-amino-3-ureido-propionsav
4.	O-foszfo-treonin	28.	α -metil-szerin
5.	Homociszteinsav	29.	Muraminsav
6.	Cisztein-szulfinsav	30.	Homoszerin
7.	Gliceril-foszforil-amino-etanol	31.	Glutation- δ -metilészter
8.	Glükózamin-6-foszfát	32.	Glutation- δ -etilészter
9.	O-foszfo-etanol-amin	33.	α -metil-glutaminsav
10.	Levulinsav	34.	Izolvaltín
11.	Treo- β -hidroxi-aszparaginsav	35.	S-metil-cisztein
12.	Eritro- β -hidroxi-aszparaginsav	36.	Fenilín
13.	3-hidroxi-prolin	37.	Fenilinsav
14.	Glükózaminsav	38.	Penicillin-amin
15.	O-foszfo-hidroxi-lizin	39.	β -2-tienil-szerin
16.	Metionin-szulfoxid	40.	2-amino-adipinsav
17.	Etionin-szulfoxid	41.	Alanil-aszparagin
18.	Metionin-szulfon	42.	Mezo-lantionin
19.	β -metil-aszparaginsav	43.	Form-imino-glicin
20.	Allo-3-hidroxi-prolin	44.	Glicil-aszparagin
21.	Allo-4-hidroxi-prolin	45.	S-etil-cisztein
22.	Tioprolin	46.	Glutation
23.	2-tio-hisztidin	47.	Mezo-lantionin
24.	Allo-treonin	48.	Glicil-szerin

21. táblázat folyt.

49.	Izoszerin	75.	Allo-izoleucin
50.	Allil-glicin	76.	Glicil-glicil-glicin
51.	α -amino-n-vajsav	77.	Glicil-alanin
52.	Treo- β -fenil-szerin	78.	Metionin-szulfoximin
53.	Glutamil-glutaminsav	79.	α,ϵ -diamino-pimelinsav
54.	Izovalin	80.	2-metil-leucin
55.	Mannózamin	81.	Etionin
56.	Galaktózamin	82.	Norleucin
57.	Pipekolinsav	83.	3,4-dihidroxi-fenilalanin (DOPA)
58.	Glicil-glicil-glicil-glicin	84.	β -2-tienil-alanin
59.	Mezo-cisztin	85.	α -hidroxi- δ -amino-valeriánsav
60.	Glutaminsav-hidrazid	86.	Aminociklopentán-karboxilsav
61.	α -amino-pimelinsav	87.	Alanil-valin
62.	Glicil-szarkozin	88.	meta-tirozin
63.	Alanil-glicil-glicerin	89.	α -amino- β -hidroxi-vajsav
64.	Alanil-alanin	90.	Glicil-valin
65.	3,5-dinitro-tirozin	91.	orto-fluoro-fenilalanin
66.	α -metil-metionin	92.	meta-fluoro-fenilalanin
67.	Fenil-glicin	93.	Izoglutamin
68.	Alanil-anhidrid	94.	Alanil-metionin
69.	Djenkolinsav	95.	orto-tirozin
70.	α -amino-n-valeriánsav	96.	Leucil-glicin
71.	Norvalin	97.	Leucil-glicil-glicin
72.	Glicil-glicin	98.	para-fluoro-fenilalanin
73.	Cisztation	99.	Alanil-norvalin
74.	α -fenil- α -alanin	100.	Glicil-norvalin

21. táblázat folyt.

101.	Alanil-leucin	125.	Kineurenin
102.	Glicil-etionin	126.	Fenilalanil-glicin
103.	δ -amino-levulinsav-metilészter	127.	β -fenil- β -alanin
104.	Homocisztin	128.	3-amino-tirozin
105.	Glicil-leucin	129.	6-hidroxi-triptofán
106.	Arginin-szukcinát	130.	δ -amino-levulinsav
107.	Alanil-norleucin	131.	Leucil-tirozin
108.	Glicil-norleucin	132.	Glicil-dehidro-fenilalanin
109.	Alaninol (2-amino-1-propanol)	133.	4-amino-fenil-glicin
110.	Glicin-amid	134.	Homokarnozin
111.	Glicil-metionin	135.	4-hidroxi-triptofán
112.	β -amino-n-vajsav	136.	3-jódtirozin
113.	Glicil-tirozin	137.	Kanavanin
114.	Glikamin (metil-amin)	138.	2-amino-3-guanidino-propionsav
115.	α -amino-kaprilsav	139.	ε -amino-n-kaprionsav
116.	Glicil-fenilalanin	140.	2-amino-4-guanidino-vajsav
117.	Alanil-fenilalanin	141.	3,5-dibróm-tirozin
118.	2,4-diamino-vajsav	142.	Leucin-amid
119.	Alamin (etil-amin)	143.	Homocisztein-tiolakton
120.	δ -amino-n-valeriánsav	144.	3,5-dijód-tirozin
121.	2,3-diamino-propionsav	145.	5-metil-triptofán
122.	α -amino- δ -fenil-vajsav	146.	Glicil-triptofán
123.	2-amino-vajsav	147.	Homoarginin
124.	5-hidroxi-triptofán		

5.1.7.4. Rövidített meghatározások néhány aminosav elemzésére

Az elemzések egy részében nincs szükségünk az összes aminosav meghatározására, hisz pár aminosavon kívül más nem érdekel bennünket. Anyag-, idő- és energiatakarékosság miatt olyan módosított, **gyors programokat dolgoztak ki**, melyekkel a teljes aminosav-meghatározás helyett csupán a minta egy-egy, számunkra fontos aminosavát határozzuk meg. A kívánt feladatot az ioncserélő gyantaoszlop méretének, a pufferek ionkoncentrációjának és pH-jának, valamint a kromatografálás hőmérsékletének megfelelő megváltoztatásával lehet elérni. A gyors módszerek közül legismertebbek a fenilketonuria, valamint a hipervalinémia és a leucinózis diagnosztizálására kidolgozott gyors eljárások, az élelmiszer-, a fehérje- és növénynevelési kutatásban pedig nagy jelentőséggel bírnak a metionin és a lizin együttes gyors meghatározására, valamint nagyszámú minta lizin- és cisztintartalmának gyors meghatározására kidolgozott eljárások.

5.1.7.4.1. Gyors módszer a metionin és a lizin meghatározására

Az élelmiszerfehérje-kutatásban, továbbá a növénynevelésben óriási jelentősége volt a **metionin és a lizin gyors meghatározásának**. A különféle gyors eluálási lehetőségek közül DÉVÉNYI és munkatársai módszere terjedt el leginkább, amellyel rövid idő alatt nagyszámú minta tesztelhető metioninra, illetve lizinre. Az általuk kidolgozott módszer bármilyen, két programváltást lehetővé tevő aminosav-analizátorral végrehajtható. A meghatározás során 14 cm-es gyantaoszlopot alkalmaztak, az eluáló pufferek pedig a következők voltak:

- 0,2 M nátrium-citrát puffer, pH=3,28, 0–25 percig,
- 0,8 M nátrium-citrát puffer, pH=4,25, 25–62 percig,
- 0,2 M nátrium-hidroxid 62–65 percig,
- 0,2 M nátrium-citrát puffer, pH=3,28, 65–75 percig.

Különös jelentőségű ez a program a mezőgazdasági kutatómunkában, a növénynevelésben és az élelmiszerek minősítésében, hisz segítségével nagyszámú minta rövid idő alatt tesztelhető a két legfontosabb esszenciális aminosavra.

Nagyszámú minta lizintartalmának gyors meghatározására VILLEGAS és munkatársai közölték módszert. Módszerükkel egy nap alatt mintegy 36 db minta lizintartalmát tudták meghatározni.

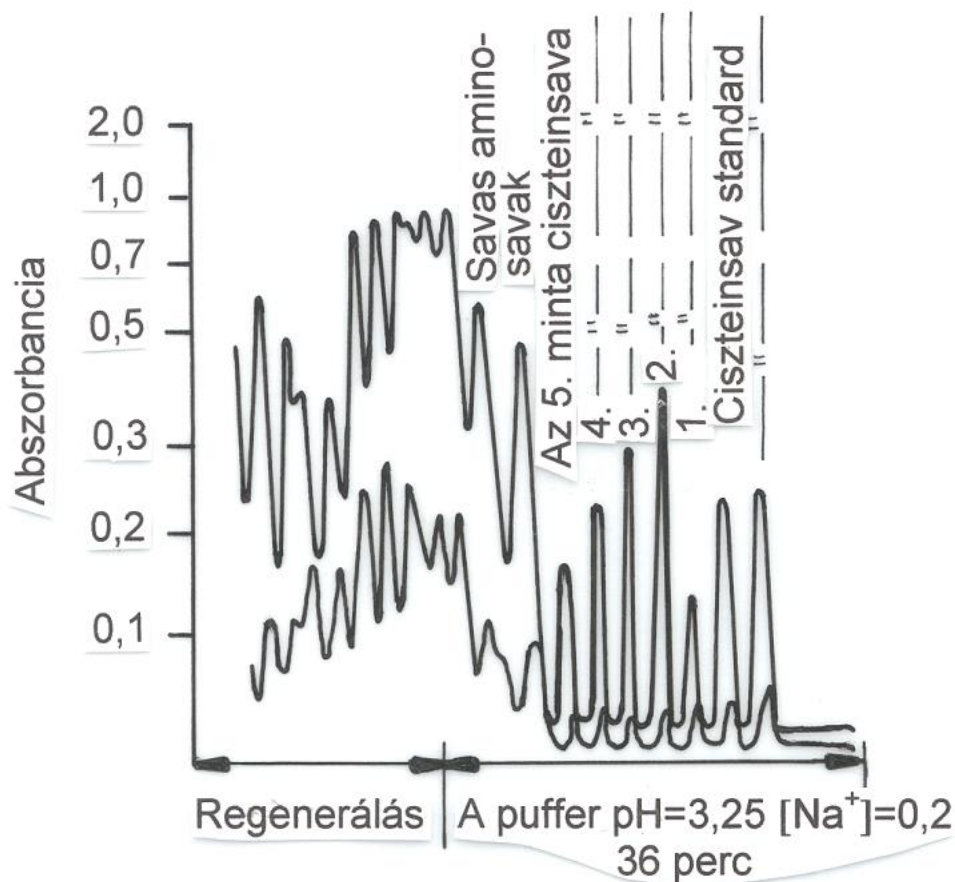
5.1.7.4.2. Gyors módszer a cisztin meghatározására

Kis fehérje- és cisztintartalmú anyagoknál a meghatározás metodikai nehézségein kívül azzal is számolni kell, hogy a cisztintartalom a fehérjehidrolízis során végbemenő bomlás és oxidáció miatt lényegesen kisebb lesz a valóságosnál. Mivel a metionin oxidációja és elbomlása a hidrolízis során a cisztinhez viszonyítva nem számottevő, ezért **csak a cisztin meghatározására** CSAPO és munkatársai **egy gyors és termelékeny módszert dolgoztak ki**, amely a cisztinmeghatározás pontosságát a többi aminosavéval azonos szintre emeli, a módszer termelékenysége pedig 10–15-szöröse a hagyományos módon végzett meghatározásnak. A 79. ábra tipikus kromatogramot mutat a cisztintartalom gyors meghatározására, perhangyasavas oxidációt követően.

CSAPO és munkatársai a cisztintartalom meghatározásánál alkalmazott gyorsított betáplálást alkalmazták **szintetikus aminosav-kiegészítők metionin-, illetve lizintartalmának meghatározására** is.

5.1.7.5. A triptofántartalom meghatározása

A triptofán tisztán sósavval kezelve 105°C-on, 22 óra alatt, 40–60%-ban, szénhidrátok jelenlétében pedig teljesen elbomlik. A triptofán nemcsak a levegőben oldott oxigén, hanem szénhidrátok, szerin, cisztin, piroszölősav, cink és még sok más anyag jelenlétében is huminná bomlik le. Aldehid hatására a triptofánból 2-acil-származékon keresztül dihidro- β -karbolin, majd β -karbolin keletkezhet. Megállapították, hogy a triptofán triptaminná és indol-3-piroszölősavvá alakulhat, e két vegyületből pedig kondenzációval (indolil-metil)tetrahydro- β -karbolin keletkezhet.



79. ábra Cisztintartalom meghatározása perhangyasavas oxidációval és gyorsított betáplálással

5.1.7.5.1. Fehérjehidrolízis módszerek a triptofántartalom meghatározására

Triptofántartalom-meghatározás savas hidrolízissel

A triptofán savas hidrolízisével elsőként FREEDLENDER és HABER foglalkozott, akik a triptofán bomlásának kiküszöbölésére a **6 M HCl-hoz 0,5% 1,4-bután-ditiolt adtak**, aminek következtében a triptofánt 80%-nál nagyobb kitermeléssel kapták vissza. MATSUBARA és SASAKI **2–4% tioglikolsavat adott a 4 M HCl-hoz**, és ezt követően vákuumban végzett hidrolízissel a triptofán 82–86%-át kapták vissza szénhidrát távollétében. JAMES a **6 M HCl-hoz** felváltva **tioglikolsavat, merkaptó-propionsavat,**

merkaptó-szukkínsavat és oxálsavat adagolva tudta a triptofán bomlását, illetve a huminképződést meggátolni. A hidrolizátumhoz hozzáadott glükóz jelenlétében a tioglikolsav védő hatása a triptofánra hatástalannak bizonyult. GRUEN és NICHOLS a **3-(3-indolil)-propionsav kis mennyiségét adva a 6 M sósavhoz**, a triptofán bomlását részben meg tudta akadályozni a hidrolízis folyamán. LIU és CHANG **0,2% 3-(2-amino-etil)-indol (triptamin) tartalmú 3 M para-toluol-szulfonsavval hidrolizálta a fehérjét** vákuumban, 110°C-on, 22, 48 és 72 óráig. A szulfonsavat nátrium-hidroxiddal közömbösítették, majd a minta aliquot részét bepárlás nélkül, a megfelelő hígítás után kromatografálták. Szénhidrátok távollétében a különböző idejű hidrolízisek eredményeit nulla időre extrapolálva, a triptofánt 90%-nál jobb hatásfokkal kapták vissza.

LIU a továbbiakban a para-toluol-szulfonsav helyett **4 M metán-szulfonsavval hidrolizálta a fehérjét** 115°C-on. Szénhidrát távollétében végzett hidrolízis után a triptofánt 90%-nál nagyobb mértékben kapta vissza. PENKE és munkatársai a fehérje triptofántartalmának meghatározására a **3 M merkaptó-etán-szulfonsavval hidrolizálták a vizsgálati anyagot**. A fehérje triptofántartalmát 110°C-on végzett 22 órás hidrolízis után öt analízis átlagában 95,4%-ban kapták vissza, bár a szerzők módszerüket nem alkalmazták nagy szénhidráttartalmú minták triptofántartalmának meghatározására. A módszer igen nagy előnye, hogy a redukáló közeg miatt az oxidációra hajlamos aminosavak (pl. metionin) nagyobb kitermelést adnak a 6 M sósavval végzett hidrolízishez képest.

CSAPÓ és munkatársai is **3 M merkaptó-etán-szulfonsavval, de magas hőmérsékleten (160, 170, 180°C) és rövid ideig (30–60 perc) hidrolizálták a fehérjét**, amelynek során a triptofán kitermelése az összes savas módszerrel összehasonlítva a legmagasabb, és ugyanez elmondható volt a metionintartalomra is. Ez az egyetlen módszer a triptofán racemizációjának tanulmányozására is, hisz lúgos körülmények között végzett hidrolízisnél a triptofán racemizációja teljes mértékben végbemegy.

A felsorolt eljárások egyrészt a fehérjehidrolízis közben fellépő aminosav-destrukciót kívánták csökkenteni, másrészt a triptofántartalom meghatározását kívánták megoldani. A közölt eredményeket csak a leírt metodikai feltételek igen pontos betartásával (hőmérséklet, vákuum, oxigén hiánya, időtartam, nulla időre való extrapolálás) és a megadott körülmények között (szénhidrát távolléte) lehet elérni. Ezért LIU szerint csakis **alkalikus hidrolízissel lehet a triptofántartalmat kvantitatíve meghatározni**.

Triptofántartalom meghatározása lúgos hidrolízissel

Amint az előzőekből is kitűnik, **a fehérjék savas hidrolízise alatt a triptofántartalom**, különösen szénhidrátok jelenlétében, **teljes mértékben elbomlik**. A triptofán szabad és kötött formában is egészen labilis a fém-, a hidrogén- és hidroxidionok jelenlétében. A bomlási folyamatok magasabb hőmérsékleten különösen felgyorsulnak, ezért a triptofánt, annak ellenére, hogy az élelmiszerek nagy részét kitevő gabonamagvak második limitáló aminosava és táplálkozási szempontból igen fontos lenne mennyiségének ismerete, a többi aminosavval együtt, a hagyományos kromatográfias módszerekkel rendszerint nem lehet meghatározni.

A szakirodalomban a fehérjék lúgos hidrolízisére számos változat található. **A fehérjék bárium-hidroxidos hidrolízisét** először HOMER alkalmazta a triptofántartalom meghatározására. JORPES **5 M NaOH-dal hidrolizálta a fehérjét**, és a triptofánt 78–98%-ban kapta vissza. A MILLER által kidolgozott hidrolízismódszer során **a báriumot bárium-szulfát alakban távolítják el az oldatból**, aminek során a csapadék triptofánadszorpciója minimális, és ezzel a módszerrel a gabonafélék és élelmiszerek triptofántartalmát igen nagy biztonsággal meg tudták határozni.

DÉVÉNYI és munkatársai is **4 M nátrium-hidroxiddal hidrolizálták a fehérjét**, majd a sósavval való közömbösítés után a hidrolizátumot közvetlenül kromatografálták. Az eljárás során 5 mg peptidet, fehérjét, illetve ennek megfelelő vizsgálati anyagot 2 cm³ 4 M NaOH-dal oldottak, nitrogént buborékolattak keresztül a rendszeren, majd a fehérjét öt órán át 105°C-on hidrolizálták.

A publikációkból világosan látszik, hogy **a lúgos hidrolízis optimális idejét nem lehet minden fehérjére vagy élelmiszerre egységesen megszabni**, ezért a meghatározás során legalább kétféle ideig célszerű a fehérjét hidrolizálni.

OELSHLEGEL és munkatársai szintén bázikus hidrolízist alkalmaztak a fehérje triptofántartalmának meghatározására, azonban a módszert túlzottan időigényesnek találták. **A lúgos hidrolízis körülményeit** nagyon alaposan tanulmányozták NOLTMANN és munkatársai. A fehérjék bárium-hidroxidos hidrolízisére vonatkozó követelményeket az alábbiak szerint összegezték:

- 10 mg fehérjéhez 1,26 g $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ -t és 1,45 cm³ vizet mérnek száraz vizsgálati minta esetén.
- A hidrolízishez olyan eszközöket kell használni, amelyekből nem keletkezhet a hidrolízis folyamán bárium-szilikát, vagy nem oldódhat ki olyan anyag, amely a triptofán bomlását meggyorsítaná.
- A hidrolízist 110°C-on 16 és 48 órán át célszerű végezni.

Áttekintve a rendelkezésre álló szakirodalmat úgy tűnik, hogy **a triptofántartalom meghatározásakor a legcélravezetőbbnek a bárium-hidroxidos hidrolízis látszik**, hisz itt a hidrolízis viszonylag gyorsan lejátszódik, és a báriumot a nátriumnál lényegesen könnyebben el lehet távolítani. Úgy tűnik, hogy a bárium szulfát-alakban való eltávolítása célravezetőbb, hisz a bárium nátrium-szulfáttal való kicsapása semleges oldatból nem okoz triptofánadszorpciót.

5.1.7.5.2. Triptofántartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

A bárium-hidroxiddal, esetleg a 4 M nátrium-hidroxiddal végzett fehérjehidrolízist követően a 2 cm³ hidrolizátumhoz DÉVÉNYI előírásai szerint hozzáadunk 3 cm³ 0,2 M nátrium-citrát (pH=3,28) puffert és 1 cm³ 37%-os HCl-at. A hidrolizátum aliquotját megfelelő hígítás után vagy hígítás nélkül közvetlenül az aminosav-analizátor ioncserélő oszlopára visszük. Az oszlop kalibrálására a fentiek alapján kezelt triptofán-törzsoldatot használjuk. A meghatározás során a következő körülményeket alkalmazzuk:

- Gyantatöltet magassága: 14 cm.
- Puffer: 1,5 M nátrium-citrát, pH=6,0.
- Pufferátfolyási sebesség 100 cm³/óra.
- Ninhidrin átfolyási sebesség 50 cm³/óra.

Az alkalmazott feltételek szerint az arginin a 16. perc elteltével jelenik meg a kromatogramon, ezt követően az arginintől és a többi aminosavtól jól elválóan

megjelenik a triptofán, majd 24 perc alatt a meghatározás befejeződik. Tekintettel az eluáló puffer magas nátriumion-koncentrációjára és pH-jára, regenerálás és ekvilibrálás nem szükséges, ezért a triptofáncsúcs megjelenését követően az analízis további mintákkal folytatható.

5.1.7.5.3. Triptofántartalom meghatározása spektrofotometriával

A szabad vagy peptidkötésben lévő triptofán több vegyülettel színes terméket képez, így például a **para-toluol-szulfonsavval**, a **para-dimetil-amino-benzaldehiddel** és az **N-bróm-szukcinimiddel** lejátszódó reakciók képezik a triptofán fotometriás meghatározásának az alapját, amelynek során a kvantitatív meghatározásnál kapott színt hasonlítják a jól ismert koncentrációjú standard színéhez, ami rendszerint szabad triptofánból áll.

A fotometriás módszerek közül a n-bróm-szukcinimides meghatározás nem terjedt el a gyakorlatban, és ugyanez elmondható a jégecet-vas(III)-klorid reagenssel létrehozott színreakcióra is. Ez utóbbi esetében a keletkezett vörös színű oldatot 545 nm-en fotometráva gabonamagvak triptofántartalmát határozták meg. A **para-dimetil-amino-benzaldehides módszert** viszont **többen alkalmazták** mind a hidrolizálatlan fehérje, mind a hidrolizátum triptofántartalmának meghatározására. A reagens és a triptofán közötti kék színreakciót gabonafélék, valamint hús és húskészítmények triptofántartalmának meghatározására alkalmazták. A módszer egészen jól alkalmazható magas triptofántartalom esetében, gabonaféléknél azonban korlátozottan használható, mert a gabonafélék igen lassan oldódnak a kénsavban, és a kapott zavaros oldat hibás értékeket ad a triptofánra.

Érdekes módszert közöl a triptofán fotometriás meghatározására BASHA és ROBERTS, akik a triptofánt nátrium-nitrittel oxidálták, majd **az oxidált terméket N-1(naftil)-etilén-diamino-dihidro-kloriddal reagáltatták**, majd a kapott bíbor-rózsaszín anyagot 550 nm-en fotometrálták. A fényabszorpciót nem zavarják a szénhidrátok, az aminosavak, a sók és számos olyan komponens, ami a hidrolizátumban előfordul. A reakciót számos indolszármazék, mint amilyen például az indol-3-ecetsav, is adja. A peptidkötésben lévő triptofán kevésbé reaktív, mint a szabad állapotban lévő, ezért a fehérjét a színreakció előtt mindenképpen hidrolizálni kell. A fehérje triptofánjának **indolcsoportja az ultraibolya tartományban fényelnyelést mutat**, ami ugyancsak

felhasználható mennyiségének meghatározására. Oldható fehérjék esetében az UV-abszorpciót 280–288 nm-en mérik.

5.1.7.5.4. A kéntartalmú aminosavak mennyiségének meghatározása

A kéntartalmú aminosavak meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával. A fehérje szerkezetének kialakításában igen fontos szerepet töltenek be a kéntartalmú aminosavak: a cisztin, a cisztein és a metionin. **A cisztin és a cisztein a fehérje hidrolízise során,** különösen szénhidrátok jelenlétében bomlik, **oxigén jelenlétében pedig elsősorban cisztein-szulfinsavvá és ciszteinsavvá oxidálódik.** A kéntartalmú aminosavak hidrolízis közbeni bomlására már a XX. század 30-as 40-es éveiben rámutattak, sőt rájöttek arra is, hogy a ciszteinből a hidrolízis során alanin és szerin, szénhidrátok jelenlétében pedig glicin képződhet. **A metionin nyomnyi oxigén jelenlétében metionin-szulfoxiddá alakul, de lebomolhat homociszteinné, homocisztinné és glicinné is.** A cisztein elbomlását segíti a jelen lévő szabad triptofán is, hisz a triptofán cisztein jelenlétében huminná bomlik le.

A cisztin diszulfidhidakkal köti össze a peptidláncokat, amelyek redukcióval, oxidációval és hidrolízissel bonthatók meg. A hidrolízis a cisztin különféle, nehezen azonosítható átalakulásaihoz vezet, redukcióval pedig egy molekula cisztinből két molekula cisztein keletkezik. Erőteljes **oxidáció hatására egy molekula cisztinből két molekula ciszteinsav keletkezik,** miközben a molekulában lévő **metionin metionin-szulfoxiddá, majd metionin-szulfonná alakul át.** A cisztein elbomolhat a hidrolizátum feldolgozása és beszárítása közben, és többen beszámolnak növényi eredetű élelmiszerek savas hidrolízise alatt lejátszódó metioninvesztéséről is. Többen közölnek módszereket merkapto-etanol vagy tioglikolsav használatáról a savas hidrolízis során a kéntartalmú aminosavak oxidációjának megelőzésére.

Mivel igen sokan bizonyították a cisztin és a metionin hidrolízis alatti oxidációját, és mert a két aminosav végső oxidációs származéka, a metionin-szulfon és ciszteinsav igen stabil vegyület, magától adódott a lehetőség a két kéntartalmú aminosav oxidált formában való meghatározására. Az oxidációhoz olyan oxidálószer kellett választani, amely a kéntartalmú aminosavakat teljes mértékben átalakítja, de az összes többi aminosavat nem károsítja. 1942-ben alkalmazták először a perhangyasavat kéntartalmú aminosavak oxidációjára, és ekkor tanulmányozták először a perhangyasavas oxidáció

reakciókörülményeit is. SCHRAMM és munkatársai javaslatára terjedt el széleskörűen a perhangyasav a kéntartalmú aminosavak oxidációjára az aminosav-analitikában. HIRS 1956-ban a *ribonukleáz* aminosav-összetételének meghatározásánál **a kéntartalmú aminosavakat nagy pontossággal meg tudta határozni a perhangyasavas oxidációt követően metionin-szulfon, illetve ciszteinsav alakban.** A kéntartalmú aminosavak meghatározásának módszerét végül MOORE és STEIN tökéletesítette és tette rutinszerűen alkalmazhatóvá. A módszer kritikus pontja – amennyiben nemcsak a kéntartalmú aminosavakat, hanem az összes aminosavat is az oxidált mintából kívánjuk meghatározni – a **túloxidáció** és annak **megakadályozása.** A túloxidáció megakadályozására először a hidrogén-bromid alkalmazását javasolták, majd az oxidáció leállítására kipróbálták a nátrium-szulfitot is. Az első módszer a cisztinre jól reprodukálható, a metioninra viszont reprodukálhatatlan eredményeket adott. A második módszernél olyan treonin- és szerinszármazékok keletkeztek, amelyek a ciszteinsav helyén megjelenve akadályozták annak kiértékelését. Ezt a problémát később úgy oldották meg, hogy a nátrium-piroszulfitot használták a perhangyasav eltávolítására.

CSAPÓ és munkatársai **3 M merkapto-etán-szulfonsavval 125°C-on, 24 órán át és magas hőmérsékleten (160, 170, 180°C), rövid ideig (30–60 perc) hidrolizálták a fehérjét,** ezután a redukáló közegnek megfelelően az összes hidrolízismódszer közül a legnagyobb kitermelést kapták a metioninra (illetve a triptofánra). Cisztint ezzel a módszerrel nem tudtak meghatározni, mert **a cisztin ciszteinné redukálódva a prolinnal együtt eluált** a normál, ioncserés oszlopkromatográfiás aminosav-analízis körülményei között. Ajánlanak ugyan speciális puffereket a cisztein és a prolin elválasztására, de így a módszer nehézkessé válik, és nem javasolható a ciszt(e)intartalom meghatározására annak ellenére, hogy a metioninra az összes hidrolízismódszer közül a legjobbnak bizonyult.

A kéntartalmú aminosavak meghatározására végzett vizsgálatokat összegezve kitűnik, hogy mind a cisztin, mind a metionin hajlamos a hidrolízis közbeni bomlásra, más vegyületekké való átalakulásra, és ez az átalakulás szénhidrátok jelenlétében még fokozottabban jelentkezik. A vizsgálatok szerint **a cisztin sokkal hajlamosabb a nyomnyi mennyiségben jelen lévő oxigénnel való reakcióra, mint a metionin.** Növényi és állati eredetű fehérjék aminosav-összetételének meghatározásánál arra az eredményre jutottak, hogy ha a hidrolízist vákuumban vagy a 6 M HCl megfelelő nitrogénezetése után végzik, akkor a minták metionintartalma nem különbözik

lényegesen attól függően, hogy metionin vagy metionin-szulfon alakban történik-e a meghatározás. Ezzel szemben mind a növényi, mind az állati eredetű fehérjék aminosav-összetételének meghatározásánál azt állapították meg, hogy az oxidált mintákból a cisztin, ciszteinsav alakban meghatározva, mintegy 40–45%-kal többnek adódik a nem oxidált, cisztin formában meghatározotthoz képest. Nem sokkal jobb a helyzet akkor sem, ha a hidrolizáló ágenshez redukálóanyag hozzáadásával kívánjuk megakadályozni a két kéntartalmú aminosav oxidációját, vagy ha redukálószer alkalmazunk hidrolizáló ágensként (merkaptó-etán-szulfonsav). Ekkor ugyanis a cisztin már nyomnyi redukálóanyag jelenlétében részben vagy teljesen ciszteinné alakul, és ha a hidrolízis végén, vagy a hidrolizátum oszlopra juttatása előtt nem történik meg a cisztein visszaoxidálása cisztinné, akkor egyrészt csökken a cisztinkitermelés, másrészt a keletkezett cisztein – különösen magas cisztintartalmú minták esetében – meghamisíthatja a prolin mérési eredményeit, mert a cisztein a prolin helyén jelenik meg a kromatogramon. Nagyobb mennyiségű redukálószer hozzáadása esetén vagy ha a minta tartalmaz redukálóanyagot, vagy ha a hidrolizáló ágens tartalmaz redukáló csoportot, mint például a merkaptó-etán-szulfonsavas hidrolízis esetén, a minta cisztintartalma kvantitatíve átalakul ciszteinné. Ennek visszaoxidálása cisztinné megkívánja a redukálószer eltávolítását, manipulációs veszteséget okozhat, és nehéz az oxidációt úgy végrehajtani, hogy az megálljon a cisztinnél, és ne oxidálja a metionint, valamint a jelen lévő cisztint. Különböző szerzőknek cisztintartalomra végzett összehasonlító vizsgálataiból kiderül, hogy a ciszteinsav formában való meghatározás mintegy 10–15%-kal nagyobb értéket ad a cisztintartalomra, mint a cisztin alakban való meghatározás levegővel való visszaoxidálás után vagy S-karboximetil-cisztein alakban meghatározva. A módszereket illetően tehát **a kéntartalmú aminosavakra a legegyszerűbben kivitelezhetőnek és talán legpontosabbnak a perhangyasavas oxidációt követő ciszteinsav, illetve metionin-szulfon alakban való meghatározás mondható.**

5.1.8. Az aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia elterjedése az 1960-as évek végén, a 70-es évek elején kezdődött. A módszer kidolgozása során megfelelő pumpával megvalósították a kolonnán nagy nyomáson való folyadékáramlást, a kolonnán kilépő

komponensek detektálására pedig **rendkívül érzékeny detektorokat fejlesztettek ki**. Ezek segítségével a módszer alkalmassá vált a fehérjealkotó aminosavak szétválasztására és mennyiségi meghatározására. A kidolgozott módszerek többsége **fordított fázisú kromatográfiát** alkalmaz, amelynek során a mozgó fázis polaritása nagyobb, mint az álló fázisé. A fordított fázisú kromatográfiában álló fázisként általában egy hidrofób, oktadecil- (C18) vagy oktil- (C8) csoportokkal borított töltetet és poláris mozgó fázist használnak.

5.1.8.1. Származékképzés

Az aminosavak HPLC-s meghatározása során több módszert dolgoztak ki, amelyek közös vonása, hogy a **meghatározást általában származékképzési lépés előzi meg**, ami egyrészt javítja az aminosavak szeparációját, másrészt alkalmassá teszi az aminosav-származékokat az ultraibolya vagy fluoreszcens detektorral való meghatározásra. (Köztudott, hogy az aminosavak közül csak a triptofán, a tirozin és a fenilalanin mutat ultraibolya-abszorpciót.) A szakirodalomban számos származékképző reagenst közöltek, amelyek közül leggyakrabban az alábbiakat alkalmazzák: OPA (o-ftálaldehid), FMOc (9-flourenil-metil-klór-hangyasav-észter), DABS-Cl (4-dimetil-amino-azo-benzol-4'-szulfonil-klorid; Dabzil-klorid), DNS-Cl (1-dimetil-amino-naftalin-5-szulfonil-klorid; Danzil-klorid), DNFB (2,4-dinitro-fluor-benzol), PITC (fenil-izo-tiocianát).

Az aminosav-meghatározásokat általában gradiens elúcióval végzik, egyszerűbb problémák megoldására azonban az izokratikus elúció is alkalmazható. Az aminosavak HPLC-vel való meghatározására az alábbi **oszlop előtti származékképző reagensnek** terjedtek el a gyakorlatban, melyeknek a az alábbi követelményeknek kell megfelelni:

- Egyszerű reakciókörülmények között kvantitatív reakció.
- Kvantitatív reakció az összes fehérjeépítő aminosavval, beleértve az iminosavakat is.
- Stabil reakciótermékek.
- A származékok nagy fluoreszcenciás aktivitása vagy UV-abszorpciója.

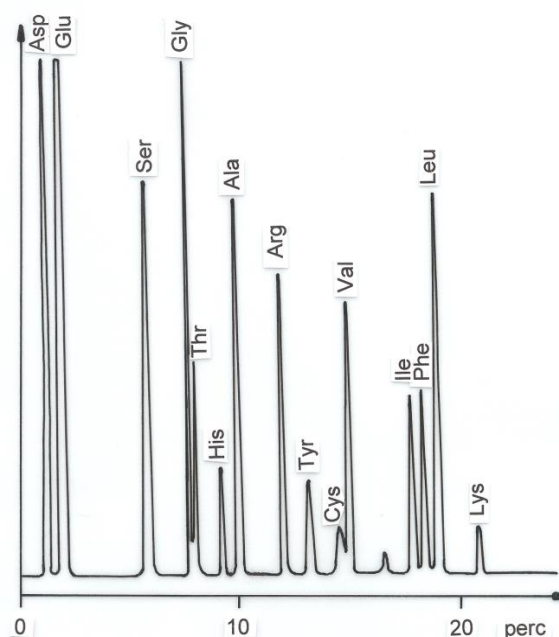
- A reagens feleslege és a melléktermékek jól szeparálódjanak az aminosav-származékoktól.
- A reagens tegye lehetővé a módszer könnyű automatizálhatóságát.

A származékképző reagensek nem minden esetben tudnak megfelelni ezeknek az optimális elvárásoknak, azonban kisebb-nagyobb hiányossággal mindegyik jól alkalmazható a maga területén.

5.1.8.2. A fehérjealkotó aminosavak meghatározása oszlop előtti származékképzéssel

Az o-ftálaldehiddel (OPA) végzett származékképzés

Az OPA-val végzett származékképzés nagy előnye, hogy önmagában nem rendelkezik fluoreszcenciás aktivitással, az aminosavakkal képzett **származékainak** viszont **nagy a fluoreszcenciás aktivitása**, melynek következtében a módszer nem érzékeny a reagens feleslegére, nagymennyiségű OPA mellett az aminosav-származékok tökéletesen analizálhatók. Néhány OPA-származék instabil, és a reakció hátránya még az is, hogy az iminosavak nem képeznek származékot az OPA-val. A származékok instabilitása csak akkor okoz problémát, ha a készülékünk nem rendelkezik automata származékképzési rendszerrel, ennek birtokában ugyanis, mivel a standard és a minta származékképzése ugyanazzal a módszerrel történik, az eredmények jól reprodukálhatók. A módszerrel a fehérjehidrolizátum 17 aminosavából 15 detektálható és jól mérhető, a módszer hibája viszont az, hogy a prolin (iminosav) nem képez származékot az OPA-val, a tisztin OPA-származékának fluoreszcenciás jele pedig rendkívül alacsony (80. ábra). A prolin esetében a módszer alkalmatlan annak meghatározására, a tisztinnél fennálló probléma pedig úgy oldható meg, hogy a származékképzés során a tisztin szulfhidril-csoportját jód-ecetsavval blokkolják, aminek következtében a származékképzés során egy erősen fluoreszcens izoindol-származék jön létre.



80. ábra Az aminosavak szétválasztása OPA/merkapto-etanol oszlop előtti származékképzés után, HPLC-vel

A stabilitás növelése érdekében az OPA-reagenshez 2-merkapto-etanolt adnak, melynek során jelentősen nő a fluoreszcenciás jel. A módszer előnye, hogy:

- Az aminosavak és az OPA között a reakció már szobahőmérsékleten is igen gyors.
- Az OPA maga nem rendelkezik fluoreszcenciás aktivitással, ezért a reagensfelesleget nem kell eltávolítani, a származékot egy lépésben lehet létrehozni.
- A HPLC-s meghatározásnál a származékokat könnyű szétválasztani gradiens elúcióval.
- A triptofán is detektálható az OPA módszerrel.
- Rendkívül nagy érzékenységgű, 0,1 pmol aminosav a módszerrel meghatározható.

A módszer hátránya, hogy:

- A prolin és a hidroxiprolin nem mérhető az OPA-val.
- Az OPA-reagens kevésbé stabil, és az OPA-származékok is instabilak, viszonylag gyorsan lebomlanak, ezért jó reprodukálhatóság csak automatizált rendszereknél képzelhető el.
- A cisztein és a cisztin OPA-származékának fluoreszcenciás jele nagyon alacsony, a fluoreszcenciás detektálás nem eléggé érzékeny ezekre az aminosavakra, mérésük azonban UV-detektálással 330 nm-en megoldható.

5.1.8.3. Származékképzés 9-fluorenil-metil-kloroformáttal (FMOC)

EINARSSON és munkatársai 1983-ban publikálták az aminosavak 9-fluorenil-metil-kloroformát (FMOC) reagenssel való származékképzését és a származékok fordított fázisú HPLC-s analízisét. Az aminosavak és a FMOC közötti reakció nagyon gyors, és **az iminosavak is származékot képeznek a reagenssel**, sőt a cisztein FMOC-származéka is jól mérhető fluoreszcenciás jelet ad. A FMOC-származékképzés hátránya, hogy a reagens feleslegét kromatografálás előtt pentánnal való extrakcióval el kell távolítani. Az extrakció megvalósítása nehézkessé teszi a módszert, és fennáll a lehetősége annak is, hogy az aminosav-származékok egy része extrahálódhat a pentánnal. A pentán helyett más extrahálószerket is javasolnak, azonban ezek nem javították lényegesen a módszer reprodukálhatóságát.

Az OPA és a FMOC együttes alkalmazása kiküszöböli a módszerek hibáit. Amennyiben nem vagyunk kíváncsiak a mintában lévő prolin-, hidroxiprolin- és cisztintartalomra, célszerűbb a származékképzést OPA-val végezni. Ha ezek az aminosavak is érdekelnek bennünket, jobb a FMOC-reagenst alkalmazni. Amennyiben a fluoreszcenciás jel gyenge, célszerű a detektálást sorba kötött fluoreszcenciás és UV-detektorral végezni.

5.1.8.4. Származékképzés dabzil-kloriddal (DABS-Cl)

A dabzil-kloriddal (DABS-Cl) végzett származékképzés rendkívül népszerű az aminosav-analitikában, mert **az aminosav-származékok** szobahőmérsékleten több mint egy hónapig **stabilak** és a látható tartományban detektálhatók. A módszer előnye a

rendkívül egyszerű származékképzési eljárás, a nagyon jó stabilitás, a reprodukálhatóság, a komplett folyadékkromatográfiás szétválasztás minden aminosavra és a látható tartományban való detektálás. A danzil-klorid mind az amino-, mind az iminosavakkal stabil származékot ad, az érzékenység alsó határa 1 pmólnál kisebb; néhányan a fmól tartományban adják meg értékeiket. A származék stabilitásából következik, hogy nem igényel automatikus származékképző és -adagoló rendszert, a kézi származékképzés is jól reprodukálható eredményeket ad.

5.1.8.5. Származékképzés danzil-kloriddal (DNS-Cl)

A danzil-klorid (DNS-Cl) volt az első reagensek egyike, amelyeket oszlop előtti származékképzésre alkalmaztak az aminosavak szétválasztása és meghatározása során. Mind az amino-, mind az iminosavakkal reagál, aminek során **nagy fluoreszcenciás aktivitású danzil-aminosavak keletkeznek**, amelyek könnyen és nagy érzékenységgel detektálhatók. A módszer hátránya, hogy a danzil-aminosav származékok érzékenyek a fényre, ezért a reakció alatt, majd az analízis megkezdéséig a fénytől óvni kell őket. A reakció alatt és után a danzil-klorid folyamatosan hidrolizál danzil-szulfonsavvá, ami zavarhatja a szétválasztást. Probléma az is, hogy a lizin, a hisztidin és a tirozin reakciója a danzil-kloriddal több reakcióterméket is eredményezhet, ami a módszer megbízhatóságát ezen aminosavak esetében megkérdőjelezheti.

5.1.8.6. Származékképzés fenil-izo-tiocianáttal (PITC)

Az aminosavak fenil-izo-tiocianátos (PITC) reakciójakor fenil-tiokarbamil- (PTC) származékok jönnek létre, amelyek sav hatására fenil-tiohidantoil- (PHT) származékokká rendeződnek át. Mindkét származék alkalmas az aminosavak folyadékkromatográfiás szétválasztására és meghatározására, de többnyire a fenil-tiokarbamil származékképzéssel dolgoznak, amelynek során a detektálás az UV-tartományban történik.

5.1.8.7. Az aminosavak HPLC-s meghatározására alkalmazott származékképzési módszerek összehasonlítása

Az előzőekben ismertetett öt módszer összehasonlítását a detektálás, az érzékenység, a származék stabilitása, a reakcióidő és az iminosavak mérhetősége szerint a következőképpen összegezzük.

- Fluoreszcens módszerrel detektálhatók az OPA, a FMOC és a DNS-Cl származékok, ultraibolya tartományban a PITC, a látható tartományban a DABS-Cl származékok.
- Az OPA, a FMOC és a DNS-Cl módszerrel fmól, a DABS-Cl és a PITC módszerrel pmól tartományban lehet az aminosavakat mérni.
- A FMOC és a DABS-Cl származékok stabilitása kiváló, a PITC-é jó, az OPA-é és a DNS-Cl-é gyenge.
- Az OPA-val és a FMOC-kal való reakció gyors, a PITC-vel közepes, a DABS-Cl-dal és a DNS-Cl-dal pedig lassú.
- Az OPA kivételével mindegyik módszer alkalmas a prolin, a hidroxiprolin és a cisztein mérésére.

5.1.8.8. A D- és L-aminosavak meghatározása nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával

A korábbi elképzelések szerint élelmiszerfehérjékben D-aminosavak nem, esetleg csak nyomokban fordulnak elő. Újabb vizsgálatok azonban kimutatták, hogy akár a mikrobiológiai romlás, akár a technológiai beavatkozás következtében egyes élelmiszerek és takarmányok fehérjetartalmában **jelentős lehet a D-aminosavak mennyisége**, ezért meghatározásuk iránt az utóbbi időben egyre nagyobb az igény. A D- és az L-sztereoizomer aminosavakat a hagyományos módszerekkel (ioncserés oszlopkromatográfia, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia) nem lehet szétválasztani, mivel a sztereoizomer aminosavak minden fizikai és kémiai tulajdonságban – a poláros fény síkjának elforgatása kivételével – megegyeznek. Az aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására kezdetben a polarimetriát használták, amely módszert elsősorban tiszta aminosavak racemizációjának tanulmányozására alkalmazták. Enzimes technikákat is használtak a D- és L-aminosavak meghatározására. Az eljárás lényege a D- vagy L-aminosavak enzimes oxidációja, majd ezt követően a maradék aminosavak meghatározása. E módszereknek, mint általában az enzimes fehérjehidrolízis módszereknek, az a hibája, hogy nem használható a D-aminosavak nyomnyi mennyiségének meghatározására, és igen jelentős hibaforrás lehet az enzimekből származó L-aminosavakkal való szennyezés is.

5.1.8.8.1. A minimális racemizációval járó fehérjehidrolízis

Élelmiszerekből vagy biológiai eredetű mintákból esetenként a szabad aminosavakat, a legtöbb esetben azonban a fehérjeláncban lévő aminosavakat kell meghatározni. Ez utóbbi esetben az előkészítés során a fehérje hidrolízise elengedhetetlen, hisz legyen szó bármilyen meghatározásról, az csak a szabad aminosavakkal tud dolgozni. Nagyon fontos annak ismerete, hogy **a fehérje hidrolízise során történik e racemizáció**, hisz amennyiben igen, az megamisíthatja a mérési eredményeket. (Ugyanilyen fontos, hogy a származékképzés során fellép-e racemizáció; ezt a problémát a módszerek tárgyalása során kiemelten kezeljük.) Különböző tanulmányok beszámoltak arról, hogy **a racemizáció foka** a hidrolízis folyamán **függ a peptid, illetve fehérje típusától**, az aminosav környezetében jelen lévő **többi aminosavtól**, és megállapították, hogy a **peptidkötésben lévő aminosavak általában gyorsabban racemizálódnak** a szabad aminosavaknál. L-glutaminsavat 6 M sósavval 24 órán át refluxáltatva azt tapasztalták, hogy annak mintegy 3–5%-a átalakul D-glutaminsavvá, lómioglobint és marhainzulint hidrolizálva pedig 4,6–6,6%-ban mértek D-glutaminsavat. A kísérletek azt bizonyítják, hogy **legkönnyebben azok az aminosavak racemizálódnak, amelyek aromás oldalláncot** (tirozin, fenilalanin) **vagy indol- és imidazil-csoportot** (triptofán, hisztidin) **tartalmaznak**, és legnehezebb racemizációra bírni az apoláros oldalláncot tartalmazó valint, izoleucint és leucint.

Leszögezhető tehát, hogy **más a racemizáció a szabad, a peptidben vagy a fehérjében kötött aminosavaknál**, és e három reakciónál a racemizációt a különböző környezeti hatások is másként befolyásolják. Az a tény, hogy lúgos körülmények között a racemizációs folyamatok felgyorsulnak, felhívja a figyelmet arra, hogy a technológia során mindennemű lúgos kezelést lehetőleg el kell hagyni.

5.1.8.8.2. A fehérjehidrolízis és a racemizáció

Amennyiben az aminosav-enantiomerek meghatározása a cél, olyan fehérjehidrolízis-módszert kell választani, amelynek során **nincs vagy minimális a racemizáció**, hisz a hidrolízis alatt fellépő számottevő racemizáció esetén nem tudjuk eldönteni, hogy az aminosav-enantiomerek egy része eredetileg is benne volt-e a mintában vagy csak a hidrolízis folyamán keletkezett. Több módszert is kidolgoztak a fehérjehidrolízis során bekövetkezett racemizáció visszaszorítására, ezek a módszerek azonban meglehetősen

hosszadalmasak, illetve nehézkesek voltak. Fentiek miatt CSAPÓ és munkatársai egy magas hőmérsékleten, rövid ideig végzett fehérjehidrolízis-módszert dolgoztak ki a lehető legkisebb racemizáció elérésére a hidrolízis folyamán. Vizsgálataik szerint:

- A szabad aminosavak racemizációja lényegesen lassabb a peptidláncban kötött aminosavakéhoz viszonyítva; ugyanolyan körülmények között a szabad aminosavaknál előforduló racemizáció csak mintegy 20–40%-a a peptidkötésben lévőkéhez képest.
- Hagyományos módszerrel végezve a fehérje hidrolízisét, 1,5–2,5-szer nagyobb a racemizáció, mint magas hőmérsékleten (160–180°C) a fehérje tökéletes hidrolízisét eredményező körülmények után. Ez a lényegesen alacsonyabb racemizáció magyarázható azzal, hogy magas hőmérsékleten a fehérje gyorsabban hidrolizál szabad aminosavakra, és a szabad aminosavak racemizációja lényegesen lassúbb, mint a fehérjeláncban kötötteké. Alacsony hőmérsékleten, hosszabb ideig végzett hidrolízisnél a peptidláncban kötött aminosavakat hosszabb ideig érik a racemizációt kiváltó hatások, tehát **minden olyan hatás, amely meggyorsítja a hidrolízist, csökkenti a racemizációt.**
- Tejpor esetében a racemizáció nagyobb volt, amit a jelen lévő nehézfémek racemizációt katalizáló hatásával lehet magyarázni.
- 48 óra alatt, 110°C-on, 4 M bárium-hidroxid hatására az összes aminosav (szabad vagy peptidláncban kötött) teljes mértékben racemizálódott. Bárium-hidroxidos fehérjehidrolízissel tehát a triptofán racemizációját nem lehet meghatározni.
- A magas hőmérsékleten, rövid ideig tartó hidrolízist (160°C-on 60–90 perc, 170°C-on 45–60 perc és 180°C-on 30 perc) javasolják mindazoknak, akik nem akarnak enzimes hidrolízist alkalmazni, és szeretnék a fehérjeláncban bekövetkezett racemizáció mértékét meghatározni.

5.1.8.8.3. A D- és az L-aminosavak elválasztására és meghatározására kifejlesztett módszerek

Az optikailag aktív (királis) aminosavak reakciója királis reagensekkel **diasztereomer vegyületeket** eredményez, amelyek nem királis oszlopon is szétválaszthatók. Amennyiben a királis reagens egy másik aminosav, akkor diasztereomer dipeptidek keletkezhetnek, amelyek elválasztása ioncserés oszlopkromatográfiával is megoldható. Az eljárás lényege egy L-aminosav-N-karboxi-anhidridnek vagy valamelyik aminosav aktív észterének a vizsgálandó D- és L-aminosavakkal lejátszódó reakciója, melynek során **diasztereomer dipeptidek** keletkezhetnek, amelyek **alkalmasak az ioncserés szétválasztásra**. Így például rutinszerűen analizáltak L- és D-aszparaginsavat L-Leu-D-Asp és L-Leu-L-Asp diasztereomer dipeptid formában.

A D- és L-aminosavak szétválasztására a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia mellett az egyik legjobb módszer a gázkromatográfia. Az enantiomereket szét lehet választani egy megfelelő aszimmetriás reagenssel létrehozott diasztereomer pár formában, vagy az illékonyra tett származékokat optikailag aktív álló fázison kell szeparálni. CHARLES és munkatársai az n-trifluoracetyl-(±)-2-n-alkoholokat használták a diasztereomerek képzésére, és ezt a módszert tökéletesítették POLLACK és munkatársai, akik a származékképzéshez (+)-2-n-butanolt használtak. A gázkromatográfiában elsőként alkalmazott optikailag aktív álló fázis az n-trifluor-acetyl-L-izoleucil-lauril-észter volt, majd ezt követően az N-lauril-L-valil-tercier-butilamidot alkalmazták és találták nagyon hatékynak az optikai izomerek szétválasztására. A gázkromatográfiás technikát ma már olyan tökéletesre fejlesztették, hogy az enantiomerek meghatározásának hibája kisebb, mint 5%, és a reprodukálhatóság is rendkívül jó.

Újabban az enantiomerek szétválasztására és meghatározására – az előzőekben említett módszerek rovására – egyre inkább teret nyer a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia. WEINSTEIN és WEINER az aminosavakból az **5-dimetil-aminonafthalin-1-szulfonil fluoreszkáló származékokat képezték**, és fordított fázisú folyadékkromatográfiával az N,N'-di-n-propil-L-alanin (L-DPA) és réz-acetát királis töltet alkalmazásával az összes fehérjealkotó aminosav D- és L-enantiomerjét szét tudták választani. A módszer érzékeny és gyors, aminosav-enantiomerek meghatározására kiválóan alkalmas. Biológiaiilag aktív anyagok optikai tisztaságának

ellenőrzésére KNABE, valamint GÜBITZ és munkatársai direkt módszert dolgoztak ki nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, amelynek lényege a kémiaiilag kötött L-hidroxi-prolin-Cu²⁺ királis oszlop és Cu²⁺-tartalmú mozgó fázis. Ezen álló és mozgó fázis alkalmazásával lehetőség van mindazon vegyületek optikai tisztaságának ellenőrzésére, amelyek kelátkomplexeke képeznek a Cu²⁺-ionokkal, mint amilyenek például az aminosavak. A módszer hibája, hogy egyszerre csak egy aminosav D- és L-változatát lehet vele meghatározni.

MARFEY ugyancsak nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert fejlesztett ki az aminosav-enantiomerek szétválasztására. Az **1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin-amid** segítségével, ami egy igen reakcióképes fluoratomot tartalmaz, diasztereomer származékokat hozott létre D- és L-aminosavak keverékéből. Ezeket a származékokat HPLC-vel trietil-aminfoszfát és acetonitril eluensek megfelelő gradiensek alkalmazásával igen jó eredménnyel szét tudta választani, és mennyiségileg meg tudta határozni. Közleményében a D- és L-aszparaginsav, -glutaminsav, -metionin, -alanin és -fenilalanin elegyének szétválasztását közli, de a feltételek megfelelő megváltoztatásával lehetőség van a többi aminosav-enantiomer szétválasztására is.

Az aminosav-enantiomerek mennyiségi meghatározásához nem elég csak az enantiomereket egymástól elválasztani, de ügyelni kell arra is, hogy az enantiomerek a többi aminosavtól vagy azok származékaitól is jól elkülönüljenek. Ezenkívül a megfelelő érzékenység elérésére kis mennyiségben is jól detektálható aminosav-származékot kell képezni. Az utóbbi időben erre a célra széleskörűen alkalmazták a **fluoreszcens reagensekkel való oszlop előtti származékképzést** és a származékok fordított fázisú kromatográfiáját. E módszereknél a kimutathatóság határa a meghatározni kívánt aminosavaknál igen kicsi, és az analitikai rendszer flexibilitása is rendkívüli előnyöket rejt magában. A királis reagensekkel való származékképzés után lehetőség van a fehérjeépítő aminosavak enantiomerjeinek szétválasztására és meghatározására RP-HPLC-vel. Mivel a kromatográfiás elválasztás általában 50–70 percet vesz igénybe, nagyon fontos hogy a kidolgozott analitikai módszer teljesen automatikus legyen. Előfeltétel még az egyszerű származékképzési reakció, amely szobahőmérsékleten rövid idő alatt végbemegy.

A **királis tiolok** használatára az aminosav-enantiomerek szétválasztásánál ASWAD tette az első javaslatot, aki az OPA-t és az **N-acetil-L-ciszteint** (NAC) alkalmazta a D- és L-

aszparaginsav szétválasztására. A származékok szétválaszthatók réz-prolin rendszerben is, aminek során azok komplexeket képeznek a rézzel. A NAC mellett alkalmazták még a tercier-butyl-oxi-karbonil-L-ciszteint is származékképzésre. NIMURA és munkatársai a királis **2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranozil-izocianátot** (GITC) alkalmazták a D- és L-aminosavak szétválasztására. Igen jó elválasztást kaptak az RP-HPLC-s szétválasztás során, amely lehetővé tette a fehérjeépítő aminosav-enantiomerek egy lépésben való szétválasztását és meghatározását. EINARSSON és munkatársai a GITC kereskedelmi forgalomban kapható tiol-analógiát, a **2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranozidot** (TATG) alkalmazták az OPA-val való reakcióban az aminosavak oszlop előtti származékképzésére. A kísérletük célja az volt, hogy olyan diasztereomereket szintetizáljanak, amelyek könnyen szétválaszthatók és detektálhatók mind fluoreszcens detektorral, mind elektrokémiaiilag.

EINARSSON a királis **1-(9-fluorenil)-etil-kloroformátot** (FLEC) használta az aminosav-enantiomerek szétválasztására, illetve meghatározására. Ez a módszer azzal az előnnyel jár, hogy nemcsak az α -aminosavakkal, hanem az iminosavakkal is stabil származékot képez, ezért segítségével mind az imino-, mind az aminosavak meghatározhatók, sőt lehetőség van az iminosavak szelektív származékképzésére és az igen kis mennyiségű iminosavak kimutatására a nagy mennyiségben jelen lévő aminosavak mellett.

Az enantiomerek szétválasztása és meghatározása során külön említést érdemel a hidroxiprolin, a treonin és az izoleucin, amelyek két aszimmetriacentrummal rendelkeznek. Ezek közül gyakorlati jelentőséggel az izoleucin átalakulása bír, amelynek során D-allo-izoleucin keletkezik, ami mint az izoleucin diasztereomere, a rutinszerűen alkalmazott ioncserés oszlopkromatográfiás aminosav-elválasztás során az izoleucin és a metionin között jelenik meg a kromatogramon, azoktól jól elváló és értékelhető csúcsot adva.

Az előzőekben említett módszerek közül az EINARSSON és munkatársai által publikált fluorenil-etil-kloroformátos (FLEC) és az orto-ftálaldehid és a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranozidos (OPA/TATG) módszert CSAPÓ és mtsai a gyakorlatban alkalmazták, és használták több ezer élelmiszer minta D- és L-aminosav tartalmának meghatározására.

Az aminosav-enantiomerek szétválasztása és meghatározása 1-(9-fluorenil)-etil-kloroformáttal (FLEC) való származékképzés után RP-HPLC-vel

A származékképzés során két, különböző eljárást alkalmaztak. Az első módszert **mind az α -aminosavak, mind az iminosavak származékainak képzésére használták**, a második módszert viszont **csak az iminosavak származékképzésére alkalmazták**. A szelektivitás az α -aminosavak és az OPA közötti reakción alapszik, amelyet követ az iminosavak származékképzése FLEC-tal. Az OPA blokkolja az α -aminosavakat, aminek következtében a FLEC csak az iminosavakkal tud reakcióba lépni. Az OPA-származékok különböző fluoreszcenciás tulajdonságainak köszönhetően az iminosavakat az α -aminosavak zavaró hatása nélkül meg lehet határozni.

Az **iminosav-enantiomerek szelektív meghatározásának** módja három gyors reakciót foglal magában. Az **aminosavak blokkolása az OPA/merkaptó-etanol reakcióval** történik, ami előkészíti a terepet az iminosavak FLEC-tal való reakciójához. A **jód-acetát** szerepe csak az, hogy **eltávolítsa a merkaptó-etanol-felesleget**, megvédve a FLEC reagenst a tioloktól. Kevesebb, mint egy perc szükséges az első két reakcióra, és kevesebb, mint öt perc, hogy a **FLEC-tal a reakció** tökéletesen végbemenjen.

A hidroxi-prolin- és a prolin-enantiomerek szétválasztásához alacsony pH-jú mozgó fázis szükséges. Az elválasztást egy egyszerű izokratikus elúcióval tökéletesen végre lehet hajtani, és ugyanilyen körülmények között szét lehet választani a hidroxi-prolin cisz- és transz-izomerjét optikailag inaktív FMOC-Cl-dal való származékképzés után.

Az aminosav-enantiomerek tisztaságának és a fehérjehidrolízis során lejátszódó racemizáció arányának mérése szükségessé teszi, hogy az enantiomereket széles koncentrációtartományban meg lehessen határozni. **A D-aminosavak nyomnyi mennyiségének detektálása problematikus** lehet a lehetséges átfedések miatt, amit például a reagensből vagy az egyéb aminosavakból eredő szennyeződés okozhat. Rendkívül előnyös, ha a származékképző reagens mindkét enantiomerjét módunkban áll használni, mert ez megnöveli a csúcsok azonosításának megbízhatóságát, mivel a reagens másik enantiomerjével végezve el a származékképzést, **megváltozik a diasztereomer-származékok elúciós sorrendje**. A másik előnye a reagens mindkét

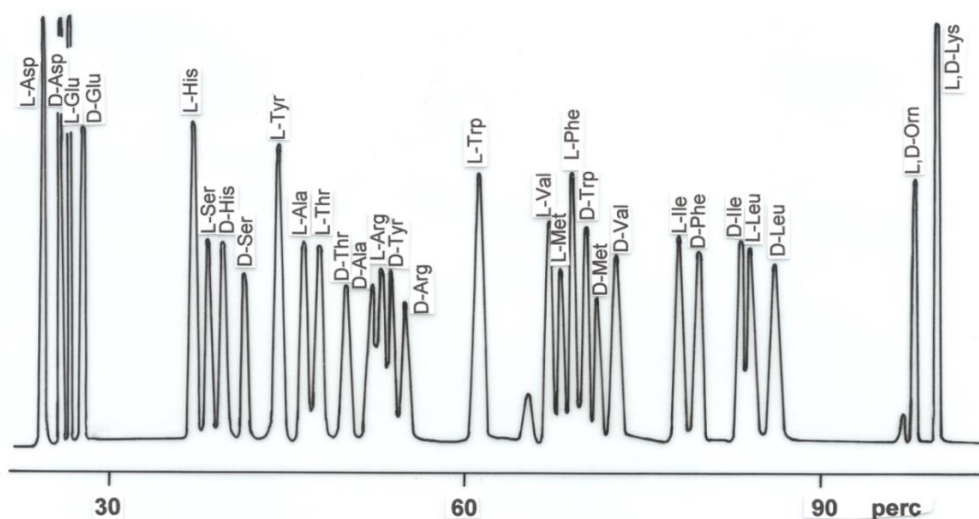
enantiomere használatának az, hogy lehetőség van annak az aminosav-enantiomer retenciós idejének meghatározására is, amely nincs is jelen a mintában, elvégezve a kromatografálást az ellentétes térszerkezetű reagenssel létrejött reakció után. A csúcsok azonosításának különösen az élelmiszeralízis esetén van nagyon nagy jelentősége, hisz ebben az esetben a kromatografálás során sok olyan csúcs jelenik meg a kromatogramon, amelyről igen nehéz eldönteni, hogy egy kis koncentrációban jelen lévő D-aminosavról vagy valami egyébről van szó. Amennyiben megváltozik az elúciós sorrend, biztosak lehetünk a D-aminosav jelenlétében, amennyiben ez a sorrend nem változik meg, akkor nagy valószínűséggel nem D-aminosavról van szó.

Az aminosav-enantiomerek szétválasztása és meghatározása o-ftálaldehiddel és 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranoziddal történő származékképzés után (OPA/TATG) RP-HPLC-vel

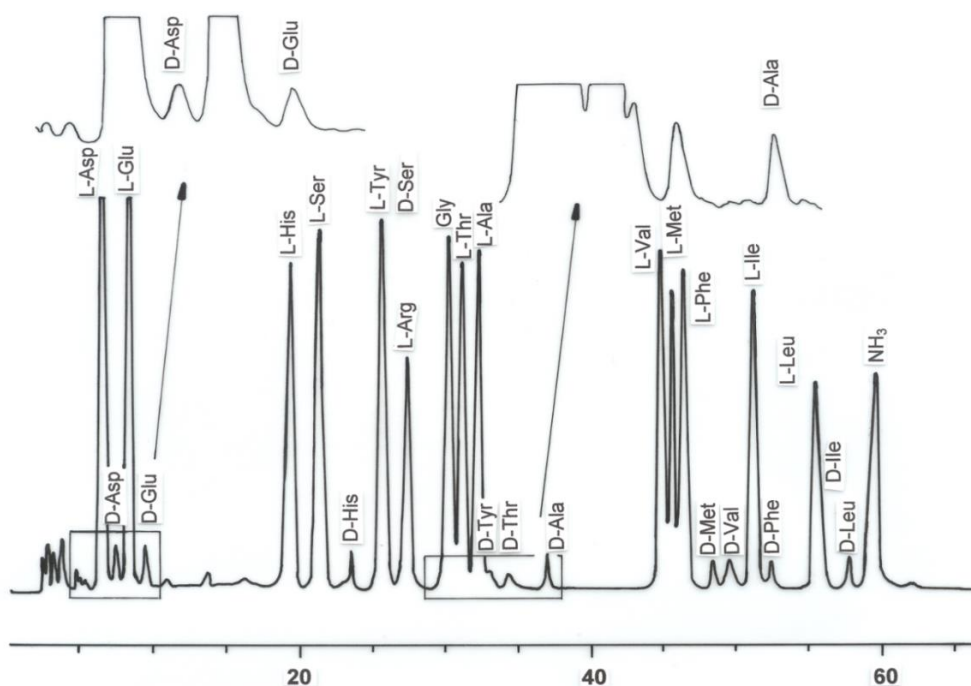
A származékképzés során az aminosavak reakciója az OPA/TATG-vel hasonló módon megy végbe ahhoz, mint amit az OPA/merkaptó-etanol és az aminosavak közötti reakciók esetében tapasztaltak. Az L-alanin, az L-lizin, az L-metionin, az L-aszparaginsav, az L-hisztidin, az L-szerin, valamint az L- és a D-treonin reakciósebességét tanulmányozva megállapítottuk, hogy a reakció a treonin kivételével kevesebb, mint három perc alatt végbemegy. A treonin esetében azonban legalább hat perc szükséges a reakció tökéletes lejátéshoz. A gyors reakció az OPA és a nagy tömegű TATG-molekula, valamint az aminosavak között alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint a tömeg növekedése nem jár feltétlenül a reakció sebességének csökkenésével. Az OPA-reagens aminosav-analízisnél való használatkor komoly probléma, hogy a képzett származék instabil, ezzel szemben az **OPA/TATG-származék** egészen **stabilnak** bizonyult. Az alanin-, a glicin- és a szerinszármazékok nem mutattak fluoreszcenciacsökkenést még másfél órával a reakció befejeződése után sem. 10 órás, szobahőmérsékleten végzett tárolás után a fluoreszcenciának mintegy 68%-át mérték lizin és 37%-át ornitin esetében.

A legtöbb alkalmazás során csak pár aminosav D- és L-enantiomerére vagyunk kíváncsiak, és nincs szükség az összes fehérjealkotó aminosav enantiomereinek szétválasztására és meghatározására, ezért a mozgó fázis pH-jának és ionerősségének megváltoztatásával vagy más szerves oldószer alkalmazásával, esetleg az analitikai

oszlop méretének és töltésének változtatásával lehetőség van arra, hogy bármelyik fehérjealkotó aminosav-enantiomert tökéletesen szét tudjunk választani és meg tudjunk határozni. Természetesen ilyenkor mindig el kell végezni a rendszer optimalizálását a kérdéses aminosavakra. A következőkben egy ilyen **optimalizálás látható az aszparaginsav és glutaminsav, valamint az alanin enantiomereinek szétválasztására (81. és 82. ábra).**



81. ábra Az aminosav-enantiomerek szétválasztása OPA/TATG származékképzés után



82. ábra A kismennyiségű D-aminosavak meghatározása a nagy mennyiségben jelen lévő L-aminosavak mellett

Élelmiszerfehérjékben a fehérje 20–30%-a is lehet a **glutaminsav**, és az **aszparaginsav** mennyisége is elérheti a 8–10%-ot. E két aminosav **D-enantiomerének mennyiségéből következtetni lehet az összes többi aminosav D-enantiomerére**, ugyanis ha a mintából nem tudunk D-glutaminsavat és D-aszparaginsavat kimutatni, szinte biztosak lehetünk abban, hogy természetes eredetű fehérjék esetében az összes többi D-aminosav mennyisége elhanyagolhatóan csekély. A D-alanin mennyisége pedig azért érdekelheti a szakembereket, mert a **D-alanin (a D-aszparaginsavval és a D-glutaminsavval együtt) a bakteriális fehérjeszintézis markere**, hisz a baktériumok sejtfalában lévő peptidoglikánok jelentős mennyiséget tartalmaznak e három D-aminosavból. A kromatogramból látható, hogy a kérdéses hat aminosav elválása egymástól és a többi enantiomertől egészen kiválóan mondható, és látható az is, hogy 20-szoros mennyiségű L-aminosav mellett nem okoz gondot a D-aminosavak elválasztása és meghatározása a hagyományos fluoreszcens detektor alkalmazásával. A D-aminosavak meghatározásának alsó határa ebben a rendszerben 0,2–0,5 μmol között van, bár a D-aszparaginsav és D-glutaminsav esetében ez a koncentráció kisebb 0,1 μmol -nál, a lizinél pedig 2 μmol körül van.

Összehasonlítva a FLEC és az OPA/TATG módszert az aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására az alábbiakat lehet elmondani:

- Mindkét módszer kiválóan alkalmas az aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására, mert a származékképzés során egyiknél sem tapasztalható számottevő racemizáció.
- A FLEC módszer talán előnyösebb, ha nagyobb mintamennyiségek állnak rendelkezésünkre, és nem érdekelnek bennünket különösebben az aszparaginsav enantiomerjei. A FLEC módszer rendkívül jól használható, ha a bázikus aminosavak enantiomerjeit akarjuk szétválasztani, és különösen bevált a lizin-enantiomerek tesztelésére.
- Az OPA/TATG módszer előnyösebb, ha az aszparaginsav-enantiomereket is meg akarjuk határozni, ha igen kis anyagmennyiségek állnak rendelkezésünkre vagy a minta sok ásványi anyagot tartalmaz. A FLEC módszer igen érzékeny az ásványi anyagokra, a keletkező csapadék a származékképzés során megghiúsíthatja a származékképzési reakciót, illetve az analízist.

- A FLEC módszer igen nagy előnye egyrészt az, hogy alkalmas az iminosavak szelektív származékképzésére. Segítségével az L-prolin a D-prolintól, valamint a transz-L-hidroxi-prolin, a cisz-L-hidroxi-prolin, a transz-D-hidroxi-prolin és a cisz-D-hidroxi-prolin egymástól tökéletesen szétválasztható. Az aminosavak meghatározása esetén előny még az is, hogy (+)FLEC és (-)FLEC alkalmazásával a megváltozott elúciós sorrendet kihasználva a csúcsok azonosításának biztonsága megnő, illetve a mintában elő sem forduló enantiomer retenciós idejét is meg lehet határozni.

Végső összegzésként tehát elmondható, hogy szinte nincs olyan aminosav-analitikai feladat az aminosav-enantiomerek szétválasztása területén, amelyet vagy a FLEC, vagy az OPA/TATG származékképzéssel, a rendszer megfelelő optimalálása után, ne lehetne megoldani.

5.1.9. Réteg- és papírkromatográfia

5.1.9.1. A rétegekromatográfia alapjai

A kromatográfias módszerek közül a rétegekromatográfia a planáris módszerek csoportjába tartozik. Valójában egy „**planáris**” **oszlopról** van szó, ezért az oszlopmódszerek és a planáris módszerek között elvi alapokat tekintve gyakorlatilag alig van különbség. A tartó felületet üveg, alumínium vagy műanyag lemezek adják, melyeken az álló fázis egy-két tized mm vastagságban van felvíve. Az álló fázis lehet alumínium-oxid, szilikagél vagy valamilyen ioncserélő anyag. Az álló fázis egyik pontjára visszük fel a szétválasztani kívánt keverékeket, majd a réteget eluensbe állítva kifejlesztjük az elválasztást. A mozgó fázis a kapilláris erők hatására az álló fázisba felszívódik, és megtörténik az anyagkeverék komponenseinek szétválasztása. A komponensek zónát, ill. foltot képeznek, melyek a **retenciós faktor** alapján azonosíthatók. A retenciós faktort (R_F) megkapjuk, ha a felcseppentési ponttól lemérjük a folt középpontja közt lévő távolságot, és azt elosztjuk a felcseppentési ponttól mért mozgófázis által megtett úttal. A definíciónak megfelelően az **R_F értéke nulla és egy közé esik**, mely alapján az ismeretlen komponens az ismert komponens R_F értékéhez hasonlítva beazonosítható. Ha a minta nem mozdul el a startponttól akkor R_F értéke nulla, ha az oldószer fronttal együtt halad, akkor egy. Az R_F értékét két tizedes pontossággal adjuk meg.

A rétegekromatográfia kis mennyiségű anyagok keverékének gyors elválasztására használható. **Előnyei** a kifejlesztés rövid időtartama, a foltok jó szétválasztási lehetősége és hogy a kémiai ellenálló hordozóanyagon agresszív szerves oldószerek is felhasználhatók. **A rétegekromatográfia eszközei** a rétegekromatográfias lemez, az adszorbens, és a kötőanyag. **A rétegekromatográfiára történő előkészítés során** az adszorbenst és a kötőanyagot a szükséges mennyiségű vízzel szuszpenzióvá elegyítjük, a lemezre (üveg, műanyag vagy fémlemez) felkenjük, szobahőmérsékleten szárítjuk, 100-105°C-os szárítószekrényben 30-45 percig aktiváljuk, majd az aktivált lemezeket exsikkátorban tároljuk. A rétegeket kromatografálás közben csiszolt fedővel ellátott üveg futtatókamrában (üvegcádák) légmentesen lezárjuk, melynek következtében a lemezek az oldószergőzőkkel telített térben vannak.

A rétegekromatográfia során először kiválasztjuk a réteget, a vizsgálandó oldatot mikropipettával egymástól 20-30 mm-re lévő pontokra felvisszük ügyelve arra, hogy egy-egy folt 6-8 mm-nél ne legyen nagyobb átmérőjű, majd a lemezt a futtatószer gőzeivel előzetesen telített futtatókamrába helyezzük. A rétegre felvitt anyag foltjának előrehaladását a vonatkozó adszorpciós izoterma határozza meg. A kromatogram kifejlesztését akkor fejezzük be, ha az oldószer frontja megközelíti a lemez felső szélét. Szerves adszorbensek esetén előhívásra agresszív anyagokat (tömény kénsav, perklor-sav, antimon-klorid) is lehet alkalmazni.

A kromatografálás során az első lépés **a réteg kiválasztása, előkészítése, aktiválása**, majd következik a mintafelvétel a réteg aljától számítva 1,5-2,0 cm-re foltban vagy sávban. Ezt követi a futtatás a lemez felső szélétől kb. két cm-re, majd következik a kiemelés és a szárítás, és végül a foltok előhívása, és a minőségi és mennyiségi értékelés.

A rétegekromatográfia során legtöbbször **függőleges kifejlesztést, és felszálló technikát** alkalmazunk. A felszálló kifejlesztésnél a mozgó fázis a réteglap alsó végén helyezkedik el. A lineáris kifejlesztés lehet egy vagy két dimenziós és többszörös kifejlesztésű is. Egydimenziós esetben a komponensek csak egy irányban vándorolnak, **kétdimenziós kromatográfiánál** pedig az első kiterjesztéssel merőlegesen egy újabb kromatografálást végzünk. Többszörös kifejlesztés esetén a kifejlesztést azonos vagy különböző mozgófázissal megismételjük.

A rétegekromatográfia segítségével anyagokat tudunk beazonosítani, ill. félkvantitatív értékelést tudunk végezni. A **félkvantitatív értékelést** denzitométerrel, vagy a foltok kioldását követően fotometriás elemzéssel végezzük. A színtelen vagy UV fénnel sem kimutatható vegyületek analízisének színezésképző színreagenseket használunk.

Az oszlopkromatográfia felbontóképessége ugyan jelentősen nagyobb, mint a rétegekromatográfiáé, ennek ellenére a **rétegekromatográfiának számos előnye van** az oszlopkromatográfiával szemben. A rétegekromatográfiával elválasztott vegyületek vizuálisan értékelhetők, a szétválasztott vegyületek kimutatására szelektív és specifikus színreakciók alkalmazhatók, így pár vegyület specifikusan kimutatható a sok komponens mellett. Oszlopkromatográfiás elválasztáskor egyes komponensek értékelhetetlenül, irreverzibilisen az oszlophoz kötődnek; rétegekromatográfiás elválasztáskor viszont a minta összes komponenséről áttekintést kapunk. A rétegekromatográfiában a kromatográfiás feltételek megváltoztatása rövid időt vesz igénybe, és fő előnye még az is, hogy a legtöbb rétegekromatográfiás módszer egyszerű, olcsó berendezésekkel, rövid idő alatt ad értékes adatokat néha bonyolult anyagkeverékek esetében is.

A rétegekromatográfiás analízis során a hordozók megválasztásával lehetőség van megoszlási, adszorpciós és ioncserés rétegekromatográfiás vizsgálatokra is. A papírkromatográfia manapság már háttérbe szorult, ezzel szemben rendkívüli módon elterjedtek a 0,25-0,50 mm vastag **kent rétegek**, melyeket megfelelő aktiválás után lehet analitikai célokra felhasználni. A kent rétegek mellett nagyon sok cég gyárt **kész réteglapokat**, melyek készítéséhez hordozólapnak üveglemezt és műanyag- vagy alumíniumfóliát használnak. A kész réteglapok könnyen tárolhatók, darabolhatók, egyszerűen dokumentálhatók és egyenletes homogén réteget adnak.

A vizsgálandó oldott anyagmintákat cseppenthetjük pontban vagy sávban, megfelelő mikropipettával vagy kapillárisal. A cseppentés során meleg levegővel a foltokat vagy sávokat beszárítjuk, mellyel a felcseppentett anyag mennyiségét széles határok közt változtathatjuk. A felcseppentés után a réteglapokat csiszolt fedelű futtatókádba állítjuk, melynek az aljára töltjük a futtatószer-elegyet. Az oldószer-elegy megfelelő távolságra jutása után a réteglapot a kádból kiemeljük, és a megszáradt rétegen a szétválasztott anyagokat saját színük, UV-fluoreszcenciájuk vagy megfelelő reagenssel való bepermetezés után, esetleg melegítéssel kombinálva, mutatjuk ki.

A rétegekromatográfiában végezhetünk kétdimenziós futtatást is, sőt az egyik dimenzióban **rétegelektroforézist** is alkalmazhatunk. A **kétdimenziós futtatással** a komponensek szétválását, beazonosítását és mennyiségi meghatározását javíthatjuk.

A **nagy teljesítményű rétegekromatográfia (HPTLC)** esetén az álló szilárd fázis kisebb részecskemérete (5-7 μm átmérő) és a réteg tömör kialakítása az elválasztási teljesítményt növeli. A **lineáris HPTLC-technika** alkalmazása 10x10 cm-es rétegen, 30-50 minta eredményes, mennyiségileg is jól értékelhető vizsgálatát teszi lehetővé.

A **túlnyomásos rétegekromatográfia (OPTLC)** növeli a rétegekromatográfia teljesítőképességét, mert a mozgó fázis áramlási sebessége az egész szétválasztás alatt állandó.

5.1.9.2. A rétegekromatográfia alkalmazása élelmiszerfehérjék vizsgálatára

A fehérjéket gélrétegen, szerves- és szervetlen alapú rétegeken, cellulóz rétegen, esetleg ioncserélő rétegeken is elválaszthatjuk. Az ioncserélő vékonyrétegen történő elválasztás inkább az aminosavak és a peptidek szétválasztására használható, míg a fehérjék elválasztására a gélréteg-kromatográfia a legalkalmasabb. A gélréteg készítésére általában a dextrán alapú félszintetikus és az akrilamid alapú szintetikus géleket használjuk. A gélrétegeket általában üveglapokon 0,5 mm vastagságban rétegkenő szerkezettel készítik. A kent rétegek 15–20 perces szabad levegőn történő állás után felhasználhatók kromatográfiás vizsgálatokhoz, illetve nedves kamrában hosszabb ideig tárolhatók, ha a mikroorganizmusoktól a réteget meg tudjuk védeni.

A vizsgálandó fehérjemintából kapilláris vagy mikropipetta segítségével 1–5 μl -t viszünk a gélrétegre, és célszerű, ha a vizsgálati minta mellett ismert fehérjepreparátumot is futtatunk. A gélréteg-kromatográfiás futtatókamra egy olyan egyszerű berendezés, amely az üveglap 10–20 fokos dőlésével biztosítja az anyagok optimális vándorlási sebességét, a futtatókeverék pedig megegyezik a gélkromatográfiás elválasztásokhoz használt pufferrendszerekkel. A futtatás után a gélréteglapot a futtatókamrából kiemeljük, majd elvégezzük a lapok értékelését. A színes és fluoreszkáló anyagok esetén az értékelést közvetlenül végezhetjük, a gélrétegen

szétválasztott fehérjék detektálására viszont a fehérjéket különböző módszerekkel megfestjük.

A gélréteg-kromatográfia alkalmazható peptidek és fehérjék molekulatömegének meghatározására, ugyanis **a fehérjék molekulatömegének logaritmusa** és egy adott rétegen, azonos idő alatt **megtett távolság között, szoros az összefüggés**. Ennek alapján ismert molekulatömegű fehérjék futtatását követően megszerkesztett standardgörbe segítségével ismeretlen molekulatömegű fehérjék közelítő molekulatömege meghatározható.

A gélréteg-kromatográfia jelentős felhasználási területe a biológiai folyadékok fehérjeösszetételének meghatározása, továbbá a patológias fehérjék detektálása. Az ilyen bonyolult keverékek vizsgálata csak kétdimenziós módszerrel lehetséges, amikor is az első dimenzióban géliszűrést, a második dimenzióban pedig elektroforézist, illetve imunodiffúziót célszerű használni. Gélréteg-kromatográfiával vizsgálhatók többek közt az enzimek is, melyek közül többet (pl. *tejsav dehidrogenáz*, *ornitin-karbamoil transzferáz*, *glioxalát reduktáz*, *savanyú- és lúgos foszfatáz*) gélkromatográfiával határoztak meg. A fehérjék elválasztására eredményesen használható a vékony gélrétegben végzett izoelektromos fókuszálás is, melyre általában poliakrilamid-gélt használnak. Ismeretes olyan módszer is, amellyel izoelektromos fókuszálás után az enzimek proteolitikus aktivitása is kimutatható.

A fehérjék elválasztására a folyadék-folyadék, valamint a folyadék-szilárd rétegekromatográfia, a nagy molekulatömeg miatt nem igazán alkalmazható. Ugyan többen próbálkoztak cellulóz és szilikagél rétegen különféle fehérjepreparátumok és enzimek szétválasztására, a rétegekromatográfia a nemfehérje rész jó kromatografálhatósága miatt mégis csak a lipoproteinek vizsgálatára használható. Így például sikeresen megoldották a hiperlipidémiás betegek lipoproteinjeinek szétválasztását szilikagélén. Hisztonfesték-komplexeket és egyéb bázikus fehérjéket is szét sikerült választani cellulóz rétegen.

5.1.9.3. Az aminosavak rétegekromatográfiája

5.1.9.3.1. Az aminosavak elválasztása szervesetlen alapanyagú rétegen

Aminosavak rétegekromatográfiás analízise szilikagél rétegen előnyösen végezhető. A legkülönbözőbb minőségű szilikagél porokból jó minőségű rétegek készíthetők, de kész szilikagél rétegek is kaphatók az aminosavak vizsgálatához. Analitikai célokra általában 0,25 mm vastag rétegeket használnak, preparatív célokra viszont az 1–2 mm vastag szilikagél rétegek a legalkalmasabbak. Szilikagél vékonyrétegen az aminosav-keverékek szétválasztása csak kétdimenziós futtatással ad megbízható eredményt, mert egydimenziós futtatással az aminosavak egy része nem választható szét egymástól. Kétdimenziós vizsgálatokhoz az alábbi futtatóelegypárok a legalkalmasabbak.

1 dimenzió	2 dimenzió
n-butanol–jégecet–víz (4:1:5)	fenol–víz (7:3, g/g)
CHCl ₃ –CH ₃ OH–17% NH ₃ (2:2:1)	fenol–víz (7:25, g/g)
n-butanol–jégecet–víz (4:1:5)	CHCl ₃ –CH ₃ OH–17% NH ₃ (2:2:1)

A szakirodalomban közölt elválasztásokat még kész réteglapok alkalmazása esetén sem lehet mindig reprodukálni, ezért a futtatóelegyeket, illetve a futtatási körülményeket némiképp módosítva, az elválasztási körülményeket folyamatosan optimalni kell.

5.1.9.3.2. Az aminosavak elválasztása cellulózárrétegen

Az aminosavak cellulózárrétegeken való elválasztása és meghatározása valójában **a papírkromatográfia továbbfejlesztett változataként** fogható fel. A megfelelő módon előkészített cellulózporból általában 0,25 mm vastag réteget állítanak elő, amely rétegeknek előnye, hogy stabilak, ellenállnak az előhívás különféle változatainak, a különféle specifikus reagensek jól használhatók, a reprodukálhatóság elfogadható, és a cellulózárréteg különösen alkalmas denzitometriás kiértékelésre. Hátránya a cellulózárrétegnek, hogy agresszív reagensek nem használhatók, és az aminosavak kimutatási reakcióinak érzékenysége kisebb, mint a szilikagél réteg esetében. A cellulózárrétegeket használjuk néhány aminosav szétválasztásra, a bázikus aminosavak meghatározására és a fehérjehidrolizátumban lévő aminosavak beazonosítására. A

cellulóz szilikagéllel kombinálva javítja az elválasztást, és jelentősen nő az aminosavak ninhidrin érzékenysége is.

5.1.9.3.3. Aminosavak elválasztása ioncserélő rétegen

Aminosavak rétegekromatográfiás elválasztásánál ioncserélő hordozók is használhatók. Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiájánál használt ioncserélő műgyantához hasonló tulajdonságú anyagokat üveglapra kenve az aminosavak két dimenzióban szinte tökéletesen szétválaszthatók. DÉVÉNYI és munkatársai Na^+ -ion formában lévő ioncserélő műgyantát műanyag fóliára rögzítettek, amelynek segítségével a fehérjeépítő aminosavakat analizálták. Az ioncserélő rétegeken végzett munka hasonló más, rétegekromatográfiás vizsgálatokhoz. A meghatározás során hasonló munkafeltételeket kell teremteni, mint az oszlopkromatográfiás szétválasztáskor, az ioncserélő vékonyréteget ugyanis felhasználás előtt ekvilibrálni kell, majd ezt követően cseppenthető fel az elválasztani kívánt aminosavak elegye az ioncserélő vékonyrétegre. Az aminosavak szétválasztását eltérő pH-jú, illetve eltérő nátriumion-koncentrációjú citrátpufferekkel lehet elvégezni. Különböző pufferek alkalmazásával a különböző karakterű aminosavak elválasztását lehet optimálni. El lehet választani az összes fehérjeépítő aminosavat, a bázikus aminosavakat, lehet tesztelni a hidrolizátumot metioninra és lizinre, illetve speciális futtatószer alkalmazni csak a triptofán szétválasztására az összes fehérjeépítő aminosavtól. Vékonyréteg-kromatográfiával gyorsan lehet értékelni különféle anyagcsere-betegségben szenvedők vérszérumának és vizeletének aminosav-tartalmát.

5.1.9.3.4. Az aminosavak kimutatása a rétegekromatogramokon

Szilikagél alapú rétegek esetében ninhidrinoldattal érhetünk el jó eredményt. A ninhidrint oldhatjuk butanolban és ecetsavban, adhatunk az oldathoz kadmium-acetátot és acetont, majd a bepermetezést követően 20 percig $90\text{--}100^\circ\text{C}$ -on a lapokat szárítjuk, aminek során végbemegy az aminosavak és a ninhidrin közötti reakció. Az aminosavak különböző színű (ibolyás–lilas–kékes) foltokat adnak a ninhidrinnel, amelyek komplexképző kationok adagolásával állandósíthatók, bázisok adagolásával pedig speciális színhatások érhetők el. Polikromatikus ninhidrinreagens is használható az aminosavak kimutatására, amelyek közül a klasszikusnak nevezhető reagens az alábbi oldatokból állítható elő. Első oldat: 50 cm^3 0,2% ninhidrinoldat abszolút etanolban + 10

cm^3 ecetsav + 2 cm^3 2,4,6-kollidin. Második oldat: 1%-os $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ abszolút etanolban. Felhasználás előtt a két oldatot 50:3 arányban kell elegyíteni, majd a vékonyréteget ezzel kell bepermetezni. Az aminosavak rendkívül érzékeny kimutatását teszi lehetővé, ha a rétegeket előbb dietilaminnal kezeljük, három percig 110°C -on szárítjuk, majd lehűlés után a réteglapot 0,2%-os metanolos ninhidrinnel fűjük be, és végül tíz percig 110°C -on melegítjük. Ekkor az aminosavak foltjai a gyenge kék színű háttérben intenzíven jelennek meg.

Az egyes aminosavak különféle specifikus reakciókkal is kimutathatók, amelyek alkalmasak lehetnek az illető aminosav azonosítására, esetleg mennyiségi meghatározására. A különféle aminosavak az alábbi reagensekkel adnak speciális színreakciót. **Arginin:** 8-hidroxi-kinolinnal vagy α -naftollal, karbamiddal és brómmal, **aszparaginsav:** ninhidrinnel, borátoldattal és sósavval, **cisztin, cisztein és metionin:** nitroprusszid-nátriummal és nátrium-cianiddal vagy nátrium-aziddal és jóddal, **glicin:** o-ftáldaldehyddel és kálium-hidroxiddal, **hisztidin:** szulfanilsavval, **hidroxiprolin:** dietil-aminnal és ninhidrinnel, **lizin és ornitin:** vanillinnal és kálium-hidroxiddal vagy $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -tal és furfurollal, **arginin, hisztidin és lizin:** bizmut-jodiddal, **prolin:** dietil-aminnal és ninhidrinnel, **szerin, treonin és tirozin:** Na-metaperjodáttal és NESSLER-reagenssel, **triptofán:** p-dimetil-amino-benzaldehiddel vagy o-foszforsavval.

5.1.9.3.5. Az aminosavak félkvantitatív és mennyiségi meghatározása

A különféle módon kialakított rétegekromatogramokon az aminosavakat közvetlenül a rétegeken vagy elúció után határozhatjuk meg. Közvetlen meghatározás esetében a folt nagyság négyzetgyöke és a felvitt mennyiség logaritmus között lineáris az összefüggés, mely alkalmas félkvantitatív meghatározásra. Megbízhatóbbak az eredmények, ha a réteglapokon elválasztott aminosavak értékelésére **denzitométert** használunk, ami **a folt nagyságát és a szín intenzitását integráltan veszi figyelembe**. A rétegekromatogramok mennyiségi értékelésének pontossága lényegesen elmarad az oszlopkromatográfás módszerekétől, előnye azonban a rendkívüli érzékenység, az olcsóság és az, hogy a vizsgálatokhoz kis mennyiségű peptid vagy fehérje is elegendő.

A rétegeken szétválasztott aminosavakat a megfelelő színreakció után a rétegről eluálhatjuk, ezt követően a mennyiségi értékelés fotometriásan is elvégezhető. A

menyiségi kiértékelés mind a vékonyréteg lapon végzett közvetlen, mind a közvetett kiértékelésnél, standardgörbék segítségével lehetséges.

5.1.9.4. Papírkromatográfia

Egymással nem elegyedő vagy csak korlátozottan elegyedő folyadékokban az anyagok, oldékonyságuktól függően, különböző mértékben oldódnak, ami alkalmas a több összetevőből álló elegyek komponenseinek szétválasztására. A megoszlást előidéző oldószer egyikének szabad mozgását adszorpcióval megakadályozzuk, a másik oldószer áramoltatjuk át ezen az adszorbensen. A rendszerben sorozatos megoszlási folyamatok játszódnak le, melynek hatására az elválasztandó elegy összetevői egyenként, különválva hagyják el a kromatografáló rendszert.

A papírkromatográfia esetén az alkalmazott szilárd hordozó a kromatográfias célokra megfelelő papír, a rajta megkötött folyadék az álló fázis, a másik oldószer a mozgó fázis. Az elválasztandó elegy összetevői e két fázis között oszlanak meg. A szilárd hordozó a papírkromatográfia esetében szűrőpapírlap, vagy -csík, ami a papírkromatográfia elnevezését adja.

Az elválasztandó anyagok beazonosítása a **retenciós faktor** (R_f) vagy visszatartási tényező alapján történik:

$$R_f = \frac{\text{a sáv elmozdulása}}{\text{a folyadékfront elmozdulása}} \quad (35)$$

Az R_f értéke függ a papír minőségétől, a papírrostok irányától, a kifejlesztés módjától (leszálló, felszálló, körkörös stb.), az oldat töménységétől, a zavaró anyagok jelenlététől és a kifejlesztés hőmérsékletétől. Adott oldószelegyekre, meghatározott papírral, kísérleti körülmények között, **az R_f -értékek viszonylag állandók.**

A megoszlási kromatográfiában alkalmazott szilárd fázisú **hordozóanyagok** a két oldószer közül az egyiket adszorbeálják. Ha az álló fázis vizes rendszer, akkor az adszorbens a vizet nagymértékben képes megkötni a felületén. Hidrofób anyagok kromatografálása esetén az álló folyadékfázis apoláros oldószer, ezért ilyenkor csökkentett hidrofilitású hordozóanyagot kell használnunk. A hidrofób adszorbensen,

hidrofób álló és hidrofil mozgó fázissal végzett megoszlási kromatográfia a **fordított fázisú kromatográfia**.

A **papírkromatográfiában** alkalmazott kromatográfiás papír nagy nedvszívó képességű, az álló fázis kialakulásához elegendő oldószert tud adszorbeálni, és nedves állapotban is kielégítő szilárdságú. A papír vastagsága folyadékfelszívó képességét határozza meg. A megoszlási kromatográfia folyadékfázisa víz vagy több, vízzel korlátozottan vagy korlátlanul elegyedő folyadék, de lehet meghatározott pH-jú pufferoldatot is használni. Az oldószerek használatánál figyelemmel kell lenni arra, hogy az **R_f -érték függ az oldószer polaritásától**, ugyanis a hidrofil anyagok R_f -értéke az oldószer polaritásával együtt nő.

Egyfázisú oldószerelegyként vízzel korlátlanul elegyedő szerves folyadékok (pl. aceton, metil-alkohol, etil-alkohol, hangyasav, piridin stb.) használatosak. Eredetileg vízzel korlátozottan elegyedő folyadékok esetében, hidrofilező komponensek (ecetsav) alkalmazásával, vízzel minden arányban elegyedő 3-4 komponensű elegyeket (pl. etilacetát–jégecet–víz 3:2:3) hoztak létre. **Kétfázisú oldószerelegyként** kiválóan alkalmasak a butanol–víz, butanol–ecetsav–víz, fenol–víz különböző arányú elegyei.

A **papírkromatográfia eszközei** a kromatografáló szekrény, mely 50-80 cm magas és 30x60 cm alapterületű saválló acél vagy üveg, a kromatográfiás papír, a mintafelvívő mikropipetták, a futtatószer, az előhívó reagensek, és egy szárítószekrény.

A **megoszlási papírkromatográfia** lehet leszálló-, felszálló-, vízszintes csík- és körpapír-kromatográfia. Az elválasztandó elegy koncentrációja az oldatban mindegyik esetben 0,5-2,0% közötti. A felcseppentéshez mikropipettát, szűk kapillárist használunk ügyelve arra, hogy a szétválasztandó oldat foltja kb. 5 mm átmérőjű legyen, és mintegy 0,01-0,3 mg anyagot tartalmazzon. A felcseppentés során töményítést végezhetünk a papíron a felvitt csepp óvatos beszárításával.

Leszállókromatográfia esetén a papír végétől 8-10 cm-nyire, egymástól 2-4 cm távolságban helyezünk el az egyes anyagkeverékek cseppjeit, nagyobb mennyiségek kromatografálása esetén viszont sávos felvitelt alkalmazunk. A futtatószeret tartalmazó edény a kromatografáló-berendezés felső részében van, ebbe merül bele a papír vége. Az oldószer részben a kapillaris erő, részben a nehézségi erő hatására lefelé halad a papírban. A kromatogramot addig futtatjuk, amíg a folyadékfront meg nem közelíti a

papír végét. Ha az oldószert tovább futtatjuk a papíron, túlcsepegő futtatás hajtunk végre.

Felszállókromatográfia esetén az elrendezés a leszálló módszer fordítottja. A papírcsík megcseppentett vége a berendezés alján elhelyezett oldószerbe merül, a futtatószer pedig a kapilláris erők hatására fölfelé halad.

Vízszintes kromatográfia esetén a kiszabott papírcsíkokat vízszintesen helyezzük el, az oldószert pedig papírnyelv segítségével közvetítjük hozzá. A **körpapírkromatográfiában** a kromatográfiás papírból 8-10 cm-es sugarú kört vágunk, és az oldószer a megcseppentés helyétől, a középponttól vízszintesen halad a papírban a kerület felé, és az anyagkeverékek egyes alkotói koncentrikus körök alakjában válnak szét.

Nyújtott papírkromatográfia esetén ha az oldószerfront eléri a papír szélét a futtatást megszüntetjük, a kromatogramot megszáritjuk, és hasonló oldószerrel újra futtatjuk.

A **kétdimenziós papírkromatográfiát** sokkomponensű keverék szétválasztására használjuk, ha az R_f -értékek egymáshoz közel esnek, és egydimenziós futtatással nem érhető el a kívánt elválasztás. Az elválasztani kívánt oldatok elegyét a papír bal alsó sarkába cseppenjük, az első futtatószerrel megfuttatjuk, majd szárítás után 90 fokkal elforgatva ismételten ugyanazzal, vagy másik futtatószer eleggyel újabb futtatást végzünk. A futtatás iránya a második esetben tehát az elsőre merőleges.

A **papírkromatogramok értékelése** során a kromatogramot kiemeljük a berendezésből, ha a színes anyagok közvetlenül megfigyelhetők, még nedvesen megjelöljük az oldószerfrontot, a foltok súlypontját becsléssel meghatározzuk, és grafit ceruzával megjelöljük. Színtelen anyagok esetén ultraibolya fényben végzett megfigyeléssel, alkalmas előhívó szer segítségével, vagy a komponenseket színes származékokká alakítva lehet a kromatogramot értékelni. Az előhívó szer a papírra gáz, gőz vagy folyadékpermet alakjában vihető fel. Leggyakoribb mód a reagensoldat rápermetezése a kromatogramra, melyet követően az előhívást gyakran melegítéssel kell összekapcsolni. A színes foltokat is körülrajzoljuk és megjelöljük a súlypontjukat, hogy amennyiben később a színükből veszítenének, vagy az teljesen eltűnne, további értékelést is tudjunk végezni.

5.1.9.4.1. Minőségi és mennyiségi meghatározás

A **minőségi analízis** az R_f -értékek megállapításával, összehasonlító, azonosító anyagok együttfuttatásával történik. A **mennyiségi analízis** hígítási sorral történő együttfuttatással, denzitométerek segítségével végzik. A **denzitométerek** spektrofotométerek, melyek a megvilágított kromatogramon áteső vagy arról visszavert fény intenzitását mérik, illetve regisztrálják. E mellett az értékelés lehetséges kioldás, elúció után is. A **futtatáshoz használt oldószereket** úgy kell megválasztani, hogy a vizsgált anyagok R_f -értékei 0,3-0,7 közé essenek. A **kétdimenziós kromatogramoknál** minden egyes komponens modelloldatából, egydimenziós futtatással, külön-külön mindkét oldószerben meghatározzuk az R_f -értékeket, és kiszámítjuk az illető anyag feltjának várható helyét.

5.2. Elektroforézis és izoelektromos fókuszálás

5.2.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása

Az **elektroforézis** során töltéssel rendelkező anyagok vándorolnak az elektromos térben, mely jelenség analitikai vagy preparatív célokra használható. Az elektroforézis anyagok egyszerű szétválasztására, minőségi vagy mennyiségi meghatározásra, a részecskék mozgékonyasága alapján anyagok jellemzésére használható. Az elektroforézis olyan elválasztási folyamat, amelyben **a szeparálandó komponensek elektromos erőterben különböző sebességgel vándorolnak**. A részecske vándorlási sebességét az elektrolit oldatban főképpen annak töltése és az elektromos térerő szabja meg. A mozgás sebessége függ a részecske alakjától és nagyságától is, ezért az azonos töltésű, de különböző alakú vagy nagyságú molekulák, vagy azonos nagyságú vagy alakú de eltérő töltésű részecskék ennek alapján elválaszthatók.

Az elválasztandó molekulának magának is lehet töltése, vagy a töltést eredményezheti a molekula felületére adszorbeálódott ion. A töltéssel rendelkező részecskéknek a közegben való mozgását gátolja a súrlódási ellenállás, amely a részecske átmérőjével és az oldat viszkozitásával arányos. A mozgást gátolhatja még az elektrolitoldat, melynek az elválasztandó anyag molekuláival ellentétes előjelű ionjai burokszerűen körülveszik a részecskéket. Ez az ionfelhő hidrátkörköt vonz magához, mely gátolja a részecskék mozgását. A fékezőerő annál nagyobb, minél nagyobb a puffer ionerőssége, ezért a vizsgálandó molekula vándorlási sebessége elektromos erőterben az ionerősség növekedésével csökken.

Az **elektroforézis** valójában anyagkeverékek analitikai vagy preparatív elválasztására szolgáló eljárás, mely **az egyes komponensek elektroforetikus mozgékonyságának különbségén alapszik**. A mintaadagolás módja szerint lehet szakaszos vagy folyamatos üzemű, az elválasztáshoz alkalmazott közeg minősége szerint pedig megkülönböztethetünk szabad és szilárd hordozón végzett elektroforézist (a hordozó lehet papír, keményítő, agar, cellulóz-acetát, porózus üveg vagy poliakrilamid-gél). A használt feszültség nagysága alapján ismerünk kis-, közép- és nagyfeszültségű elválasztásokat.

Az elektroforézisnek két alapvető módszere van: A Tiselius-elektroforézis vagy vándorló határfelületek módszere, és a **zónaelektroforézis**. A **Tiselius-elektroforézis** során az U-alakú csőben levő fehérjeoldat pufferben oldott, eltérő mozgékonyaságú fehérjéket tartalmaz. A nagyobb mozgékonyaságú fehérjék és a kisebb mozgékonyaságú fehérjék tiszta oldata egymástól elkülönül. A módszer anyagkeverékek jellemzésére és mennyiségi meghatározására szolgál.

A **zónaelektroforézis** során a vizsgálandó anyag oldatát keskeny sáv (zóna) alakjában visszük be az elektrolitoldatba. Ha az anyagok mozgékonyasága eléggé eltérő, akkor a komponensek tökéletesen szétválaszthatók. Az elválasztáskor elkülönült sávok keletkeznek, melyeket egymástól tiszta oldószer választ el. Ezzel a módszerrel az egyes anyagok rendkívül tisztán állíthatók elő.

A **stabilizált zónaelektroforézisnél** az anyagot nemcsak az oldatban (a foltok elmosódnak), hanem valamely hordozóanyagon vándoroltatjuk. A részecskék mozgékonyasága a hordozó-anyagokban kisebb, ezért a részecske a hordozóanyagban hosszabb utat tesz meg, mert a hordozó szerkezete zezugos vándorlásra kényszeríti a részecskét.

A **papírelektroforézis** során a papírban felitatott pufferoldatban történik a vizsgálandó anyag elválasztása. Az eljárás során kisfeszültség esetén 0-300 V, közép-feszültségnél 300-1500 V, nagyfeszültség esetén 2000-3000 V egyenfeszültséget alkalmazunk. A papírcsíkot az elektroforézis folyamán zárt, nedves kamrákba helyezzük, ahol a papír két vége a pufferrel megtöltött elektródedénybe ér. A papírelektroforézis-elválasztást befolyásolhatja a puffer áramlása, a papír minősége és az elektrooszmózis. Az elektroforézisnél ugyanazokat a papírokat alkalmazzuk, mint a papírkromatográfiánál.

Az analízis során célszerű a vizsgálandó oldatot a papírcsík közepén elhelyezni, mert az elektroforézis folyamán az elektródokon lejátszódó elektrolízis következtében pH-eltolódások játszódhatnak le. A papírelektroforézis időtartama 3-16 óra lehet.

Két dimenzióban végezve az elválasztást jelentősen növelhető az elválasztás határfoka. Mivel a különböző pufferekben a mozgékonyaságok eltérők, a második futtatáskor az első futtatáskor együtt elmozduló anyagok egymástól szétválaszthatók.

A **folytonos elektroforézis, vagy elektrochromatográfia** esetén az elektromos erőter irányára merőlegesen elektrolitot áramoltatunk, a vizsgált anyag oldatát a felvitel helyén állandóan pótoljuk, melynek során a szétválasztott frakciók legyezőszerű sávokban különülnek el.

Keresztező (crossing) papírelektroforézist alkalmazva két különböző anyagot visznek fel a papírhordozó két pontján. Az elektroforézis folyamán a két anyag útja egymást keresztezi, és amennyiben egymással reakcióba lépnek, a találkozás helyén reakciótermék képződik, ezért a vándorló anyagok útja megváltozik. Ha nincs reakció, az anyagok irányváltoztatás nélkül vándorolnak tovább.

Az **immunelektroforézis** során az antitesteket vándoroltatjuk a felvitt immunszérum irányába, és vizsgáljuk a csapadék keletkezésének tényét.

A papíron kívül **elektroforézisre használhatók még** a cellulózacetát-membránok, a szemeses anyagokból készült oszlopok, rétegek, az üvegpor, a műanyagpor [polivinilklorid vagy poli(vinil-klorid) és poli(vinil-acetát) kopolimerje], a keményítő, a cellulózpor és a hidratált gélrészecskék (Sephadex, agaróz).

A **gélelektroforézises** technikák közül a **keményítógél-** és **poliakrilamidgél-** elektroforézis a legelterjedtebb. A natív állapotban oldhatatlan keményítő részleges savas hidrolízissel szobahőmérsékleten gél képző termékké alakítható, ami magasabb hőmérsékleten elfolyósodik. A keményítógél-réteget vízszintes vagy függőleges helyzetben lehet alkalmazni. Ismert technikák még az **agar-**, illetve **agarózgél elektroforézis**.

A **poli(akrilamid)gél-elektroforézis** alkalmas fehérjék és nukleinsavak vizsgálatára. (A fehérjék analíziséről a fejezet végén részletes leírás található). A gél akrilamidból és N,N'-metilén-bisakrilamidból (BIS) készítik vinilpolimerizációval, katalizátorok és iniciátorok jelenlétében. Az akrikamid és a BIS mennyiségének növelése keményebbé és törekenyebbé, a koncentrációk csökkentése viszont lágyabbá és rugalmasabbá teszi a gélét. Kémiai polimerizálásra az ammónium-perszulfát–N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin (TEMED) rendszert alkalmazzák.

A poli(akrilamid)gél hordozó pórusai révén aktívan részt vesz az elválasztásban. Minél nagyobb a gélkészítéshez felhasznált akrilamid-monomer mennyisége, annál kisebb a

gélben az átlagos pórusméret, a makromolekulák mozgékonyasága viszont fordítottan arányos a pórusmérettel. A fehérjék relatív vándorlási sebességének logaritmusát a molekulatömeg függvényében ábrázolva egyenest kapunk, amely összefüggés a molekulatömeg meghatározására alkalmas.

A gélelektroforézis két elterjedt technikája a gélpálcikákban (rudakban) végzett „diszk”-elektroforézis és a lapelektroforézis. A **diszkelektroforézis során** a gél kb. 5 mm átmérőjű üvegcsövekben állítjuk elő, melynek során a függőlegesen álló cső alsó részébe kis pórusú elválasztógél, ennek tetejére pedig a nagy pórusú gyűjtőgél kerül. A gyűjtőgélben a fehérjék koncentrációja során a mintát a gyűjtőgél felszínére visszük, majd a csöveket óvatosan feltöltjük elektródpufferrel. A **lapelektroforézis egyik előnye** a gélpálcikákhoz képest az, hogy a géllapokon egyszerre több anyag analízise lehetséges.

Gélelektroforézis során alkalmazott egyéb anyagok elősegítik a fehérjék oldódását, esetleg a nagyobb komplex molekulák disszociációját idézik elő. A fehérjék oldására használnak 3-12 mol/dm³ koncentrációjú karbamidoldatot, amely a hidrogénkötéseket bontja. A diszulfidhidak bontására szolgál a β -merkapto-etanol és a ditiotreit, és detergens (nátrium-dodecil-szulfát (nátrium-lauril-szulfát, SDS) is használatos, mely elősegíti az oldódást, komplexet képez a fehérjékkel, melynek következtében a komplexeknek nagy negatív töltésük lesz. Ez utóbbi esetben a fehérjék eredeti töltése nem érvényesül, a mozgékonyaság megközelítően lineárisan alakul a molekulatömeg logaritmusával, tehát ez a módszer alkalmas a **molekulatömeg meghatározásra**.

Az elektroforézises technikák hatékonyságának növelésére **gradiens zónaelektroforézist** alkalmaznak. A **sűrűséggradiens** estében az oldat sűrűsége az oszlopban lefelé növekszik. Az elválasztáskor különböző összetételű (3,5%, 4,75%, 7,0% és 10%) akrilamidtartalmú géleket rétegzünk egymásra, majd a futtatás a csökkenő porozitás irányában végezzük. A módszerrel 3-4 óra alatt rendkívül nagy felbontás érhető el, hisz ez a módszer jelentős mértékben eltérő molekulatömegű anyagok analízisére is alkalmas.

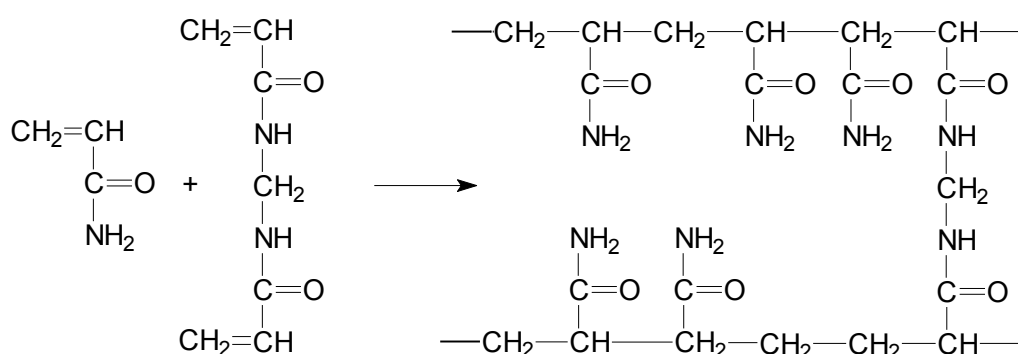
A pH-gradiensben a fehérjék addig vándorolnak, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH-sávot. Mivel ott töltésüket elveszítik, azzal együtt

mozgékonyosságuk is megszűnik. A pH-gradiens előállítható speciális amfolitokkal. A pH-gradienssel végzett elektroforézist **izoelektromos fókuszálásnak** nevezik.

Az analitikai eljárások közül a múlt század nyolcvanas éveig legelterjedtebb volt a papírelektroforézis, manapság azonban a poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE) szinte teljesen háttérbe szorította a többi módszert. A PAGE alkalmazásának legszembetűnőbb oka nagy felbontóképessége, hisz míg a papírelektroforézissel a szérumfehérjéket csak 5-7 frakcióra, addig a PAGE-sel akár 50-60 frakcióra is szét lehet választani. Fentiek miatt a papír-, a cellulóz-acetát-membrán-, a keményítő-, az agar-gél elektroforézises technikákkal nem foglalkozunk, röviden ismertetjük viszont a PAGE alapjait.

5.2.2. A poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid, az akrilamid és az N,N'-metilén-bisz-akrilamid (BIS) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke; a térhálósító BIS a poliakrilamid-láncokba beépülve szabad funkciós csoportjaival, a szomszédos láncokkal is reagálni képes a 83. ábra szerint.



83. ábra Az akrilamid és a BIS reakciója

A hálószerkezet kialakulásával polimer gélgomolyagok keletkeznek, melyekben a poliakrilamid-láncok a maximális entrópiának megfelelően szabálytalan alakot vesznek fel. Az akrilamid- és a BIS-koncentráció, valamint a polimerizáció foka megszabja az átlagos pórusnagyságot, a pórusnagyság pedig megszabja az azokon még átszűrődő molekulák maximális tömegét.

A poliakrilamid-gél előnye a kémiai stabilitás és indifferencia, a nagyfokú transzparencia, a tág határokon belül megválasztható pórusnagyság, az adszorpció és az

elektrooszmózis hiánya és a legtöbb oldószerben való oldhatatlanság. Fentiek miatt **a PAGE szinte valamennyi fehérje elválasztására és analízisére alkalmas**; jól szeparálhatók vele mind a neutrális, mind a bázikus, mind a savanyú karakterű fehérjék, mert a poliakrilamid-gél teljes mértékben inert, nem változtatja meg az elválasztandó fehérjemolekulák natív tulajdonságait. Ha a gél és a puffer összetételét jól választjuk meg, bármilyen molekulatömegű, illetve tulajdonságú fehérjét a legjobb felbontóképességgel tudunk elválasztani.

A poliakrilamid-gél elektroforézis folyamata a következők szerint összegezhető. A szétválasztani kívánt fehérjekeverék a **mintagélbe** kerül, amely nagypórusú, kis akrilamid-koncentrációjú gél. Az alatta levő réteg, a **gyűjtő- vagy elosztógél**, szintén nagypórusú, benne koncentrálódik az elektroforézis első fázisában az elválasztandó anyag. Az elválasztógél kisebb pórusú, melyben a fehérjemolekula-keverék frakcióira szeparálódik. A gélekben különböző pufferoldatok vannak, melyek a vezető-, illetve követőionokat tartalmazzák. A különböző összetételű gél- és elektródpufferek következtében a fehérjemolekulákkal együtt kétféle ion vándorol az elektromos erőter hatására; a gélben lévő puffer vezető ionjai, az ún. **vezetőionok**, és az elektródpufferből származó ún. **követőionok**.

Az elválasztás kezdetén a minta- és a gyűjtőgélben csak vezetőionok találhatók, a követőionok pedig kizárólag az elektródpufferben vannak. Az áram bekapcsolásakor a vezetőionok nagyobb mozgékonyaságuk következtében a gyűjtőgélben a fehérjék és a követőionok előtt mozognak, egy kisebb vezetőképességű zónát hagyva maguk mögött. Mivel **a vezetőképesség és az elektromos térerő fordítottan arányos**, a kisebb vezetőképességű zóna nagyobb térerőt kap, ami a fehérjéket és a követő ionokat felgyorsítja, melyek a vezetőionok mögött azonos sebességgel vándorolnak. Amint a vándorló fehérjezóna a gyűjtő- és az elválasztógél határára ér, megváltozik a pH és a pórusnagyság. Az elválasztógél pH-jának hatására a követőionok disszociációja és így mozgékonyasága többszörösére növekszik, ezáltal sebességük majdnem eléri a vezetőionokét, meghaladja minden fehérjemolekula mozgékonyaságát, melynek következtében a követőionok a fehérjék előtt, a vezetőionok mögött fognak haladni.

A PAGE alapvető vegyületei az akrilamid és a bisz-akrilamid, a katalizátorok, melyek a térhálós szerkezet kialakításáért felelősek, a különféle detergensek, melyek a PAGE alkalmazási lehetőségeit tovább bővítik és tökéletesítik, és a pufferoldatok, melyek az

elválasztásnál az optimális pH-t és a különböző ionokat szolgáltatják. A különböző gélekészítési technikák ismertetése nem tartozik szorosan a tárgyhoz, ezért ettől eltekintünk. Azt csak megemlítjük, hogy a korábban alkalmazott **pálcikaalakú géleket a laptechnika szinte teljes egészében kiszorította**, mert ez utóbbi sok minta párhuzamos futtatására alkalmas, az elektroforézis folyamán keletkezett hő elvezetése biztosabb, kétdimenziós elválasztásra is lehetőséget ad, a denzitometriás kiértékelés is pontosabb, a dokumentálás könnyebb, és könnyen alkalmazható az autoradiográfiás módszer is.

5.2.2.1. A fehérjeminták előkészítése, gélre vitele és az elektroforézis folyamata

A mintafelvétel előtt meg **kell határozni a vizsgálandó anyag fehérjetartalmát**, hisz attól függően, hogy a minta hány komponenst tartalmaz, **egy mintahelyre 10-100 µg fehérjét** kell feljuttatni annak ellenére, hogy egyetlen fehérje 0,1 µg mennyiségében is jól detektálható. 30-50 vagy több komponenst tartalmazó minta esetén **200-400 µg fehérjét kell a gélre felvinni**. Biológiai folyadékokat a fehérjekoncentrációtól függő mennyiségben akár közvetlenül is a gélre lehet vinni, élelmiszer- és takarmányfehérjék esetében azonban az analízist jelentős mértékű tisztításnak kell megelőzni. Az előkészítés során 10-100 µg fehérjét tartalmazó oldathoz 0,1 cm³ puffert adunk, melyben előzőleg 0,1%-os metanol-ecetsav (9:1)-ban oldott bróm-fenolkéket teszünk, mely mint jelzőfesték a frontvonal haladását mutatja az elektroforézis folyamán. Ebből a keverékből lehetőleg 10-20 µl anyagot rétegzünk egy-egy mintahelyre. Nagy ionerősségű oldatok esetében az elektroforézist megelőzően feltétlenül dializálni kell a hígított gyűjtőgéllal vagy a hígított elektódpufferrel szemben.

A minta felvitele után indíthatjuk az elválasztást. Alkalikus pufferrendszerekben a fehérje negatív töltésének következtében az anód felé vándorol. Az egyenáramú áramforrást úgy kell megválasztani, hogy a feszültség és az áramerősség állandó kontroll alatt maradjon. **A mintát kisebb áramerősség mellett koncentráljuk (1mA/gél), majd 2-5 mA/gélre növelve végezzük a fehérjemolekulák szétválasztását.** Minden eltérő gélméret és puffer esetében más az optimális feszültség és áramerősség, azt azonban figyelembe kell venni, hogy ha a feszültség és az áramerősség az optimálisnál kisebb, akkor az elválasztott zónák életlenek lesznek, ha

viszont nagyobb, akkor a keletkezett hő rontja a szeparációt. A futtatást addig folytatjuk, amíg a jelzőfesték a gél szélétől 0,5-1 cm távolságra nem ér, amikor az áramforrást kikapcsoljuk, és a géleket kisedjük.

A géllapok eltávolítása a készülék konstrukciójától függ. Egyes esetekben vékony tűvel és vízszaggárral lehet eltávolítani, majd az elvált géllapot ajánlatos azonnal fixálóoldatot tartalmazó edénybe helyezni. A fixálás megakadályozza a fehérje kidiffundálását a gélből, és a festőoldatot is kíméli. Fixálás után a fehérjezónákat festéssel tesszük láthatóvá, majd sor kerülhet a fehérjefrakciók minőségi és mennyiségi kiértékelésére. Festésre leggyakrabban az amidofeketét vagy a Coomassie-kéket használjuk, melyek gélen megkötődő feleslegét mosással kell eltávolítani.

A proteinogram kiértékelése festés nélkül is megvalósítható az UV fényabszorpció segítségével, de alkalmas erre a fluorimetriás értékelés is fluoreszcens festést követően. A gyakorlatban jobban elterjedt azonban a festett proteinogramok értékelése, melynek során a festékek a fehérjemolekulák szerkezeti sajátosságai miatt különböző módon kötődnek. A megfestett frakciók kvantitatíve ezért csak ugyanazzal a fehérjével felvett kalibrációs görbe alapján értékelhetők. A mennyiségi értékelés követelménye a jó elválasztás, a denzitométer és az integrátor, illetve a számítógép szoftver. Ilyen esetben is rendkívüli óvatossággal kell eljárni, hisz a mennyiségi értékelést befolyásolhatja a sávok nem megfelelő elválása, és ha a detektor érzékenysége nem lineáris az abszorpcióval.

Az elkészült proteinogramot 7%-os ecetsavban a festés intenzitásának csökkenése nélkül hosszú ideig lehet tárolni. Géllapokat dehidratálással is lehet tartósítani.

5.2.2.2. Speciális alkalmazások az élelmiszerfehérje kutatásban

Az élelmiszerfehérjék analízisére a PAGE sikeresen alkalmazható, figyelemmel kell lenni azonban arra, hogy az elválasztással kapott frakciók száma nem mindig adja meg a mintában lévő különböző fehérjekomponensek valóságos számát. Ugyanaz a fehérje vagy enzim több csík formájában is megjelenhet a proteinogramon, mert ez esetek egy részében különbség lehet az izomer molekulák méretében, melyet a töltésbeli különbség vagy a kisebb ligandumkötés okozhat, és a frakciók konformációja is különböző lehet. Előfordulhat az is, hogy a frakciók heterogenitását az eljárás során elkövetett hiba, a puffer és a fehérjemolekulák közötti kapcsolat, valamint az egyes fehérjefrakciók

közötti kölcsönhatások következtében előállt változások okozzák. Így vagy az adott fehérjemolekula részleges disszociációja következhet be, vagy a fehérje aggregációja állhat elő, vagy a konformációs izomerek közötti kapcsolódás jöhet létre, és a fehérjemolekulák közötti komplexképződés sem zárható ki az elválasztás folyamán.

A PAGE alkalmazható élelmiszerfehérjék molekulatömegének meghatározására is. A fehérjék Na-dodecil-szulfáttal (SDS) való kezelése a molekulákat azonos töltésű random láncokká alakítja, mely az SDS gél-elektroforézis molekulatömeg meghatározására történő alkalmazásának az alapja. A különféle módszerek a fehérjéket SDS-sel inkubálják, merkaptó-etanollal kezelik, majd detergenst tartalmazó gél- és pufferrendszert használnak, melynek során **az SDS-fehérjekomplex elektroforetikus vándorlása a molekulatömeggel lesz arányos.** A vizsgálandó fehérje mozgékonyágát ismert molekulatömegű fehérje mozgékonyágával összehasonlítva a molekulatömeg meghatározható. Kalibrációs görbe készítése céljából meghatározzuk különböző ismert molekulatömegű fehérjék mobilitását, majd rendszerint **a molekulatömeg logaritmusát a mobilitás függvényében ábrázolva olyan hitelesítő görbét kapunk,** melynek segítségével a vizsgált fehérje molekulatömege a relatív mobilitás alapján meghatározható.

A PAGE jól használható **enzimek specifikus kimutatására, elválasztására és mennyiségi meghatározására** is. Ezen túl a PAGE alkalmazható az élelmiszerfehérje kutatásban különféle fehérjék szétválasztására. A többkötetnyi alkalmazás közül kiemelkedő, hogy a PAGE-t alkalmazták a bab oldható fehérjéinek izolálására, közeli rokonságban lévő növények rokonsági fokának meghatározására, állati eredetű fehérjék (tej, tojás, hús) fehérjefrakcióinak elemzésére és az izomszövet oldható fehérjéinek jellemzésére. Az utóbbi időben olyan bonyolultnak tűnő feladatokat is sikerült a PAGE-val megvalósítani, mint a különböző fajú állatok tejének megkülönböztetése és a keverési arány meghatározása. Ennek során VÖRÖS és mtsai. egyrészt a kancatej fehérjefrakcióit tanulmányozták, másrészt módszert dolgoztak ki a kancatejhez hozzákevert tehéntej mennyiségének meghatározására.

5.2.3. Különféle fehérjék szétválasztása és meghatározása izoelektromos fókuszálással

Az elektroforézis konstans pH-jú gélek és pufferek segítségével történik, ezzel szemben az izoelektromos fókuszáláshoz (IEF) olyan **pH-gradienst hozzunk létre, amely a katódtól az anódig folyamatosan változik**, így tulajdonképpen pH-gradiens segítségével végezzük az elektroforézist. A pH-gradiensben az egyes fehérjék töltésüknek megfelelően vagy a katód, vagy az anód irányába vándorolnak, ott azonban, ahol a pH az egyes molekulák izoelektromos pontjának megfelelő, megállnak, hisz ott töltéssel nem rendelkező, semleges molekulaként viselkednek. Összefoglalva tehát **a fehérjék abban a pontban fókuszálódnak, ahol a közeg pH-ja a fehérje pI-jével azonos**. A módszer kidolgozását az tette lehetővé, hogy előállították a vivő amfolin-preparátumot, amely különböző poliamino- és polikarboxisavak keveréke, mellyel sikerült megvalósítani a folyamatosan változó pH-t, mely pH-gradiens a meghatározás során stabilis. Az alifás poliamino- és polikarboxisavak jól oldódnak vízben, pH-értékük különböző, az egyes komponensek pH-ja 3 és 10 között változik, de megfelelő módszerrel a pH-intervallum választható például 4 és 6, 5 és 8, 7 és 9 vagy 8 és 10 között. A vivő-amfolineknek 280 nm-en van abszorpciója, ami kis fehérjekoncentráció esetében nagyobb hibát okozhat. Ha a fehérjetartalmat színreakcióval akarjuk meghatározni, akkor mindenképpen dialízist kell alkalmazni legalább 500-szoros térfogattal szemben, 72 órán át, az oldószert 10–12 óránként cserélve.

Az izoelektromos fókuszálást szacharóz gradienssel is kombinálhatjuk, melynek segítségével elsősorban **a fehérje izoelektromos pontját tudjuk megállapítani**. Napjainkban legnagyobb jelentősége a poliamid-gélben végzett izoelektromos fókuszálásnak van, melynek segítségével többek között a tejfehérje genetikai variánsokat is szét lehet választani. Az izoelektromos fókuszálás alkalmas lehet arra is, hogy különféle fajok egymáshoz kevert, hasonló karakterű fehérjeit szét lehessen választani, és mennyiségüket meg lehessen határozni. VÖRÖS és mtsai. arra vállalkoztak, hogy a drága kancatejhez hamisítási célból hozzákevert tehéntejet egyrészt kimutassák, másrészt annak mennyiségére közelítő információt kapjanak. A fehérjefrakciók elválasztását CA-IEF (+10 mg glicin)-rendszerben, 124x258x0,2 mm-es gélen végezték, 0,5 M H₃PO₄ anódpuffer és 0,5 M NaOH katódpuffer alkalmazásával. A minta hígítása 10 mg/cm³, a mintafelvétel módja szűrőpapír, a felvitt mennyiség pedig

11 µl/slot volt. A fixálást 12,5%-os triklórecetsavval, a festést pedig 0,15%-os Serra-blue-G-vel végezték.

Az izoelektromos fókuszálással a kanca- és a tehéntejből készült elektroforetogramokat összehasonlítva feltűnő a két állatfaj tejfehérje szerkezetének különbsége, amely legmarkánsabban a tehéntej α_1 -kazein komponenseinek helyzetével és azok intenzív tónusával jellemezhető. A kancatej ugyanezen a helyen nem tartalmaz fehérjekomponenseket, ezért ha a hasonló körülmények között végzett IEF során a kancatejmintában ebbe a tartományba eső fehérjék fordulnak elő, akkor biztosan állítható, hogy a kancatejet más, vélhetően tehéntejjel elegyítették. Ha az elektroforetogramról denzitogramot is készítünk, akkor a kontroll tejminták felhasználásával az elegyítés mennyiségi arányára is kaphatunk információt.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Csapóné Dr. Kiss Zsuzsannának, Dr. Kiss Ildikónak, Bacskainé Bódi Évának és Soós Áronnak a könyv szerkesztéséhez nyújtott tanácsaikért.