

NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA (HPLC) GYAKORLAT

Rövidített jegyzet

Forrás: Dr. Lázár István: Nagynyomású folyadékkromatográfia, Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 2009.

1. Bevezetés

A nagynyomású (vagy nagy teljesítményű) folyadékkromatográfiát, amely mintegy 40 éve ismert, ma az analitikai és a szintetikus kémia egyik legértékesebb elválasztási eljárásának tartjuk. Előnyei közé tartozik, hogy a méréseket szobahőmérsékleten vagy annak közelében végezhetjük, így termikusan érzékeny anyagok is vizsgálhatók vele, megfelelő szerkezeti anyagok felhasználásával pedig biológiai eredetű minták is közvetlenül analizálhatók. A kromatográfiás körülmények (kolonna töltetanyaga, eluens minősége, stb.) megfelelő megválasztásával szinte minden vegyületcsalád és minta vizsgálatára alkalmas, sőt esetenként összetett reakcióelegyek komponenseinek üzemi léptékű szétválasztására is alkalmazzák. Hozzáértő kromatográfus kezében a HPLC olyan eszköz, amellyel a gyógyszerekkel, szerves kémiai vagy biológiai eredetű mintákkal kapcsolatos legtöbb analitikai jellegű probléma nagy pontossággal és nagy megbízhatósággal megoldható.

Előnyei mellett nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy még egy alapkiépítettségű HPLC készülék is meglehetősen költséges. A készülék üzemeltetése szintén jelentős anyagi terhet jelent. A legutóbbi években elterjedőben vannak azok a nagyon kis belső átmérőjű, illetve nagyon finom töltetű kolonnák, amelyekkel az analitikai felbontóképesség megtartása, sőt növekedése mellett a felhasznált eluens mennyisége, illetve a szükséges mérési idő a korábbi mennyiség töredékére csökkenthető. Az ilyen kolonnák egy részét csak a legmodernebb, ún. ultranagy (1000 bar) nyomású készülékekben lehet használni. Az általános célokra szolgáló kolonnák mellett ma már számos, célzottan csak egy bizonyos vegyületcsalád vizsgálatra kifejlesztett kolonnatípusok is hozzáférhetők.

2. A kromatogramok jellemzésére szolgáló paraméterek

A kromatogram és az abban szereplő csúcsok jellemzésére több paraméter szolgál, amelyek kapcsolatát a különféle fizikai és kémiai állandókkal, valamint az elválasztási folyamatban részt vevő komponensek anyagi jellemzőivel a kromatográfia elmélete részletesen tárgyalja. A továbbiakban azokkal a paraméterekkel ismerkedünk meg, amelyeket a folyadékkromatográfia mindennapi gyakorlatában használnak.

Szeretnénk kihangsúlyozni, hogy a paraméterek nem öncélúak. Nem azért vannak, hogy elméleti számításokat lehessen velük végezni. Az elmélet a gyakorlatban használt paraméterek magyarázatára, a mélyebb összefüggések felderítésére szolgál. A modern folyadékkromatográfia elméletét a gyakorlati tapasztalatokkal összevetve az utóbbi években olyan számítógépes programokat fejlesztettek ki, amelyek képesek elfogadható pontossággal előre megbecsülni egy még soha nem vizsgált, új vegyület kromatográfiás tulajdonságait, valamint a környezeti paraméterek hatását az elválasztásra. Az ilyen programok nagy segítséget jelentenek a módszerfejlesztő kromatográfusok számára, hiszen az új vizsgálatok kidolgozásához szükséges időt a töredékére csökkenthetik.

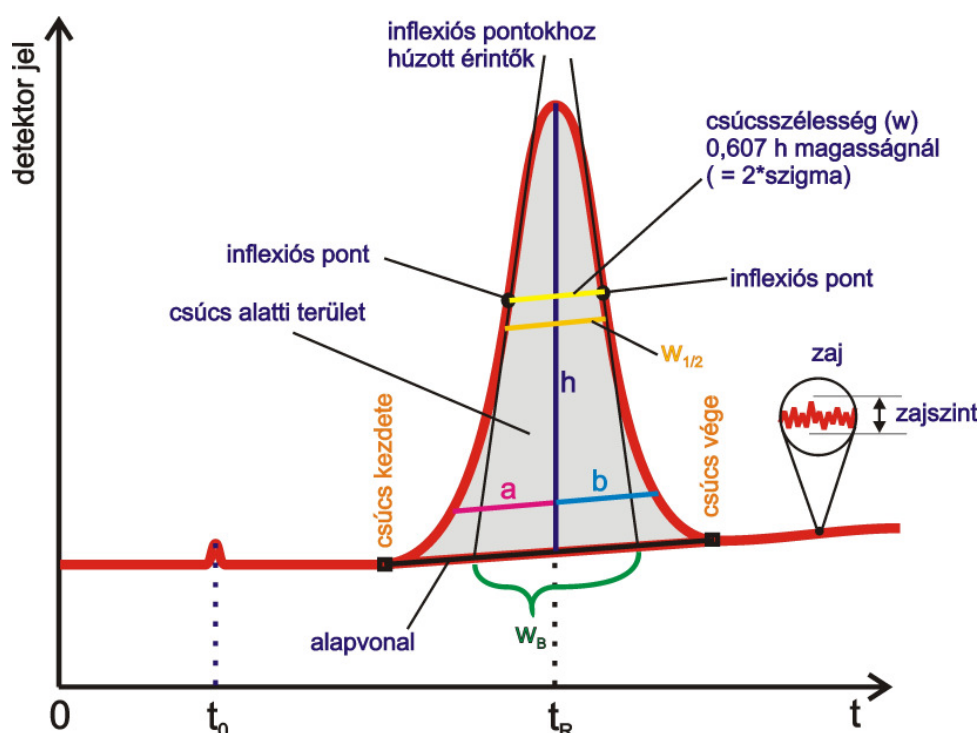
Két nagy gyakorlati probléma körül csoportosulnak a kromatográfiás paraméterek. Az egyik probléma az egyedi csúcsok megtalálása, jellemzése, kiértékelése. Ezek a paraméterek képezik az alapját a minőségi és a mennyiségi meghatározásoknak, így ismeretük elengedhetetlen. Az egyedi csúcsokra

vonatkozó paraméterek azonban nem adnak felvilágosítást az egyik csúcshoz a másik csúcshoz viszonyított helyzetére, két vagy több csúcs szétválására vonatkozóan.

A második problémakör, amivel a kromatográfiában foglalkozni kell, a csúcsok egymáshoz való viszonyának, az elválasztás jóságának, szelektivitásának a megadása, a kromatogram egészének a mennyiségi jellemzése. Ezekkel a paraméterekkel tudjuk azt megadni (és bizonyítani), hogy a módszerünk valóban alkalmas a vizsgált komponensek mennyiségi és minőségi vizsgálatára. Minden egyes kromatográfiai módszert (annak publikálásához, vagy az általa nyert adatok bármilyen szinten történő hivatalos elfogadtatásához) ezekkel a paraméterekkel jellemezni kell.

2.1. Alapfogalmak

Az alapvonal és a kromatográfiai csúcsok viszonya



1. ábra A kromatográfiai csúcsok jellemzésére szolgáló legfontosabb paraméterek.

Az 1. ábrán azokat a paramétereket tüntettük fel, amelyeket egy kromatogramban szereplő csúcs jellemzésére használunk. A paraméterek többsége közvetlenül a kromatogramból meghatározható kísérleti adat, az inflexiós pontokra illesztett egyenesek által az alapvonalból kimetszett w_B alapvonalon mért csúcshélesség azonban számított érték. Minden kromatográfiai mérés a minta injektálásával kezdődik, az injektálás pillanatához tartozik a $t=0$ időpont. A vizsgálat során a detektorjel időbeli változását rögzítjük, a kapott idő–jelintenzitás görbét **kromatogram**nak nevezzük. A kromatogramban két tartomány váltakozása figyelhető meg, az egyik az alapvonal, amely jellemzően egy közel vízszintes egyenes, a csúcsok pedig az alapvonalból kiemelkedő hegyek vagy dombok. Az alapvonal a csúcsok alatt is folytatódik, ilyenkor az alapvonalat a csúcs kezdetét és végét jelző pontokat összekötő egyenes határozza meg.

Az alapvonal jelét kinagyítva látható, hogy a kromatogram pontjai nem egy tökéletes egyenes vagy valamilyen szabályos görbe mentén helyezkednek el, hanem egy zajos kísérleti görbét alkotnak. Hogyan lehet azt eldönteni, hogy egy kromatogramban mi tekinthető csúcshoz és mi zajnak? Az alapvonal egy kiválasztott tartományában a zajszint a tartományon belüli mérési pontok intenzitás maximuma és minimuma közötti különbség. Azokat a pontokat tekintjük **csúcshoz**, amelyeknek az

alapvonalhoz viszonyított intenzitása eléri vagy meghaladja az alapvonal zajsztintjének a háromszorosát. (Van olyan ország, ahol az alapvonal zajsztintjének a kétszerese a határérték.)

Hogyan határozza meg a számítógép a csúcs kezdetét és végét? A kromatográfias szoftverek alapértelmezésben olyan adatelemző beállításokat tartalmaznak, amelyek az átlagos csúcsok megtalálását automatikusan biztosítják. (A beállításokat a kromatográfusnak a mérések során a konkrét kromatogram tulajdonságait figyelembe véve pontosítani kell.)

A kromatogramokban általában sok ezer vagy tízezer mérési pont van (másodpercenként 5-20 képződik, a beállítástól függően). Ilyen nagy adathalmaznál lehetőség van arra, hogy pl. ötösével vagy kilencesével csoportokat alkossunk az egymás után következő pontokból és kiszámítsuk a csoportok átlagát. Az átlagul kapott értéket a csoportok közepéhez rendeljük hozzá. Ezután a két egymás után következő középpontra egy egyenest húzunk, és kiszámoljuk az egyenes meredekségét. Amennyiben a meredekség abszolút értéke eléri vagy meghaladja a programban megadott határértéket, akkor azt mondjuk, hogy a második tartomány középpontja lesz a csúcs kezdete (illetve a lefutó ágban ha a határérték alá csökken, akkor a csúcs vége).

Önmagában ez a módszer még rengeteg hamis csúcsot adna, hiszen esetenként az alapvonalnak is jelentős ingadozása van, gyakoriak a rövid élettartamú zajok, amelyek meghaladják az alapvonal zajsztintjének a háromszorosát és a fenti meredekségi kívánalmat, így alkalmasak lehetnek a szoftver megtévesztésére. Éppen ezek kiküszöbölésére egy másik paramétert, az ún. minimális csúcshélességet is használjuk, ami alapértelmezésben a HPLC-ben kb. 0,1-0,2 perc. A program minden megtalált csúcs-jelölt esetén megvizsgálja annak szélességét, és csak azokat tekinti valódi csúcshélességűnek, amelyek szélessége nagyobb a beállított határértéknél.

Vannak esetek, amikor nem akarjuk a rendkívül kis csúcsokat is kilistázni, mert csak a fő komponenseket keressük. Ilyen esetekre létezik egy harmadik beállítási lehetőség, ez pedig a minimális csúcsterület értéke. Csak azokat a csúcsokat fogja a szoftver az eredmények között felsorolni, amelyek integrálértéke (területe) meghaladja az általunk beállított határértéket.

Az egymással átfedésben lévő csúcsok pontos, hiteles integrálása rendkívül nehéz, problematikus feladat. A kapott eredmények gyakran nem is teljesen egyértelműek. Bár minden kromatográfias szoftver számos lehetőséget ad az átfedő csúcsok kezelésére, a szabványokban rögzített módszerek többsége csak a teljes alapvonal elvárlást fogadja el. Ha az nem teljesül, addig kell a kromatográfias módszert fejleszteni, amíg jó nem lesz.

2.2. Egyetlen csúcs jellemzésére szolgáló paraméterek

A **retenciós idő** (t_R) az az időtartam, amely a minta injektálásának pillanatától a csúcs intenzitás maximumáig eltelik. A HPLC-s gyakorlatban a retenciós idő fogalmát használjuk a leggyakrabban. Más kromatográfias technikáknál (pl. gélkromatográfiánál) elterjedt a retenciós térfogat használata (V_R). A **retenciós térfogat** a mozgó fázisnak az a térfogata, amely az injektálástól a kromatográfias csúcs maximumának megjelenéséig áramlott át az oszlopon. A retenciós térfogat a retenciós időből és a térfogati áramlási sebességből (F , flow) a következő módon számítható ki (feltéve, ha az áramlás egyenletes volt):

$$V_R = t_R \cdot F$$

Azok a komponensek, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba az állófázissal, gyorsan és akadálytalanul átjutnak az oszlopon. Az ilyen, vissza nem tartott anyagok átjutásához szükséges időt **holtidőnek** (t_0), a holtidőhöz tartozó elúciós térfogatot **holttérfogathatnak** (V_0) nevezzük. A holttérfogathat elméletileg az állófázis szemcséi közötti tér, valamint a szemcsék belsejében lévő üregek és csatornák együttes térfogathatát adja meg.

Nyilvánvaló, hogy a kolonna méretei, valamint a töltet porozitása nagyságrendileg alapvetően meghatározzák a holttérfogathat. Minél hosszabb és minél nagyobb átmérőjű a kolonna, annál nagyobb a holttérfogathat. Minél kisebb porozitású (minél tömörebb) az állófázis, annál kisebb a hozzájárulása a holttérfogathat.

A kísérletileg meghatározott holtterefogat az elméletileg várt értéktől kisebb. Azt, hogy a szemcsék belsejében mekkora a valóban hozzáférhető terefogat, azt az állófázis anyagának pórusméret eloszlása, a pórusok felületének minősége, az eluens minősége, az áramlási sebesség és a holtidő méréshez használt vegyület tulajdonságai együttesen határozzák meg.

Egy komponens retenciójának a valódi mértékét nem a retenciós terefogattal v. retenciós idővel fejezzük ki, hanem a **kapacitásfaktorr**al v. kapacitástényezővel (k'), ami a redukált retenciós terefogat ($V_R - V_0$) és a holtterefogat (V_0) hányadosa.

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R \cdot F - t_0 \cdot F}{t_0 \cdot F} = \frac{(t_R - t_0) \cdot F}{t_0 \cdot F}$$

A HPLC-s mérések során a terefogati áramlási sebességet általában állandó értéken tartjuk, így a F terefogati áramlási sebességgel való egyszerűsítés után a képlet a következő módon egyszerűsödik:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Ha nagyon egyszerű rendszerrel dolgozunk (pl. 1-3 jól elváló komponens mennyiségi meghatározása, semmi zavaró ismeretlen vegyület) és semmilyen más kizáró okunk sincs, akkor a gyakorlatban általában arra törekszünk, hogy a k' értékek lehetőleg a $k'=2-5$ tartományba essenek. Konkrét példán bemutatva ez azt jelenti, hogy egy 10 cm hosszúságú, hagyományos kolonnán mérve, amelyen a módszer szerinti holtidő $t_0=0,8$ perc, a retenciós időket praktikusán a 2,5–5 perc tartományba érdemes állítanunk.

A k' -re vonatkozó előbbi útmutatás nem azt jelenti, hogy ennél hosszabb retenciós idők feltétlenül rosszak lennének, csupán azt, hogy ha nem szükséges, akkor nem kell hosszú mérési időt használni. Ilyen rövid időnél még gazdaságos az oldószerszelhasználás, a csúcsok már jól szétválnak, a diffúzió okozta sávszélesedés még kicsi, ezért a csúcsfelbontás általában elegendően nagy.

A csúcsmagasság 60,7%-ánál mért szélességet a **csúcs szélességének** (w), az 50%-nál mért szélességet a **csúcs félmagasságban mért szélességének** ($w_{1/2}$), a csúcs felfutó és lefutó ágához az inflexiós pontoknál illesztett érintők által az alapvonalból kimetszett szakasz hosszát pedig a **csúcs alapvonalon mért szélességének** (w_B) hívjuk.

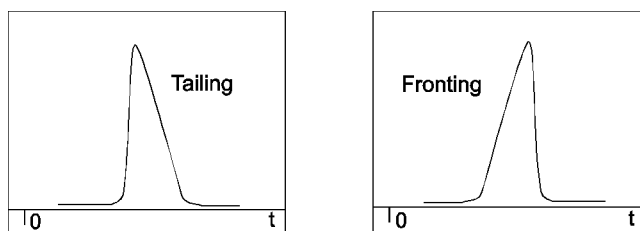
A mennyiségi meghatározás alapja a kromatográfiában általában a **csúcs alatti terület** (A), ami az alapvonal és a csúcs által bezárt területet jelenti. A terület konkrét mértékegysége a szoftver beállításától és a detektor által kibocsátott jel típusától függően változó, de a dimenziója mindegyiknek jelintézés*idő (tipikusan mV*perc vagy mV*s). A detektortól függően egyes esetekben a csúcsok területe helyett a csúcs magasságát használják a mennyiségi meghatározáshoz. Abban az esetben, amikor a detektorjel az anyagi minőségtől függetlenül csak a komponensek koncentrációjától függ (pl. RI detektálás), az összes vizsgált anyag területét összeadva néha a terület százalékos kiértékelést is használják. A legtipikusabb UV detektálásnál az egyes komponensek fényelnyelése a komponens spektrumától és a detektálási hullámhossztól függ, ezért teljes mértékben alaptalan egy termék tisztaságát terület százalékos alapon kifejezni.

Nagyon sokat elárul a kromatográfiás körülmények milyenségéről a csúcsok szimmetriája. Általában a 10% csúcsmagasságnál mért aszimmetria faktort használják, de más magasságban mért aszimmetria faktorok is ismertek. Az As_{10} **aszimmetria faktor** megadja azt, hogy ha az alapvonalal párhuzamosan, 10%-os magasságnál elvágjuk a csúcsot, akkor ezen az egyenesen mérve a csúcs közepétől a csúcs végéig mért távolság (b) hányszorosa a csúcs közepétől a csúcs elejéig mért távolságnak (a). Az 1. ábrán látható jelölést használva az aszimmetria faktor értéke:

$$As_{10} = \frac{b}{a}$$

Elméleti számítások szerint még ideális körülmények között is van a csúcsnak egy nagyon kis mértékű természetes elnyúlása (azaz $b > a$). A következő ábrán a két tipikus csúcsalak-torzulás látható, ezek a **csúcs elhúzóódása** (elterjedt angol kifejezéssel: **tailing**), valamint a **csúcs előrenyúlása** (angol:

fronting). Mindkét esetben valamilyen kinetikai, anyagtranszportbeli probléma van az álló és a mozgó fázis között. Tailing hatás esetén azért nyúlik el a csúcs vége, mert túlságosan lassú az anyagtranszport az álló fázison belül. Ennek a leggyakrabban túlságosan erős kölcsönhatás az oka az analit és az álló fázis, vagy az álló fázist hordozó szilárd anyag között. Tipikusan ilyen alakúak a nagyon bázisos anyagok csúcsai szilikagél hordozós, nem tökéletesen véglezárt fordított fázisú kolonnákon. A fronting hatás leginkább akkor jelentkezik, ha az anyagtranszportot a mozgó fázisból az álló fázisba valamilyen ionos jellegű kölcsönhatás akadályozza. Gyenge savak vagy bázisok esetén például ha az eluens pH-ja nem megfelelő értékű, akkor a fordított fázison a megoszlási egyensúly mellett még egy disszociációs egyensúly is fennáll, ami akadályozza a disszociált és disszociálatlan részecskék szétválását, az ionos jellegű részecskék mintegy előreszaladnak a kolonnán.



3. ábra A HPLC-ben tapasztalható csúcsalak-torzulások

Fontos, hogy az aszimmetria faktor számszerű értéke alapján el lehessen dönteni, mennyire megfelelők a körülmények a mennyiségi vagy minőségi elemzés számára. **Tökéletes alakúnak** azokat a csúcsokat tekintjük, amelyeknél az $As_{10} = 0,9-1,4$. Az ilyen csúcsok esetén a retenciós idő állandó, nem függ a koncentrációtól, a csúcs minőségi és mennyiségi elemzésre egyaránt felhasználható. Ha az As_{10} az 1,4–2,5 tartományba esik, akkor a koncentrációtól függően a retenciós idő kissé változik, de mennyiségi meghatározásra még lehetőség van. A **torzult csúcsalagnak** azonban az a következménye, hogy a közeli csúcsok esetleg nem megfelelően válnak szét. Amennyiben az As_{10} eléri vagy meghaladja a 3-at, akkor a retenciós idő a mennyiség függvényében jelentősen változik, minőségi azonosításra már csak szűk koncentráció tartományban alkalmas. Az integrálást nem lehet pontosan elvégezni, mert annyira elnyúlik a csúcs, hogy nehéz megmondani, hol is végződik valójában. Amennyiben erősen elhúzódo vagy előreszaladó csúcsról van szó, úgy kell megváltoztatni a kromatográfiai körülményeket (eluens összetétele, kolonna), hogy jó szimmetriájú csúcsokat kapjunk, amelyekkel pontos méréseket végezhetünk.

A kolonna adott komponenssel szemben mutatott hatékonyságát több módon is jellemezhetjük, ezek között a legegyszerűbben számítható az **elméleti tányérszám** (N), amely megadja, hogy hány „elméleti tányér” tudna az adott csúcs esetén ugyanakkora elválasztási hatásfokot biztosítani, mint az adott kromatográfiai kolonna. Az **elméleti tányér** az kolonnának egy olyan darabja, amelyen dinamikus, áramló körülmények között egyszer beáll a statikus K állandóval jellemzett megoszlási, illetve adszorpciós egyensúly.

Az elméleti tányérszám kiszámítására több képlet is használható, ezek egymással ekvivalensek.

$$N=16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_B} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Az **elméleti tányérmagasság** (H) az egy elméleti tányérnak megfelelő kolonna hosszúságát adja meg, és könnyen ki tudjuk számítani az elméleti tányérszámból és a kolonna hosszúságából:

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

Az elméleti tányérszám a konkrét kromatográfiai körülmények között egy kiválasztott anyagra vonatkozik, abszolút értékének igazából nincs jelentősége. Az egyik anyagra megállapított elméleti tányérszám nem ad információt egy másik vegyület kromatográfiai viselkedésére vonatkozóan. Ami számít, az a szomszédos csúcsok elméleti tányérszámával történő összehasonlítás, illetve az adott komponens elméleti tányérszámának időbeli változása. Minél nagyobb az elméleti tányérszám, illetve

minél kisebb az elméleti tányérmagasság, annál nagyobb a kolonna hatékonysága az adott anyagra nézve.

A kromatográfiás gyakorlatban az eluens áramlási sebességét általában a térfogati áramlási sebességgel (F) szokták megadni, de az elméleti számításokhoz, illetve a kromatográfiás módszereknek eltérő átmérőjű kolonnára történő átviteléhez, az egyes kolonnák összehasonlításához a **lineáris áramlási sebességet** (u) használjuk. E két mennyiség között a következő képlettel adhatjuk meg az összefüggést:

$$u = \frac{F}{\varepsilon \cdot A}$$

ahol ε a részecskék közötti porozitás, A pedig a kolonna keresztmetszete.

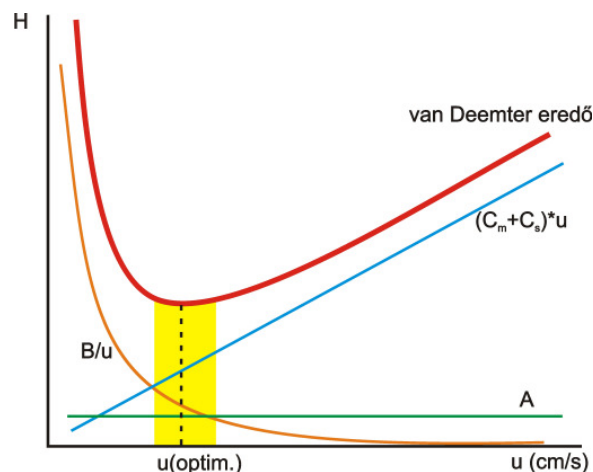
A lineáris áramlási sebesség és az elméleti tányérmagasság között a **van Deemter egyenlet** teremt matematikai összefüggést. Az egyenlet egyszerűsített formában a következő alakú:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_m \cdot u + C_s \cdot u$$

ahol C_m a tömegátadással szembeni ellenállás a mozgófázisban, C_s pedig az állófázisban. Az egyenletben az „A” tényező a részecskék átmérőjével és a töltés szerkezetével, a „B” a mozgó fázisban mérhető diffúziósebességgel, a „ C_m ” az állófázis vastagságával, az állófázisban mérhető diffúziósebességgel és a kapacitástényezővel, a „ C_s ” pedig a részecskék átmérőjével, a töltés geometriai szerkezetével, a kapacitástényezővel és a mozgófázisban mért diffúziósebességgel kapcsolatosak.

Ha a H értékét az u (vagy az F) függvényében ábrázoljuk, akkor általában egy **minimumgörbét** kapunk. Az adott komponensre vonatkozó legjobb lineáris áramlási sebességet (u_{opt}) a görbe minimuma adja meg. Amennyiben a kromatográfiás elválasztást csak erre az egy vegyületre optimalizáljuk, akkor a legjobb eredményt az u_{opt} áramlási sebesség alkalmazásával kapjuk.

Az ábrából láthajtuk, hogy a van Deemter görbe alja meglehetősen lapos, ezért van az, hogy a gyakorlatban szélesebb tartományból választhatunk áramlási sebességet a felbontás észrevehető romlása nélkül.



4. ábra A van Deemter egyenlet és az azt alkotó függvények ábrázolása. Az elméleti tányérmagasságot ábrázoljuk a lineáris áramlási sebesség függvényében

2.3. Több kromatográfiás csúcs egymáshoz viszonyított jellemzésére használatos paraméterek

Az eddigiekben csak egyetlen kromatográfiás csúcs jellemzőit vizsgáltuk, ugyanakkor a gyakorlatban a standardokat kivéve mindig több anyag van egyszerre jelen, így nagyon fontos a csúcsok egymástól való elválásának problémájával foglalkoznunk.

Két csúcs egymáshoz való viszonyában az **elválasztási tényező** (α) a legegyszerűbben kifejezhető paraméter, megadja, hogy a második csúcs retenciós ideje (t_{R2}) hányszorosa az első csúcs retenciós idejének (t_{R1}):

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Az elválasztási tényezőt gyakran kiszámolják, de valójában semmilyen információt nem ad arra nézve, hogy szétválnak-e a csúcsok, hiszen nem veszi figyelembe a csúcsok szélességét.

Két csúcs egymáshoz való viszonyát sokkal jobban kifejezhetjük a **felbontás** v. csúcsfelbontás értékével (R_s) is, amit a következő képlettel számíthatunk ki ($t_{R2} > t_{R1}$):

$$R_s = 2 \cdot \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_{B1} + W_{B2}}$$

Ahhoz, hogy két csúcs elváljon egymástól minimálisan az kell, hogy $R_s > 1,5$ teljesüljön.

Az $R_s = 1$ esetén még nem teljes a csúcsok szétválása, hanem az alapvonal közelében átfednek egymással. Annál jobb két csúcs szétválása, minél nagyobb az R_s értéke. A képlet nagyon egyszerű, de nem sok felvilágosítást ad arról, hogy hogyan lehet befolyásolni a csúcsok elválasztását egymástól.

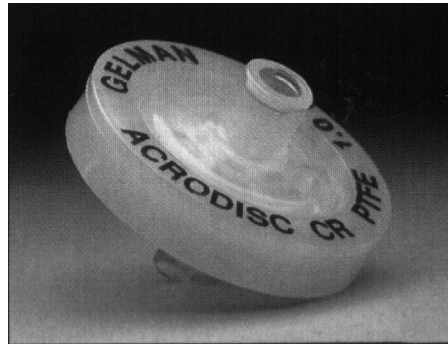
3. A kromatográfiás vizsgálatok anyagai és eszközei

3.1. Eluens- és mintaelőkészítés

A lehető legritkábban találkozunk olyan feladattal, amelynél kristálytiszt, minden zavaró komponenstől mentes mintát kell vizsgálnunk. sokkal gyakoribbak azok az esetek, amikor a keresett komponens vagy komponenseket egy sötét színű, zavaros vagy csapadékos oldatból kell meghatározni úgy, hogy a készülékünket ne tegyük tönkre már az első injektálással. A három leggyakoribb tisztítási művelet, amivel a gyakorlatban találkozunk, a szűrés, a centrifugálás és a szilárd fázisú extrakció.

Szűrés-Membránszűrés

A HPLC-ben különösen nagy a jelentősége annak, hogy mind az alkalmazott oldószerek, mind pedig az injektált minták maximálisan meg legyenek tisztítva mindenfajta lebegő szennyeződéstől. Ezt a legegyszerűbben úgy érhetjük el, ha az oldószereket illetve a mintákat megfelelően kis pórusméretű szűrőn, úgynevezett membránszűrőn átszűrjük. Mivel a membránszűrő lapok nagyon finomak (néhány tized mikronosak) a folyadékok saját súlyuknál fogva már nem képesek ezeken a lapokon a kellő sebességgel átfolyani, a szűrés meggyorsítására ezért vákuumot vagy nyomást alkalmazunk.



7. ábra. Injekciós fecskendő végére illeszthető membránszűrő, amellyel nagyon kis térfogatú minta is minimális veszteséggel szűrhető meg. A legelterjedtebb pórusméretek a $0,22\ \mu$, $0,45\ \mu$ és az $1\ \mu$, a membrán készülhet szerves anyagból, cellulózból, poliamidból vagy éppen teflonból, a szűrő átmérője néhány mm-től egészen kb. 4 cm-ig változhat.

Centrifugálás

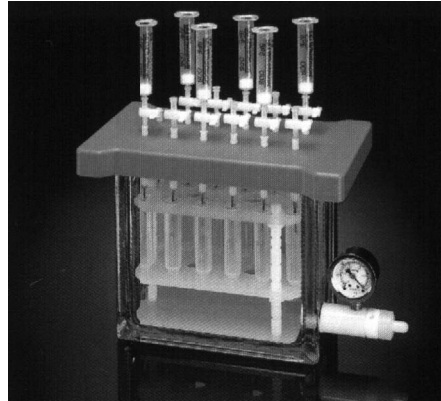
A legolcsóbb és legáltalánosabban használható eljárás makroszkópikus szennyezők eltávolítására. Előnye az, hogy egy jó minőségű asztali centrifugával kb. 20000 g gyorsulás érhető el, még a sejtalkotók és sejtmembrán töredékek is lecentrifugálhatók, azaz a sterilszűrésnél nagyobb tisztaságot ad. Az egyszer használatos műanyag centrifugacsövek olcsók, a membránszűrők meglehetősen költségesek. Egyszerre akár 50-60 minta is centrifugálható, a készülékbe ezen túl még centrifugális szűrőpatronok is behelyezhetők, amelyekkel ultraszűrést vagy nanoszűrést is végezhetünk. A centrifugálás egy jól használható, költséghatékony alternatívája a membránszűrésnek.

Szilárd fázisú extrakció

Gyakran találkozhatunk azzal a problémával, hogy a vizsgálni kívánt anyag a mintában csak nagyon kis koncentrációban van jelen, vagy nagyon sok, az elválasztást megnehezítő, vagy lehetetlenné tevő komponens van még mellette. Ha a mintából nagyobb mennyiség áll a rendelkezésünkre, akkor hagyományos eljárásokkal (pl. lecsapatás, szűrés, ultracentrifugálás) gyakran meg tudunk szabadulni a számunkra fölösleges anyagoktól, illetve kellő mértékben dúsítani tudjuk a vizsgált komponenst (pl. vizes oldatoknak az extrakciójával). Kis mintamennyiség esetén (ilyenek általában az orvosi diagnosztikai, biológiai eredetű minták) azonban a hagyományos eljárások nem, vagy csak nehézkesen és időt rabló módon használhatók. Ma már széles körben használjuk a *szilárd fázisú extrakciós* (SPE) eljárásokat, amelyek lényege az, hogy a vizsgálni kívánt komponens(ek)e)t egy kis méretű kromatográfiás oszlopon megkötjük, mosással megszabadítjuk a mintát a nem kívánt komponensektől, majd utolsó lépésben leoldjuk a mintánk hasznos részét az oszlopról és most már könnyen és egyszerűen elvégezhetjük annak kromatográfiás vizsgálatát. Az eljárás gyors, egyszerű, hatékony.

Az SPE céljára használt töltetek általában megegyeznek azzal a töltetípussal, amivel később az analitikai elválasztást végezzük, de attól lényegesen nagyobb szemcseméretűek és sokkal olcsóbbak. Olyan műanyag házba vannak betöltve, amilyenekből az egyszer használatos műanyag fecskendők készülnek. A töltetet alul és felül vékony, porózus műanyag lapocskák tartják. Az oldószerek átszívását vákuum segítségével végezzük, az alábbi ábrán néhány szilárd fázisú extrakciós oszlopot láthatunk, mellette pedig a használatukat segítő vákuumkamra képe található.

Az SPE kolonnákat használat előtt általában valamilyen pufferoldattal kondicionálni kell, majd átszívjuk rajtuk a mintákat, lemoszuk a meg nem kötődött oldatot, végül megfelelő oldószerezrel leoldjuk a kolonnán megkötődött vizsgálandó anyagot.



8. ábra Szilárd fázisú extrakcióhoz használatos, gyári készítésű, általában 100–500 mg szilárd szorbenst tartalmazó egyszerű használatos oszlopok, valamint a több oszlop befogatására és az oldószer átszivtatására szolgáló, csapokkal ellátott vákuumkamra képe.

3.2. Kolonnák

Töltetek

A kromatográfiai gyakorlatban nagyon sok fajta töltetanyaggal találkozhatunk, itt sajnos nincs lehetőség a kereskedelmileg hozzáférhető óriási számú szorbens vázlatos ismertetésére sem, csak a legfontosabb típusokat soroljuk fel.

A legegyszerűbb szorbens a szilikagél (**normál fázis**). A szilikagél kémiai tulajdonságai lehetővé teszik, hogy a felületéhez kovalens kötéssel rögzítve hosszabb-rövidebb szénláncokat, vagy funkciócsoportokkal szubsztituált szénláncokat kapcsoljunk. A kémiai kötött bevonat alapvetően megváltoztatja a szilikagél tulajdonságait, például alkilcsoportokkal bevonva az addig erősen poláris felületű szilikagél felülete apolárisává válik (**fordított fázis**). Megfelelően megválasztott funkciócsoportokkal teljesen új tulajdonságú, nagy szelektivitású, bizonyos vegyülettípusokra specifikus töltetanyagok állíthatók elő.

A szilikagélen alapuló töltetanyagok csak olyan pH-n használhatók, ahol nem oldódik fel a hordozó szilikát váz, azaz az oldat nem lehet bázisos, sem pedig erősen savas. Véglezárással a pH-tartomány kissé kibővíthető, de semmiképpen sem lehet pH = 9 fölött dolgozni velük. A használható pH-tartomány problémáját úgy oldották meg, hogy a felületi rétegeket nem szilikagélhez, hanem mikroszkópikus üveggyöngyökhöz (nem porózus szerkezetű), kemény polisztirol-szemcsékhez, vagy más polimer hordozókhoz kötötték. A polimer hordozós töltetek a mechanikai igénybevételekkel szemben kevésbé ellenállóak, az oldószer-váltás, pH-változás hatására duzzadhatnak vagy zsugorodhatnak, a hirtelen nyomásváltozásokat pedig nem viselik el, de izokratikus elúció esetén jól használhatónak bizonyultak.

A gyógyszeriparban alapvető fontosságú a **királis vegyületek analízise** és elválasztás (esetleg ipari méretekben is). Sok gyógyszerhatóanyagról kimutatták már, hogy (legegyszerűbb esetben) a két optikai izomerjük nem egyforma gyógyító hatással rendelkezik, sőt már arra is volt példa, hogy míg az egyik izomer gyógyított, addig a másik esetleg súlyos elváltozásokat okozott. Az ilyen vegyületek vizsgálatára fejlesztették ki a dextránvázhhoz kémiai kötéssel kapcsolt, királis molekulák alkotta állófázisokat, amelyek szelektíven csak az egyik izomert tartalmazzák és egy racém elegyben lévő különböző izomerekkel eltérő erősségű kölcsönhatást alakítanak ki.

1. táblázat A leggyakoribb töltetanyagok jelölése és tulajdonságai

Jel	Név, jelölés	Jellemzők
Si	szilika	Normál fázisú töltet, különösen poláris, nem ionos vegyületek elválasztására alkalmas.

		Vízzel, víztartalmú oldószerekkel nem szabad együtt használni, mert a víz dezaktiválja a felületét. A szilikagél-hordozós töltetek mechanikailag meglehetősen erősek, így a kolonnák még néhány nagyobb lökést is elviselnek.
C8, C18	oktil, RP-8, MOS, LC8 oktadecil, RP-18, ODS	A legelterjedtebb fordított fázisú töltetek, apoláris komponensekkel szemben a legnagyobb visszatartással bír. Különösen alkalmasak gyógyszer-hatóanyagok, vitaminok, drogok, környezetvédelmi mérések céljaira.
C6H5	fenil	Az aromás vegyületekkel szemben különösen nagy szelektivitással rendelkező, fordított fázisú töltet, de hidrofób kölcsönhatások kromatográfiában is alkalmazható.
CN	cianopropil	Vegyes tulajdonságú, enyhén poláris szorbens, fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Gradiens elválasztásokra különösen alkalmas, mert az egyensúlyi helyzetet gyorsan eléri. Bizonyos gyógyszerek analízise során kiterjedten alkalmazzák.
NH2	aminopropil	Fordított és normál fázisú, valamint gyenge anioncserélő töltetként egyaránt alkalmazható. Normál fázisként szelektivitása a szilikához hasonló, nagy előnye azonban, hogy nem dezaktiválja a felületét a víz.
SAX WAX SCX WCX	többféle	Erős vagy gyenge típusú (S vagy W) kation- vagy anioncserő (CX vagy AX) tulajdonságú töltetek, amelyek bázisok, savak, sók nukleozidok, nukleotidok elválasztására használhatók.

Különlegessége miatt említést érdemel még egy porózus szerkezetű, szintetikus előállított grafit-szemcsés töltet, amelyek felületére pirolízis során kémiai kötással aromás gyűrűket is felvittek. Ez a kolonna fordított fázisú kolonnaként működik, de emellett alkalmas az enantiomerek szétválasztására is, nem érzékeny a mechanikai igénybevételekkel szemben, és a teljes pH-tartományban használható. Különleges tulajdonságai ellenére csak kevés helyen használják, mert meglehetősen sokba kerül.

3.3. Eluenstároló edények, HPLC-s szerkezeti anyagok

A gyakorlatban többféle edényt használnak, a nagyon drága, kifejezetten professzionális célokra készült, törésgátló műanyagréteggel bevont, kúpos aljú, porszűrő ventillel ellátott edényektől kezdve egészen az egyszerű vegyszeres üvegekig. Az eluenstárolók és az eluenssel érintkező szerkezeti anyagok megválasztásakor a **következő általános szempontokat** kell figyelembe venni:

A tárolóedénynek, a csővezetéknek és egyéb szerkezeti anyagoknak *kémiaailag teljesen inertnek* kell lenniük az alkalmazott oldószerekkel szemben.

Az oldószer-tároló edényeknek lehetőség szerint *minél zártabbnak* (de nem légmentesen zártak!) kell lenniük. Ezzel megakadályozzuk a por bejutását az oldószerbe, valamint a gyakran egészségre veszélyes oldószer-gőzöknek a levegőbe kerülését.

Az oldószer-vezeték(ek)et feltétlenül el kell látni *finom szűrővel*, amely az oldószerbe véletlenül belekerült, szemmel láthatatlan szennyezőket eltávolítja. A rendszerbe került szilárd szennyezők a pumpát súlyosan károsíthatják, a kolonnát pedig eltömik!

A csővezetékekhez, szerkezeti és csatlakoztató elemekhez leggyakrabban a következő táblázatban szereplő anyagokat használják, mindenre egyformán jól alkalmazható, univerzális megoldás még nem létezik.

2. táblázat A HPLC készülékeknél alkalmazott szerkezeti és tömítő anyagok jellemző tulajdonságai

Anyag	Tulajdonságok
rozsdamentes acél	A legelterjedtebb anyag. Előnye, hogy minden, a HPLC-ben előforduló nyomással és hőmérséklettel szemben ellenálló, viszonylag jól hajlítható, gyakorlatilag minden oldószer esetén használható. A vassal vagy annak ötvözőivel komplexet képező anyagok, illetve a biológiai minták egy része esetén nem használható. Ilyen anyagok vizsgálata esetén nem csak a csővezetékeknek kell biokompatibilis műanyagból készülni, hanem a mintával érintkező minden szerkezeti elemnek, így a kolonna falának, az injektornak, a mintahuroknak, sőt még a fecskendőnek is.
PEEK	Poliéter-éter-keton típusú műanyag. Kémiai anyagokkal szemben nagyon ellenálló, csak a nagyon agresszív savak támadják meg (pl. tömény kénsav, tömény salétromsav). Néhány szerves oldószerrel nem célszerű a használata, mert ha nem is oldódik fel, de megduzzad (pl. diklór-metán, THF, DMSO). Mivel a PEEK megfelelően rugalmas, ugyanakkor kemény anyag, ezért a csövek mellett tömítések és egyéb szerkezeti darabok is készülnek belőle. Legfeljebb kb. 100 °C-ig használható.
Teflon	Poli-tetrafluor-etilén. Minden oldószerrel szemben tökéletesen ellenálló. Mechanikailag nem elég erős ahhoz, hogy nagyobb igénybevételnek kitett szerkezeti elemeket készítsenek belőle, de a kisnyomású oldószer-szállító csövek ma már gyakorlatilag csak Teflonból készülnek.

3.4. Gázmentesítés

A levegőben lévő oxigén és nitrogén minden oldószerben oldódik, de eltérő mértékben. Vízből és szerves oldószerből álló elegyek esetén a gázok oldékonysága nem lineárisan változik a szerves komponens térfogatfrakciójával, hanem minimumot mutat. Ha például vizet és metanolt, akkor az elegy túltelített lesz az oldott oxigénnel és nitrogénnel, és a főleg buborékok formájában kiválik. Az így keletkező buborékok problémát jelentenek a HPLC-s vizsgálatok során, ezért a használt oldószereket elegyítés előtt meg kell szabadítani a bennük oldott gázoktól. Amennyiben nem gázmentesítjük az oldószereket, akkor egy idő után a kolonnában vagy a kolonna után buborékok képződnek, amelyek eredményeképpen a csúcsok alakja torzul, az oldószeráramlás sebessége ingadozik, a fotometriás detektoron áthaladó buborékok pedig fantom csúcsokat adnak.

Több eljárást is kidolgoztak az oldószerek gázmentesítésére, a gyakorlatban bármelyik módszerrel találkozhatunk. A végeredményt tekintve mindhárom eljárás megbízható eredményt ad.

Ultrahangos gázmentesítés

Az ultrahang által mikroszkópikus méretekben keltett, gyorsan váltakozó nyomás és vákuum hatására az oldószerben oldott gázokból makroszkópikus méretű buborékok képződnek, amelyek eltávoznak az oldatból. Az ultrahangos gázmentesítést sokkal hatékonyabb, ha közben vákuumot is alkalmazunk.

Héliumos gázmentesítés

A hélium gyakorlatilag elhanyagolható mértékben oldódik az oldószerekben, ezért héliummal alaposan átbuborékolatva az eluenst vele ki lehet üzni az oldott gázokat. Előnye, hogy nagyon jó minőségű, fluoreszcenciás detektorokhoz is jól használható oldószert állít elő, hátránya, hogy működtetése meglehetősen költséges, ugyanis a hélium meglehetősen drága.

Vákuumos gázmentesítés

Megvalósítható akár úgy, hogy az oldószereket a mérés megkezdése előtt alacsony nyomáson kevertetve éppen forrásba hozzuk, amikor is az oldott gázok eltávoznak, vagy úgy, hogy az oldószeraamlás útjába (on-line) egy folyamatosan működő, vákuumkamrás gázmentesítő egységet helyezünk, amely mindig csak annyi oldószert gázmentesít, amennyi éppen felhasználásra kerül. A jelenlegi kromatográfiai gyakorlatban ez a legelterjedtebben eljárás, az on-line vákuumos gázmentesítőket az új készülékekben már egybeépítik a pumpával.

3.5. Pumpák

A folyadék szállítását a különböző megoldású kromatográfiai pumpákkal biztosítjuk. Bár a pumpa szerepe kritikus a vizsgálatok szempontjából, a tapasztalatok szerint a legkevesebb gondot a mérések során éppen a pumpák jelentik.

A pumpák általában ún. pozitív térkiszorítású, két dugattyús folyadék adagoló eszközök. A szokásos nyomástartományuk 0-450 bar, de a legújabb eszközök akár 1200 bar nyomást is biztosíthatnak. A szállított folyadék mennyisége nem túlságosan nagy, általában 1-2 ml/perc, így a nagy nyomás ellenére sem szükséges nagy elektromos teljesítmény vagy méret. A modern HPLC-s pumpák mérete semmiben nem különbözik pl. az UV-detektor méretétől, esetenként pedig közvetlenül a pumpával egy dobozba építik be az on-line gázmentesítőt, a kisnyomású gradiensképzőt és a keverőszelepet is.

Két alapvető kívánalmat kell kielégíteniük a pumpáknak: egyenletesen, pulzálástól mentesen kell az eluenst nagy nyomáson is szállítaniuk. Ennek technikai megoldására számos, egymástól csak a részletekben különböző megoldás létezik, de azok részleteivel nem szükséges itt foglalkoznunk. Ma már a pumpák mindegyike alkalmas a hagyományos méretű (4,6 mm belső átmérőjű) kolonnákkal végzett munkákhoz, az ultranagy nyomáson, 1-2 mm-es belső átmérőjű, nagyon finom szemcseméretű kolonnákkal végzett munkákhoz azonban csak néhány készülék alkalmas.

3.6. Automata injektorok, mintaváltók

Bármilyen megoldású injektort használunk is, annak biztosítani kell azt, hogy a mérendő mintánka atmoszférikus nyomáson be tudjuk tölteni egy bemérő hurokba (ami tulajdonképpen egy ismert térfogatú csődarab), majd ezt a mintát veszteség nélkül be tudja juttatni a nagynyomású folyadékaamlásba. Ma már csak a kutató laborokban lehet manuális injektorokkal találkozni, ezért azok részletes tárgyalásától itt eltekintünk. Az automata injektorok automata mintaváltóval vannak egybeépítve (autosampler), amelyek teljes belső tere a bemérő hurokkal és az injektorral együtt termosztálható.

Az automata injektor egy erős tű segítségével átszúrja a vezérlő program által magadott pozícióban lévő mintásüveg kupakján lévő rugalmas membránt, az üvegben lévő folyadékból kiszívja a szükséges

mennyiséget, amit aztán a mintahurokba beletölt. A program által adott jelre a készülék a mintahurkot becsatlakoztatja a folyadékáramlásba, és ezzel megtörténik a minta injektálása.

Az automata injektorok a mintavételen túl még elvégzik a tű és a csövek tisztítását is, hogy a minták egymással való szennyeződését megakadályozzák. A különböző automata injektorokban más-más mosási technikát használnak, amelyek mindegyike biztosítja a teljes tisztítást (elméletileg).

A gyakorlat szempontjából kiemelkedő az autosamplerek fontossága. Alapvető kívánalom, hogy az injektált térfogatoknak minél kisebb legyen a szórása, fontos a szinte veszteségmentes injektálás lehetősége (kis mintamennyiség esetén érdekes), valamint a keresztzennyezés kizárása. Éppen ez utóbbinál jelentkeznek a leggyakrabban a problémák, ezért új készülék vásárlásánál erre különösen nagy gondot kell fordítani.

3.7. Detektorok

Nem elég a komponenseket a kolonnán elválasztani, de valamilyen módszerrel érzékelhetővé, detektálhatóvá („láthatóvá”) is kell tenni azokat. Detektálásra valamilyen olyan anyagi tulajdonságot használunk fel, amely jellemző a vizsgálandó komponensünkre, ugyanakkor nem jellemző az eluensre (pl. fényelnyelés, tömegszám, redoxi reakció), vagy éppen fordítva, az eluensre jellemző, és annak tulajdonságait módosítja a komponens (pl. törésmutató, vezetőképesség). A detektor típusok száma elég nagy, itt csak a leggyakrabban használt detektorokat említjük. Nem térünk ki különböző tömegspektrometriás detektálási lehetőségekre, mert azok csak a nagyon jól felszerelt laboratóriumokban fordulnak elő, üzemeltetésükhöz pedig speciálisabb feltételek szükségesek.

Ultribolya–látható spektrofotometriás detektor

A HPLC-s gyakorlatban a leggyakrabban és legáltalánosabban az UV-VIS fotometriás detektorokat használják. Alkalmazásának feltétele az, hogy a detektálni kívánt vegyületekben legyen kromofor csoport.

Vezetőképességi detektor

Egy oldat vezetőképességének a folytonos mérésével információt kaphatunk mind az abban oldott szerves, mind a szervetlen vegyületek mennyiségéről. A cella két platinalamezket tartalmaz, amelyen keresztül váltakozóáramot vezetnek át. A nagyobb frekvenciájú váltakozóáram hatására nem következik be elektródreakció, az áthaladó áram intenzitása arányos lesz az oldott anyag mennyiségével. A detektor hátránya, hogy csak kis koncentrációtartományban ad a mennyiséggel egyenesen arányos jelet. Gradiens elúció esetén csak úgy használható, ha az eluens vezetőképessége állandó marad a gradiens során (mivel ezt szinte lehetetlen teljesíteni, inkább csak izokratikus elúciónál alkalmazzák).

Törésmutatóindex (RI) detektor

Ez a detektor az ún. tömegérzékeny detektorok közé tartozik, automatikusan méri az átfolyó oldat törésmutatóját, amely pedig arányos az oldószerben oldott anyag mennyiségével. Két, egymással sorban kapcsolt cellából áll a detektor, az egyik a referencia cella, a másik pedig a mérőcella. A referencia cellát le lehet választani az áramlásról. Általában a gyakorlatban úgy használják, hogy amikor az alapvonal jön, akkor folyamatosan öblítik a referencia cellát is, majd amikor egy csúcs érkezik, akkor lezárják a referencia cellát, így az tiszta eluents tartalmaz, és annak a törésmutatójával hasonlítják össze a mérő cellán áthaladó oldat törésmutatóját. A detektor teljesen általánosan használható minden vegyület esetében, nem szükséges hozzá az, hogy a vegyület fényelnyeléssel rendelkezzen. Igazából azt mondhatjuk, hogy az RI detektor közelíti meg legjobban az ideális detektort. A mai RI detektorok már viszonylag érzékenyek, de számottevően elmaradnak az UV detektorok érzékenysége mögött. Mivel a törésmutató nagyon erősen függ a hőmérséklettől, az RI detektor celláját nagyon gondosan termosztálni kell (legalább 0,001 °C pontossággal!).

MÉRÉSI FELADATOK

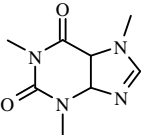
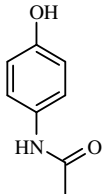
A gyakorlat célja a HPLC elméleti és gyakorlati alapjainak megismertetése szabadforgalmú gyógyszerek és élelmiszerek koffein és paracetamol tartalmának mennyiségi meghatározásával. A két vegyület tulajdonságai a táblázatban láthatók.

A gyakorlaton használt Jasco gyártmányú HPLC készülékkel részletesen a gyakorlaton ismerkedünk meg. Fő egységei:

- ERC 3315 on-line eluens gázmentesítő
- Jasco LG-980-02 kisnyomású gradiensképző egység
- a gázmentesített oldószerke megfelelő arányú keverését végzi
- Jasco PU-980 pumpa
- Az oldószerrel érintkező részek polírozott rozsdamentes acélból készültek. A szokásos térfogati áramlási sebesség 0,5-2 ml/perc, a maximális nyomás 300–400 bar.
- Jasco AS-1555 automata mintaváltó és injektor
- Analitikai kolonna (C18-as fordított fázisú oszlop)
- Jasco UV-975 scanning UV/VIS detektor (190-600 nm tartomány)
- CromPass számítógépes vezérlő/kiértékelő program

A detektorból kifolyó oldat a többi hulladékkal együtt közös gyűjtőedénybe kerül. A gyakorlat során a hulladék oldószereket nem öntjük a lefolyóba, hanem a fülke alatt található hulladékgyűjtő üvegekbe öntjük. Az edények elmosásakor nem alkalmazunk acetont az edények kiszárítására, mert a legkisebb maradék is óriási csúcsot ad az UV-spektrumban, helyette indokolt esetben metanolt vagy etanolt használunk.

3. táblázat A gyakorlaton használt hatóanyagok tulajdonságainak rövid ismertetése.

Név, képlet	Leírás
<p>Koffein</p> 	<p>Gyógyszerkönyve neve: Coffeinum. Mindenki által ismert, élénkítő hatású alkaloid. Ájulás, alacsony vérnyomás, testi és szellemi fáradtság érzése ellen, valamint más gyógyszerekkel kombinálva használatos. Gyógyszerként használva egyszeri adagja 50-300 mg, míg napi adagja 150-600 mg lehet. Mellékhatásként émelygés, heves szívdobogás, arra érzékenyeknél ritmuszavar, hasmenés, fokozott vizeleti inger jelentkezhet. A kávé és tea jelentős mennyiségben tartalmaz koffeint, de megtalálható számos üdítőitalban, valamint gyógyszerben is.</p> <p>UV maximum: 270 nm (220 nm), minimum: 245 nm</p>
<p>Paracetamol, más néven: acetaminofen.</p> 	<p>Szintetikus egyszerűen előállítható, régóta használatos az orvosi gyakorlatban láz és kisebb fájdalmak csillapítására. Szabadforgalmú gyógyszer, számos mellékhatása van.</p> <p>UV maximum: 245 nm</p>

A gyakorlaton elvégzendő feladatok

A kiadott eszközök átvétele, szükség esetén mosogatás.

A készülék bemutatása, a szoftver ismertetése.

A rendelkezésre álló törzsoldatokból a kalibráló oldatok elkészítése hígítással (szükség esetén törzsoldat készítése).

Mérőoldat készítése az ismeretlenből.

A készülék kalibrálása, az ismeretlenben a paracetamol és/vagy koffein tartalom meghatározása.

Az eredmények nyomtatása, jegyzőkönyvkészítés, mosogatás, eszközök leadása.

ZH, referálás, a jegyzőkönyv bemutatása, a gyakorlat értékelése.

A gyakorlatra kiadott törzsoldatok koncentrációit, az esetleg szükséges hígítások mértékeit a mérések megkezdése előtt a helyszínen adjuk meg. Amennyiben a gyakorlaton más utasítást nem kapunk, a következők szerint kell eljárni az oldatkészítések során.

A hígításokat a méréssorozat megkezdése előtt kell elvégezni, a jó időbeosztás nagyon fontos. A mérés során a törzsoldatból történő hígításokat a kis térfogatokra tekintettel nem mérőlombikban, hanem állítható térfogatú digitális pipetták segítségével, 2 cm³-es mintásüvegekben, egyszerű összeméréssel végezzük. A hatóanyagok vízben vannak feloldva, a szükséges hígításokat is vízzel végezzük.

Kalibráló oldatsor készítése

Koffeinre illetve paracetamolra nézve 1000 µg/ml-es illetve 100 µg/ml-es oldatok vannak készen (µg/ml=ppm). Ezekből kell a következő táblázatnak megfelelően összemérni a mérőoldatokat.

Kalibráció szintje	Összemérésre kerülő oldatok (microliter)				Oldószer	Koncentráció a mérőoldatokban (micrg/ml)	
	Koffein 1000	Koffein 100	Paracet. 1000	Paracet. 100		Víz	Koffein
Level 1	0	50	0	50	900	5	5
Level 2	0	100	0	100	800	10	10
Level 3	0	250	0	250	500	25	25
Level 4	0	500	0	500	0	50	50
Level 5	100	0	100	0	800	100	100

A kalibrálást öt különböző koncentrációnál végezzük, a vezérlő program ezeket nevezi Level 1Level 5-nek. Célszerű a kalibrációt mindig a leghígabb oldattal kezdeni és haladni az egyre töményebbek felé, hogy a minták közötti esetleges keresztszennyeződés hatását minimalizáljuk. (A keresztszennyeződés akkor következik be, ha a mintavevő túból és a vezetékből nem sikerül teljesen kimosni az előző oldatot. Még teljesen automata rendszereknél is számolni kell a keresztszenyezéssel, ezért két mérés között minél többször ki kell mosatni a tüt.)

Ismeretlenek készítése

Lehetséges ismeretlenek: szabadforgalmú gyógyszerek, vagy élelmiszerek, amelyek valamelyik vagy mindkét standardot tartalmazzák.

Tea

Közvetlenül mérhető

Egy tea filtert 200 ml forró vízben kiáztatunk, a kapott oldatot lehűtjük, két centrifugacsövet megtöltünk vele és 5 percig centrifugáljuk. Mindkét cső tetején lévő tiszta oldatból 700 mikrolitert az ismeretlenes mintaedénybe mérünk.

Kávé

Négyszeres hígítás után közvetlenül mérhető

Szokásos presszókávéból vagy hosszúkávéból 1,00 ml-t bemérünk egy 4 ml-es mintásüvegbe és 3,00 ml vizet adunk hozzá. Az oldatot homogenizáljuk, majd a teánál leírtak szerint centrifugáljuk és mintásüvegbe visszük.

Gyógyszer 1

Az elporított tablettából analitikai mérlegen pontosan kimérünk 12-13 mg-ot egy félmikro kémcsőben, majd a kémcső tartalmát kb. 20-40 ml vízzel egy 100 ml-es mérőlombikba mossuk. Az oldatot kb. 5 percig rázogatjuk, majd a lombikot jelre töltjük és az oldatot többszöri átfordítással homogenizáljuk. Két centrifugacsőbe bemérünk 1,50-1,50 ml oldatot és 5 percig centrifugáljuk. Mindkét cső tetején lévő tiszta oldatból 700 mikrolitert az ismeretlenes mintaedénybe mérünk.

Gyógyszer 2

Az elporított tablettából kb. 15 mg-ot analitikai mérlegen pontosan lemérünk, majd 250 ml-es mérőlombikba mossuk és az előző pontban leírtak szerint mintát készítünk belőle.

Cola

Négyszeres hígítás után közvetlenül mérhető.

A Colából kiöntünk egy kémcsőbe néhány ml-t, majd rázogatással kihajtjuk belőle a szén-dioxidot. A már nem buborékoló oldatból 1,00 ml-t bemérünk egy 4 ml-es mintásüvegbe és 3,00 ml vizet adunk hozzá. Az oldatot homogenizáljuk, majd mintásüvegbe visszük.

Energiaital

Tízszerez hígítás után közvetlenül mérhető.

A Colánál leírtak szerint buborékmentesítjük az energiaitalt, majd 250 mikrolitert bemérünk egy 4 ml-es mintásüvegbe és 2250 mikroliter vizet adunk hozzá. Az oldatot homogenizáljuk, majd mintásüvegbe visszük.

A mérendő oldatokat a következő sorszámú helyekre kell a mintatartó tálcába helyezni:

1. víz (vak minta)
2. Level 1
3. Level 2
4. Level 3
5. Level 4
6. Level 5

7. Ismeretlen

Mérési paraméterek

A gyakorlaton használt mérési paraméterek a gyakorlat.METH illetve a Paracetamol-Koffein.METH fájlban vannak tárolva.

A méréshez előre elkészített mérési szekvenciát használunk, a minták injektálását automata injektor végzi.

A gyakorlaton a detektálást 240 nm-en, vagy egymás után 245 és 270 nm-en végezzük. A vizsgálatok során $0,8 \text{ cm}^3/\text{min}$ térfogati áramlási sebességet használunk. Az összes futtatást 40-60 metanol-víz eleggyel végezzük, amelyet tiszta oldószerekből a gradiensképző egység segítségével állítunk elő. Az effektív műszeres mérési idő minden minta esetében 5 perc.

Szoftver

A modern kromatográfias szoftvereknek nemcsak a készülék vezérlését és az eredmények kiszámítását kell biztosítaniuk, hanem azt is, hogy minden felhasználó csak a saját illetékességi körébe tartozó adatokhoz és beállításokhoz férjen hozzá, csak a rá tartozó paramétereket változtathassa meg, a nyers mérési adatokat pedig senki ne tudja módosítani (még a rendszergazda sem!). Ennek a sokféle kívánalomnak elsősorban minőségellenőrzési és jogi okai vannak, hiszen például egy gyógyszer jószágának bizonyításra nem lehet felhasználni egy olyan kromatogramot, amibe bárki egy egyszerű szövegszerkesztővel bele tud piszkálni. Hogy ezt elkerüljék, minden mérési fájl titkosított formában kerül tárolásra. A feladatok is megkívánják, hogy az ugyanazon a készüléken, de különböző projekteken dolgozó csoportok adatai, mérési módszerei elkülönüljenek egymástól. Mivel az összes kívánalmat kielégítő szoftverek meglehetősen összetettek tudnak lenni, itt most nem foglalkozunk a program felépítésével, hanem a ChromPass program felhasználói szintű ismertetése a gyakorlaton történik. Az angol nyelv alapjainak ismerete feltétlenül szükséges a program kezeléséhez.

A mérési adatokat futtatásonként külön-külön fájlban tároljuk. A készülék automatikusan elvégzi a minták futtatását, a kalibrálást, majd kiértékeli az ismeretlent. Csak az ismeretlenről készített jelentést nyomtatjuk ki, azt be kell tűzni (ragasztani) a jegyzőkönyvbe.

Az elvégzett hígítási feladatok pontossága határozza meg a kalibráló egyenes pontosságát, illetve az ismeretlenre kapott eredményeket. A kalibrálás jószágát a gyakorlatvezető ellenőrzi. A referálás vagy ZH eredménye mellett a kalibráló egyenes R^2 értéke (0–1 közötti érték, minél közelebb van az 1-hez, annál jobb), illetve az ismeretlenekre meghatározott koncentráció érték alkotják a gyakorlatra kapott jegy fő részét.