

Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)

Dr. Lázár István

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2009.

A kromatogramok jellemzésére szolgáló paraméterek	6
Alapfogalmak	7
Az alapvonal és a kromatográfiás csúcsok viszonya	7
Egyetlen csúcs jellemzésére szolgáló paraméterek	9
Több kromatográfiás csúcs egymáshoz viszonyított jellemzésére használatos paraméterek	19
A kromatográfiás vizsgálatok anyagai és eszközei	21
Eluens- és mintaelőkészítés	21
Szűrés-Membránszűrés	21
Centrifugálás	23
Szilárd fázisú extrakció	23
Kolonnák	24
Mechanikai kialakítás	24
Töltetek	25
Eluentszároló edények, HPLC-s szerkezeti anyagok	28
Gázmentesítés	30
Ultrahangos gázmentesítés	30
Héliumos gázmentesítés	30
Vákuumos gázmentesítés	30
Pumpák	31
Automata injektorok, mintaváltók	31
Detektorok	32
Ultribolya-látható spektrofotometriás detektor	33
Fluoreszcenciás detektor	34
Elektrokémiai detektor	34
Vezetőképességi detektor	35
Törésmutatóindex (RI) detektor	35
A kromatográfiás vizsgálatok általános menete	37
Mérési módszer kidolgozása	37
Mintaelőkészítés	38
Elúciós technikák	39
Minőségi azonosítás	39
Mennyiségi meghatározás	40
Külső standard módszer	40
Standard addíció	40
Belső standard módszer	41
Mérési feladatok	42
A gyakorlaton elvégzendő feladatok	43

Kalibráló oldatsor készítése	44
Ismeretlenek készítése.....	44
Tea.....	45
Kávé.....	45
Gyógyszer 1	45
Gyógyszer 2	45
Cola	45
Energiaital	45
Mérési paraméterek	46
Szoftver	46
Ajánlott irodalmak.....	47

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.

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 kromatográfiai 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 kromatográfiai 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 csúcsnak 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.

A hivatalos vizsgálatokat általában a különböző nemzeti vagy nemzetközi szabványokban megadott módszerekkel végzik. A szabványosított módszerek nem azt írják elő, hogy konkrétan melyik gyártó milyen készülékén és kolonnáján kell a mérést végezni (bár a teljes mérésre vonatkozólag egy-egy kidolgozott példát általában bemutatnak). Ehelyett azt adják meg, hogy ilyen vagy olyan *típusú* kolonnán végezve a mérést az eljárásnak teljesítenie kell a megadott paramétereket (pl. csúcsfelbontás, kapacitásfaktorok tartománya, a mennyiségi kimutatás alsó határa, szórás, linearitás, stb.) és azokat a módszer laboratóriumi beállításakor megfelelően bizonyítani és dokumentálni kell. Sorozatmérések közben ellenőrző standardok felhasználásával folyamatosan figyelni kell, hogy a mérőrendszerünk teljesíti-e az előírtakat. Míg a gázkromatográfiában egy-egy kolonna élettartama akár tíz év is lehet és egy jól beállított gázkromatográfiás módszer akár hónapokig is stabilan működik, a folyadékkromatográfiában a kolonnák csupán néhány hónap élettartamúak és a kolonna öregedése miatt rövid időn belül is nagyon sokat változhatnak a retenciós paraméterek. Nyilvánvaló, hogy a HPLC-s gyakorlatban különösen fontos a mérések folyamatos ellenőrzése.

Alapfogalmak

Az alapvonal és a kromatográfiás csúcsok viszonya

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 csúcsszélesség azonban számított érték. Minden kromatográfiás 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 kromatogramnak 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 csúcsnak és mi zajnak? Az alapvonal egy kiválasztott tartományában a zajszt a tartományon belüli mérési pontok intenzitás maximuma és minimuma közötti különbség. Azokat a pontokat tekintjük csúcsnak, amelyeknek az alapvonalhoz viszonyított intenzitása eléri vagy meghaladja az alapvonal zajsztintjének a háromszorosát. (Van olyan ország, ahol az alapvonal zajsztintjének a kétszerese a határérték.)

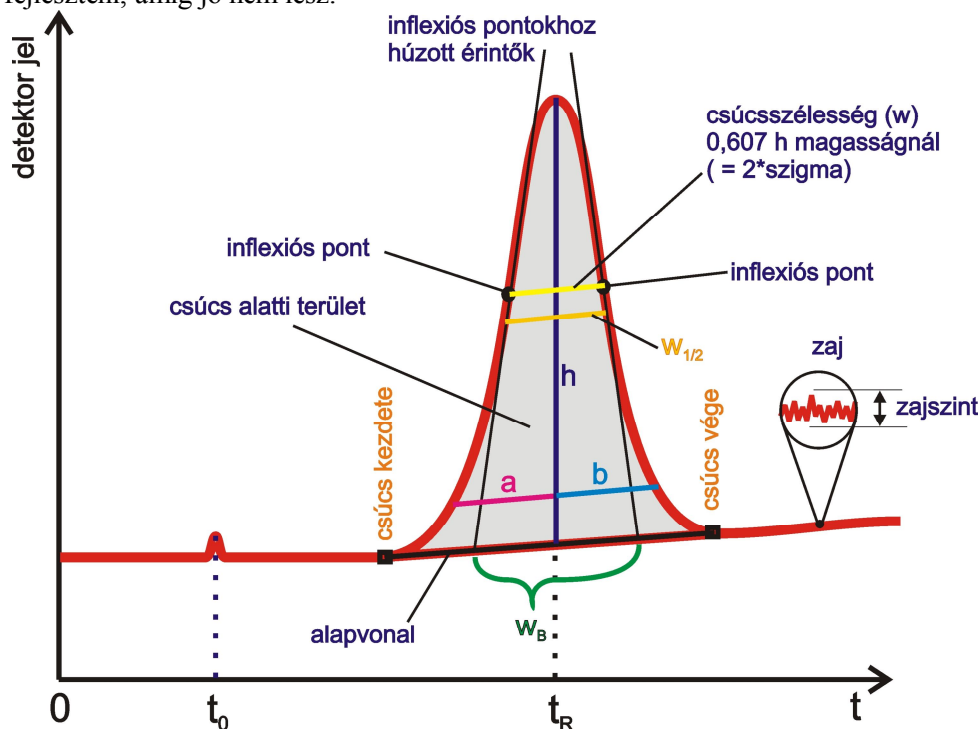
Hogyan határozza meg a számítógép a csúcs kezdetét és végét? A kromatográfiás szoftverek alapértelmezésben olyan adatelemző beállításokat tartalmaznak, amelyek az átlagos csúcsok megtalálását automatikusan biztosítják. (A beállításokat a kromatográfusnak a mérések során a konkrét kromatogram tulajdonságait 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 csúcsszélességet 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 csúcsnak, 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 kromatográfiás szoftver számos lehetőséget ad az átfedő csúcsok kezelésére, a szabványokban rögzített módszerek többsége csak a teljes alapvonal elválást fogadja el. Ha az nem teljesül, addig kell a kromatográfiás módszert fejleszteni, amíg jó nem lesz.



1. ábra A kromatográfiás csúcsok jellemzésére szolgáló legfontosabb paraméterek.

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 kromatográfiás technikáknál (pl. gélkromatográfiánál) elterjedt a retenciós térfogat használata (V_R). A retenciós térfogat a mozgó fázisnak az a térfogata, amely az injektálástól a kromatográfiás 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):

$$V_R = t_R \cdot F$$

Fordított fázisú kromatográfiában egy anyag retenciós térfogata közvetlen kapcsolatban van az anyagnak az álló és a mozgó fázis közötti megoszlási hányadosával (K) a következő egyenletnek megfelelően:

$$V_R = V_m + K \cdot V_s$$

ahol V_m a kolonnán belül a mozgófázis, V_s pedig a kolonnán belül az állófázis térfogata.

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 holttérfogatnak (V_0) nevezzük. A holttérfogat elméletileg az állófázis szemcséi közötti tér, valamint a szemcsék belsejében lévő üregek és csatornák együttes térfogatát adja meg.

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

A kísérletileg meghatározott holttérfogat az elméletileg várt értéktől kisebb. Azt, hogy a szemcsék belsejében mekkora a valóban hozzáférhető térfogat, 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.

A holttérfogat pontos kísérleti meghatározása néha igen nehéz lehet az elválasztásban részt vevő folyamatok sokfélesége következtében. Nem mindegy, hogy kémiai milyen tulajdonságú, ill. fizikailag mekkora méretű a holttérfogat méréséhez használt molekula. Nagy molekulák például nem férnek be a nagyon kis pórusokba, így nem is mérhetik azokat. A fordított fázisú folyadékkromatográfiában a holttérfogat közelítő pontosságú mérését deuterált oldószerekkel, tiokarbamiddal vagy uracillal végzik. Az ezekkel kapott eredmények a gyakorlat számára már elfogadhatóak. A pontos értéket a homológ sorozatokra kapott kapacitásfaktorok logaritmusának ($\log k'$) nulla szénatomszámmra történő extrapolálásával határozzák meg.

Egy komponens retenciójának a valódi mértékét nem a retenciós térfogattal v. retenciós idővel fejezzük ki, hanem a *kapacitásfaktor*ral v. kapacitástényezővel (k'), ami a *redukált retenciós térfogat* ($V_R - V_0$) és a holtterfogat (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 kapacitásfaktor jelölésére a HPLC-s gyakorlatban hagyományosan a k' -t használják. Az IUPAC már hosszú idő óta a vessző nélküli k használatát tartja szabályosnak, de a könyvek, cikkek nagyobbik hányada a régi jelölést alkalmazza. Ebben a jegyzetben éppen a hozzáférhető irodalommal való kompatibilitás miatt meghagytuk a régies jelölést, de legyünk tisztában az új szabályokkal! (Történelmileg azért használták a k' jelölést, hogy ne lehessen összekeverni a K egyensúlyi állandóval, amit akkoriban gyakran kis k betűvel írtak.)

A HPLC-s mérések során a térfogati áramlási sebességet általában állandó értéken tartjuk, így a F térfogati 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 oldószerfelhasználás, a csúcsok már jól szétválnak, a diffúzió okozta sávszélesedés még kicsi, ezért a csúcsfelbontás általában elegendően nagy.

A kapacitásfaktor közvetlenül az álló és mozgó fázisokban oldott anyagmennyiségekből (n_s ill. n_m), illetve az álló és mozgó fázis térfogataiból (V_s , ill.

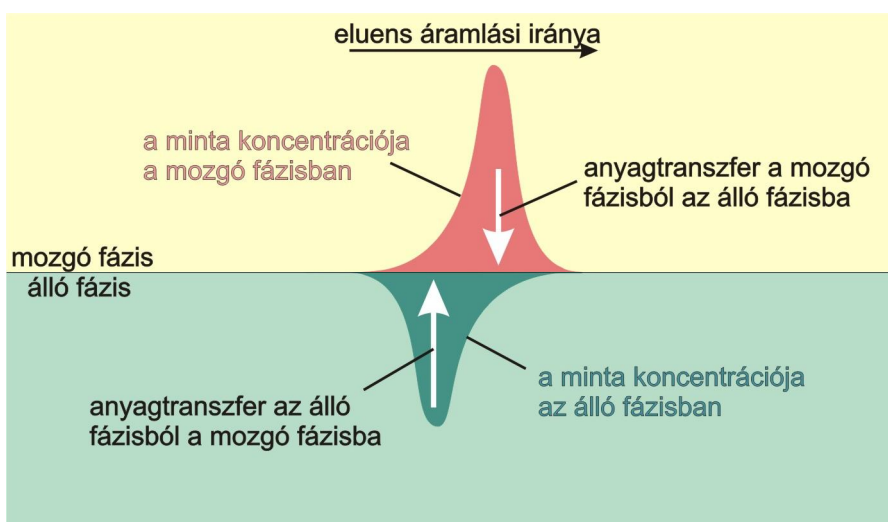
V_m) származtatható. Amennyiben felhasználjuk a megoszlási hányados ($K=c_s/c_m$) definícióját, a k' a következő képlettel fejezhető ki:

$$k' = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s}{c_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} = K \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

A visszatartott komponens retenciója tehát közvetlen kapcsolatban van a két fázis közötti megoszlási folyamat termodinamikájával. Fontos azonban felfigyelnünk arra, hogy a K -val jellemzett statikus egyensúly beállításához számottevő időre van szükség, ami dinamikus, folyamatosan áramló rendszereknél nem valósul meg, ugyanis a fázisokon belüli, valamint a fázisok közötti közötti anyagátadással kapcsolatban gátlások lépnek fel.

A K értékét legjobban a megoszlási folyamatban részt vevő két fázis anyagi minőségének (azaz a kolonna töltetének és az eluens összetételének) megváltoztatásával érhetjük el. A k' értékét kisebb mértékben az álló és mozgó fázis térfogatarányával is befolyásolni lehet. Minél nagyobb az állófázis térfogata a mozgófázis térfogatához képest, annál nagyobb a k' értéke.

A fordított fázisú kromatográfiában a kapacitásfaktor értéke a kromatográfiás megoszlási folyamat szabadenergiaváltozásával arányos. A 2. ábrán a két fázis közötti megoszlás révén kialakuló koncentrációprofil látható az áramló mozgó fázisban, illetve az álló fázisban.



2. ábra Az anyagtranszport mechanizmusának és a koncentráció profilok kialakulásának szemléltetése fordított fázisú kromatográfiás elválasztás esetén.

Fizikai-kémiai tanulmányainkból tudjuk, hogy egyensúlyi folyamatoknál az egyensúlyi állandó és a folyamat szabadentalpia változása között a következő összefüggés van:

$$RT \cdot \ln K = -\Delta G^0$$

Adott kolonnán a K megoszlási hányados és a k' kapacitásfaktor csak egy konstans szorzótényezőben különböznek, tehát a kapacitásfaktor egy egyensúlyi állandó jellegű, termodinamikai mennyiség. Az előző egyenletet átírhatjuk a következő formában:

$$RT \cdot \ln k' = -\Delta G^0 - RT \cdot \ln c$$

ebből az $\ln k'$ -t kifejezve:

$$\ln k' = \frac{-\Delta G^0}{RT} - \ln c = \frac{-\Delta H + T\Delta S}{RT} - \ln c = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} - \ln c$$

Az $\ln k'$ hőmérsékletfüggését az egyenlet T szerinti deriválásával kapjuk, így jutunk el az elválasztási folyamat hőmérsékletfüggését leíró van't Hoff egyenlethez:

$$\frac{d \ln k'}{dT} = \frac{\Delta H_{s \rightarrow m}}{RT^2}$$

ahol a $\Delta H_{s \rightarrow m}$ az állóból a mozgó fázisba történő anyagátmenet entalpiaváltozása.

Mivel a folyadékkromatográfiában az álló és mozgó fázis közötti anyagátmenet során az entalpiaváltozás ($\Delta H_{s \rightarrow m}$) viszonylag kicsi, a hőmérséklet kis mértékű megváltozásának csak nagyon kis hatása van az elválasztásra. A gyenge hőmérsékletfüggés ellenére igényes, nagy pontosságú elválasztásoknál ma már elvárás a kolonna termosztátok használata.

Vannak olyan HPLC-s módszerek, amelyek során nem csak szobahőmérséklet közelében, hanem megemelt hőmérsékleten (40-90 °C) dolgoznak. Természetesen csak akkor van lehetőség ezekre a vizsgálatokra, ha a minta komponensei elegendően hőállóak. Legújabbak már 100 °C környezetében lévő vízzel is történnek

vizsgálatok, szerves módosítók hozzáadása nélkül. A csak vizet használó módszerek környezetbarátok és olcsók, de csak a vegyületek szűkebb köréhez alkalmazhatók és a kolonnákkal szemben is nagy kihívást jelentenek.

A hőmérséklet függvényében a folyadékok viszkozitása és az oldott komponensek diffúziós állandója is nagyon jelentősen változik, ezeken keresztül módosítani (javítani vagy rontani) lehet a kromatográfiás elválasztási folyamatokat. A viszkozitás a hőmérséklet emelésével rohamosan csökken, ami lehetővé teszi, hogy a korábbinál nagyobb áramlási sebességet is használhassunk anélkül, hogy a készülékünk felső nyomáshatárát elérnénk. A hőmérséklet emelkedésével azonban a diffúziós állandó nő, ami szélesíti a csúcsokat, rontja az elválasztást. A lecsökkent viszkozitás által lehetővé tett nagyobb áramlási sebességgel kompenzálni, sőt meghaladni lehet a diffúzió növekedésének a negatív hatását, ezért a kromatográfiás körülmények megfelelő beállításával magasabb hőmérsékleten gyorsabb és élesebb elválasztásokat lehet elérni.

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.

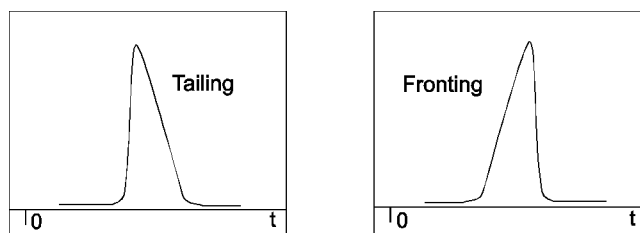
A mennyiségi meghatározás alapja a kromatográfiában általában a csúcs alatti terület (A), ami az alapvonal és a csúcs által bezárt területet jelenti. A terület konkrét mértékegysége a szoftver beállításától és a detektor által kibocsátott jel típusától függően változó, de a dimenziója mindegyiknek jelintenzitás*idő (tipikusan $mV \cdot perc$ vagy $mV \cdot s$). 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 alapvonallal párhuzamosan, 10%-os

magasságnál elvágjuk a csúcst, 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 elhúzóda (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 csúcsalaknak 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 elhúzódozó vagy előreszaladó csúcsról van szó, úgy kell megváltoztatni a kromatográfiás körülményeket (eluens összetétele, kolonna), hogy jó szimmetriájú csúcsokat kapjunk, amelyekkel pontos méréseket végezhetünk.

A kolonna adott komponessel 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 ugyanakkorra elválasztási hatásfokot biztosítani, mint az adott kromatográfiás 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 hosszúságot adja meg, és könnyen ki tudjuk számítani az elméleti tányérszámból és a kolonna hosszúságából:

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

Az elméleti tányérszám a konkrét kromatográfiás körülmények között egy kiválasztott anyagra vonatkozik, abszolút értékének igazából nincs jelentősége. Az egyik anyagra megállapított elméleti tányérszám nem ad információt egy másik vegyület kromatográfiás 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.

Mire lehet az elméleti tányérszámot a gyakorlatban felhasználni? Általában arra, hogy a kolonna jóságát valamilyen számszerű módon jellemezni tudjuk. A kolonnákat mindig egy minőségi tanúsítvánnyal együtt szállítják, amelyen feltüntetnek egy olyan kromatogramot, amit az adott kolonnán vettek fel ellenőrzött körülmények között. Ezen általában négy vagy több vegyület csúcsa látható, mindegyikre megadják több más adat mellett az elméleti tányérszám értékét is. Amikor a kromatográfus ellenőrizni szeretné, hogy mennyire használható még a kolonna, akkor a tanúsítványban feltüntetett mintát az eredetivel azonos körülmények között futtatja, majd az újonnan kapott elméleti tányérszám értékeket összehasonlítja a tanúsítványban szereplőkkel. Amennyiben jelentős csökkenést tapasztal, úgy igényes, nagy felbontást kívánó munkához célszerű új kolonnát beállítani. A használt kolonnát nem feltétlenül kell kidobni, mert tájékozódó jellegű vizsgálatokhoz, agresszívabb kromatográfiás körülményekhez, kezdeti módszerfejlesztésekhez még sokszor felhasználható.

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:

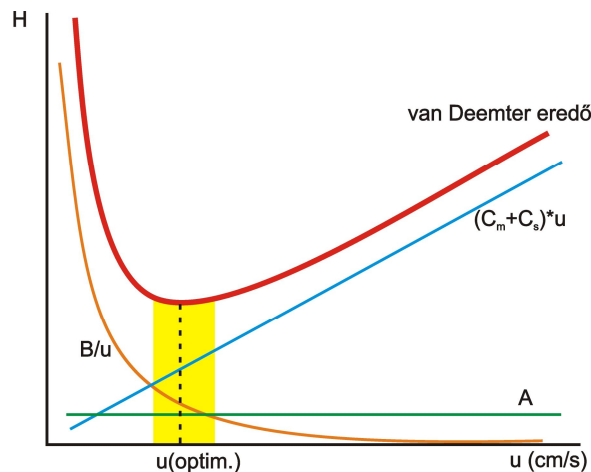
$$H = A + \frac{B}{u} + C_m \cdot u + C_s \cdot u$$

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.



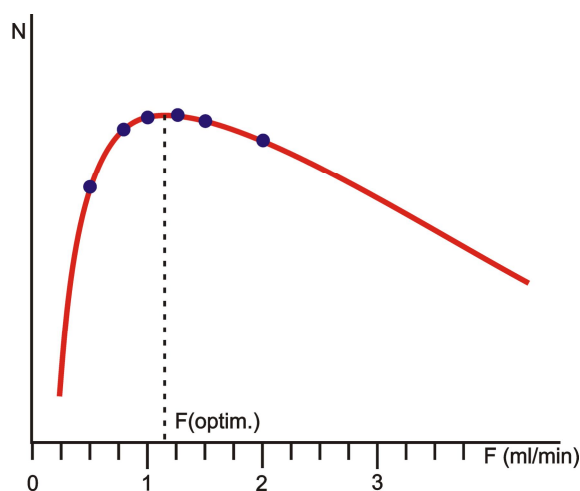
4. ábra A van Deemter egyenlet és az azt alkotó függvények ábrázolása. Az elméleti tányérmagasságot ábrázoljuk a lineáris áramlási sebesség függvényében

Hogyan tudjuk saját magunk meghatározni saját kolonnánk esetén az optimális áramlási sebességet? Először nézzük meg, hogy hogyan változik meg a görbe alakja, ha a van Deemter egyenlet helyett a térfogati áramlási sebesség (F) függvényében ábrázoljuk az elméleti tányérszámot (N)! A vízszintes tengelyen a változás csak egy konstans szorzótényezőt jelent, a függőleges tengelyen pedig egy reciprokl összefüggést, összességében tehát a van Deemterhez hasonló alakú, de maximummal rendelkező görbéhez jutunk, ahogy az alábbi ábrán is láthatjuk.

A gyakorlatban úgy járunk el, hogy kiválasztunk egy komponenst a vizsgálathoz, a térfogati áramlási sebességet kivéve mindent állandó értéken tartunk, majd több

áramlási sebességnél is megfuttatjuk a kiválasztott komponenst. A csúcs paramétereiből kiszámítjuk az elméleti tányérszámot, és azt ábrázoljuk az áramlási sebesség függvényében. Öt-hat mérési pontból már elegendő pontossággal meg tudjuk becsülni, hogy hol van a görbe maximuma.

A tapasztalat az, hogy a hagyományos 4,6 mm belső átmérőjű kolonnák esetén a gyakorlatban a legtöbbször 1 ml/perc körüli térfogati áramlási sebességet használnak, ez pedig nagyjából megegyezik a kimérhető optimális áramlási sebességgel.



5. ábra Az optimális térfogati áramlási sebesség kísérleti meghatározása során egy kiválasztott anyagot futtatunk azonos körülmények között, csak az áramlási sebességet változtatjuk 5-6 lépésben, kb. a 0,5-2 ml/perc tartományban, majd amérési pontokból nagyjából megbecsüljük az optimumot.

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.

Az R_s kifejezésére még egy másik, az előzővel ekvivalens képletet is használnak:

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right)$$

Ebben az egyenletben egyidejűleg szerepelnek a kinetikai jellegű (N_2) és a termodinamikai jellegű (α , k') paraméterek, felhasználásukkal lehetőség van előre kiszámítani azt, hogy mennyit kell pl. a retenciós időkön vagy az áramláson változtatni ahhoz, hogy az elválasztás megfelelő legyen.

A KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK ANYAGAI ÉS ESZKÖZEI

Eluens- és mintaelőkészítés

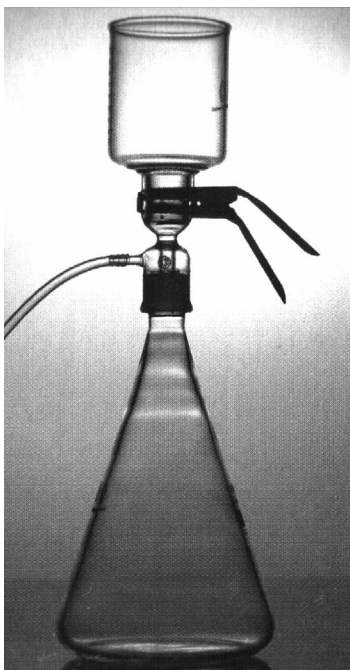
A lehető legritkábban találkozunk olyan feladattal, amelynél kristálytiszt, minden zavaró komponenstől mentes mintát kell vizsgálnunk. sokkal gyakoribbak azok az esetek, amikor a keresett komponest vagy komponenseket egy sötét színű, zavaros vagy csapadékos oldatból kell meghatároznunk úgy, hogy a készülékünket 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

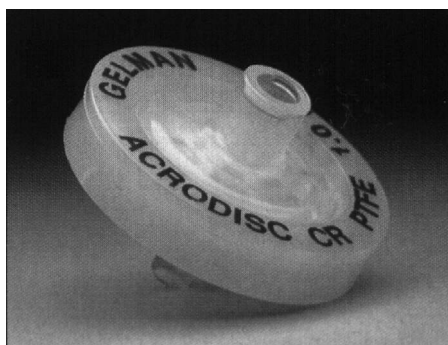
A HPLC-ben különösen nagy a jelentősége annak, hogy mind az alkalmazott oldószerek, mind pedig az injektált minták maximálisan meg legyenek tisztítva mindenfajta lebegő szennyeződéstől. Ezt a legegyszerűbben úgy érhetjük el, ha az oldószereket illetve a mintákat megfelelően kis pórusméretű szűrőn, úgynevezett membránszűrőn átszűrjük. Mivel a membránszűrő lapok nagyon finomak (néhány tízed mikronosak) a folyadékok saját súlyuknál fogva már nem képesek ezeken a lapokon a kellő sebességgel átfolyani, a szűrés meggyorsítására ezért vákuumot vagy nyomást alkalmazunk. A következő ábrán olyan, üvegből készült szűrőtölcsért láthatunk, amelyben cserélni lehet a membránszűrő lapokat, így mindig a kellő finomságú lapot választhatjuk ki munkánkhoz.

A membránszűrés közben részlegesen az oldott gázok is eltávoznak, amivel megkönnyíthetjük az on-line gázmentesítő egység munkáját is. A fenti készülék nagy méretei miatt használhatatlannak bizonyulna a kis mennyiségben rendelkezésre álló minták szűrésénél, ezért ilyen célra sokkal kisebb, néhány cm³-es térfogatú szűrőtölcséreket is kifejlesztettek. Gyakran azonban a rendelkezésre álló minta térfogata olyan kicsi, hogy nincs lehetőség a fenti készülék használatára. Ilyen esetekben injekciós fecskendő végére szerelhető, nagyon sokféle méretben és finomságban kapható membránszűrőket használunk, amelyek esetén az átfolyást nem vákuum, hanem nyomás alkalmazásával érjük el. Ezek a kis méretű szűrőlapok

olyan kis belső holttérfogattal rendelkeznek, hogy a folyadékvesztés minimálisnak tekinthető.



6. ábra Nagyobb térfogatú oldószer szűrésére használható, cserélhető szűrőlapos készülék képe. A tölcserbe egyszerre általában 200–300 cm³ folyadékot tölthetünk.



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 sterilizálásnál 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.

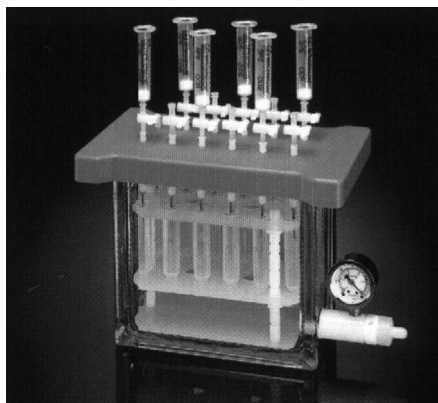
Szilárd fázisú extrakció

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 extrakció*s (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 töltettípussal, 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 lapocska tartja. Az oldószer átívását vákumm 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 átívadjuk rajtuk a mintákat, lemosuk a meg nem kötődött oldatot, végül megfelelő oldószerrel leoldjuk a kolonnán megkötődött vizsgálandó anyagot.



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

Kolonnák

Mechanikai kialakítás

A kromatográfokhoz sokáig csak egyetlen fajta mechanikai kialakítású, csavarkulcsok segítségével szerelhető kolonnát használtak. Ezek használata nem volt igazán kényelmes, ezért kidolgozták a csupasz kézzel is szerelhető csatlakozókat, amelyeknél a szokásos méretű csatlakozóelemeket az addigiaknál sokkal nagyobb,

bordázott felületű, jól kézbe fogható méretű peremmel látták el. A kolonnákat hagyományosan a két végükön lévő menetes csatlakozókkal együtt árulják, de olyan patronos megoldású kolonnák (cartridge) is kaphatók, amelyeknél csak a töltött csövet kell kicserélni és a csere kézzel is elvégezhető. A cartridge kolonnák használatához meg kell vásárolni a befogató elemeket, amelyek gyakran csak egy adott gyártó kolonnájához használhatók.

Töltetek

A kromatográfiás gyakorlatban nagyon sok fajta töltetanyaggal találkozhatunk, itt sajnos nincs lehetőség a kereskedelmihez 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 kötással rögzítve hosszabb-rövidebb szénláncokat, vagy funkciós csoportokkal 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 funkciós csoportokkal 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 $\text{pH} = 9$ fölött dolgozni velük. A használható pH-tartomány problémáját úgy oldották meg, hogy a felületi rétegeket nem szilikagélhez, hanem mikroszkópikus üveggyöngyhöz (nem porózus szerkezetű), kemény polisztirol-szemcsékhez, vagy más polimer hordozókhoz kötötték. A polimer hordozós töltetek a mechanikai igénybevételekkel szemben kevésbé ellenállóak, az oldószerváltás, 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 gyógyszer-hatóanyagról 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

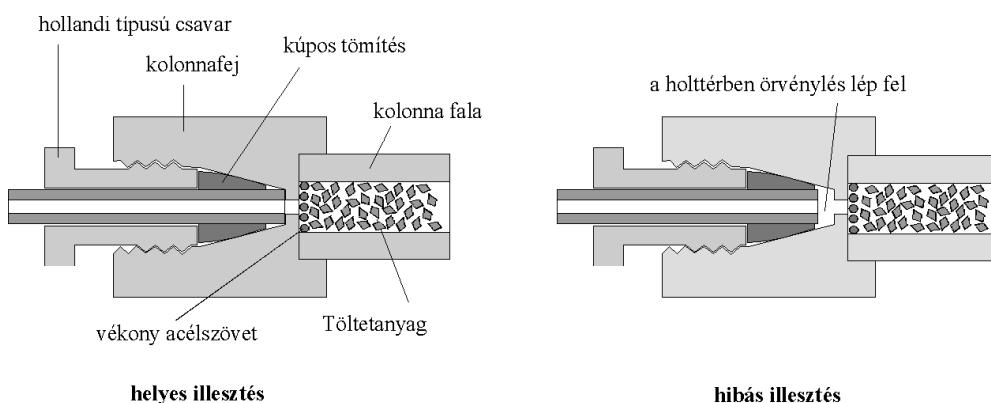
fejlesztették ki a dextránvázhhoz kémiai kötéssel kapcsolt, királis molekulák alkotta állófázisokat, amelyek szelektíven csak az egyik izomert tartalmazzák és egy racém elegyben lévő különböző izomerekkel eltérő erősségű kölcsönhatást alakítanak ki.

1. táblázat A leggyakoribb töltetanyagok jelölése és tulajdonságai

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

A kolonának és a csövek illesztésénél vigyáznunk kell arra, hogy minél közelebb kerüljenek a csatlakozó végek egymáshoz, hogy közöttük a holttér minimális legyen. A holttér rendkívül káros, mert benne örvénylés alakul ki, aminek következtében a minta sokkal szélesebb fronton halad végig, mint ami szükséges. Ez a csúcsok kiszélesedéséhez vezet, aminek következtében a készülék felbontása jelentősen romlik. A kolonna és egy vezeték csatlakozójának vázlatos metszeti képe látható a 13. ábrán.



9. ábra A kolonna és a csatlakozó csövek helyes és helytelen illesztése

Fémről készült cső és fém hollandi csavar esetén a tömítésnek általában fémből kell lennie, míg műanyagcső, műanyag hollandi csavar esetén a tömítés anyaga is műanyag. A tömítés anyagának eltévesztése szivárgáshoz, valamint a csővég károsodásához vezethet. Nagyon gondosan kell eljárni a legelső csatlakoztatás végrehajtásakor (különösen fémből készült szerelvények esetén), mert a tömítés a csavar első meghúzásakor enyhén deformálódik, rápréselődik a csőfalra és az ekkor beállított helyről többé már nem távolítható el!

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 csővezetékeknek és egyéb szerkezeti anyagoknak *kémiaailag teljesen inertnek* kell lenniük az alkalmazott oldószerrel szemben.

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

Az oldószervezeték(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.

Milyen átmérőjű csöveket használnak a legtöbb HPLC készülékben? Az általánosan elterjedt gyakorlat szerint a legtöbb esetben a csövek külső és belső átmérőjét inch-ben ($1'' = 25,4 \text{ mm}$) adják meg. A legerjedtebbek az $1/16''$ (1,59 mm) külső átmérőjű csövek, ennek belső átmérője $0,01''$ (0,25 mm), $0,02''$ (0,51 mm) vagy $0,03''$ (0,76 mm) lehet. A legvékonyabbat az injektor és a kolonna, valamint a kolonna és a detektor közötti (lehetőleg minél rövidebb) összekötő csőnek ajánlják, hogy a cső okozta sávszélesedést a lehető legkisebbre csökkentsék.

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 oldószerszállító csövek ma már gyakorlatilag csak Teflonból készülnek.

Hogyan lehet méretre vágni a nagyon vastag falú kromatográfiás csöveket? Semmiképpen sem harapófogóval! Valójában két lehetőség áll a kromatográfus előtt. Ha acél csövet használ, a legköltségesebb, de legjobb módszer az, ha gyári készítésű, méretre előre levágott csövet vásárol. Második lehetőségként vásárolhat gyári készítésű csővágót, ami műanyag csövek esetén nagyon jól, acél csövek esetén elfogadhatóan használható. Műanyag csöveket éles szikével vagy borotvapengével is szépen lehet vágni.

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 térfogattörtjével, hanem minimumot mutat. Ha például vizet és metanolt, akkor az elegy túltelített lesz az oldott oxigénre és nitrogénre, 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 változó 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 átbuborékolgatva az eluent vele ki lehet űzni 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 oldószeráramlás útjába (on-line) egy folyamatosan működő, vákuumkamrás gázmentesítő egységet helyezünk, amely mindig csak annyi oldószert

gázmentesít, amennyi éppen felhasználásra kerül. A jelenlegi kromatográfiás gyakorlatban ez a legelterjedtebben eljárás, az on-line vákuumos gázmentesítőket az új készülékekben már egybeépítik a pumpával.

Pumpák

A folyadék szállítását a különböző megoldású kromatográfiás 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 eluent 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.

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 folyadékáramlásba. 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 átszűrja 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 autosamplerok fontossága. Alapvető kíváncsi, 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.

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. Ennek a detektornak mára már több, különböző bonyolultsági fokú típusa (működési módja) is kialakult, ezek a következők:

Változtatható hullámhosszon történő detektálás: a spektrofotométert tetszőleges hullámhosszra be lehet állítani és lehetőség van a futtatás közbeni hullámhosszváltásra is.

Scanning detektorok: olyan változtatható hullámhosszúságú detektorok, amelyekkel a kromatográfiás csúcsok maximumához érve lehetőség van egy-két másodperc alatt teljes UV vagy UV-VIS spektrum felvételére és tárolására.

Diódasoros detektorok esetén egy a fentiekől eltérő detektálási módszer használnak, a mintán nem a monokromátor által előállított, kiválasztott hullámhosszúságú fény halad át, hanem a teljes spektrumú fény, amelyet egy rács segítségével a minta után bontanak fel folytonos spektrummá. Ezt a spektrumot vetítik rá egy fényérzékeny diódákból készített lapkára, amelyen minden hullámhossz érzékelését külön-külön dióda végzi. Az eredmény az lesz, hogy minden egyes kromatográfiás ponthoz egy teljes spektrum rendelhető. Egyszerű kétdimenziós kromatogram helyett háromdimenziós ábra jön létre, amelyből tetszőleges hullámhossznál kivághatunk egy-egy hagyományos kromatogramot, de természetesen számtalan más ábrázolási mód is rendelkezésünkre áll. Csak számítógéppel összekapcsolva használható. A detektort természetesen 1-3 kiválasztott hullámhosszon is lehet használni, ekkor a szokásos kromatogramokat szolgáltatja. Az ilyen detektorokhoz olyan számítógépes programokat is kifejlesztettek, amelyek segítségével spektrum-adatbázisból az egyes csúcsok automatikus azonosítása, illetve a csúcstisztaság vizsgálata megvalósítható.

Hogyan választjuk ki a detektáláshoz használt hullámhosszat UV-detektorok esetén? Lehetőség szerint arra törekszünk, hogy a vizsgálni kívánt anyagunk UV-spektrumában az elnyelési maximumhoz tartozó hullámhosszon végezzük a mérést, hiszen ekkor lesz az adott komponensre nézve a legnagyobb a készülékünk érzékenysége. Változtatható hullámhosszúságú detektorral vagy diódasoros detektorral el tudjuk érni azt, hogy minden vegyületet a saját elnyelési maximumán detektáljunk.

Fluoreszcenciás detektor

A fluoreszcenciás detektorok nagy érzékenyságük és szelektivitásuk következtében egyre népszerűbbek, különösen a biológiai és orvosi diagnosztikai vizsgálatokban, mivel a porfirinvázis vegyületek, az aflatoxinok, riboflavinok, vitaminok, gyógyszerek és gyógyszer-metabolitok erősen fluoreszkálnak. Működése azon alapszik, hogy a vegyületeket valamilyen kiválasztott hullámhosszúságú fénnel gerjesztik és a gerjesztett vegyület által kibocsátott fényt sötét háttér előtt detektálják. A kibocsátott fény hullámhossza nagyobb, mint a gerjesztő fényé. A fluoreszcenciás detektorok annyira érzékenyek, hogy a kolloid lebegő szilárd anyagok vagy az oldatban képződő, UV-detektorok számára még láthatatlan nagyságú buborékok is jelentős zavarjeleket eredményeznek. A detektor érzékenyen reagál a hőmérséklet és az eluens viszkozitása változására, ezért a detektorcellát termosztálni kell.

Elektrokémiai detektor

Minden olyan anyag detektálható elektrokémiai módszerrel, amely valamilyen elektródreakcióba vihető, oldata vezeti az elektromos áramot (ionos vegyületek). Ezek egy része egyidejűleg UV-aktív anyag is, míg másik részüket fotometriás úton közvetlenül nem lehet kimutatni. Az elektrokémiai detektoroknak nagy az érzékenysége, nagy a szelektivitása, jól összeférhetők a fordított fázisú kromatográfiás rendszerekkel (hiszen itt az egyik eluens általában a víz) és nagy a lineáris tartományuk. Működési elvüket tekintve két nagy csoportjuk különböztethető meg: a voltametriás és az amperometriás detektorok. A legújabb gyártmányú készülékekkel már minden detektálási mód használható.

Amperometriás detektorok: A cellára kapcsolt egyenfeszültséget egy elektromos stabilizátor egységgel állandó értéken tartják és folyamatosan mérik a cellán áthaladó áram erősségét.

Amennyiben a feszültséget úgy állítják be, hogy az összes áthaladó komponens részt vesz az elektródreakcióban, akkor az eljárást coulometriás detektálásnak nevezik.

Voltametriás detektorok: A cellára adott feszültséget rövid időközön belül folytonosan változtatják és közben mérik az áthaladó áram erősségét. A detektálás

megvalósítható mikrométerekben, de makroszkópikus detektoroként is használható. Amennyiben cspegő higanyelektrodot alkalmaznak, akkor a detektort polarográfiás detektornak nevezik.

Az alkalmazott típustól függetlenül általában minden esetben háromelektrodos (munkaelektrod, segédelektrod és referenciaelektrod) átfolyó cellát használnak.

Vezetőképességi detektor

Egy oldat vezetőképességének a folytonos mérésével információt kaphatunk mind az abban oldott szerves, mind a szervetlen vegyületek mennyiségéről. A cella két platinalamezkét tartalmaz, amelyen keresztül váltakozóáramot vezetnek át. A nagyobb frekvenciájú váltakozóáram hatására nem következi be elektródreakció, az áthaladó áram intenzitása arányos lesz az oldott anyag mennyiségével. Amennyiben elektromosan vezető eluent használunk, akkor az elektromosan nem vezető komponensek is kimutathatók, mert ezek „hígítják” az alap elektrolitot, aminek következtében a kromatogramban negatív csúcsként jelentkeznek. 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 eluent 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!).

A KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK ÁLTALÁNOS MENETE

Nem lehet egyetlen olyan általános receptet adni, amely minden kromatográfiás vizsgálathoz egyformán használható lenne. Annál nehezebb a kromatográfus dolga, minél több komponensű az analizálandó minta, és minél több major és minor komponens mennyiségét kell meghatározni.

A legnehezebb feladat az olyan mintának a teljes vizsgálata, amelynek a komponenseiről (azok számáról, kémiai minőségéről, mennyiségéről) semmit nem tudunk. Egy ilyen teljes vizsgálat tökéletesen felszerelt laboratóriumban is több hónapig tarthat és egyáltalán nem garantálható, hogy a végén minden komponenst sikerül beazonosítani. Az ismeretlen vegyületek azonosításáról mindenképpen tudnunk kell, hogy nagyon összetett feladat, rutin szinten megoldani általában nem lehet. A legutóbbi években általánosan elterjedtek a különböző típusú HPLC-MS rendszerek, illetve egyre több helyen találhatók HPLC-NMR rendszerek, amelyek más detektorokkal, illetve kétdimenziós futtatási lehetőségekkel kiegészítve először adnak reményt a legtöbb komponens minőségi azonosítására. Egy teljesen ismeretlen vegyület első körben történő beazonosítását (vagy vélt beazonosítását) csak akkor tekinthetjük biztosnak, ha független forrásból származó standardot találunk, amit azonos körülmények között azonos vizsgálatoknak vetünk alá és azonos eredményeket kapunk. A kromatográfiás azonosságot két eltérő polaritású kolonnán történő futtatás során kapott azonos retenciós idővel igazolhatjuk. Az anyagi minőség azonosságát legjobban nagy felbontású tömegspektrummal lehet igazolni, vagy kis felbontású tömegspektrum fragmentációs mintájával, illetve szelektív reakció nyomkövetéses technikával. Ezek mindegyike nagyon magas szintű szaktudást és speciális műszerezettséget igényel. A legnagyobb problémát a gyakorlatban a független standardok beszerezhetlensége jelenti.

Mérési módszer kidolgozása

Amennyiben van információnk a meghatározandó vegyületek köréről, legelső sorban azt kell eldöntenünk, hogy milyen típusú kolonnán végezzük a vizsgálatot (könnyen

lehet, hogy egyetlen kolonnával nem is tudjuk megoldani a feladatot), majd ki kell választanunk a számításba vehető eluenseket. Ehhez nagyon nagy segítséget jelentenek a különböző kromatográfiás katalógusok, azokban ugyanis a legismertebb vegyület esetén gyakran minta módszereket és kromatogramokat is megadnak, amik segíthetnek a saját mérésünk beállításában. Ezután következik tiszta standardok felhasználásával a kromatográfiás körülmények beállítása és optimalizálása, a módszer teljesítményparamétereinek (kimutatási határértékek, szórások, linearitási tartományok) meghatározása, majd az egész dokumentálása.

Mintaelőkészítés

A gyakorlatban nem a mérési módszer megtalálása jelenti a legnagyobb problémát, hanem a vegyes forrásból származó minták pontos előkészítése a mérésekhez. Nagyon sok ismeretlen komponens szokott a mintákban lenni, amelyek kromatográfiás szempontból rendkívül változatosan viselkednek, sokszor zavarják a mérést, vagy nem is kromatografálhatók a rendszerünkön. Nagyon gyakori, hogy dúsítani kell a mintánkat a meghatározandó komponensre nézve, más esetekben valamilyen szelektív elválasztási módszerrel már előzetesen el kell csoportonként különíteni a komponenseket (pl. vér és vizelet mintából le kell csapatni a fehérjét).

A mintaelőkészítési eljárások legalapvetőbb szabálya az, hogy nem szabad veszíteni a meghatározandó komponensből. Ezt a gyakorlatban csak nagyon nagy gondosság mellett lehet teljesíteni. A mintaelőkészítési lépések ellenőrzése céljából pontosan ismert mennyiségű ún. kísérő standardot adunk az eredeti mintához. A kísérő standard oldékonysági és kromatográfiás szempontból nagyon hasonlóan kell hogy viselkedjen, mint a meghatározandó komponensünk. Együtt mennek végig a teljes előkészítési láncon, majd ismeretlenként kezelve ugyanúgy meghatározzuk a kísérő standard mennyiségét, mint a valódi ismeretlenünket. A kísérő standard eredetileg bemért mennyiségét ismerjük, így a bemért és a visszamért értékből a mintafeldolgozás/dúsítás hatásfokát ki tudjuk számítani. Általában a szabványok nem fogadnak el olyan mérést, aminél a kísérő standard visszanyerési hatásfoka kívül esik a 90-105% tartományon. Tömegspektrometriás detektálás esetén a meghatározandó komponens deuterált származékai a legkézenfekvőbb és legjobb kísérő standardok, de más detektort használva azok nem különböztethetők meg az eredeti ismeretlentől. UV, RI, fluoreszcenciás, stb. detektoroknál az ismeretlentől elkülönülő kromatográfiás csúcsot adó vegyületet használunk, aminek a kiválasztása még a módszerbeállítás során történik és bizonyítani kell, hogy valóban teljesíti a szabvány által megkívánt visszanyerési hatásfokot.

Elúciós technikák

A folyadékkromatográfiában a minta komponenseinek elúcióját (a kolonnáról történő leoldását) alapvetően kétfajta módon végezhetjük el, ezek az izokratikus elúció és a gradiens elúció.

Az izokratikus elúció során az eluens összetétele állandó a teljes kromatográfiás eljárás során. Ez a létező legegyszerűbb technika, általában csak kromatográfiásan hasonló tulajdonságú komponensekből álló ismeretlenek mérésére használjuk. Amennyiben a mérési feladatunk megoldható izokratikus elúcióval, nincs okunk gradiens elúciót használni. Az izokratikus elúcióval kapott kromatogramokra az a jellemző, hogy a csúcsok viszonylag közel helyezkednek el egymáshoz képest, nincsenek nagy üres régiók a kromatogramban.

Amennyiben izokratikus elúciót alkalmazva a csúcsok csak a kromatogram elején következnek viszonylag közel egymáshoz, majd a csúcsok közötti távolságok és a retenciók idői is rohamosan nőnek (sok az üres tér), úgy szükség van a kromatogram rövidítésére úgy, hogy a felbontás ne romoljon, sőt lehetőség szerint nőjön. Ezt a gradiens elúció alkalmazásával valósíthatjuk meg. A gradiens elúció azt jelenti, hogy megkezdjük a futtatást egy adott összetételű eluenssel, majd a nagyobb elúciós erejű komponens koncentrációját fokozatosan növeljük a mozgó fázisban, így a távoli csúcsokat egyre gyorsabban mossuk le a kolonnáról. Végeredményül egy rövidebb, tömörebb kromatogramot kapunk, amelynek az eleje olyan, mint amit izokratikus elúcióval kapunk, a távoli csúcsok pedig időben is, és egymáshoz is közelebb kerülnek.

Minőségi azonosítás

Először a kromatográfiás paraméterek megfelelő változtatásával el kell érni, hogy lehetőleg minden komponens jól elváló, emellett lehetőleg ideális alakú csúcsként detektálható legyen. (Ehhez hozzátartozik az is, hogy meg kell találni a megfelelő detektálási módot, de erről még beszélünk a detektorok kapcsán.)

Az elsődleges minőségi azonosítás a retenciók idő alapján történik, ez azonban egyetlen kolonnán, egyetlen kromatográfiás módszerrel meghatározva nem

bizonyítja a minőségi azonosságot. Ahhoz, hogy a retenciók idői alapján a komponensek azonosítását elfogadjuk az szükséges, hogy egy másik típusú (más polaritású) kolonnán, más kromatográfiás körülmények között is retenciók idői azonosságot találjunk a standarddal összehasonlítva. Ezt a másik kolonnát általában konfirmáló (megerősítő) kolonnának nevezzük.

Tömegspektrométer detektort használva a vegyület ujjlenyomatszerű primer tömegspektruma, illetve a különböző szelektív tömegspektrometriás technikákkal nyert származék ionjainak a megjelenése egyetlen kolonnán történő mérésel is bizonyítja a minőségi azonosságot.

Mennyiségi meghatározás

Külső standard módszer

A folyadékkromatográfiában nagyon gyakran használt, egyszerű és népszerű módszer. Használatát az teszi lehetővé, hogy a detektorok nagyon stabilis, jól reprodukálható, kis hibával terhelt jelet szolgáltatnak. Pontosan ismert koncentrációjú oldatsorozattal kalibrálva a készülék abszolút koncentrációk mérését teszi lehetővé.

A modern kromatográfiás szoftverek minden nehézség nélkül kezelni tudják a nem lineáris jel–mennyiség kalibráló görbéket is.

Standard addíció

Ezt a módszert akkor használjuk, amikor összetett minták elemzése során felmerül a gyanúja annak, hogy a mintát alkotó egyéb anyagok (a mátrix) aktívan kölcsönhatásba lép a meghatározandó vegyületünkkel (pl. komplexet képez), aminek következtében nem a teljes mennyiségét, hanem annak csak egy hányadát detektáljuk.

Úgy járunk el, hogy a mintához a meghatározni kívánt komponensből ismert mennyiségeket adnak, és minden hozzáadás után elvégezzük a kromatográfiás vizsgálatot. Az integrálértékeket ezután a hozzáadott standardmennyiség függvényében ábrázolva egy olyan egyenest kapunk, amely a függőleges tengelyt

nem a nulla pontban, hanem egy attól nagyobb értéknél metszi. A nulla hozzáadott mennyiségre extrapolált koncentráció (azaz a meghatározni kívánt ismeretlen koncentráció) az egyenes tengelymetszetéből és a meredekségből kiszámítható.

Belső standard módszer

A vizsgálati mintákat nagyon gyakran extrahálni, szűrni, szárítani, bepárolni kell. Ezek során egyre töményebb (dúsított) oldatokat állítunk elő, amelyek térfogata azonban olyan kicsi, hogy nem tudjuk a dúsítási folyamat végén jelre tölteni, mert például csak 200-250 mikroliter van belőle. A végső térfogat bizonytalansága miatt a koncentrációt meghatározni nem sok értelme van. Ennek a bizonytalanságnak a kiküszöbölésére használjuk a belső standard módszert. Belső standard bármilyen anyag lehet, ami adott körülmények között jól kromatografálható. Közvetlenül a mérés előtt a mintánkhoz ismert mennyiségű (pl. 50 µg) belső standardot adunk, majd elvégezzük a vizsgálatot. Ilyen esetben nem a görbe alatti terület alapján, hanem az ismeretlenünk és a belső standardunk csúcsainak területaránya alapján végezzük a mennyiségi meghatározást. Természetesen ilyenkor a kalibrálást is a területarány alapján végezzük. A mérés során nem az ismeretlen komponens koncentrációját fogjuk megkapni, hanem a mintásüvegben lévő ismeretlen komponensek tömegét. A módszer nagyon jól használható minden dúsításos eljárás során, a végső térfogat ingadozása pedig azért nem zavaró, mert a belemért belső standardot végső soron ugyanígy érinti a hígulás, mint a meghatározandó komponenst, és a csúcsok területaránya ezért állandó.

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 oldószerek megfelelő arányú keverését végzi

Jasco PU-980 pumpa

Az oldószerekkel 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

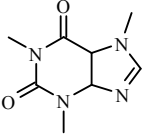
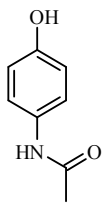
Analitikai kolonna (C18-as fordított fázisú oszlop)

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
Koffein 	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. UV maximum: 270 nm (220 nm), minimum: 245 nm
Paracetamol, más néven: acetaminofen. 	Szintetikusan egyszerűen előállítható, régóta használatos az orvosi gyakorlatban láz és kisebb fájdalmak csillapítására. Szabadforgalmú gyógyszer, számos mellékhatása van. UV maximum: 245 nm

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 Víz	Koncentráció a mérőoldatokban (micrg/ml)	
	Koffein 1000	Koffein 100	Paracet. 1000	Paracet. 100		Koffein	Paracetamol
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 keresztzennyeződés hatását minimalizáljuk. (A keresztzennyeződés 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 keresztzennyezéssel, ezért két mérés között minél többször ki kell mosatni a tűt.)

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

Tízyszeres hígítás után közvetlenül mérhetők.

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 cm³/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 kromatográfiás 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 kívánságnak elsősorban minőségellenőrzési és jogi okai vannak, hiszen például egy gyógyszer jóságának 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 ismeretlen. 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 jóságát 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.

AJÁNLOTT IRODALMAK

Elsősorban az Elválasztástechnika előadás anyaga!

Elválasztástechnika, Tankönyvkiadó, Budapest, 1985., 144-162. oldal

Analitikai kémia, Tankönyvkiadó, Budapest, 1985., 83-104. oldal

Bevezetés az intenzív folyadékkromatográfiába, (L. R. Snyder, J. J. Kirkland)
Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1979.