

**Kiegészítés Dr. Lázár István “Nagynyomású
folyadékkromatográfia (HPLC)” című
segédanyagához**

Készült a HPLC II. gyakorlathoz

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2017.

A HPLC II. gyakorlaton a hallgatók egy szimulációs szoftversegítségével tudják a megtapasztalni az eddig csak elméletben látott alapösszefüggések és kromatográfiás paraméterek elválasztásra gyakorolt hatását, mely ismeretek alapvető fontosságúak egy HPLC módszer kidolgozásához. Az alábbi rövid anyag, olyan kiegészítő ismereteket tartalmaz, ami hasznos lehet a gyakorlati feladatok megoldásában, illetve az eredeti segédanyaggal együtt megfelelő alapot nyújt a további HPLC-vel kapcsolatos tárgyakhoz és gyakorlatokhoz.

Mivel ez az anyag csak kiegészítője a „Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)” című oktatási segédanyagnak, így a gyakorlatra és az annak elején írandó tesztre **a két anyagból együttesen kell felkészülni**, melyhez a gyakorlat honlapján található minta tesztkérdések is segítséget nyújtanak.

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 a **szelektivitási 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.

Egy kromatográfiás módszer kifejlesztése során több, egymással összefüggő faktort kell figyelembe venni, annak érdekében, hogy egy hatékony és gazdaságos módszert tudjunk beállítani. A felbontás számításának fenti bővített képlete jó alapot ad ahhoz, hogy gyakorlati szempontból vegyünk sorba a módszerfejlesztés során változtatott paramétereket hatásukat az elválasztásra (a **van Deemter egyenlet** különböző tagjai is az itt leírt változókat foglalják magukban).

Az egyenlet első tagja foglalja magába a kinetikai jellegű paramétereket, vagy más megfogalmazás szerint azokat a paramétereket, melyek a kromatogramon látható **zónaszélesítő** hatásokért (más néven **csúcsszélesedés**) felelősek. Az elválasztás során a mintát dugószerűen, viszonylag kis térfogatban juttatjuk a kolonnára, ahol a mintában lévő komponensek elválnak egymástól. A folyamat során azonban az oszlop hosszával párhuzamos (longitudinális) és keresztirányú diffúziós folyamatok is zajlanak, amik növelni fogják azt a térfogatot, amiben a minta (illetve az egyes komponensek) megtalálhatóak. Ez azt eredményezi, hogy a kromatográfiás csúcs szélessége növekedni fog, míg az intenzitása csökkenni. A **csúcsszélesedésért** felelős folyamatok a csúcs alatti terület értékét nem befolyásolják, de szélesebb csúcsok esetében gyakrabban figyelhető meg a csúcsok közötti átfedés, ami a kvantitatív analízist nehezíti vagy lehetetlenné teszi.

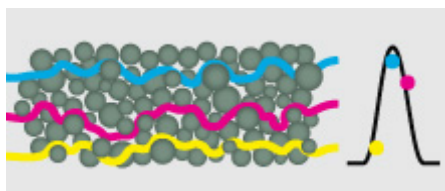
Általánosan elmondható, hogy annál hatékonyabb egy oszlop (egy konkrét komponensre nézve), minél nagyobb elméleti tányérszámot tudunk elérni az elválasztás során. Nézzük meg, milyen paraméterek változtatásával tudjuk növelni az elméleti tányér számot (és ezzel együtt javítani a felbontást):

1. **Az oszlop hossza.** Az oszlop hosszának az elméleti tányérszámra gyakorolt hatása egyértelműen adódik az elméleti tányérszám definíciójából. Minél többször tud kialakulni az elválasztás során az álló és mozgófázis közti kvázi egyensúly, annál nagyobb lesz az adott oszlopon, adott komponensre kapott elméleti tányérszám. Ebből következik, hogy az oszlop hosszának növelése növelni fogja az elméleti tányérszámot. Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy az oszlop hosszának növelésével a mérési idő is növekedni fog, amivel a fent leírt diffúziós folyamatok is jobban érvényesülnek, így az oszlop hosszának növelésével csak bizonyos pontig tudjuk javítani az elválasztásunk minőségét, a csúcsok jelentős kiszélesedése nélkül.
2. A folyadékkromatográfiában a felbontást meghatározó egyik döntő tényező a töltetet alkotó **szemcsék mérete**. Minél kisebb szemcsékből áll a töltet, annál nagyobb az összes felület, ahol az elválasztás történhet, illetve annál kisebb lesz a szemcsék közti holtterfogat. A különböző szemcseméretű tölteteket úgy lehet elképzelni, mintha egy adott térfogatú üveget szeretnénk feltölteni borsóval vagy mákkal. A szemek közti térben nem történik elválasztás, vagyis ezeken a helyeken a mintakomponensek visszatartás nélkül áramlanak, vagyis ha sok ilyen tér van, akkor az oszlop hatékonysága csökken. A szemcseátmérő csökkentésével azonban négyzetesen nő a rendszeren fellépő nyomás (**Darcy törvény**), hiszen a kisebb szemcsék tömörebb töltetet eredményeznek, amin csak nagyobb nyomás alkalmazásával lehet átáramoltatni az eluent. Ezt a nyomást a hagyományos HPLC rendszerek nem minden esetben képesek elérni (max. 400 bar), így a nagyon kis szemcseátmérőjű oszlopokat főleg az UPLC technikában alkalmazzák.

$$u = \frac{P \times K_p}{\eta \times L}$$

Darcy-törvény, ahol P a kolonnán fellépő nyomás, K_p az oszlopra jellemző konstans, ami négyzetesen függ a szemcseátmérőtől, η az eluens viszkozitása, L a kolonna hossza, u a lineáris áramlási sebesség.

3. **Az oszlopban lévő töltet homogenitása.** A jelenleg elérhető oszlopokban egy viszonylag homogén, gömbszimmetrikus, porózus szemcsékből álló kromatográfiás töltetet találunk. A töltet homogenitása két tulajdonságot foglal magába: a töltetet alkotó szemcsék méretbeli homogenitását illetve a töltet tömörségét. A szemcsék méretének fontossága az előző pontban olvasható. Itt annyi kiegészítés szükséges, hogy egy inhomogén szemcseeloszlású töltet kinetikai hatékonysága nem éri el a homogén töltet hatékonyságát. A töltet tömörsége azért fontos, mert optimális esetben az oszlopon belül a folyadék lineárisan áramlik. Azonban, ha a töltetben kisebb-nagyobb üregek találhatók, a folyadék áramlása is változik ezeken a pontokon, így különböző minta komponensek nem egyforma sebességgel tudnak áramlani a töltet különböző részein, ami hozzájárul a kromatográfiás csúcs kiszélesedéséhez.



1. ábra: Töltet inhomogenitás okozta csúcsszélesedés
(Forrás: Sigma-Aldrich)

4. **Áramlási sebesség.** Az áramlási sebesség és a felbontás közti összefüggés a fent már részletezett van Deemter összefüggésből adódik (4. ábra). Az áramlási sebesség optimumától való negatív eltérés (túl alacsony áramlási sebesség) azt eredményezi, hogy az elválasztás időtartama megnő, növekszik az elméleti tányér magasság, ami viszont az elméleti tányérszám csökkenését okozza. Ha pozitív irányban térünk el az optimumtól, a két fázis közti kvázi egyensúlyok száma csökken, vagyis túlságosan gyorsan jutnak át a komponensek az oszlopon, ami az elválasztás elégtelenségét eredményezi.
5. **Hőmérséklet (és viszkozitás).** 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 csúcsokat lehet elérni. A hőmérséklet növelése azonban csak az elválasztandó komponensek hőérzékenységének vizsgálata illetve az alkalmazott oldószerek forráspontjának figyelembevételével lehetséges. A viszkozitás növekedése egy szempontból hasznos is lehet, hiszen egy viszkózusabb áramló közegben kevésbé érvényesülnek a diffúziós, zónaszélesedést okozó folyamatok. Ezt azonban a gyakorlatban a viszkozitás növekedése által okozott egyéb negatív hatások miatt többnyire nem alkalmazzák.
- Amint a fent leírtakból is látható, egy kromatográfiás módszer beállítása során több, egymással összefüggő és általában optimumot mutató paramétert is figyelembe kell venni, vagyis egyik paramétert sem változtathatjuk meg jelentősen anélkül, hogy annak negatív következménye lenne, valamely másik tulajdonságra nézve.

Az egyenlet második tagja a szelektivitási tényezőt, míg harmadik tagja a visszatartási tényezőt (kapacitási faktort) tartalmazza. Mivel a k' alapvetően egy megoszlási hányados, ezt az állófázis, mozgófázis és a minta komponensek között kialakuló molekuláris interakciók határozzák meg. Ezek befolyásolása, elsősorban az álló és mozgófázis fizikai és kémiai tulajdonságainak változtatásával lehetséges, ami gyakorlati szempontból egy eltérő oszlop (eltérő funkciós csoportok) alkalmazását illetve az eluens összetételének és erősségének a változtatását jelenti.

A folyadékkromatográfiában alkalmazott eluensek

A kromatográfiás technikák egyik egyszerű csoportosítási módja az alkalmazott **mozgófázis halmazállapota alapján** történik. E szerint megkülönböztetünk folyadék- (LC), gáz- (GC) és szuperkritikus fluid (SFC) kromatográfiát. Jelen jegyzetben elsősorban a kölcsönhatáson alapuló kromatográfiás technikák jellemzőit taglaljuk, azon belül is a normál- és fordított fázisú kromatográfiát.

Az elválasztás alapja, hogy a vizsgált, eltérő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező mintakomponensek eltérő arányban oszlanak meg az álló- és mozgófázis között, ezáltal eltérő idő alatt jutnak keresztül a kromatográfiás kolonnán. Ezek alapján elmondható, hogy azok a komponensek, melynek képesek kölcsönhatást kialakítani a kromatográfiás töltettel, hosszabb idő alatt jutnak el a detektorba (visszatartódnak), míg azok, melyek nem képesek kölcsönhatást kialakítani, a mozgófázissal megegyező sebességgel haladnak. Ez utóbbi komponensek a retenciós idejét nevezzük az adott oszlop **holtidejének** (t_0).

A mozgófázis összetétele döntően meghatározza az elválasztás hatékonyságát, hiszen az állófázis mellett ez fogja meghatározni, hogy milyen jellegű és erősségű kölcsönhatások alakulnak ki az elválasztás során. Azt, hogy az egyes elválasztások esetében milyen típusú és összetételű mozgófázissal dolgozunk, minden esetben az alkalmazott állófázis és az elválasztandó komponensek fizikai és kémiai tulajdonságai határozzák meg.

A nagynyomású folyadékkromatográfia két legelterjedtebb típusa a **normál-**, és a **fordított fázisú kromatográfia**. Azt, hogy adott rendszer normál- vagy fordított fázisú elválasztásra alkalmas-e, minden esetben az álló- és mozgófázis egymáshoz viszonyított polaritása határozza meg. Ezek alapján **normál fázisú** kromatográfiás rendszerben az állófázis polárosabb, mint a mozgófázis; míg **fordított fázis** esetében az állófázis apolárosabb, mint a mozgófázis. Ez alapján látható, hogy a két típusú elválasztás során eltérő összetételű mozgófázisokat kell alkalmazni: normál fázis esetében az eluenserősség a mozgófázis polaritásának növekedésével nő, míg fordított fázisú rendszerekben a polaritás növekedésével csökken. Az oldószerek elúciós erősségét **eluotróp sornak** nevezzük, melyet Snyder dolgozott ki. Ennek a skálának a kiindulási pontján a pentán található, melynek az elúciós erősségét választotta 0-nak. Snyder a skála kidolgozásakor alumínium-oxid állófázist alkalmazott, de az oldószerek erőssége a megfelelő képlet és az alkalmazott adszorbensre jellemző konstans segítségével más állófázisokra is kalkulálható. Ez szilika gél esetében a következőképpen alakul:

$$\epsilon_{\text{szilika}}^0 = 1.1 \times \epsilon_{\text{Al}_2\text{O}_3}^0$$

Eluenserősség változása normál fázison (az elúciós erő balról jobbra nő, a szelektivitás balról jobbra csökken)

Diklórmétán < tetrahidrofurán < etil-acetát < metanol < acetonitril < ecetsav < víz

Eluenserősség változása fordított fázison (az elúciós erő balról jobbra nő, a szelektivitás balról jobbra csökken)

víz < metanol < acetonitril < etanol < izopropanol < tetrahidrofurán

1. táblázat: HPLC-ben gyakran alkalmazott oldószerek elúciós tulajdonságai, UV elnyelési adatai

Solvent	$\epsilon^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$	$\epsilon^0(\text{SiOH})$	$\epsilon^0(\text{C18})$	UV cutoff (nm)
Pentane	0.00	0.00	-	190
Hexane	0.00-0.01	0.00-0.01	-	195
Iso-Octane	0.01	0.01	-	215
Cyclohexane	0.01	0.03	-	200
Carbon Tetrachloride	0.17-0.18	0.11	-	-
1-Chlorobutane	0.26-0.30	0.2	-	220
Xylene	0.26	-	-	288
Toluene	0.20-0.30	0.22	-	284
Chlorobenzene	0.30-0.31	0.23	-	287
Benzene	0.32	0.25	-	-
Ethyl Ether	0.38	0.38-0.43	-	215
Dichloromethane	0.36-0.42	0.32-0.32	-	295
Chloroform	0.36-0.40	0.26	-	245
1,2-Dichlorethane	0.44-0.49	-	-	-
Methyl Ethyl Ketone	0.51	-	-	329
Acetone	0.56-0.58	0.47-0.53	8.8	330
Dioxane	0.56-0.61	0.49-0.51	11.7	215
1-Pentanol	0.61	-	-	-
Tetrahydrofuran	0.45-0.62	0.53	3.7	212
Methyl <i>t</i> -Butyl Ether	0.3-0.62	0.48	-	210
Ethyl Acetate	0.58-0.62	0.38-0.48	-	256
Dimethyl Sulfoxide	0.62-0.75	-	-	268
Diethylamine	0.63	-	-	-
Acetonitrile	0.52-0.65	0.50-0.52	3.1	190
1-Butanol	0.70	-	-	215
Pyridine	0.71	-	-	-
2-Methoxyethanol	0.74	-	-	210
<i>n</i> -Propyl Alcohol	0.78-0.82	-	10.1	210
Isopropyl Alcohol	0.78-0.82	0.60	8.3	205
Isobutyl Alcohol	-	-	-	220
Ethanol	0.88	-	3.1	-
Methanol	0.95	0.70-0.73	1.0	205
Ethylene Glycol	1.11	-	-	-
Dimethyl Formamide	-	-	7.6	268

(Forrás: Paul C. Sadek: The HPLC solvent guide, Wiley, 2002)

A folyadékkromatográfiás módszer fejlesztésénél a mozgófázis az egyik legmeghatározóbb tényező, hiszen a kidolgozott módszer szelektivitását döntően befolyásolja. Emellett a mozgófázis összetétele a legtöbb tartományban változtatható tényező is, hiszen manapság már számtalan különféle oldószer áll rendelkezésünkre, melyeket tetszőlegesen kombinálhatunk a megfelelő módszer kidolgozása érdekében. Ezen felül, a mai korszerű készülékek esetében lehetőségünk van az eluens összetételének előre programozott ütemben történő változtatására az elválasztás során (**gradiens elúció**), ami további segítséget jelent jelentős eltéréseket mutató komponenseket tartalmazó minták elválasztása esetén.

A mozgófázis kiválasztásának szempontjai

A mozgófázis kiválasztásakor a **polaritáson** kívül (ld. fent) több más szempontot is figyelembe kell vennünk:

1. **Viszkozitás.** A folyadékkromatográfias eljárások többségét szilárd szemcsékkel töltött ún. töltetes oszlopokon végzik. Ezek a töltetek viszonylag tömörek, hogy ellenálljanak annak a nyomásnak, amivel az eluent áramoltatjuk keresztül rajtuk. Ennek megfelelően belátható, hogy az eluens viszkozitásának növekedése növelni fogja a rendszerben fellépő nyomást, hiszen a viszkozusabb folyadék tömör tölteten keresztül való áramoltatása nagyobb nyomást kíván.

2. **Kompatibilitás az alkalmazott detektorral.** A modern HPLC rendszereket különféle detektorokkal szerelhetik fel, az alkalmazási céloknak megfelelően. A különféle detektorok eltérő oldószerekkel kompatibilisek, amit a módszer kidolgozása során figyelembe kell venni. A leggyakrabban alkalmazott detektorok az UV és látható hullámhossz tartományban működnek, működési elvük a spektrofotométerhez hasonló. UV tartományban történő detektálásnál fontos, hogy az eluensben található komponensek ne zavarják a mérést, vagyis elnyelési maximumuk („cut-off” érték) a detektálási hullámhossz alatt legyen.

3. **Tisztaság.** Alapvető fontosságú az elválasztások során, hogy az alkalmazott eluensünk tiszta legyen. Ez a tisztaság azt jelenti, hogy nem tartalmaz szilárd szennyeződések és/vagy olyan oldott anyagokat, amik befolyásolhatják az elválasztásunk sikerességét. Előbbi probléma kiküszöbölése érdekében az alkalmazott eluensünket célszerű szűrni (pl. pufferek esetében a fel nem oldódott sókristályok eltávolítása érdekében). A készülékekben is alkalmaznak különféle szűrőket, melyek egyrészt az eluensből nem engedik a rendszerbe jutni a szilárd szennyezőket (kis pórusmértű szűrő), másrészt kiszűrik a mintából esetlegesen a rendszerbe jutó szilárd szennyezőket vagy az oszlopon irreverzibilisen kiváló komponenseket, mielőtt azok az oszlopra kerülve annak károsodását/dugulását okozhatnák (előtét oszlop).

Különböző tisztaságú gyári oldószereket találhatunk a gyártók kínálatában, melyek tartalmazhatnak ugyan oldott szennyezőket, de ezekről minőségi és mennyiségi információ is rendelkezésre áll, így az egyes oldószerek alkalmazása előtt lehetőség van mérlegelni, hogy alkalmas-e az adott oldószer az aktuális elválasztáshoz, vagy sem. Az, hogy az elválasztás izokratikusan vagy gradiens elúcióval történik, szintén fontos szempont, hiszen utóbbi esetében tisztább oldószerekre van szükség.

4. **Oldott oxigén tartalom:** A különböző alkalmazott oldószerek eltérő mértékben képesek oldani az oxigént. Ezek keveredése esetén a rendszerben az oxigén kiválás eredményeként buborékképződés történhet. Ez elsősorban a detektort érinti, ahol már nincs jelen a nagy nyomás. A detektorban a buborékok rövidtávú alapvonal ingadozást (zajt) okoz. A buborékok emellett negatívan befolyásolhatják az eluens áramlását is. Hasonlóképpen történhet buborékképződés abban az esetben is, ha az elválasztás során termosztáljuk a kromatográfias rendszert, hiszen magasabb hőmérsékleten a gázok oldékonysága csökken.

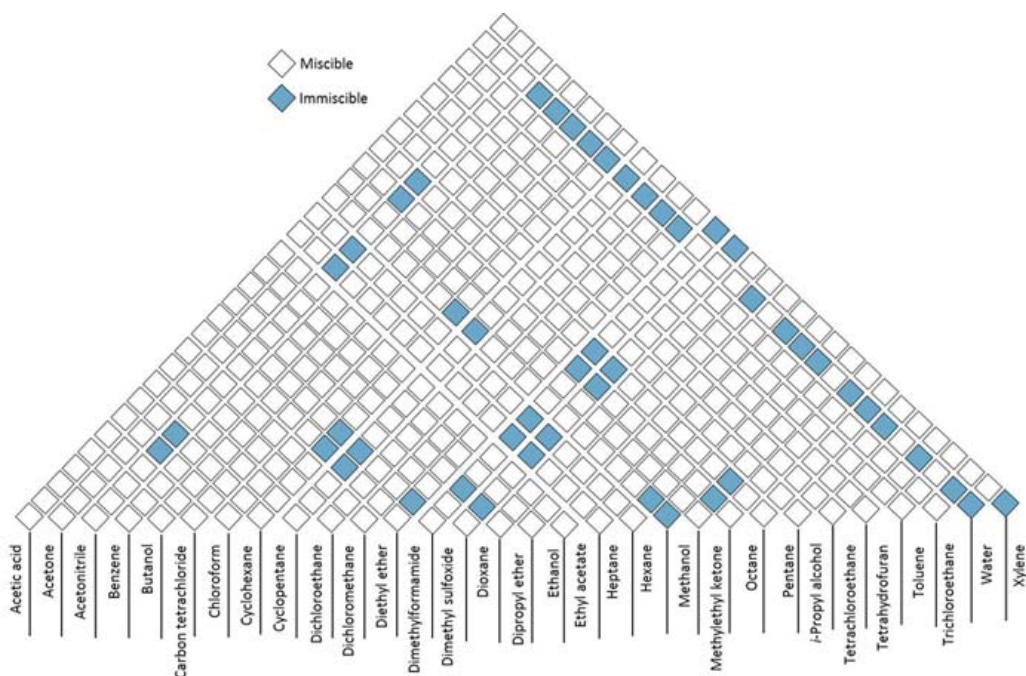
5. **Forráspont.** Az alacsony forráspontú oldószerek esetében, már szobahőmérsékleten is megfigyelhető buborékképződés, ami az előző pontban leírtaknak megfelelően problémát okozhat az elválasztás során. Elsősorban normál fázisú kromatográfiánál jelent problémát, hiszen a fordított fázisú rendszerekben, általában magas víztartalmú eluensokat alkalmaznak.

6. **Elegyíthetőség.** Ügyelnünk kell arra, hogy ha több komponensből áll össze az alkalmazott eluensünk, ezek kompatibilisek legyenek egymással. Normál fázisú kromatográfiánál, ahol döntően szerves oldószereket alkalmazunk az eluensben, figyelembe kell venni a különböző oldószerek elegyíthetőségét is az alkalmazás előtt. Fordított fázisú rendszerekben, főleg pufferek alkalmazása során kerülhetnek előtérbe az elegyedési problémák, ha a keverőben találkozik egymással a puffer és a szerves módosító. Ennek a találkozásnak az eredménye só kiválás lehet, mely a rendszer dugulását okozhatja.

7. **Kompatibilitás az állófázissal.** Az előző fejezetben leírtak alapján látható, hogy a leggyakrabban használt szilika alapú kromatográfiás oszlopok érzékenyek a pH-ra valamint az eluens víztartalmára. Így az eluens kiválasztásánál mindig figyelembe kell venni az alkalmazott állófázis oldószerrel szembeni kompatibilitását is.

8. **Inertség.** Az alkalmazott módszerrel szemben támasztott alapvető követelmény, hogy a vizsgált minta ne módosuljon az elválasztás során. Ennek megfelelően, a vizsgált minta fizikai és kémiai tulajdonságainak figyelembevételével kell megválasztanunk az eluenst is. Azonban nem csak a mintával szemben kell inertnek lennie az eluensnek hanem a készülék minden részével szemben, amivel érintkezik, megelőzendő a készülék korrodálódását, sérülését. Az eluens abban az egy esetben módosíthatja a vizsgált komponenseket, ha puffertelt rendszerben dolgozunk és célunk a vizsgált komponensek töltéseinek előre meghatározott irányba való megváltoztatása (a töltések jelenléte vagy hiánya kismértékben megváltoztatja a komponens polaritását, ezáltal az elválasztás hatékonyságát is).

9. **Ár.** A folyadékkromatográfia manapság a rutin diagnosztika és a kutatás egyik alapvető eszköze. Ennek megfelelően sokszor folyamatos üzemenben, nagy mintaszámokkal kell kalkulálni, ami jelentős oldószer felhasználást is jelent. Ennek megfelelően, az alkalmazott oldószerek ára is egy fontos paraméter, a módszerek kidolgozása során.



2. ábra HPLC-ben alkalmazott oldószerek elegyedési tulajdonságai
(Forrás: <http://www.chromacademy.com>)

Minőségi azonosítás

Először a kromatográfiás paraméterek megfelelő változtatásával el kell érni, hogy lehetőleg minden komponens jól elváló, emellett lehetőleg ideális alakú csúcsként detektálható legyen.

Az elsődleges minőségi azonosítás a retenciós idő alapján történik, ez azonban egyetlen kolonnán, egyetlen kromatográfiás módszerrel meghatározva nem bizonyítja a minőségi azonosságot. Ahhoz, hogy a retenciós idők alapján a komponensek azonosítását elfogadjuk az szükséges, hogy egy másik típusú (más polaritású) kolonnán, más kromatográfiás körülmények között is retenciós idő azonosságot találjunk a standarddal összehasonlítva. Ezt a másik kolonnát általában **konfirmáló (megerősítő) kolonnának** nevezzük.

Ismert összetételű mintánál, abban az esetben nincs lehetőségünk az összes komponens standarddal történő azonosítására, a retenciós sorrendből is következtethetünk az egyes csúcsokban eluálódó komponensre (ezt csak egyszerű, néhány komponenst tartalmazó minta esetében tehetjük meg). Hasonló gondolkodást igényel a kísérlet megtervezése során is, ha előre szeretnénk megbecsülni a komponensek elúciójának várható sorrendjét. Mivel a normál- és fordított fázisú kromatográfiás rendszerekben az elválasztás alapja a polaritás (az egyszerűség kedvéért most eltekintünk az egyéb tényezőktől, pl. a komponenseknek szemcsék pórusméretéből adódó kizáródásától), a minta komponenseinek és a kolonna polaritásának ismeretében lehetőségünk van megbecsülni a várható **elúciós sorrendet**. Ehhez azt kell figyelembe vennünk, hogy azok az anyagok, melyek nagyobb affinitással kötődnek az állófázishoz, nagyobb visszatartással fognak eluálódni, vagyis a kromatogramon nagyobb retenciós idővel jelennek meg. Konkrétan, egy normál fázisú rendszerben a polárosabb anyagok, míg egy fordított fázisú rendszerben az apolárosabb anyagok fognak később eluálódni.

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

Ajánlott irodalom:

Dr. Fekete Jenő: Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata – Tankönyv (2006)