

LABORLEIRAT A HPLC LABORATÓRIUMI GYAKORLATHOZ

(ANALITIKAI KÉMIA 1.)

TARTALOMJEGYZÉK:

KÖVETELMÉNYEK.....	2
A FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA ALAPJAI.....	2
Az elválasztás.....	2
A készülék.....	3
Folyadékkromatográfiás módszerek, fordított fázisú folyadékkromatográfia.....	5
Elúciós technikák, pH kontroll a fordított fázisú kromatográfiában	6
Minimális követelmények a mintával, az állófázissal és a mozgófázissal szemben	7
A folyadékkromatográfia alapvető elméleti megfontolásai.....	9
FELADATOK A GYAKORLAT SORÁN.....	14

KÖVETELMÉNYEK

A leirat célja, hogy a folyadékkromatográfiás gyakorlat elvégzéséhez, a gyakorlat megértéséhez szükséges alapokat rendszerezze. Készítésekor nem törekedtünk az elméleti alapok részletes magyarázatára. Az elméleti háttér részletes magyarázata megtalálható az egyetemi tankönyvekben (Dr. Pokol György - Dr. Sztatisz Janisz: Analitikai Kémia 1., Műegyetmi Kiadó; Dr. Fekete Jenő: Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata, Edison House Kft.). A gyakorlat elvégzése az itt összefoglalt alapok ismerete nélkül nem lehetséges, ezért a gyakorlat előtt beugrót íratunk, melynek során öt feltett kérdésből legalább kettőre helyes választ kell adni. A beugróban csak a leiratban összefoglaltakat kérdezzük vissza. Ha a beugró nem sikerül, a hallgató nem végezheti el a gyakorlatot. Ebben az esetben az oktatóval egyeztetett időpontban pótolnia kell. A gyakorlat során végzett munkából a hallgatók jegyzőkönyvet készítenek. A jegyzőkönyv akkor fogadható el, ha a gyakorlat során egyeztetett módon, tömören és egyértelműen tartalmazza azokat az információkat, amely alapján a méréseket reprodukálni lehet. Jegyzőkönyvet egyszer lehet javítani. Ha másodjára sem sikerül elfogadható jegyzőkönyvet produkálni, a laborgyakorlatot - az oktatóval egyeztetve - meg kell ismételni. A gyakorlatra mindenki hozzon magával laborköpenyt, védőszemüveget, számológépet és vonalzót!

A gyakorlat értékelése:

- 5 pont kapható a beugróra (min. 2-t el kell érni a beugráshoz)

- 5 pont kapható a jegyzőkönyvre

a két jegy számtani közepe a végső laborjegy. A jegyzőkönyvek leadására egy hét áll rendelkezésre, utána minden megkezdett napon fél jegy levonásra kerül. Végső laborjegy csak akkor adható, ha a beugró és a jegyzőkönyv is legalább 2 pontra sikerül.

A FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA ALAPJAI

Az elválasztás

Folyadékkromatográfiás elválasztás során arra törekszünk, hogy az oldott állapotban lévő mintánk egyes komponenseit az alábbi elv alapján válasszuk el egymástól:

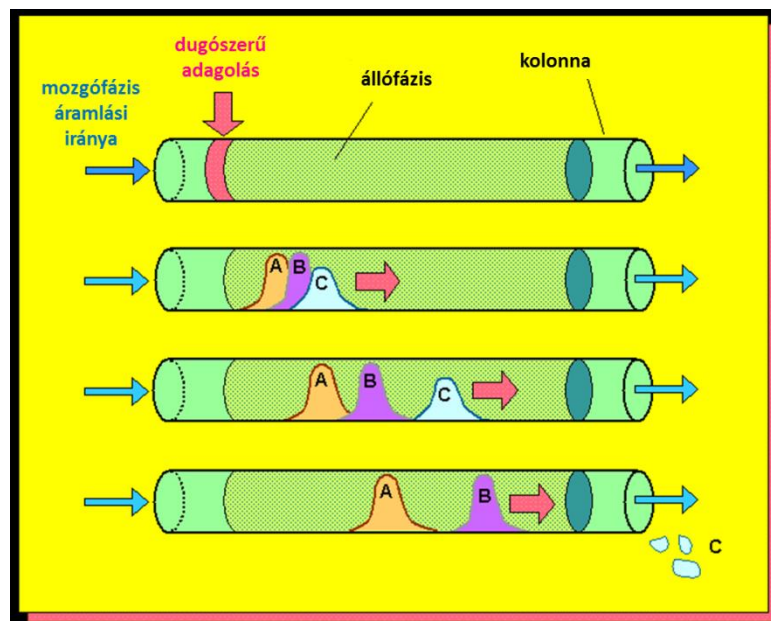
Egy helyhez kötött állófázis (esetünkben szemcsés, porózus töltet a kolonnában) fölött adott összetételű folyadékot (mozgófázist, eluent) áramoltatunk. **Az elválasztandó komponensek fizikai és kémiai tulajdonságai** (ionizáltság, hidrofóbicitás, polaritás), **az állófázis felületi tulajdonságai** (ionizáltság, hidrofóbicitás, polaritás) **és mérési körülmények** (mozgófázis összetétel, pH, ionerősség,

hőmérséklet) alapján megfelelő körülmények között olyan kölcsönhatások jönnek létre, amelyek lehetővé teszik, hogy a komponensek különböző erősséggel kötődjenek az állófázishoz. Az elválasztás azért jön létre, hogy a komponensek eltérő ideig tartózkodnak az állófázisban vagy annak felületén.

A fellépő kölcsönhatások a következők lehetnek:

- szorpciós kölcsönhatások: adszorpció, abszorpció
- van der Waals-féle gyenge kölcsönhatások
- H-hidas kölcsönhatás
- sav-bázis kölcsönhatások
- ionos kölcsönhatás
- komplexképzés
- enzim-szubsztrátum kapcsolat

A komponensek és állófázis között létrejövő szorpciós-deszorpciós folyamatok (megoszlás az állófázis és a mozgófázis között) miatt az erősen kötődő komponensek több, míg a gyengébben kötődő komponensek kevesebb időt töltenek az állófázishoz kötve. Végeredményként a különböző erősséggel kötődő komponensek időben elválasztva eluálthatók a kolonnáról. A fent leírtakat az alábbi ábra szemlélteti.



1. ábra. A folyadékkromatográfiás elválasztás alapja. A **dugószerűen injektált minta** komponensei: A-C, ahol A a legerősebben kötődő-legjobban visszatartott komponens

A készülék

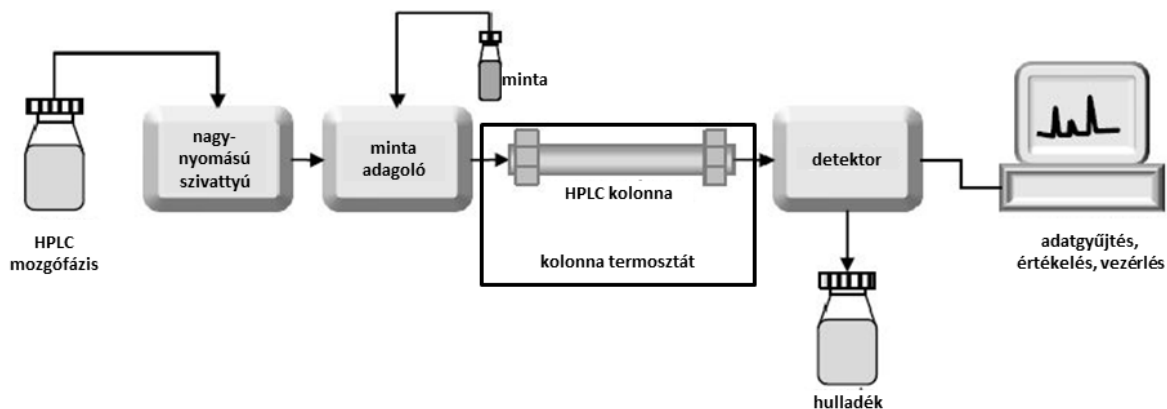
A fent leírtakból következik, hogy az elválasztórendszer alapja a kolonna. Ez esetünkben néhány μm átmérőjű porózus szemcsékkel töltött cső. Analitikai HPLC-ben a jellemző méretek: 3-10 μm

szemcseátmérő, 3-4.6 mm kolonnaátmérő és 10-25 cm kolonnahossz. Maga a **töltet** általában különböző fémiontartalmú **szilikagélből** készül, melyen a kívánt felületi tulajdonságok elérése érdekében felületi módosításokat hajthatnak végre. A **kolonna permeabilitása viszonylag kicsi**, ezért nagy nyomásra van szükség a mozgófázis (eluens) áramoltatásához. A HPLC **nagynyomású szivattyúk** jellemzően 300-400 bar nyomással szemben tudnak folyadékot szállítani. A kolonna előtt szükség van egy (injektor) **mintaadagoló** beépítésére, mely a kívánt mennyiségű **mintát** (jellemzően 1-20 μ l) **dugószerűen képes az mozgófázisba juttatni**, mely aztán a kolonnára kerül. A kolonnáról **eluálódó komponensek észlelése** többnyire valamilyen **fizikai tulajdonságuk mérésével** lehetséges. Ezt a feladatot látják el a **detektorok**, amelyek egy **mért jel-idő függvényt** generálnak, amit **kromatogramnak** nevezünk.

A modern HPLC-ben a következő detektorok alkalmazhatók:

- UV, UV-VIS
- fluoreszcens detektorok
- elektrokémiai detektorok (amperometriás, kulometriás)
- vezetőképesség mérésén alapuló detektorok
- törésmutató különbség mérésén alapuló detektorok (RI)
- Egyéb: radiokémiai, fényszórás mérésén alapuló, viszkozitás mérésén alapuló, polarimetriás detektorok, MS stb.

Az egyes komponensek a detektoron való áthaladáskor a kromatogramon csúcsként jelennek meg. Minden csúcshoz tartozik egy ún. **retenciós idő (regisztrálás időpontja az adagolástól számítva)**, mely a **komponens minőségére és a magassága**, vagy a **csúcs területe** pedig a **komponens mennyiségére** utal. Leggyakrabban **UV-detektorokat** használunk, amelyek a vizsgált komponens UV-fényelnyeléséből eredő **abszorpciát alakítják elektromos jellé**. A rendszer vezérlését (áramlás, injektálás, kolonna-hőmérséklet, detektálás), a kromatogramok megjelenítését és az adatok értékelését **számítógép** segítségével végezzük. Az alábbi ábrán a kromatográfiás mérőrendszer felépítése látható. **A gyakorlat során az egyes modulok működését részletesen megbeszéljük. Kérjük, hogy a bemutatott alkatrészeket ismertessék a jegyzőkönyvben!**



2. ábra. A kromatográfiai mérőrendszer vázlatja

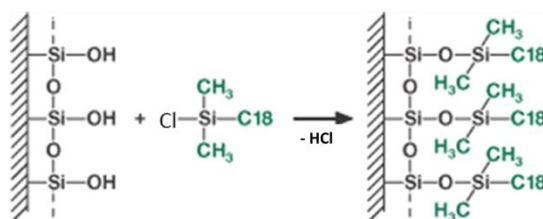
Folyadékkromatográfiai módszerek, fordított fázisú folyadékkromatográfia

Azt, hogy milyen kromatográfiai módban dolgozunk, a **mozgófázis és az állófázis polaritásának viszonya**, és a visszatartást kialakító kölcsönhatások alapján sorolhatjuk be.

Kromatográfiai módszer	Állófázis minősége	Mozgófázis minősége
<i>Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)</i>	poláris töltet	apoláris
<i>Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)</i>	apoláris töltet	poláris
<i>Hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (HILIC)</i>	polárisabb	kevésbé poláris
<i>Ionkromatográfia (IC)</i>	kis ioncserélő kapacitású töltet	közepes vezetékű puffer
Ionpár kromatográfia (MPIC)	apoláris töltet	poláris oldószer + ionpároképző puffer oldat
Ioncserés kromatográfia (HPIC)	töltéssel rendelkező töltet	ásványi savtartalmú víz vagy víztartalmú elegy
Ion kizárásos kromatográfia (HPICE)	erős kationcserélő töltet	
<i>Méretkizárásos kromatográfia (SEC)</i>	nagy pórusátmérővel rendelkező töltet (gél)	víz vagy szerves oldószer
<i>Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)</i>	hidrofób felületű töltet	só tartalmú oldat, elválasztás során csökkenő só koncentráció

Normál fázisú elválasztás esetén a **mozgófázis** (pl. hexán, heptán, diklórmetán, néhány % alkohol, éter, észter) mindig **apolárisabb, mint az állófázis** (szilikagél, polárisan módosított szilikagél, stb.). Ilyen körülmények között apolárisabb (oldható a mozgófázisban), poláris csoportokkal rendelkező (van H-hidas, vagy dipól-dipól kölcsönhatási lehetőség a szilikagél felületével) vegyületek választhatók el. A mozgófázis (eluens) nem tartalmazhat vizet, mert deaktiválja a szilikagél kölcsönhatási helyeit.

Fordított fázisú elválasztás során a **mozgófázis** (víz + acetonitril, metanol, etanol, stb.) mindig **polárisabb, mint az állófázis** (apolárisan módosított szilikagél, polimer alapú állófázisok, stb.). Ilyen körülmények között hidrofób karakterű (van visszatartás az apoláris tölteteken), apoláris (+ poláris) csoportokkal rendelkező vegyületek határozhatóak meg. Az apoláris csoportok lehetővé teszik a hidrofób kölcsönhatások létrejöttét az apolárisan (C4-C18 láncokkal) módosított felülettel. Sztérikus okok miatt a felületen lévő szilanol csoportok csak mintegy fele reagál módosítás során, ezért H-hidas kötéshelyek is maradnak az állófázis felületén. Ezek biztosítanak poláris szelektivitást is a töltetnek. A felület módosítása leggyakrabban úgy történik, hogy az alap szilikagél szilanolcsoportjait hosszú szénláncú klórszilánokkal viszik kondenzációs reakcióba:



3. ábra. Szilikagél felületi módosítása C18 láncokkal (fordított fázisú töltet)

A módosítás után visszamaradt szilanolokat általában utószilanzálással (pl. trimetil-klórszilánnal) igyekeznek elreagáltatni. **A módosított szilikagél pH tűrése általában korlátozott**, ezért ügyelnünk kell a gyártó által javasolt mozgófázis pH-tartomány betartására. (Ez jellemzően pH 2-8 között van. pH 2 alatt a felületi módosítás hidrolizál le, pH 8 fölött az alap szilikagél (polikovasav) oldódik.) Jó kromatográfiai tulajdonságainak és egyszerű használhatóságának köszönhetően ezek a leggyakrabban alkalmazott töltet típusok. **A gyakorlat során is fordított fázisú elválasztást** fogunk végezni.

Nem szabad megfeledkezni az **egyéb folyadékkromatográfiai módokról** sem, melyeknek kivétel nélkül fontos szerepük van: ioncserés kromatográfia, hidrofób kölcsönhatási kromatográfia, hidrofil kölcsönhatási kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia, stb. Ezek részletesebb ismertetésétől itt eltekintünk.

Elúciós technikák, pH kontroll a fordított fázisú kromatográfiában

Alapvetően két féle elúciós technikát alkalmazunk a gyakorlatban: **izokratikus elúció** és **gradiens elúció**.

Izokratikus elúció során a kromatográfiai mérés alatt **végig azonos összetételű** mozgófázist (**eluent**) áramoltatunk az állófázis felett, tehát az eluenserősség nem változik a mérés során. **Minél erősebb az eluens, a komponens annál kisebb retenciós idővel eluálódik az oszlopról.** Ez a módszer akkor

alkalmazható, ha hasonló hidrofóbicitású vegyületeket választunk el, így kedvező esetben a kromatográfia során az összes komponens a $2 < k < 10$ (ld. később) retenciós ablakban eluáltható.

Gradiens elúció során a kromatográfia gyengébb oldószer eleggyel indul (pl. 10% acetonitril-víz), majd a mérés során az erősebb oldószer részarányának növelésével **fokozatosan növeljük az eluenserősséget** (pl. 60% acetonitril-víz). Ezt nevezzük oldószer gradiensnek. Ez lehetővé teszi, hogy egymástól nagyon különböző hidrofóbicitású vegyületeket válasszunk el. Fontos megemlíteni, hogy gradiens elúció során mindig tisztább oldószereket kell használnunk, mint izokratikus elúció alkalmazásakor. Ennek oka, hogy az eluensek szennyezői a gyenge oldószer-erősségű fázis során dúsulhatnak a kolonna elején, majd az erős elúciós szakaszban szellemcsúcsok formájában eluálódhatnak. Izokratikus elúció során az állandó elúciós erősség miatt nincs mód dúsulást követő elúcióra. Izokratikus elúció során a kolonnát bizonyos időközönként le kell mosni, hogy az adott körülmények között nem eluálódott, az állófázison megkötődött komponenseket eltávolítsuk.

Savas, vagy bázikus csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásakor pH-kontrollt kell alkalmazni. Ez azt jelenti, hogy a mozgófázis pH-ját pufferek segítségével állandó értéken kell tartani. Erre azért van szükség, mert ilyen vegyületek polaritása –így a visszatartáson keresztül a köztük lévő szelektivitás - nagymértékben változik a pH függvényében. Robusztus fordított fázisú módszer kidolgozásához el kell érni, hogy a savas/bázikus csoportot tartalmazó vegyületek molekuláris formáinak aránya állandó legyen és lehetőleg csak az egyik molekuláris forma legyen jelen. Fordított fázisú körülmények között ez lehetőleg az ionvisszaszorított forma. A molekuláris formák aránya gyakorlatilag $pK_a \pm 2$ pH tartományban változik. Nagyon fontos kritérium, hogy a puffer nem válhat ki a mozgófázisban. Általában foszfát, acetát, formát puffereket használunk.

Minimális követelmények a mintával, az állófázissal és a mozgófázissal szemben

A **minta** akkor **vizsgálható folyadékkromatográfián**, ha eleget tesz az alábbi követelményeknek:

- nem tartalmaz szilárd szennyezést, ami eltömődést okozhat a rendszerben, vagy a kolonnán.
- oldható a mozgófázisban kémiai átalakulás nélkül (hamis mérési eredményre vezethet)
- az oldhatóság mértéke megfelel a detektálás megszabta követelményeknek (pl. UV-Detektor esetén minimálisan 1-10 $\mu\text{g/ml}$)

A **mozgófázissal szemben általánosan elvárt minimális követelményeket** az alábbi néhány pont foglalja össze:

- kis viszkozitású (kisebb nyomásesést és hatékonyabb anyagátadást biztosít ld. később Van Deemter- és Darcy-egyenlet)
- nem tartalmazhat szilárd anyagot
- polaritása módszer-specifikus (ld. fent, folyadékkromatográfiai módok)
- nem károsítja az állófázist (pl. pH munkatartomány szilika alapú állófázisok esetén)
- az oldószer fényáteresztése lehetővé teszi a detektálást (pl. UV detektálás esetén nem nyel el a felső UV -200-210nm feletti- tartományban)
- a módszernek megfelelő tisztasággal rendelkezik (ld. fent, elúciós technikák)
- forráspontja kellően magas (így elkerülhető a rendszerben a buborékok képződése, melyek zavarják a mérést: pulzálást okoznak a folyadékszállításban és szórják a fényt a detektorban)
- többkomponensű oldószerrendszerek komponensei egymással jól elegyíthetőek
- a mérés során esetlegesen alkalmazott pufferek nem válhatnak ki benne
- lehetőleg nem toxikus
- kedvező ár

Az állófázissal szemben tipikusan elvárható alapvető követelmények:

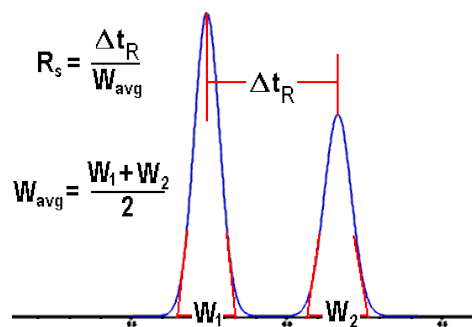
- **mechanikailag stabilnak** kell lennie, hogy a szemcsék ne roppanjanak meg az alkalmazott nyomás hatására
- **a töltetágnak homogénnek** kell lennie (egyenletes áramlási csatornák a szemcsék közt: ld. később Van Deemter egyenletben az örvénydiffúzió)
- a **szemcsék átmérője** kicsi legyen és kicsi legyen **a szemcseátmérő eloszlása** lehetőleg *szűk eloszlást mutasson*. Kis szemcsék az alkalmazható nyomást (Darcy-tv.), míg a nagy szemcsék az elválasztás hatékonyságát (Van Deemter-egyenlet) korlátozzák, ha szemcseátmérő eloszlás nagy, akkor heterogén töltetágy jöhet létre.
- a szemcsék **pórusméretének** olyannak kell lenni, hogy ne gátolja a vizsgálandó anyagok diffúzióját. Ne tartalmazzon mikropórusokat, mert ún. mikropórusokban $d_p < 2$ nm az anyagátadási ellenállás nagy, és széles kromatográfiai csúcsokat kapunk
- a **töltet felületének energetikailag homogénnek** kell lennie (a nagyon különböző kölcsönhatási erősséget biztosító kötődési helyek száma ne legyen összemérhető, különben a csúcsalak torzul, az elválasztás romlik.)
- **módszer-specifikus követelmény:** a módszernek megfelelő kémiai tulajdonsággal rendelkezzen a felület

A fent felsorolt pontok természetesen a sikeres elválasztás szükséges, de nem elégséges feltételei. Sikeres elválasztáshoz jól kell megválasztani az állófázist (felületi tulajdonságok, geometriai paraméterek), a mozgófázist (összetétel, pH) és a mérés egyéb körülményeit (pl. hőmérséklet, injektált

mintamennyiség, stb.). Egyes esetekben a mérési módszer kidolgozásához, optimalizálásához szoftveres módszerfejlesztést is segítségül kell hívni.

A folyadékkromatográfia alapvető elméleti megfontolásai

A folyadékkromatográfiai elválasztások többségében nem használunk szelektív detektorokat (pl. tömegspektrométer), ezért a mérni kívánt komponenseinket a minta egyéb alkotóitól és egymástól el kell választanunk. Az elválasztás számszerű jellemzésére az R_s (resolution-felbontás) értéket használjuk, amely a kromatogramokból az alábbi módon számolható:



4. ábra. Felbontás meghatározása kromatogramból

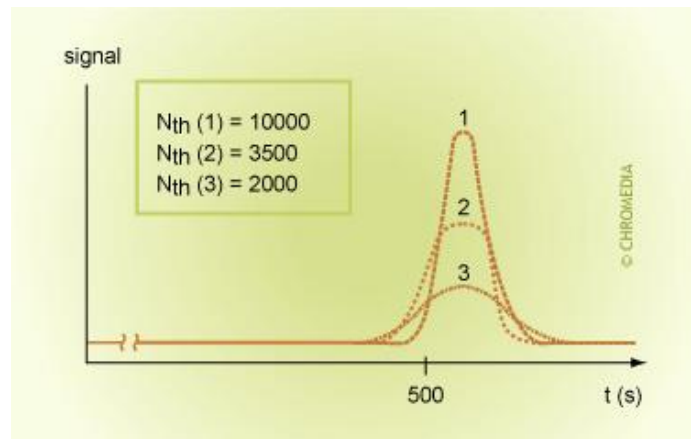
itt Δt_r a retenciós idők különbsége, W_1 és W_2 pedig az alapvonalon mért csúcshélesség. Ezt úgy kapjuk, hogy a csúcs inflexiós pontjaihoz érintőt szerkesztünk, amely az alapvonalból adott hosszúságú szakaszt metsz ki. R_s az alábbi módon is kifejezhető:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

az egyenletet az alábbiakban bontjuk szét:

$$\text{az elméleti tényérszám (hatékonyság): } N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2,$$

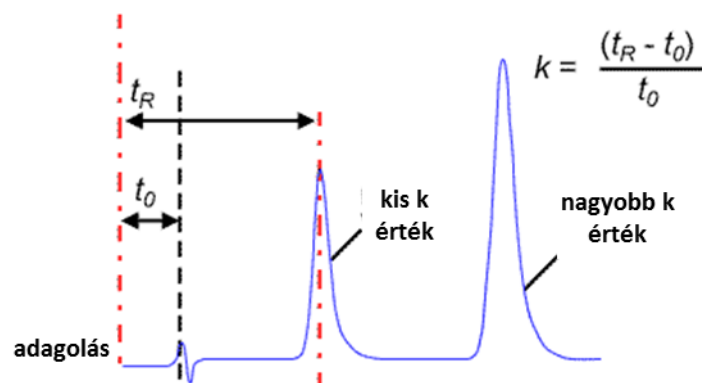
mely a csúcshélességgel kapcsolatos mennyiség. Minél nagyobb N , a csúcs annál keskenyebb, annál nagyobb esély van két szomszédos csúcs elválasztására:



5. ábra. Hatékonyság hatása a csúcsalakra

$$\text{A visszatartási tényező: } k = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

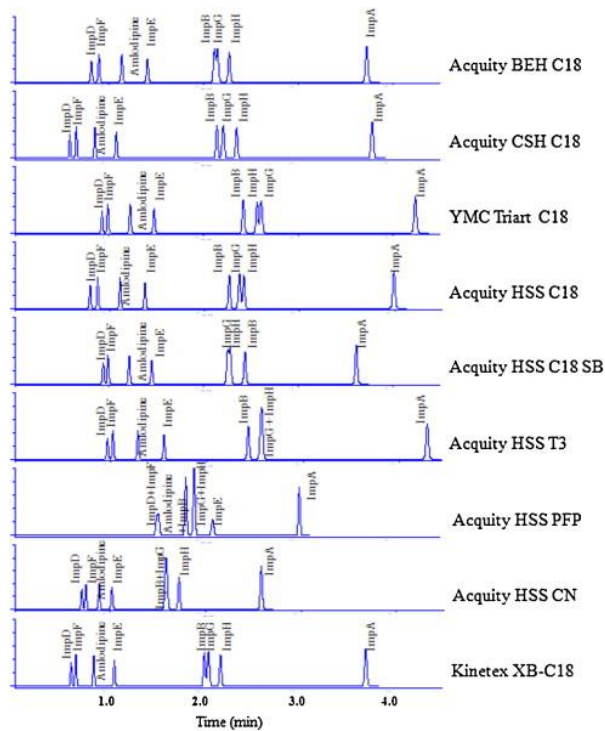
(t_0 a holtidő, annak a komponensnek a retenciós ideje, amelyik nem hat kölcsön az állófázissal-nincs visszatartása) amely megmutatja az állófázison és a mozgófázisban töltött idő viszonyát. Ez azért fontos, mert elválasztást elsődlegesen az állófázis szabja meg. Ha k kicsi, a komponensek nem tartózkodnak elég időt az állófázison ahhoz, hogy az különbséget tudjon tenni köztük \Rightarrow nincs elválasztás. Ha k túl nagy, akkor az oszlopon történő diffúzió miatt a csúcs kiszélesedik, romlik a hatékonyság és a felbontás. **Általában kívánatos, hogy $1 < k < 10$ legyen.**



6. ábra. a visszatartás értelmezése (itt t_0 -t ún. oldószerzavarás jelöli)

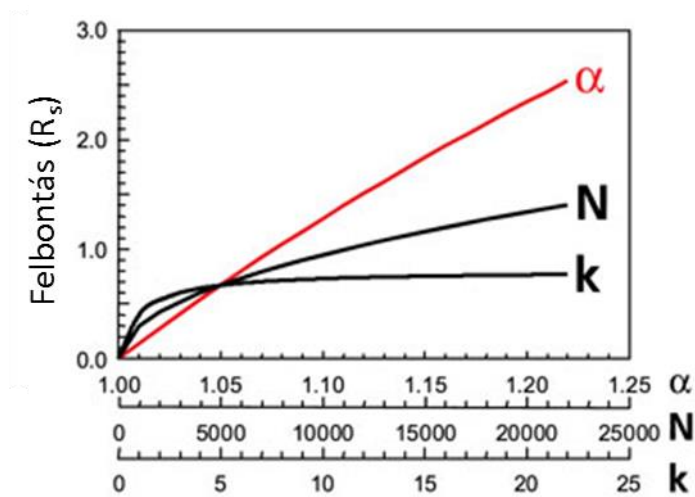
$$\text{A szelektivitás: } \alpha = \frac{k_2}{k_1},$$

amely megmutatja, hogy két komponens visszatartása milyen mértékben tér el. Tehát, hogy az állófázis képes-e az adott körülmények között termodinamikai szempontból különbséget tenni a két komponens között.



7. ábra. Ugyanazon vegyületek elválasztása különböző szelektivitású kolonnákon

Az elválasztás egyenlete alapján (R_s) három tag befolyásolja az elválasztást. Az egyes tagok hozzájárulása a felbontáshoz az alábbi ábrán látható.



8. ábra. A felbontást meghatározó tényezők hatása

A visszatartás nagyon hamar (már kb. $k=2$ mellett) többé-kevésbé konstans viselkedést mutat. Ez azt jelenti, hogy az oldószererősség változtatásával $k>2$ fölött nem lehet érdemben befolyásolni a felbontást. N értékét a töltet paramétereit és az oszlop geometria méretei szabják meg. Az oszlop hosszának növelésével N egyenes arányban nő, viszont ebben az esetben számolnunk kell a mérési idő

és az oszlopon mérhető nyomásesés növekedésével. N növelése továbbá gyökös arányossággal növeli a felbontást. A legnagyobb hatása a felbontásra a szelektivitásnak van. Ha tehát a módszerfejlesztésbe kezdünk, érdemes először megvizsgálni, hogy az adott állófázis képes-e egyáltalán megkülönböztetni a komponenseinket. Ha igen, akkor van értelme a hatékonyság és a visszatartás optimalálásának.

A visszatartást az eluenserősséggel és a hőmérséklet változtatásával tudjuk befolyásolni, míg a szelektivitást elsődlegesen a töltet felületi kémiájával másodsorban az eluens összetételével, és a hőmérséklettel. A kinetikai hatékonyságot a töltet szemcseátmérője, a kolonnahosszal és a hőmérséklettel tudjuk változtatni. A kinetikai hatékonyság változását a mozgófázis lineáris sebességének függvényében a Van Deemter összefüggés írja le.

$$HETP(H) = A + \frac{B}{u} + Cu = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u$$

$$H=L/N$$

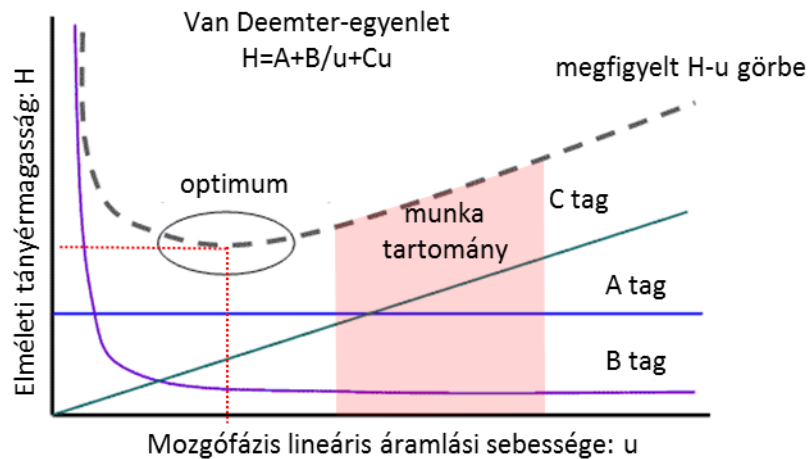
ahol HETP az elméleti tányérmagasság (height equivalent to a theoretical plate), L: oszlophossz, N: elméleti tányérszám A, B és C konstansok, u a mozgófázis lineáris áramlási sebessége ($u=L/t_0$). Minél kisebb HETP, a csúcs annál keskenyebb, tehát HETP (H) alacsony értéken tartása kívánatos.

Az első tag (**A tag**) csúcshézaghoz hozzájárulása a szemcsék közti egyenetlen áramlási csatornákhöz köthető. Ha a csatornák egyenetlenek, a molekulák ugyanolyan áramlási sebesség mellett eltérő hosszúságú utakat járnak be, amely zónadiszperziót okoz. Ezt szokás **örvény diffúzió**nak is nevezni.

A második tag (**B tag**) a **hosszirányú diffúzió**val kapcsolatos. Minél több időt tölt az anyag a kromatográfiás rendszerben, Fick II. törvényének értelmében annál nagyobb mértékben szélesedik a zóna.

A harmadik tag (**C tag**) az **anyagátadási ellenállással** kapcsolatos. Ez a mozgófázis lamináris áramlási profiljából adódó folyadékrétegek közti diffúziós ellenállásból (**C_m**), valamint az állófázis felületén lévő stagnáló folyadékfilmen keresztüli diffúziós ellenállásból (**C_s**) adódik. A stagnáló filmben lévő és a mozgófázissal áramló molekulák lineáris áramlási sebességkülönbsége adja a zónaszélesedést. Úgy is mondhatjuk, hogy a zónaszélesítő hozzájárulás itt a diffúziós ellenállásból adódik.

Amint az alábbi ábrán látszódik, a fent leírt tagok eredőjeként H minimum értéket vesz fel egy adott áramlási sebesség mellett (optimum efficiency az ábrán). Gyakorlatban ettől a tartománytól kicsit jobbra dolgozunk, mert az optimum környékén a lassú áramlás miatt a mérés túl hosszú.



9. ábra. A hatékonyság és Van Deemter egyenlet egyes tagjainak kapcsolata Magyarosítani

Jegyezzük meg, hogy a gyakorlati tartományban a C és az A tag dominál. Mindkét tag jelentősen csökkenthető a szemcseméret csökkentésével, és a diffúziós állandó növelésével. A szemcseméret csökkentésének határt szab a **Darcy-törvény**:

$$\Delta p = \frac{\phi \eta L u}{d_p^2}$$

ahol Φ a kolonna áramlási ellenállásával kapcsolatos konstans, Δp a nyomásesés a kolonnán, η a mozgófázis viszkozitása, d_p a töltet átlagos szemcseátmérője. A törvény szerint a szemcseméret csökkentésével a kolonna nyomásesése négyzetesen nő. Látható, hogy a nyomásesés csökkenthető a viszkozitás csökkentésével. A diffúziós állandó növelhető a viszkozitás csökkentésével. A mozgófázis viszkozitása két fontos ponton gyakorol hatást a rendszerünkre: az áramlási ellenálláson és az anyagátadáson keresztül. Ezért fontos tehát kis viszkozitású mozgófázisokkal dolgozni. A viszkozitás az elválasztási hőmérséklet emelésével tovább csökkenthető.

FELADATOK A GYAKORLAT SORÁN

A gyakorlat során két csoport fog párhuzamosan dolgozni. Az egyik csoport elválasztási paramétereket fog számolni kapott kromatogramokból, míg a másik csoport különböző italok koffein, teofillin és teobromin tartalmát fogja meghatározni fordított fázisú folyadékkromatográfiával, kalibrációs módszer segítségével. Félidőben a két csoport cserél. A felmerülő kérdések megvitatására a gyakorlat során lesz lehetőség (ajánlott élni vele). Ez a leirat nem tartalmaz minden szükséges információt a laborjegy megszerzéséhez, a gyakorlat során a fontos, jegyzőkönyvben szerepeltetendő információkra a gyakorlatvezető fel fogja hívni a figyelmet. A gyakorlat során minden hallgató kap jegyzőkönyv fedőlapot. Ezen a fedőlapon fel van sorolva, hogy minek kell szerepelnie a jegyzőkönyvben. A gyakorlatvezetővel a részleteket egyeztetve, eszerint kell elkészíteni a jegyzőkönyvet.