

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia laborgyakorlat

A gyakorlat célja:

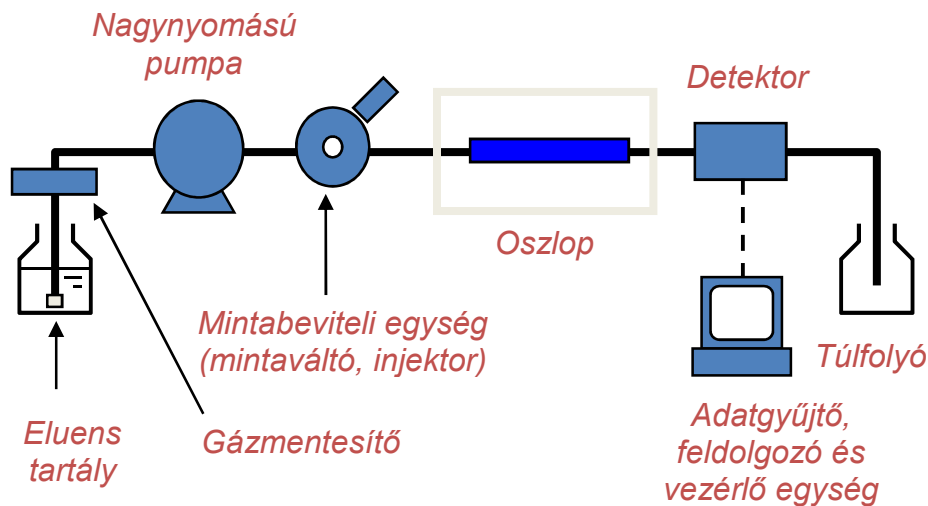
- a HPLC rendszer egységeinek megismerése
- kromatográfiai paraméterek meghatározása szerkesztéssel
- instant kávé koffeintartalmának mennyiségi meghatározása kalibrációval

A gyakorlat menete:

- beugró ZH: a lehetséges kérdéseket ld. a leírat végén. Felkészülési tananyag: jelen leírat, a bevezető előadás anyaga, és az Analitikai kémia jegyzet (szerk. Pokol György, Typotex 2017.) 17.1, 17.3.1-3, 17.3.8. fejezete.
- kávé minták előkészítése, kalibráló sor hígítása
- koffein sztenderdek és kávé minták HPLC-s mérése
- a mérés várakozási idejében a készülék egységeinek ismertetése, kromatográfiai paraméterek meghatározása kiadott kromatogramon

A jegyzőkönyvet a gyakorlat ideje alatt, egyénileg kell megírni, és a gyakorlat végén a gyakorlatvezetőnek beadni.

A HPLC rendszer

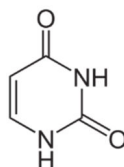


1. ábra: HPLC rendszer általános felépítése

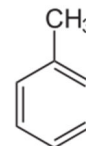
A. Kromatográfiai paraméterek meghatározása szerkesztéssel:

A gyakorlaton kiadunk egy kromatogramot, amelyet uracil, metilbenzoát, toluol és naftalin sztenderdek keverékére kaptunk. Ezen a kromatogramon szerkesztéssel kell meghatározni a fontosabb kromatográfiai paramétereket, és azokat a jegyzőkönyv fedlap hátoldalán található táblázatban rögzíteni. A jegyzőkönyvhöz csatolni kell a kromatogramot, amelyen a szerkesztési segédvonalaknak látszódniuk kell.

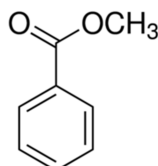
uracil
log P: -1,07
vízoldhatóság: 3,6 g/L (25°C)



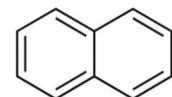
toluol
log P: 2,73
vízoldhatóság: 0,526 g/L (25°C)



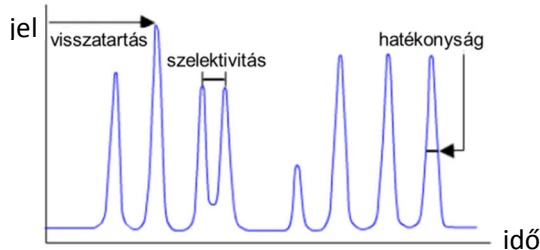
metilbenzoát
log P: 2,12
vízoldhatóság: 2,04 g/L (25°C)



naftalin
log P: 3,30
vízoldhatóság: 0,031 g/L (25°C)



A kromatográfiás elválasztás célja, hogy a mintánkban levő komponenseket minél rövidebb idő alatt megfelelő felbontással (azaz alapvonalig) elválasszuk egymástól. A felbontást a kromatográfiás rendszer három, egymástól nagyjából független jellemzője befolyásolja, amiket külön-külön tudunk a kísérleti körülményekkel változtatni, hogy a megfelelő felbontást elérjük. Ezek a jellemzők a visszatartás, a szelektivitás és a hatékonyság, amelyeket az alábbi kromatogramon szemléltetünk.



Visszatartás

A visszatartás azt jellemzi, hogy mennyi idő alatt eluálódik egy adott komponens az oszlopról. Fordított fázison az apolaritás növekvő sorrendjében eluálódnak a komponensek. Az apolaritásról az anyag oktanol/víz megoszlási hányadosa ($\log P$), ill. vízdoldhatósága ad információt.

Szelektivitás

A szelektivitás azt mutatja meg, hogy két egymás mellett eluálódó komponens között mennyire tesz különbséget a rendszer, vagyis mennyire különbözik a retenciós idejük.

Hatékonyság

A hatékonyság azt mutatja meg, hogy mennyire szélesíti ki a csúcsokat a kromatográfiás oszlop. Az **elméleti tényérszámmal**, vagy az **elméleti tényérmagassággal** jellemezzük. Az elméleti tényérszám kiszámolható (a) az alapvonalon mért csúcshélességből, (b) a csúcs félérték-szélességből, vagy (c) a csúcs inflexió pontjában mért csúcshélességből, de gyakorlatban legegyszerűbb a csúcs félérték-szélességből, azaz a csúcs magasságának felénél mért csúcshélességből számolni.

A fenti jellemzőket különböző paraméterek segítségével számszerűsíthetjük. Az egyes paraméterek definíciója a következő:

Retenciós idő: t_R

Az injektálástól a csúcsmaximumig eltelt idő.

Holtidő: t_0

Az az idő, amíg az inert anyag/eluens végighalad a kromatográfiás rendszeren.

A holtidőt meghatározhatjuk úgy, hogy egy inert anyagot (fordított fázison erősen poláris anyagot, pl. uracilt) injektálunk, ami egyáltalán nem kötődik az állófázison, vagyis a retenciós ideje a holtidővel megegyezik. Ilyen, ún. t_0 jelző anyag hiányában is leolvashatjuk a kromatogramról a holtidőt, ugyanis t_0 -ban általában egy jelzavarás jelentkezik az injektálás okozta nyomáshullám következtében.

A holtidőt továbbá közelítő számítással *megbecsülhetjük* az oszlop geometriai méreteiből és a térfogat-áramlási sebességből az alábbiak szerint:

$$\text{Az oszlop geometriai térfogata: } V_g = \frac{d^2 \pi}{4} L$$

Az állófázis gömbszimmetrikus szemcséi az oszlop geometriai térfogatának 2/3-át töltik ki, de a szemcsék térfogatának a fele pórus, így összesen az oszlop geometriai térfogatának 2/3-át

$$\text{tölti ki az eluens (holtterfogat): } V_0 = \frac{2}{3} \frac{d^2 \pi}{4} L$$

A holtidő pedig: $t_0 = \frac{V_0}{w} = \frac{d^2 \pi \cdot L}{6w}$, ahol d az oszlop átmérője, L az oszlop hossza, w a térfogat-áramlási sebesség.

Redukált retenciós idő: $t'_R = t_R - t_0$

Az az idő, amit az adott komponens az állófázison megkötődve tölt.

Retenciósfaktor: $k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0}$

Megadja, hogy az adott komponens az állófázis és a mozgófázis között milyen molarányban oszlik meg. Tulajdonképpen az állófázison és a mozgófázisban töltött idő hányadosa.

Szelektivitási tényező: $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

Mindig a nagyobb retenciósfaktort osztjuk a kisebbel, vagyis $\alpha \geq 1$.

Arra jellemző, hogy milyen mértékben képes megkülönböztetni két egymás mellett eluálódó komponenst a kromatográfiás rendszer. Értéke 1, ha nem válik el a két csúcs, vagy 1-nél nagyobb szám, ha elválnak.

Félérték szélesség: $w_{1/2}$

A csúcsmagasság alapvonalától mért 50 %-ánál mért csúcshélesség.

Elméleti tányérszám: $N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$

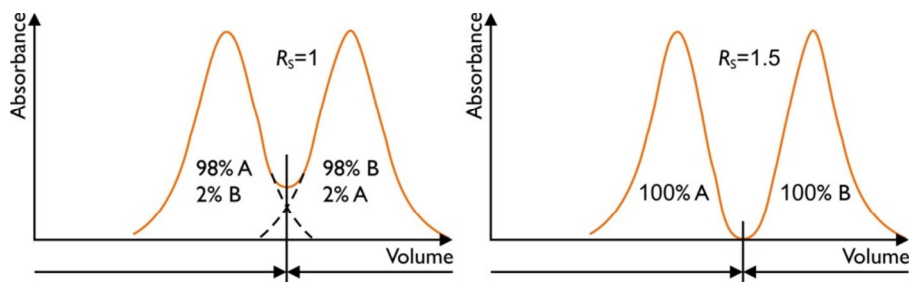
Kromatográfiában az elméleti tányérszám alatt *szemléletesen* azt értjük, hogy hányszor kötődik meg az adott komponens az állófázison, amíg végig ér a kolonnán.

Elméleti tányérmagasság: $H = \frac{L}{N}$

Azt jellemzi, hogy a kromatográfiás oszlop milyen mértékben szélesíti ki a csúcsokat. Minél kisebb az értéke, annál keskenyebbek a csúcsok ezért hatékonyabb az elválasztás. Szemléletesen a H az a távolság, amit a mintamolekula két állófázison való megkötődés között előrehalad az oszlopon.

Felbontás: $R_s = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}$

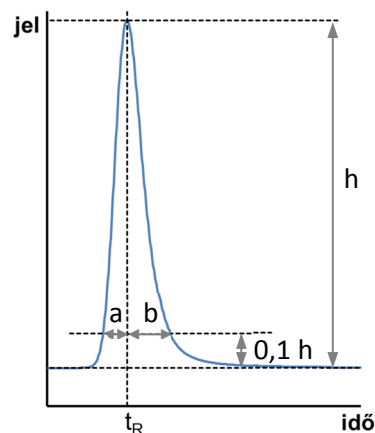
Megmutatja, hogy két csúcs milyen mértékben válik el egymástól. Ha a felbontás 1, a két csúcs még részben átlapol. Az alapvonal elválasztásnál a felbontás értéke 1,5. (Nem tévesztendő össze az α szelektivitási tényezővel!)



Aszimmetria faktor: $A = \frac{b}{a}$

Ideális esetben a kromatográfiás csúcsot Gauss-görbe írja le és szimmetrikus. A valóságban azonban sosem teljesen szimmetrikusak a csúcsok. A csúcs alakját az aszimmetria faktoral jellemezzük, ami a jobb oldali ábrából érthető meg. A csúcsmagasság 10%-ánál mérjük az **a** és **b** szakaszt és ezek hányadosa az aszimmetria faktor.

Szimmetrikus csúcs esetén az aszimmetria faktor 1, de 1,8-2 értékig még elfogadható a csúcsalak. Ennél nagyobb mértékű csúcstorzulás már bizonytalaná teszi a csúcsterület meghatározását és ronthatja a felbontást.



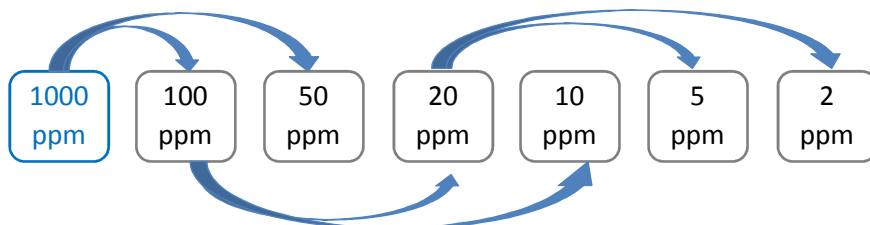
A mérés során kapott kromatogramokból a fent felsorolt paramétereket fogjuk meghatározni, szerkesztéssel. **A gyakorlat elvégzéséhez vonalzó és számológép szükséges!**

B. Koffein mennyiségi meghatározása instant kávéporból

Megmérjük és összehasonlítjuk egy normál és egy koffeinmentes instant kávé koffein-tartalmát.

Kalibráló sor hígítása és mintaelőkészítés:

A mérés során hatpontos kalibrációt veszünk fel. 1000 ppm koncentrációjú koffein törzsoldatból¹ indulunk ki, melyet vízzel hígítunk. Mindegyik kalibráló oldatból 1-1 ml-t készítünk, egymásból hígítva az alábbiak szerint:



A hígítások kiszámolása után automata pipetták segítségével mérjük össze a megfelelő mennyiségeket, majd az oldatokat homogenizáljuk.

A kávéporokból 3-3 párhuzamos mintaelőkészítést végzünk a következő módon. Főzőpohárba analitikai pontossággal kimérünk 100-200 mg instant kávé, és feljegyezzük a pontos tömeget. A kávéport kb. 70 ml szobahőmérsékletű ultratiszta vízben feloldjuk (az oldódást ultrahangos fürdővel gyorsíthatjuk, és ügyeljünk arra, hogy ne habosodjon). A kávé oldatot maradéktalanul átmoszuk egy 100 ml térfogatú mérőlombikba, végül jelre töltjük a lombikot vízzel. A homogenizált mintákból kb. 1 ml-t fecskendőszűrővel átszűrünk egy HPLC mintatartó üvegcsébe.

Kromatográfiai mérés:

A kromatográfiai mérés *fordított fázisú HPLC* rendszerben történik. Az állófázis 3 μm szemcseméretű C18 szénláncokkal módosított szilikagél, ami *apoláris* felületet biztosít. Az eluens a *poláris* víz, melyet egy kevésbé poláris szerves oldószerrel, acetonitrillel keverünk.

A kromatográfiai rendszerbe először a kalibrációs oldatokat (koncentráció szerint növekvő sorrendben), majd a mintaoldatokat injektáljuk. A mérési paraméterek az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat: A gyakorlaton alkalmazott HPLC rendszer és mérési körülmények

Pumpa	Exforma EX1600 Pump
Detektor	Exforma EX1600 UV detektor
Mintaadagoló	Kézi (Rheodyne)
Oszlop	Zorbax SB-C18 75×4,6 mm, 3,5 μm
Eluens	10:90 acetonitril-víz elegy
Térfogatáram	1 ml/perc
Detektálási hullámhossz	273 nm
Injektált térfogat	20 μl

A HPLC mérés menete:

- mozgófázis (eluens) készítése, ultrahangozása (levegőmentesítés)
- a HPLC pumpa átmosása a mozgófázissal („purge”)
- a kromatográfiai oszlop (állófázis) bekötése, lassú áramlásnál a bekötések ellenőrzése (nem csöpög-e), majd az oszlop ekvilibrálása a mozgófázissal (10 oszloptérfogatnyi eluens átáramoltatása), mérési térfogatáramnál a nyomás ellenőrzése (feljegyzése)
- detektálási hullámhossz beállítása

¹ A törzsoldat nagytisztaságú szilárd koffein sztenderdből készült pontos tömegbeméréssel, melyet mérőlombikban vízzel megfelelő térfogatban oldottunk.

- alapvonal ellenőrzése
- fájlnev megadása, kézi injektálás, kromatogram felvétele
- az oszlop mosása ACN-víz eleggyel (pumpa átmosása után 10·V₀)

A mérések értékelése:

A kalibráló oldatok kromatogramjairól leolvassuk a koffein retenciós idejét, majd minden kromatogramon szoftveres integrálással meghatározzuk a koffeinhez tartozó csúcs területét. A kromatográfiás csúcs területe arányos az adott komponens koncentrációjával. A kalibrációs pontok alapján felvesszük a kalibrációs egyenest: a koncentráció – csúcsterület diagramra egyenest illesztünk. A kalibrációs egyenes illeszkedése alapján röviden értékelni kell a kalibráció megfelelőségét. A kalibráció elfogadható, ha $R^2 > 0,99$ és minden koncentrációszinten 85-115% közé esik a kalibráció pontossága. A kalibrációs egyenes segítségével kiszámítjuk az injektált minták koffein koncentrációját. Ebből az ismert tömegbemérések és hígítások segítségével visszaszámoljuk a kétféle instant kávépor koffeintartalmát, amit az átlaggal és a szórással adunk meg.

HPLC labor - beugró kérdések

1. Mi a kromatográfiás elválasztás elve?
2. Mi a folyadékkromatografálhatóság feltétele?
3. Mi a retenciós idő, holtidő, redukált retenciós idő?
4. Mi a retenciós tényező és a szelektivitási állandó?
5. Milyen értékek közé kell beállítani a retenciós tényezőt, és miért?
6. Hogyan számolható a felbontás a kromatogramról leolvasható értékek felhasználásával?
7. Milyen három, egymástól nagyjából független kromatográfiás paramétertől függ a felbontás? (az elválasztás alapegyenlete)
8. Milyen kromatográfiás körülményekkel tudjuk a szelektivitást befolyásolni (soroljon fel minimum 3-at!)?
9. Rajzoljon fel egy kromatogramot, ahol a két komponensre vonatkozó szelektivitási tényező értéke 1!
10. Mit jellemez az elméleti tányérszám?
11. Milyen folyamatok okoznak zónaszélesedést a HPLC-ben?
12. Mi okozza az örvénydiffúziót? Az általa okozott csúcscsészesedés hogyan függ az áramlási sebességtől?
13. Mi okozza a hosszirányú diffúziót? Az általa okozott csúcscsészesedés hogyan függ az áramlási sebességtől?
14. Mi az anyagátadási ellenállás? Az általa okozott csúcscsészesedés hogyan függ az áramlási sebességtől?
15. Hogyan függ egy kromatográfiás oszlop elméleti tányérmagassága (H) az eluens lineáris áramlási sebességétől (u) (képlet)? Ábrázolja az összefüggést!
16. Milyen az álló- és mozgófázis polaritása a fordított fázisú kromatográfiában?
17. Milyen álló- és mozgófázisokat használnak a fordított fázisú kromatográfiában?
18. Milyen az álló- és mozgófázis polaritása a normál fázisú kromatográfiában?
19. Milyen álló- és mozgófázisokat használnak a normál fázisú kromatográfiában?
20. Milyen követelmények vannak az állófázissal szemben? (soroljon fel legalább hármat!)
21. Milyen követelmények vannak a mozgófázissal szemben? (soroljon fel legalább hármat!)
22. Milyen esetben van szükség a mozgó fázis pH-jának beállítására?
23. Hogyan befolyásolja az eluenserősség a visszatartást? Melyik az erősebb eluens a RP-HPLC-ben: 60:40 = MeOH:H₂O vagy 80:20 = MeOH:H₂O?