

Sőre Ferenc–Tihanyi Péter–Vámos István

Laboratóriumi gyakorlatok

Műszeres analitikai és környezetvédelmi mérések

Tankönyv

Tartalomjegyzék

5. Kromatográfiás eljárások	80
5.1. A kromatográfia elve	80
5.2. A kromatográfiás módszerek felosztása	80
5.3. A kromatogramok jellemzői és értékelésük	81
5.4. Kromatográfiás minta-előkészítési eljárások	84
5.5. A gázkromatográfia	87
5.5.1. A gázkromatográf felépítése	87
5.5.2. Mintabevitel – injektálás	88
5.5.3. Gázkromatográfiás kolonnák	90
5.5.4. Detektorok	92
5.5.5. A minőségi és a mennyiségi analízis módszerei	95
5.6. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	96
5.6.1. A folyadékszállítás	97
5.6.2. Mintabevitel – injektálás	98
5.6.3. Folyadékkromatográfiás oszlopok	99
5.6.4. Detektorok	102

5. Kromatográfiás eljárások

5.1. A kromatográfia elve

A kromatográfia felfedezője Cvet, orosz tudós, aki szemcsés kalcium-karbonáttal töltött üvegcsőn falevél petroléteres extraktumát engedte át. A különböző alkotók az oszlop mentén színes gyűrűk formájában szétváltak. Ez adta a módszer nevét (kromatográfia = színírás). Azóta a kromatográfia nemcsak forradalmasította a szerves vegyületek analízisét, hanem fogalma is nagymértékben bővült.

A kromatográfia olyan elválasztási módszer, amellyel a minta alkotói egy álló és egy mozgó fázis közötti megoszlás révén választhatók szét.

A minta komponensei az álló és a mozgó fázissal létesített kölcsönhatás eredményeképpen különböző sebességgel haladnak. Ha az álló fázissal nem alakul ki kölcsönhatás, a minta a mozgó fázissal (pl. oldószerfronttal) együtt halad. Minél erősebb a minta kölcsönhatása az álló fázissal, annál inkább lemarad, mivel az álló fázisnak visszatartása, ún. **retenciója** van.

A kromatográfiás meghatározások alapja tehát a különböző anyagok eltérő szorpció képessége és a fázisok közötti megoszlás.

5.2. A kromatográfiás módszerek felosztása

A kromatográfiás módszerek több szempont szerint csoportosíthatók.

Az elválasztás **mechanizmusa** szerint:

- adszorpció kromatográfia;
- megoszlásos kromatográfia;
- ioncserés kromatográfia;
- gélkromatográfia.

Ahogy az elnevezések is mutatják, az elválasztásban az első esetben az anyag álló fázison való adszorpciója, a másodikban az álló és mozgó fázis közötti – extrakció elvén működő – megoszlása, a harmadikban az álló és a mozgó fázis felületén lezajló ioncsere a fő folyamat. A gélkromatográfia esetén az álló fázis duzzasztott gél szemcséi a molekulák méret alapján való szétválasztását teszik lehetővé.

A mozgó fázis halmazállapota alapján:

- gázkromatográfia (GC = Gas Chromatography);

- folyadékkromatográfia (LC = Liquid Chromatography), illetve nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC = High Performance Liquid Chromatography).

Az álló fázis alakja szerint:

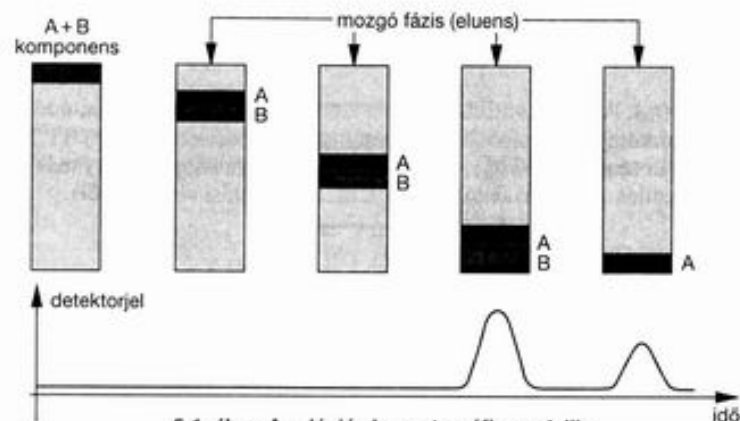
- oszlopkromatográfia;
- rétegekromatográfia.

A kifejlesztés módja szerint:

- frontális kromatográfia;
- kisorításos kromatográfia;
- elúciós kromatográfia.

Analitikai célokra elsősorban az elúciós kromatográfiát használjuk, mivel a frontális és a kisorításos technika esetén az oszlop telítve van mintával, ezért újabb mérésre való előkészítésük sok időt igényel. A kisorításos és a frontális kromatográfia kis koncentrációjú elegyek dúsítására, fázisegyensúlyok fenntartására, illetve preparatív célokra használatos. Az elúciós technika nagy előnye, hogy elemzés után az oszlopon csak az eluens marad, így az oszlop azonnal felhasználható.

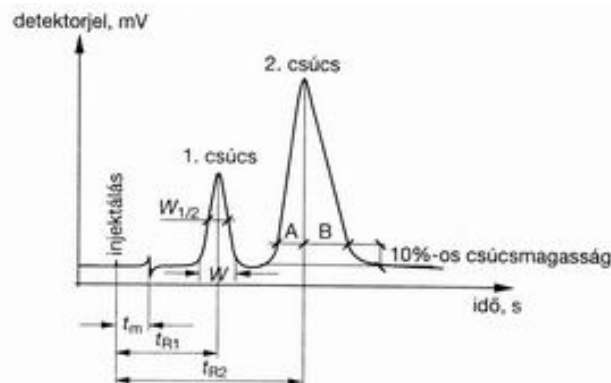
Az **elúciós** elválasztás során egy olyan vivőanyagot (eluent) áramoltatunk keresztül az álló fázison, amelynek elhanyagolható a szorpciója. A vizsgálandó minta igen kis mennyiségét juttatjuk dugószerűen az állandó áramlási sebességű eluensáramba (5.1. ábra).



5.1. ábra. Az elúciós kromatográfia modellje

5.3. A kromatogramok jellemzői és értékelésük

Az alkotók fajlagos szorpciójuknak megfelelően különböző időt töltenek az álló és a mozgó fázisban. Az oszlopról időben elkülönülten távozó alkotók a detektorba jutnak. A detektor az alkotók valamilyen fizikai vagy kémiai sajátosságát méri, és ideális esetben az alkotó mennyiségével arányos jelet ad. A kapott jel időbeli változását rögzíti a **kromatogram** (5.2. ábra). Ez egy differenciális jel, amely az alkotók koncent-



5.2. ábra. Elúciós kromatogram

rációeloszlását mutatja. A kromatogramon a megjelenő csúcs helye (**retenciós idő**) az alkotó **minőségi jellemzője**, a **görbe alatti terület mennyiségi jellemző** (az alkotó koncentrációjával arányos).

A következőkben a legfontosabb kromatográfiás jellemzőket és meghatározásokat foglaltuk össze.

- **Retenciós idő (t_R)**. Az az időtartam, ami a minta beinjektálása és a vizsgált alkotó maximális koncentrációban való megjelenése között eltelik. Minőségi jellemző.
- **Holtidő (t_M)**. Az eluens átfutási ideje a kolonnán (egy nem szorbeálódó, de detektálható komponens – többnyire metán segítségével mérjük.)
- **Redukált retenciós idő (t'_R)**. Az előbbi két idő különbsége, amely már független a készülék geometriájától (de függ pl. az áramlási sebességtől).

$$t'_R = t_R - t_M$$

- **Retenciós térfogat (V_R)**. A retenciós idő alatt áthaladt mozgó fázis (eluens) térfogata.
- **Holttérfogat (V_M)**. A mozgó fázisnak az a mennyisége, ami az oszlop feltöltéséhez kell.
- **Retenciós faktor (k')**. Az elválasztás minőségére jellemző hányados. Régebben *kapacitásfaktor*nak is nevezték, de a IUPAC (1993) nomenklatúra szerint – a félreértések miatt – ma már csak a retenciós faktor használható. (A kapacitásfaktor elnevezés ugyanis azt sejteti, mintha a k' közvetlen összefüggésben lenne a kolonna kapacitásával, vagyis a terhelhetőségével, a maximálisan megengedhető mintamennyiséggel.)

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

- **Csúcshélesség (W)**. A kromatogramon az elúciós görbe (5.2. ábra) egy Gauss-görbével jellemezhető. Az ideális csúcshélességnek végtelenül kicsi a csúcshélessége. A valóságban szinte mindig jól mérhető csúcshélességgel számolhatunk. A csúcshélesség elsősorban az áramlási sebességtől, az anyagi minőségtől és a kolonna hosszától függ.
- **Félérték-szélesség ($W_{1/2}$)**. A csúcsmagasság (h) felénél mért csúcshélesség.
- **Aszimmetriafaktor, $A_s = B/A$** . A kromatogram minőségi jellemzője. Általában a kromatogramok különböző okokból létrejövő torzulásainak jellemzésére használjuk.
- **Szelektivitási vagy elválasztási tényező (α)**. A komponensek megoszlását adja meg az álló és a mozgó fázis között. Hatékony elválasztás esetén $\alpha > 1$.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

- **Elméleti tányérszám (N_{elm})**. A kifejezés a desztilláció analógiájára épül. E gondolat kísérlet szerint a kolonna olyan elméleti tányérokra osztható, amelyek mindegyikére megoszlási egyensúly írható fel. A tányéros desztillálókolonnában minden egyes tányér után a fázisok szétváltnak, és a következő tányéron az újabb érintkezés hatására újabb egyensúly áll be. A kromatográfiás oszlopon, ahol folyamatos az érintkezés, elméletileg képzelhetők csak el ilyen „tányérok”.

$$N_{\text{elm}} = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

- **HETP (H)**. A kifejezés az angol Height Equivalent to a Theoretical Plate kifejezésből ered, vagyis az elméleti tányérral egyenértékű oszlopmagasság értéke.

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \left(\frac{W}{t_R} \right)^2$$

ahol L az oszlop hossza, N a tányérszám.

- **Felbontóképesség (R_s)**. A kolonna hatásosságát jellemzi, megadható a két szomszédos csúcs közötti eltávolodás mértékével. Analitikai szempontból jó elválasztás esetén $R_s \geq 1,5$.

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_2 + W_1}$$

A **gázkromatográfia** néhány speciális jellemzője:

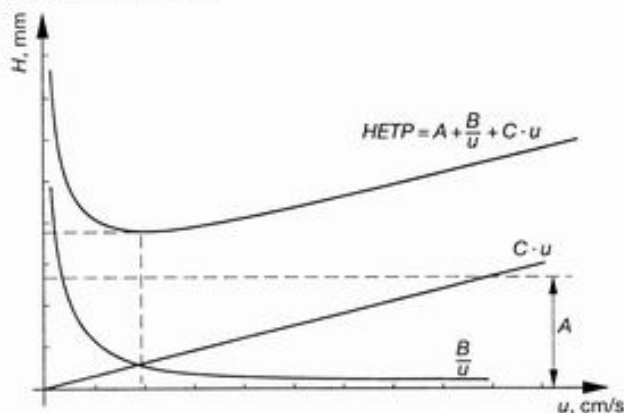
- **Átlagos lineáris gázsebesség (u)**. A vivőgáz áramlási sebességét jellemzi; fontos a vivőgáz optimális áramlási sebességének meghatározásához. Metánt injektálva a készülékbe mérjük a t_M értékét. A kolonnahossz (L) ismeretében $u = L/t_M$, cm/s.
- **A van Deemter-egyenlet**. A töltött kolonnában végbemenő folyamatokat a tányérelméleten kívül más oldalról is megközelíthetjük. Ilyen a sebességi elmélet. Van Deemter és munkatársai foglalkoztak behatóan e témával. A részletek mel-

lőzésével van Deemter úgy találta, hogy a kolonnán az anyagátadást befolyásoló tényezők három tagból állnak. Az első tag a töltet geometriájának hatását, a második a gázfázisban végbemenő hosszirányú diffúziót, a harmadik pedig a szorpció-deszorpció folyamatok hatását veszi figyelembe. A van Deemter-egyenlet alkalmas arra, hogy a H -nak az áramlási sebességtől való függését vizsgáljuk (és meghatározzuk az **optimális gázáramlási sebességet**).

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

Az összefüggést diagramon ábrázolva az találjuk, hogy a gázsebesség döntően befolyásolja a kolonna hatásosságát (5.3. ábra).

Jó közelítéssel az optimális gázsebességek: nitrogén esetén 12 cm/s, hélium esetén 20 cm/s és hidrogénre 40 cm/s.



5.3. ábra. Optimális áramlási sebesség-HETP összefüggés

5.4. Kromatográfias minta-előkészítési eljárások

A gáz- és folyadékkromatográfias oszlopok élettartamát jelentősen csökkenti, ha egy mintát tisztítás nélkül injektálunk be. Más esetekben a dúsítás a cél, megszabadulva egy-egy zavaró komponenstől. A kromatográfias minta-előkészítések során ezeket a szempontokat mindenképp figyelembe kell venni.

A minta-előkészítés következő új módszere egy lépésben, kevés oldószer felhasználással mindezeket megoldja.

Szilárd fázisú extrakció (Solid Phase Extraction, SPE)

Az elmúlt időszak legnagyobb ütemben fejlődött extrakciós módszere a szilárd-folyadék extrakció, rövidebben a szilárd fázisú extrakció, vagy ahogy a magyar nyelvben is meghonosodni látszik: egyszerűen SPE technika.

E módszerrel folyadékokból a nem illó alkotókat tudjuk kinyerni.

A szilárd anyag lehet:

- adszorbens (aktív szén, alumínium-oxid, szilikagél stb.);
- módosított szilikagél megosztófolyadékkal (pl. a folyadékkromatográfiában is használatos RP 18);
- ioncserélő sajátosságú töltet.

Az adszorbenssel töltött oszlopok, amelyek általában 10–50 cm hosszúságú, 8–10 mm belső átmérőjű üvegsővek, régóta használatosak elsősorban előválasztásra, tisztításra. Tegyük fel, hogy szennyvízmintából poláris fenolokat akarunk kinyerni. A lúgosított mintaoldatot szilikagél töltetű oszlopon átvezetve az egyéb alkotók a tölteten maradnak, s a fenolátok oldata átsorog. Az így megtisztított oldat savanyítás után szükség szerint töményíthető. Hasonlóan járunk el pl. vérszérumminták esetén vagy más biológiai mátrixú mintáknál is. Gyakori megoldás a különböző mértékben deaktivált alumínium-oxid használata.

A leghatékonyabb szilárd fázisú extrakció módosított szilikagél tölteten megy végbe. Ez leggyakrabban 0,5–1 cm belső átmérőjű és 5–10 cm hosszú polipropilénbe töltött 100–500 mg töltet segítségével valósul meg. A töltetet alul és felül porózus szűrőelem rögzíti (5.4. ábra).

A szokásos töltetek a szilikagél hordozó felületéhez kötött poláris vagy apoláris gyökcsoportok. Az *apoláris töltetek* többnyire a szilikagél felületi szilanolszoportjához kondenzációval kapcsolt alkil- (RP 18, RP 8) vagy arilcsoportokat (pl. LC-Ph) tartalmaznak. Az igen gyakran használt RP 18 „megosztófolyadék” okta-dec-il-szililéter szilikagél hordozóhoz kötve. Ezek a töltettípusok a vizes oldatokból apoláris alkotók kinyerésére alkalmasak (fordított, ún. reverz fázisú üzemmód). A *poláris töltetek* olyan szililéterek, amelyek —CN, —NH₂, —OH stb. poláris csoportokat is tartalmaznak, melyek a poláris alkotókat kötik meg.

Az SPE extrakció lépései (5.5. ábra):

- kondicionálás;
- mintafelvétel, megkötődés;
- mosás;
- leoldás (elúció).

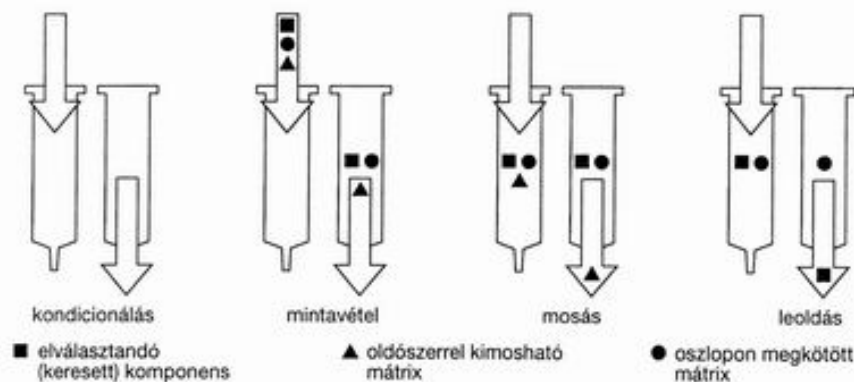
A kondicionálás során a töltetet tulajdonképpen nedvesíthetővé tesszük. Például vizes oldatból apoláris jellegű alkotók kinyeréséhez az oszlopot vizes metanolal mossuk, vigyázva arra, hogy az oszlop a mintafelvétel előtt ne száradjon ki.

A mintafelvétel során 50–100 ml mintát áramoltatunk keresztül az oszlopon; ami a laboratóriumi feltételektől függően különböző módokon oldható meg (injekciós fecskendővel túlnyomás, centrifugálás, szívópalack stb. segítségével) vagy gyárilag készített célkészülékkel is (5.6. ábra).

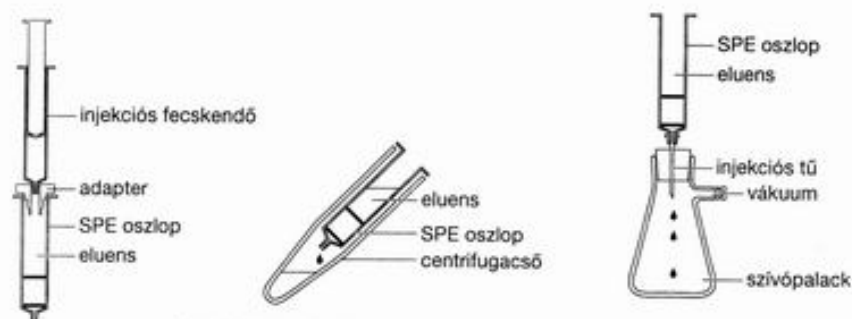
A kívánt alkotó *szelektív megkötődése* után a nemkívánatos szennyezőket (zavaró mátrix) lemoszuk a töltetről; természetesen olyan oldószert alkalmazva, hogy az ér-



5.4. ábra. Az SPE oszlop felépítése



5.5. ábra. A szilárd fázisú extrakció lépései



5.6. ábra. A minta átszívításának lehetőségei az SPE oszlopon

tékes anyagot ne oldjuk le ebben a fázisban az oszlopról. A mosás térfogatára kb. $3 \text{ cm}^3/\text{min}$. Ezt követi az elúció, melyhez alig $1\text{--}2 \text{ cm}^3$ jól megválasztott oldószerre van szükség. A leoldási sebesség kb. $1 \text{ cm}^3/\text{min}$. Ha apoláris alkotókat nyertünk ki vízből, akkor a leoldás előtt a töltetet meg kell szárítani nitrogénátfúvatással, mert a leoldó szerves oldószer (ha nem elegyedik a vízzel), nem tudja leoldani a vizes felülettel bevont szemcsékről az alkotókat.

A módszer egyik legnagyobb előnye, hogy gyors és igen kicsi a szervesoldószer-felhasználás (szemben pl. a Soxhlet-extrakcióval). Az oszlopok általában egyszer használatosak, bár újratöltésük megoldható.

Különböző kapacitású oszlopokat gyártanak ($100\text{--}500 \text{ mg}$) a megkötendő alkotó mennyiségéhez igazodva.

5.5. A gázkromatográfia

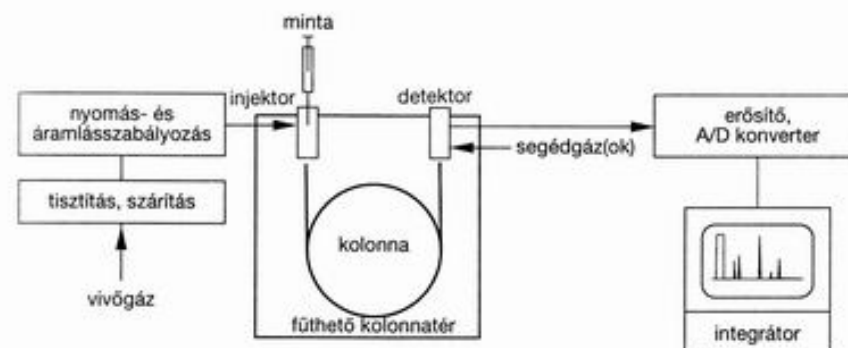
A kromatográfia – mint korábban már megállapítottuk – olyan elválasztási módszer, amelyben az alkotók szétválasztása egy álló fázis és az ezzel érintkező mozgó fázis közötti anyagátmenet során jön létre. Az álló fázis lehet szilárd (adszorpciós kromatográfia) vagy folyadék (abszorpciós kromatográfia). A gázkromatográfia esetén a mozgó fázis mindig gáz, leggyakrabban nagy tisztaságú hélium, nitrogén, hidrogén vagy argon. A mozgó fázist itt vivőgáznak nevezzük.

5.5.1. A gázkromatográf felépítése

Az adszorpciós és az abszorpciós gázkromatográfia a készülék felépítésében nem tér el egymástól, csupán a kolonna töltete különbözik.

A gázkromatográf a következő fő részekből áll (5.7. ábra):

- vivőgáz-rendszer,
- injektor,
- programozható fűtési kolonnatér a kolonnával,
- detektor,
- erősítő analóg-digitál (A/D) átalakítóval,
- kiértékelőrendszer (integrátor vagy számítógép).



5.7. ábra. A gázkromatográf elvi felépítése

A gázellátást leggyakrabban gázpalackok segítségével oldjuk meg. A levegőt – ami bizonyos gázkromatográfiai detektorokhoz segédgázként szükséges – célszerű helyben, levegőkompreszor segítségével előállítani. Igen fontos feladat a vivőgáz tisztítása, szárítása. A tisztított vivőgáz megfelelő nyomás, illetve áramlásszabályozó egységbe jut. A palackból érkező gáz nyomása általában $2\text{--}3 \text{ bar}$. A gázok alacsonyomása a legtöbb gázkromatográf esetén kézi úton beállítható megfelelő membrán-, illetve tűszelepek segítségével.

5.5.2. Mintabevitel – injektálás

A gázkromatográfiában az elválasztás mindig gázfázisban valósul meg, de a vizsgálandó minta legtöbbször oldat. Így az injektálórendszernek mindenképp el kell **párologtatni** a mintát, majd a vivőgázzal együtt az oszlopra kell irányítani gázelegyet.

A **mintaadagoló rendszer** vagy **injektor** feladata a beinjektált minta elpárologtatása. Az injektor hőmérsékletét általában a minta forráspontjánál 50 °C-kal magasabbra fűtjük.

A nagy térfogatnövekedéssel járó hirtelen elpárologtatás káros mellékhatásainak kiküszöbölésére többféle injektálási technika alakult ki. Mindegyikben közös, hogy a mintát **mikrofecskendővel** (Hamilton-fecskendő) juttatjuk be az injektálórendszerbe. A bevitt minta mennyisége 1–5 μl . (5.8. ábra)



5.8. ábra. Hamilton-fecskendő

Az injektort (5.9. ábra) többnyire egy hűtőbordázott sapka zárja le, ami alatt hőálló szilikongumból készült tömítés (szeptum) van. Beszúráskor a tű hegye apró forgácsokat juttathat az injektorba, ami hőbomlást szenvedve szennyezi a kromatogramunkat. Ezt a hatást csökkenti az ún. szeptum-purge (szeptumtisztító) gáz. Az injektor teste fémből készül, amelybe egy inert anyagból készült **liner** merül. Az injektort kívülről elektromosan fűtjük. Megfelelő szűkítőelem segítségével az injektor a kolonnához csatlakozik.

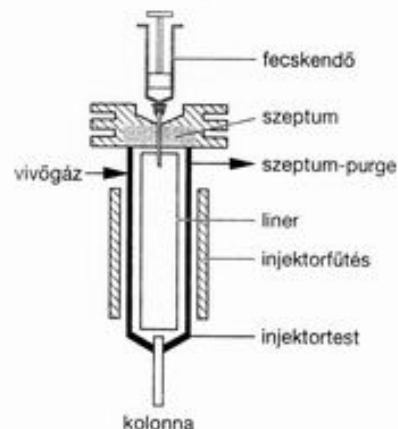
Négy fontos injektálási technika terjedt el:

- a közvetlen injektálás;
- a split vagy mintaáram-elosztásos technika;
- a splitless vagy mintaáram-elosztás nélküli technika és
- a cold on-column, a hideg kolonnára injektálás módszere.

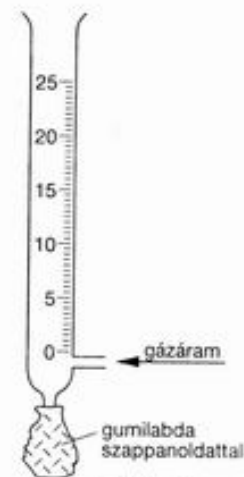
A **közvetlen** injektálást töltött oszlopok vagy 0,5 mm belső átmérőnél nagyobb kolonnák esetén alkalmazzuk. 1–2 μl mintát teljes mennyiségében az oszlopra juttatunk, lehetőleg pillanatszerűen, tehát minél gyorsabban injektálunk. Az injektort fűteni kell a minta teljes elpárologtatása érdekében.

A kapilláriskolonnákra (belső átmérő < 0,5 mm) mindössze 50–100 ng minta kerülhet 0,1–0,1 μl oldószerrel. A legkisebb mintamennyiség, amit viszonylag jól reprodukálhatóan képesek vagyunk bejuttatni, kb. 1 μl . Így tehát általában 1 μl körüli mintamennyiséget adagolunk az elpárologtatóba, de a kolonnára csak ennek töredékét juttatjuk. A képződő gőz nagyobbik hányadát egy elosztó (splitter) segítségével a szabadba engedjük. Ez a **mintaáram-elosztásos** vagy **split** technika.

Egy beépített fojtás segítségével szabályozhatjuk a splitarányt. Például 100:1 splitarány esetén a minta 1%-a jut a kolonnára, a 99% pedig a splitágon a szabadba távo-



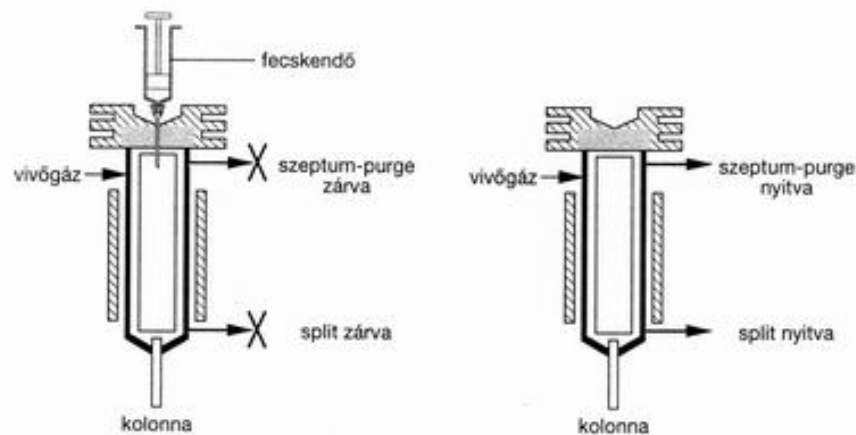
5.9. ábra. Az injektor vázlata



5.10. ábra.
A szappanhártyás
áramlásmérő

zik. Ekkora térfogatáramok beállítására szappanhártyás áramlásmérőt használhatunk (5.10. ábra).

A **splitless** technika alkalmazásakor a minta bevitelét követően a teljes elpárolgásig nem alkalmazunk mintaáram-elosztást (splitless fázis), majd a kolonna túlterhelését megakadályozandó csak a minta egy adott hányadát juttatjuk a kolonnára (split fázis), a többit lefűvátjuk. A legtöbb gázkromatográfot ma már split/splitless injektorral felszerelve gyártják. A spit/splitless technika két fázisát az 5.11. ábrán követhetjük nyomon.



5.11. ábra. A splitless/split injektálási technika

A splitless/split technikát többnyire akkor alkalmazzuk, ha a nagy koncentrációjú komponensek mellett kis koncentrációjú *illékony* komponensek is vannak a mintában.

A **cold on-column** technikát akkor alkalmazzuk, amikor a minta hőérzékeny vagy nagyon illékony komponensekből áll. A mintánkat hideg kolonnára adagoljuk – többnyire 0,53 mm-es töltetlen kapillárisra, amely már elég nagy belső átmérőjű ahhoz, hogy a vékony tűhegy beleérjen. Ehhez a kb. 10 cm-es szakaszhoz csatlakozik az analitikai kolonna. Injektáláskor az injektor és a kolonna is hideg. Ezután gyors hőprogram segítségével a mintát elpárologtatjuk, és megkezdődik a kolonnán az elválasztás. Ennél a technikánál nincs szeptum. Lassan injektálunk egy speciális on-column tüvel, ami sokkal vékonyabb és hosszabb a normál GC-s fecskendőknél.

Gázok injektálására vagy gáztömör tüt, vagy speciális – a HPLC-s injektálórendszerhez hasonló – gázbermérő csapokat alkalmazunk (lásd ott).

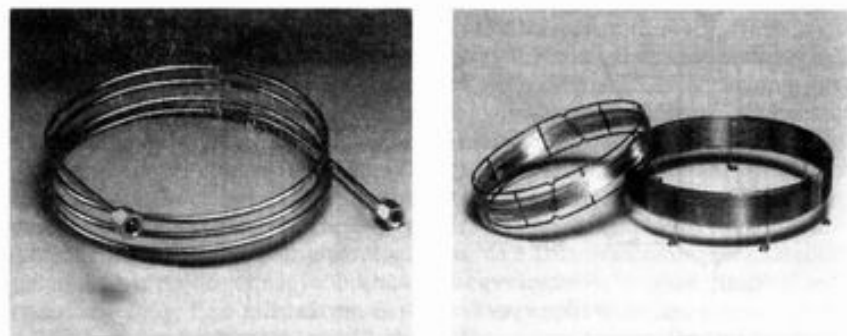
5.5.3. Gázkromatográfiás kolonnák

A gázkromatográfiás gyakorlatban vagy töltött kolonnával, vagy kapilláriskolonnával dolgozunk, ami **termosztálható** kolonnatérben van elhelyezve.

A kolonnátér állandó hőmérsékleten tartása rendkívül fontos, mivel ettől függ a szétválasztás hatékonysága és a kolonnán való áthaladási sebesség is. A gyakorlatban többnyire légtermosztátot alkalmaznak, ahol egy nagy teljesítményű ventilátor után helyezik el a fűtőszálakat, így a szükséges hőmérsékletet a forró levegő biztosítja. Az elválasztást vagy **izoterm** körülmények között, vagy **programozott fűtéssel** valósítjuk meg. A légtermosztát segítségével mindkét eljárás tized fok pontossággal megvalósítható.

A **töltött kolonnák** vagy töltött oszlopok anyaga fém vagy üveg. Ebbe kerül a megfelelő szemcseméretű töltet (hordozó), melynek egyik legfőbb jellemzője, hogy milyen típusú folyadékfilmmel van borítva.

A **kapilláriskolonna** tulajdonképpen igen vékony kvarccső, belsejében vékony megosztó folyadékfilmmel. (5.12. ábra)



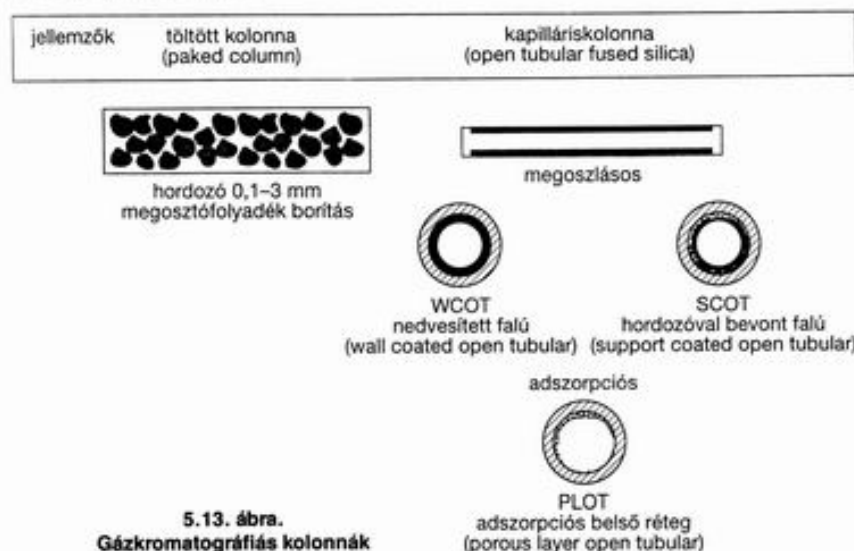
5.12. ábra. Töltött oszlop (a) és kapillárisoszlop (b)

A legfontosabb kolonnajellemzőket az 5.1. táblázatban foglaltuk össze.

5.1. táblázat. A legfontosabb kolonnajellemzők

Jellemzők	Töltött kolonna	Kapilláriskolonna
Hosszúság	1–6 m	5–100 m
Belső átmérő	2–4 mm	0,2–0,75 mm
Filmvastagság	1–10 mm	0,1–7,0 mm
Kapacitás	10 mg minta	50 ng minta
Típusa	adszorpciós (nincs megosztófolyadék), megosztós (van megosztófolyadék)	
Megosztófolyadék	nem poláros, közepesen poláros, poláros	

A gázkromatográfiában döntő jelentősége van a folyadékfilmnek, amellyel a kapillárisoszlop belső falát, illetve a hordozószemcsék felületét bevonjuk (5.13. ábra). Ezt nevezzük **megosztófolyadéknak**. A megosztófolyadékok legtöbbje makromolekuláris anyag, nagy hőstabilitású szilikon (polialkil-sziloxán) vagy poliglikol (polietilén-glikol) típusú.



5.13. ábra. Gázkromatográfiás kolonnák

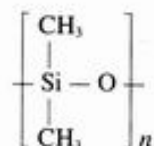
A **poliglikolok** a kereskedelemben többnyire Carbowax néven kerülnek forgalomba. A nevük utáni szám (pl. Carbowax 600) a molekulatömegükre utal. Általános képletük:



Polaritásuk a moláris tömeg növekedtével csökken. Jól alkalmazhatók alkoholok, aldehidek, ketonok, észterek, aminok szétválasztására.

A **szilikonfázisok** közül az egyik leggyakoribb apoláris megosztófolyadék a poli(dimetil-sziloxán). A különböző cégek ugyanezt a típusú fázist különböző neveken

forgalmazzák, pl. CP Sil 5 CB (Chrompack), OV-1 (Ohio Valley), Rtx-1 (Restek) stb. Szerkezetük:



A metilcsoport helyett természetesen más szubsztituens is elképzelhető (pl. fenil-, ciano- stb.). A szubsztituensek arányának változtatásával széles skálán belül lehet a polaritást változtatni.

A **kromatográfiás polaritás (CP)** 0 pontja a szkvalán ($\text{C}_{30}\text{H}_{62}$) és a 100 pontnak (legpolárosabb) az OV-275-öt (diállil-nitril-sziloxánt) választották. Ezen a skálán pl. az OV-1-nek $CP = 5$ felel meg, az 5% difenil- és 95% dimetil-polisziloxán pedig $CP = 8$ -as értéket kapott. A Carbowax 20M $CP = 52$ értékű.

Poláros anyagok szétválasztására poláros megosztófolyadék szükséges, apoláros-hoz pedig apoláros.

A kapillárisoszlopokat a gyártó cégek egy adatsorral jellemzik. Mit fejez ki pl. a következő felirat: $30 \times 0,32 \times 0,25$ mm CP Sil 5 CB? Az első szám az oszlop hosszúságát adja meg m-ben, a második a belső átmérőt mm-ben, a harmadik a megosztófolyadék filmvastagságát, majd a betű-szám kombináció a megosztófolyadék minőségét és kémiai kötöttségét jelöli.

5.5.4. Detektorok

A **detektor** feladata a kolonnából kilépő vivőgázban megjelenő komponensek folyamatos észlelése. A detektor tehát a kolonnából kilépő gázáram valamilyen fizikai vagy kémiai tulajdonságának megváltozását jelzi. A kis mintabemérésnek megfelelően a detektornak igen érzékenynek kell lennie, hogy a vivőgáz tulajdonságainak igen kis változását érzékelje. A gázkromatográfiás módszerek széles körű elterjedését a különböző, nagy érzékenységgű detektorok kifejlesztése segítette elő. A jó detektor legfontosabb tulajdonságait a következőkben foglalhatjuk össze:

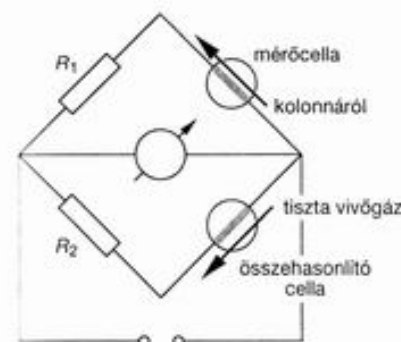
- nagy érzékenység a különböző komponensekre;
- a jel gyorsan követi a kolonnából kilépő gázáram minőségének megváltozását;
- a jel arányos a koncentrációváltozással (linearitás);
- széles alkalmazhatósági határ.

Hővezetőképességi detektor (Thermal Conductivity Detector, TCD)

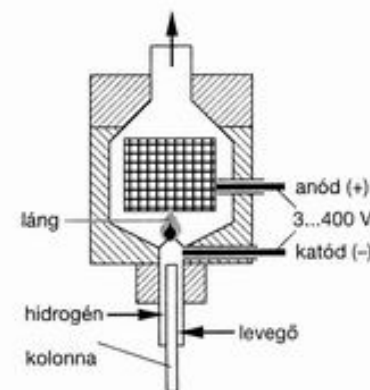
A detektor felépítése (5.14. ábra): hőszigeteléssel ellátott fémtömb furataiban külső fűtésű ellenálláshuzalok (filamentek) vannak elhelyezve, melyeknek ellenállása a hőmérséklettel jelentősen változik. Anyaguk platina, platina-ródium ötvözet.

Ha valamilyen komponens megjelenik a vivőgázban, a gázáram hővezető képessége megváltozik, ami a fűtött szál ellenállásának megváltozását okozza. A vivőgáz mi-

nősége ennél a detektornál igen lényeges, hővezetésének igen nagy mértékben el kell térnie az összes vizsgálandó anyag hővezetésétől. Ebből a szempontból a hidrogén és a hélium a legmegfelelőbb vivőgáz. A négy furat közül kettőn a tiszta vivőgáz (referenciaág), kettőn pedig a kolonnából kilépő gáz (mérőcella) áramlik keresztül. A konvencionális TCD-k cellatérfogata $0,5-3 \text{ cm}^3$. Ez lehetetlenné teszi a kapillárisoszlophoz való illesztést, e detektorok tehát csak töltött kolonnákkal használhatók. A hővezetőképesség-mérő detektorok koncentrációérzékenyek, tehát a detektorjel nagysága a vizsgált alkotó koncentrációjával arányos.



5.14. ábra. Hővezetőképesség-mérő cella



5.15. ábra. Lángionizációs detektor

Lángionizációs detektor (Flame Ionization Detector, FID)

A detektort már az 1950-es évek végén kidolgozták, és a legelterjedtebb detektorrá vált. Elsősorban azért, mert egyedülállóan széles a linearitási tartománya, nagy az érzékenysége és igen egyszerű a felépítése is.

Az ionizációs detektorok működésének alapja a gázok villamos vezetése. Közöséges nyomáson és hőmérsékleten a gázok tökéletes szigetelők. Ha azonban ionizáljuk az atomot, illetve a molekulát a gázban, ezek a külső elektromos tér hatására elmozdulnak, és a gáz vezetővé válik. A hatás már igen kevés ion keletkezése esetén is jelentkezik. Ez magyarázza az ionizációs detektorok nagy érzékenységét.

A lángionizációs detektor (5.15. ábra) esetén a kolonnáról jövő gázáramhoz hidrogént keverünk. Így jut be a gázáram a mikroégőbe. A hidrogént itt elégetve, az égő lángba bejutó szerves anyagokból töltéshordozók keletkeznek, és ionáramot hoznak létre.

A legtöbb detektorban maga az égő az egyik elektród és valamilyen, a lángot körülvevő cső a másik elektród. Az égő a pozitív elektród, a hengeres gyűjtőelektród (a kollektor) pedig a negatív. A kis ionáramok méréséhez nagy bemenő ellenállású erősítőre van szükség.

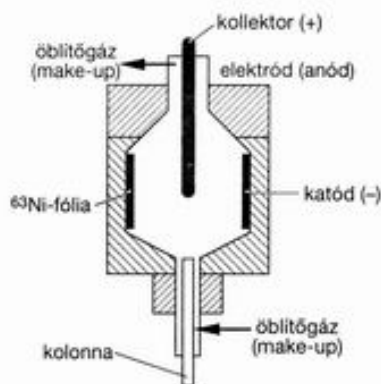
Ha a detektorhoz kapilláriskolonnát csatlakoztatunk, akkor az oszlopról lejövő és

a detektorba jutó gázmennyiség oly csekély, hogy a detektort – nagyobb térfogata miatt – folyamatosan öblíteni kell. Ezért kell a kapillárisoszlopok esetén külön öblítő-gázzal is gondoskodni. Az öblítőgázt a szakirodalomban *make-up* gáznak nevezik.

Elektronbefogásos detektor (Electron Capture Detector, ECD)

Az elektronbefogásos detektort az 1960-as években fejlesztették ki, és igen gyorsan elterjedt; a halogéntartalmú növényvédő szerek és rovarirtószer-maradványok kimutatásában nélkülözhetetlenné vált.

A detektorban β -sugárforrás van. Ez leggyakrabban ^{63}Ni (izotópot) tartalmazó fólia, amit negatív pólusként kapcsolnak (5.16. ábra).



5.16. ábra.
Elektronbefogásos detektor

A kollektorelektrod felé a polarizációs feszültség kicsi (1–10 V), így az áramkörben egy nagyon kicsi, de jól mérhető alapáram folyik. Ha a vívőgázzal olyan anyag érkezik a detektorba, amely nagy elektronegativitású elemeket tartalmaz (F, Cl, O, Br), ezek az elemek adszorbeálják, „befogják” a β -sugárforrás által kibocsátott elektronokat. Így valójában az alapáramnál kisebb ionáram jelzi a vizsgált anyag megjelenését a detektorban. A detektor a szénhidrogénekre gyakorlatilag érzéketlen, a halogénezett vegyületekre viszont igen érzékeny.

A bemutatott detektorokon kívül használunk még **láng-termoionizációs** (Flame Thermionic Detector, FTD) detektort, **lángfotometriás** (Flame Photometric Detector, FPD) detektort, melyeknek gyakorlati jelentősége a kén- és foszfortartalmú vegyületek elemzésében van.

Egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a gázkromatográf összekapcsolása tömegspektrométerrel (GC-MS, GC-Mass Spectrometry). Ebben a kolonnáról érkező gázok egy egyszerű felépítésű tömegspektrométerbe jutnak, ahol ionizáció után egy analízator választja szét az ionokat fajlagos tömegük szerint.

5.5.5. A minőségi és a mennyiségi analízis módszerei

A vizsgált minta minőségi és mennyiségi adataira a kromatogramjából következtethetünk.

A **minőségi azonosítás** leggyakoribb esetei:

- ismerjük az összetevőket, és meg akarunk bizonyosodni jelenlétükről. Ebben az esetben az ismeretlen minta mért retenciós idejét hasonlítjuk össze egy *standard* készült kromatogram retenciós idejével;
- nem ismerjük, csak feltételezzük egy adott komponens jelenlétét. Ekkor a feltételezett komponens standardját *addicionáljuk* a mintához. Feltételezésünket a kiválasztott retenciós időhöz tartozó csúcsterület növekedése igazolja.

A **mennyiségi azonosítás** két legismertebb módszerét ismertetjük: a kalibrációs módszert és a belső standard módszert.

Kalibrációs módszer. A standardból 1–5 tagú oldatsorozatot készítünk, azokat kromatografáljuk, és meghatározzuk az adott koncentrációkhoz tartozó csúcs alatti területeket (a legtöbb integrátor ezt automatikusan meghatározza). Az ismeretlen mintát azonos körülmények között kromatografáljuk, és az előbbi standardokból készített kalibrációs görbe segítségével ismeretlenünk koncentrációja meghatározható. A számítógépes kiértékelőrendszereknél a kalibrációs görbe készítését és az ismeretlen minta koncentrációjának kiszámítását integrátorunk – megfelelő programozás után – elvégzi.

A **belső standard** módszer igen elterjedt a gázkromatográfiában. Lényege, hogy a vizsgálandó mintához egy olyan anyagot keverünk, amelyet a minta eredetileg nem tartalmaz, de a kromatografálás során jól elváló csúcsot ad. Célszerű olyan anyagot választani, amelynek retenciós ideje közel van a vizsgált alkotó retenciós idejéhez. A kiértékelés során a belső standardra kapott jelet hasonlítjuk az ismeretlenhez. Ezzel a módszerrel kiküszöbölhetjük a mintaadagolás pontatlanságából adódó hibát.

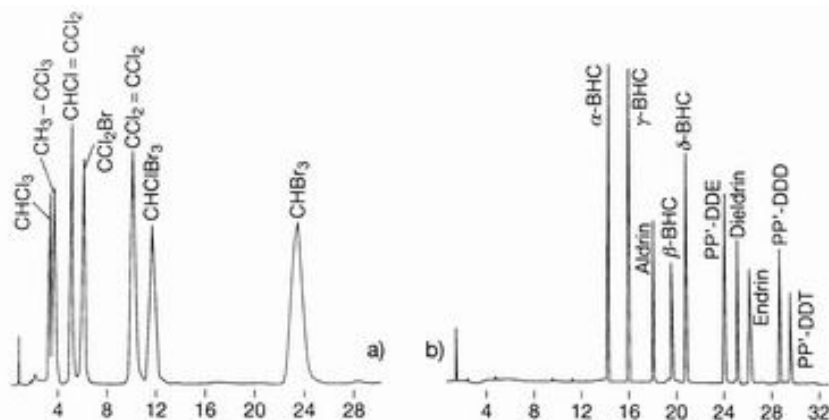
Az első lépés a **relatív érzékenység** meghatározása. Tegyük fel, hogy csak egy alkotót vizsgálunk. Beinjektálunk egy olyan mintát, mely ismert mennyiségben tartalmazza a belső standardot (m_s) és a vizsgált komponenst (m_i). A kromatogramból meghatározzuk a csúcsterületeket (A_s , A_i), ezek segítségével pedig a relatív érzékenységet.

$$f_i = \frac{A_i \cdot m_s}{A_s \cdot m_i}$$

A második lépésben a ismert mennyiségű (G), a vizsgált összetevőt ismeretlen mennyiségben (m_i) tartalmazó elegyhez hozzáadjuk a belső standard ismert mennyiségét (m_s), és ezzel az eleggyel veszünk fel egy kromatogramot. A területek rendre A_s^* és A_i^* . Az adatok ismeretében az ismeretlen minta vizsgált alkotójának m/m %-os összetétele:

$$m_{i, \%} = \frac{m_s \cdot A_i^*}{G \cdot A_s^* \cdot f_i} \cdot 100.$$

Több vizsgálandó alkotó esetén az elv azonos, csak mindegyik alkotóra meg kell határozni a belső standardra vonatkozó relatív érzékenységet.



5.17. ábra. Gázkromatogramok töltött oszlopon (a) és kapillárisoszlopon (b)

Az 5.17. ábrán két gázkromatográfiás kromatogramot láthatunk. Az első jellegzetesen töltött oszlopra utaló szélesebb csúcsokat mutat (szerves halogénvegyületek), a második kapillárisoszlopon elválasztott klórozott peszticidyszármazékok igen kis csúcsszélességű kromatogramja.

Kérdések, feladatok

1. Ismertessük a legfontosabb kromatográfiás jellemzőket!
2. Milyen kromatográfiás eljárások vannak?
3. Milyen részegységeket tartalmaz egy gázkromatográf? Melyiknek mi a szerepe?
4. Milyen gázkromatográfiás detektorokat ismerünk?
5. Mi a belső standard módszer elve?
6. FID-detektort használva keressük a vívgáz optimális áramlási sebességét (hidrogénre 12 cm/s), az oszlophosszúság 30 m. A három mérési pontunk (metánt injektálva);

p (hidrogén, bar)	t_M
0,2	0,5
0,5	1,25
1,1	3

Melyik nyomásértéket állítsuk be? (0,5 bar)

5.6. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

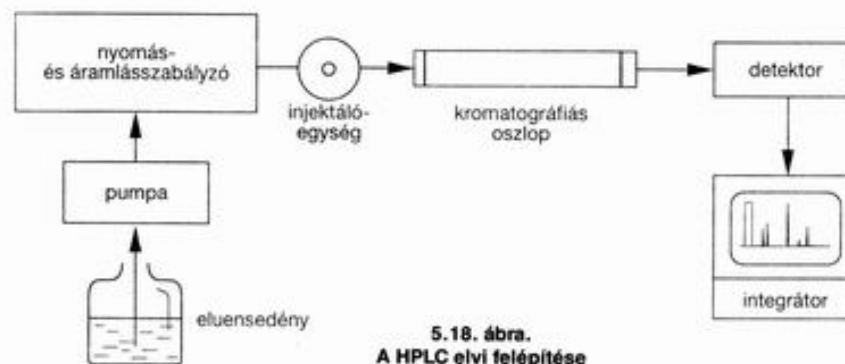
Az 1950-es évekig egyszerűsége miatt gyakorlatilag csak a kis nyomású folyadékkromatográfiát alkalmazták papír- vagy oszlopkromatográfia formájában. A gázkromatográfia fejlődése azonban jótékonyan hatott a folyadékkromatográfiára is. Egy statisztikai felmérés szerint az alkalmazott analitikai eljárások 40%-át a HPLC-s eljárások teszik ki. Tehát ma ez az egyik leggyakrabban alkalmazott analitikai módszer.

Gázkromatográfiás eljárással sok minta alkotói nem választhatók el. 500 g/mol-nál nagyobb moláris tömegű anyagokat nem lehet gázállapotba vinni elbomlás

nélkül. A folyadékkromatográfiás elválasztásokhoz nincs szükség magas hőmérsékletre.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia kialakulása szorosan összefügg a kolonnátöltetek minőségi fejlődésével, ami elsősorban a szemcseméret csökkenésében és a fajlagos felület növelésében nyilvánult meg. Az 1960-as évek 50–200 mm-es szemcseméreteit a hetvenes évek végére 3–5 μm -es porózus mikroszemcsék váltották fel. Minél kisebb az álló fázis részecskemérete, annál hatékonyabb az elválasztás. A hatékonyság növelésének azonban az az ára, hogy egyre nagyobb és nagyobb nyomást kell alkalmazni. Lényeges azonban, hogy 2 μm -nél kisebb szemcseméretet ne tartalmazzon az oszlop, mert ezek rontják a kolonna minőségét és nagyon megnövelik a nyomásesést. A nyomás növelése semmiképp sem kerülhető el a szemcseméret csökkenésével, de ma már nagyon jó minőségű, nagy nyomású (1000 bar!) folyadékszállító pumpák állnak rendelkezésre. Az 5 μm átlagos részecskeméretű álló fázis kb. 300 bar nyomást igényel. Az elválasztás néhány perc alatt elvégezhető, és egy kb. 10 cm hosszú oszlop esetén a tányérszám mintegy 10000.

Egy általános célú, nagynyomású folyadékkromatográf működési vázlatát az 5.18. ábrán látható. Ennek alapján tárgyaljuk a szerkezeti egységek funkcióját és a velük szemben támasztott követelményeket.



5.18. ábra.
A HPLC elvi felépítése

A mozgó fázist (eluens) az eluensedényből egy dugattyús pumpa juttatja egy injektoron (mintahurok) keresztül a kromatográfiás oszlopra. Itt megvalósul a szétválás. A detektorrel egy integrátorba jut, ami nemcsak a kromatogramot veszi fel, hanem részletes adatokat szolgáltat a kromatogram minden paraméteréről.

5.6.1. A folyadékszállítás

A nagynyomású folyadékkromatográfok oszlopai 2–40 μm szemcseméretű töltet tartalmaznak, amelyeknek igen nagy a hidrodinamikai ellenállásuk. Az eluens 0,1–10 cm^3/min áramlási sebességének fenntartásához igen nagy nyomásra (10–350 bar) van szükség.

A nagy nyomáson pulzálásmentesen szállító szivattyúk kifejlesztése technikailag bonyolult feladat volt. Olyan tömítőanyag szükséges ugyanis, amely ellenáll a nagy nyomásnak és kémiai is inert. Erre a célra a teflon bizonyult a legalkalmasabbnak. Továbbá úgy kellett a szivattyúkat kiképezni, hogy minél kisebb legyen a holtterük. Ez különösen a **gradienselúció** esetén fontos. A gradienselúció olyan eljárás, amely-lal az analízis során az eluens összetételét előzetesen meghatározott program szer-int változtatjuk. Ha egymáshoz nagyon hasonlóan kötődő anyagokat kell elválasztani, akkor szinte elengedhetetlen, hogy az eluens polaritását, pH-ját vagy ionerősségét folyamatosan változtassuk. Ezt a hatást két vagy több egymással jól elegyedő, de eltérő tulajdonságú oldószer összekeverésével lehet elérni. Ehhez természetesen megfelelő szelepeket és megfelelő számú szállítópumpát kell folyamatosan szabályozni.

A gradienselúció ellentettje a **normál** vagy **izokratikus elúció**. Ez olyan elválasztás, ahol a mozgó fázis összetétele az elválasztás során állandó marad (az „isocratic” görög szó, jelentése: azonos erősség).

Legelterjedtebb nagynyomású folyadékszállító eszköz a dugattyús szivattyú, ami meglehetősen pulzáló áramlást hoz létre. A lüktetés csökkentésére két vagy három hengert működtetnek egyszerre, valamint pulzáláscsökkentőt építenek be a szivattyú nyomóvezetékébe.

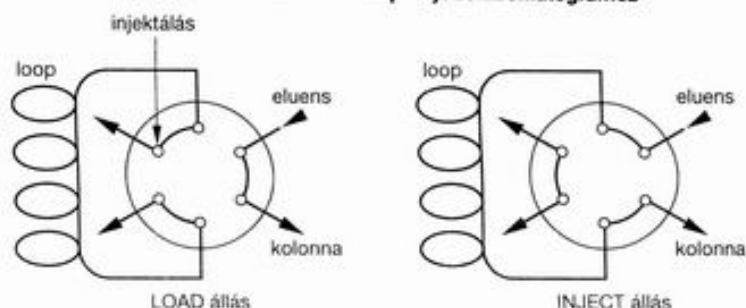
5.6.2. Mintabevitel – injektálás

Az intenzív folyadékkromatográfiában a jó elválasztás érdekében igen fontos a megfelelő mintabevitel. Minél impulzusszerűbb a mintabevitel, annál kisebb sáv szélesedésre számíthatunk a kromatogramon. Ideális esetben tehát a mintát végtelenül keskeny sáv formájában kell felvinnünk a kolonnára.

Az egyik legegyszerűbb módszer a fecskendős injektálás, ami a gázkromatográfiában használatos szeptomos rendszerhez hasonló. Ez a módszer azonban maximum 50–100 bar nyomásig alkalmazható. E fölött a szeptom nem zár jól, és nagyobb nyomás ellenében fecskendővel sem tudunk mintát beadagolni.

Sokkal elterjedtebb az ún. hatfuratú mintabemérő csap, idegen szóval a loop (ejtsd lúp, jelentése: hurok). Ennek alkalmazásakor a mintát fecskendővel juttatjuk egy kalibrált térfogatú vékony csőszakaszba (hurok), majd egy határozott mozdulattal be-

5.19. ábra. Mintabemérő csap folyadékkromatográfhoz



forgatjuk a feltöltött csőszakaszt az eluensáramba. A mintabemérő csapnak tehát két állása van:

- LOAD állás;
- INJECT állás.

A mintabemérés lépéseit az 5.19. ábrán követhetjük nyomon.

5.6.3. Folyadékkromatográfias oszlopok

A korszerű nagynyomású folyadékkromatográfok legfontosabb része a hatékony, jó elválasztóképességű, minimális csúcshéyesedést okozó oszlop (5.20. ábra). Az oszlopok általában nyomásálló, rozsdamentes acélból készülnek. Hosszúságuk többnyire 15–30 cm, belső átmérőjük 2,5–8 mm. A legelterjedtebb méret a 25 cm × 4 mm-es. Csatlakoztatásuk a nagy műveteli nyomás miatt különös gondosságot igényel.



5.20. ábra. Folyadékkromatográfias oszlopok

Az álló és mozgó fázisok részletes tárgyalása előtt tekintsük át az 5.2. táblázatban a legfontosabb elválasztási módszereket!

5.2. táblázat. Folyadékkromatográfias elválasztási módszerek

Folyadékkromatográfias módszer	Álló fázis	Mozgó fázis	Vegyülettípus
Normál fázisú HPLC NP-HPLC (Normal Phase HPLC)	Poláris töltet	Apoláris oldószer, poláris modifikátorral	Közepesen poláris vegyületek, izomerek
Fordított fázisú HPLC RP-HPLC (Reverse Phase HPLC)	Apoláris töltet	Poláris oldószerkelet savaknál, bázisoknál puffertolva	Apoláris vegyületek, poliaromás szénhidrogének, vitaminok, fenolok, savak
Fordított fázisú ionpár kr. RP-IP-HPLC (Reverse Phase Ion P. HPLC)	Apoláris töltet	Puffertolt víz – szerves oldószerkelet hidrofób ionnal	Savak, bázisok, ionos vegyületek
Ioncserés kromatográfia	Pozitív vagy negatív töltés a felületen	Puffer és/vagy szerves oldószer	Ionos vegyületek
Méretkizárásos kromatográfia (SEC)	Nagy, ismert méretű porus-átmérő	Savtartamú víz és/vagy szerves oldószer	Cukrok, fehérjék, nukleinsavak

Az álló fázis kiválasztása

A legrégebben használt kromatográfiás eljárás az adszorpciós kromatográfia. A legjobban elterjedt álló fázisok: alumínium-oxid, szilikagél, diatómaföld, hidroxilapatit, poliamid. A folyamat az álló fázis felszíne és az oldott anyag között alakul ki adszorpciós hatás révén. Az anyagok elválását végső soron a dipólus-dipólus kölcsönhatások, hidrogénkötések stb. idézik elő. E szerint az adszorpciós kromatográfia elsősorban a polarizálható kötésekkel rendelkező anyagok elválasztására alkalmas.

Szilikagélek esetén a poláris reakciópartner szerepét a szilanolszoportok ($-\text{Si}-\text{OH}$) töltik be. A mozgó fázis polározottságától függően a folyadékfázisban a kémiai kötéseknek jóval gyengébb, különböző stabilitású kötések alakulnak ki.

A folyamat során fontos szerepet töltenek be a szterikus kölcsönhatások. Az alumínium-oxidnak van a legnagyobb aktivitása, a hidroxilapatitnak a legkisebb. A poliamidok viszont alkalmasak hidrogénkötések létrehozására, tehát fenolok, cukrok stb. elválasztására. A szorbens aktivitása sok más tényezőtől is függ, különösen a mozgó fázis polározottságától.

Különböző anyagok eluációs kapacitása a szilikagélen a következő sorrend szerint csökken:

- alkánok;
- aromás szénhidrogének;
- szerves halogénszármazékok;
- éterek;
- nitrovegyületek;
- észterek/aldehidek/ketonok;
- alkoholok/amidok;
- karbonsavak.

Ha adszorpciós kromatográfiával kívánunk foglalkozni, akkor a legelső lépés a megfelelő mozgó és álló fázis (oszloptöltet) kiválasztása. Elválasztás általában csak akkor lehetséges, ha a mozgó fázis polaritása kisebb, mint az álló fázisé. Ennek az elvnek a megfordításával egy igen hatékony módszerhez lehet jutni, a neve **fordított (reverz) fázisú kromatográfia**. Ma az elválasztások több mint 70 %-ára a reverz fázis jellemző. Az eljárás alkalmazásakor az eredeti szilikagél töltet polaritását csökkenteni kell.

Ezt régebben a szilikagél paraffinolajos impregnálásával oldották meg. Manapság azonban kovalens kötéssel a szilikagél felszínén levő szilanolszoportokhoz alkilszoportot – pl. oktadecil-szilánokat, RP 18 ($-\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) – kötnek. Így a szemcsé felületét egy alkilszoportokból álló, gyakorlatilag monomolekuláris réteg fedi, és így hidrofóbbá válik.

Az elválasztás körülményei emiatt megfordulnak, és így közepesen vagy gyengén poláris anyagokat választhatunk el apoláris álló fázison közepesen vagy erősen poláris mozgó fázisok segítségével. Következésképp az eluációs kapacitási sorrend is megfordul:

- karbonsavak;
- alkoholok/fenolok;
- aminok;

- észterek/aldehidek;
- ketonok;
- szerves halogénszármazékok;
- aromás szénhidrogének;
- alifás szénhidrogének.

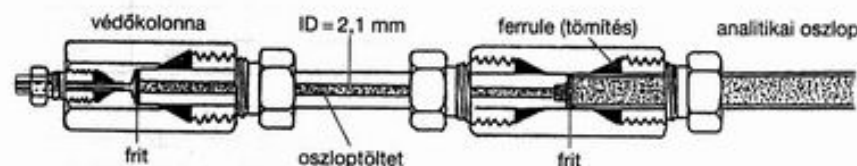
A reverz fázisoknak (RP) számos előnyük van a normál szilikagél töltettel szemben:

- nem kell őket dezaktiválni (az alumínium-oxid aktivitását ugyanis gyakran csökkenteni kell);
- mozgó fázisként vizes oldatokat is használhatunk;
- pufferek használatával optimalizálni lehet a gyengén savas vagy gyengén lúgos anyagok elválasztását;
- ionpárok képzésével ionos vegyületeket is el lehet választani.

Az oszlopok végére általában porózus anyagból készült ún. **fritteket** (szűrőket) helyeznek, hogy a töltet kimosódását az oszlopból megakadályozzák. Anyaguk általában porózus nikkell, saválló acél vagy teflon. A frittek kb. 3 mm hosszúságúak, és pórusméretük a töltet szemcsék átmérőjénél kisebb kell legyen (0,5–10 μm).

Az analitikai oszlop elé gyakran védőkolonnát (guard column) tesznek. Ez többnyire az oszlop töltetével azonos töltetű rövid oszlop, a mintában található szennyezőktől védi a kromatográfiás oszlopunkat.

A folyadékkromatográfiás oszlop szerkezete az 5.21. ábrán látható.



5.21. ábra.
A folyadékkromatográfiás oszlop szerkezete

A mozgó fázis kiválasztása

A folyadékkromatográfia sikerességének elengedhetetlen feltétele, hogy megfelelő mozgó fázist alkalmazzunk. Ez biztosítja azt, hogy az elválasztás a lehető leggyorsabban és a legnagyobb hatékonysággal legyen elvégezhető. A mozgó fázisnak emellett nem szabad kémiai reakcióba lépnie a mintával. A leghatékonyabb mozgó fázisok: *n*-hexán, *i*-oktán, kloroform, etil-acetát, ecetsav, acetonitril, metanol, víz.

A mozgó fázis erőssége, azaz polaritása határozza meg, hogy a minta komponensei milyen gyorsan haladnak át az oszlopon. Az erős mozgó fázis gyorsabban megjelenő, élesebb csúcsokat ad. A gyenge mozgó fázis nagyobb retenciós időt ad valamennyi sávra, és nagyobb lesz a sáv szélesedés.

Az 5.3. táblázatban a legelterjedtebb mozgó fázisok tulajdonságait foglaltuk össze.

5.3. táblázat. A folyadékkromatográfiás eluensek

Mozgó fázis	Polaritás	Dipólus paraméter	Proton-akceptor paraméter	Proton-donor paraméter	Reflexiós index	UV határ nm
n-pentán	0,00	0	0	0	1,358	210
Hexán	0,00	0	0	0	1,357	210
i-oktán	0,01	0	0	0	1,404	210
Petroléter	0,01	0	0	0		210
Ciklohexán	0,04	0	0	0	1,427	210
Xilol	0,26	0	0,5	0	1,500	290
i-propil-éter	0,28	0,5	0,5	0	1,368	220
Toluol	0,29	0	0,5	0	1,496	285
Dietil-éter	0,38	2	2	0	1,353	220
Kloroform	0,40	3	0,5	3	1,443	245
Metilén-klorid	0,42	5,5	0,5	0	1,424	245
Aceton	0,56	5	2,5	0	1,359	330
Dioxán	0,58	4	3	0	1,422	220
Atil-acetát	0,58	3	2	0	1,370	260
Acetonitril	0,65	8	2,5	0	1,340	200
Propanol	0,82	2,5	4	4	1,380	210
Etanol	0,88	4	5	5	1,361	210
Metanol	0,95	5	7,5	7,5	1,329	210
Víz	nagy	nagy	nagy	nagy	1,333	190

A mozgó fázis vagy eluens többnyire nem egy tiszta anyag, hanem az előbbi anyagok megfelelő arányú keveréke. Sok esetben a jó elválasztás érdekében az oszlopon állandó pH-t kell tartani. Így az eluálódások gyakran puffereket is tartalmaznak.

5.6.4. Detektorok

A detektorral az oszlopot elhagyó eluensben az elválasztott komponensek koncentrációja követhető nyomon folyamatosan. Az intenzív folyadékkromatográfiás gyakorlatban nem ritka, hogy 1 cm³ eluensben 10 ng-nyi anyagot kell tudni mérni. Nagyon fontos tehát, hogy az adott feladathoz elég érzékeny legyen a detektor.

A folyadékkromatográfiás detektoroknak két nagy csoportja van: az *univerzális detektorok* (valamilyen bruttó tulajdonságot mérnek) és a *szelektív detektorok* (a minta valamely specifikus tulajdonságát mérik).

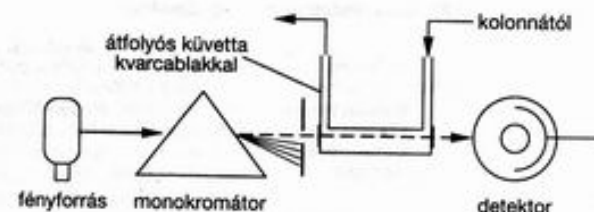
A leggyakrabban használt *detektortípusok* a következők:

- UV-VIS fotométerek;
- differenciálrefraktométerek;
- vezetőképességi detektorok;

- fluorometriás detektorok;
- diódasoros detektor;
- HPLC-MS.

Az UV és a látható tartományban működő detektorok jelenleg a legelterjedtebb **HPLC-s detektorok**. Kevésbé érzékenyek az áramlási sebesség változásaira és a hőmérséklet-ingadozásokra, több vegyület igen érzékeny detektálását teszik lehetővé. Nyilvánvaló, hogy a detektálandó mintának az ultraibolya vagy a látható tartományban abszorbeálni kell.

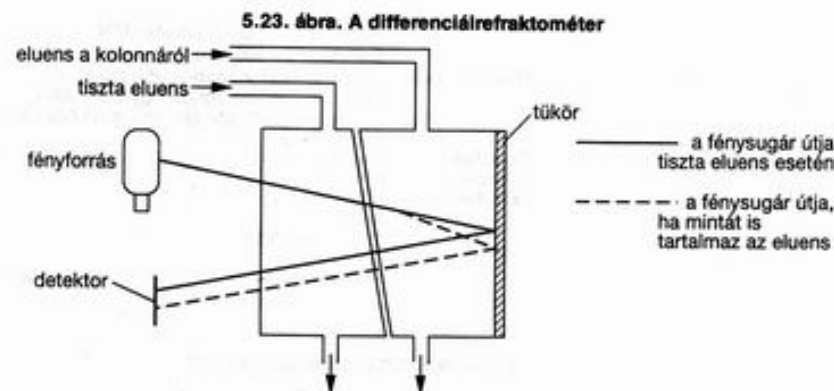
Eleinte meghatározott hullámhosszon működő fotométereket készítettek (a leggyakoribb hullámhossz 254 nm). A korszerű fotométer-detektorok mérő hullámhossza fokozat nélkül állítható. A fényforrás UV tartományban deutériumlámpa, a látható tartományban volfrámlámpa. A monokromátor megfelelő tükrözőfelülettel ellátott rács, amelynek mozgatásával lehet a hullámhosszat állítani. A mérőházba a fény megfelelő résen keresztül jut. Itt helyezkedik el a kvarcból készült átfolyós mérőcella és a fényérzékelő detektor (5.22. ábra).



5.22. ábra. UV/VIS detektor

A látható hullámhossz-tartományban dolgozó fotométereket is alkalmazhatjuk folyadékkromatográfiás detektorként, ha az oszlop után a szintelen komponenseket színreakcióba vesszük. Ezen az elven működik pl. a ninhidrintes aminosav-analizátor.

A **differenciálrefraktométerek** (5.23. ábra) a második legelterjedtebben használt detektorok. Az érzékelő folyamatosan méri a referenciacellában levő tiszta és



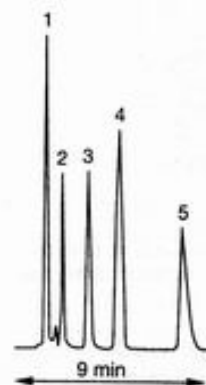
5.23. ábra. A differenciálrefraktométer

az analizátorcellában levő, az elválasztott komponens is tartalmazó eluens törésmutatója közötti különbséget.

Ionkromatográfia esetén gyakran alkalmazott detektortípus a kiváló érzékenységgel rendelkező **vezetőképesség-mérő cella** (5.24. ábra). Az ionkromatográfiai módszert az 1970-es években fejlesztették ki elsősorban szervesen anionok és hidrophil savak, bázisok kimutatására. Ezzel lehetővé vált anionok egymás melletti meghatározása tized ppm-es tartományban.



5.24. ábra. Vezetőképességi detektor



Column: μ BondapakTM C₁₈ Radial-pakTM
Cartridge 8 x 100 mm
Mobile Phase: Methanol:Water, 75:35 PIC B6
Flow Rate: 3.0 mL/min
Detection: 254 nm
Sample:
1. Ascorbic Acid
2. Niacinamid
3. Piridoxine
4. Riboflavin
5. Thiamine



Column: μ BondapakTM C₁₈ Radial-pakTM
Cartridge 8 x 100 mm
Mobile Phase: 7% (V/V) Acetonitrile and 93% of an aqueous solution containing 0.5% (W/V) Ammonium-Acetate and 2% (V/V) Glacial Acetic-Acid
Flow Rate: 4 mL/min
Detection: 254 nm
Standards:
1. Saccharin
2. Coffeine
3. Benzoic-Acid

5.25. ábra. HPLC-s kromatogramok

A **fluorometriás detektorok** igen érzékeny és szelektív érzékelők, melyek az elválasztott komponensek UV sugárzással keltett fluoreszcens sugárzását mérik. A fluoreszkáló vegyületek nagy részét származékképzéssel állítják elő. Többnyire biológiai eredetű minták esetén használják.

Az egyre gyakrabban alkalmazott **diódasoros detektorok** nem tartalmaznak mozgó alkatrészt, egyidejűleg képesek felvenni a szétválasztott minta teljes elnyelési spektrumát.

A legújabb fejlesztésű HPLC-ben az ún. **LC-MS detektálást** alkalmazzák, ami a GC-MS-hez hasonlóan a minta ionizációjából és tömegszám szerinti szétválogatásból áll.

A detektor jelét megfelelő erősítés után egy A/D konverter alakítja át digitális jellé, amelyet általában számítógépes integrátor követ. Az integrátor által felvett kromatogram hasonló a korábbiakban már megismerthez (5.25. ábra). A kromatogramok kiértékelése a gázkromatogramokéhoz hasonló. A minta minőségi azonosítását a retencióidő alapján, a mennyiségi meghatározást a csúcs alatti területből számolhatjuk ki.

Kérdések, feladatok

1. Milyen szerkezeti elemekből épül föl egy folyadékkromatográf?
2. Hogyan működik a HPLC-ben alkalmazott bemérőcsap? Hogyan biztosítható a minta eluensáramba való pontos és pillanatszerű bejuttatása?
3. Milyen kromatográfiai oszloptölteteket ismerünk?
4. Mi az előnye a HPLC alkalmazásának a gázkromatográfiával szemben?
5. 11,3 mg koleszterintartalmú standardoldatot készítünk, hozzámérve 12,0 mg 5- α -kolesztán belső standardot. Beinjektálva a koleszterinre 635, a belső standardra 1009 területegységet kapunk. Ezután a belső standardot is tartalmazó ismeretlen injektáljuk be. A koleszterin retencióidőjénél megjelenő csúcs területe 990, a belső standardé 1031 területegység. Mennyi az ismeretlen minta koleszterintartalma? (17,24 mg)