

NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA

A GYAKORLAT CÉLJA: A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) módszerének tanulmányozása és alkalmazása egyes aromás vegyületek mennyiségi és minőségi analizisére vizes oldatban.

A MÉRÉSI MÓDSZER ELVE

A műszeres analízis kromatográfias módszereinek feladata, hogy a minta komponenseit – legtöbbször szerves vegyületeket – egymástól elválassza. A módszer működésének alapja az, hogy a mozgófázisba (amely gáz vagy folyadék lehet) kevert mintaelegyet szoros kontaktusba hozzuk egy azzal nem elegyedő másik fázissal, amelyet állófázisnak hívunk (egy lapra felvitt, vagy cső belsejében rögzített folyadék vagy szilárd halmazállapotú anyag). A mozgófázist (eluens) állandóan mozgásban tartva a mintaelegy komponensei az állófázissal való kölcsönhatásuk különböző mértéke miatt megfelelő kontaktidő után elkülönülnek egymástól. Amennyiben a rendszerben egy detektort helyezünk el, amely a mintakomponenseket képes megkülönböztetni a minta oldószerétől (pl. képzeljünk el egy vezetőképességi detektort annak a csőnek a kifolyó végére szerelve, amely az állófázist magában foglalja), akkor a detektorjel idő függvényében való ábrázolásakor a mintakomponenseket reprezentáló csúcissorozatot fogunk észlelni. Ezt a grafikont hívjuk kromatogramnak, a berendezést pedig kromatográfnak.

A kromatográfias módszereknek igen sokféle változata alakult ki, amelyek több szempont szerint is csoportosíthatók. Az egyik csoportosítás alapja, hogy az állófázis milyen kivitelezésű: ha az állófázist egy cső (oszlop, kolonna) belsejében helyezük el töltésként, vagy a cső belső falát vonjuk be azzal filmszerűen, akkor oszlopkromatográfiaról beszélünk, szemben a sík kivitelezésű állófázist alkalmazó planáris kromatográfiaval. A gyakorlatban az oszlopkromatográfias módszerek túlnyomó többségben vannak. Egy másik szempont lehet, hogy a mintakomponensek és az állófázis között kialakuló kölcsönhatás természete milyen: ez lehet adszorpción, megoszláson, ioncsere egyensúlyon, stb. alapuló; ekkor rendre adszorpció, stb. kromatográfia-ról beszélünk. Egy további csoportosítás szerint a mozgófázis halmazállapotát tekintjük: eszerint folyadékkromatográfiat (liquid chromatography, LC) és gázkromatográfiat (gas chromatography, GC) különböztetünk meg.

A kromatográfias módszerek nagy előnye, hogy a mérési körülmények (az álló és mozgófázis minőségének és összetételének) alkalmas megválasztásával ezek a módszerek az elválasztandó komponensek igen széles körére alkalmazhatóak. Megfelelően érzékeny detektor alkalmazásával pedig akár nyomnyi mennyiségű szerves vegyületek jelenléte is kimutatható vagy azok mennyisége meghatározható. Az is fontos tény, hogy a kromatográfok

nemcsak kis anyagmennyiségek kezelésére, analitikai célokra, hanem nagy méretben, kimondottan az egyes szétválasztott komponensek összegyűjtése céljából is építhetők (preparatív kromatográf).

A kromatogramról leolvasható egyik legfontosabb adat az egyes kromatográfias csúcsokhoz tartozó retenciós idő (= visszatartási idő, t_r), amely a mintának a mozgófázisba juttatásától a komponens detektor által mért maximális koncentrációjának (a megfelelő csúcs maximális értékének) a megjelenéséig eltelt idő. A retenció minden komponensre (minden kromatográfias csúcsra) más és más, így a komponens anyagi minőségével függ össze. A retenciós időt azonban ritkán használjuk az anyagi minőség megállapítására, hiszen az magában foglalja azt az időt is, amely a mozgófázisnak a kromatográfion való áthaladásához szükséges (holtidő, t_m). Leggyakrabban ezért a retenciós idő és a holtidő különbségét képezzük, és az így kapott redukált retenciós időt:

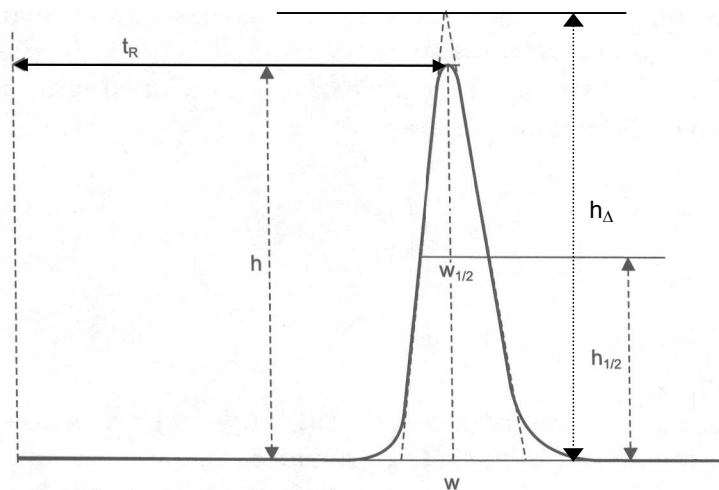
$$t'_r = t_r - t_m$$

vagy másképpen nettó retenciós időt használjuk az analízis során. A holtidő megállapítása például úgy lehetséges, hogy a mintánkhöz beadagolás előtt egy olyan komponenst adunk, amely a kolonnán nem kötődik meg, a detektorban azonban jelet szolgáltat (pl. poláris anyagok elválasztására szolgáló kolonna esetében egy apoláris komponenst), ennek a komponensnek a retenciós ideje közelítőleg a holtidővel egyenlő.

A kromatográfias módszerek – elsősorban az alkalmazott oszlop – jellemzésére egyik leggyakrabban használt paraméter az elméleti tányérszám (N). A desztillációnál és extrakciónál használt ún. tányérelmélet alkalmazásával (ez az elmélet a desztillációs tornyokban ténylegesen meglévő szedőtányérokon lejátszódó folyamatokkal foglalkozik) és a kromatogram csúcsait a Gauss (normális) eloszlást követőnek feltételezve, a csúcs könnyen mérhető adatai alapján az elméleti tányérszámra a következő definíciós képlet adódik:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

ahol W a csúcs talpszélessége, $W_{1/2}$ pedig a csúcs félértékszélessége (**1. ábra**). Minél nagyobb N értéke egy adott kromatográfias módszerre nézve, annál hatékonyabb az elválasztás, vagyis pl. adott idő alatt annál több komponenst tudunk elválasztani vagy másképpen két csúcs annál jobban elkülönül egymástól.



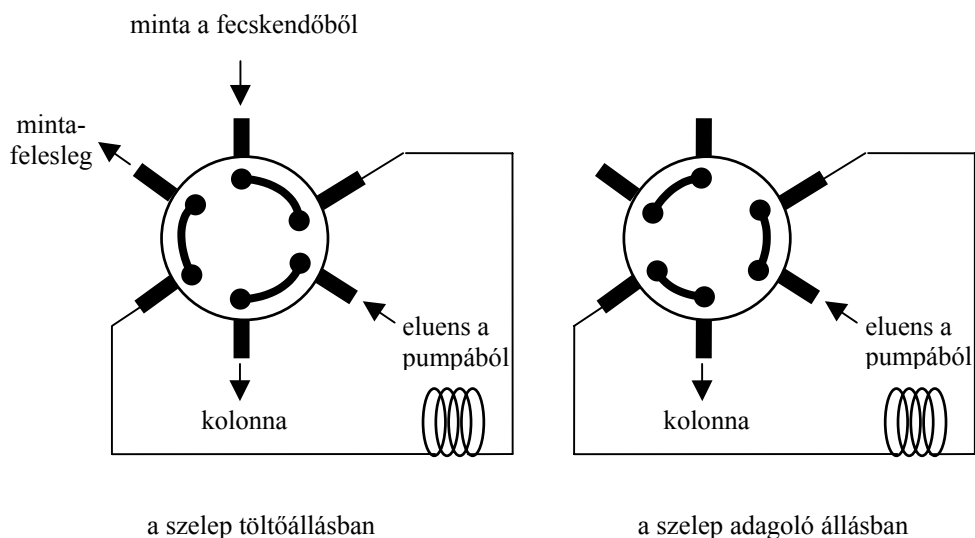
1. ábra. A kromatográfiás csúcsok néhány alapadata

A kromatogramban található információ minőségi analízisre is használható. A legegyszerűbb módszer egy adott kromatográfiás rendszeren mért redukált retenciók összehasonlítása ugyanazon a rendszeren mért ismert anyagok redukált retenciók időivel. Ez az összehasonlítás azonban nyilván nagyon hosszadalmas, különösen ha nem rendelkezünk semmilyen előzetes információval a minta összetevőiről. Ilyenkor ugyanis komoly bizonytalanságot okoz az azonosításban, hogy sokféle anyag adhat közeli retenció idejű csúcsokat, amelyek a meghatározás körülményei mellett könnyen azonosnak tűnhetnek. Megbízhatóbbá tehetjük az ilyen összehasonlításon alapuló minőségi analízist, ha az összehasonlítást két különböző állófázist tartalmazó kolonnán is elvégezzük. A legmegbízhatóbb eljárás azonban egyértelműen az, amikor a kromatográfot szelektív detektorral látjuk el (pl. tömegspektrométer), ilyenkor ugyanis a detektor összetett, az adott komponens anyagi minőségére jellemző jelet (spektrum) szolgáltat. Az ilyen detektorokkal az átfedő kromatográfiás csúcsokat adó komponensek is kellő biztonsággal azonosíthatók.

A kromatográfiás mennyiségi analízis alapja a csúcsok területének (keskeny és hegyes csúcsok esetén a csúcsmagasság) arányossága a koncentrációval. Ismert koncentrációjú mintasorozat mérésével kalibrálva, vagyis kalibrációs görbe felvétele után az ismeretlen koncentrációja a görbéről visszaolvasva meghatározható. A csúcsterületek meghatározása régebben vonalzó használatával manuálisan történt, ma azonban szinte kizárólag elektronikus integrátorokkal illetve számítógépes adatgyűjtő programok segítségével történik. A manuális kiértékelés alapjául a **1. ábrán** is látható adatok szolgálhatnak; a csúcs alatti területet a félértékszélesség alapján téglalappal ($W_{1/2} \cdot h$), vagy a csúcs oldalaihoz érintő egyenesek behúzásával, majd az így kialakuló háromszöggel ($h_{\Delta} \cdot W / 2$) közelíthetjük.

A folyadékkromatográfia ma elterjedten alkalmazott változata a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). A HPLC technika nagy hatékonyságú és igen gyors analíziseket tesz lehetővé: akár tucatnyi komponens is elválasztható egy perc alatt. A hatékonyság növelését a speciális megosztófázisok alkalmazása mellett igen apró szemcseméretű – és így nagy fajlagos felületű – töltetek készítésével érték el. Az apró töltet szemcsék azonban igen tömören helyezkednek el a kolonnában, ami jelentősen megnöveli annak áramlási ellenállását. Ennek következtében a mozgófázis áramoltatása csak nagy (100-500 bar, vagyis 10^7 Pa

nagyságrendű) nyomással, különleges szerkezeti anyagból készülő és kémiaileg ellenálló, költséges dugattyús folyadékpumpákkal lehetséges. A nagy nyomáson való működés további követelményeket támaszt a felhasznált folyadékokkal és a mintaadagolóval szemben is. Az eluens és a minta sem oldott gázokat, sem apró szemcsés szennyeződések nem tartalmazhat; az előbbieket a detektorban felszabadulva a jel pulzálását idézhetik elő, míg az utóbbiak a töltésszemcsék közötti, mikrométernél kisebb járatokat eltömítik. Így az eluenseket és a mintát 0,2-0,45 µm-es pórusméretű szűrőn való vákuumszűréssel és az eluens esetében még ultrahangos kirázással szokás előkészíteni a használatra. A tipikusan 5-100 µL térfogatú minták beadagolása csak speciális segédeszközzel, adagolószeleppel (2. ábra) történhet.



2. ábra. Egy hatutas HPLC adagolószelep működése

Ezek az adagolók két, egymáshoz szorosan illeszkedő, elfordítható korongot tartalmaznak, amelyek közül az elülsőn három vékony vajat formájában két-két szomszédos bemeneti nyílást összekötő csatorna található. A szelep elülső korongjának egy külső karral 60°-al való elfordítása hatására ezen vajakok más belső összekötést valósítanak meg. Töltőállásban a mintaoldat egy mikroliterfecskendővel (ez a fecskendő a gázkromatográfiában használatossal ellentétben nem hegyes, hanem tompa végű!) juttatható be a fecskendőnyíláson át. A feleslegben beadagolt oldat megtölti és átöblíti a rögzített térfogatú mintahurkot, miközben a pumpa tiszta eluents pumpál a kolonnára. A szelep adagoló állásba helyezésekor a belső vajakok elcsúszása révén az áramlási viszonyok úgy változnak meg, hogy ekkor a pumpált eluensáramlás kimossa a mintahurok tartalmát, rájuttatva azt a kolonnára.

A HPLC kolonnák többnyire 1-4 mm belső átmérőjű, 10-30 cm hosszúságú acélcsővek, amelynek töltete apró szemcséjű (2-40 µm) porózus hordozóból és annak felületén kötött megosztófolyadékból áll. Azt, hogy az elkészült kolonna milyen komponensek hatékony elválasztására lesz alkalmas, a kapcsolt megosztófolyadék kémiai tulajdonságai döntenek el: pl. fenilcsoportok aromás vegyületek elválasztására, királis funkció csoportok az optikailag aktív komponensek elválasztására alkalmas különösen. Az igen elterjedt ún. C-18 kolonnákban a hordozó felületéhez oktadecil-csoportok kapcsolódnak. Természetesen az eluensösszetétel is nagyban befolyásolja az elválasztás eredményességét. Normálfázisú

kromatográfiánál az állófázis poláros, míg a mozgófázis apoláros jellegű; ilyenkor a poláros komponensek jobban kötődnek az állófázishoz, vagyis nagyobb retenciós idejű csúcsokat fognak produkálni, ez az összeállítás tehát a poláros komponensek elválasztásának kedvez. Fordított fázisú kromatográfia esetében ez éppen fordítva van, az állófázis apoláros (pl. C-18 csoportokat tartalmaz) és a mozgófázis poláros (pl. víz-metanol elegy); ilyen körülmények mellett az apoláros komponensek, pl. aromás szénhidrogének választhatók el jól.

A HPLC módszer elterjedésében széleskörű alkalmazhatósága mellett nagy szerep jutott a sokoldalú és érzékeny detektoroknak is. Az egyik gyakori detektor a spektrofotometriás detektor, amely lényegében egy vékony kapillárisból kialakított, állandó mikroküvetés (kb. 10 µL térfogat és tipikusan 10 mm optikai úthossz) spektrofotométernak tekinthető. Mivel nem minden mintakomponens ugyanazon a hullámhosszon abszorbeálja a látható vagy ultraibolya fényt, ezért a mai modern spektrofotometriás detektorokban a mérési hullámhossz programozható az eltelt analízisidő függvényében (minden egyes kolonnáról leérkező komponens méréséhez más-más hullámhossz programozható be). A legújabb spektrofotometriás, ún. diódasoros detektorok a mintakomponens teljes abszorpciós spektrumát felveszik, ami az ismeretlen komponensek azonosítását is nagymértékben megkönnyíti. A spektrofotometriás detektor sokoldalú, érzékeny detektor; segítségével akár 0,01 ng mintamennyiség is kimutatható. A törésmutató különbségi detektor szintén elterjedt. Ez a HPLC detektor a kolonnát elhagyó és a mintakomponenseket tartalmazó eluens optikai törésmutatóját hasonlítja össze a tiszta eluensével. Ennek a detektornak a kimutatási képessége gyengébb, mint a spektrofotometriásé (kb. 1 ng), azonban előnye, hogy majdnem minden szerves vegyület kimutatására használható. Az említett két típuson kívül más detektorok (pl. fluoreszcenciás, elektrokémiai, tömegspektrometriás, stb.) vagy azok kombinációja is használható a HPLC berendezésekben.

SZÜKSÉGES ANYAGOK, ESZKÖZÖK ÉS MŰSZEREK

Ismert koncentrációjú m-krezol, metil-benzoát, naftalin és toluol elegy
75:25 vagy 80:20 metanol-víz elegy ultrahanggal gáztalanítva (eluens)

5 db 5 cm³-es mérőlombik (a kalibráló oldatok és az ismeretlen oldat számára)
1 db műanyag testű fecskendő (a mérőlombikok jelre töltéséhez)
1 db 100 µL-es precíziós HPLC fecskendő (a minta adagolószelepbe juttatásához)
1 db 5 cm³-es osztott pipetta (a kalibráló sor készítéséhez)
2 db nagyobb főzőpohár vagy Erlenmeyer lombik (hulladékgyűjtő edény)
1 db pipettázó labda
papírkendő

Biotronik BT8200 HPLC UV-Vis detektor
Biotronik BT8100 HPLC izokratikus pumpa adagolószeleppel és C-18 kolonnával
Számítógépes adatgyűjtő hardver és szoftver

AZ ELVÉGZENDŐ FELADATOK ÉS A FELHASZNÁLANDÓ MŰSZEREK LEÍRÁSA

A kromatográf üzembeállítása. A HPLC berendezések precíziós, viszonylag kényes és drága berendezések, ezért használatuk során nagy körültekintéssel járjon el. Ha bizonytalan valamiben, kérjen tanácsot a gyakorlatvezetőtől!

Mindenekelőtt ellenőrizze, hogy az eluens (metanol-víz elegy) tároló tartályában a méréshez elegendő (legalább 300-500 mL) folyadék van és az edényt a pumpával összekötő cső leér a folyadékedény aljára. Az átlátszó összekötő műanyag csőben nem szabad buboréknak lennie. Kapcsolja be a pumpát, a detektort és a számítógépet azok hálózati főkapcsolóival. A számítógép adatgyűjtő interfésze (kisméretű fekete doboz, amely szalagkábelrel csatlakozik a számítógéphez) bemenetének a detektor rekorderkimenetéhez kell kapcsolódnia annak hátlapján, és az adatgyűjtő tápegységét is be kell dugni a hálózatba (kis piros lámpa jelzi a tápegység működését).

A pumpa és detektor ekkor diagnosztikai rutinokat kezd el futtatni, melynek végeztével mérőkész állapotba kerülnek. Mindkét egység esetében a „**Parameter**” gomb megnyomásával értelemszerűen a képernyőn végig léptethetjük az összes fontosabb, beállítható készülékparamétert. Ha a beállítani kívánt paraméter a képernyőn van, akkor az „**Edit/Enter**” billentyű megnyomásával szerkeszthetjük azt (a szerkeszthetőséget a paraméter villogása jelzi). A paraméter értékének módosítása ilyenkor a „**↑**” és „**↓**” billentyűk használatával lehetséges. Az „**Edit/Enter**” billentyű újbóli megnyomása rögzíti a beállított paraméterértéket és továbblép a következőre. Ellenőrizze, hogy a következő értékek vannak beállítva a pumpán: „**Flow: 0.8 ml/min**” (áramlási sebesség), „**Pmax: 300 kg/cm²**” (az üzemi nyomás felső határa), „**Pmin: 10 kg/cm²**” (az üzemi nyomás alsó határa). A detektoron: „**Range: 0.02**” (mérés határ), „**Lambda: 254 nm**” (ez a mérési hullámhossz; 254 nm-en a jelen gyakorlaton mérendő mindegyik aromás vegyület abszorbeál), „**Response: STD**” (a megfelelő mérési üzemmód), „**Lamp: D2 On**” (azt jelenti: a fényforrás bekapcsolva). Természetesen a pumpán látható „**Pressure**” paraméter értéke a mindenkori aktuális folyadéknyomás, az „**ABS**” paraméter értéke pedig a pillanatnyi abszorbancia. Érdemes megjegyezni, hogy „**Range**” jelentése lényegében a mérés során várt legnagyobb abszorbancia-értékkel egyezik meg. Ez a detektor által a számítógép felé küldött feszültségjel nagyságát szabja meg: ha ezt tehát kisebbre állítjuk, akkor nagyobbak lesznek a csúcsok a számítógép képernyőjén (ez természetesen a számítógép beállításaitól is függ). A pumpa „**Pump**” feliratú gombjával indítsuk meg az eluens áramlását is - 15-30 perc stabilizálódási időre mind a pumpának, mind a detektornak szüksége van. Kövesse végig az eluenstartálytól a hulladékedényig a folyadék áramlásának útját, és ellenőrizze hogy az akadálytalanul, egyenletes ütemben csepeg ki.

Mintaelőkészítés. A meghatározandó vegyületek mindegyikét tartalmazó ismert koncentrációjú törzsoldat felhasználásával készítsen kalibráló oldatsorozatot a kiadott négy darab 5 cm³-es mérőlombikba. Ügyeljen arra, hogy a lombikok előzetes átöblítését a csiszoldtugós lombikban kiadott eluenssel (metanol/víz elegy) végezze. Az oldatsorozat elkészítésekor 1, 2, 3 és 4 cm³ törzsoldatot mérjen be labdás pipettával (**az aromás vegyületek mérgezők!**) a lombikokba, és töltsen jelre azokat az eluenssel. A jelre állításhoz a mellékelt műanyag fecskendő használhatja, és a lombikok tartalmát alaposan rázza össze. Az ismeretlen mintát lombikban fogja megkapni, amelyet hasonlóan jelre kell töltenie eluenssel.

Az oldatok kezelésénél gyorsan dolgozzon a párolgási veszteség minimalizálása érdekében - ezért megengedett most a törzsoldatos lombikból való közvetlen pipettázás is.

A számítógépes adatgyűjtő használata. A mérési adatok gyűjtését és kiértékelését számítógéppel, egy „*Digitális rekorder*” nevű program segítségével fogja végezni, amely egy ún. analóg/digitális átalakító egység (8-csatornás mérésadatgyűjtő) révén fogadja a kromatográfiás detektor jelét. A program a számítógép bekapcsolása után automatikusan elindul. A szoftver használata egyszerű: a képernyő alsó sorában olvasható a kiadható parancsok listája az aktiváló billentyűk nevével - pl. a „**Súgó**” (F1 gomb) röviden összefoglalja a program főbb funkcióit. Az alapkoncepció az, hogy az „**Opciók**” (F4 gomb) menüben beállítjuk az adatgyűjtés körülményeit (pl. adatgyűjtési sebesség, adatgyűjtési időtartam, stb.), majd a „**Mérés**” (F5 gomb) parancs kiadásával megkezdődik a mérés: a mért adatok mind számszerűen, mind grafikusan nyomonkövethetők. Az adatgyűjtés az „**Esc**” billentyű megnyomására vagy az előre beállított időtartam elteltével fejeződik be. Ekkor a „**Kiértékelés**” (F6 gomb) parancsot kiadva részleteiben is megtekinthetjük a rögzített kromatogramot, és két kurzor mozgásával a kromatogram egyes részeit integrálhatjuk, csúcsmagasságokat és retenciós időket olvashatunk le. A mért adatok lemezen is tárolhatók (ASCII formátum), illetve azok visszatölthetők a programba. Ha a mért adatokat el szeretné tárolni, akkor minden egyes kromatogram felvétele után ne felejtse el az „**Opciók**” menüpont alatt beállítani a kívánt mentési útvonalat és fájlnevet (a könyvtárnevek és a fájlnev 8 karakterből és 3 karakteres kiterjesztésből állhatnak!), majd kiadni a főmenüből a „**Mentés**” parancsot. Ne feledje, hogy az adatok nem automatikusan mentődnek, csak ha azt a leírt módon manuálisan kéri, továbbá hogy azonos fájlnev esetén a korábbi adatok felülíródnak! Az adatokat mentheti floppy lemezre is, így az adatok átvitele egy másik számítógépre egyszerűbb. A program alapbeállításai megfelelőek a végrehajtandó gyakorlathoz, azonban a következő kritikus paraméterek beállításairól feltétlenül győződjön meg („**Opciók**”): „Portcím: 888”, „Adatgyűjtési sebesség: 4 Hz”, „Adatgyűjtés időtartama: 900 s”, „Kell-e kiigazítani az adatokat: igen”. A kromatogram kiértékelése során a jobb és baloldali kurzorral a kívánt csúcsot közre kell fogni (a „**TAB**” billentyűvel mindig válthatunk kis és nagy lépésközű kurzormozgatás között); ekkor a csúcs területét az „**Int korr**” (alapvonallal korrigált integrál) paraméter kijelzett értéke, míg retenciós idejét az „**Xmax**” értéke adja meg. A képernyő bal felső sarkában mindig a kurzorok helyének X és Y koordinátáit látja - ezeket az adatokat használhatja pl. a csúcsok félértékszelességének megállapításához. A program használatával ismerkedjen meg alaposan, mivel azzal más gyakorlatoknál is találkozni fog.

A kiadott minta mennyiségi és minőségi analízise. A kromatografálandó mintákat folyadékromatográfiás fecskendővel juttatja majd be a hatutas adagoló szelepbe. Mindenképpen fontos megjegyeznie, hogy itt **nem használhat hegyes végű fecskendőt a mintabevitelhez!** A precíziós dugattyús üvegtestű fecskendőt mindig alaposan öblítse át a mérendő oldat több részletével. Levegőbuborékok beadagolását mindenképpen kerülje el, ezért a mintaoldatot mindig lassan szívja fel. Ha a fecskendőben mégis lát buborékot, azt pöcköléssel juttassa a fecskendő legfelső részébe, és a beadagoláskor a dugattyút csak addig nyomja előre, hogy a buborék már ne jusson be az adagoló szelepbe. Minta beadagolása az adagoló szelepbe annak „**Load**” állásában lehetséges; az erre szolgáló nyílásba szűrje be a fecskendőt és *lassan* tolja előre ütközésig. A fecskendő térfogata (100 µL) a mintahurok

térfogatának (20 µL) többszöröse, a teljes fecskendőtartalom beadagolása nemcsak megtölti, hanem át is öblíti a mintahurkot. A fecskendőt célszerű a mérés idejére a szelepben hagynia.

A kromatográf bemelegedése, beállítása és a számítógépes adatgyűjtő program beállítása után először a legkisebb koncentrációjú kalibráló oldatot fecskendezze be az adagolószelepbe. Indítsa el a számítógépes adatgyűjtést, majd gyorsan, határozott mozdulattal fordítsa át az adagolószelep karját „Inject” állásba - ezzel a mérés elindult. Egy minta futási ideje nem több, mint 15 perc. Ez az idő az eluens összetételétől is függ; ha az első mérések során úgy találja, hogy jelentősen rövidebb idő alatt lejön az összes csúcs, akkor az adatgyűjtő programban a mérési időt csökkentheti. Értékelje ki a felvett kromatogramot, vagy mentse el a mérési adatokat gondosan, hogy azokat a mérési sorozat végén, később kiértékelhesse. Minden csúcs retenciós idejét, korrigált területét és talpszélességét (vagy félértékszélességét) kell leolvasnia. Az egyes csúcsok azonosítása a retenció alapján lehetséges: az elúciós sorrendet a vizsgált komponensek poláros jellege szabja meg (először a legpolárisabb komponens jön le az oszlopról). Az első kromatogram felvétele után az adagolószelepet forgassa ismét határozott mozdulattal, ütközésig a „Load” állásba, adagolja be és mérje meg a következő kalibráló oldatot, stb., végül az ismeretlen oldatot is mérje meg kétszer. Az új minták beadagolásával mindig várja meg, amíg az összes komponens „lejött az oszlopról”!

Feladata a retenciós idők egyezése alapján megállapítani az ismeretlen oldat minőségi és mennyiségi összetételét. A mennyiségi analízishez milliméterpapíron vagy számítógépen szerkesztett kalibrációs görbéket (egyeneseket) kell felvennie minden komponensre külön - ezek az adott komponens csúcsterületét ábrázolják a koncentráció függvényében.

BENYÚJTANDÓ ADATOK, EREDMÉNYEK

- Egy kalibrációs oldat kromatogramja kinyomtatva, csúcsazonosító feliratokkal ellátva
- A kromatográfias csúcsok összes mért adatának táblázata
- Négy külön kalibrációs grafikon a négy kalibrált komponensre
- Az ismeretlen minta minőségi összetétele
- Az ismeretlen minta mennyiségi (mg/L) összetétele

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK ÖNÁLLÓ FELKÉSZÜLÉSHEZ

1. Mi a kromatográfias módszerek működésének alapja?
2. Hogyan csoportosítjuk a kromatográfias módszereket?
3. Milyen folyadékromatográfias detektortípusokat ismer és mi azok működési elve?
4. Mi hordozza a mennyiségi és minőségi analitikai információt egy kromatogramban?
5. Mit nevezünk holtidőnek illetve redukált retenciós időnek?
6. Mit értünk a homológ sorok módszerén a kromatográfias minőségi analízisben?
7. Hogyan működik a hatutas adagolószelep?
8. Mit értünk fordított fázisú és normálfázisú kromatográfián?
9. A toluol vagy a m-krezol retenciós ideje lesz kisebb fordított fázisú HPLC mérés esetén?

10. Legalább mekkora a felbontása egy adott kromatográfiás eljárásnak, ha tudjuk, hogy a kromatogramon szomszédos 10 és 10,5 perc retenció idejű két csúcs átfedése kisebb, mint átlagmagasságuk 5%-a?
(a helyes megoldás: 20,5)