

# LABORLEIRAT A GYORS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA LABORATÓRIUMI GYAKORLATHOZ

(ELVÁLASZTÁSTECHNIKA, AZ ELVÁLASZTÁSTECHNIKA KORSZERŰ MÓDSZEREI C.  
TÁRGYAKHOZ)

A laborleirat „A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai” c. könyv (Fekete J., Kormány R.,  
Fekete Sz., 2014) kivonata, melyet ajánlott irodalomként jelölünk meg.

A leirat kiegészítésként szolgál az Analitikai Kémia 1. tárgyon belül oktatott HPLC  
laboratóriumi gyakorlat leiratához:

<http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/anal/MSc-Elvalasztastechnika/Az-elvalasztastechnika-korszeru-modeszerei/HPLC%20laborleirat.pdf>

## Tartalom:

Követelmények.....	2
A gyors folyadékkromatográfia jelentősége .....	2
A szemcseméret, hatékonyság, kolonnaméret és mérési idő összefüggései .....	3
A kolonnán kívüli zónaszélesedés jelentősége .....	5
A gyors folyadékkromatográfia gyakorlat során elvégzendő feladatok .....	7

## Követelmények

A leirat célja, hogy a gyors folyadékkromatográfias gyakorlat elvégzéséhez, a gyakorlat megértéséhez szükséges alapokat megszerezze. Készítésekor nem törekedtünk az elméleti alapok részletes magyarázatára. Az elméleti háttér részletes magyarázata megtalálható a következő tankönyvekben: Dr. Fekete Jenő: Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata, Edison House Kft., Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs: A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai, Merck Kft. A gyakorlat elvégzése az 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 mindkét (jelen leirat és a címlapon található link alatt elérhető leirat) 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 csoportosan jegyzőkönyvet készítenek. A jegyzőkönyv akkor fogadható el, ha a gyakorlat során egyeztetett módon, tömören és egyértelműen tartalmazza azokat az információkat, amely alapján a méréseket és szimulációkat 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 jegyzetfüzetet!

### 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 gyors folyadékkromatográfia jelentősége

Az 1990-es évekre a gyógyszeriparban az egyik legfontosabb analitikai mérés technika a folyadékkromatográfia lett. A folyadékkromatográfia fejlődését a hőérzékeny, protonfunkciót tartalmazó gyógyszervegyületek vizsgálhatósága és a szigorú iparági szabályozás miatt végrehajtott nagyszámú mérés elvégzése hajtotta. A 2000-es évekig nem történt sok fejlődés. Természetesen elterjedtek a nagytisztaságú, szabályos alakú, 3-5  $\mu\text{m}$  szemcseátmérőjű töltetek, valamint fejlődött a rendszerek vezérlése és adatfeldolgozása. Megnőtt az igény a korábban 5-60 perces analízisidők csökkentésére. Mint látni fogjuk,

ennek több útja van. A szemcseméret csökkentésével növelhető a kinetikai hatékonyság. A megnövekedett hatékonyság lehetővé teszi rövidebb kolonnák alkalmazását, így a mérési idő csökkentését. A csökkentett szemcseméret azonban nagy nyomásnövekedést okoz, amelyet figyelembe kell venni mind a készülék, mind a kolonna szerkezeti kialakításában. Az ultranagy hatékonyságot elérő töltetek csak a megfelelő készülékekkel üzemeltethetők, különben a kolonnán kívüli térfogatok lerontják a kinetikai hatékonyságot, miközben a nyomásesés nagy marad, ez pedig limitálja az elérhető mérési időt.

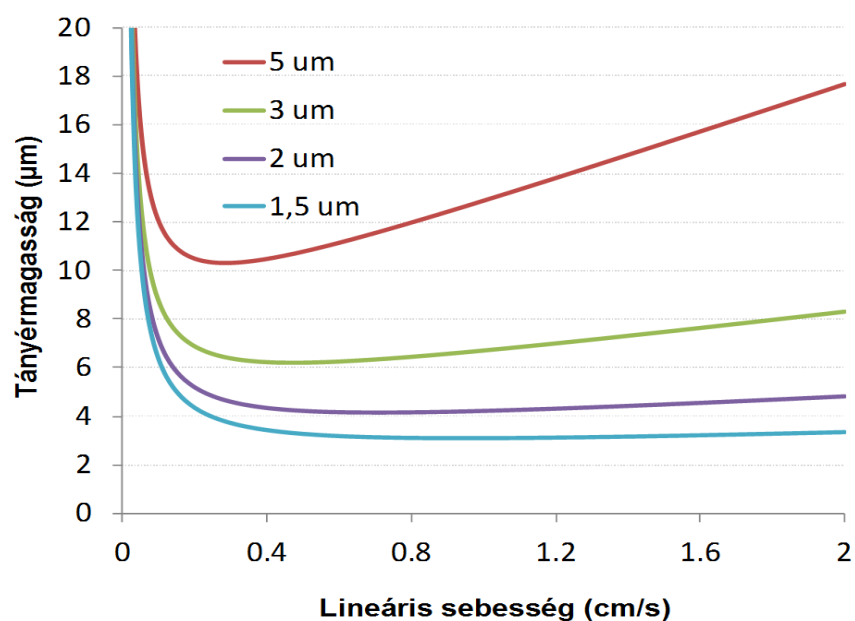
Összefoglalva a gyors folyadékkromatográfia (UHPLC) alapvetően különbözik a HPLC-től:

- a készülékek kialakításában (kolonnán kívüli térfogatok, nyomástűrés, stb.)
- a szemcsék kialakításában (2-3 $\mu\text{m}$  alatti szemcsék, héjszerű töltetek, monolitik-utóbbiakról bővebb tárgyalást az ajánlott irodalom tartalmaz)
- a kolonnák méretében (kolonnahossz és kolonnaátmérő)
- a felsorolt különbségekből adódó hatékonyságban, így elérhető mérési időben.

Végső soron a HPLC-n kidolgozott mérési módszerek ideje UHPLC körülmények között 5-10-edére csökkenthető.

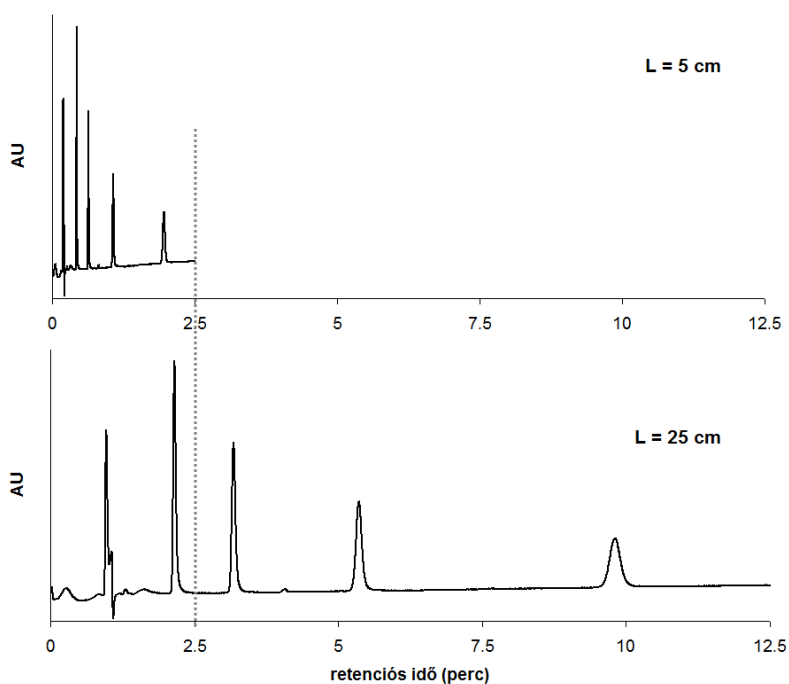
## A szemcseméret, hatékonyság, kolonnaméret és mérési idő összefüggései

Az 1. ábrán a szemcseméret csökkentéséből eredő különböző lefutású Van Deemter görbéket láthatjuk.



1. ábra. Az elméleti tányérmagasság változása a lineáris áramlási sebességekkel különböző szemcseátmérőjű töltetknél.

A kisebb szemcsék anyagátadási ellenállása (C-tag) kisebb, mert pórusaikban a diffúziós úthosszak rövidebbek. A kis szemcseátmérő kedvez a homogénebb áramlási csatornák kialakulásának a töltetágyban, így az örvénydiffúziós tag is csökken (A-tag). A C-tag csökkenésének köszönhetően a görbék minimumai nagyobb lineáris áramlási sebesség tartományokban találhatóak. Eszerint a kis szemcsék magasabb áramlási sebességek mellett üzemeltethetők hatékonyabban. Ez kedvező a mérési idő szempontjából. Figyeljük meg, hogy a 2  $\mu\text{m}$ -es szemcse  $H_{\text{min}}$  értéke kb. 4  $\mu\text{m}$ , míg az 5  $\mu\text{m}$ -es szemcse  $H_{\text{min}}$  értéke kb. 10  $\mu\text{m}$ . Ez annyit jelent, hogy  $N=L/H$  értelmében ugyanaz a kinetikai hatékonyság érhető el, ha 5  $\mu\text{m}$ -es szemcsékkel töltve 2,5-ször olyan hosszú kolonnát használunk, mint 2  $\mu\text{m}$ -es szemcsék esetében. Tehát a szemcseméret csökkentésével arányosan csökkenthető a kolonnahossz, míg a hatékonyság változatlan marad. Ne feledkezzünk meg a kis szemcsék esetében nagyobb optimális áramlási sebességről sem! A fenti példát a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra. Az elemzési idő csökkenése a kolonnahossz csökkentésével.

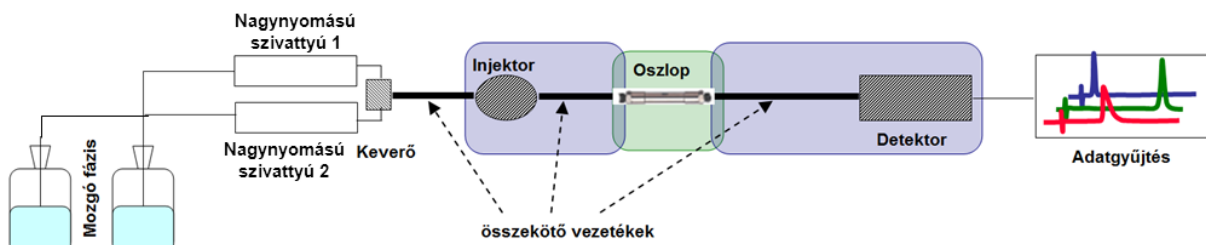
A szemcseméret a Darcy törvény értelmében fordítottan, négyzetes arányban van a kolonnán eső nyomással. Tehát a szemcseméret csökkentésének határt szab a kolonnán ébredő nyomásesés. Ma ez a határ 1,3  $\mu\text{m}$  és 1200-1400 bar körül van. Ilyen körülmények között a nagy nyomás ellenében bevitt áramlási energia hő formájában disszipálódik. Kb. 5-600 bar fölött ez keresztirányú és hosszirányú hőgradiensek kialakulását okozza a kolonnán, mely szélesíti a kromatográfiai zónát.

A jobb hőelvezetés érdekében az UHPLC tölteteket általában 2,1 mm átmérőjű oszlopokba töltik, hiszen ennek fajlagos felülete nagyobb, mint 4,6 mm átmérőjű oszlopoké. Rövidebb, 5 cm-es oszlopok esetében megengedhető a nagyobb belső átmérő, hiszen ezeken a

nyomásesés így a hőfejlődés is kisebb. Minél kisebb a kolonna térfogata, a benne lévő zóna annál kevésbé „hígul fel”, tehát a kis térfogatú kolonnákkal kisebb zónadiszperzió érhető el (ha minden egyéb jellemző azonos). Ez kedvező a kis kimutatási határok elérése céljából.

### A kolonnán kívüli zónaszélesedés jelentősége

A kolonnaméret csökkentésének határt szab az injektálható térfogat és mintamennyiség, amely arányos a kolonnatérfogattal. Az injektálható térfogat kis kolonnák esetében is növelhető, ha a mintaoldószer lényegesen gyengébb, mint a kezdeti mozgófázis (a mintaoldatban  $k$  legyen kb. 10). A kis térfogatú kolonnák továbbá rendkívül érzékenyek lehetnek a kolonnán kívüli térfogatokra, melyek zónaszélesedést okoznak. A zónaszélesítő kolonnán kívüli térfogatok (injektor, összekötő vezetékek, detektorcella, detektor elektronika) a 3. ábra szemlélteti.

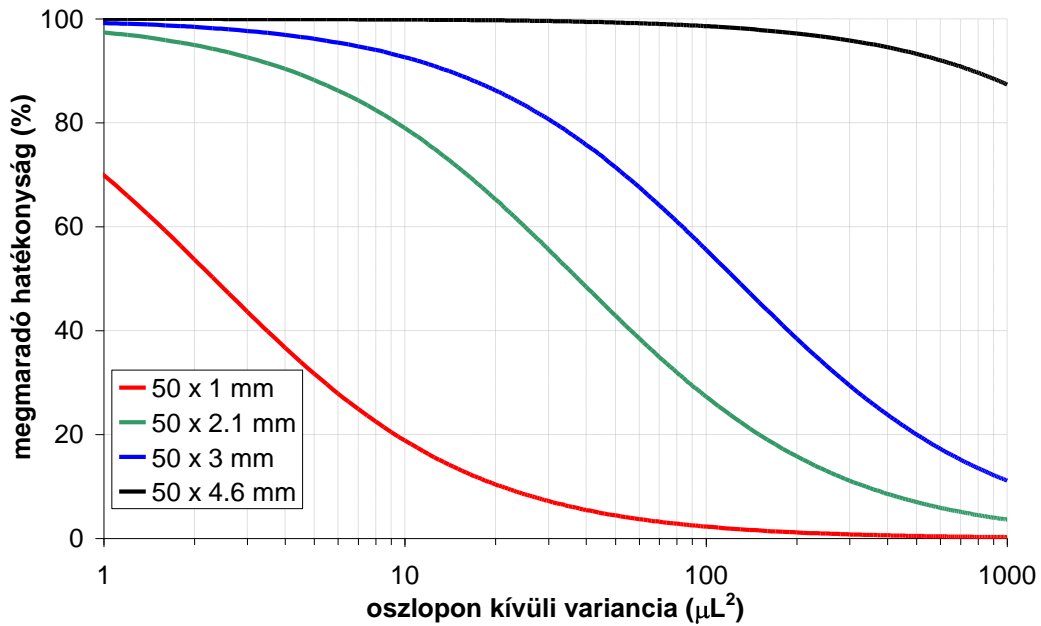


3. ábra. UHPLC rendszer sematikus vázlat, kolonnán kívüli zónaszélesítő térfogatok

Gradiens elválasztások esetén nagy jelentősége lehet a gradiens készletelési térfogatnak, erre itt bővebben nem térünk ki. A kolonnák érzékenységét a rendszerdiszperzióra a megmaradó hatékonysággal ( $E_r$ ) jellemezzük:

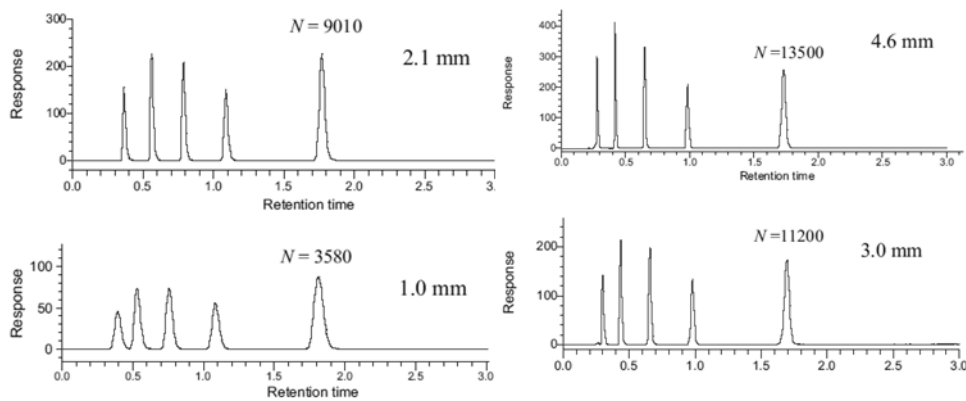
$$E_r = 100 \cdot \frac{\sigma_{col}^2}{\sigma_{col}^2 + \sigma_{ec}^2} \approx \frac{V_0}{V_{ec}}$$

$\sigma_{col}^2$ : kolonna okozta zónadiszperzió,  $\sigma_{ec}^2$ : kolonna kívüli zónadiszperzió. A megmaradó hatékonyság különböző kolonnák esetében a 4. ábra szerint függ a rendszerdiszperziótól:



4. ábra. Megmaradó hatékonyság az oszlopon kívüli variancia függvényében 50 x 4,6, 50 x 3, 50 x 2,1 és 50 x 1 mm kolonna dimenziókra (1,7 μm szemcseátmérő).

Látható, hogy UHPLC ( $\sigma_{ec}^2 < 10\text{-}15 \mu\text{L}^2$ ) rendszereken jól használhatók 2,1-4,6 mm-es belső átmérőjű kolonnák. 4,6 mm-es kolonnák konvencionális HPLC rendszereken is használhatóak. A 4. ábrát kromatográfiás példára fordítva az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra. Látszólagos hatékonyság csökkenés a kolonna átmérő csökkentésével (5 cm-es kolonnák, 1,8 μm szemcseátmérő, UPLC készülék).

Az alábbi összefoglaló 1. táblázat a HPLC és UHPLC közötti különbségeket rendszerezi. Nem várjuk a táblázatban található adatok megtanulását, azonban a köztük lévő reláció megértése szükséges.

	UHPLC	HPLC
Nyomás teljesítmény (bar)	1000 - 1400	400
Kolonna töltet átmérő (µm)	1 - 3	3 - 10
Kolonna hossz (cm)	3 - 10	10 - 25
Kolonna belső átmérő (mm)	1 - 3	3 - 8
Alkalmazott térfogatáram tartomány (mL/perc)	0,02 - 2	0,1 - 10
Injektált térfogat (µL)	0,1 - 5	5 - 200
UV-VIS detektor cella térfogat (µL)	0,5 - 2	5 - 10
Detektor mintavételi frekvencia (Hz)	20 - 100	5 - 20
Gradiens késési térfogat (mL)	0,1 - 0,7	0,5 - 3
Oszlopon kívüli variancia (µL <sup>2</sup> )	1 - 25	40 - 200

1. táblázat: Az UHPLC és HPLC rendszerek/mérések főbb jellemző adatai

## A gyors folyadékkromatográfia gyakorlat során elvégzendő feladatok

A gyakorlat során két csoport fog párhuzamosan dolgozni. Az egyik csoport HS-GC-MS mérést fog végezni, míg a másik számítógépes szimuláció segítségével vizsgálja meg a HPLC/UHPLC közti különbségek hatását (szemcseméret, nyomásesés, mérési idő, hatékonyság, kolonnán kívüli zónaszélesedés). Ezt követően bioaktív anyagok elválasztását végezzük HPLC és UHPLC módszerekkel. A két elválasztás paramétereit ugyancsak összehasonlítjuk, megvizsgáljuk a készülékek felépítésében rejlő különbségeket. 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 csoport 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.