

Alapfogalmak és felhasznált összefüggések

Ebben a rövid összefoglalóban azokat az alapfogalmakat és összefüggéseket adjuk meg, amelyeket a gyors folyadékkromatográfiás ismertetésünkben felhasználunk. A tisztelt olvasó ezekről több tankönyvekben és egyéb szakirodalomban tájékozódhat.

A folyadékkromatográfiás elválasztás alapja

Különböző szerkezeti tulajdonsággal rendelkező anyagok eltérő kölcsönhatást alakítanak ki az állófázissal, amelyet a mozgófázis és a hőmérséklet befolyásol. Az eltérő kölcsönhatás miatt vándorlási sebességük is eltérő lesz, amit a retenciós idők különbsége jelez.

A kromatográfiás elválasztás célja

Hasonló fizikai-kémiai szerkezetű vegyületek elkülönítése és mennyiségük meghatározása.

Folyadékkromatográfiásan vizsgálható anyagok (kromatografálhatóság kémiai kritériuma)

Folyadékkromatográfiásan vizsgálhatók mindazon anyagok, amelyek átalakulás nélkül oldatba vihetők, a detektálás megszabta koncentrációban.

Az elválasztás alapegyenlete

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{r-1}{r} \frac{k}{k+1} \quad (1)$$

ahol:

R_s	felbontás
N	elméleti tányérszám
	szelektivitási tényező
k	komponens visszatartása, kapacitárány

Az elválasztás alapegyenletében szereplő tényező k definíciója

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2)$$

ahol:	t_R	retenciós idő
	W_b	alpvonalon mért csúcshélesség
	$W_{1/2}$	csúcs félmagasságánál mért csúcshélesség

$$r = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{ahol } k_2 > k_1 \quad (3)$$

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \text{ ahol } t_0 \text{ az inert anyag elúciós ideje (holt id)} \quad (4)$$

Javasolt érték az egyes tényez. kre

Általában:

$$\begin{aligned} 1 < k < 10 \\ 2 < k < 5 & \text{ biológiai mintáknál} \\ r > 1,05 & \text{ (} r = 1 \text{ nincs elválasztás)} \\ N > 2000 \\ R_S > 2 \end{aligned}$$

Elúciós módszer

A minta bevitele impulzusszerűen (dugószerűen) történik, a mozgófázis állandóan áramlik az állófázis felett és szorpciója kisebb, mint a legkevésbé szorbeálódó mintakomponensé.

Lineáris elúciós módszer

A kolonnára adagolt minta mennyiségi függvényében a stacioner fázis által adszorbeált anyagmennyiség arányosan változik. A minta adagolása impulzusszerűen történik, a mozgófázis állandóan áramlik az állófázis felett és átlagos szorpciója a legkisebb.

Elméleti tányérmagasság (H)

A kromatográfiás ún. tányérelmélet alapján az a kolonna-szakasz, ahol a mozgó- és állófázis között az egyensúlyi koncentráció kialakul.

Definíciószerűen:

$$N = \frac{L}{H} \text{ ahol } L \text{ a kolonna hossza} \quad (5)$$

Sebességi elmélet és alaptételei

A sebességi elmélet (rate model) a kolonnán létrejövő kromatográfiás zónaszélesítési hatások és a mozgófázis térfogat-áramlási sebessége közötti összefüggéseket tárja fel.

Alapfeltevései:

1. A mozgó- és állófázis között kvázi-egyensúlyi helyzet van.
2. Áramlási sebesség sugárirányú változása miatt örvény-diffúziós hatások érvényesülnek.
3. A kolonnán a hosszirányú diffúzió jelentősen növelheti a kromatográfiás csúcshélesedést.
4. Az anyag átadást mind az álló-, mind a mozgófázisban a diffúzió kontrollálja.

Kromatográfias csúcshéresít hatások összegzéséje (additivitása)

Mivel az egyes kromatográfias csúcshéresít hatások egymástól függetlenek, és ha a kromatográfias csúcsok normális eloszlással közelíthetők, akkor a H -k összege adja meg a kolonna végén mérhető zónaszélesedést. Először van Deemter és kollégái mutatták meg, hogy az elméleti tányérmagasság a lineáris sebesség (u) függvényében egy minimumos görbével írható le

A van Deemter összefüggés

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (6)$$

ahol: A örvény-diffúziós tag
 B hosszirányú diffúziós tag
 C anyagátadási ellenállásra jellemző tag

Ezt az alapegyenletet azóta sokan tovább fejlesztették (Giddings, Knox, Golay, Hubert, Horváth, Myabe, Guiochon, Gritti...), különösen az A tag fizikai értelmezése az, amelyben az egyes megközelítések eltérnek.

Örvény-diffúziós tag

Az eltér áramlási csatornák következtében jelentkező kromatográfias csúcshéresít hatás. Első sorban a töltés minőségét l (rendezettségét l), szemcseátmérő t , a komponens diffúziós állandójától és a mozgófázis sebességét l függ.

Hosszirányú diffúzió

A kolonnára adagolt zóna hosszirányban az idő eltelésével diffúziós úton szélesedik. A diffúzió okozta zónaszélesedés elsősorban a mozgófázisban történik, de nem elhanyagolható az állófázisban sem. Első sorban a mozgófázis sebességét l , a komponens mozgó- és az állófázisban mért diffúziós állandójától, a komponens obstrukciós (ütközési) tulajdonságaitól és visszatartásától függ. Minél nagyobb a komponens visszatartása annál több idő áll rendelkezésre a hosszirányú diffúzió okozta zónaszélesít hatásra.

Anyagátadási ellenállás okozta kromatográfias zónaszélesít hatás

A mozgó- és állófázis között az egyensúly beállása nem pillanatszerű. Minden olyan hatás, amely növeli az egyensúly beállás idejét, kiszélesíti a kromatográfias csúcsot. Ezek a hatások lehetnek:

- diffúzió a póruson belüli álló és mozgó folyadék között
 - kinetikus gátlás az álló- és mozgófázis közötti anyagátmenetnél
- F leg a mozgófázis sebességét 1 , a komponens mozgó- és az állófázisban mért diffúziós állandójától, visszatartásától és szemcseátmér t 1 (állófázis morfológiájától) függ.

Ha szemléltetni akarjuk a szemcseátmér (d_p) és diffúziós tulajdonságok (diffúziós állandó - D_M) hatását az elválasztás hatékonyságára, akkor Neue szerint a következő egyszerű sítet formát írhatjuk fel:

$$H = A \cdot d_p + \frac{B \cdot D_M}{u} + C \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M} \quad (7)$$

Az optimális lineáris sebesség (u_{opt}) a következők szerint írható le:

$$u_{opt} = \frac{\sqrt{D_M}}{d_p} \sqrt{\frac{B}{C}} \sim \frac{1}{d_p} \quad (8)$$

Tehát a lineáris sebesség optimuma fordítva arányos a szemcseátmérvel. A 8-es egyenletet 7-be helyettesítve megkapjuk a tányérmagasság minimum értékét (H_{min}) :

$$H_{min} = d_p (A + 2\sqrt{CB}) \sim d_p \quad (9)$$

Azaz az elérhető legkisebb tányérmagasság (legnagyobb tányérszám) egyenesen arányos a töltet szemcseátmérjével.

Additivitás elmélet következménye

hagyományos HPLC módszernél:

$$\Sigma H = H_A + H_B + H_{C,\dot{a}} + H_{C,m} \quad (10)$$

ahol: H_A , H_B , $H_{C,\dot{a}}$ és $H_{C,m}$ az A , B tagból illetve az anyagátadási ellenállás álló- és mozgófázis járulékból ($C_{\dot{a}}$ és C_m) adódó tányérmagasság járulékok.

UHPLC módszerél ehhez járul a h gradiens (H_T) és ultranagy-nyomás (H_P) okozta zónaszélesítési hatások:

$$\Sigma H = H_A + H_B + H_{C,\dot{a}} + H_{C,m} + H_T + H_P \quad (11)$$

Redukált paraméterek

A redukált paraméterek segítségével különböző szemcseátmérőjű töltetek hatékonysága (minősége) hasonlítható össze.

redukált tányérmagasság (h):

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (12)$$

redukált sebesség (v):

$$v = \frac{ud_p}{D_M} \quad (13)$$

Knox egyenlet

Knox a redukált paraméterekkel írta fel a tányéregyenletet, és már figyelembe vette az A tag sebesség függését is.

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{\epsilon} + Cv \quad (14)$$

Kolonna jóságának megítélése

Egy teljesen porózus szemcsékkel töltött kolonnát jónak ítélünk ha teljesül, hogy $2 < h_{min} < 3$. Héjszerkezetű töltetknél pedig $1,2 < h_{min} < 2$ várható el.

Nyomáscsökkenés a kolonnán (ΔP)

$$\Delta P = \frac{w\gamma Lu}{d_p^2} \quad (15)$$

ahol: w kolonna áramlási ellenállása
 γ mozgófázis viszkozitása

Elválasztási ellenállás (E)

Figyelembe veszi az elérhető tányérmagasságot és a kolonna áramlási ellenállást is, így a megvalósítható analízis idő is adhat tájékoztatást.

$$E = \frac{t_R \Delta P}{N^2 \gamma (1+k)} = Wh^2 \quad (16)$$

Kinetikus elmélet alapja

A kinetikus elmélet segítségével elválasztások idő igényét (analízis idő, arányos a holtidővel) becsülhetjük adott nyomáson (P_{max}) és adott viszkozitású mozgófázissal, figyelembe véve a kolonna permeabilitását (K_V) és az adott lineáris sebességnél mért tányérmagasságot. Továbbá meghatározható, hogy egy adott tányérszámot milyen kolonna hosszal lehet elérni. Az elmélet alapegyenletei:

$$t_0 = \left(\frac{\Delta P_{max}}{\gamma} \right) \left[\frac{K_V}{u^2} \right] \quad (17)$$

$$N = \left(\frac{\Delta P_{max}}{\gamma} \right) \left[\frac{K_V}{u \cdot H} \right] \quad (18)$$

Teljes zónaszélesedés

A kromatogramon mért zónaszélesedés két fő részből tevődik össze, az egyik a kolonna megszabta, a másik a kolonnán kívüli. Ezért a kromatogramon mért zónaszélesedés (variancia) tehát a kolonnán fellépő és azon kívüli hatásokból tevődik össze:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{ec}^2 + \sigma_{col}^2 \quad (19)$$

ahol: σ_{col}^2 és a σ_{ec}^2 jelentik a kolonnán és a kolonnán kívüli zónaszélesedést, a következő módon írhatók fel:

$$\sigma_{col}^2 = \frac{V_r^2}{N_{col}} = \frac{V_0^2}{N_{col}} (1+k)^2 \quad (20)$$

$$\sigma_{ec}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{kap}^2 + \sigma_{det}^2 \quad (21)$$

ahol:

V_r a retenciós térfogat
 V_0 holt térfogat

N_{col}	oszlop valódi hatékonysága (oszlopon kívüli zónaszéledéssel korrigált tényérszám)
σ_{inj}^2	a mintaadagoló zónaszéledés hatása
σ_{kap}^2	az összekötő vezeték zónaszéledés hatása
σ_{det}^2	a detektorcella zónaszéledés hatása

Megállapodás szerint:

$$\sigma_{ec}^2 \leq 0,1 \cdot \sigma_{col}^2 \quad (22)$$

Azaz az oszlopon kívüli zónaszéledés ne legyen nagyobb mint az oszlopon létrejövő varianca 10%-a. Ekkor a készülék nem rontja le jelentősen az oszlop valódi hatékonyságát.