

HPLC gyakorlat – vegyész MSc I. évf. Mörötl Mária

A gyakorlat célja:

- a HPLC mérés technikával való megismerkedés
- a Clarity software kezelésének elsajátítása
- oszlopok tesztelése

A készülék típusa: YL9100 HPLC (Younglin gyártmányú készülék)

A jegyzőkönyvben szerepelnie kell a bemérési adatoknak és a kromatográfiás körülményeknek, a számolásoknak, valamint a következtetéseknek.

Feladatok:

- I. Az optimális mérési körülmények megtalálása
- II. Retenciós sorrend meghatározása
- III. Kalibráló sorozat készítése
- IV. Ismeretlen oldat koncentrációinak meghatározása
- V. Oszlop tesztelése, validálási paraméterek kiszámítása

A fenti feladatok közül a gyakorlatvezető jelöli ki az elvégzendő feladatokat.

I. Az optimális mérési körülmények megtalálása

A retenciós időt a folyadékkromatográfiás méréseknél számos tényező befolyásolja. Ezek közül az eluens összetétele (izokratikus, gradiens elúció), ill. a hőmérséklet hatását vizsgáljuk. Az oldat komponenseit először izokratikus elúcióval 50%MeOH-50% H₂O, majd 60%MeOH-40% H₂O végül 70%MeOH-30% H₂O összetételű eleggyel oldjuk le az oszlopról. Az eredmények alapján (rövid analízisidő, elválasztás, csúcsalak) meghatározzuk az optimális eluens összetételt. Hasonló módon gradiens elúcióval is leoldhatjuk a komponenseket. Optimizálható paraméterek a kezdeti, ill. végső összetétel, valamint a gradiens meredeksége. A másik fontos paraméter a hőmérséklet, ami befolyásolja az álló, ill. mozgó fázis közötti megoszlási egyensúlyt, és az anyagátadás sebességét, valamint az oldószer viszkozitását is. Végezzük el a mérést a kiválasztott oldószer eleggyel (izokratikus) 30 °C-on és 40 °C-on is. Hasonlítsuk össze az eredményt a labor hőmérsékletén mért kromatogrammal. Milyen változásokat figyelhetünk meg?

Az UV detektálás esetében fontos, hogy a detektálási hullámhossz a mérendő komponensek elnyelési maximumának közelében legyen. Ilyenkor nagy az érzékenység és így lehet alacsony kimutatási határokat elérni. Mivel az elnyelési maximumok az anyagi minőségtől függenek, minden anyagra más és más, ezért a detektálási hullámhosszat az összes célvegyület elnyelési spektrumának, valamint az eluens elnyelésének figyelembevételével (UV cut off, ld. melléklet) kell meghatározni. A készülékek bizonyos része fix hullámhosszon detektál (pl. 254 nm), a többinél változtatható a hullámhossz (pl. 190-900 nm között), sőt akár két detektálási hullámhosszon is lehet egyszerre mérni. A gyakorlaton két különböző hullámhosszon detektáljuk a komponenseket. A National Institute of Standards (USA) honlapján (<http://webbook.nist.gov>) keresse meg a vegyületek UV-VIS spektrumát és adja meg az elnyelési maximumukat. Válassza ki az adott vegyületcsoportra megfelelő detektálási hullámhosszat.

II. Retenciós sorrend meghatározása

Először a retenciós sorrend meghatározását végezzük el a célvegyületekre. Ezeket az oszlopok tesztelésére használt vegyületek közül választottuk ki. A tesztegyek szokásos komponensei például az uracil, dimetil-ftalát, toluol, fenol, bifenil, 4-klór-nitrobenzol, naftalin és fenantrén. A vizsgálandó oldat öt komponensből áll. Először ezekből az anyagokból 1mg/mL-es koncentrációjú metanolos törzsoldatot készítünk, majd további hígítással 50 µg/mL-es oldatokat készítünk a retenciós sorrend meghatározásához.

III. Kalibráló sorozat készítése

A kalibráló sorozatot az összes komponens összemérésével készítjük el a törzsoldatokból a 10-100 µg/mL-es tartományban. A kalibráláshoz 3-5 különböző koncentrációjú oldatot használunk.

IV. Ismeretlen oldat koncentrációinak meghatározása

Az ötkomponensű ismeretlen oldat koncentrációinak meghatározását a kalibrációs sor felhasználásával végezzük el.

V. Oszlop tesztelése, validálási paraméterek kiszámítása

Az oszlopokat a időről időre tesztelni kell, mivel a megosztó fázis a használat során módosulhat, a kölcsönható csoportok lehidrolizálhatnak, stb., ami idővel az állófázis elválasztó-képességének romlásához vezet. Kezdetben csak a kromatográfiás csúcsok kiszélesedése figyelhető meg. Bizonyos mértékű romlás után az oszlop cseréjét kell végrehajtani, mivel az nem felel meg a minőségi követelményeknek. Az ilyen minőségi ellenőrzéseket a gyártók maguk is elvégzik és az oszlophoz a teszt eredményét is mellékelik. A tesztelésre használt vegyületek köre némileg változó, de vannak viszonylag gyakran előforduló összetevői is ezeknek az oldatoknak.

Tanulmányozza át az alábbi teszteredményt és válaszoljon a következő kérdésekre:

1. Mi az a tailing?
2. Mi a k' és hogyan számítjuk ki? Mire jellemző?
3. Miért kell a savas, ill. bázikus molekuláknál puffert alkalmazni?
4. Milyen körülmények kerülendők egy oszlop használata során?

Minősítse a készülékben lévő oszlopot a tesztoldattal a gyakorlatvezető által megadott körülmények között. Határozza meg a paramétereket (elméleti tányérszám, aszimmetria faktor, stb.) és az eredményeket táblázatosan adja meg!