

NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA AZ ÉLELMISZERANALITIKÁBAN*

FRED SCHEUER

Amíg nemrég az élelmiszerelőállító üzemek laboratóriumi néhány kémcsővel és főzőpohárral voltak ellátva, ma már az elektronika ezekbe is bevonult. A pH-mérőktől a gázkromatográfokig, a Kjeldahl automatáktól a tömegspektrométerekig és a szárítómérlegektől a NIR-készülékekig feszül a korszerű készülékek íve, amelyek az élelmiszeranalitikát megváltoztatták és továbbfejlesztik. Amíg régebben még 2 napot igényelt az aminosav-elemzés, addig ma már a nagynyomású folyadékkromatográfia (a továbbiakban: HPLC) egy órán belül lehetővé teszi a meghatározást.

Az élelmiszerek koffeinmeghatározása többórás időráfordítást igényelt, ma azonban keken 5 perc alatt elvégezhető.

Ezek a példák azt mutatják, hogy korszerű laboratóriumban a HPLC elengedhetetlenül szükséges. Alkalmazása a nehezen illó vegyületek gázkromatográfias meghatározásának ideális kiegészítésére nyújt lehetőséget, amely csak sokkal kedvezőtlenebbül fogható meg gázkromatográfiával – gondoljunk csak az injektálás bomlási folyamataira, ill. a szükségképpen képződő származékokra, amelyek meghatározása időigényes, ill. amelyek az eredeti összetételt eltorzító változást okozhatnak – egészen a nagymolekulájú polimer vegyületekig. Alkalmazásának határát gyakorlatilag csupán az anyagnak az eluensben való oldhatósága szabja meg. Ezen elemzési eljárás mindent felülmúló fejlődésének legfőbb előnye kétségtelenül az oszlop töltésére szolgáló kémiaailag módosított anyagban van, mint amilyen pl. az RP-8, RP-18 megfordítható fázisok, ill. a diol-, nitro-, amino- stb. kémiaailag módosított fázisok.

Ezáltal lehetővé vált egyszerűen vizes rendszerek feldolgozása, másrészt az oszlopok rövid cseréideje, ami az elemzés időigényét, különösen a lépcsőzetes kioldást jelentősen megrövidítette. Egyidejűleg a széles körű alkalmazás lehetősége révén a kezdetben költséges HPLC kedvező költség-hasznosítási tényezőivel szabványos eljárássá vált, amely nemcsak a vizsgáló intézményeknél, hanem számos ipari üzem laboratóriumaiban is megtalálható. Mindegyik analitikus számára elvi lehetőséget jelent az összetevők szétválasztására és meghatározására.

Az elválasztás vezetése (1, 2, 3)

Ha az elválasztás tényérszámát helyezzük előtérbe a kromatográfia ábrázolásakor, a HPLC-nél többek között természetesen a gázkromatográfia jön szóba, szem előtt kell tartanunk, hogy a felbontóképességet számos tényező határozza meg.

$$R = 0,25 (\alpha - 1) \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k}{(1 + k)}$$

R..... felbontóképesség

N..... elválasztási tényérszám

α elválasztóképesség (szelektivitás)

k..... kapacitástényező

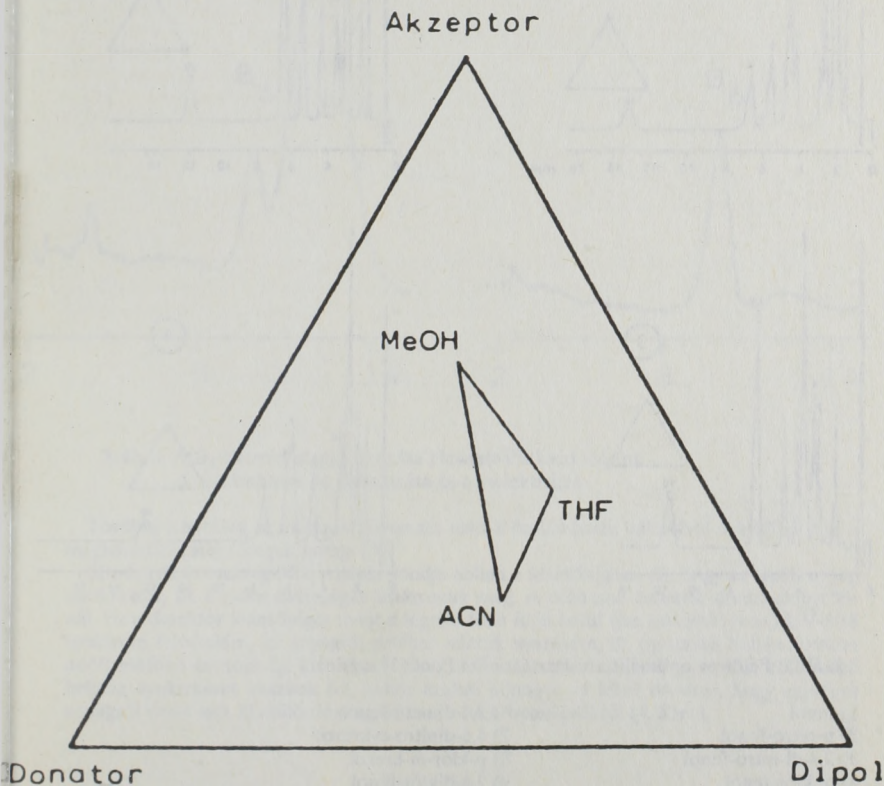
k = (az összetevők retenciós ideje – holt idő)/holt idő

*Dipl.-Ing. Dr. Fred Scheuer (HBLVA für Chem. Industrie, A-1170 Wien, Rosensteig. 79) közleménye „Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Lebensmittelanalytik” címmel a „Lebensmittel- und Biotechnologie” osztrák szakfolyóirat 1988/2 számában jelent meg, amelyet Szarvas Tibor fordításában, a kiadó engedélyével teszünk közzé.

A kapacitástényező kizárólag az eluens „erejétől” függ. Az erős folyadékok gyorsan eluálják az egyes összetevőket, a gyengék lassan. Az elválasztás javítása az elválasztás idejének növelésével csak bizonyos tartományon belül $k=20$ érhető el, ezen túlmenően az elemzés időtartama növekszik csupán.

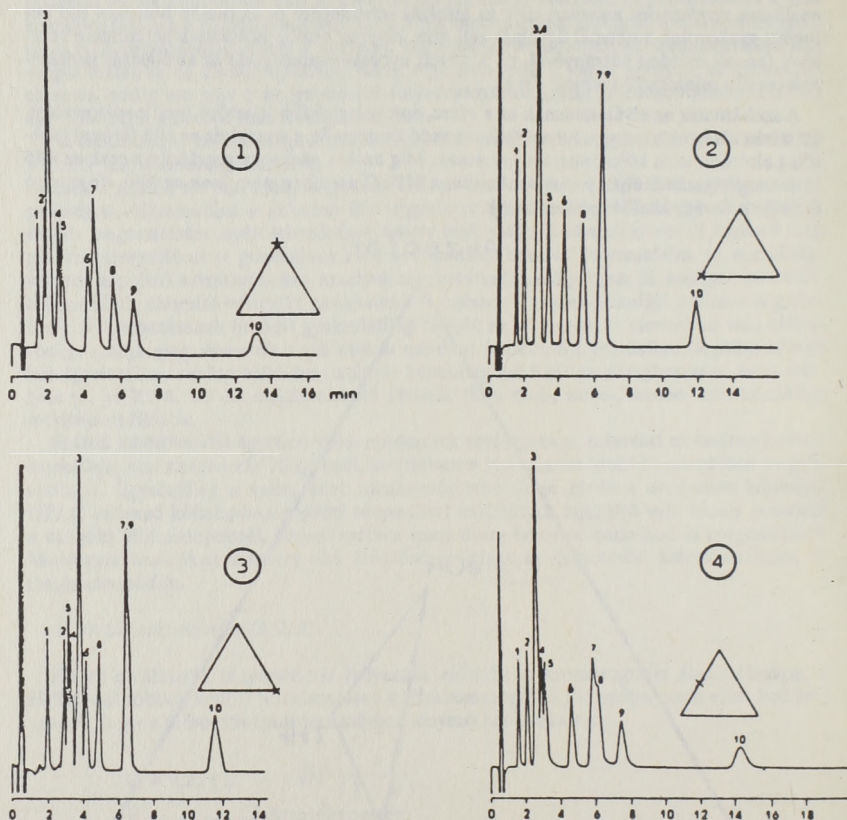
Az elválasztás tényezőjét az oszlop elválasztási teljesítménye jellemzi és ez arányos az oszlop anyagának alkalmasságával, átfolyási sebességével, valamint az oszlop hosszával. Az analitikus rendszerint azonban csak az átfolyás sebességére és az oszlop hosszára tud befolyást gyakorolni, amelynél ügyelnie kell arra, hogy az oszlop hosszának kétszeresre vételével (annak minden hátrányával, pl. a növelt nyomásvesztéssel) az elválasztás javításának csupán mintegy $\sqrt{2}$ -szeresét éri el.

A szelektivitás az elválasztásnak az a része, amely leginkább lehetővé teszi a változtatást. Ez a lehetőség akkor nagy, ha az elválasztandó összetevők a mozgó és az álló fázissal lehetőleg eltérően erős kölcsönhatást mutatnak. Míg azok a gázkromatográfiában csak az álló fázis megválasztása útján befolyásolhatók, a HPLC esetében nem csak az álló, de mozgó fázis (l. 1. ábrát) által is módosíthatók.



1. ábra: A fordított-fázisú kromatográfiában alkalmazott eluensek (3) szelektivitási tulajdonságai

Közel változatlan eluens-erősség mellett az eluensek kölcsönhatásának megválasztása által lehet az elválasztást optimalizálni (2. ábra)



2. ábra: Példa az optimális elválasztásra Du Pont (1) szerint

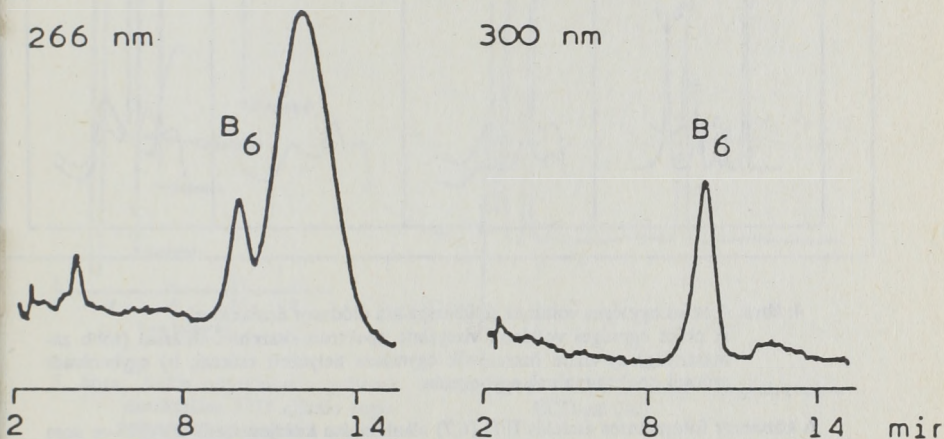
- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1) fenol | 6) 2,4-dimetil-fenol |
| 2) p-nitro-fenol | 7) 4,6-dinitro-o-krezol |
| 3) 2,4-di-nitro-fenol | 8) p-klór-m-krezol |
| 4) o. klór-fenol | 9) 2,4-diklór-fenol |
| 5) o.nitro-fenol | 10) 2,4,6-triklór-fenol |

Érzékelők (detektorok)

Az anyagkeverékek elválasztása mellett fontos követelmény az egyes összetevők kimutatása: az érzékelés. Az összes anyagcsoport számára nincs általános érzékelő és valószínűleg a jövőben sem lesz, mivel az anyagi különbségek és azok fizikai tulajdonságai, amelyek az eltérő kimutatási lehetőségek alapulnak, igen szétágazóak.

Érzékelés a ibolyántúli (UV) és a látható (VIS) fény tartományában

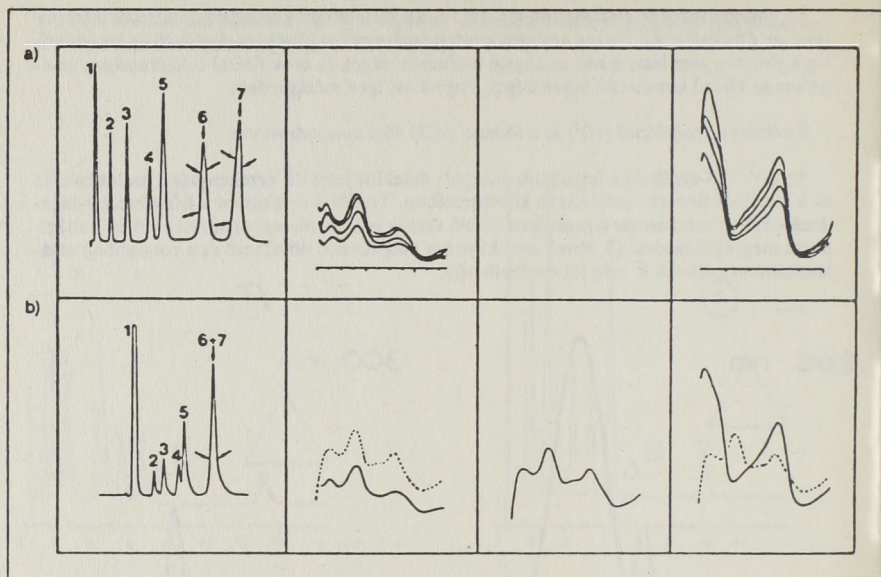
Az UV-VIS-érzékelő a leginkább elterjedt detektor jelentős érzékenysége, szelektivitása és a kiterjedt lineáris tartománya következtében. Továbbá érzéketlen a hőmérséklet-ingadozásokra és rendszerint a szakaszos elúció esetén is zavartalanul alkalmazható. A hullámhossz megválasztásával (3. ábra) szelektivitása még tovább növelhető és a rosszabb elválasztható vegyületek is még jól érzékelhetők.



3. ábra: A B₆-vitamin meghatározása Hewlett-Packard szerint.
A hullámhossz megválasztása és a szelektivitás

További lehetőség az elemzés folyamata alatt a hullámhossz váltásával érhető el, ami a meghatározás lehetőségeit javítja (4).

Mindegyik kromatográfias eljárás gondja abban a lehetőségben áll, hogy az eluált anyag szerkezetét, ill. a csúcs tisztaságát határozzuk meg. A diódásor detektor döntő előnyt kínál. Ez a detektor lehetőséget nyújt a legrövidebb időn belül (ms tartományban) UV-VIS spektrum felvételére, az anyagról értékes adatok nyeresére, ill. optimális hullámhosszon adott esetben mennyiségi kiértékelés elvégzésére. Ha ezen túlmenően a csúcs különböző helyein spektrumot veszünk fel, akkor ezáltal könnyen el lehet dönteni, hogy egységes anyagról van-e szó, ill. különféle együttesen eluált összetevőktől (4. ábra).

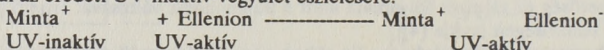


4: ábra. A csúcs egységes voltának felülvizsgálata diódasor érzékélővel.

A csúcs egységes voltának vizsgálata spektrum-összehasonlítással (több zatanyag) a) tiszta összetevők egymásra helyezett csúcsai; b) egybeolvadt csúcsok spektrumainak egybevetése

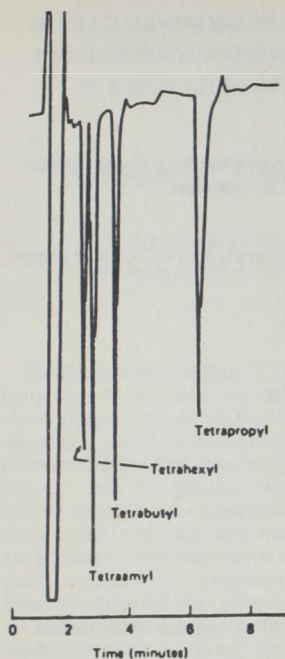
A közvetett fotométeres észlelés IPD (6,7) alkalmazása kiterjeszhető UV-VIS-re nem aktív vegyületekre is. Az eluenshez UV-VIS aktív vegyületet adagolnak, amely meghatározott alapabszorpciót idéz elő. Az inaktív vegyületek (ún. „UV-áteresztők”) eluációjánál jelen („negatív csúcsot”) észlelnek (5. ábra)

Ionos vegyületek esetén lehetőség mutatkozik „ionpárképzés” detektálásra UV-aktív ellenionnal az eredeti UV-inaktív-vegyület észlelésére.

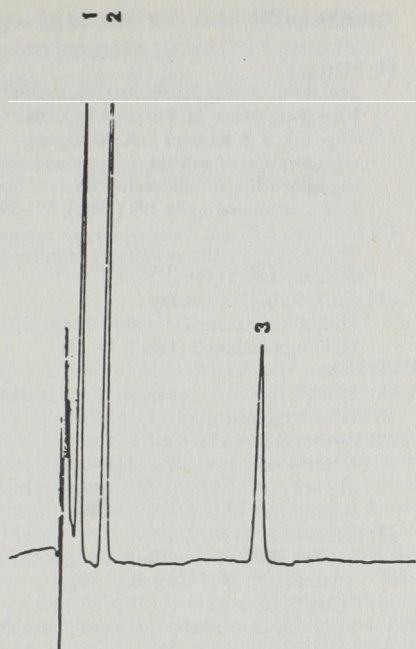


Elektrokémiai érzékelő

Az elektrokémiai detektor (ECD) méltatlanul kevésbé figyelembe vett érzékelő, amely oxidálható, ill. redukálható vegyületek kimutatására alkalmazható. Az érzékelő cella 3 elektródból áll. A munka és a vonatkoztató-elektroda között szabadon választható potenciálkülönbséget állítanak elő. Az eluálandó vegyülettel végbemenő elektrokémiai reakció során keletkező áramot segédelektróddal vezetjük le és az szolgáltatja a mérés jelét. Az összes vegyület detektálható ily módon, amely kereken - 1 V - + 1,2 V tartományban elektrokémiai reakciót vált ki (6. ábra). A polarizációs feszültség változtatásával mellékelten a nem érdekes, ill. a zavaró csúcsok detektálása kioltatható (11).



5. ábra: Alifás ammóniumvegyületek detektálása IPD eljárás segítségével idő percekben



6. ábra: Antioxidánsok meghatározása ECD-ral (10)

Törésmutató érzékelő

Itt olyan nem szelektív detektorról van szó, amely az összes anyagot regisztrálja, amely a mozgó fázistól eltérő törésmutatót ad. A jel annál nagyobb, minél nagyobb a törésmutatókülönbség. Kevésbé érzékeny, mint az UV-érzékelő és a szakaszos elúcióra rendszerint nem használható.

Fluoreszcenciás érzékelő

Valamennyi anyag amely fluoreszkál, ill. amelyből fluoreszkáló származék állítható elő, ezzel az érzékelővel meghatározható. Érzékenysége felülmúlja az UV-érzékelőét. Ezzel a detektorral azonban különösen ügyelni kell az eluensek tisztaságára, mivel a szennyezések, ill. az oxigén-nyomok csekély mennyiségei már kiolthatják a fluoreszcenciát.

Antioxidánsok elektrokémiai detektálása. A kromatográfiai feltételek:

Oszlop: Ultrasphere ODS 5μ , $250 \times 4,6$ mm; mozgó fázis: acetonitril (0,05 m foszforsav pH 3,3 /80/20/); észlelés: $U_{pol} = + 800$ mV, $I = 10$ nA; 1=NDGA, 2=BHA, 3=BHT; koncentrációk: mindenkor 20 ng/ 20μ l.

IRODALOM

- (1) Mayer, V. :
Praxis der Flüssigkeitschromatographie.
Frankfurt/Main: M. Diesterweg, 1984.
- (2) Glajch, J., J. J. Kirland a. K. M. Squire :
Optimization of solvent strength and selectivity for reversed phase liquid chromatography using an interactive mixture design statistical technique.
J. of Chromatography 199 (1980), 57-79.
- (3) Berridge, J. C. :
Techniques for the automated optimisation of HPLC separations Trends in analytical chemistry 3 (1984), 5-10.
- (4) Spatz, R. u. F. Adamsky :
Photodiodenarray-Detektion in der HPLC.
GIT-Supplement 3 (1986), 73-78.
- (5) Baltes, W. (Hrsg.) :
Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln.
Hamburg: Behr, 1987, 191f.
- (6) Larson, R. u. C. D. Pfeiffer :
Determination of Alkyl Quarternary Ammonium Compounds by Liquid Chromatography with Indirect Photometric Detection.
Anal. Chem 55 (1983), 393-396.
- (7) Small, H. u. T. E. Miller :
Indirect Photometric Chromatography.
Anal. Chem. 54 (1982), 462-469.
- (8) Denkert, M. et al. :
Reversed-phase ion-pair-chromatography with UV-absorbing ions in the mobile Phase.
J. of Chromatography 218 (1981), 31-43.
- (9) Gloor, R. a. E. L. Johnson. :
Practical Aspects of reversed phase ion-pair-chromatography.
J. of Chrom. Sci. 15 (1977), 413-423.
- (10) Nissen, H. R. u. H. W. Kreysel :
Trennung von Konservierungsstoffen und Antioxidantien mit Hilfe der HPLC.
GIT Supplement 2 (1986), 41-45.
- (11) Frank, J. :
Anwendung der elektrochemischen Detektion in der HPLC.
Chimia 35 (1981), 24-32.

HELYESBÍTÉS

Az ÉVIKE 1989/3. számában a 2 cikk ábrái megcserélődtek.

Csapó János és munkatársai cikkének ábrái helyesen:

- 144. oldal 1. ábra helyett a 160. oldal 1., 2. ábra
- 145. oldal 2., 2.a., 3. ábra helyett a 161. oldal 3., 4. ábra
- 146. oldal 4., 5., 6. ábra helyett a 162. oldal 5., 6. ábra és
- 148. oldal 7. ábra helyett a 163. oldal 7., 8. ábra

A nyomdai hiba miatt a Szerzőktől szíves elnézést kérünk.