

NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA

Néhány szempont az élelmiszeranalitikai alkalmazáshoz

H. ENGELHARDT*

1. Bevezetés

A korszerű oszlop folyadékkromatográfia, az angol kezdőbetűkből összeállított szóként HPLC vagyis High Performance (eredetileg Pressure) Liquid Chromatography — nagy hatékonyságú (eredetileg nyomású), illetve intenzív folyadékkromatográfia, az utóbbi 20 évben a korszerű laboratóriumok nélkülözhetetlen elemzési eljárásává fejlődött (1—4). Az alkalmazás lehetőségei — a gázkromatográfiával kiegészítve — a nehezen illó, ill. a bomlás nélkül el nem párologtatható vegyületek elválasztásától a polimer vegyületekig terjednek (5). Az eljárás rohamos fejlődése a kémiailag kötött, elsősorban fordított fázisok (reversed phases) bevezetésének köszönhető, ahol a mintákat közvetlenül vizes oldatból lehet a kromatográfias rendszerbe vinni. A 10 µm-nél kisebb szemcseátmérőjű oszloptöltetekkel hatékony elválasztásokat rövid időn belül, azaz jelentős elemzési sebességgel lehet elvégezni. A jelenlegi standard a 25 cm hosszú, 10000-es tányérszámú elválasztó oszlop. A pumpákkal előállítható (többnyire 400 bar) nyomás korlátozza a legfeljebb elérhető, mintegy 200000-es tányérszámot. Ez azonban mégsem hátrány, mert a folyadékkromatográfiában a szelektivitás — a gázkromatográfiával szemben — az eluensek megválasztásával széleskörűen változtatható, optimálható. A kapilláris oszlopok, amelyek a gázkromatográfiában jelentős felbontást tesznek lehetővé, a folyadékkromatográfiában szinte alig nyerne gyakorlati alkalmazást, mert nem rendelkezünk olyan detektorokkal, amelyek a komponensek érzékeny és igen kis (1 nl-es) térfogatban történő kimutatását lehetővé tennék (6).

A sokrétű fáradozások ellenére az elválasztó oszlop eluátumában a minta elválasztott komponenseinek érzékeny detektálása még mindig nehézséget jelent, ami a HPLC általános alkalmazását korlátozza. A látható, ill. az ultraibolya sugarakat abszorbeáló, ill. azok hatására fluoreszcens sugárzást kibocsátó anyagok detektálása nem jelent gondot. Erősen abszorbeáló komponensek analitikai kimutatása a ng tartományban is könnyen megoldható. Épp az élelmiszerkémia számos fontos anyaga (pl. zsírok, cukrok stb.) azonban a kedvező hullámhossztartományban nem mutat kielégítő abszorpciót, így kellő érzékenységgel nem detektálható. A nyomelemek (pl. a kontaminánsok) kimutatása is jelentős követelményeket támaszt a kromatográfias rendszerrel szemben. Ezért a következőkben meg kell kísérelni azoknak a lehetőségeknek a feltárását, amelyekkel ezek a korlátok elkerülhetők: a kimutatás érzékenysége jobb, a minőségi azonosítás biztosabb.

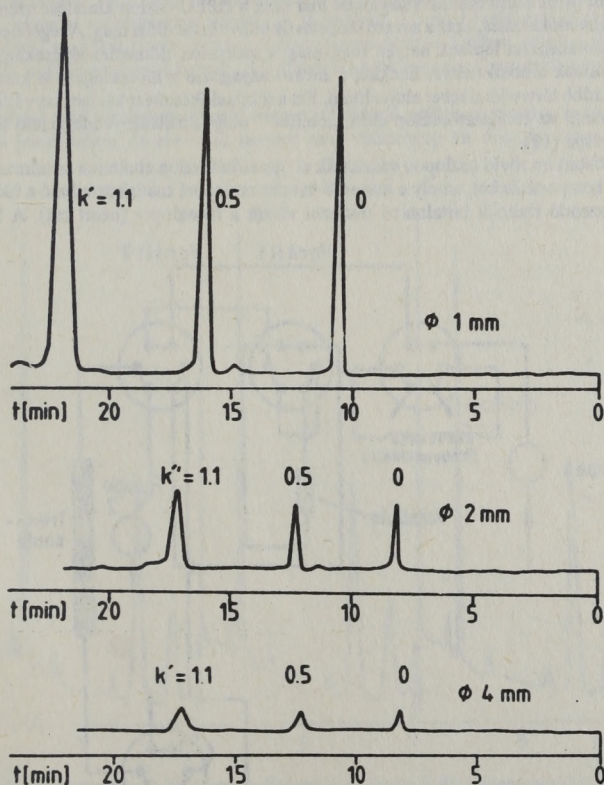
2. A kimutatás érzékenységének javítása kis átmérőjű oszlopok (Micro bore columns) alkalmazásával

A mintasávnak a kromatográfias oszlopon bekövetkező vándorlása során sávészélesedés, az anyag higulása következik be, vagyis a mintaösszetevők szétválasztásakor az elválasztott sávokat az eluens folytonosan hígítja: a komponens koncentrációja és így a csúcsmagasság csökken. Ebből következik, hogy a HPLC-ben kizárólagosan használt, koncentrációérzékeny detektorok érzékenysége is csökken. Minél kisebb a sávészélesedés, annál nagyobb a csúcsmagasság és így a koncentráció. Ezt úgy érik el, hogy kis szemcseátmérőjű oszloptölteteket alkalmaznak (a nagyobb szemcseátméretű kisebb sávészélesedésnek, csekélyebb higulásnak felel meg), s ez nagyobb érzé-

*Prof. Dr. H. Engelhardt (Fachbereich Physikalische Chemie, Universität des Saarlandes D—6000 Saarbrücken munkája, amely a „Hochdruck—Flüssigkeits—Chromatographie. Einige Betrachtungen zum Einsatz in der Lebensmittelanalytik” címmel a „Lebensmittel- und Biotechnologie” osztrák szakfolyóirat 1989/2. számában jelent meg és amelyet Szarvas Tibor fordításában, a kiadó engedélyével teszünk közzé.

kenységet eredményez. A különleges elválasztási feladathoz szükséges (adott szelektivitású) kisebb részecskékkel töltött, rövidebb oszloppal csökkentett elemzési idő alatt sikerül az elválasztást megoldani (7). Jelenleg a nagyobb elválasztási sebesség és érzékenység érdekében $3\mu\text{m}$ átmérőjű szemcsékkel töltött, 3–6 cm hosszú oszlopokat alkalmaznak (8). Korszerű készülékkel szemben alapvető követelmény a kis holtterefogat (rövid, 0, 25 mm-nél kisebb belső átmérőjű összekötő csövek) és a kis időállandójú detektor.

Az ún. micro bore oszlopok (9). nyommennyiségek kimutatására jól alkalmazhatók. Általánosan használatosak az 1–2 mm belső átmérőjű oszlopok. Változatlan mintamennyiség esetén az oszlopátmérő csökkentésével a csúcsmagasság vagyis a koncentráció 4–16-szorosára növelhető. Az 1. ábra bemutatja ezt 4, 2 és 1 mm-es belső átmérőjű oszlopokra, amelyeknél azonos mintamennyiséget vittek fel mindegyik oszlopra (10). Természetesen a 4 mm belső átmérőjű oszlopon 16-szoros mintamennyiség azonos terhelést jelent.



1. ábra. A kis belső átmérőjű elválasztó oszlopok előnyei azonos mennyiség esetén.

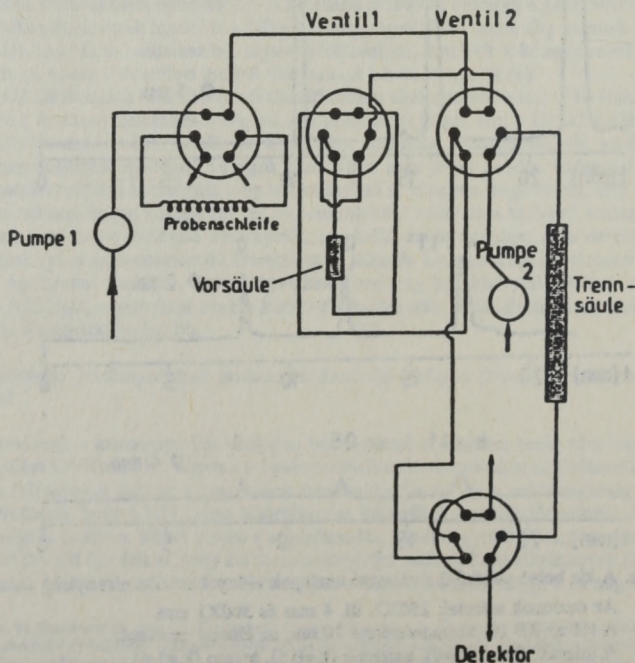
Az oszlopok méretei: 250X2, ill. 4 mm és 300X1 mm.
 A töltet: RP 18, szemcsemérete $10\mu\text{m}$, az eluens: metanol.
 A minták: fenol ($k=0$), antracén ($k=0.5$), krizén ($k=1.6$)
 A minta mennyisége mindenkor 1 μl .

A nyomelemek kimutatására a mikrooszlopok előnye valóban csak akkor érvényesülhet, ha kellően érzékeny detektorral rendelkezünk, amely megfelelő kis cellatérfogatban megtartja a detektoroknak a normál elválasztó oszlopoknál alkalmazott rétegvastagságot. A mikrooszlopok üzemeltetéséhez szükséges kis térfogatsebességhez (50–100 $\mu\text{l}/\text{perc}$ 1 mm belső átmérőjű oszlopoknál) más pumpák, a maximálisan kb. 1 μl mintatérfogatok miatt pedig módosított mintabemérők szükségesek. A HPLC gyakorlatában nagy tapasztalat szükséges, hogy a készülék hatását a kromatográfiai eredményekre vonatkozóan megismerjük és kiküszöböljük. Szigorúan korlátozott mintamennyiség esetén a kromatográfiai elemzés előnyös. A kisebb térfogatsebesség eluens megtakarítását teszi lehetővé.

3. Mintaelőkészítés és mintakonzentrálás oszlopváltással

A bonyolult összetételű minták vizsgálatát már csak a HPLC-oszlop kémelése szempontjából is gyakran mintaelőkészítés, azaz a zavaró összetevők eltávolítása előzi meg. A régebben szokásos sokoldalú szétválasztási lépések helyett manapság a szorpciós előtisztító lépésekhez alkalmas álló fázisok állnak rendelkezésre. Ezekkel a zavaró anyagokat a kromatográfiai készülék előtt a legkülönbözőbb töltetekkel lehet eltávolítani. Ezt a mintaelőkészítést két hatutas váltószeleppel lehet közvetlenül az elválasztóoszlop előtt, „on.line” megvalósítani. A megfelelő elrendezést a 2. ábra mutatja (11).

A mintát többnyire rövid oszlopon választják el. Az előtétoszlop eluátuma tartalmazza a meghatározandó komponenseket, amely a második hatutas szeleppel csatlakoztatható a főoszlophoz. A meghatározandó frakciót tartalmazó részletet viszik a főoszlopra (heart cut). A két oszlop

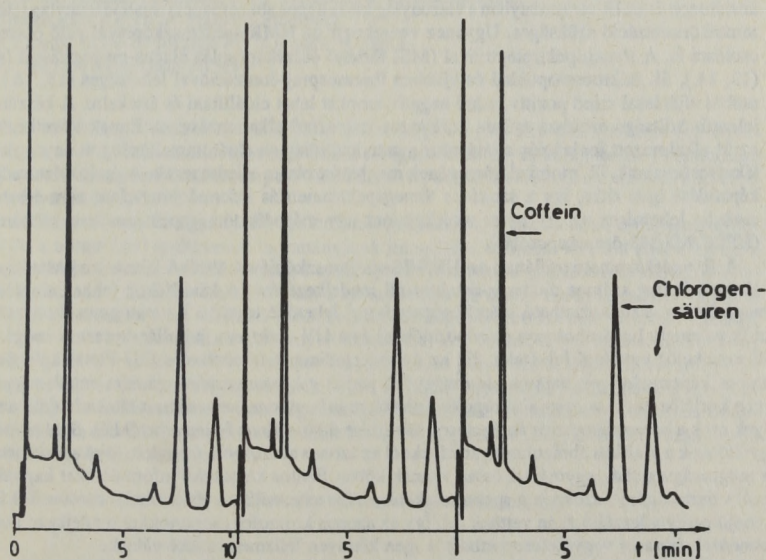


2. ábra. Az oszlopok csatlakoztatásának vázlatos elrendezése a minták előzetes tisztítására, ill. dúsítására.

egymással csak az átvitel időtartama alatt van összekötve. Amíg a főoszlopon elvégzik a szétválasztást — célszerűen, ha erre másik pumpa áll rendelkezésre — az előtétoszlopot regenerálják, ill. ismét mintával terhelik. A harmadik szelep lehetővé teszi, hogy az előtét-, ill. a főoszlopot a detektorral váltakozva összekapcsolják vagy ne kapcsolják össze. Az előtétoszlop álló fázisának alkalmas megválasztásával és a főoszlophoz való illesztésével, az oszlopváltással a sáv szélesedést korlátozni lehet. Ennek során kedvező, ha a meghatározandó komponens az előtétoszlopon kevésbé erősen kötődik, mint a főoszlopon. Miután a mintát mind az előtét-, mind a főoszlopon átengedték az eluents természetesen váltani, azaz eluálóképességét növelni kell. A fordított fázisok kombinálásakor az előtétoszlopban rövid alkilcsoportok, a főoszlopban pedig RP C18 csoportok alkalmazása előnyös.

Hasonló összeállítással anyagok dúsítása is lehetséges, ha a minta koncentrációja kicsi. Viszonylag apoláris anyagokkal ez könnyen elvégezhető. A dúsítási tényezőt ilyen esetben 1:100 arányig lehet növelni. A 3. ábra koffein dúsítását mutatja koffeinmentesített kávéból, valamint a dúsítási folyamat reprodukálhatóságát (12). Esetenként 1,5 ml kávéfőzetet (8)0,4 g kávét 10 ml forró vízzel vesz fel) 10 mm hosszú előtétoszlopon dúsít. A koffein csúcsa a 3. ábrán megfelel 0,05% koffeintartalmú kávénak. Az eljárással a klorogénsav egyidejű meghatározása is lehetséges.

Ez a dúsítási mód alkalmazható még vízben jól oldódó poláris anyagokra is apoláris mintaszeletek jelenlétében, de ebben az esetben csak viszonylag kis dúsítási tényező érhető el.



3. ábra Nyommenyiségek dúsítása: koffeinmeghatározás koffeinmentesített kávéban

Mintamennyiség: 1,5 ml kávépor 0,4%-os vizes oldata

Előtétoszlop: 10X4 mm-es Hypersil ODS-sel töltve

Főoszlop: 250X4 mm-es Lichrosorb RP 18

Eluensek: dúsításra víz, elválasztásra acetonitril+0,015 m H₃PO₄ (10—90)

Háromszoros ismétlésnek kell a reprodukálhatóságot igazolnia.

Mindezek ellenére az eljárás alkalmasnak látszik italokban vízdoldható vitaminok (pl. B2 vitamin) mennyiségi meghatározására is (11).

Meg kell jegyezni azonban azt, hogy az ilyen oszlopváltással végrehajtott dúsító és meghatározó eljárás optimalása viszonylag jelentős időráfordítást igényel és az eljárás ezért elsősorban rutinmeghatározásokra látszik alkalmazhatónak. Ez vonatkozik különösen arra az esetre, amikor a meghatározandó komponensek és a zavaró összetevők között a szorpcióerősség különbsége nem elég nagy. Ha a hasonlóan abszorbeálódó anyagok koncentrációja nagy a retenció időik jelentéktelen ingadozása az elemzési adatok (csúcsvesztesség, nem kívánatos összetevők megjelenése a főoszlopon stb.) értékelését megbízhatatlanná teszi.

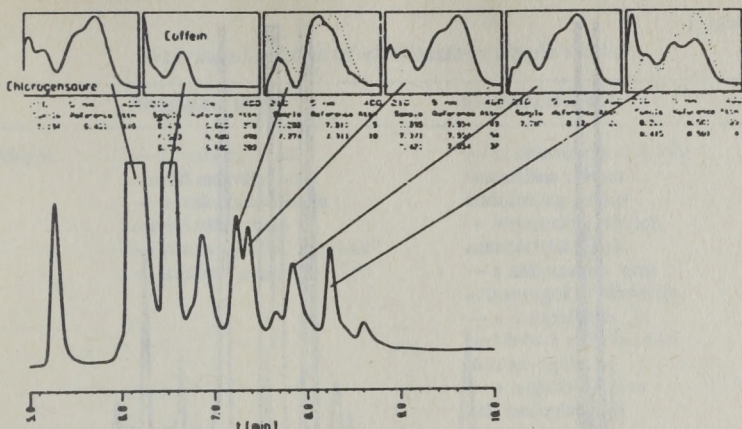
4. A HPLC összekapcsolása UV/VIS-spektroszkópiával

A kromatográfias eredmény a HPLC-ben elsődlegesen csupán mennyiségi. A detektorok megadják az oszlopról eluálódó anyagok koncentrációit g/ml-ben. A minőségi hozzárendelés csak közvetve, a megfelelő összehasonlító anyagokkal való egyeztetés, a retenció időik alapján lehetséges. A minőségi eredmények biztonságos érdekében célszerű az elválasztást legalább egy másik rendszerben megismételni. Emiatt kísérlék meg a HPLC-t más fizikai-kémiai elemzési eljárással összekapcsolni.

A folyadékkromatográfia közvetlen összekapcsolása más fiziko-kémiai elemzési eljárással zavartalanul csak az UV/VIS spektroszkópiával sikerült. Az IR-spektroszkópiával történő összekapcsolás elvileg lehetséges, de a használható kromatográfias eluensek megválasztása erősen korlátozott és az IR-tartományban a viszonylag kis fajlagos abszorbancia miatt viszonylag jelentős mintakonzentráció szükséges. Ugyanez vonatkozik az NMR-spektroszkópiával való összekapcsolásra is. A tömegspektrometriával (MS) történő összekapcsolás eluens-megosztással (split) (13, 14.), ill. mikrooszlopokkal és újabban thermospray-ionizációval lehetséges (15, 16.) Az utóbbi eljárással mind pozitív, mind negatív ionokat lehet előállítani és értékelni. A készülékek jelentős költsége azonban erősen korlátozza rutinszerű alkalmazásukat. Ennek következtében az itt alkalmazott ionizációs eljárásokat szinte kizárólag az eluátummal befogott anyagok molekulacsúcsainak, ill. molekulatömegének meghatározására alkalmazzák. A molekulatöredékek képződése igen ritka, így a szokásos tömegspektrometriás információ tartalom nem érhető el, csak ha lehetséges az így nyert molekulaiont egy második tömegspektrométeren szétördelni (HPLC/MS/MS-összekapcsolás).

A folyadékkromatográfianak az UV/VIS-spektroszkópiával történő közvetlen összekapcsolására jelenleg számos diodasor-detektor áll rendelkezésére. A készülékek (ehhez alapfeltétel megfelelően csatlakoztatható számítógéprendszer) lehetővé teszik a kromatogram (koncentrációk valamely hullámhosszon az adott időben) és a UV-spektrum (a hullámhossznak megfelelő extinkció) egyidejű felvételét. Ez az ún. háromdimenziós ábrázolás (3D-Plots) különösen színes képernyőn igen hatásos, de meggyőző erejük a kromatográfus számára ennek ellenére igen korlátozott (pl. a nagy abszorpció csúcsok más komponensek csúcsait eltakarhatják, amelyek csak a háromdimenziós ábrázolások tükrözése útján válnak felismerhetőkké). Sokkal meggyőzőbbek a grafikus ábrázolások, amelyeknél az azonos abszorpciójú pontok, mint a térképeken a magasságvonalak, egymással össze vannak kötve. Fontos kiegészítő információkat kapunk a csúcs tisztaságáról, azoknak a spektrumoknak az összehasonlítása által, amelyeket a csúcs fel-, majd pedig a leszálló ágán vettünk fel. Így az azonos kromofor csoportokkal rendelkező komponensek (azonos vegyületcsoportból) is igen könnyen felismerhetőkké válnak.

A 4. ábra zöld kávé vizes kivonatának kromatogram-részletét mutatja (17). A kromatogram mellett a különböző időpontokban felvett UV-spektrumok is szerepelnek. Ezáltal lehetővé vált a csúcsok anyagának azonosítása. A 6,52 percnél eluálódó csúcs egyértelműen a koffeinnek felelt meg. A spektrumok felmenő (6,47 perc) és leszálló ága (6,58 perc) jellemző. A csúcs nem tartalmaz más összetevőt. A spektrumok összehasonlításával a klorogénsav különböző izomérjei azonnal felismerhetők. Így ha a különböző összetevők együttesen eluálódnak, azok akkor is könnyen meghatározhatók (pl. a jobb oldali spektrumfelvétel, a spektrumot a 8,22, ill. 8,42



4. ábra Diodosor-detektor

Kromatogram-részlet bemutatása az egyes komponensek UV-spektrumával.

Zöld kávéextrakt (Robusta) vizes kivonatának kromatográfiája.

Elválasztás: RP 18-on gradiens elucióval.

A eluens: 0,5%-os foszforsav; B eluens: metanol

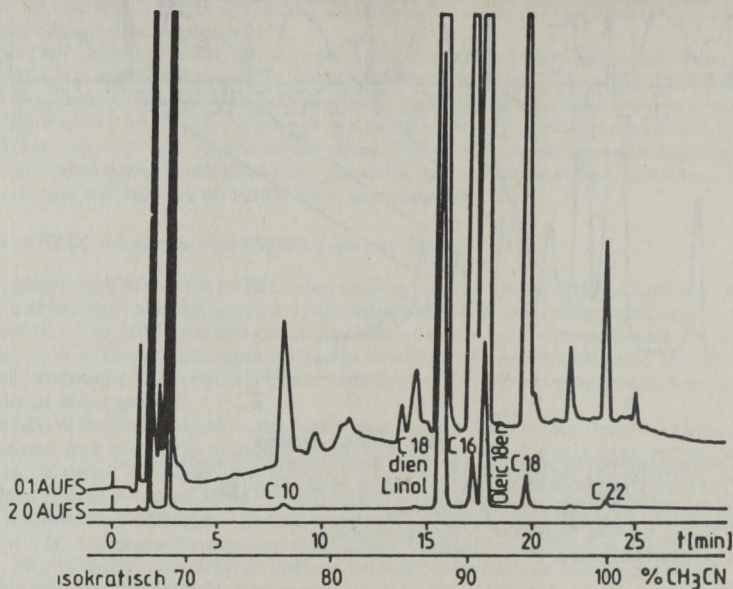
A program időtartama 10 perc

percen vették fel). Ennek során nélkülözhetetlen, hogy a nyers adatokat a számítógép elraktározza és a továbbiakban feldolgozza. Például elvégezheti az egyes komponensek mennyiségi meghatározását mindenkor az abszorpciós maximumban, de a kalibrációs görbe szélesebb, lineáris tartományát is felöllelheti.

Ezen túlmenően ez az abszorpciós spektrumok (a spektrumok maximuma, minimuma és lefutásuk, a normalizált spektrumok tartományának integrálása és annak lefutása által stb.) azok retenció ideje és karakterisztikája még a spektrumkönyvtárban megtalálható spektrumok adataival is összehasonlítható, így lehetővé válik a keverékekben az ismert komponensek egyértelmű minőségi azonosítása (18). Ehhez a feladathoz a számítógép-ráfordítás nem túlzottan jelentős, természetes a kromatográfia körülményeit állandónak kell tartani, mivel az abszorpció helye és erőssége az UV-spektrumok esetén szolvokrom hatással jelentősen befolyásolható. Ilyen számítógépes eljárással lehetőség mutatkozik olyan anyagok egyértelmű azonosítására, amelyek spektrumai kis hullámhossznál csak végabszorpciót mutatnak. Természetesen az ilyen összehasonlításnál a minta koncentrációja nem lehet kevesebb 10 ppm-nél, mert különben a számítógép zaja hibás értékelést okozhat.

5. A kimutatás érzékenységének javítása származékképző reakciókkal

A kimutatás érzékenységének javítására színes származékok előállítására a minták komponenseinek elválasztása előtt vagy után kerülhet sor. A hagyományos eljárásnál az elválasztás előtti származékképző reakció alkalmazása esetén egyáltalán nincsenek korlátozások. Kedvező mindenesetre az elválasztó rendszert úgy optimálni, hogy a reagenssel esetleg képződő melléktermékek a minta meghatározandó komponenseitől elválva eluálódjanak, hogy azok a meghatározást ne zavarják. Az 5. ábra a zsírsavak fenacilésztereinek szakaszos eluciójára mutat be példát zsírhidrolizátumból (18). Esetenként az elválasztást megelőző származékképzés a



5. ábra Zsír-sav-fenacilészter szakaszos aluciója margarinból

Grádiens-elució RP 18-on

A eluens: 70% acetonitril vízben, B eluens: acetonitril

A program időtartama 20 perc

mennyiségi meghatározást megnehezíti. Például a több funkciós csoporttal rendelkező vegyületek gyakran különböző származékokat adnak.

Jóllehet az előtétoszlopos származékképzés tulajdonképpen jellegzetes off-line eljárás, újabban a HPLC-készülékekhez kiegészítő tartozék járul, s így az on-line előtétoszlopos származékképzés közvetlenül az elválasztóoszlop előtt lehetséges. Kereskedelemben kaphatók olyan előtétoszlopok, amelyekkel az aminosavak o-ftál-aldehiddel (OPA) és 9-fluorenil-metil-klór-hangyasavészterrel (FMOC) alkotott származékok képezhetők. Az 1. táblázat a származékképzés előnyeit és hátrányait foglalja össze az elválasztás előtt és után.

Az oszlop után történő származékképzés esetén a kémiai reakcióval és a detektorokkal szemben egészen mások a követelmények (19). Az eluátumban levő anyag és a reagens között lejátszódó reakciónak teljesnek és mennyiséginek kell lennie és ez alatt a mintaszívásban zavaró mértékű diszperzió nem léphet fel. A jelentős diszperzió mindig a kimutatás érzékenységének romlásához vezet. Az eluensnek és a reagensnek természetesen nem szabad egymással reagálnia. A reagensétől eltérőnek kell lennie a reakciótermékek abszorpciójának és/vagy fluoreszcenciájának. A készülék költségráfordítása jelentősen nagyobb oszlop utáni származékképzés esetén. A reagens szállítására az állandó átfolyást lökésmentesen szolgáltató, korrozíóálló pumpa szükséges. Reaktorként töltött oszlopokat, szakaszosan átengedő nyitott csöveket vagy mértani alakzatú nyitott csöveket lehet alkalmazni (20). A 2. táblázatban a reaktorok különböző detektor-rendszereinek előnyeit és hátrányait állították össze. Az igen lassú (az 5 percet meghaladó idejű) reakciók esetén a szakaszos rendszer előnyös, míg a rövid (mintegy 1 perces) reakcióidők és agresszív

Származékképzés az elválasztás előtt és után

Elválasztás előtt	Elválasztás után	
Előnyök	<ul style="list-style-type: none"> — a reakciófeltétek szabad megválasztása — a reakcióidő tetszés szerint választható — standard HPLC készülék* — standard oszlopok 	<ul style="list-style-type: none"> — az összetevők szelektív detektálása számos kísérőanyag mellett — folyamatos, teljesen automatizált eljárás — a származékot nem adó anyagok elválasztása — a reagensek és az eszközök a szétválasztást nem zavarják — a reakciónak nem kell mennyiségileg lefutnia
Hátrányok	<ul style="list-style-type: none"> — a reakciónak egyértelműen és mennyiségileg le kell futnia — zavarok — a reagensfelesleg és az eszközök miatt — a többfunkciós vegyületek sokféle származéka képződhet — olykor szükséges előtisztítási lépés — a származékoknak azonos stabilitásúaknak kell lenniük 	<ul style="list-style-type: none"> — megfelelő összetett készülék kell — a reaktorban hígít a reagensadagolás és a sávok kiszélesednek — az eluenssel össze kell hangolni a reagent és a reakciófeltételeket — a reagens és a reakciótermékek optikai tulajdonságainak különbözniük kell

reagensek esetén a hurokszerűen kialakított reaktorok előnyösek. A diszperzió hurokszerű reaktorok esetén sem függ az áramlás sebességétől.

Oszlop utáni származékképzéshez csatlakozó reakciódetektor alkalmazásakor a kromatográfiai rendszer változatlan marad. Az aminosavak elválasztása ioncserélő kromatográfiával elérhető. Korszerű (pl. hurokszerű reaktorok alkalmazásával és OPA-del az aminosavak a pg-tartományban detektálhatók. A 6. ábra vörösbor aminosavainak kationcserélő oszlopon való szakaszos elucióját mutatja, ahol a detektálás OPA-reakciódetektorral történt (21).

A cukrok erősen alkálikus közegben ($\text{pH} > 10$) anioncserélőn választhatók el (22). A redukáló és a nem redukáló cukrok kimutatása timol/kénsav-reagenssel elvégezhető (23). Még ilyen erősen viszkozus és agresszív reagensek is használhatók. A cukrok kimutatása optimális rendszerekkel ng-tartományban is sikerült (24). A 7. ábra különböző vidékek fehér borait hasonlítja össze eltérő cukortartalmuk alapján. Mindkét bor teljesen kiforrott volt, mivel fruktóz- és glükóz-tartalmuk jelentéktelenül tért el a többi cukorétól. Lehetségesnek mutatkozik a borok különböző cukrainak koncentráció-viszonyai alapján a szőlők érettségét jellemezni.

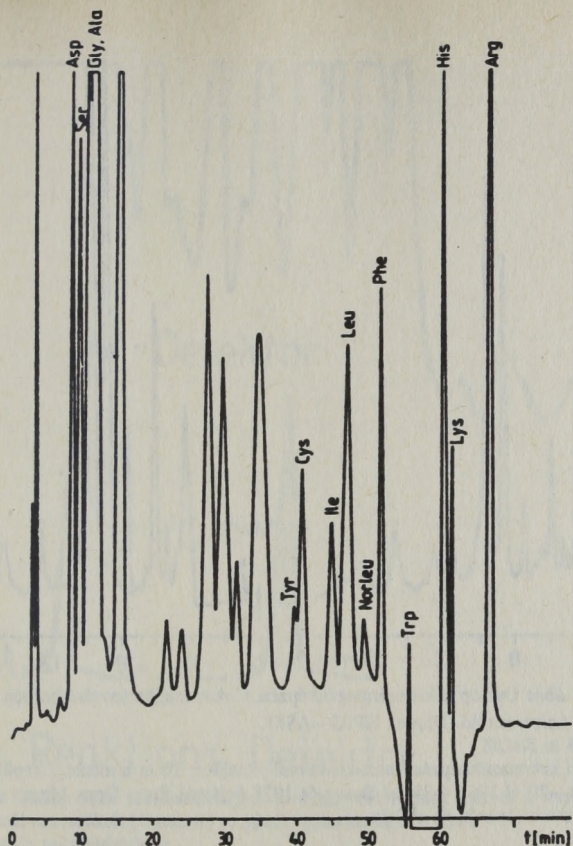
*nem érvényes HPLC-készülékhez kapcsolt automatikus oszlop előtti származékképzés esetén

Reaktortípusok összehasonlítása a reaktordetektorok számára

	Töltött reaktorok	Nyitott reaktorok	
		burkolt	légbuborékkal elválasztott
Előnyök	<ul style="list-style-type: none"> — egyszerűen előállítható — a töltet a reakcióhoz megválasztható (katalízis) — lehetséges nagyobb hőmérséklet alkalmazása 	<ul style="list-style-type: none"> — egyszerűen előállítható — a diszperzió nem függ az átfolyástól — jó hőcserélő — a nagyobb hőmérséklet nem okoz gondot (120 °C-ig teflon, felette acél) 	<ul style="list-style-type: none"> — csekélyebb nyomásnövekedés — lehetséges hosszabb reakcióidő — többlépcsős reakciók könnyen végrehajthatók — olcsó reagens pumpák (tömlős szivattyúk)
Hátrányok	<ul style="list-style-type: none"> — dugulás veszély — a töltet agresszív reagensekkel szembeni stabilitása — a töltet hőfelvétele rossz — a nyomásesés összeadódik egészen az össznyomásig 	<ul style="list-style-type: none"> — a nyomásesés adódik egészen az össznyomásig (a tényező 2—3-szor nagyobb, mint egyenes csöveknél) 	<ul style="list-style-type: none"> — fázisválasztásnál erős keveredés — korlátozott hőmérséklet-tartomány (gőznyomás) — a cső anyaga (nedvesedés) befolyásolja a diszperziót
Optimális felépítés	<p>15 μm-es szemcseméret</p> <p>20 μm-es szemcse méret</p> <p>Töltött elválasztó oszlopok esetén használatos 7—10 μm-es szemcseméret</p>	<p>0,25 mm-es belső átmérő használatos 10—25 cm hosszú oszlopon</p> <p>3—5 μm-es szemcseméret</p> <p>0,35 mm-es belső átmérő</p>	<p>—</p> <p>1 mm-es belső átmérő, az elválasztási gyakoriság mp-ként: 2 buborék</p>
Optimális reakcióidő	5 és 1 perc között	<p>0,35 mm-es belső átmérő esetén</p> <p>5 és 1 perc között</p> <p>0,25 mm-es belső átmérő esetén</p> <p>1 perc alatt</p>	5 perc alatt

További előny mutatkozik a kémiai reakció szelektivitásából adódóan, ami lehetővé teszi számos nem reagáló kísérőanyag mellett egyes anyagok, ill. vegyületsoportok összetett rendszerben történő kimutatását. Az előbb említett példa szerint lehet a borban mind az aminosavakat, mind a cukrokat mindenkor szelektíven detektálni. A többi összetevő előzetes vagy utólagos elválasztása nem történik meg. A detekció ilyen szelektivitásának előnyei jelentősek, pl. a zöldségek karbamát-pesticid maradéka elemzése esetén (25).

Gázkromatográfias meghatározáshoz a növényi kivonat költséges és veszteséges tisztítása szükséges többszörös megoszlási lépéssel. A HPLC esetében reakciódetektorral egyszerű metanol extrakciót követő centrifugálás elegendő. Amint a 8. ábra mutatja a reakciódetektoros meghatározás mindenkor lehetséges. A kromatogram, amelyet itt UV-detektorral vettek fel, nem tesz lehetővé azonosítást és mennyiségi meghatározást. A meghatározásokhoz itt többlépcsős reakciódetektort alkalmaztak. Az első lépésben a karbamátokat nátronlúggal elszappanosítják, majd a második reakciórendszerben ebből metilamint képeznek, amely OPA-del fluoreszkáló vegyületet ad és ezt határozták meg mennyiségileg.



6. ábra Oszlop utáni származékképzés, vörösbor aminosavainak grádiens-eluciója.

Oszlop: kationcserélő szilikagélén, grádiens, litiumcitrát-puffer pH2—pH7,5

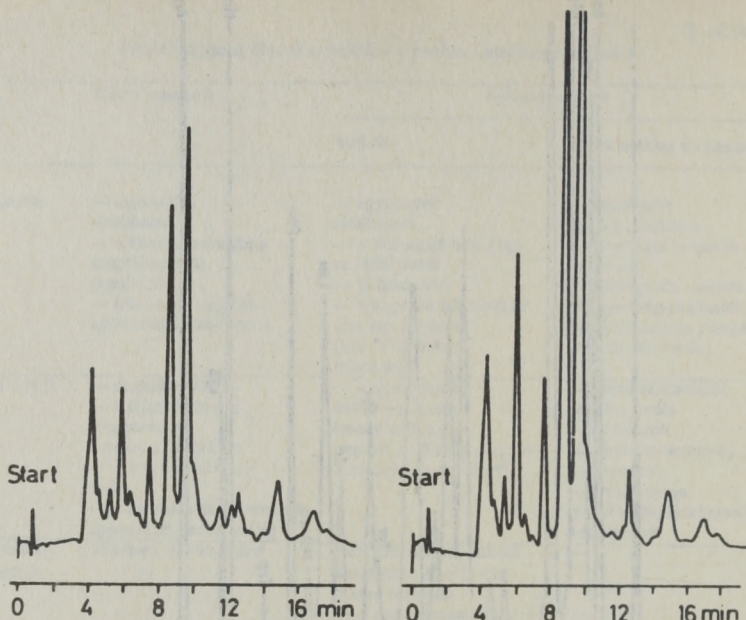
Oszlop utáni származékképzés o-ftal-aldehiddel, 10 m-es hurokszerű kapillárisban fluoreszcens-detekcióval.

Mintamennyiség: 5 μ l.

Az ilyenfajta reakciódetektor-rendszereket egy-egy adott meghatározásra optimálják. A vázolt nehézségek ellenére biztos, hogy a közeljövőben a származékképzési reakciók további lehetőségeit tárják majd fel, kiterjesztve ezzel azok alkalmazhatósági körét.

6. Kilitások

A HPLC analitikai módszerként való elterjedése még határozottan a növekedés szakaszában van. A komponensek kimutatásának korlátozása az UV/VIS spektrumtartományban nem jár súlyos következményekkel. A kémiai reakciódetektorban a hátrány megkerülésének lehetősége nyitva áll. Az utóbbi időben terjed a cseppfolyós (szuperkritikus) gázok, különösen a széndioxid mozgó fázisként való alkalmazása. Ennek előnye az, hogy a nehezen illó vegyületek kisebb hőmérsékleten és ezáltal kíméletesebben választhatók el, mint gázkromatográfiával. Az érzékeny



7. ábra Oszlop utáni származékképzés. Cukor meghatározása borban.

Elválasztás: anioncserélő (Dionex HPIC—AS6)

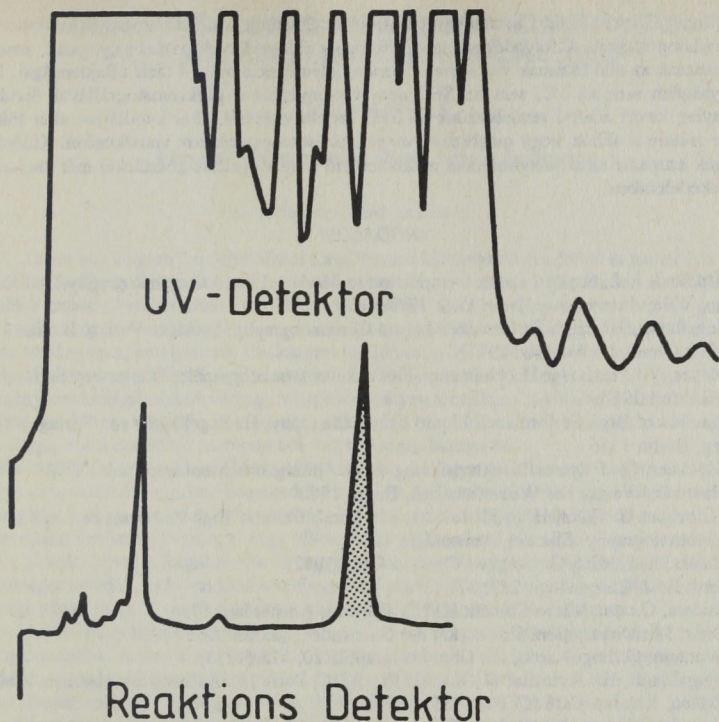
Eluens: 0,15 m NaOH

Oszlop utáni származékképzés timol-kénsavval. Reaktor: 10 m hurkszerű kapilláris. Minta-mennyiség: 20—20 ul 1982 évjáratú Soave és 1978 évjáratú Enter Deux Mers.

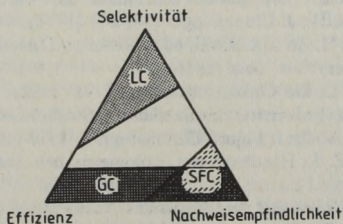
Mindkét fő csúcs fruktóz és glükóz.

lángionizációs detektorok is használhatók itt, ami a komponensek érzékeny kimutatását nem színes vegyületek esetén is lehetővé teszi. Mindenesetre ekkor széndioxidra, kéjgázra és xenonra (1 kg: 6000 DM) korlátozódik a használat. Minthogy e cseppfolyós közegek fizikai-kémiai tulajdonságai inkább a folyadékokhoz, mint a gázokéhoz hasonlít, a kapilláris gázkromatográfia nagy hatékonyságát a mozgó fázisként való elválasztással biztosan nem lehet elérni, hanem azok ugyancsak csekély diffúziós tényezőjük miatt közelebb állnak a folyadékkromatográfiai oszlopokéhoz. A nagy forráspontú apoláris anyagok elválasztására a szuperkritikus gázokat mozgó fázisként alkalmazó kromatográfia mégis bizonyos előnyöket nyújthat. Ennek az elválasztási rendszernek a szelektivitása, még a gáz-, ill. a folyadékkromatográfiában eddig alkalmazott álló fázisokkal is, teljesen ismeretlen. A cseppfolyós közegek eluálóképessége úgy látszik sűrűségükkel növekszik. További előnyt jelent a szuperkritikus gázokkal való extrakció kombinációja a kromatográfiával ugyanabban a közegben. A 9. ábra a mai szemlélet alapján értelmezi a kromatográfiai eljárás előnyeit három különböző mozgó fázis esetén.

A gázkromatográfia előnyei az elemzés gyorsasága és a detektorok érzékenysége (pl. a lángionizációs /FID/ és az elektronbefogó /ECD/ detektor stb.). Ezenkívül a gázkromatográfia egyszerűen összekapcsolható más fizikai-kémiai eljárással, mint amilyen többek között az MS-, az FTIR spektroszkópia. Ha mozgó fázisként cseppfolyós széndioxidot alkalmaznak, akkor az ún.



8. ábra Oszlop utáni származékképzés szelektív detektálása számos kísérőanyag mellett. Karbamát-maradékok (Curaterr) meghatározása kelkáposztában
Kétlépcsős reakciódetektor



9. ábra A különböző mozgó fázisú (gáz, folyadék, cseppfolyós) kromatográfiai eljárások előnyei

szelektivitas
hatékonyság érzékenység
LC folyadékkromatográfia
GC gázkromatográfia
SFC szuperkritikus folyadékkromatográfia

SFC (Super Critical Fluid Chromatography)-ról beszélhetünk, amely biztosan összevethető a gázkromatográfiával. A folyadékkromatográfia nagy előnye szelektivitásán nyugszik, amelyben nemcsak az álló fázisnak van szerepe, hanem jelentősek a mozgó fázis tulajdonságai. Hatékonyágban sem az LC, sem az SFC nem versenyezhet a gázkromatográfiával. Ezideig viszonylag kevés adattal rendelkezünk az SFC szelektivitásáról, akár kapilláris-, akár töltött oszlop esetére is ahhoz, hogy megbízható megállapítást tehesünk erre vonatkozóan. Különböző cégek szuperkritikus széndioxiddal működtethető kromatográfiai készülékei már kaphatók a kereskedelemben.

IRODALOM

- (1) Kirkland, J. J., Snyder, L. R.: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, Wiley-Interscience, New York 1979
- (2) Engelhardt, H.: High Performance Liquid Chromatography, Springer-Verlag, Berlin 1979 (Deutsche Ausgabe 1977)
- (3) Meyer, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Diesterweg-Salle, Frankfurt 1983
- (4) Practice of High Performance Liquid Chromatography, H. Engelhardt, ed., Springer-Verlag, Berlin 1986
- (5) Glöckner, G.: Polymercharakterisierung durch Flüssigkeitschromatographie, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1980
- (6) Guiochon, G. Colin, H. in Pl. Kucera, ed., Micro Column High Performance Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1984
- (7) Halász, I., Görlitz, G.: Angew. Chem. 94, 50 (1982)
- (8) Emi, F.: J. Chromatogr. 282, 371 (1983)
- (9) Kucera, O.: ed., Micro Column HPLC, Elsevier, Amsterdam 1984
- (10) Dühr, M.: Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1985
- (11) Jaumann, G. Engelhardt, H.: Chromatographia 20, 615 (1985)
- (12) Engelhardt, H., Jaumann, G., König, Th.: ASIC, Paris 1986; Chemical Abstracts-Zitat: Colloq. Sci. Int. Café (C. R.) 1985, 11th, 213
- (13) Guiochon, G., Arpino, P. J.: J. Chromatogr. 271, 13 (1983)
- (14) Arpino, P. J.: J. Chromatogr. 323, 3 (1985)
- (15) Alexander, A. J. Kebarle, P.: Anal. Chem. 58, 471 (1986)
- (16) Günther, W.: Labo, Mai 1986, S. 94 ff.
- (17) König, Th.: Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1986
- (18) Engelhardt, H., Elgass, H.: J. Chromatogr. 158, 249 (1978)
- (19) Lillig, B., Engelhardt, H.: in I. S. Krull, ed., „Reaction Detection in Liquid Chromatography”, Marcel Dekker, New York; 1986
- (20) Engelhardt, H., Neue, U. D.: Chromatographia 15, 91 (1982)
- (21) Lillig, B.: Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1984
- (22) Rocklin, R. D., Pohl, A. C.: J. Liquid Chromatogr. 6, 1577 (1983)
- (23) Kakác, B., Vejdelek, Z. J.: Handbuch der photometrischen Analysen, Verlag Chemie, Weinheim 1974—83
- (24) Ohs, P.: Dissertation Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1986
- (25) Engelhardt, H., Lillig, B.: Chromatographia 21, 136 (1986)