

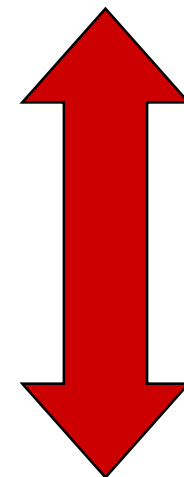
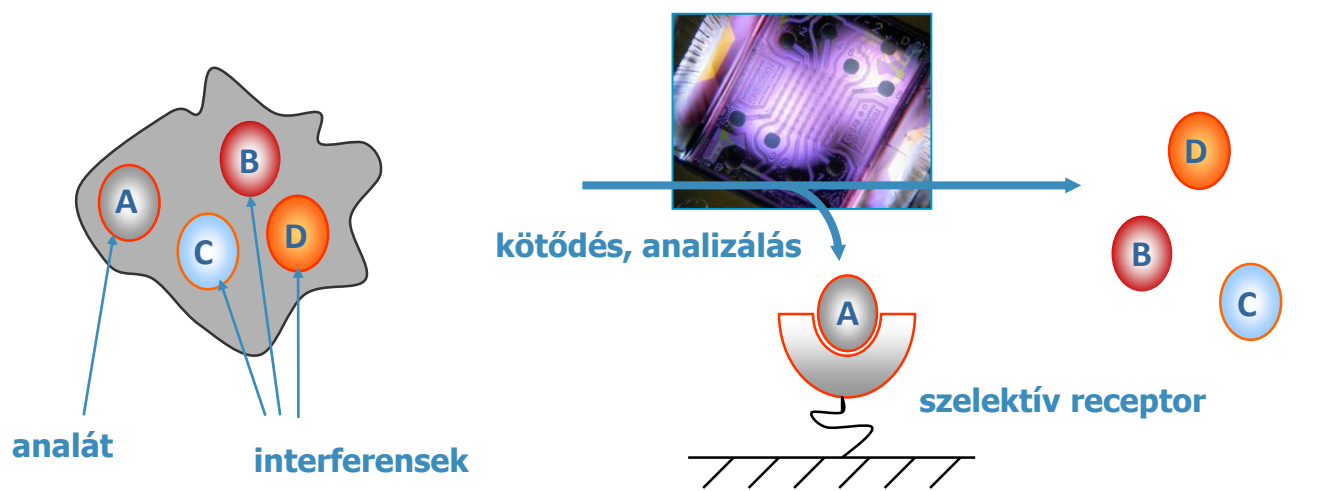
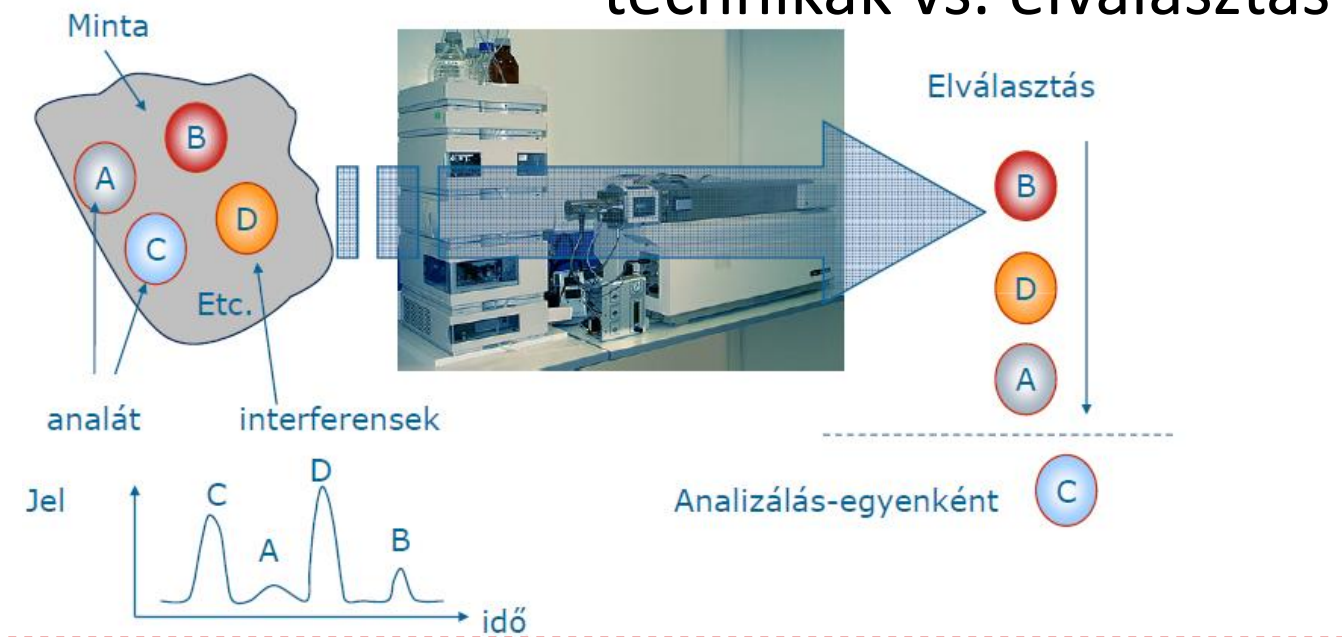
# **Kromatográfia**

**HPLC rész**

**Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék**

2017/2018. őszi félév

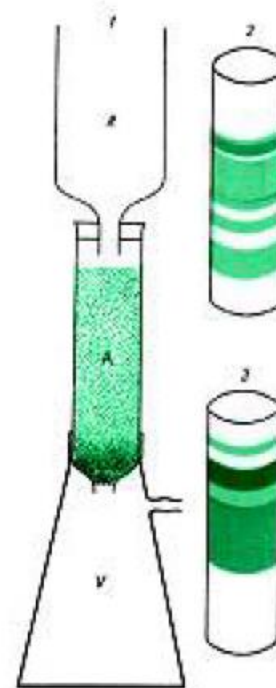
# Nem-szelektív, elválasztáson alapuló mérési technikák vs. elválasztás nélküli, szelektív módszerek



# Cvet, az első kromatográfus

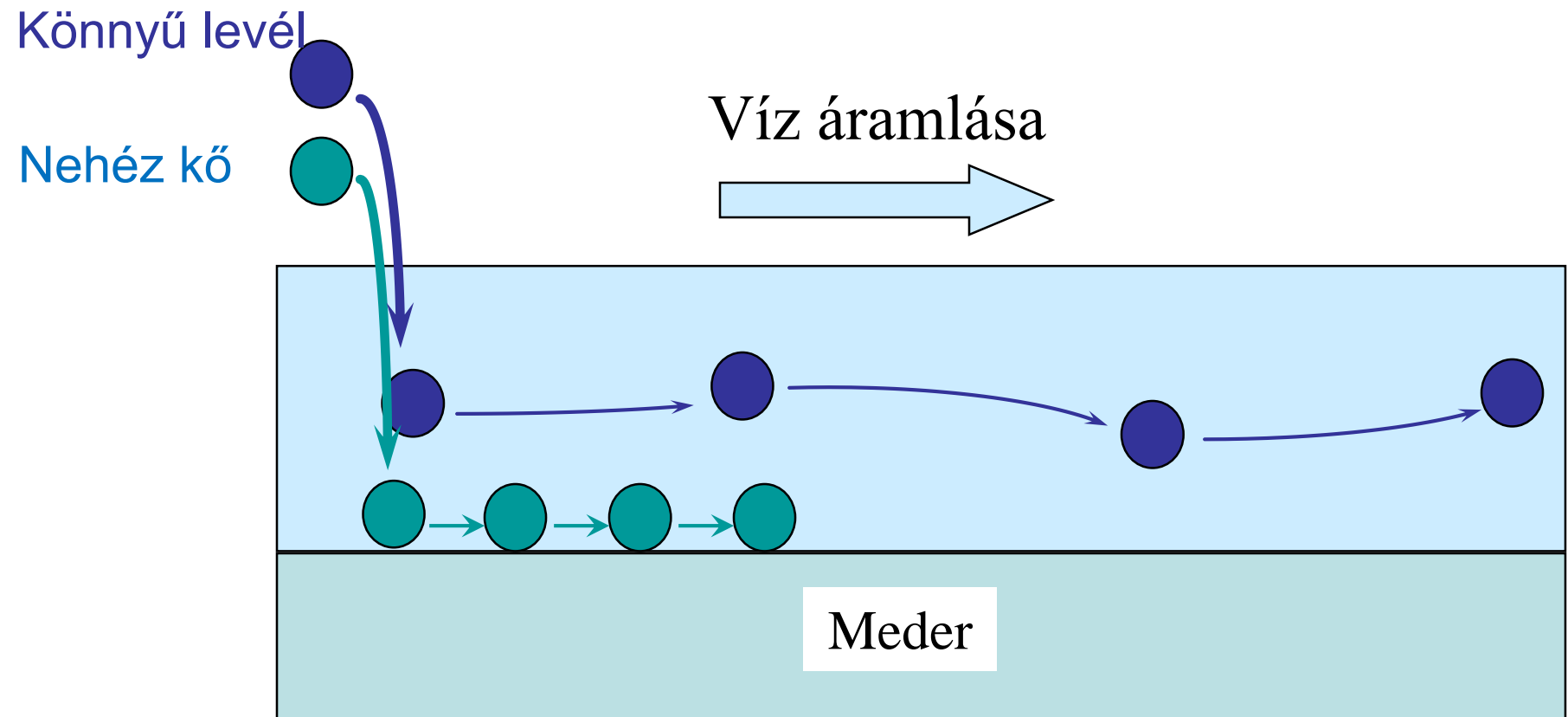


Russian Botanist  
Mikhail Tswett (1872-1919)

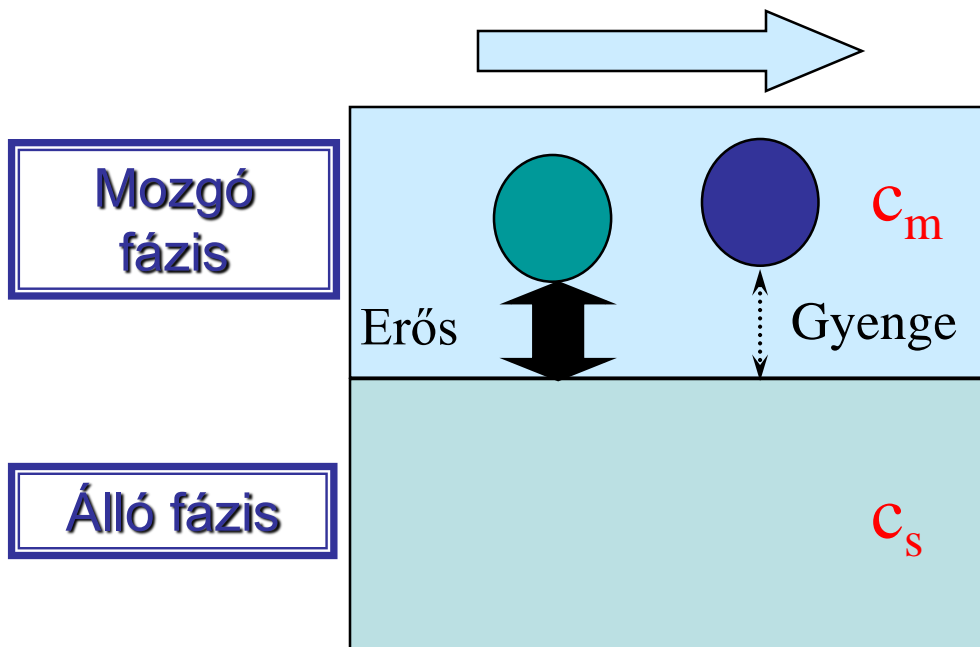


From Tswett's notebook (1910) on early  
chromatographic experiments

# A kromatográfia egy folyóhoz hasonlít



# Mozgó fázis/Álló fázis



A **mozgó fázis** az **álló fázissal** érintkezik egy határfelületen.

Egyenletesen áramlik.

Átlagos szorpciója kisebb mértékű, mint a legkevésbé kötődő minta komponensé.

→ **elúciós technika**

A **minta** bevitel dugószerűen történik.

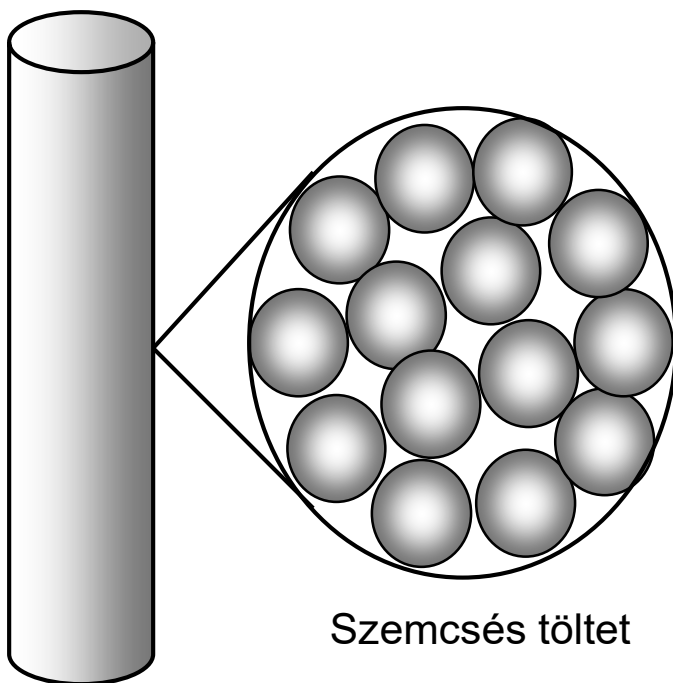
A különböző anyagoknak más-más a megoszlási hányadosa az álló fázison.

→ **Elválasztás** történik az anyagok különböző sebessége következtében.

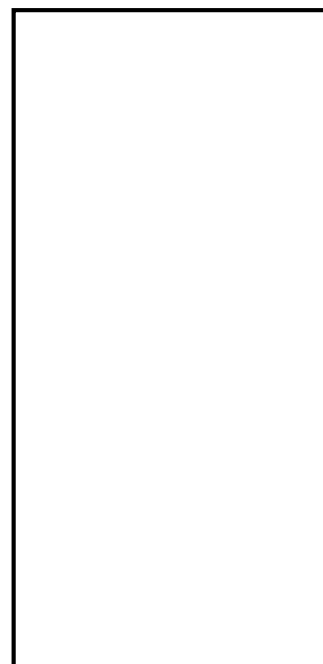
Megoszlási hányados: 
$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

# Oszlop kromatográfia / Réteg kromatográfia

Elválasztó  
oszlop



Oszlop kromatográfia



Papír, vagy  
szemcsékkel  
borított szubsztrát

Papír kromatográfia  
Vékonyréteg kromatográfia (VRK)

# A mozgó és állófázis állapota szerinti felosztás

		Mozgó fázis		
		Gáz	Folyadék	Szilárd
Álló fázis	Gáz			
	Folyadék	Gáz-kromatográfia	Folyadék kromatográfia	
	Szilárd			

# GC összehasonlítása HPLC-vel I.



Tipikus GC kapilláris oszlop  
30 m x 0,25 mm i.d.



Tipikus HPLC oszlop  
15 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m

## Meghatározható anyagok

- illékonyság (250°C alatt megfelelő tenzió)
- derivatizálás hibát vihet be a kvantitatív mérésbe
- molekulatömeg: < 500 Da

- oldékonyság a mozgófázisban
- széles polaritási tartomány, ionos vegyületek is elemezhetők
- molekulatömeg: nincs felső korlát, fehérjék is



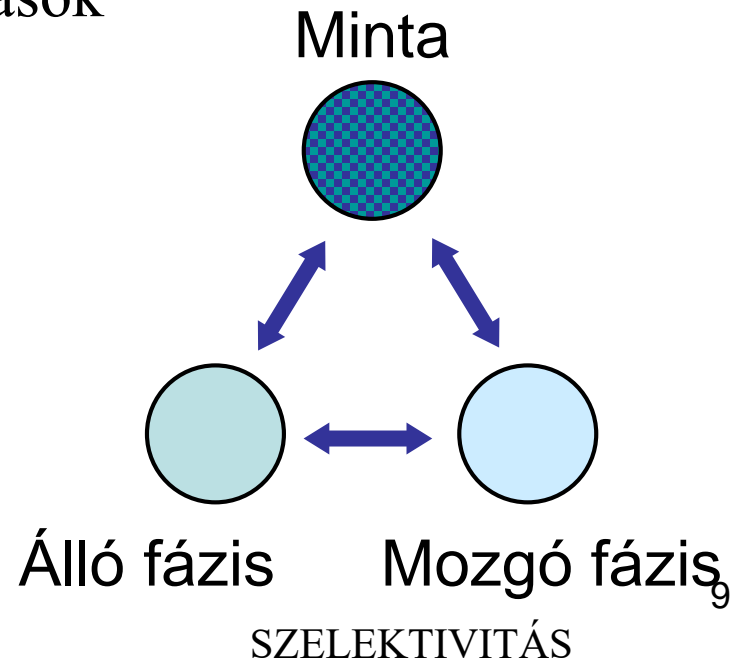
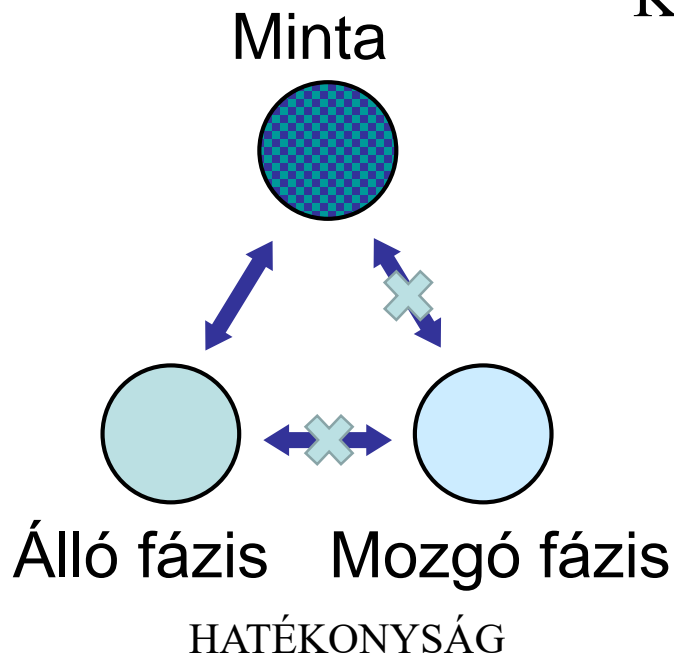
# GC összehasonlítása HPLC-vel II.

## Körülmények

magas hőmérséklet (akár 350°C)  
→ hőstabilitás  
sok GC detektor (pl. FID) destruktív  
tipikus érzékenység: ng-pg

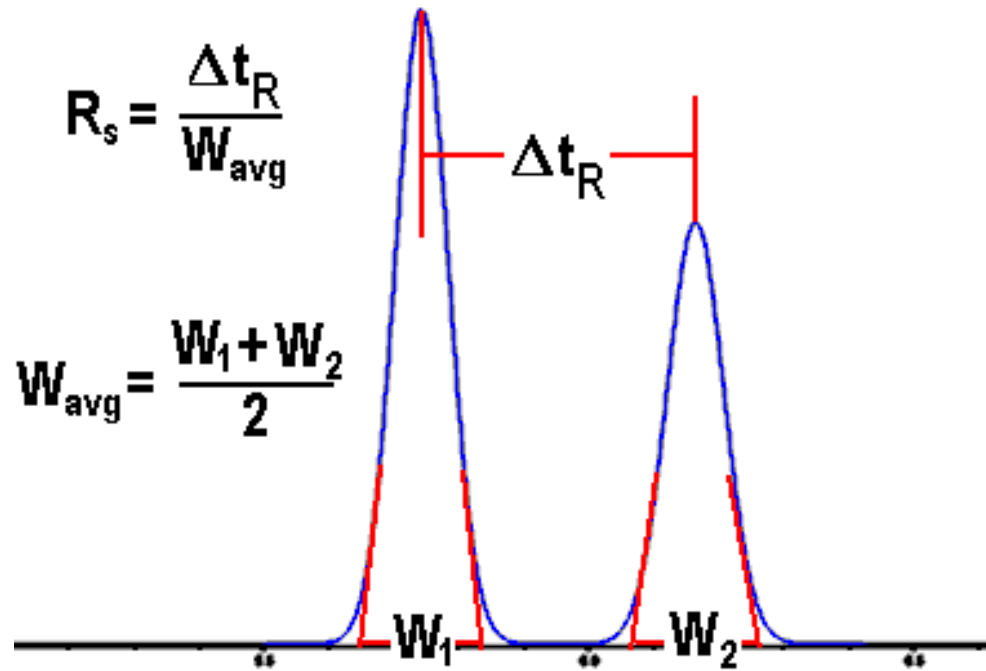
szobahőmérséklet (80°C-ig)  
az UV detektor nem destruktív  
tipikus érzékenység: ng

## Kölcsönhatások



# HPLC elválasztási módok

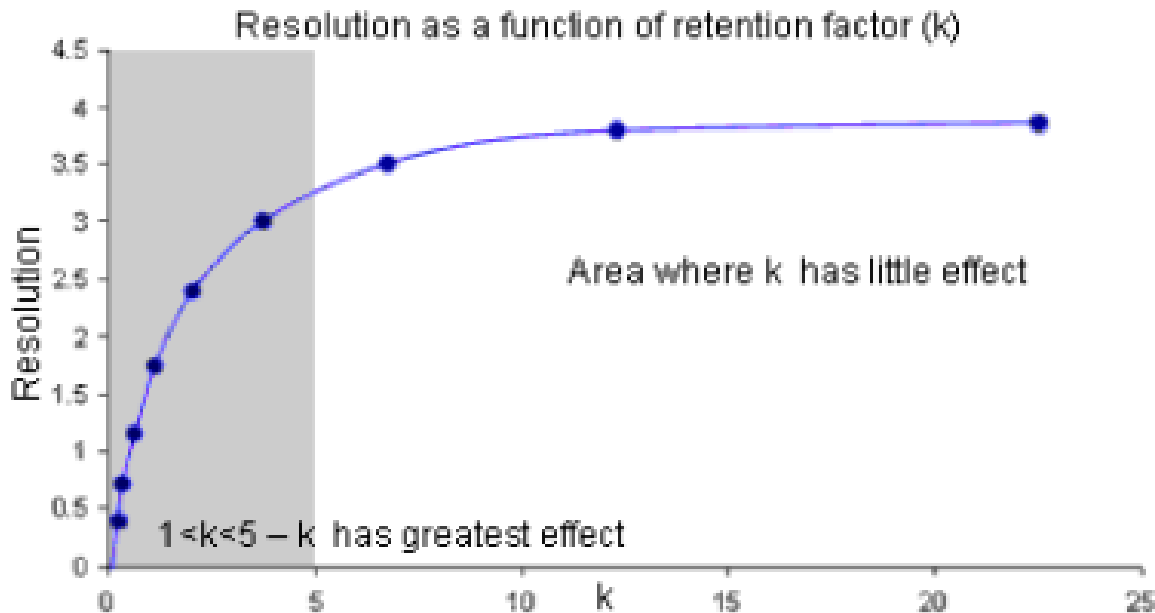
Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis	<b>Apoláris</b> C18, C8, C4, ciano, amino	<b>Poláris</b> Víz/szerves módosítók
Vízben oldhatatlan vegyületek	Normál fázis	<b>Poláris</b> Szilikagél Alumínium oxid	<b>Apoláris</b> Szerves oldószerek/poláris módosítók
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár	C18, C8	Víz/szerves oldószerek- ionpárképzők
Ionos vegyületek, szervetlen ionok	Ioncsere	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes/puffer ellenion
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol szilika	Gél szűrés - vizes Gél permeációs - szerves



$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k + 1} \geq 1,5$$

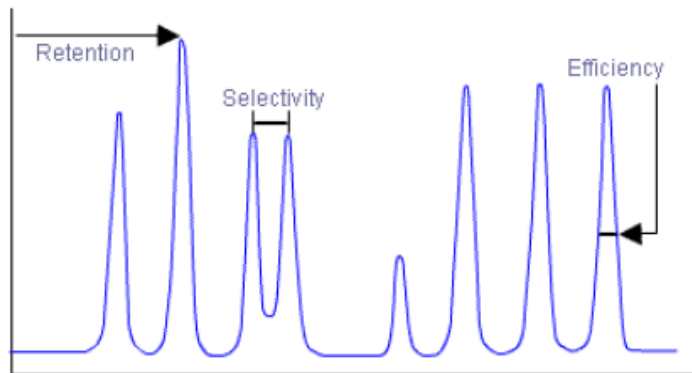
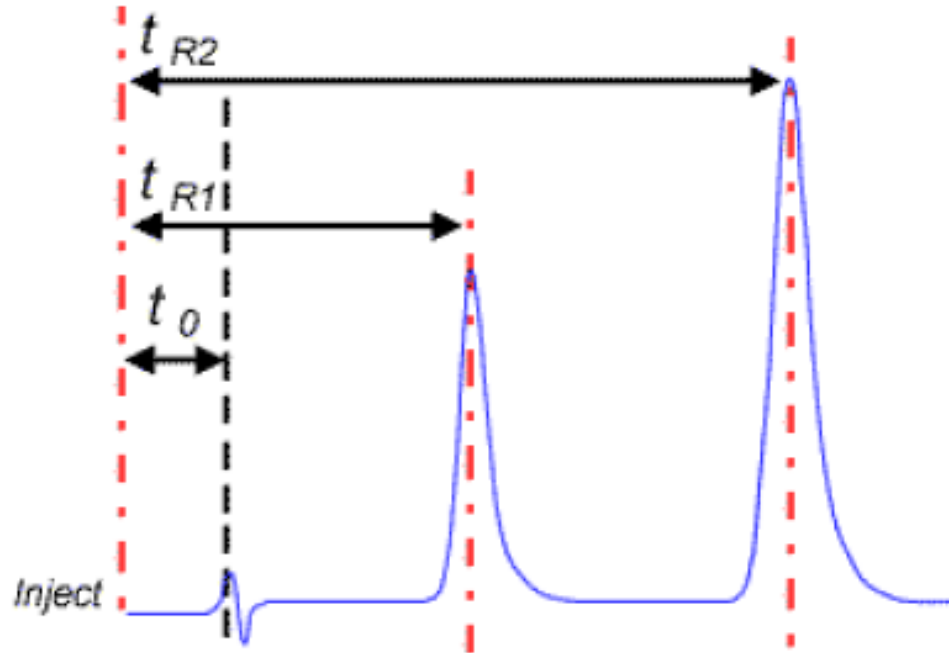
# Hogyan befolyásolja az elválasztást a retenciós tényező?

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \left( \frac{k}{k + 1} \right)$$



$$1 < k < 10$$

# Szelektivitás



$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Mivel tudjuk a szelektivitást befolyásolni?

mindennel, ami megoszlási hányadost befolyásolja:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2 \frac{V_s}{V_m}}{K_1 \frac{V_s}{V_m}} = \frac{K_2}{K_1}$$

## Paraméter

Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

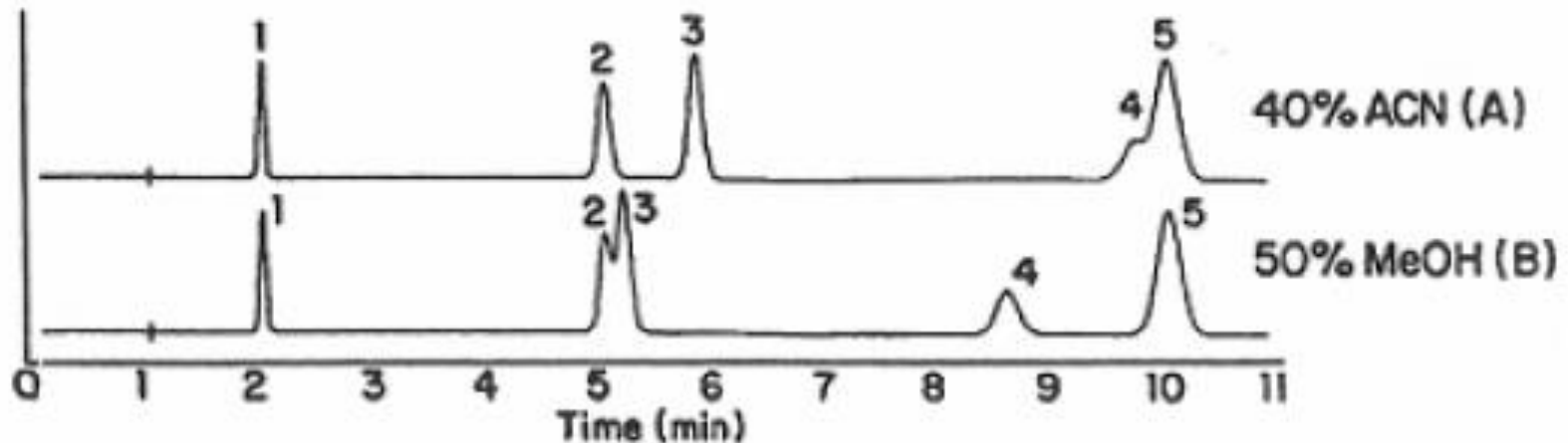
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

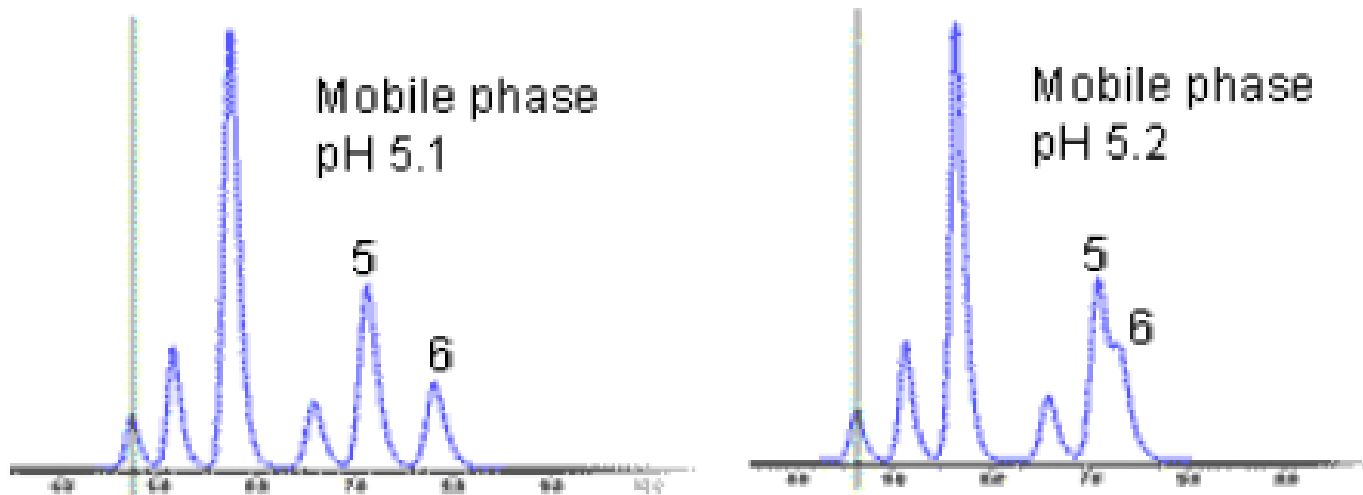
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet





# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

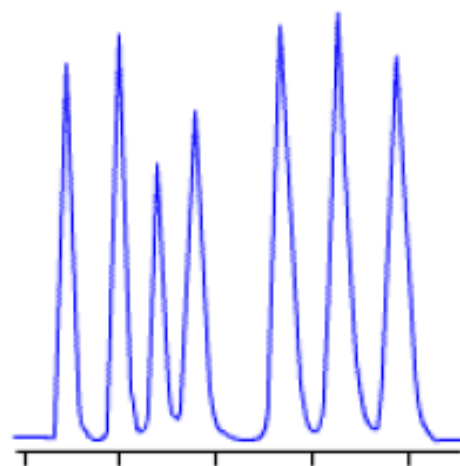
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

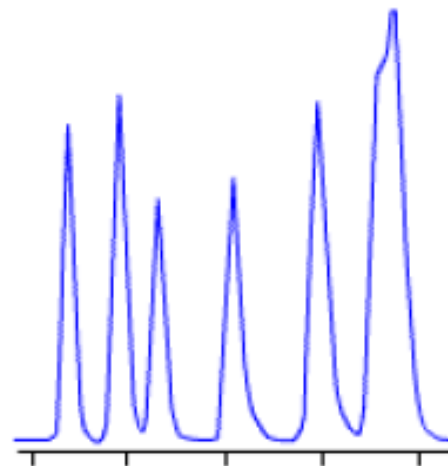
Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Mobile phase octane  
sulphonic acid conc.: 57mM



Mobile phase octane  
sulphonic acid conc.: 60mM

# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

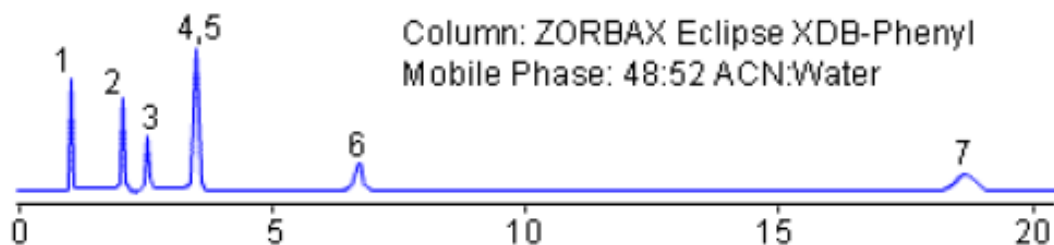
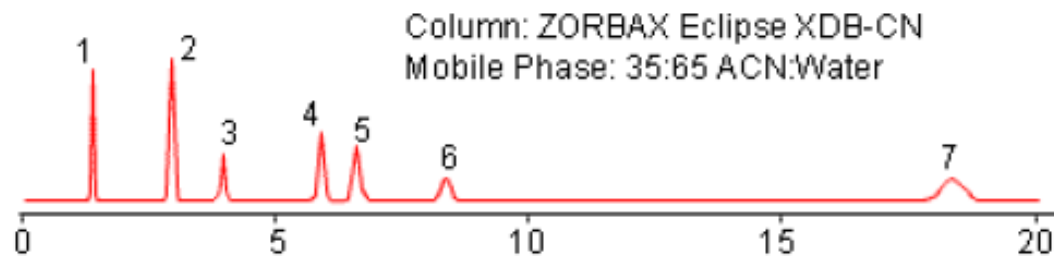
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



# Hogyan befolyásoljuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

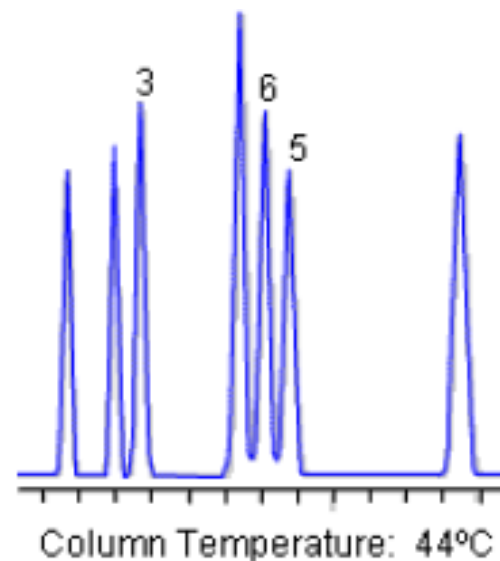
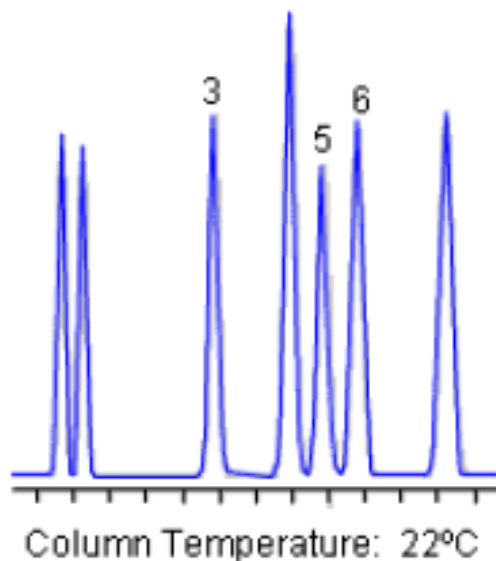
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

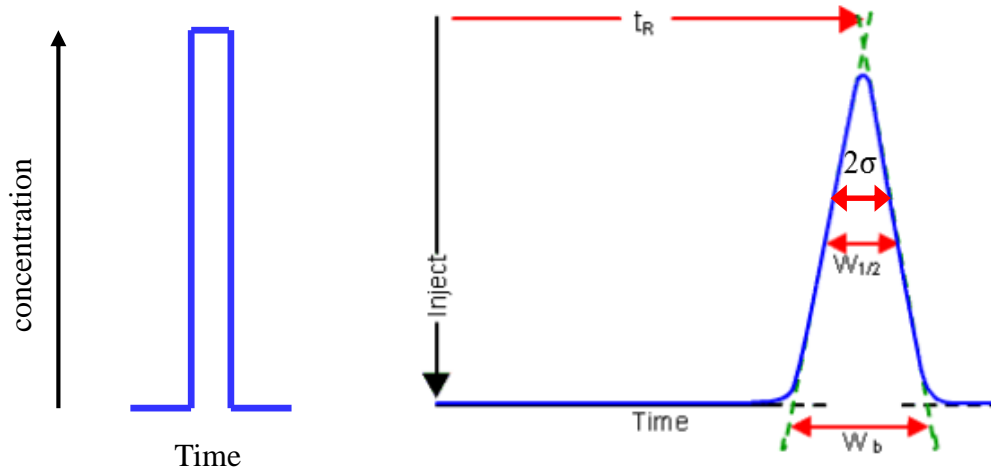


# Hogyan befolyásolja az elválasztást a szelektivitás?

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

- Ha  $\alpha = 1$ , nincs elválasztás
- Ha  $\alpha$  1,1-ről 1,15-re nő, akkor a felbontás ~1,5-szörösére nő!
- $\alpha = 1,1$  feletti szelektivitás értékek már a rutin HPLC-ben jó elválasztást biztosítanak,  $R_s > 1,5$ .
- $\rightarrow K_2$  10%-kal nagyobb, mint  $K_1$ .
- Folyadék-folyadék extrakciónál, hogy 99% tisztaságot elérjünk 2 anyagra, az kell, hogy
- $K_1 = 100$  és  $K_2 = 0,01$ , vagyis  $\alpha = 10.000$  kellene.

# Hatékonyság



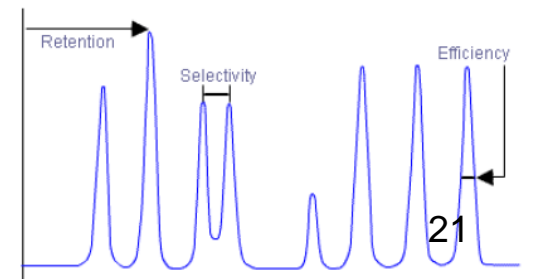
zónaszélesedés v.  
zónadiszperzió

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

$$w_{1/2} = 2,35482\sigma$$

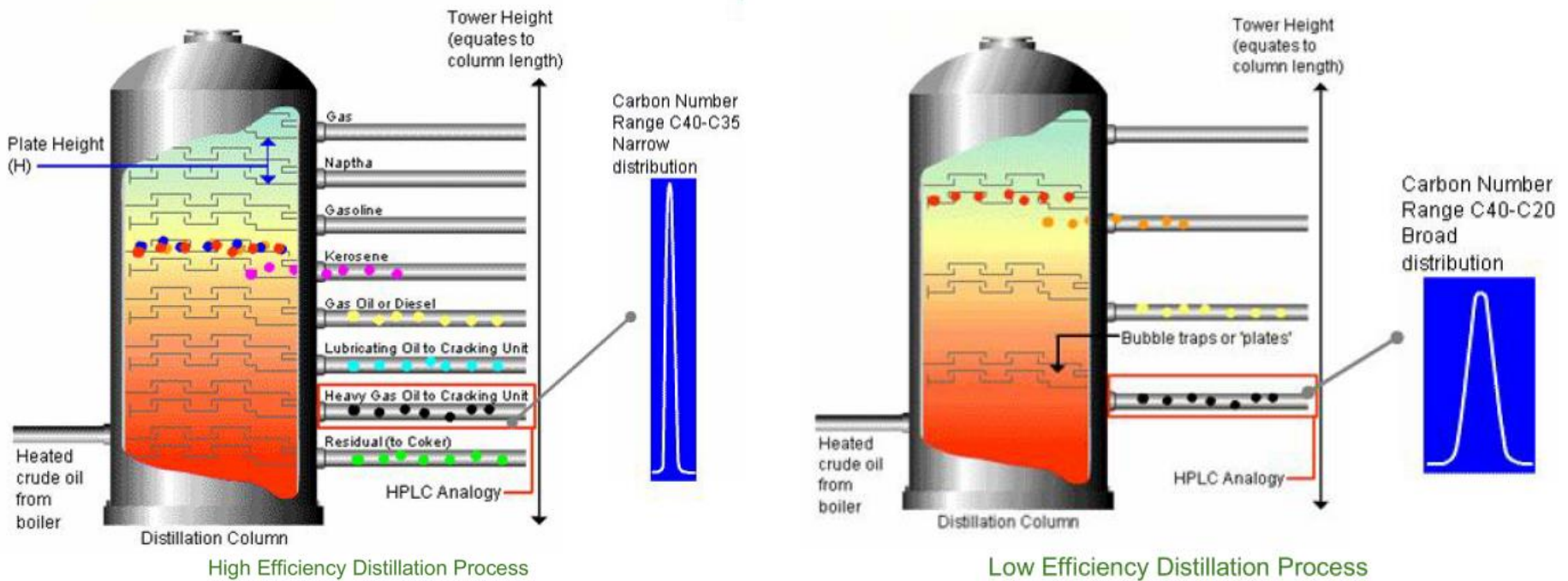
$$w_b = 4\sigma$$

- $N$  elméleti tányérszám
- $t_R$  retenciósi idő
- $W_b$  alapvonalon mért csúcshélesség
- $W_{1/2}$  csúcs félmagasságánál mért csúcshélesség



# Hatékonyság

Elméleti tányérszám: analógia frakcionált desztilláció

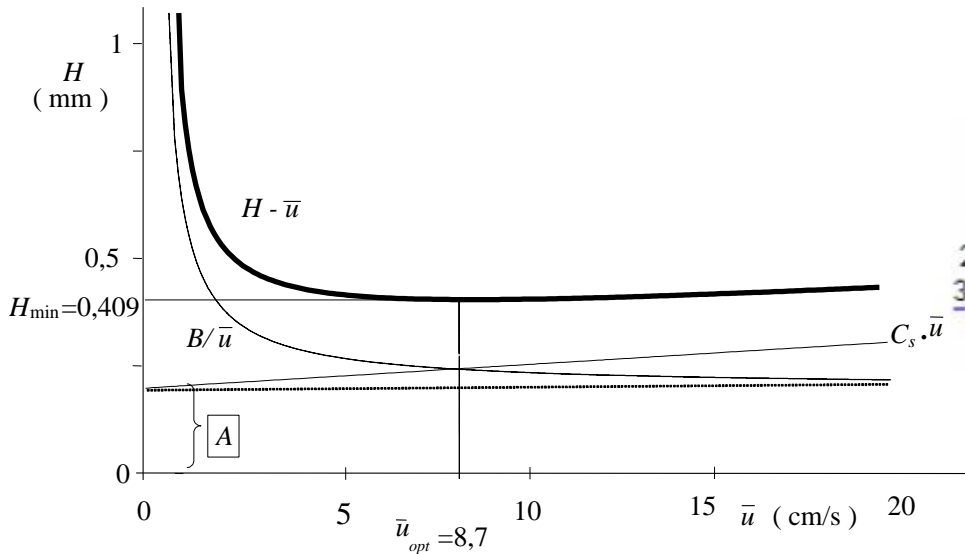


$$N = \frac{L}{H}$$

H elméleti tányérmagasság HETP height equivalent to a theoretical plate  
L oszlop hossza

# van Deemter egyenlet (HPLC kolonnákra és töltött GC oszlopra!)

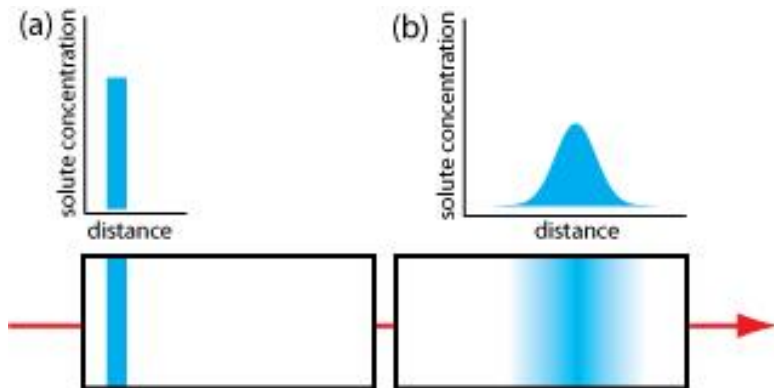
$$H = A + B/u + C_s u$$



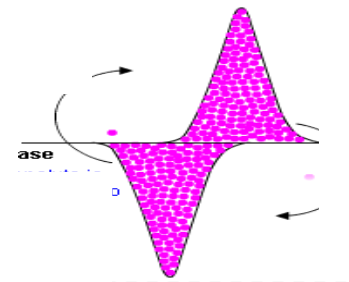
„A” tag: eddy (angolul örvény) „diffúzió”



„B” tag: lineáris diffúzió



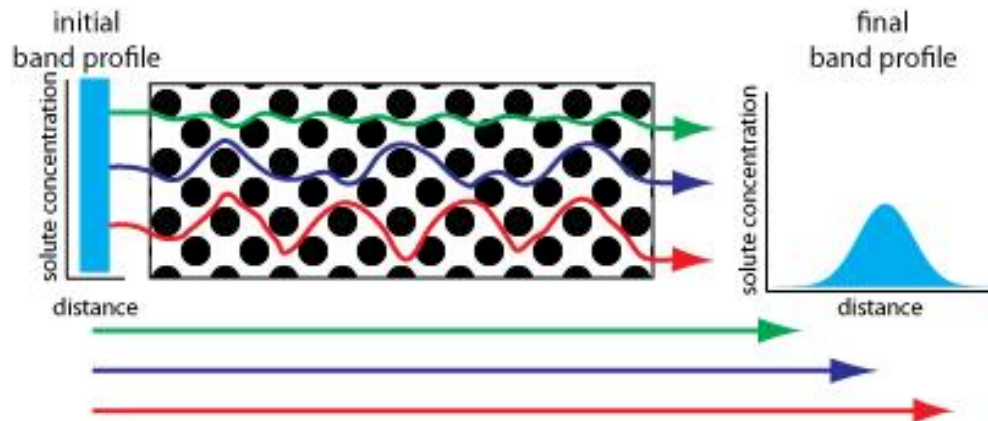
„C<sub>s</sub>” tag: állóf. → mozgóf. anyagátmenet ellenállása



# Mi okoz zónaszélesedést?

## 1. Örvénydiffúzió - A

- eltérő áramlási csatornahosszak és keresztmetszetek
  - kolonna töltés inhomogenitásai
  - szemcseátmérő nem teljesen egyforma
- a kolonnában az áramlási sebesség sugárirányban változik – lamináris áramlási profil



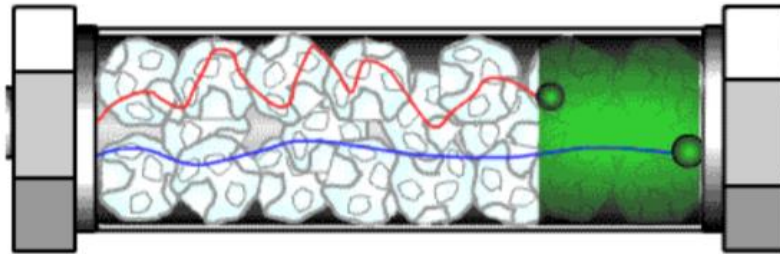
az áramlási sebességtől független

$H \sim A$

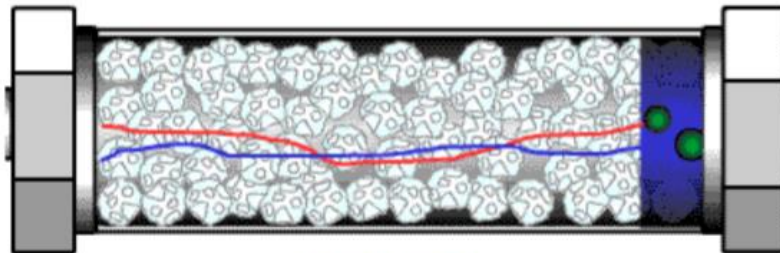


# Örvénydiffúzió csökkentése

- jól töltött kolonna választása
- szemcseméret csökkentése
- szűk szemcseméret eloszlás



Large Particles



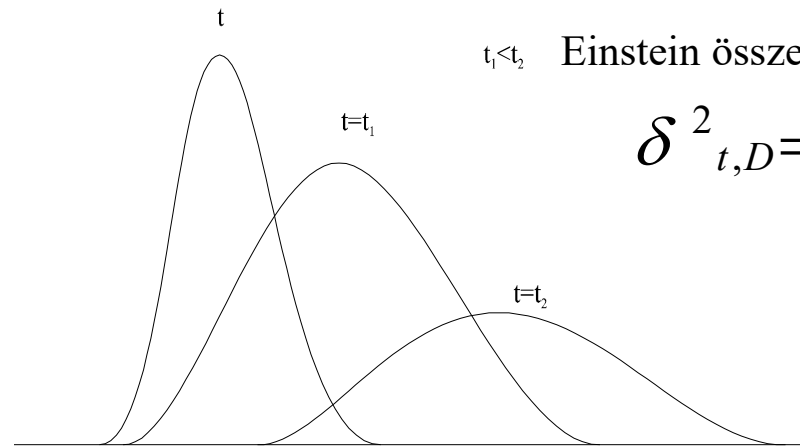
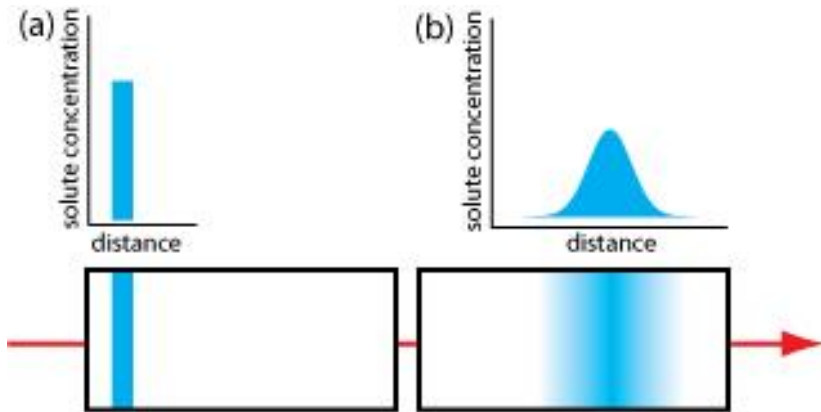
Small Particles

# Mi okoz zónaszélesedést? 2. Hosszirányú diffúzió - $B$

a beinjektált mintadugó szélein a koncentrációgradiens miatt longitudinális (hosszirányú) diffúzió történik

- legerősebb az oszlopon
- oszlopon kívül is

túl hosszú, vagy túl nagy átmérőjű kapillárisok  
csatlakozások  
detektor cella



$t_1 < t_2$  Einstein összefüggés

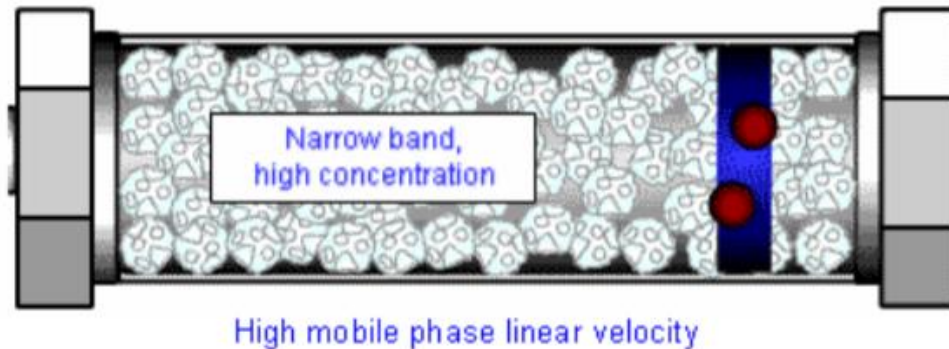
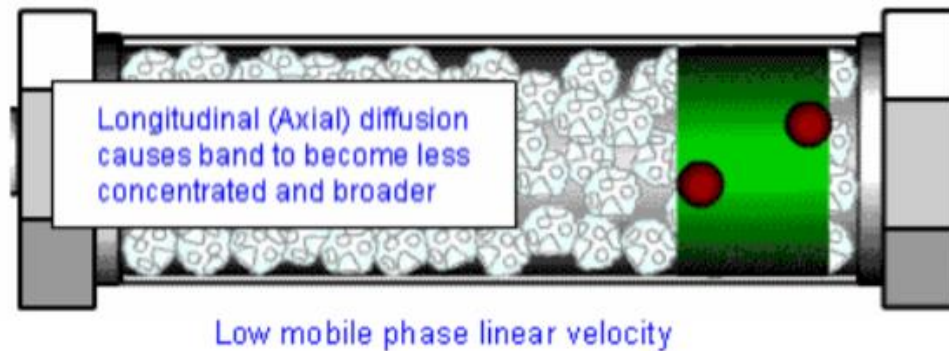
$$\sigma^2_{t,D} = 2Dt$$

az áramlási sebességgel fordítottan arányos

$H \sim B/u$

# Oszlopon történő hosszirányú diffúzió csökkentése

- nagyobb áramlási sebesség alkalmazása



# Az oszlopon kívüli zónaszélesedés csökkentése

Hogyan mérjük meg az oszlopon kívüli térfogatot?

1.szedjük ki az oszlopot és tegyünk be helyette egy 0 holtterefogatú csatlakozót

2.injektáljunk 100% acetonitrilt, vagy 1% acetont

3.az oldószercsúcs maximumnál mérjük meg a retenciós időt

4.a térfogatáram és a retenciós idő szorzatából megkapjuk az oszlopon kívüli holtterefogatot.

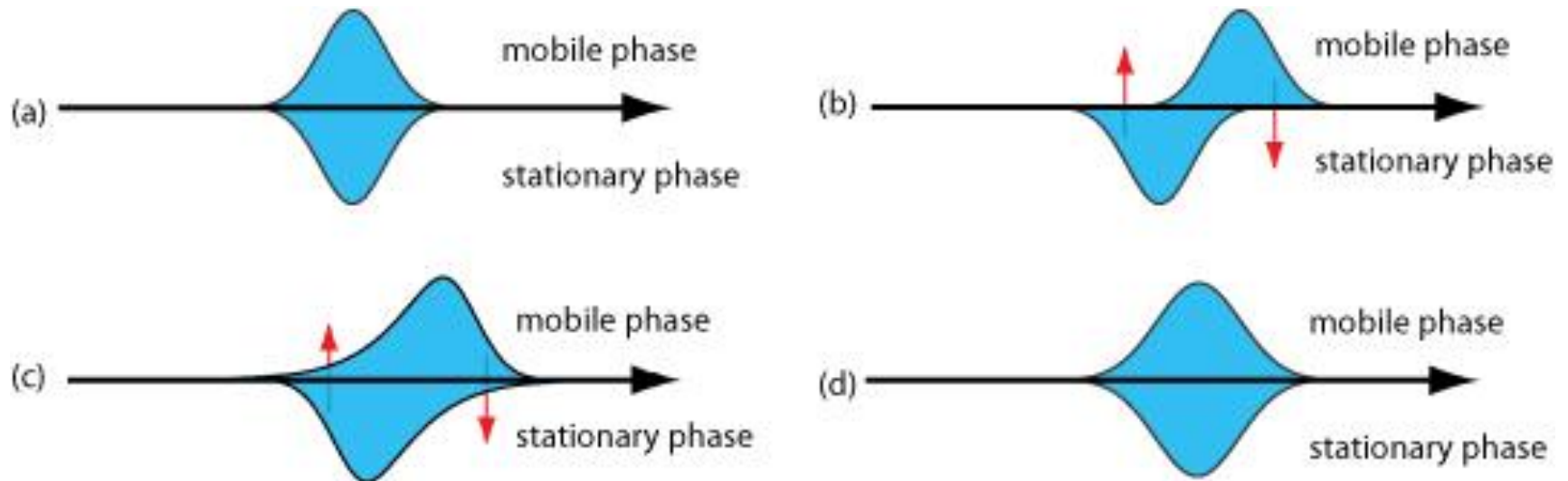
- minél rövidebb és kisebb átmérőjű kapillárisok használata (0.12 mm belső átmérő ideális)
- megfelelő fittingek, csatlakozók használata (minél kevesebb csatlakozás)
- injektor hurok térfogatának csökkentése
- detektor cella térfogatának csökkentése

# Mi okoz zónaszélesedést?

## 3. Anyagátadási ellenállás - C

az állófázisból a mozgófázisba történő anyagátmenet nem pillanatszerű (kvázi-egyensúly kialakulása)

- a pórusokon belül diffúzióval jut a felületre a molekula  $\rightarrow C_m$
- a molekula az állófázisban/ból is diffundál  $\rightarrow C_s$



az áramlási sebességgel egyenesen arányos

$H \sim C_u$

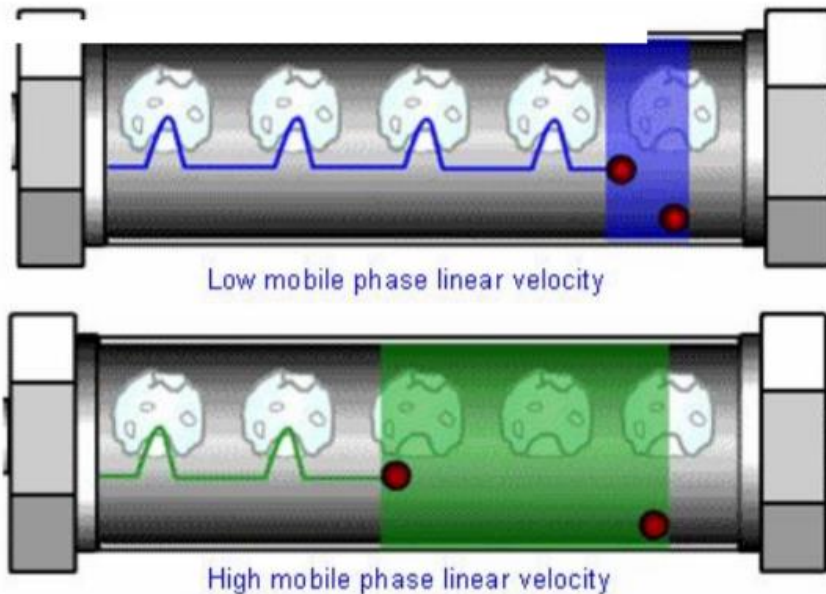
# Anyagátadási ellenállás

A folyadékkromatográfiában az anyagátadási ellenállás vagy másképp a **kvázi-egyensúly eltérése az egyensúlyi állapottól** okozza a legnagyobb zónakiszélesítő hatást.

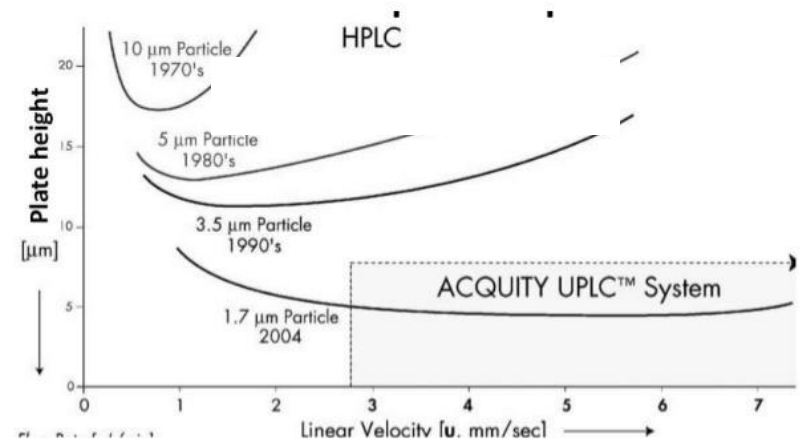
- tapadó réteg a szemcsék felületén
- pórusokon belüli nem áramló, de a mozgófázis összetételével megegyező folyadék
- adszorpciós felületi rétegek a pórusokon belül és a szemcséken kívül, ebből több mint 99,9% a belső felület.

# Anyagátadási ellenállás csökkentése

- kisebb szemcseméretű állófázis
- áramlási sebesség csökkentése
- kolonnahőmérséklet emelése (gyorsabb diffúzió)



Why is UPLC more efficient??



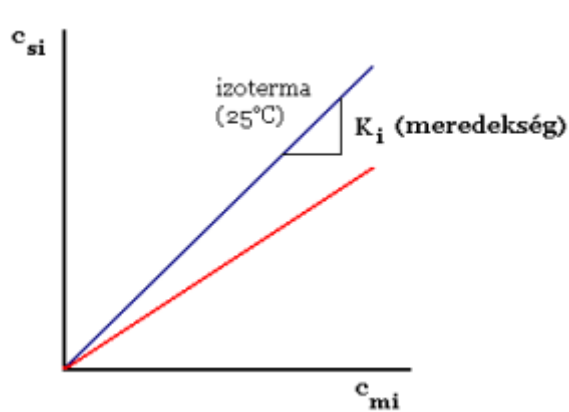
11/1/2014

6

# Megoszlási hányados, adszorpció izoterma

Mérése: egy termosztált edényben

1. ismert mennyiségű állófázist, eluent és analátot összerázunk
2. megvárjuk az egyensúly beállítását
3. meghatározzuk az analát koncentrációját az eluensben:  $c_m$
4. az anyagmérleg alapján megkapjuk az állófázison az analát koncentrációját:  $c_s$

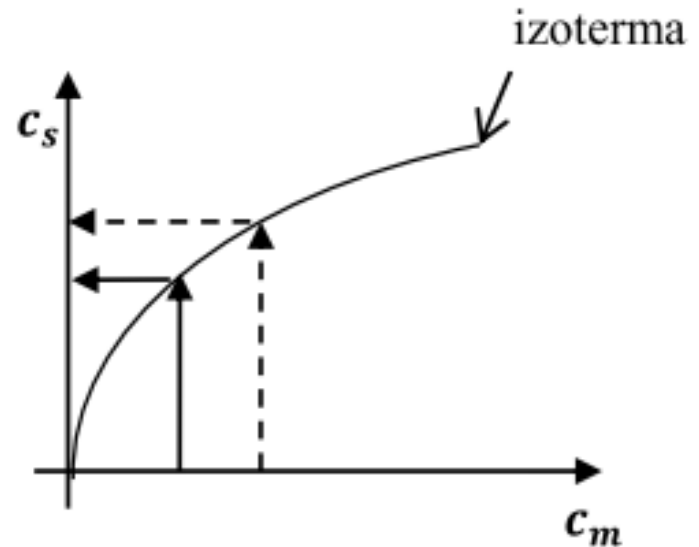


Az egyenes egyenlete:

$$c_s = K \cdot c_m$$

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

Lineáris izoterma

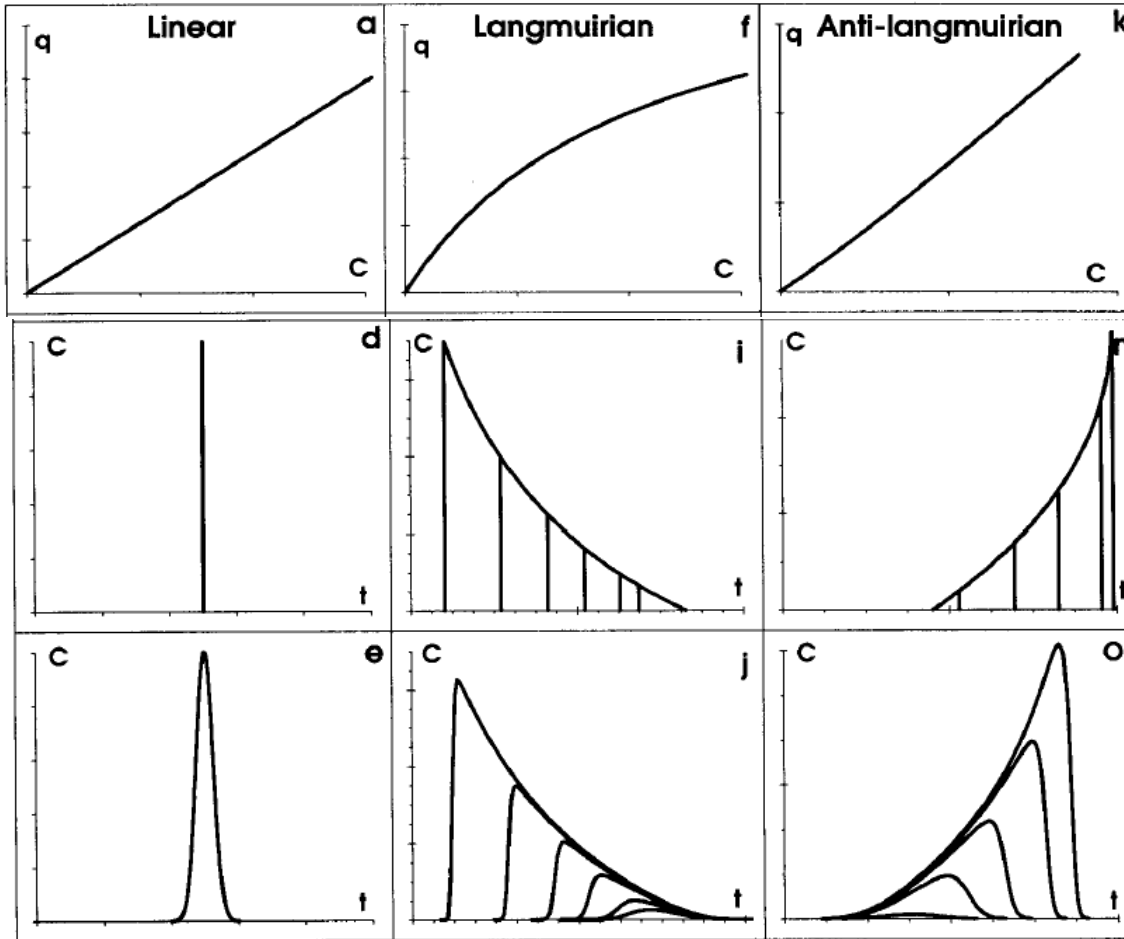


Nemlineáris izoterma



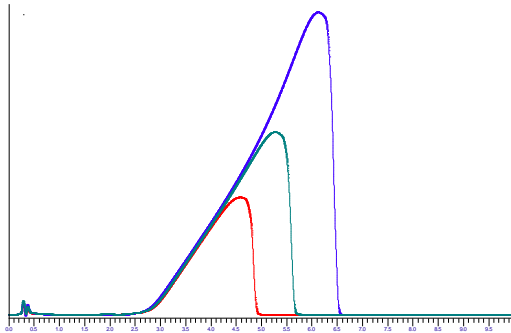
# Nemlineáris kromatográfia (főleg preparatív kromatográfias alkalmazások)

$N = \infty$

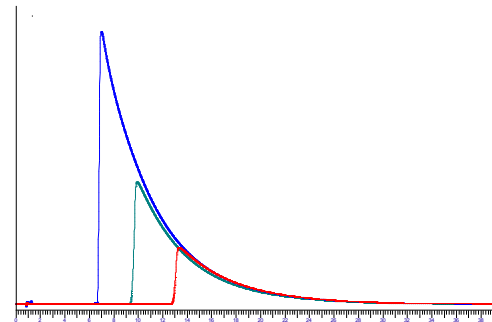


# Koncentrációfüggés a gyakorlatban

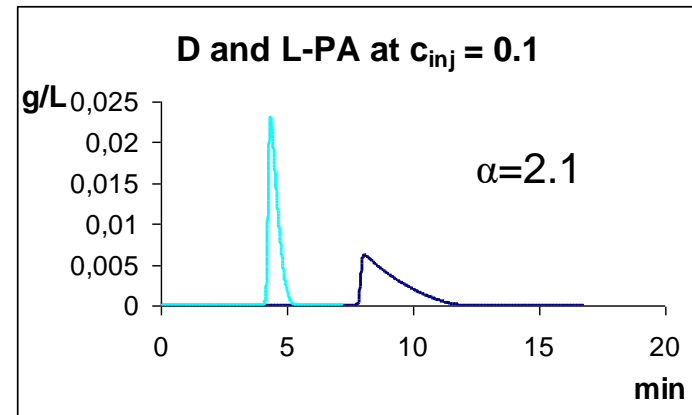
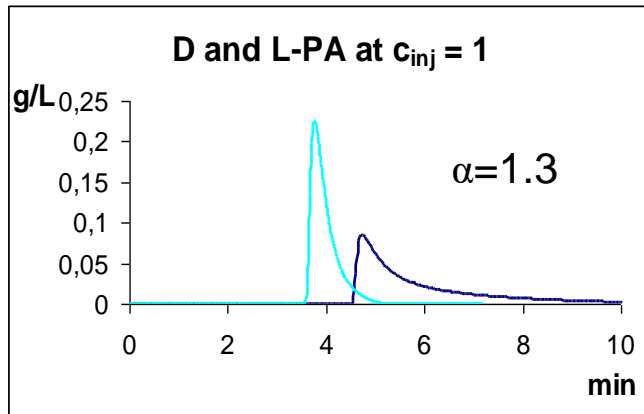
Ibuprofen csúcsok különböző koncentrációknál



Kromasil C4 oszlop  
50x3mm  
Szemcseméret: 13 $\mu$ m  
Eluens: 80/20 AcN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puffer pH=4.4



Purospher RP-18e oszlop  
125x4 mm  
Szemcseméret: 5 $\mu$ m  
Eluens: 30/70 AcN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puffer pH=4.4



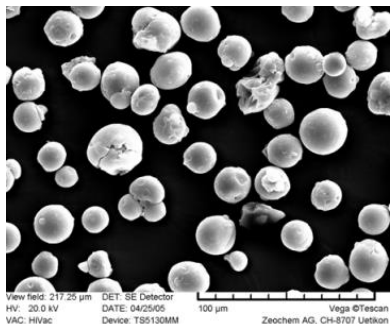
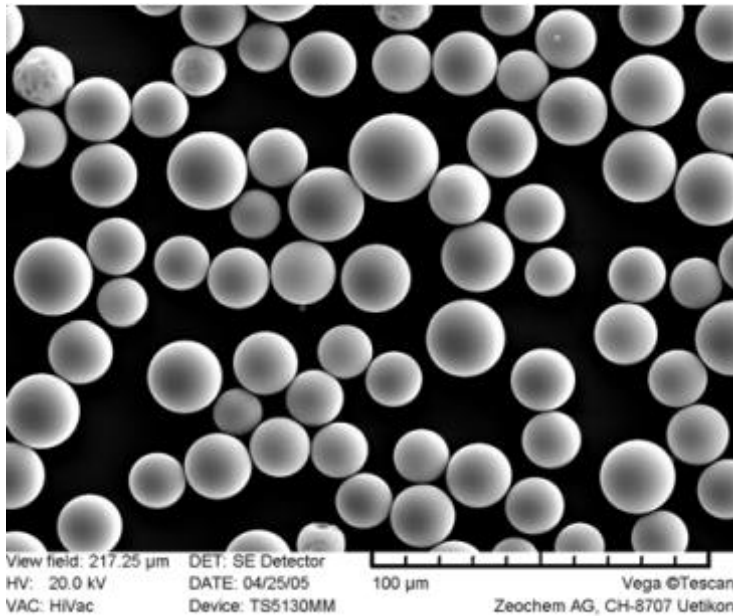
Racém elegy kromatogramja különböző koncentrációknál **az izotermák alapján szimulálva** (PA: phenylalanine anilide)

Dependence of the chromatographic enantioselectivity,  $\alpha$ , on the column length  $L$  (left panel) and on the column i.d. (right panel)

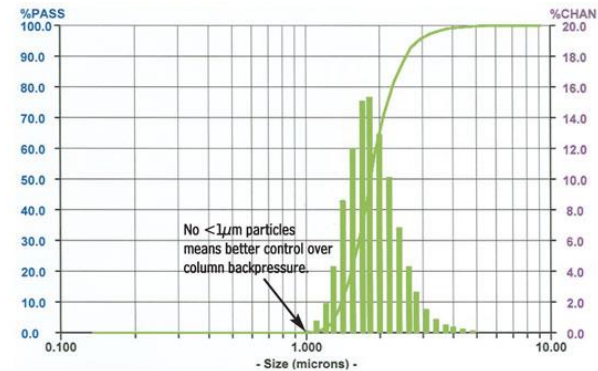
$L$ (cm)	$d$ (cm)	$\alpha$	$L$ (cm)	$d$ (cm)	$\alpha$
5	0.46	1.92	10	0.2	1.48
10	0.46	2.13	10	0.3	1.82
20	0.46	2.31	10	0.46	2.13

# HPLC töltetek morfológiája

## Porózus szemcsék



## Szemcseméret eloszlás



$d_{10} = 1,3 \mu\text{m}$ ,  $d_{50} = 1,9 \mu\text{m}$ ,  $d_{90} = 2,5 \mu\text{m}$

10% kisebb, mint  $1,3 \mu\text{m}$

50% kisebb, mint  $1,9 \mu\text{m}$

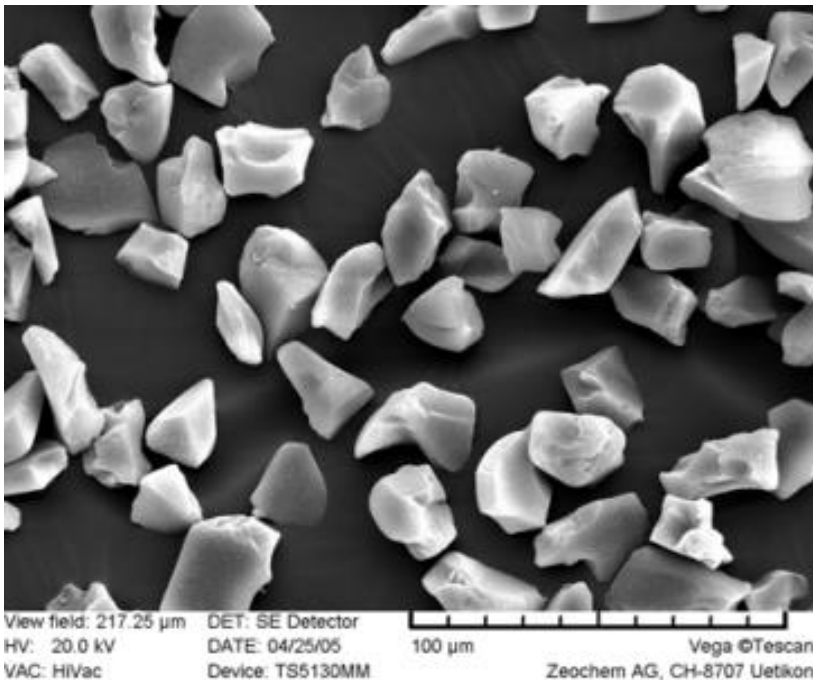
90% kisebb, mint  $2,5 \mu\text{m}$

Jó, ha  $d_{90}/d_{10} < 1,5-2$

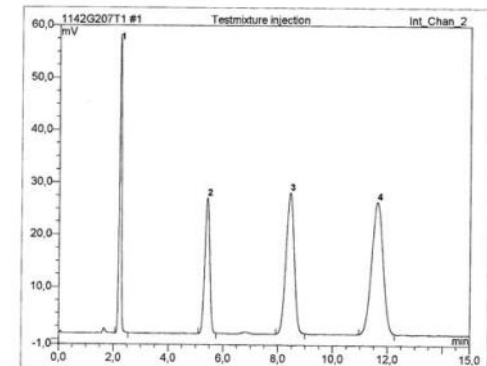
- örvénydiffúzió
- szemcsén belüli diffúzió
- kis molekuláknál kevésbé fontos, mint a makromolekuláknál
- nagyon finom szemcsék eltömhetik az oszlopot

# HPLC töltetek morfológiája

Szabálytalan alakú töltetek, ma főleg preparatív célra

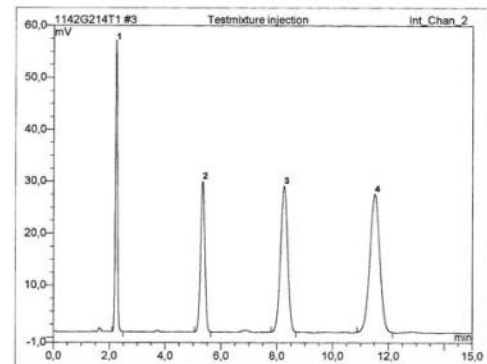


szabálytalan



No.	Peak Name	Ret.Time min	Concentration mg/l	K'	Asymmetry	Plates /m
1	Uracil	2.23	30,0	0,00	1,00	15432
2	Toluene	5,41	520,0	1,43	0,98	16536
3	Xylene	8,44	530,0	2,78	0,98	14544
4	Fluorene	11,63	250,0	4,21	0,98	14208

szabályos

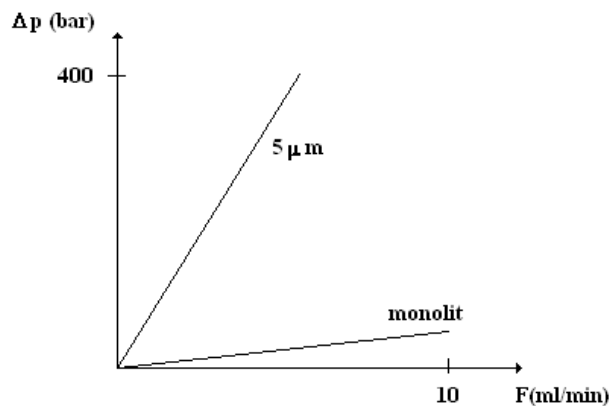
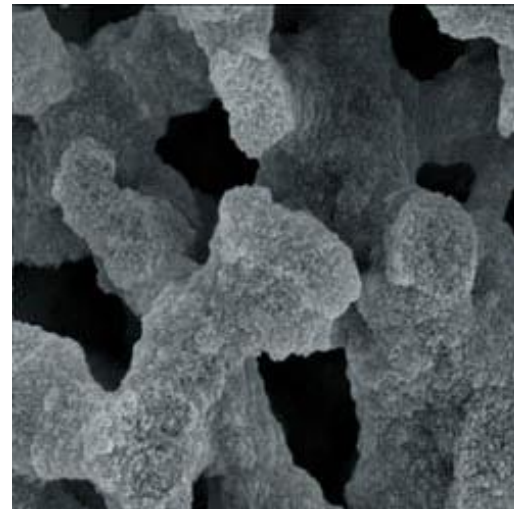
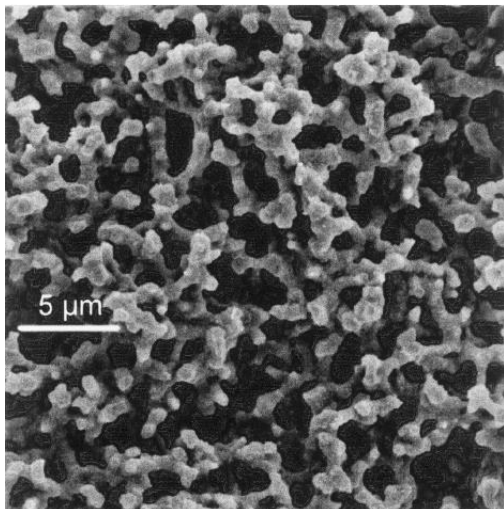


No.	Peak Name	Ret.Time min	Concentration mg/l	K'	Asymmetry	Plates /m
1	Uracil	2,25	30,0	0,00	1,00	18000
2	Toluene	5,34	520,0	1,38	0,98	23116
3	Xylene	8,26	530,0	2,68	0,98	19920
4	Fluorene	11,51	250,0	4,12	0,98	19716

Roszbabb hatékonyság  
 Oszloptöltés kevésbé homogén és reprodukálható  
 Roszbabb mechanikai stabilitás

# HPLC töltetek morfológiája

## Monolit



Porozitás  $> 0,8$

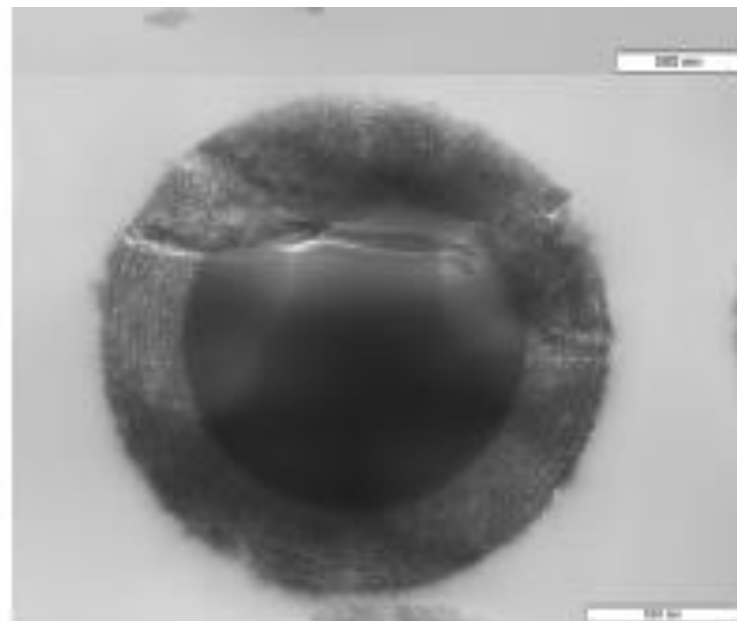
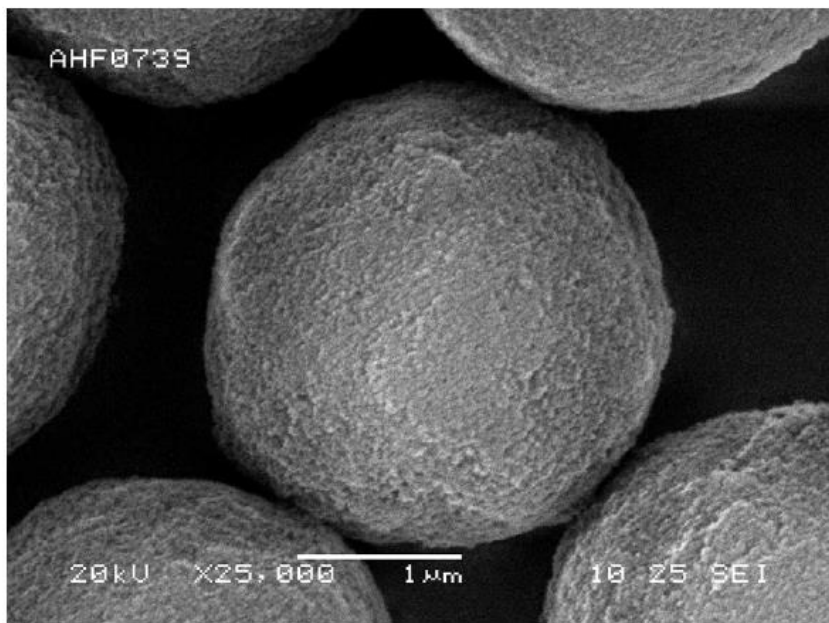
Bimodális pórusméret eloszlás

18 nm-es mezopórusok

3 μm-es makropórusok

# HPLC töltetek morfológiája

## Mag-héj



# Kromatográfiás töltetek jellemzés a pórusparaméterek alapján

- átlagos pórusátmérő:  $d_p$
- fajlagos felület:  $A_s$
- fajlagos pórustérfogat:  $V_p$



# Pórusátmérő osztályozás

Az IUPAC ajánlása szerint,

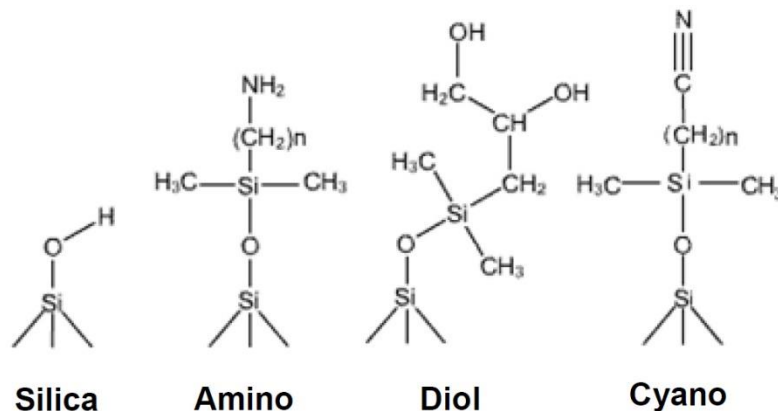
- ha a pórusátmérő  $< 2\text{nm}$ , akkor mikropórusról,
- ha  $> 50\text{ nm}$  makropórusról,
- ha kettő közé esik (2-50 nm) mezopórusról beszélünk.

# Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)

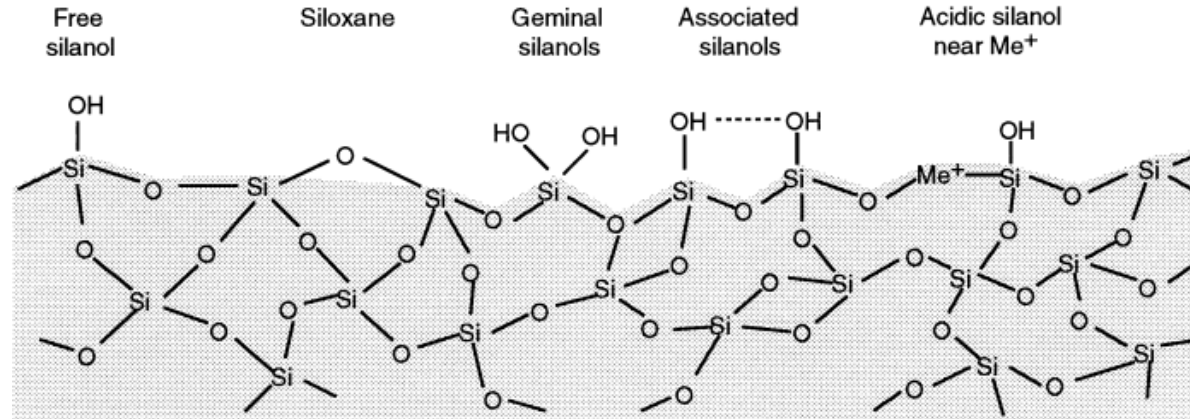
- Az első folyadékkromatográfiai technika (Cvet használta növényi pigmentek elválasztására; kalcium karbonát állófázist és petroléter mozgófázist alkalmazva)
- Az állófázis *polárisabb*, mint a mozgó fázis (minta: köztes polaritású, nem ionos)

Állófázisok alkalmazási gyakorisága:

- Szilikagél (80-90%)
- Alumínium-oxid (5-10%)
- Módosított szilikagél: pl.: amino, ciano, diol, nitro, stb. (5-10%)



# Szilikagél alapú állófázisok



Porózus - nagy fajlagos felület 50-400 m<sup>2</sup>/g között  
- fajlagos pórus térfogat, 0,5 – 1,0 cm<sup>3</sup>/g között  
→ nagy hatékonyság a nagyszámú interakciós lehetőség miatt

Könnyen előállítható

- különböző szemcseméretben (1,7-10 μm között)
- és pórusmérettel (6-20 nm között)

Mechanikailag stabil

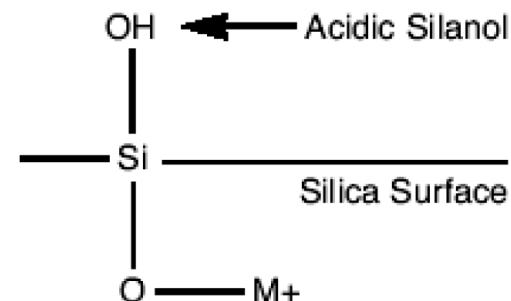
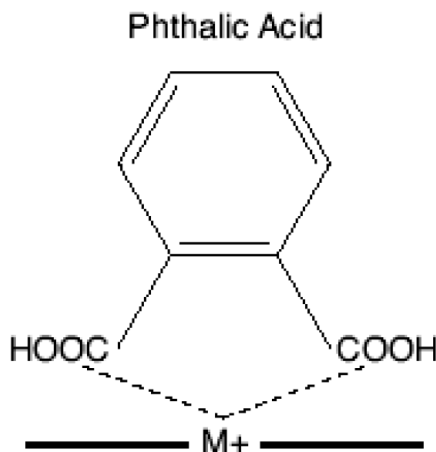
pH>8 oldódik

A módosított szilikagél pH<2 hidrolizál

Bázikus anyagokkal erős kölcsönhatásba lép

# Fémion szennyezés

- Felületi fémionok kelátot képeznek a minta molekulákkal ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ )
  - A felületi fémionok aktiválják a szilanol csoportokat, amelyek savas, vagy bázikus molekulákkal interakcióba lépnek
- másodlagos retenciós mechanizmus → peak tailing, irreverzibilis kötődés



## Alapszilikagélek

- nagy fémion tartalmú (I. generációs)
- közepes fémion tartalmú (II. generációs)
- kis fémion tartalmú (III. generációs)

# Szilikagél állófázis „vízérzékenysége”

- Szilikagélek jó vízmegkötő anyagok
- Kromatográfias szempontból: a felületen adszorbeálódott víz erősen kötődik a szilanol csoportokhoz, dezaktiválja azokat (kizárva a komponens hozzáférhetőségét).
- Igen kis mennyiségű víz is jelentős mértékben dezaktiválja a kolonnát, ezért a mozgófázisok nem tartalmazhatnak vizet, vagy csak kontrollált mennyiségben.

## Aktiválás lehetőségei:

- Lassabb módszer: a kolonnán egyre apolárisabb vízmentes mozgófázisokat áramoltatunk keresztül. Gyakorlatban: először alkoholt, majd étert, azt követően klórozott szénhidrogént, végül hexánt.
- Hatékonyabb, gyorsabb módszer: a kolonnát 150-200 fokon tartva, száraz, állandó nitrogénárammal vízmentesítjük.

# Polárisan módosított szilikagél állófázisok előnyei

- A mozgófázis nyomnyi víztartalmát nem kell kontrollálni
- Gyorsabb egyensúlybeállítás
- Gradiens elúció kivitelezhető
- Polaritás, szelektivitás széles tartományban változtatható
- Energetikailag homogénebb felület
- Kevésbé „tailinges” csúcsok, mint szilikagél esetén
- Ezek a fázisok a mozgó fázis polaritásától függően használhatók normál- és fordított fázisként is

# Mozgófázisok az NP-HPLC-ben

Alkánok	Hexán, Heptán, Izooktán
Klórozott szénhidrogének	Diklórmetán, Diklóretán, Kloroform
Éterek	Diizopropil-éter, Diizobutil-éter, MTBE, THF, Dioxán
Észterek	Metil-acetát, Etil-acetát
Alkoholok	Etanol, Izopropanol
Nitrilek	Acetonitril
Aminok	Trietil-amin, Butil-amin
Savak	Ecetsav
Víz	Víz

# Mozgófázisok az NP-HPLC-ben II.

- **Alap oldószerek:**
- Hexán, Heptán, Izooktán
- **Oldhatóságot növelő oldószerek:**
- Diklórmétán, Diklóretán, Kloroform
- **Módosító szerek (modifikátorok):**
- Az állófázis legaktívabb helyein kötődnek meg. A lokalizáltan kötődő modifikátorok erős H-hidas kölcsönhatással, a nem lokalizáltan kötők gyenge H-hidas kölcsönhatással. Modifikátorokat akkor alkalmazunk, ha a mérendő anyag túl erős kölcsönhatásba lép az állófázissal.
- Az I. generációs töltetek esetén nagy fémion koncentráció marad a töltetben, ecetsavat teszünk az eluensbe. Az ecetsav irreverzibilisen megkötődik a túl nagy aktivitású helyeken.
- A II. generációs töltetknél ha a mérendő anyag bázikus, maszkírozószerként pl. alifás amint alkalmazunk, ami kiszorítja a legaktívabb helyekről a mérendő komponenst, így javítja a csúcsalakot.



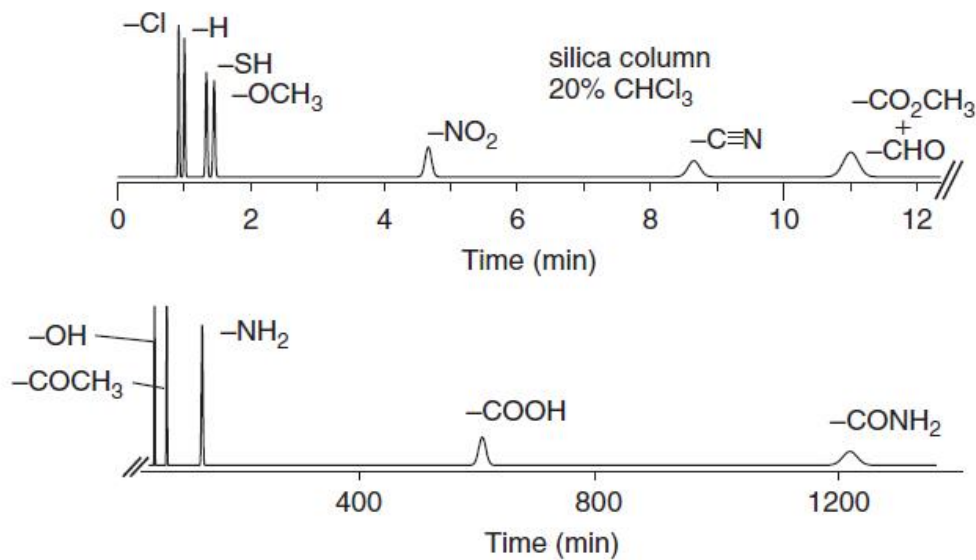
# Normál fázisú folyadékkromatográfia

- Használható semleges és ionos formába hozható anyagok esetén is, de leggyakrabban semleges anyagoknál alkalmazzák
- Ha az RP HPLC nem elég szelektív
- Ha mérendő anyag nem oldódik szerves/vizes közegben (szerves közegből injektálva a csúcsalak rossz lesz)
- Királis anyagok illetve szerkezeti izomerek elválasztásához
- Preparatív kromatográfiában (az oldószer könnyű elpárologtathatósága miatt)

# Retenció

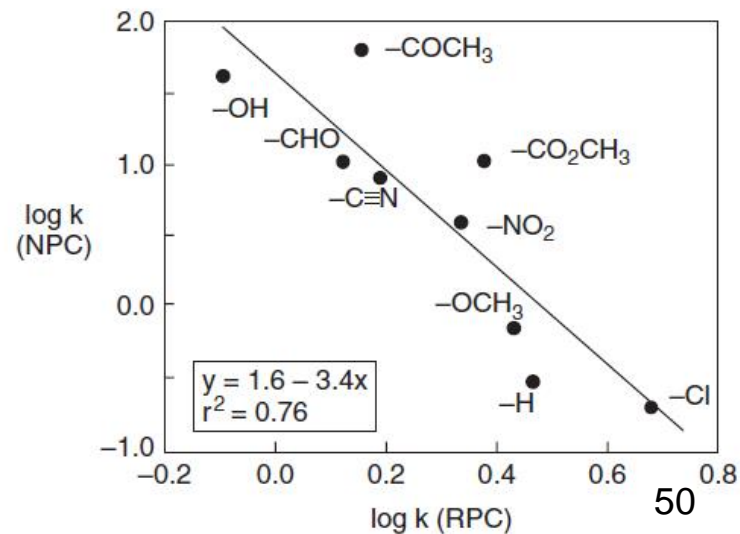
Állófázis polárisabb – polárisabb anyagok tartódnak vissza jobban

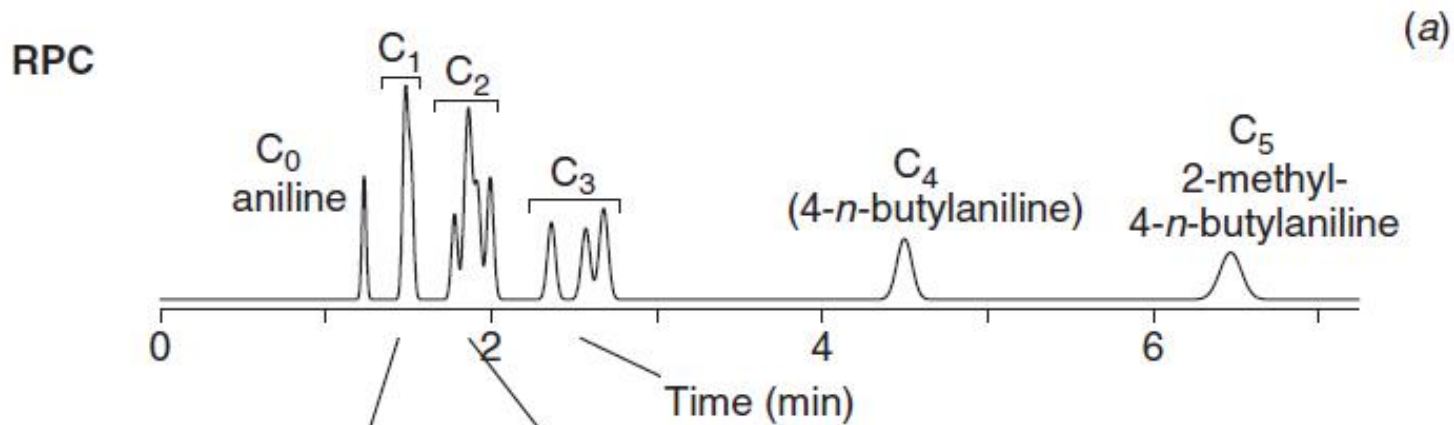
## Monoszubsztituál benzol származékok elválasztása



(a) 150x4,6 mm szilika oszlop (5 $\mu$ m);  
20% kloroform-hexán; 2 ml/min

150x4,6 mm Hypersil C18 oszlop;  
50% AcN-víz; 2 ml/min

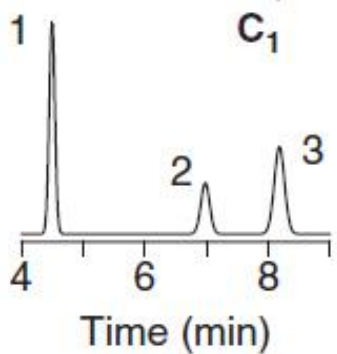




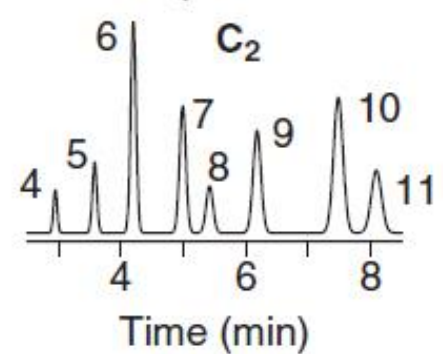
(a)

C8  
 60 % metanol: 40  
 % pH=7 puffer

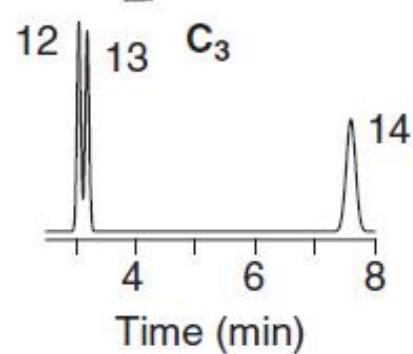
**NPC**



(b)



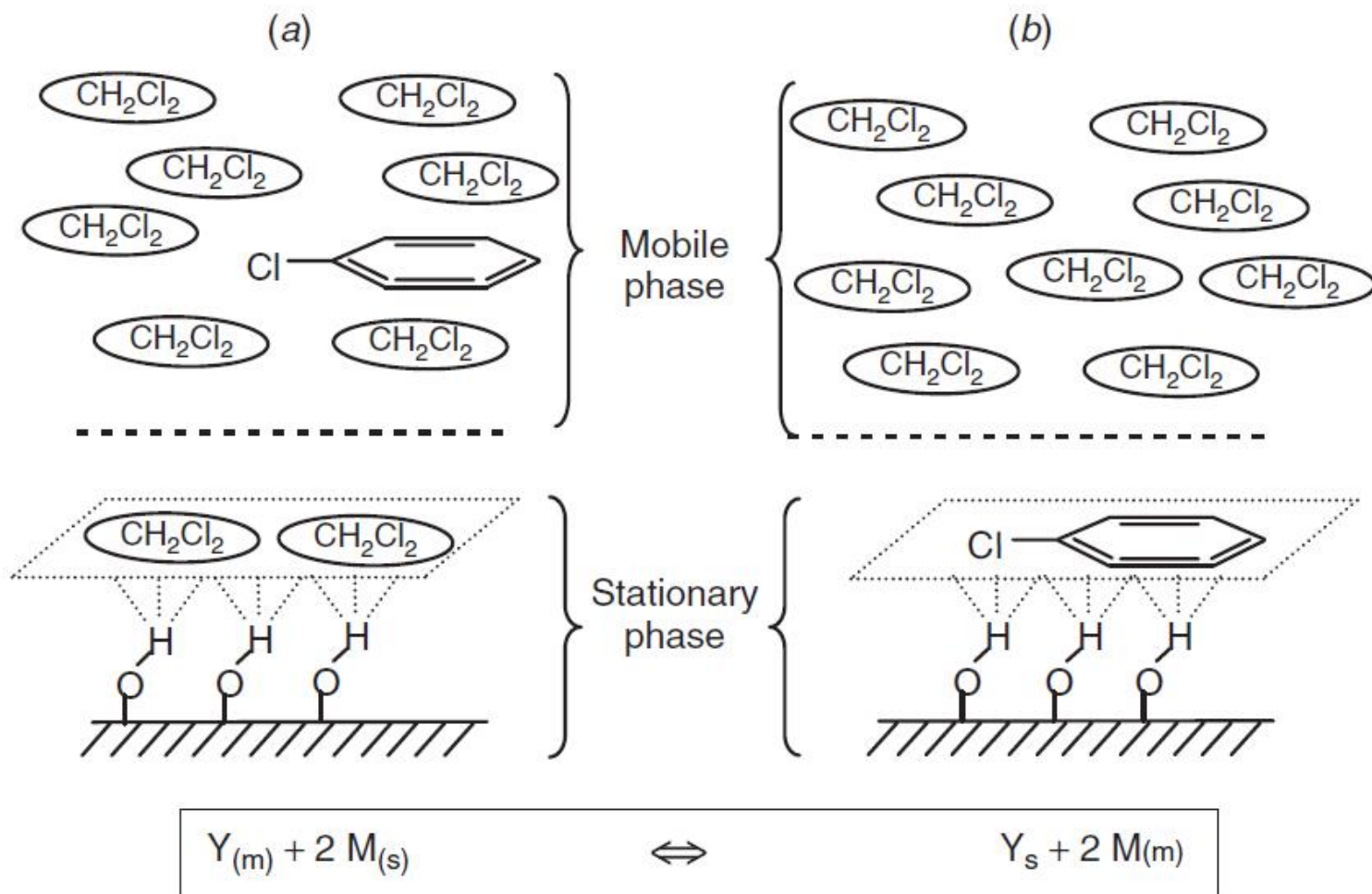
(c)



(d)

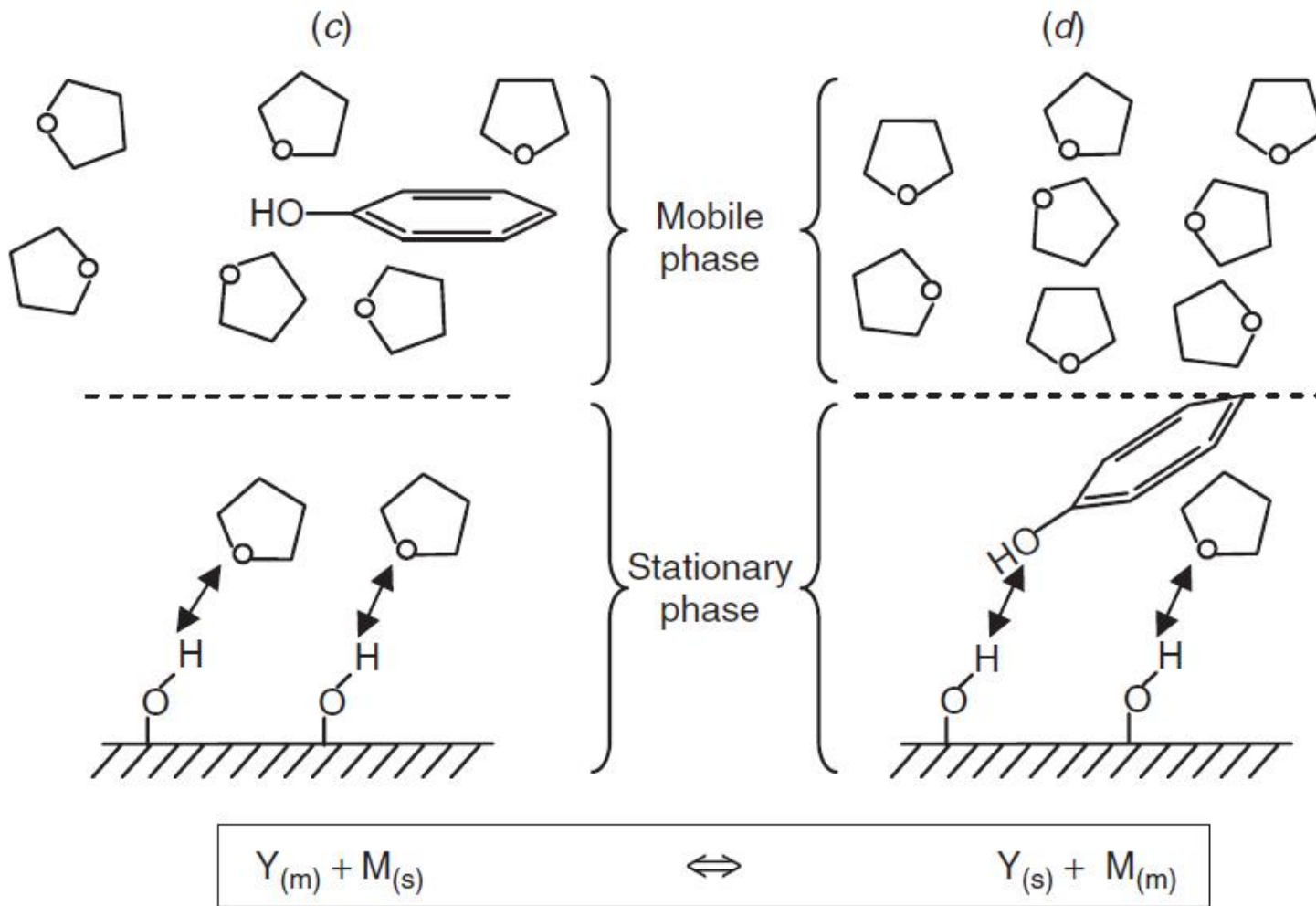
ciano  
 0,2 % iPrOH-  
 hexán

# Elmélet



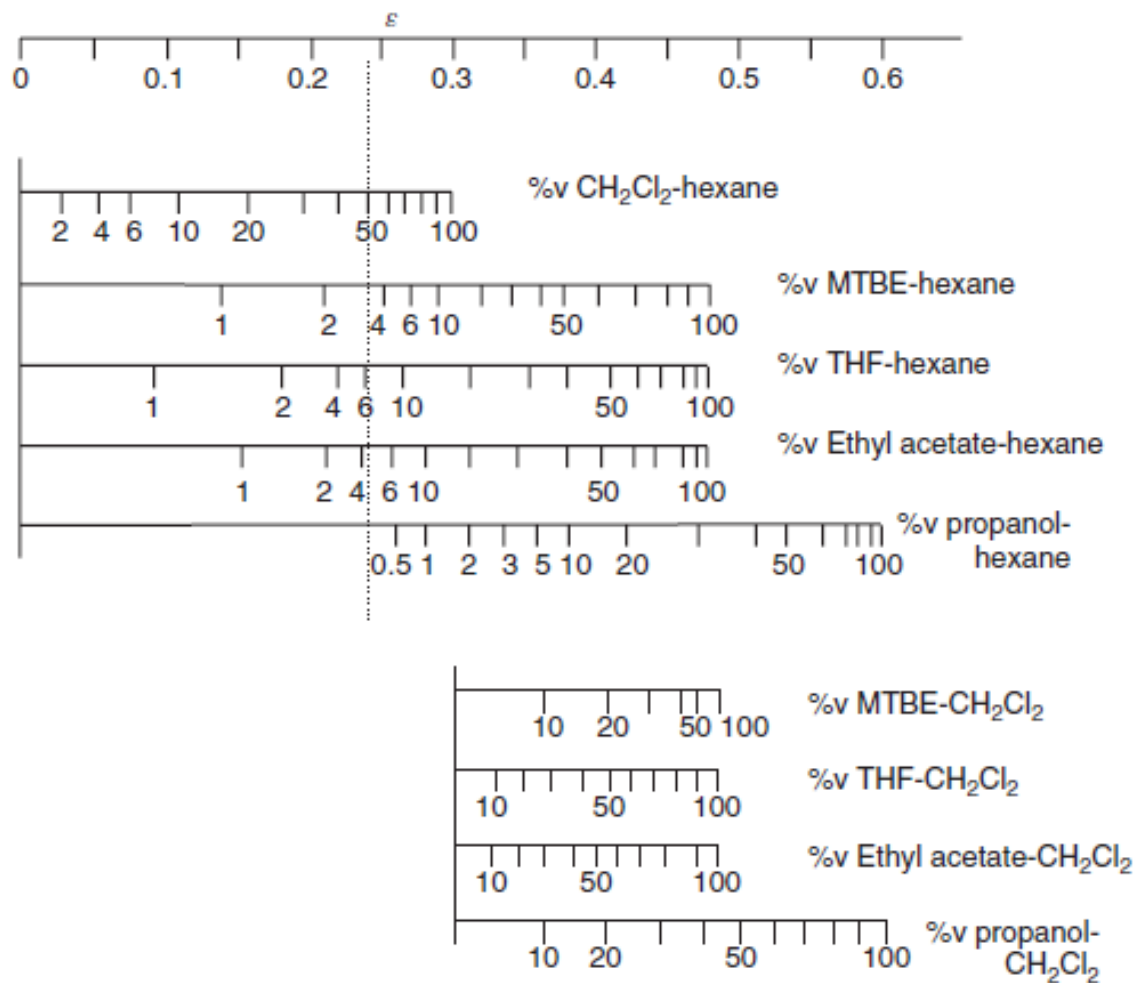
Retenció – kiszorítás

Kevésbé poláris anyag – gyengébb állófázis

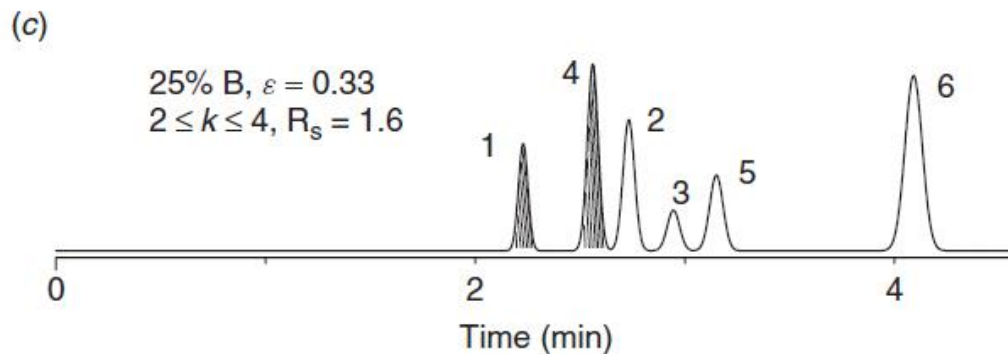
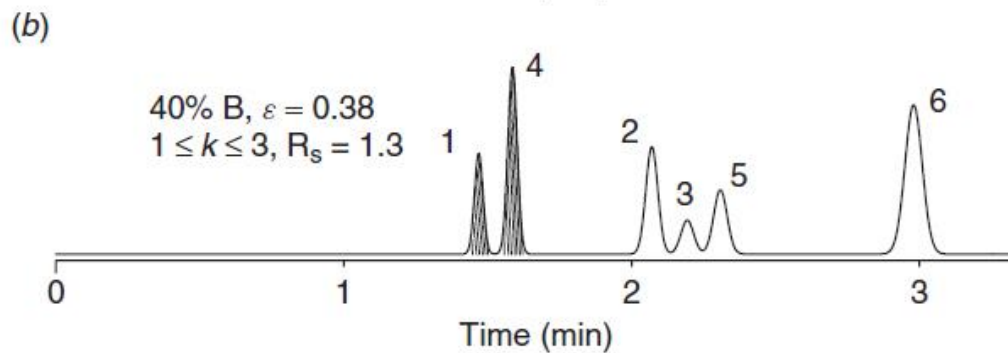
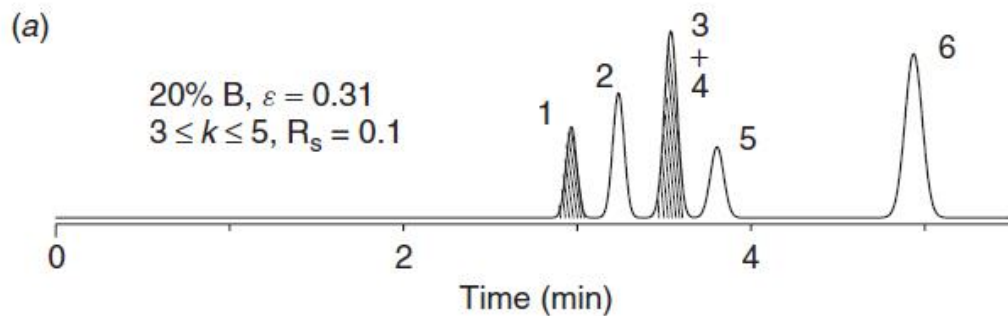


Polárisabb mozgófázis: THF - Polárisabb analát: fenol -> erősebb kölcsönhatás  
 1:1 arányú kölcsönhatás -> lokalizált adszorpció

# Eluenserősség ( $\epsilon$ )



## Eluenserősség hatása

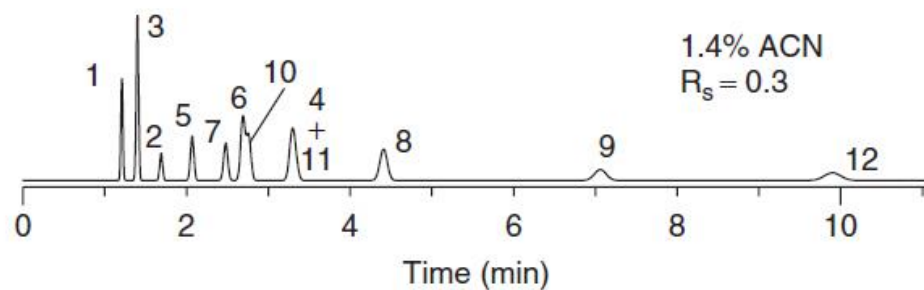
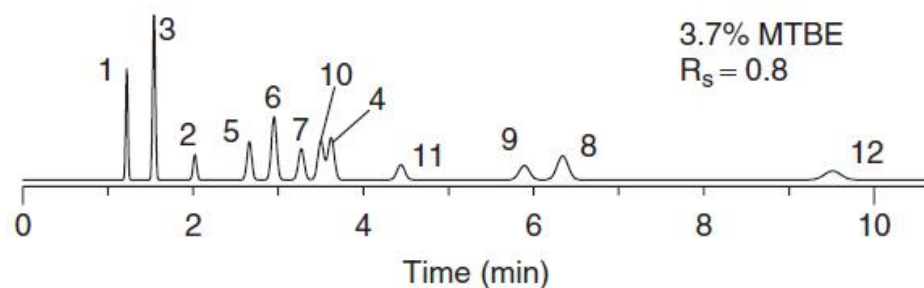
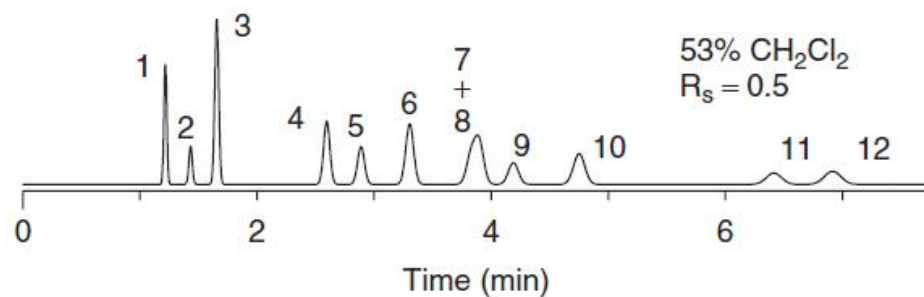


1,2-aminonaphthalene;  
 2, 2,6-dimethylquinoline; 3,  
 2,4-dimethylquinoline; 4, 4-  
 nitrophenol;  
 5, quinoline;  
 6, isoquinoline

A: ciklohexán  
 B: etilacetát

2,3,5,6: (-N=)  
 1: (NH<sub>2</sub>)  
 4: (-NO<sub>2</sub>, -OH)

„B” oldószer minőségének hatása

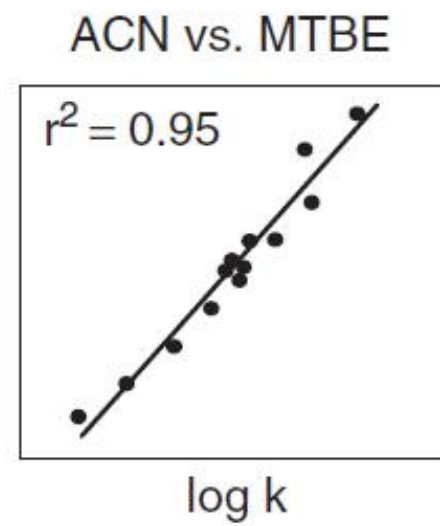
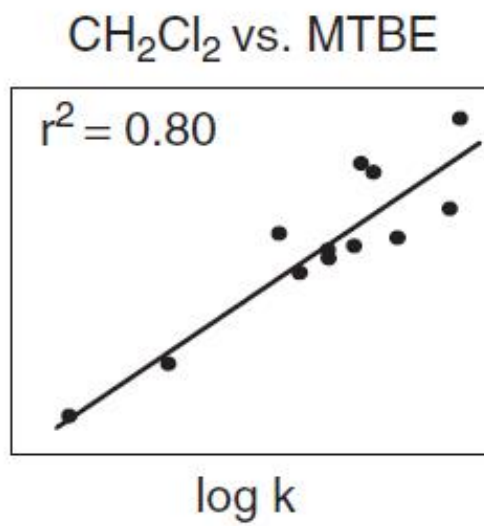
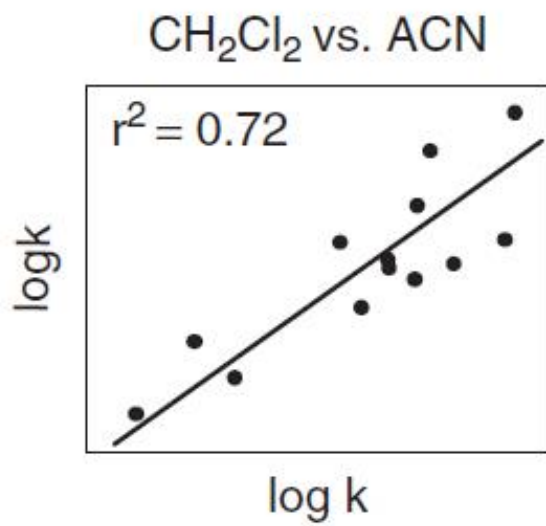


- (a) 1, 2-methoxynaphthalene;  
2, 1-nitronaphthalene;  
3, 1,2-dimethoxynaphthalene; 4,  
1,5-dinitronaphthalene;  
5, 1-naphthaldehyde;  
6, methyl-1-naphthoate;  
7, 2-naphthaldehyde;  
8, 1-naphthyl nitrile;  
9, 1-hydroxynaphthalene;  
10, 1-acetylnaphthalene;  
11, 2- acetylnaphthalene;  
12, 2-hydroxynaphthalene

(b)

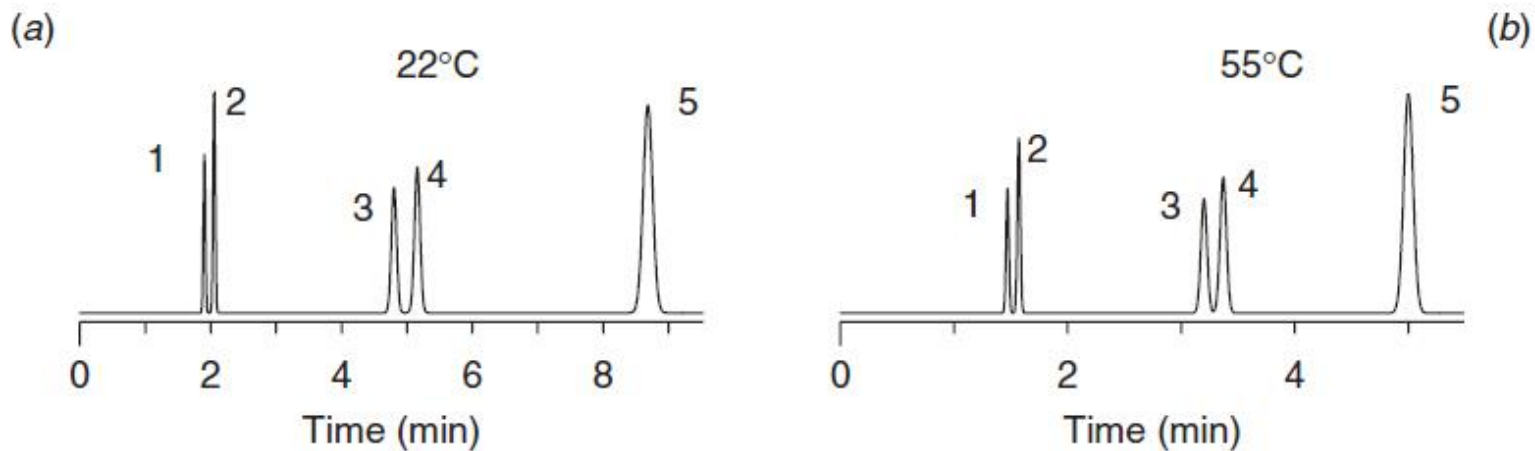
A: hexán



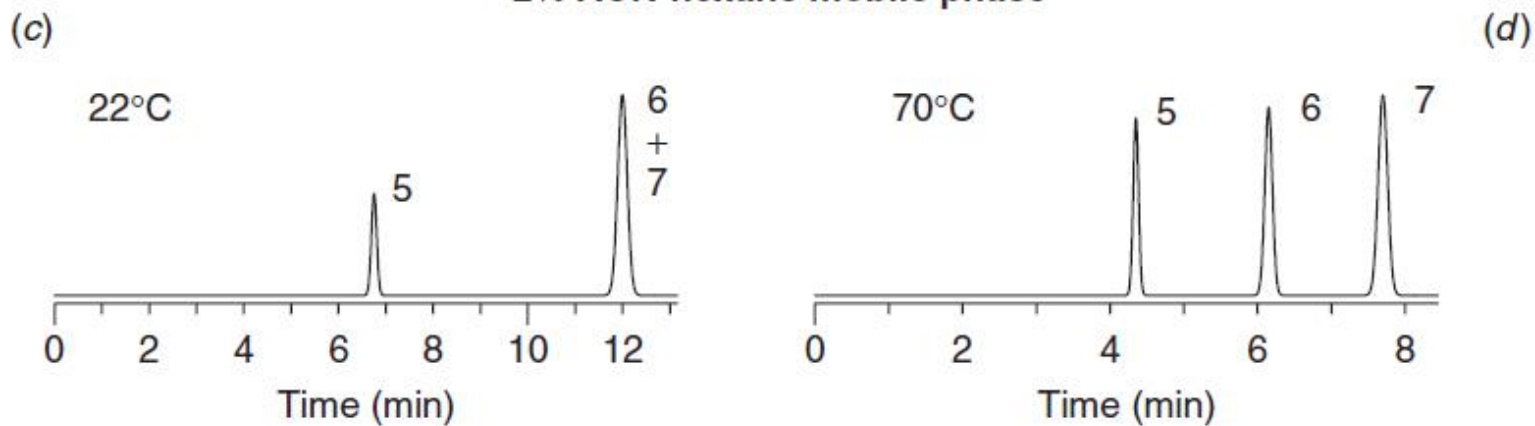


# Hőmérséklet hatása a szelektivitásra

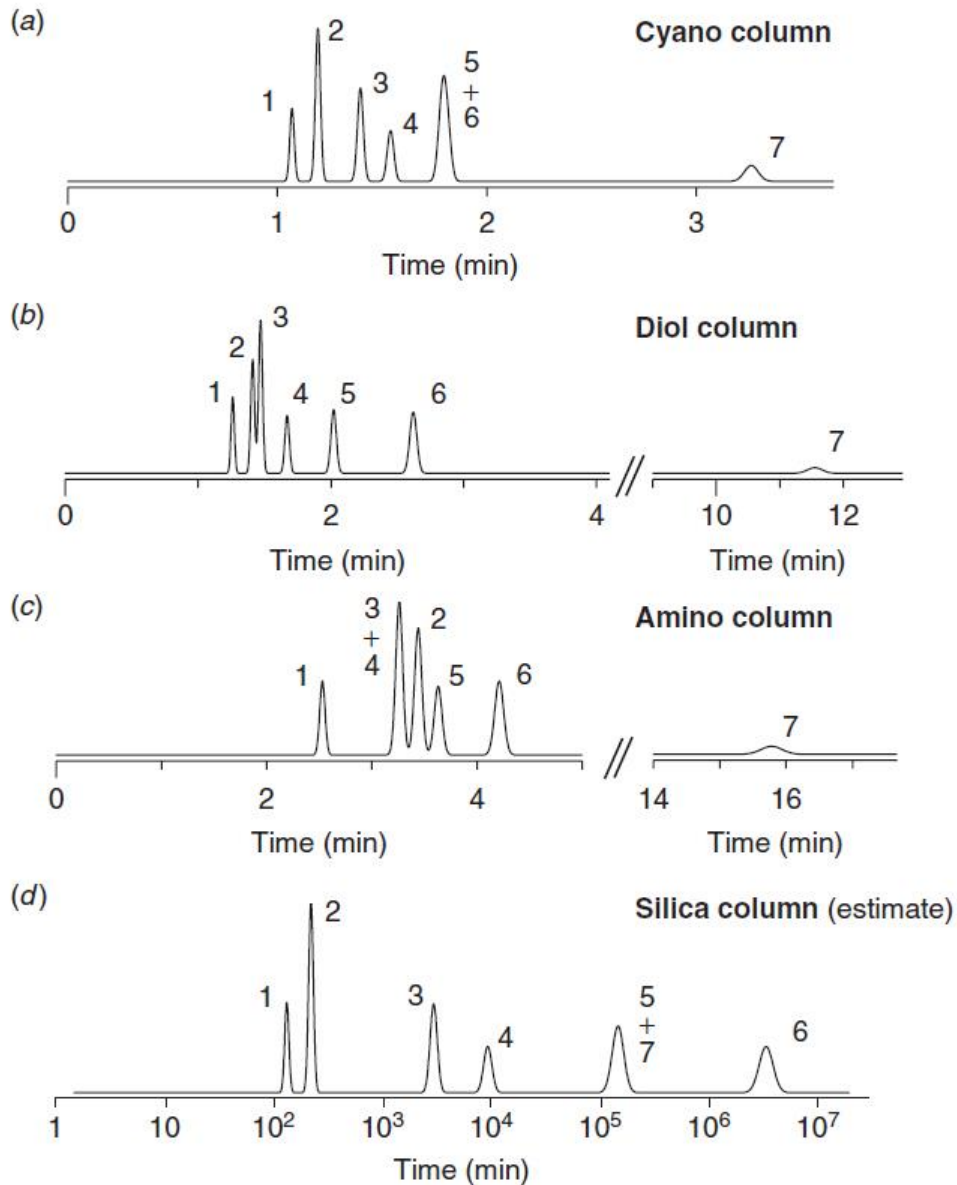
100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mobile phase



2% ACN-hexane mobile phase



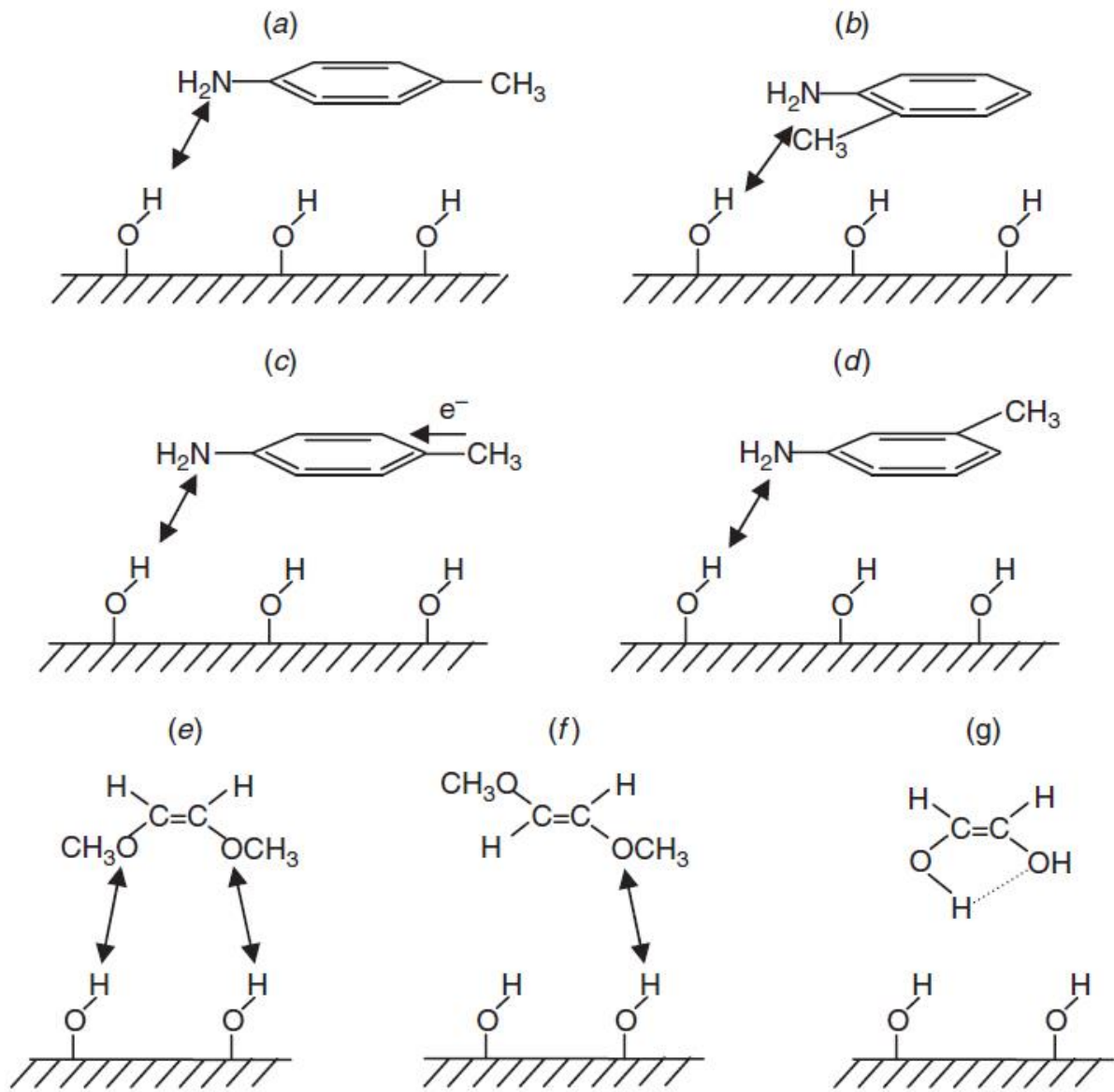
# Állófázis minőségéből adódó szelektivitás



- 1, chrysene;
- 2, perylene;
- 3, 1-nitronaphthalene;
- 4, 1-cyanonaphthalene;
- 5, 2-acetonaphthalene;
- 6, naphthalene-2,7-dimethylcarboxylate;
- 7, benzyl alcohol

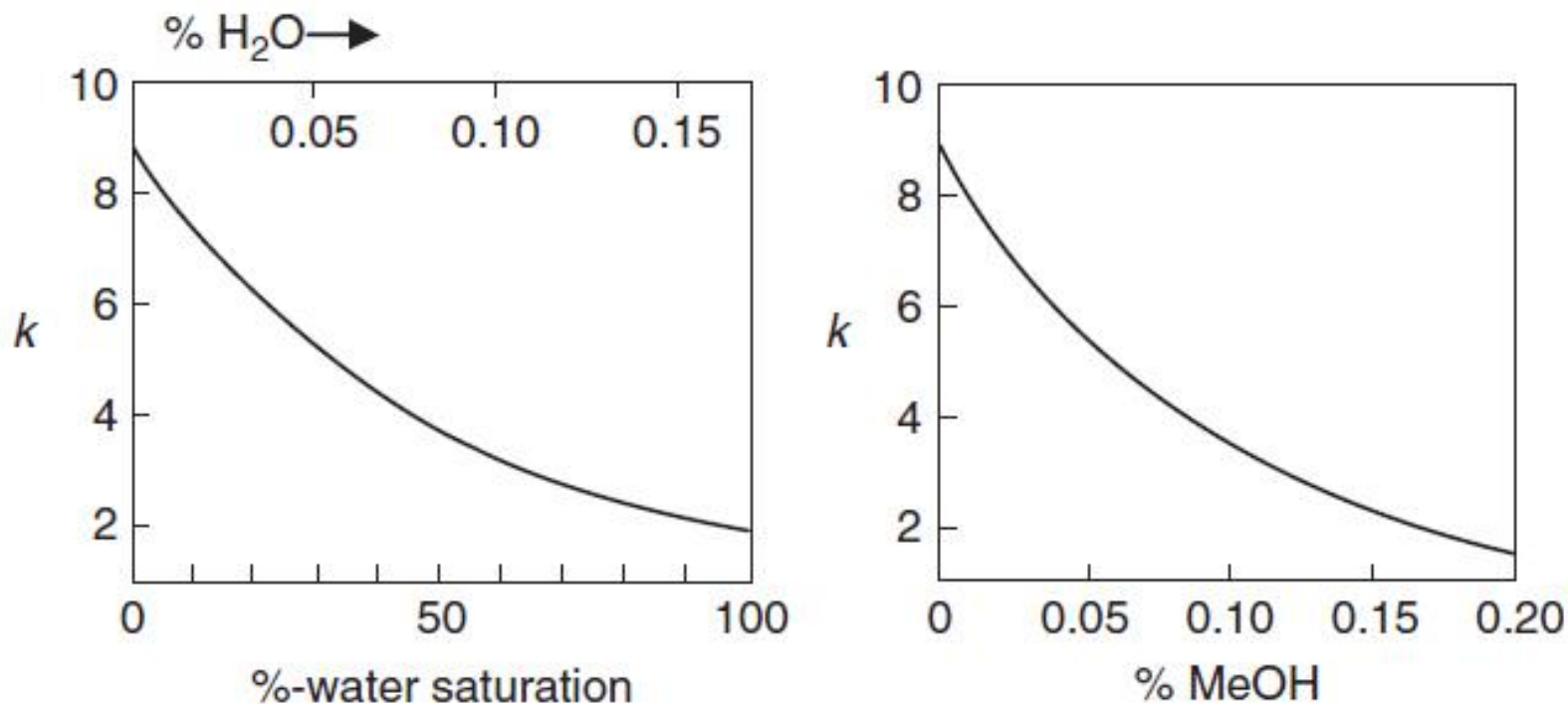
Eluens: hexán

# Izomerek elválasztása



# Problémák a normál fázisú HPLC-ben

Ismételhetőség: retenciós idők változhatnak a napok között, vagy akár napon belül is. (ha a labor levegőjének páratartalma változik)



Benzanilid retenciós tényezőjének változása szilika oszlopon diklórmetán eluenssel

Megoldás: víztartalom kontrollálása (vízmentes és vízzel telített oldószerek keverésével)  
kis mennyiségű, nagyon poláris oldószer adagolása  
páratartalom kontrollálása, oldószerek közvetlen adagolása az eluenstartályba)

# Problémák a normál fázisú HPLC-ben

## Oldószer „szételegyedés”

A felületen az erősebb oldószer erősebben kötődik, leszorítja a gyengébbet. Ezért lassú az egyensúlybeállítás ideje.

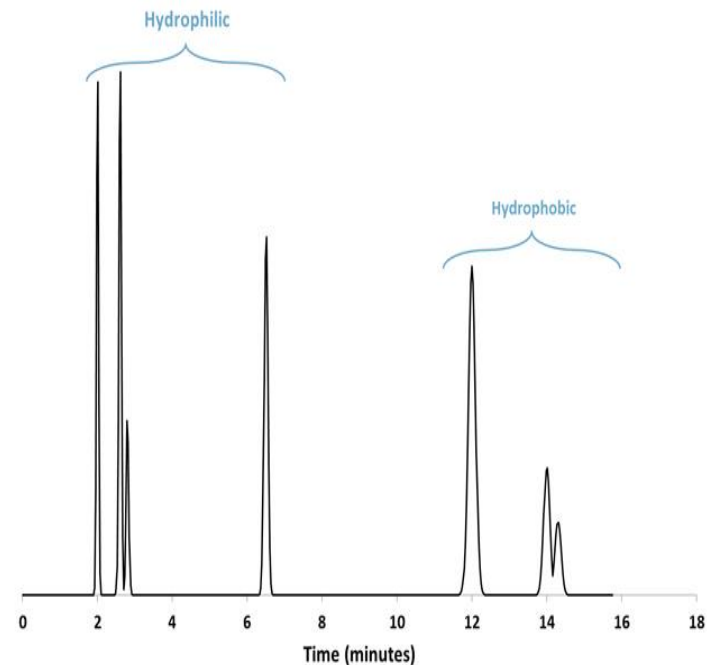
Megoldása: izokratikus módszer, illetve az  $\varepsilon_0$ -ban 0,5-nél kisebb különbség esetén nem okoz nagy problémát

## Tailinges csúcsok

valószínűleg a lassabb diffúzió okozza, heterogén kötőhelyeloszlás  
megoldás: type B szilka alkalmazása -> nagyobb N, jobb csúcsalak  
(preparatív elválasztásoknál megfelelő a type A is, ami sokkal olcsóbb)

# Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)

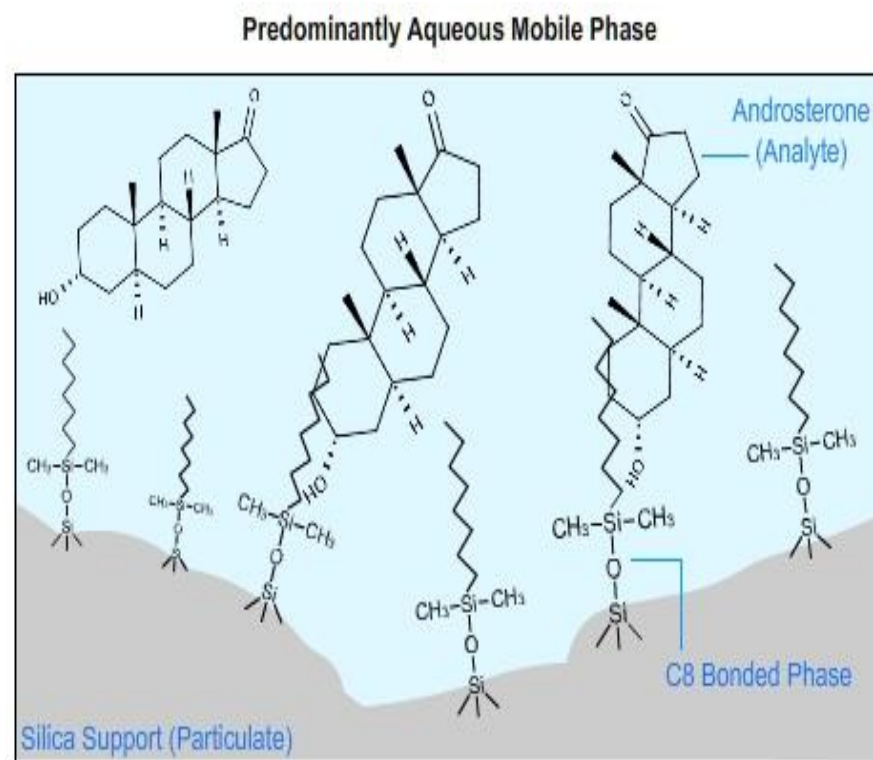
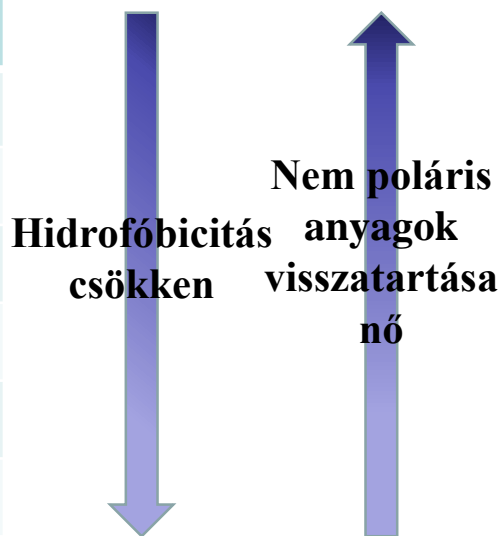
- Fordított: a korábban kidogozott „normál”-hoz képest
- A mozgó fázis *polárisabb*, mint az állófázis
- A leggyakrabban használt módszer



# Állófázisok az RP-HPLC-ben I.

- Módosított szilikagél állófázisok

Módosítás
C18
C8
C4
ciano
fenil
amino





# Módosított szilikagél állófázisok

## - pH probléma

- Szilikagél a kovasav polimerje -> lúgban feloldódik
- Általában pH=8-ig használható a szilikagél állófázis, de a jól utószilanizált, nagy felületi borítottságú töltetekenél akár pH=10 is lehet
- Alacsony pH-n az alkilláncot tartó kötés (Si-O-R) hidrolízis sebessége nő meg
- Általában pH=2 felett használható, de ha sikerül stabilizálni a kötetést, pH=1-ig is le lehet menni
- Fontos, hogy az oszlopot a leírásában megadott pH tartományon belül használjuk csak!!!!

# Állófázisok az RP-HPLC-ben II.


- **Szerves polimer alapú töltetek**
  - Sztírol – divinil-benzol kopolimerek (létezik C18-as módosított változata is)
  - pH-nak nincs szerepe (pH=9 felett is használhatók)
  - Nyomásnak kevésbé állnak ellen
  - Előállítás során mikropórusok is keletkeznek -> zónaszélesedés
  - 20-100% szerves oldószer kell legyen a mozgófázis, mert a nagy víztartalom nem nedvesíti
  - Problémát jelet az oldószer-kompatibilitás (klórozott szénhidrogének duzzasztják -> összeroppan)
  - Drága (lényegesen drágább, mint a szilikagél)

# Állófázisok az RP-HPLC-ben III.

- **Aktív szén állófázis:**

- Nem bírja a nyomást
- Felülete tele van funkció csoportokkal, eltérő aktivitású helyekkel
- Mikropórusos
- Adszorpció izotermája nemlineáris

Nyomásálló grafit előállítása (nagy hőmérsékleten)



- **Porózus grafit állófázis (PGC):**

- Széles pH tartományban stabil
- Leghidrofóbabb (legapolárisabb) állófázis
- Sztereospecifikus – adszorpció függ a molekula geometriájától
- Fehérjével módosított töltettel enantiomerek is elválaszthatók
- Inert minden eluenssel szemben, használható normál és fordított fázisú mozgófázissal is

# Állófázisok az RP-HPLC-ben IV.

- **Aluminium-oxid állófázisok**
  - Poláris
  - Kapszulázott töltetek (polimerfilmmel, pl.: butadiénnel vonják be)
  - pH= 12-nél oldódik csak fel
- **Egyéb állófázisok**
- **Cirkónium- és titán-oxidok**

# Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

## Általános követelmények

- Tisztasági követelmény
- Jó UV áteresztőképesség (UV cut-off)
- Kis viszkozitás
- A minta komponenseinek jól kell oldódniuk a mozgófázisban
- Nem tartalmazhat szilárd anyagot
- Kis toxicitás
- Nem tartalmazhat oldott gázokat (gázmentesítés)
- Módszerspecifikus követelmény: polárisabb legyen, mint az állófázis

# Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

- Általános követelményeknek a víz megfelel, hiszen kis viszkozitású, 190 nm felett nem nyel el.
- A szerves vegyületek nagy részét azonban nem oldja, ezért szükség van szerves oldószerekre:
- Etanol, 2-propanol: nagy a viszkozitásuk -> ritkán használatosak
- Dioxán: poláris, de reaktív és mérgező -> használata nem jelentős
- THF: állás közben peroxidosodik (stabilizálószerrel adnak hozzá, ez azonban rontja az UV cut-off értéket) -> csak akkor használják, ha szelektivitásnövelés érhető el vele
- Leggyakrabban tehát **acetonitril** és **metanol** használnak, ezek kis viszkozitása, megfelelő tisztasága miatt

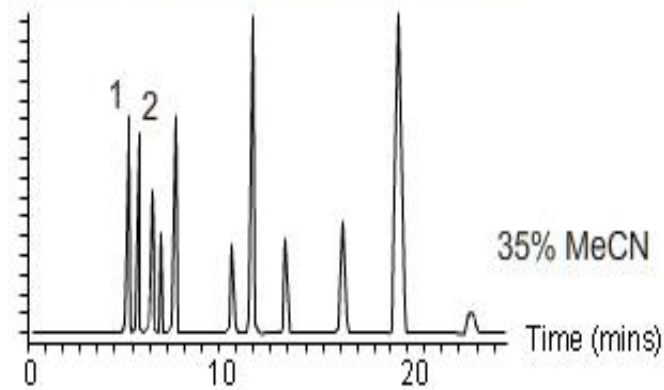
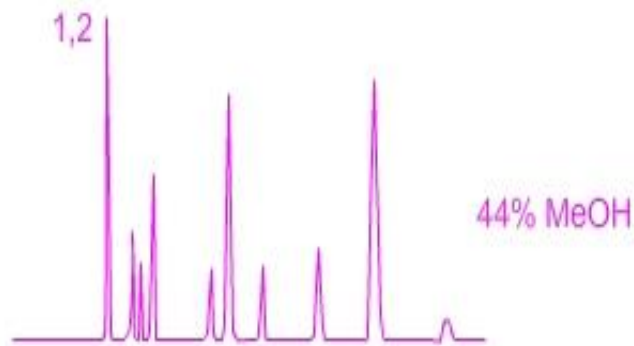
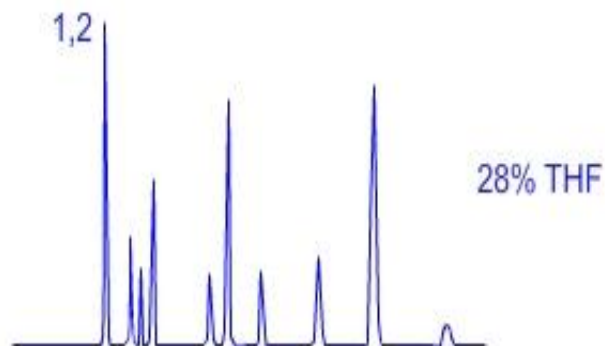
# Eluenserősség

- Tekintsünk egy tökéletes borított felületű, nagy sűrűségű állófázist! Ilyen körülmények között csak diszperziós kölcsönhatás léphet fel az állófázis és a vizsgált molekula között. Ilyen körülmények között az alábbi eluotróp sor írható fel:

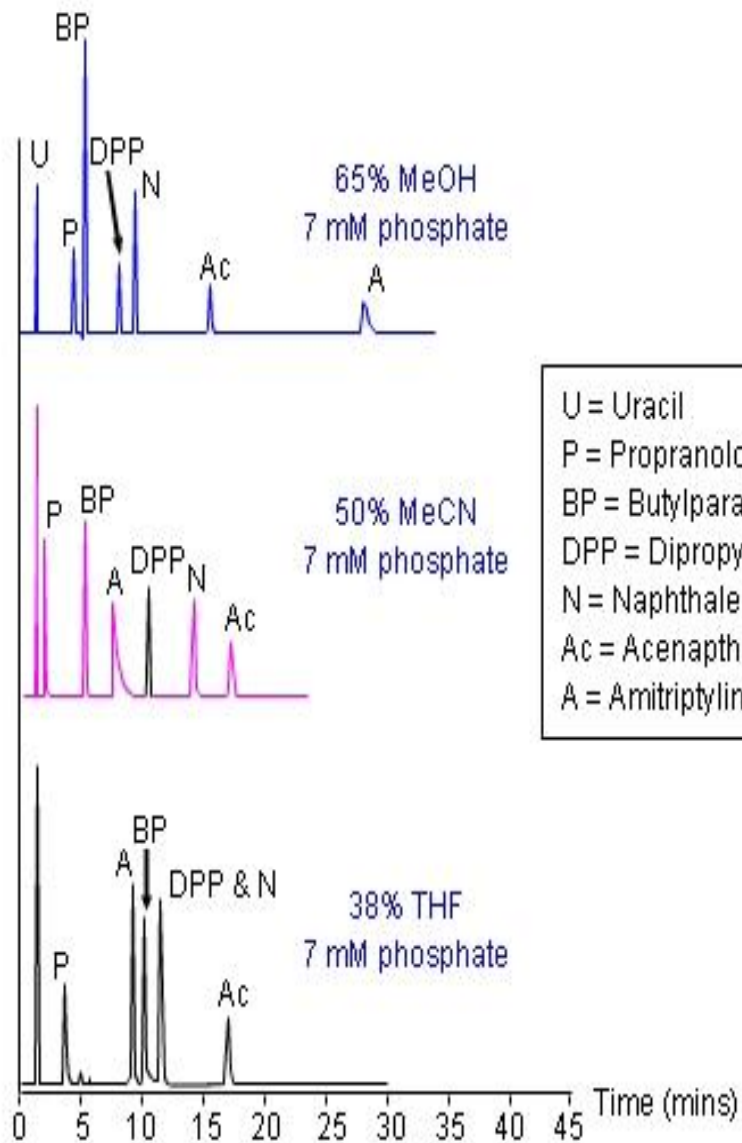


- **víz < metanol < acetonitril < etanol < 2-propanol < tetrahydrofuran**

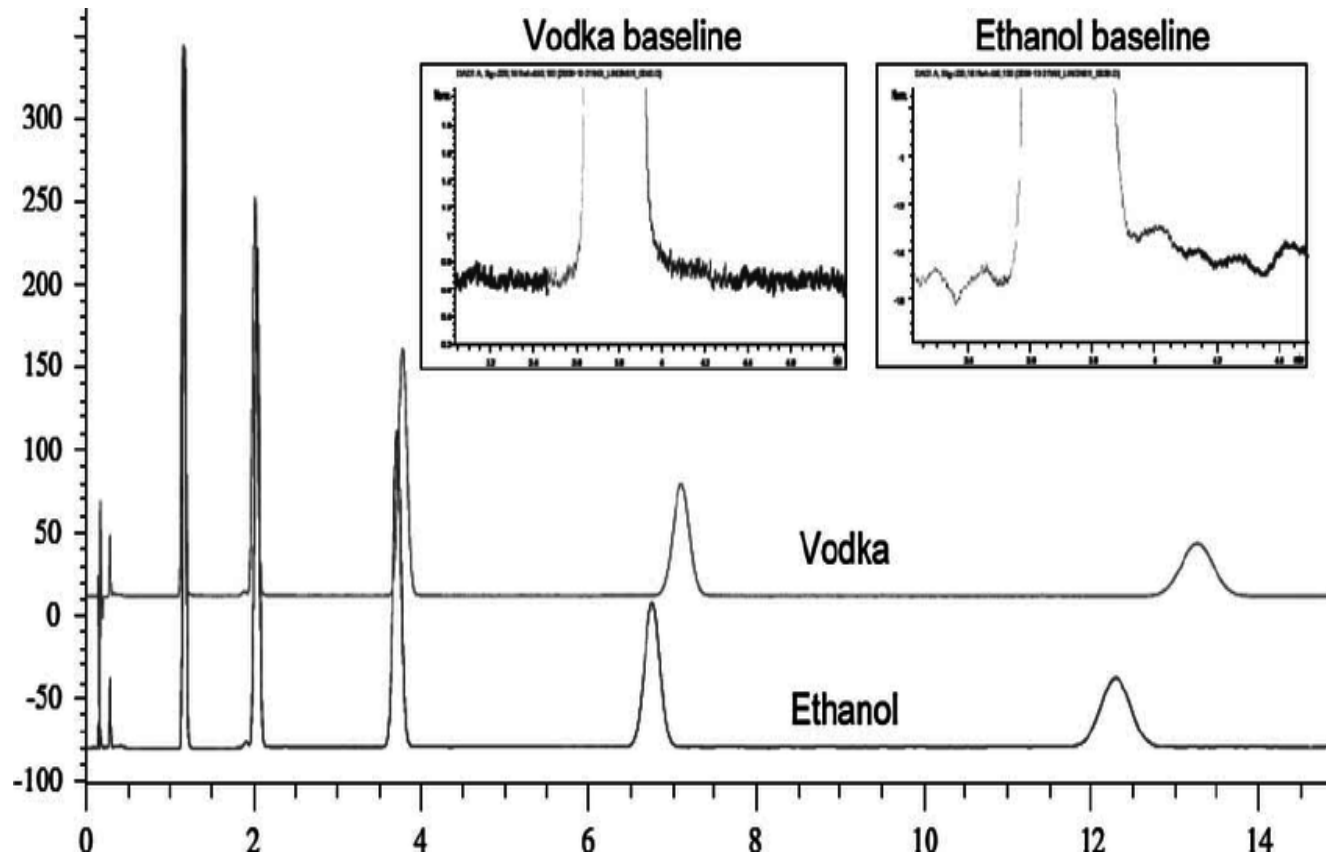








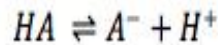
# Oldószer tisztaság



# Pufferek használata

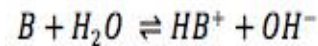
- Ionos és könnyen ionizálható anyagok vizsgálata esetén elengedhetetlen a pH kontroll
- A pufferekkel szemben támasztott általános követelmények:
  - Alacsony hullámhosszú UV cut-off
  - Adott mérési körülmények között nagy pufferkapacitás
  - Szilárdanyag mentesség (szűrés)
  - Tisztaság
  - Kompatibilitás: nagy szerves oldószerhányadnál ne váljon ki

# pH szerepe az RP-HPLC-ben



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$$pK_a = -\log_{10} K_a$$

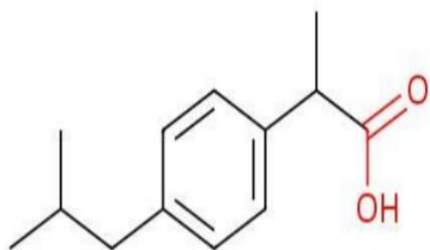


$$K_b = \frac{[OH^-][HB^+]}{[B]}$$

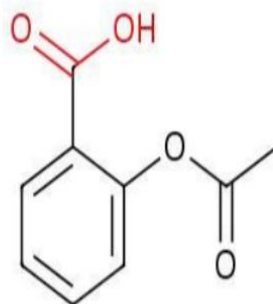
$$pK_b = -\log_{10} K_b$$

- Gyenge bázis egyensúlyban van a konjugált savval, megegyezés szerint gyenge bázisok jellemzésére a konjugált sav  $pK_a$  értékét használjuk (ugyanúgy, ahogy pH-t használunk, és nem pOH-t).
- Minél erősebb a sav, annál kisebb a  $pK_a$  értéke.
- Minél erősebb a bázis, annál nagyobb a  $pK_a$  értéke.

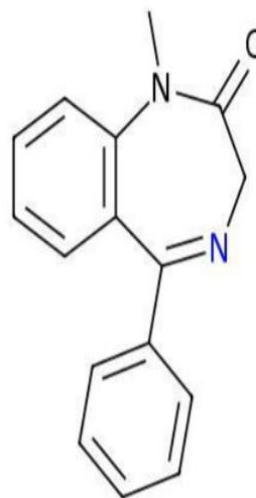
# Néhány vegyület $pK_a$ értéke



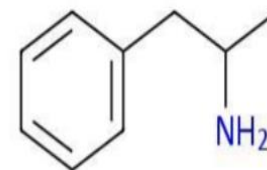
Ibuprofen  $pK_a$  4.9



Aspirin  $pK_a$  3.5



Diazepam  $pK_a$  3.3



Amphetamine  $pK_a$  9.8

# Funkciós csoportok $pK_a$ értékei

Funkciós csoport	$pK_a$ érték (H <sub>2</sub> O)
Karbonsavak	0,65-4,76
Alkoholok	8,4-24,0
Aminok	4,7-38
Amidok	18,2-26,6*
Imidek	8,30-17,9*
Szénhidrogének	15-53
Észterek	11-24,5
Ketonok	7,7-32,4*
Éterek	22,85-49

\*: DMSO-ban

# Pufferek $pK_a$ értékei

Puffer	$pK_a$	pH taromány	UV cut off (nm)
Foszfát	2,1	1,1-3,1	< 200
	7,2	6,2-8,2	
	12,3	11,3-13,3	
Acetát	4,8	3,8-5,8	210 (10 mM)
Citrát	3,1	2,1-4,1	230
	4,7	3,7-5,7	
	5,4	4,4-6,4	
Karbonát	6,1	5,1-7,1	< 200
	10,3	9,3-11,0	
Formiát	3,8	2,8-4,8	210 (10 mM)
Ammónium bikarbonát	7,6	6,6-8,6	230
Borát	9,3	8,3-10,3	N/A

# Vegyületek csoportba sorolása kromatográfiás szempontból

- Kromatográfiás szempontból semleges vegyületek
- Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
- Bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
- Ionos vagy ionizálható vegyületek (fordított fázisú ionpár kromatográfia)

A csoportosítás vezérlő elve, hogy a mozgófázis pH-jának változtatásával megváltozik-e a vegyületek molekuláris formája. Ha ez bekövetkezik, pH kontrollra van szükség.

Fontos továbbá, hogy a szilikagél alapú állófázisoknál a szilanol csoportok molekuláris formáit is állandó értéken kell tartani.

Lehetséges tehát olyan eset, hogy a vegyület molekuláris állapota pH független, de a szilikagél alapú állófázis megköveteli a pH kontrollt



# Kromatográfiás szempontból semleges vegyületek

- pH változás esetén nem változtatják meg molekuláris állapotukat. Mozgófázis oldalról nem szükséges pH kontroll
- Az állófázissal való kölcsönhatás szempontjából két részre oszthatjuk ezt a csoportot:
  - Olyan vegyületek, amelyek csak diszperziós kölcsönhatást tudnak kialakítani az állófázissal (alkil csoportokkal)
  - Azon vegyületek, melyek a szilanol csoportokkal is kölcsönhatásba lépnek

Az első esetben a fordított fázisú töltet apolaritása a döntő, az állófázis hidrofóbicitása (apoláris felület), a második esetben a szilanol csoportok poláris kölcsönhatásra való hajlama (poláris felület) is meghatározza az elválasztást

# 1. a. csoport

- Mindazon szerves vegyületek, melyek szénből, hidrogénből és kovalens kötésű halogénből épülnek fel. A szén – halogén kötés minden esetben polarizált, viszont a halogénatom bevitele a molekulába annak lipofil jellegét jelentős mértékben növeli. Kromatográfiás szempontból ez a hatás érvényesül közvetlenül. A szén – halogén atom polarizációjából eredő töltéseltolódás hatása a fordított fázisú kromatográfiás körülmények között elhanyagolható. A visszatartást az apoláris felülettel való kölcsönhatás szabja meg.
  - Aromás és alifás szénhidrogének (folyadékkromatográfiás szempontból kiemelve a több gyűrűsek)
  - Policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok)
  - Halogénezett aromás és alifás szénhidrogének

# 1. b. csoport

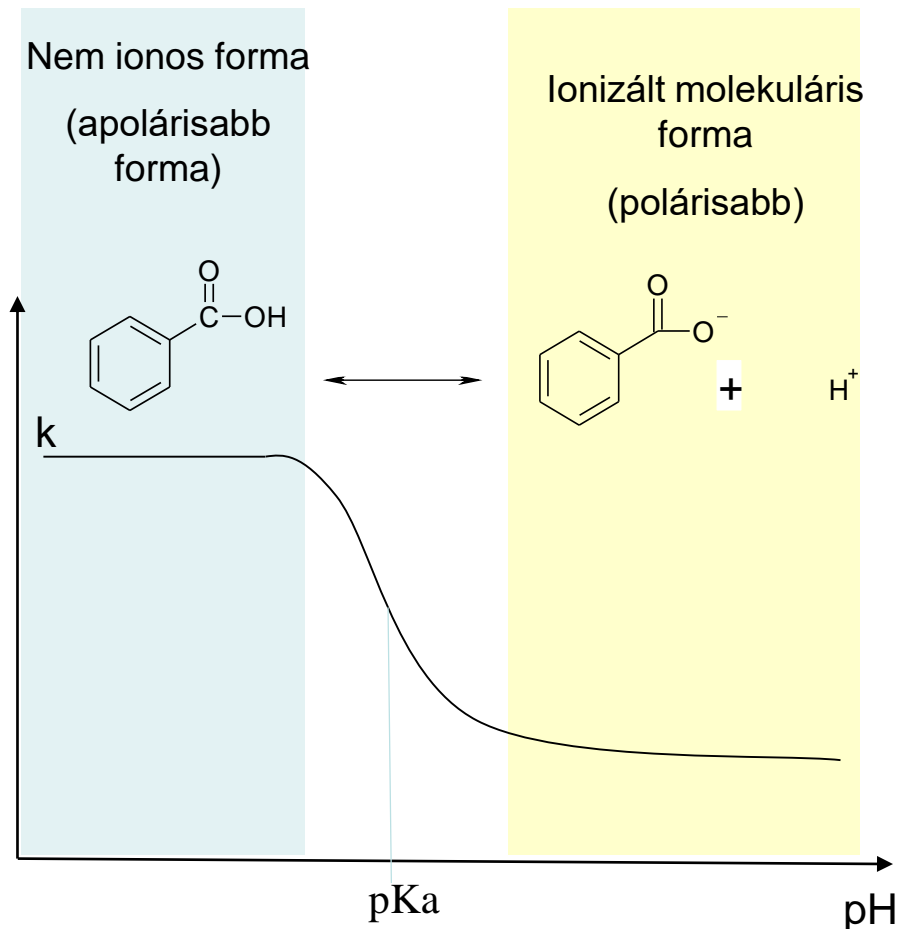
- Minden esetben tartalmaznak poláris csoportot vagy csoportokat. Ezek a csoportok vagy H-hidas kötést alakítanak ki az állófázis szilanol csoportjaival, vagy dipól-dipól kölcsönhatásba lépnek azokkal. Ezeket a kölcsönhatásokat együttesen polárisként adjuk meg a folyadékkromatográfiás gyakorlatban. Ezek a poláris kölcsönhatások energetikailag nagyobbak, mint a diszperziós, de fordított fázisú körülmények között nem szélesítik ki elfogadhatatlanul a kromatográfiás csúcsokat vagy teszik aszimmetrikussá azokat. A poláris kölcsönhatást ki tudjuk használni az elválasztás hatékonyságának növelésére.
  - Alkoholok
  - Éterek
  - Aldehydekek
  - Ketonok
  - Nitrilek
  - Nitro-vegyületek
  - Azo vegyületek

Azonos váz esetén a visszatartást a csoportok H-hidas kölcsönhatásra való hajlama szabja meg. Az alkoholok nagyobb erősségűt tudnak kialakítani, mint az oxo-vegyületek, és ha ez a kölcsönhatás lesz a domináns a visszatartásnál, akkor a retenciójuk is nagyobb lesz.

# Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

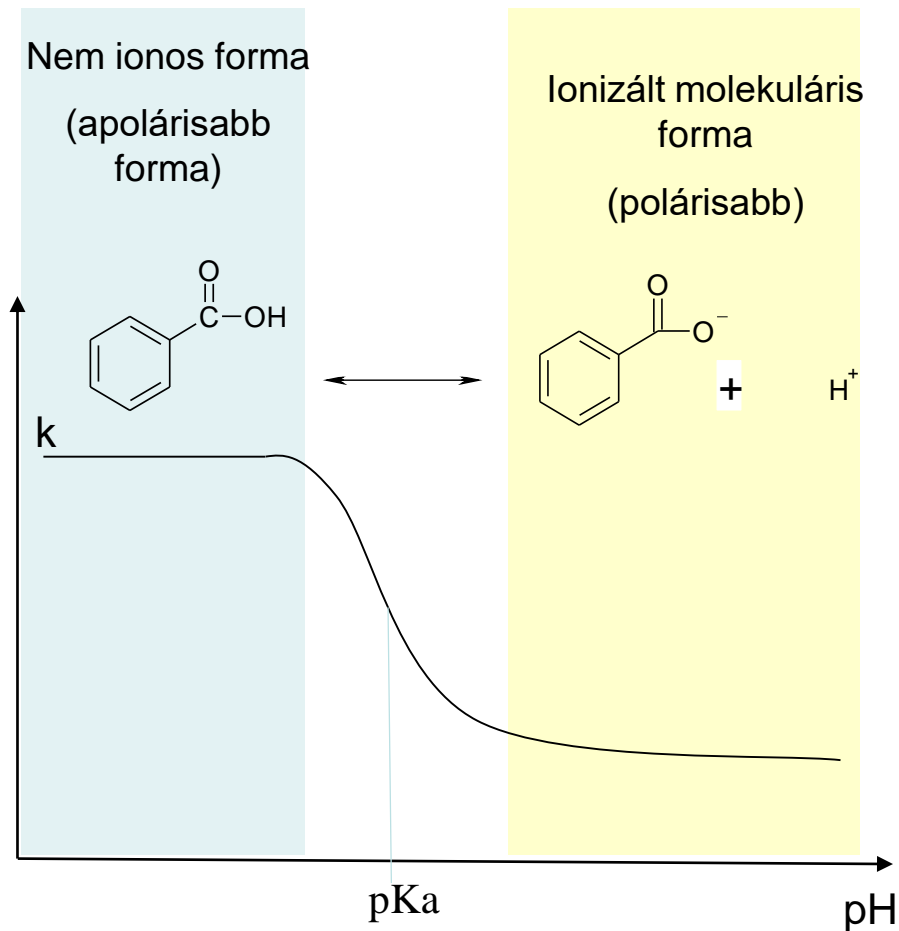
- pH-tól függően két molekuláris állapotban lehetnek jelen, s ezeknek a mozgófázisban való oldhatósága eltérő. Ebből következik, hogy ha pH kontroll nélkül próbálnánk mérni, és a körülmények valami miatt megváltoznak, akkor a molekuláris formák aránya is változni fog, ami pedig a visszatartási tényező definíciójának megfelelően a retenció megváltozását eredményezi.
- A pH kontroll célja biztosítani a mozgófázisban a molekuláris formák arányának állandóságát, illetve azt, hogy vagy csak az egyik vagy másik forma legyen jelen.
- A fentiek igazak a bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületekre is.

# Savas vegyület: retenciós tényező pH függése RP-HPLC-ben



1. A  $pH < pK_a - 2$  értéknél savasabb tartományban a vegyület ionvisszaszorított formában van jelen, a kölcsönhatási formák száma kevés és kis erősségű, keskeny csúcs, nagy a visszatartás, robusztus a módszer. Ebben az állapotban a savas csoport csak H-hidas kötést alakít ki a szilanol csoporttal. Ez a kölcsönhatás fordított fázisú körülmények között gyenge és a továbbiakban kihasználható az elválasztás optimalizálásánál.

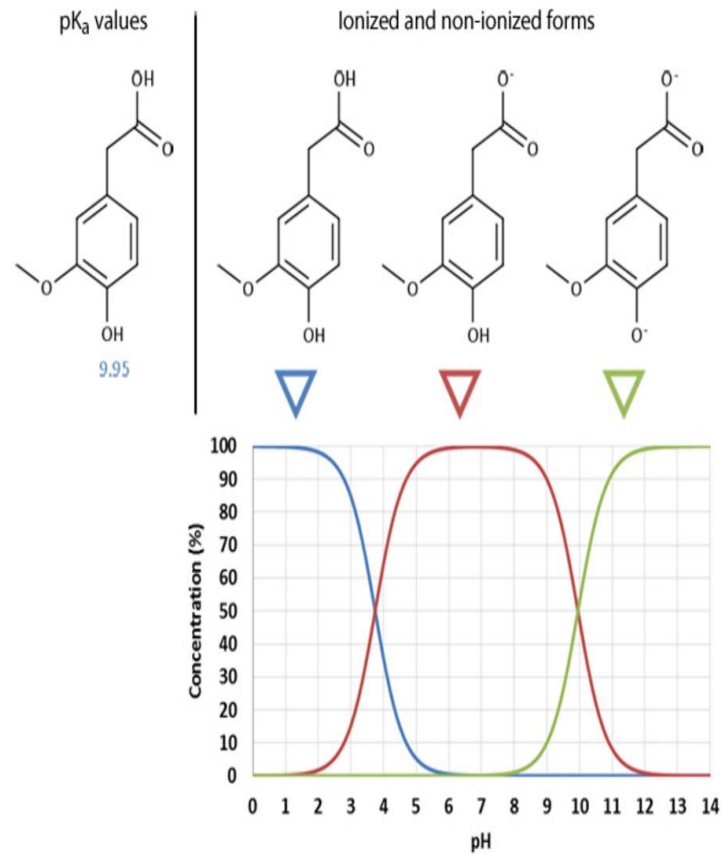
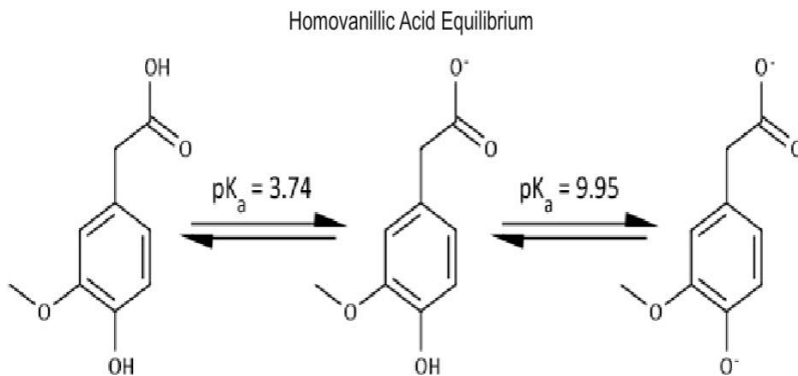
# Savas vegyület: retenciós tényező pH függése RP-HPLC-ben



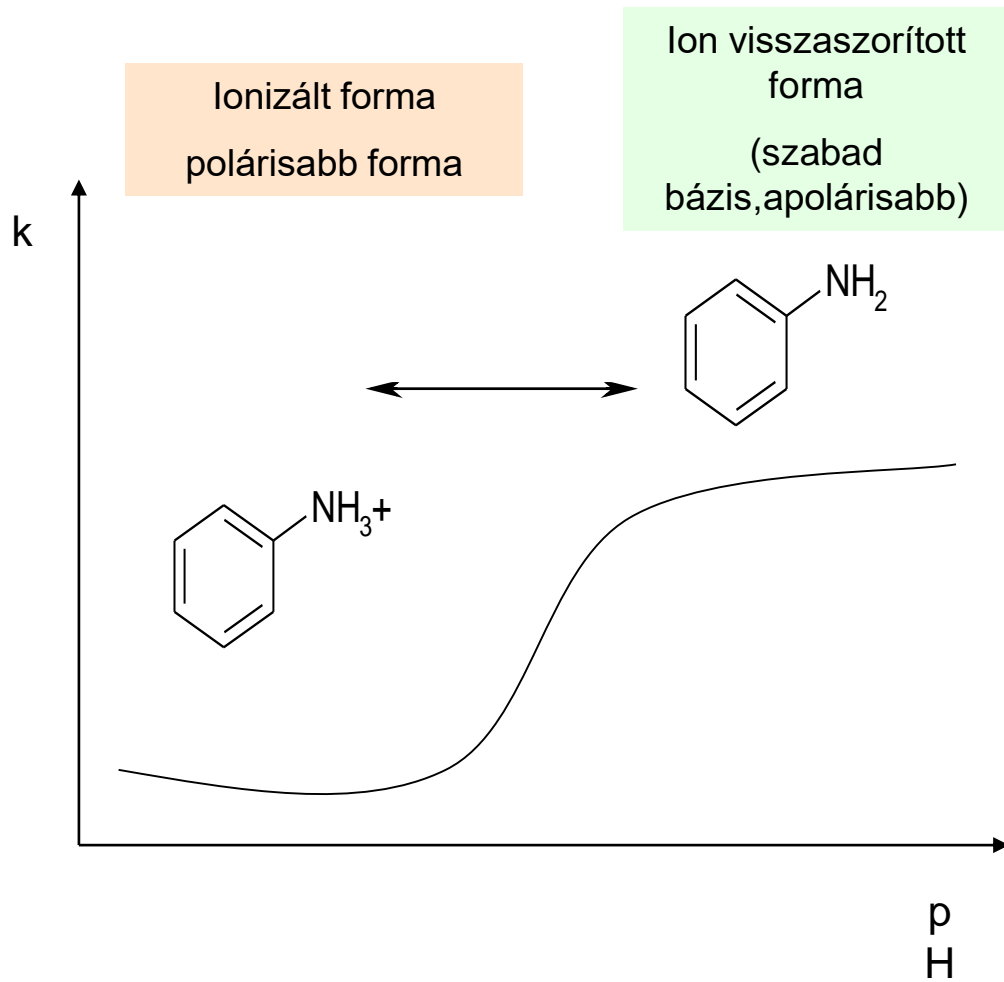
2. A  $pH > pK_a + 2$  értéknél lúgosabb tartományban a molekula ionos formában van, a kölcsönhatási formák száma kicsi, jó a csúcsalak, kicsi a visszatartás, robusztus a módszer. Kérdés, hogy a  $k > 1$  kritérium teljesül-e. A szilikagél alapú állófázisoknál a másik korlát a kolonna felső megengedett pH-ja. A gyakorlatban kevésbé használt tartomány

3. A  $pH = pK_a \pm 2$  tartományban a molekula mindkét formája jelen van, a visszatartás attól függ, milyen a két forma aránya. Több kölcsönhatási forma is szerepet játszik, a csúcs széles. Nem robusztus a módszer, hiszen kis pH változás esetén a két molekulaforma arányának megváltozása miatt jelentős retencióváltozás következhet be.

# Savas vegyület



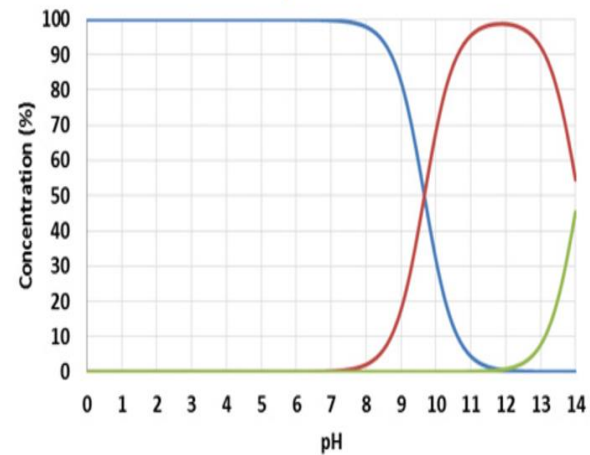
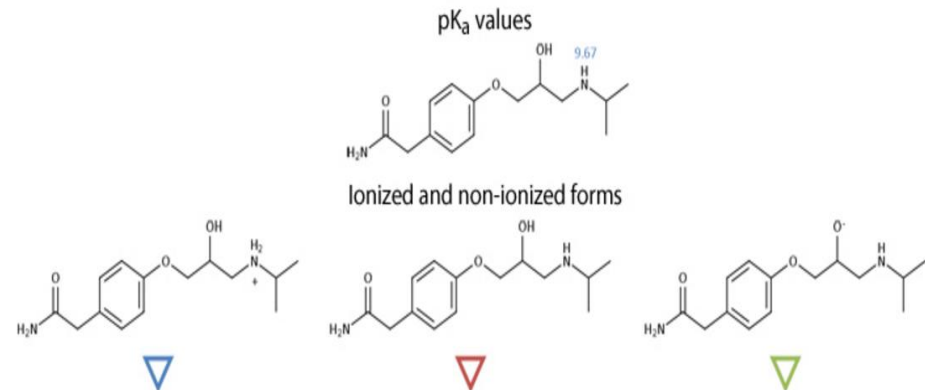
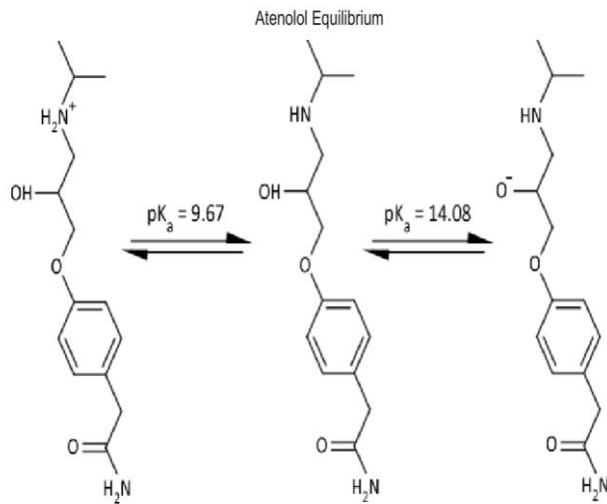
# Bázikus vegyület: retenciós tényező pH függése



1.  $\text{pH} < \text{pK}_a - 2$  : ionos forma, kisebb visszatartás. Kölcsönhatási lehetőségek száma kicsi, szimmetrikus csúcs
2.  $\text{pH} > \text{pK}_a + 2$  : ionvisszaszorított forma, ez az apolárisabb, nagyobb visszatartás
3.  $\text{pH} = \text{pK}_a \pm 2$  : a molekula mindkét formája jelen van



# Bázikus vegyület



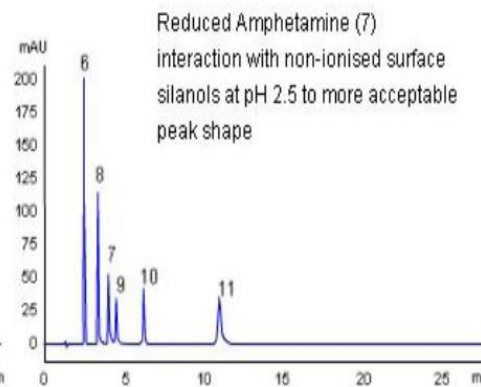
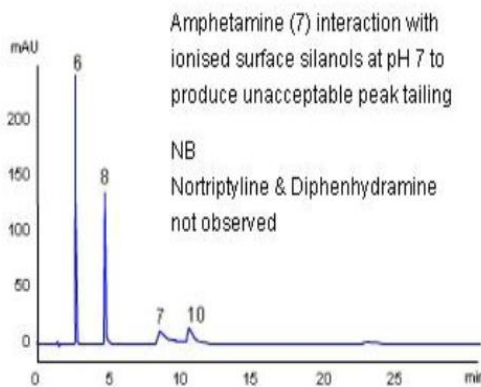
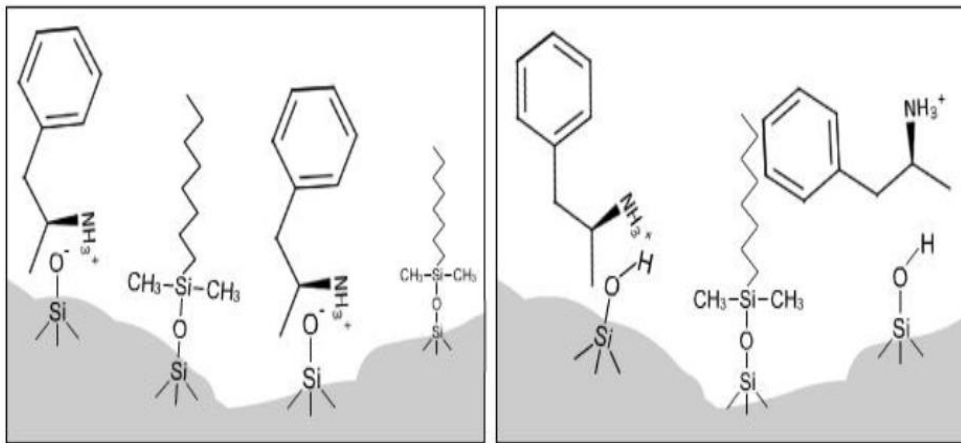
# Bázikus anyagok - ionelnyomás

- Protonált bázisok gyakran nagy retenciával rendelkeznek, és elnyúló csúcsot adnak.
- Ennek oka a szilanol-csoportokkal való kölcsönhatás.

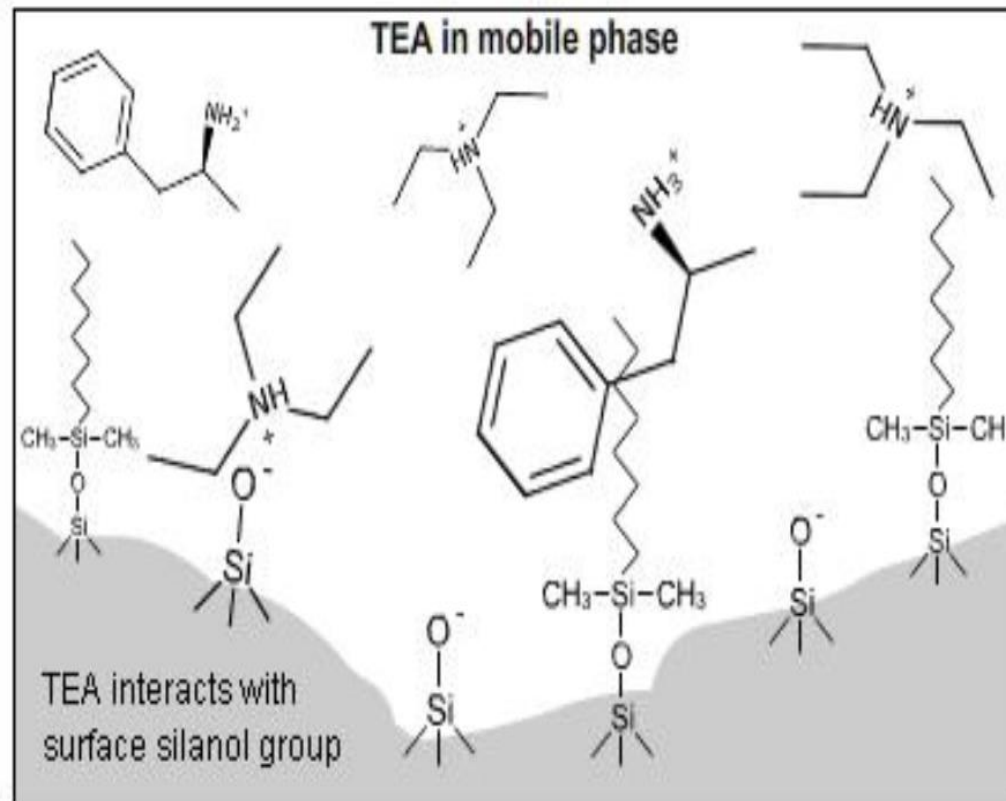
## **Kiküszöbölése:**

- pH csökkentése
- Trietilamin (TEA) adagolása

# Bázikus anyagok csúcsalakjának javítása a pH csökkentésével

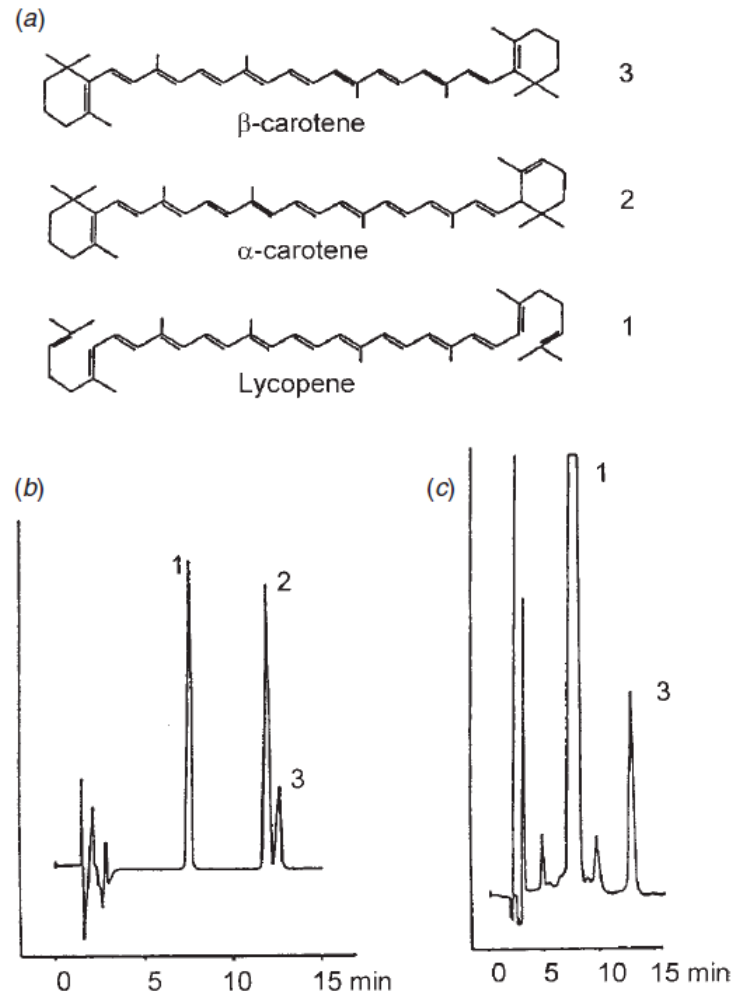


# TEA



# „Nemvizes” fordított fázisú HPLC - NONAQUEOUS REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHY (NARP)

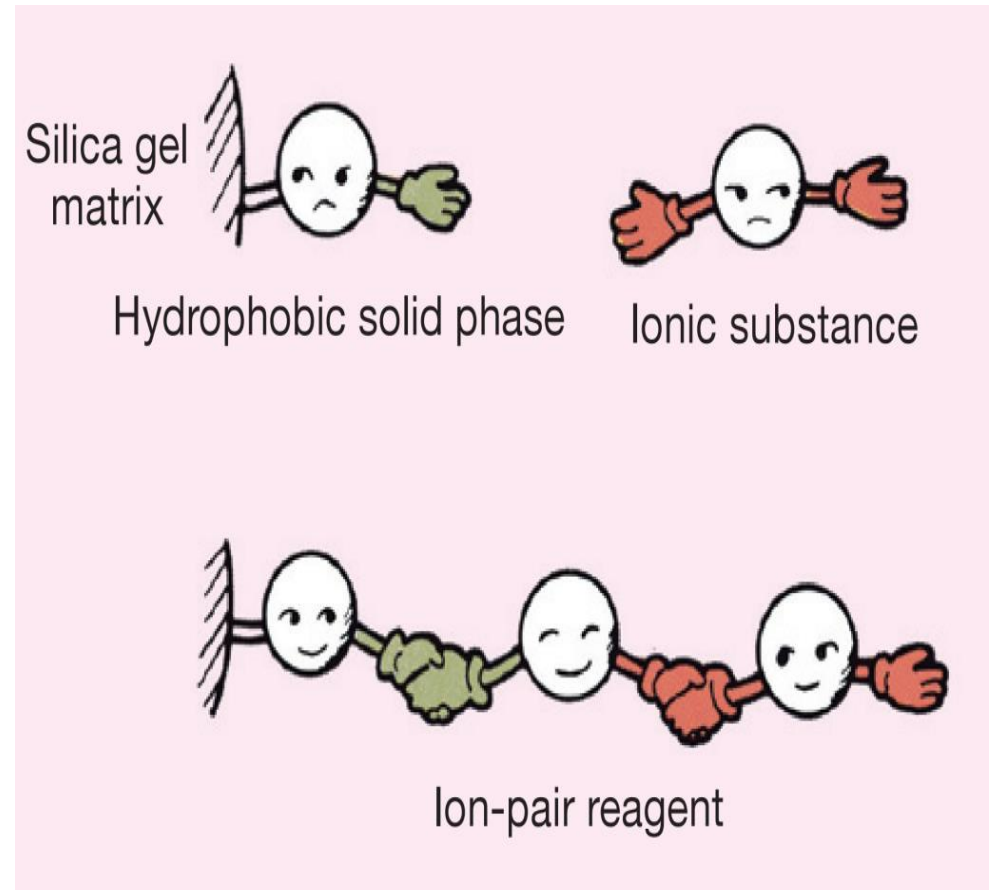
- Nagyon hidrofób komponensek esetén, amik nagy retencióval rendelkeznek, 100% AcN esetén sem eluálódnak (pl.: lipidek, szintetikus polimerek)
- A oldószer: polárisabb (AcN vagy metanol), B oldószer: kevésbé poláris (THF, diklór-metán, kloroform, MTBE)
- pl.: C18 oszlop, AcN-kloroform, b: standard, c: paradicsom extraktum



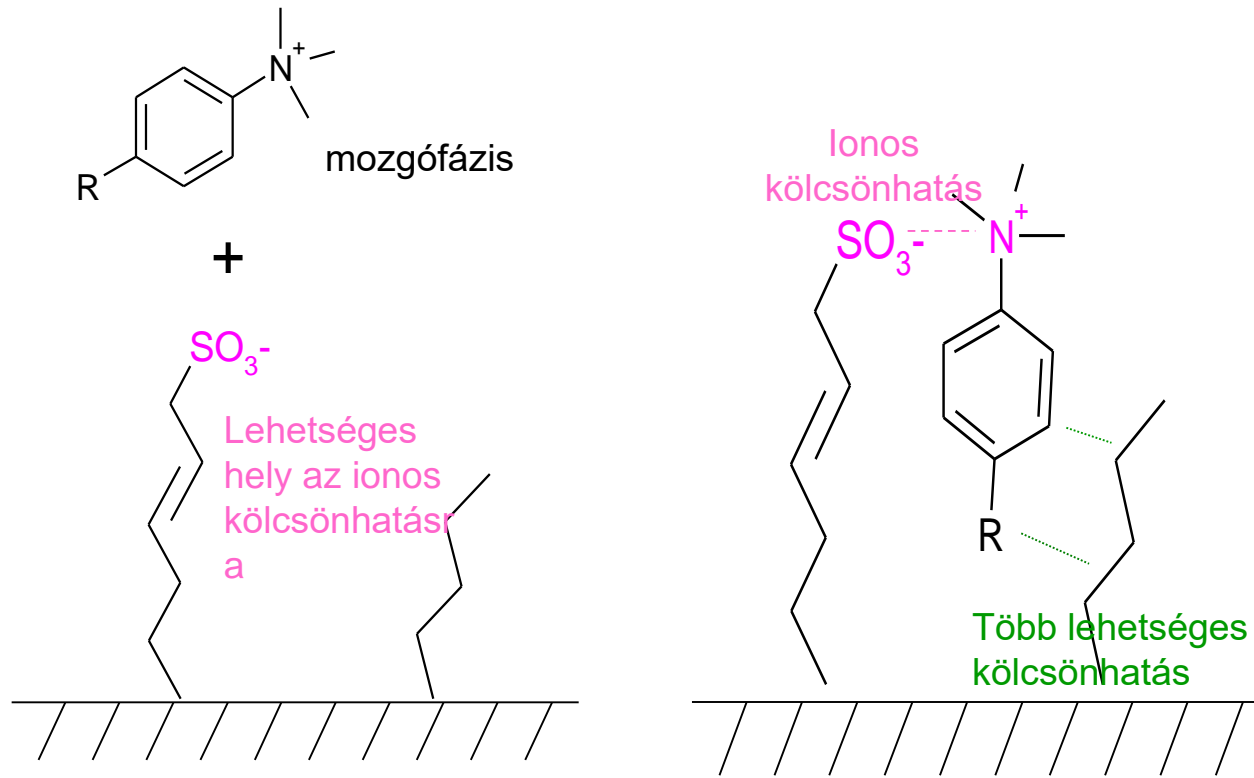
# Fordított fázisú ionpár kromatográfia

## RP-IP-HPLC

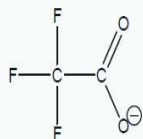
- Ionos vagy könnyen ionizálható vegyületek visszatartása RP-HPLC-ben kicsi.
- Visszatartás növelése: 1-100 mM ionpárképző, hidrofób részt tartalmazó ionos anyag adagolása az eluenshez. Az ionpárképző megváltoztatja az állófázis felületét, valamint ion-asszociátumot képez a mérendő molekulával. Az asszociátum apolárisabb lesz, mint az eredeti vegyület.



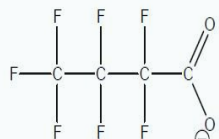
# RP-IP-HPLC



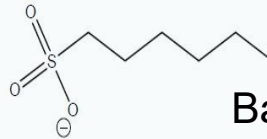
# RP-IP-HPLC, ionpárképzők



Trifluoroacetic acid  
(TFA)

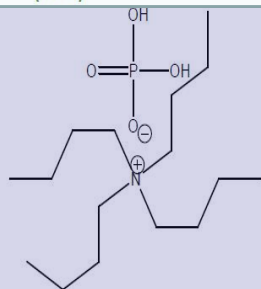


Heptafluorobutyric acid  
(HFTBA)

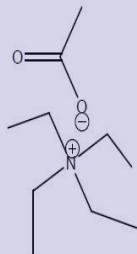


Hexanesulfonic acid

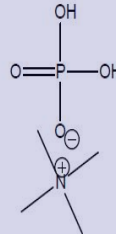
Bázikus anyagokhoz



Tetrabutylammonium  
phosphate (TBA)



Triethylammonium  
acetate (TEAA)



Tetramethylammonium  
phosphate (TMA)

Savas anyagokhoz



# RP-IP-HPLC, a visszatartást és szelektivitást befolyásoló tényezők

- Főbb folyamatok:
  - Ionpár képződése az eluensben
  - Ionpárképző adszorpciója az álló fázis felületén
  - Ionpárképző és a vegyület együttes adszorpciója az állófázis felületén
  - Ionos formában lévő anyagok megkötődése az adszorbeálódott ionpárképzőn

## **Kontrollálható paraméterek:**

szerves oldószer minősége, mennyisége

pH (puffer típusa és koncentrációja)

idegen só koncentrációja

ionpárképző koncentrációja, jellege (láncossz, elágazó/nem elágazó, só vagy ionizálható)

hőmérséklet

# Tanaka teszt

Retenciós tényező(kPB) - mérése pentilbenzollal (kPB) (holdidő meghatározása metanollal). Retenciós tényező:

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

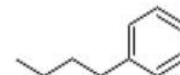


Körülmények: MeOH–H<sub>2</sub>O (8:2, v/v), 1,0 ml/min,  
40 °C, 5 µl pentilbenzol (0,6 µg/ml) injektálása

A pentilbenzol retenciós tényezője a felület nagyságáról, a felületi borítottságról ad információt. A fázis retenciós tulajdonságairól ad felvilágosítást fordított fázisú módban. Nagyobb kPB érték azt jelenti, hogy az oszlop hidrofóbbabb, így a hidrofób anyagokat jobban visszatartja. A fenil módosított állófázisnál azonban, ami kevésbé hidrofób nagyobb kPB értéket kapunk a  $\pi - \pi$  kölcsönhatások miatt.

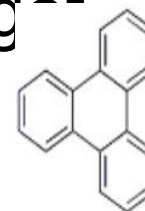
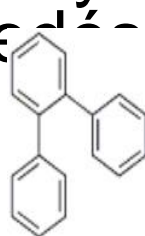
# Tanaka teszt 2.

- Hidrofób szelctivitás  $\alpha_{\text{CH}_2}$  - pentilbenzol és butilbenzol retenciós tényezőjének hányadosa. Az oszlop azon tulajdonságát jellemzi, hogy hogyan tud elválasztani két anyagot, amik csak egy metil-csoportban különböznek



- $\alpha_{\text{CH}_2} = k_{\text{PB}} / k_{\text{BB}}$

- Alak szelektivitás  $\alpha_{\text{T}/0}$  - Az oszlop azon tulajdonságát jellemzi, hogy hogyan tud elválasztani egy planáris anyagot (trifenilén) és egy nagyobb térbeli kiterjedésű anyagot

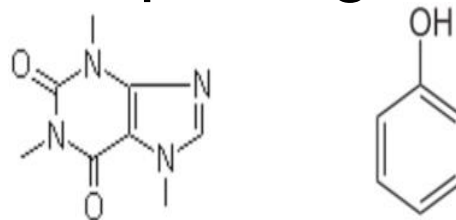


- $\alpha_{\text{T}/0} = k_{\text{T}} / k_0$

# Tanaka teszt 3.

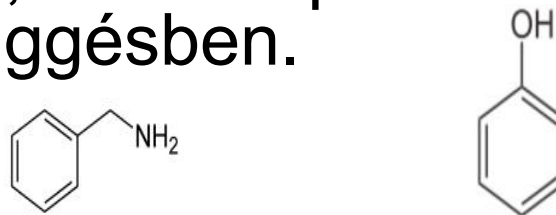
- Hidrogén kötés kapacitás  $\alpha_{C/P}$  - Koffein és fenol retenciós tényezőjének hányadosa. Az oszlop hidrogén kötés kialakítási képességét írja le.

- $\alpha_{C/P} = k_C / k_P$



- Totál ioncsere kapacitás  $\alpha_{B/P}$  pH7,6 – Benzilamin (pKa:9,33) és fenol (pKa:9,95) retenciós tényezőjének hányadosa, az oszlop szilanol-aktivitásával van összefüggésben.

- $\alpha_{B/P} = k_B / k_P$  (pH 7,6)



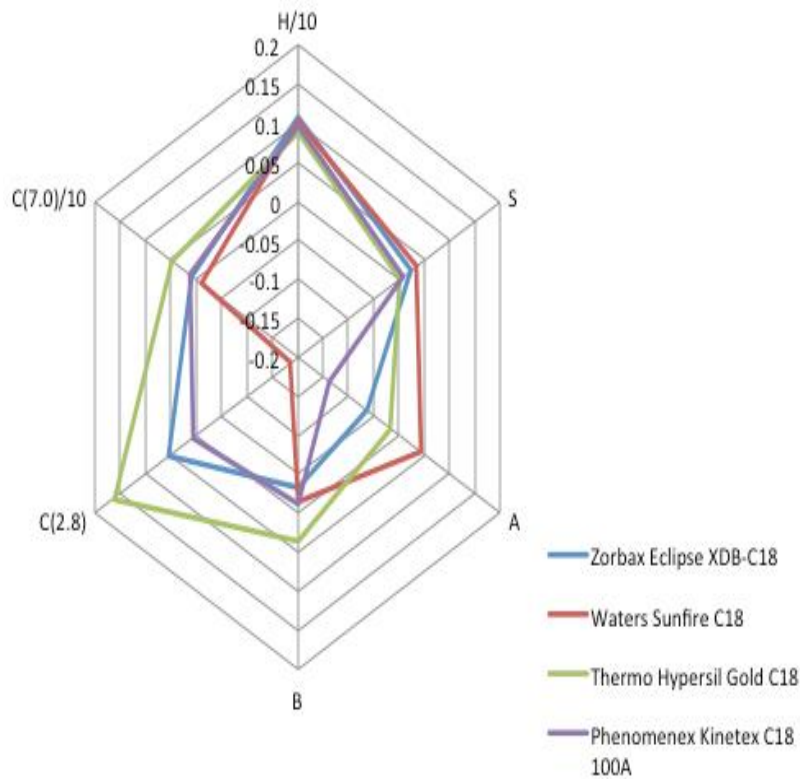
# Tanaka teszt 4.

- Savas ioncsere kapacitás  $\alpha_{B/P}$  pH2,7 – Benzilamin (pKa:9,33) és fenol (pKa:9,95) retenciós tényezőjének hányadosa. Ezen a pH-n a felületi szilanol csoportok nem-ionizált formában vannak jelen, csak a legsavasabb csoportok vannak ionizált formában. Ha nagy az érték, arra utal, hogy vannak jelen erősen savas szilanol csoportok -> rossz csúcsalak
- $\alpha_{B/P} = k_B / k_P$  (pH 2,7)

# Különböző C18-as oszlopok összehasonlítása

- H: hidrofóbicitás
- S: sztérikus vagy alak effektus
- A: „Hydrogen Bond Acidity” (Nagy A értékű kolonnák használhatók 100% vizes eluenssel)
- B: „Hydrogen Bond Basicity”
- C (2,8): Szilanol ionizáció pH=2,8-nál
- C (7): Szilanol ionizáció pH=7-nél

# Különböző C18-as oszlopok összehasonlítása



Manuf acture r	Zorbax	Waters	Therm o	Pheno menex
<b>Brand</b>	Eclipse	Sunfire	Hypersil Gold	Kinetex
<b>Style</b>	XDB-C18	C18	C18	C18 100A
<b>H</b>	1.077	1.031	0.881	0.963
<b>H/10</b>	0.1077	0.1031	0.0881	0.0963
<b>S</b>	0.024	0.034	0.002	0.009
<b>A</b>	-0.063	0.044	-0.017	-0.137
<b>B</b>	-0.033	-0.014	0.036	-0.011
<b>C (2.8)</b>	0.055	-0.186	0.162	0.007
<b>C (7.0) / 10</b>	0.0088	-	0.0479	0.0125
<b>C (7.0)</b>	0.088	-0.099	0.479	0.125