

KROMATOGRÁFIA

Előadás BSc. hallgatóknak

Dr. Balla József

2016. őszi félév

A kromatográfia felfedezője és névadója



Mihail Szemjonovics
Cvet
(1872-1919)

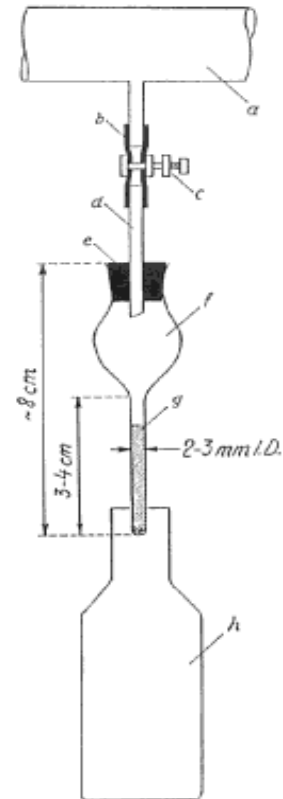
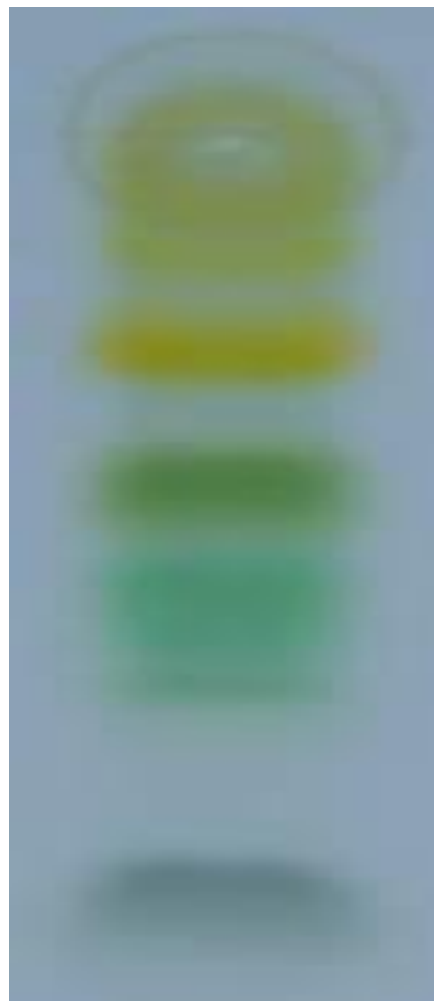
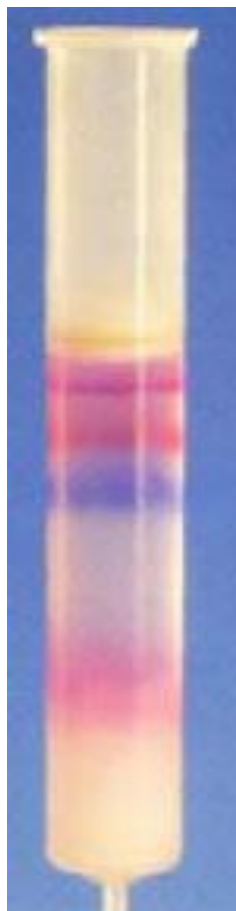


Fig. 5.3. Tswett's chromatographic column and its connection to the manifold of his chromatographic system. *a* = Manifold, *b* = rubber tube, *c* = pinch-cock, *d* = glass tube, *e* = cork, *f* = solvent reservoir, *g* = chromatographic column, *h* = flask to collect the eluting solvent.

Kromatográfia



Karotinoidok

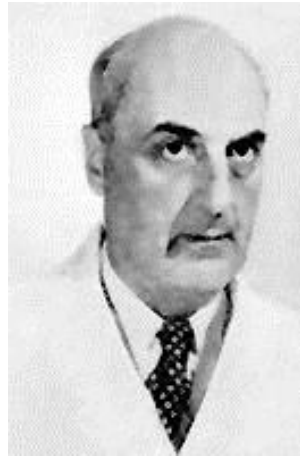


Richard Kuhn
(1900-1967)

1938 Nobel-díj abszorpciós
kromatográfia



Edgar Lederer
(1908-1988)



Zechmeister László
(1889-1972)



Cholnoky László
(1899-1967)

Die chromatographische Adsorptionsmethode. Grundlagen,
Methodik, Anwendungen, Wien, 1937



Archer John Porter
Martin



Richard Laurence Millington
Synge

A megoszlási kromatográfia terén végzett munkásságukért **1952-ben Nobel-díj kaptak.**

A GC KEZDETE

Kováts Ervin,



Horváth Csaba

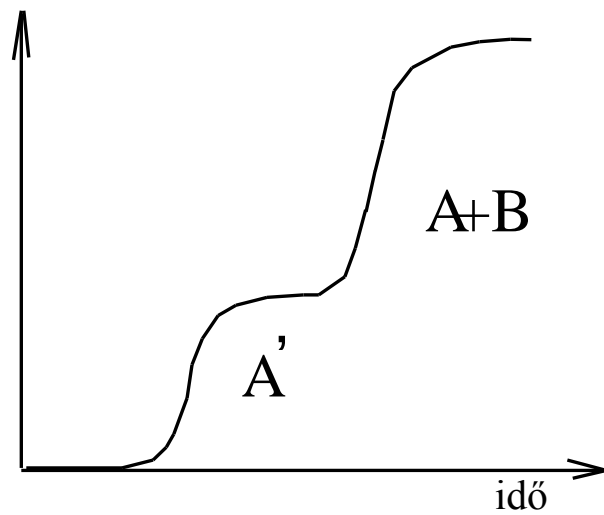
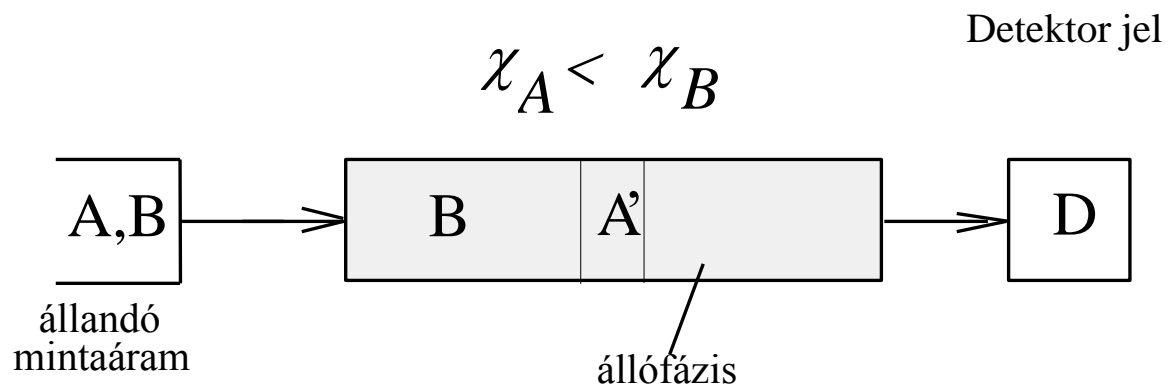


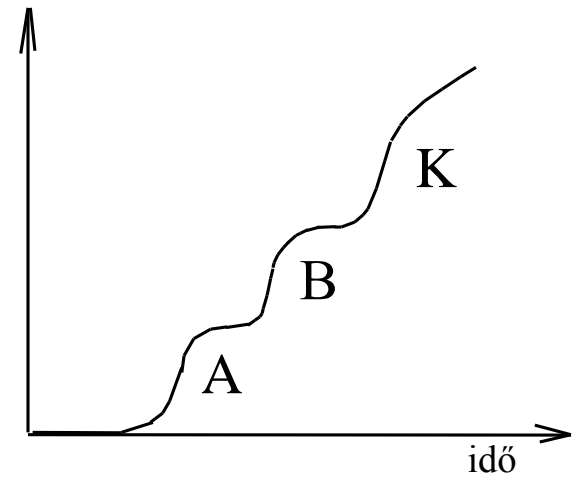
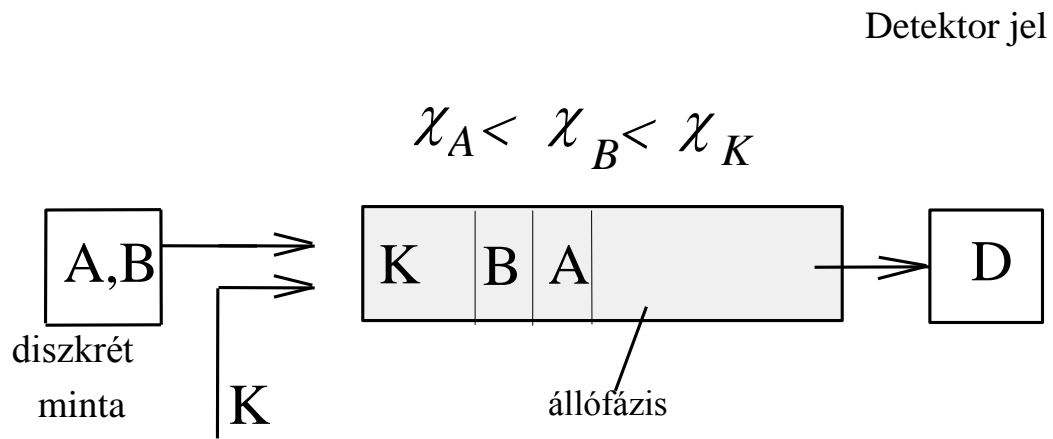
Történet

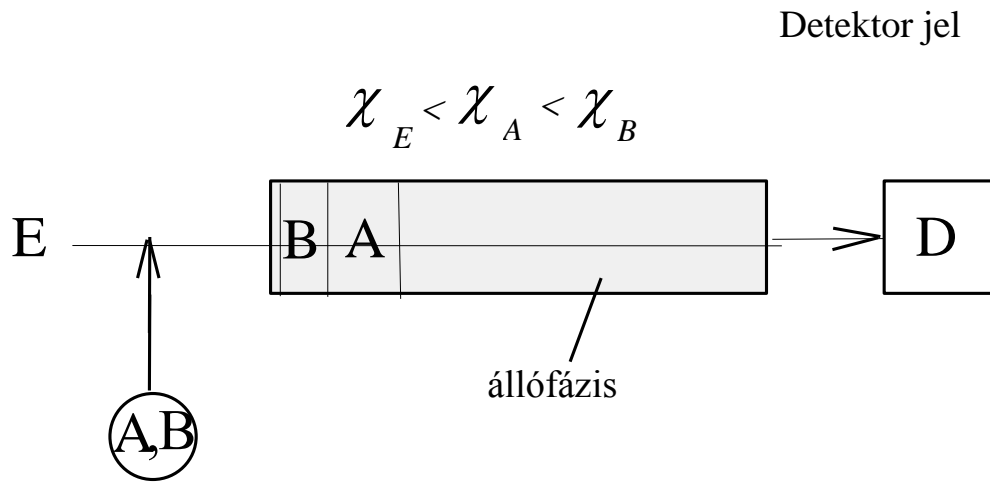
- **1897 D.T.Day** fullerföld, nyersolaj
- **1906 M.Zwett**. A kromatográfia felfedezője és névadója.
Chroma graphien, χρωμα γραφο
- **1937 Zechmeister és Cholnoky** (első könyv, angolul)
- **1937 Tiselius**: Elektroforézis
- **1940 Ioncserélő kromatográfia** Izmailov, Schreiber
- **1941 A.P.Martin és Synge**. Megoszlási folyamatok
- **1944 Consden, Gordon, Martin**: Papírkromatográfia
- **1952-58 E.Stahl**: Rétegkromatográfia
- **1952 James, Martin**: Gázkromatográfia
- **1957 E.Kováts**: Retenciós index
- **1958 Golay**: kapilláris GC

- **1961 G.Schay: A gázkromatográfia alapjai, Akadémiai Kiadó, 1961.**
 - **1963-66 Giddings: Egységes elmélet lehetősége**
 - **1965-68 Horváth, Huber, Snyder, Kirkland, Halász, SCOTT: HPLC**
 - **1978-79 Dandenau: kvarcüveg kapilláris**
 - **1976-80 Regnier, Horváth, Karger: biopolimerek elválasztása**
 - **1981-83 Jorgenson, Lukács: kapilláris elektroforézis (CE)**
 - **1982-85 Novotny, Lee: SCF**
- GC-MS, HPLC-MS**

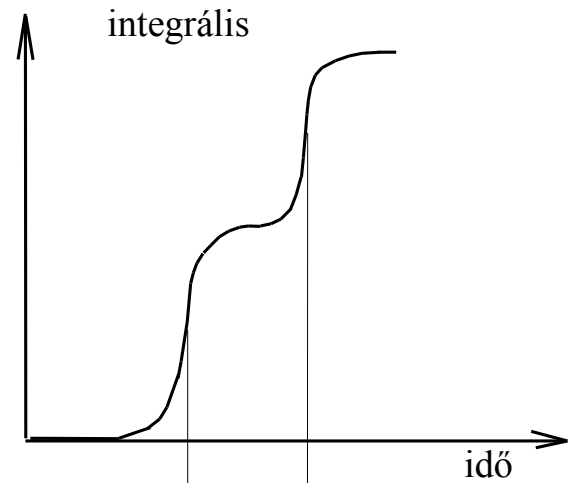
	Mozgófázis	Állófázis	
		szilárd	folyadék
GÁZKROMATOGRÁFIA (GC)	gáz	GSzK (GSC) gáz-szilárd kromatográfia	GFK (GLC) gáz-folyadék kromatográfia
SZUPERKRITIKUS FLUID KROMATOGRÁFIA (SFC)	szuperkritikus fluidum	SFK (SFC)	
FOLYADÉK- KROMATOGRÁFIA (LC)	folyadék	FSzk (LSC) VRK (TLC) vékonyréteg kromatográfia IK (IC) ionkromatográfia GK (Gél) gélkromatográfia	FFK (LLC) PK (PC) Papír kromatográfia



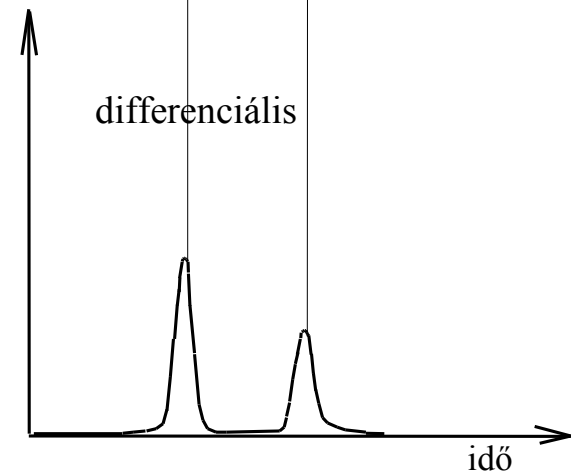


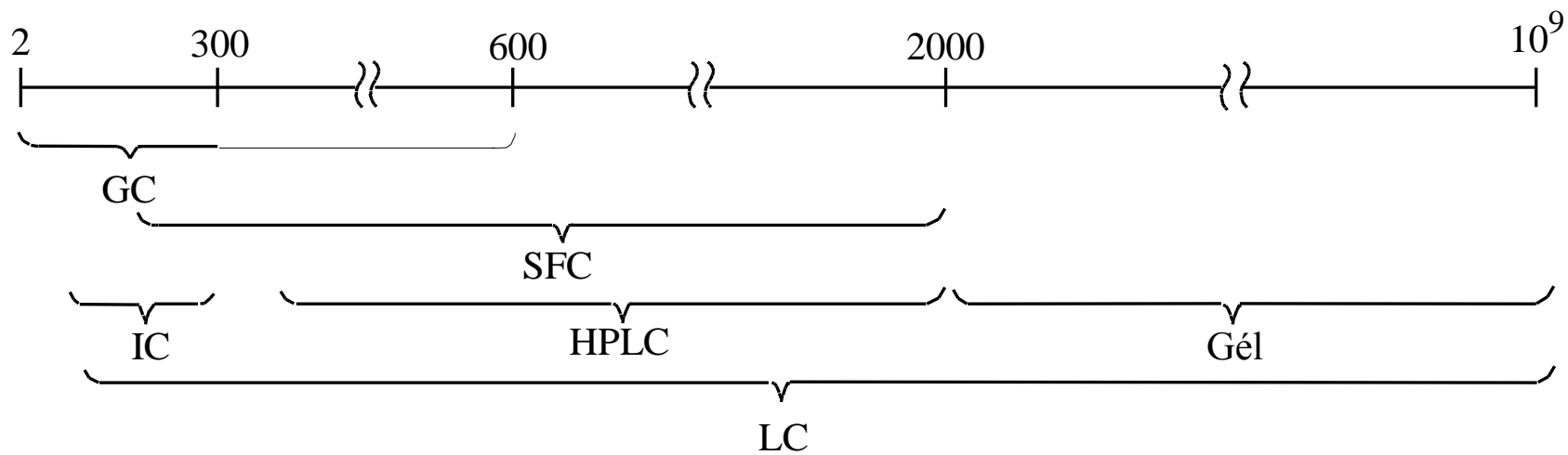


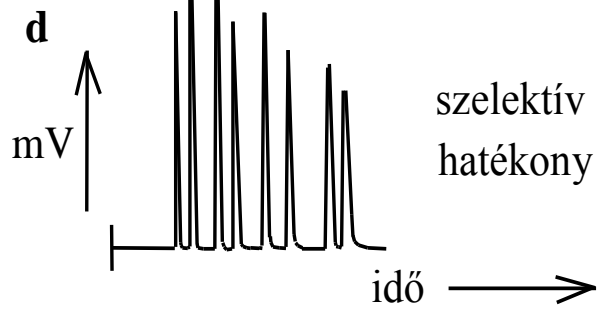
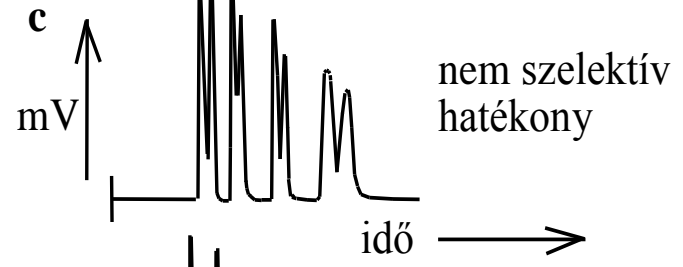
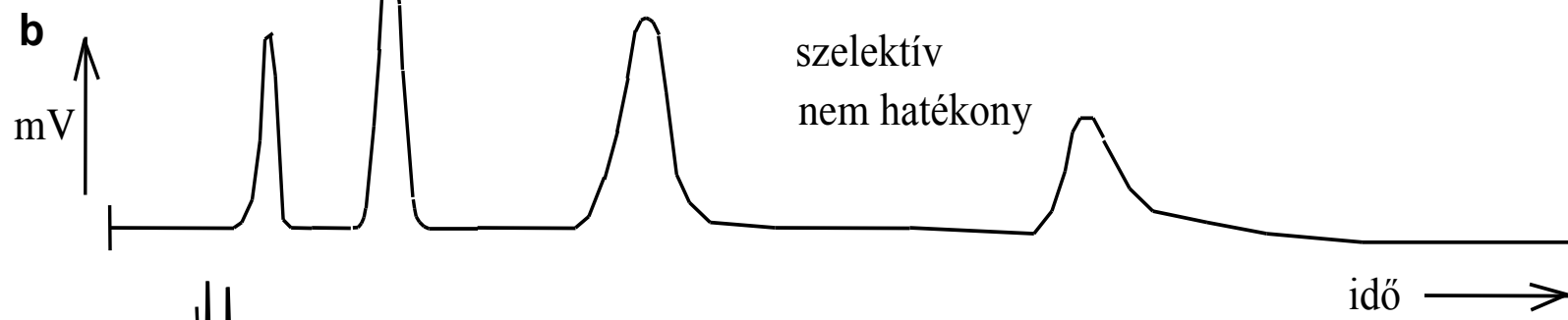
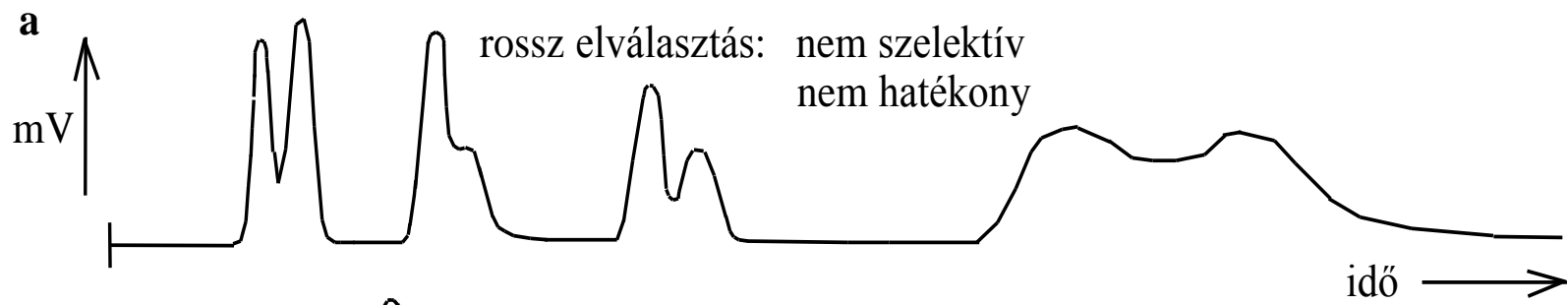
Detektor jel



Detektor jel







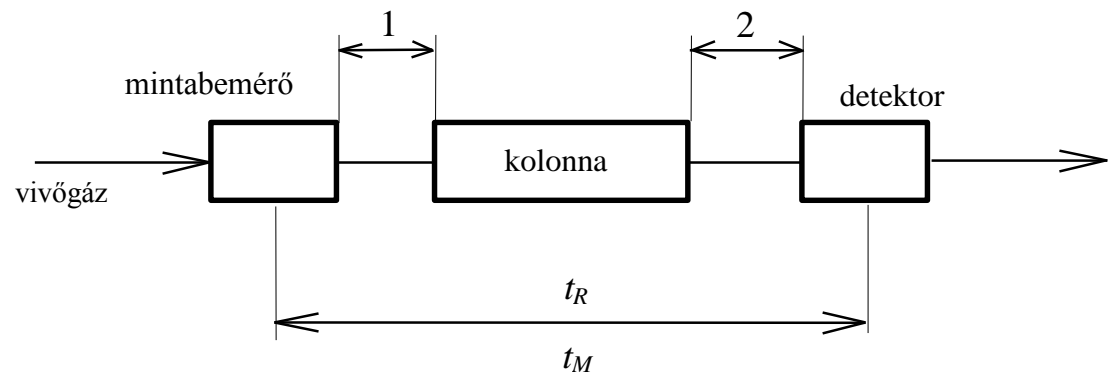
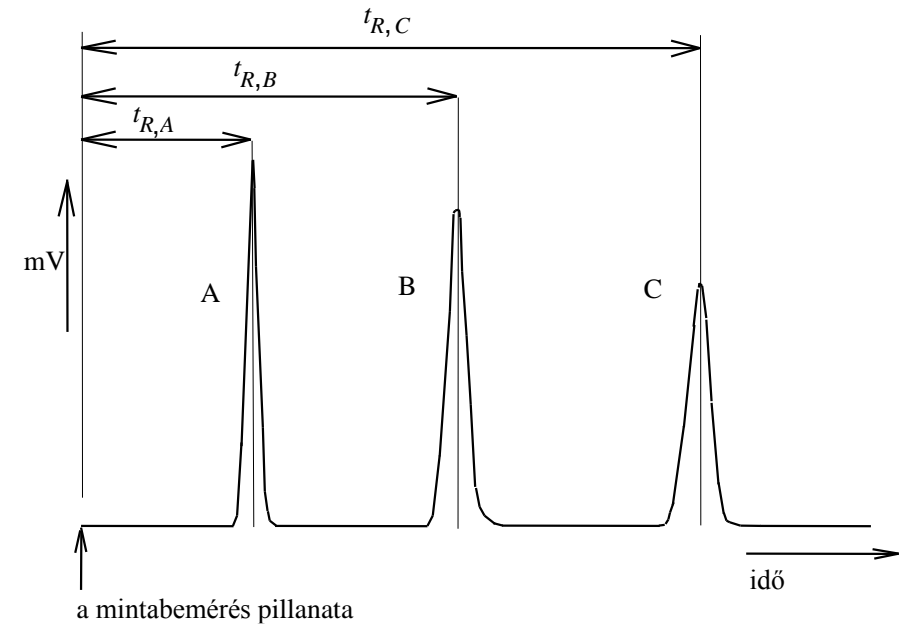
GC

A gázkromatográfiás elválasztás leírásának alapkérdései

- **-a mozgófázis áramlásával összefüggő problémák (áramlás szemcsés tölteten és üres csőben),**
- **-az anyagátmenetet leíró gázkromatográfiás elméleti megközelítések,**
- **-a jellemző molekulakölcsönhatások,**
- **-a koncentrációeloszlás, csúcsalak és az elválasztás jellemzésére vonatkozó legfontosabb ismeretek.**

Retenció

- Retenciósidők
- Retencióstérfogatok
- Relatívretenció

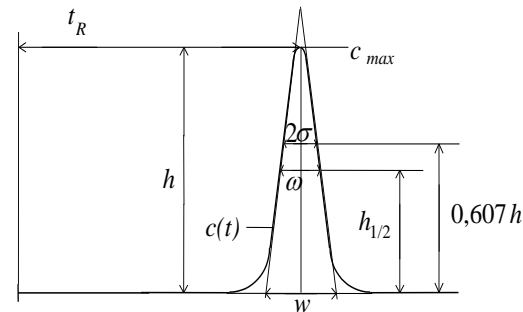


Kromatográfiás alapösszefüggések I.

- Bruttó retenciós idő t_R
- Holtidő t_M
- Redukált retenciós idő $t'_R = t_R - t_M$
- Kolonnahossz L
- Lineáris áramlási sebesség u
- Megoszlási hányados $K = \frac{c_s}{c_m}$
- Retenciós tényező $k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{n_s}{n_m}$
- Csúcsszélesség w
- Relatív csúcsszélesség w/t_R
- Tányérszám N
- Elméleti tányérmagasság $HETP=L/N$

Gázkromatográfiás alapfogalmak

- Megoszlási hányados
- Szelektivitás
- Hatékonyság
- Felbontóképesség

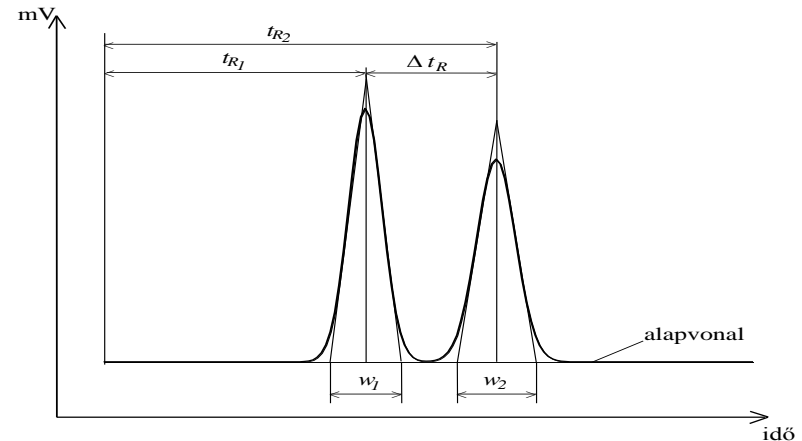


$$w = 4\sigma$$

$$\omega = w \sqrt{\frac{\ln 2}{2}} = 2\sigma \sqrt{2 \ln 2}$$

$$A = h\omega$$

$$c_{max} = \frac{m}{V_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}}$$



$$R_s = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1} \geq 1,5$$

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

Kromatográfiás alapösszefüggések II.

1. A szükséges, de elégséges felbontóképesség.

Általában:

$$R_s = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1} \geq 1,5$$

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

hatékonyság

$$N = 16 \left(\frac{t_{R,2}}{w} \right)^2 \quad N_{\max} \text{ illetve } H_{\min} \quad \left(H = \frac{L}{N} \right)$$

szelektivitás

$$\alpha = \frac{t_{R,2}}{t_{R,1}} = \frac{t_{R,2} - t_M}{t_{R,1} - t_M} = \frac{k_2}{k_1} > 1$$

retenció

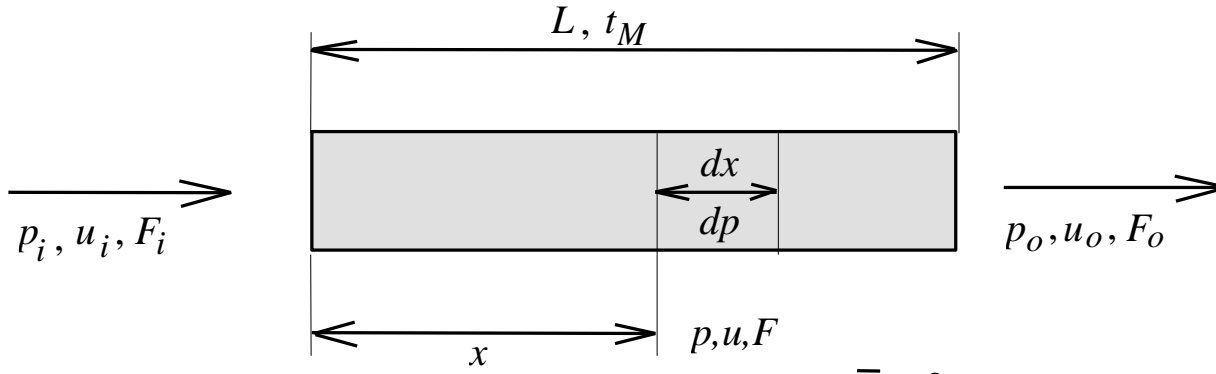
$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

2. Érzékenység: detektálás!

3. Elemzési idő

$$t_{R,n} = t_o (1 + k_n) = \frac{NH}{\bar{u}} (1 + k_n) = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(k_n + 1)^3}{k_n^2} \frac{H}{\bar{u}}$$

$$u = -\frac{K_p}{\eta} \frac{dp}{dx}$$



$$\bar{u} = ?$$

$$p_o u_o = pu \quad u = \frac{p_o u_o}{p}$$

$$\frac{p_o u_o}{p} = -\frac{K_p}{\eta} \frac{dp}{dx}$$

$$\eta p_o u_o \int_0^L dx = -K_p \int_{p_i}^{p_o} p dp$$

$$t_M = \int_0^L \frac{dx}{u} = \int_0^L \frac{p dx}{p_o u_o}$$

$$\eta p_o u_o L = \frac{K_p}{2} (p_i^2 - p_o^2)$$

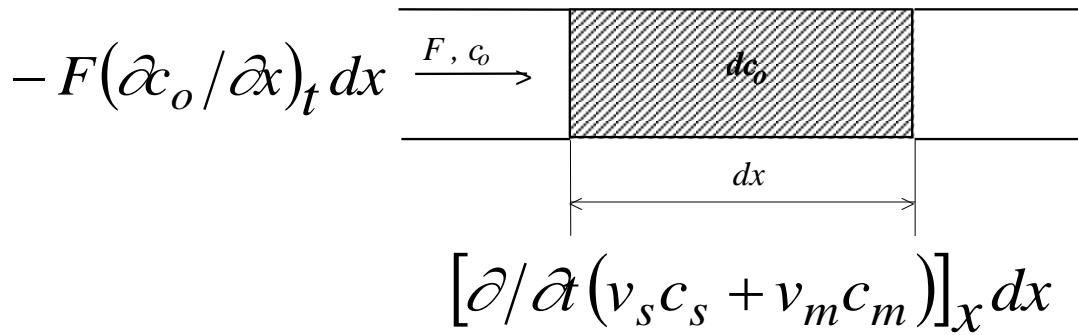
$$t_M = -\int_0^L \frac{p^2 K_p}{p_o^2 u_o^2 \eta} dp = \frac{K_p}{3 p_o^2 u_o^2 \eta} (p_i^3 - p_o^3)$$

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$$

$$\bar{u} = \frac{3L \eta p_o^2 u_o^2}{K_p} \frac{1}{(p_i^3 - p_o^3)}$$

$$\bar{u} = \frac{3L \eta p_o^2 u_o^2}{2L \eta p_o u_o} \frac{(p_i^2 - p_o^2)}{(p_i^3 - p_o^3)}$$

$$\bar{u} = u_o \frac{3 (p_i / p_o)^2 - 1}{2 (p_i / p_o)^3 - 1} = u_o j$$



$$v_s = V_s/L \text{ és } v_m = V_m/L$$

$$-F \left(\frac{\partial c_o}{\partial x} \right)_t dx = \left[\frac{\partial}{\partial t} (v_s c_s + v_m c_m) \right]_x dx$$

$$\left(\frac{\partial c_s}{\partial t} \right)_x = \left(\frac{\partial c_s}{\partial m} \right)_x \left(\frac{\partial c_m}{\partial t} \right)_x$$

$$-F \left(\frac{\partial c_o}{\partial x} \right)_t = K \left(\frac{\partial c_m}{\partial t} \right)_x v_s + \left(\frac{\partial c_m}{\partial t} \right)_x v_m$$

$$K = \left(\partial c_s / \partial c_m \right)_x = \text{állandó}$$

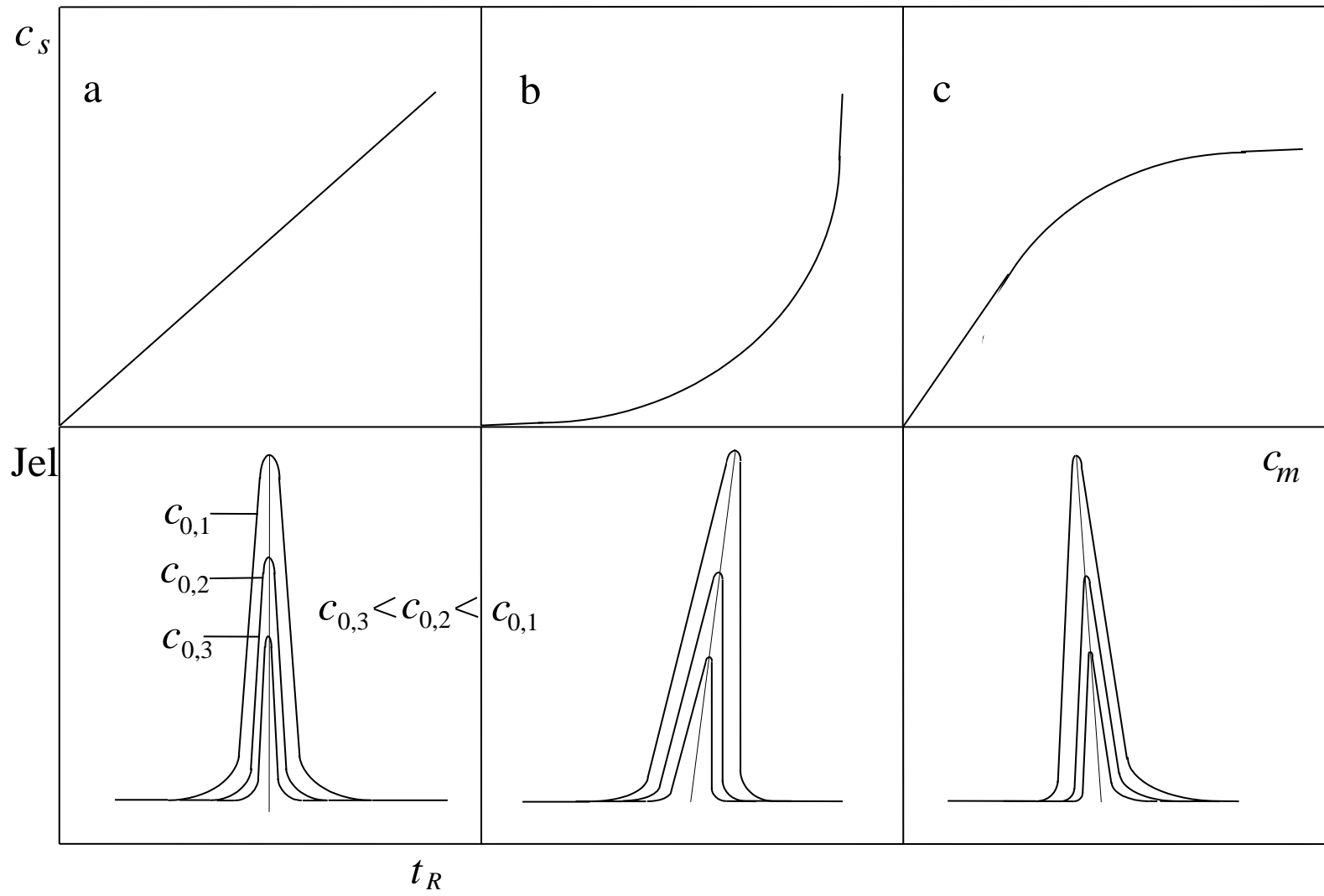
$$\left(\frac{\partial c_m}{\partial x} \right)_t \left(\frac{\partial x}{\partial t} \right)_{c_m} \left(\frac{\partial t}{\partial c_m} \right)_x = -1$$

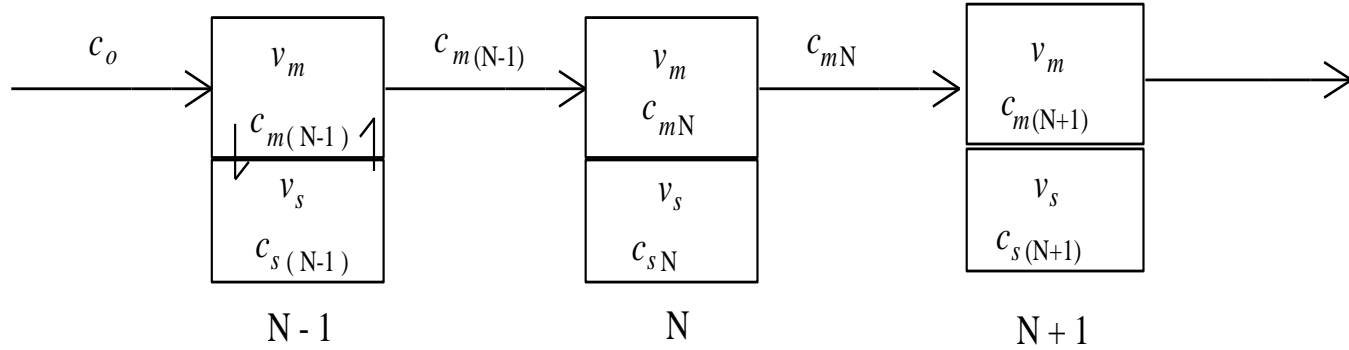
$$F \frac{\left(\frac{\partial c_m}{\partial t} \right)_x}{\left(\frac{\partial x}{\partial t} \right)_{c_m}} = \left(\frac{\partial c_m}{\partial t} \right)_x (K v_s + v_m)$$

$$u_z = \left(\partial x / \partial t \right)_{c_m}$$

$$\frac{F}{u_z} = K v_s + v_m = \frac{1}{L} (K V_s + V_m) \quad u_z = \frac{FL}{K V_s + V_m}$$

$$V_R = K V_s + V_m$$





$$(c_{m(N-1)} - c_{m,N})dV = v_m dc_{m,N} + v_s dc_{s,N}$$

$$K = \frac{c_{s,N}}{c_{m,N}}$$

$$(c_{m(N-1)} - c_{m,N})dV = v_m dc_{m,N} + v_s K dc_{m,N} = (v_m + v_s K) dc_{m,N}$$

$$v_m + v_s K = v_{eff}$$

$$\frac{dc_{m,N}}{c_{m(N-1)} - c_{m,N}} = \frac{dV}{v_{eff}}$$

$$\beta = \frac{V}{v_{eff}} \quad y_N = \frac{c_{m,N}}{c_o}$$

$$\frac{dy_N}{y_{N-1} - y_N} = d\beta$$

$$y_N = \frac{e^{-\beta} \beta^N}{N!}$$

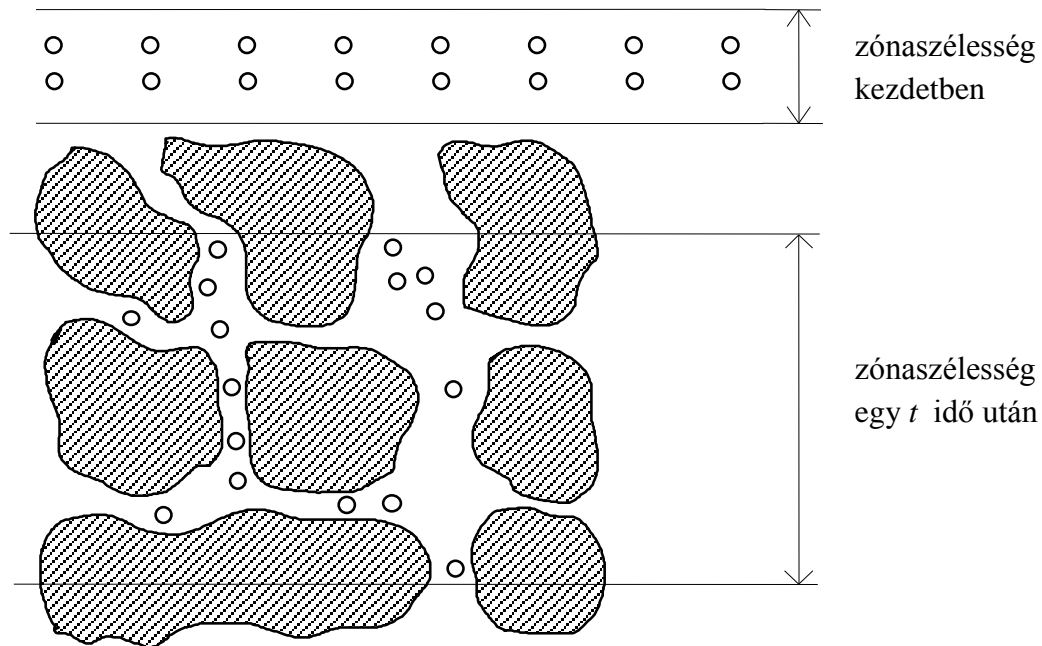
$$\beta > 100$$

$$y_N = \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} e^{-\frac{(\beta - N)^2}{2N}}$$

A van Deemter egyenlet

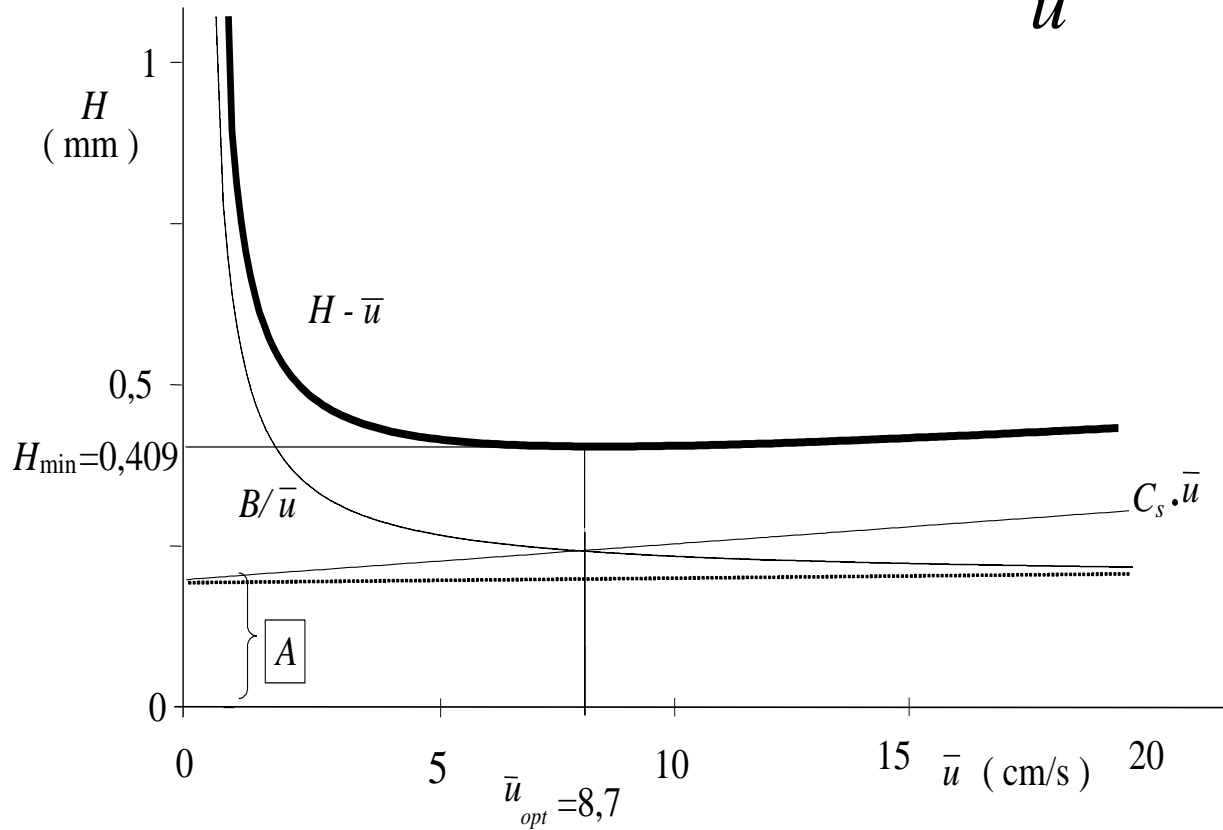
$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{\bar{u}} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} \bar{u}$$

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C_s \bar{u}$$



HETP- u

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C_s \bar{u}$$

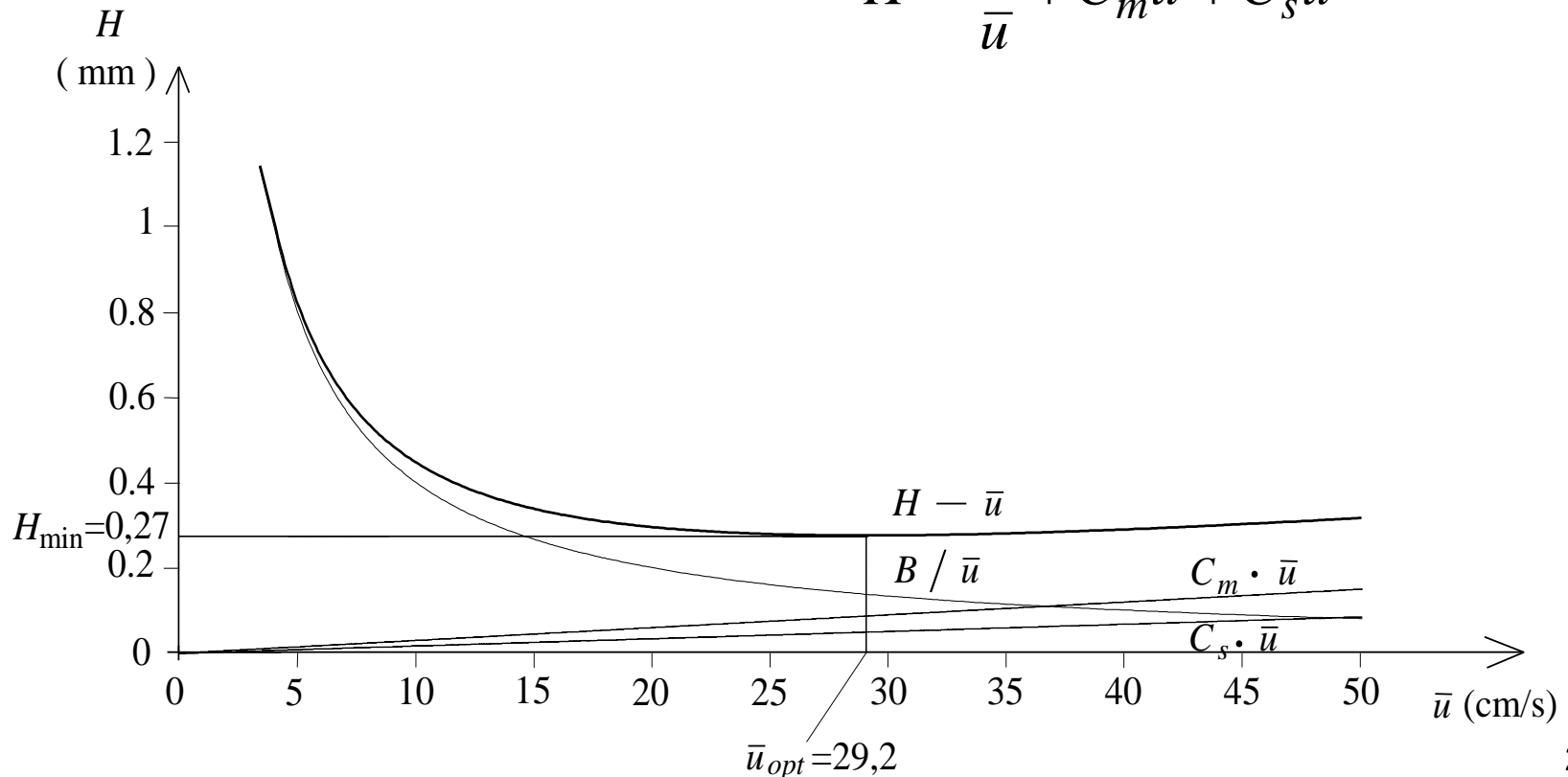


v

A Golay egyenlet

$$H = \frac{2D_m}{\bar{u}} + \frac{1+6k+11k^2}{24(1+k)^2} \frac{r_c^2}{D_m} \bar{u} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} \bar{u}$$

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + C_m \bar{u} + C_s \bar{u}$$



$$H_{\min} = 2\sqrt{B(C_m + C_s)} \qquad \bar{u}_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C_m + C_s}}$$

df (m)	C_m (%)	C_s (%)
0,25	98	2
0,50	82	18
1,00	67	33
2,00	45	55
5,00	15	85

$$H = \frac{2D_m}{\bar{u}} + \frac{1 + 6k + 11k^2}{24(1+k)^2} \frac{r_c^2}{D_m} \bar{u}$$

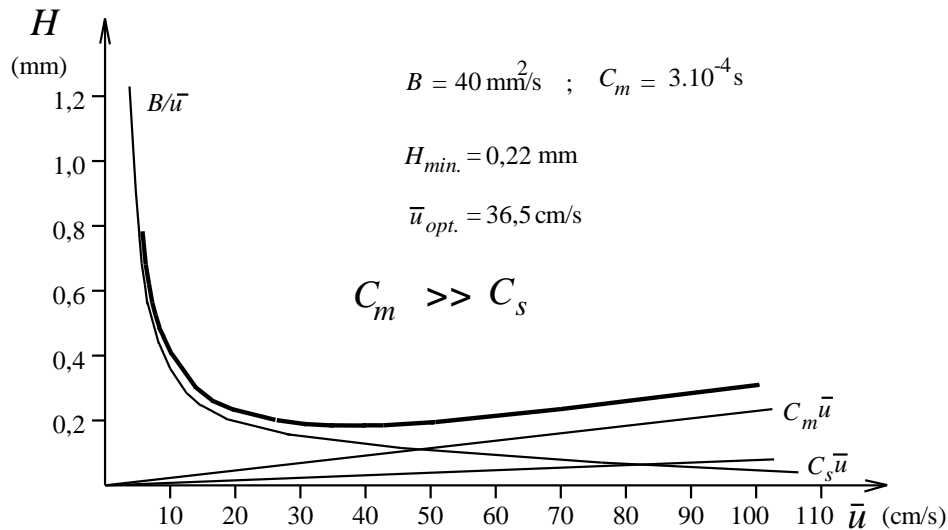
$$H_{min} = 1,91r_c \approx d_c \qquad \bar{u}_{opt} \approx 2,1 \frac{D_m}{r_c}$$

Vékonyfilmes

$$d_f < 1$$

$$C_m > C_s$$

$$(\beta > 100)$$

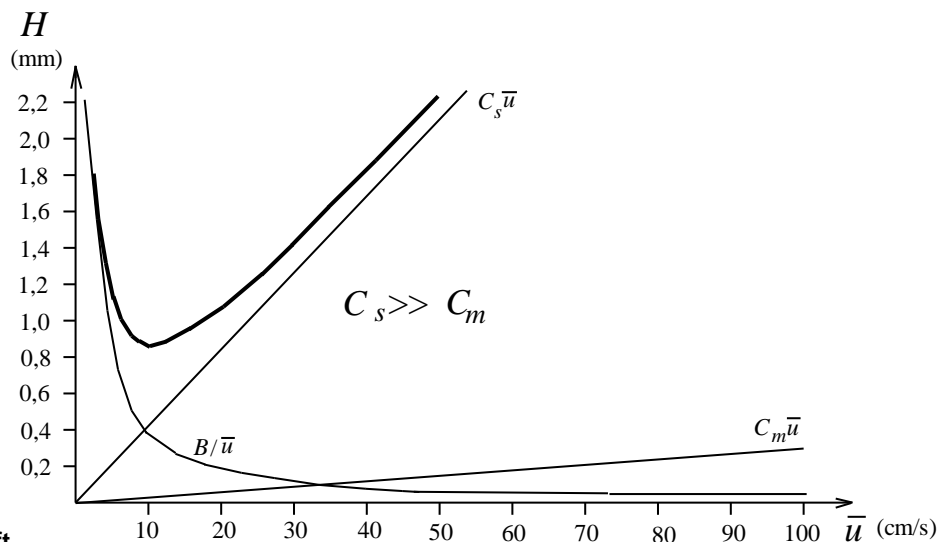


Vastagfilmes

$$d_f > 1$$

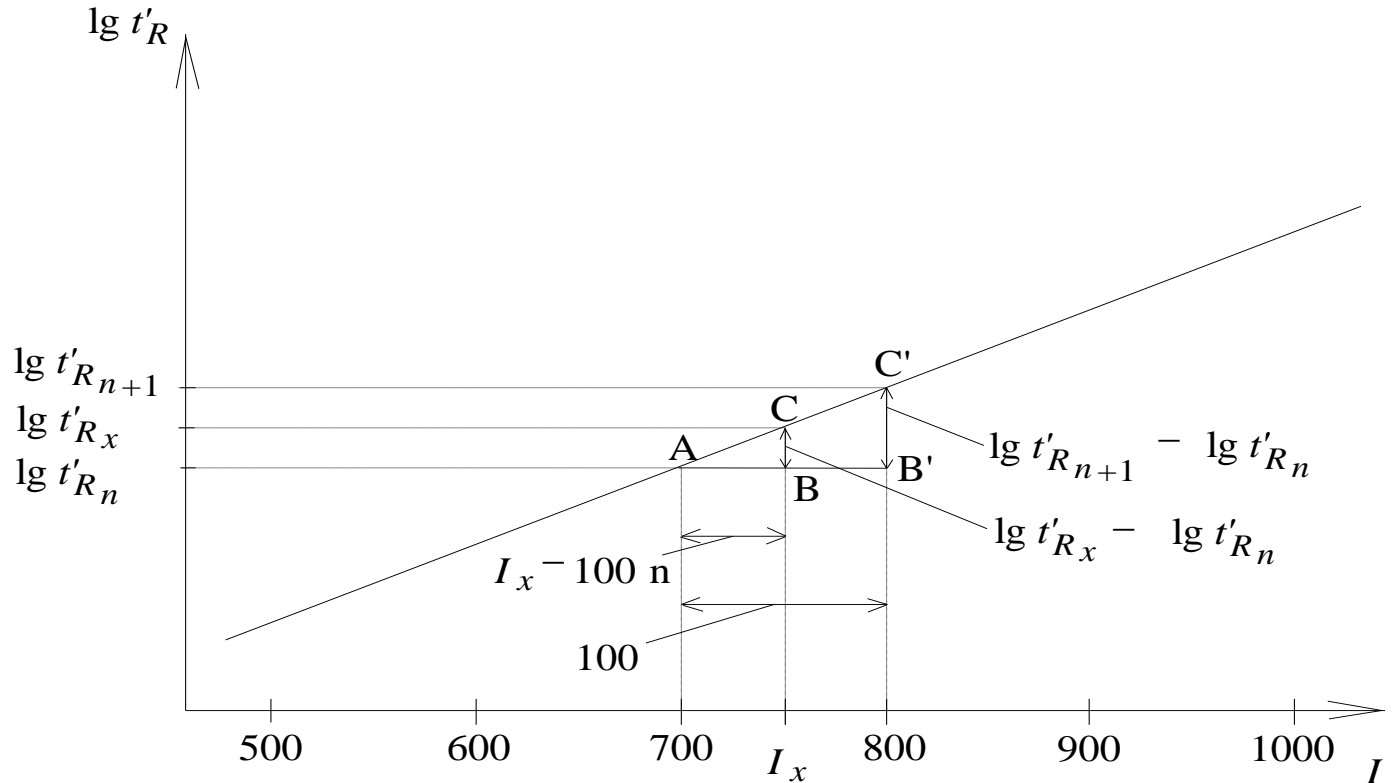
$$C_s > C_m$$

$$(\beta < 100)$$



Relatív retenció:

$$r_{2,1} = \frac{t'_{R,2}}{t'_{R,1}} = \frac{V'_{R,2}}{V'_{R,1}} = \frac{k_2}{k_1} = \dots$$



$$I_x = 100 \frac{\lg t'_{R,x} - \lg t'_{R,n}}{\lg t'_{R,n+1} - \lg t'_{R,n}} + 100n$$

Az elválasztás jellemzése

$$n_p = \frac{\sqrt{N}}{4R_s} \ln\left(\frac{k_l + 1}{k_f + 1}\right) + 1$$

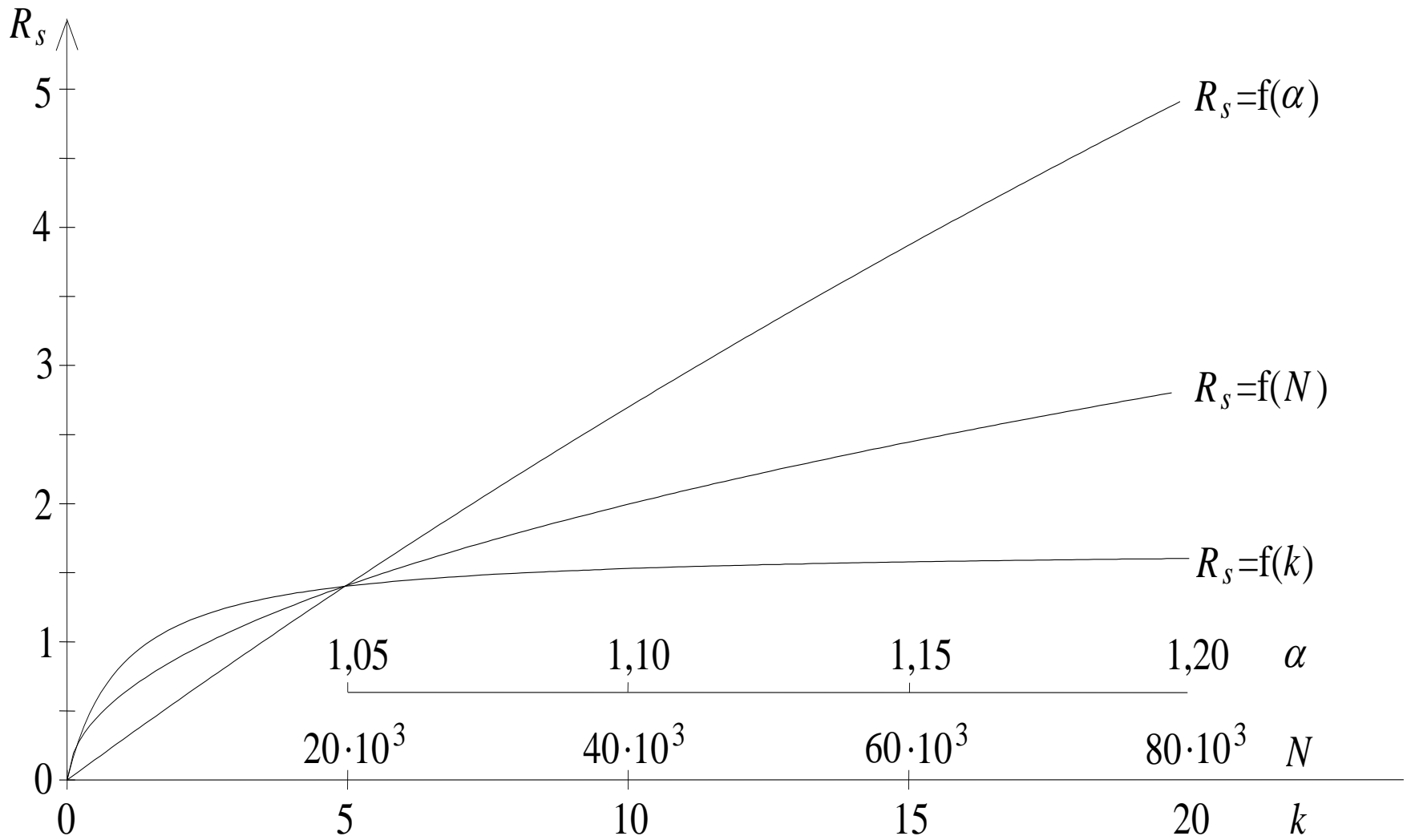
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k} > 1,5$$

$$N_{req} = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \left(\frac{k_2 + 1}{k_2}\right)^2$$

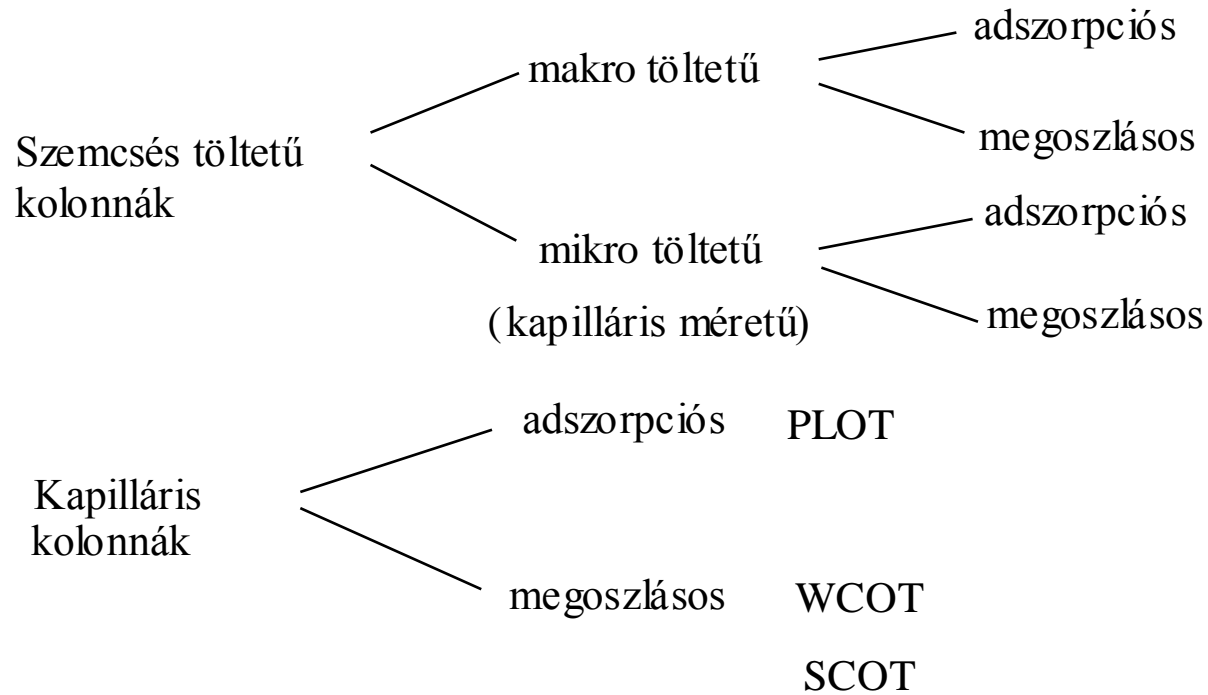
$$SN = TZ = \frac{t_{R,n+1} - t_{R,n}}{\omega_{n+1} + \omega_n} - 1$$

$$t_{R,n} = t_o (1 + k_n) = \frac{NH}{\bar{u}} (1 + k_n) = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \frac{(k_n + 1)^3}{k_n^2} \frac{H}{\bar{u}}$$

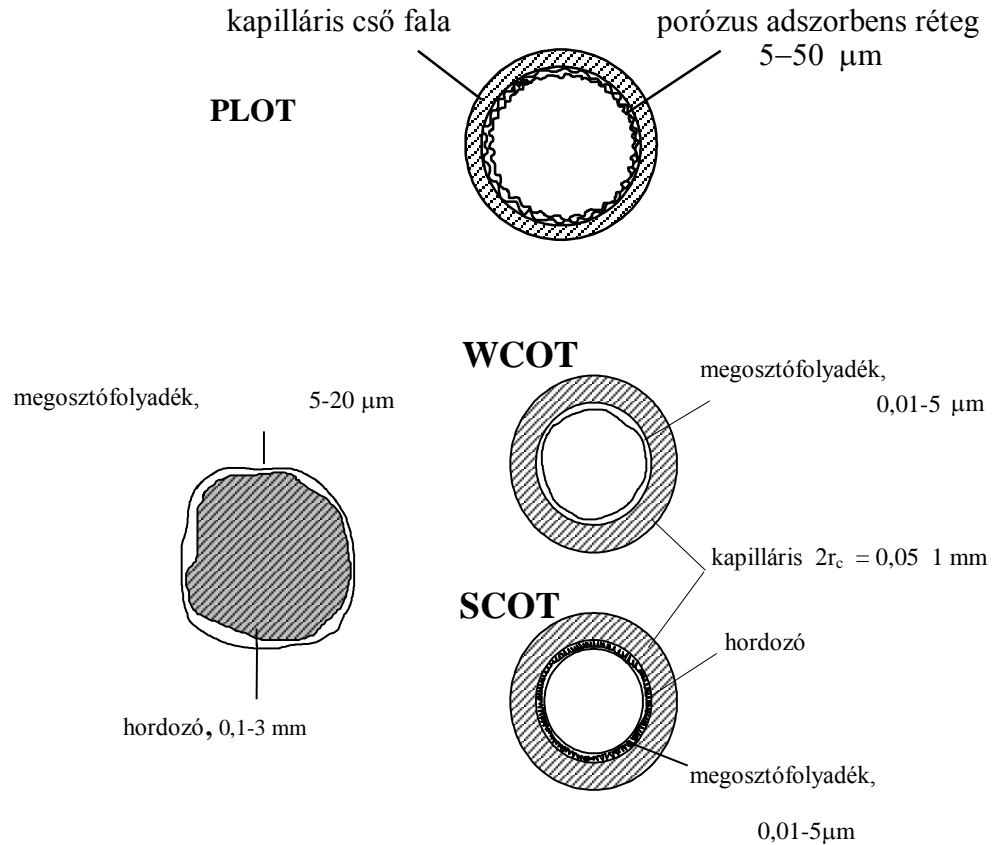
N	α	k	$\sqrt{N}/4$	$\alpha - 1/\alpha$	$k/(1+k)$	R_s
$20 \cdot 10^3$	1,05	5	35,35	0,05	0,83	1,47
$40 \cdot 10^3$	1,05	5	50,00	0,05	0,83	2,08
$60 \cdot 10^3$	1,05	5	61,23	0,05	0,83	2,54
$80 \cdot 10^3$	1,05	5	70,70	0,05	0,83	2,93
$20 \cdot 10^3$	1,10	5	35,35	0,09	0,83	2,64
$20 \cdot 10^3$	1,15	5	35,35	0,13	0,83	3,81
$20 \cdot 10^3$	1,20	5	35,35	0,17	0,83	4,99
$20 \cdot 10^3$	1,05	10	35,35	0,05	0,90	1,60
$20 \cdot 10^3$	1,05	15	35,35	0,05	0,94	1,66
$20 \cdot 10^3$	1,05	20	35,35	0,05	0,95	1,68

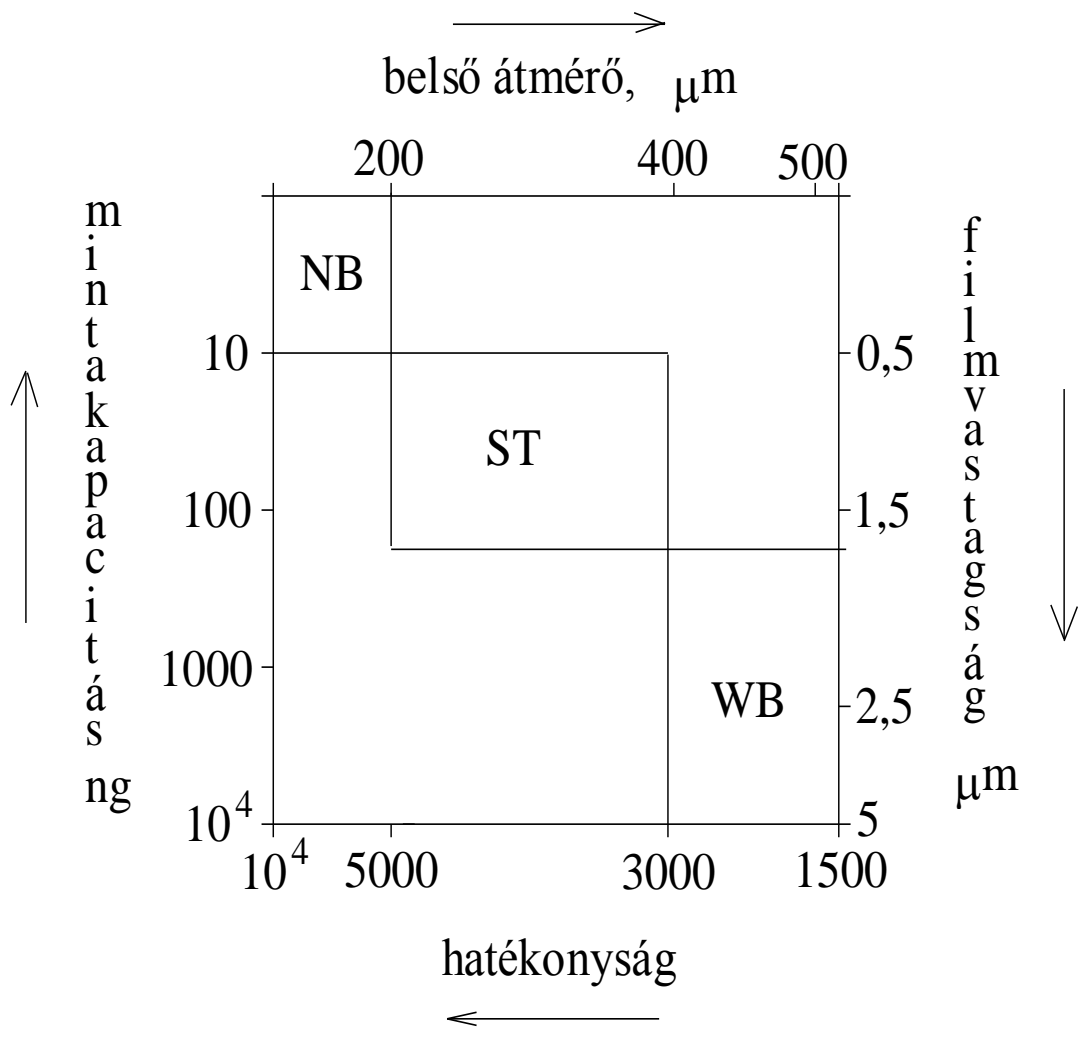


GC-s kolonnák



Kapilláris kolonnák





Belső átmérő (mm)	Filmvastagság (μm)	Fázisarány (β)	Mintakapacitás (ng)
0,2	0,1 0,2	500 250	10-20 30-40
0,25	0,1 0,25 1	625 250 63	30-40 100-150 400-500
0,32	0,1 0,25 1	800 320 80	50-70 100-200 400-500
0,53	0,1 0,25 1 5	1325 530 133 27	50-100 200-300 1000-1500 8000-10000

Rohrschneider

$$I^{F_1} - I^{sq} = ax_1 + by_1 + cz_1 + du_1 + es_1$$

$$I^{F_2} - I^{sq} = ax_2 + by_2 + cz_2 + du_2 + es_2$$

.....

.....

$$I^{F_5} - I^{sq} = ax_5 + by_5 + cz_5 + du_5 + es_5$$

McReynolds (1970)

$$(\Delta I)_i^F = I_i^F - I_i^{sq},$$

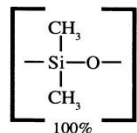
$$(\Delta I)_i^{OV-275} = I_i^{OV-275} - I_i^{sq}$$

$$CP = \frac{\sum_{i=1}^5 (\Delta I)_i^F}{\sum_{i=1}^5 (\Delta I)_i^{OV-275}} 100$$

A megosztó-folyadék neve	Min. max.hôm.C	Oldó-szer	Benzol	1-Butanol	2-Pentanon	1-Nitro-propán	Piridin	Summa	CP-index
Apiezon L	50/300	C,T	32	22	15	32	42	143	3
Butándiol-szukcinát	50/225	C	370	571	448	657	611	2657	63
Carbowax 1540	50/175	C	371	639	453	666	641	2770	66
Carbowax 4000	60/200	C	317	545	378	578	521	2339	55
Carbowax 4000 mono-sztearát	60/200	C	282	496	331	517	467	2093	50
Carbowax 20M	60/225	C	322	536	368	572	510	2308	55
Carbowax 20M-tereftálsav	60/225	C	321	537	367	573	520	2318	55
Dexsil 300	50/450	T	47	80	103	148	96	474	11
Dexsil 400	50/400	T	72	108	118	166	123	587	14
Dexsil 410	50/400	T	72	286	174	249	171	952	23
DEGA	0/200	A	378	603	460	665	658	2764	66
DEGS	20/200	A	496	746	590	837	835	3504	83
Squalan	20/100	T,C	0	0	0	0	0	0	0
EPON 1001	50/225	A,C	284	489	406	539	601	2319	55
Etilénglikol-szukcinát	100/200	C	537	787	643	903	889	3759	89
FFAP	50/250	C	340	580	397	602	627	2546	39 60

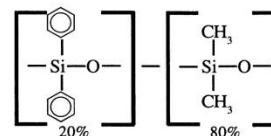
A megosztófolyadék neve	Min.max.hőm.C	Oldószer	Benzol	1-Butanol	2-Pentanon	1-Nitropropán	Piridin	Summa	CP-index
SE-30	50/300	C	15	53	44	64	41	217	5
SE-52	50/300	C,T	32	72	65	98	67	334	8
SE-54	50/300	C,T	33	72	66	99	67	337	8
XE-60	0/250	A	204	381	340	493	367	1785	42
OV-1	100/350	C,T	16	55	44	65	42	222	5
OV-3	0/350	C,T	44	86	81	124	88	423	10
OV-7	0/350	C,T	69	113	111	171	128	592	14
OV-11	0/350	C,T	102	142	145	219	178	786	19
OV-17	0/375	C,T	119	158	162	243	202	884	21
OV-22	0/350	C	160	188	191	283	253	1075	25
OV-25	0/350	C	178	204	208	305	280	1175	28
OV-73	0/325	T	40	86	76	114	85	401	10
OV-101	0/350	C	17	57	45	67	43	229	5
OV-210	0/275	A	146	238	358	468	310	152	36
OV-275	25/250	A	629	872	763	1106	849	4219	100
OV-1701	0/250	C	67	170	153	228	171	789	40 19

Rtx[®]-1
100% dimethyl polysiloxane



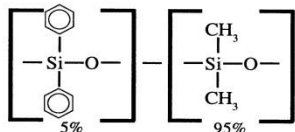
Polarity: least polar bonded phase
Uses: boiling point separations (solvents, petroleum products, and pharmaceuticals)
Properties: min. temp. (-60°C), max.temp. (360°C to 430°C), helix structure

Rtx[®]-20
20% diphenyl - 80% dimethyl polysiloxane



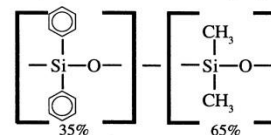
Polarity: slightly polar
Uses: volatile organic compounds
Properties: min. temp. (-20°C), max.temp. (310°C)

Rtx[®]-5
5% diphenyl - 95% dimethyl polysiloxane



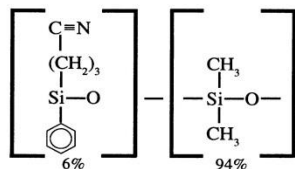
Polarity: non-polar
Uses: boiling point separations (aromatics, flavors, environmental samples, and aromatic hydrocarbons)
Properties: min. temp. (-60°C), max.temp. (340°C)

Rtx[®]-35
35% diphenyl - 65% dimethyl polysiloxane



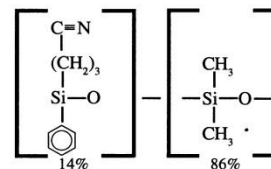
Polarity: intermediate polarity
Uses: pesticides, Aroclor[®], and amines
Properties: min. temp. (0°C), max.temp. (300°C)

Rtx[®]-1301/Rtx[®]-624
6% cyanopropylphenyl
94% dimethyl polysiloxane



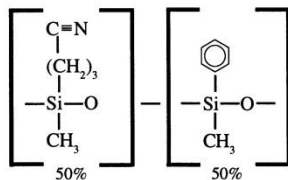
Polarity: slightly polar
Uses: pesticides, Aroclor[®], alcohols, oxygenates, and volatile organics
Properties: min. temp. (-20°C), max.temp. (280°C)

Rtx[®]-1701
14% cyanopropylphenyl
86% dimethyl polysiloxane



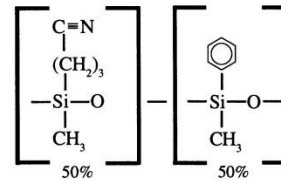
Polarity: intermediate polarity
Uses: pesticides, Aroclor[®], alcohols, and oxygenates
Properties: min. temp. (-20°C), max.temp. (280°C)

Rtx[®]-225
50% cyanopropylmethyl
50% phenylmethyl polysiloxane



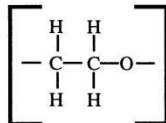
Polarity: polar
Uses: fumes, and carbohydrates
Properties: min. temp. (40°C), max.temp. (260°C)

Rtx[®]-225
50% cyanopropylmethyl
50% phenylmethyl polysiloxane



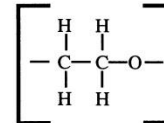
Polarity: polar
Uses: fumes, and carbohydrates
Properties: min. temp. (40°C), max.temp. (260°C)

Stabilwax[®]
Carbowax[®] Peg 20M



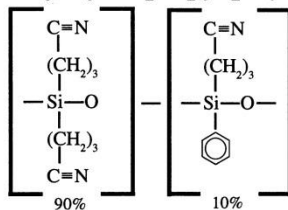
Polarity: polar
Uses: fumes, flavors, acids, amines, and solvents
Properties: min. temp. (40°C), max.temp. (250°C)

Stabilwax[®]
Carbowax[®] Peg 20M



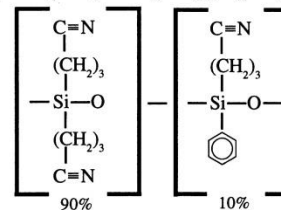
Polarity: polar
Uses: fumes, flavors, acids, amines, and solvents
Properties: min. temp. (40°C), max.temp. (250°C)

Rtx[®]-2330
90% biscyanopropyl
10% phenyl cyanopropyl polysiloxane

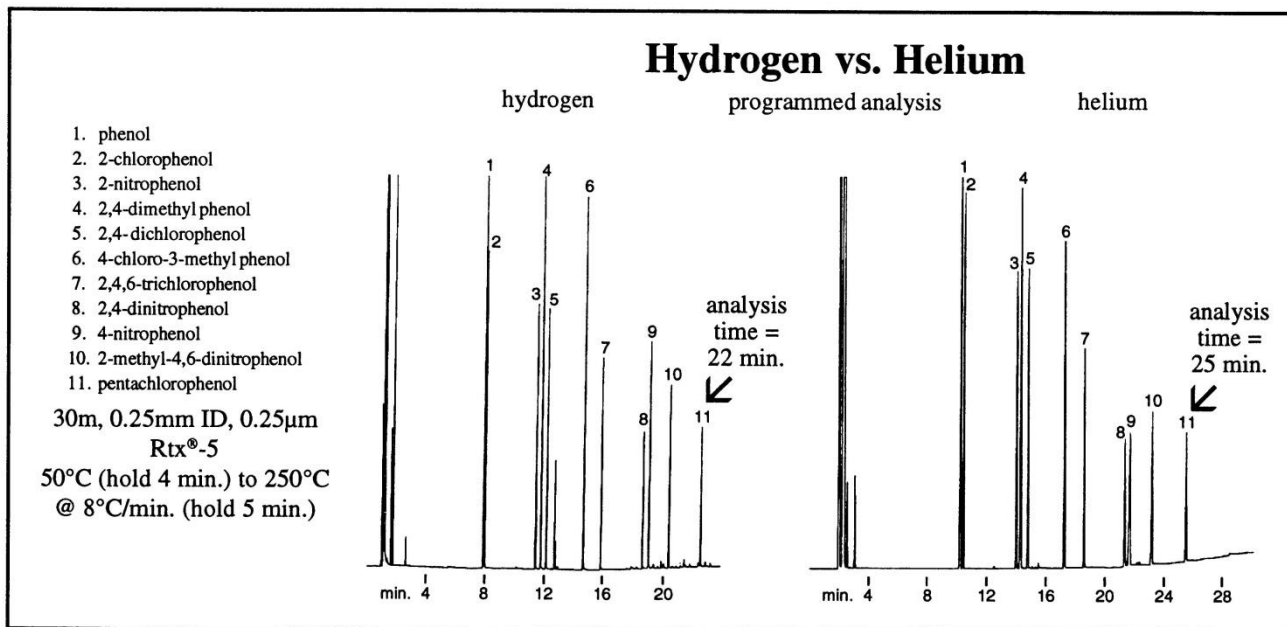
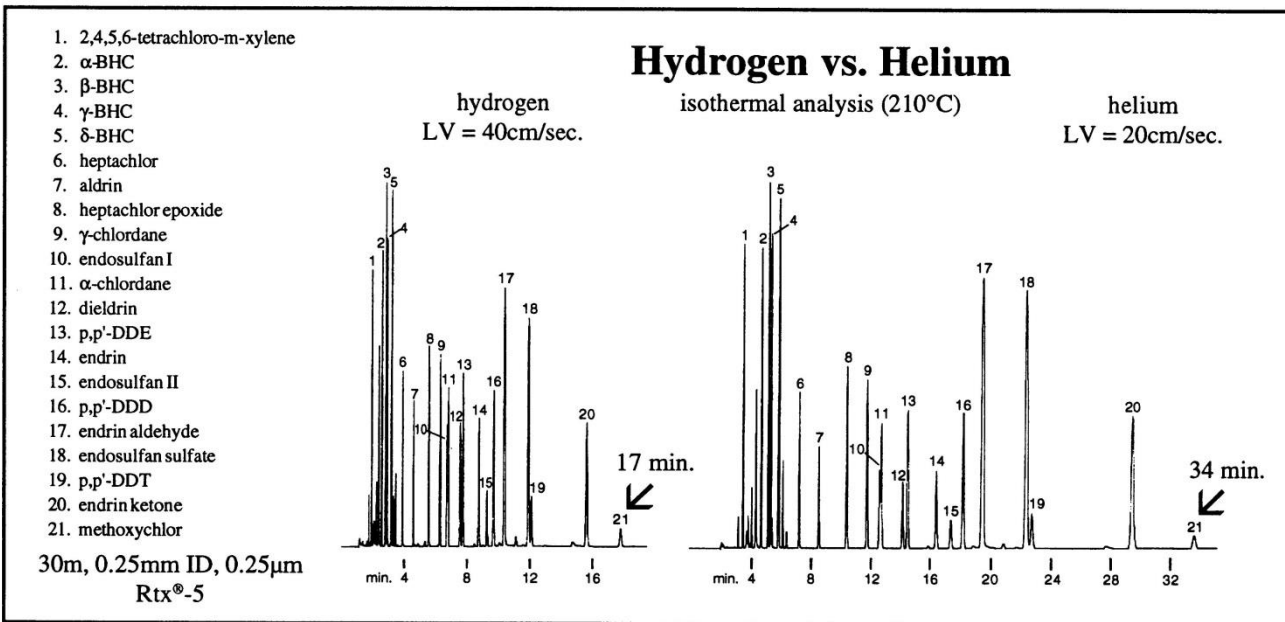


Polarity: very polar
Uses: cis/trans isomers
Properties: min. temp. (0°C), max.temp. (275°C)

Rtx[®]-2330
90% biscyanopropyl
10% phenyl cyanopropyl polysiloxane

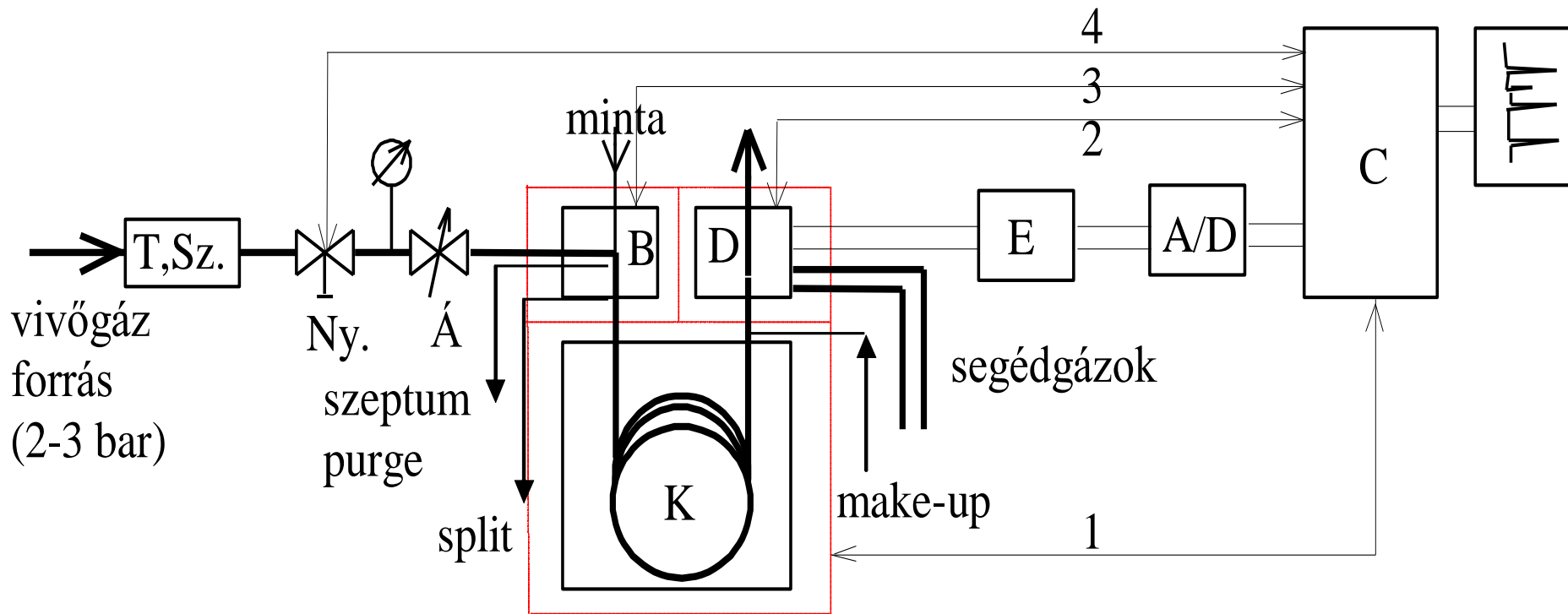


Polarity: very polar
Uses: cis/trans isomers
Properties: min. temp. (0°C), max.temp. (275°C)



SGE	Restek	Quad-rex	JW	HP	Chrom-pack	Allteck	Supel-co	Minőséég
BP-1	Rtx-1	007-1	DB-1	HP-1 Ultra-1	CP-Sil 5CB	AT-1	SPB-1	SE-30, OV-1, OV-101, SP-2100
BP-5	Rtx-5	007-2	DB-5	HP-5 Ultra-2	CP-Sil 8CB	AT-5	SPB-5	SE-54, SE-52, OV-73
BP-10	Rtx-1701	007-1701	DB-1701	-	CP-Sil 19CB	AT-1701	SPB-1701	OV-1701
-	Rtx-50	007-17	DB-17	HP-50 HP-17	-	AT-50	SPB-50	OV-17, OV-2250
BP-21	Stabilwax- DA	007-FFAP	DB-FFAP	HP-FFAP	CP-Wax 58CB	AT-1000	Nukol	SP-1000, FFAP
-	Rtx-2340	-	-	-	CP-Sil 88	-	SP-2340	SP-2340, OV-275
PONA	-	007-1-50- 0.5F	-	PONA	Squalane	-	Petro col 50.2	Squala-ne
BPX 624	Rtx-624	007-624	DB-624	HP-624	CP-Sil 13CB	AT-624	VOCOL	-
-	Stabil wax-DB	-	CAM	-	CP-Wax 51	-	Carbowax Amin	-

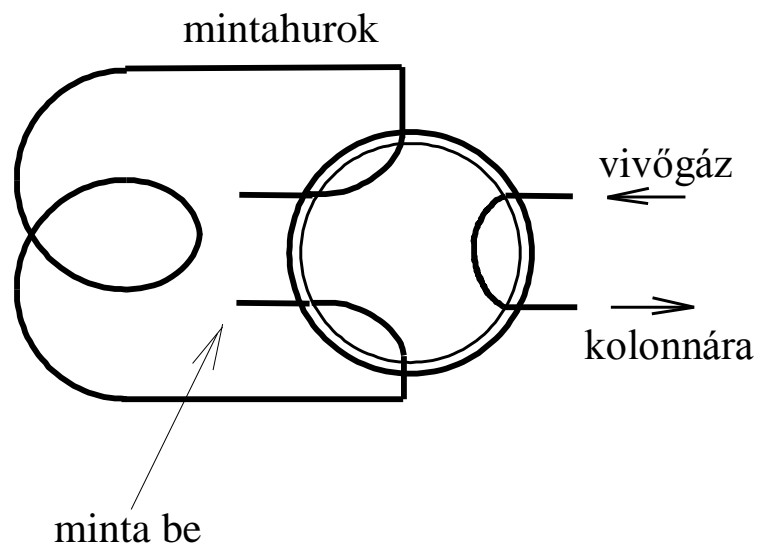
GC általános felépítése



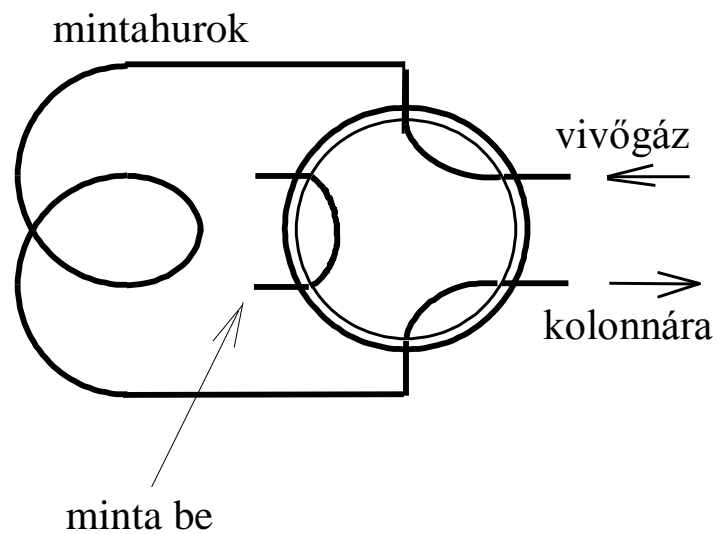
Mintabeviteli megoldások

Gázminta bemérés

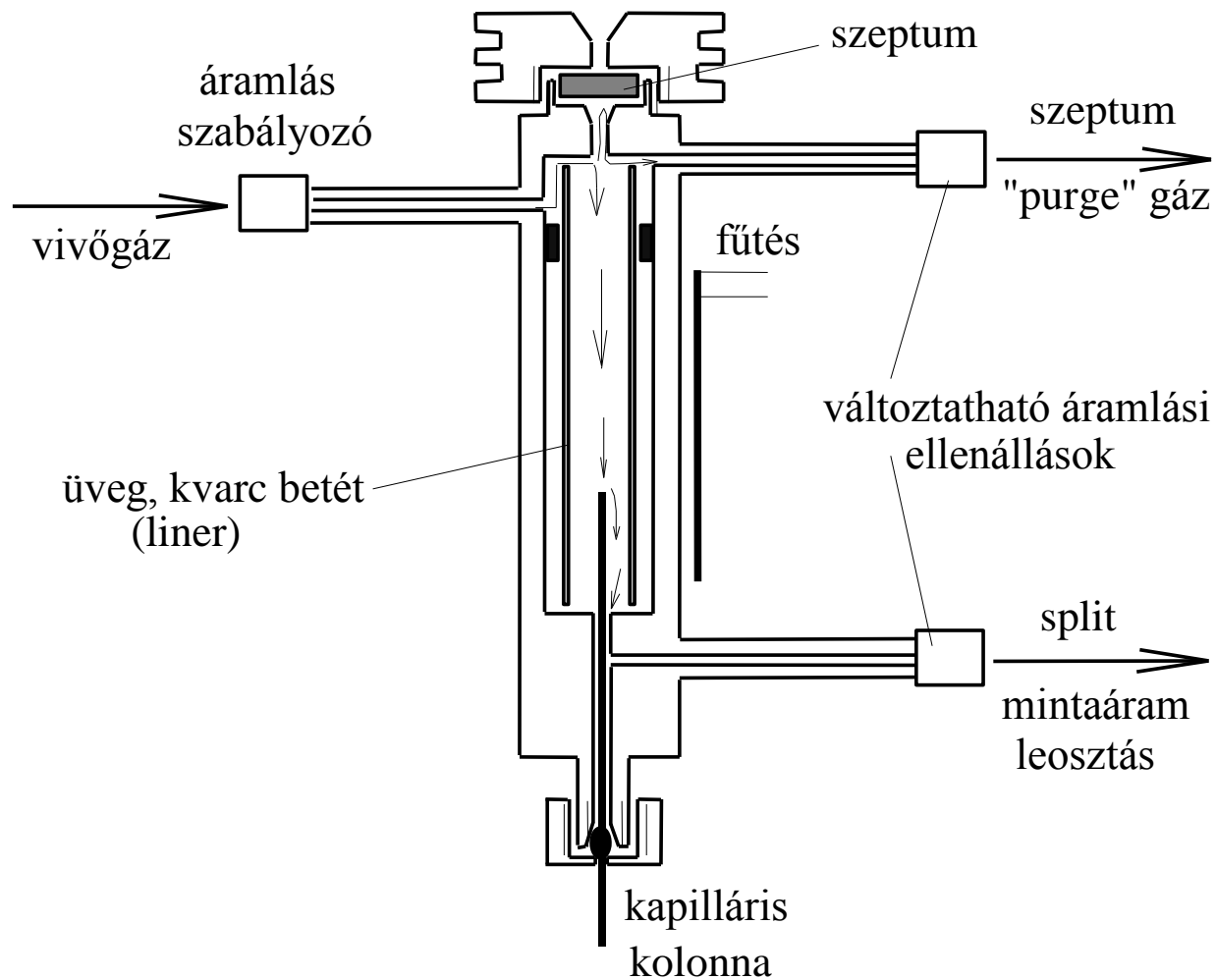
a)



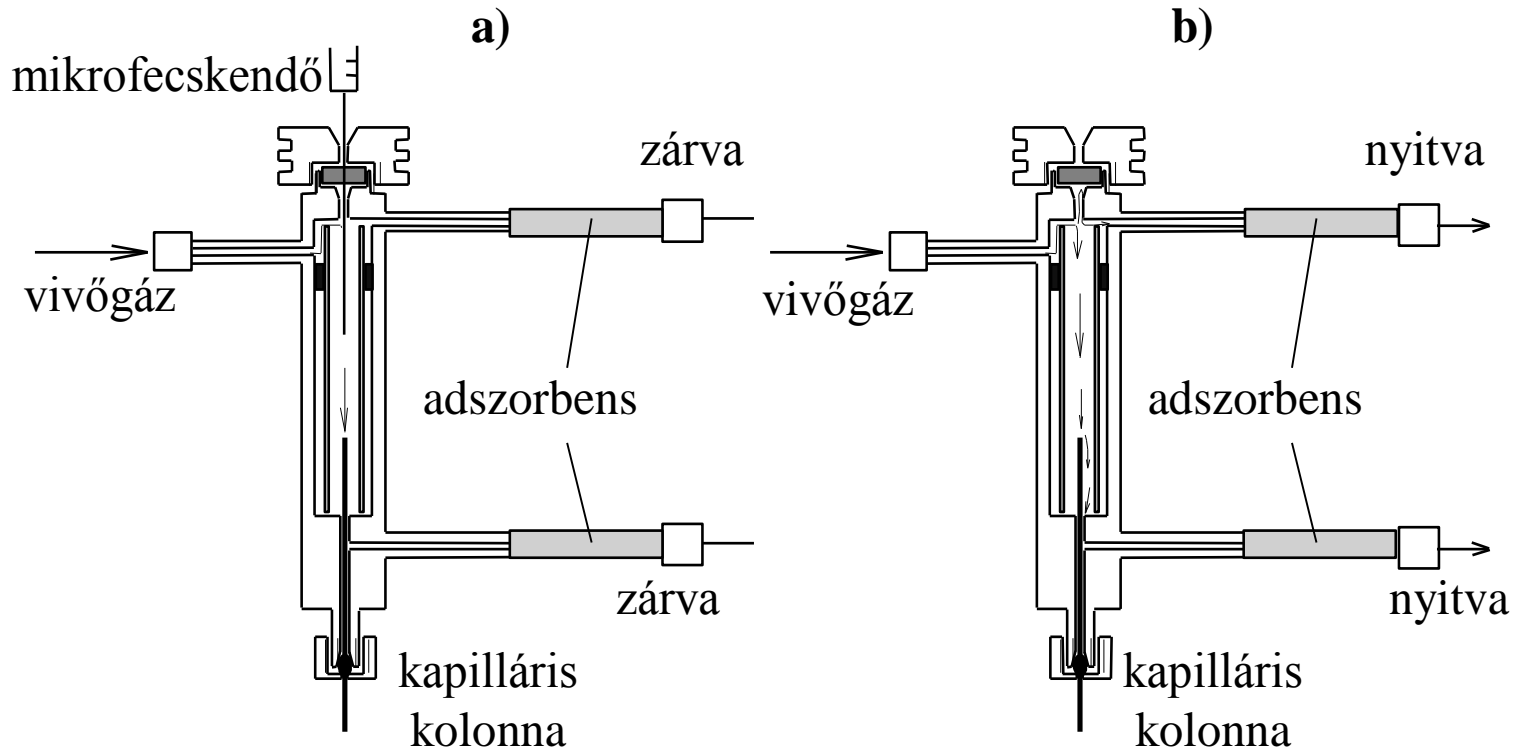
b)



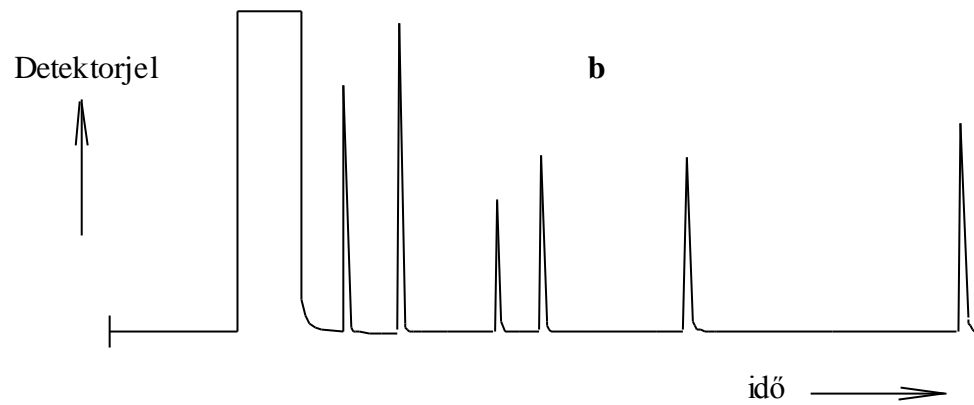
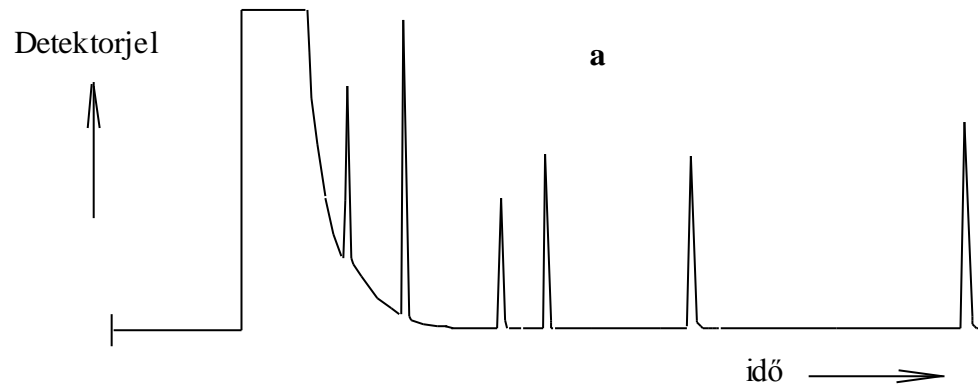
Mintaáram elosztó: **splitter** elvi vázlat



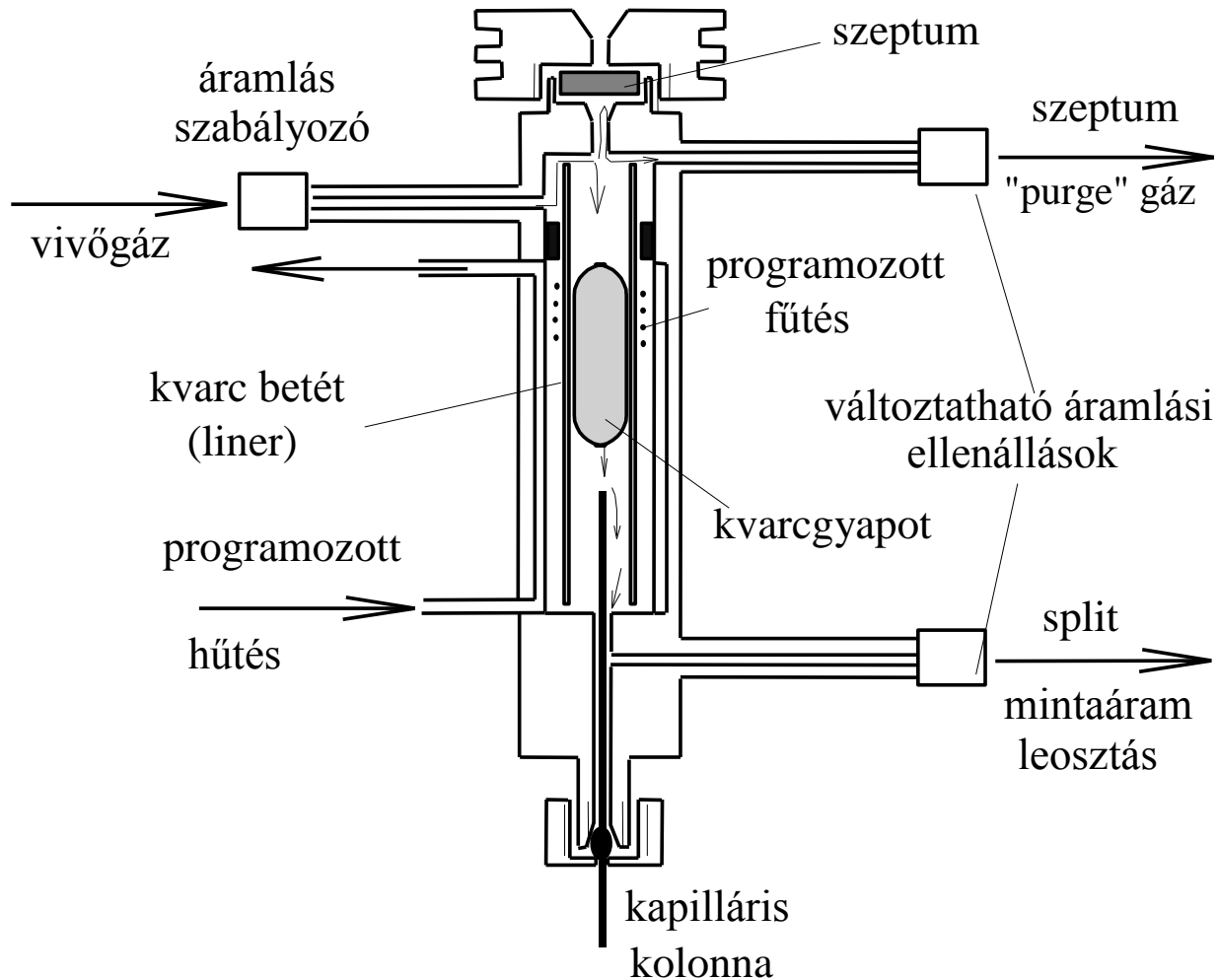
Splitless bemérés



Oldószerhatás

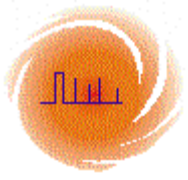


PTV injektor



GC-s detektorok

- 1. hővezetőképességi detektorok,
- 2. ionizációs detektorok,
- 3. fotometriás detektorok
- 4. molekulaszелеktiv, vagy tömegspektrometriás detektorok (MSD)
- 5. elektromos vezetőképességi detektorok,
- 6. oxigén szelektív detektor,
- 7. kombinált detektorok, stb.



Melyik előnyösebb detektorként?

	<i>Z</i>	<i>DAH</i>	<i>DFH</i>		linearitási	típus	
		<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>		tartomány	1.	2.
MSD	- 10^{-16}A	10^{-15} g	10^{-10} g		$10^4\text{-}10^5$	Univerzális, specifikus	koncentráció
FID	10^{-14} A	10^{-12} g/s	10^{-5} g/s		10^7	szerves	tömegáram érz.
ECD	10^{-14}V	10^{-13} g	10^{-9} g		10^4	specifikus	konc. érz.
FPD P	-	10^{-12} gP/s	10^{-7} gP/s		10^5 (lgA- lgc)	specifikus	tömegáram érz.
FPD S	-	10^{-10} gS/s	10^{-7} gS/s		10^3 (lgA- lgc)	specifikus	tömegá. ramérz.
PID	10^{-14} A	10^{-13} g	10^{-9} g		10^4	specifikus	konc. érz.

Követelmények a készülékekkel szemben:

$$\sigma_{telj}^2 = \frac{A^2}{12} + \left(\frac{t_R^2}{N} \right)_{kol} + \frac{V_D^2}{12F^2} + \left(\frac{t_R^2}{N} \right)_{ex}$$

$$\sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{ex}^2 \ll \sigma_{kol}^2$$

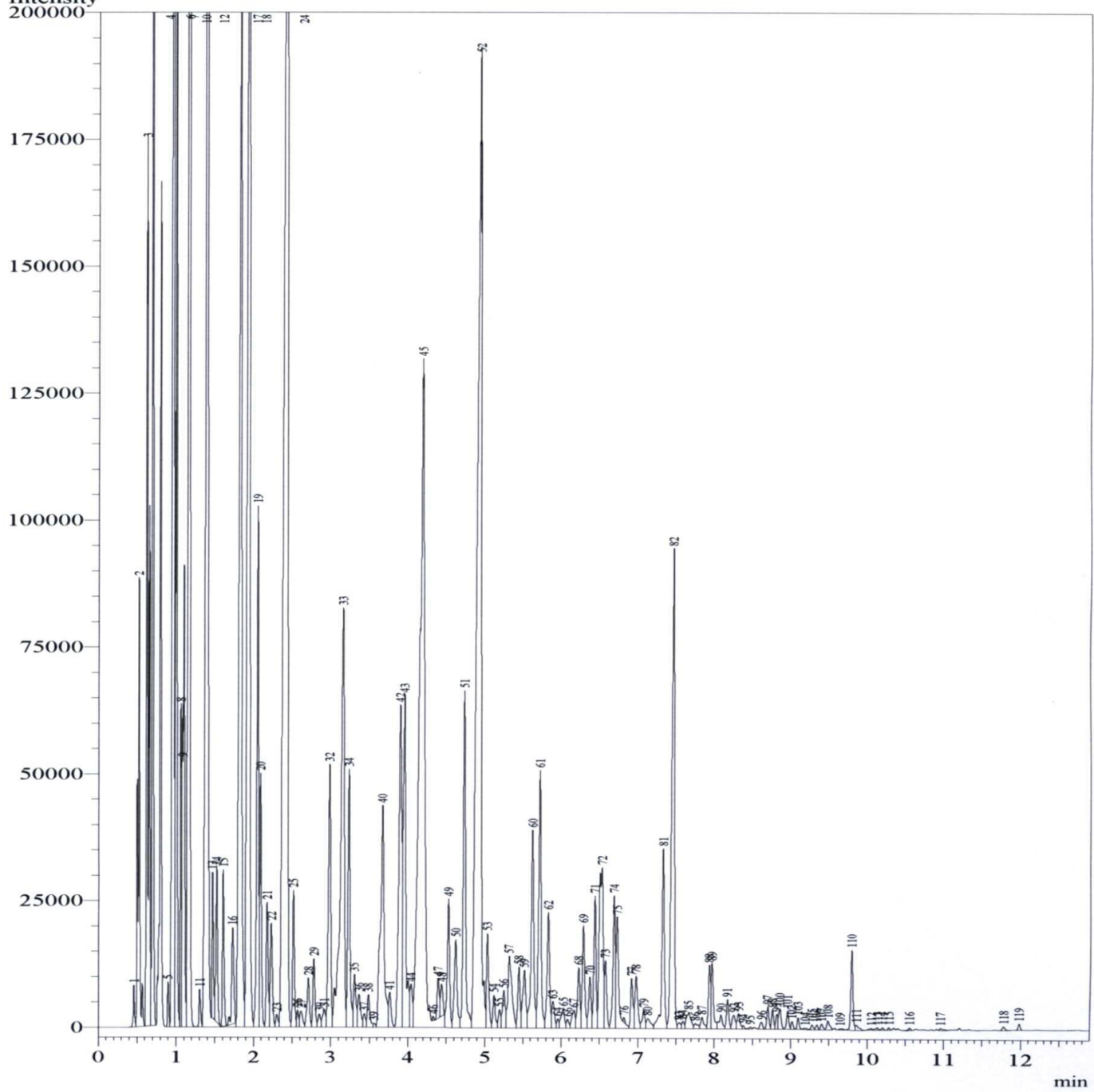
Fast GC $k \rightarrow \infty$

$$H = \frac{2D_m}{\bar{u}} + \frac{r_c^2}{24D_m} \bar{u}$$

$$H_{min} = 2\sqrt{B(C_m + C_s)} \quad \bar{u}_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C_m + C_s}}$$

$$H_{min} = 0,6r_c \quad \bar{u}_{opt} = 6,9 \frac{D_m}{r_c}$$

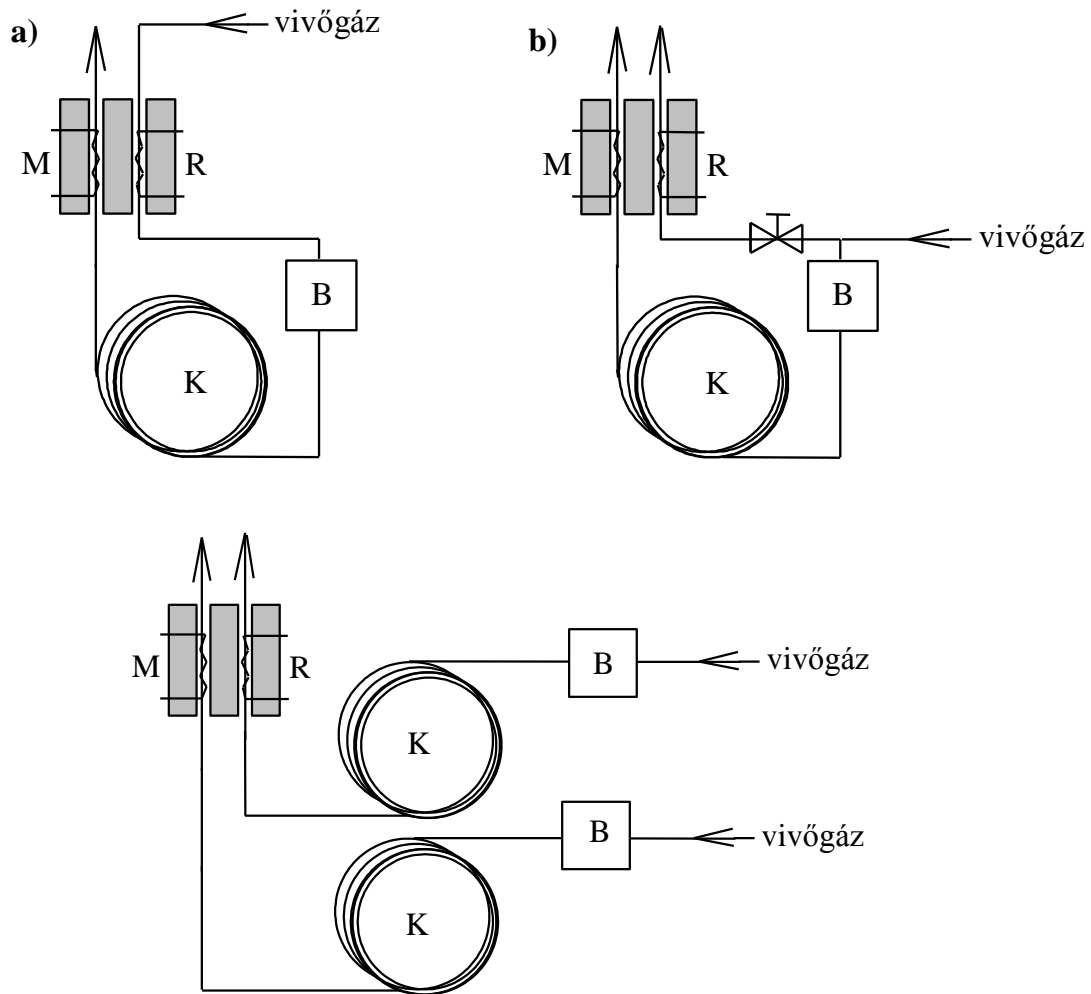
Intensity
200000



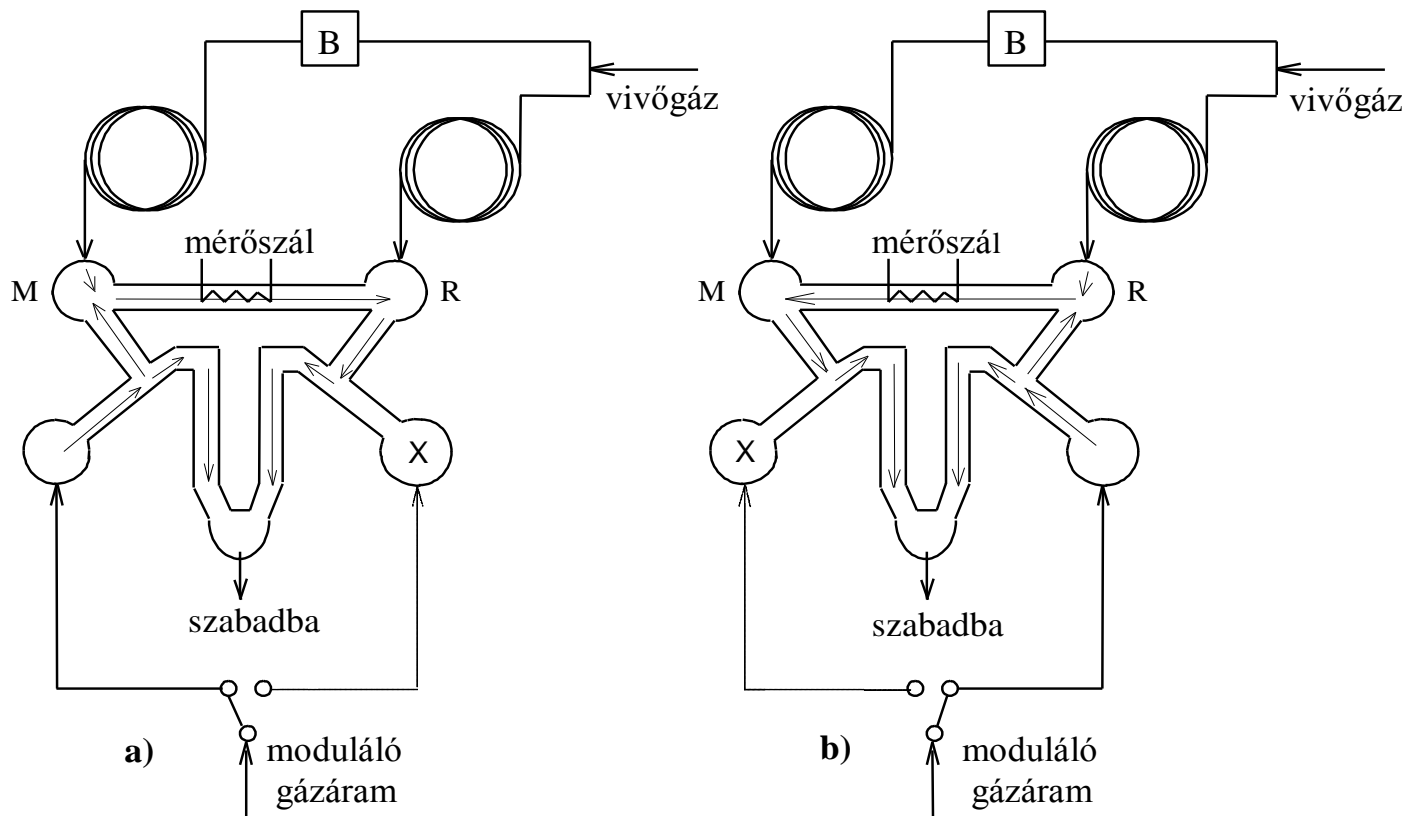
GC-s detektorok

- 1. hővezetőképességi detektorok,
- 2. ionizációs detektorok,
- 3. fotometriás detektorok
- 4. molekulaszелеktív, vagy tömegspektrometriás detektorok.
- 5. elektromos vezetőképességi detektorok,
- 6. oxigén szelektív detektor,
- 7. kombinált detektorok, stb.

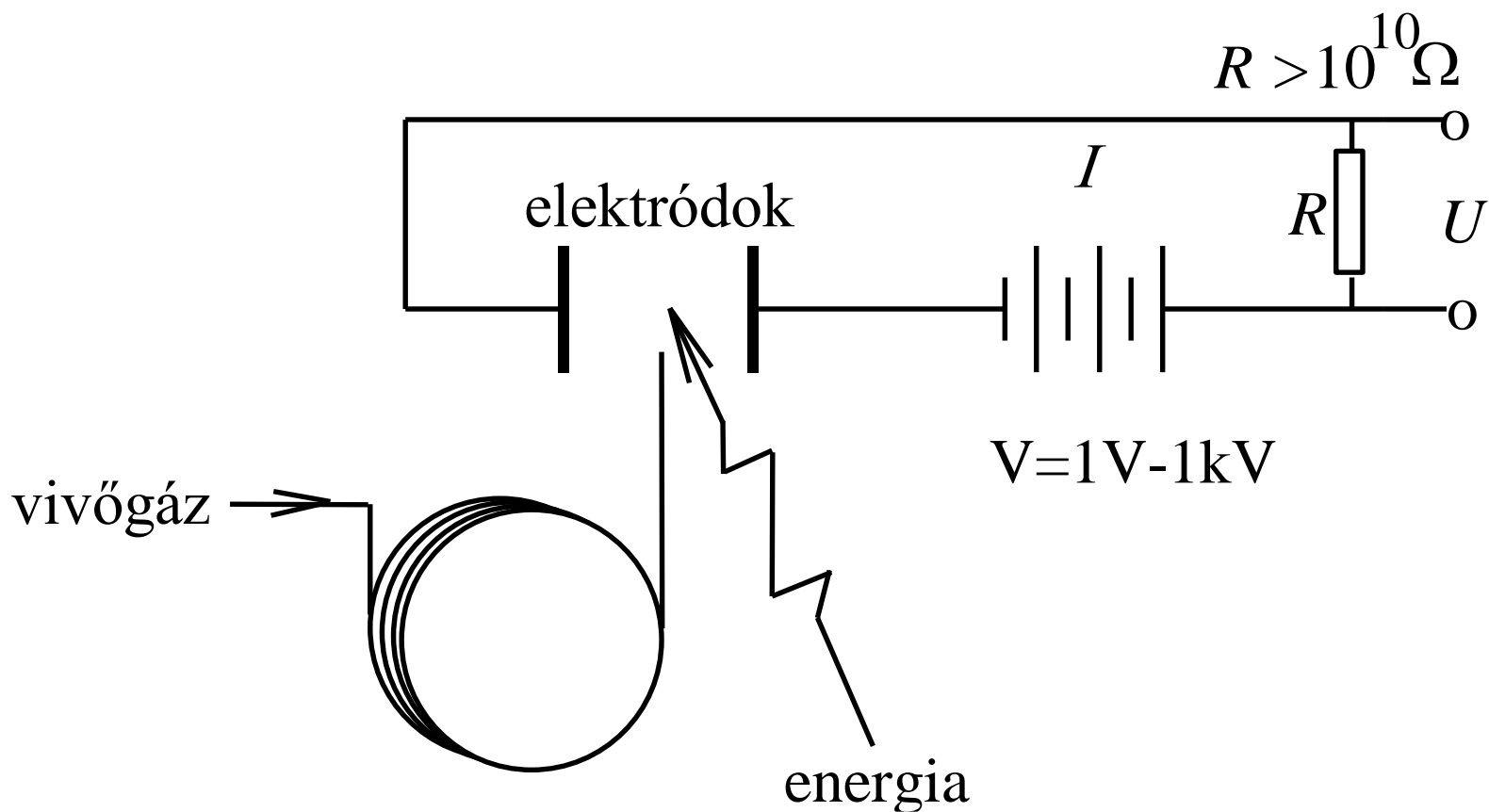
HWD, TCD kapcsolás



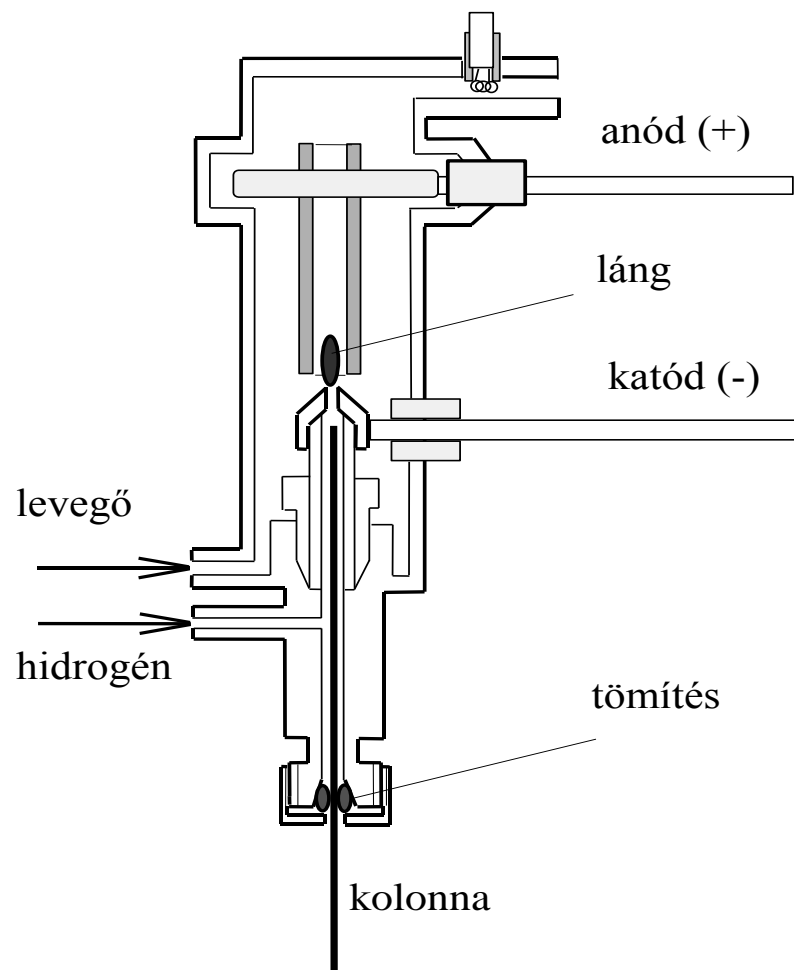
mikro-TCD



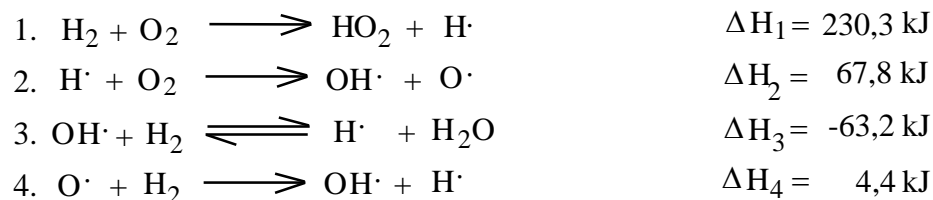
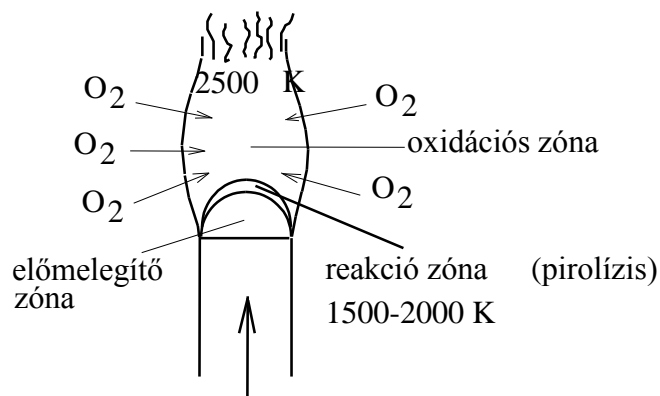
Az ionizációs detektorok működési elve



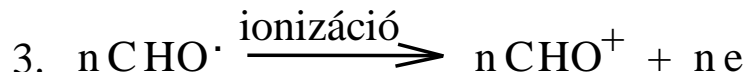
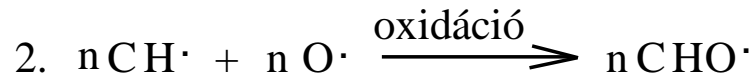
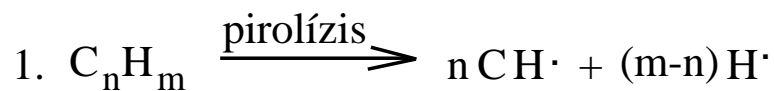
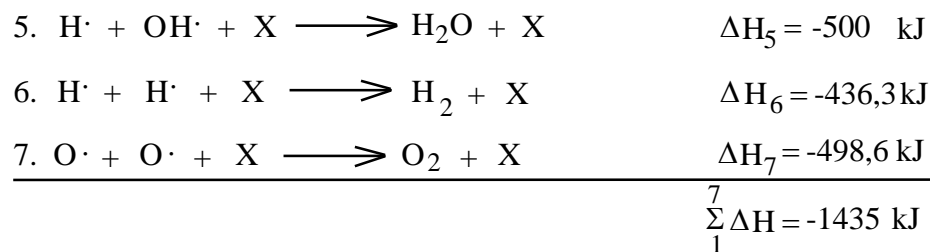
FID elvi vázlata



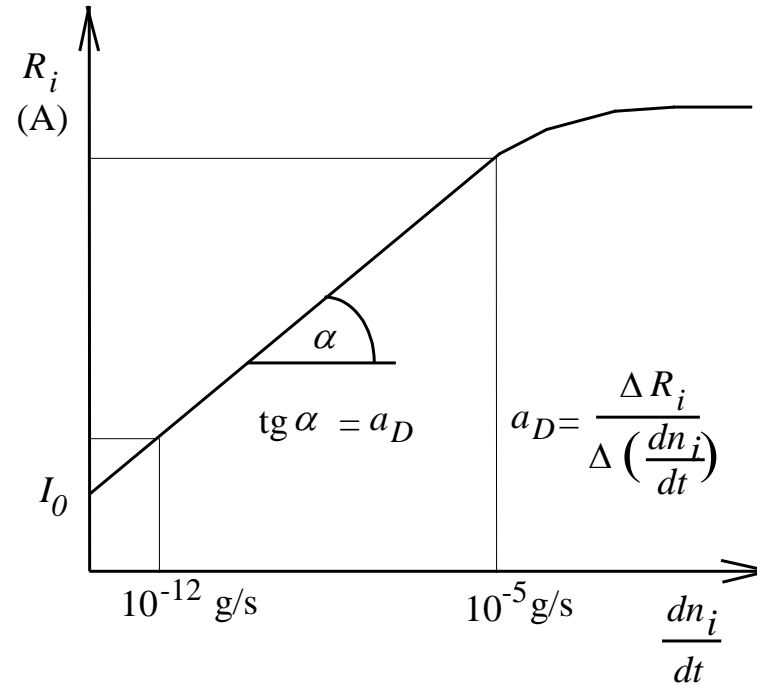
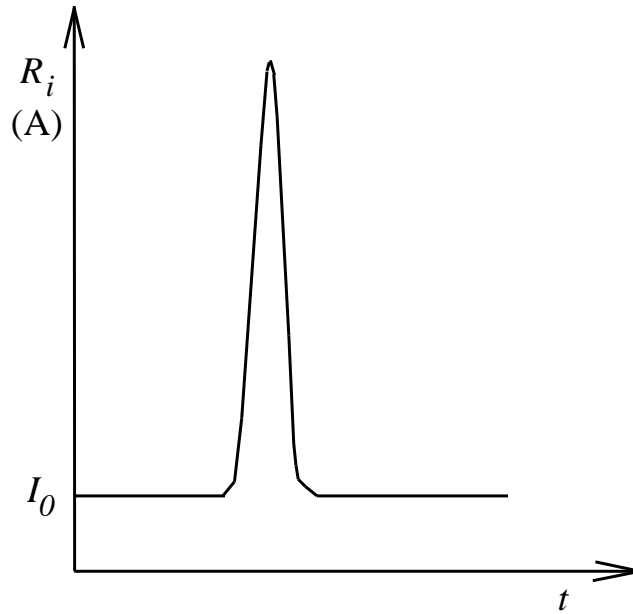
A lángban lejátszódó folyamatok



Rekombinációs reakciók:



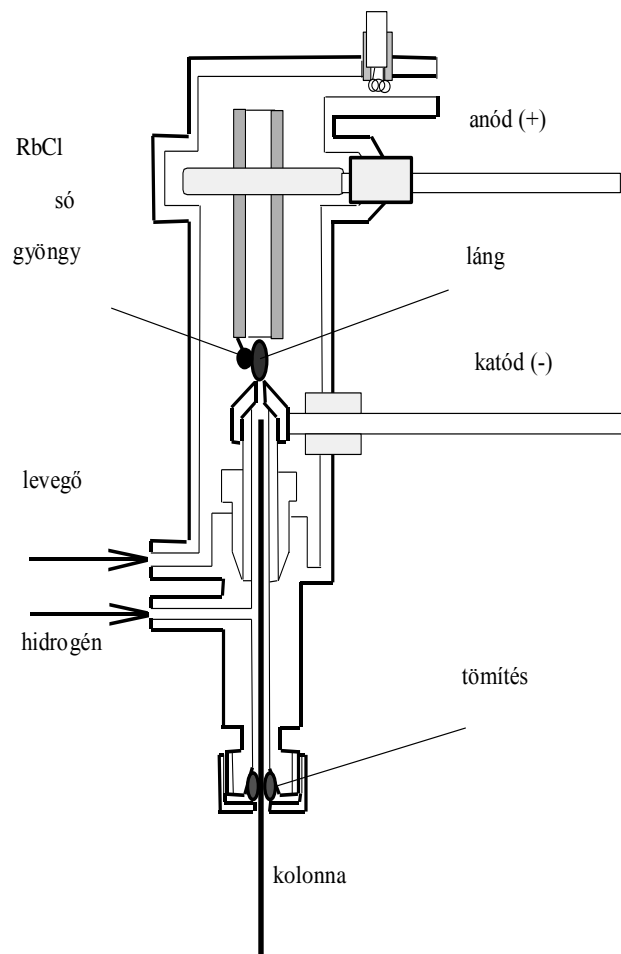
A FID jellegörbéje, érzékenysége



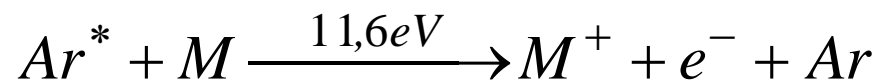
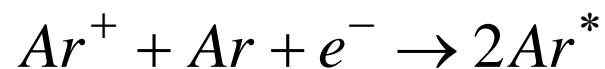
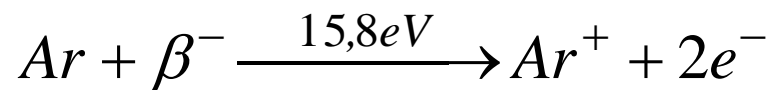
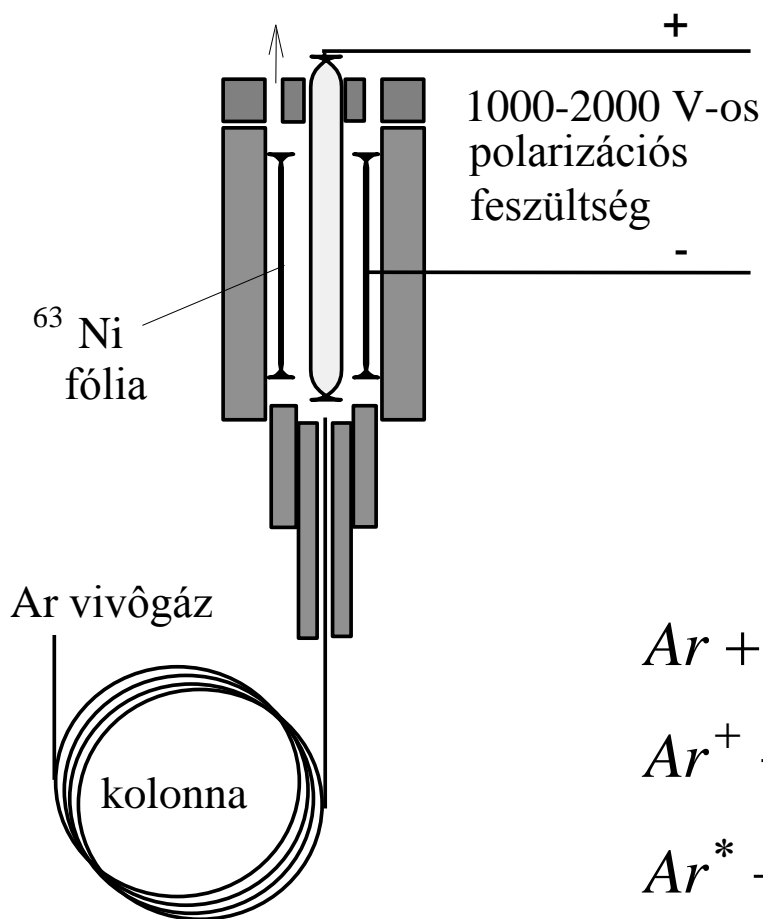
$$a_D = \frac{h_i}{\left(\frac{dm_i}{dt} \right)_{\max}} = \frac{h_i}{c_{\max} F} = \frac{A_i}{m_i} \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln 2}}$$

$$a_D = \gamma q_M \frac{12 n_c}{M_i} \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln 2}}$$

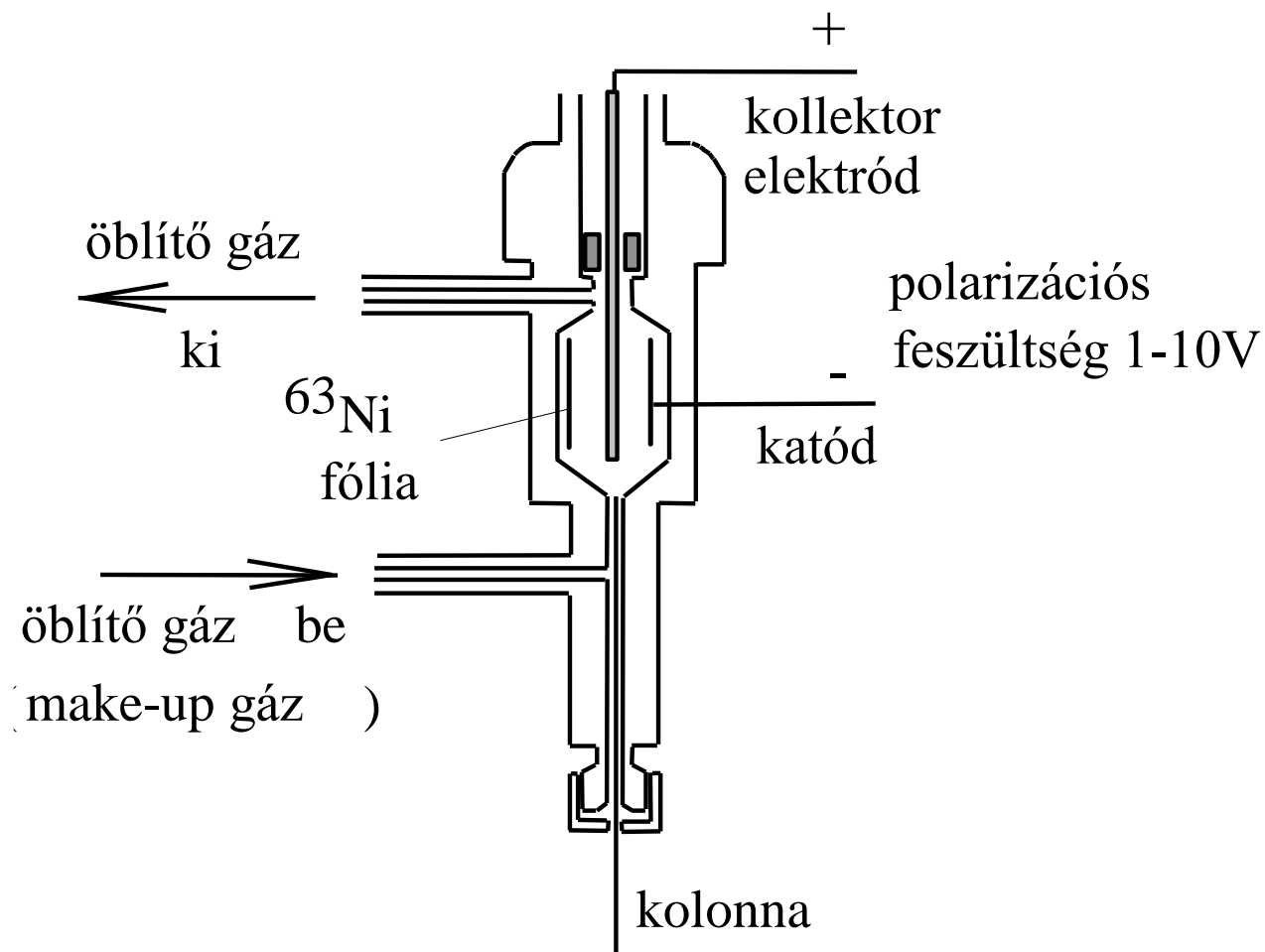
AFID



β -sugár ionizációs detektorok: Ar, He



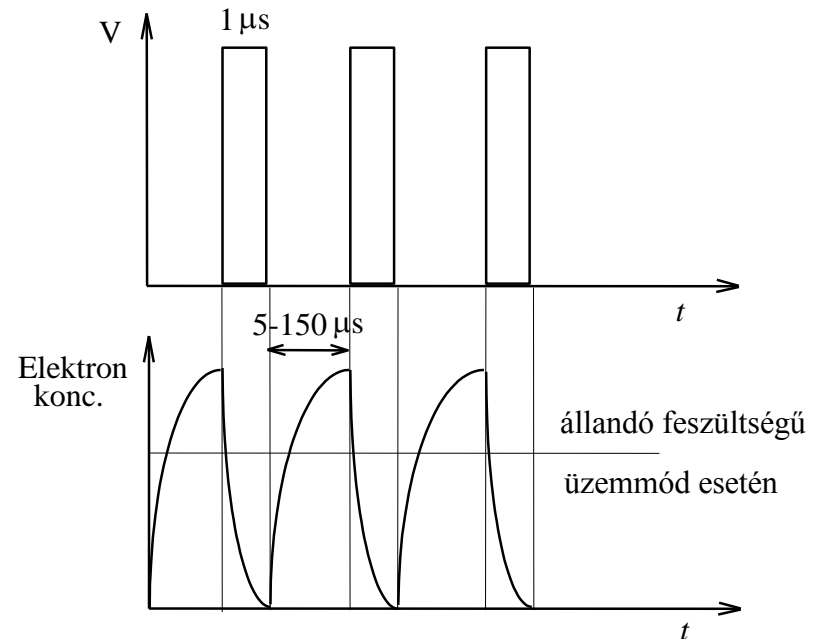
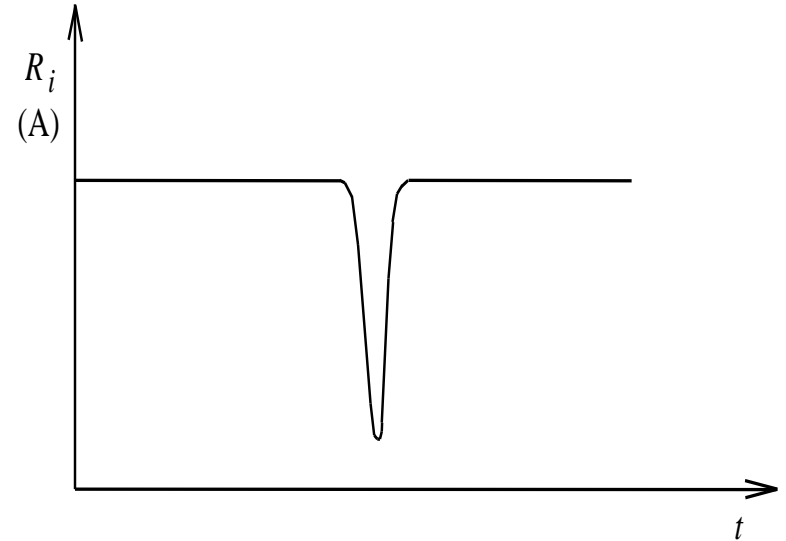
ECD



Az ECD érzékenysége

$$a_D = \frac{h_i}{c_{max}} = \frac{R_{i,max}}{c_{max}} = \frac{\gamma I_o \kappa_i \Phi_i c_{max}}{c_{max} M_i}$$

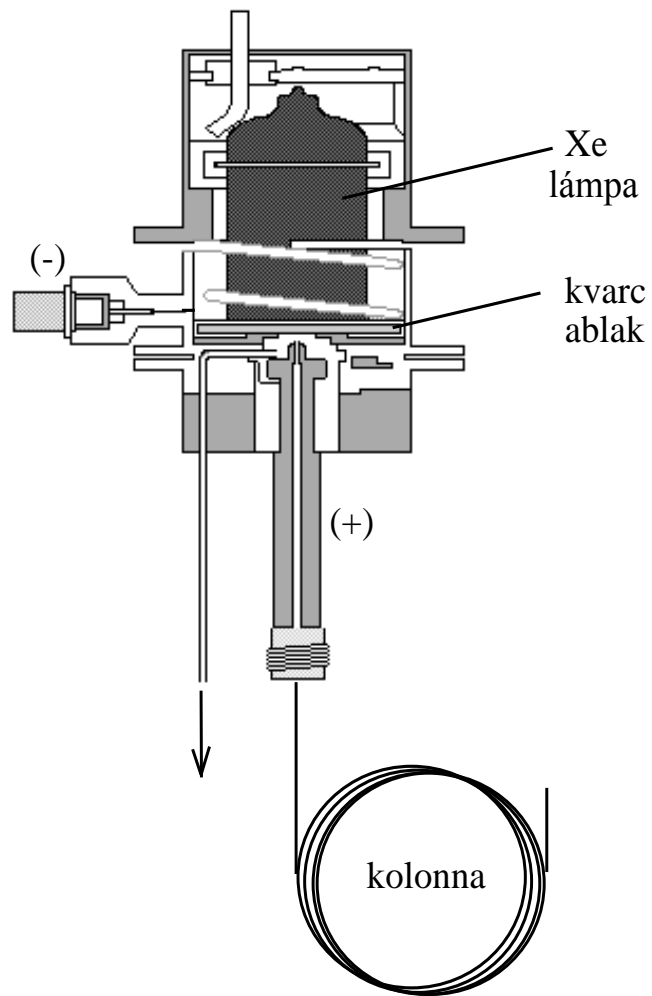
$$a_D = \gamma I_o \kappa_i \Phi_i \frac{1}{M_i}$$



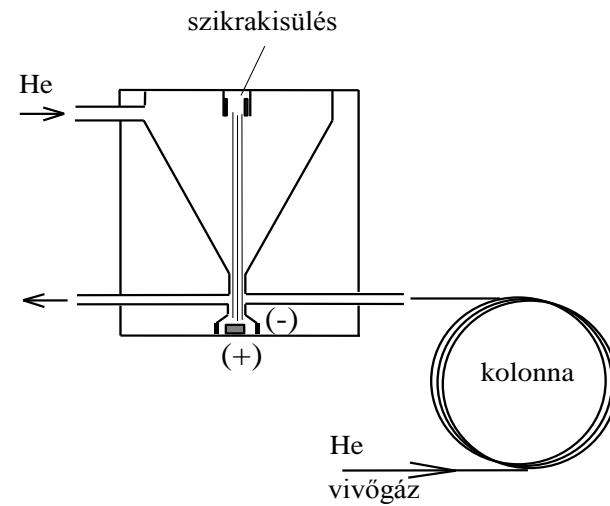
Az ECD relatív érzékenysége

Vegyület	Relatív érzékenység	Vegyület	Relatív érzékenység
benzol	0,06	oktafluor-propán	1,0
aceton	0,50	trifluor-klór-metán	3,3
di-n-butiléter	0,60	trifluor-klór-etén	100
metil-butirát	0,90	pentafluor-klór-etán	170
1-butanol	1,00	1,1-difluor-2,2-diklór-etén	670
1-klór-bután	1,00	difluor-diklór-metán	3*10 ⁴
1,4-diklór-bután	15,00	kloroform	3,3*10 ⁴
klór-benzol	75,00	1,1,2-triklór-etén	6,7*10 ⁴
1,1-diklór-bután	111,00	bróm-trifluor-metán	8,7*10 ⁴
1-bróm-bután	280,00	1,1,2-trifluor-1,2,2-triklór-etán	1,6*10 ⁵
bróm-benzol	450,00	1,1,1-trifluor-2-bróm-2-klór-etén	4,0*10 ⁵
kloroform	6*10 ⁴	1,1,1,2,2,3,3-heptafluor-3-jód-propán	6,0*10 ⁵
1-jód-bután	6*10 ⁴	1,1,2,2-tetrafluor-1,2-dibróm-etén	7,7*10 ⁵
széntetraklorid	6*10 ⁴	fluor-triklór-metán	1,2*10 ⁶

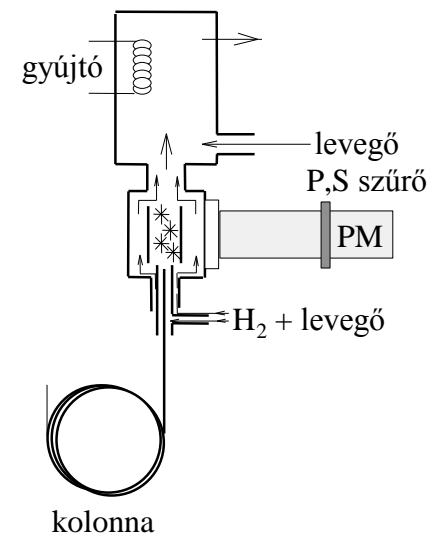
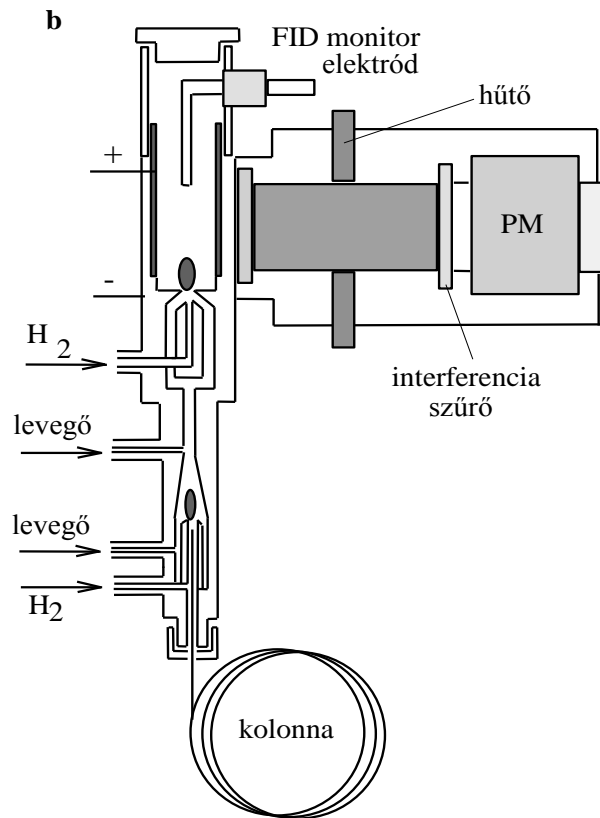
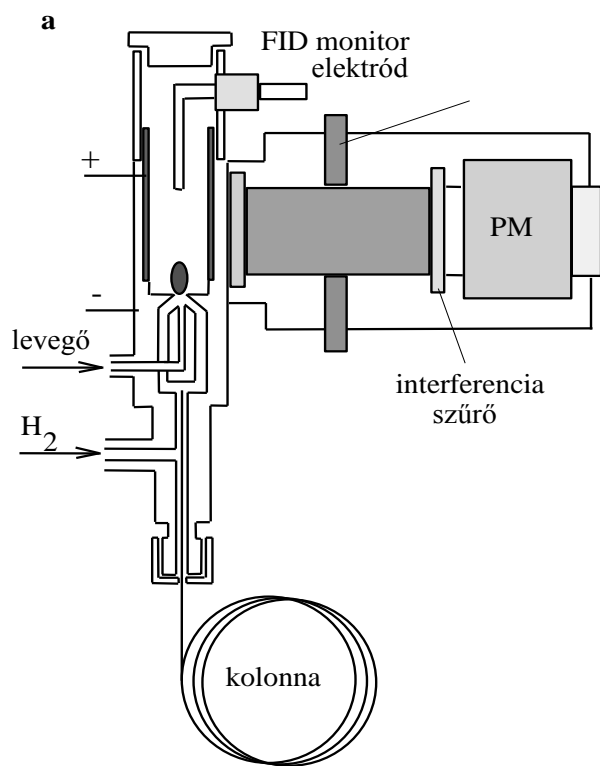
PID



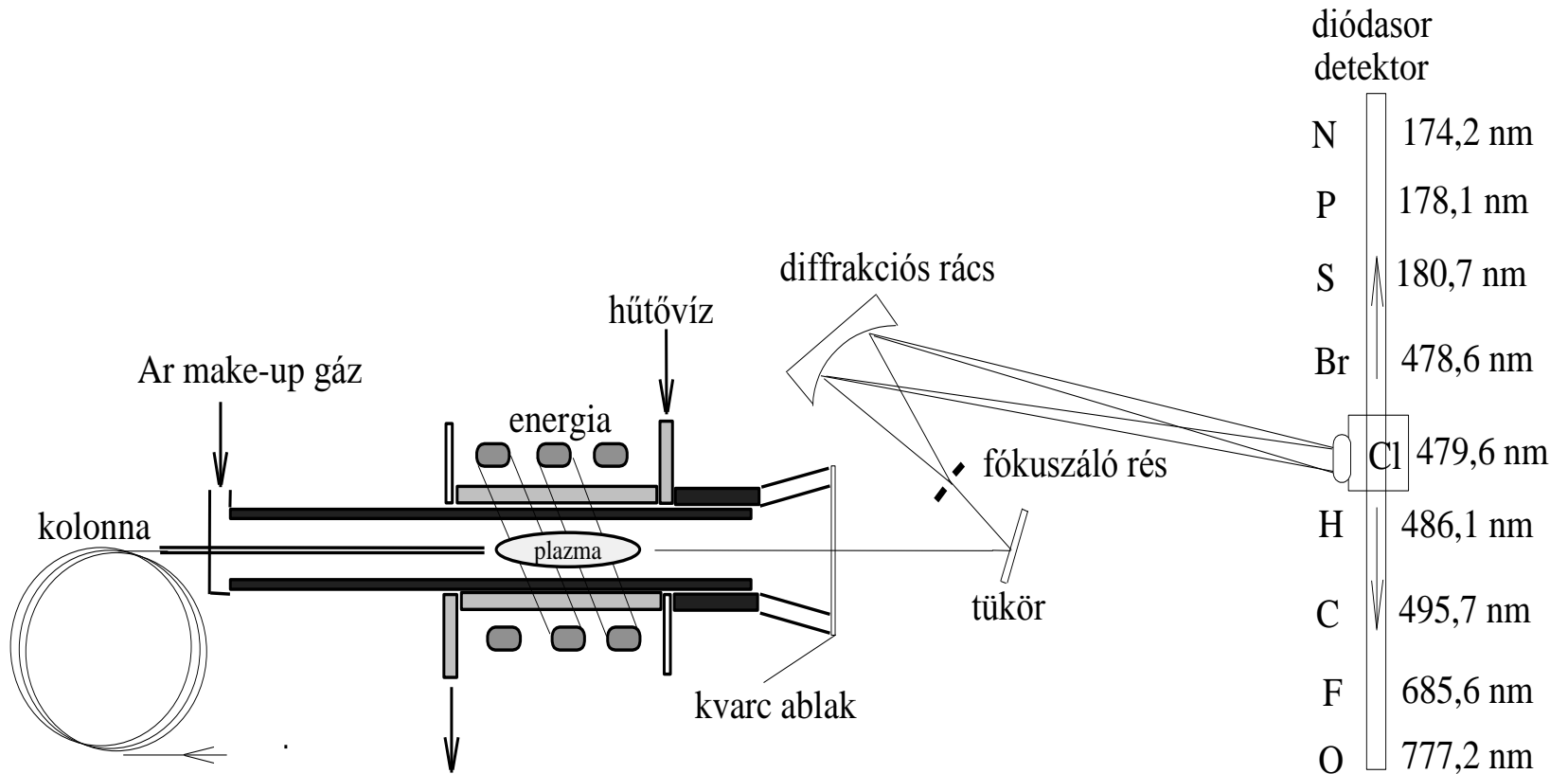
DID



FPD



AED



Fontosabb detektorok jellemzői

	<i>Z</i>	<i>DAH</i>	<i>DFH</i>	<i>a_D</i>	Linearitási tartomány	Típus 1.	Típus 2.
TCD	-	10 ⁻⁶ g	10 ⁻¹ g	10 ⁶ mVcm ³ /m g	10 ⁴ -10 ⁵	univ.	konc.
FID	10 ⁻¹⁴ A	10 ⁻¹² g/s	10 ⁻⁵ g/s	-	10 ⁷	szerves	tömegára m érz.
ECD	5 ⁻⁶ V	10 ⁻¹³ g	10 ⁻⁹ g	-	10 ⁴	spec.	konc.
FPD P	-	10 ⁻¹² gP/s	10 ⁻⁷ gP/s	-	10 ⁵	spec.	tömegára m érz.
FPD S	-	10 ⁻¹⁰ gS/s	10 ⁻⁷ gS/s	-	10 ³	spec.	tömegára m érz.
PID	10 ⁻¹⁴ A	10 ⁻¹³ g	10 ⁻⁹ g	-	10 ⁴	spec.	konc.
MS	10 ⁻⁶ V	10 ⁻¹⁵ g	10 ⁻⁹ g		10 ⁴ -10 ⁶	univ. szelektív	

Mindennapi feladataink:

- 1. az irodalom követése,**
- 2. a mintavétel, mintaelőkészítés problémáinak áttekintése,**
- 3. a gázkromatográfiás elválasztás,**
- 4. a minőségi azonosítás, mennyiségi elemzés kérdéseinek eldöntése,**
- 5. az eredmények megadása és dokumentálása, valamint**
- 6. az eredmények hihetőségének a bizonyítása,**
- 7. gyakori feladat a készülék hibáinak felismerése és elhárítása.**

Gyakorlati alkalmazások

- Permanens gázok mennyiségi elemzése
- Szénhidrogénipari elemzések
- Környezetvédelmi analízis
- Gyógyszeripari elemzések
- Élelmiszerek, mezőgazdasági termékek gázkromatográfiás vizsgálata, stb.

HPLC

A HPLC-s elválasztás

- **Célja:** minden termikusan érzékeny nemionos, ionos és ionizálható szerves és szervetlen alkotók eredményes elválasztása és a identifikálása, azaz a szükséges és elégséges felbontóképesség biztosítása:

$$R_s = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1} \geq 1,5$$

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

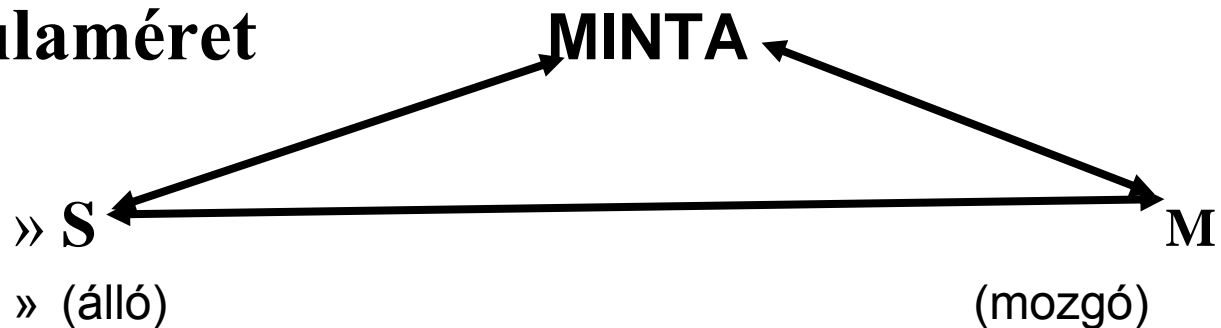
Hatékonyság

Szelektivitás

Kapacitás

A szorpciót eredményező kölcsönhatások:

- **1. diszperziós: apoláris-apoláris (hidrofób)**
- **2. indukciós: apoláris-poláris**
- **3. orientációs: poláris-poláris**
- **4. H-hidas: donor-akceptor**
- **5. ionos**
- **6. biospecifikus**
- **7. molekulaméret**



Szelektivitás:

állófázis megválasztása

eluens összetétel megválasztása

**izokratikus
gradiens elúció**

hőmérséklet szerepe

Az elválasztás hatékonysága I.

van Deemter egyenlet:

$$HETP = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{\bar{u}} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_s} \bar{u}$$

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C_m \bar{u}$$

- λ : töltési tényező
- d_p : a kolonnatöltet átlagos szemcseátmérője
- D_m : az alkotó lineáris diffúziós állandója a mozgó fázisban
- γ : a töltet zeg-zugosságát kifejező tényező
- u : az eluens lineáris áramlási sebessége
- k : a retenciós tényező
- D_s : az alkotó lineáris diffúziós állandója az álló fázisban

Az elválasztás hatékonysága II.

- A : az áramlási egyenetlenségekből származó csúcsszélesedés
– („eddy-diffusion”)
- B : a diffúzió csúcsszélesítő hatása
- C_s : az anyagátadás csúcsszélesítő hatása
- **Knox-egyenlet:**

$$h = A \nu^{1/3} + \frac{B}{\nu} + C_s \nu$$

$$h = \frac{H}{d_p}$$

$$\nu = \frac{u d_p}{D_m}$$

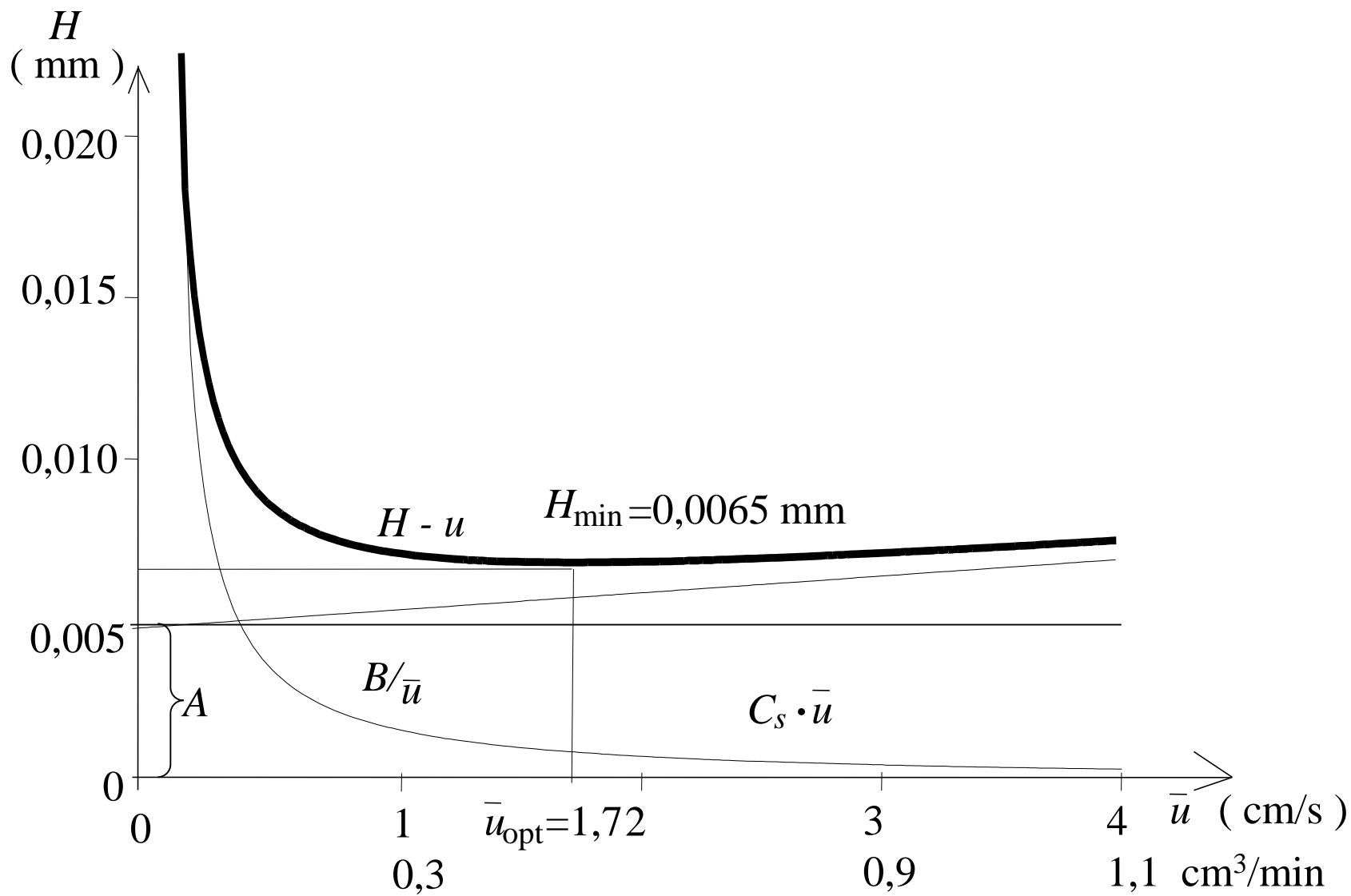
Az elválasztás hatékonysága III.

- $C_s = H_{\text{anyagátadás}} = H_{\text{áramlásidiff}} + H_{\text{filmellenállás}} + H_{\text{pórusdiff}} + H_{\text{kinetikai}}$

$$H_{\text{áramlási}} = c_a \frac{k^2}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_p}{D_m} u$$

$$H_{\text{pórusdiff}} = \frac{\Theta(k_0 + k + k_0 k)^2 \bar{d}_{\text{pórus}}^2 u}{30(1+k_0)^2 (1+k)^2 D_m k_0}$$

$$H_{\text{kin}} = \frac{2k\nu}{(1+k_0)(1+k)^2 k_d} = \frac{2k^2\nu}{(1+k_0)(1+k)^2 \beta k_a}$$



Áramlás szemcsés tölteten

- η : az eluens viszkozitása
- φ : a kolonna áramlási ellenállása

$$\Delta p = \frac{Lu \eta \varphi}{d_p^2}$$

HPLC-s elválasztások:

- **1. Normál fázisú (NP)**
- **2. Fordított fázisú (RP)**
- **3. RP ionpár kromatográfia**
- **4. Ioncserés kromatográfia**
- **5. HILIC**
- **6. UHPLC**
- **7. Méretkizárásos**
- **8. Affinitás kromatográfia**
- **9. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló**
- **10. Konvergens kromatográfia**
- **11. Folyadék-folyadék megoszlásos**
- **12. Elektrokromatográfiás módszerek**

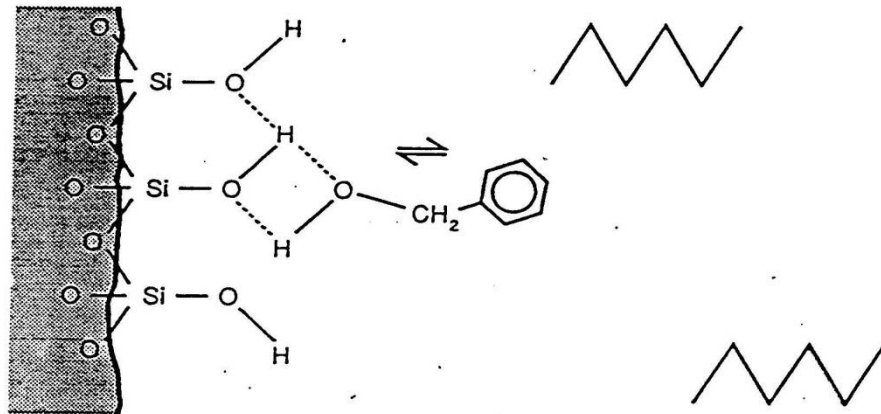
Oszlopos megoldású HPLC módszerek

<i>LC módszer</i>	<i>Állófázis minősége</i>	<i>Mozgófázis minősége</i>
NP-HPLC , normálfázisú kr.	poláris töltet	apoláris
RP-HPLC , fordított fázisú kr.	apoláris töltet	poláris
IC ionkromatográfia		
-ionpár kromatográfia	apoláris töltet	poláris eluens+ionpárképző
-ioncserés kromatográfia (HPIC)	töltéssel rendelkező töltet	puffer oldat
-ionkizárásos kromatográfia	kationcserélő töltet	puffer oldat
SEC , méretkizárásos kromatográfia	pórusos töltet	víz, vagy szerves oldószer
HIC , hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia	hidrofób felületű töltet	só tartalmú oldat: csökkenő sókoncentráció
HILIC , hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia	erősen poláris töltet	apoláris, majd növekvő polaritású

**A szilikagél mint állófázis alapanyag:
polikovasavak halmaza
a leggyakrabban használt állófázis**

- Fajlagos felülete: 200-400 m²/g
- Pórusmérete: 20-100Å (2-10nm)
- Pórustérfogat: 0,1-3 cm³/g
- Szemcseméreték: 1,3; 1,7; 3; 5 μm
- Módosított szilikagél carbon telítettsége: 5-20%

Normál fázisú kromatográfia



mechanizmus:

a vissztartás azáltal jön létre, hogy az álló fázis poláris felülete valamint a molekulák poláris részletei kölcsönhatásba kerülnek egymással

állófázis:

SiO₂, Al₂O₃
-NH₂, -CN, -diol, -NO₂

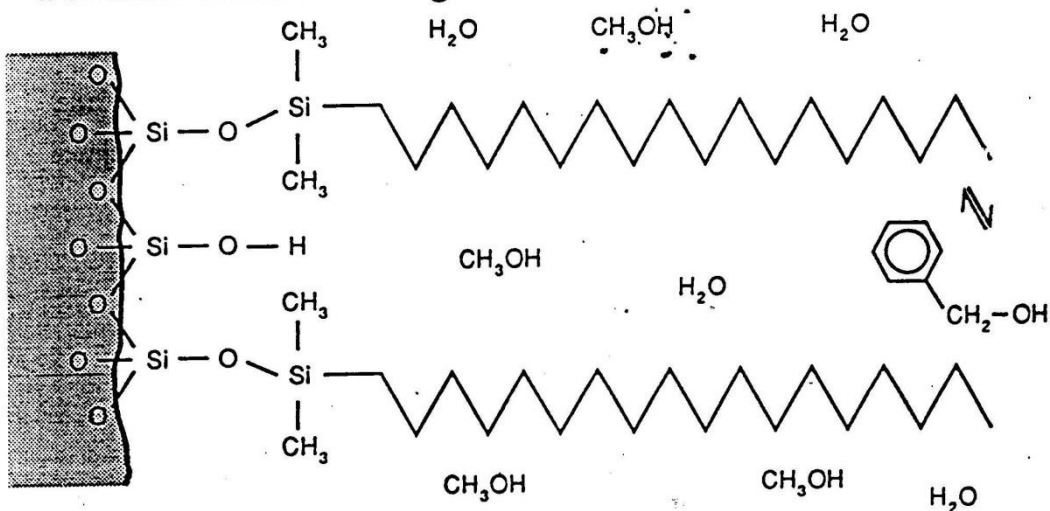
mozgó fázis:

heptán, hexán, ciklohexán, kloroform, diklórometán, dioxán, metanol

alkalmazás:

nem ionos apoláris illetve közepesen poláris anyagok (szénhidrogénektől a karbonsavakig) elválasztására

Fordított fázisú kromatográfia:

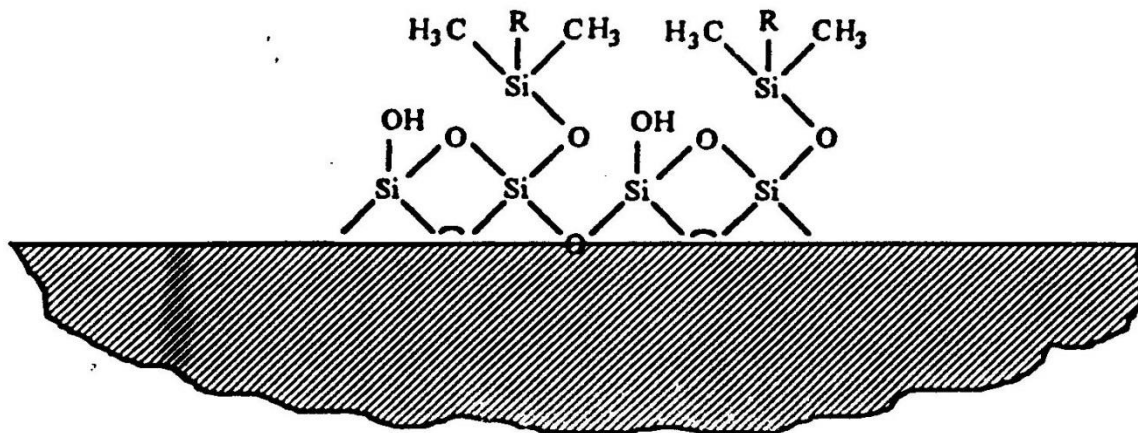


mechanizmus: a visszatartás az álló fázis apoláris szénhidrogén láncainak a molekulák apoláris részeivel való kölcsönhatása által jön létre

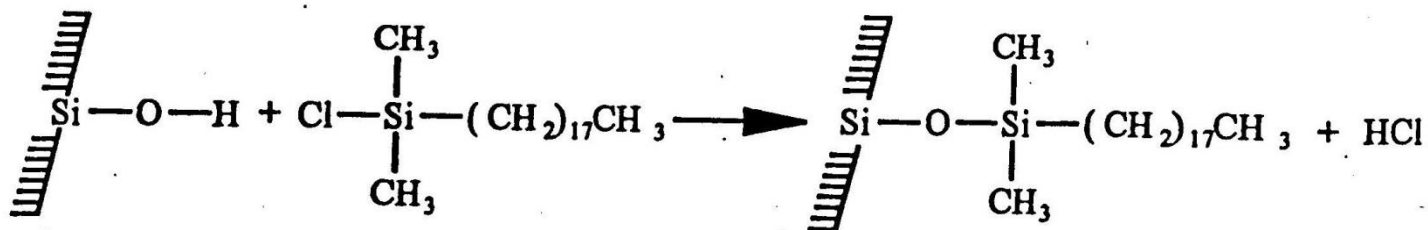
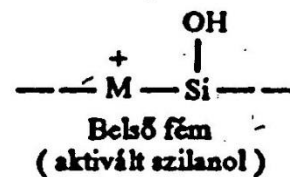
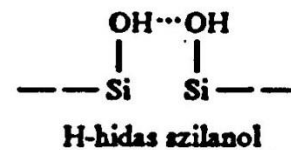
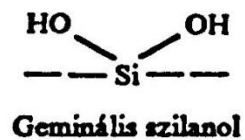
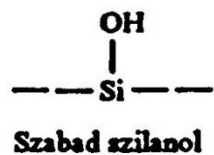
álló fázis: n-oktadecil (RP-18), n-oktil (RP-8), etil (RP-2), fenil, (CH₂)_n-CN, (CH₂)_n-diol, hidrofób polimerek

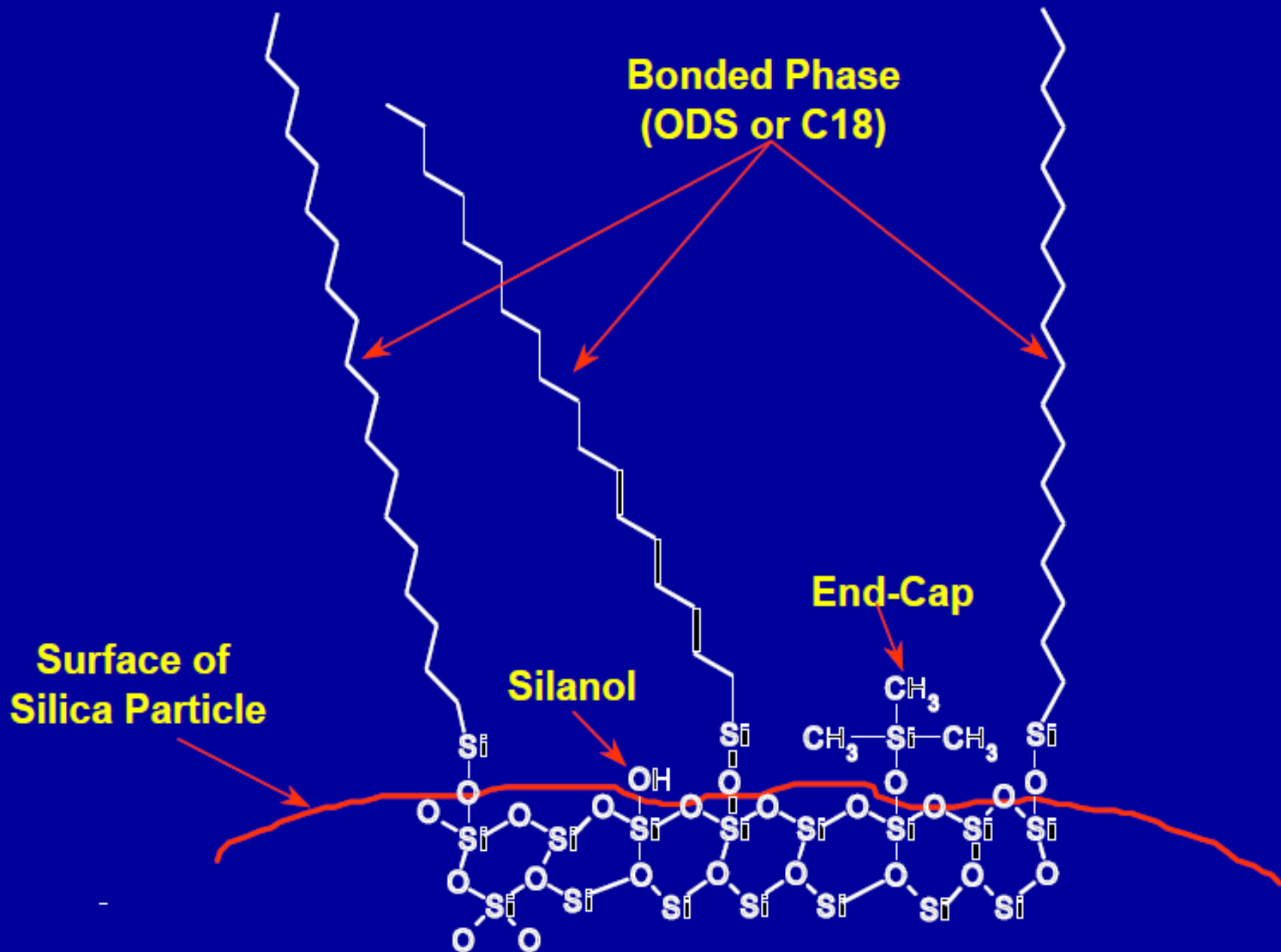
mozgó fázis: metanol vagy acetonitril/víz vagy puffer (alkalmanként tetrahydro-furán vagy dioxán adalékként)
általában: ha 10 %-kal növeljük az eluens víztartalmát, a kapacitás arány kétszeres lesz

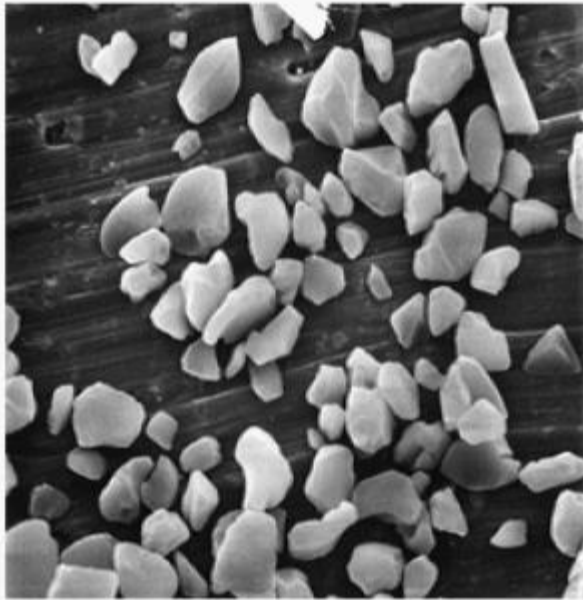
alkalmazás: ionos vagy nemionos formájú apoláris illetve közepesen poláris vegyületek elválasztására (karbonsavaktól szénhidrogénekig). Ha ionos formájú anyagokat akarunk elválasztani, pH-kontrollált puffereket célszerű használni.



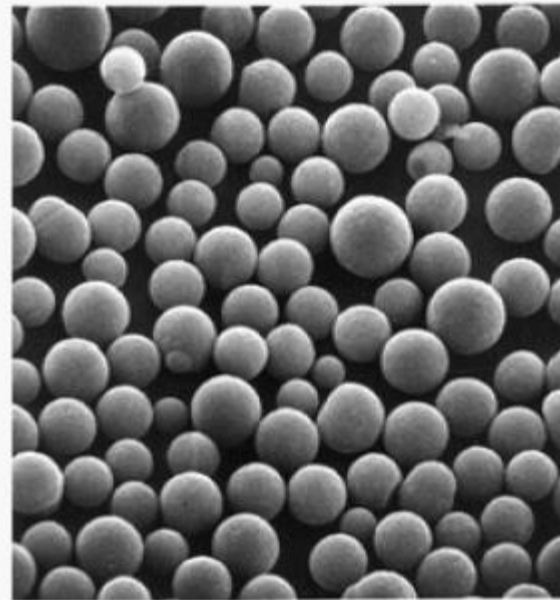
A kötött fázis felülete



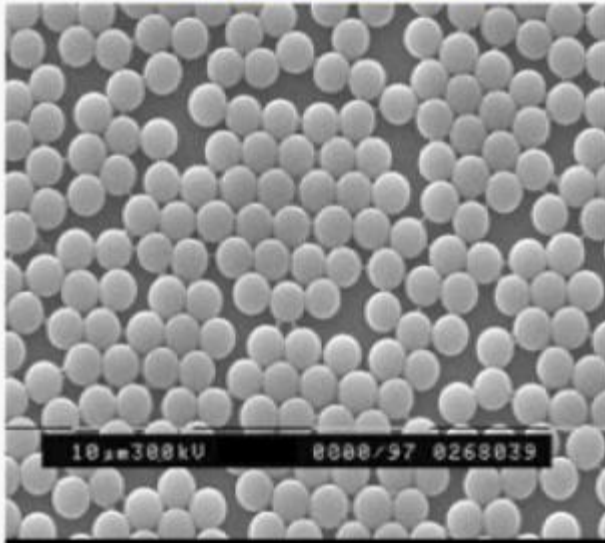




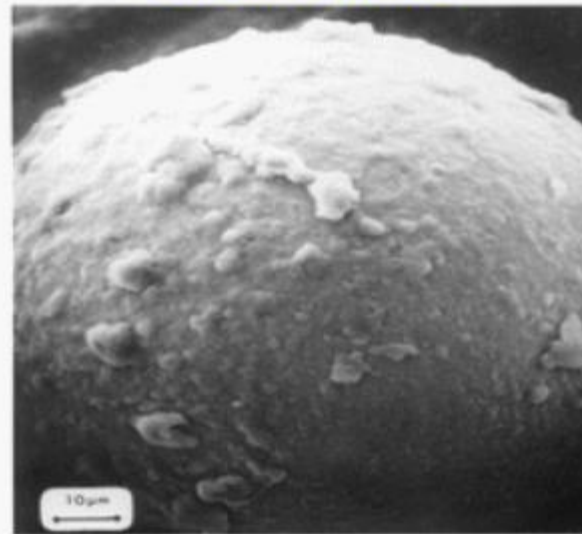
Irregular Silica Gel



Pellicular Packing

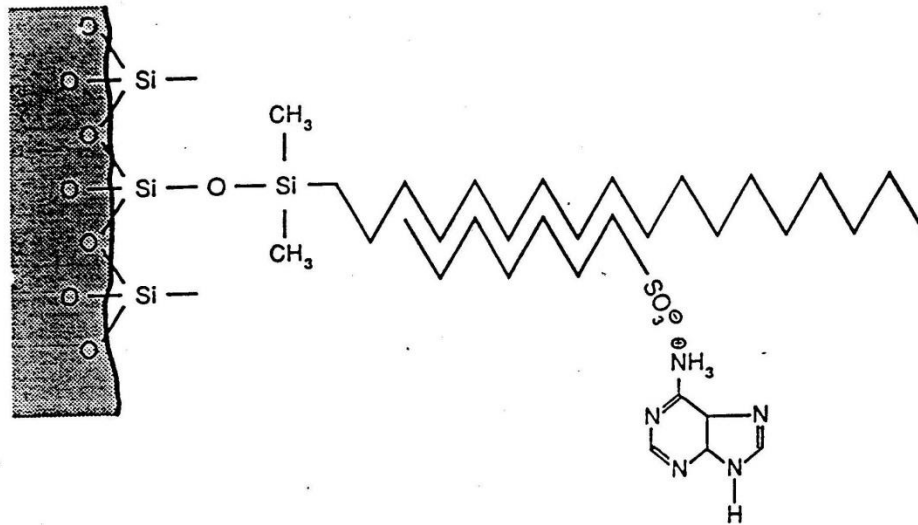


Spherical Silica Gel



Pellicular Particle

Fordított fázisú ionpár kromatográfia:

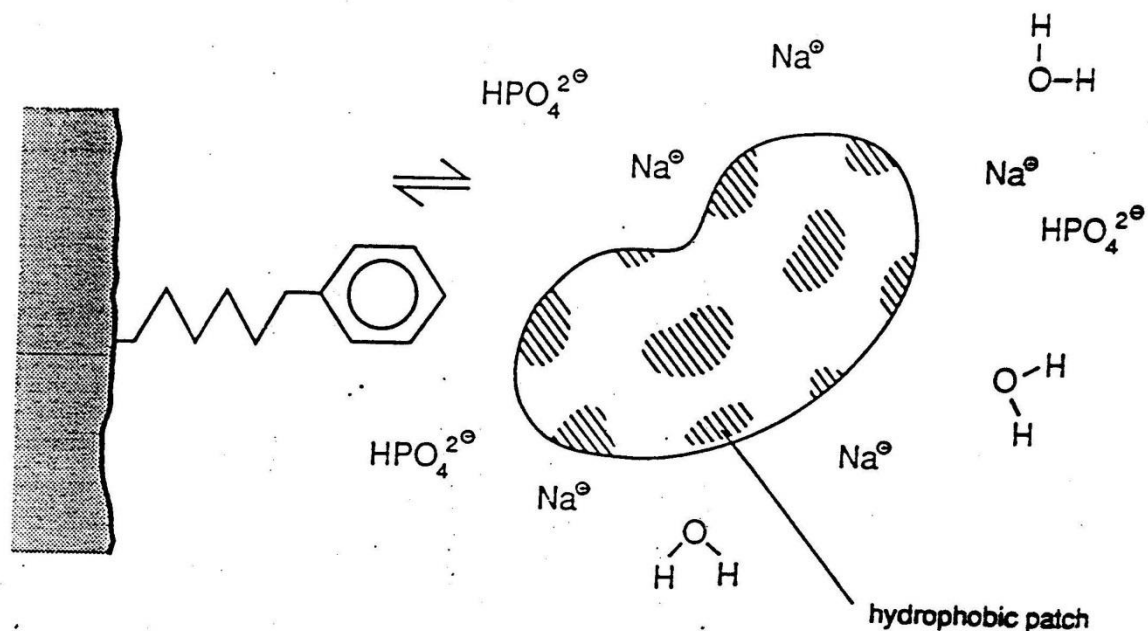


- mechanizmus:** A minta ionos molekulái ionos kötéssel kötődnek egy ionpárképző reagenshez. Az ionpárképző reagens olyan apoláris részt tartalmaz, mely kölcsönhatásba léphet az álló fázis apoláris szénhidrogén láncjaival.
- álló fázis:** fordított fázisú anyagok (RP-18, RP-8, -CN)
- mozgó fázis:** metanol vagy acetonitril/puffer, mely tartalmazza az ionpárképző reagenst (10⁻³-10⁻² M)
- alkalmazás:** ionos vegyületek kevésbé kötődnek meg fordított fázisokon, ezért ionpárképző reagens hozzáadásával növeljük a visszatartást

Minta molekulák:
Savakhoz
lúgokhoz

Ionpár reagens:
tetraalkil-ammónium sók
alkil-szulfonátok

A hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia:



mechanizmus:

az erősen poláris eluens kényszeríti a minta molekulákat, hogy az álló fázissal való érintkezés során kölcsönhatásba lépjenek annak apoláris csoportjaival (vö. kiszóó hatás). A minta molekulái **akkor** eluálódhatnak, ha csökken az eluens poláris karaktere, pl. ha csökken a sókoncentráció.

álló fázis:

fenilcsoportokkal vagy alkiláncokkal borított szorbensek

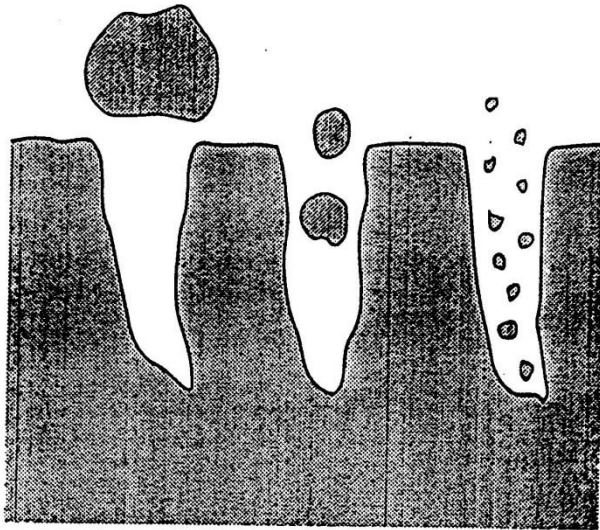
mozgó fázis

vizes pufferek magas só koncentrációval, sógradiens

alkalmazás:

fehérjék tisztítása és elválasztása

Méretkizárásos kromatográfia



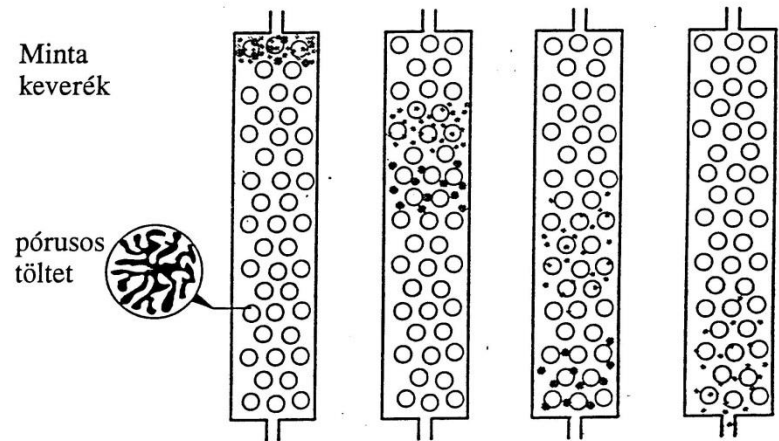
mechanizmus: a visszatartás azáltal valósul meg, hogy a különböző méretű kis molekulák más-más ideig tartózkodnak a pórusokban, a nagyok viszont kizáródnak.

álló fázis: olyan porózus anyagok, melyek pórus méretei kevésbé térnek el egymástól (szilika, módosított szilika, szerves polimerek, szénhidrát polimerek)

mozgó fázis: szerves vagy vizes eluensek lehetnek, megválasztásuknál figyelemmel kell lenni arra, hogy bennük a minta molekulái jól oldódjanak, ellenben az álló fázis tulajdonságait ne változtassák meg és azt ne is oldják.

alkalmazás:

- nagy molekulású molekulák elválasztására (többnyire polimerek)
- polimerek molekulású eloszlásának és átlag molekulásújának meghatározására
- biopolimerek molekulásújának meghatározására illetve elválasztására

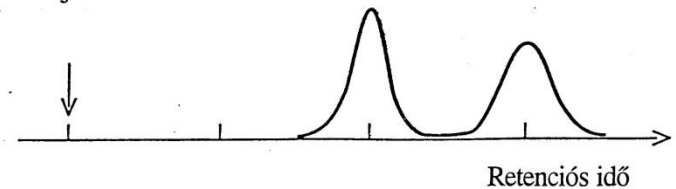


Minta keverék

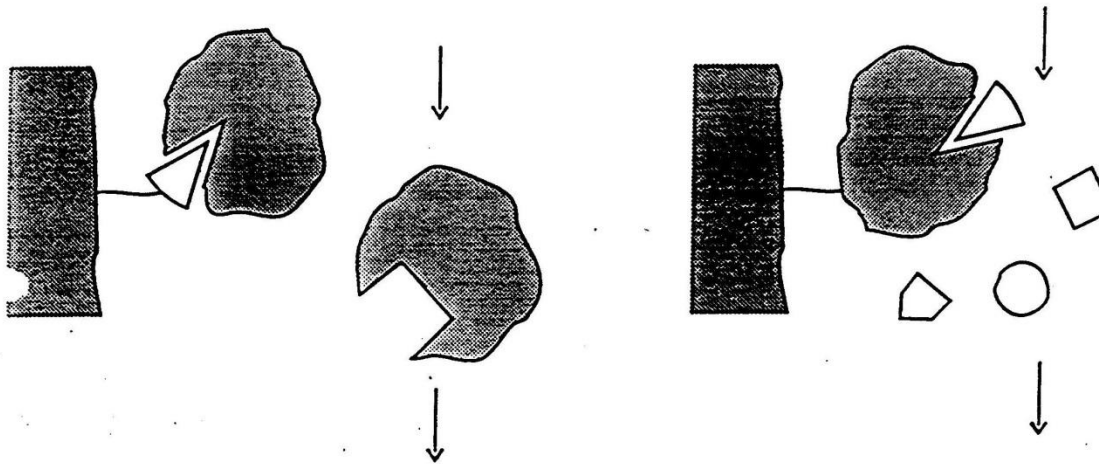
pórusos töltet

Kromatogram

Injektálás



Affinitás kromatográfia:



mechanizmus:

adszorbenseken immobilizált szubsztrátok, ligandumok vagy biológiai makromolekulák felszínükön illetve belsőjükben olyan specifikus kötődési helyekkel rendelkezhetnek, melyeken csak ennek megfelelő molekulák kötődhetnek meg (kulcs-zár effektus). Egyéb biomolekulák, melyek nem rendelkeznek a megfelelő kötődési lehetőséggel, nem kötődnek.

A megkötődött molekulák úgy eluálhatók, hogy megváltoztatjuk a puffer pH-ját, vagy koncentrációját, ezáltal változik a biomolekula konformációja, megszűnik kötődőképessége.

álló fázis:

immobilizált szubsztrátok, ligandok vagy biomolekulák

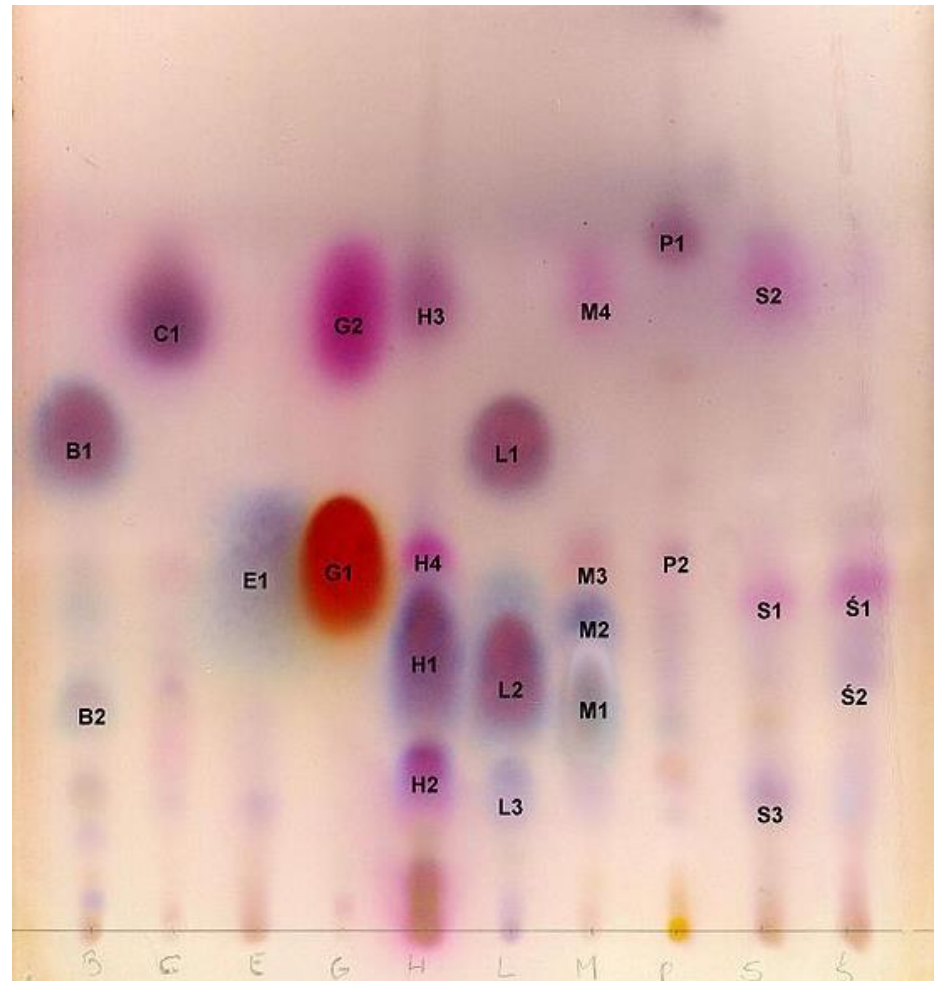
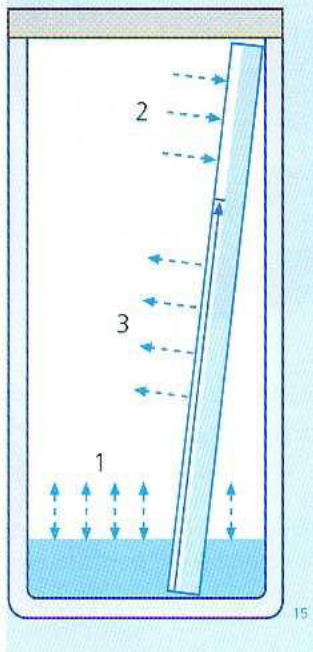
mozgó fázis

vizes pufferek

alkalmazás:

biomolekulák és szubsztrátjaik dúsítására illetve tisztítására

Réteggromatográfia



toluene - ethyl acetate (93:7 v/v), next sprayed with vanillin in H_2SO_4 and heated. From left to right oils from: bergamot, cedar, eucalyptus, syzygium, malaleuca, lavandula, mint, orange, pine, spruce. Identified components: B1 and L1 - linalol, B2 and L2 - linalyl acetate, E1 - cinneol, G1 - eugenol, G2 - carryophyllene. Doubtfully identified components - C1 - cedrol, M3 - menthol, P1 - limonene.

HPLC Töltetek fejlődése

<i>Őskor:</i> (-1966)	Szabálytalan, 100 -300 μm, gravitáció
<i>Kőkör:</i> (1965-1969)	Szabálytalan, 30 -100 μm (40 -70 μm) Száras töltés, kényszeráramlás (pumpa)
<i>Első generáció:</i> (1970-)	Szabálytalan, 10 -15 μm Porózus felületű, Iszapfázisú töltés, hatásosság Kémiaailag kötött (fordított) fázisok Polimer gélek
<i>Második generáció:</i> (1980-)	Gömbalakú, 3 -5 μm Endcapping Tágpórusú (WP) töltetek (30 -400 nm) Poláris (Diol, NH_2, CN) fázisok Hatásosság + szelektivitás Polimer töltetek Királis töltetek

***Harmadik generáció:
(1990-)***

**Szintézis szilánokból, nagy tisztaság
3 -5 μm , Endcapping, védett (stabil)
fázisok (SB)**

**Hatásosság + szelektivitás + stabilitás
+ reprodukálhatóság**

**Nemporózus töltetek, 1-2 μm ,
Gyorsaság**

Monolit töltetek

Héjszerkezetű töltetek

Töltetek anyaga

Szervetlen oxidok:

szilika gél

alumínium-oxid

TiO_2 , ZrO_2

hidroxil-apatit ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Szerves polimerek:

sztírol-divinilbenzol

poli-alkilmetakrilát

polivinil-alkohol-észter

poliéter

alkilált poliakrilamid

dextrán-akrilamid

Porózus grafitált karbon (PCG)

Töltetek aktív részei

Adszorbens / normál fázisú:

szilika-gél-SiOH

Alumínium-oxid Al_2O_3

Florisil Mg_2SiO_3

Diol $-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}_2-\text{CHOH}-\text{CHOH}$

Amino $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

Ciano $-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$

Fordított fázisú:

Oktadecil $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$

Oktil $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$

Etil $-\text{CH}_2\text{CH}_3$

Ciklohexil $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_{11}$

Fenil $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_6$

Endcapping

Embedding

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$

Ioncserélő:

anioncserélő: Amino $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
Kvaterner amin $-(\text{CH}_2)_3\text{-N}^+\text{-}(\text{CH}_3)_3$

kationcserélő: Karbonsav $-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Propil szulfonsav $-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_2\text{OH}$
Benzol szulfonsav $-(\text{CH}_2)_3\text{-SO}_2\text{OH}$

Királis fázisok:

a,AGP, (R) Urea, (R)DBF
ciklodextrin

Affinitási töltetek:

Fenilboronát
Biospecifikus ligandok

SEC töltetek:

Silica
Polimer

HIC töltetek:

Silica
Polimer

NP-HPLC mozgó fázisokkal szembeni elvárások

- polaritás**
- viszkozitás**
- UV áteresztés**
- tisztaság**
- toxicitás mentesség**
- forráspont**
- oxigén oldódás**
- víztartalom**
- elegyíthetőség**
- ár**

NP-HPLC mozgó fázisok

- **Alap oldószerek:**
 - **n-hexán**
 - **n-heptán**
 - **izooktán**
- **Oldhatóság növelők:**
 - **diklór-metán**
 - **diklór-etán**
 - **kloroform**
- **Modifikátorok: észterek, éterek, alkoholok, stb.**

RP-HPLC mozgó fázisok

- **acetonitril**
- **1,4-dioxán**
- **etanol**
- **2-propanol**
- **metanol**
- **tetrahidrofurán**
- **VÍZ**

Oldószer jellemző adatai

Oldószer	Refraktív index (20 °C)	Polaritás [P']	Viszkozitás [cP, 20°C]	Forráspont [°C]	UV Cut off [nm]
Tetrahidrofurán	1.4072	4	0.55	66	212
Dioxán	1.4224	4.8	1.37	101.3	215
Acetonitril	1.3441	5.8	0.38	81.6	190
2-Propanol	1.3772	3.9	2.40	82.3	205
Etanol	1.3614	-	1.20	78	210
Metanol	1.3284	5.1	0.55	64.7	205
Víz	1.333	10.2	1	100	190

Oldószerek jellemző adatai

Oldószer	Oldószer erősség (ϵ°)	Oldhatósági paraméter (δ)	Polaritási index (P')	Sűrűség [g/cm^3]	Viszkozitás [cP 20°C]	Forráspont [°C]	UV Cut off [nm]
n-Pentán	0.00	7.1	0.00	0.626	0.22	36	200
n-Heptán	0.01	7.2	0.20	0.684	0.42	98	200
Izooktán	0.01	7.3	0.10	0.690	0.50	99	200
CCl_4	0.14	8.6	1.60	1.594	0.97	77	265
Toluol	0.22	8.9	2.4	0.867	0.59	110	285
Dietiléter	0.29	7.4	2.90	0.708	0.24	35	220
Kloroform	0.31	9.3	4.10	1.483	0.57	61	250
Diklórmetán	0.32	9.7	3.10	1.327	0.44	40	250
Tetrahydrofurán	0.35	9.1	4.00	0.881	0.46	66	220
Metil-etilketon	0.39	9.8	4.70	0.805	0.40	80	330
Etilacetát	0.45	9.6	4.40	0.900	0.45	77	260
Acetonitril	0.50	11.7	5.80	0.786	0.37	82	210
2-Propanol	0.63	11.5	3.90	0.785	2.90	82	200
Etanol	0.68	12.7	4.30	0.791	1.20	79	210
Metanol	0.73	14.4	5.10	0.791	0.60	65	205
Víz	>0.73	23.4	10.20	1.000	0.89	100	-

Az oldószerek erőssége

1. $\varepsilon_{sz}^o = 1,1 \varepsilon_{alox}^o$

2. $\delta_i = \left(-\frac{E_i}{V_i} \right)^{1/2} = \sqrt{\frac{\Delta H_{v,i} - RT}{V_i}}$

3.

$$\delta_i = \delta_{diszp} + \delta_{ind} + \delta_{or} + \delta_{don} + \delta_{acc}$$

4. Snyder-féle polaritási index: etanol (akceptor),
dioxán (donor)
nitrometán (orientáció)

$$P' = \Sigma \log K_{et} + \log K_{diox} + \log K_{nitrom}$$

RP-HPLC elválasztás optimalizálása

- **SZELEKTIVITÁS**
- **Hatékonyság**
- **Kapacitás**
- **Az elválasztások pH függése:**
 - ionos és ionizálható alkotók (savak, bázisok)
 - nem disszociális alkotók elválasztása (nem pH függő)

Az ionizálható vegyületek jellemzői:

- elektrolitos disszociáció (pK_a),**
- ionizálhatók szerves és vizes fázisok közötti megoszlás (lgD)**

$$\lg D_{\text{sav}} = \lg P - \lg \left[1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a} \right]$$

$$\lg D_{\text{bázis}} = \lg P - \lg \left[1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}} \right]$$

Nem ionizálható vegyületek

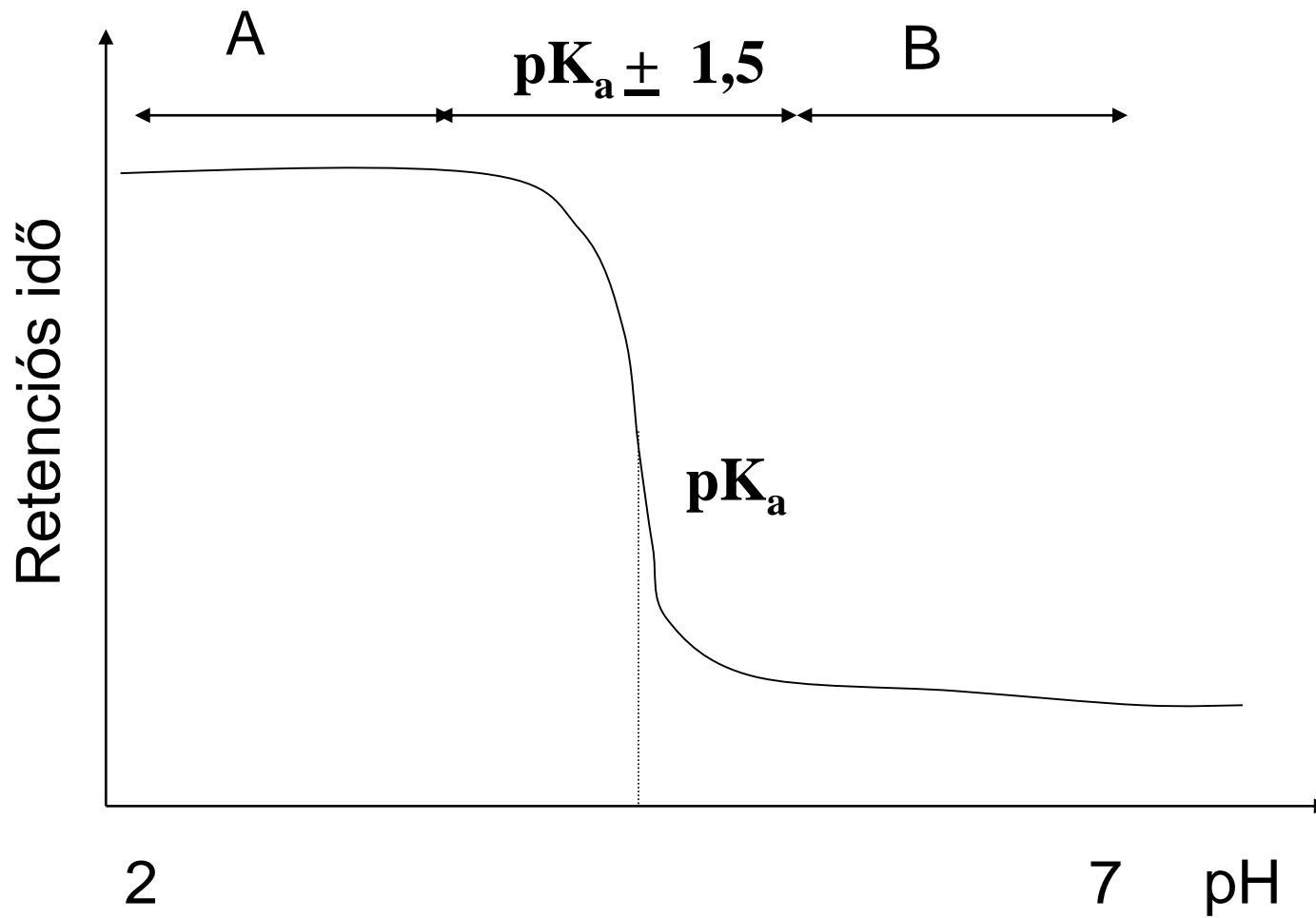
- oktanol-víz megoszlási hányadosa (lgP),**

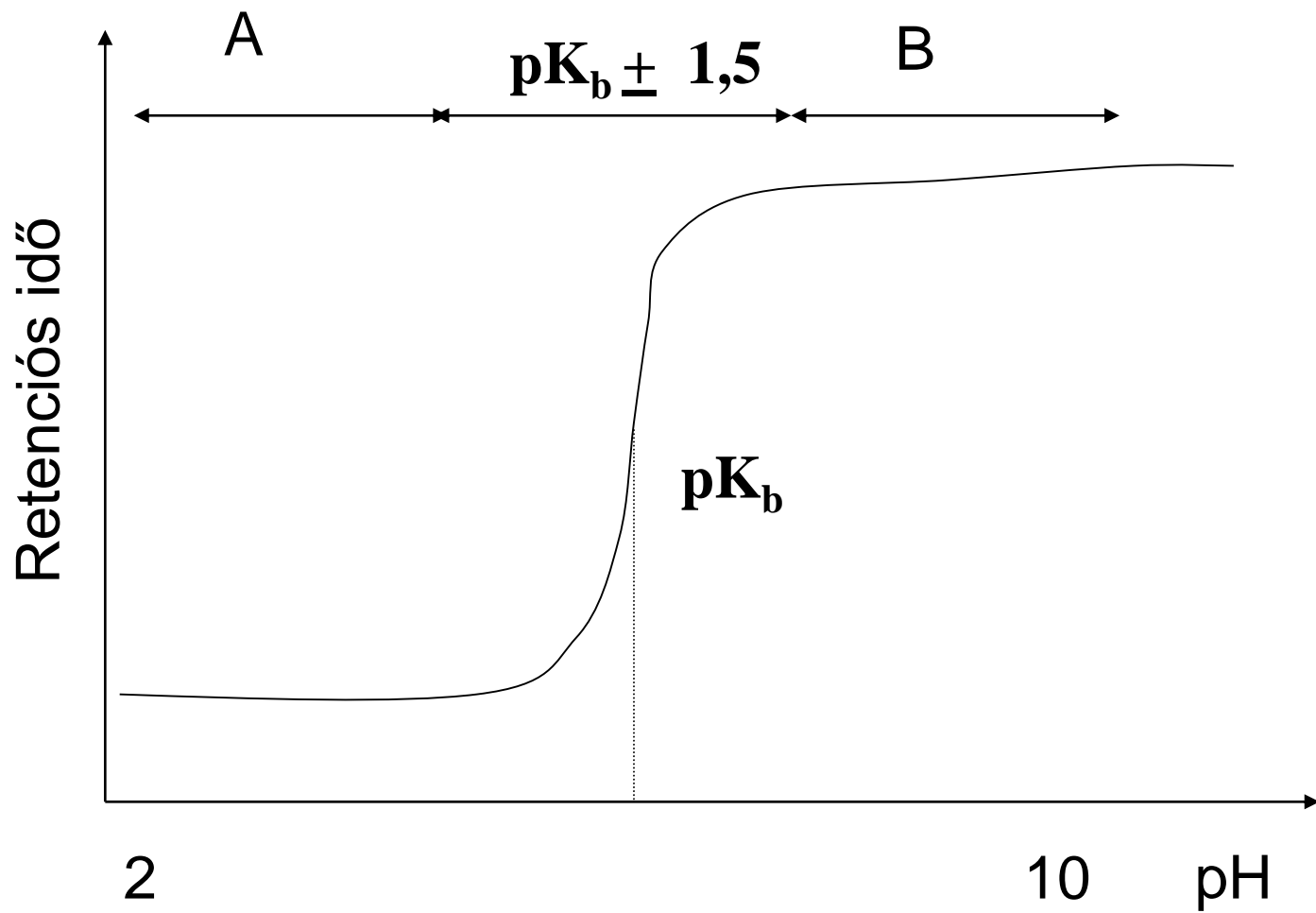
$$\lg P = \lg \frac{c_{\text{okt}}}{c_{\text{víz}}}$$



$$\mathbf{D}_{\text{sav}} = \frac{[\mathbf{AB}]_{\text{org}}}{[\mathbf{AB}]_{\text{aq}} + [\mathbf{A}^+]_{\text{aq}}}$$

$$\mathbf{D}_{\text{bázis}} = \frac{[\mathbf{AB}]_{\text{org}}}{[\mathbf{AB}]_{\text{aq}} + [\mathbf{B}^-]_{\text{aq}}}$$

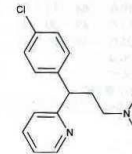




pH szerepe: savak, bázisok, sók

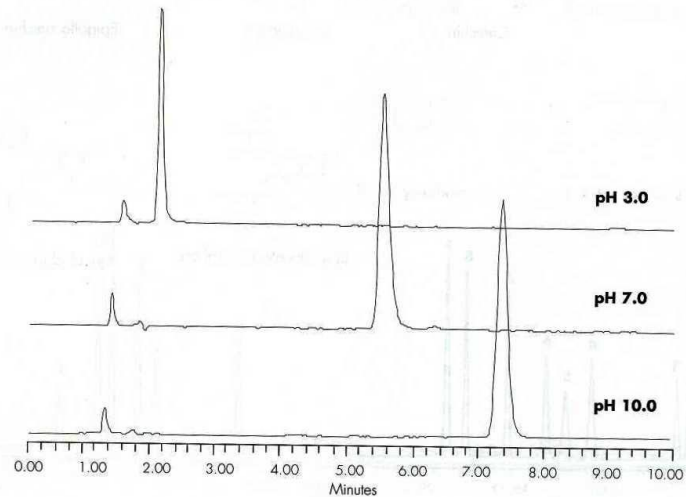
Conditions

Column: XTerra® RP18 4.6 x 150 mm, 5 µm
Part Number: 186000492
Mobile Phase:
pH 3.0: H₂O/ACN/100 mM NH₄COOH, pH 3.0
45: 45: 10
pH 7.0: H₂O/ACN/100 mM NH₄HCO₃, pH 7.0
55: 35: 10
pH 10.0: H₂O/ACN/100 mM NH₄HCO₃, pH 10.0
50: 40: 10
Flow rate: 1.0 mL/min
Injection Volume: 5 µL of 250 µg/mL
Temperature: 30°C
Detection: UV @ 270 nm
Instrument: Alliance® 2695, 2996 PDA



Chlorpheniramine

Mobile Phase pH	USP Tailing
3.0	1.29
7.0	1.43
10.0	1.19



- **pH beállítás**

- **ammónium –formiát** **2,8-4,8 pH**

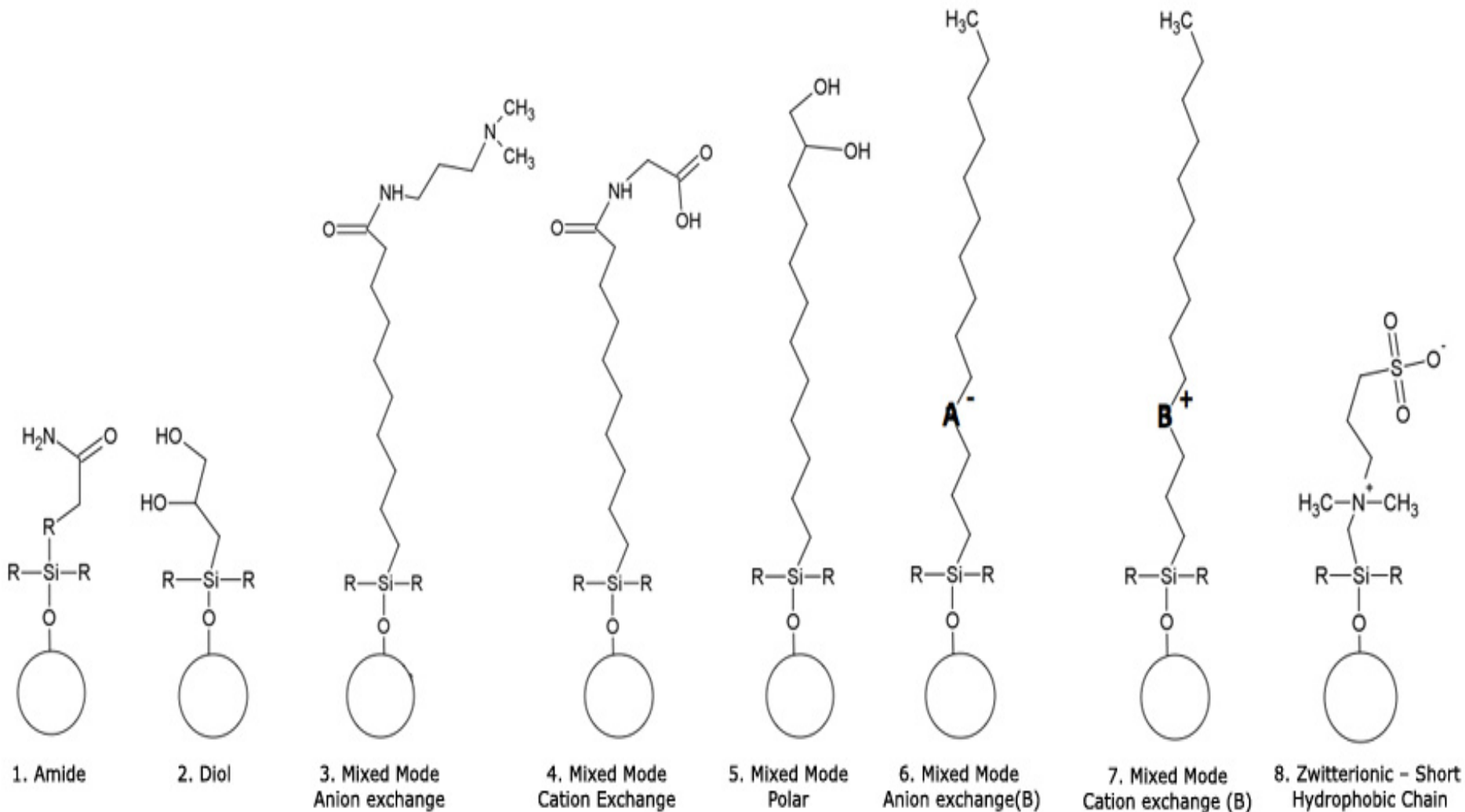
- **ammónium-acetát** **3,8-5,8 pH**

- **ammónium-hidroxid** **8-11 pH**

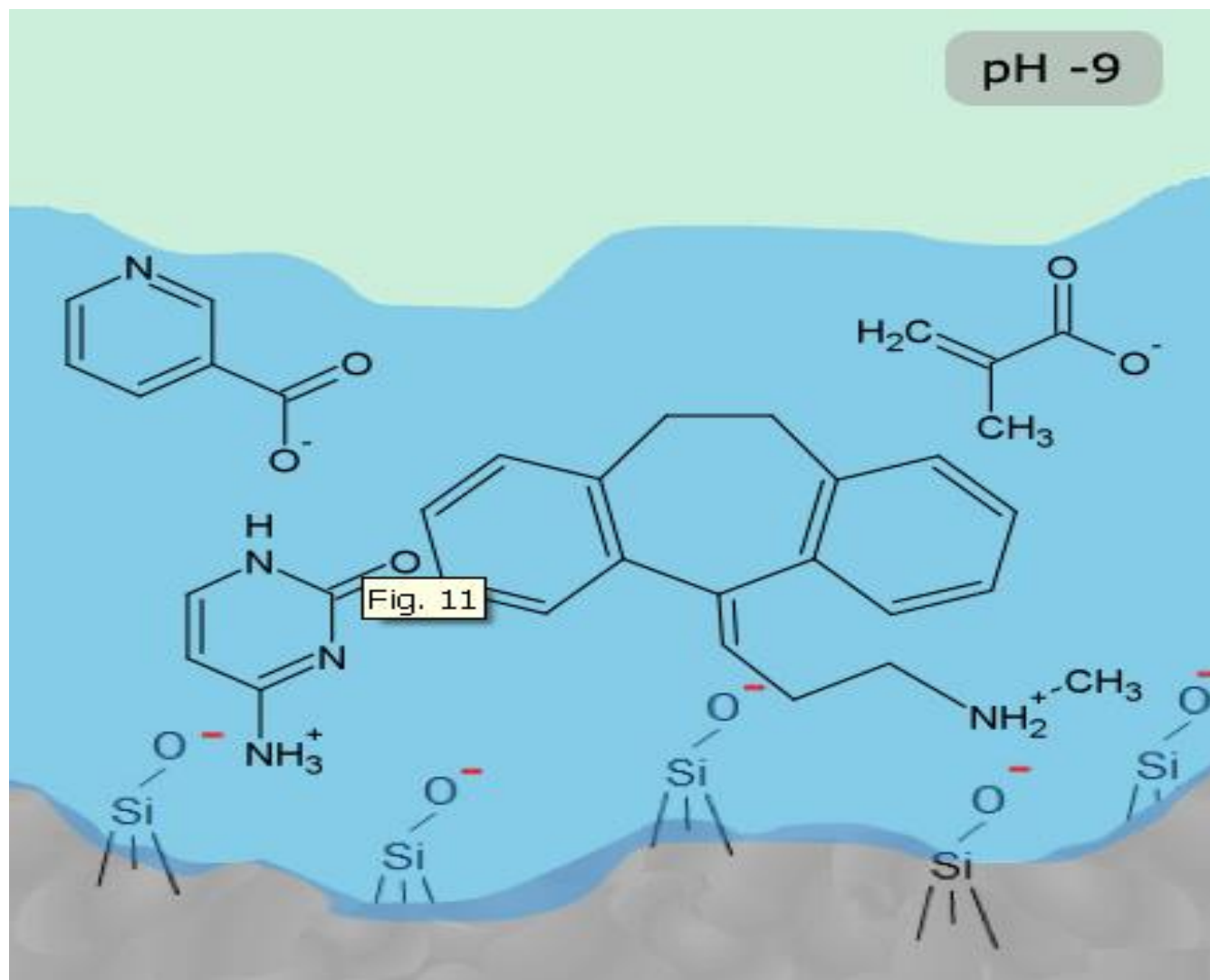
- **amm.-hidrogén-karbonát** **6-8 pH**

HILIC

HILIC

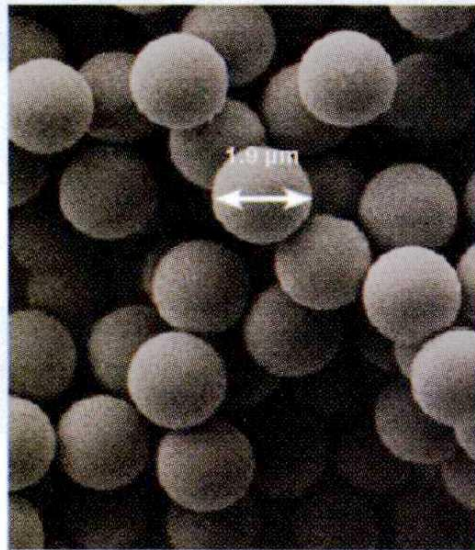


HILIC

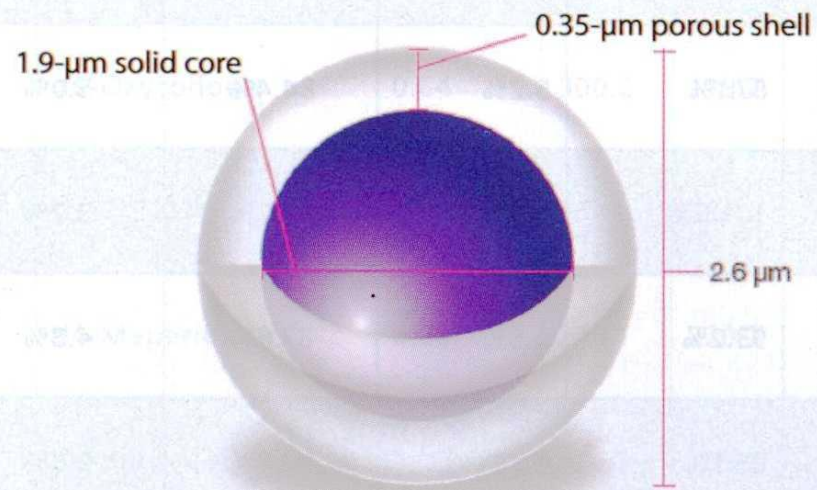
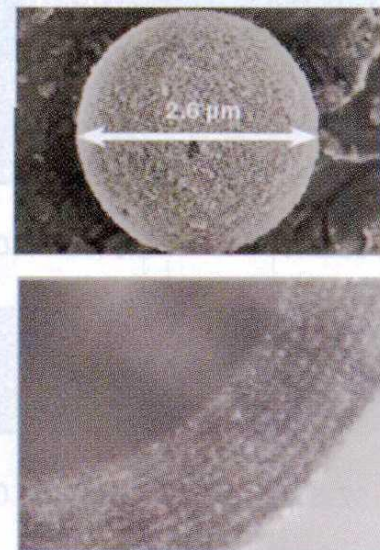


UHPLC

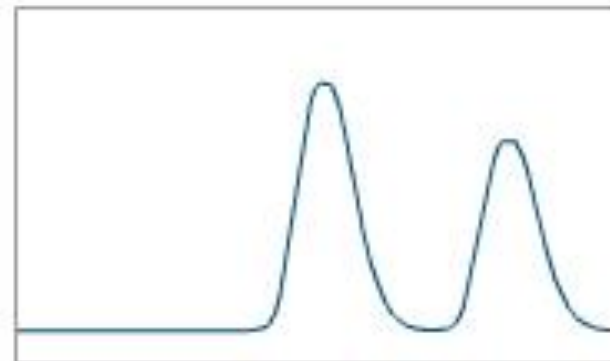
SEM of 1.9- μm nonporous solid-core particles



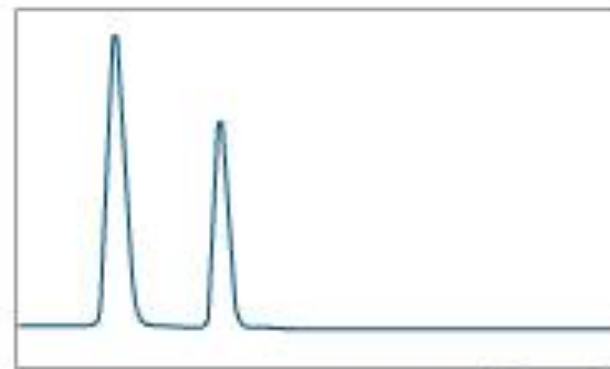
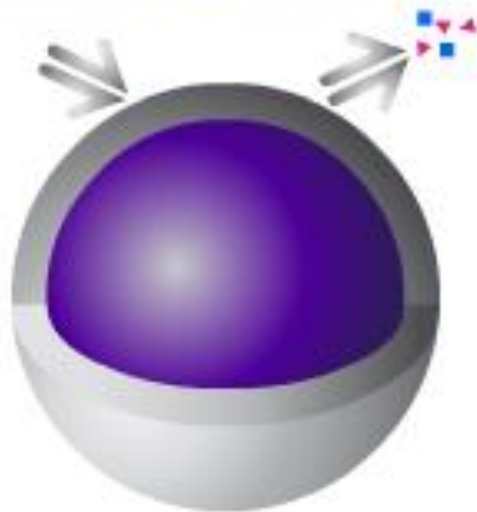
SEM of 2.6- μm core-shell particle



Traditional Diffusion Path



Optimized Diffusion Path

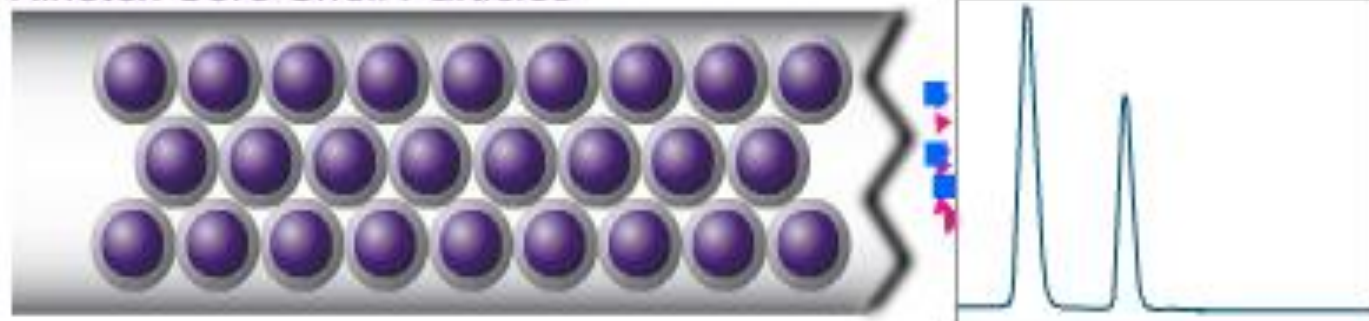


Replay

Reduced Eddy Diffusion

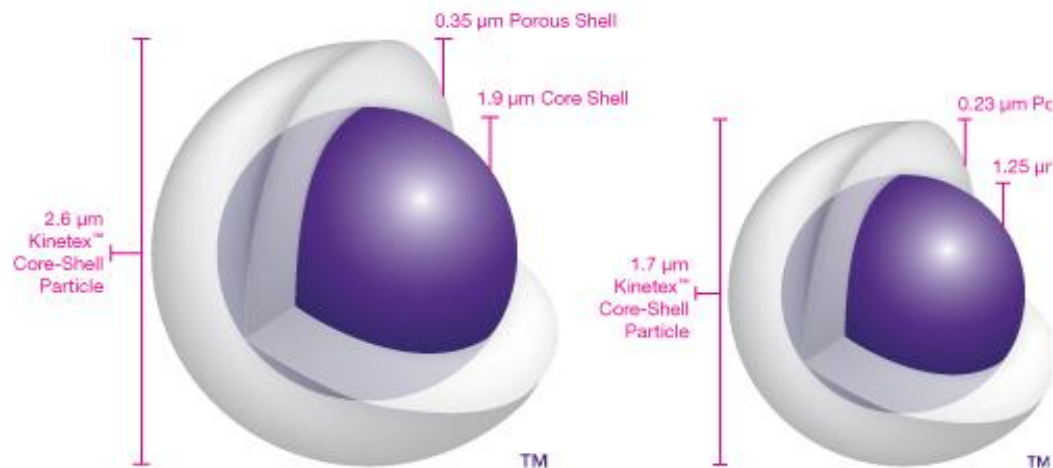
The extremely narrow particle size distribution of Kinetex® core-shell particles reduces the effects of Eddy Diffusion (multi-path effect- the A term of the van Deemter equation).

Kinetex Core-Shell Particles



Traditional Fully Porous Particles





Kinetex® 2.6 µm Core-Shell Particle

Kinetex® 1.7 µm Core-Shell Particle

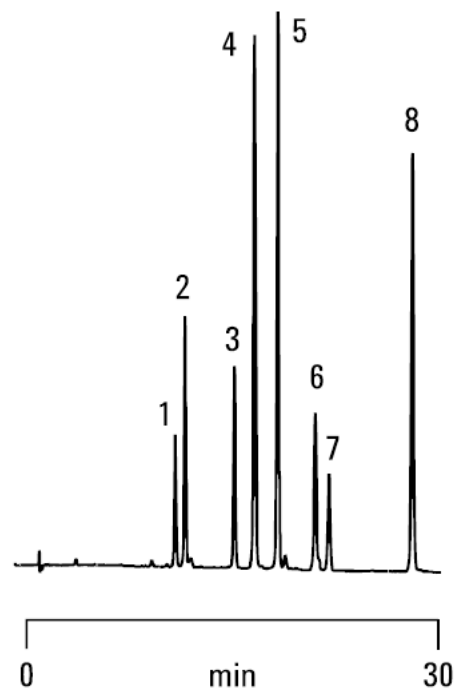
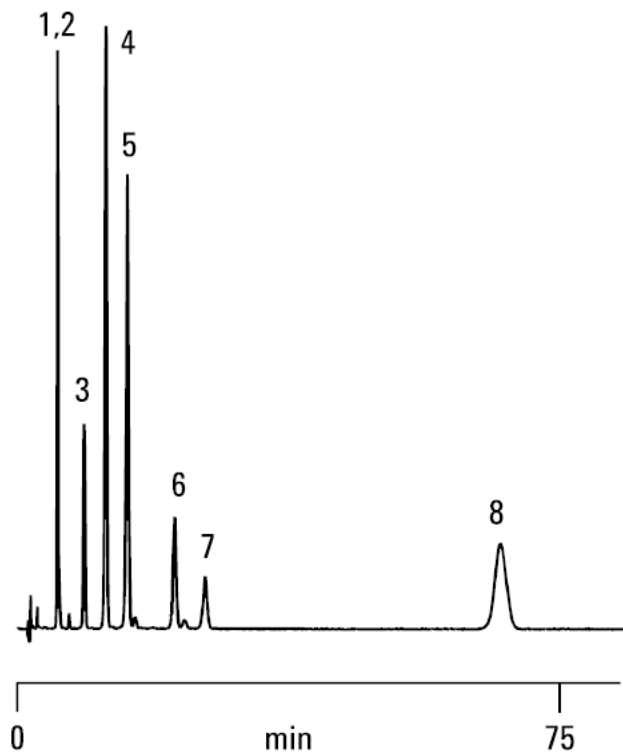
Material Characteristics

Packing Material	Total Particle Size (µm)	Porous Shell (µm)	Solid Core (µm)	Pore Size (Å)	Effective Surface Area (m ² /g)	Effective Carbon Load %	pH Stability	Pressure Stability
Kinetex C18	2.6	0.35	1.9	100	200	12	1.5 - 10**	1000/600 Bar*
Kinetex PFP	2.6	0.35	1.9	100	200	9	1.5 - 8.0	
Kinetex HILIC	2.6	0.35	1.9	100	200	0	2.0 - 7.5	
Kinetex C18	1.7	0.23	1.25	100	200	12	1.5 - 10**	1000 Bar
Kinetex PFP	1.7	0.23	1.25	100	200	9	1.5 - 8.0	
Kinetex HILIC	1.7	0.23	1.25	100	200	0	2.0 - 7.5	

* 2.1mm ID Kinetex columns are pressure stable up to 1000 Bar

**Kinetex C18 columns are pH stable 1.5-10 under isocratic conditions. Kinetex C18

Gradiens elúció



Peak Identification

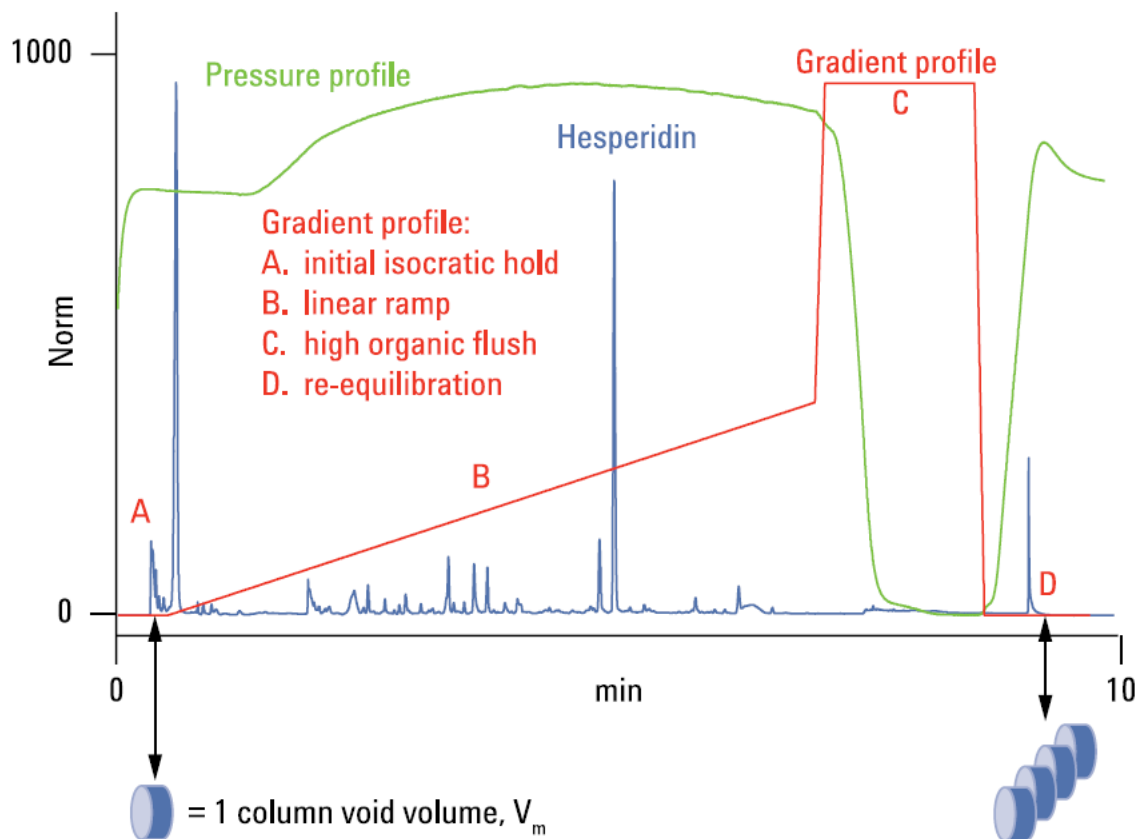
1. Tebuthiuron
2. Prometon
3. Prometryne
4. Atrazine
5. Bentazon
6. Propazine
7. Propanil
8. Metolachlor

Conditions

Column: ZORBAX SB-C8
 4.6 x 150 mm, 5 μ m

Mobile phase:
 A: H₂O with 0.1% TFA, pH 2
 B: Acetonitrile

Flow rate: 1.0 mL/min



Time	%B	mL/min
0	0	0.8
0.5	0	0.8
7	40	0.8
7.1	100	0.8
8.6	100	0.8
8.7	0	0.8
10	0	0.8

Conditions

LC:

Agilent 1290 Infinity
with DAD

Column:

Agilent RRHD SB-C18
2.1 x 150 mm, 1.8 μ m
PN 859700-902

Injection :

1 μ L of 0.2 μ m filtered
grapefruit juice

Temperature:

40 $^{\circ}$ C

Detection:

UV, 276 nm

Solvent A:

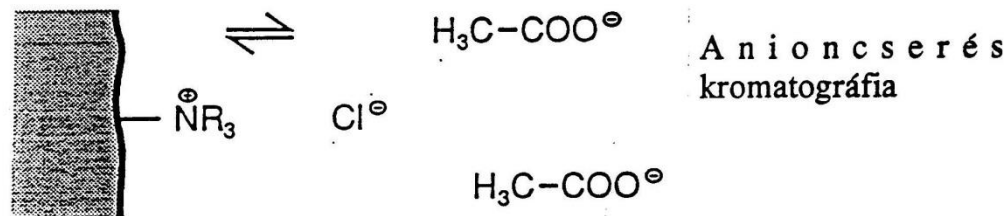
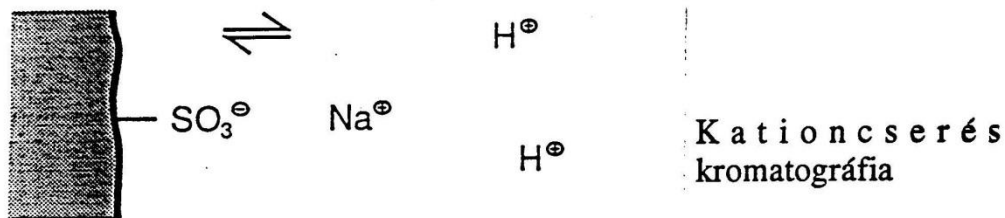
Water

Solvent B:

Acetonitrile

IONCSERÉLŐ KROMATOGRÁFIA

Ioncserés kromatográfia:



mechanizmus:

a visszatartás és elválasztás azért jön létre, hogy az eluensben lévő ionok különböző erősségű reverzibilis ionos kötést tudnak létrehozni az álló fázis töltött részeivel.

álló fázis:

kationcserélő	-erős	$-\text{SO}_3^-$
	-gyenge	$-\text{COO}^-$
anioncserélő	-erős	$-\text{NR}_3^+$
	-gyenge	$-\text{NHR}_2^+$

mozgó fázis:

vízés pufferek

alkalmazás:

ionos formájú anyagok elválasztására

- szervetlen ionok
- szerves savak, szerves bázisok
- fehérjék
- nukleinsavak

Ioncserélő állófázisok 1.

- Kationcserélők

- erős $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$

- gyenge $-\text{COO}^- \text{H}^+$

- Anioncserélők

- erős $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{OH}^-$

- gyenge $-\text{N}^+\text{H}_3 \text{OH}^-$

Ioncserélő állófázisok 2.

- divinil-benzol gyöngy kopolimer alap
 - módosított szilikagél alap
 - polisztirol alap
 - polimetil-metakrilát alap
-
- Porózus, pórusméret 2-40 nm
 - Héjszerkezetű HPIC

Eluensek

- **Kationok meghatározásához**
 - híg HCl (0,01M)
- **Anionok méréséhez**
 - híg NaHCO₃, Na₂CO₃, KOH
- **VEZETŐKÉPESSÉGI DETEKTÁLÁS!**

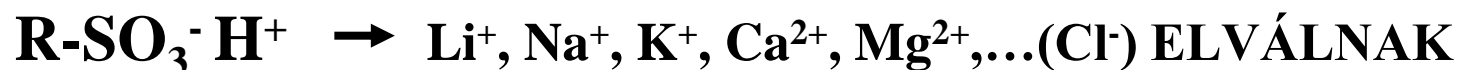
Ioncsere-ionkromatográfia

- **Döntő az állófázis ioncserélő kapacitása**
 - **Teljes ioncsere:** nagy ioncserélő kapacitás
 - 2-10 mgeq/g
 - **Ionkromatográfia:** kis ioncserélő kapacitás
 - 0,1-0,2 mgeq/g
- **Megvalósítás**
 - Kiszorításos módszer
 - **Elúciós módszer**

- Kétkolonnás elválasztás, ionelnyomó kolonna (supressor): nagy ioncserélő kapacitás!
 - kémiai
 - elektrokémiai
- Egykolonnás elválasztás

Kationok elválasztása erős kationcserélőn

- **Állófázis: kis kapacitású szulfonsavas**
- **Mozgófázis: 0,01M HCl**
- **Minta: Li⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺,...(Cl⁻)**



- **Supressor: nagy kapacitású anioncserélő kvaterner amin**



Anionok elválasztása

- **Állófázis: kis kapacitású kvaterner amin**
- **Mozgófázis: 0,01M NaHCO₃, Na²CO₃, KOH**
- **Minta: F⁻, Cl⁻, Br⁻, NO²⁻, NO³⁻, HPO₄²⁻, SO₄²⁻, I⁻, ClO₄⁻, BrO₃⁻**

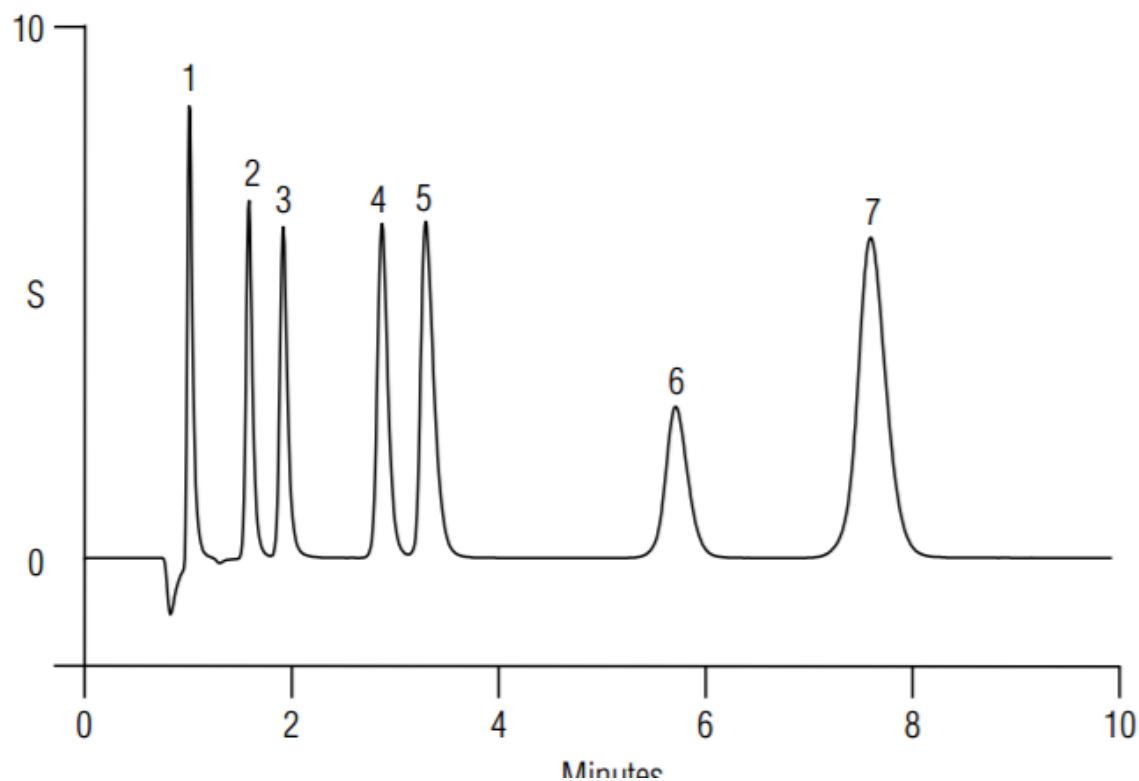


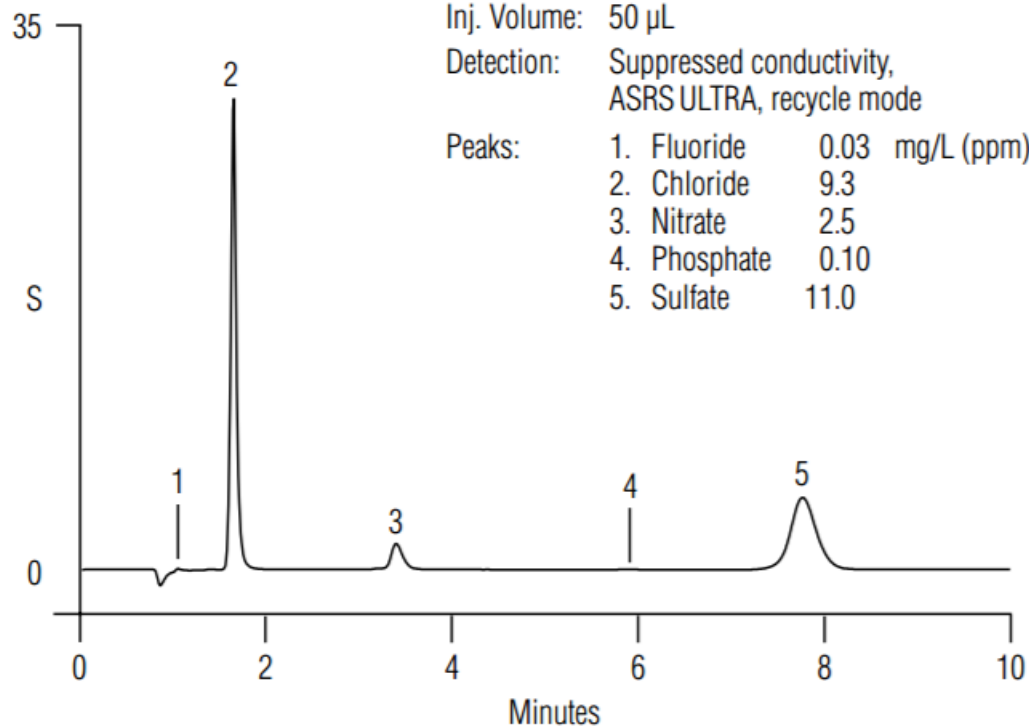
- **Supressor: nagy kapacitású kationcserélő**



Column: IonPac AG4A-SC, AS4A-SC
Eluent: 1.7 mM sodium bicarbonate/
1.8 mM sodium carbonate
Flow Rate: 2.0 mL/min
Inj. Volume: 50 μ L
Detection: Suppressed conductivity,
ASRS ULTRA recycle mode

Peaks:		
1. Fluoride	2	mg/L (ppm)
2. Chloride	3	
3. Nitrite	5	
4. Bromide	10	
5. Nitrate	10	
6. Phosphate	15	
7. Sulfate	15	





Column: IonPac AG4A-SC, AS4A-SC,
 Eluent: 1.7 mM sodium bicarbonate/
 1.8 mM sodium carbonate
 Flow Rate: 2.0 mL/min
 Inj. Volume: 50 μ L
 Detection: Suppressed conductivity,
 ASRS ULTRA, recycle mode
 Peaks: 1. Fluoride 0.03 mg/L (ppm)
 2. Chloride 9.3
 3. Nitrate 2.5
 4. Phosphate 0.10
 5. Sulfate 11.0

Columns: IonPac AG4A-SC, 4 \times 50 mm
 (P/N 43175)
 IonPac AS4A-SC, 4 \times 250 mm
 (P/N 43174)
 Eluent: 1.8 mM sodium carbonate/
 1.7 mM sodium bicarbonate
 Run Time: <8 min
 Flow Rate: 2.0 mL/min
 Injection Volume: 50 μ L
 Detection: Suppressed conductivity, ASRS[®]
 ULTRA, 4 mm, in recycle mode,
 50 mA current
 System
 Backpressure: ~1000 psi
 Background
 Conductance: ~14 μ S

Ionmozgékonyyságok

Kation	$\lambda_+ / (\Omega^{-1}\text{cm}^2 \text{mol}^{-1})$	Anion	$\lambda_- / (\Omega^{-1}\text{cm}^2 \text{mol}^{-1})$
H ⁺	350	OH ⁻	199
Li ⁺	39	F ⁻	55
Na ⁺	50	Cl ⁻	76
K ⁺	74	Br ⁻	78
Ag ⁺	62	J ⁻	77
Mg ²⁺	106	NO ₃ ⁻	71
Ca ²⁺	119	SO ₄ ²⁻	158

A supressor kolonnát regenerálni kell!

- Kationcserélőt tömény kénsavval
- Anioncserélőt tömény nátronlúggal

Egykolonnás elválasztás

- Eluens: gyenge elektrolitok
 - benzooesav
 - citromsav
 - o-ftálsav
 - bórsav
 - glukonsav
 - stb.

Egykolonnás elválasztás

Column: Waters IC Pak A/HR

Eluent: Borate / Gluconate

Back Cond: 240 μ S

Flow Rate: 1 mL/min

Inj Volume: 100 μ L

1 Fluoride = 1 ppm

2 Bicarbonate

3 Chloride = 2

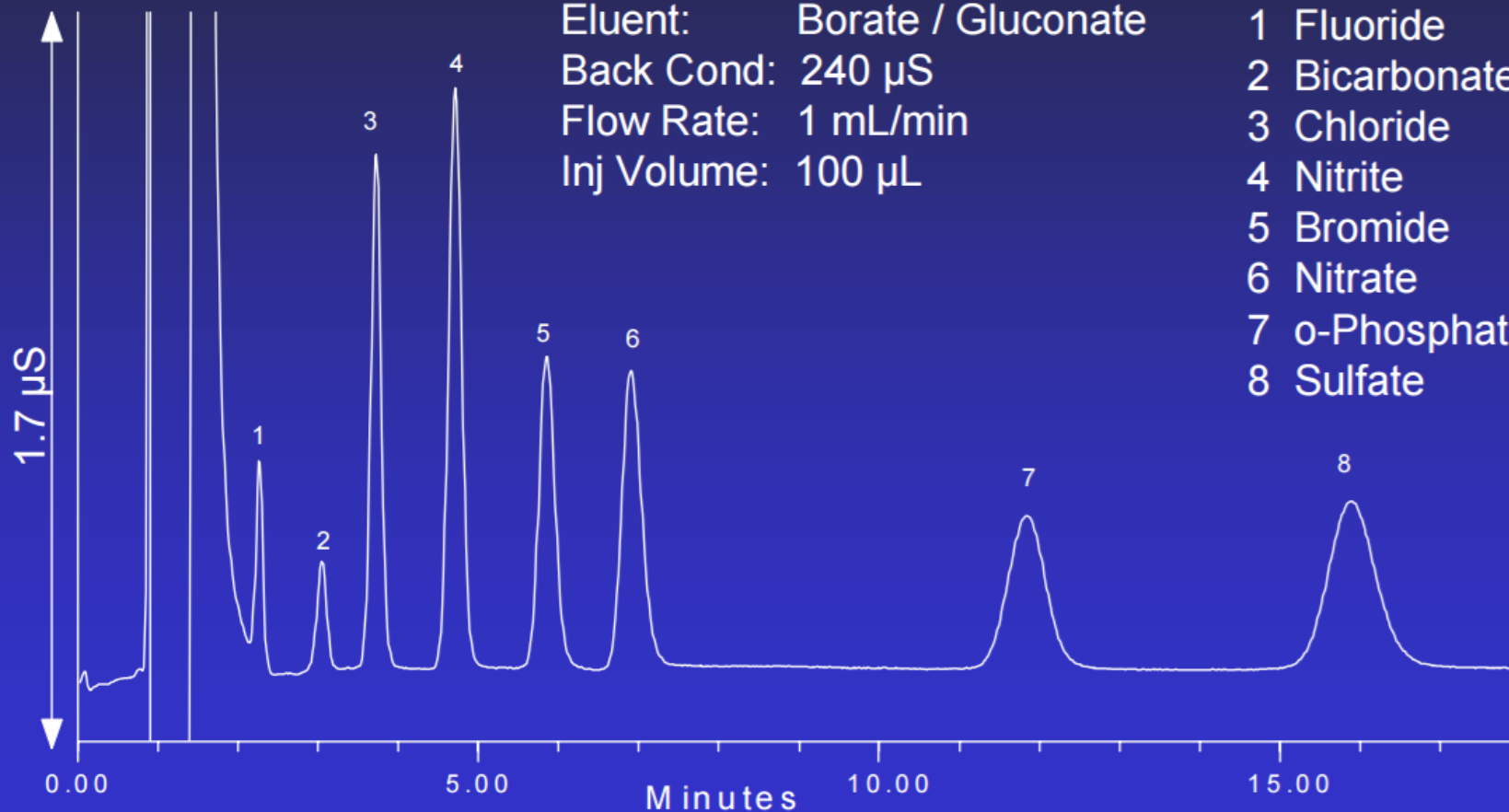
4 Nitrite = 4

5 Bromide = 4

6 Nitrate = 4

7 o-Phosphate = 6

8 Sulfate = 4



Slide #

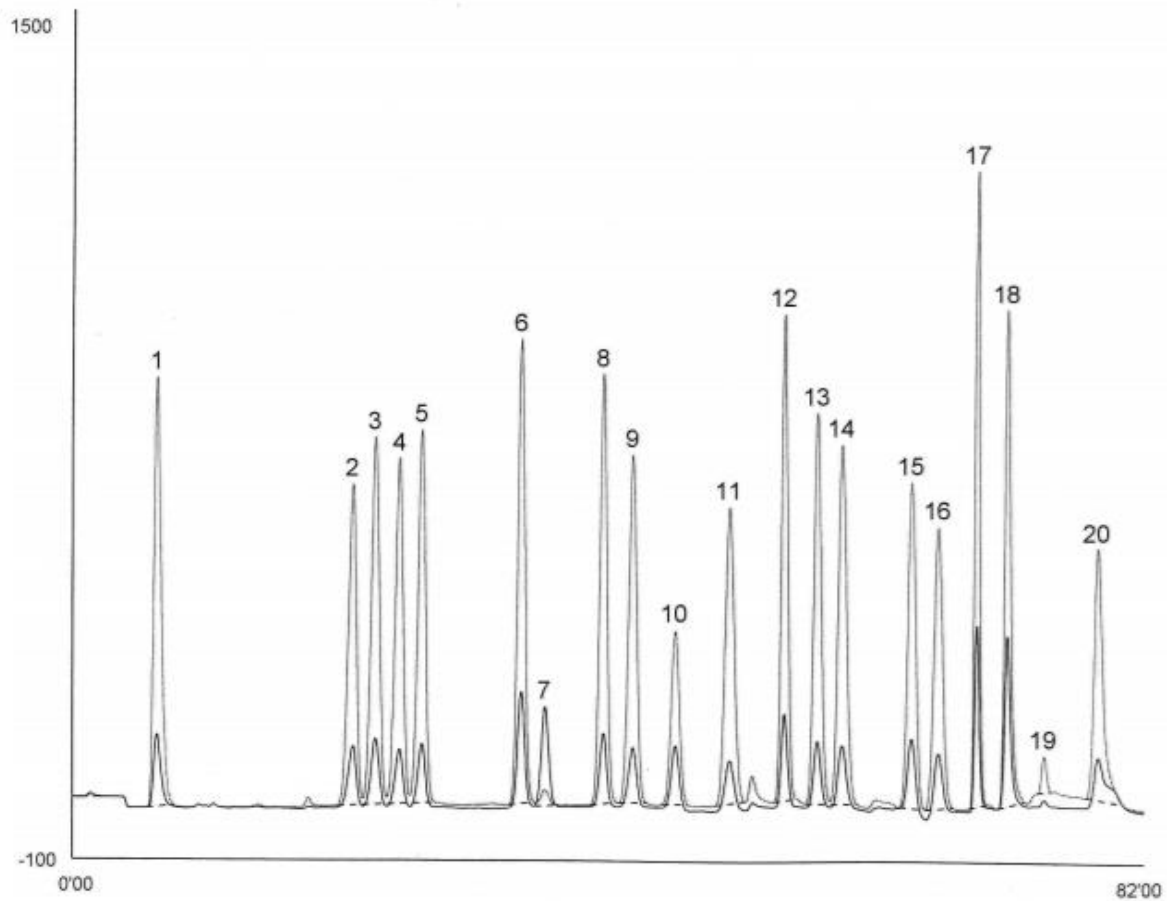
Gyenge ioncserélők pH függése

- Az ioncserélő kapacitás pH függő!
 - gyenge kationcserélő
 - gyenge anioncserélő töltetek esetén

- Erős ioncserélők kapacitása független a pH-tól!

Gyakorlati alkalmazások:

- Főként anionok elválasztása
- Aminosavak savas közegben kationos elválasztása

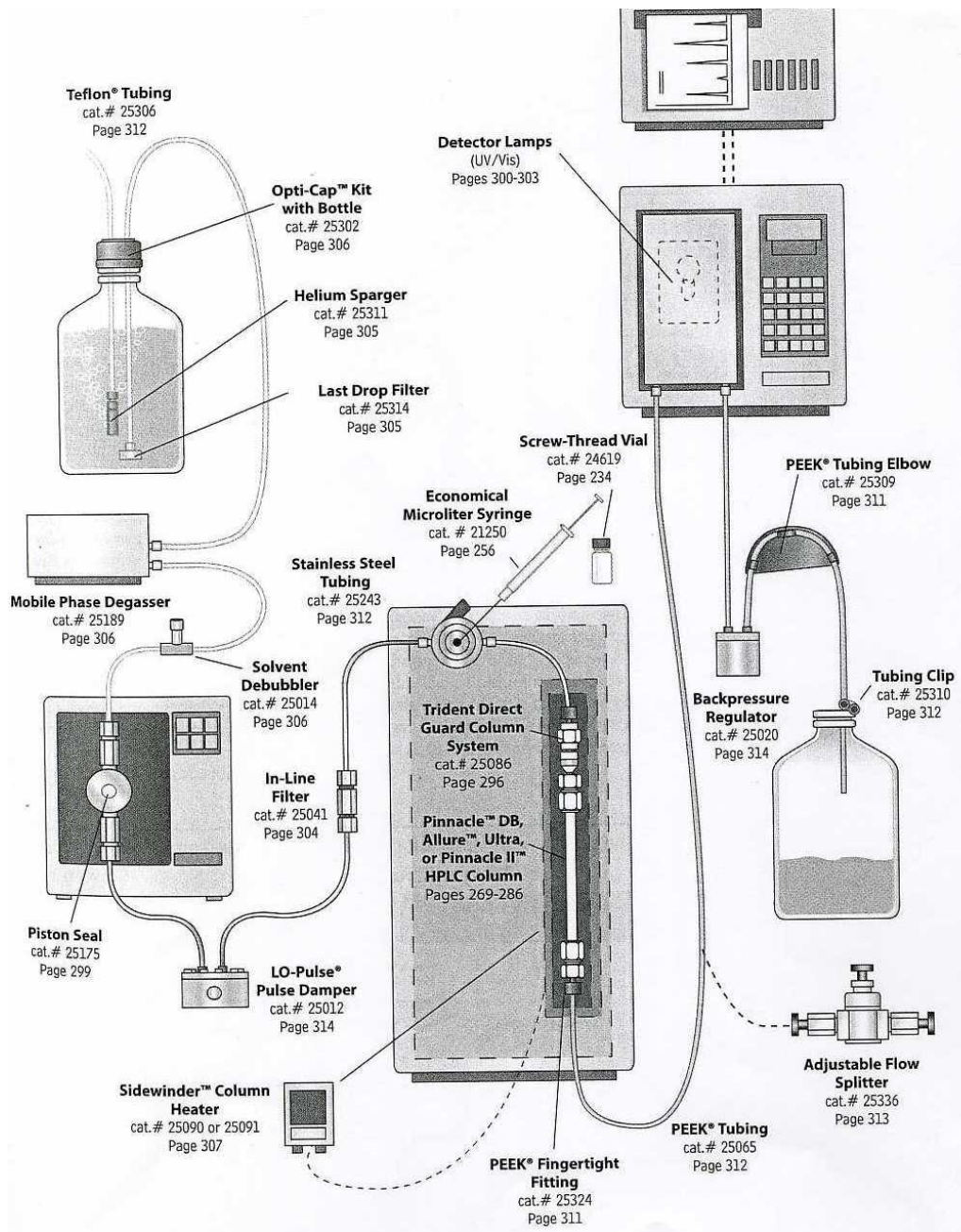


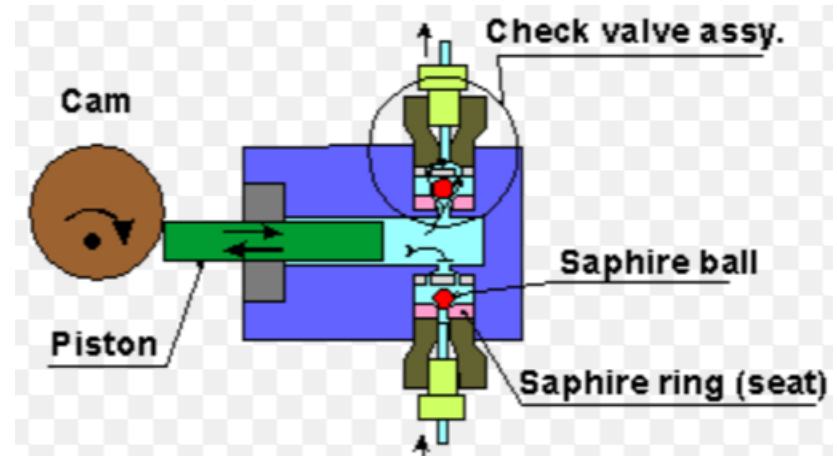
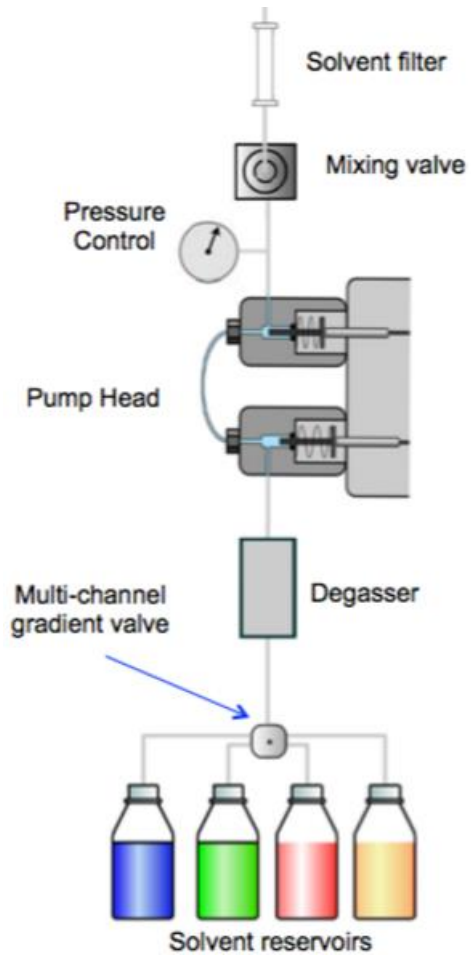
on the chromatogram are: 1. cysteic acid, 2. methionine sulphone, 3. Asp, 4. Thr, 5. Ser, 6. Glu, 7. Pro, 8. Gly, 9. Ala, 10. Cys, 11. Val, 12. Met, 13. Ile, 14. Leu, 15. Tyr, 16. Phe, 17. His, 18. Lys, 19. NH₃, 20. Arg.

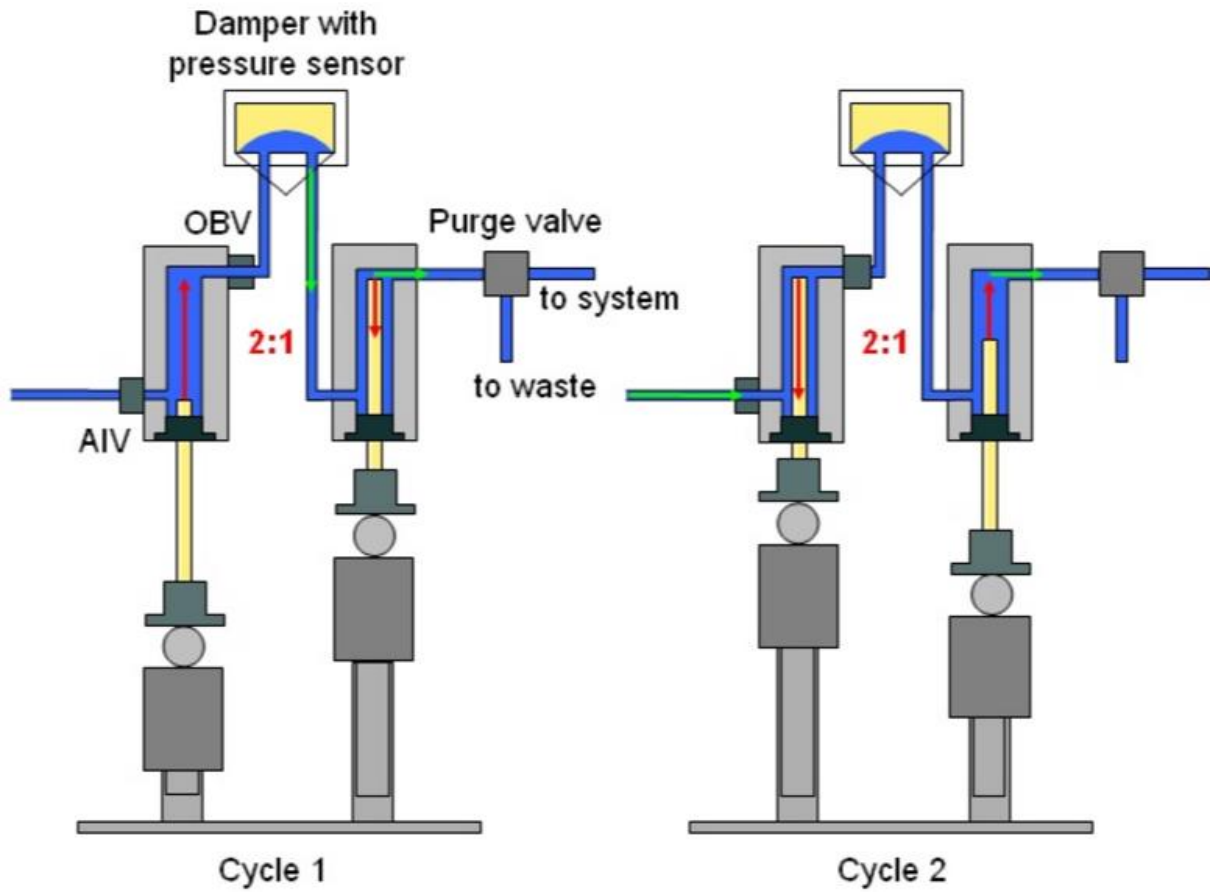
Kiszorításos ioncserés elválasztások

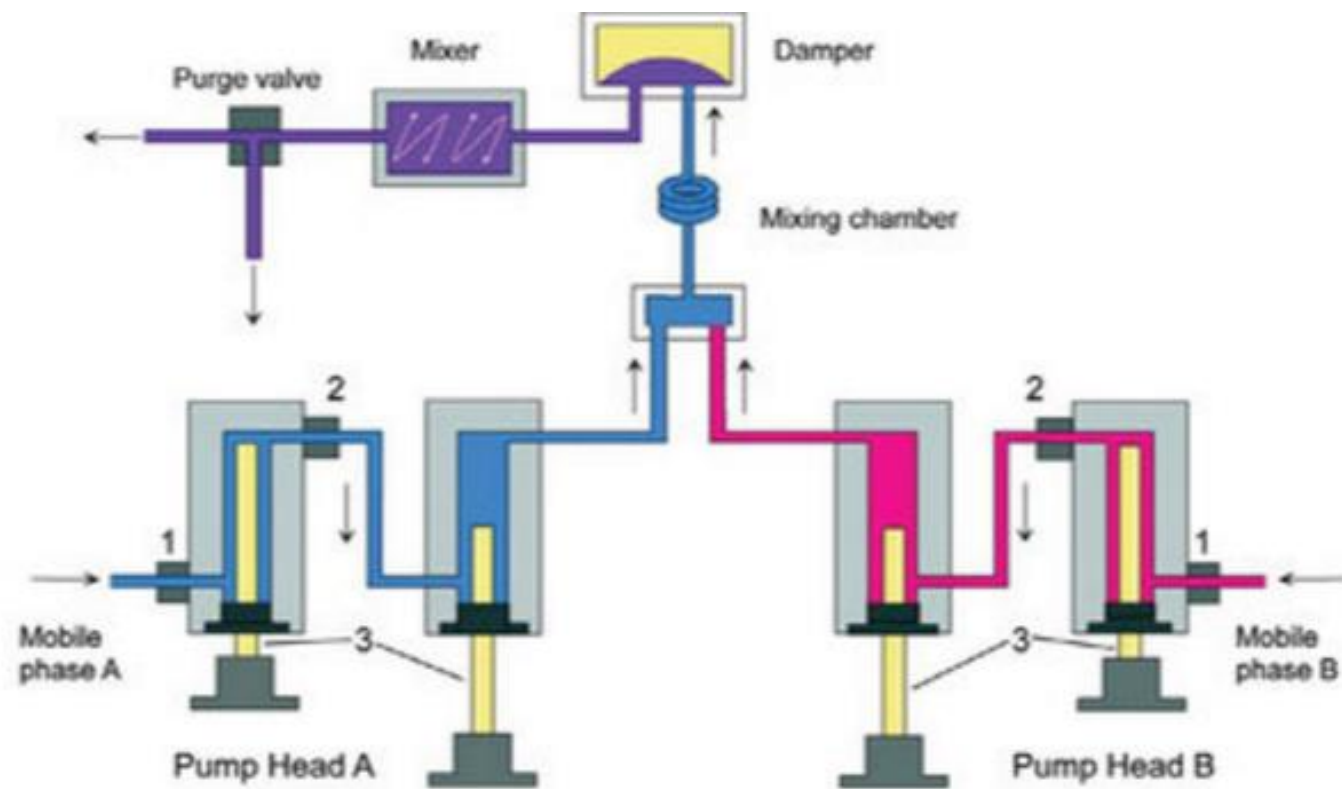
HPLC készülékek felépítése

- Eluens szállítás,
- Mintabevitel
- Elválasztó kolonna
- Detektor
- adatfeldolgozás



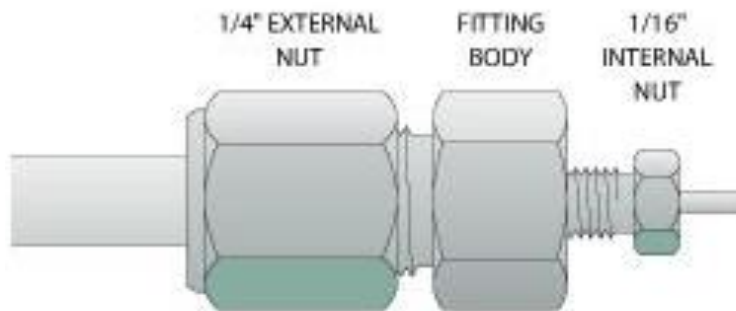




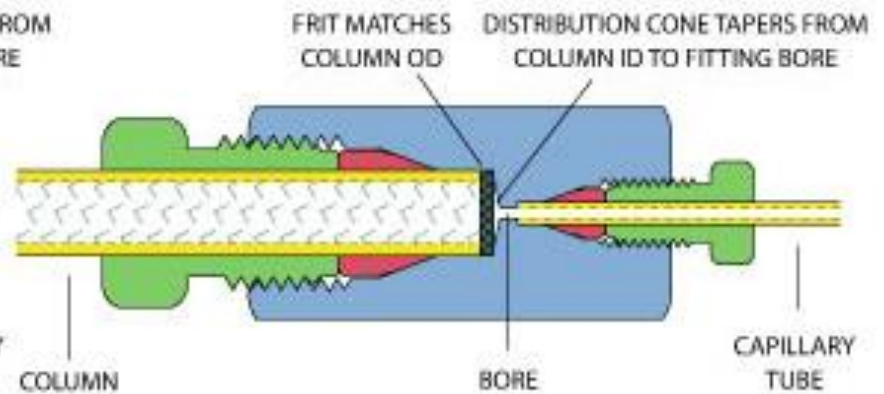
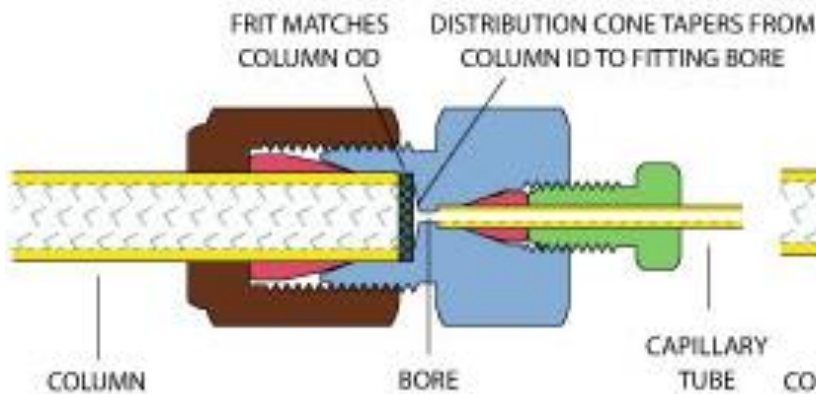


Kolonnák: töltés, csatlakozások

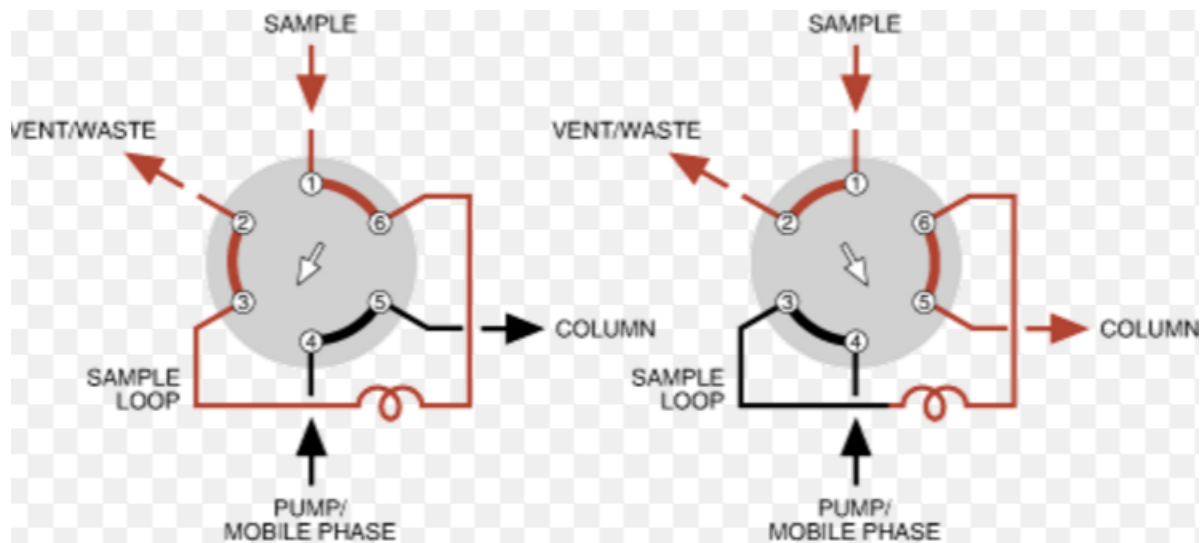
EXTERNAL COLUMN END FITTING



INTERNAL COLUMN END FITTING



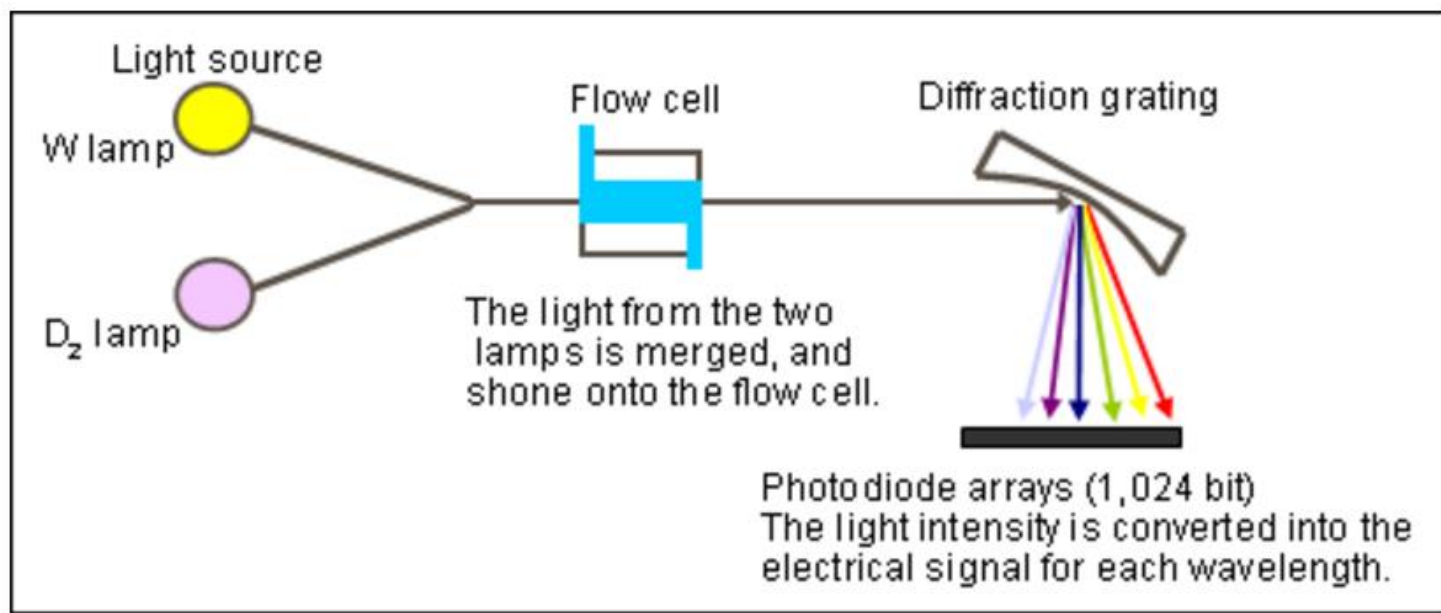
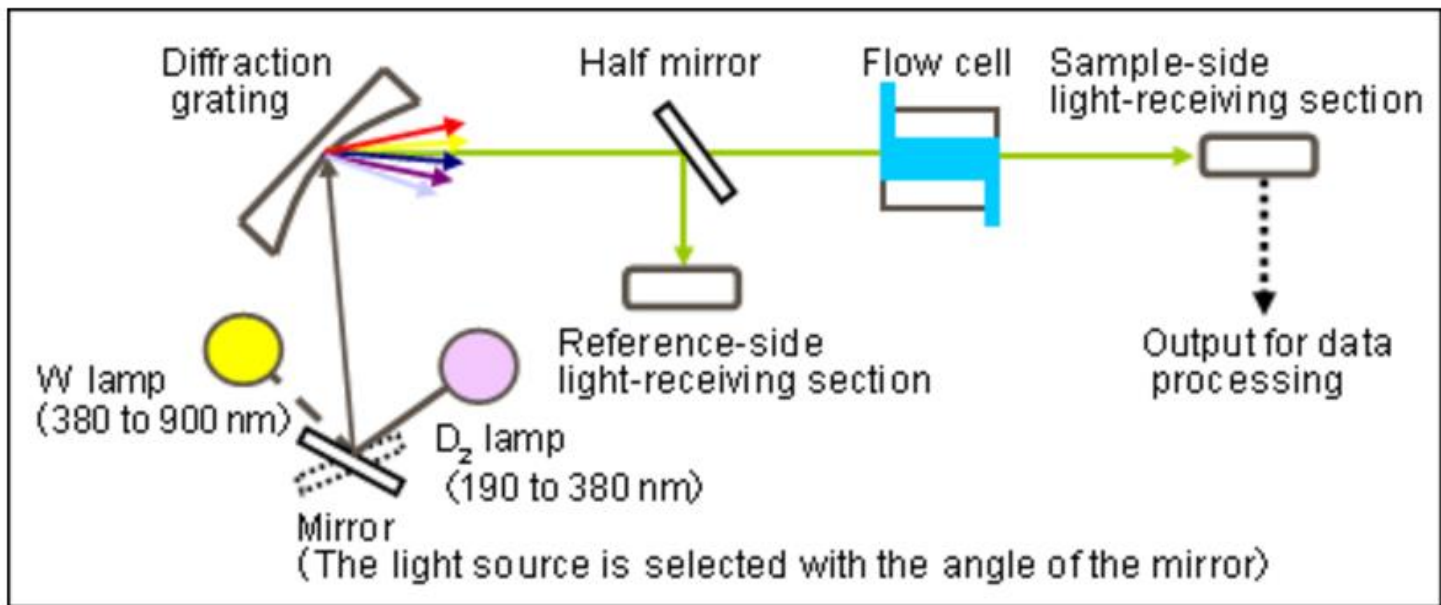
Mintabevitel: manuális, automatikus

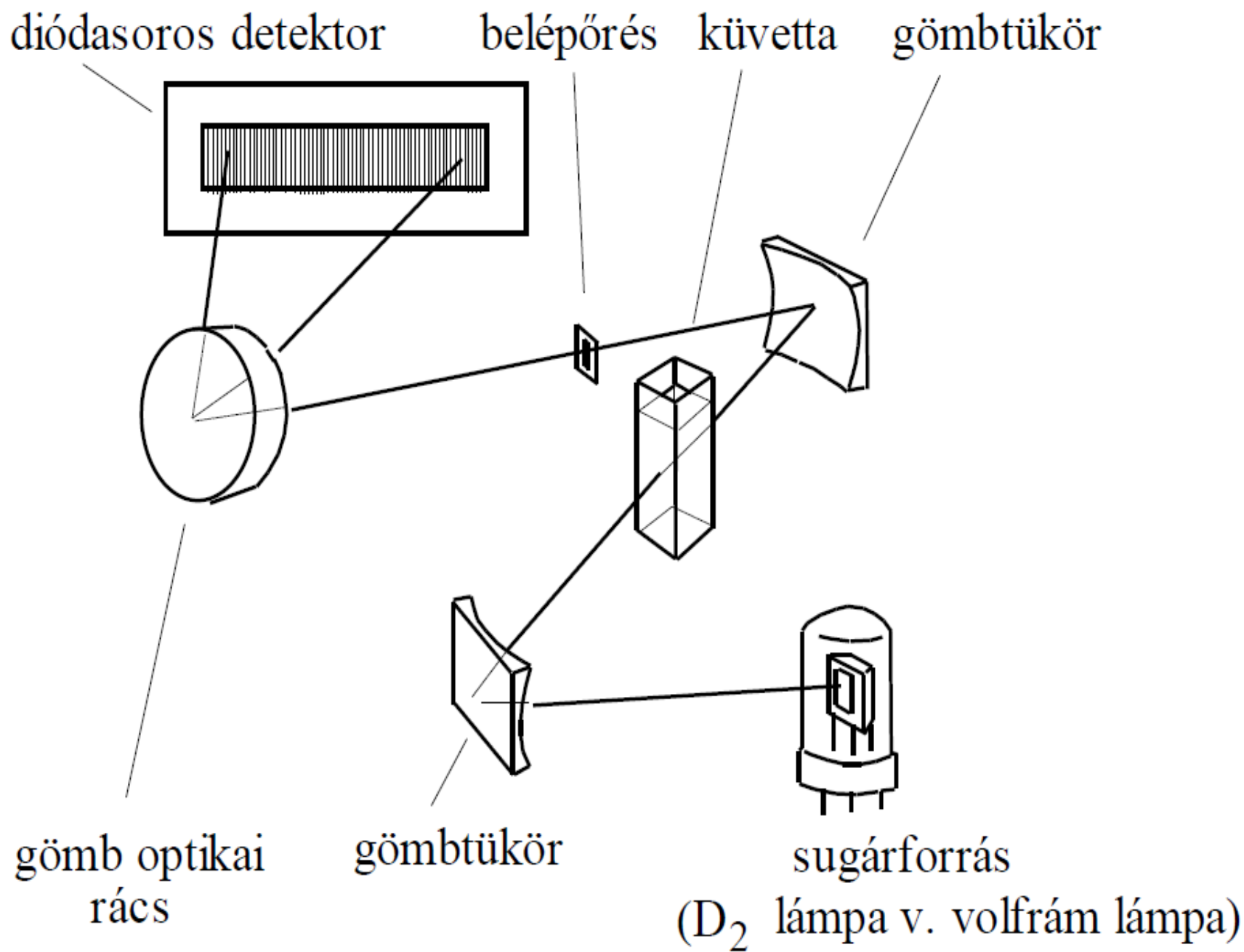


Detektorok

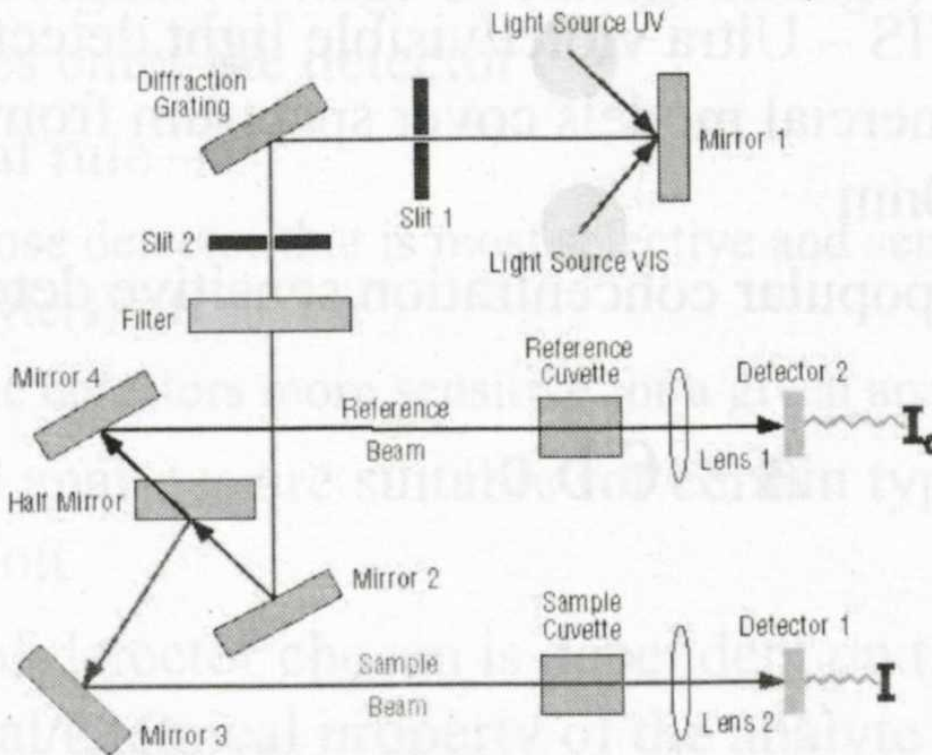


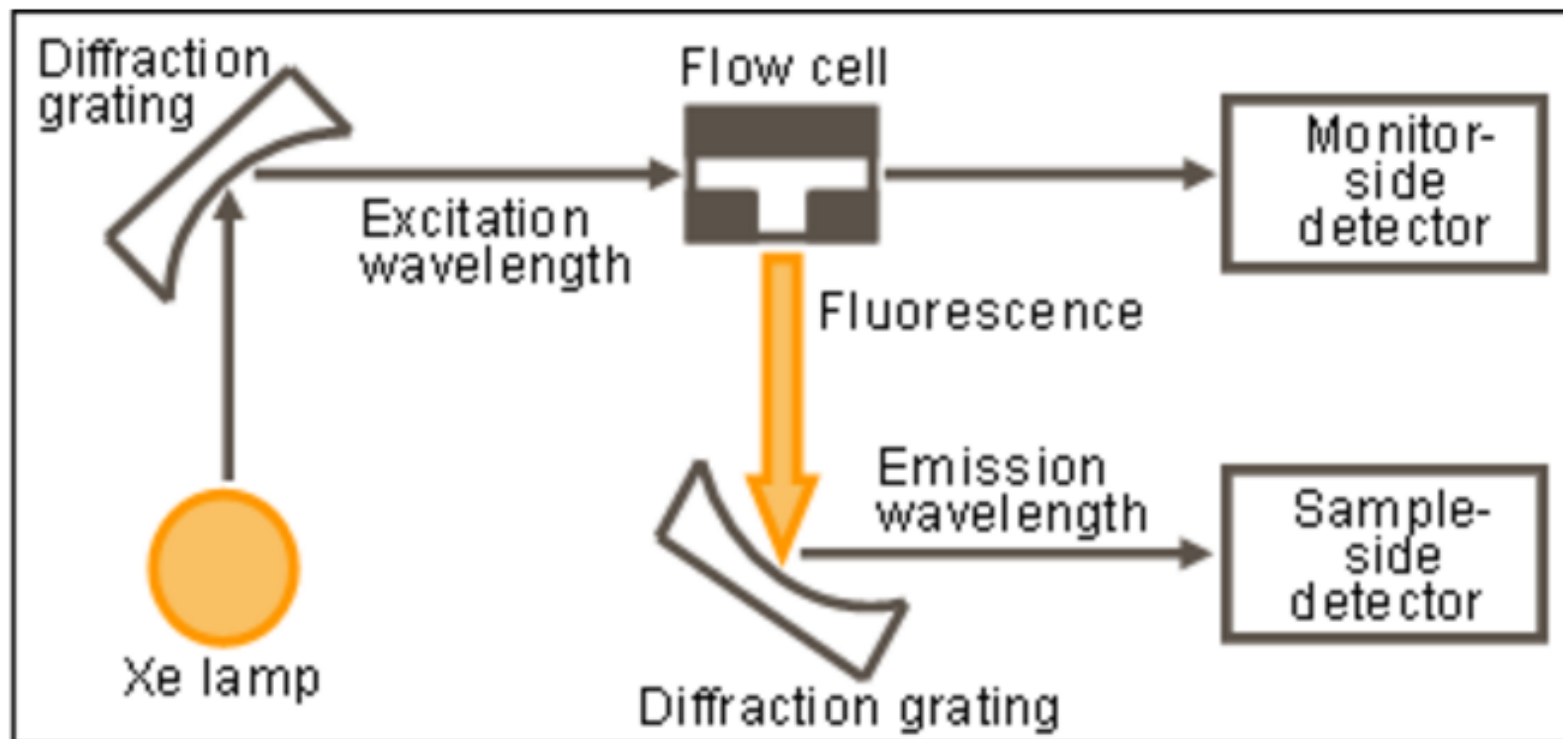
HPLC detector	Commercially available	Mass LOD (commercial)	Mass LOD (state of the art)
Absorbance	Yes	100pg-1ng	1pg
Fluorescence	Yes	1-10 pg	10fg
Electrochemical	Yes	10pg-1ng	100fg
Refractive index	Yes	100ng-1μg	10ng
Conductivity	Yes	500pg-1ng	500ng
Mass spectrometry	Yes	100pg-1ng	1pg
FT-IR	Yes	1μg	100ng
Light scattering	Yes	10μg	500ng
Optical activity	No	-	1ng
Element selective	No	-	10ng
Photoionisation	No	-	1pg-1ng

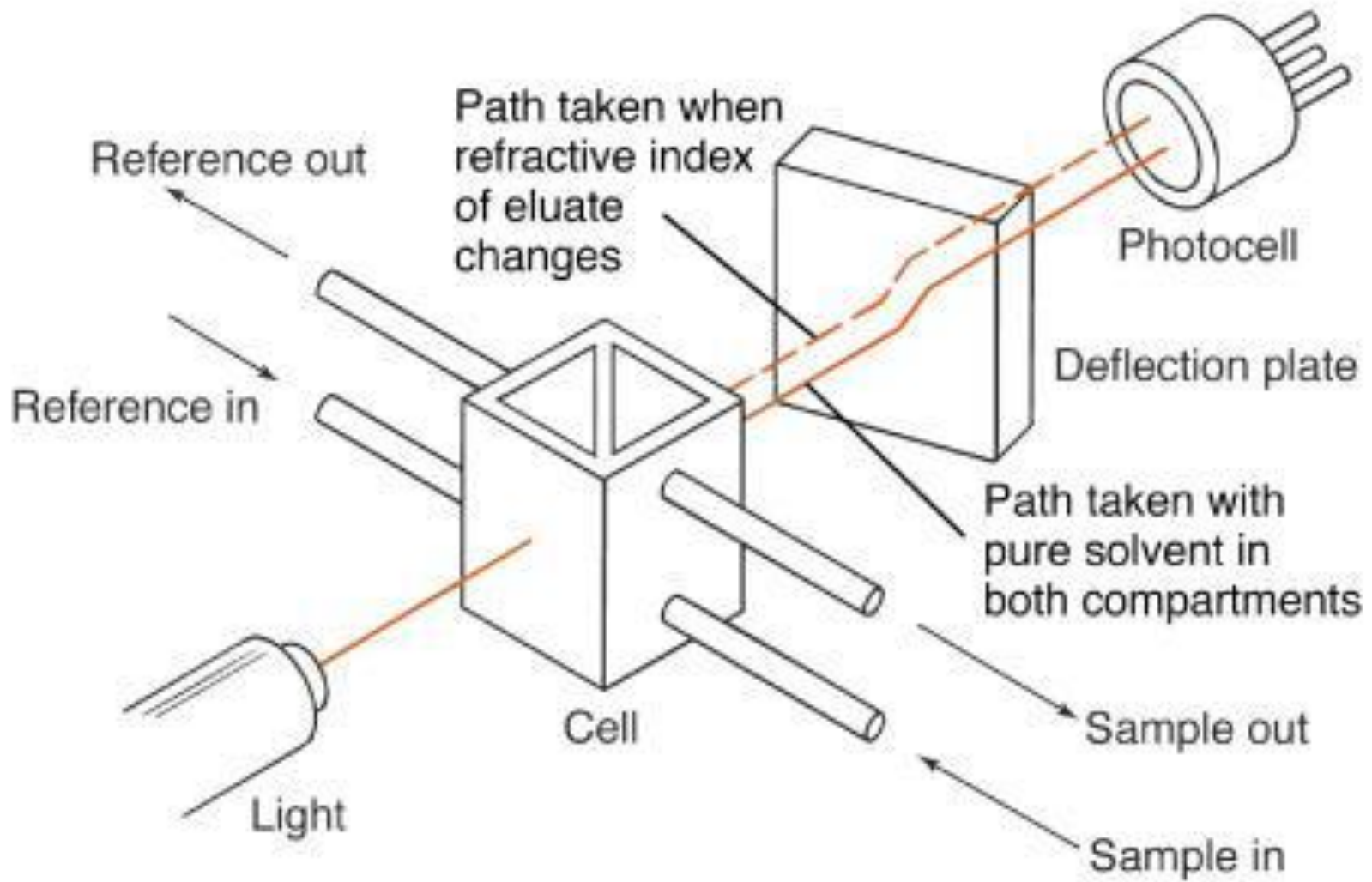




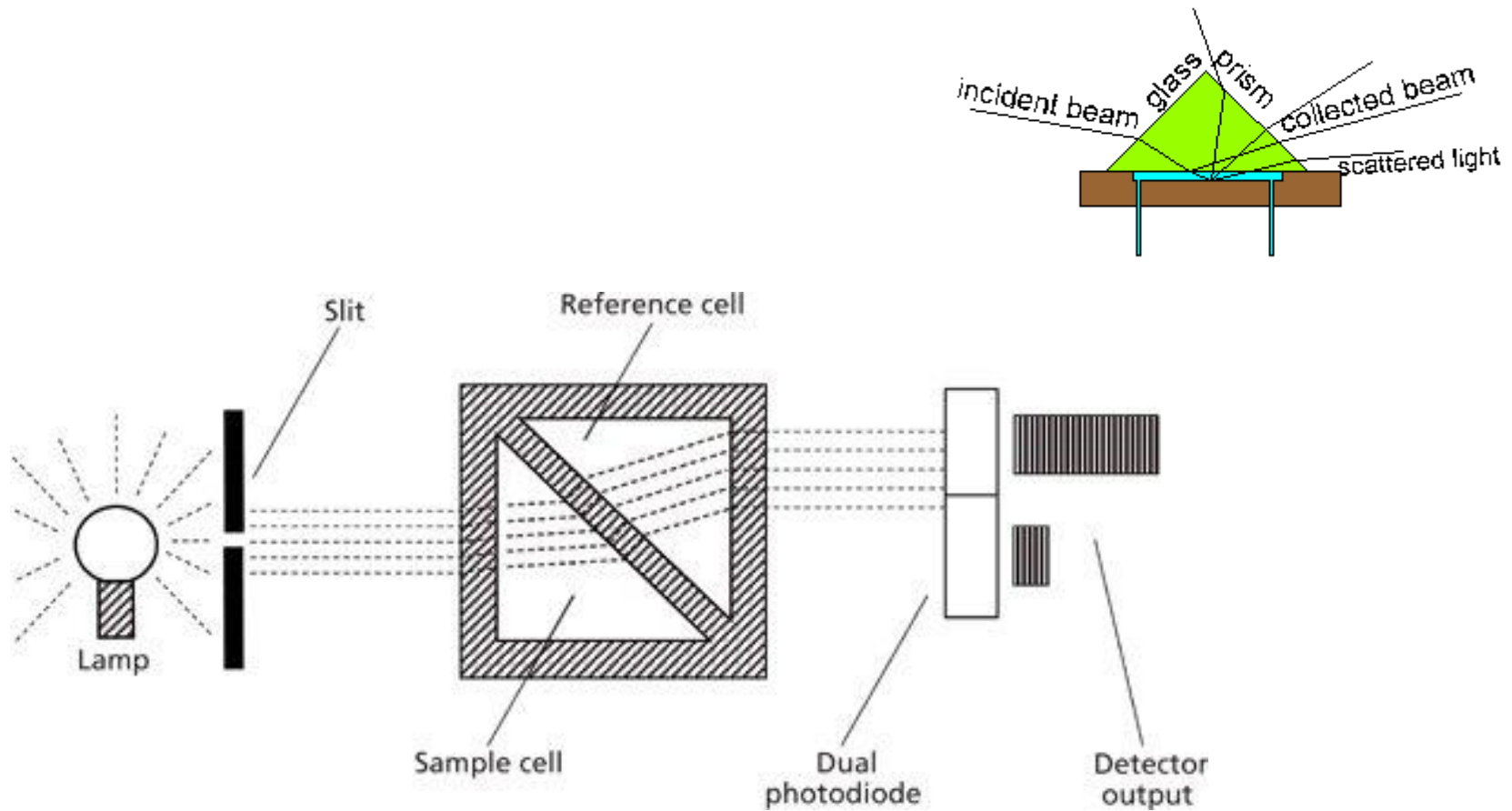
UV/Vis Detector – Dual Beam



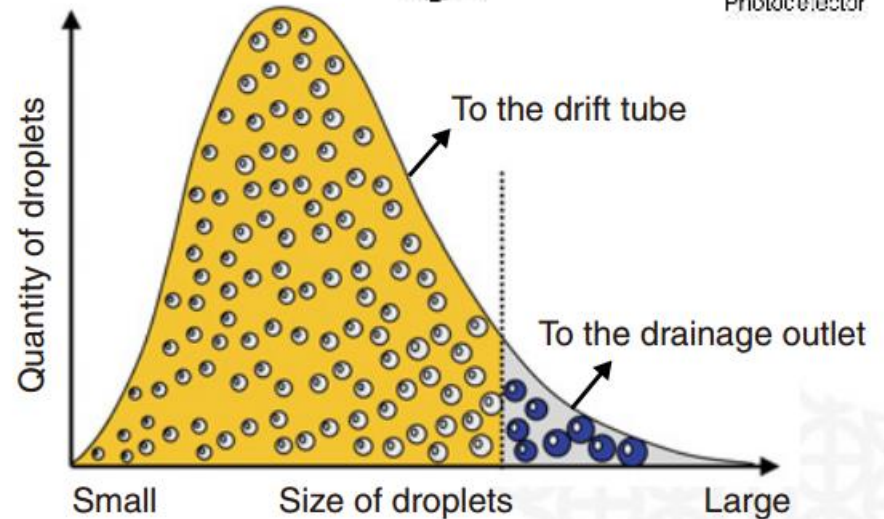
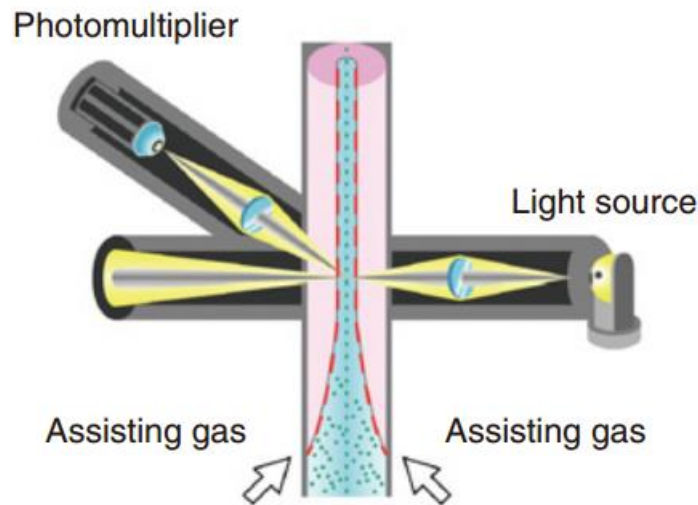
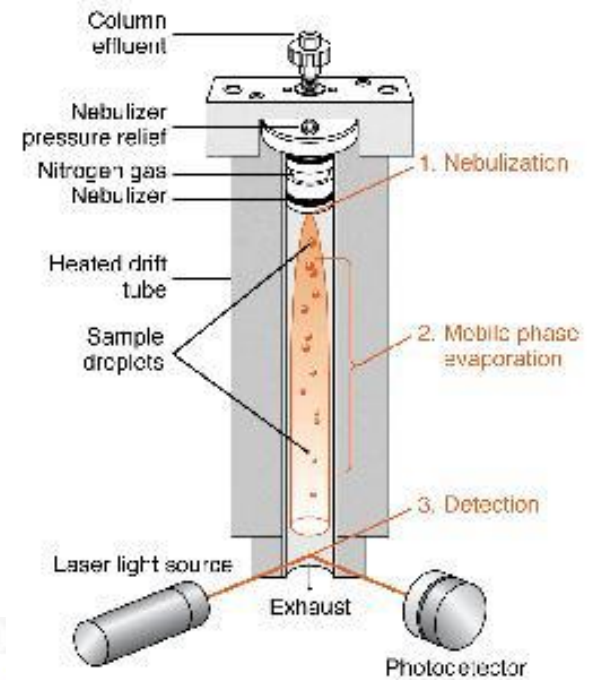
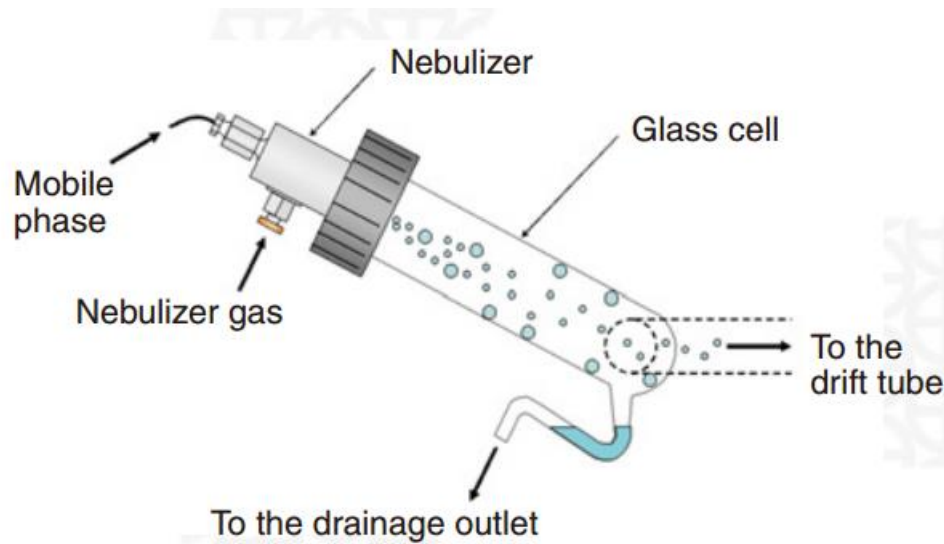




RI detektor: törésmutató mérés



ELSD: evaporating light scattering detector



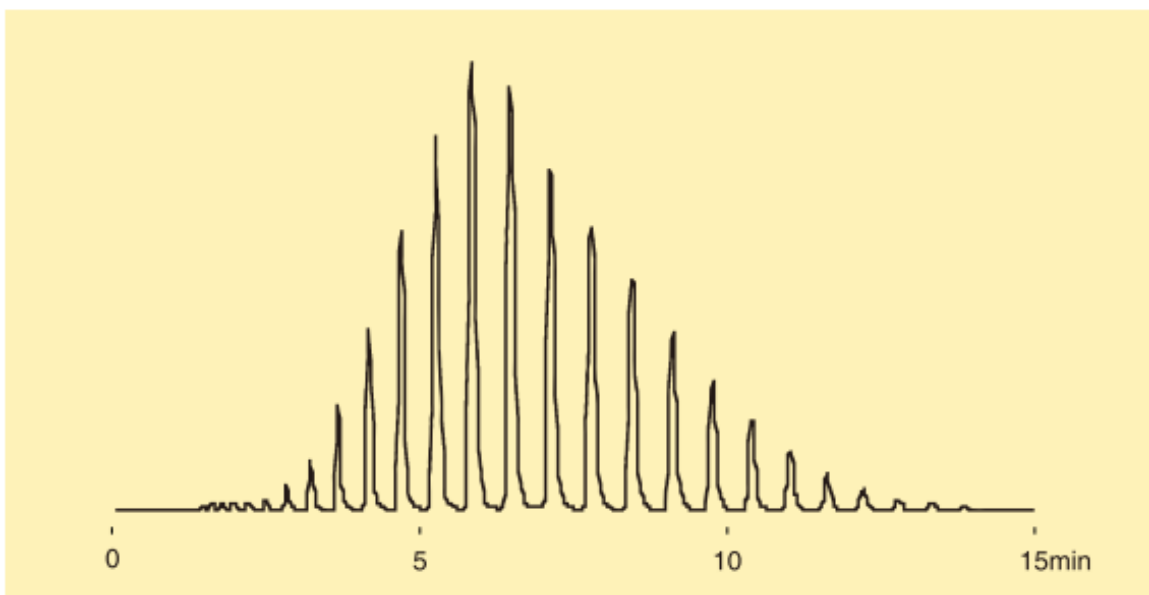
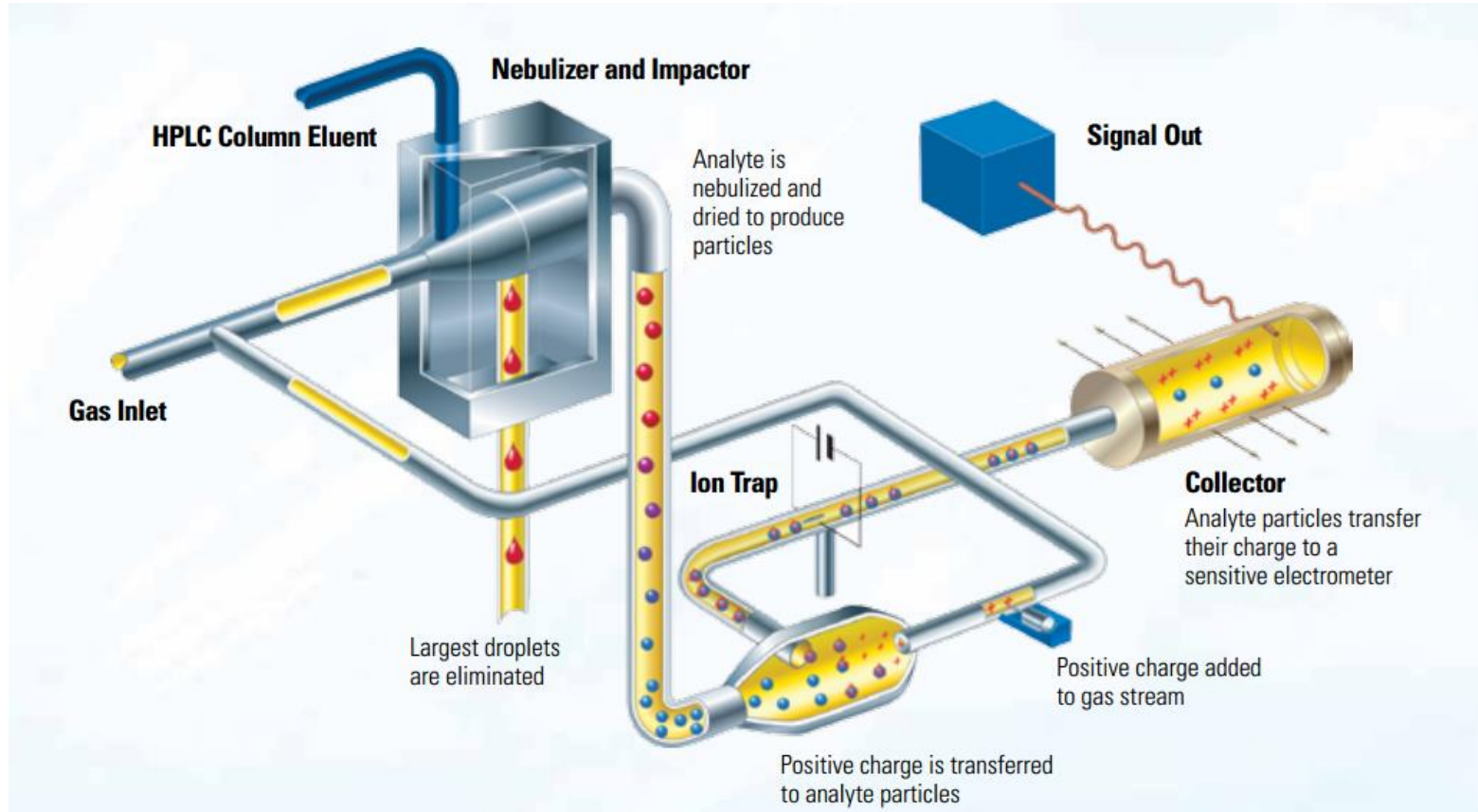


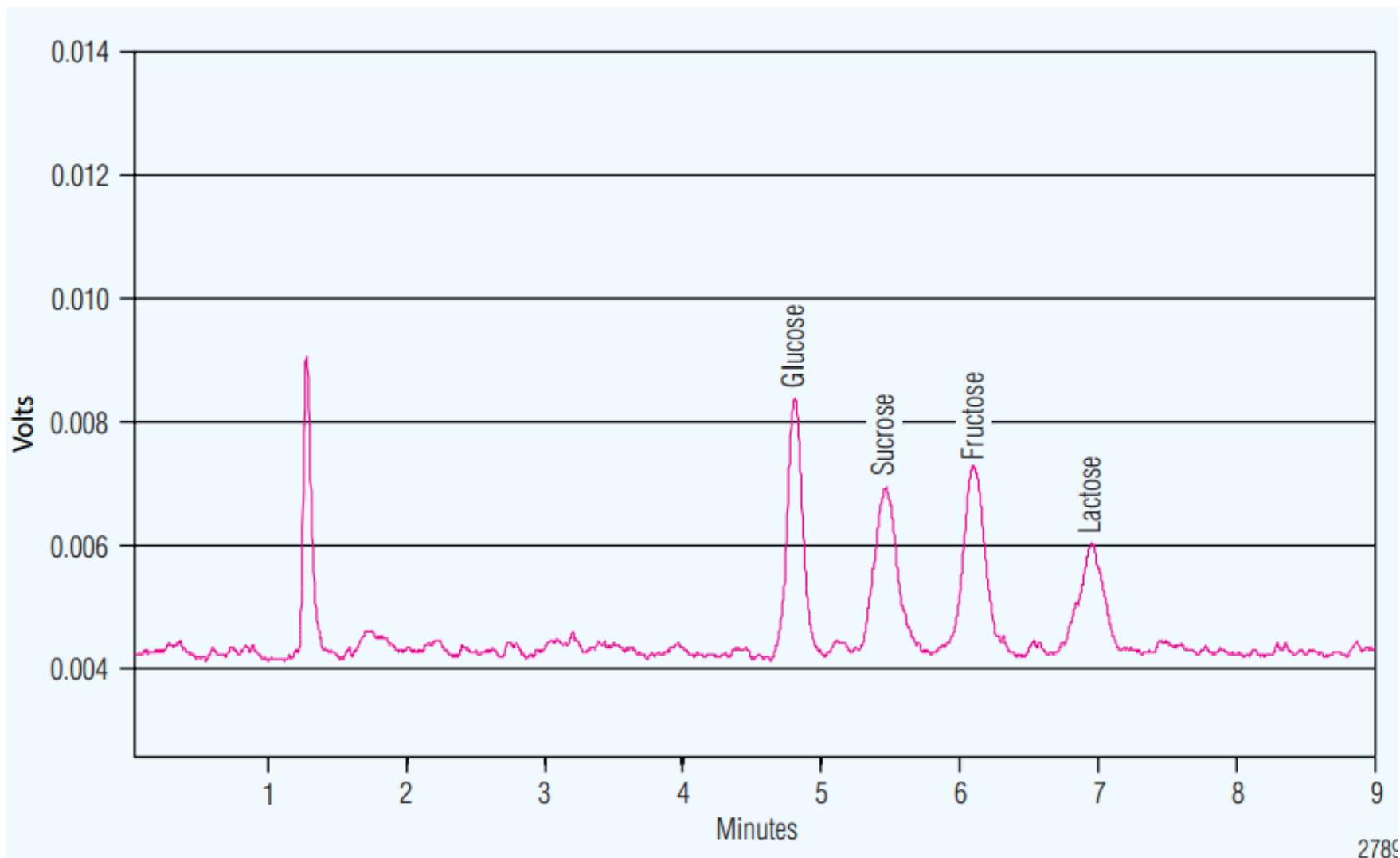
Fig. 7 Example of Analysis of Polyethylene Glycol

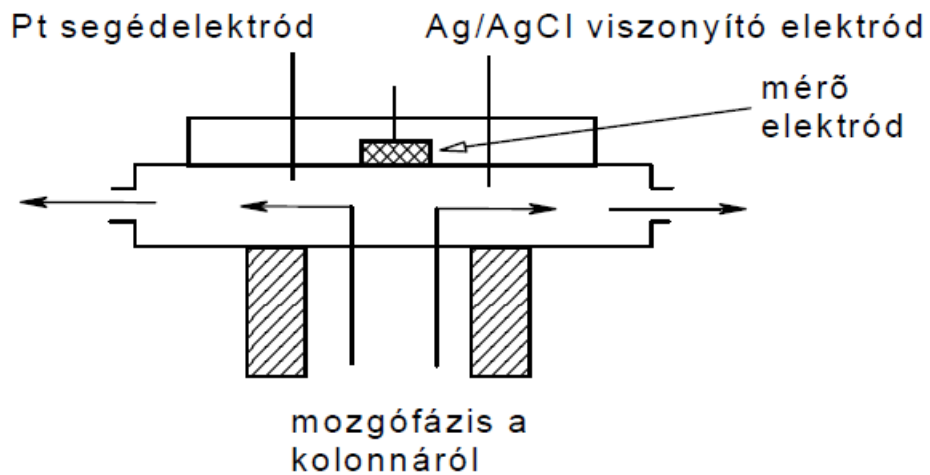
Table 3 Analytical Conditions

Sample	Polyethylene Glycol 1000
Column	Shim-pack VP-ODS (250mmL. x 4.6mm i.d.)
Mobile Phase	A) Water B) Methanol
Time Program	B Conc.40% (0min) → 60% (15min)
Flow Rate	1.0mL/min
Column Temp.	40°C
Detection (ELSD)	Temperature : 40°C Gas Pressure : 350kPa

CAD: Corona® Charged Aerosol Detector (CAD®)







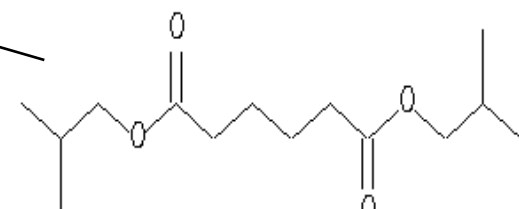
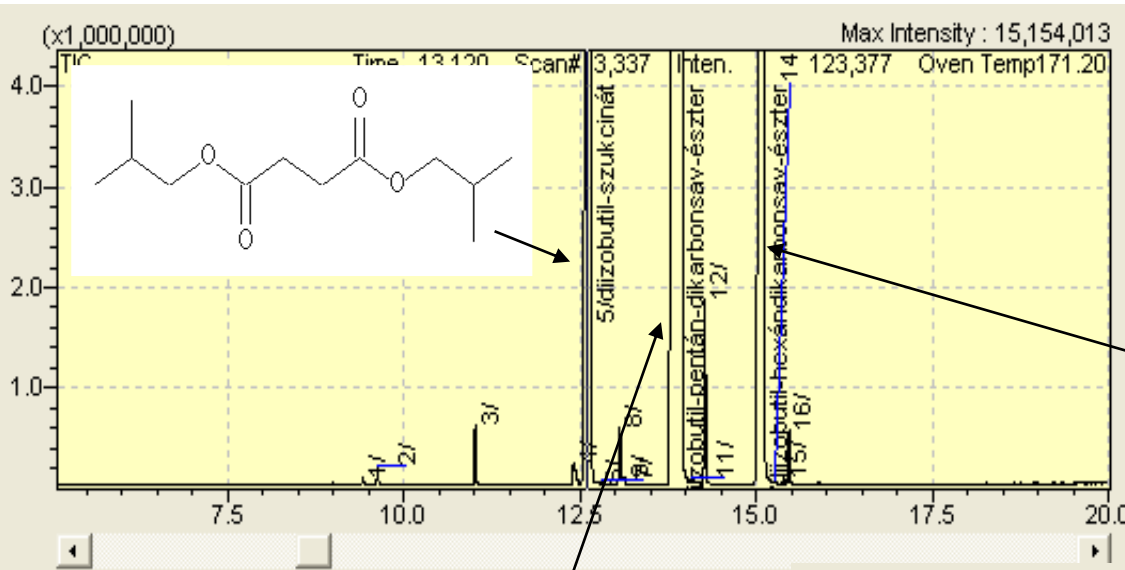
wall-jet detektor

- **Elektromos vezetőképességi detektor**
- **MS detektorok**

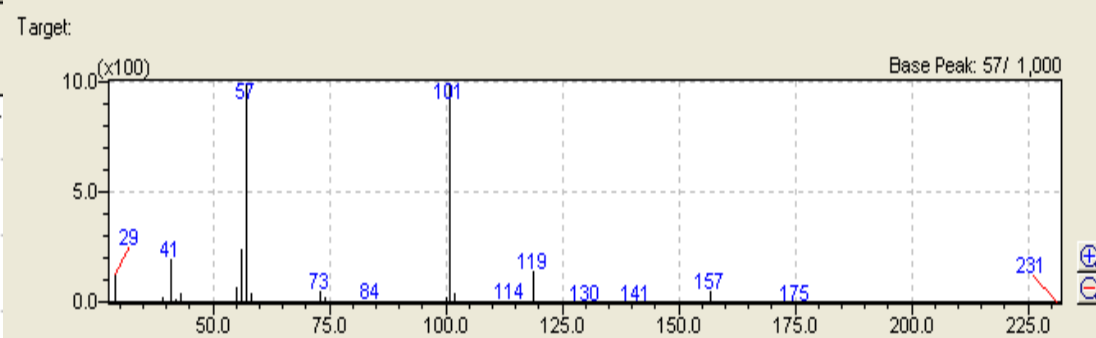
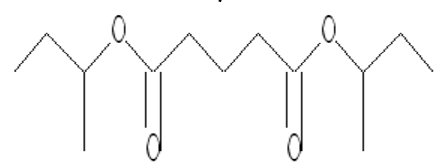
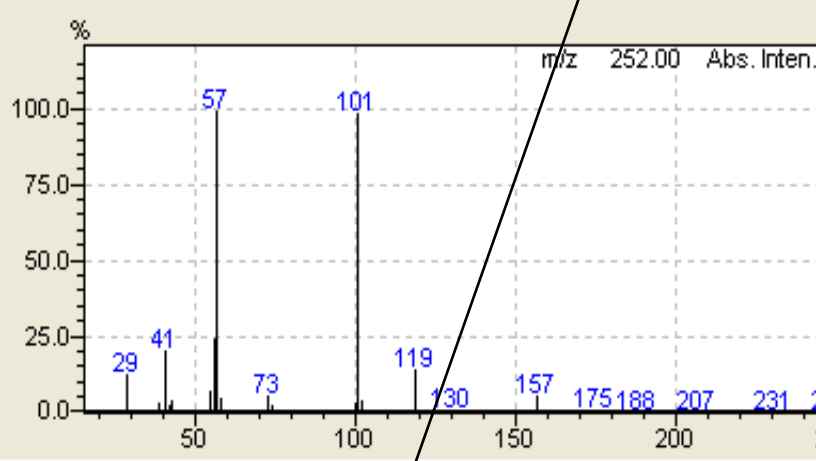
A HPLC gyakorlati alkalmazásai

- Környezeti analízis (víz, talaj, hulladék)
- Gyógyszeranalízis
 - hatóanyagok
 - metabolitkutatás
 - Késztermék analízis
- Élelmiszer elemzés
- Szermaradvány vizsgálatok
- Technológiai termékek elemzése
- Fehérjekutatás és analízis

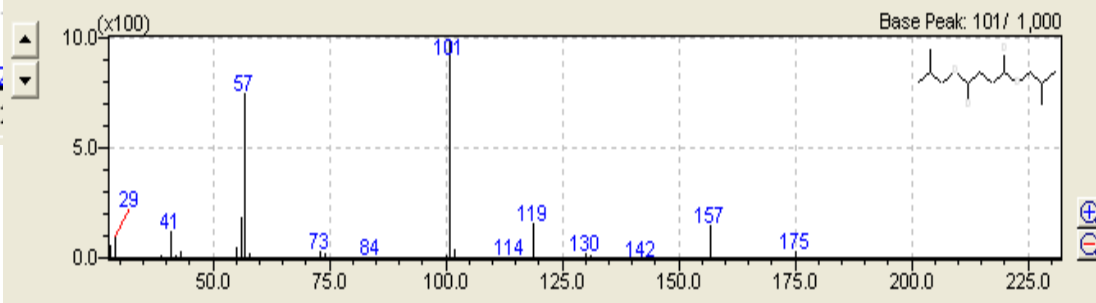
Gyakorlati példák



Ret. Time : [12.603] Scan# : [3182]



1 : 230 : Butanedioic acid, bis(2-methylpropyl) ester \$\$ Succinic acid, diisobutyl ester \$\$ Diisobutyl succinate \$\$

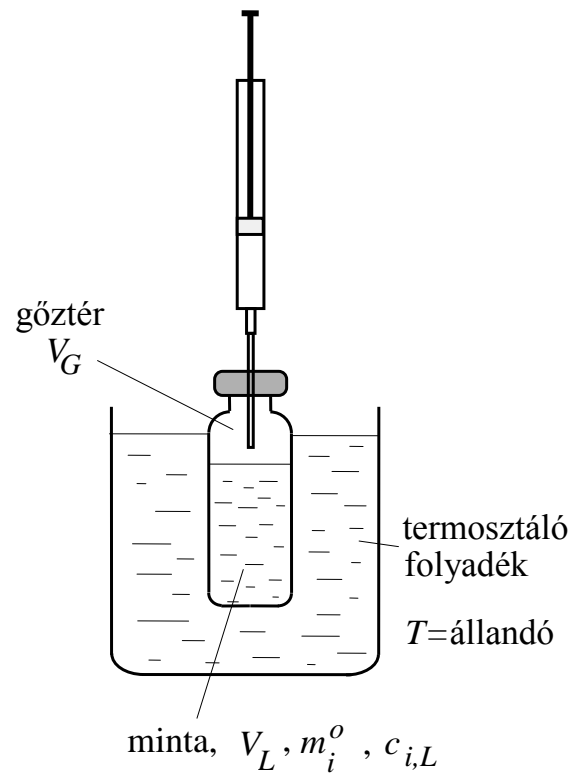
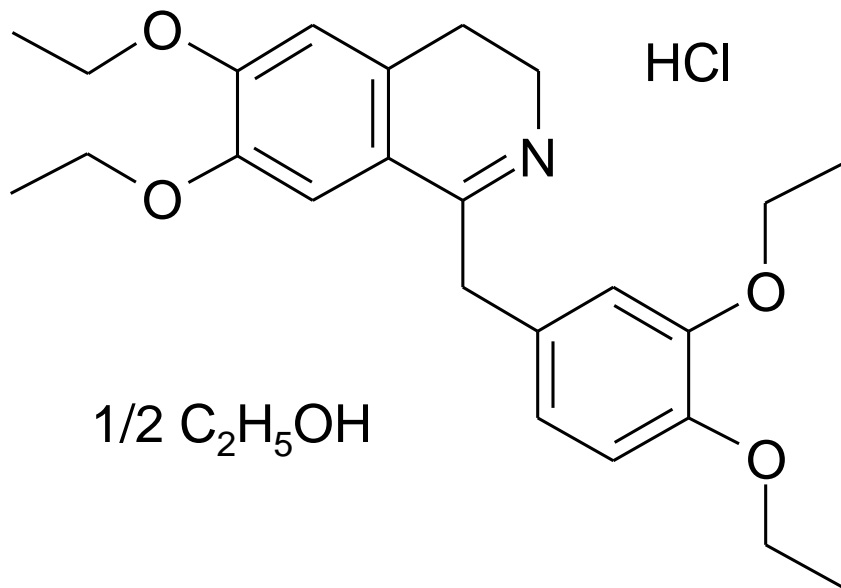


CAS#: 925-06-4 Mol Wt: 230 Serial#: 47331

Cmpd Butanedioic acid, bis(2-methylpropyl) ester \$\$ Succinic acid, diisobutyl ester \$\$ Diisobutyl succinate \$\$

Formula: C12H22O4 Ret.Index: 0

Drotaverin HCl illékony szennyezőinek HS-GC-MS meghatározása



Simaizom görcsoldó

tárolás közben **etil-klorid** képződik

Megengedett etil-klorid koncentráció a Drotaverin hatóanyagban: 750 ppm

Kapilláris kolonna: DB-624 25mx0,2mmx1,12 μ m

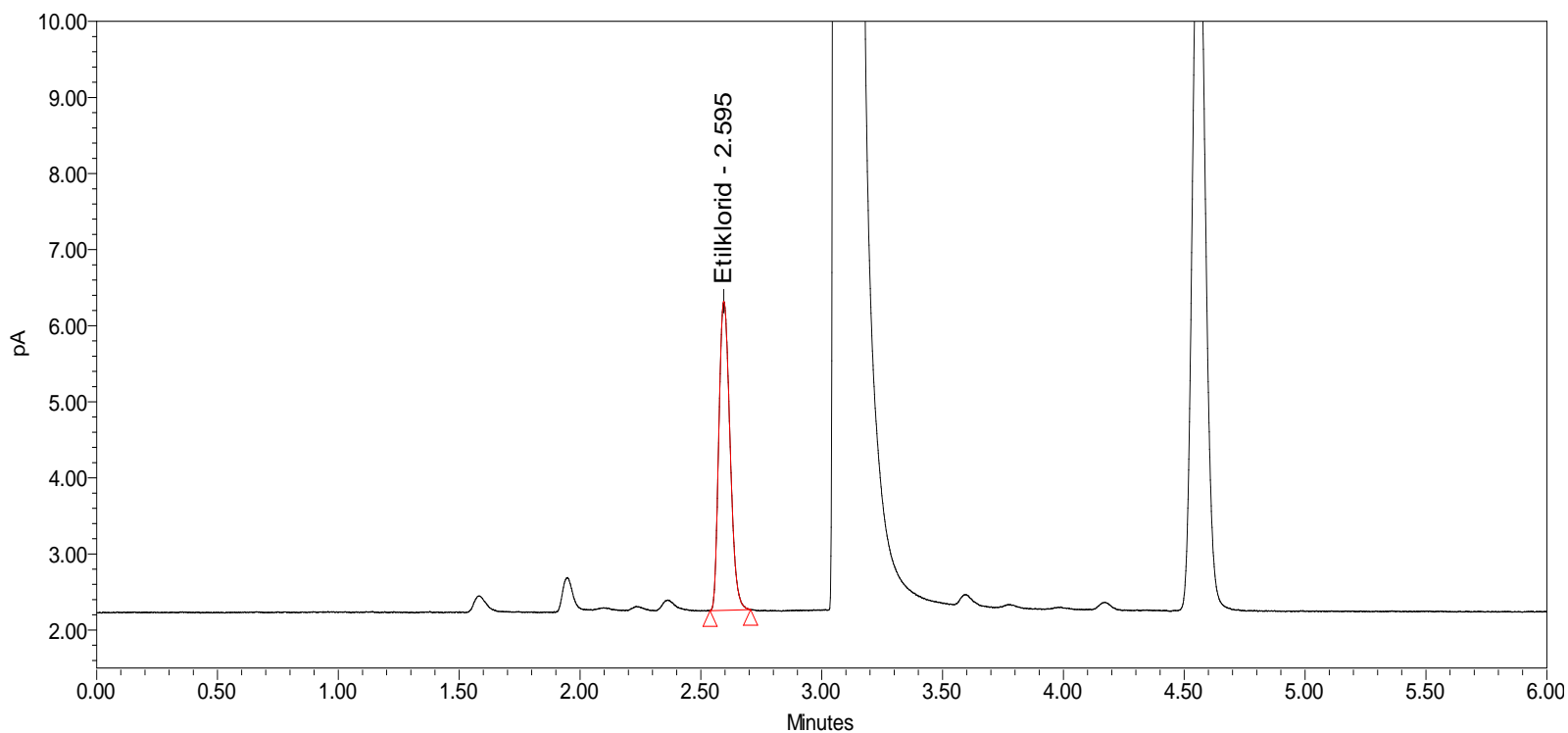
(6% cianopropilfenil- 94% polidimetilsziloxán)

Hőprogram: 40°C izoterm 1 percen át, majd 5°C/perc felfűtési sebesség 15 °C-ig

Oldószer: DMSO

Termosztálási hőmérséklet: 80 °C, idő 20 perc, mintabevitel 1 ml

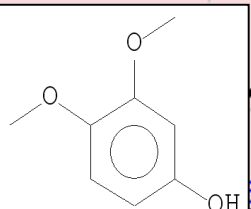
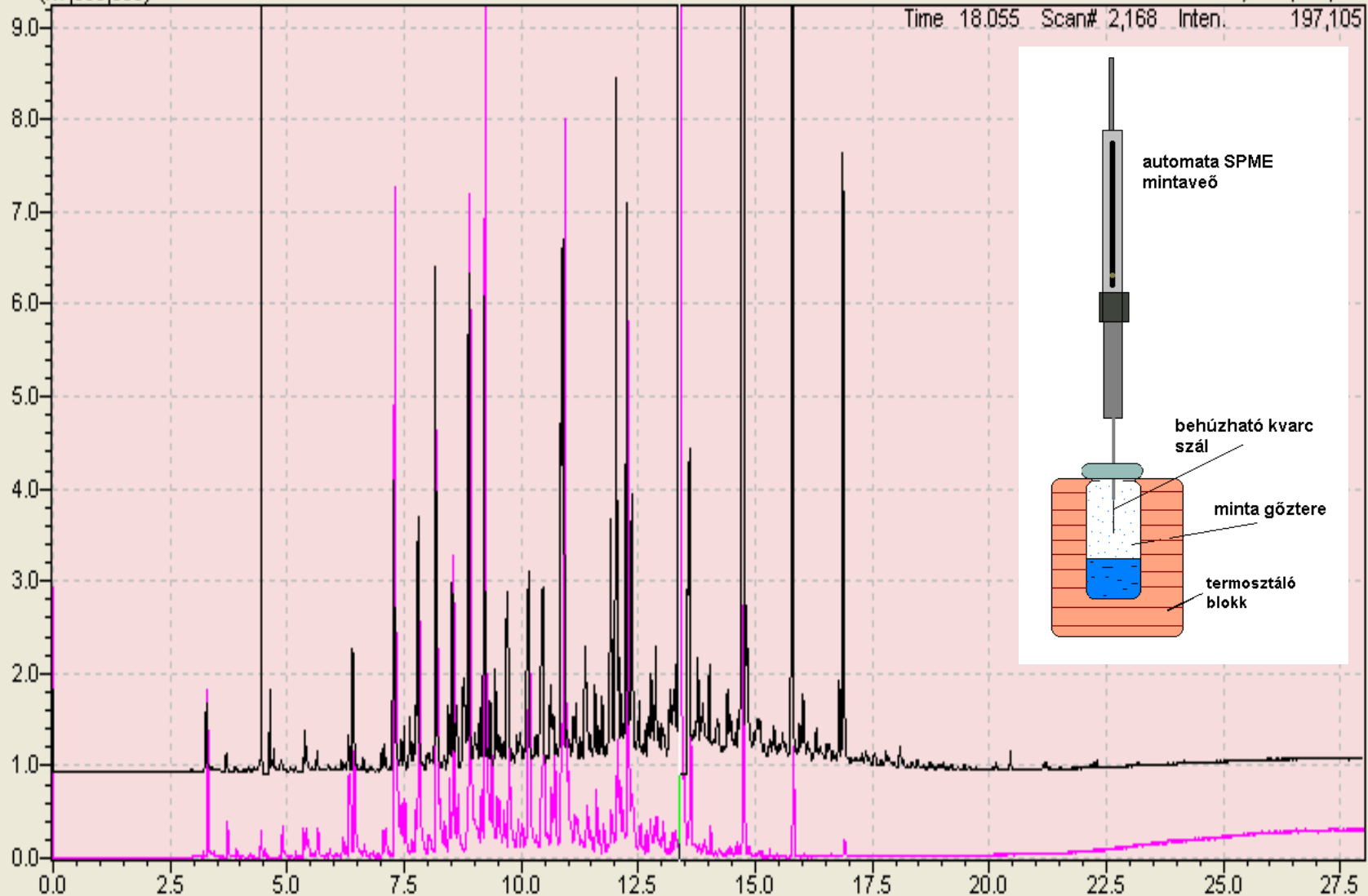
Detektor: MS



(x1,000,000)

Max Intensity : 36,858,724

Time 18.055 Scan# 2,168 Inten. 197,105



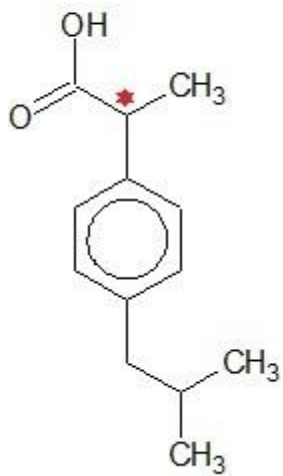
Mass (m/z)	Relative Intensity (%)
65	100
69	10
79	10
91	10
93	10
107	10
111	10
125	10
139	10
141	10
140	10
154	10
156	10
157	10
166	10

Data1: fust_direktinj_10_060502_3
 R.T. [13.375]
 Scan# [1606]
 Data2: fust_spme_70_060427.qgd
 R.T. [13.375]
 Scan# [1606]

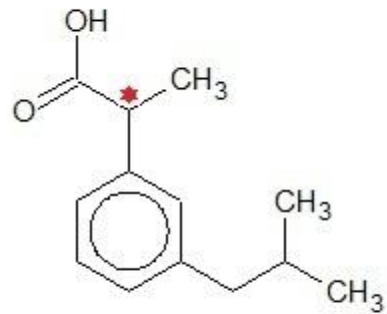
Filmtabletta analízise

gyulladásgátló, lázcsillapító

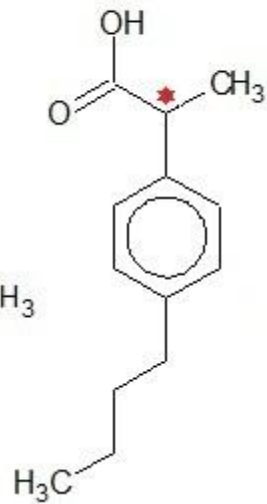
Ibuprofen



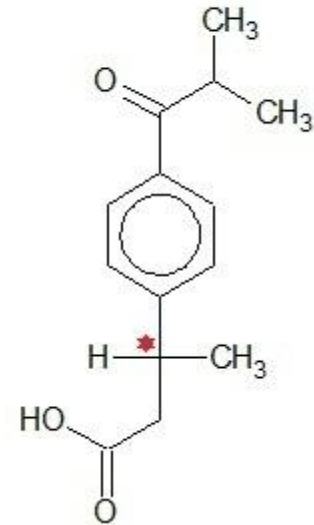
Ibuprofen A



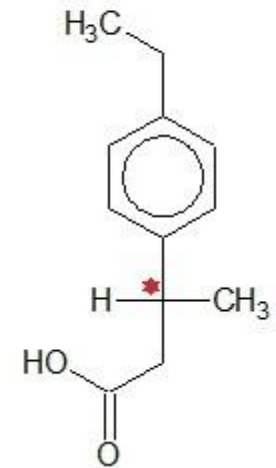
Ibuprofen B

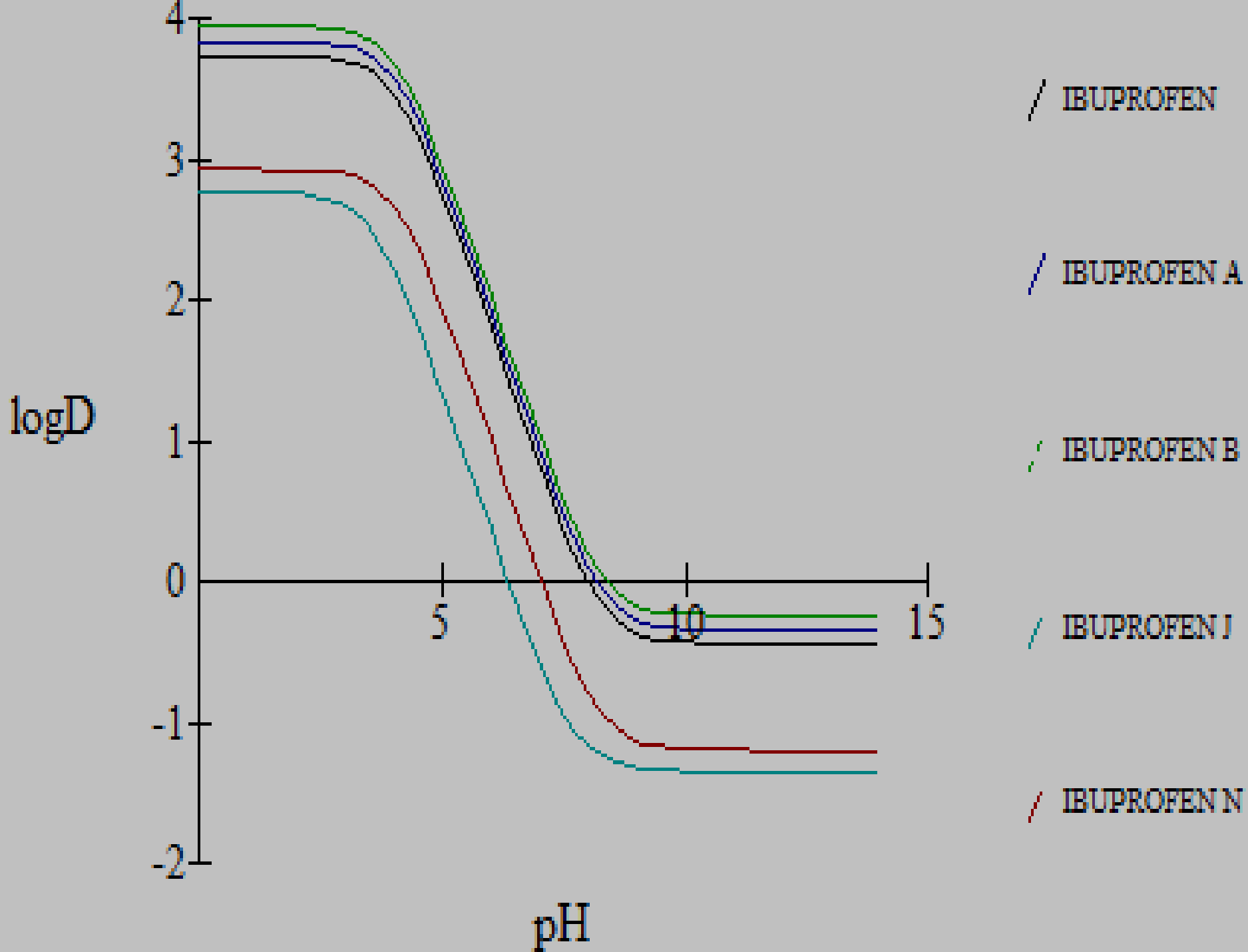


Ibuprofen J



Ibuprofen N





Ibuprofen melléktermékeinek az elválasztása

Oszlop: 150×4,6 mm; C18 álló fázis (5 μm) (Ajánlott: BDS
Hypersil C18 5μm)

Eluens:tisztított víz – acetonitril – ortofoszforsav = 600 : 340 :
0,5; az elegyedési egyensúly beállta után tisztított vízzel 1000
térfogategységre hígítva.

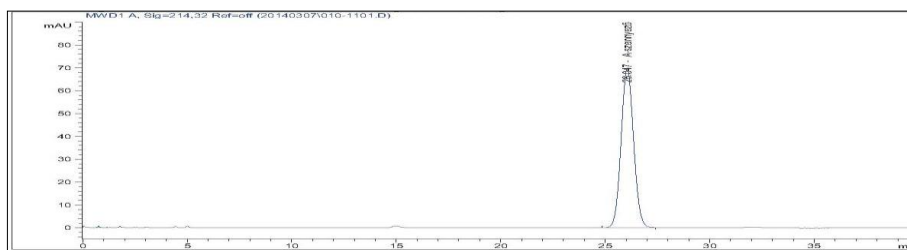
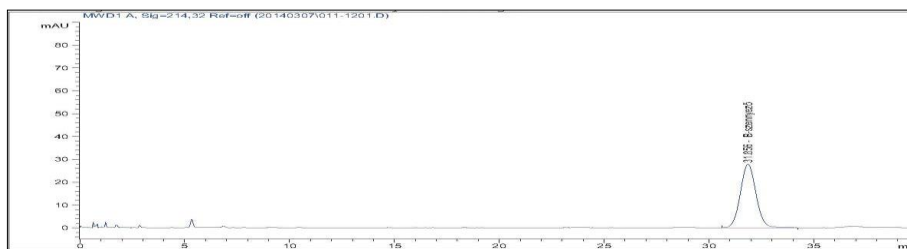
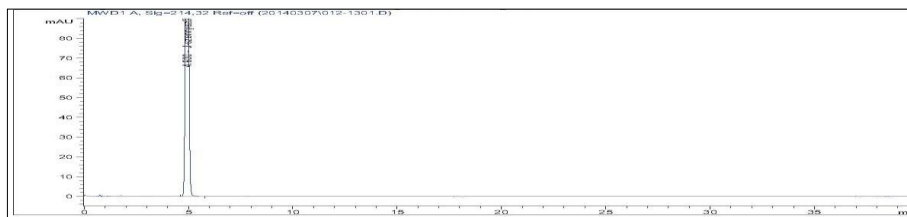
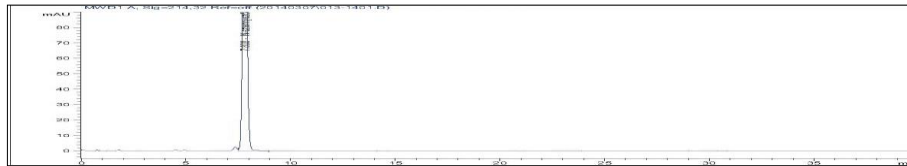
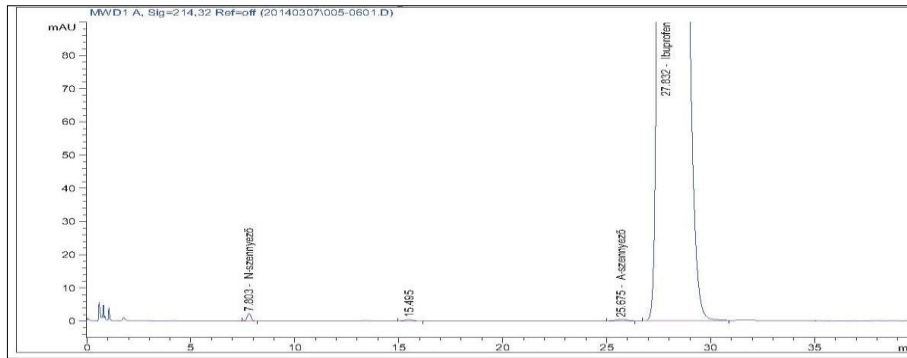
Áramlási sebesség: 2,0 ml/min

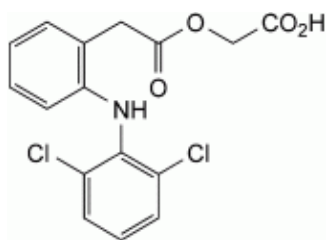
Hullámhossz: 214 nm

Hőmérséklet: 25 °C

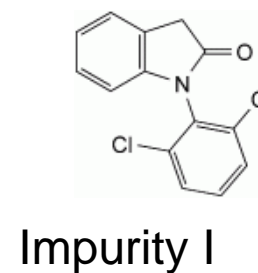
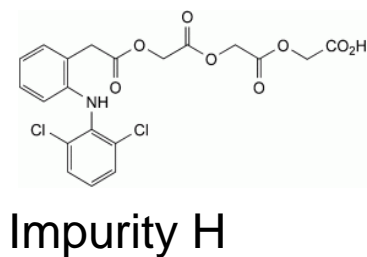
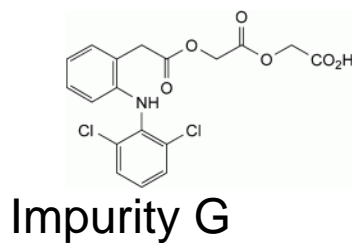
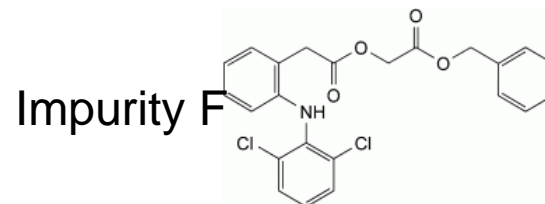
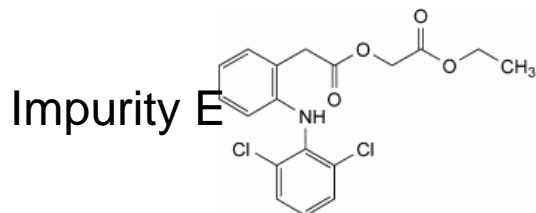
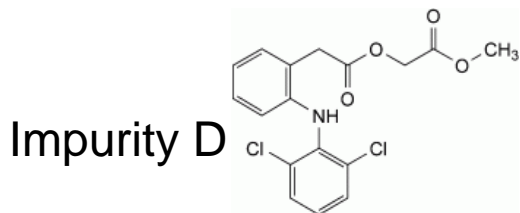
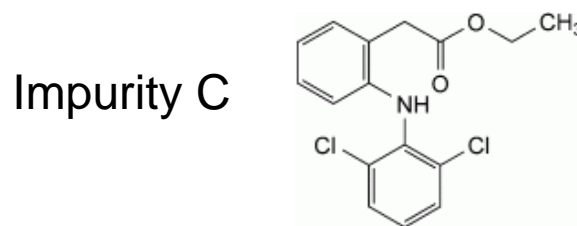
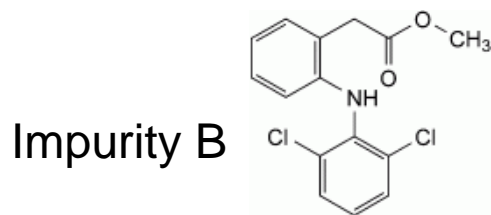
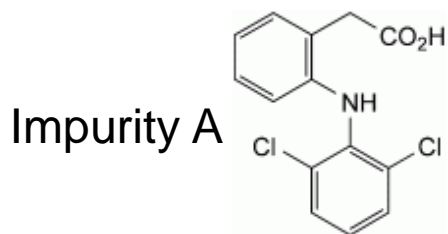
Mérés időtartama: 40 perc

Injektált térfogat: 20 μl

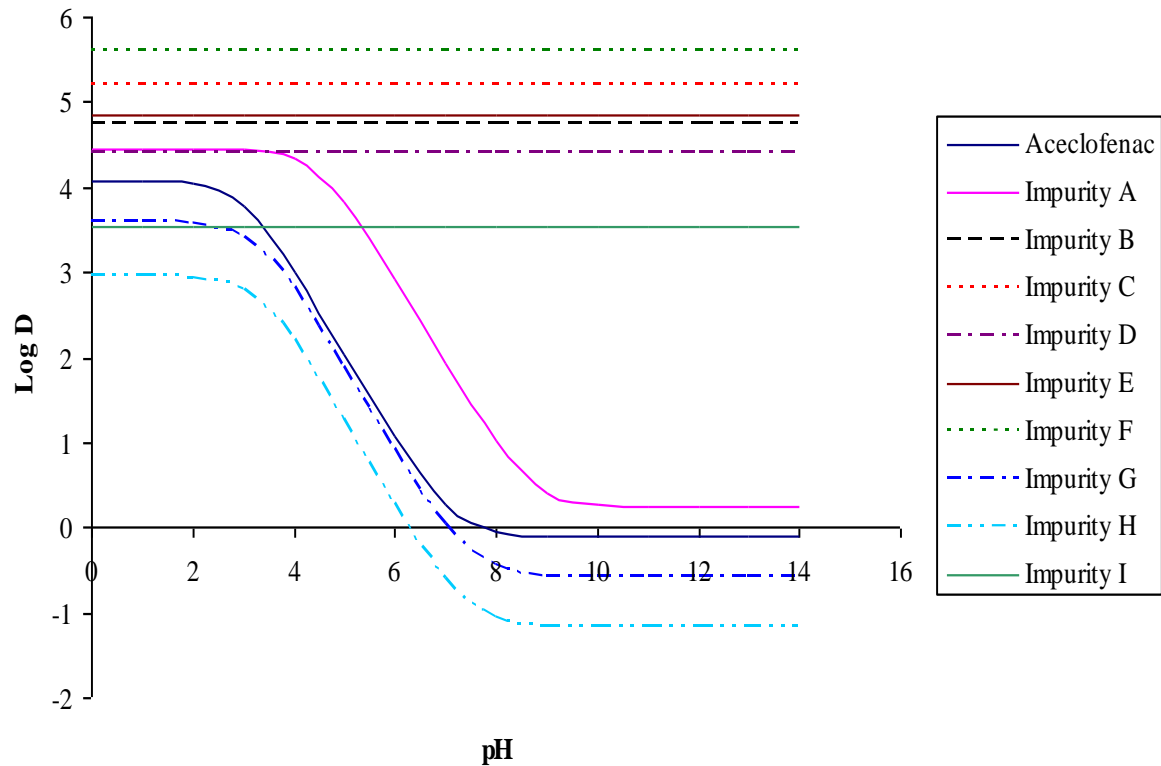




Aceclofenac: gyulladásgátló



Log D - pH diagram

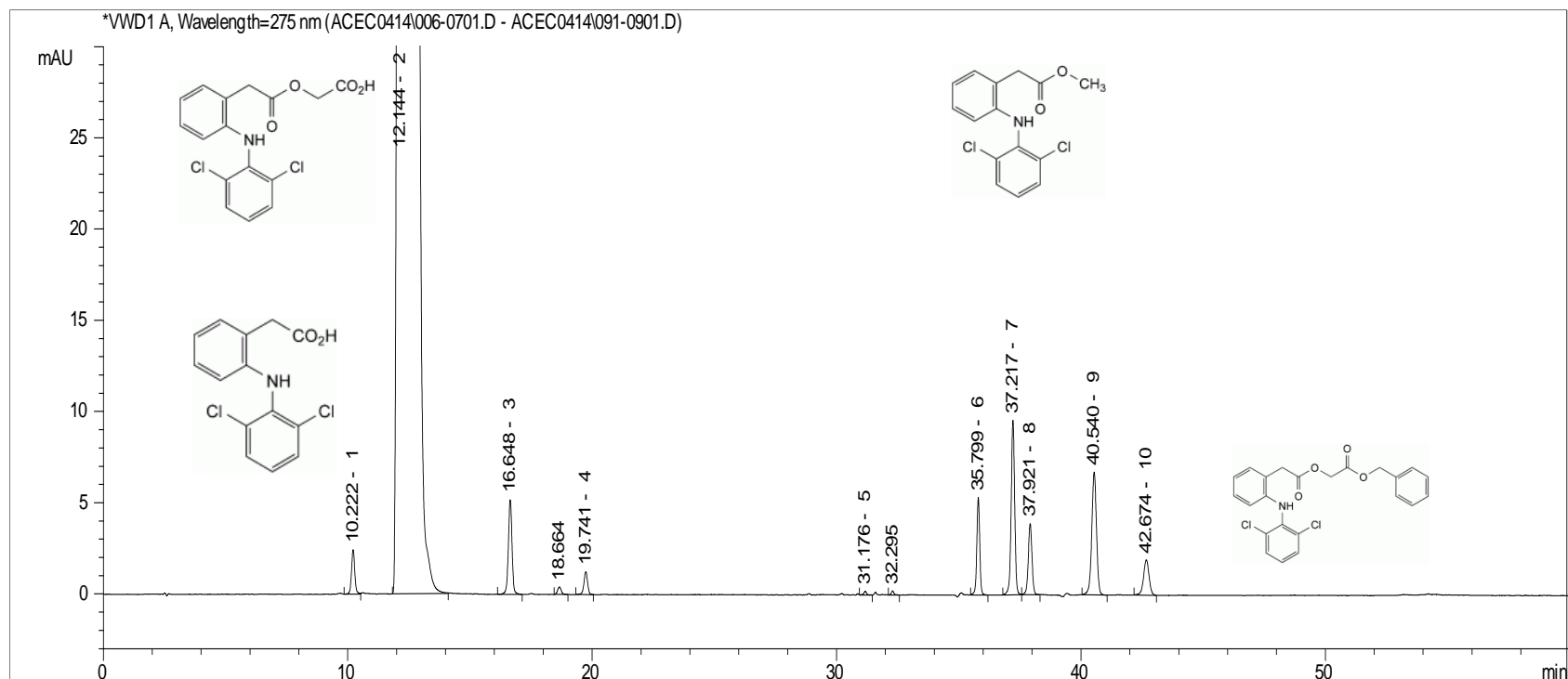


gyakorlatilag semleges
Imp. B, C, D, E, F

semleges
Imp. I

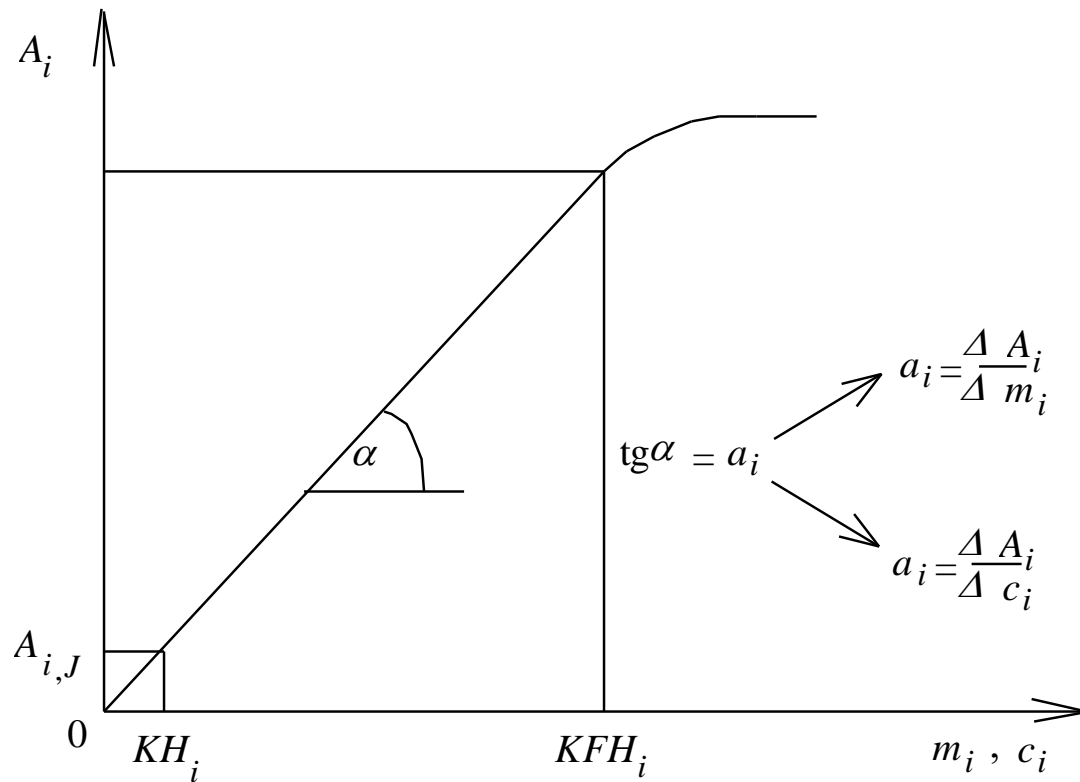
gyenge sav
Aceclofenac,
Imp. A, G H

Aceclofenac és szennyezőseinek az analízise



1. Impurity A 2. Aceclofenac 3. Impurity G 4. Impurity H 5. Impurity I
6. Impurity D 7. Impurity B 8. Impurity E 9. Impurity C 10. Impurity F

A mennyiségi elemzés alapjai



$$A_i = a_i m_i$$

$$A_i = a_i c_i$$

1. kalibrációs módszer,
2. addíciós módszer
3. belső standard módszer

- Ajánlott irodalom:
- Dr. Balla József: A gázkromatográfia analitikai alkalmazásai, Edison House Kft., Budapest, 2006.
- Dr. Fekete Jenő: Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata, Edison House Kft., Budapest, 2006.