

Mitől gyors az elválasztás?

$$t_r = t_0 (1 + k)$$

Ahol

t_r – retenciós idő

t_0 – holtidő

k – visszatartási tényező

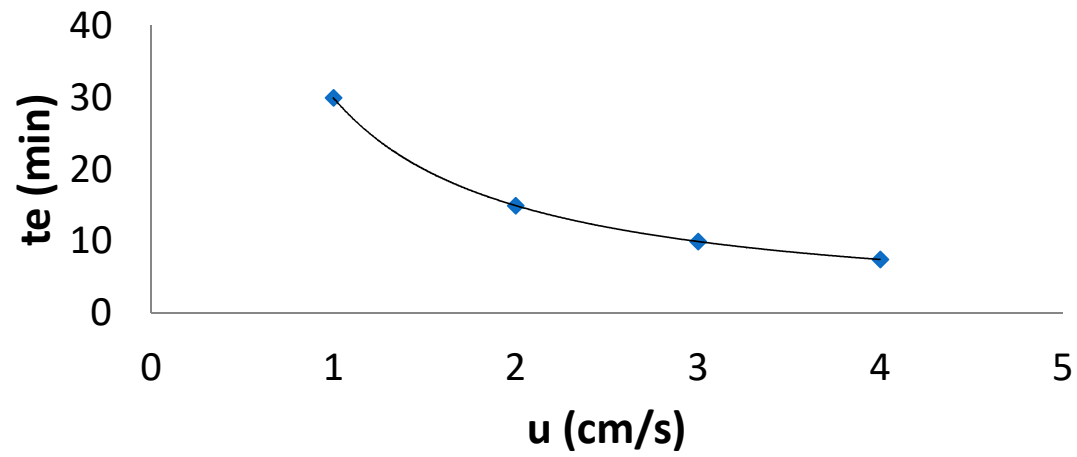
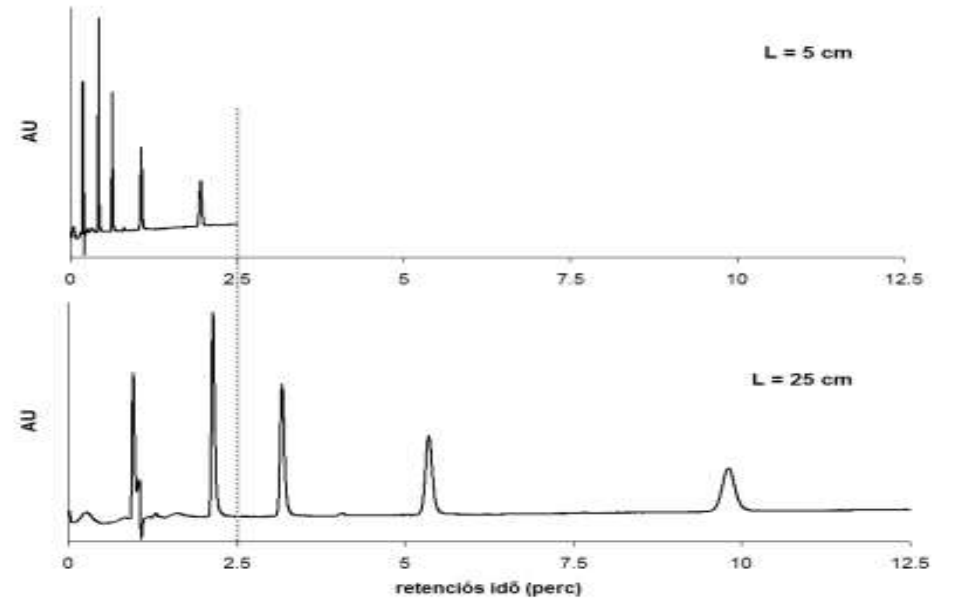
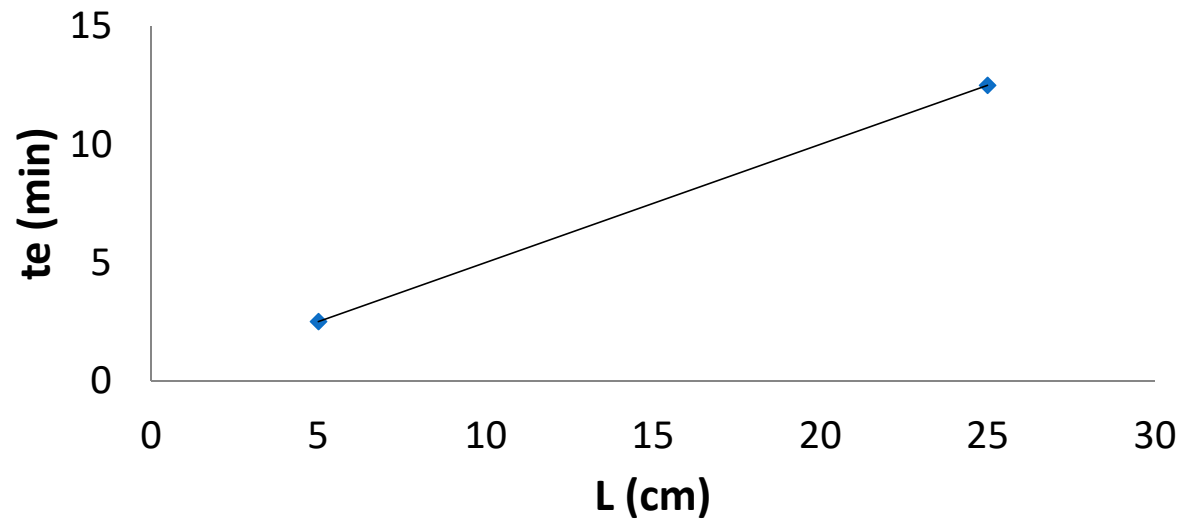
$$t_0 = \frac{L}{u}$$

Ahol

L – oszlop hossza

u – lineáris áramlási sebesség (cm/s)

$$t_r = \frac{L}{u} (1 + k)$$



Darcy egyenlet:

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

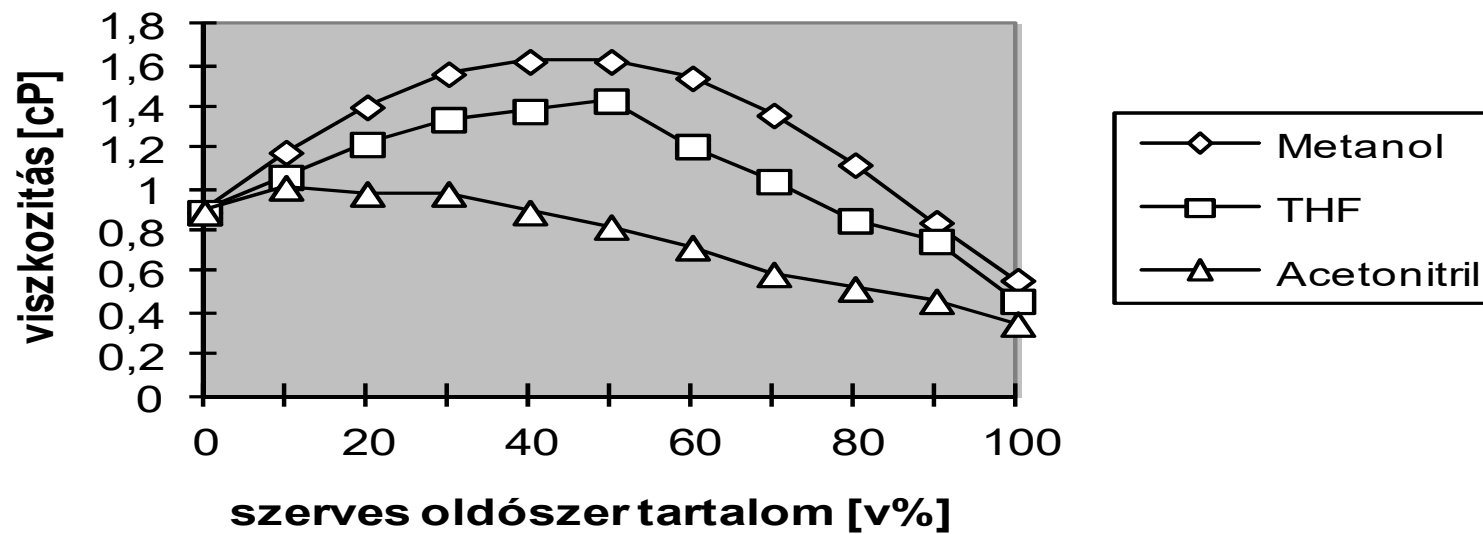
Ahol:

Φ – kolonna áramlási ellenállása

η – mozgófázis viszkozitása

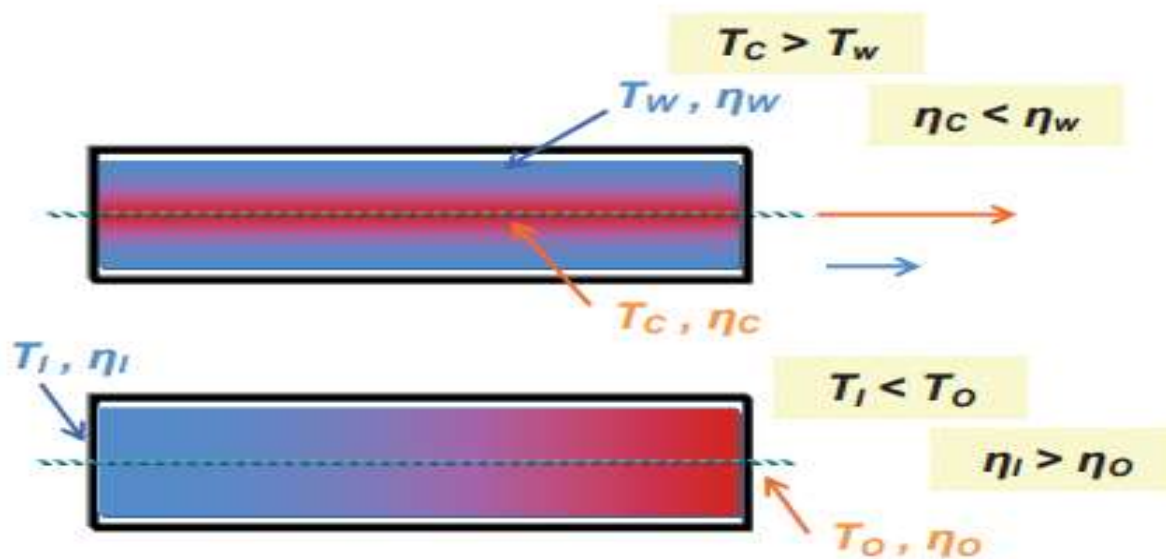
d_p – töltet szemcseátmérője

**Biner oldószerelegyek viszkozitásának
változása az összetétel függvényében (25°C-
on)**



Hatékonyságot csökkentő tényezők I.

1.) Hőgradiens



Gyors elválasztás megvalósításának lehetőségei I.

$$t_r = \frac{L}{u} (1 + k)$$

1.) megoldás:

- L – csökken
- $d_p \sim 3 \mu\text{m}$
- d_c – HPLC-s tartomány  HPLC (400 bar)

Korlátok:

A kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások miatt a teoretikus elméleti tányérszám fele – harmada érhető el.

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

Gyors elválasztás megvalósításának lehetőségei II.

$$t_r = \frac{L}{u} (1 + k)$$

2.) megoldás:

- Δp – nő
- d_p – szub-2 μm
- d_c – 2 mm alatt



UHPLC (1000 – 1400 bar)

Mit várunk készülék oldalról?

- Oszlopon kívüli zónaszélesítő hatások
- Gradiens késés
- Adagolható minta mennyisége

Oszlopon kívüli zónaszélesítő hatások

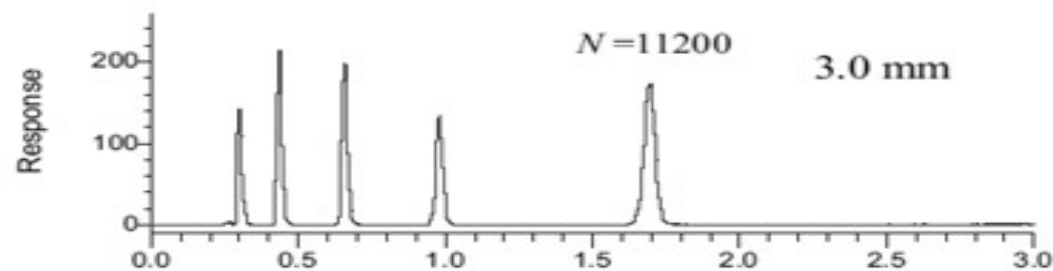
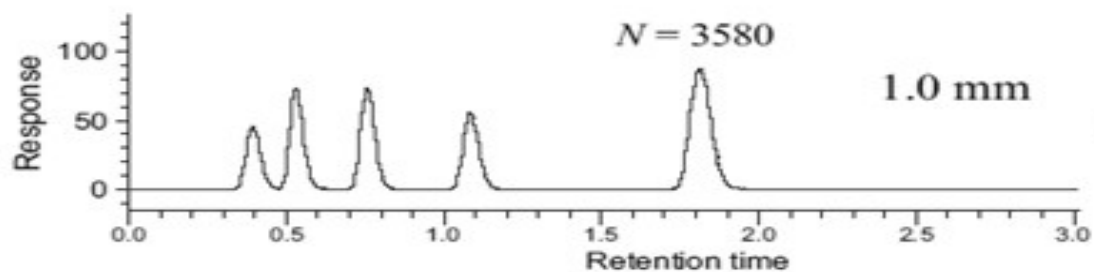
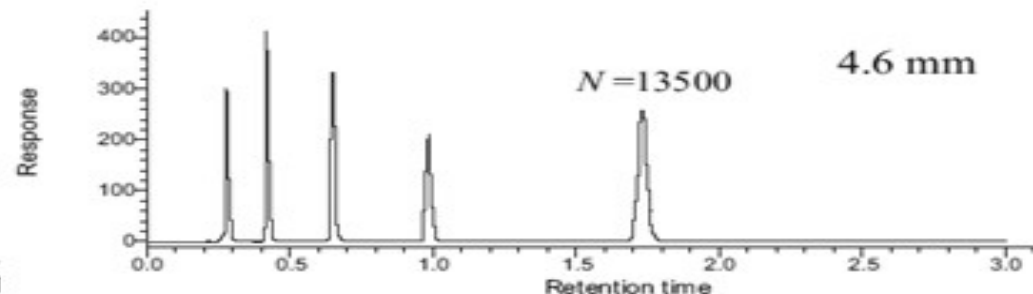
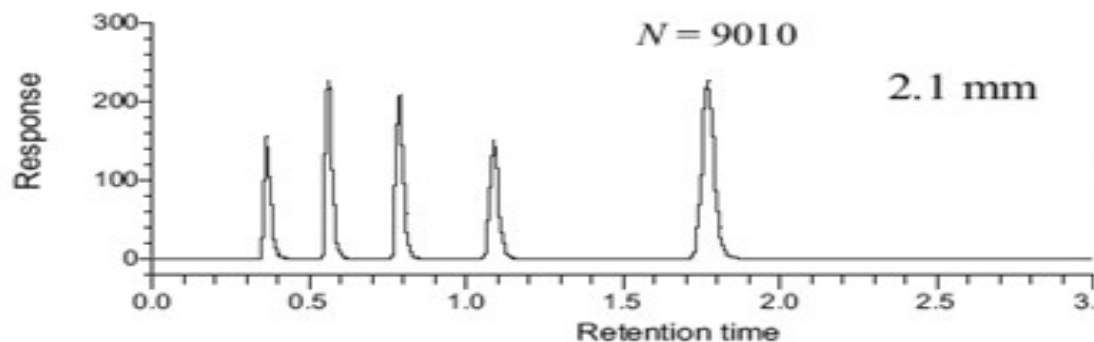


Zónaszélesítő hatások:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{ec}^2 + \sigma_c^2$$

$$\sigma_{ec}^2 \leq 0,1 \sigma_c^2$$

Mit jelent ez a gyakorlatban?



kolonna hossza: 5 cm; szemcsméret: 1,8 μm ; készülék: Acquity UPLC

Mit tehetünk:

- Csökkentjük az összekötő vezetékek hosszát és átmérőjét
- Csökkentjük a detektor cella térfogatát
- Optimalizáljuk az injektálás módját

Gradiens elúció

Kisnyomású gradiens (dinamikus keverő):

- a mozgófázis összetevők a nagynyomású szivattyú előtt keverednek
- késleltetési térfogat:
nagynyomású szivattyú+keverő+mintahurok+összekötő vezeték

Nagynyomású gradiens (statikus keverő):

- a mozgófázis összetevőket a nagynyomású szivattyú után az adagoló előtt keverjük össze
- késleltetési térfogat:
keverő+mintahurok+összekötő vezeték

Gradiens elúció

Gradiens készítés HPLC esetén

- Nagynyomású keverő rendszereknél: 0,5 – 2 ml
- Kisnyomású keverő rendszereknél: 1 – 5 ml

Gradiens készítés UHPLC esetén

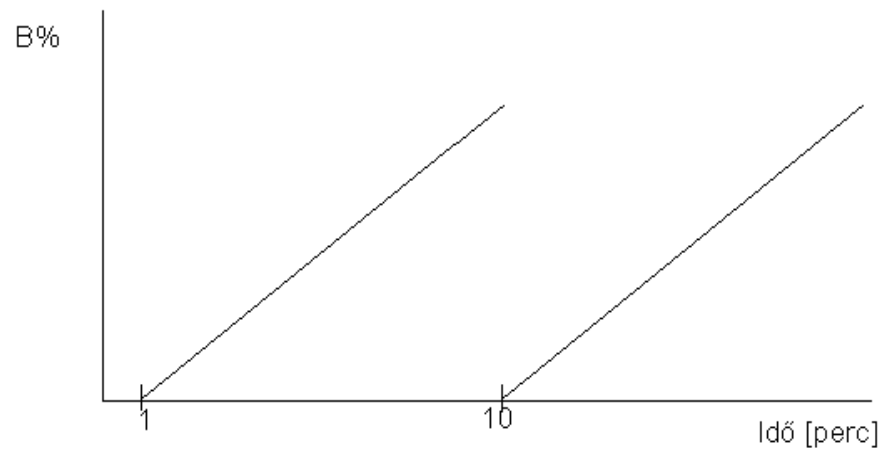
- 0,08 – 0,5 ml

Gradiens készítés meghatározható:

- „A” mozgófázis: MeOH
- „B” mozgófázis: MeOH + aceton
- Mérési hullámhossz: 250 nm
- Gradiens program:

t (min)	„A” (%)	„B” (%)
0	100	0
10	0	100
5	0	100

Gradiens elúció



Módszer transzfer:

- A kisebb gradiens késésű készülék esetén izokratikus szakasz iktatható be
- A nagyobb gradiens késésű készüléknél nem az elejétől indíthatjuk a gradienst

Adagolható minta mennyisége

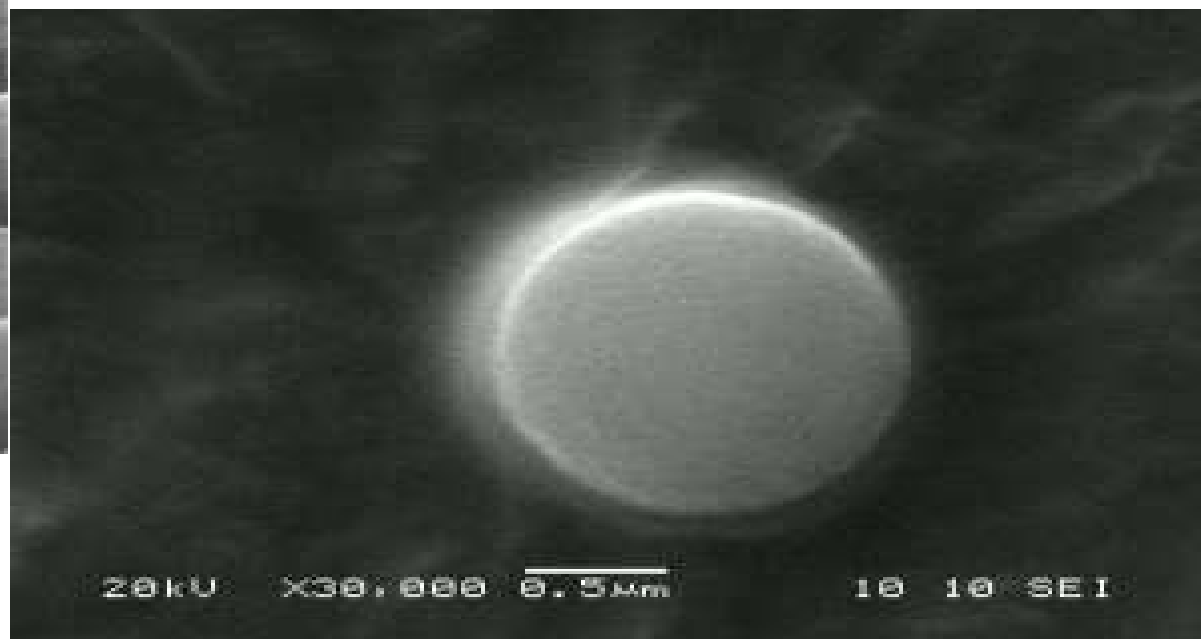
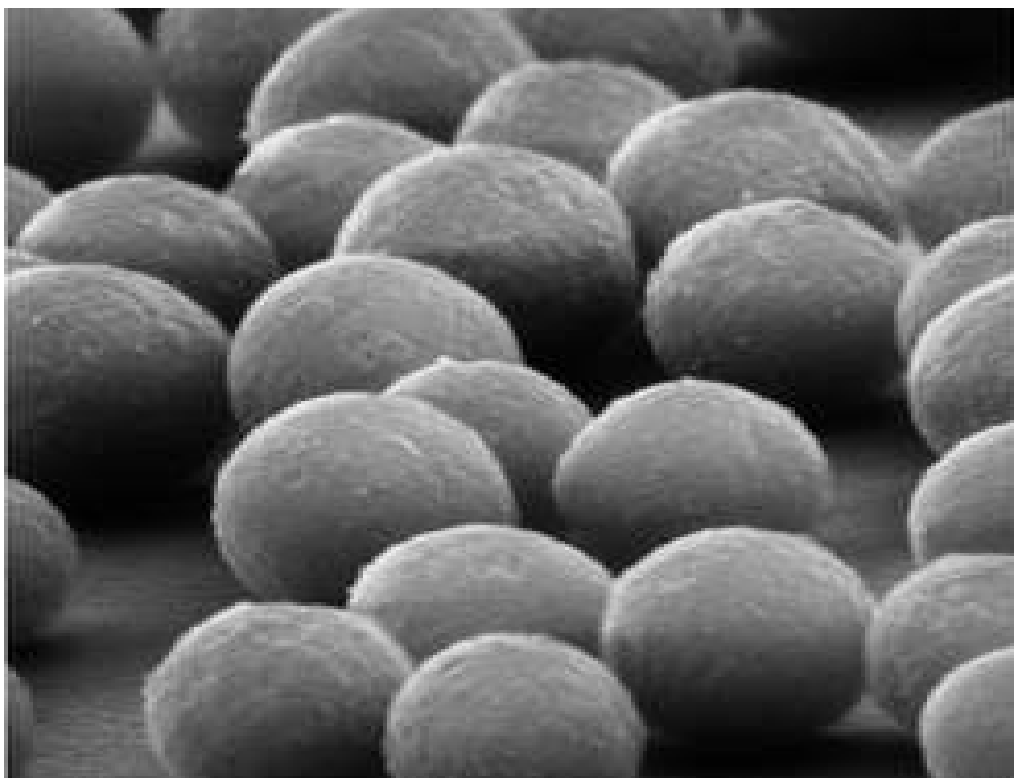
Minta oldószer: azonos v. gyengébb összetételű, mint a mozgófázis (molekuláris forma azonos a mintaoldószerben és a mozgófázisban!)

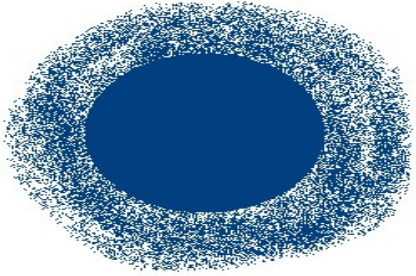
Adagolható minta mennyisége:

- Hagyományos HPLC-ben: 5 – 20 μl
- Gyors elválasztásoknál (kis kolonna hossz): max. 5 μl

Összehasonlítás		
Paraméter	HPLC	UHPLC
Szemcseátmérő (µm)	3-10	1-2
Kolonnahossz (cm)	10 (5) -25	2 -10
Kolonnaátmérő (mm)	3-8	1-3
Nagynyomású szivattyú (bar)	max. 400	1000-1400
Tipikus térfogatáramlási sebesség (ml/perc)	0,1-10	0,01-2
Adagolható mintatérfogat (µl)	5-200	0,1-5
Összekötő vezeték térfogata (µl)	50-250	5-10
Összekötő vezeték átmérője (mm)	0,254	0,05-0,1
UV-VIS detektor mérőcella térfogata (µl)	5-10	0,1-1
UV-VIS detektor adatgyűjtési frekvenciája (Herz)	10-20	20-100
Gradiens elúciónál a keverési térfogat (ml)	0,5-2	0,05-0,2
Oszlopon kívüli variancia (µl ²)	40-200	1-25

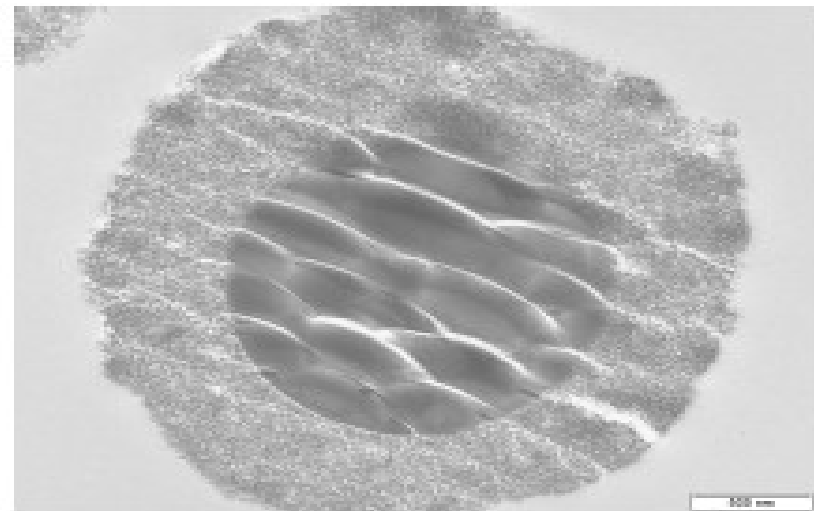
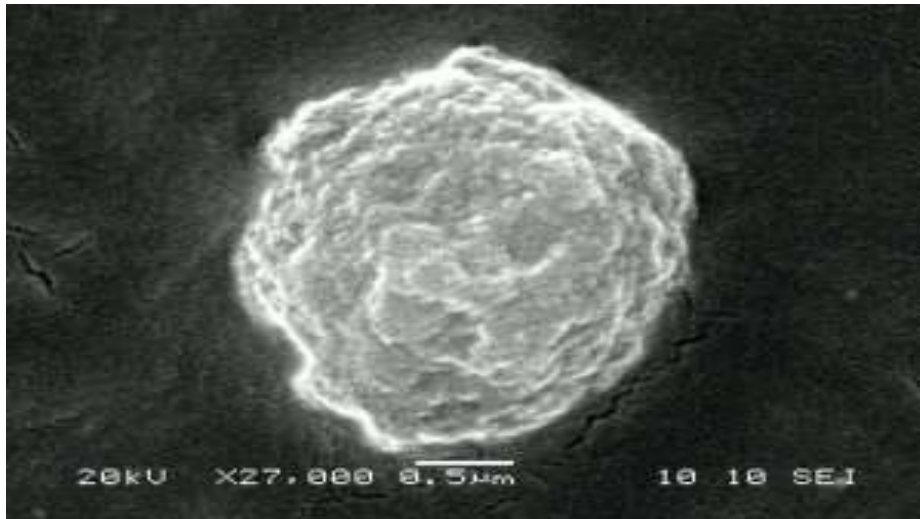
Teljesen porózus kis szemcseátmérőjű töltetek





Héjszerkezetű töltetek

- A gyors analízis alapja az, hogy a csökkentett diffúziós úthossz miatt kisebb a zónaszélesedés (gyorsabb az anyagátadás).
- Nincs extrém nagy nyomás! ($\sim 3 \mu\text{m}$ szemcseátmérő)
- Halo, Ascentis:



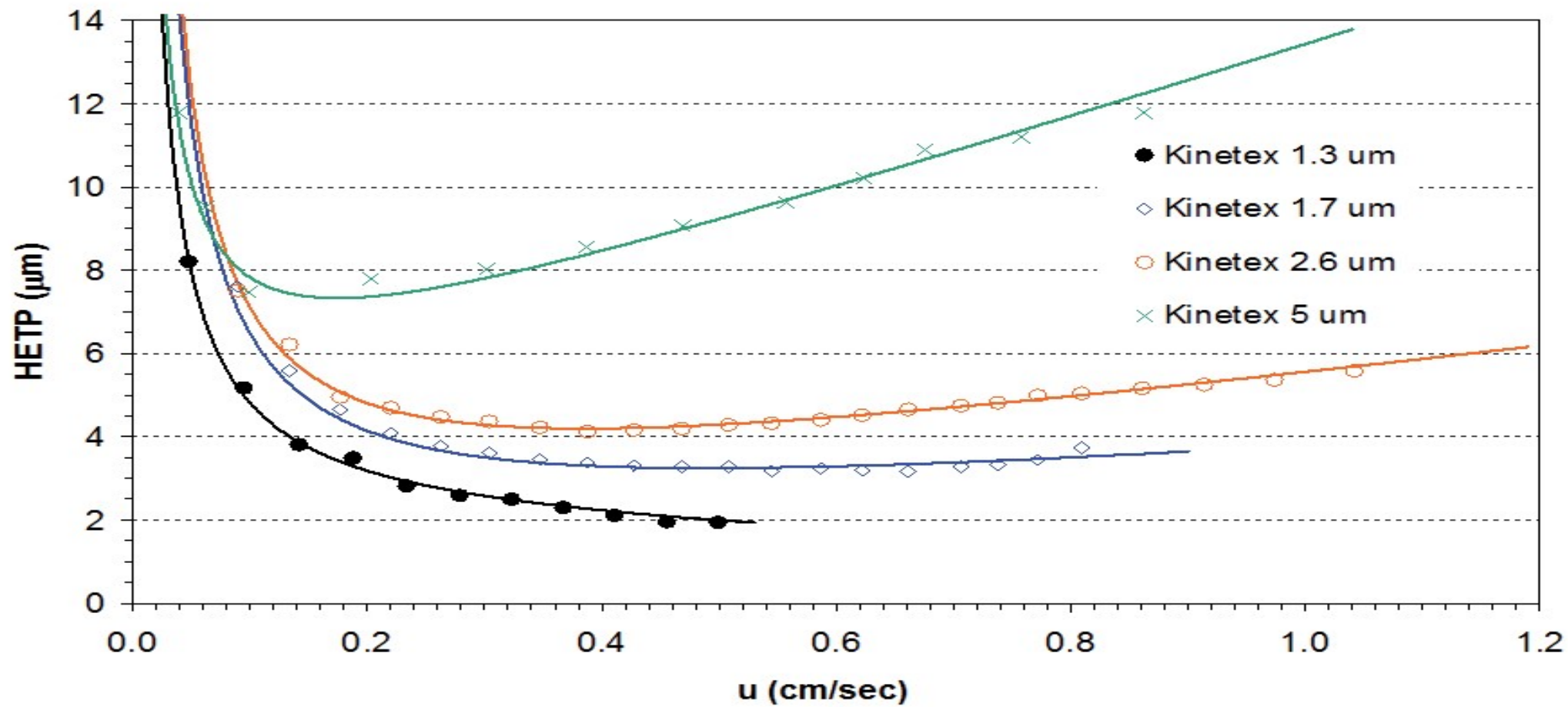
Héjszerkezetű töltetek

Előnyök:

- Vékony porózus héjnak köszönhetően a szemcsén belüli anyagátadás gyorsabb → fehérje analitika
- Kis szemcseméret eloszlás
- Göbös felület egyenletesebb töltet ágyat eredményez
- Mag hőátadása jobb, mint a teljesen porózus tölteteké

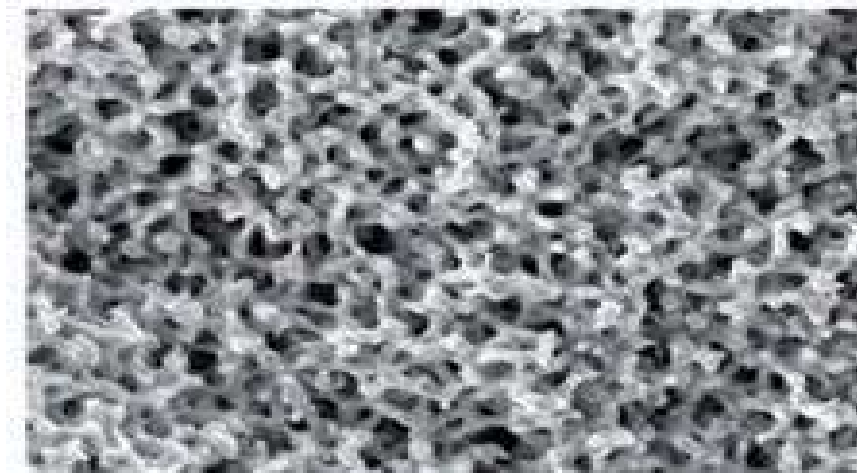
Hátrány:

- Terhelhetőség

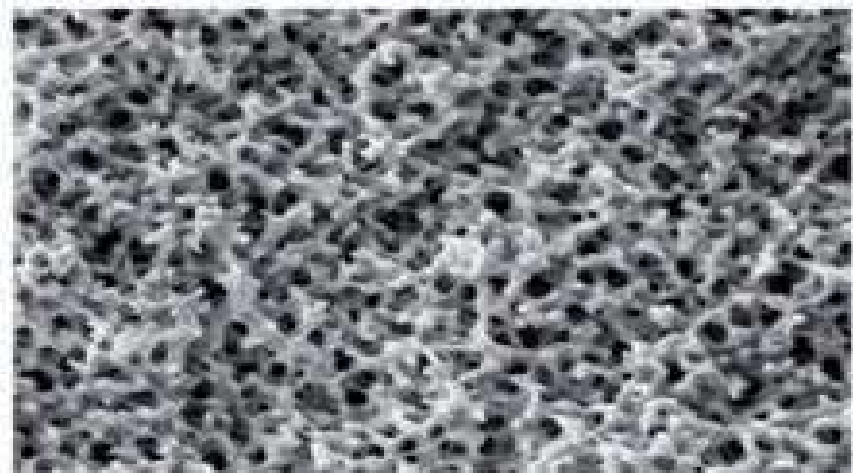


Monolit töltetek

- A gyors analízis alapja a csökkent áramlási ellenállás



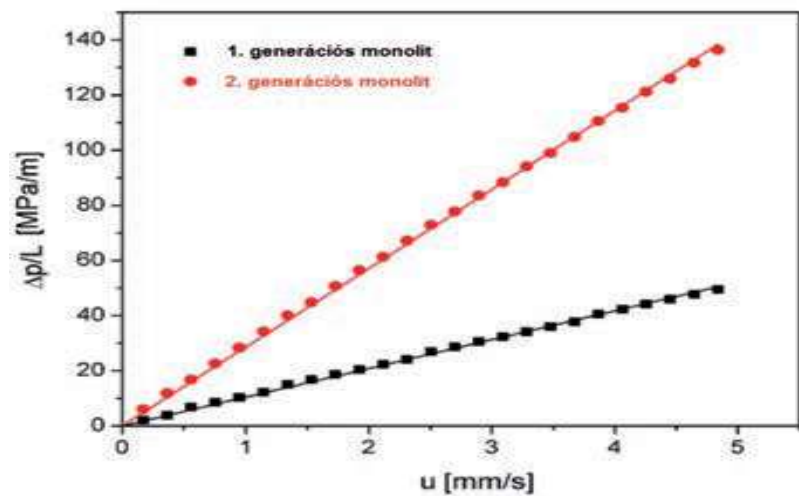
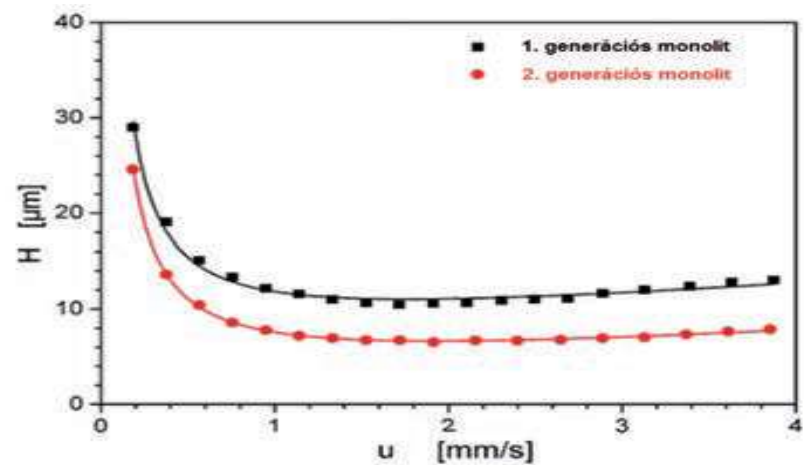
Első generációs monolit



Második generációs monolit

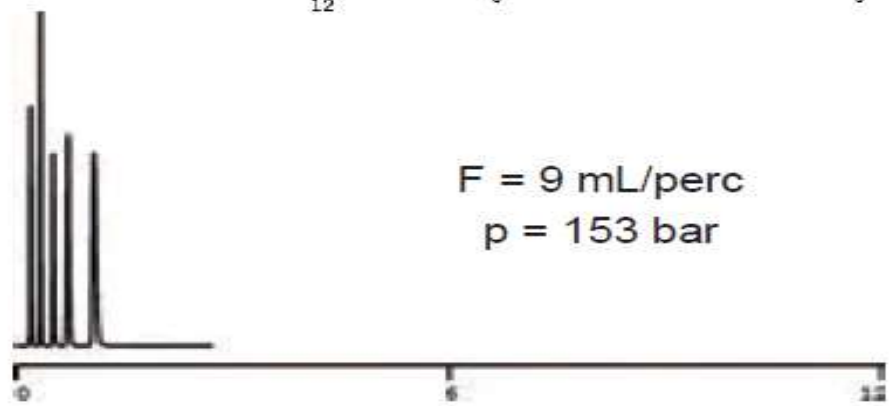
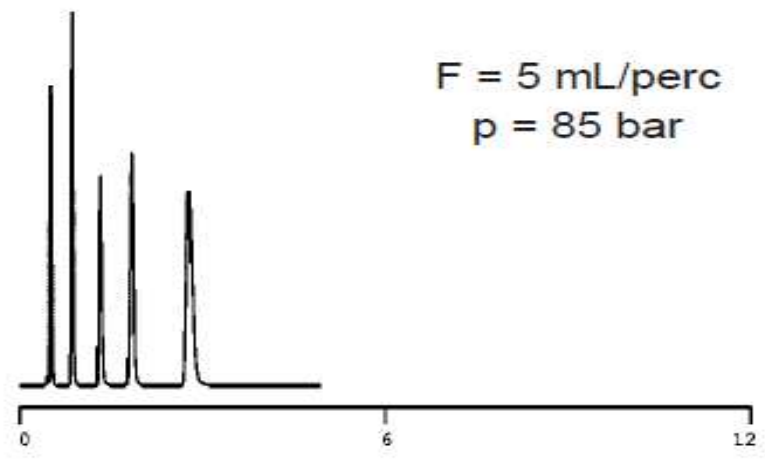
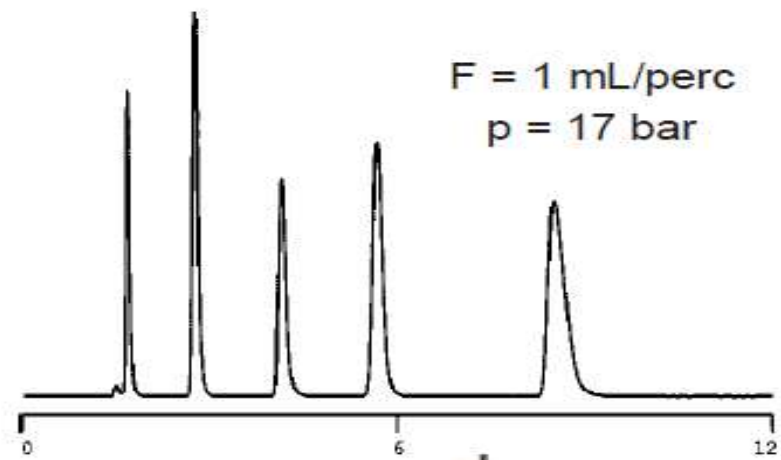
- A hatékonyságuk hasonló az 5 μm szemcseátmérőjű töltetekkel kisebb nyomásesés mellett!

Monolit töltetek



Monolit töltetek

- Maximális nyomás 200 bar – 6-9 ml/perc áramlási sebesség
- Térfogati és tömeg túlterhelés nincs
- Térfogatáramlási sebesség gradiens
- Szilikagél monolitok
- Szerves polimer alapú (polimetakrilát, poliakrilamid, polisztirol-divinilbenzol) monolitok → fehérje analitika



Módszerátvitel HPLC-ről UHPLC-re

Gyártói szoftverek segítségével vagy...

Térfogati áramlási sebesség:

$$F_2 = \frac{d_2^2}{d_1^2} * F_1 = \frac{(2,1 \text{ mm})^2}{(4,6 \text{ mm})^2} * 1 \text{ ml / perc} = 0,2 \text{ ml / perc}$$

Gradiens idő:

$$t_{G2} = \frac{L_2}{L_1} * t_{G1} = \frac{100 \text{ mm}}{250 \text{ mm}} * 20 \text{ min} = 8 \text{ min}$$

Injektált térfogat:

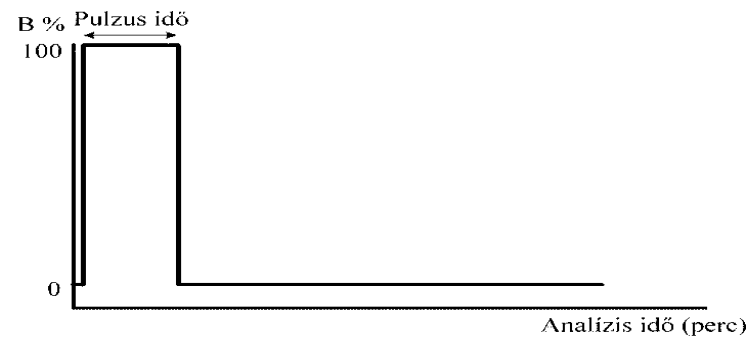
$$V_2 = \frac{r_2^2 * L_2}{r_1^2 * L_1} * V_1 = \frac{(2,1 \text{ mm})^2 * 100 \text{ mm}}{(4,6 \text{ mm})^2 * 250 \text{ mm}} * 20 \mu\text{l} = 1,67 \mu\text{l}$$

Csúcsfókuszálási lehetőségek

1. Oldószer megfelelő megválasztása:

- Izokratikus elválasztásnál a mozgófázisnak megfelelő vagy attól gyengébb erősségű oldószer
- Gradiens elúciónál a kiindulási mozgófázis erősségének megfelelő vagy attól gyengébb erősségű oldószer

2. Pulzus gradiens alkalmazása



3. Gradiens elúció

Tanaka teszt

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

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

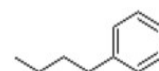


Körülmények: MeOH–H₂O (8:2, v/v), 1,0 ml/min,
40 °C, 5 µl pentilbenzol (0,6 µg/ml) injektálása

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 hidrofóbabb, így a hidrofób anyagokat jobban visszatartja. A fenil módosított állófázisnál azonban, ami kevésbé hidrofób nagyobb kPB értéket kapunk a $\pi - \pi$ kölcsönhatások miatt.

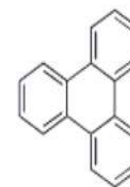
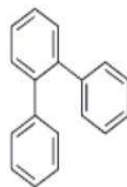
Tanaka teszt 2.

- Hidrofób szelctivitás α_{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.

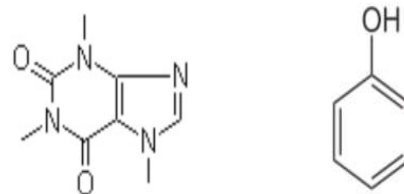


- $\alpha_{\text{T}/0} = k_{\text{T}} / k_0$

Tanaka teszt 3.

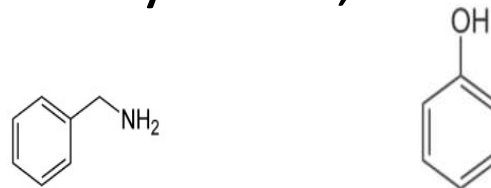
- Hidrogén kötés kapacitás $\alpha_{C/P}$ - Koffein és fenol retenciós tényezőjének hányadosa. Az oszlop hidrogén kötés kialakítási képességét írja le.

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



- 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)



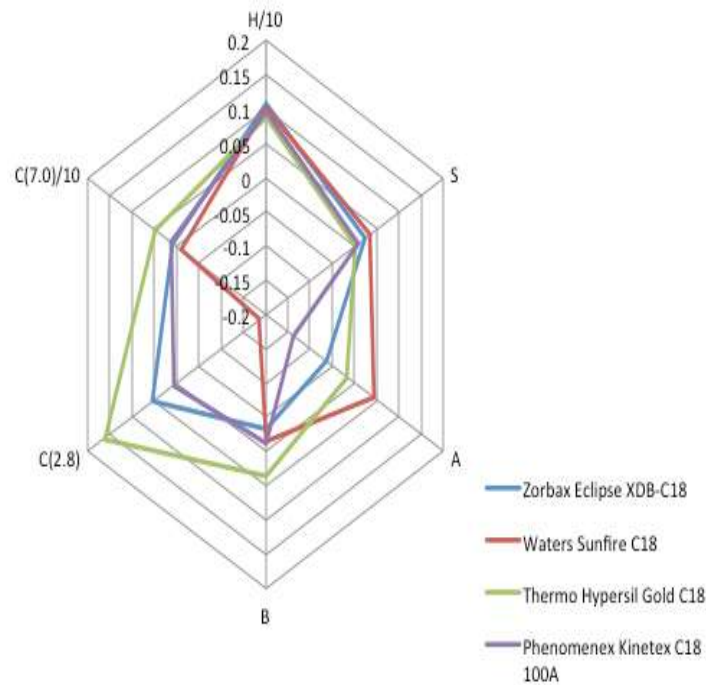
Tanaka teszt 4.

- Savas ioncsere kapacitás $\alpha_{B/P}$ pH 2,7 – 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: hidrofóbitás
- S: sztérikus vagy alak effektus
- A: „Hydrogen Bond Acidity” (Nagy A étékű 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



Manufacturer	Zorbax	Waters	Thermo	Phenomenex
Brand	Eclipse	Sunfire	Hypersil Gold	Kinetex
Style	XDB-C18	C18	C18	C18 100A
H	1.077	1.031	0.881	0.963
H/10	0.1077	0.1031	0.0881	0.0963
S	0.024	0.034	0.002	0.009
A	-0.063	0.044	-0.017	-0.137
B	-0.033	-0.014	0.036	-0.011
C (2.8)	0.055	-0.186	0.162	0.007
C (7.0) / 10	0.0088	0.0099	0.0479	0.0125
C (7.0)	0.088	-0.099	0.479	0.125

http://apps.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html

USP Database

About USP approach

To find an alternative column for your column of interest, please select this column in the list of columns already evaluated. If your column is not listed, it means that the data from the manufacturer has not been received yet.

Luna 5 μ C18(2) (Phenomenex)

Then select which parameters are more important for your chromatographic procedure:

CTF: CFA: TFA: BD:

The database will automatically display the first 10 columns that, theoretically, could be equivalent to your column. The column with rank 0 is your column. The smaller the F value more similar are the columns, at least theoretically.

Rank	F	Column	Hy	CTF	CFA	TFA	BD	USP Designation	Manufacturer
0	0	Luna 5 μ C18(2)	2.2	1.2	5.3	1.1	3.4	L1	Phenomenex
1	0.28	PurospherSTAR RP-18e 3 μ m	2.1	1.2	5.7	1.5	3.3	L1	Merck KGaA (EMD Millipore)
2	0.39	Acclaim 120 C18	2.3	1.2	5.6	1.6	3.2	L1	Dionex
3	0.42	Prevail Select C18	2	1.1	4	1.1	3.2	L1	Grace/Davison
4	0.52	SepaxHP-C18	2	1.2	6.8	1.81	3.3	L1	Sepax Technologies
5	0.52	Monitor C18	2.1	1.438	5.71	1.966	3.34	L1	Orochem Technologies
6	0.59	Symmetry C18	2.2	1.7	5.1	1.7	3.2	L1	Waters
7	0.61	Discovery HS C18	2.4	1	5.4	1.3	3.8	L1	Supelco
8	0.72	Prestige C18	2.21	1.194	6.61	2.176	3.084	L1	Orochem Technologies
9	0.73	Ascentis C18	2.7	1	6.2	1.3	3.6	L1	Supelco

PQRI Database

About the PQRI approach

Select the column that is under evaluation in the list of columns already evaluated. If your column is not listed, it means that the column manufacturer has not sent it for evaluation yet.

Luna C18(2) (Phenomenex)

You have the option to see the columns that are the most similar to the column of your interest, or the columns that are the most different (for applications in orthogonal methods), by selecting View Different or View Similar.

You are viewing similar columns.

View Different

Select the option Acids present, if there are acids present in the sample, or Bases present, if there are bases present in the sample. Select the pH of the mobile phase. The default is from 2.8 up to 7.0. pH values outside this range are not going to be accepted.

Acids present: Bases present: pH of mobile phase: 2.8 Update

The database will automatically display the first 10 columns that, theoretically, could be equivalent or very different to/from your column, depending on the option you selected. The column with rank 0 is your column. The smaller the F value more similar are the columns, at least theoretically. The higher the F value more different.

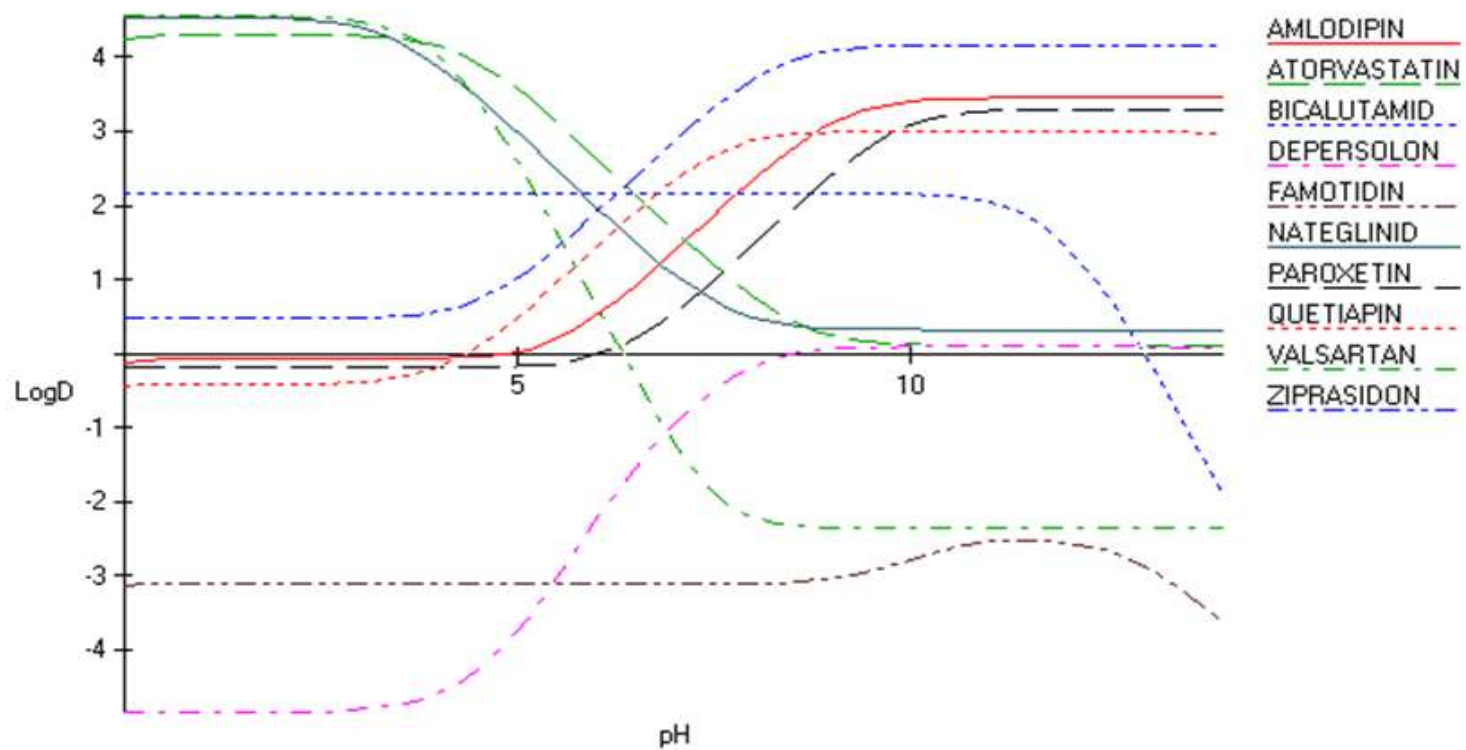
Rank	F	Column	H	S	A	B	C(2.8)	C(7.0)	Type	USP Designation	Manufacturer
0	0	Luna C18(2)	1.002	0.024	-0.124	-0.007	-0.269	-0.174	B	L1	Phenomenex
1	42.11	Inertsil ODS-EP	0.8	0.06	-1.52	0.05	-0.62	-0.07	EP	L60	GL Sciences
2	41.97	Flare C18+	1.137	-0.308	0.73	0.966	-0.507	1.178	Other		Diamond Analytic
3	35.27	Microsorb-MV 100 CN	0.357	-0.241	-0.852	-0.029	0.148	0.785	CN	L10	Agilent/Varian
4	31.15	BioBasic Phenyl	0.493	-0.233	-0.671	0.217	0.014	0.39	phenyl	L11	Thermo/Hypersil
5	30.17	Cosmosil 5PYE	0.671	-0.271	-0.283	0.092	0.521	1.318	Other		Nacal Tesque
6	29.73	apHera C18 Polymer	0.838	-0.01	-1.106	0.001	-0.554	7.511	B	L67	Supelco
7	29.45	Allure PFP Propyl	0.833	-0.265	0.051	0.348	1.109	1.659	F	L43	Restek
8	29.2	Zorbax Bonus RP	0.654	0.107	-1.046	0.373	-2.971	-1.103	EP	L60	Agilent Technologies
9	28.58	Cogent UDC Cholesterol	0.625	0.227	0.528	0.069	0.745	1.212	other		MicroSolv
10	28.18	ZirChrom-PS	0.589	-0.232	-0.477	0.062	1.75	1.75	other		ZirChrom

Miben segít a $\lg D$ – pH diagram?

Mi olvasható le a diagramról?

- Szükséges-e pH kontrol (ha igen milyen pH-n dolgozzunk)?
- Milyen kromatográfiás technikát alkalmazzunk (RP-HPLC, HILIC)?
- Kell-e gradiens elúciót alkalmaznunk ($\Delta \lg P \geq 2$)?
- Mi lesz a retenciós sorrend?

Pallas szoftver – lgD-pH függvény



Chemdesk szoftver – lgD-pH függvény

