

**AZ ELVÁLASZTÁSTECHNIKA KORSZERŰ
MÓDSZEREI
IV.**

Dr. Balla József

2019. őszi félév

A kémiai analízis az elválasztások művészete.

Elválasztástechnika?

- Ipari elválasztások
- Analitikai elválasztási módszerek:
 - ***mechanikai módszerek***: szűrés, ultraszűrés, centrifugálás, flotálás, stb.
 - ***kémiai módszerek***: szelektív oldás, feltárás, stb.
 - ***fizikai-kémiai módszerek***: desztillációs módszerek (egyensúlyi, desztilláció, frakcionált desztilláció, vízgőz desztilláció, molekuláris desztilláció), **extrakciós elválasztások**, **kromatográfiás módszerek**, **elektroforetikus módszerek**, **kapcsolt módszerek** (GC-MS, HPLC-MS, ICP-MS, TG-MS), stb.
 - ***biológiai-biokémiai elválasztások***: enzim-szubsztrát, antigén-antitest kölcsönhatások, stb.

Az elválasztások

**A,B,C,...X halmaz
összetett mátrix**



**A / B / C /...X
egyedi halmaz**

Az analitikai cél:

- mintaelőkészítés
- **analízis**

Mintaelőkészítés

- **Gáz extrakciós módszerek (VOC)**
 - HS-GC
 - „Purge and Trap”
 - SPME-HS-GC
- **Folyadék extrakciós módszerek (Soxhlet)**
 - folyadék-gáz extrakció: elnyeletés (abszorpció)
 - folyadék-folyadék extrakció: rázótlöcséres extrakció, ultrahangos extrakció,
 - folyadék-szilárd extrakció (Soxhlet)
 - permeációs mintavétel
- **Szilárd extrakciós módszerek:**
 - adszorpciós gázmintavétel
 - SPE megoldásai (SVOC, NVOC), diszperziós SPE
 - SPME (immerziós)
 - twister, ITEX (in-tube extraction), MEPS (microextrction by packed sorbent)

Kromatográfiás módszerek I.

- GC
- töltetes,
- HRGC,
- **fast GC**

Kromatográfiás elválasztások II.

- 1. Normál fázisú (NP) HPLC
- 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 „kromatográfia”(CPC)
- 12. Elektroforetikus és elektrokromatográfiás módszerek

Kromatográfiás elválasztások III.

- TLC
- OPLC
- Kapcsolt technikák GC-MS, LC-MS
- 2D elválasztások
- CPC

Követelmények

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

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

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

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

4. Ismételhetőség

5. Minimális ráfordítás

A korszerű kromatográfiás módszerek alapja:

a hatékonyság növelése

=

a relatív csúcshélesség csökkentése

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \cdot \left(\frac{w}{t_R} \right)^2$$

Golay egyenlet

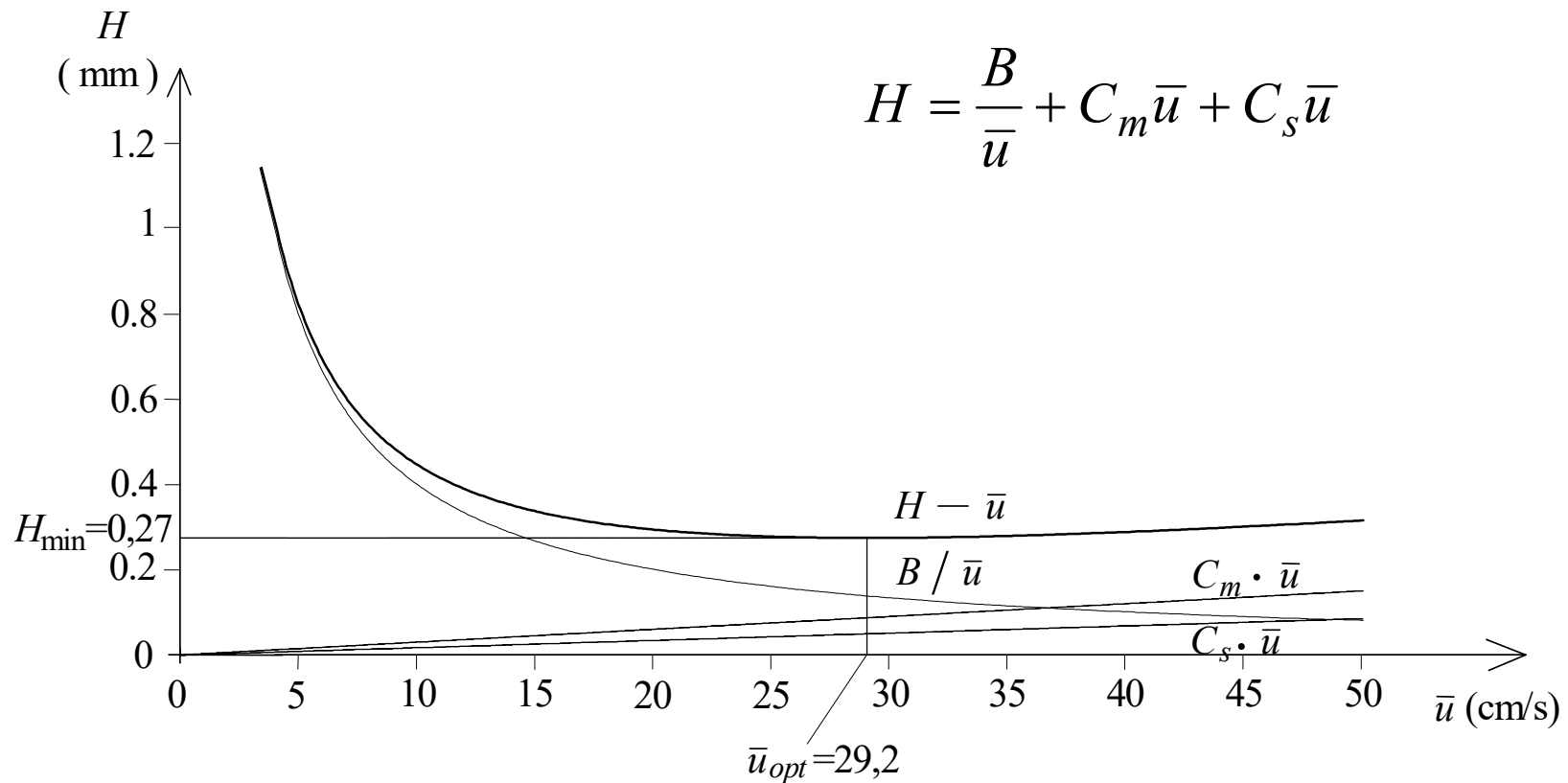
$$H = \frac{2D_m}{\bar{u}} + \frac{1 + 6k + 11k^2}{24(1+k)^2} \frac{r_c^2}{D_m} \bar{u} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} \bar{u}$$

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

van Deemter egyenlet

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

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

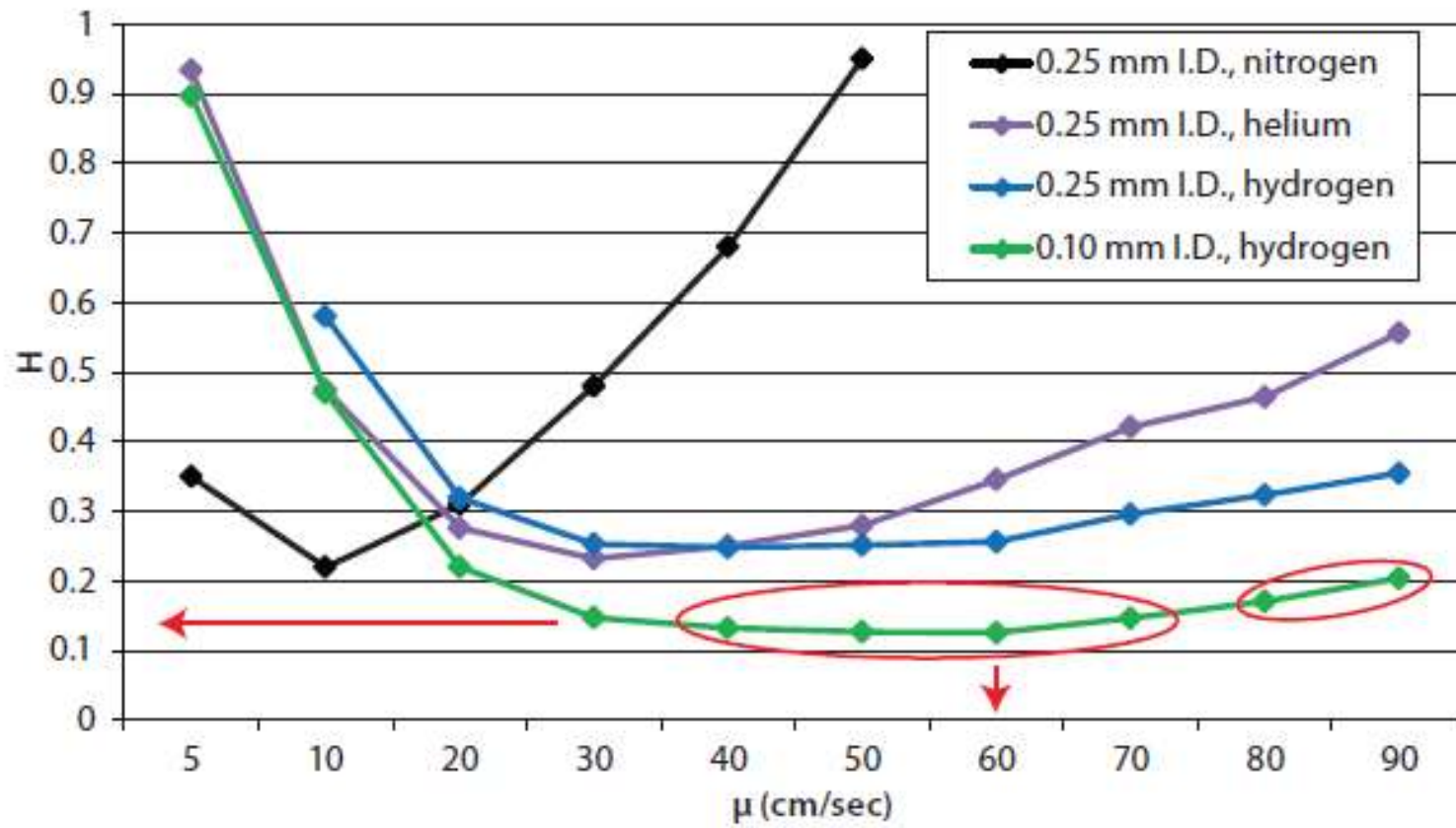


Fast GC $k \rightarrow 0$

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

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

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



**A kolonna átmérő (sugár) szerepe:
„micro bore” kolonnák!
Minőségi különbség!**

$$\Delta p * j = \frac{8L\eta\bar{u}}{r_c^2}$$

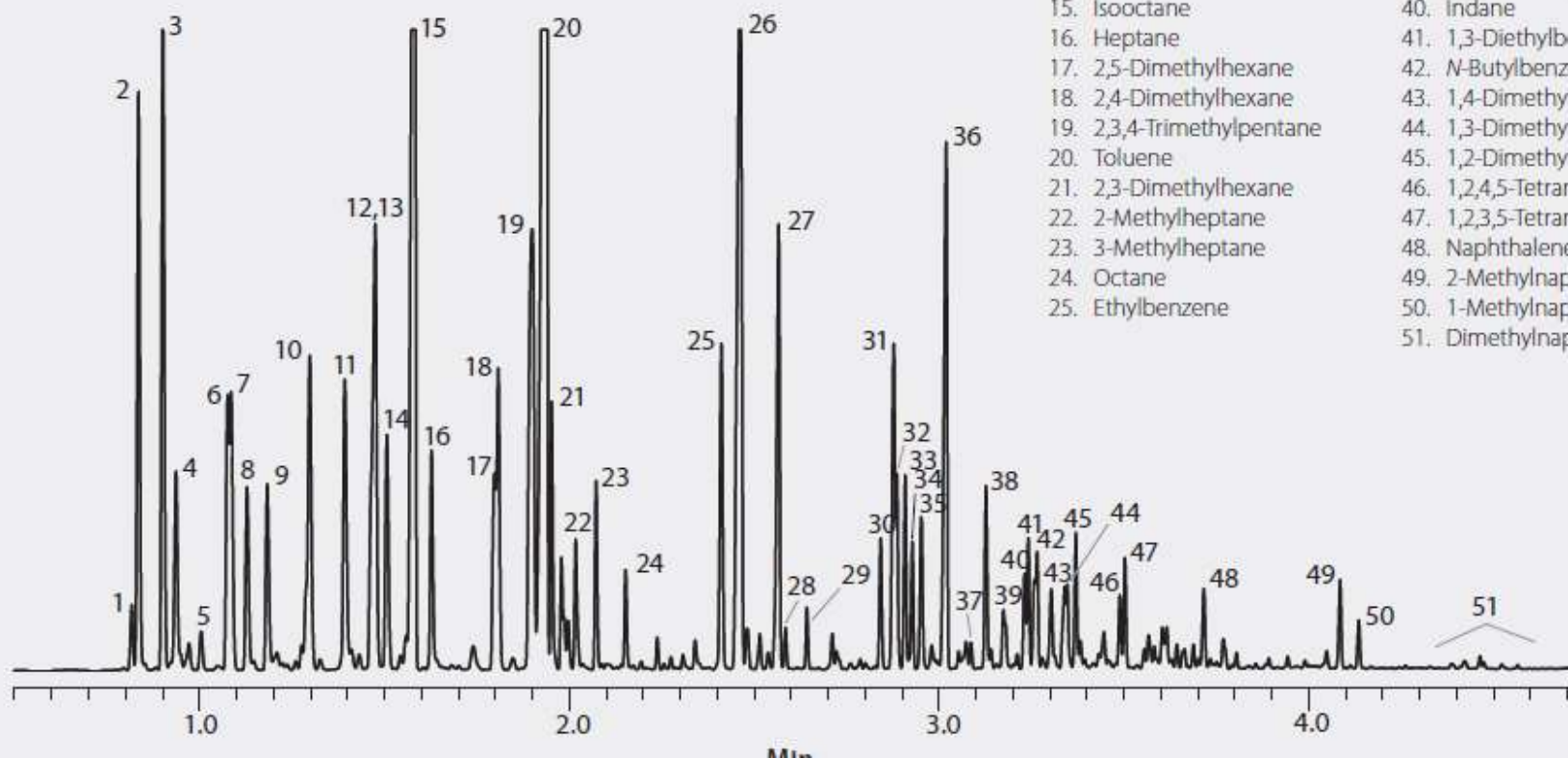
<i>u cm/s</i>	0,1mm	0,25 mm	0,53 mm
30	5,6 bar	0,9	0,2
80	15,1 bar	2,4	0,5

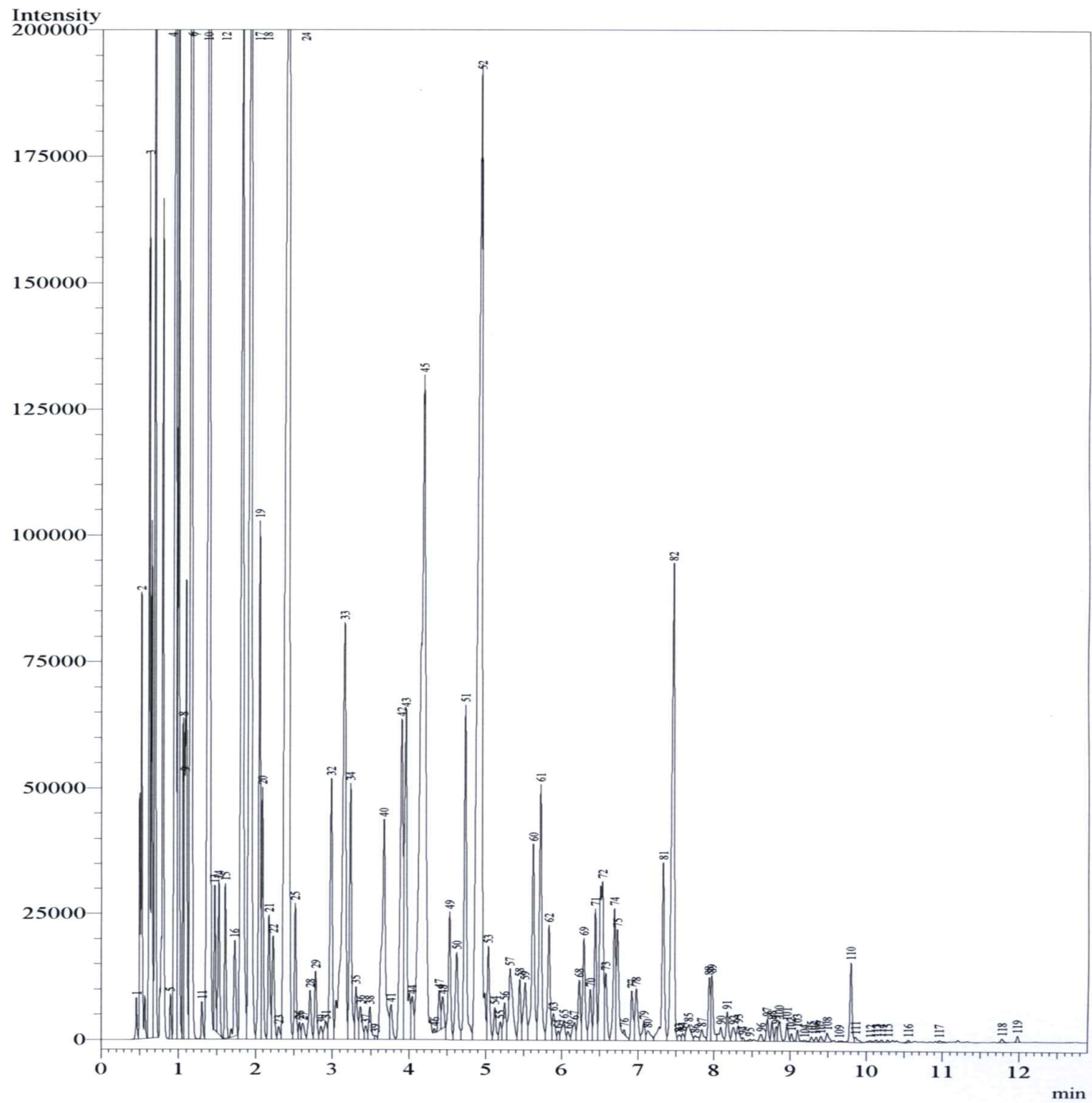
L=25m, 100 °C, He

Rövidebb kolonna kell!

column: Equity-1, 15 m x 0.10 mm I.D., 0.10 μm (28039-U)
 oven: 40 °C (1 min), 45 °C/min to 150 °C (2 min)
 inj.: 175 °C
 det.: FID, 175 °C
 carrier gas: hydrogen, 45 cm/sec constant
 injection: 0.1 μL, 300:1 split
 liner: 2 mm I.D., straight
 sample: unleaded gasoline (refinery standard), neat

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1. Isobutane | 26. <i>m</i> - <i>p</i> -Xylene |
| 2. Butane | 27. <i>o</i> -Xylene |
| 3. Isopentane | 28. Nonane |
| 4. Pentane | 29. iso-Propylbenzene |
| 5. 2,2-Dimethylbutane | 30. Propylbenzene |
| 6. 2,3-Dimethylbutane | 31. 1-Methyl-3-ethylbenzene |
| 7. 2-Methylpentane | 32. 1-Methyl-4-ethylbenzene |
| 8. 3-Methylpentane | 33. 1,3,5-Trimethylbenzene |
| 9. Hexane | 34. 3,3,4-Trimethylheptane |
| 10. 2,4-Dimethylpentane | 35. 1-Methyl-2-ethylbenzene |
| 11. Benzene | 36. 1,2,4-Trimethylbenzene |
| 12. 2-Methylhexane | 37. iso-Butylbenzene |
| 13. 2,3-Dimethylpentane | 38. sec-Butylbenzene |
| 14. 3-Methylhexane | 39. 1,2,3-Trimethylbenzene |
| 15. Isooctane | 40. Indane |
| 16. Heptane | 41. 1,3-Diethylbenzene |
| 17. 2,5-Dimethylhexane | 42. <i>N</i> -Butylbenzene |
| 18. 2,4-Dimethylhexane | 43. 1,4-Dimethyl-2-ethylbenzene |
| 19. 2,3,4-Trimethylpentane | 44. 1,3-Dimethyl-4-ethylbenzene |
| 20. Toluene | 45. 1,2-Dimethyl-4-ethylbenzene |
| 21. 2,3-Dimethylhexane | 46. 1,2,4,5-Tetramethylbenzene |
| 22. 2-Methylheptane | 47. 1,2,3,5-Tetramethylbenzene |
| 23. 3-Methylheptane | 48. Naphthalene |
| 24. Octane | 49. 2-Methylnaphthalene |
| 25. Ethylbenzene | 50. 1-Methylnaphthalene |
| | 51. Dimethylnaphthalenes |





Kapcsolt technikák (hyhpened)

- GC-MS
- HPLC-MS

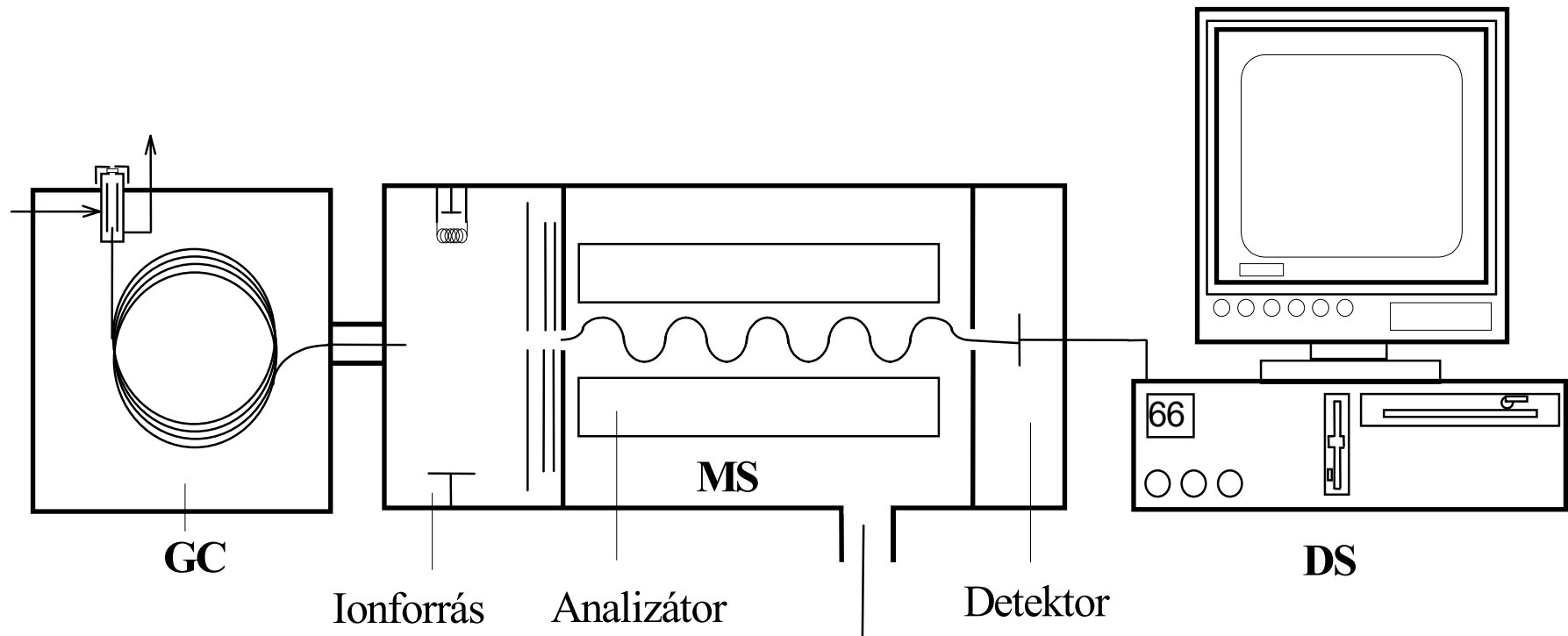
A GC és az MS kompatibilitása:
gázfázisú elválasztás-gázfázisú ionizáció

1. Ionkémiai folyamatok

A molekula ionizációja



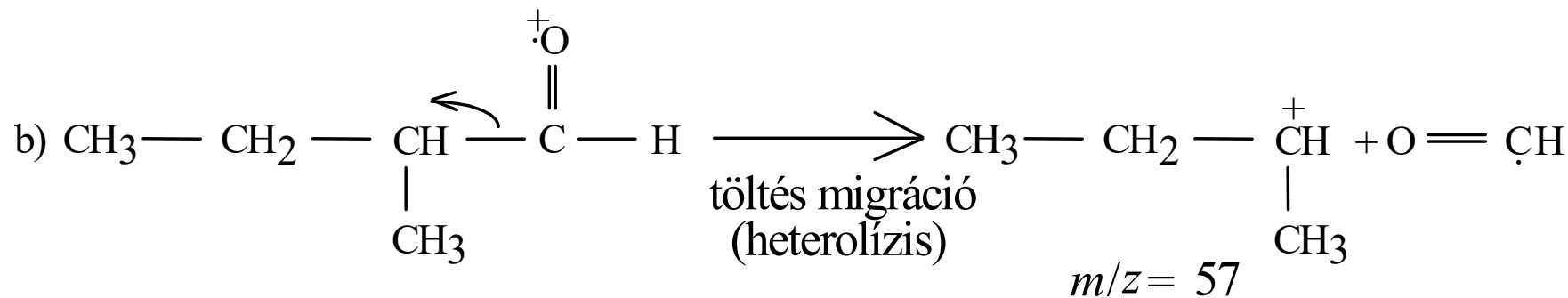
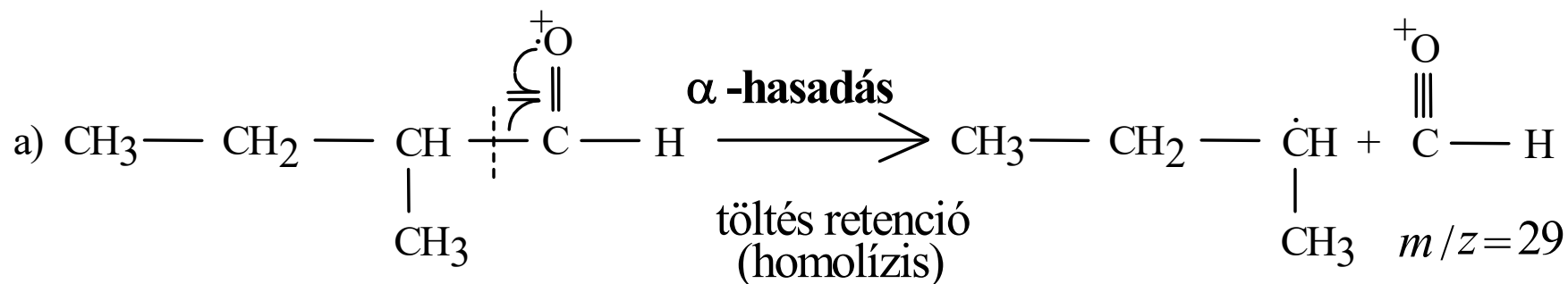
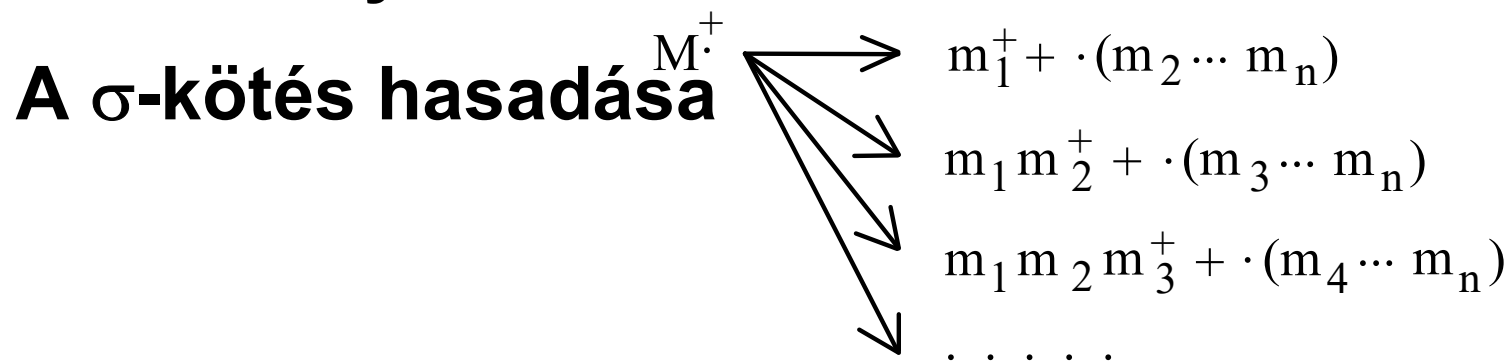
GC-MS-DS



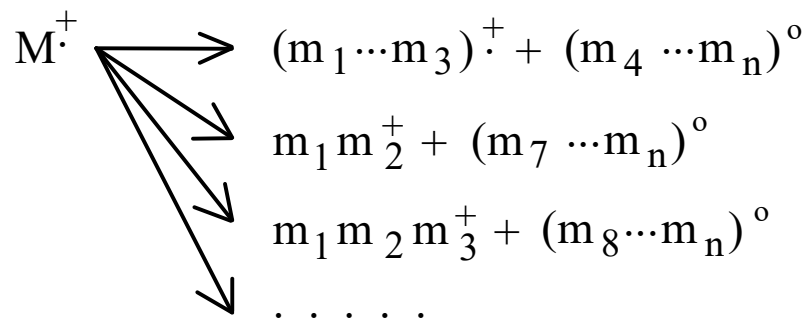
Atmoszférikus nyomás:
 $\sim 10^5$ Pa

Vákuum rendszer
 10^{-3} - 10^{-5} Pa

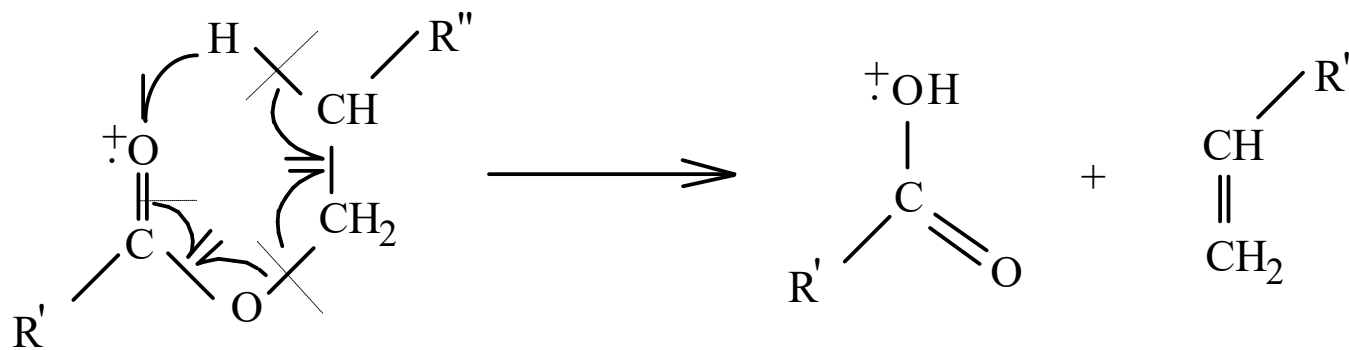
2. Ionkémiai folyamatok

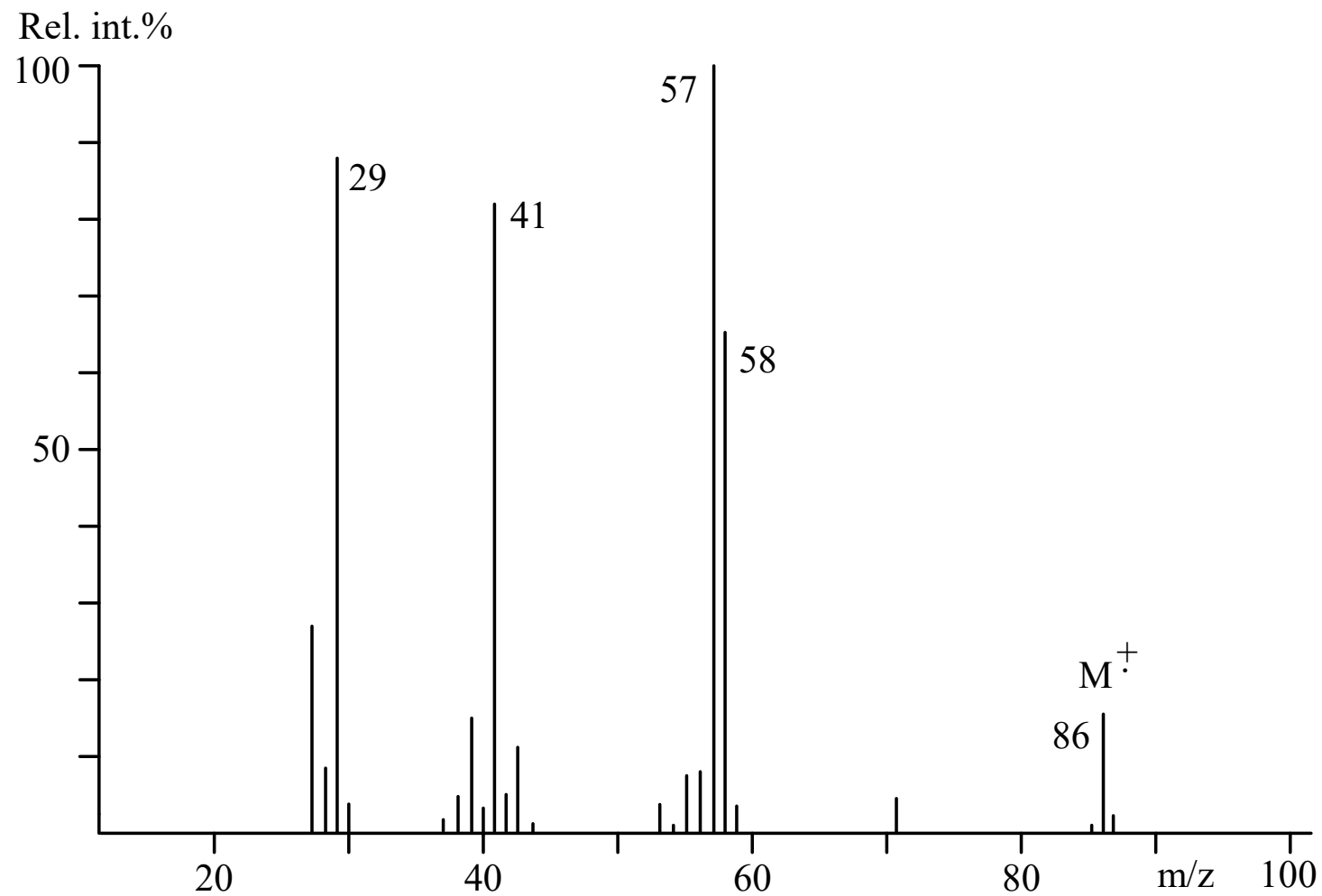


3. Ionkémiai folyamatok Átrendeződések



Pl. McLafferty-átrendeződés





A 2-metil-butanal EI tömegspektruma

Izotóp	Atomtömeg	Gyakoriság %	Relatív gyak.%
¹ H	1,007825	99,985	100
² H	2,014102	0,015	0,016
¹² C	12,000000	98,89	100
¹³ C	13,003354	1,11	1,12
¹⁴ N	14,003074	99,63	100
¹⁵ N	15,000108	0,37	0,37
¹⁶ O	15,994915	99,79	100
¹⁷ O	16,999133	0,037	0,04
¹⁸ O	17,999160	0,204	0,204
¹⁹ F	18,998405	100	100
³¹ P	30,993763	100	100
³² S	31,972094	95,02	100
³³ S	32,971461	0,78	0,79
³⁴ S	33,967865	4,22	4,44
³⁶ S	35,967079	0,11	0,11
³⁵ Cl	34,968852	75,77	100
³⁷ Cl	34,965903	24,23	31,98
⁷⁹ Br	78,918336	50,69	100
⁸¹ Br	80,916289	49,31	97,28
²⁸ Si	27,976927	92,23	100
²⁹ Si	28,976495	4,67	5,06
³⁰ Si	29,973770	3,10	3,36

A spektrumok értelmezését segítő szabályok

1. Paritások
2. N-szabály
3. telítetlenség
4. a spektrum jellege

Izotópok szerepe a tömegspektrumok értelmezésében

Az **n+1** szabály

Az ionintenzitások aránya = a polinom tagjainak aránya

$$(a+b+\dots)^n(x+y+\dots)^m(t+z+\dots)^p\dots$$

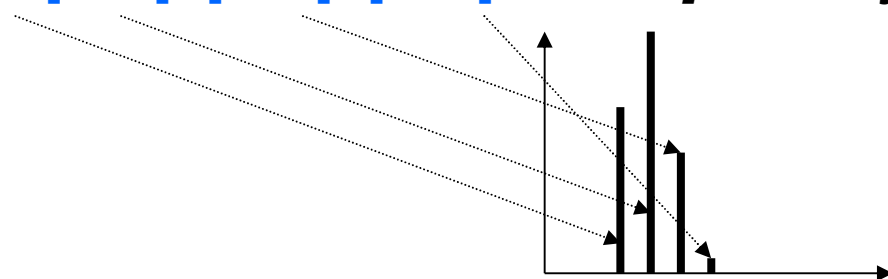
a, b, x, y, t, z, ...: az izotópok gyakorisága

n, m, p, ...: az többizotópos atomok száma

pl. **R-Cl₂Br⁺** $(a+b)^n(x+y)^1 = (a^2+2ab+b^2)(x+y) = a^2x+2abx+b^2x+a^2y+2aby+b^2y$

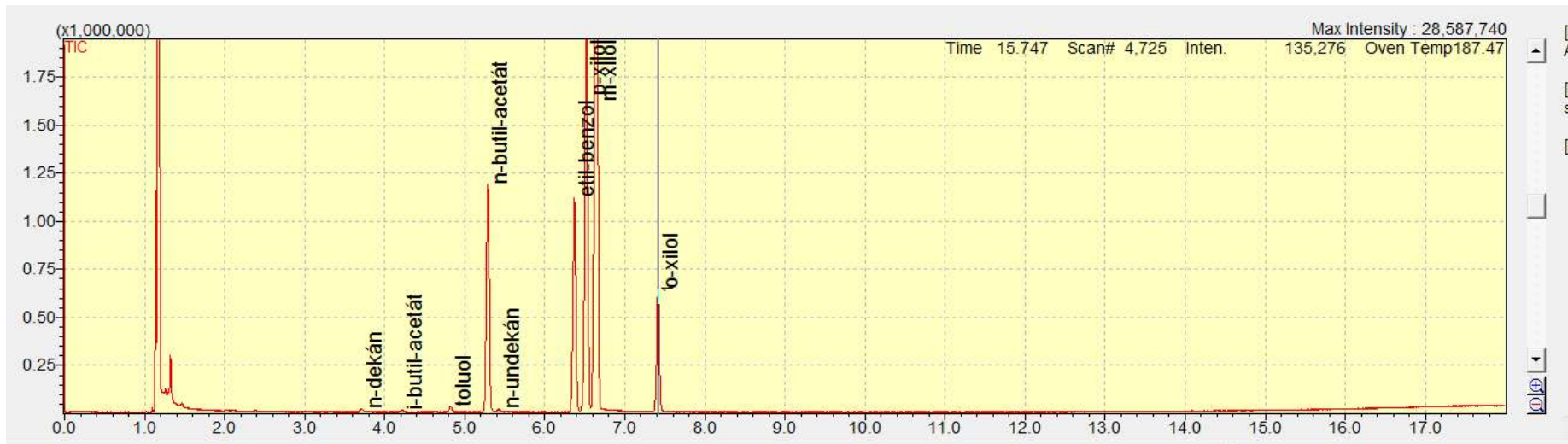
R- ³⁵ Cl ³⁵ Cl ⁷⁹ Br	M ⁺	a ² x	a=3 (75,77%), b=1 (24,23%), x=1 (50,69%), y=1 (49,31%)
R- ³⁷ Cl ³⁵ Cl ⁷⁹ Br	[M+2] ⁺	2abx	
R- ³⁷ Cl ³⁷ Cl ⁷⁹ Br	[M+4] ⁺	b ² x	
R- ³⁵ Cl ³⁵ Cl ⁸¹ Br	[M+2] ⁺	a ² y	
R- ³⁷ Cl ³⁵ Cl ⁸¹ Br	[M+4] ⁺	2aby	
R- ³⁷ Cl ³⁷ Cl ⁸¹ Br	[M+6] ⁺	b ² y	

$$M^+ : [M+2]^+ : [M+4]^+ : [M+6]^+ = a^2x : [2abx+a^2y] : [b^2x+2aby] : b^2y = 9 : 15 : 7 : 1$$

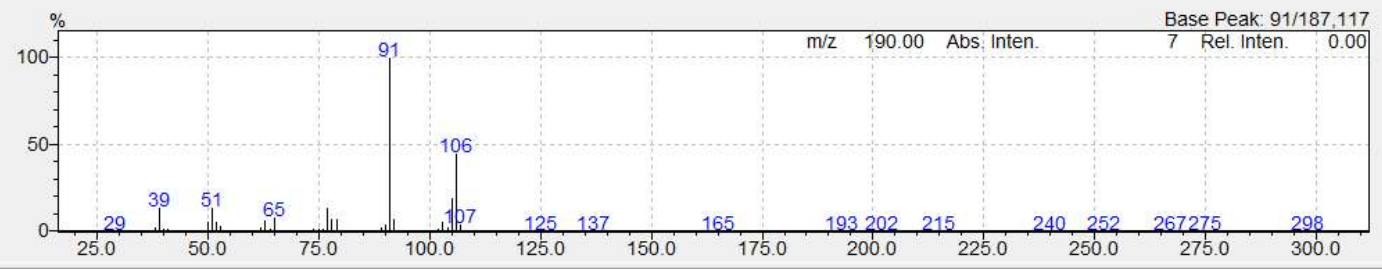


GC-MS üzemmódok

- Pásztázó üzemmódú mérés (SCAN): minőségi azonosítás, mennyiségi elemzés a rekonstruált kromatogram (TIC) alapján
- Szelektív ionkövetéses mérés (SIM): az azonosított alkotók mennyiségi elemzése kiválasztott ionok csúcsai alapján



Event#1: Scan Ret.Time: [7.410 -> 7.417] - [7.383 <-> 7.457] Scan#: [2224 -> 2226] - [2216 <-> 2238]

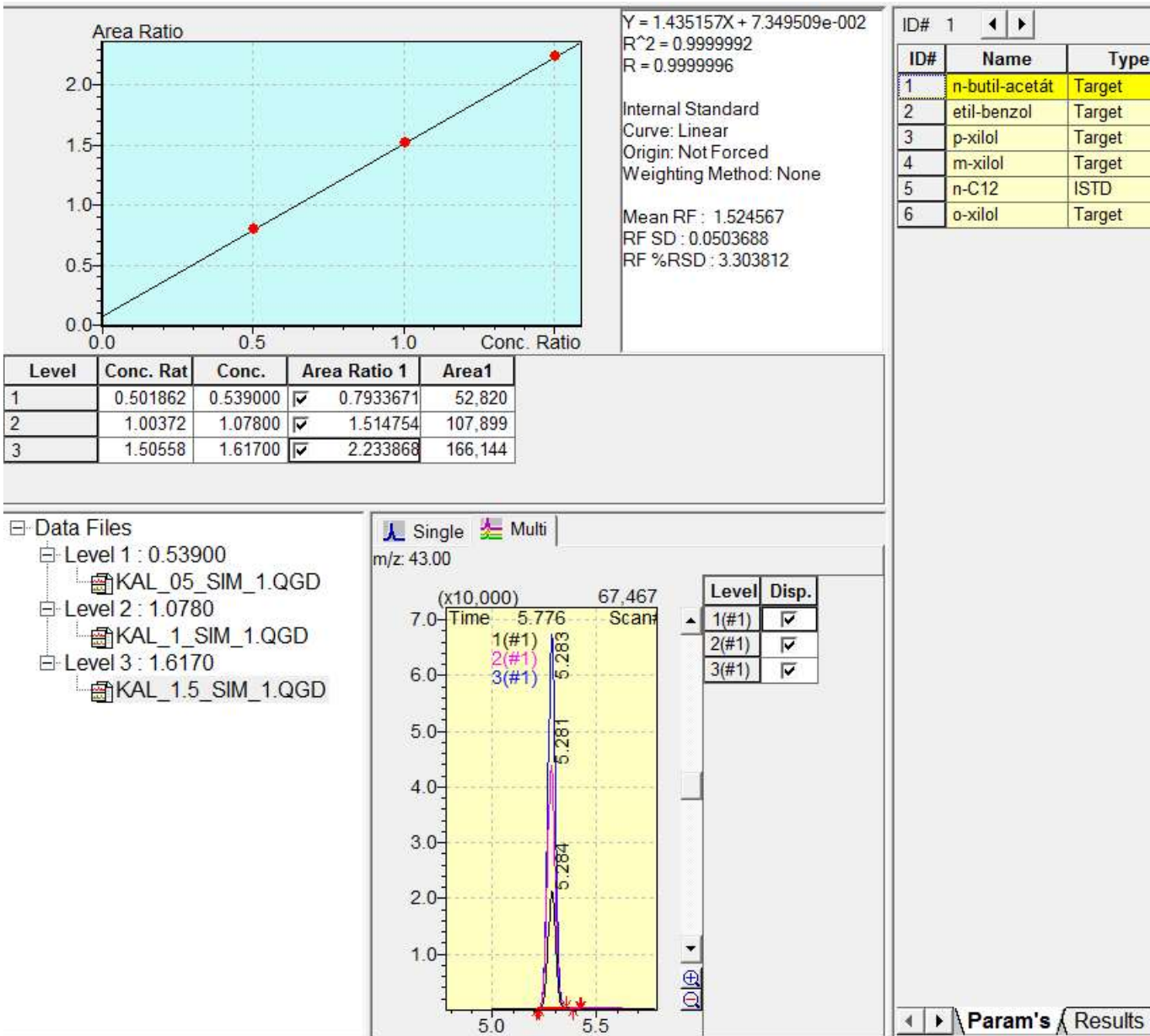


ID#	Name	Type	ISTD Gr
1	n-butil-acetát	Target	1
2	etil-benzol	Target	1
3	p-xilol	Target	1
4	m-xilol	Target	1
5	o-xilol	Target	1

Param's Results

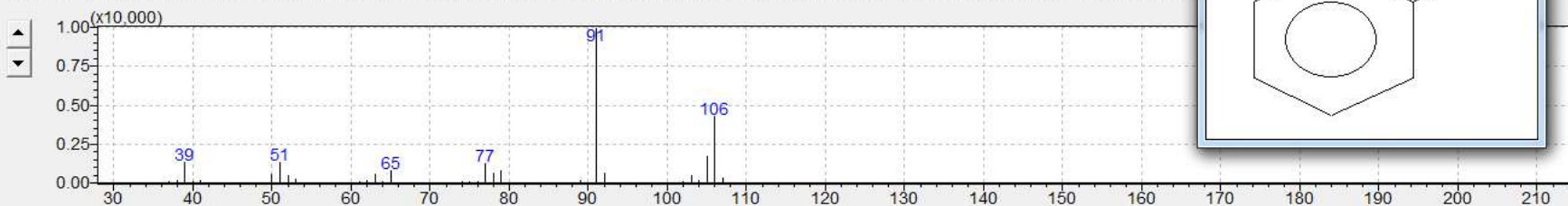
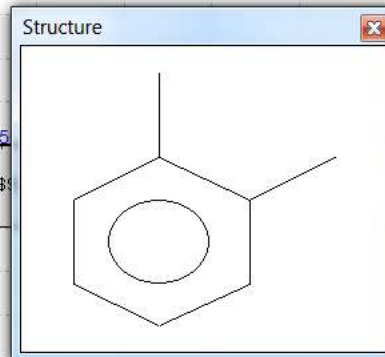
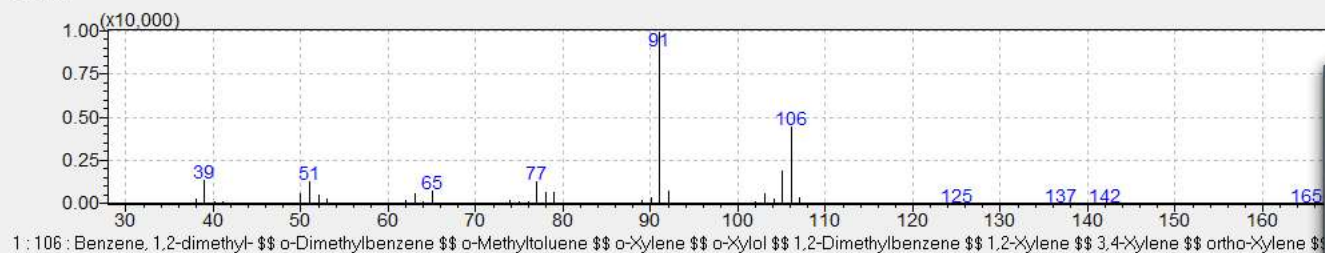
Group#1 - Event#1

	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z	Ch1 m/z	Ch2 m/z	Ch3 m/z
1	5.00	6.00	SIM	0.20				43.00	0.00	0.00
2	7.00	7.70	SIM	0.30				57.00	91.00	0.00
3	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00			

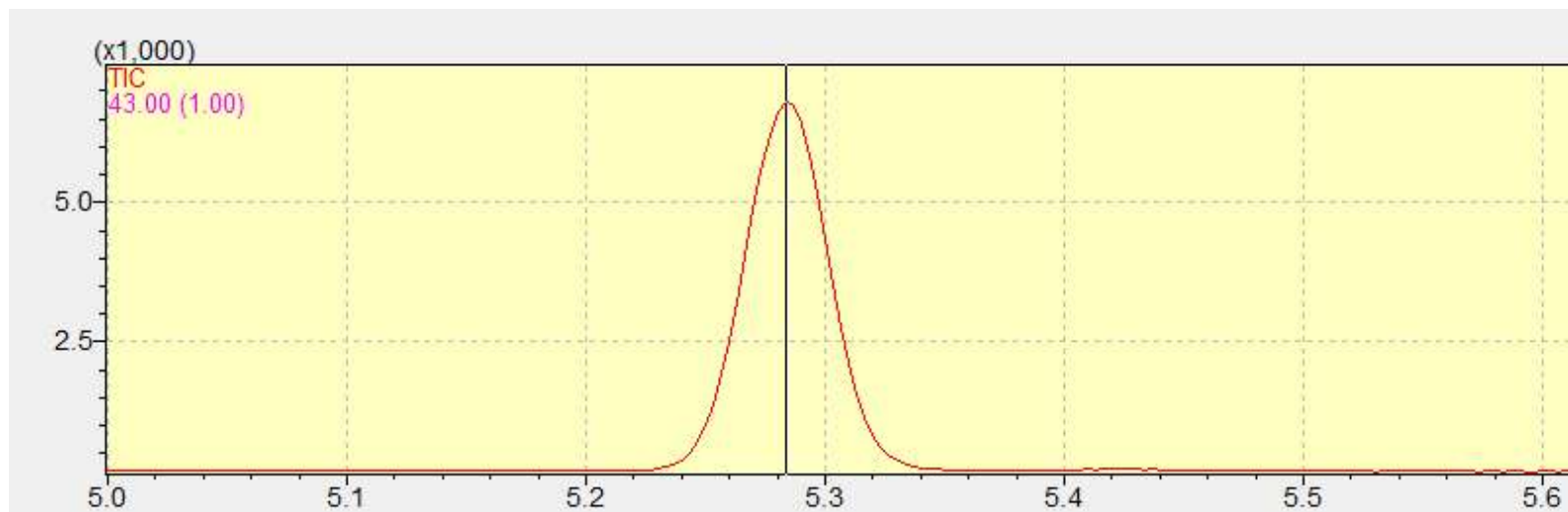


Hit#	Similar	Regist	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	99	<input checked="" type="checkbox"/>	Benzene, 1,2-dimethyl- \$\$ o-Dimethylbenzene \$	106	C8H10	NIST107.LIB
2	96	<input type="checkbox"/>	Benzene, 1,3-dimethyl- \$\$ m-Xylene \$\$ m-Dimet	106	C8H10	NIST107.LIB
3	94	<input type="checkbox"/>	p-Xylene \$\$ Benzene, 1,4-dimethyl- \$\$ p-Dimeth	106	C8H10	NIST107.LIB
4	93	<input type="checkbox"/>	Ethylbenzene \$\$ Benzene, ethyl- \$\$ Ethylbenzol	106	C8H10	NIST107.LIB
5	91	<input type="checkbox"/>	1,3-Cyclopentadiene, 5-(1-methylethylidene)- \$\$	106	C8H10	NIST107.LIB
6	90	<input type="checkbox"/>	Cyclopentene, 1-ethenyl-3-methylene- \$\$	106	C8H10	NIST107.LIB
7	87	<input type="checkbox"/>	2,4-Octadiyne \$\$	106	C8H10	NIST107.LIB
8	87	<input type="checkbox"/>	Benzeneethanol, alpha., beta.-dimethyl- \$\$ 3-Ph	150	C10H14O	NIST107.LIB
9	87	<input type="checkbox"/>	Hydroxylamine, o-(phenylmethyl)- \$\$ Hydroxyla	123	C7H9NO	NIST107.LIB

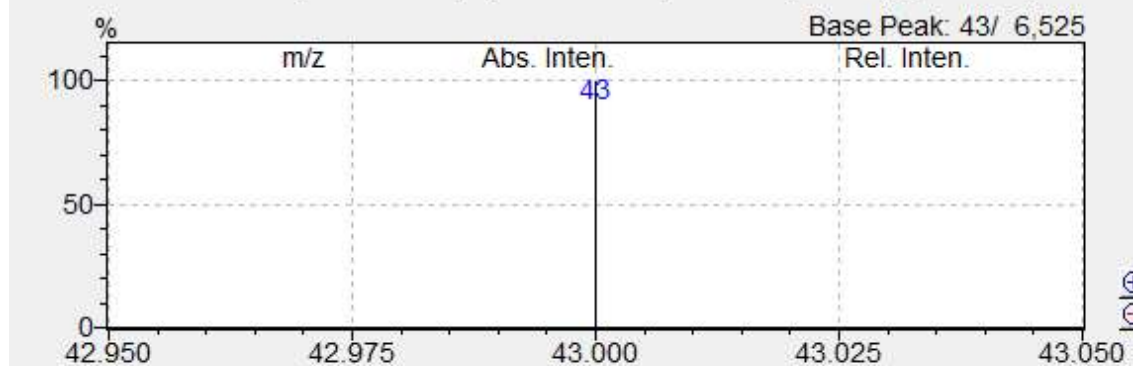
Target:



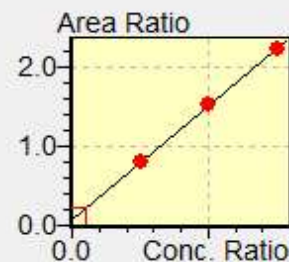
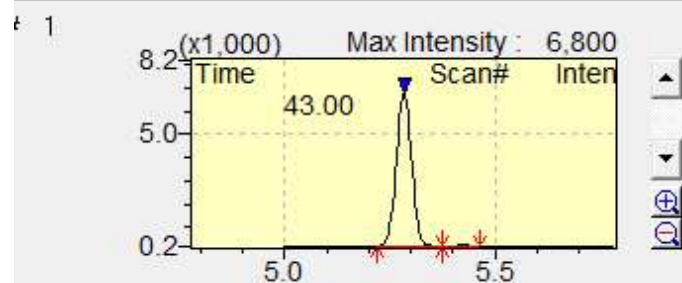
CAS#: 95-47-6 Mol Wt: 106 Serial#: 2460
 Cmpd Name: Benzene, 1,2-dimethyl- \$\$ o-Dimethylbenzene \$\$ o-Methyltoluene \$\$ o-Xylene \$\$ o-Xylol \$\$ 1,2-Dimethylbenzene \$\$ 1,2-Xylene \$\$ 3,4-Xylene \$\$ ortho-Xylene \$\$ UN 1307 \$\$ Benzene, 1-2-dimethyl- \$\$
 Formula: C8H10 Class Flag: No Class Flags.



Event#1:SIM Ret.Time : [5.280 -> 5.287] - [5.220 <-> 5.373] Scan# : [85 -> 87] - [67 <-> 113]



ID#	Name	Conc
1	n-butyl-acetát	0.1073
2	etil-benzol	No peak is det
3	p-xilol	No peak is det
4	m-xilol	No peak is det
5	n-C12	1.0000
6	o-xilol	0.0890



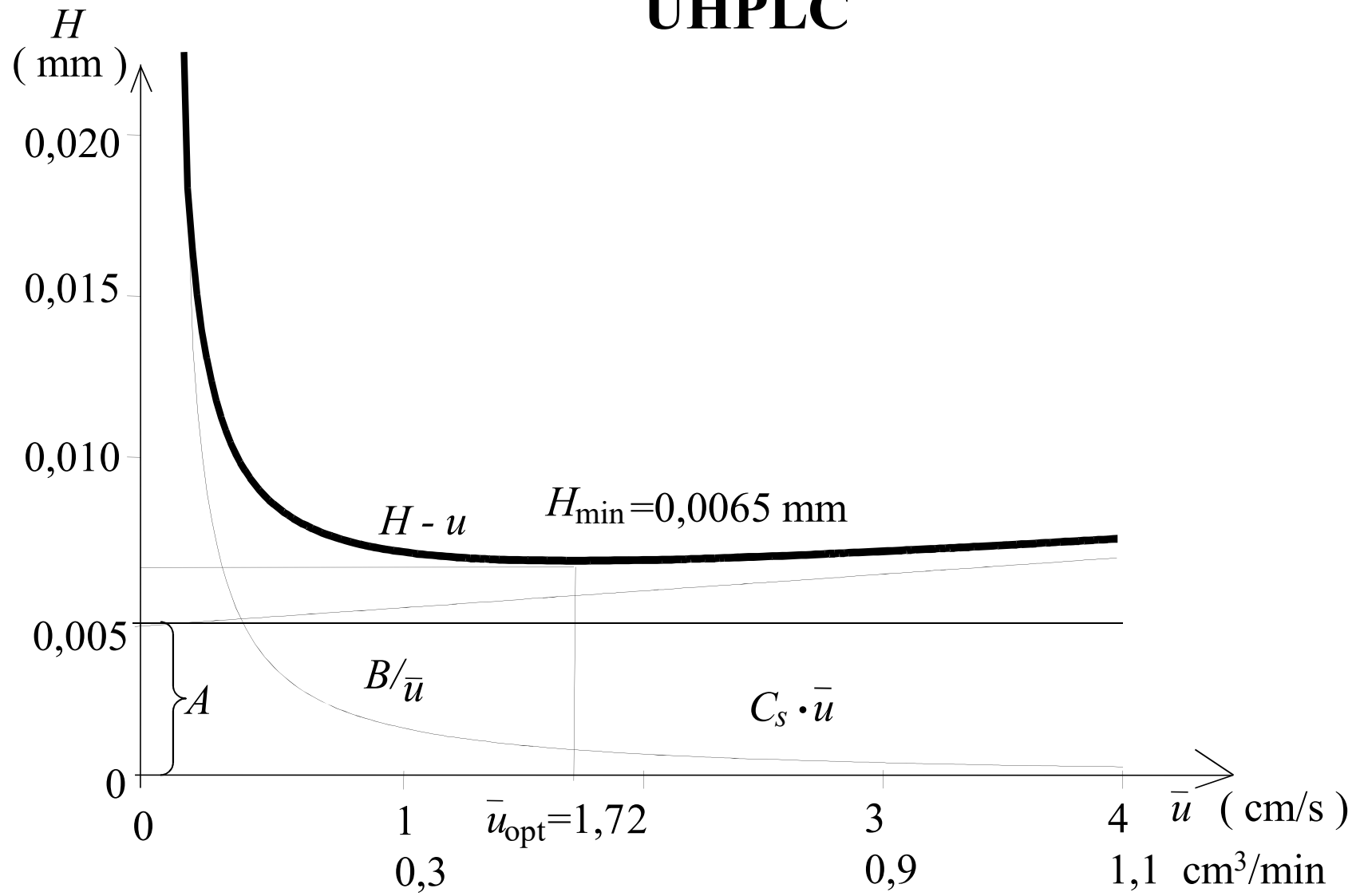
Param's Results G

UHPLC

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

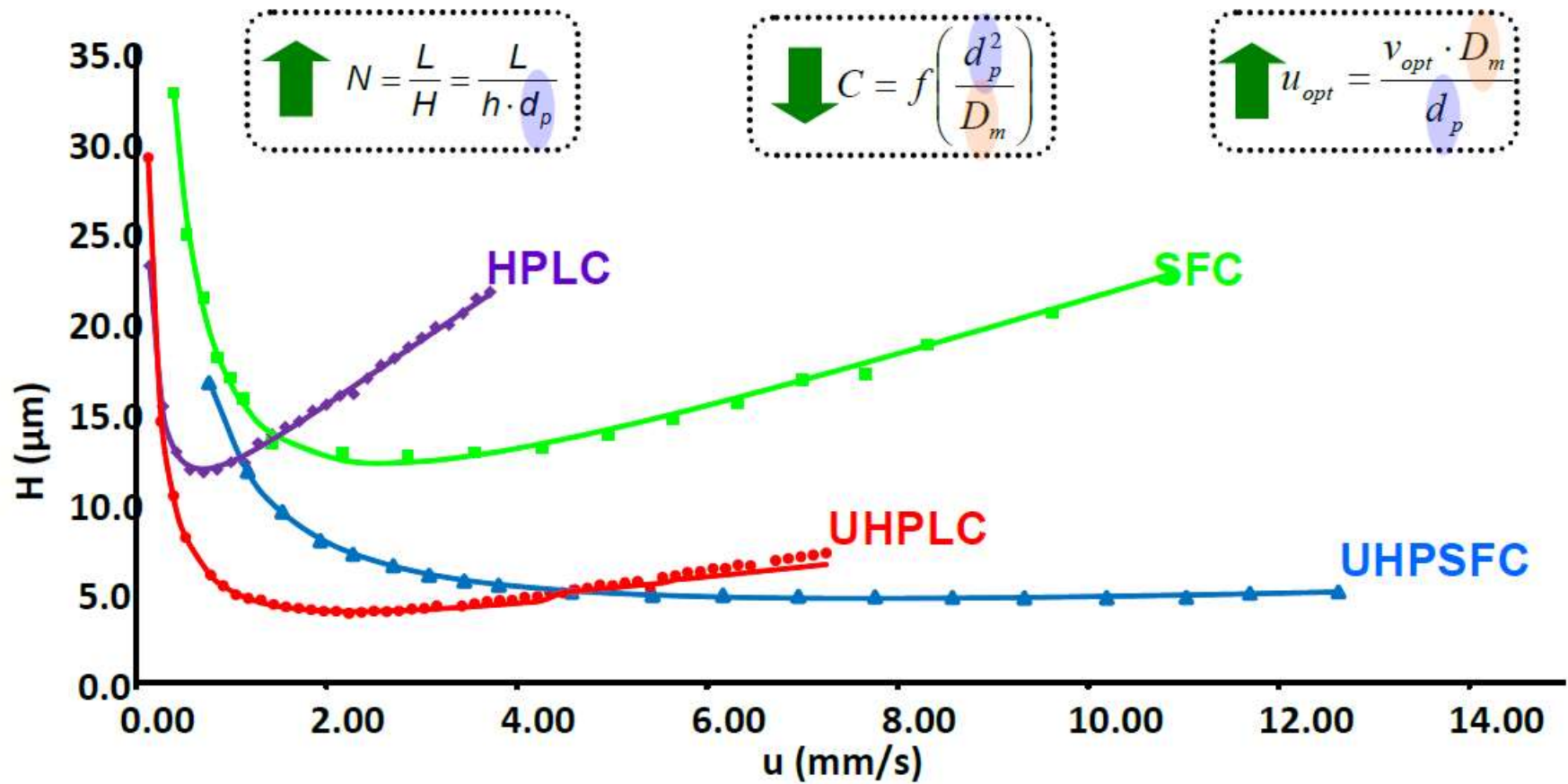
$$H_{p\acute{o}rusdiff} = \frac{\Theta(k_0 + k + k_0 k)^2 \bar{d}_{p\acute{o}rus}^2 u}{30(1+k_0)^2 (1+k)^2 D_m k_0}$$

UHPLC

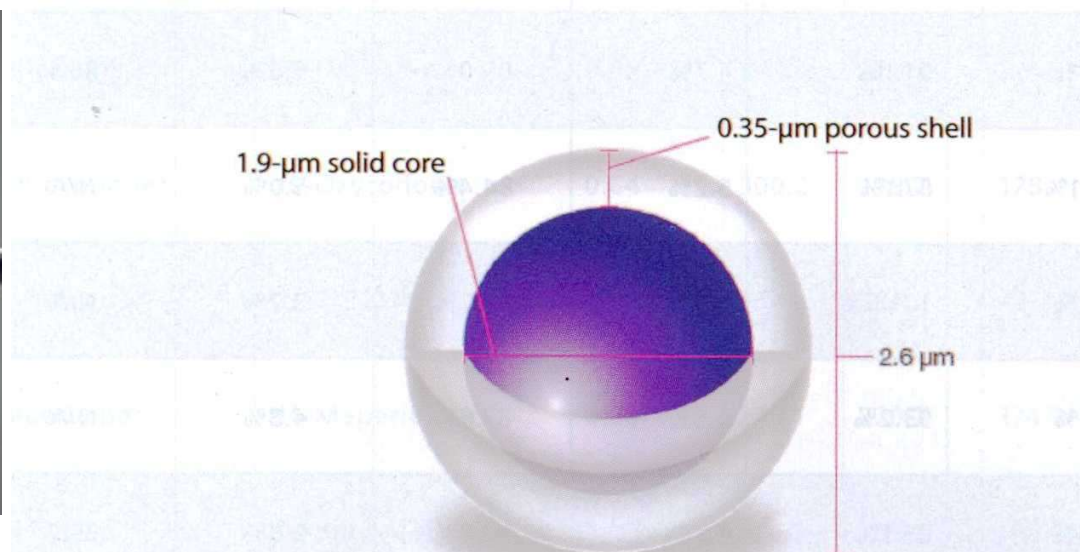
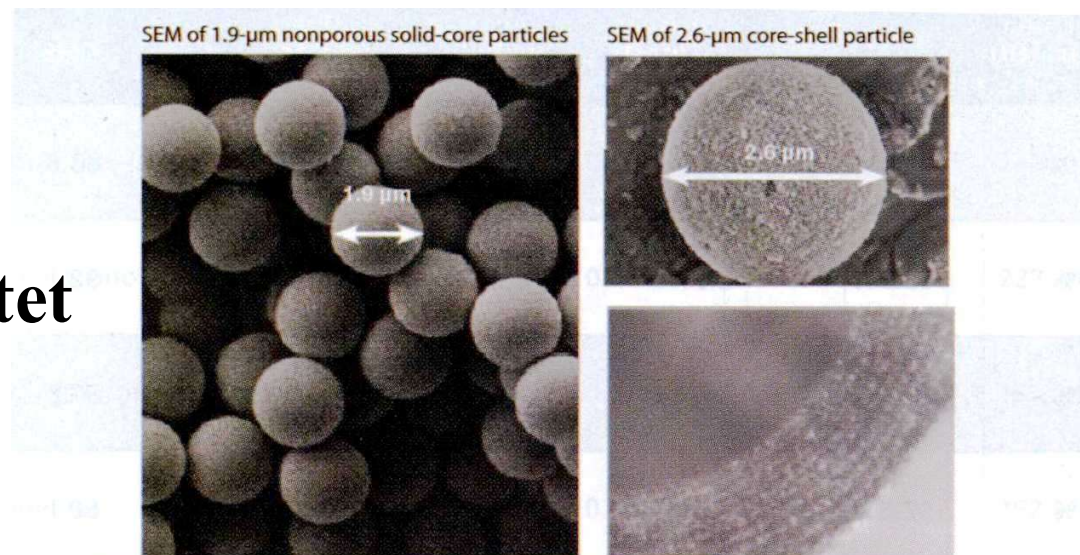


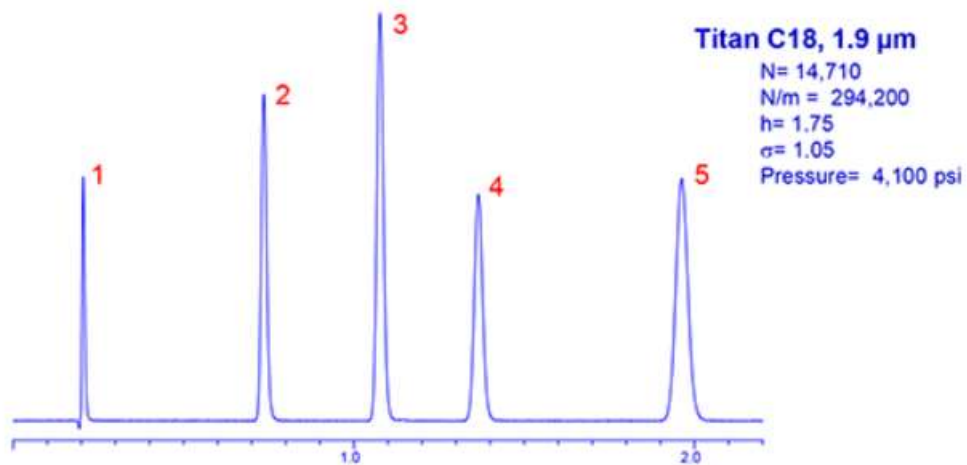
**A szilikagél mint állófázis alapanyag:
polikovasavak halmaza
a leggyakrabban használt állófázis**

- 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%



Héjszerkezetű töltet





Conditions

column: 5 cm x 3.0 mm I.D.

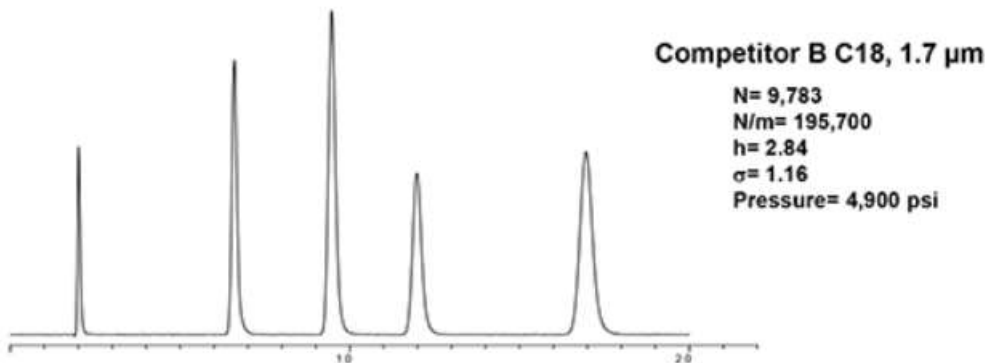
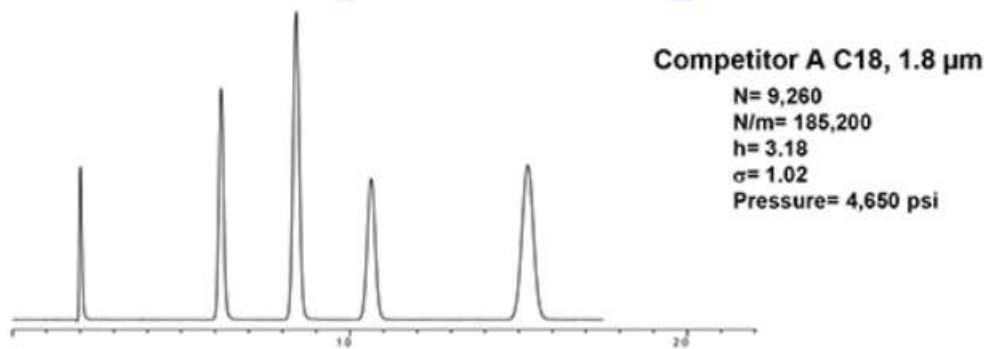
mobile phase: 60% acetonitrile

flow rate: 0.9 mL/min

temp.: 35 °C

det.: 254 nm

1. Uracil
2. Diazepam
3. Toluene
4. Naphthalene
5. Biphenyl



Áramlás szemcsés tölteten

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

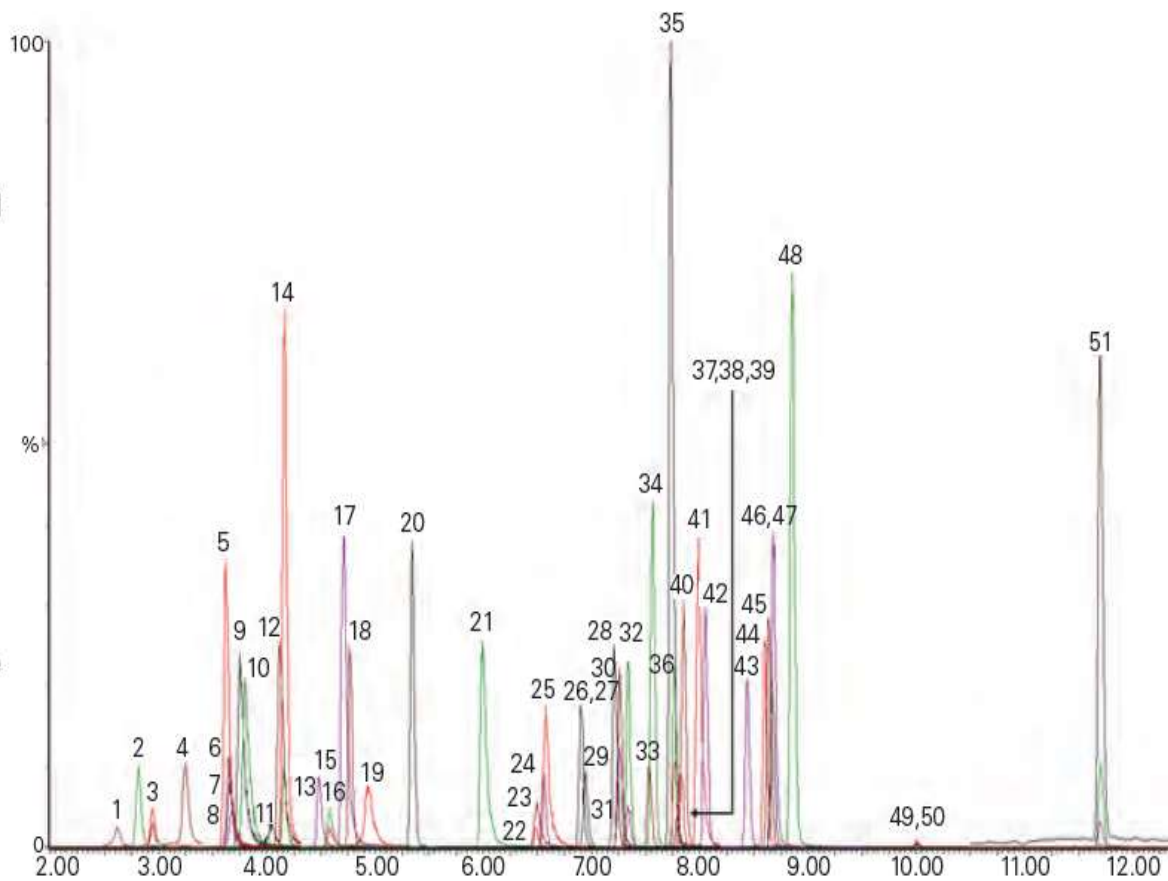
$$\Delta p = \frac{Lu\eta\varphi}{d_p^2}$$

Tudatmódosítók

Column: ACE Excel 1.7 C18
Dimensions: 100 x 2.1 mm
Part Number: EXL-171-1002U
Mobile Phase: A: 5 mM ammonium acetate in H₂O
 B: 5 mM ammonium acetate in MeOH
Gradient:

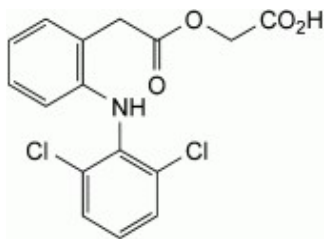
Time (mins)	%B
0.0	10
10.0	90
11.9	90
13.4	10
15.5	10

Flow Rate: 0.3 mL/min
Injection: 10 µL
Temperature: 40 °C
Detection: MS Quattro Premier XE triple quad
 MRM, positive and negative ESI mode
 Desolvation temperature: 450 °C
 Ion source temperature: 150 °C
 Collision gas pressure: 3.5 x 10⁻³ mbar



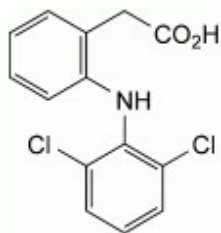
Peak	Analyte	R _t (Mins)	Q1 (Da)	Q3 (Da)
1	Oxymorphone	2.62	302.2	198.1
2	Morphine-d3	2.82	289.2	201.0
3	Morphine	2.95	286.2	201.0
4	Hydromorphone	3.25	286.2	185.1
5	Amphetamine-d5	3.62	141.0	123.9
6	Amphetamine	3.65	136.0	118.9
7	Dihydrocodeine	3.66	302.2	199.1
8	MDA	3.67	180.1	105.0
9	MDMA	3.75	194.1	163.0
10	Methamphetamine	3.80	150.0	90.9
11	Oxycodone	4.03	316.2	241.2
12	MDEA	4.12	208.2	163.0
13	BZE-d3	4.15	293.1	171.0
14	BZE	4.17	290.1	168.0
15	6-MAM	4.48	328.2	165.1
16	Codeine	4.59	300.3	215.1
17	Norfentanyl	4.71	233.1	84.0
18	7-Amino-clonazepam	4.77	286.2	121.0
19	Hydrocodone	4.94	300.2	199.1
20	7-Amino-flunitrazepam	5.34	284.2	135.0
21	Cocaine	5.99	304.2	182.0
22	Norbuprenorphine	6.47	414.3	101.0
23	PCP	6.49	244.2	159.9
24	Zaleplon	6.55	306.2	264.2
25	EDDP	6.58	278.2	234.2
26	Norketamine	6.90	224.1	124.9

Peak	Analyte	R _t (Mins)	Q1 (Da)	Q3 (Da)
27	Bromazepam	6.95	316.1	182.1
28	Ketamine	7.21	238.1	124.9
29	Clonazepam	7.26	316.1	270.1
30	Nitrazepam	7.26	282.2	236.1
31	α-Hydroxytriazolam	7.34	359.1	331.1
32	Flunitrazepam	7.34	314.2	268.2
33	α-Hydroxyalprazolam	7.54	325.2	297.1
34	Estazolam	7.56	295.2	267.2
35	Zolpidem	7.73	308.2	235.1
36	Triazolam	7.77	343.0	308.1
37	2-Hydroxyethylflurazepam	7.77	333.2	109.0
38	Lorazepam	7.80	321.1	275.1
39	Oxazepam	7.82	287.2	241.0
40	Alprazolam	7.85	309.2	281.2
41	Methadone	7.99	310.2	265.2
42	Temazepam	8.05	301.1	255.1
43	Nordiazepam	8.44	271.1	139.9
44	Midazolam	8.61	326.2	291.2
45	Diazepam-d5	8.63	290.2	154.0
46	Diazepam	8.67	285.2	154.0
47	Flurazepam	8.68	388.2	315.1
48	Fentanyl	8.85	337.3	105.0
49	THC-COOH-d3	9.98	348.2	302.2
50	THC-COOH	10.01	345.2	299.2
51	Buprenorphine	11.70	468.3	101.0

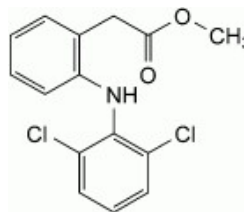


Aceclofenac: gyulladásgátló

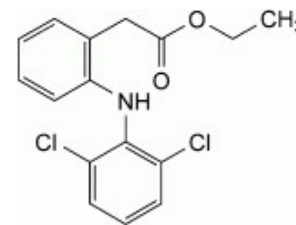
Impurity A



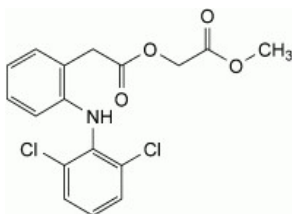
Impurity B



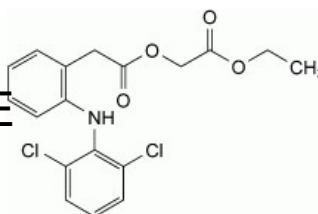
Impurity C



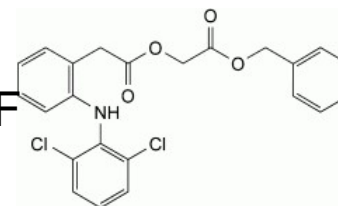
Impurity D



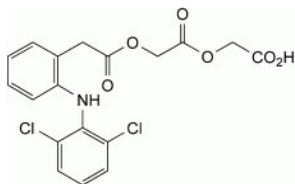
Impurity E



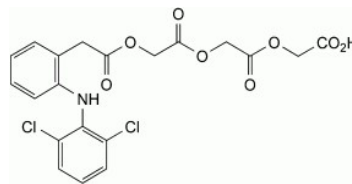
Impurity F



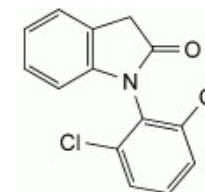
Impurity G

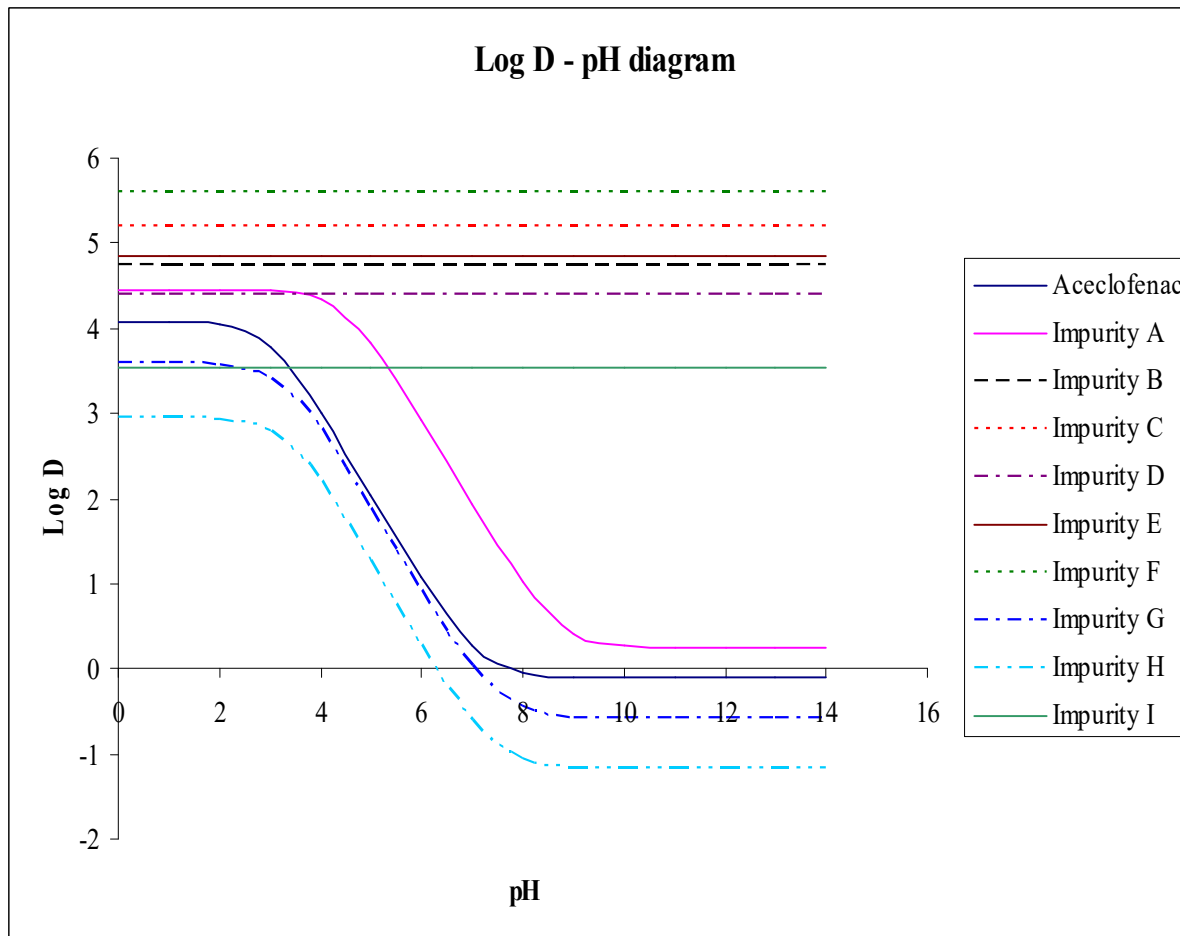


Impurity H



Impurity I



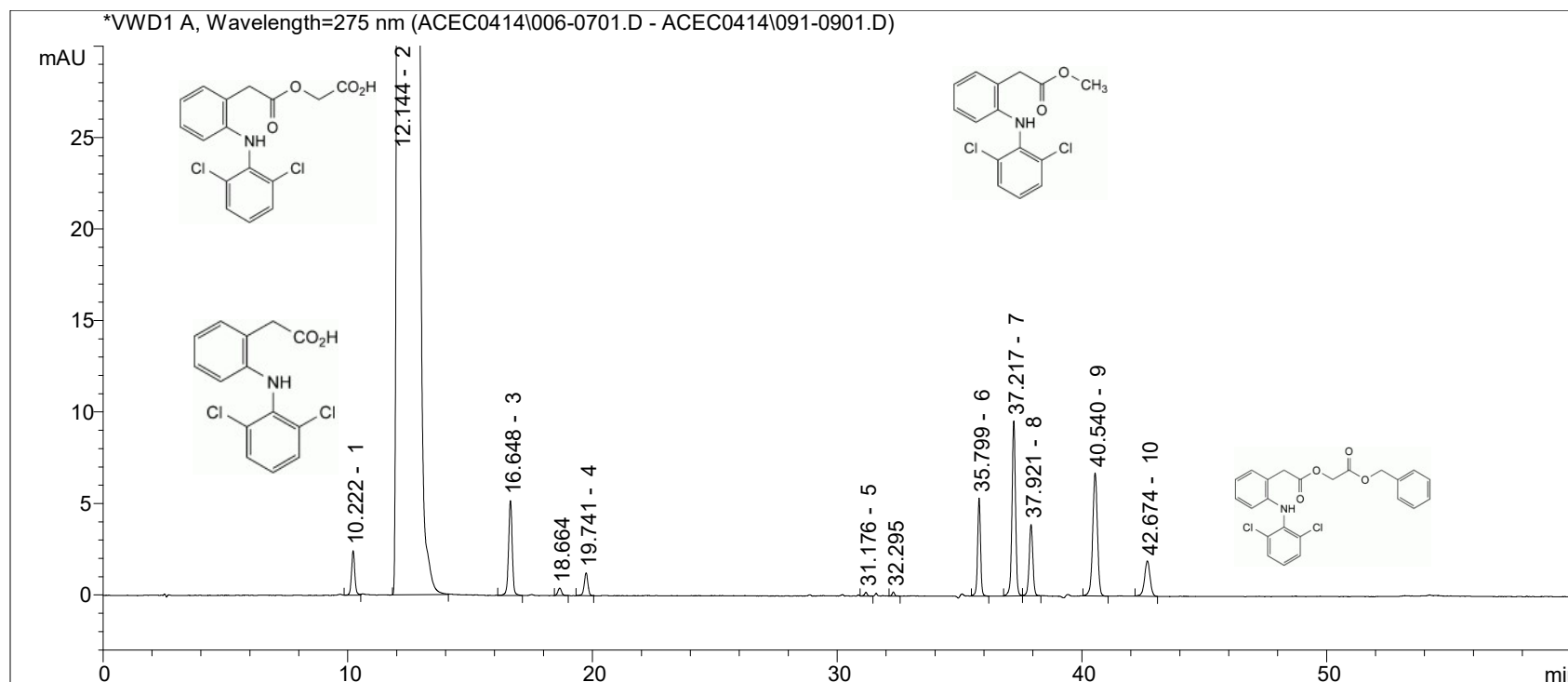


gyakorlatilag semleges
Imp. B, C, D, E, F

semleges
Imp. I

gyenge sav
Aceclofenac,
Imp. A, G H

Aceclofenac és szennyezéseinek az analízise

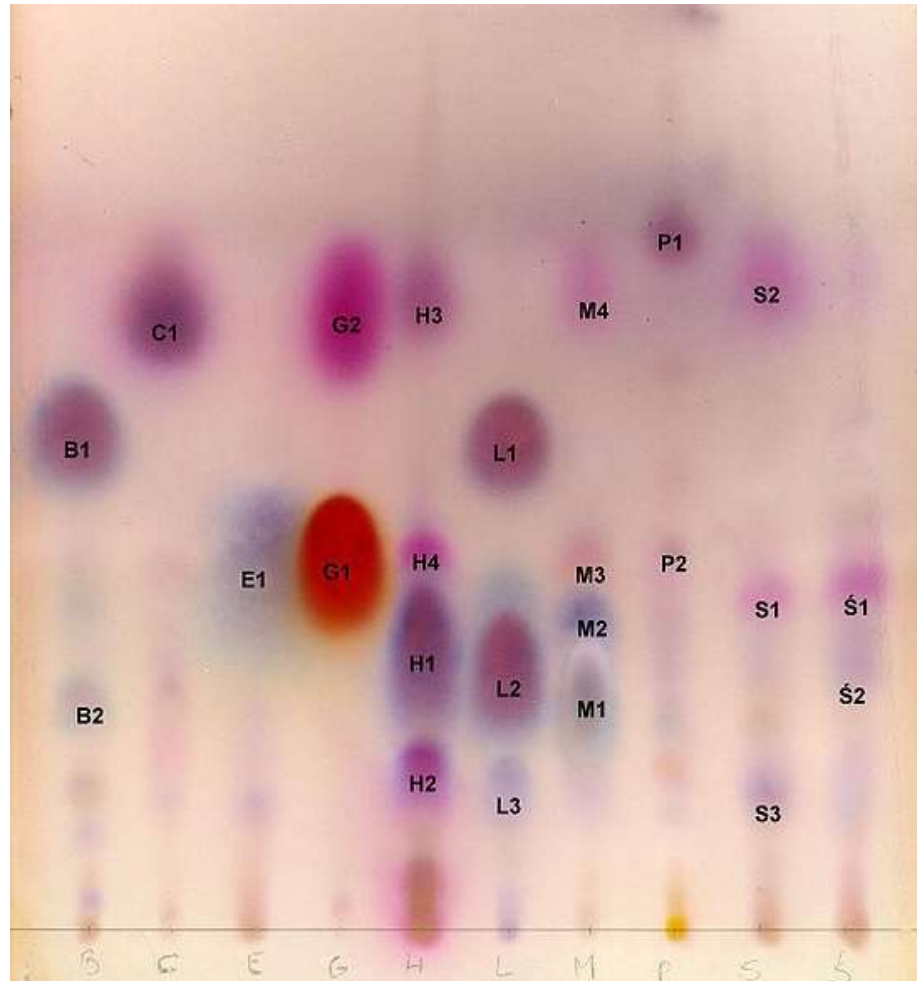
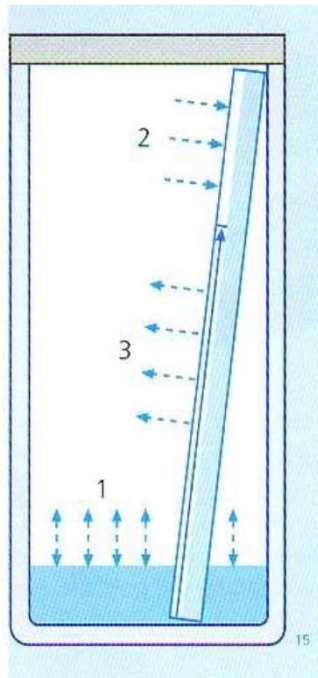


1. Impurity A 2. Aceclofenac 3. Impurity G 4. Impurity H 5. Impurity I
6. Impurity D 7. Impurity B 8. Impurity E 9. Impurity C 10. Impurity F

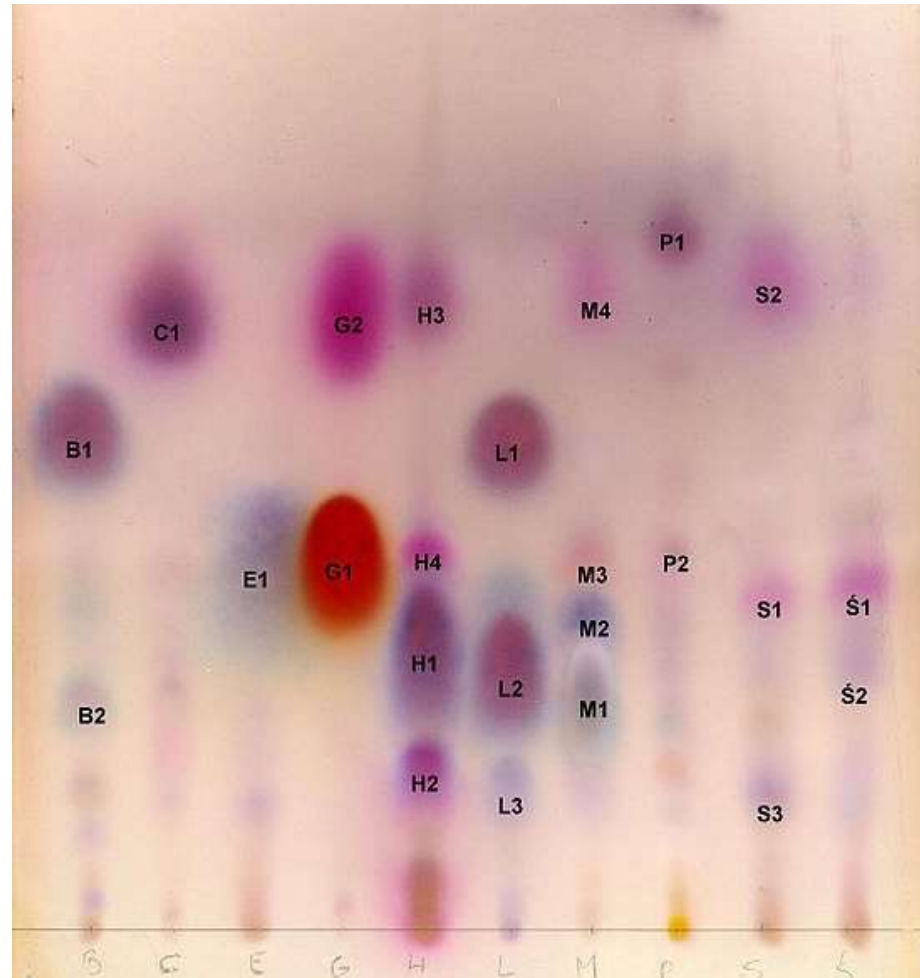
Oszlopos megoldású HPLC módszerek

<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

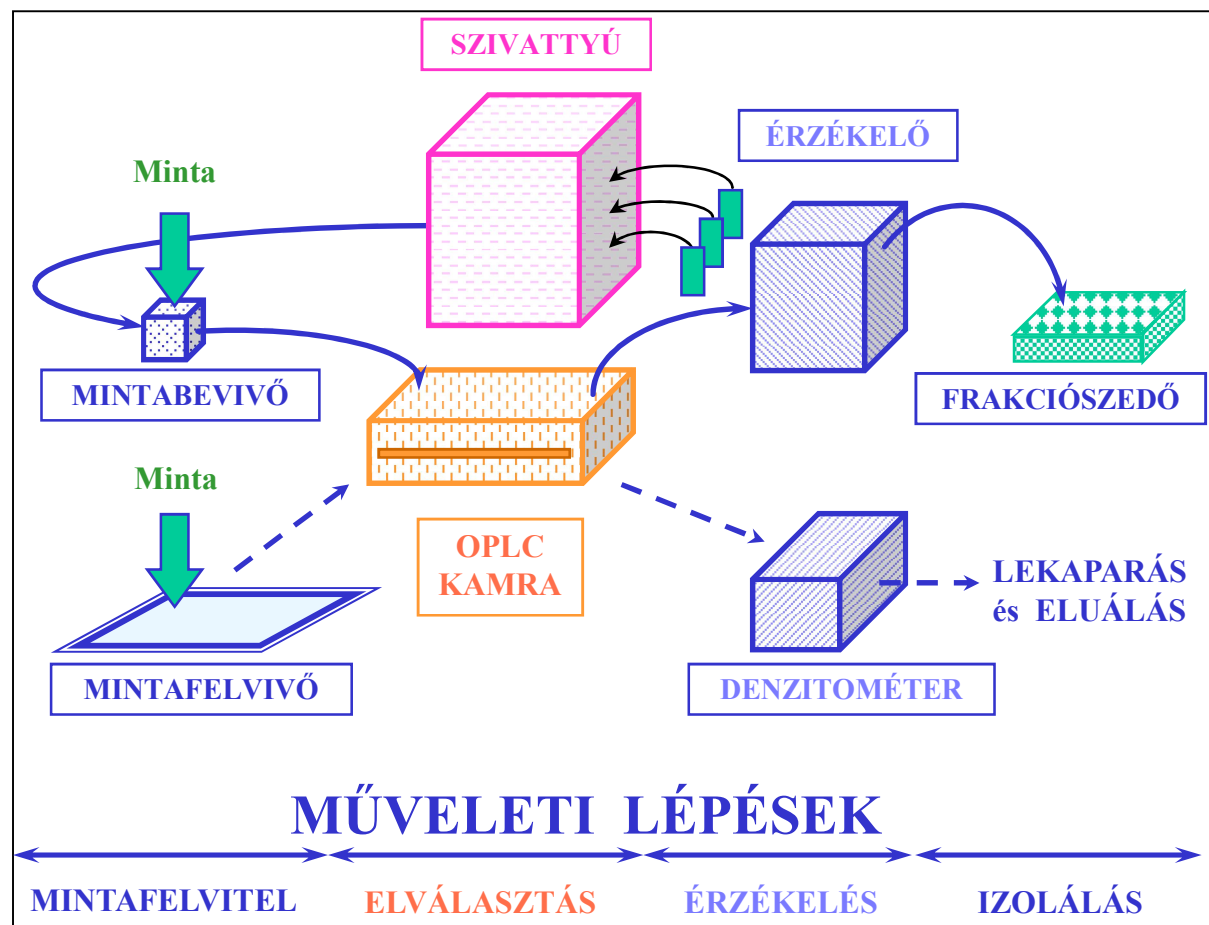
Réteggkromatográfia: TLC



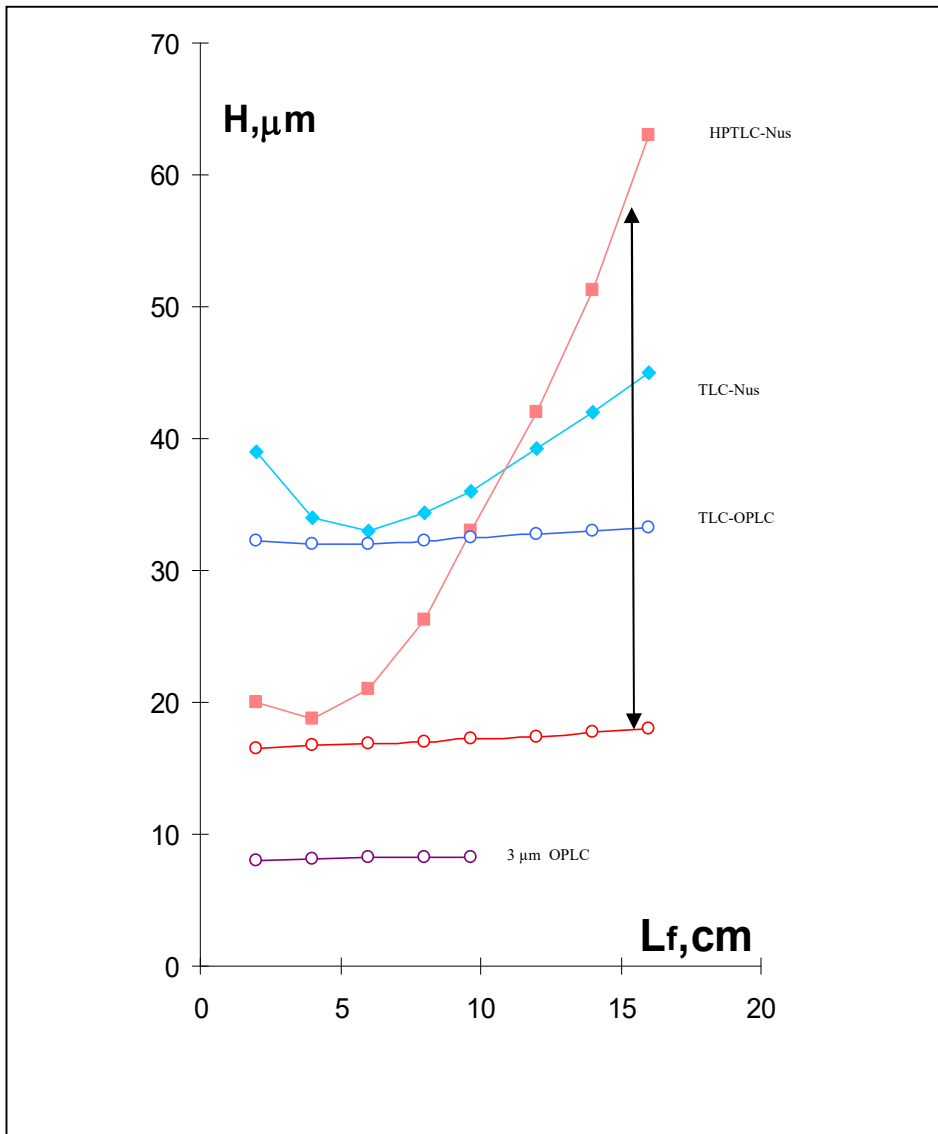
OPLC



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.



folyamatos vonal : „on-line” lépés
szaggatott vonal : „ off-line” lépés

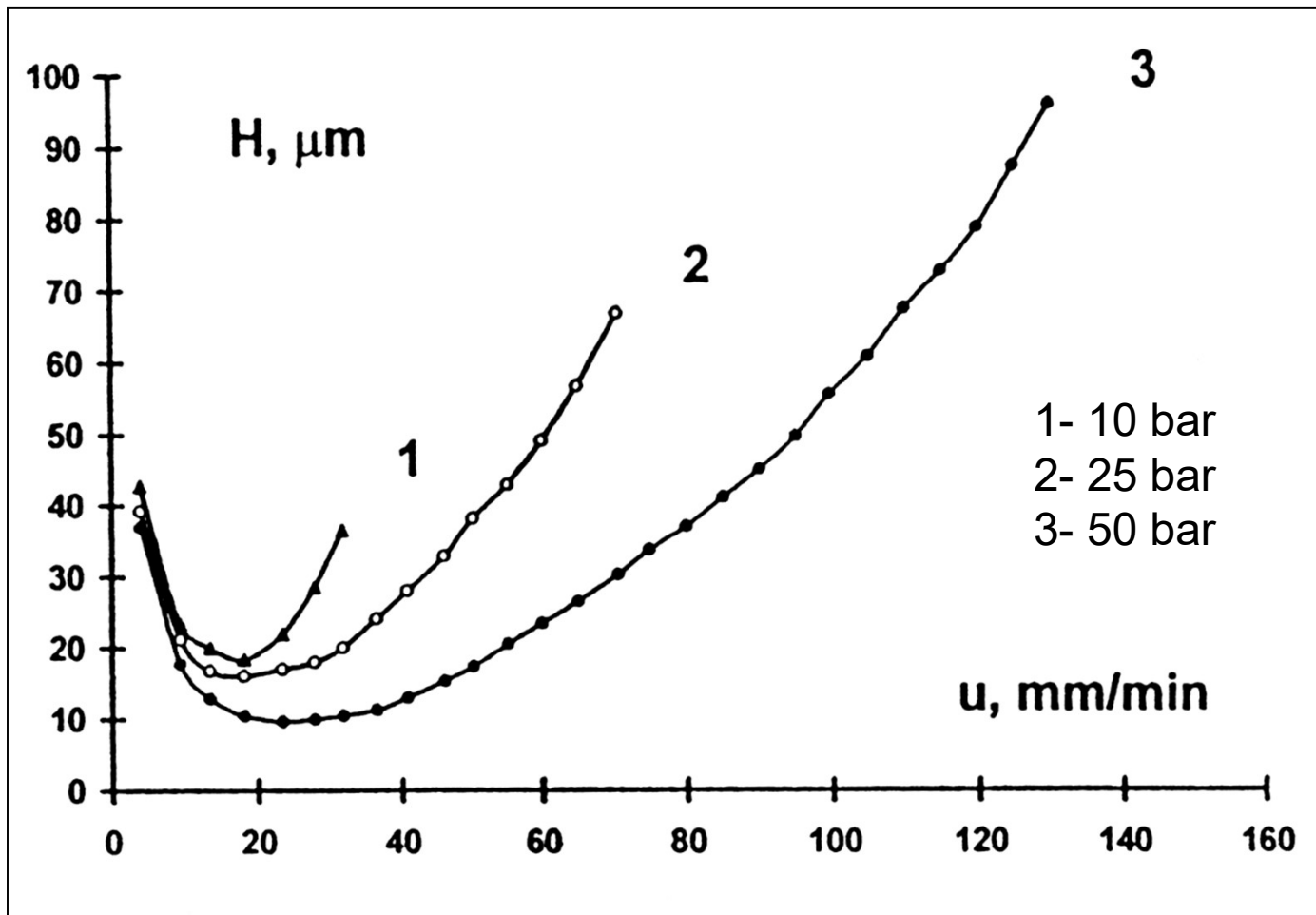


Elméleti tányérmagasság (H)
 változása a kifejlesztés folyamán (L_f)
 hagyományos TLC és OPLC esetében
 különböző szemcseméretű rétegek
 esetében

TLC- 10 μm

HPTLC- 5 μm

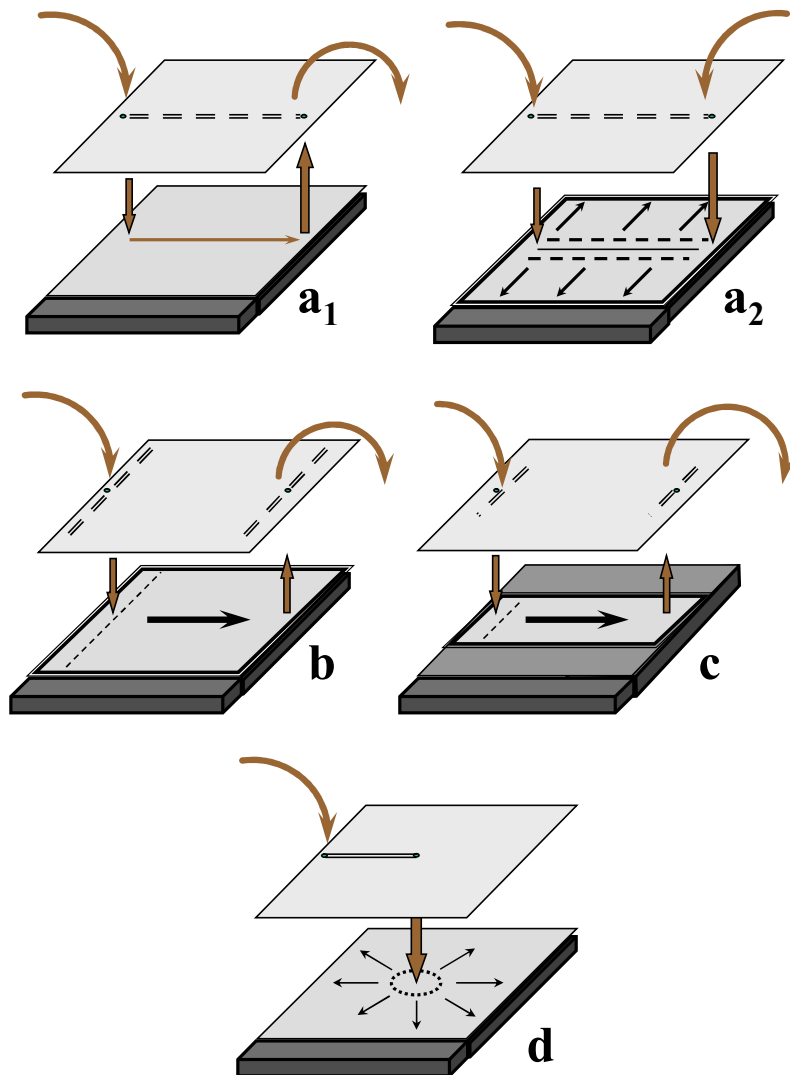
Nus- telítetlen normál kamra





Személyi OPLC 50 rétegekromatográf

- 1- kamra
- 2- folyadékszallító rendszer
- 3- kazetta
- 4- mozgó fázis váltó szelepe
- 5- mozgó fázis tartályok
- 6- gyűjtő tartály



OPLC kazetták sematikus ábrái

a- kazetta mosó(1) és kétirányú (2) elrendezésben

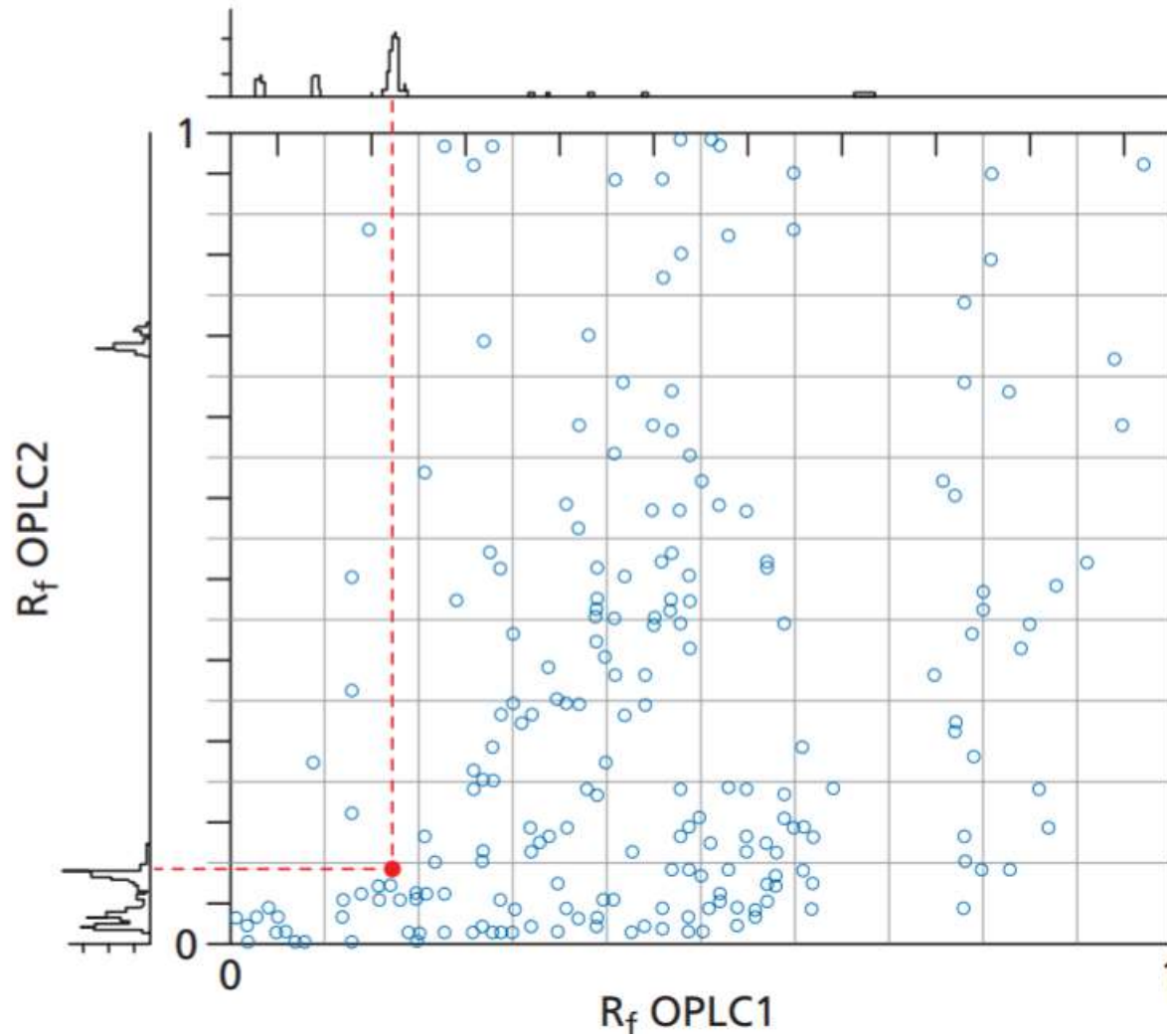
b- kazetta 20x20 cm-es réteg befogadására (analitikai fóliás, analitikai üveglapos, 0.5 mm preparatív)

c- kazetta 10x20 cm-es üveglapos analitikai réteglaphoz

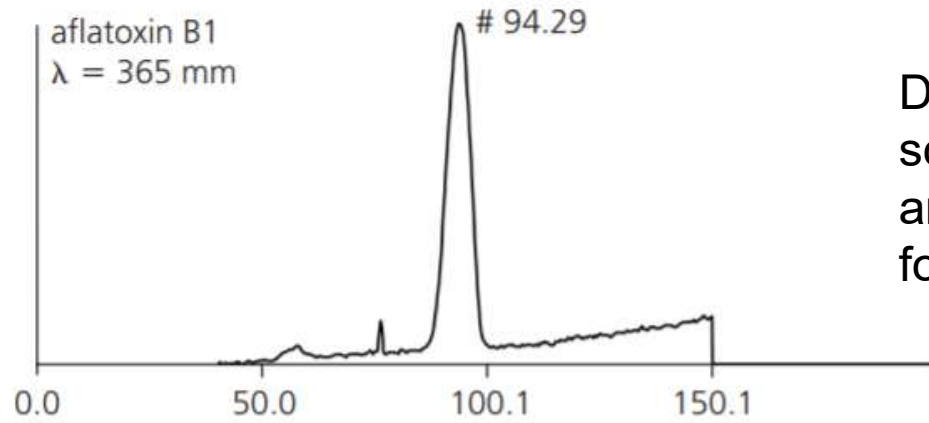
d- kazetta cirkuláris kifejlesztéshez

Nyilak a mozgó fázis irányát jelzik.

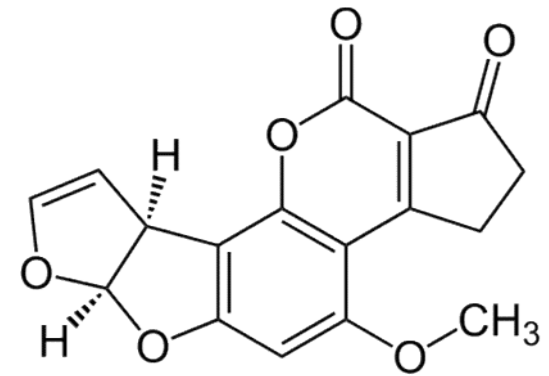
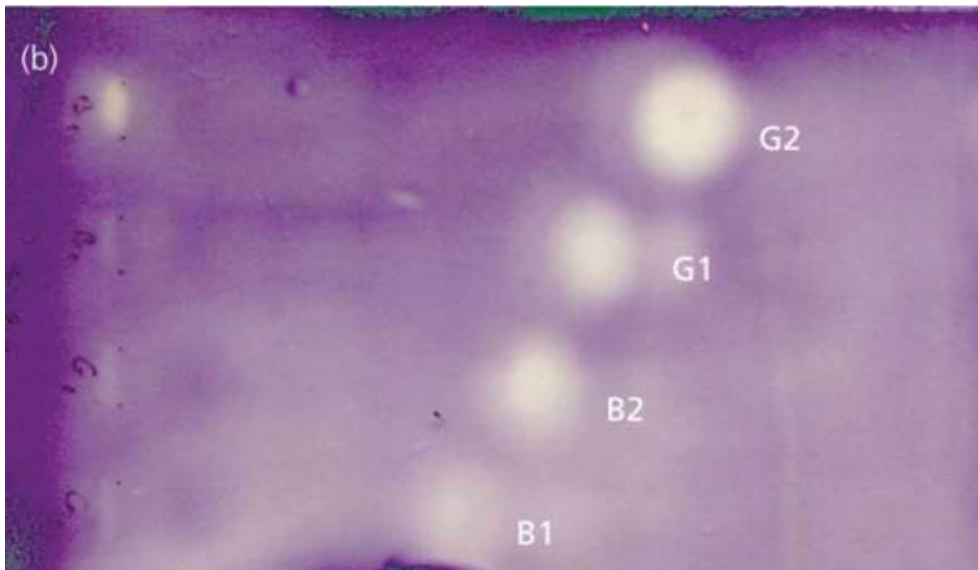
2D representation for the identification of codeine (red) from a library of over 200 known substances. Actual 1D separations are encrusted.



(a)



Detection of aflatoxins B1, B2, G1, G2 by scanning densitometry [B1 is shown (a)] and by bioautography in BioArena [all four shown (b)].

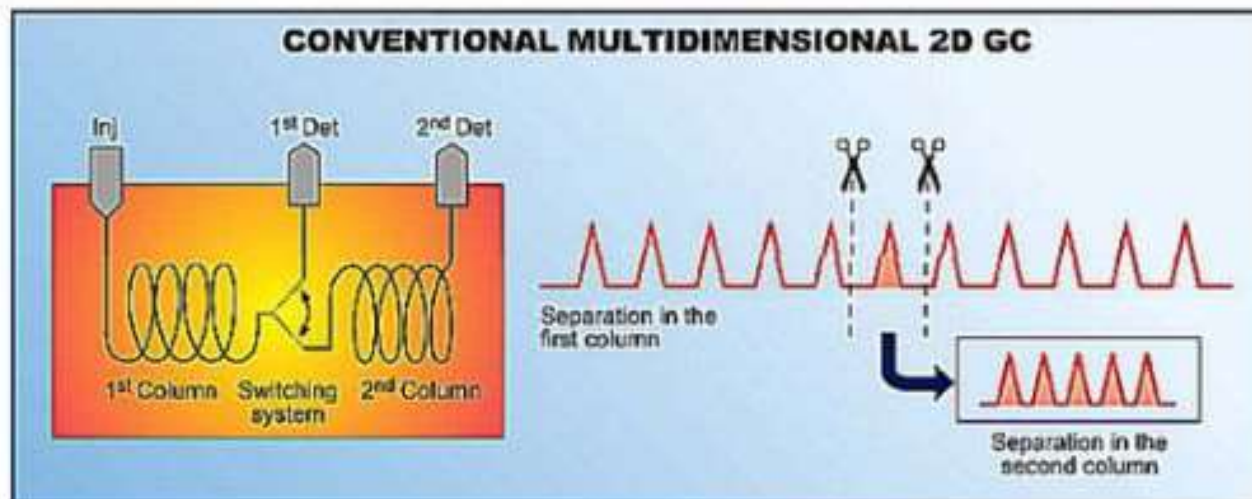


2D elválasztások

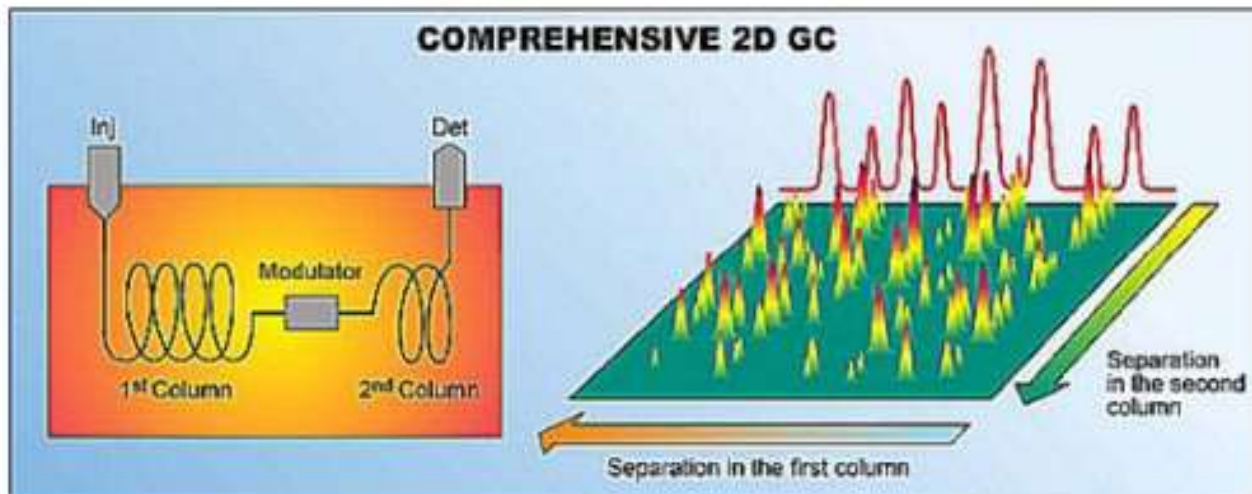
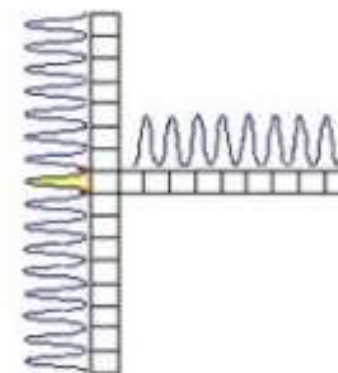
- **GC²**
- **2D HPLC**
- **2D OPLC**

GC² kombinációk

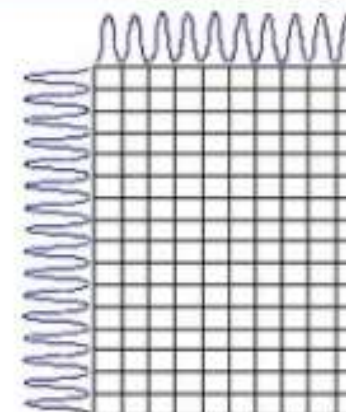
- Két különböző állófázisú kolonna (apoláris és poláris)
- Két azonos polaritású kolonna eltérő hőmérsékleten működtetve (pl. összekapcsolt két termosztáttal)
- Két különböző állófázisú kolonna, eltérő hőmérsékleten működtetve két termosztáttal

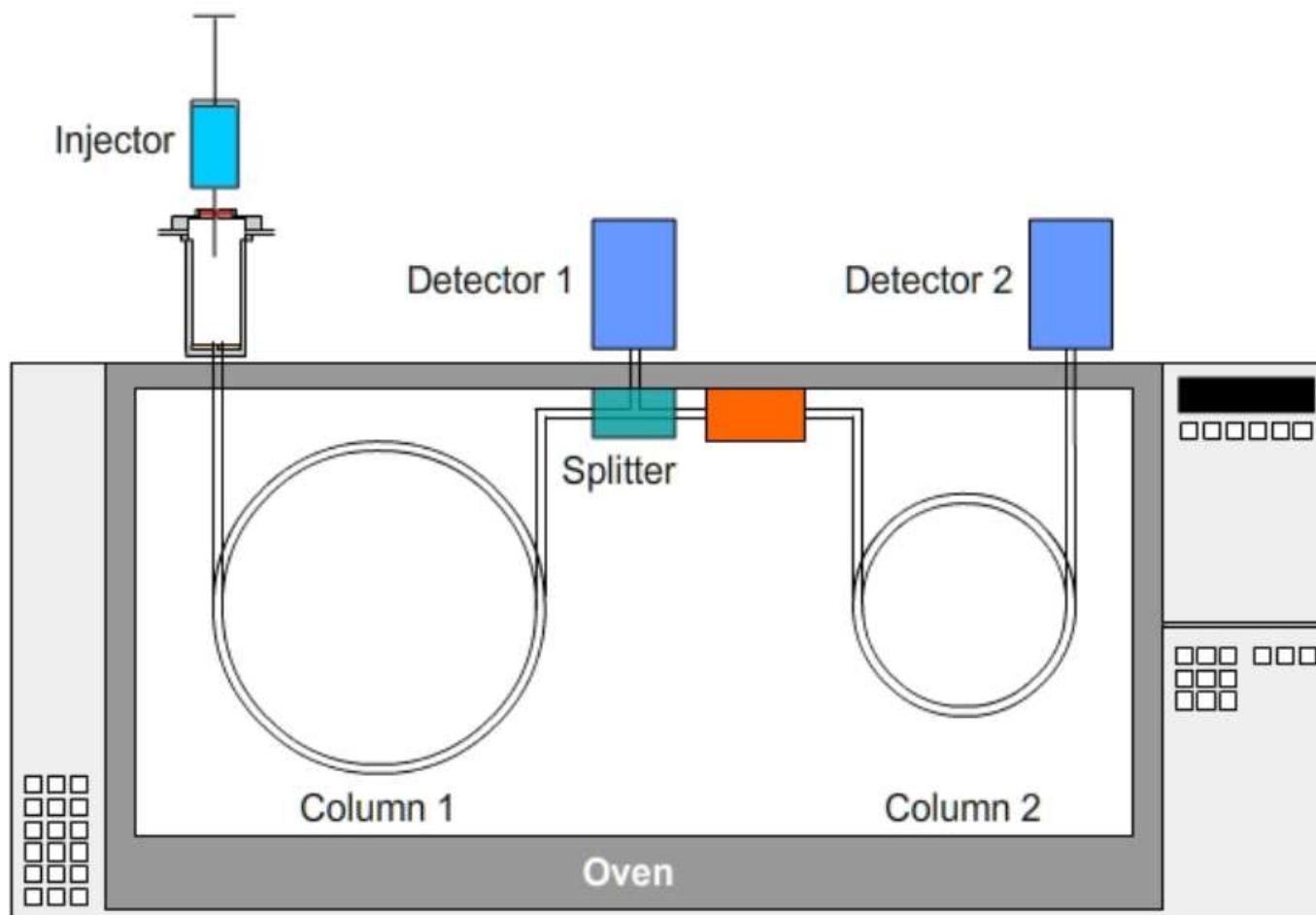


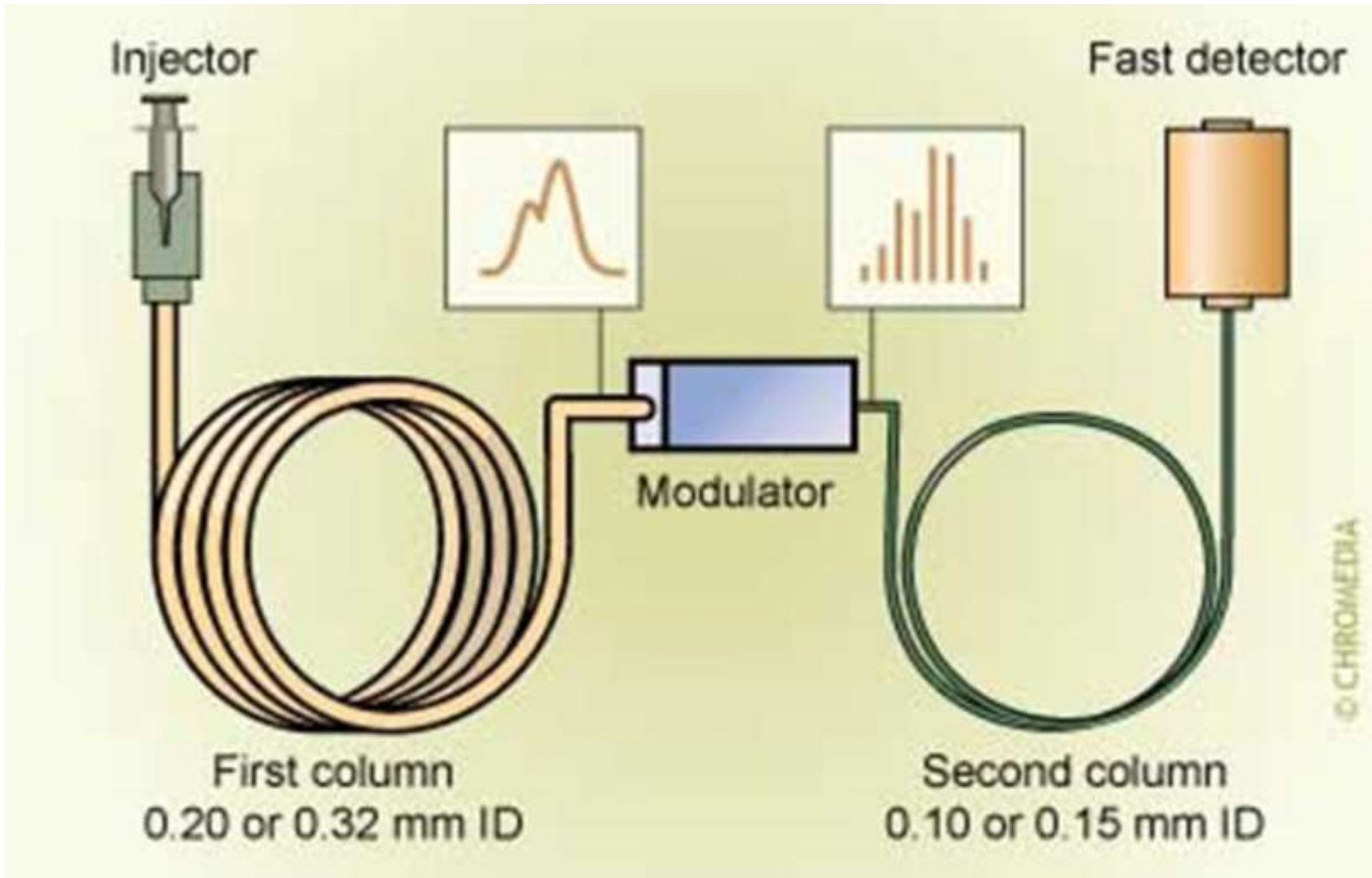
GC-GC

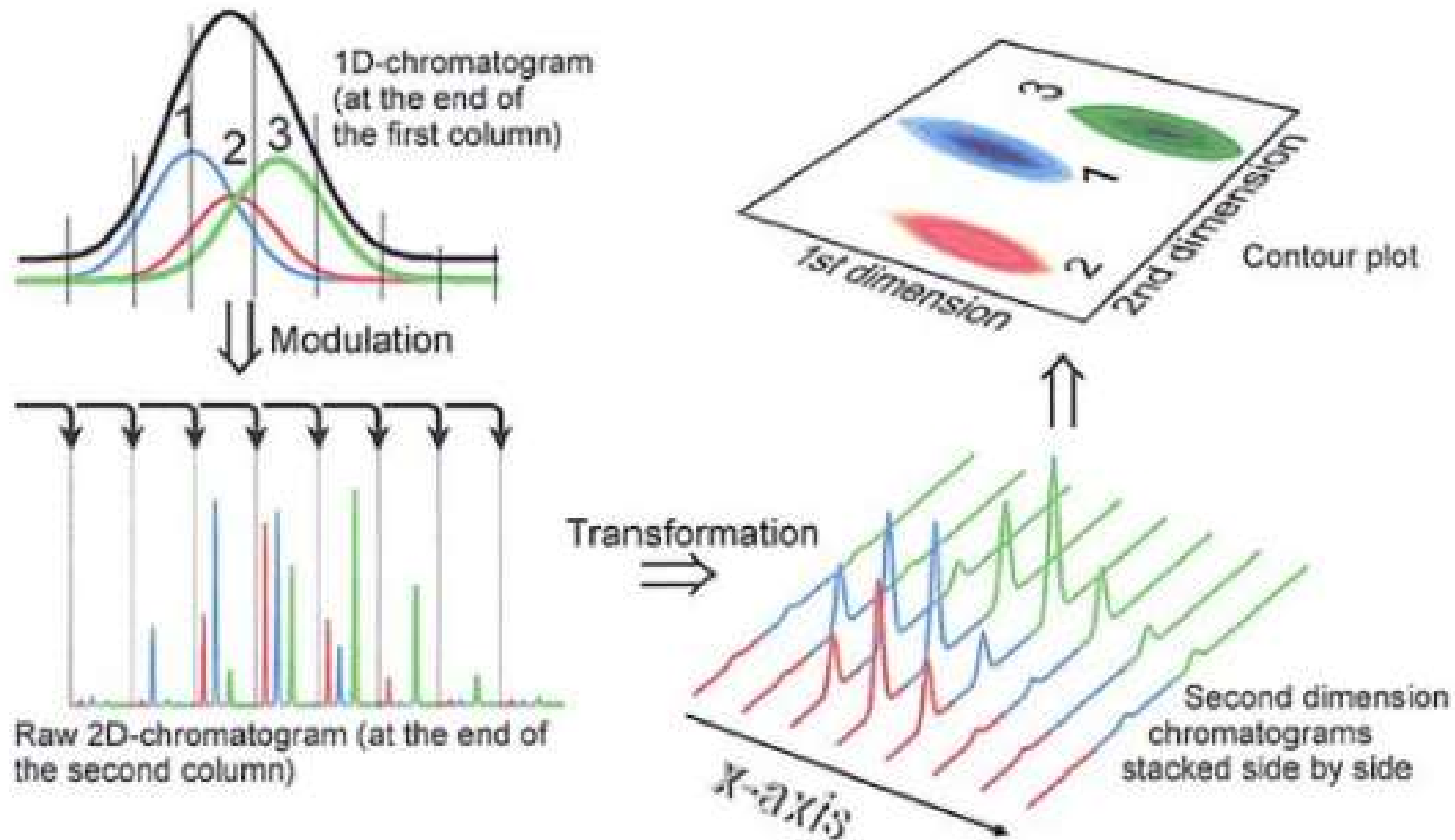


GCxGC

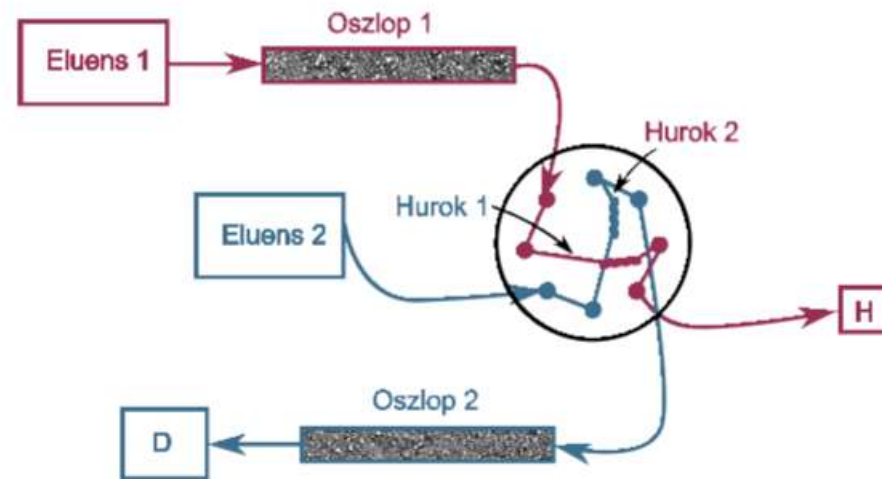
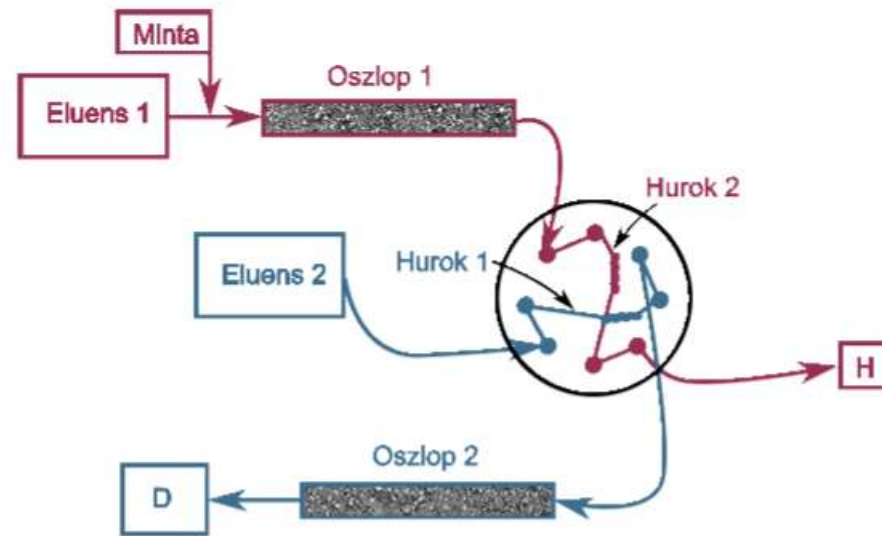


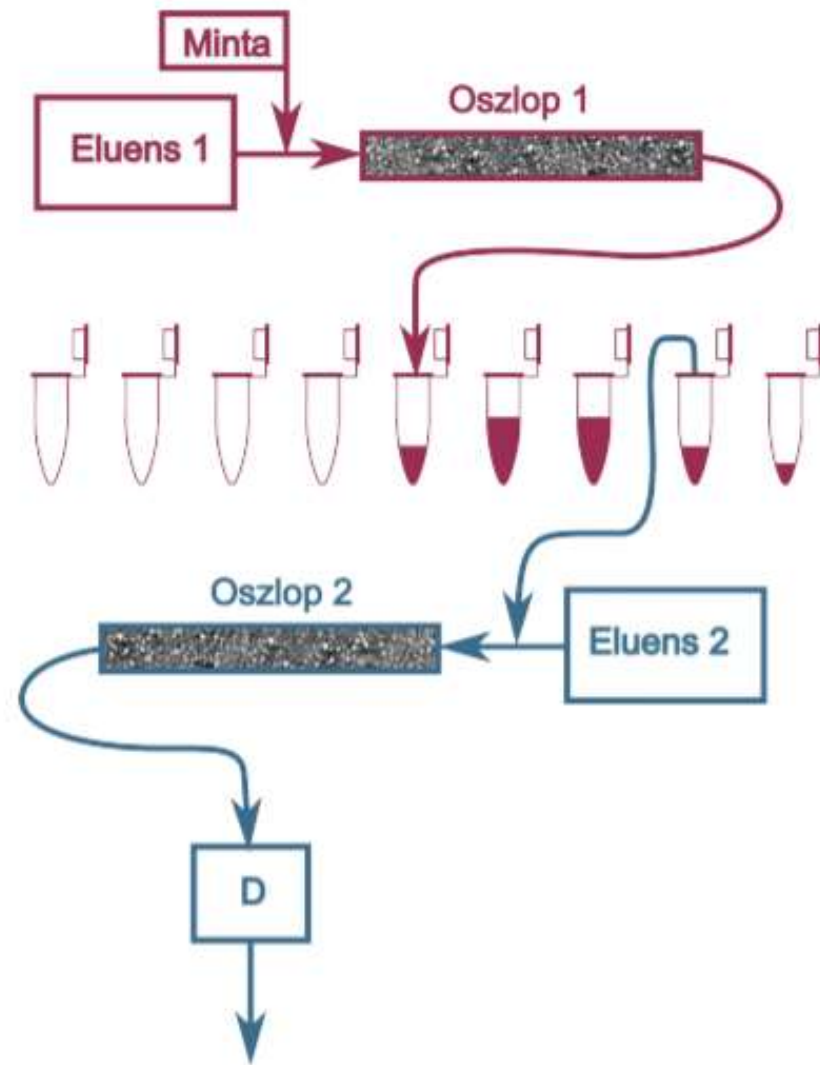


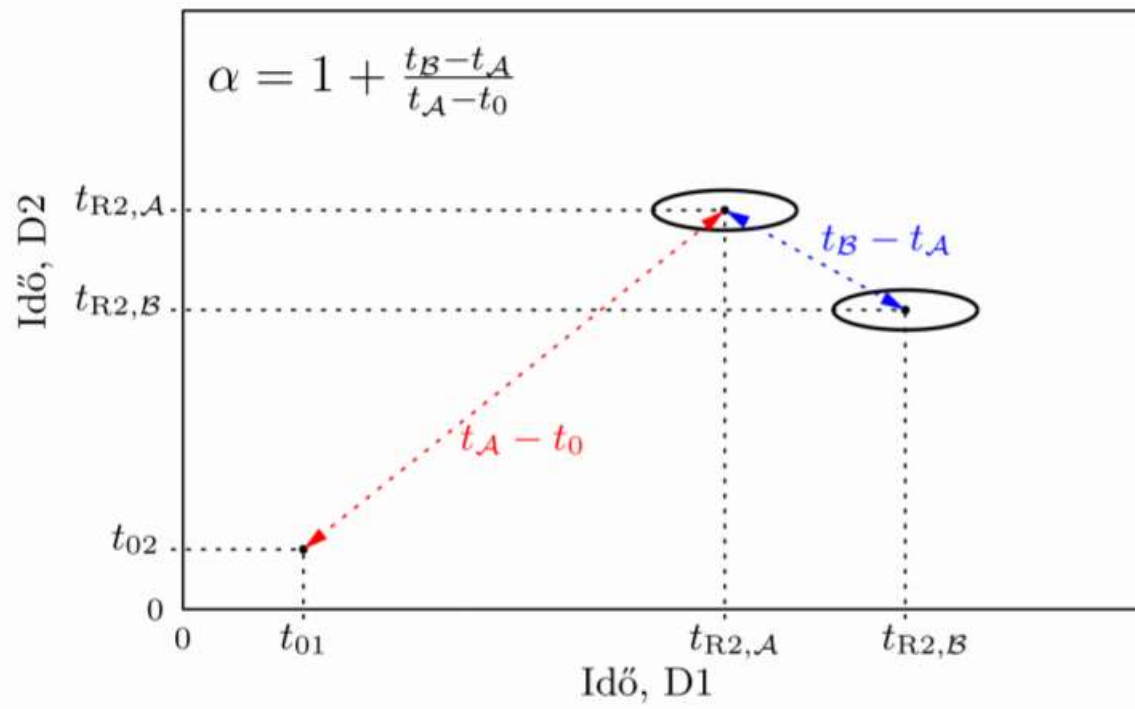


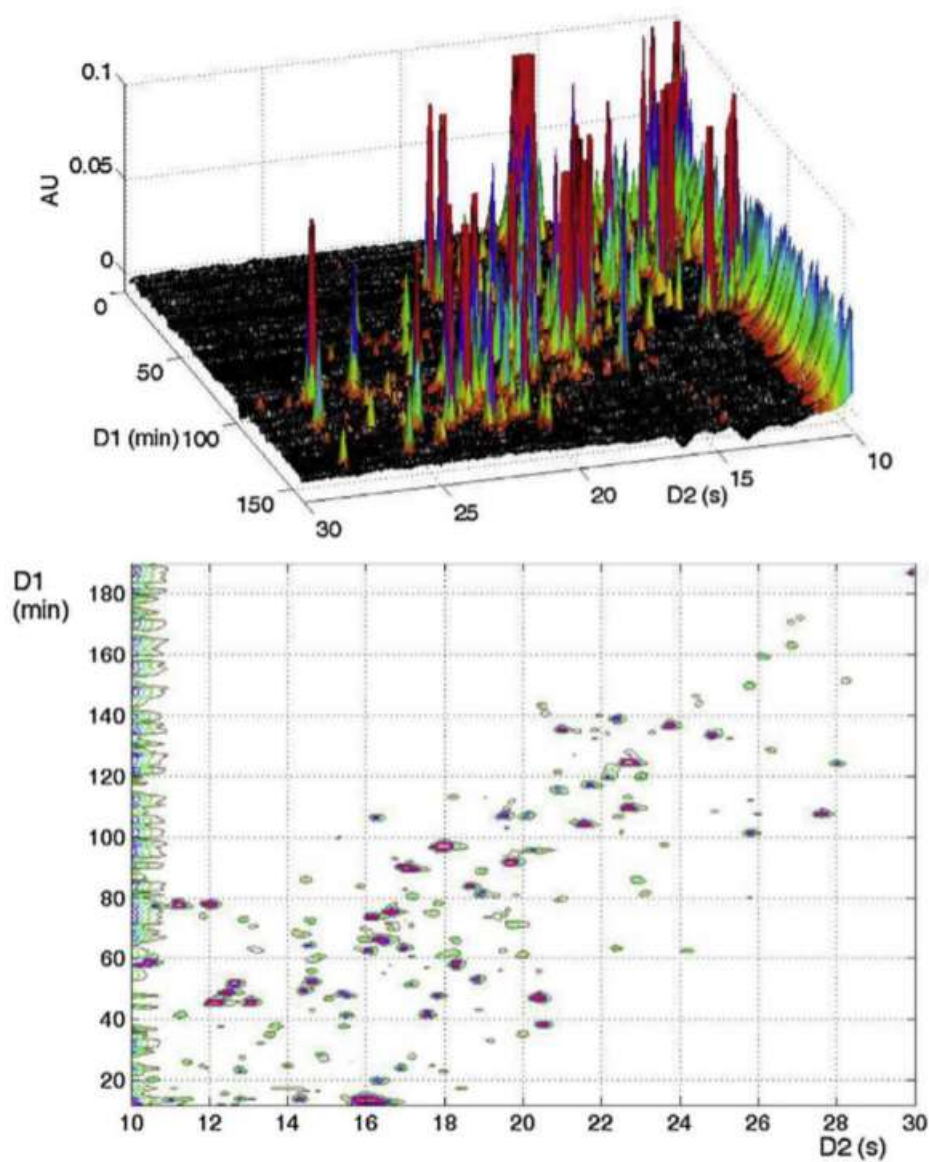


2D HPLC









Borjú szérum albumin, lizozim és mioglobin emésztvény 2DLC elválasztása.

Első dimenzió fordított fázis
lúgos, 10 mM ammónium-acetát " puffer",

második dimenzió: fordított fázis savas,
0,1%-os hangyasav



Centrifugális megoszlási folyadék kromatográfia

CPC: centrifugal partition
chromatography

LLC?: folyadék-folyadék kromatográfia

2018.

Kromatográfia \neq Extrakció

- Hasonlóság?
 - Igen: egymással nem elegyedő fázisok közötti anyagátmeneten alapuló elválasztás. Hajtóerő a kémiai potenciálok kiegyenlítődési törekvése.
- Különbségek
 - Kromatográfia:
 - a fázisok felületi érintkezése (nincs diszpergálás!)
 - az elválasztandó alkotók „elhanyagolható” mennyisége a fázisokhoz képest
 - Extrakció:
 - a fázisok intenzív érintkeztetése, egymásban diszpergálva
 - a lehető legnagyobb mennyiségű alkotó kinyerése

Folyadék-folyadék „kromatográfia” (LLC)



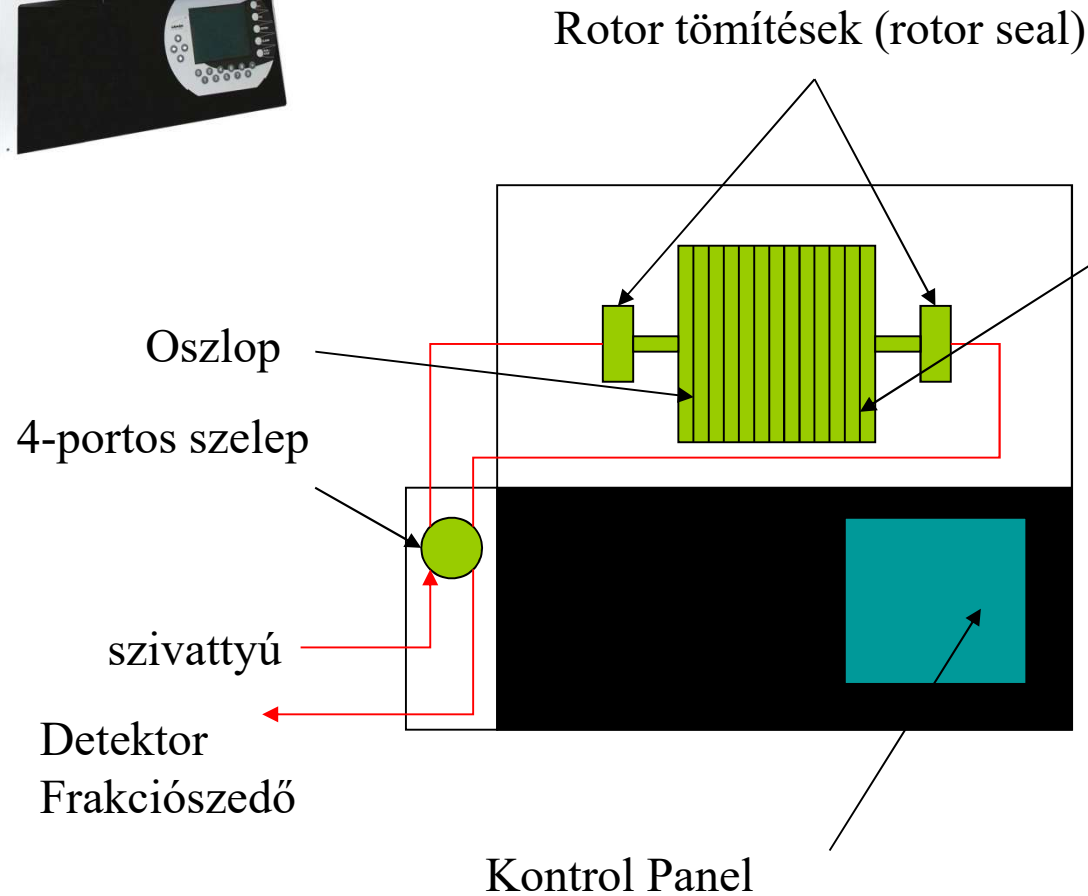
- ☞ Legfontosabb különbség a HPLC-vel szemben, hogy NINCS szilárd állófázis
- ☞ Az álló és mozgófázis, egymással alig elegyedő kétkomponensű folyadékrendszert alkot



- ☞ Az állófázist a centrifugális erő tartja a rendszerben
- ☞ Az elválasztás az egyes mintakomponens megoszlási hányadosainak (K_d) különbsége adja



CPC készülék



Kolonna tányérok

illetve az egyes tölcsérek
nagyítva (funnel):

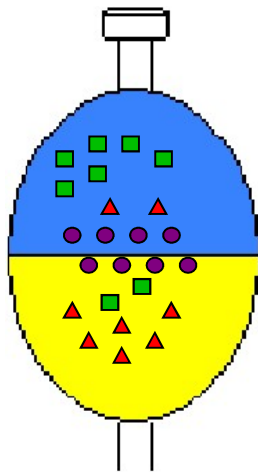


LLC a gyakorlatban



Könnyű fázis

Nehéz fázis



$$K_D > 1$$



$$K_D = 1$$

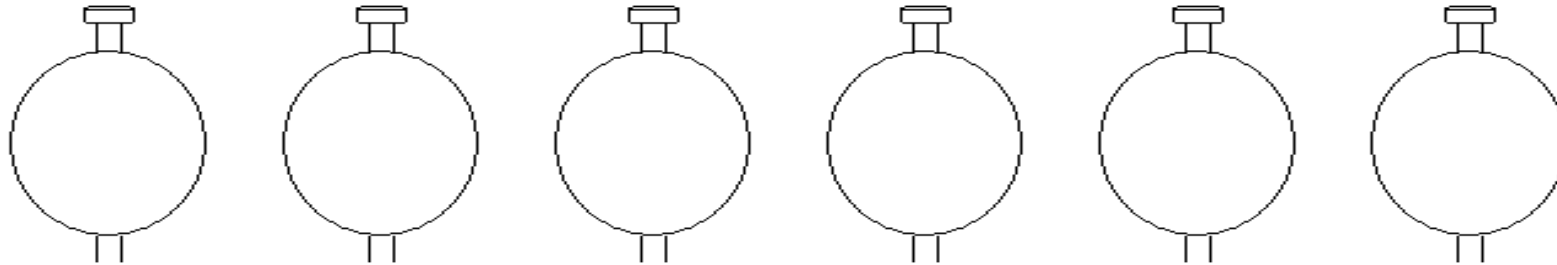


$$K_D < 1$$

$$K_D = \frac{[A]_{\text{könnyű}}}{[A]_{\text{nehéz}}}$$

Tölcsér
(funnel)

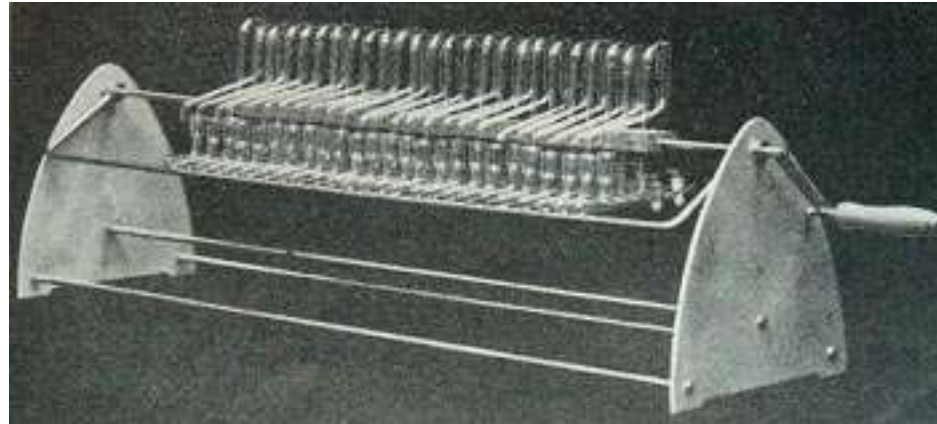
LLC a gyakorlatban



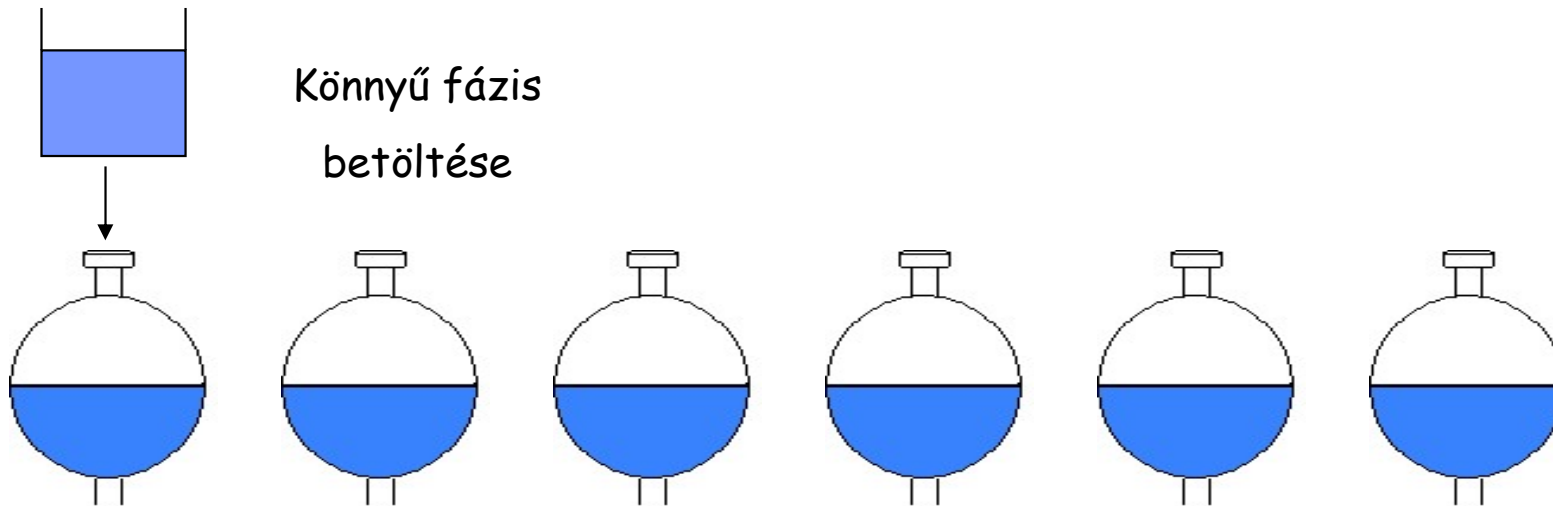
LLC a gyakorlatban



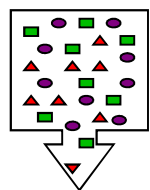
Craig-
extraktor



Könnyű fázis
betöltése



LLC a gyakorlatban



mintabeadás



$K_D > 1$

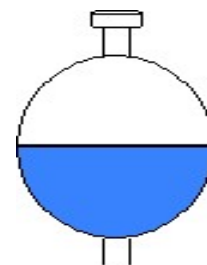
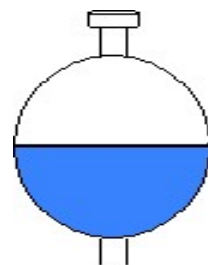
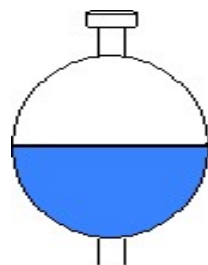
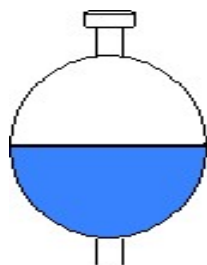
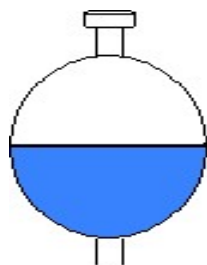
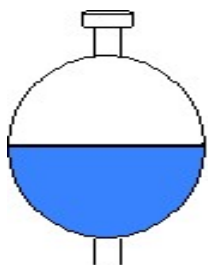


$K_D = 1$

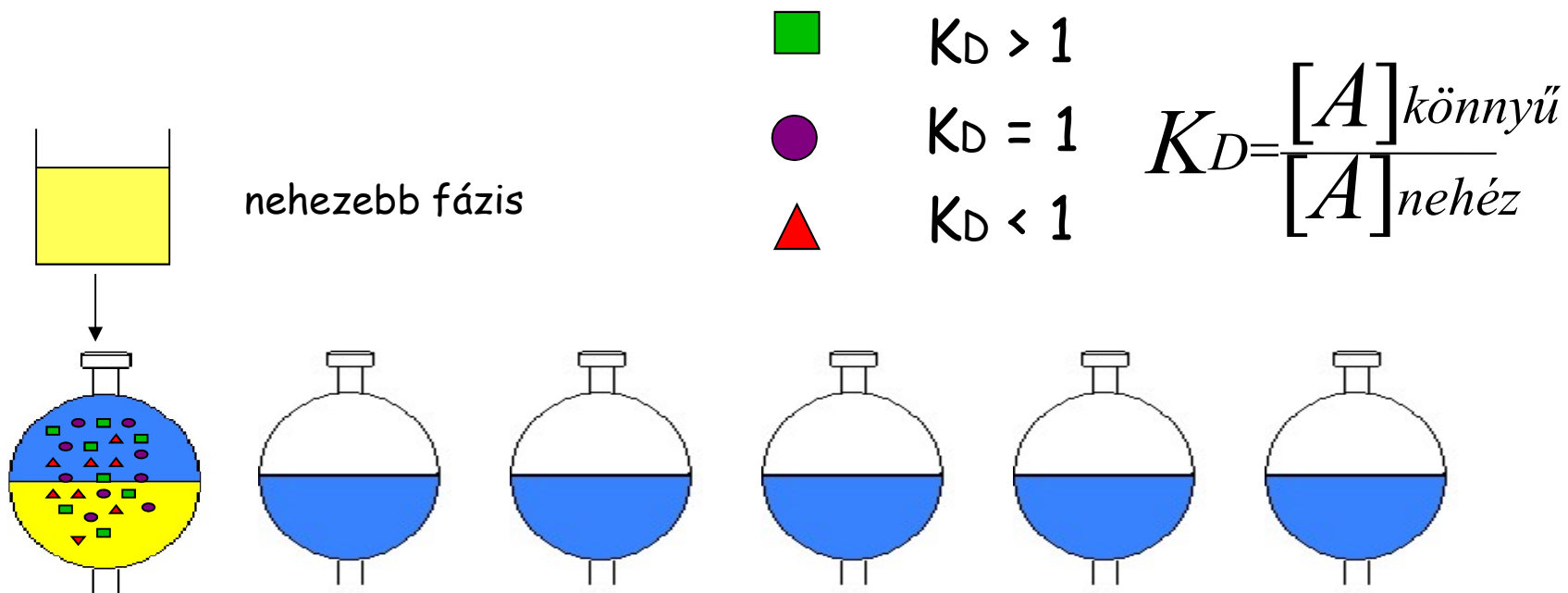


$K_D < 1$

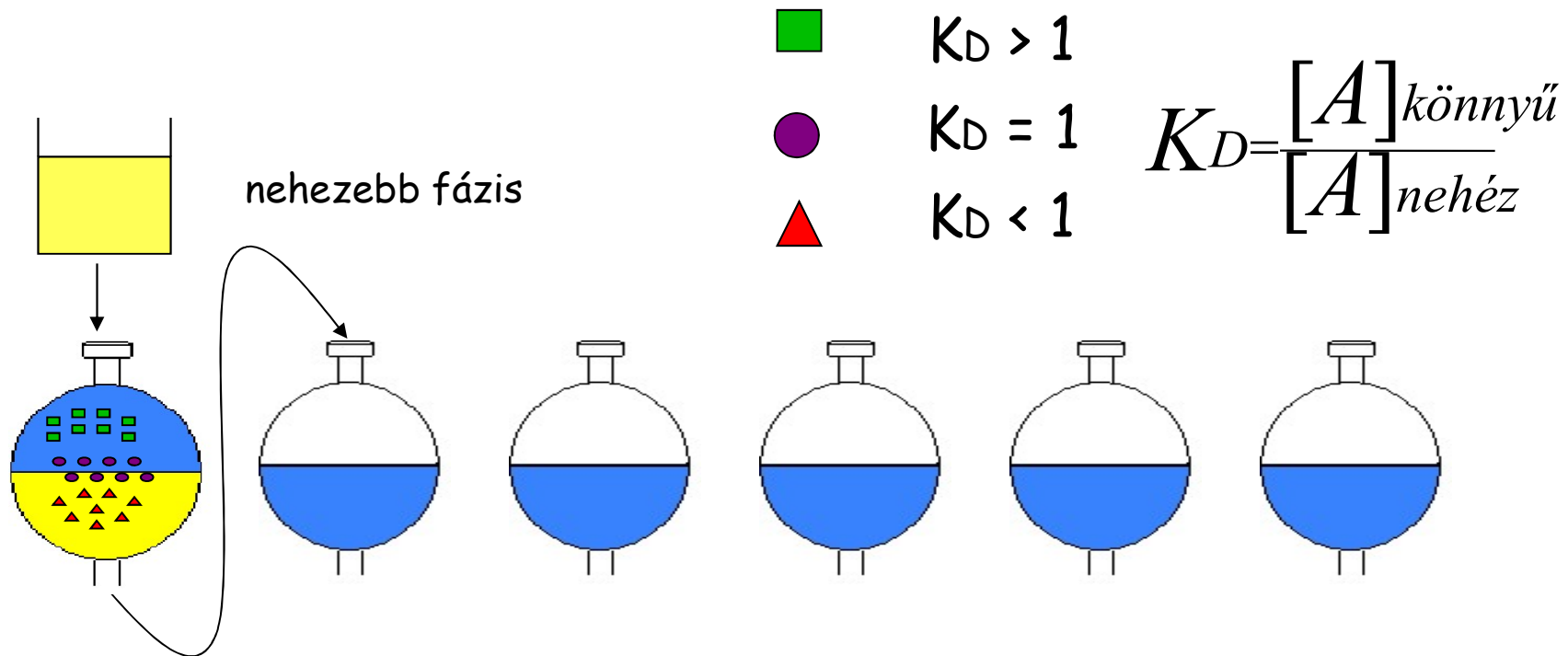
$$K_D = \frac{[A]_{\text{könnyű}}}{[A]_{\text{nehéz}}}$$



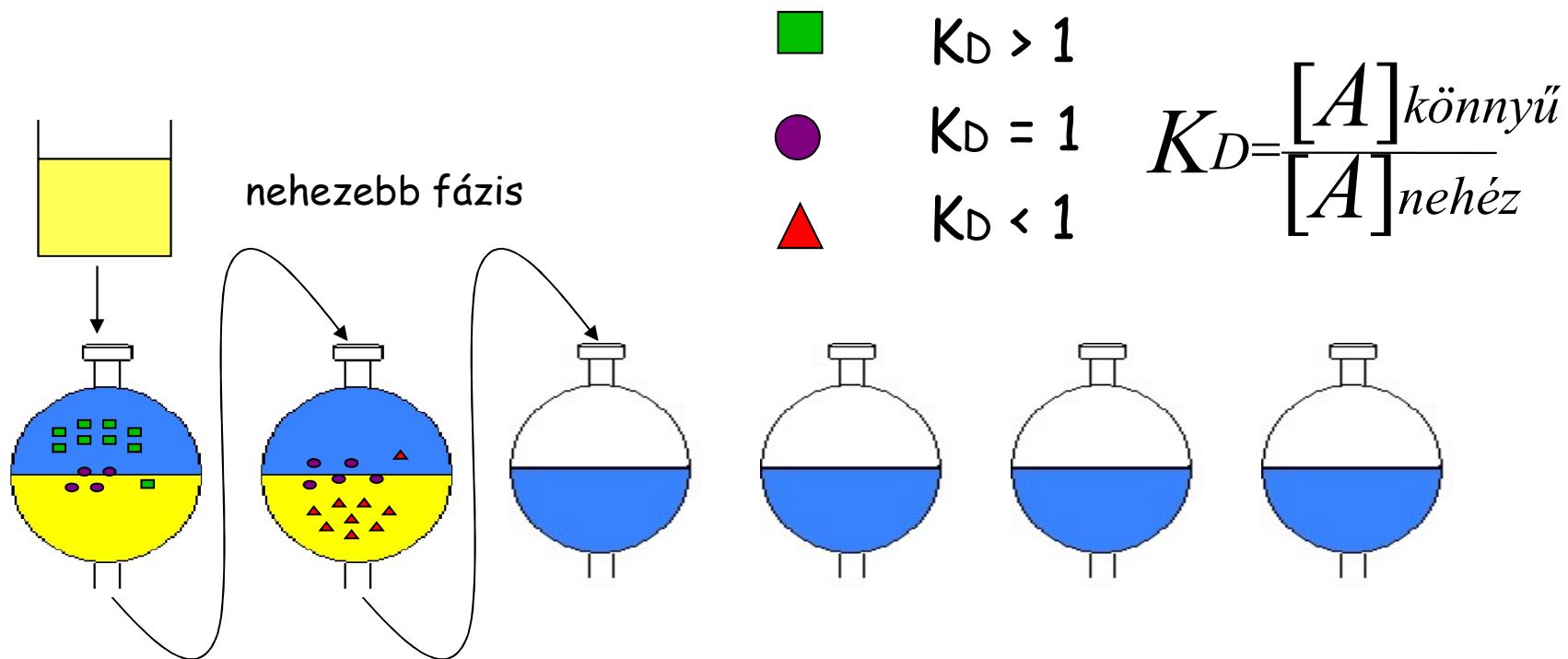
LLC a gyakorlatban



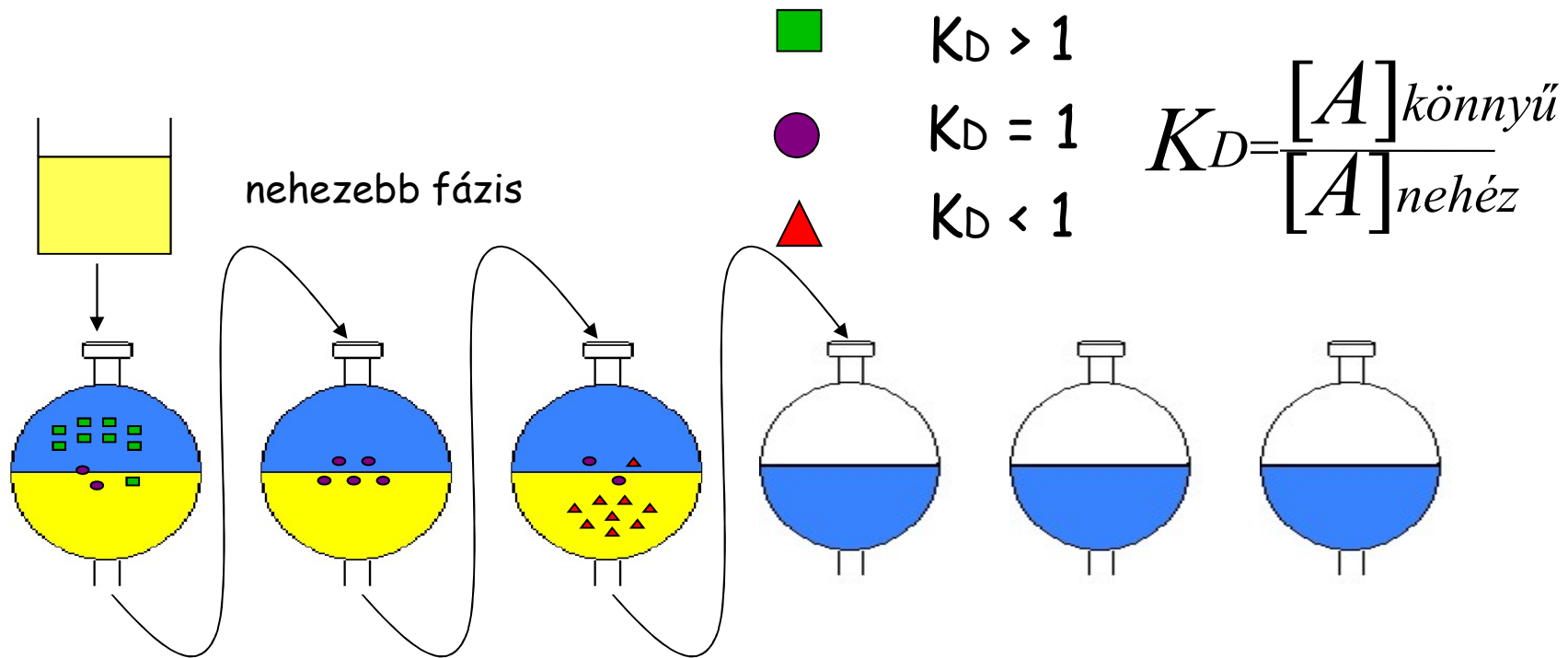
LLC a gyakorlatban



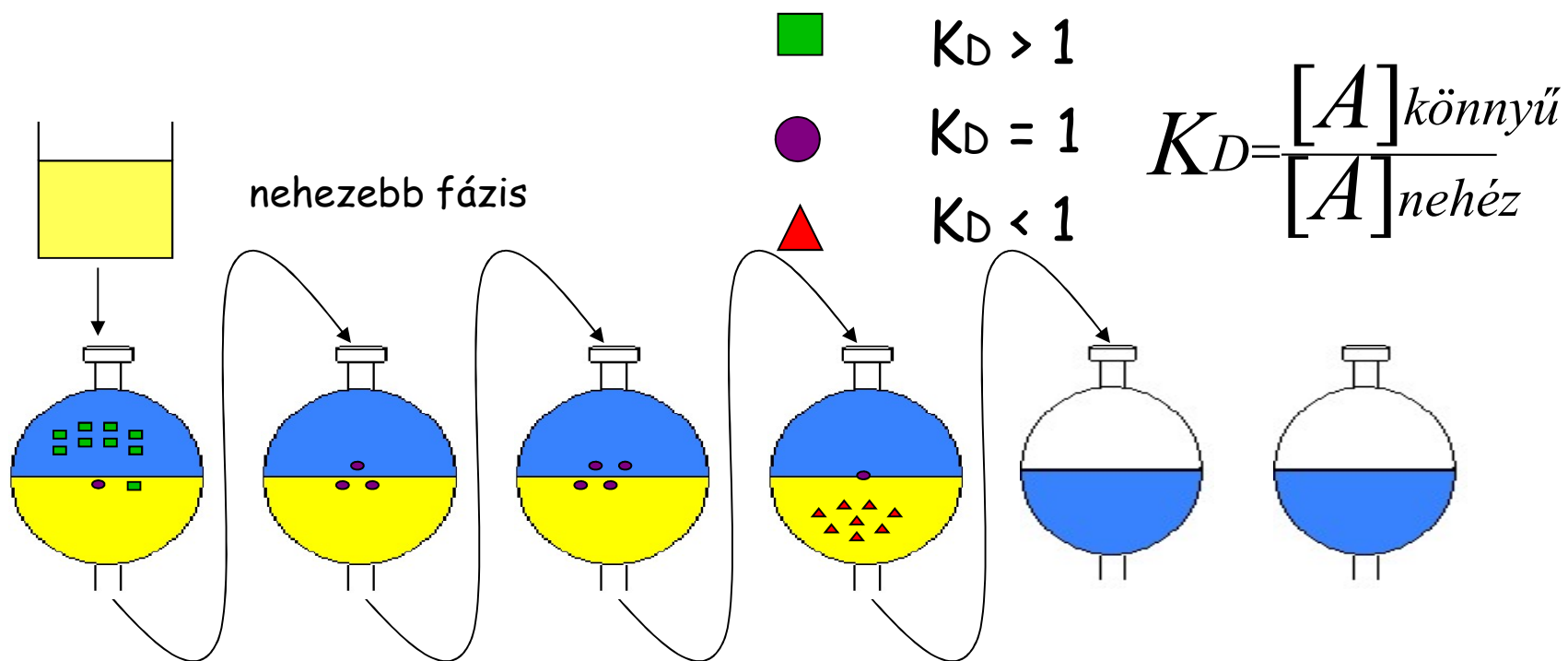
LLC a gyakorlatban



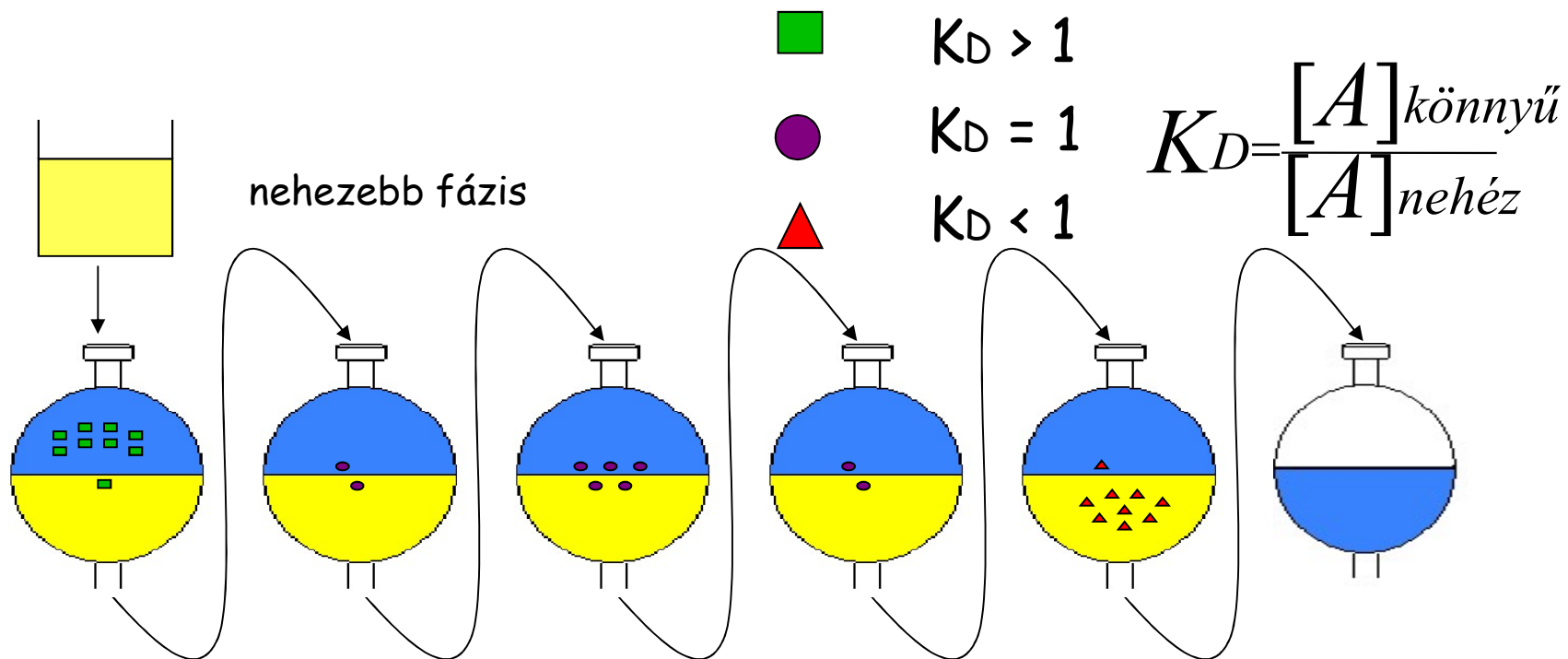
LLC a gyakorlatban



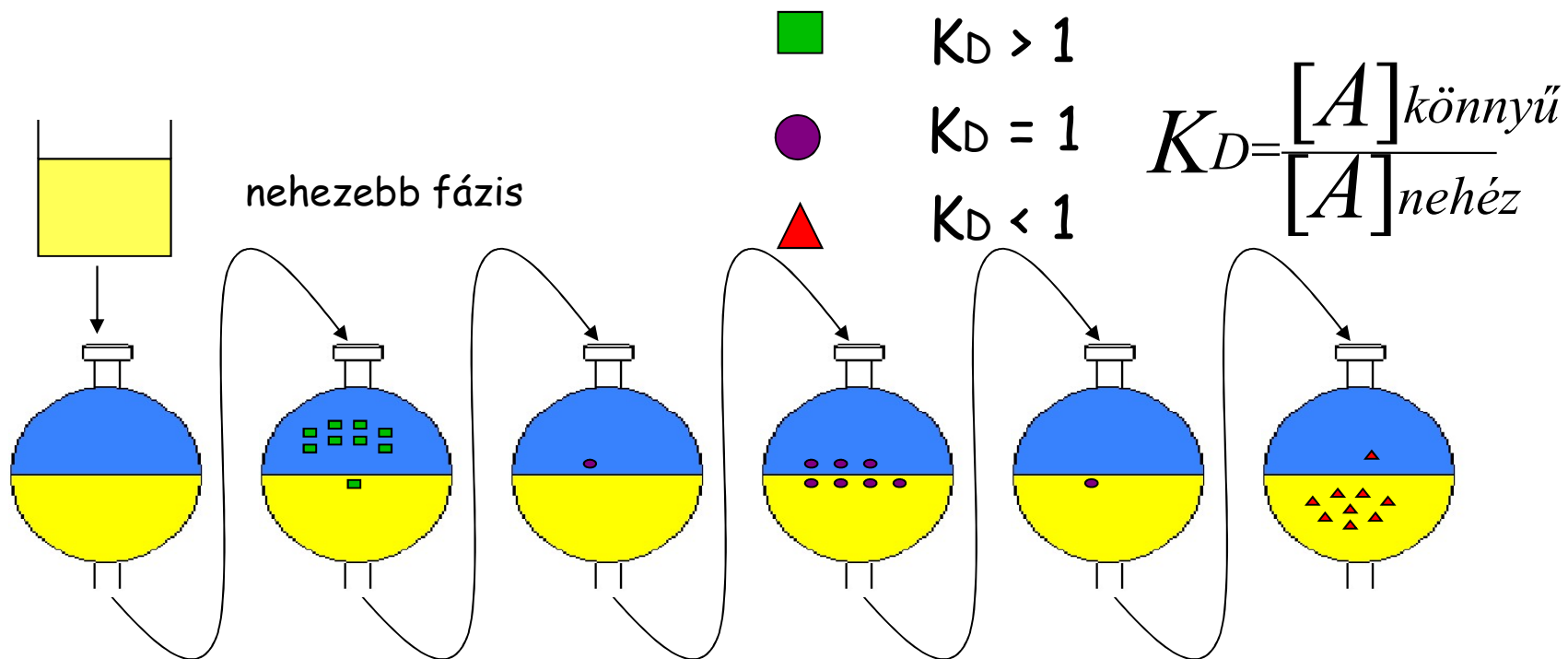
LLC a gyakorlatban



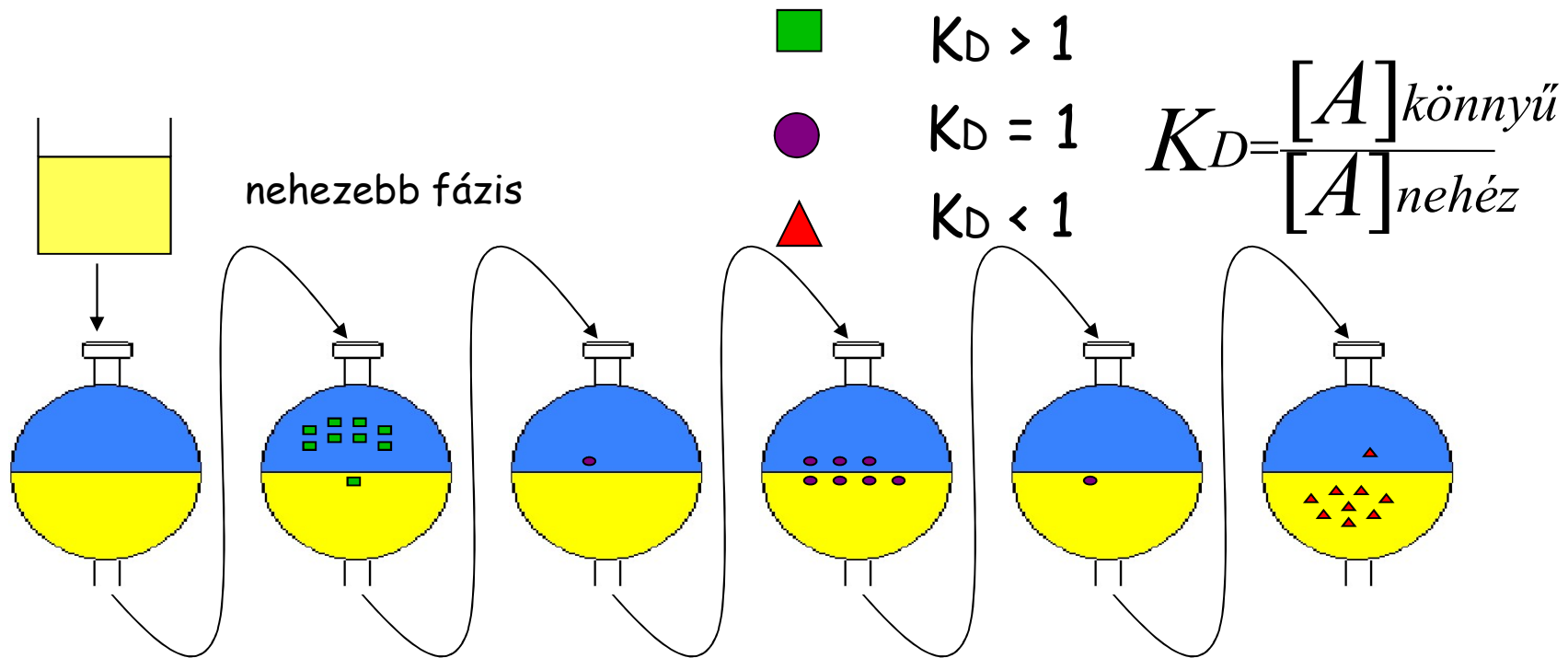
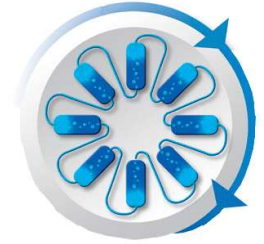
LLC a gyakorlatban



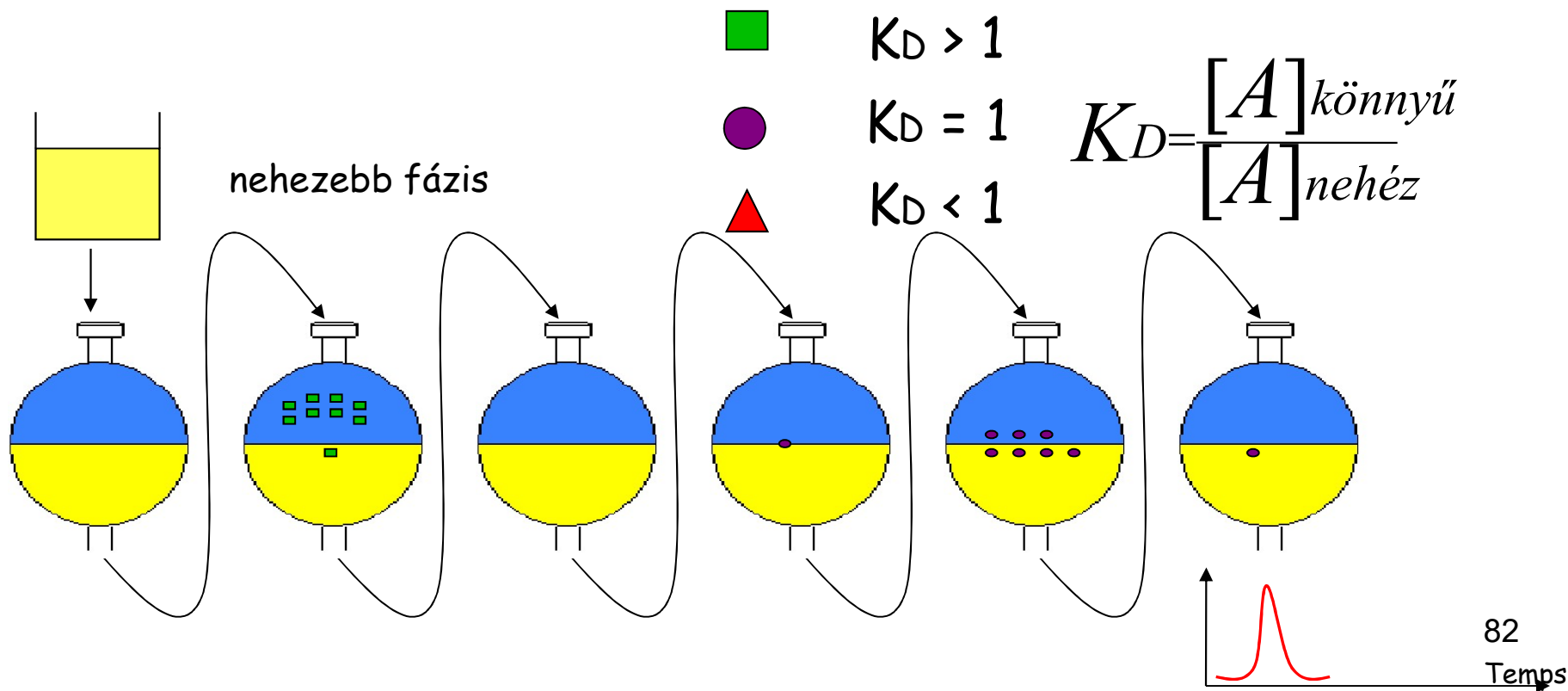
LLC a gyakorlatban



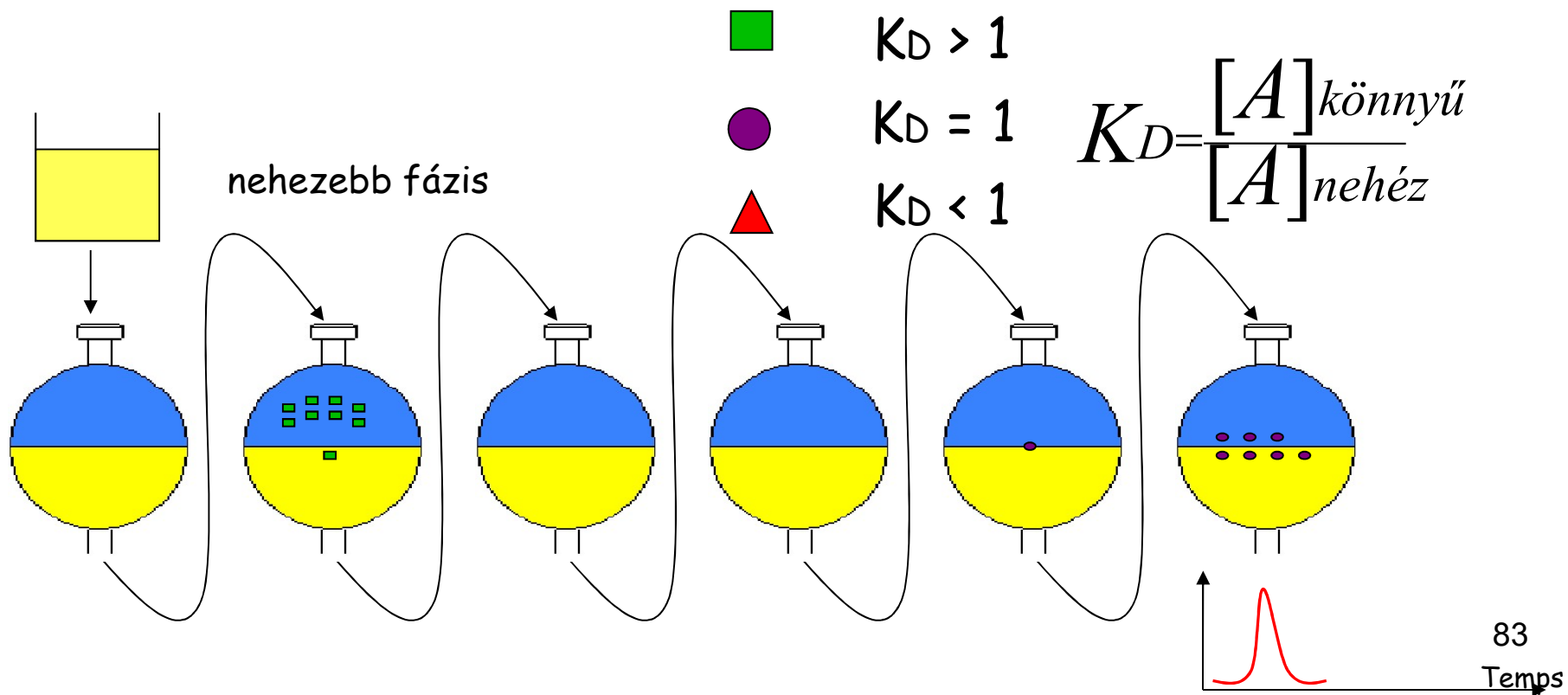
LLC a gyakorlatban



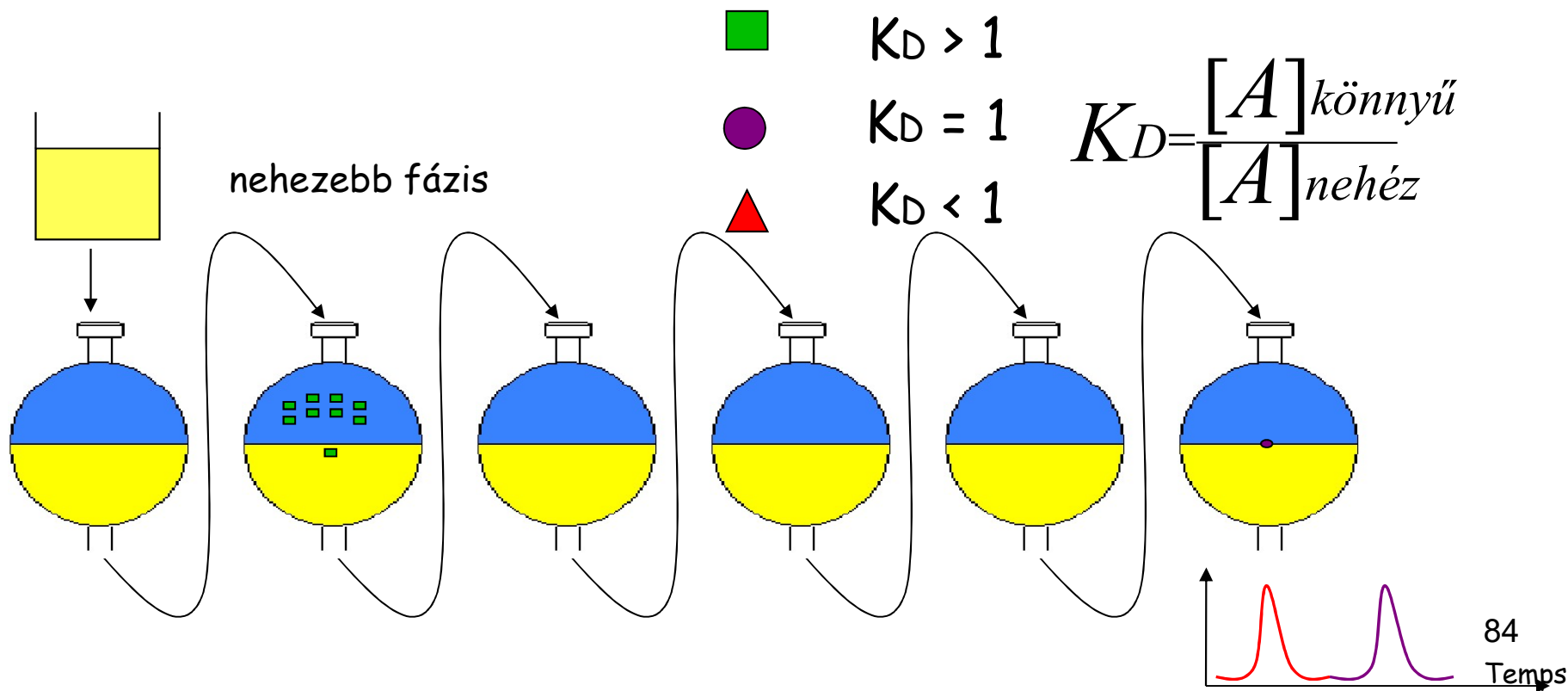
LLC a gyakorlatban



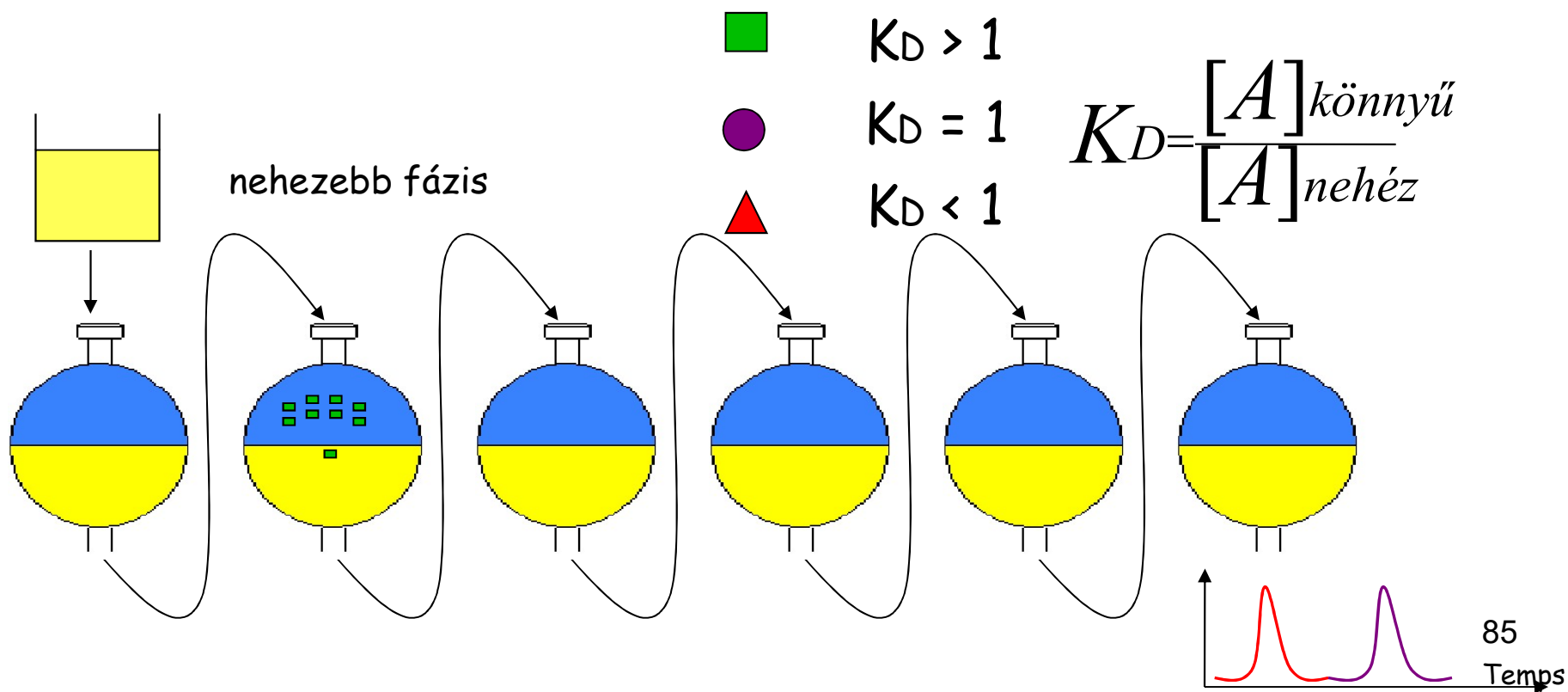
LLC a gyakorlatban



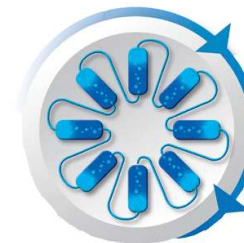
LLC a gyakorlatban



LLC a gyakorlatban



Nagyságrendek



Készülék	Oszlop térfogat	Áramlási sebesség	Tisztítható anyag tömege
Laboratóriumi preparatív rendszerek	250 ml	10-20 ml/perc	2-6 g/batch 100-500 g/nap
↓	↓	↓	↓
Pilot rendszerek	5 l	150-200 ml/perc	100-150 g/batch Pár kg/nap
↓	↓	↓	↓
Ipari méretű tisztítás (TMB)	Maximum 50 l	6-15 l/perc	tonnák! folyamatos üzemmódban

Konvergens kromatográfia

SFC, UPC²

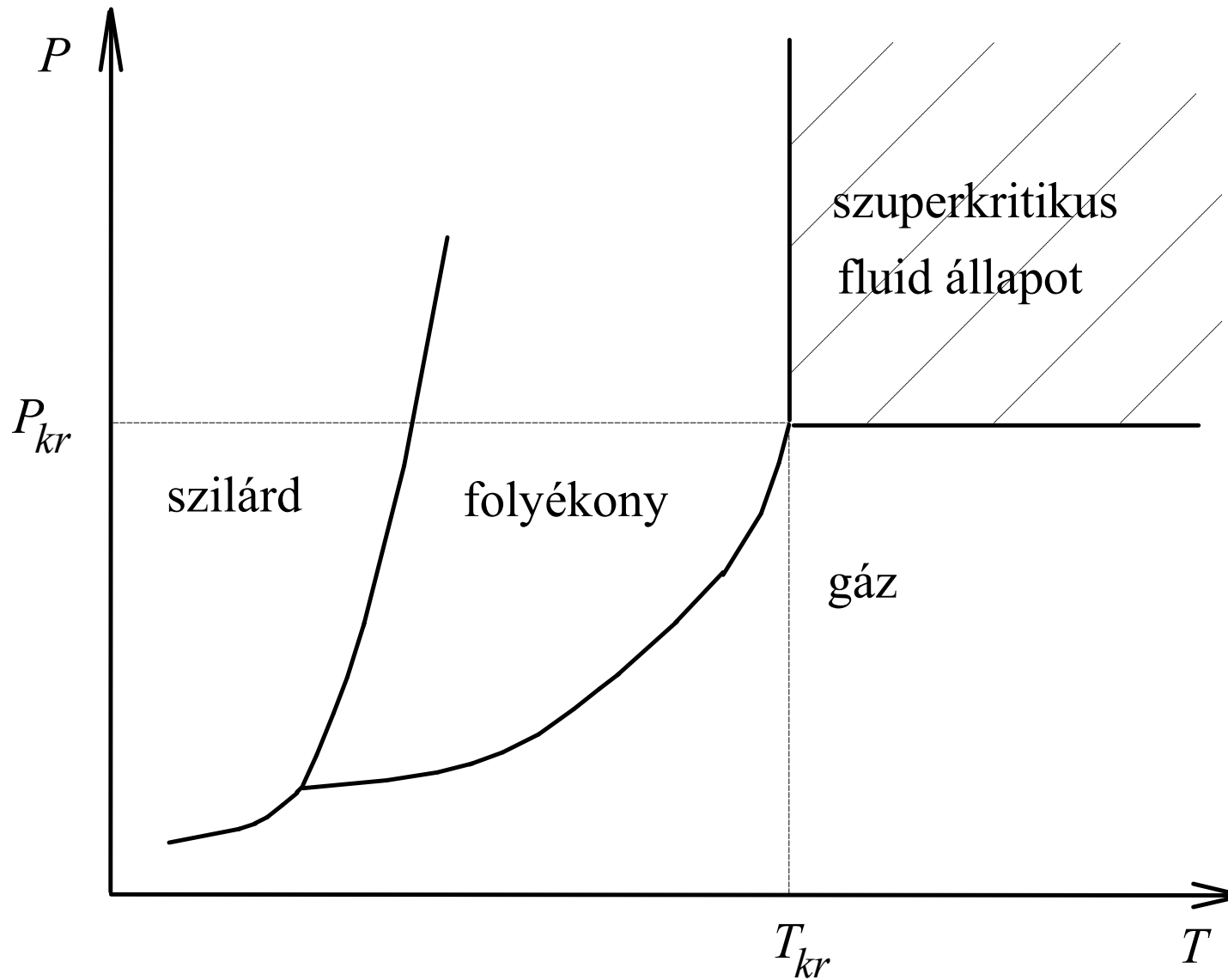
*„One of the most interesting features of **ultra high pressure gas chromatography** would be **convergence with classical liquid chromatography**”*

Giddings, 1965

A mozgó fázisok fizikai jellemzői:

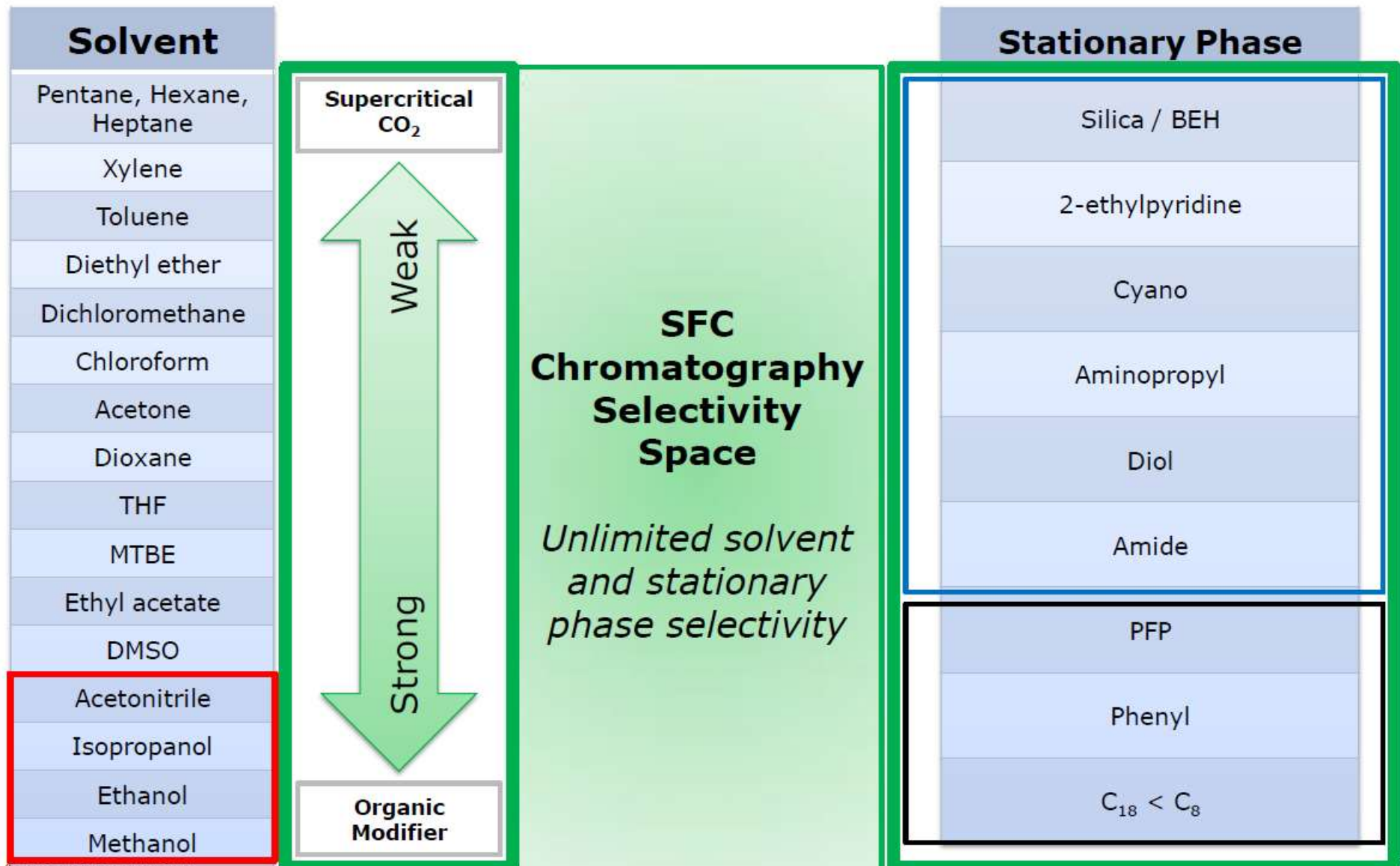
	GC	SFC	LC
Sűrűség (gcm^{-3})	10^{-3}	0.3-0.8	1
Viszkozitás ($\text{gcm}^{-1}\text{s}^{-1}$)	10^{-4}	10^{-4} - 10^{-3}	10^{-2}
Diffúziós áll. (cm^2s^{-1})	10^{-1}	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-5} - 10^{-6}

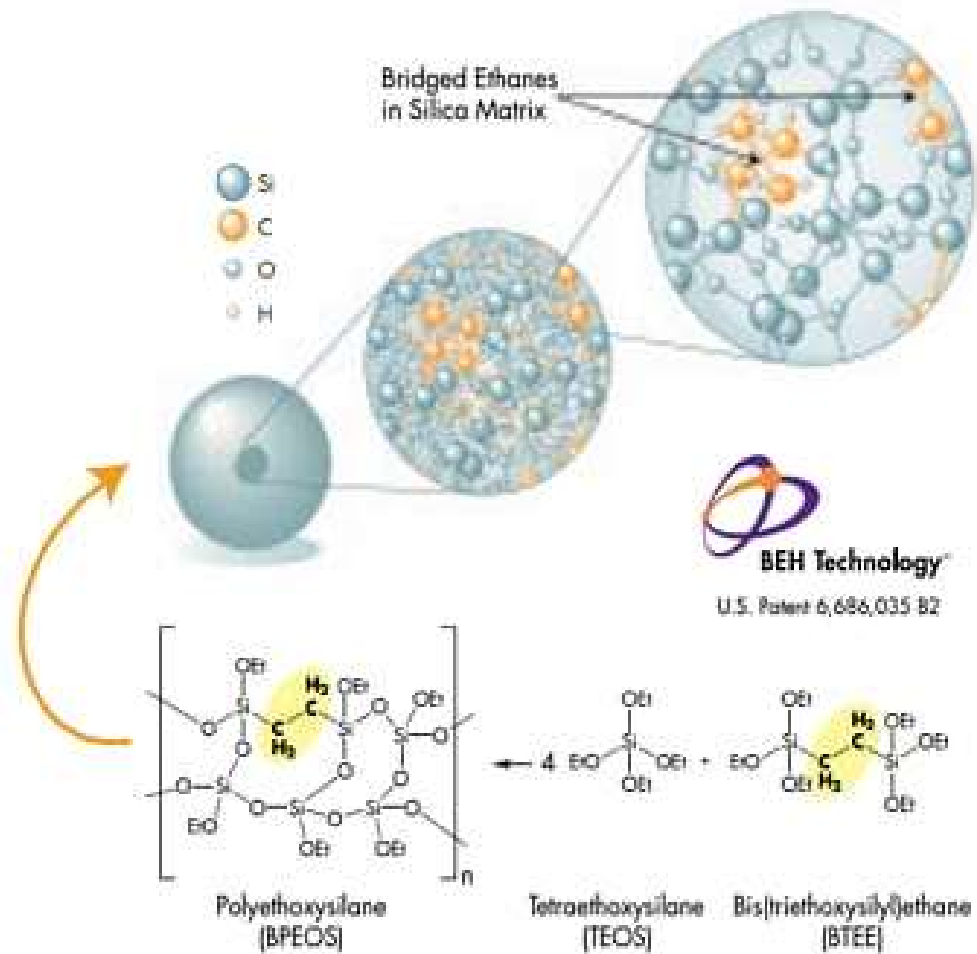
Szuperkritikus fluid állapot

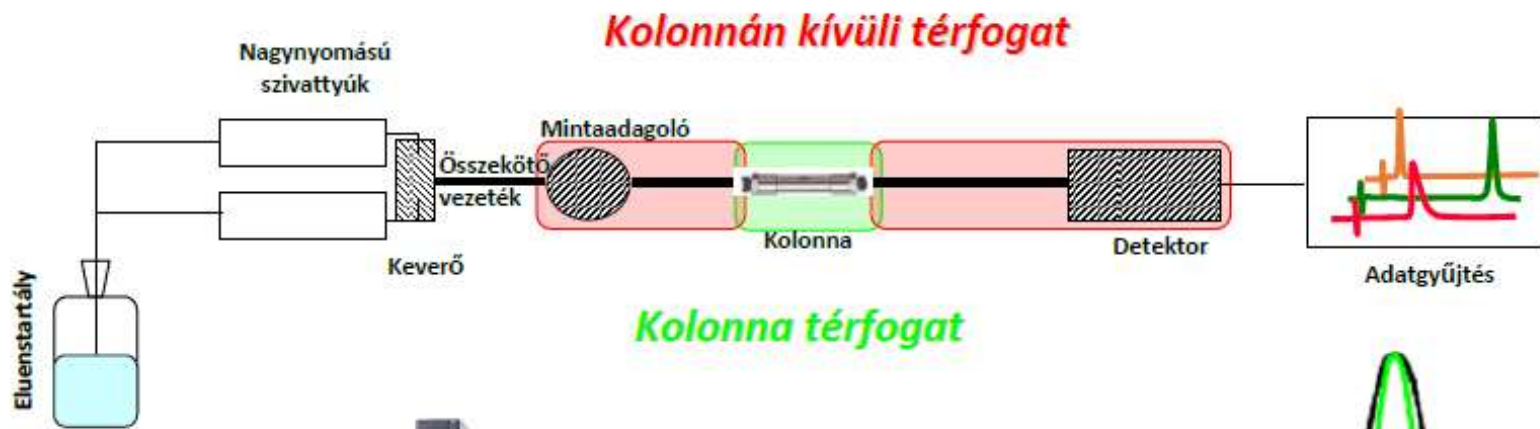


Szuperkritikus fluidumok

	P_{kr} (bar)	T_{kr} (°C)	(g/cm ³)
CO₂	72,9	31	0,446
N₂O	72,3	36,5	0,457
CF₂Cl-CF₂Cl	37,1	146,7	0,582
SF₆	37,1	46	0,750
n-C₅	33,3	197	0,252
i-propanol	47	253	0,273



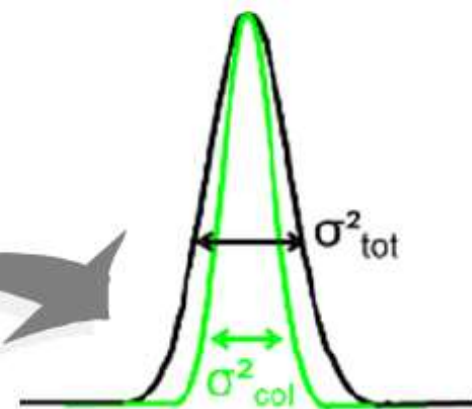




Kolonna térfogat

~ **85 μL^2**

$$\sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2 = \sigma_{total}^2$$

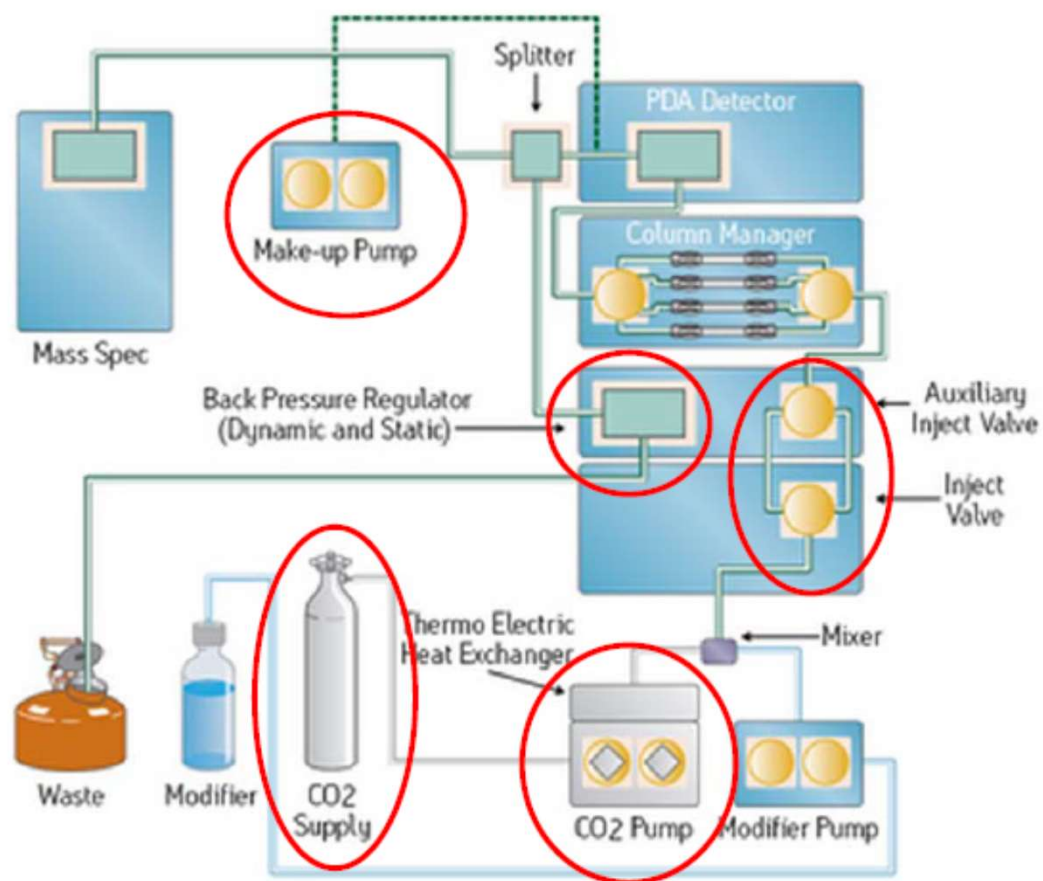


$$\sigma_{col}^2 = \frac{V_r^2}{N_{col}} = \frac{(V_0 \times (1+k))^2}{N_{col}}$$

$$\sigma_{ext}^2 = K_{inj} \frac{V_{inj}^2}{12} + K_{cell} \frac{V_{cell}^2}{12} + \tau^2 F^2 + \frac{r_c^4 \times l_c \times F}{7.6 \times D_m}$$

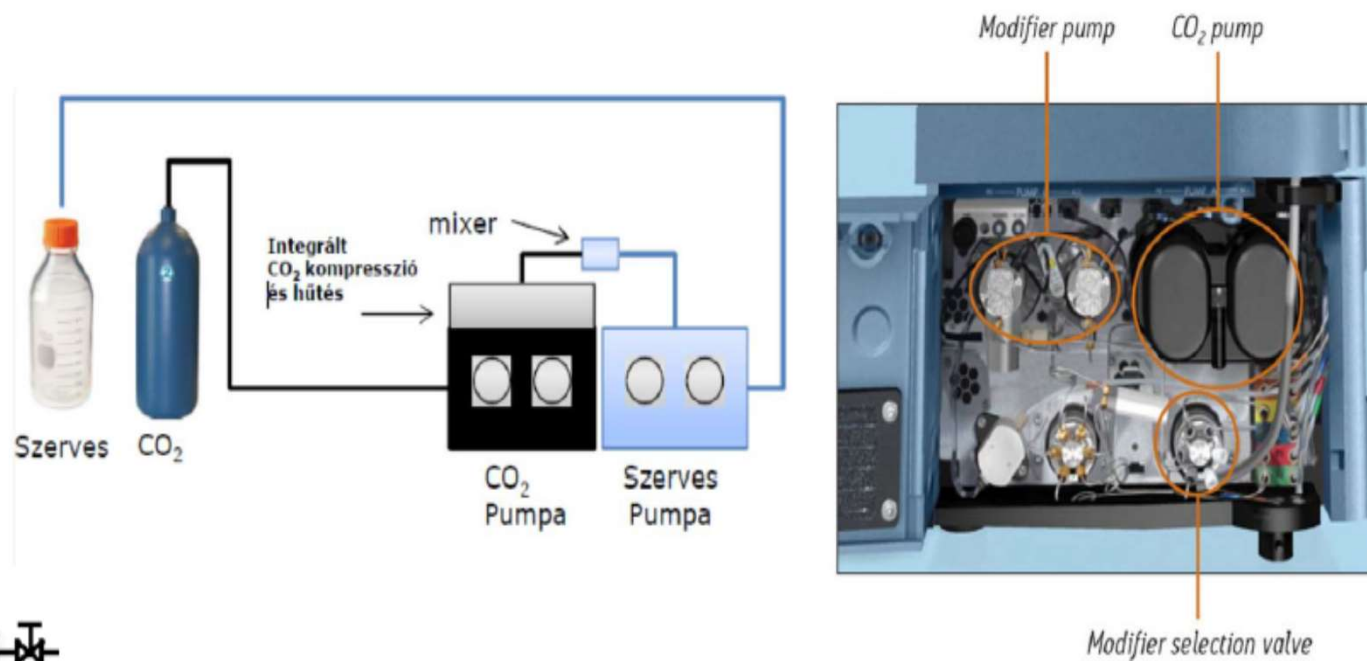
Mintaadagoló Detektor Összekötő vezeték

A készülék felépítése (UPC²)



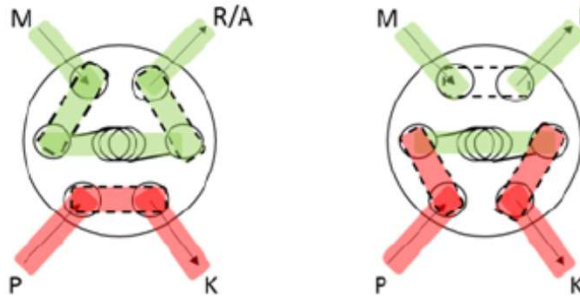
különbségek egy UHPLC rendszerhez képest

- Hűtött pumpafej a CO₂ szállítására
- Injektálás kiegészítő forgószelepen keresztül
- Aktív előmelegítés (opcionális UHPLC-ben)
- Nyomásszabályozás az UV/DAD detektor után, CO₂ kezelése



- **A pumpa folyékony CO₂-ot szállít** (merülőcsöves élelmiszeripari minőségű (\$) CO₂)
- a nyomás állandó értéke automatikus összenyomhatósági kompenzációval valósul meg
- a pumpa termosztált, így **a nyomás és hőmérséklet jól kontrollált, a mozgófázis sűrűsége konstans és az áramlási sebesség állandó**

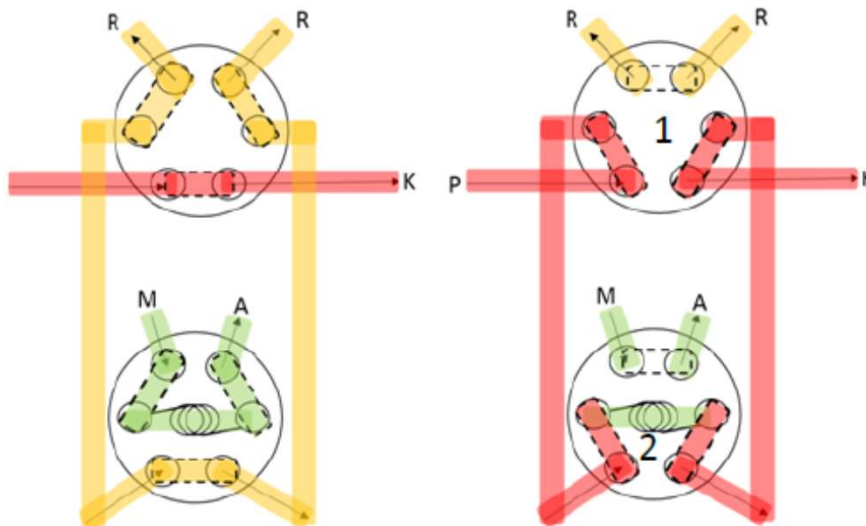
Injektálás kiegészítő forgószelepen keresztül



LC:

- nincs fáziskülönbség a minta és a mozgófázis között
- töltés alatt a mozgófázis nem jut a mintahurokba (nem diffundál bele)

Minta betöltése (load) Injektálás (inject)

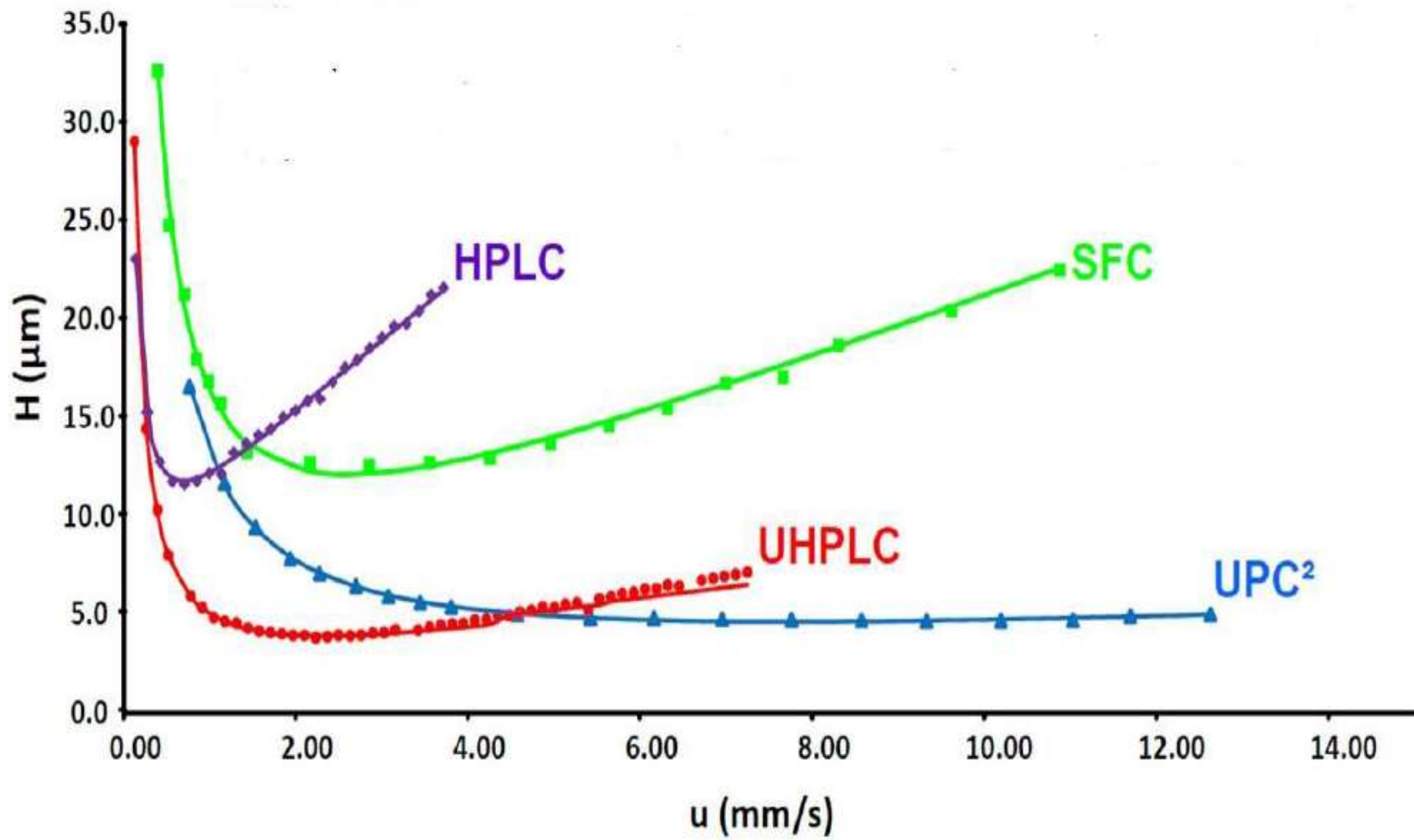


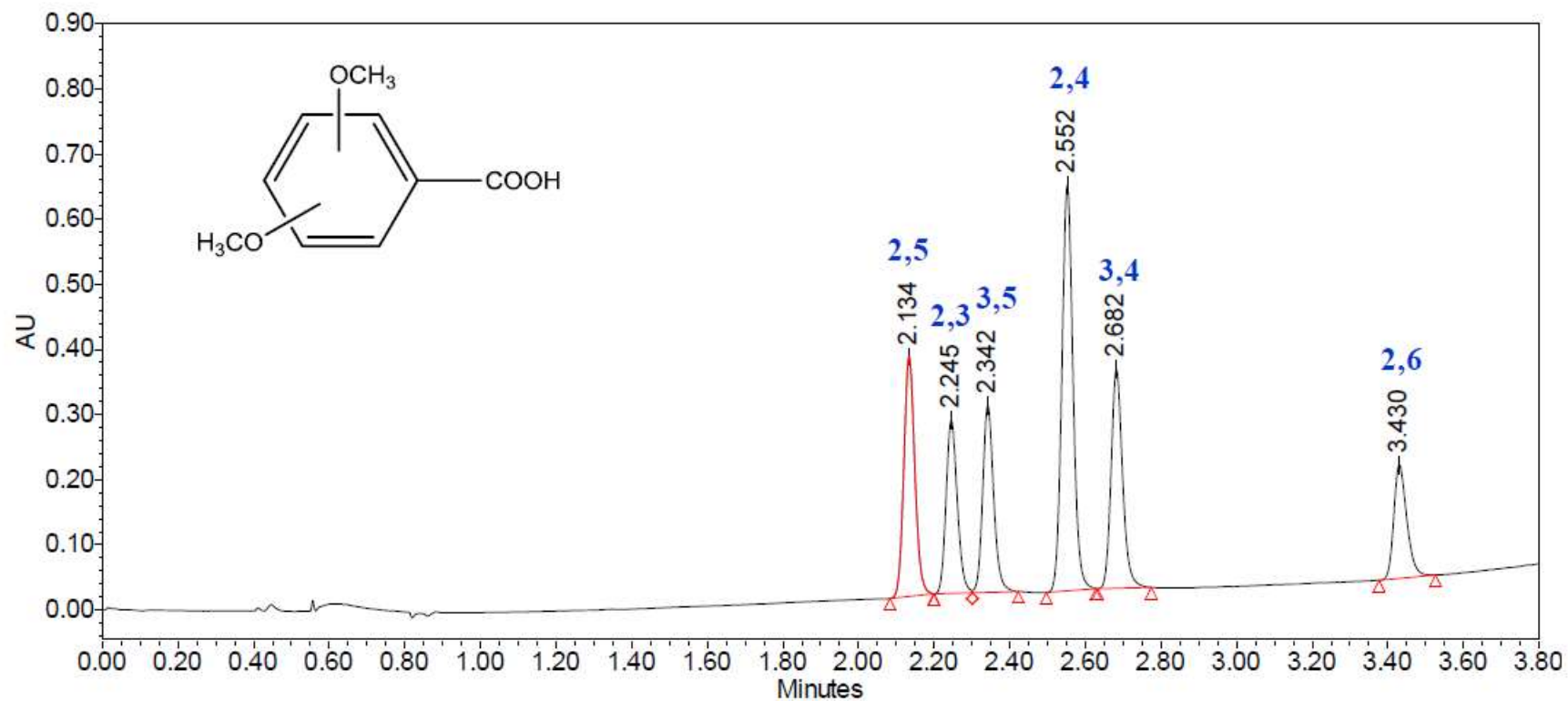
SFC:

- van fáziskülönbség a minta és a mozgófázis között
- töltés alatt (néhány sec) a mozgófázis bediffundálhatna a mintahurokba (reprodukálhatóság csökkenése)
- A segédszelep (1) töltés alatt atm. nyomáson tartja a 2-es szelepet
- Injektálás: először a 2-es, majd az 1-es szelep fordul

Minta betöltése (load)

Injektálás (inject)





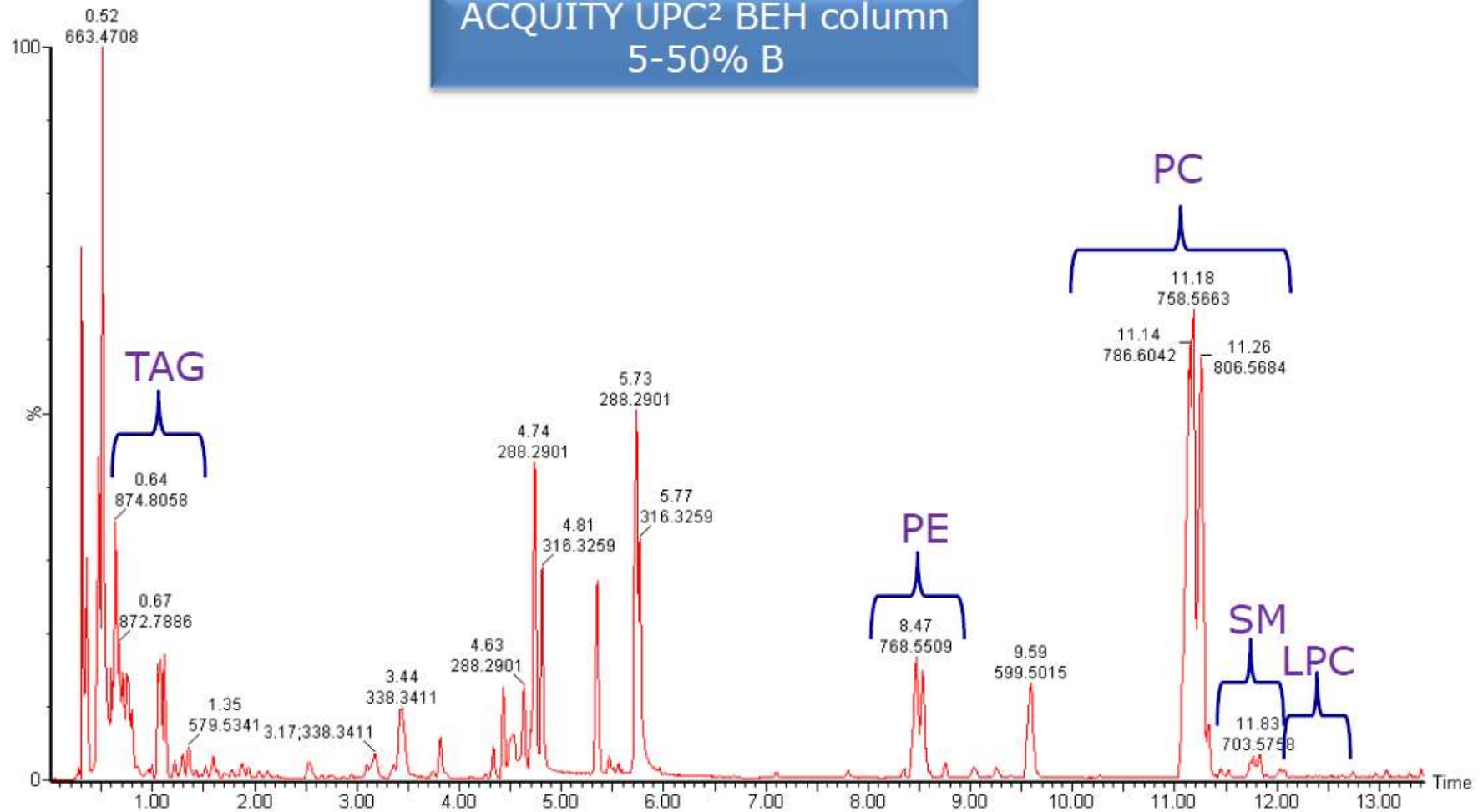
Mixture of 6 positional isomers of DMBA

Sample: Each at 0.2 mg/mL in isopropanol (IPA)

Column: 3.0 x 100 mm, 1.7 μ m ACQUITY UPLC BEH125

Solvent: CO₂ / MeOH with 0.2% formic acid

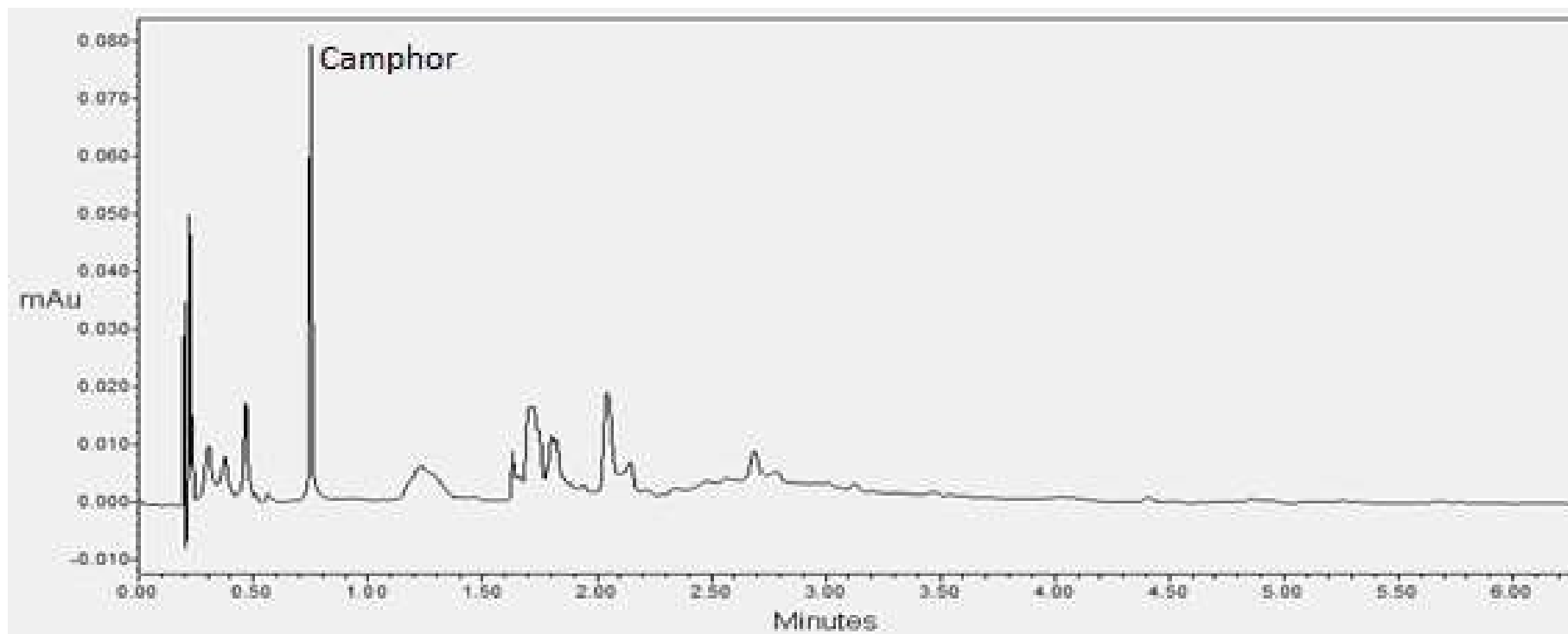
ACQUITY UPC² BEH column
5-50% B



TAG: Triacylglycerides
SM: Sphingomyelin

PE: Phosphatidylethanolamine
LPC: Lysophosphatidylcholine

PC: Phosphatidylcholine



Acquity UPC² BEH-2EP column (100 mm x 3 mm, 1.7 μ m, Waters, MA, USA). The eluents were supercritical carbon dioxide (A) and isopropanol (B). A gradient program was applied: 0-10 min. 0%→10% B with a flow rate of 2.0 ml/min. The column temperature was 50°C. The detection wavelength was 290 nm during the analysis, UV spectra were recorded from 200 nm to 400 nm, the resolution was 2.4 nm and the sampling rate was 20 points/minute. The back pressure was set to 2000 psi. Empower 3 software was used for the data processing.

Convergence chromatographic determination of camphor in the essential oil of *Tanacetum parthenium* L.

Krisztina Végh^{1*}, Eszter Riethmüller², Anita Tóth¹, Ágnes Alberti¹, Szabolcs Béni¹, József Balla³, Ágnes

Kéry¹

UHPLC

UHPLC

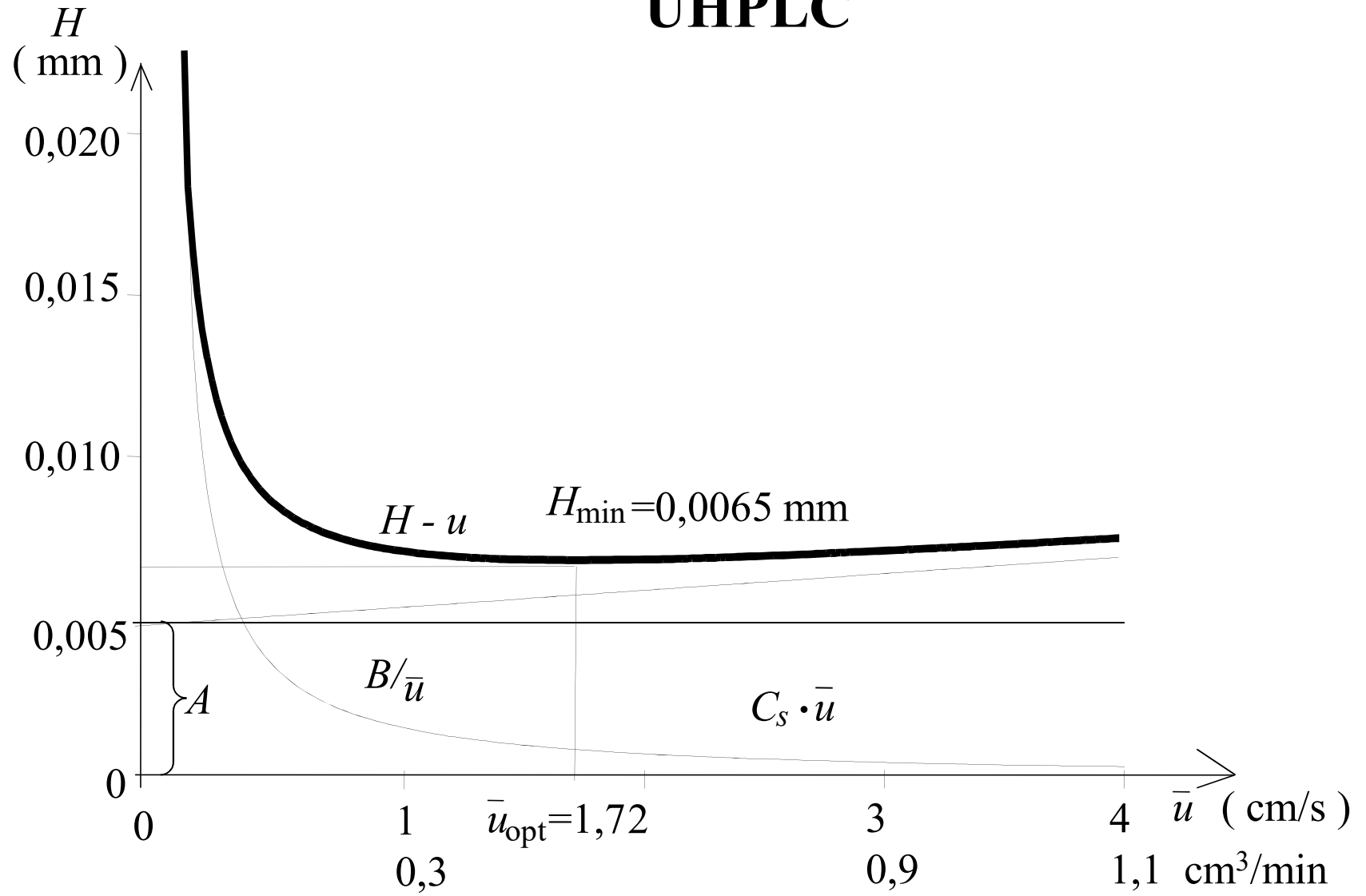
$$HETP = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{\bar{u}} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_s} \bar{u}$$

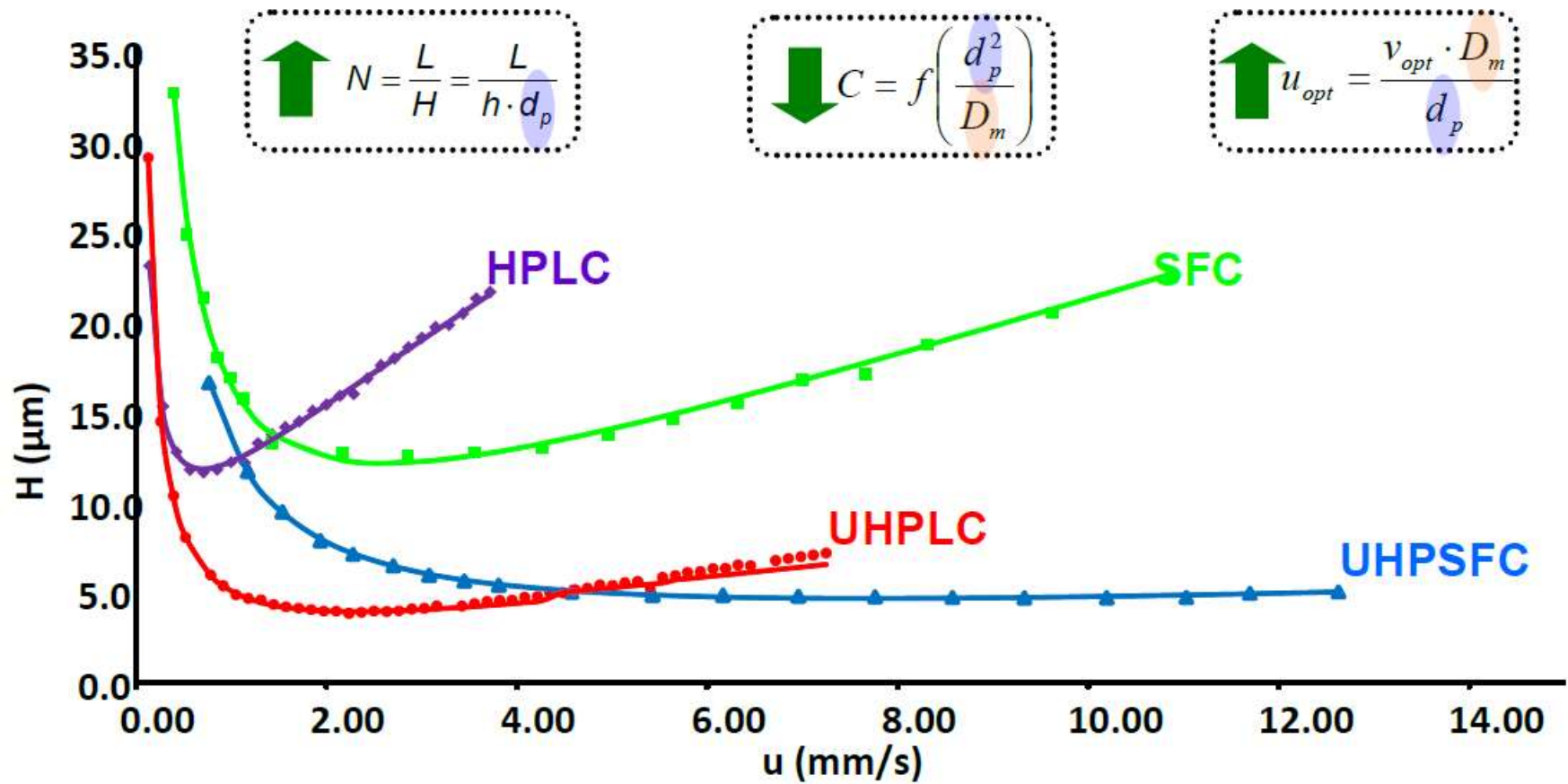
$$H_{p\acute{o}rusdiff} = \frac{\Theta(k_0 + k + k_0 k)^2 \bar{d}_{p\acute{o}rus}^2 u}{30(1+k_0)^2 (1+k)^2 D_m k_0}$$

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

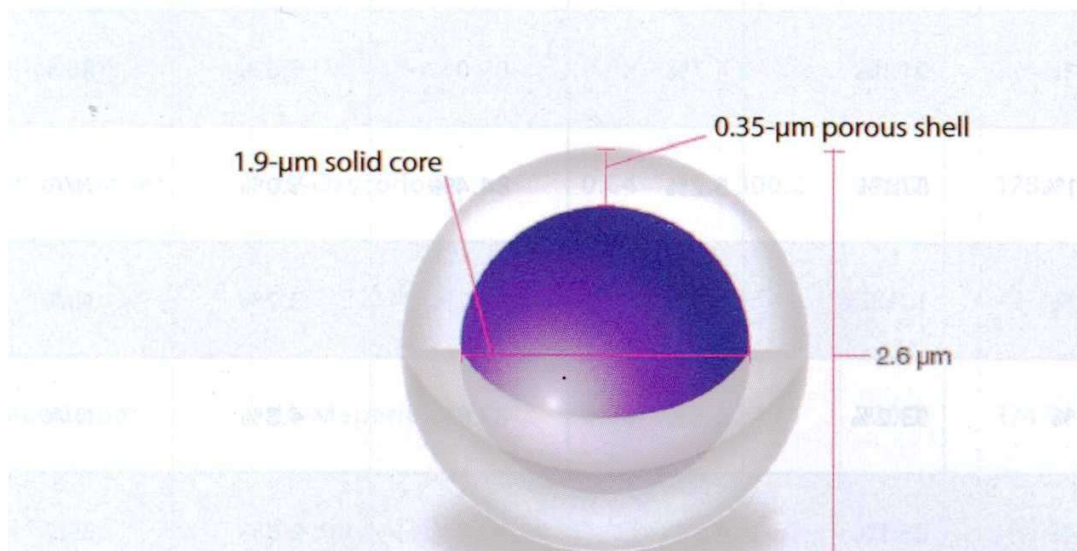
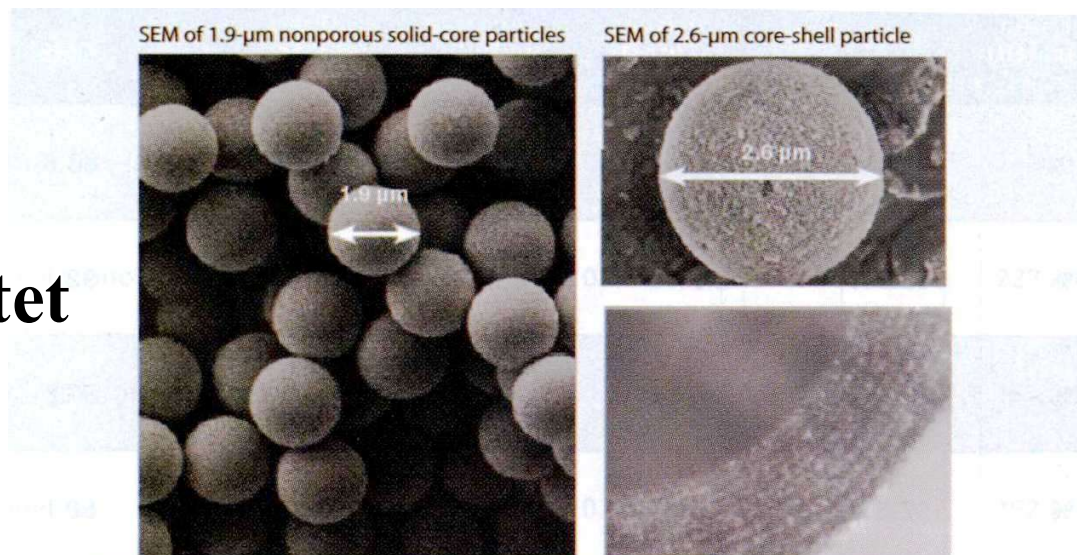
- Fajlagos felülete: 200-400 m²/g
- Pórusmérete: 20-100Å (2-10nm)
- Pórustérfogat: 0,1-3 cm³/g
- Szemcseméreték: 1,3; 1,7; 3; 5 μm
- Módosított szilikagél carbon telítettsége: 5-20%

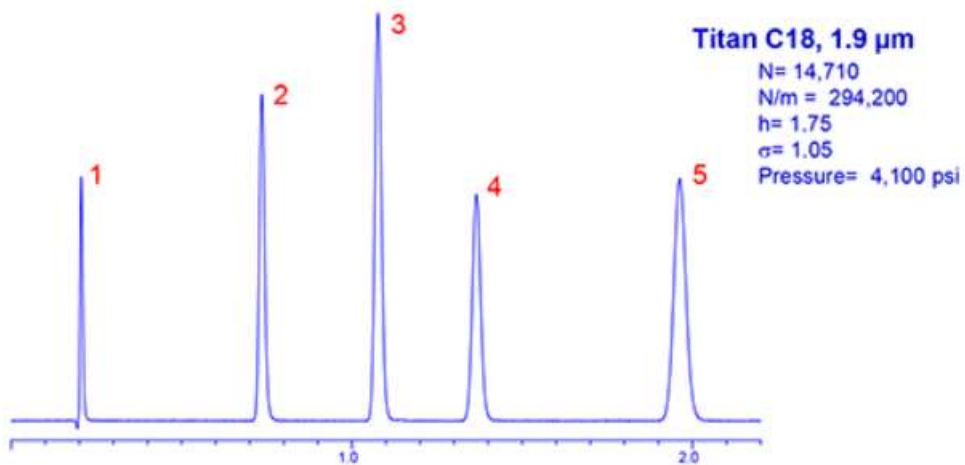
UHPLC





Héjszerkezetű töltet





Conditions

column: 5 cm x 3.0 mm I.D.

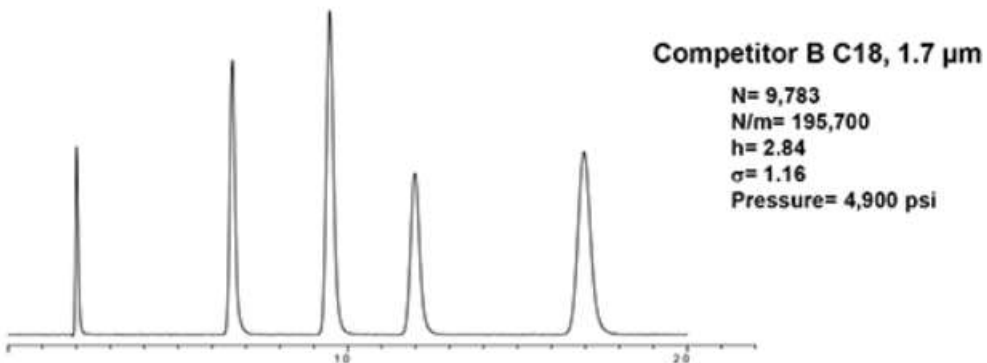
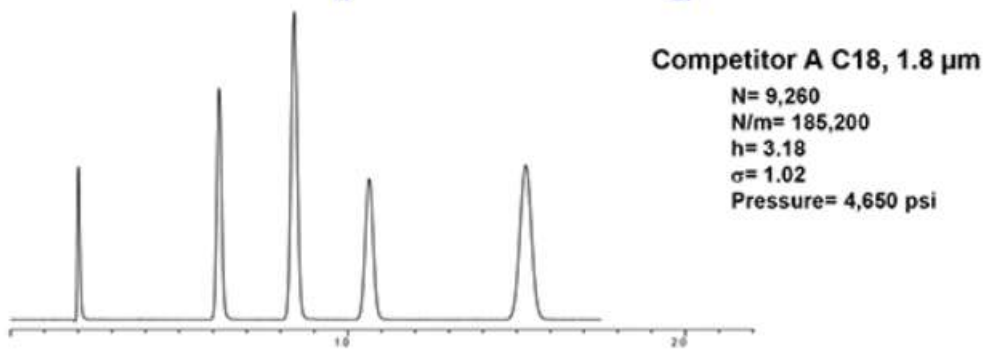
mobile phase: 60% acetonitrile

flow rate: 0.9 mL/min

temp.: 35 °C

det.: 254 nm

1. Uracil
2. Diazepam
3. Toluene
4. Naphthalene
5. Biphenyl



Áramlás szemcsés tölteten

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

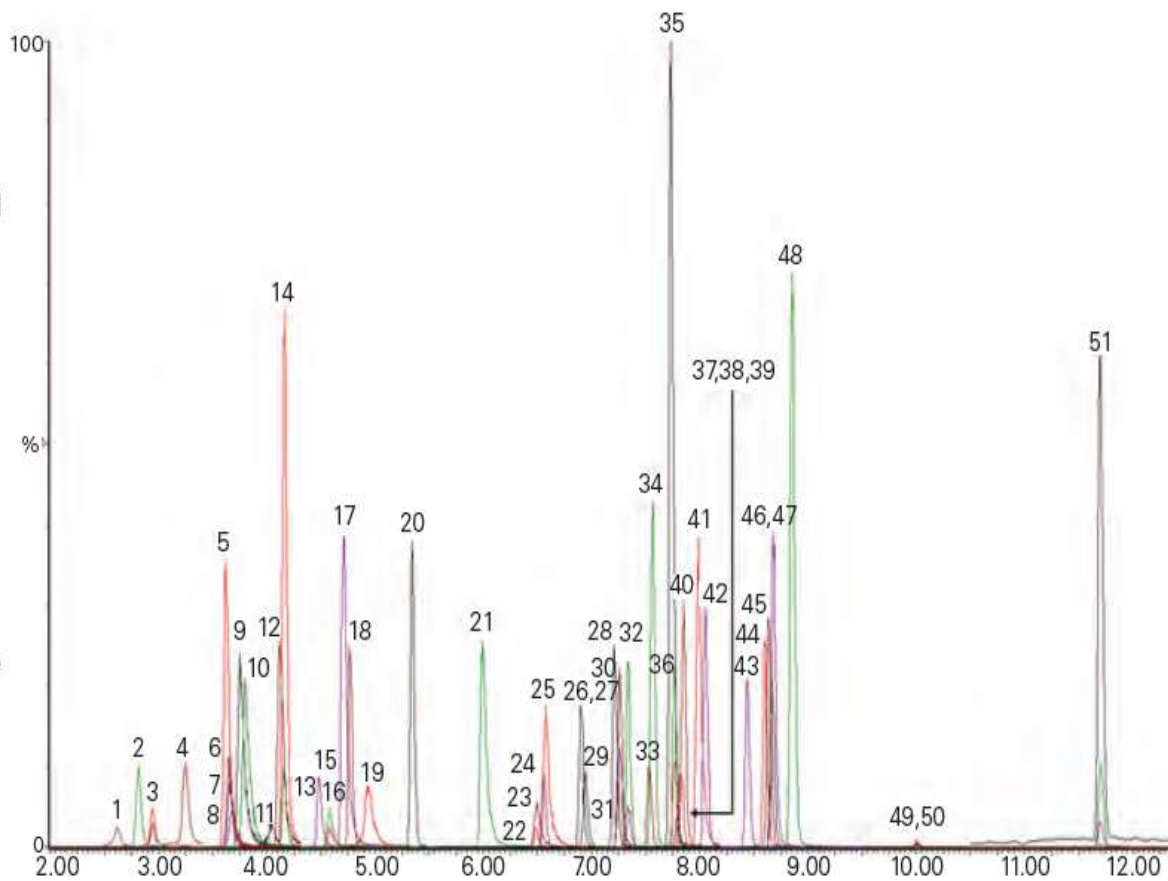
$$\Delta p = \frac{Lu\eta\varphi}{d_p^2}$$

Tudatmódosítók

Column: ACE Excel 1.7 C18
Dimensions: 100 x 2.1 mm
Part Number: EXL-171-1002U
Mobile Phase: A: 5 mM ammonium acetate in H₂O
 B: 5 mM ammonium acetate in MeOH
Gradient:

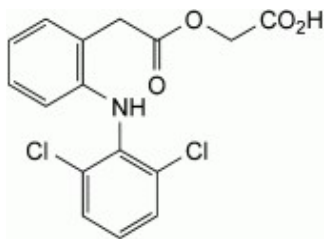
Time (mins)	%B
0.0	10
10.0	90
11.9	90
13.4	10
15.5	10

Flow Rate: 0.3 mL/min
Injection: 10 µL
Temperature: 40 °C
Detection: MS Quattro Premier XE triple quad
 MRM, positive and negative ESI mode
 Desolvation temperature: 450 °C
 Ion source temperature: 150 °C
 Collision gas pressure: 3.5 x 10⁻³ mbar

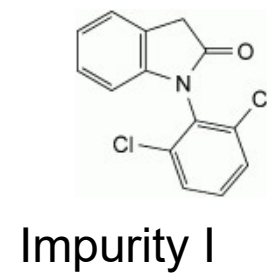
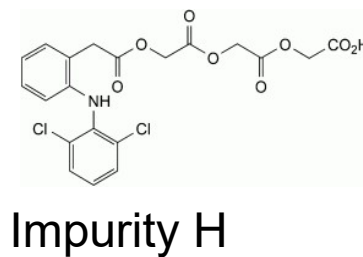
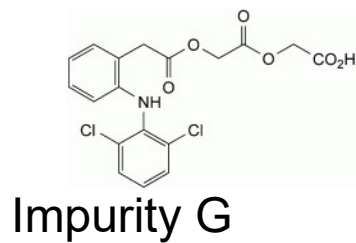
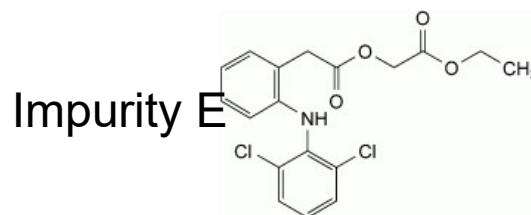
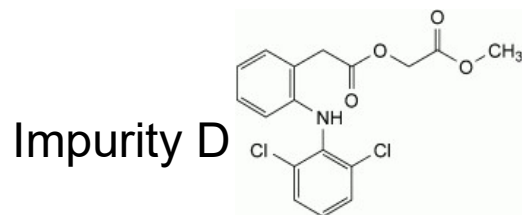
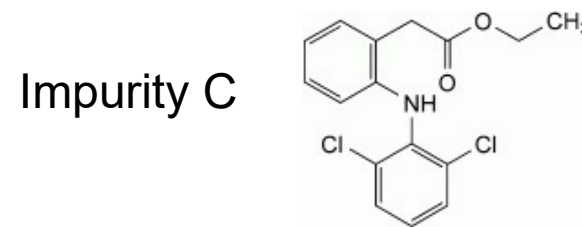
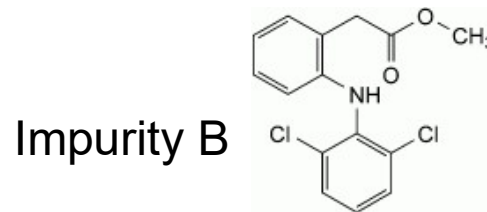
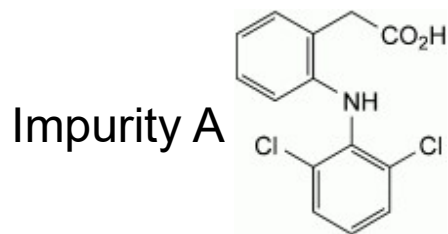


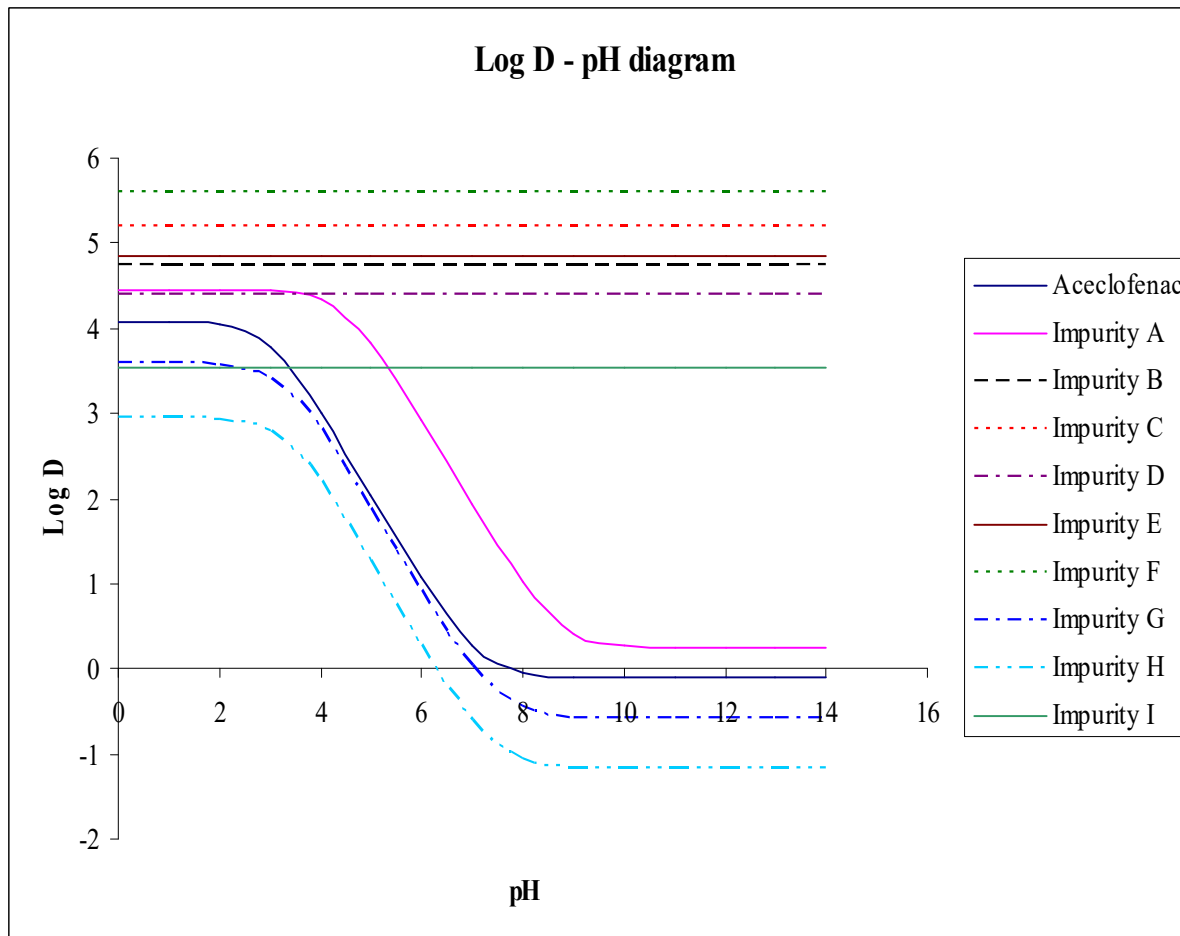
Peak	Analyte	R _t (Mins)	Q1 (Da)	Q3 (Da)
1	Oxymorphone	2.62	302.2	198.1
2	Morphine-d3	2.82	289.2	201.0
3	Morphine	2.95	286.2	201.0
4	Hydromorphone	3.25	286.2	185.1
5	Amphetamine-d5	3.62	141.0	123.9
6	Amphetamine	3.65	136.0	118.9
7	Dihydrocodeine	3.66	302.2	199.1
8	MDA	3.67	180.1	105.0
9	MDMA	3.75	194.1	163.0
10	Methamphetamine	3.80	150.0	90.9
11	Oxycodone	4.03	316.2	241.2
12	MDEA	4.12	208.2	163.0
13	BZE-d3	4.15	293.1	171.0
14	BZE	4.17	290.1	168.0
15	6-MAM	4.48	328.2	165.1
16	Codeine	4.59	300.3	215.1
17	Norfentanyl	4.71	233.1	84.0
18	7-Amino-clonazepam	4.77	286.2	121.0
19	Hydrocodone	4.94	300.2	199.1
20	7-Amino-flunitrazepam	5.34	284.2	135.0
21	Cocaine	5.99	304.2	182.0
22	Norbuprenorphine	6.47	414.3	101.0
23	PCP	6.49	244.2	159.9
24	Zaleplon	6.55	306.2	264.2
25	EDDP	6.58	278.2	234.2
26	Norketamine	6.90	224.1	124.9

Peak	Analyte	R _t (Mins)	Q1 (Da)	Q3 (Da)
27	Bromazepam	6.95	316.1	182.1
28	Ketamine	7.21	238.1	124.9
29	Clonazepam	7.26	316.1	270.1
30	Nitrazepam	7.26	282.2	236.1
31	α-Hydroxytriazolam	7.34	359.1	331.1
32	Flunitrazepam	7.34	314.2	268.2
33	α-Hydroxyalprazolam	7.54	325.2	297.1
34	Estazolam	7.56	295.2	267.2
35	Zolpidem	7.73	308.2	235.1
36	Triazolam	7.77	343.0	308.1
37	2-Hydroxyethylflurazepam	7.77	333.2	109.0
38	Lorazepam	7.80	321.1	275.1
39	Oxazepam	7.82	287.2	241.0
40	Alprazolam	7.85	309.2	281.2
41	Methadone	7.99	310.2	265.2
42	Temazepam	8.05	301.1	255.1
43	Nordiazepam	8.44	271.1	139.9
44	Midazolam	8.61	326.2	291.2
45	Diazepam-d5	8.63	290.2	154.0
46	Diazepam	8.67	285.2	154.0
47	Flurazepam	8.68	388.2	315.1
48	Fentanyl	8.85	337.3	105.0
49	THC-COOH-d3	9.98	348.2	302.2
50	THC-COOH	10.01	345.2	299.2
51	Buprenorphine	11.70	468.3	101.0



Aceclofenac: gyulladásgátló



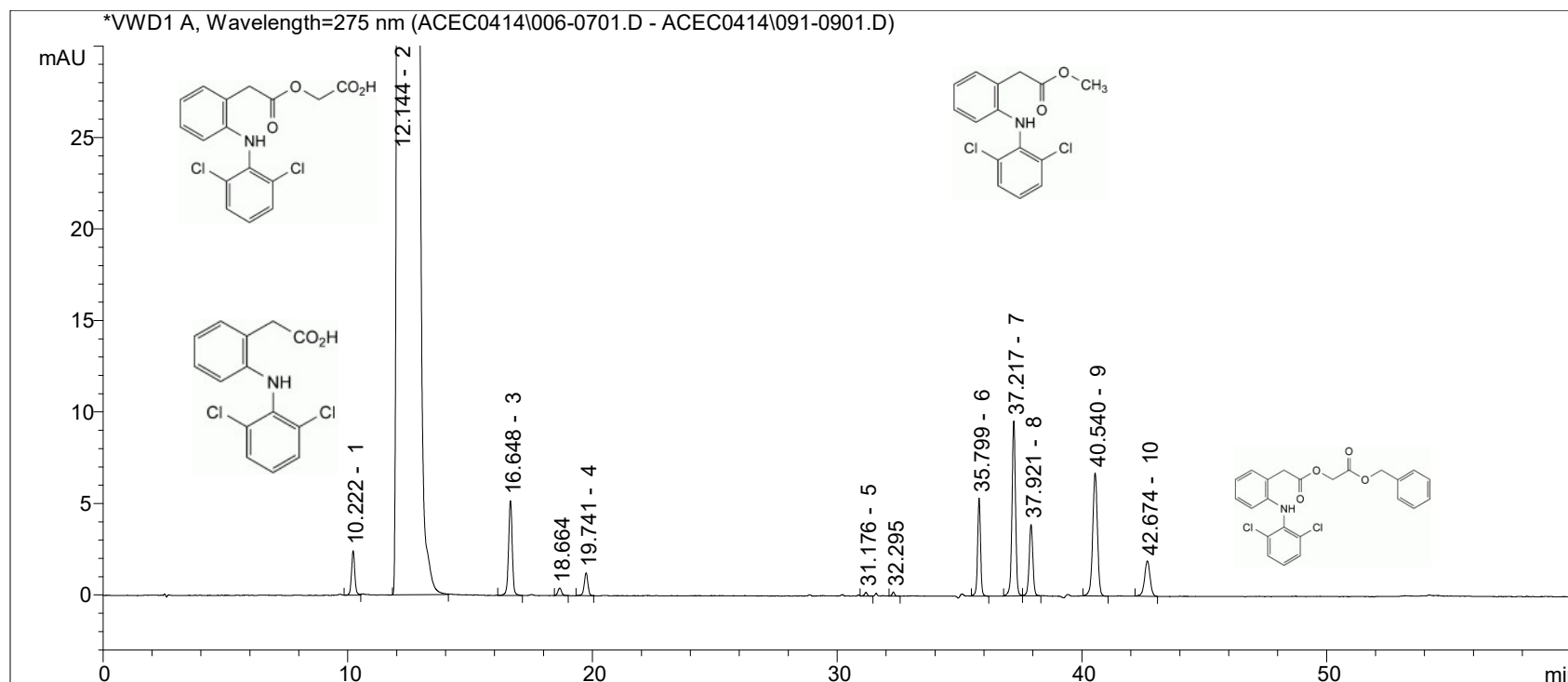


gyakorlatilag semleges
Imp. B, C, D, E, F

semleges
Imp. I

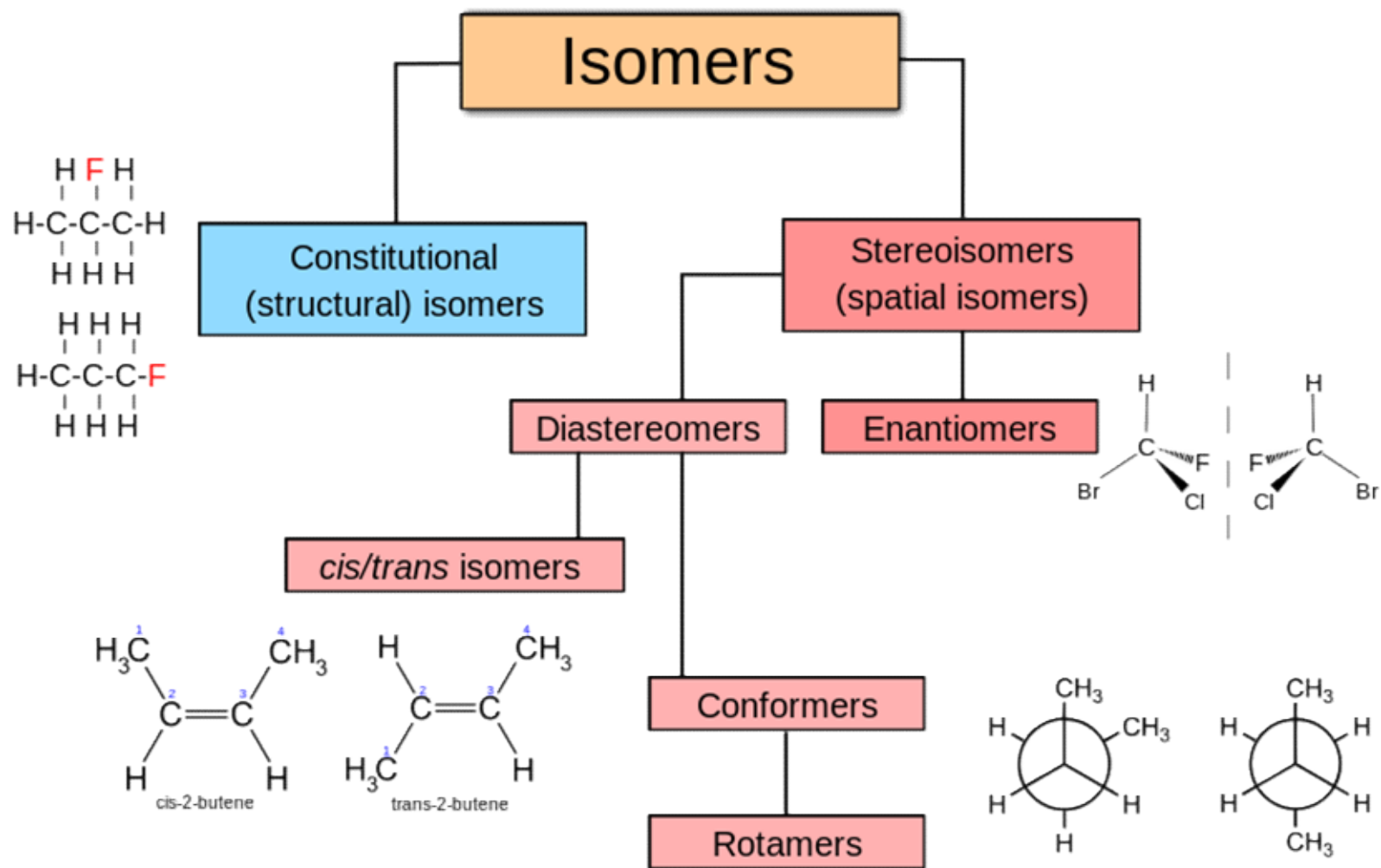
gyenge sav
Aceclofenac,
Imp. A, G H

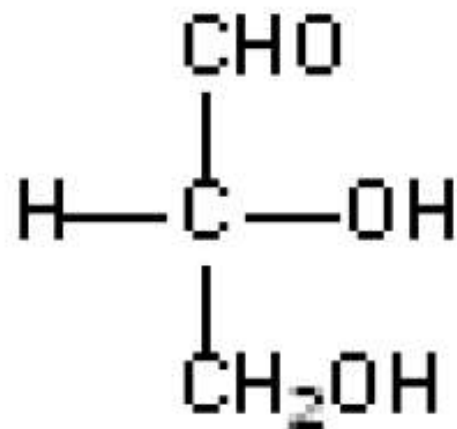
Aceclofenac és szennyezőseinek az analízise



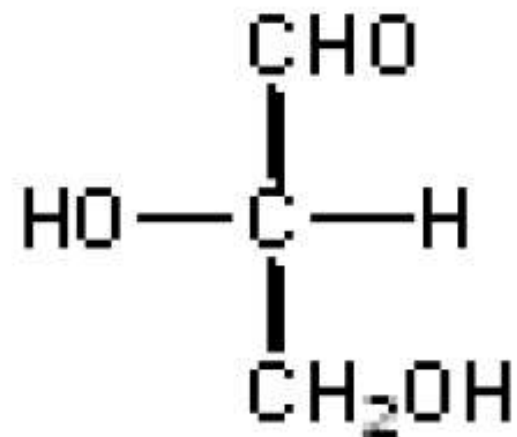
1. Impurity A 2. Aceclofenac 3. Impurity G 4. Impurity H 5. Impurity I
6. Impurity D 7. Impurity B 8. Impurity E 9. Impurity C 10. Impurity F

Királis elválasztások

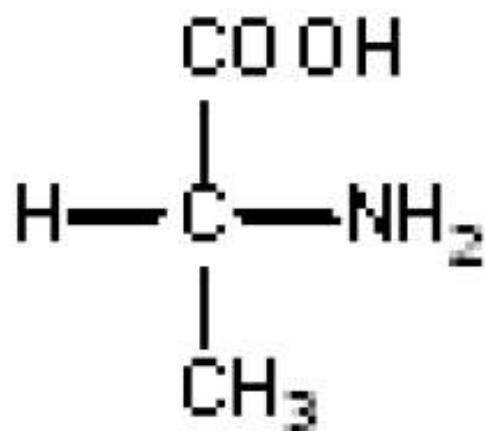




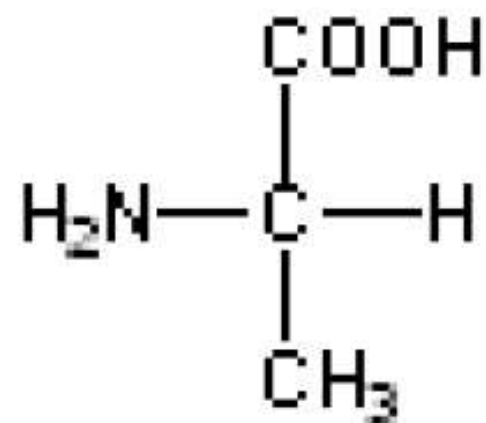
D-(+)-glicerinaldehyd



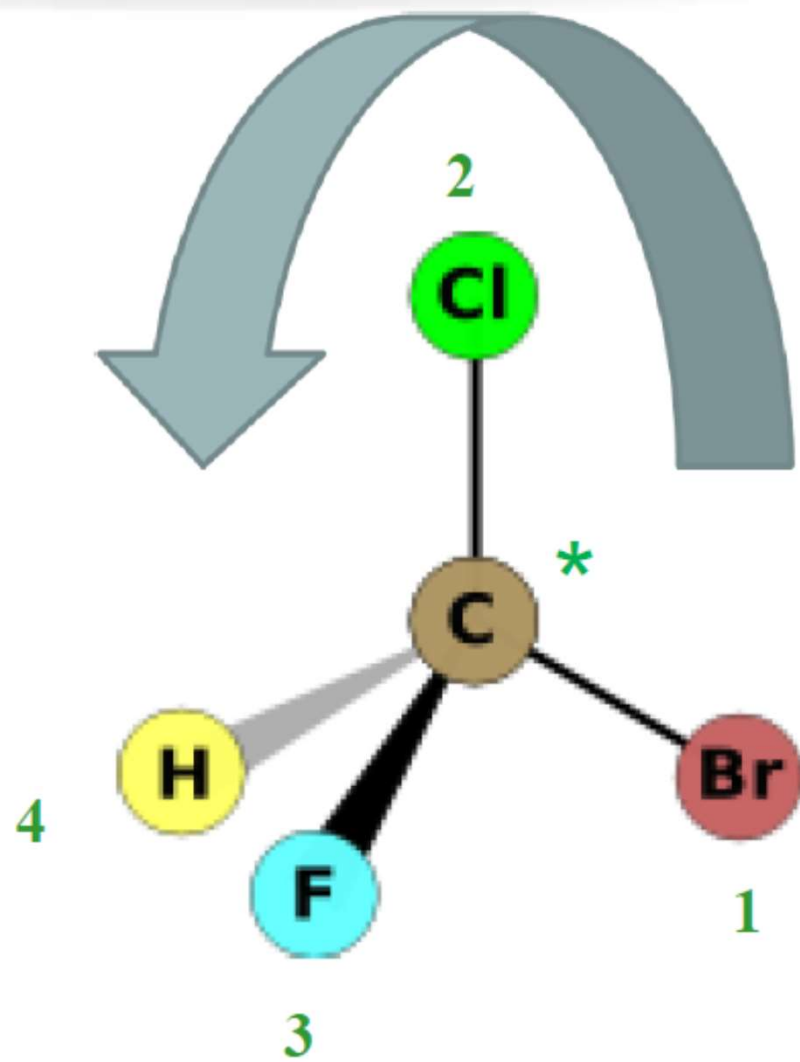
L-(-)-glicerinaldehyd



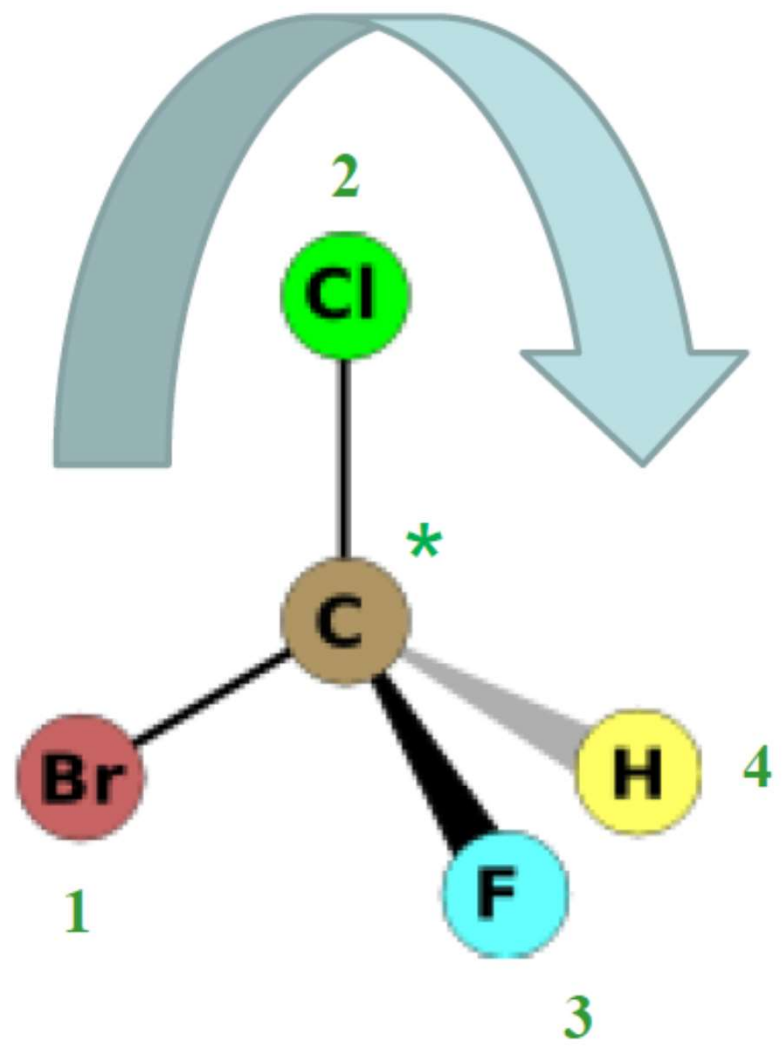
D-alanin



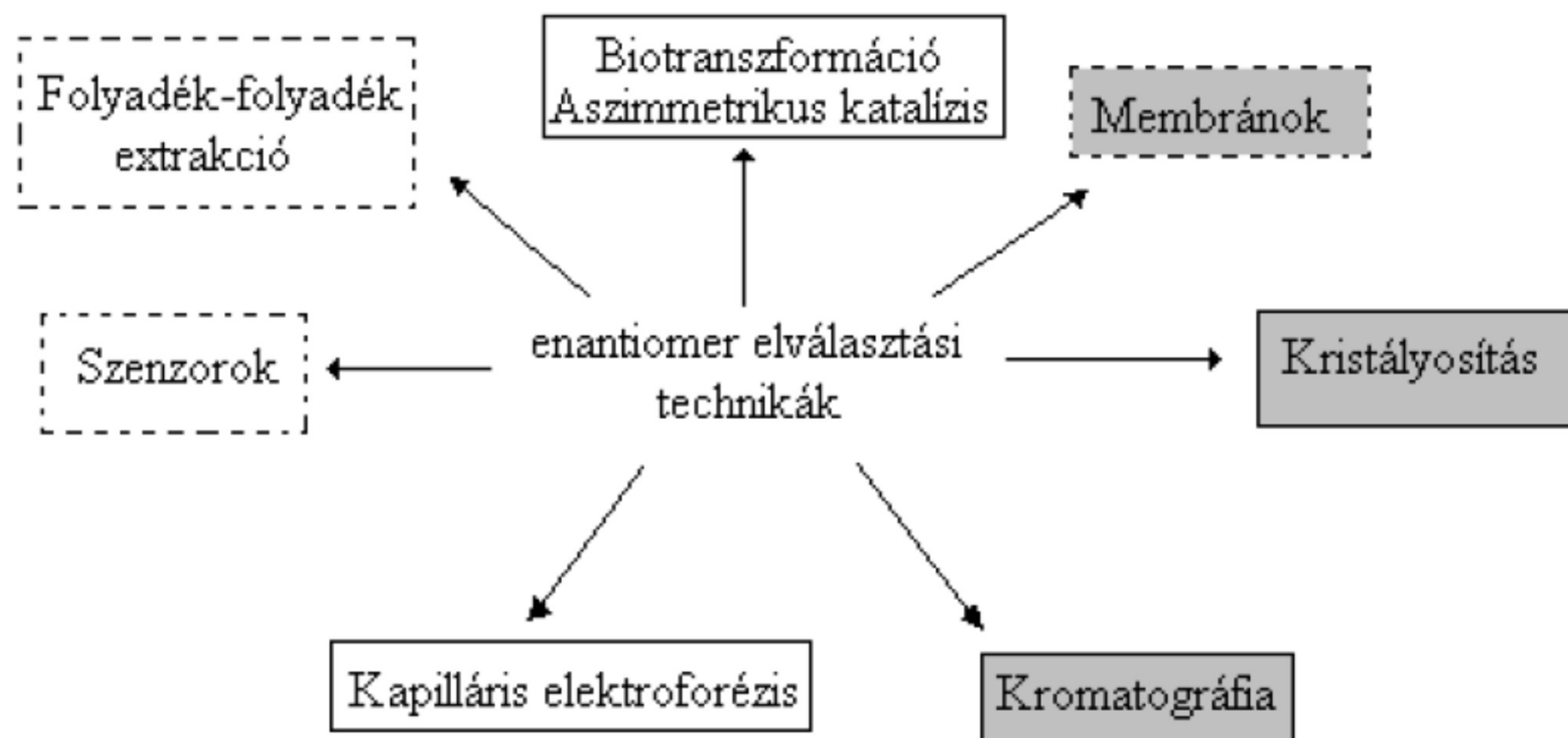
L-alanin



S-enantiomer



R-enantiomer

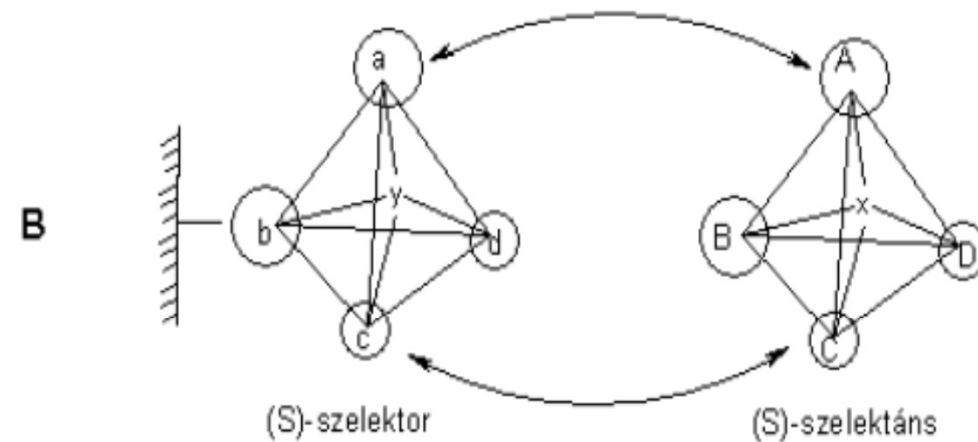
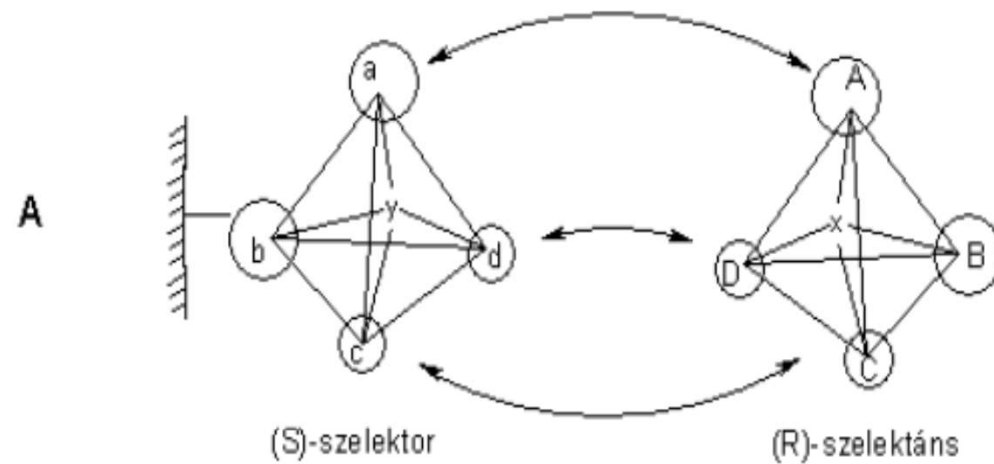


■ Analitikai/Preparatív

□ Analitikai

----- Ritkán alkalmazott

———— Gyakran alkalmazott



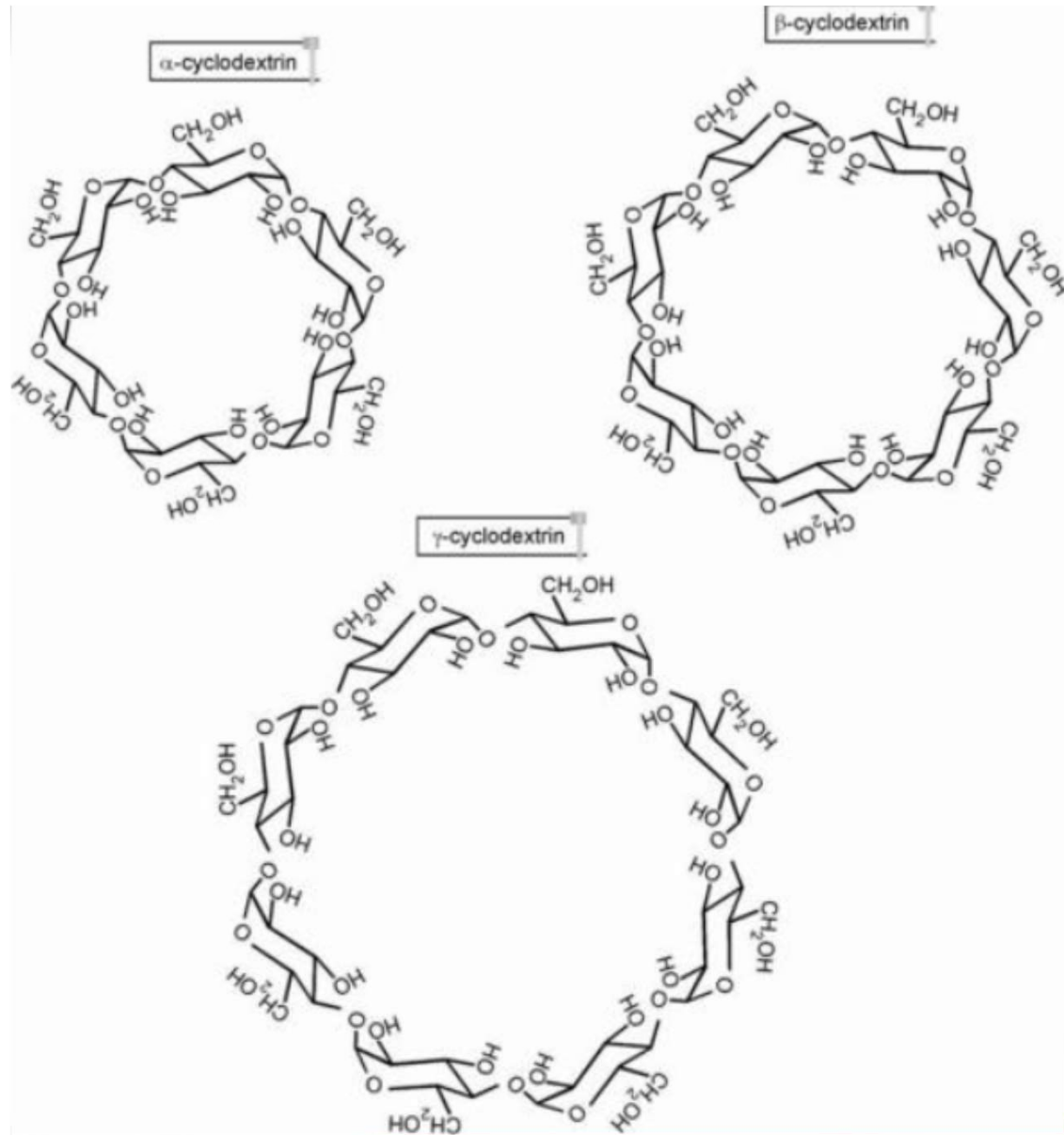
Kölcsönhatási lehetőségek

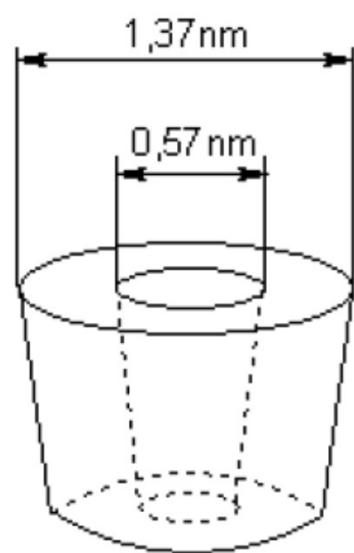
a - A = H-hidas

d - D = $\pi - \pi$

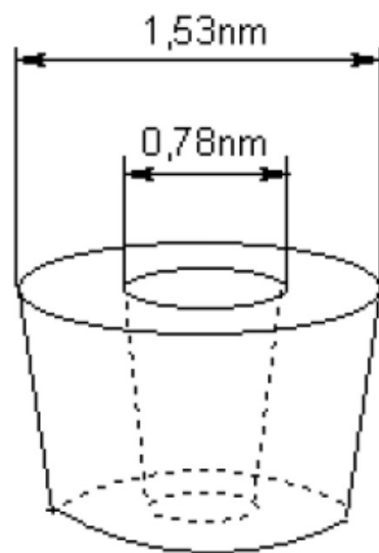
c - C = diszperziós

GC

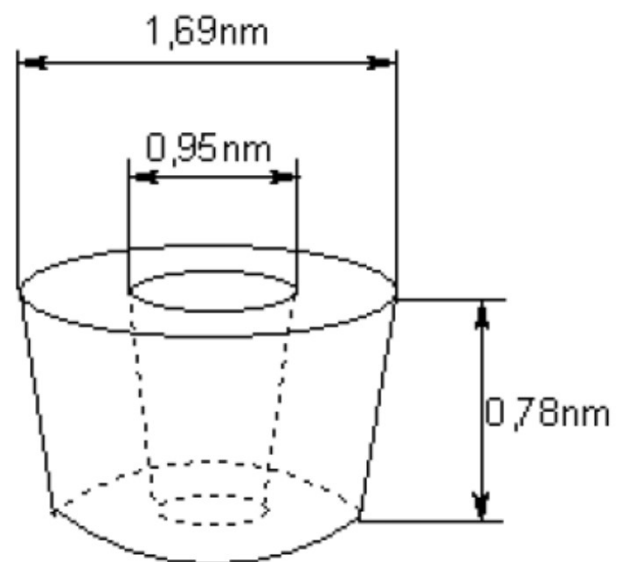




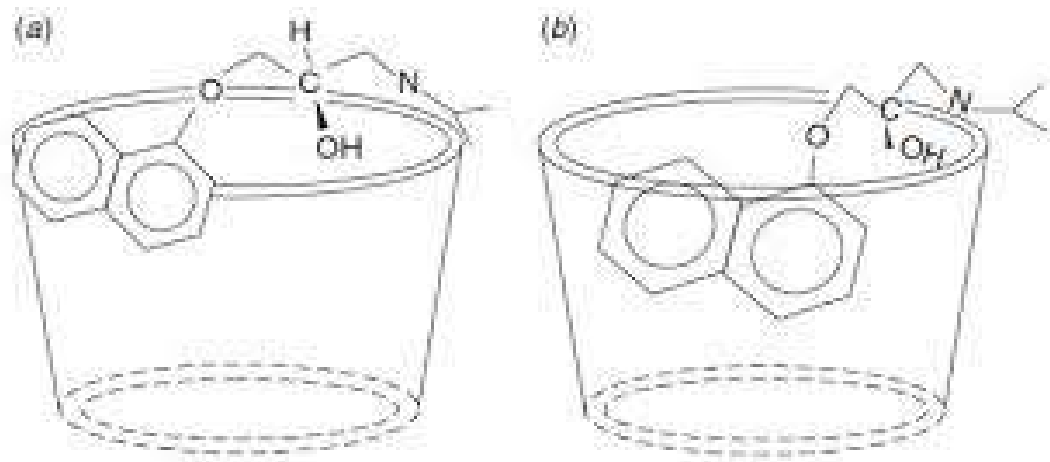
α CD

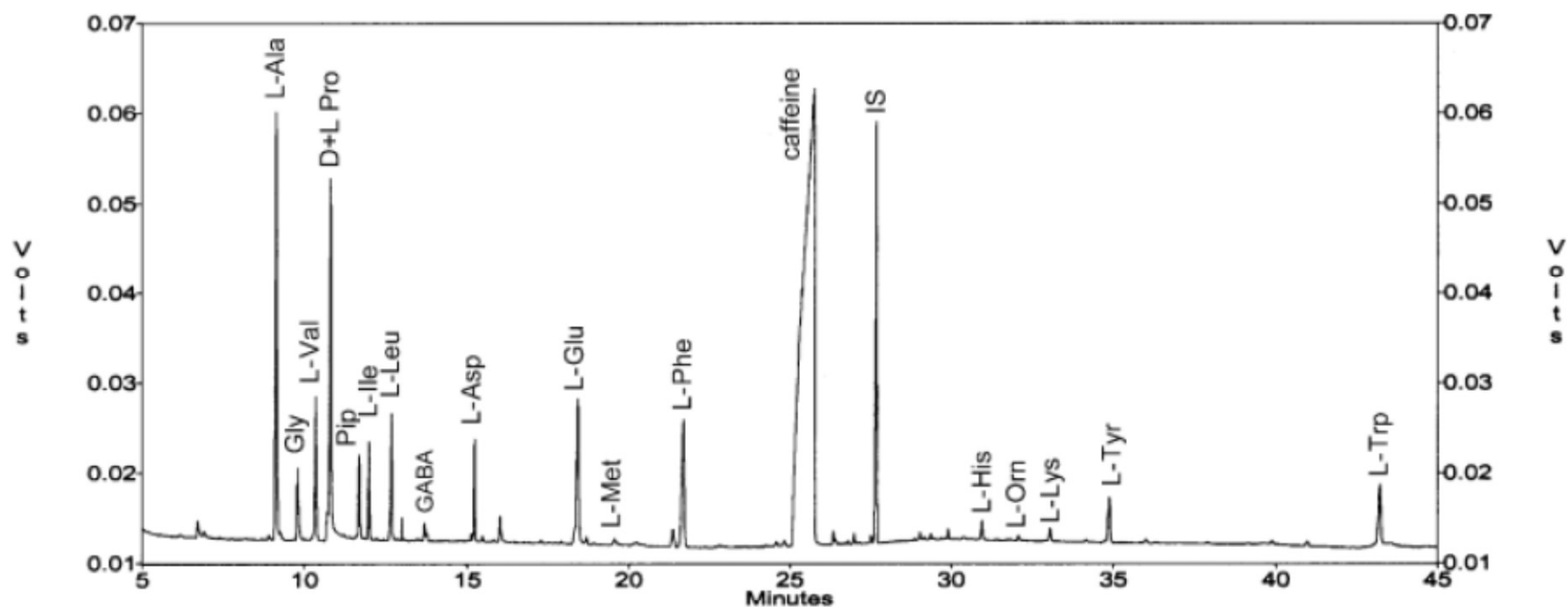


β CD



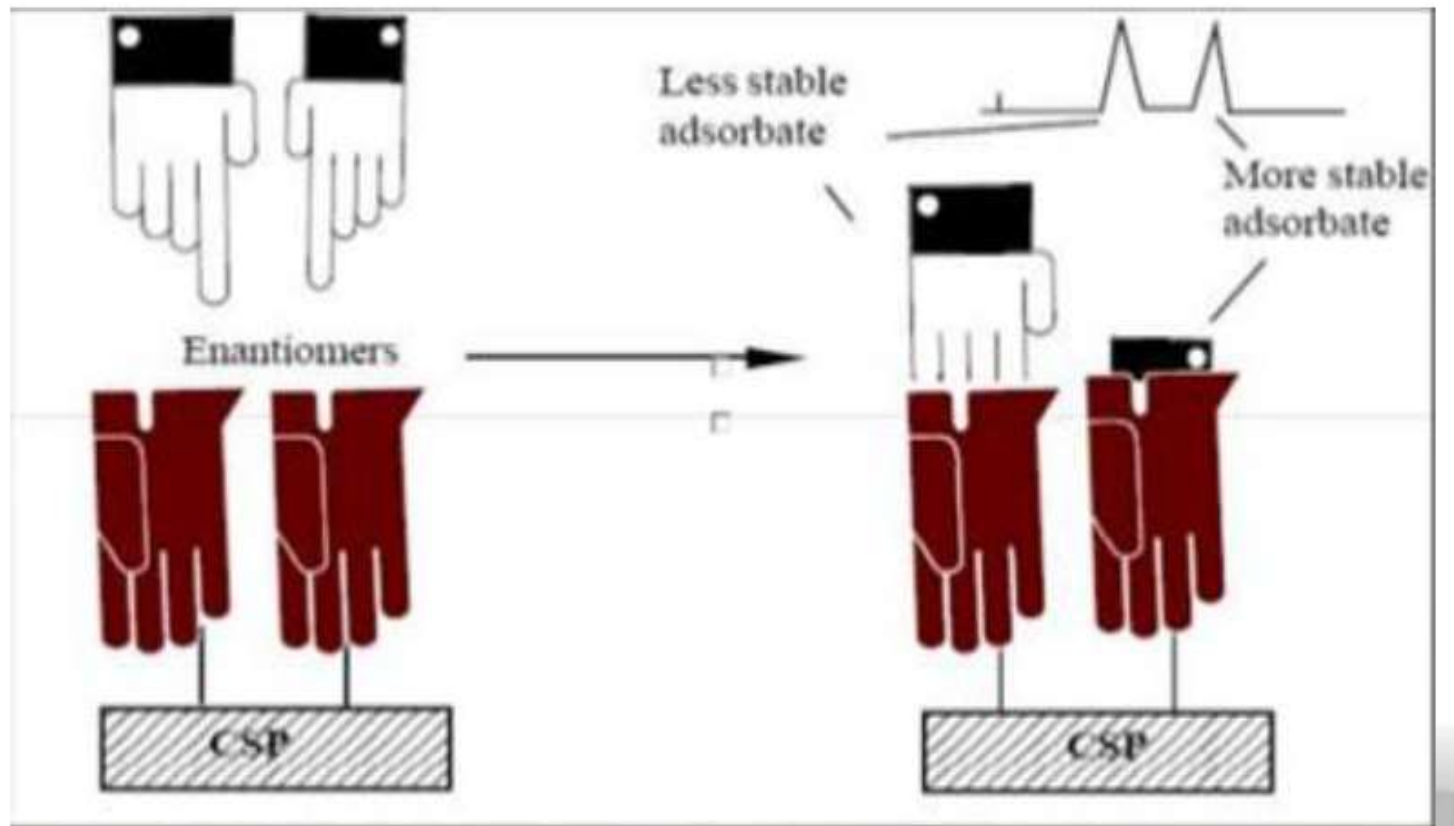
γ CD



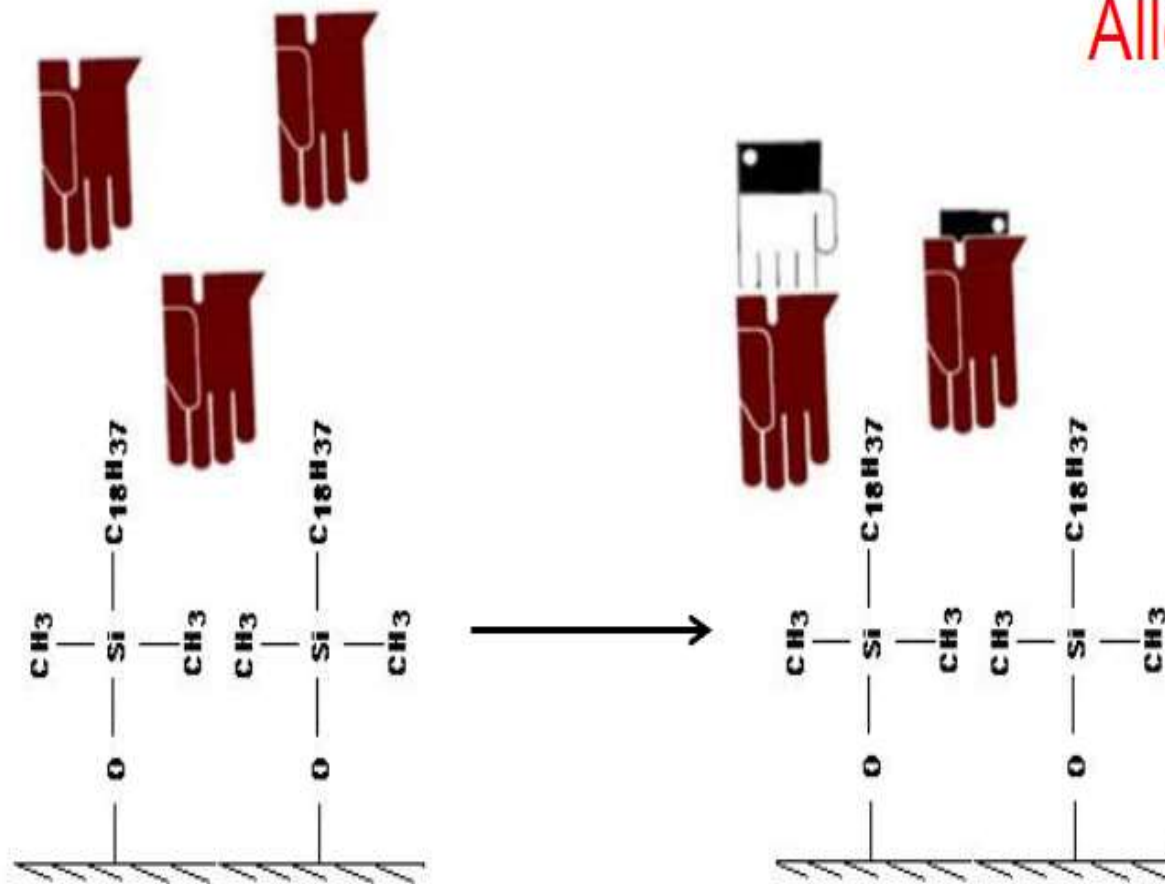


Separation was achieved on a Chirasil L-Val (25 m × 0.25 mm i.d.) fused-silica capillary column with a 0.12 μm film coating (Chrompack) with programmed temperature: increase from 80 °C (1 min hold) to 150 °C, at 5 °C/min (7 min hold), followed by an increase to 195 °C at 7 °C/min (15 min hold). The temperatures of the injector and detector were 250 and 280 °C, respectively, and splitless injection was used with a purge time delay of 0.8 min. Helium was used as the carrier gas at an initial inlet flow of 0.7 mL/min programmed to increase to 1.7 mL/min after 36 min

- Állófázis optikailag aktív

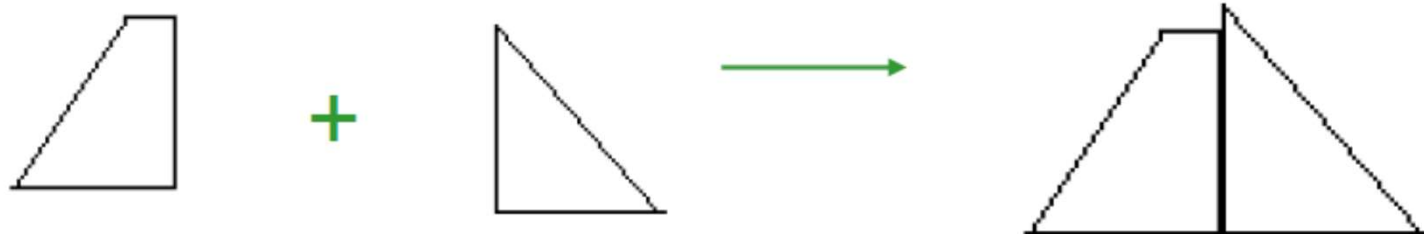


•Mozgófázis optikailag aktív



Állófázis hatás!

• Származékképzés az elválasztás előtt



Királis reagens

R-enantiomer

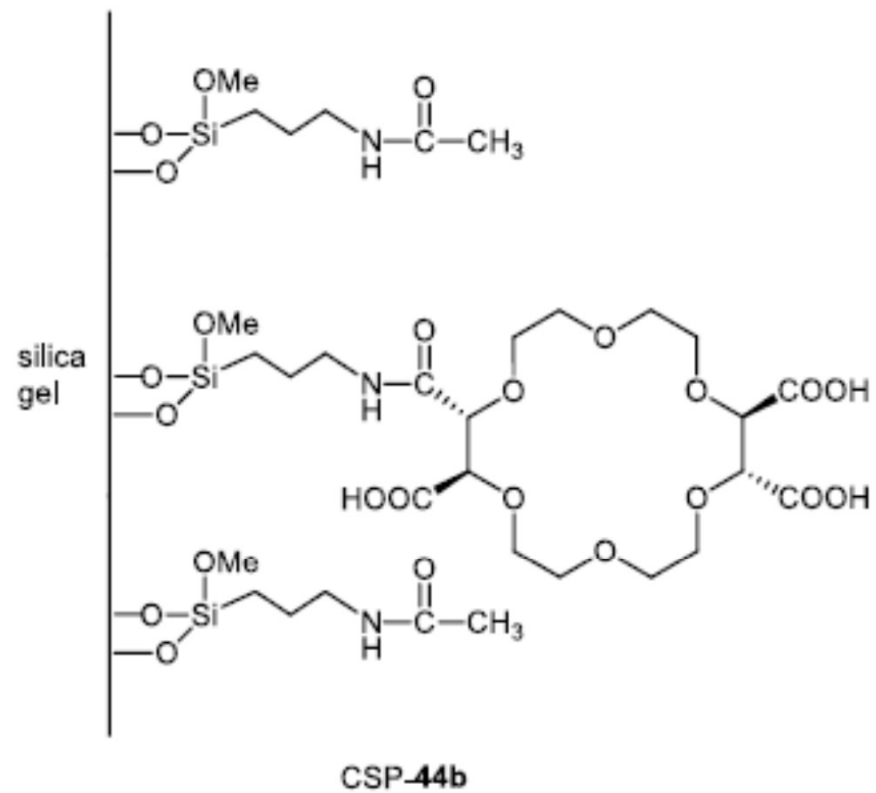
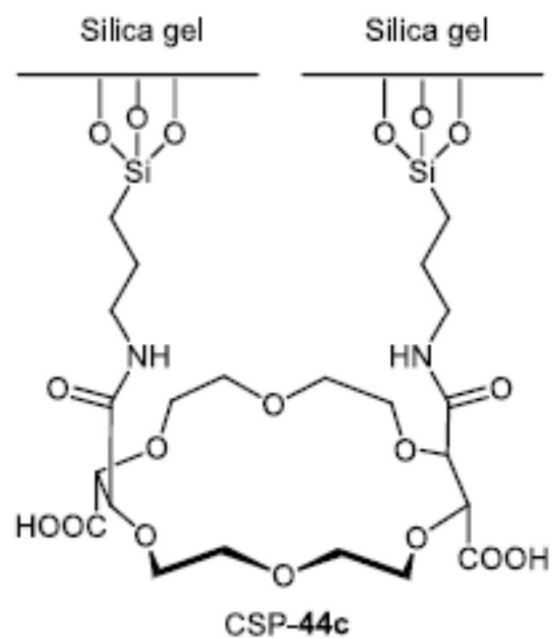
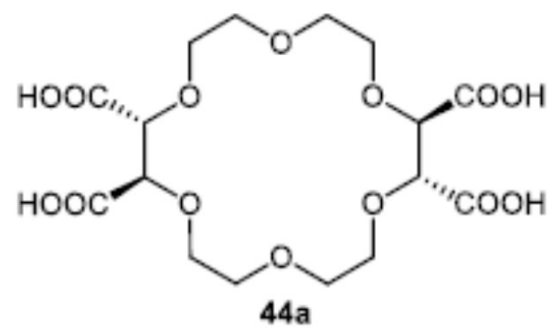


Királis reagens

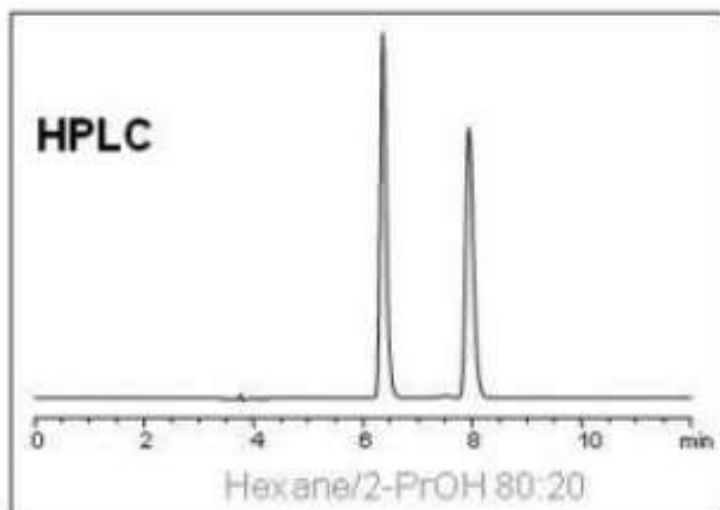
S-enantiomer

HPLC

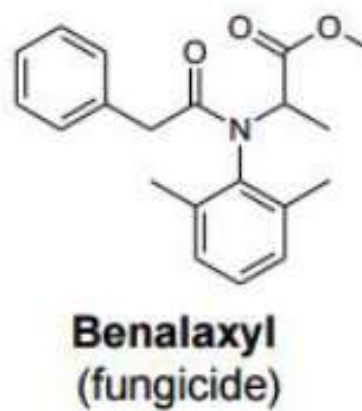
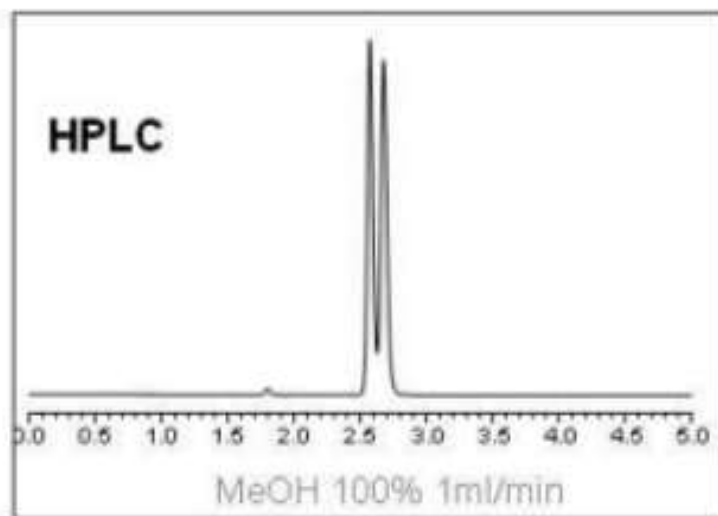
- Természetes alapú állófázisok:
 - Fehérjék (BASP, avidin)
 - poliszacharidok) (keményítő, cellulóz, dextrán, stb.)
 - Ciklodextrinek
 - Antibiotikumok (pl. vankomicin)
- Félszintetikusok: a fentiek módosított változatai
- Szintetikus:
 - Koronaéterek
 - Helikális szerkezetű polimerek: poliakrilamid, poliakrilátok



CHIRALPAK ID



CHIRALPAK IC-3



Az elválasztástechnika korszerű módszerei IV:
2019. őszi félév

1. Milyen elvárásoknak kell megfelelniük a korszerű analitikai kromatográfias módszereknek?
2. Mi a korszerű kromatográfias módszerek fejlesztésének az alapkérdése?
3. Ismertesse a gyors GC elvét!
5. Milyen technikai feltételekkel valósítható meg a gyors GC-s elválasztás?
6. Mi lényege az UHPLC-s elválasztásnak? Értelmezze a van Deemter-egyenlet segítségével!
7. Mi a fő különbség a HPLC és az UHPLC között? Milyen technikai kritériumai vannak az UHPLC gyakorlati használatának?
8. Mi a szilikagél és milyen főbb paraméterekkel jellemezzük a kromatográfias szempontból fontos tulajdonságait?
9. Mi a jelentősége a módosított felületű szilikagél állófázisok használatának? Ismertesse főbb típusait!
10. Jellemezze a héjszerkezetű állófázisokat!
11. Miért van szükség az UHPLC alkalmazásakor nagyobb nyomásra a HPLC mérésekhez képest? Értelmezze ezt a Darcy-képlet segítségével!
12. Mi UPC² jelentése?
13. Jellemezze a konvergens kromatográfia (SFC) legfontosabb tulajdonságait!
14. Milyen feladatok megoldására alkalmas az SFC?
15. Ábrázolja a HPLC, az UHPLC, az SFC és az UHPSFC H-u függvényeket!
16. Mi az OPLC és miben különbözik a hagyományos TLC-től?
17. Milyen analitikai információt szolgáltat a GC-MS mérés?

18. Hogyan értelmezhető a GC és az MS hatékony kapcsolása?
19. Mi az elvi felépítése a GC-MS készülékeknek és mi az egyes egységek funkciója?
20. Ismertesse a EI ionforrás felépítését és funkcióit!
21. Ismertesse az EI ionforrásban lejátszódó legfontosabb ionkémiai folyamatokat!
22. Hogyan épül fel egy tömegspektrum és melyek a legfontosabb információ hordozó elemei?
23. Milyen szerepe van az izotópoknak a tömegspektrumok értelmezésében?
24. Mi a lényege a SCAN és a SIM üzemmódnak a GC-MS mérések során?
25. Mi az értelme, előnye, a kétdimenziós kromatográfiás elválasztásoknak?
26. Mi a lényege a 2D kromatográfiás elválasztásoknak?
27. Mi a gyakorlati analitikai előnye a 2D OPLC-s elválasztásnak?
28. Milyen 2D GC kombinációk használatosak?
29. Vázzon fel egy kétdimenziós HPLC-s kapcsolást!
30. Mi az elve a CPC (LLC) elválasztásnak? Mi az analitikai és a technológiai jelentősége?
31. Jellemezze az extrakció és a kromatográfia közötti különbséget!
32. Miért fontos a királis vegyületek analitikai megkülönböztetése, elválasztása?
32. Milyen feltételei vannak a királis vegyületek GC-s és HPLC-s elválasztásnak?
33. Milyen állófázisok használatosak királis elválasztásokhoz?
34. Milyen főbb alkalmazási feladatai vannak a királis vegyületek analitikai elválasztásának?