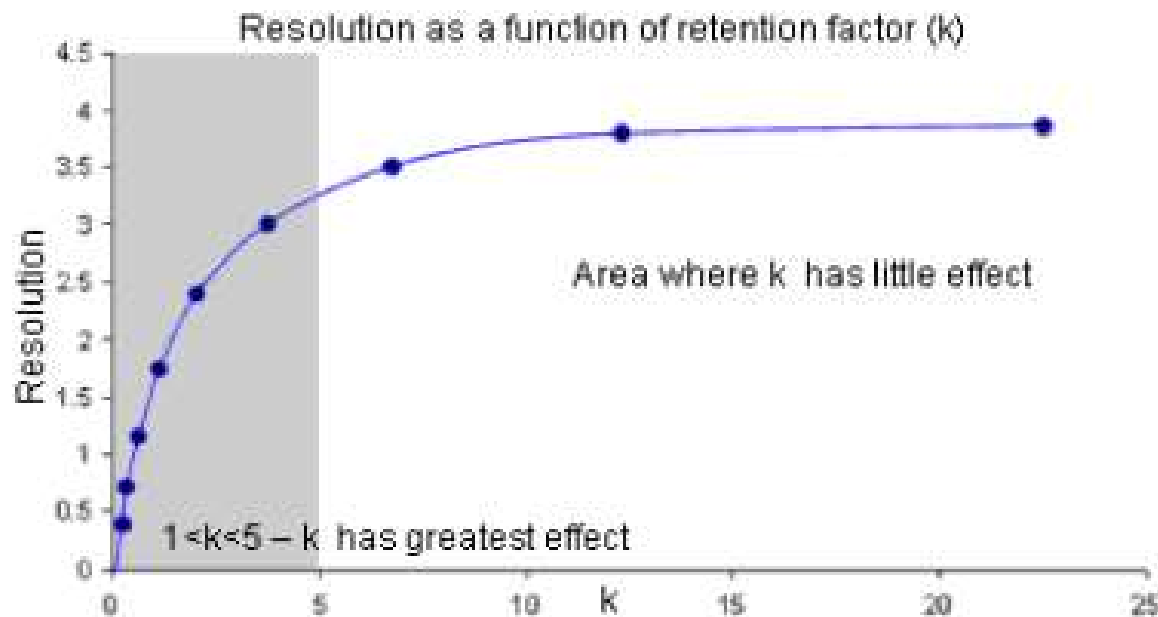


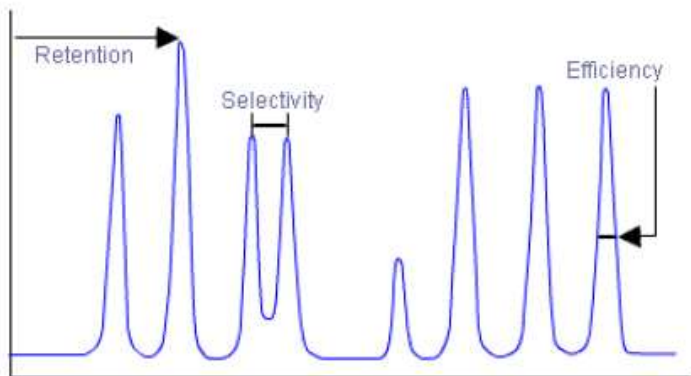
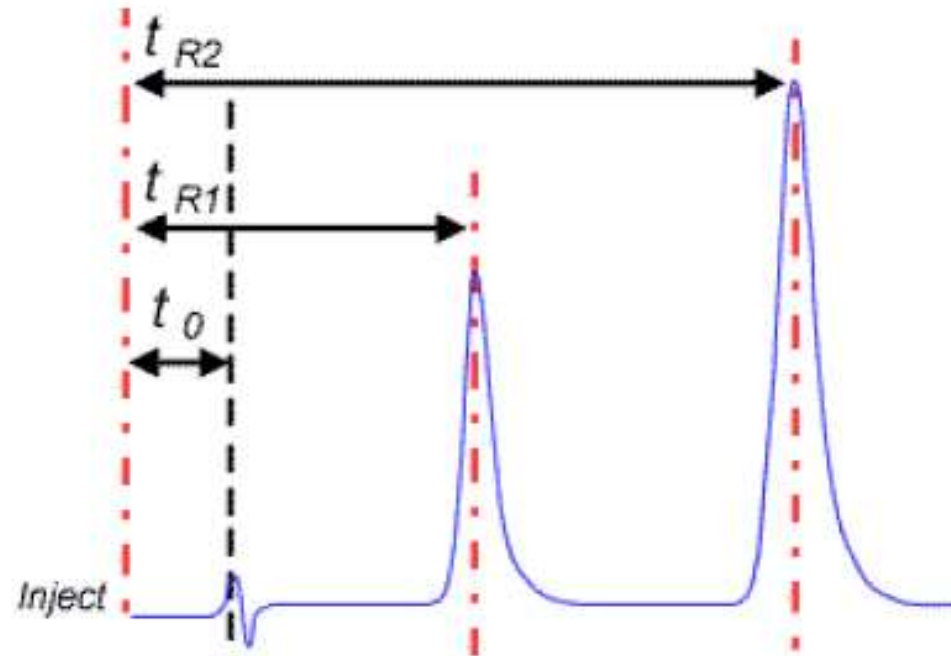
Hogyan befolyásolja az elválasztást a retenciós tényező?

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



$$1 < k < 10$$

Szelektivitás



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

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Mivel tudjuk a szelektivitást befolyásolni?

mindennel, ami megoszlási hányadost befolyásolja:

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

Paraméter

Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

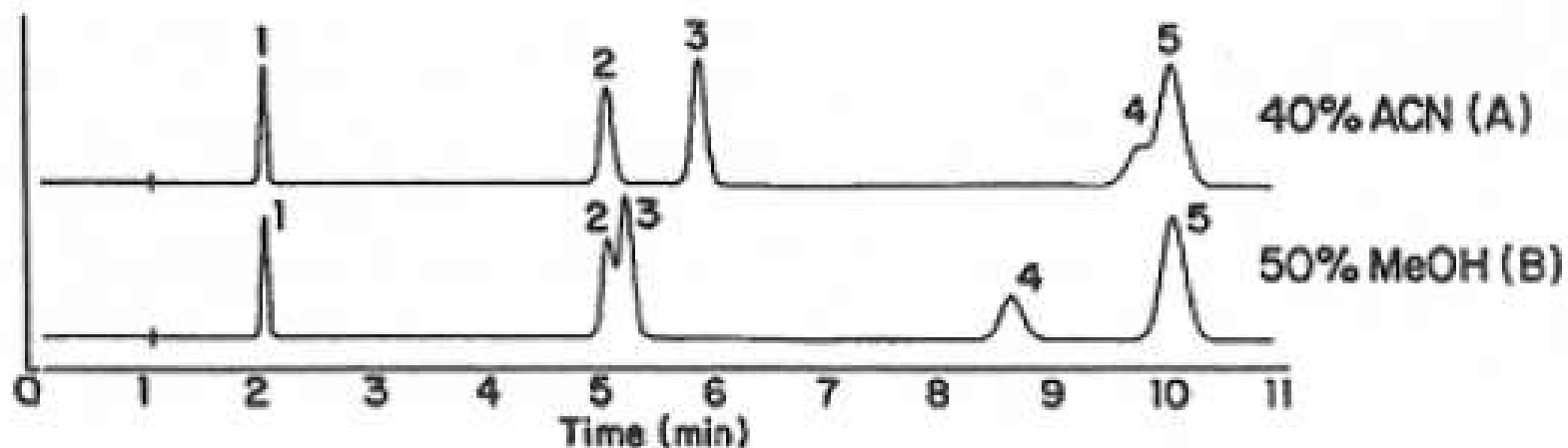
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

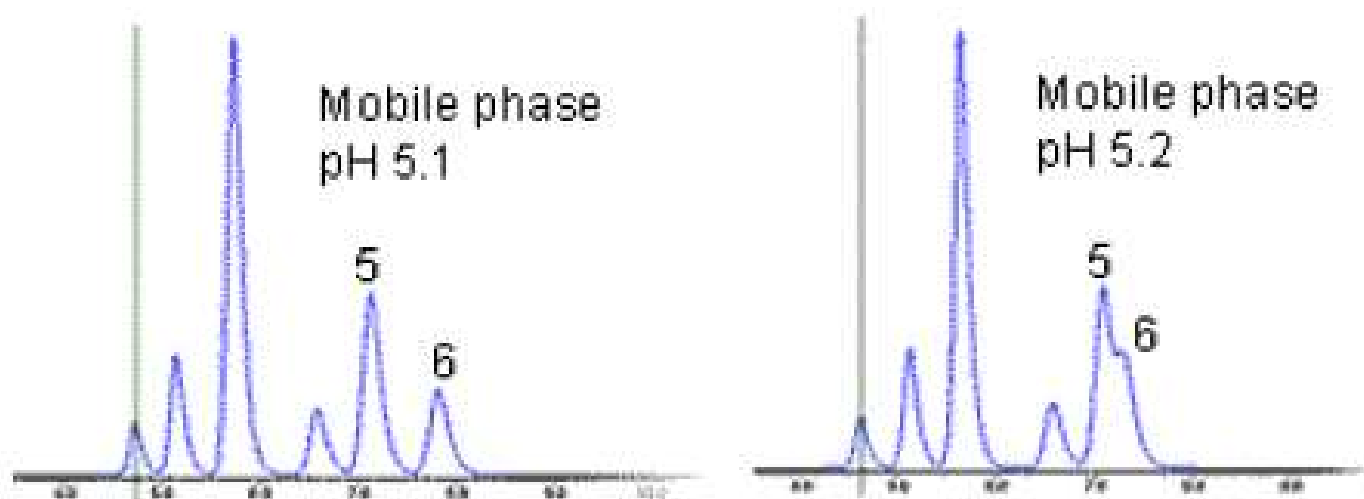
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

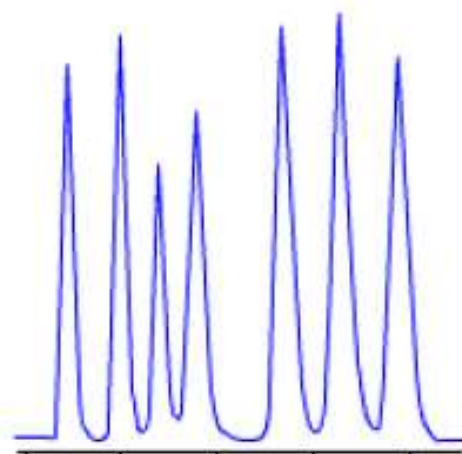
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

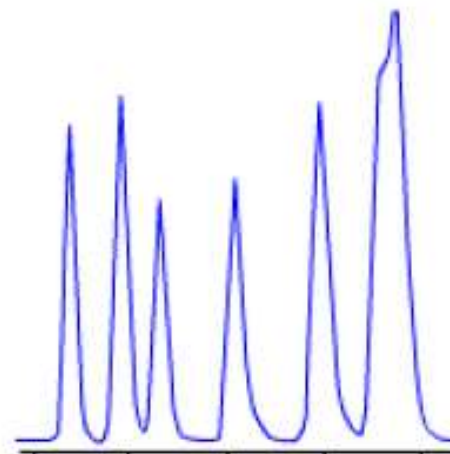
Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Mobile phase octane
sulphonic acid conc.: 57mM



Mobile phase octane
sulphonic acid conc.: 60mM

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

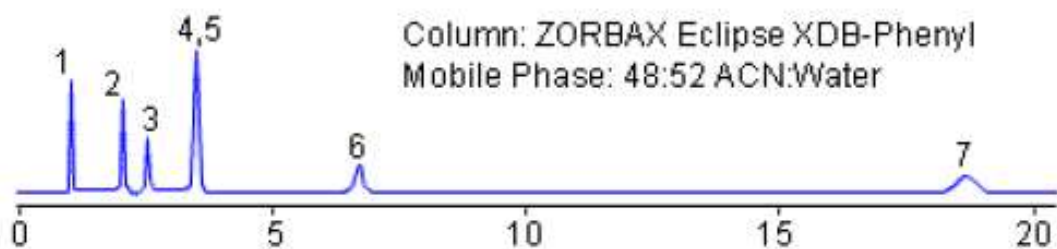
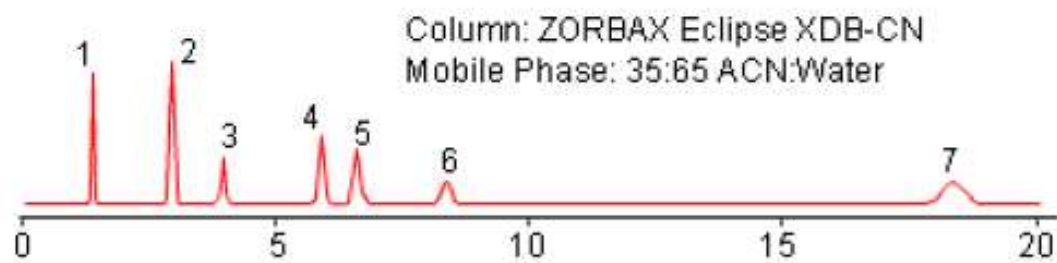
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásoljuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

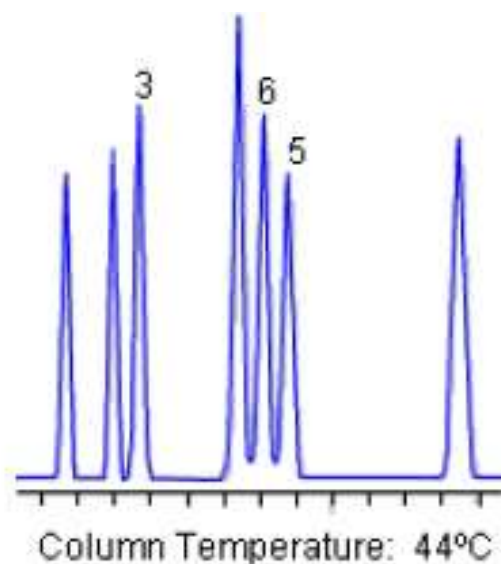
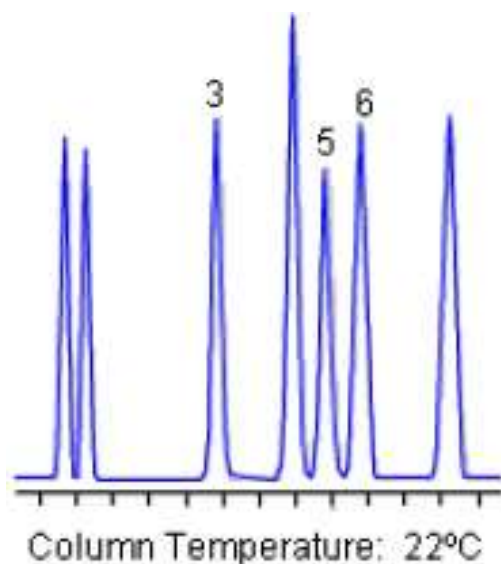
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

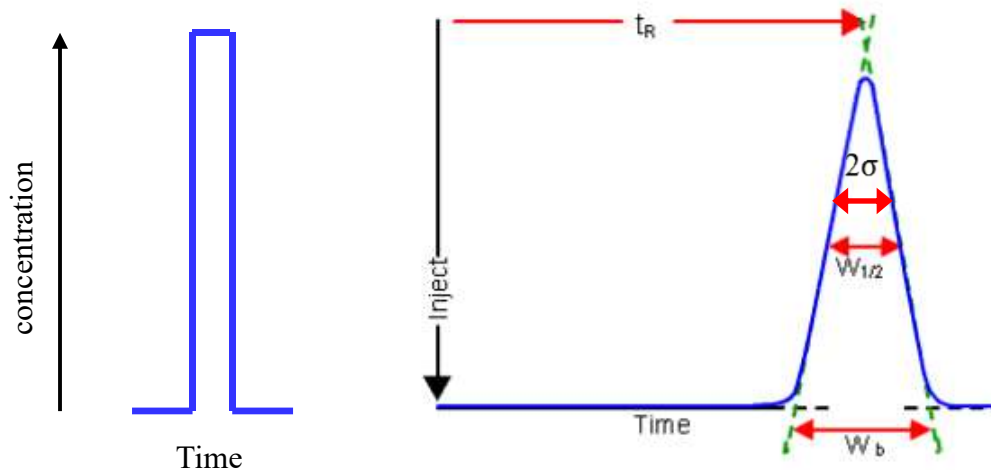


Hogyan befolyásolja az elválasztást a szelektivitás?

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

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

Hatékonyság



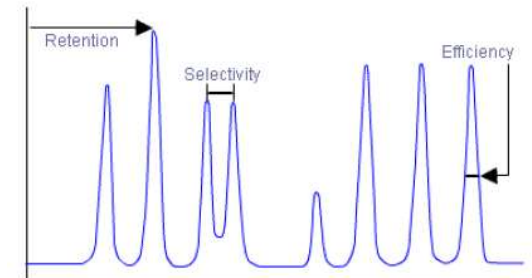
zónaszélesedés v.
zónadiszperzió

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

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

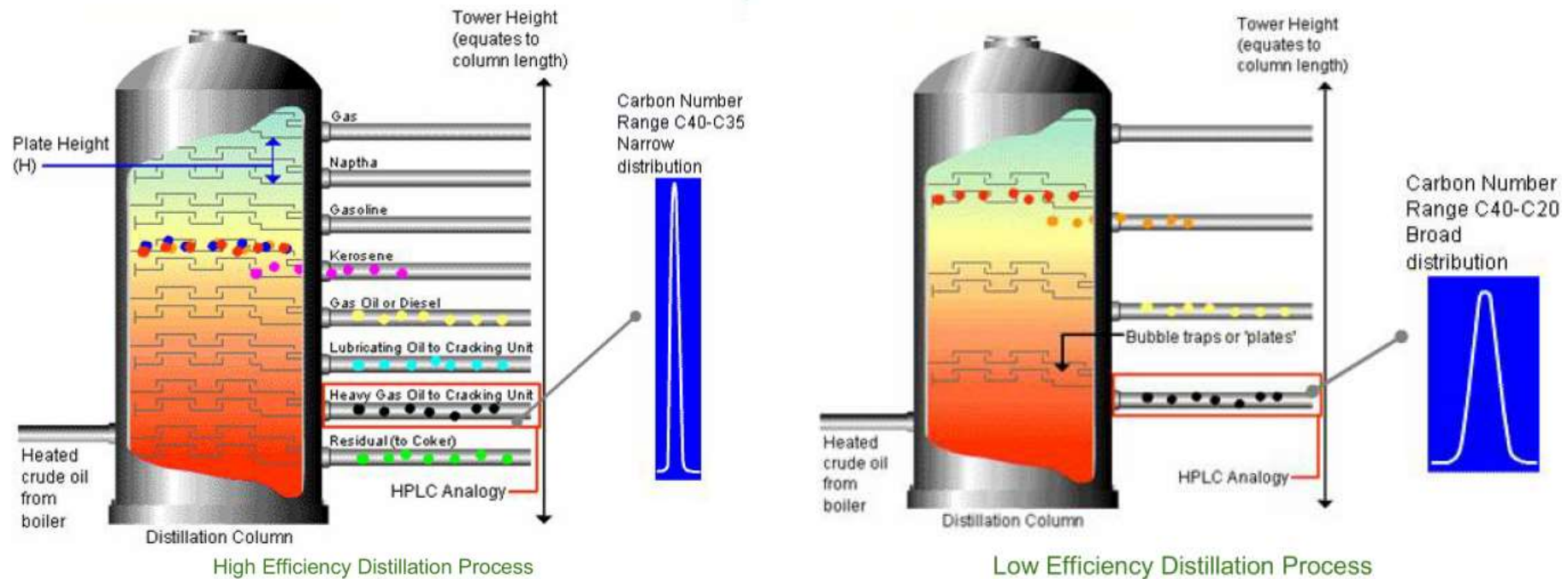
$$W_b = 4\sigma$$

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



Hatékonyság

Elméleti tányérszám: analógia frakcionált desztilláció



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

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

Mi befolyásolja a zónaszélesedést?

Oszlop:

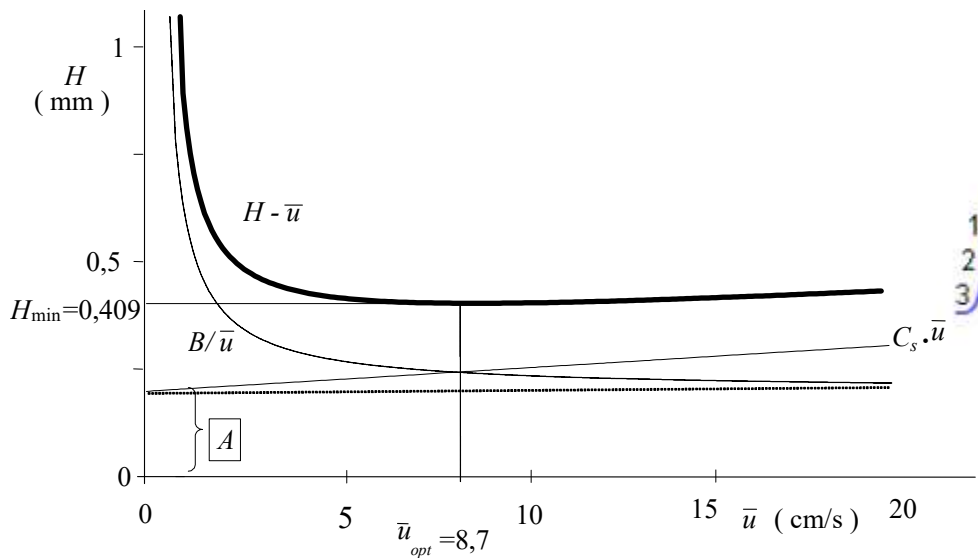
- oszlop hossza ($N=L/H$)
- részecskeméret ($H_{\min} \sim 2d_p$)
- állófázis minősége és felületi fizikai-kémiai tulajdonsága
- oszloptöltés minősége, esetleges holtterek

Oszlopon kívüli tényezők:

- áramlási sebesség
- injektált térfogat
- oszlopon kívüli holtterfogatok (detektorcella, összekötő kapillárisok, csatlakozások)

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

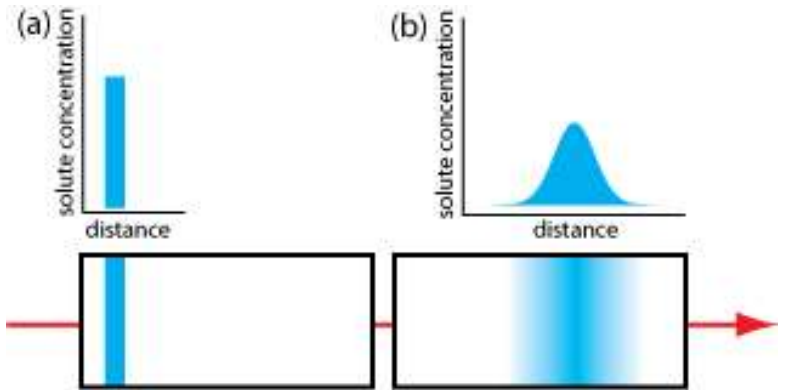
$$H = A + B/u + C_s u$$



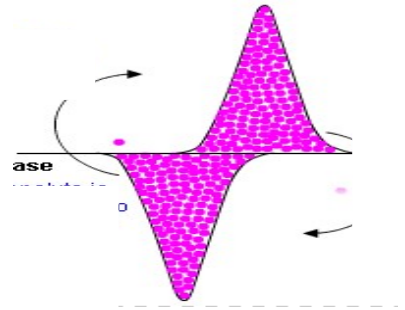
„A” tag: eddy (angolul örvény) „diffúzió”



„B” tag: lineáris diffúzió



„C_s” tag: állóf. → mozgóf. anyagátmenet ellenállása

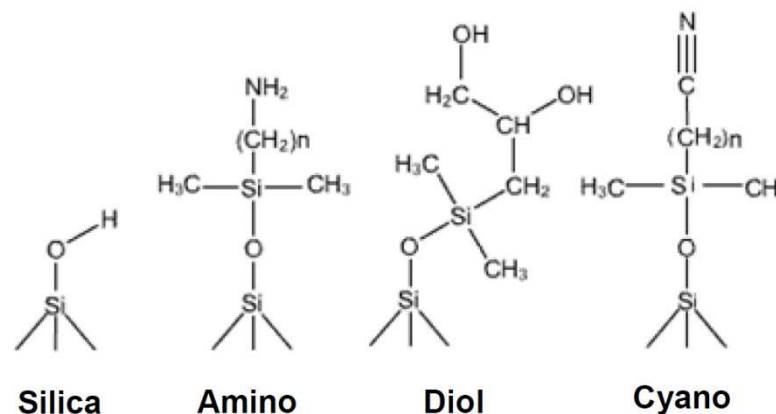


Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)

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

Állófázisok alkalmazási gyakorisága:

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



Szilikagél állófázis „vízérzékenysége”

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

Aktiválás lehetőségei:

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

Polárisan módosított szilikagél állófázisok előnyei

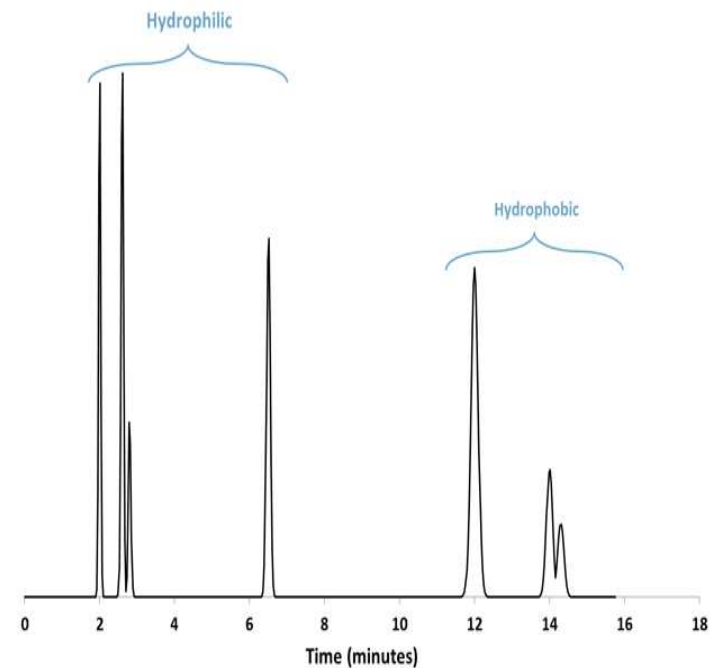
- A mozgófázis nyomnyi víztartalmát nem kell kontrollálni
- Gyorsabb egyensúlybeállítás
- Gradiens elúció kivitelezhető
- Polaritás, szelektivitás széles tartományban változtatható
- Energetikailag homogénebb felület
- Kevésbé „tailinges” csúcsok, mint szilikagél esetén
- Ezek a fázisok a mozgó fázis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

Mozgófázisok az NP-HPLC-ben

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

Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)

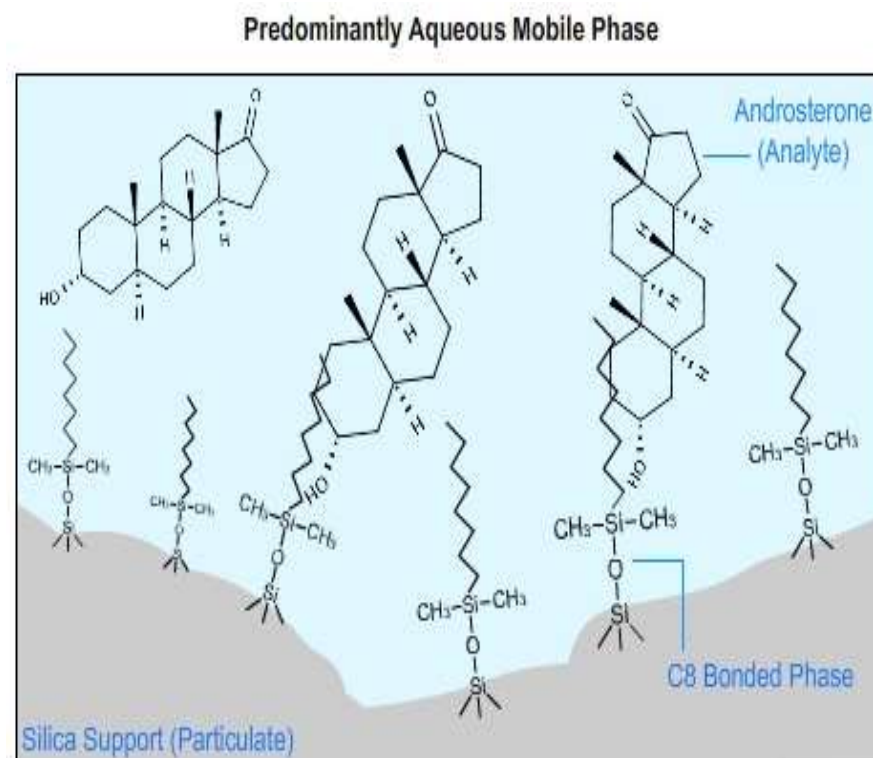
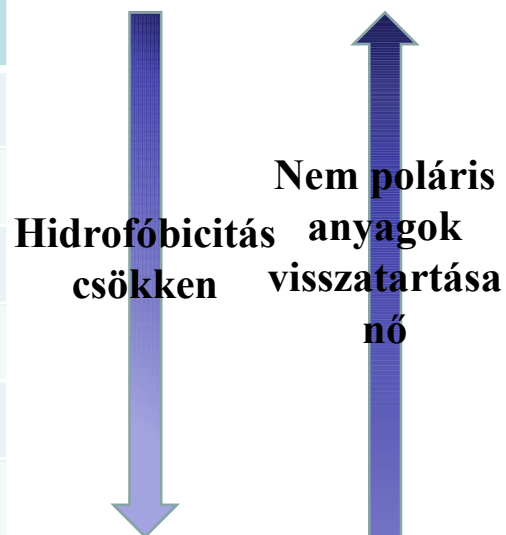
- Fordított: a korábban kidogozott „normál”-hoz képest
- A mozgó fázis *polárisabb*, mint az állófázis
- A leggyakrabban használt módszer



Állófázisok az RP-HPLC-ben I.

- Módosított szilikagél állófázisok

| Módosítás |
|-----------|
| C18 |
| C8 |
| C4 |
| ciano |
| fenil |
| amino |



Módosított szilikagél állófázisok - pH probléma

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

Állófázisok az RP-HPLC-ben II.


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

Állófázisok az RP-HPLC-ben III.

- **Aktív szén állófázis:**

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

Nyomásálló grafit előállítása (nagy hőmérsékleten)



Porózus grafit állófázis (PGC):

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

Állófázisok az RP-HPLC-ben IV.

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

Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

Általános követelmények

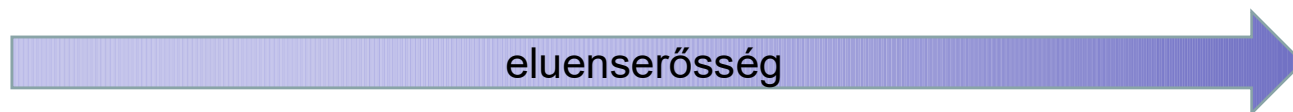
- Tisztasági követelmény
- Jó UV áteresztőképesség (UV cut-off)
- Kis viszkozitás
- A minta komponenseinek jól kell oldódniuk a mozgófázisban
- Nem tartalmazhat szilárd anyagot
- Kis toxicitás
- Nem tartalmazhat oldott gázokat (gázmentesítés)
- Módszerspecifikus követelmény: polárisabb legyen, mint az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

Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

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

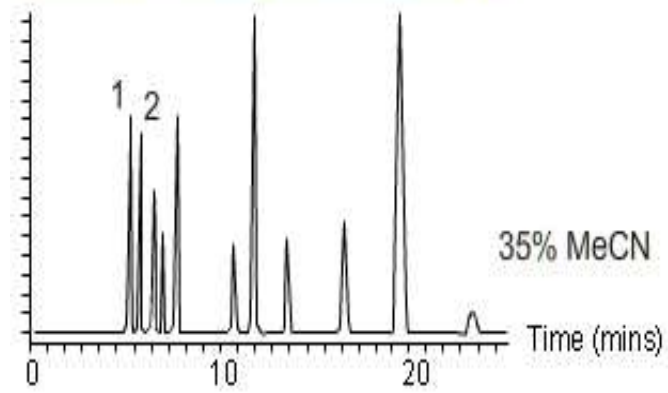
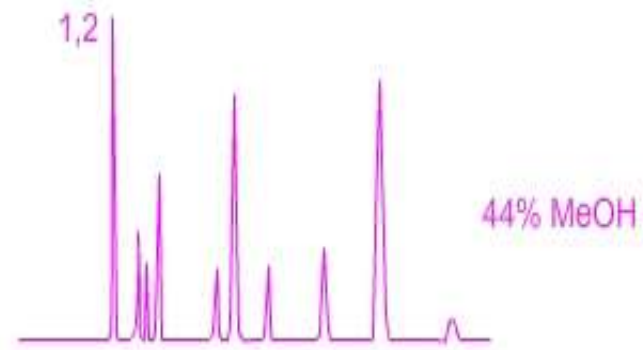
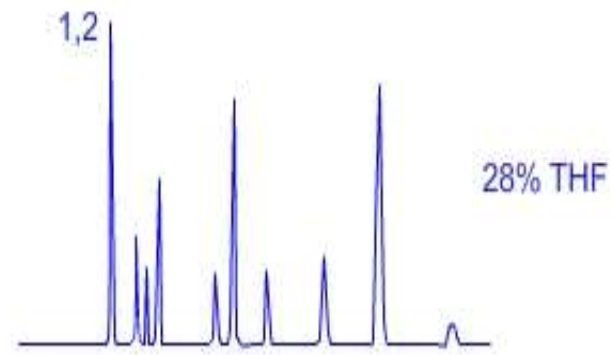
Eluenserősség

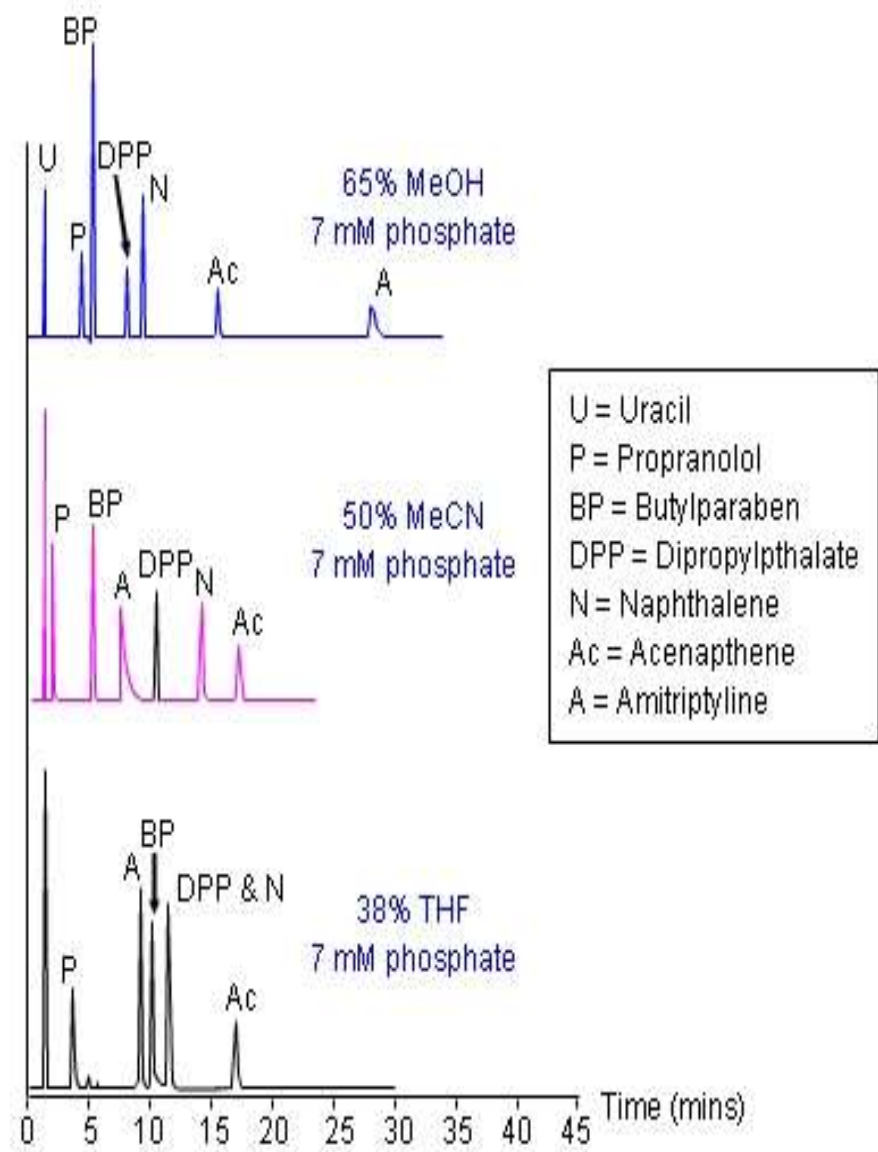
- Tekintsünk egy tökéletes borított felületű, nagy sűrűségű állófázist! Ilyen körülmények között csak diszperziós kölcsönhatás léphet fel az állófázis és a vizsgált molekula között. Ilyen körülmények között az alábbi eluotróp sor írható fel:



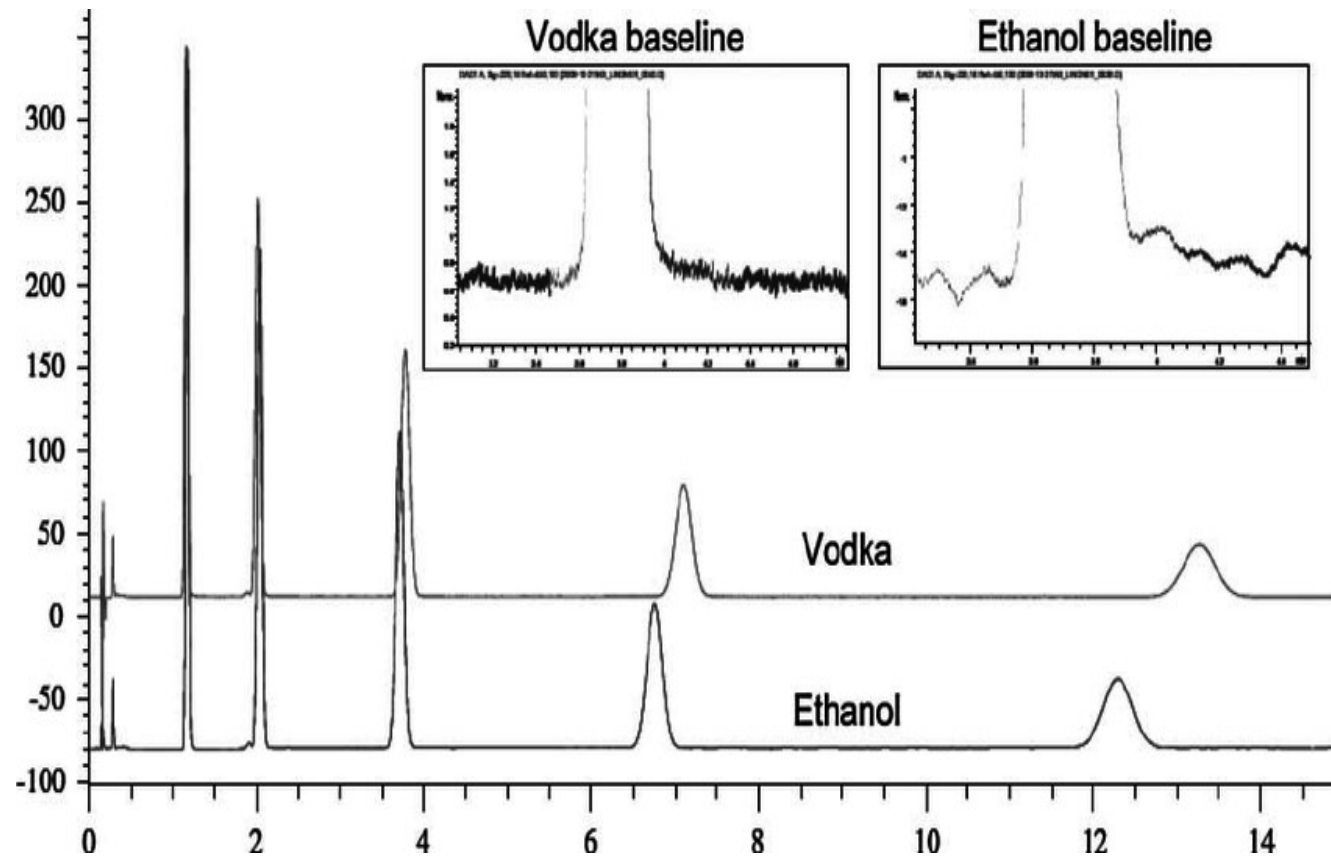
- **víz < metanol < acetonitril < etanol < 2-propanol < tetrahydrofuran**







Oldószer tisztaság



Pufferek használata

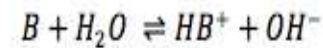
- Ionos és könnyen ionizálható anyagok vizsgálata esetén elengedhetetlen a pH kontroll
- A pufferekkel szemben támasztott általános követelmények:
 - Alacsony hullámhosszú UV cut-off
 - Adott mérési körülmények között nagy pufferkapacitás
 - Szilárdanyag mentesség (szűrés)
 - Tisztaság
 - Kompatibilitás: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

pH szerepe az RP-HPLC-ben



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

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

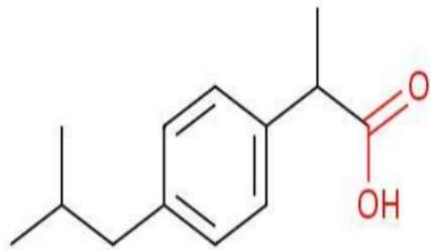


$$K_b = \frac{[OH^-][HB^+]}{[B]}$$

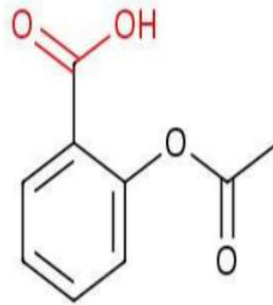
$$pK_b = -\log_{10} K_b$$

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

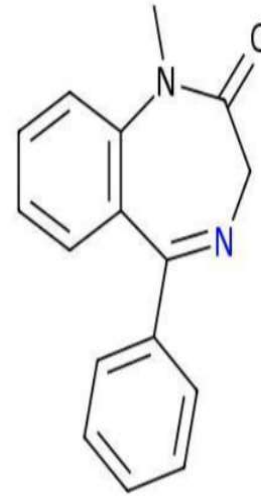
Néhány vegyület pK_a értéke



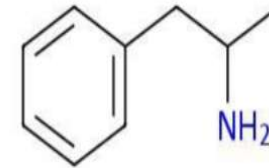
Ibuprofen pK_a 4.9



Aspirin pK_a 3.5



Diazepam pK_a 3.3



Amphetamine pK_a 9.8

Funkciós csoportok pK_a értékei

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

*: DMSO-ban

Pufferek pK_a értékei

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

Vegyületek csoportba sorolása kromatográfiás szempontból

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

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

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

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

Kromatográfiás szempontból semleges vegyületek

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

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

1. a. csoport

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

1. b. csoport

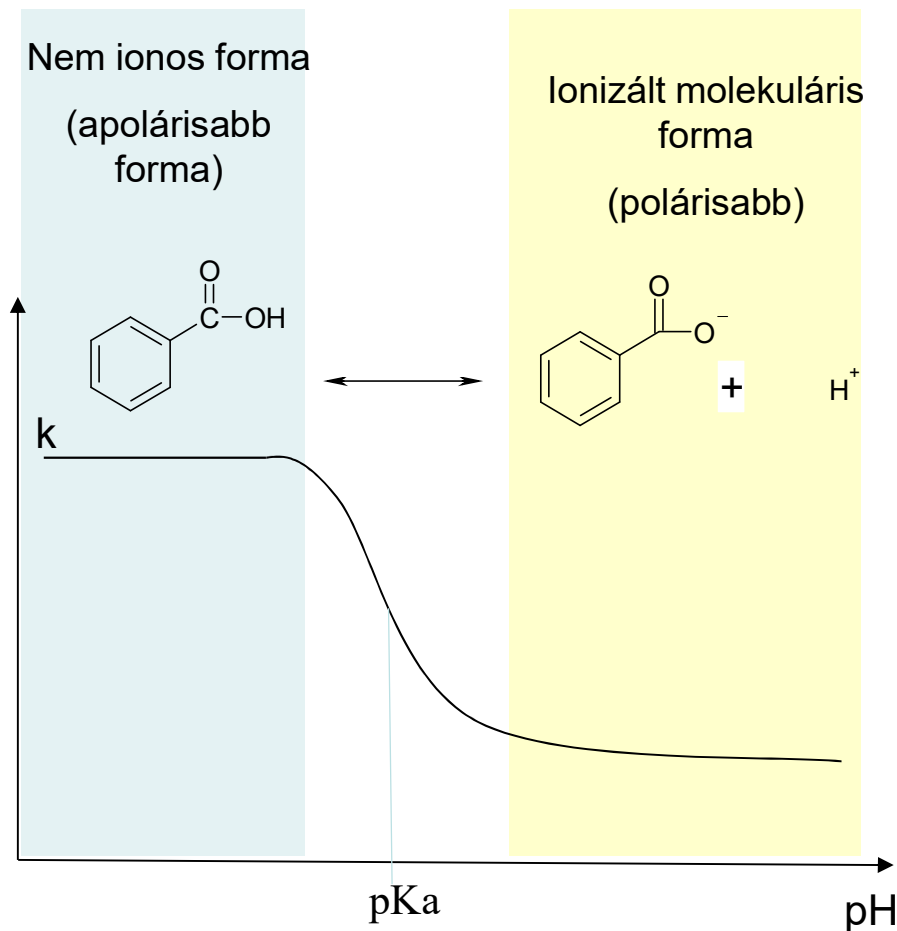
- Minden esetben tartalmaznak poláris csoportot vagy csoportokat. Ezek a csoportok vagy H-hidas kötést alakítanak ki az állófázis szilanol csoportjaival, vagy dipól-dipól kölcsönhatásba lépnek azokkal. Ezek a kölcsönhatásokat együttesen polárisként adjuk meg a folyadékkromatográfiás gyakorlatban. Ezek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

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

Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

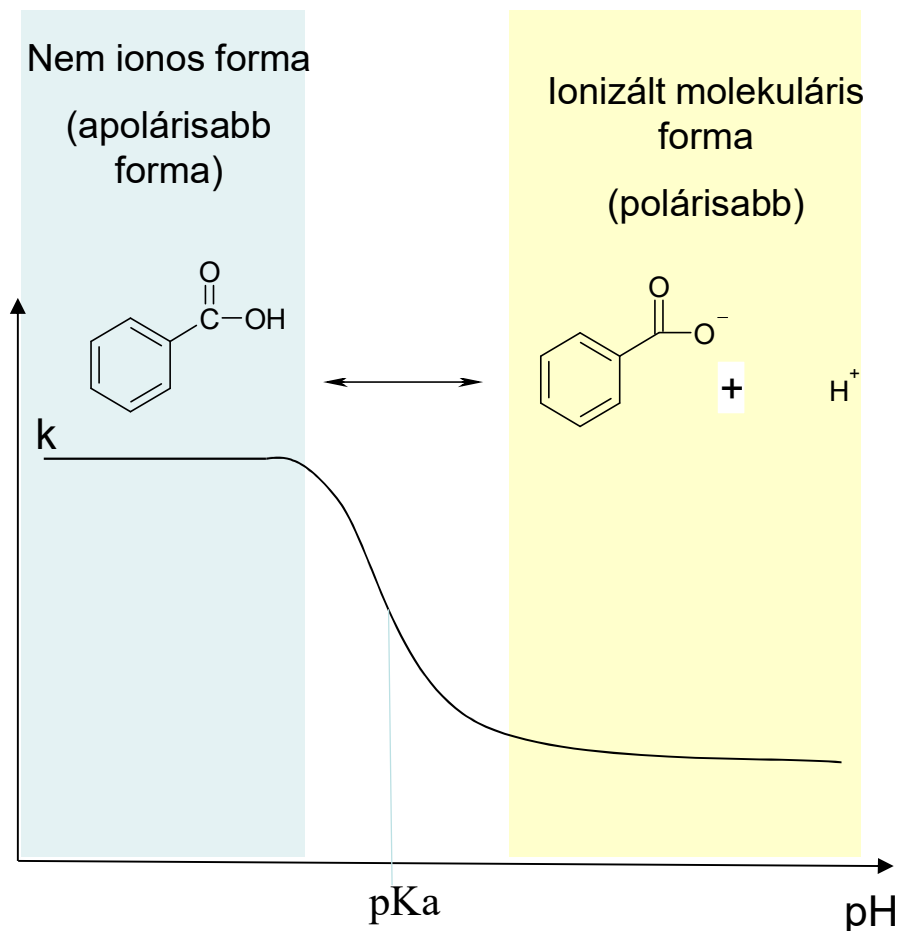
- pH-tól függően két molekuláris állapotban lehetnek jelen, s ezeknek a mozgófázisban való oldhatósága eltérő. Ebből következik, hogy ha pH kontroll nélkül próbálnánk mérni, és a körülmények valami miatt megváltoznak, akkor a molekuláris formák aránya is változni fog, ami pedig a visszatartási tényező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

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



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

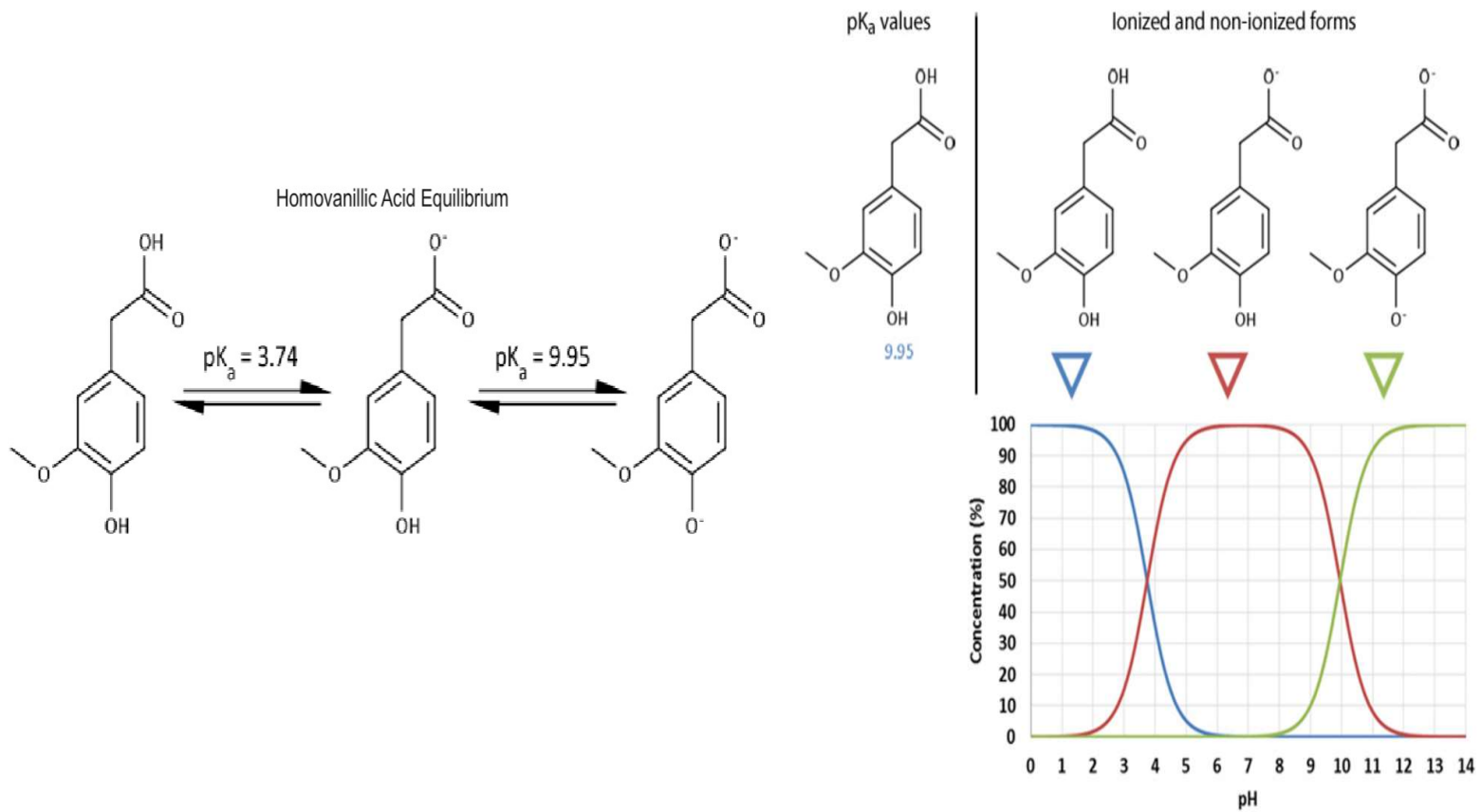
Savas vegyület: retenciós tényező pH függése RP-HPLC-ben



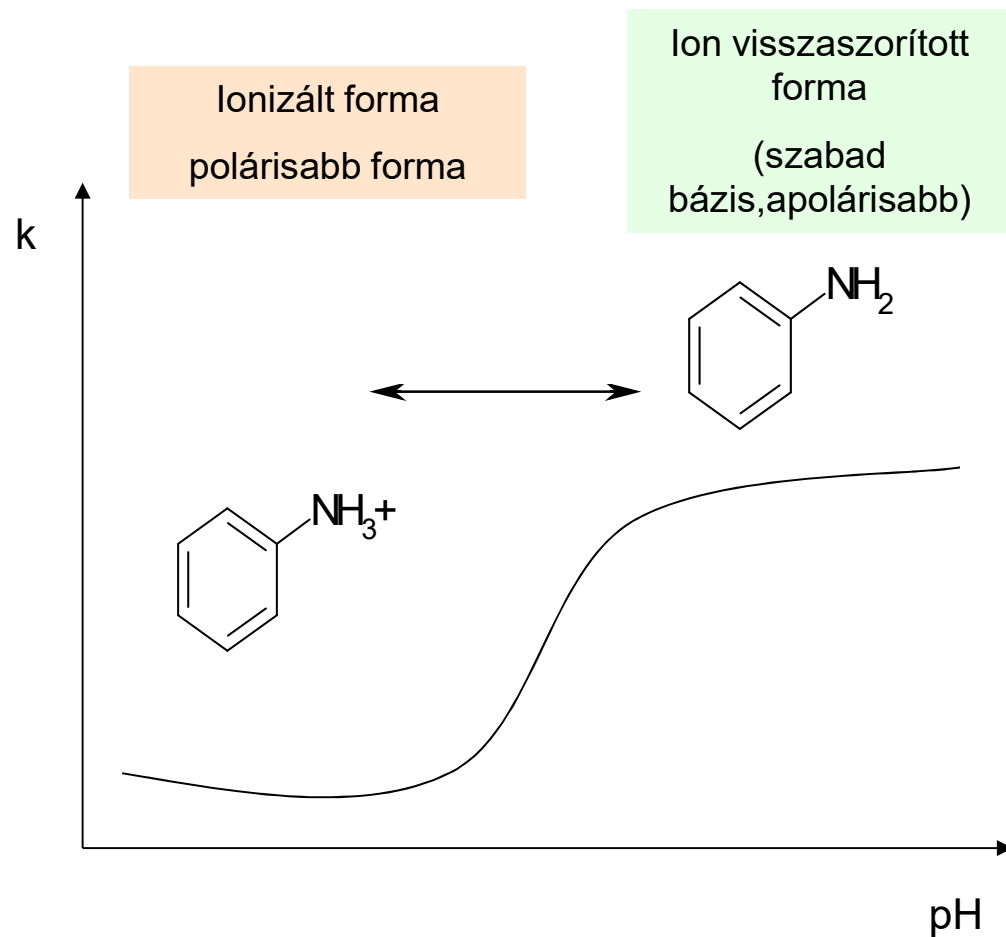
2. A $pH > pK_a + 2$ értéknél lúgosabb tartományban a molekula ionos formában van, a kölcsönhatási formák száma kicsi, jó a csúcsalak, kicsi a visszatartás, robusztus a módszer. Kérdés, hogy a $k > 1$ kritérium teljesül-e. A szilikagél alapú állófázisoknál a másik korlát a kolonna felső megengedett pH-ja.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

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

Savas vegyület

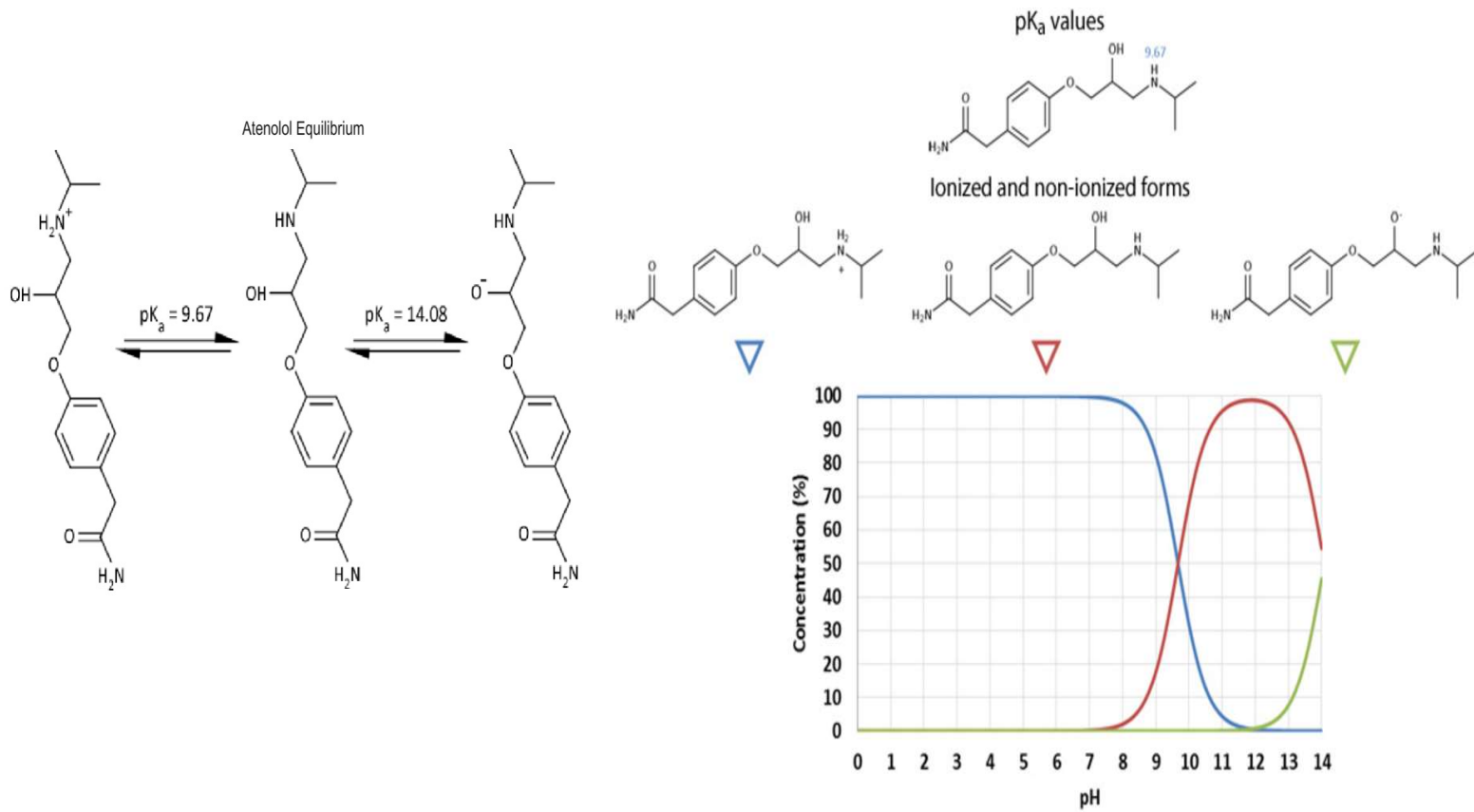


Bázikus vegyület: retenciós tényező pH függése



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

Bázikus vegyület



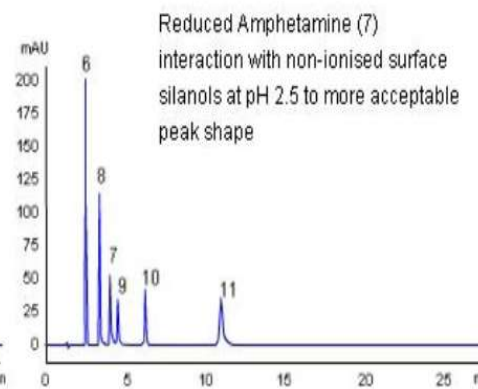
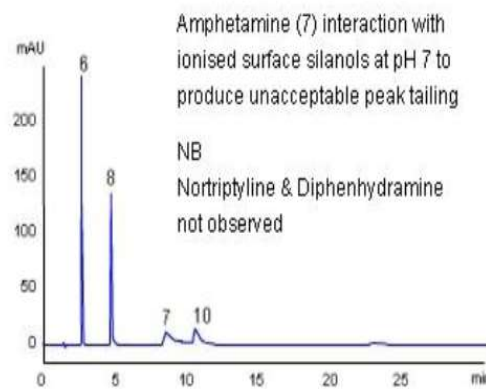
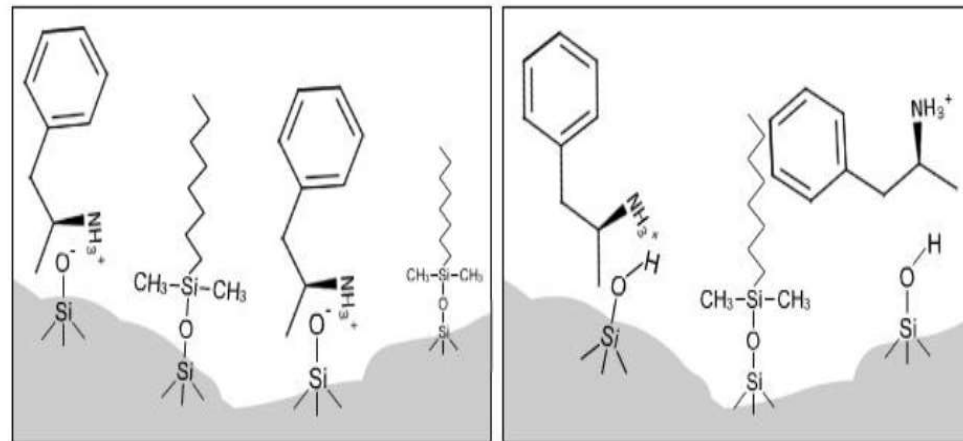
Bázikus anyagok - ionelnyomás

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

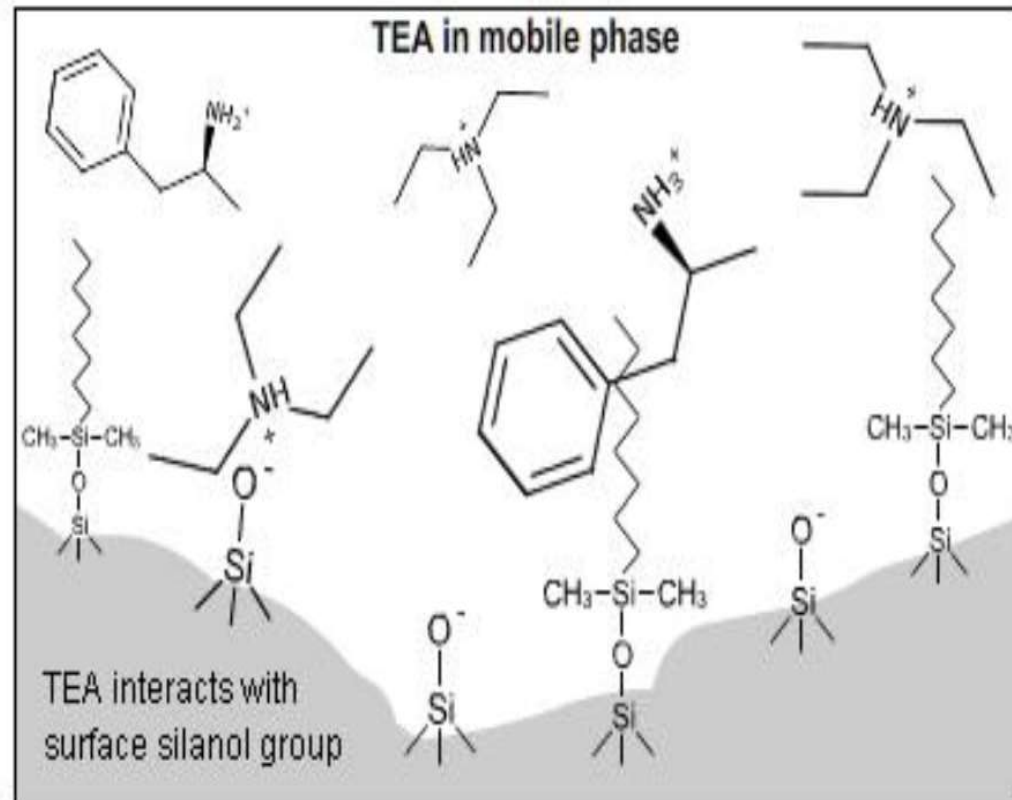
Kiküszöbölése:

- pH csökkentése
- Trietilamin (TEA) adagolása

Bázikus anyagok csúcsalakjának javítása a pH csökkentésével

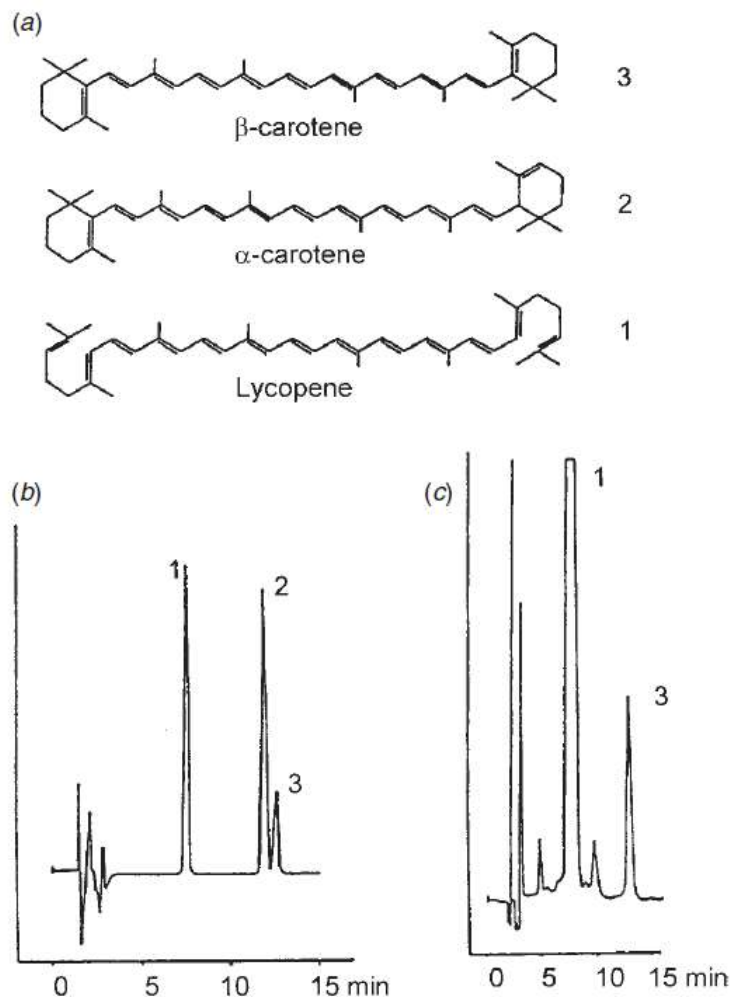


TEA



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

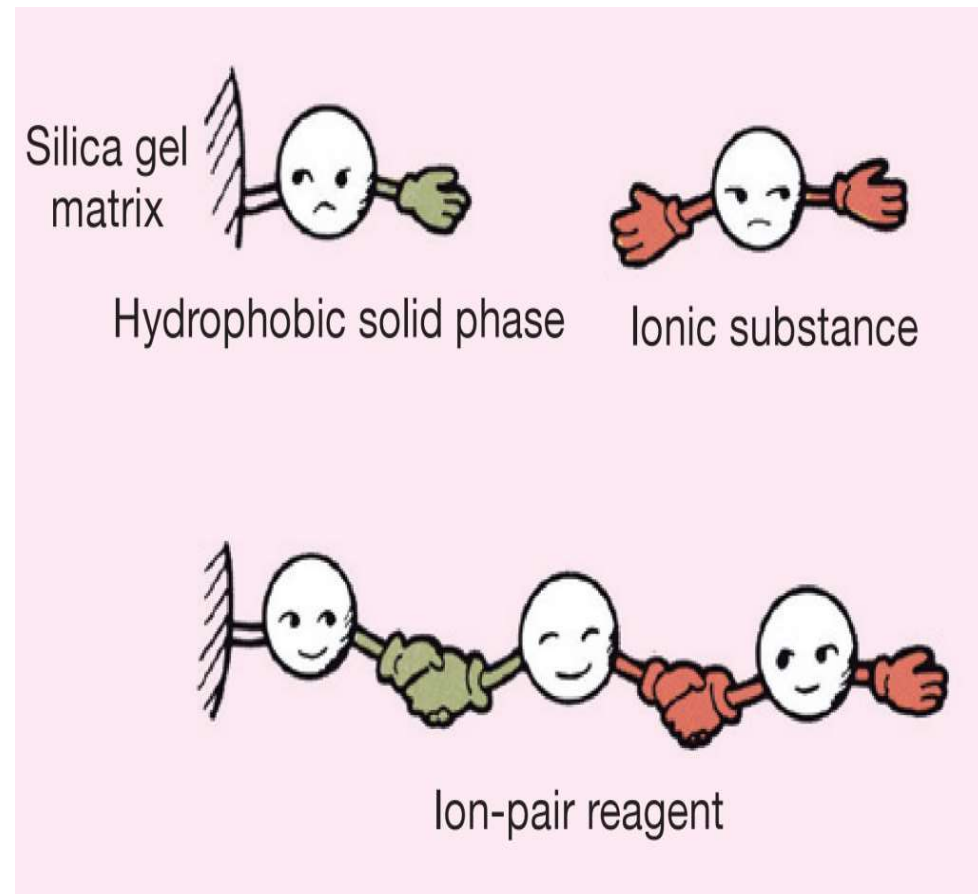
- Nagyon hidrofób komponensek esetén, amik nagy retencióval rendelkeznek, 100% AcN esetén sem eluálódnak (pl.: lipidek, szintetikus polimerek)
- A oldószer: polárisabb (AcN vagy metanol), B oldószer: kevésbé poláris (THF, diklór-metán, kloroform, MTBE)
- pl.: C18 oszlop, AcN-kloroform, b: standard, c: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



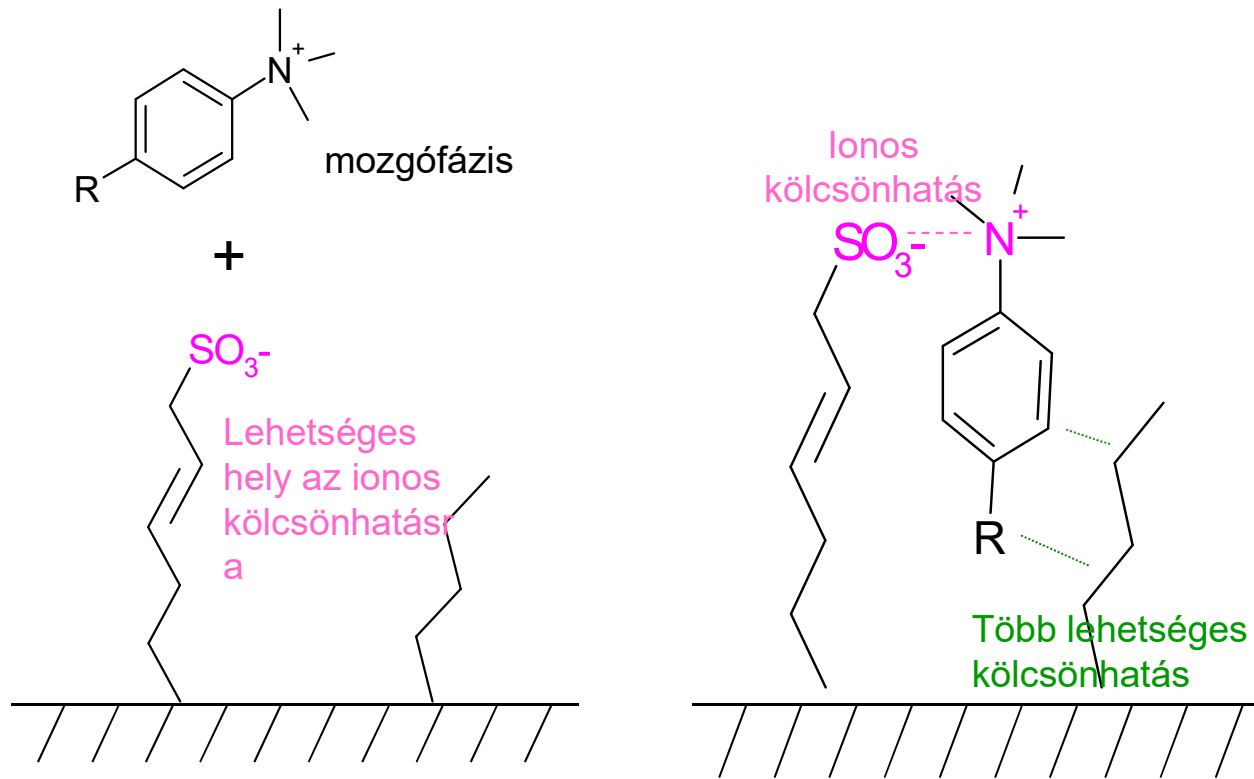
Fordított fázisú ionpár kromatográfia

RP-IP-HPLC

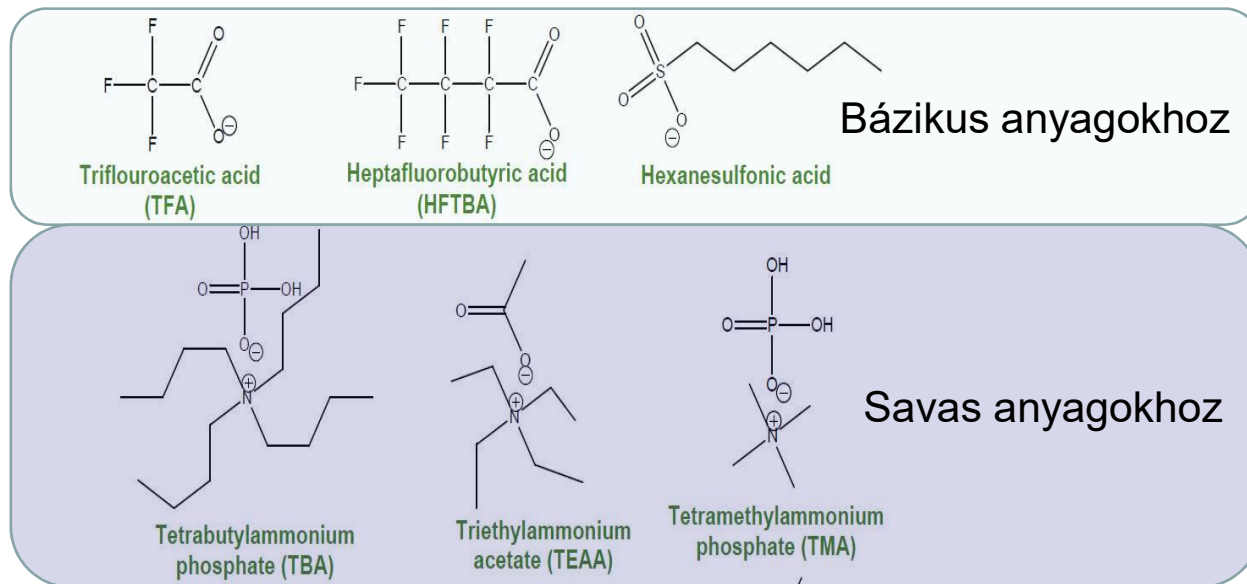
- Ionos vagy könnyen ionizálható vegyületek visszatartása RP-HPLC-ben kicsi.
- Visszatartás növelése: 1-100 mM ionpárképző, hidrofób részt tartalmazó ionos anyag adagolása az eluenshez. Az ionpárképző megváltoztatja az állófázis felületét, valamint ion-asszociátumot képez a mérendő molekulával. Az asszociátum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



RP-IP-HPLC



RP-IP-HPLC, ionpárképzők



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

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

Kontrollálandó paraméterek:

szerves oldószer minősége, mennyisége

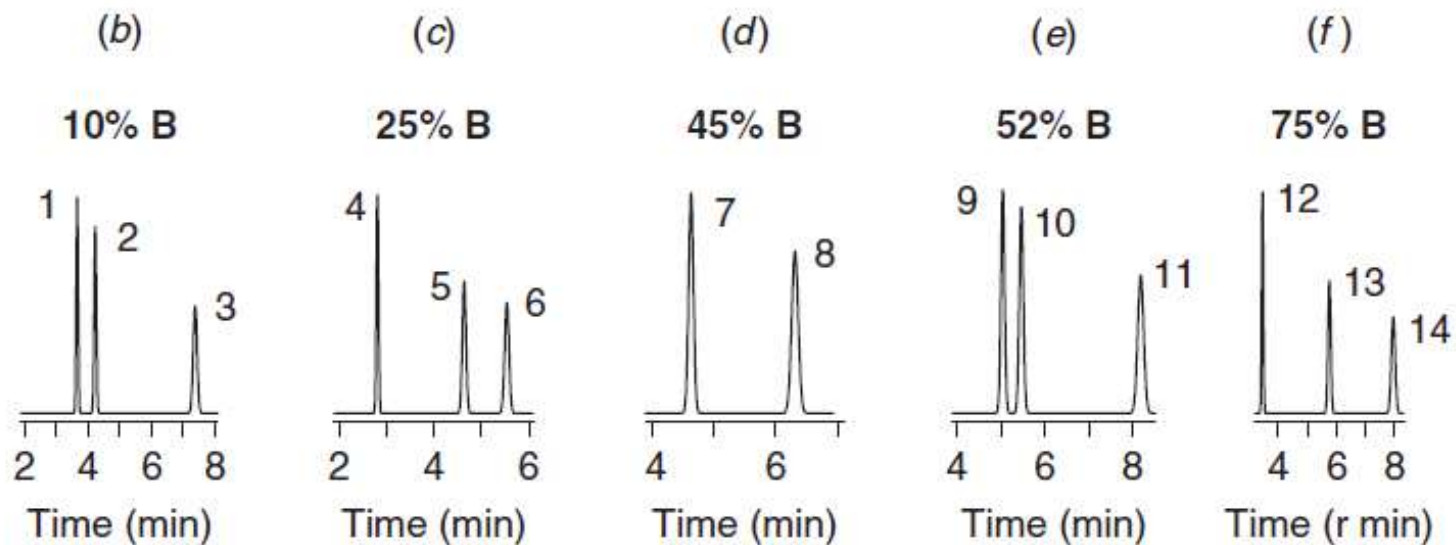
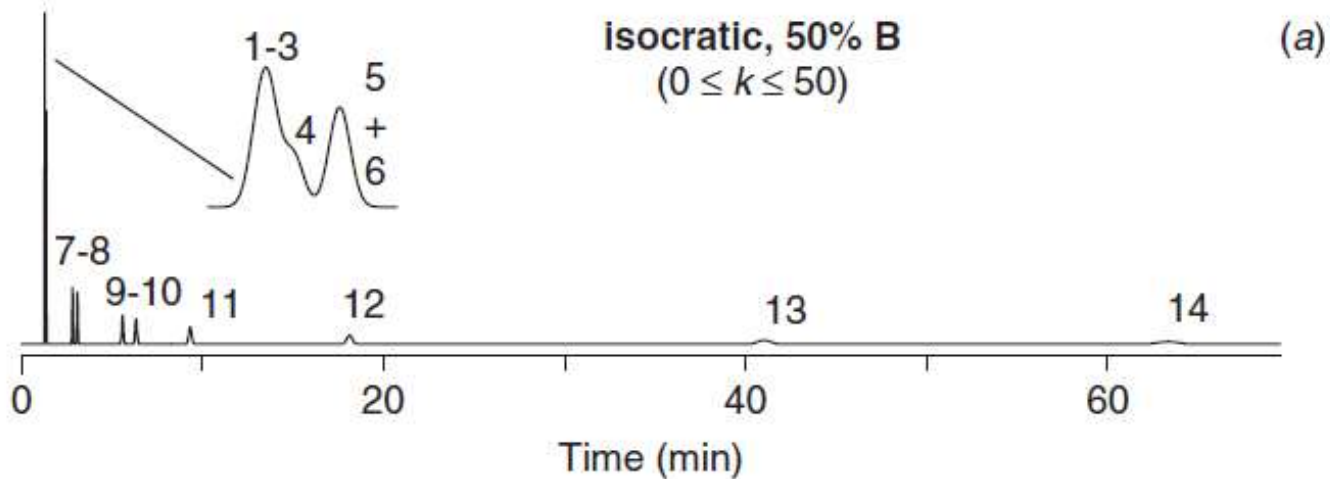
pH (puffer típusa és koncentrációja)

idegen só koncentrációja

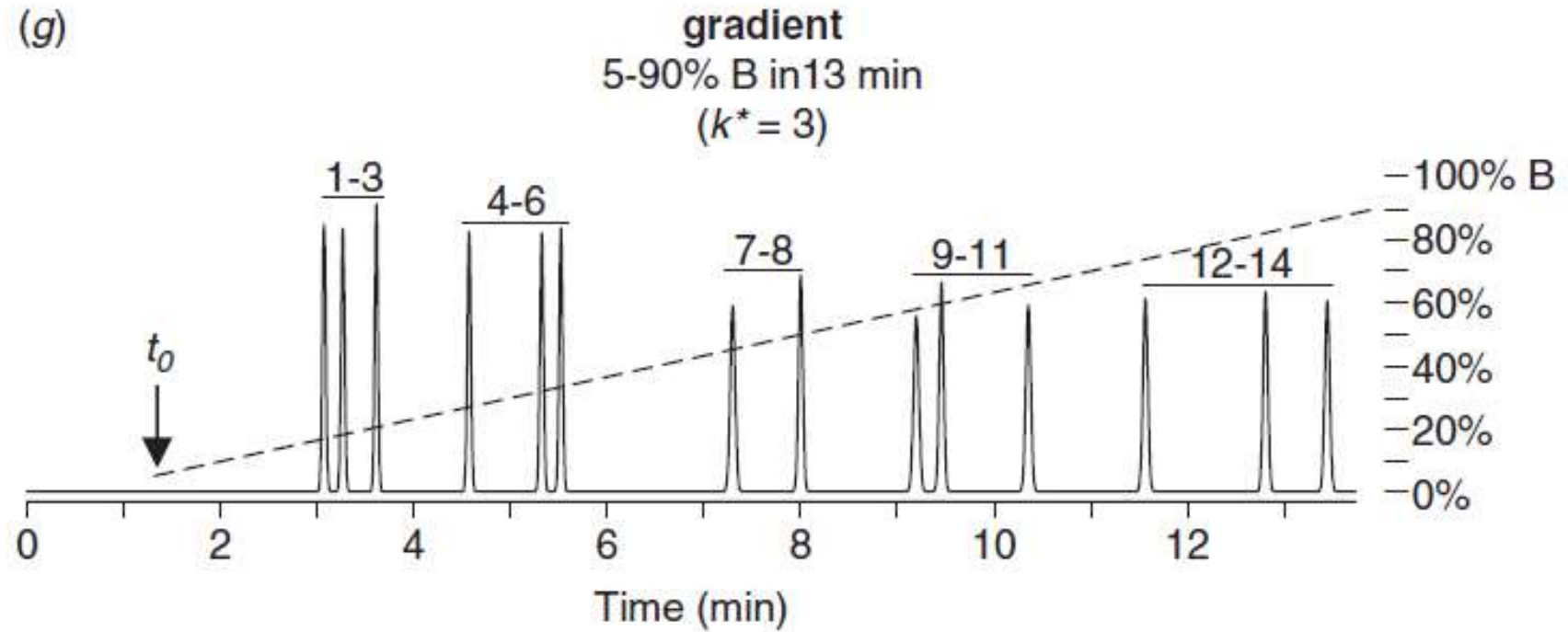
ionpárképző koncentrációja, jellege (láncossz, elágazó/nem elágazó, só vagy ionizálható)

hőmérséklet

Gradiens elúció



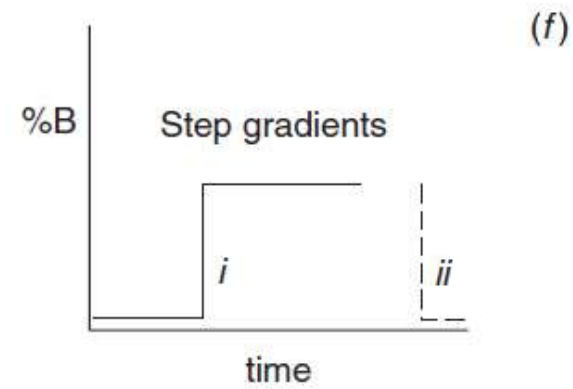
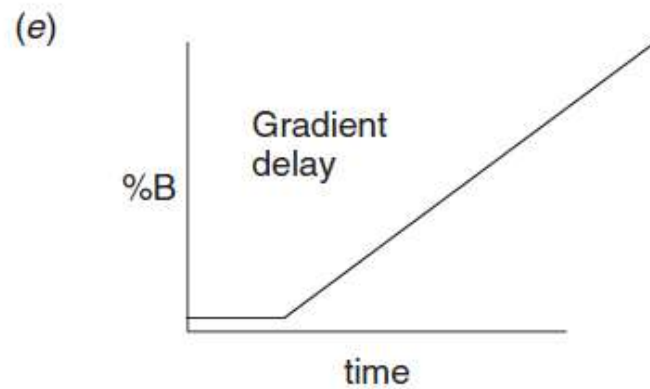
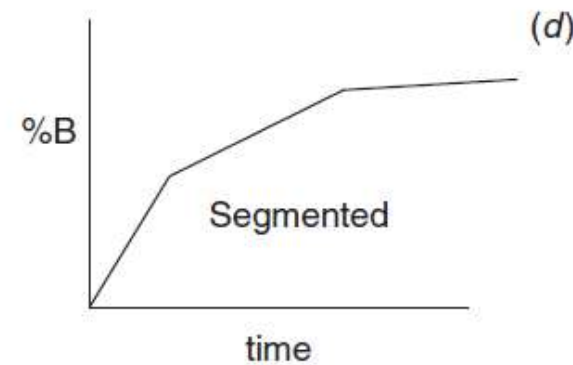
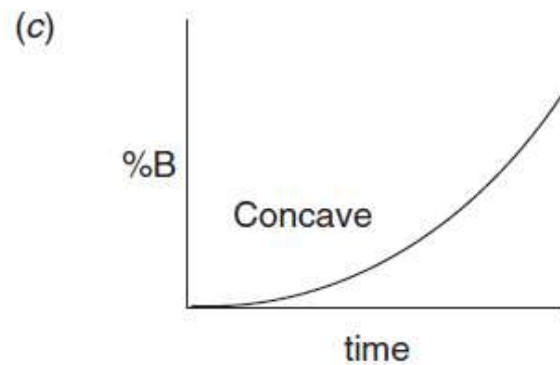
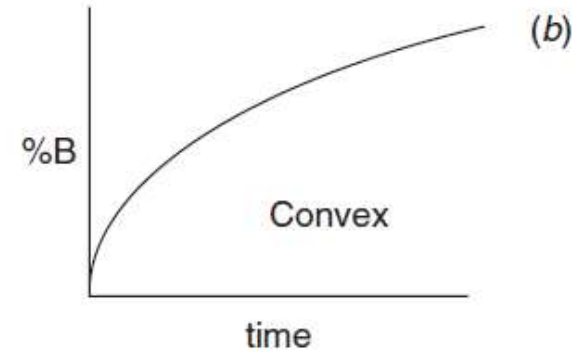
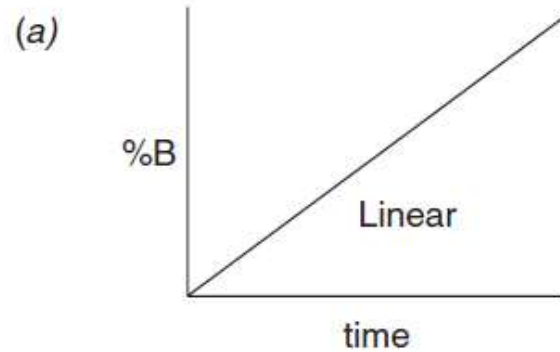
(g)



1-3 csúcs keresztülhalad a kolonnán $k \approx 3$ értékkel, amíg a 4-14 anyag a kolonna elején marad

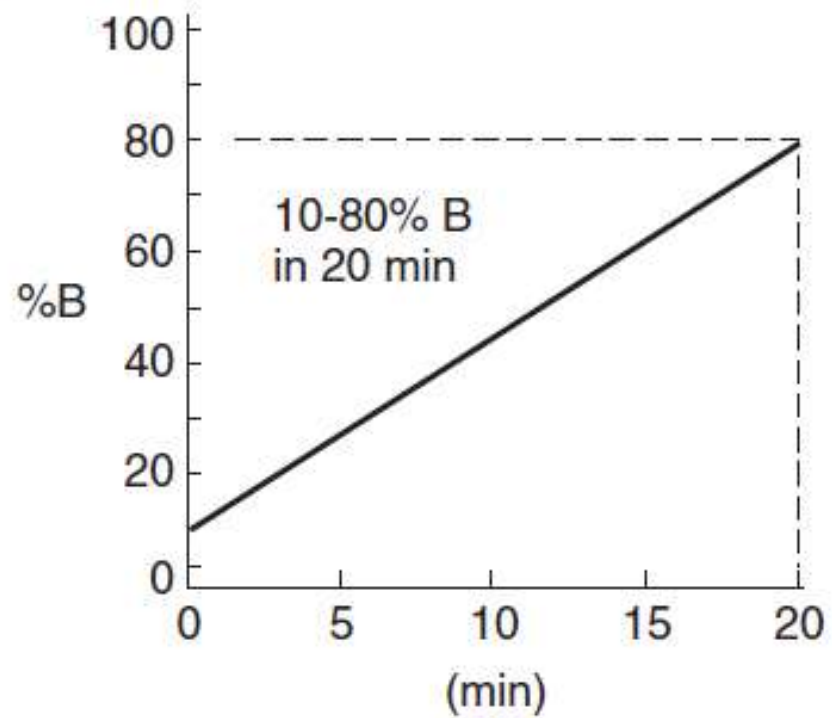
A körülmények megfelelő megválasztásával elérhető, hogy a többi anyag is $k \approx 3$ értékkel eluálódjon -> azonos szélességű csúcsok

Különböző lefutású gradiensek

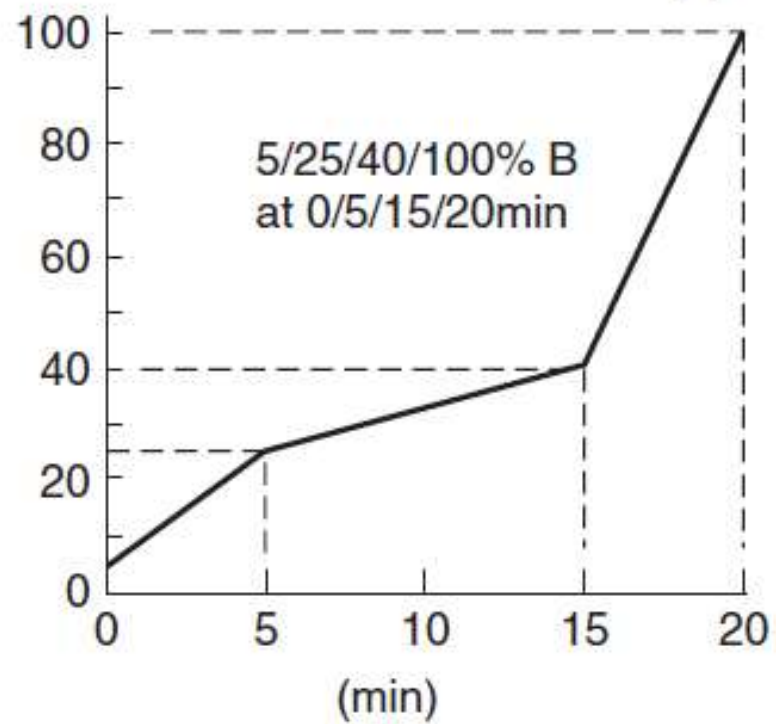


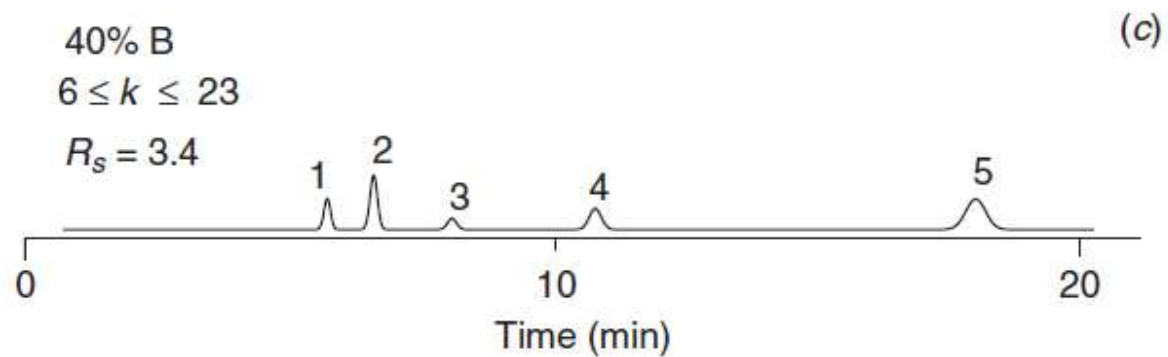
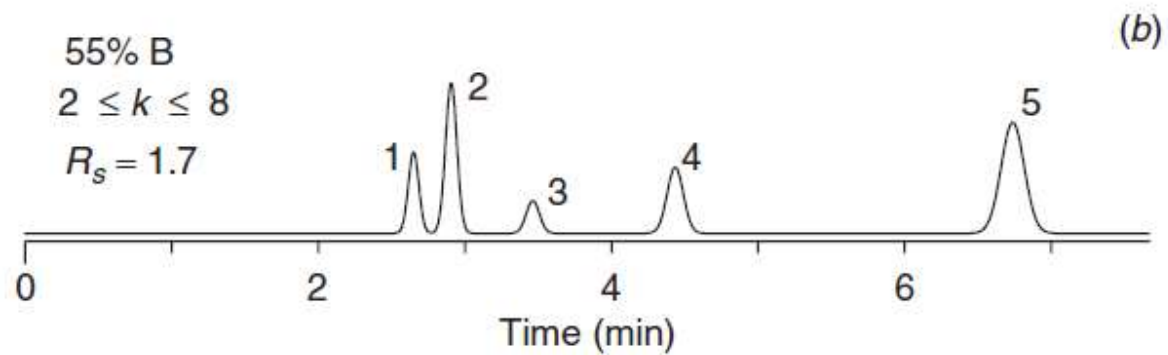
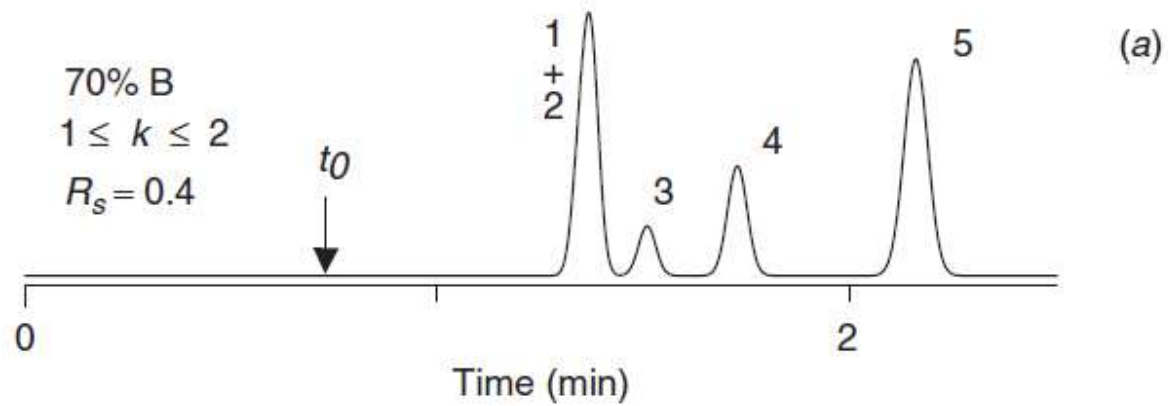
Általánosan használt gradiensprogramok

(g)

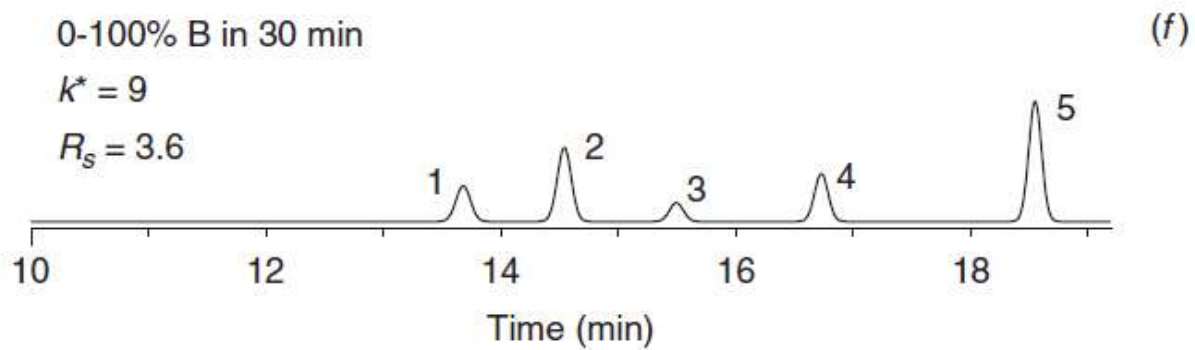
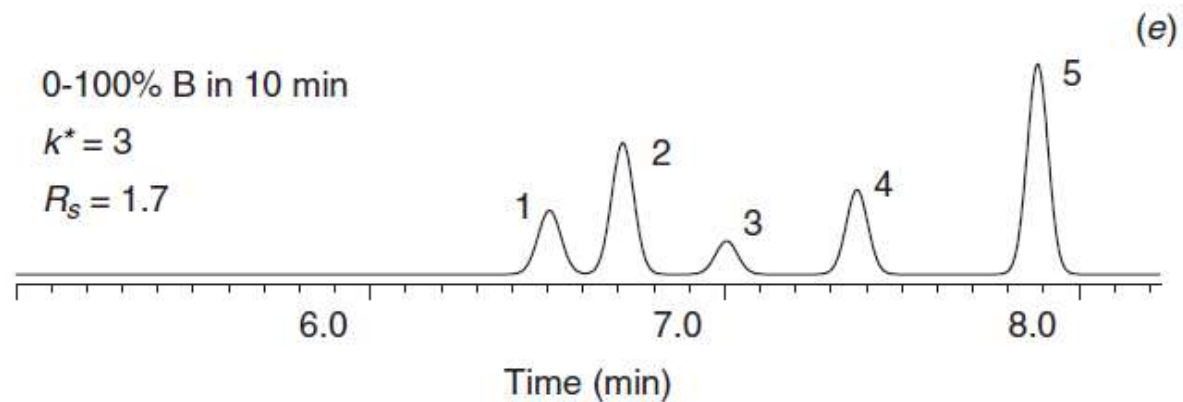
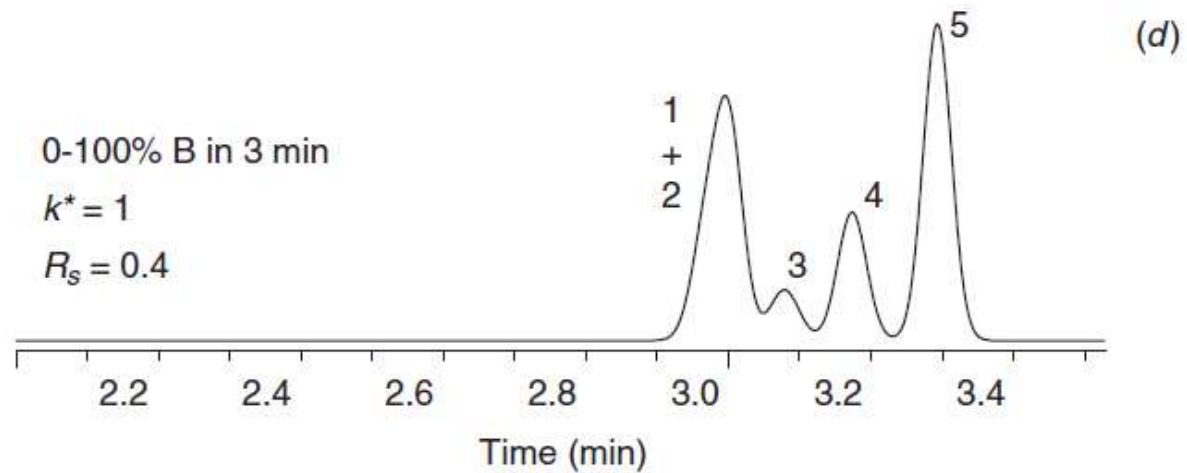


(h)

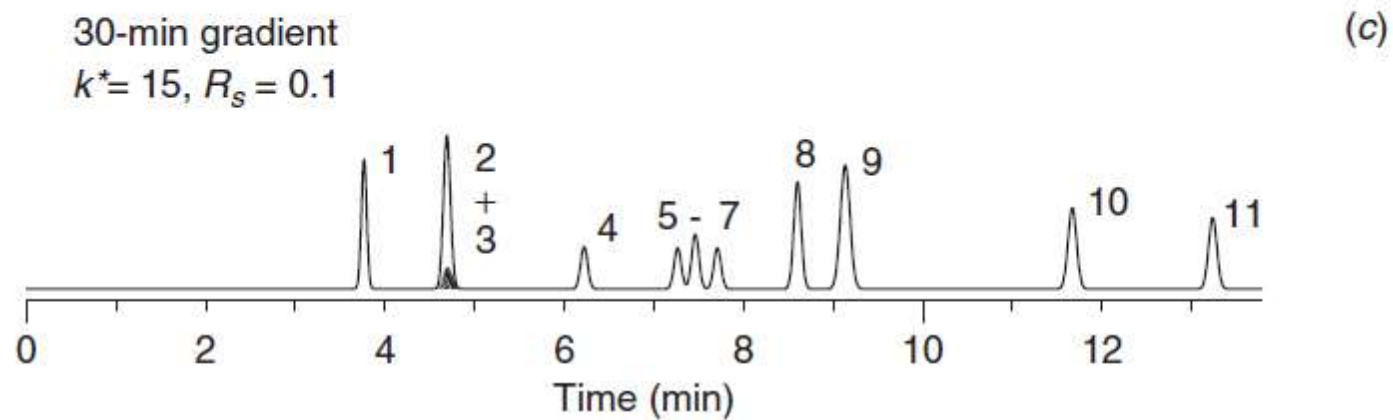
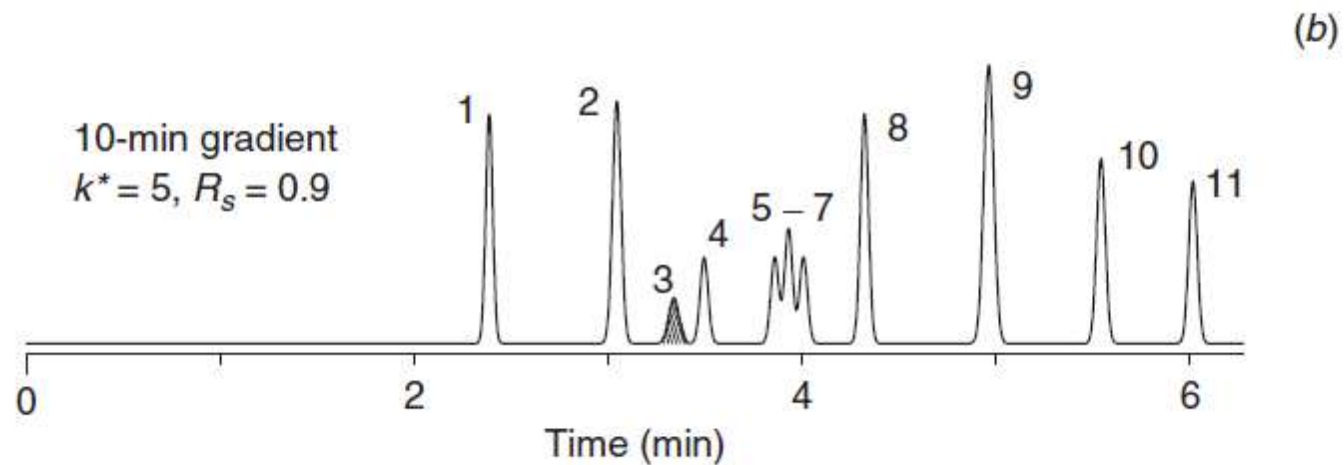
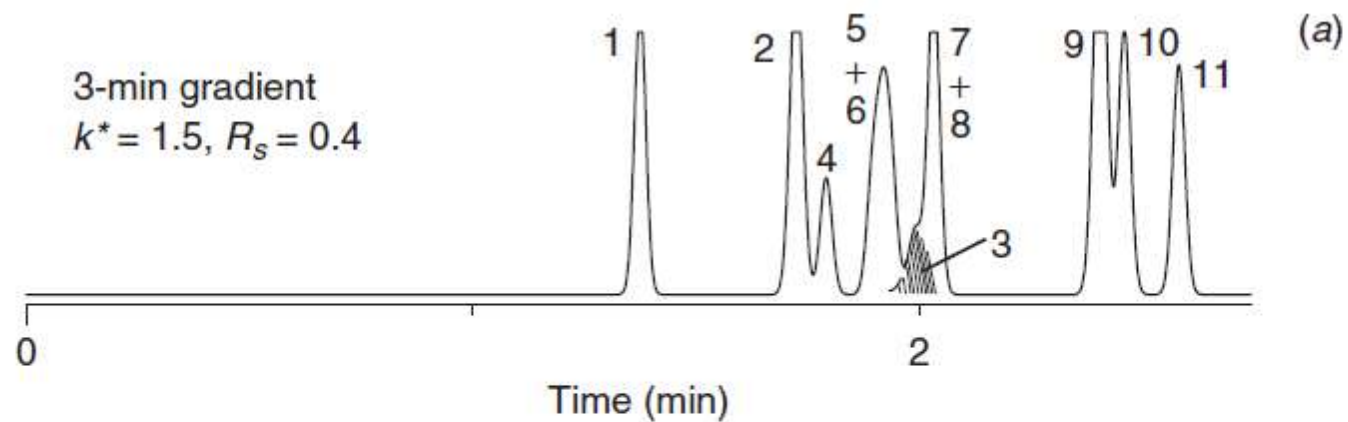




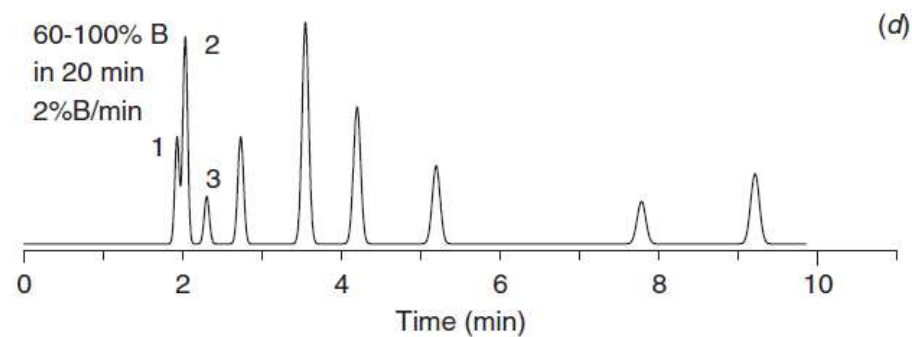
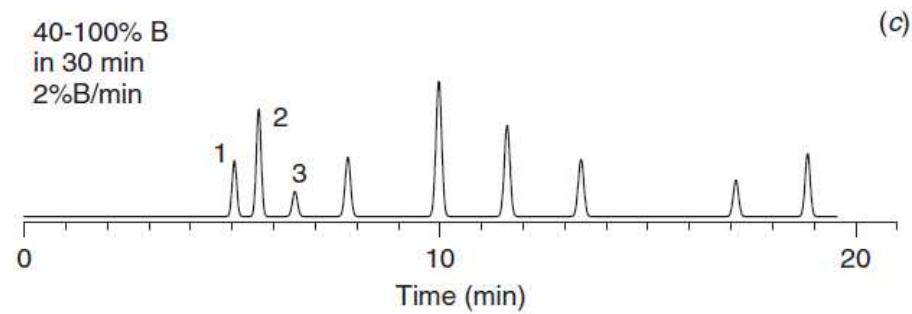
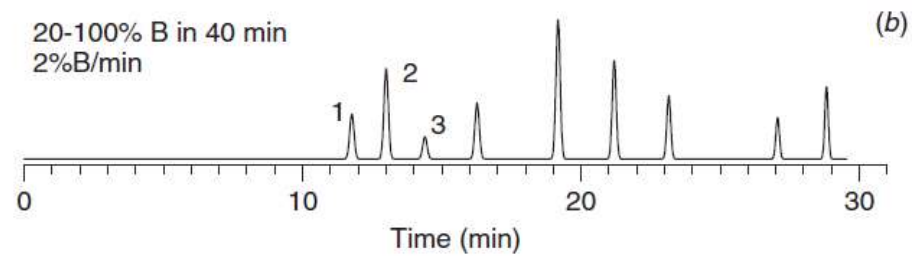
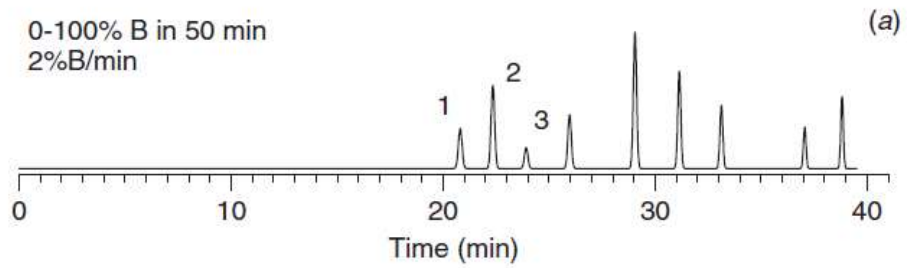
Izokratikus elválasztás különböző erősségű eluensekkel



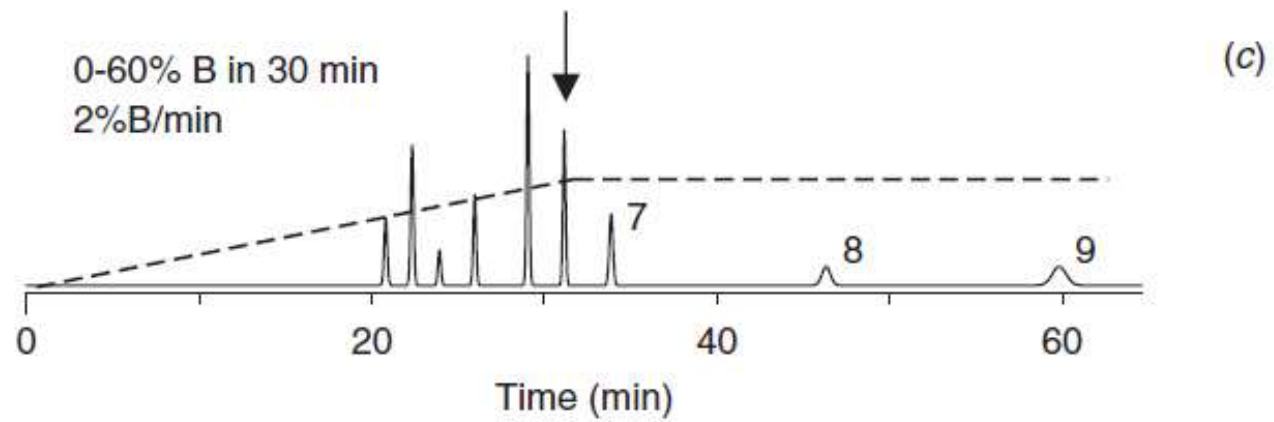
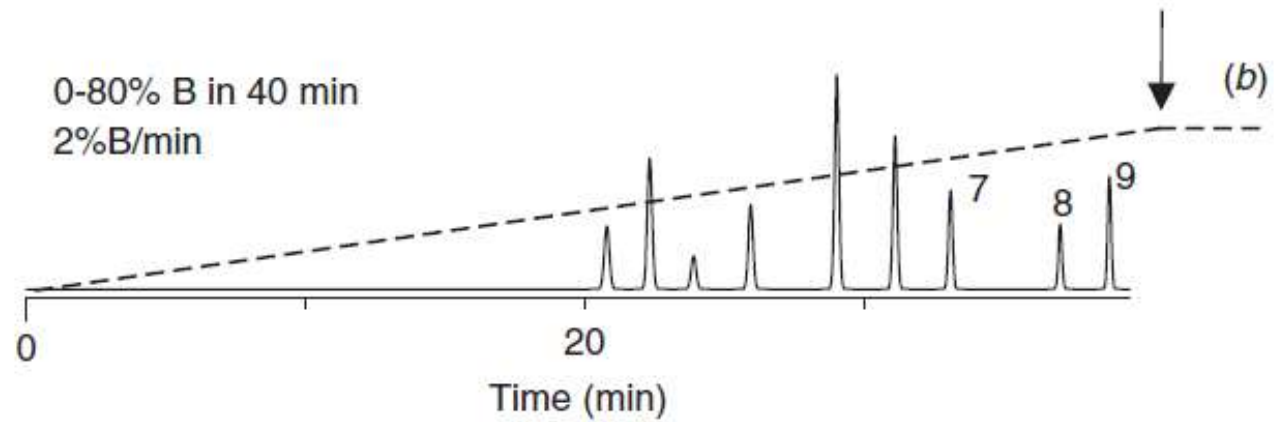
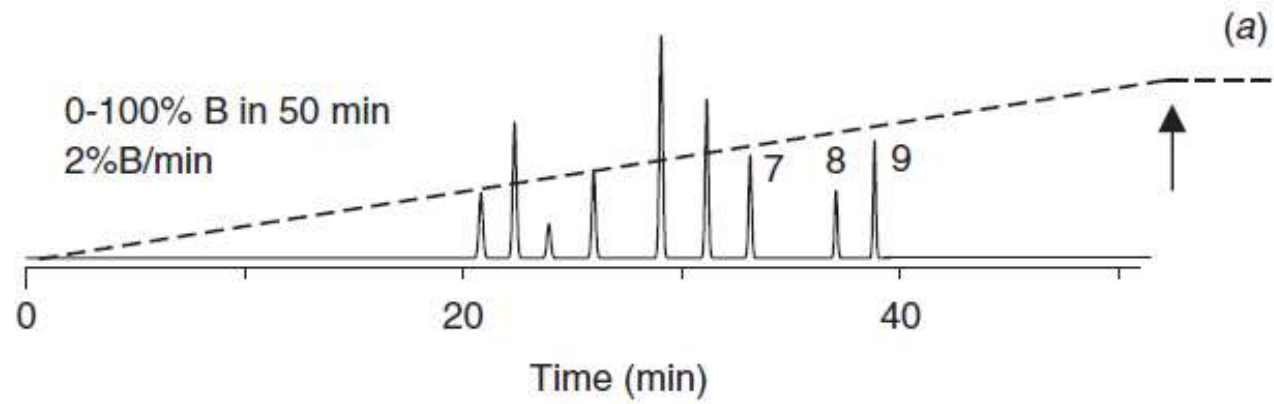
Gradiens elválasztás különböző gradiensidőkkel



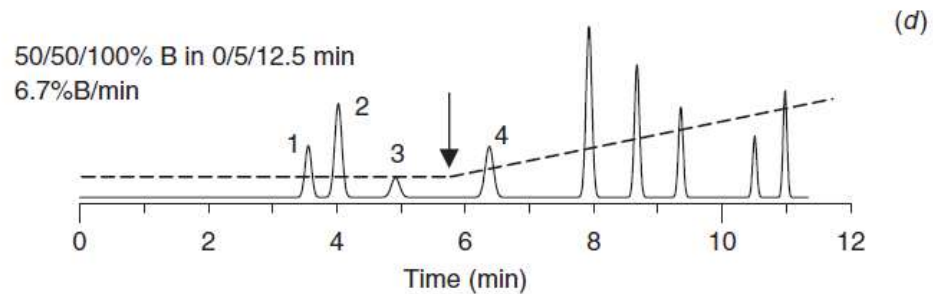
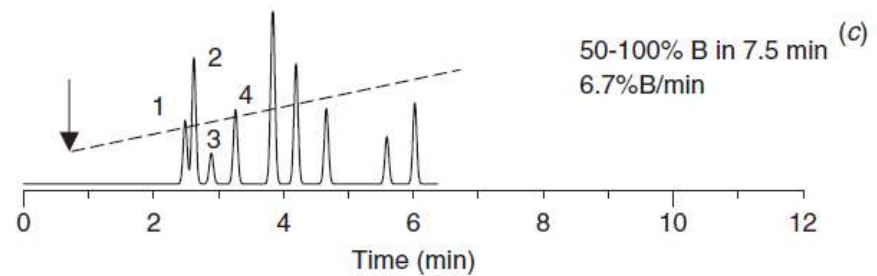
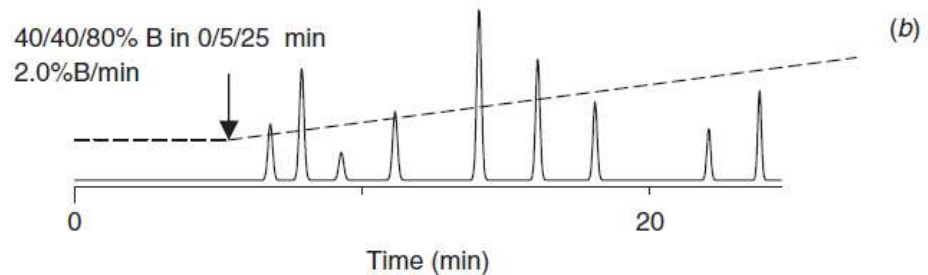
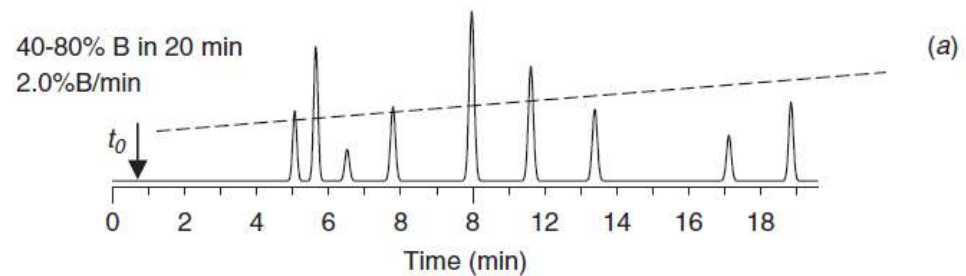
Kiindulási B% változtatása (minta herbicidek)



Végső B% változtatása



Gradienskésés változtatása



Szakaszos gradiensek

