

Elválasztástechnikai alapfogalmak

- Módszerek:
- mozgófázis állapota szerint:
 - 1. gáz: gázkromatográfia (GC)
 - 2. folyadék: folyadékkromatográfia (LC)
 - 3. szuperkritikus fluidum: szuperkritikus kromatográfia (SFC)

- **A folyadék- , gáz- és SFC-ban az elválasztás alapja az, hogy a különböző fizikai-kémiai tulajdonságú komponensek megoszlása a mozgó- és az állófázis között eltérő.**
- Kapilláris elektroforézis(CE,CZE): elektromos erőterben a vegyületek, ionok eltérő sebességgel vándorolnak

- Kromatográfiás módszerek: elúciós módszerek.
- 1. Impulzusszerű adagolás
- 2. Állandóan áramlik a mozgófázis
- 3. a mozgófázis szorpciója a legkisebb
- 4. Az analitikai elválasztás lineáris technika

Kromatográfiásan vizsgálható anyagok
(kromatografálhatóság kémiai és fizikai kritériumai)

- 1. Gázkromatográfia
- - gázkromatográfiában gőz(gáz) állapotba vitelt jelent kb.400 °C-ig, szerkezeti átalakulás nélkül, más szóval hőstabil vegyületek

- Mire használjuk ezt a technikát?
- Például: véralkohol mérés
- Olimpiákon: dopping ellenőrzés
- Dohány: mennyi káros anyagot bocsát ki egy cigis

GC nincs kapcsolva on-line módon

GC on-line kapcsolatok

Adagolás és mintaelőkészítés

Szerkezetvizsgálati módszerekkel

- Varázsszavak:

on-line

oldószer mentesség vagy csökkentett oldószer
felhasználás

Multidimenzionalitás

- Varázsszavak:

on-line

oldószer mentesség vagy csökkentett oldószer felhasználás

Multidimenzionitás

- On-line mintaelőkészítés

- **HS-GC**

- **HS-GC-MS**

- ATD-GC, ATD-GC-MS

- SPME-GC, SPME-GC-MS

- Általános alapelv:
- -mozgófázis állapotába kell vinni, úgy hogy
- -szerkezete ne változzon
- -detektálás megszabta koncentrációban

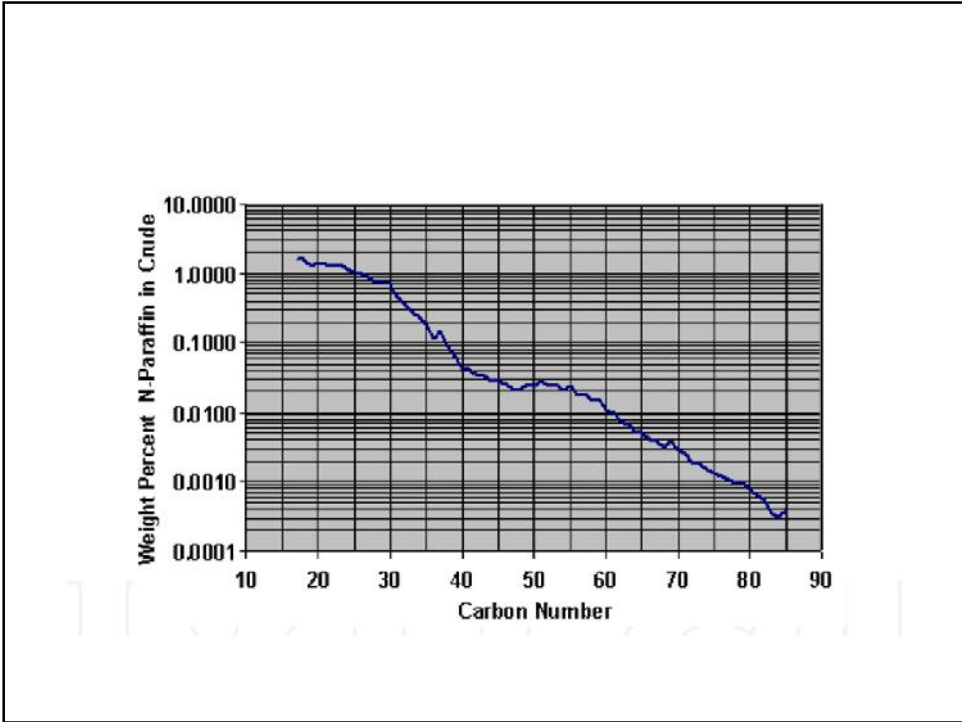
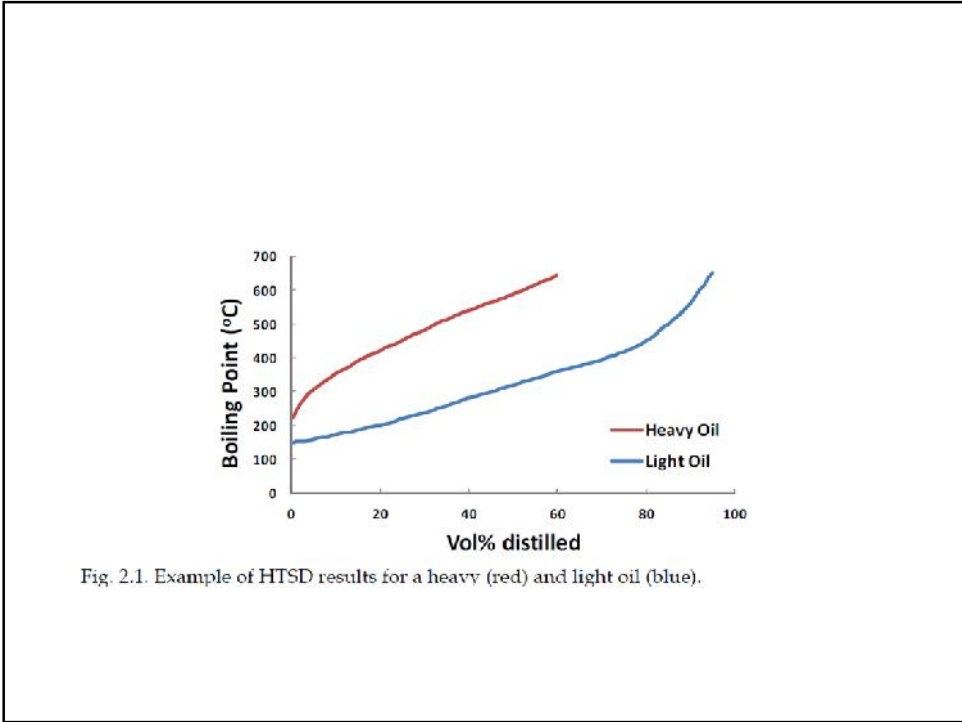
- Mozgófázis: gáz, ami állandóan áramlik, az állófázis felett, ebbe kell a komponenst
- bevinni
- A minta megfelelő állapota: gáz vagy gőz
- Készülék felső hőmérséklet határa:
- 400-450 °C.
- Irányadó: a vegyületek forráspontja

- Szükséges anyagmennyiség: pg-ng
- Korrigált forráspont!!!
- Tfp-100, 150 °C

17

Gas Chromatograph Applications in Petroleum Hydrocarbon Fluids

Huang Zeng, Fenglou Zou, Eric Lehne, Julian Y. Zuo* and Dan Zhang
*Schlumberger DBR Technology Center, Edmonton, AB,
Canada*



High Temperature Simulated Distillation According to ASTM D6352 using a Dedicated GC Analyzer

Vivek Dhole, Madhul Narakesari
Thermo Fisher Scientific, Nashik, India

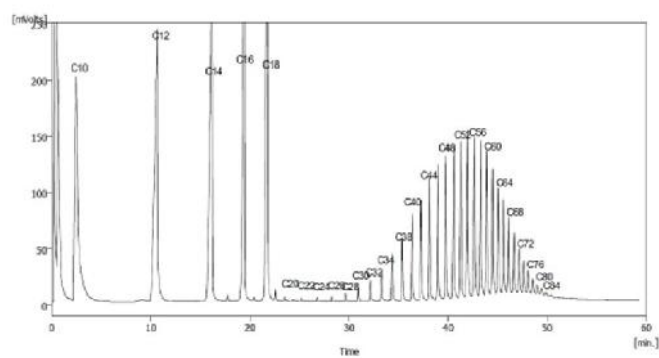


Figure 3. GC chromatogram of the prepared Polywax calibration standard.

Injector PTV temperature program	50 °C to 430 °C at 200 °C / min. hold 12 min.
Split ratio	4:1
Injection volume	2.0 µL
SIMDIST column, dimensions	MXT-500 metal column, length 6 m, ID 0.53 mm, 0.15 µm film thickness
Column flow	10 mL/min, Helium, constant flow mode
Oven program	35 °C , 6 min 5.5 °C /min to 90 °C 10 °C /min to 425 °C 425 °C , 10 min
FID temperature	430 °C
H ₂ flow	45 mL/min
Air	255 mL/min
N ₂ Make-up	20 mL/min

- Vegyületek jellege:
 - 1.Apolárisak
 - 1.a. C,H, halogének-hőstabil
 - 1.b.apoláris váz+poláris csoport, nem tartalmaz aktív hidrogén atomot
 - 2.Polárisak aktív hidrogén atommal!!!!

- Apolárisak-diszperziós gyenge kölcsönhatás
- Apoláris, de polarizálható
- Polárisak, de nincs aktív H-atom,H-hidas kötés(kölcsönhatás), hidrogén-akceptor
- Dipól-dipól kölcsönhatás
- Polárisak aktív H-atommal, H-donor, H-akceptor
- Dipól-dipól kölcsönhatás

- Vegyületek beosztása:
- -gázok
- -szobahőmérséklet körüli forráspontúak
- -100-300 °C közöttiek
- -300 °C fölöttiek

- Hőstabilitás szerint
- 1.a. apoláris vegyületek-nagy hőstabilitás
- 1.b.apoláris váz+poláris csoport, nem tartalmaz aktív hidrogén atomot- közepes, hőstabilitás
- 2.Polárisak aktív hidrogén atommal!- kis hőstabilitás

Figure 2. GC/FID analysis of beeswax on VF-1ms. 15 m x 0.32 mm x 0.1 μ m (2A) and 10 m x 0.15 mm x 0.1 μ m (2B and 2C). 2B, maximum oven temperature 350 $^{\circ}$ C; 2C, maximum oven temperature 380 $^{\circ}$ C.

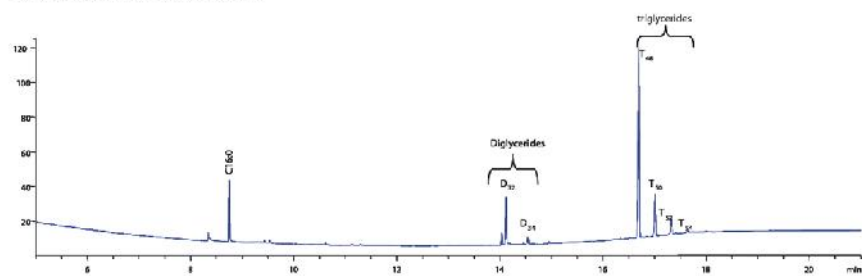
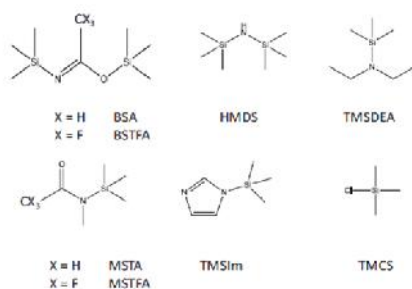


Figure 3. GC/FID analysis of Japan wax.

- Hőstabilitás növelése
- és illékonyág növelése:
- Származékképzéssel
- RCOOH+ metilezőszer=metilészter
- ROH+szilezőszer=szililéter

Journal of Chromatography A, 1296 (2013) 2–14

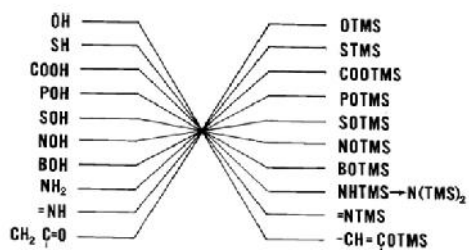


Review

Alkylsilyl derivatives for gas chromatography

Colin F. Poole*

Department of Chemistry, Wayne State University, Detroit, MI 48202, USA



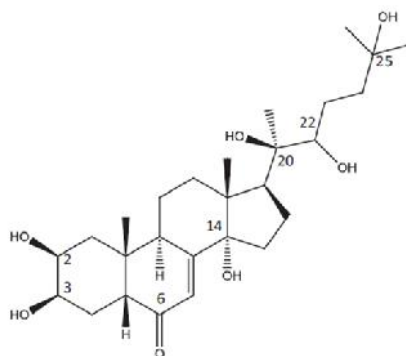


Fig. 4. Structure of the insect molting hormone ecdysterone (2 β ,3 β ,14 α ,20,21,25-hexahydroxycholest-7-en-6-one) showing numbering system for hydroxyl groups.

Journal of Chromatography A, 1296 (2013) 15–24

Table 8
Reagents with functional group selectivity.

Reagent type	Functional groups reacting	Typical reagents
Esterifying	COOH, SOH, POH, ArOH	CF ₃ CH ₂ OH, CCl ₃ CH ₂ OH, CF ₃ CF ₂ CH ₂ OH
Hydroxylamine	CO, CHO	C ₆ F ₅ CH ₂ ONOH
Hydrazine	(NO ₂) ₂ C ₄ H ₂ NHNH ₂ , C ₆ F ₅ NHNH ₂	C ₆ F ₅ CH ₂ OH
Primary amine	CO, CHO	C ₆ F ₅ CH ₂ NH ₂
Aldehyde	NH ₂	C ₆ F ₅ CH ₂ CHO
Chloroformate	Tert-amine	C ₆ F ₅ CH ₂ OCOCl

Review

Derivatization reactions for use with the electron-capture detector

Colin F. Poole*

Department of Chemistry, Wayne State University, Detroit, MI 48202, USA

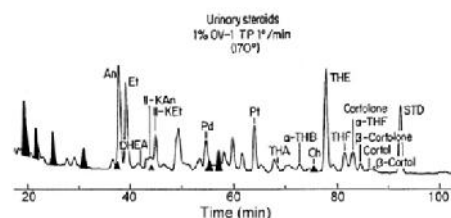


Fig. 1 - The first true GC/MS profile from 1968 is reproduced in honor of Evan C Horning. This chromatogram contains examples of human adrenal and gonadal steroids (as methoxime-trimethylsilyl ethers) of all polarities. The black shaded peaks are compounds which also appear in a reagent blank. A few representative abbreviations (not inclusive) are as follows: An, androsterone; Et, etiocholanolone; Pd, pregnanediol; THE, tetrahydrocortisone; THF, tetrahydrocortisol. Reproduced from [2] with permission.

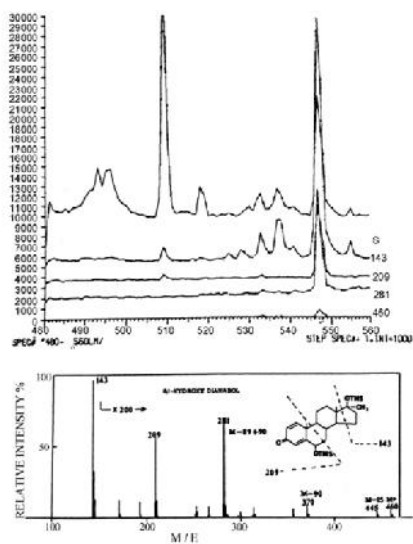
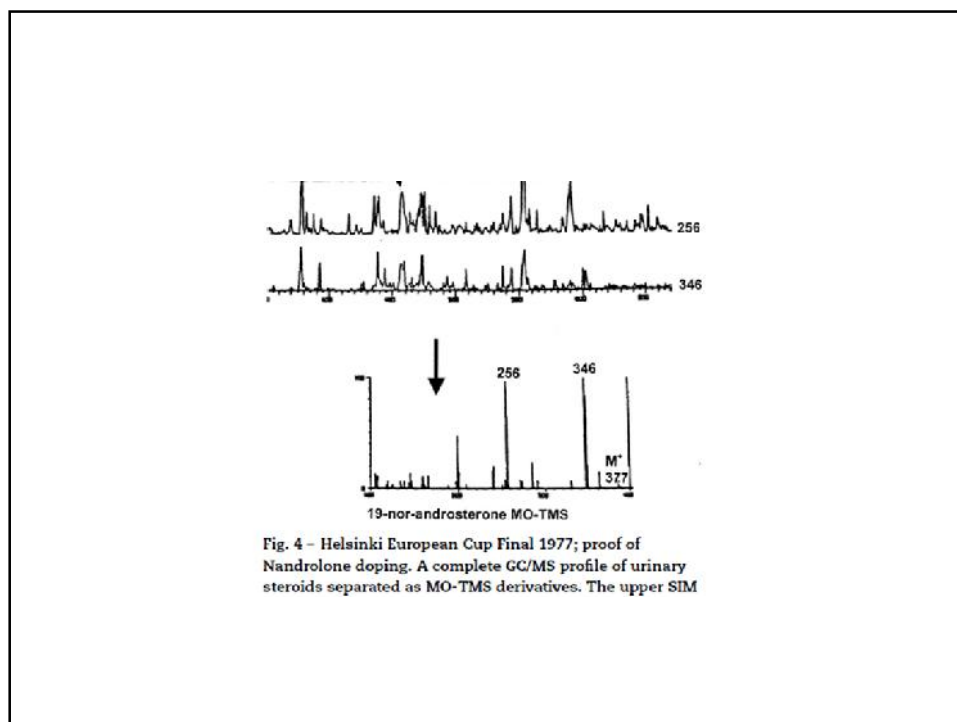
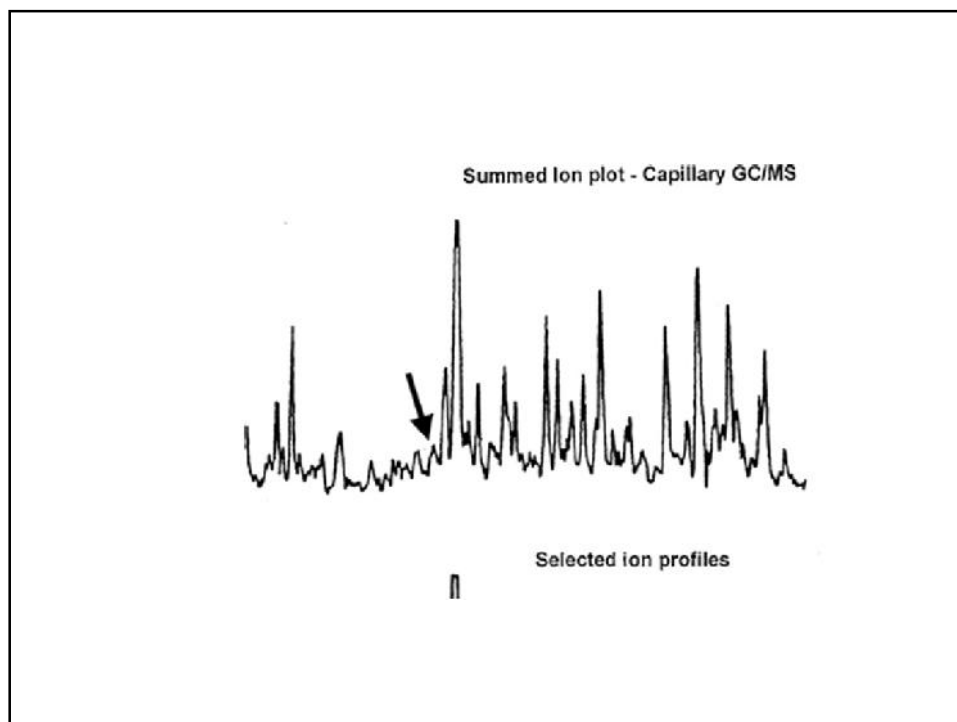


Fig. 3 - Commonwealth Games 1974; the first official testing. GC/MS identification of 6β-hydroxydianabol in an athlete's urine. Reprinted from [14] with permission.



Kigondolta volna, hogy NDK szelleme tovább él?



Fig. 5 – The East German star shot-putter Ilona Slupianek in 1977 just before her suspension for Nandrolone doping. Courtesy of Associated Sports Photography [asp@sports-photos.co.uk], with permission.

Kábítószer hajból, amfetamin

- 1. Ionkromatogram
- 2. Tömegspektrum

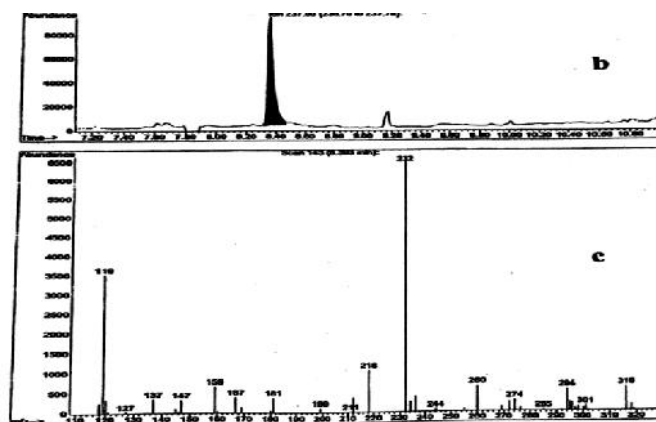


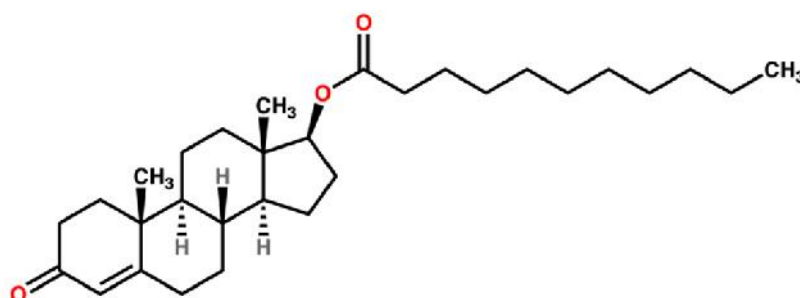
Fig. 1. Chromatogram of an extract of 50 mg of hair tested positive for amphetamine. In the two upper boxes

Anabolikus szteroidok hajban és vízben

Results in urine and hair for anabolic steroids³

Identified molecules	<i>n</i>	Urine (ng/ml)	Hair (ng/mg)
Nandrolone	1	0	5.1
Testosterone undecanoate	2	0	15.2

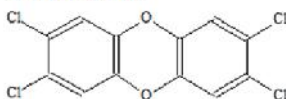
Testosterone undecanoat fp.550,7°C



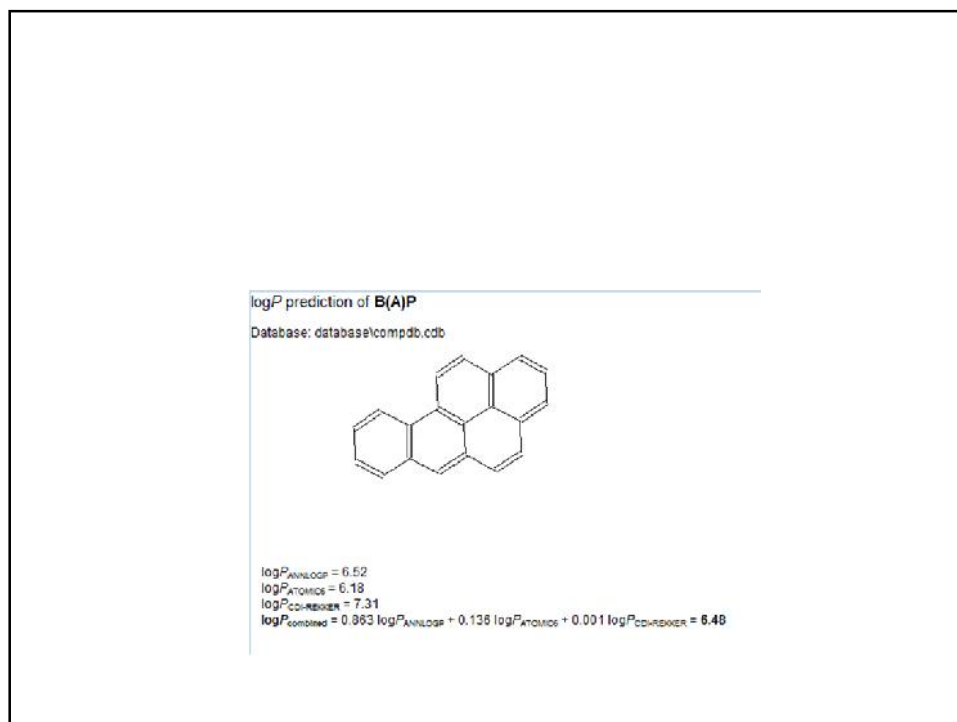
- Elválasztástechnika:
- gázkromatográfia
- folyadékkromatográfia

logP prediction of TCDBD

Database: databaselcompdb.cdb



$\log P_{\text{ANNLOGP}} = 6.77$
 $\log P_{\text{ATOMIC6}} = 5.40$
 $\log P_{\text{CDI-REKER}} = 7.26$
 $\log P_{\text{COMBIN6S}} = 0.863 \log P_{\text{ANNLOGP}} + 0.136 \log P_{\text{ATOMIC6}} + 0.001 \log P_{\text{CDI-REKER}} = 6.58$



- Mikor használható a GC?
- Milyen anyagok határozhatók meg vele?
- Milyen forráspontúak mérhetőek?
- *BENZO(a)PIRÉN*
- *Forráspont: 496°C. Olvadáspont: 178.1°C. Sűrűség: 1.4 g/cm³*

- TCDD has a molecular weight of 322 and occurs as a colorless to white
- crystalline solid. It has melting point of 305°C to 306°C, a boiling point
- of 446.5°C, and a log octanol-water partition coefficient of 6.8.
- **Vizsgálható-e gázkromatográfiásan?**

- **Folyadékkromatográfia**
- **Szerkezeti változás** nélkül oldani kell a mozgófázisban a **detektálás megszabta koncentrációban**
- **Detektorok:**
 - -UV-Vis ng
 - -Fl -pg
 - -ED pg-ng
 - -MS pg-ng
 - -RI ug
 - -ELSD ng-ug
 - -CAD ng-pg

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
 folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- 1. Poláris kölcsönhatások, de nem ionosak
 - a. NP-HPLC: polárisabb felület,
 apolárisabb mozgófázis
 - b. HILIC= hydrophilic liquid chromatography
 polárisabb felület
 kevésbé poláris mozgófázis
 vizes NP-HPLC
-

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
 folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- 2. Apoláris-, hidrofób-, vagy diszperziós kölcsönhatás
 - a. RP-HPLC
 - apolárisabb felület-
 - polárisabb mozgófázis
 - b. HIC= hidrophob interaction chromatography
 az RP-HPLC-nél kevésbé poláris felület (C-4,
 C-6, RP-HPLC fázis)-
 nagy sótartalmú, vizes mozgófázis

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- **3. Ionos kölcsönhatás**
 - a. RP-IPHPLC
 - állófázis: apoláris
 - Mozgófázis: víz-szerves oldószerbe tett hidrofób ion
 - b. Ioncserés kromatográfia
 - állófázis: felületen rögzített ion
 - mozgófázis: víz+só vagy puffer

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- **c: ioncserélővel kialakított gyenge hidrofób és H-hidas kölcsönhatás**
- **Ionkizárásos kromatográfia**
- **Állófázis: nagy ioncserélő kapacitású H-formában lévő kationcserélő**
- **Mozgófázis: 0,01-0,001 mól/l ásványi sav tartalmú víz**

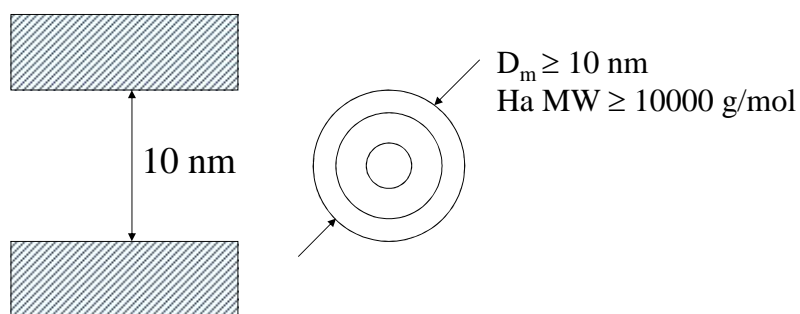
- állófázis: nagy ioncserélő kapacitású H-formában lévő anioncserélő
- mozgófázis: 0,01-0,001 mól/l ásványi lúg tartalmú víz

Nincs kölcsönhatás

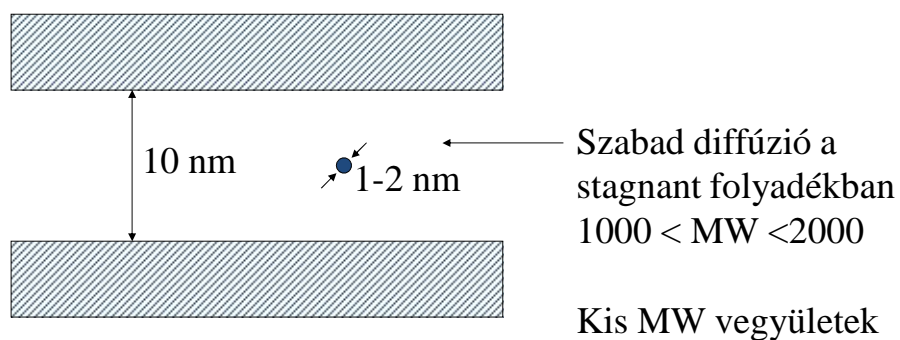
- Méret kizárásos kromatográfiai módszerek
- állófázis: nagy pórusátmérőjű szerves és szervetlen porózus anyag,
- Mozgófázis:
 - a. víz+puffer: vizes méretkizárásos kromatográfia, nagynyomású gélszűrés
 - b. szerves oldószer: nem vizes méretkizárásos kromatográfia, gélermeációs kromatográfia

Molekulatömeg

HPLC: kis molekulatömeg, ha pórusátmérő (d_p)
20nm (szokványos: $d_p \sim 10\text{nm}$).



Ha $d_p/d_m \geq 10 \rightarrow$ nincs jelentős pórus okozta
zónaszélesedés



A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
 folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- 1. Poláris kölcsönhatások, de nem ionosak
 - a. NP-HPLC: polárisabb felület,
 apolárisabb mozgófázis
 - b. HILIC= hydrophilic liquid chromatography
 polárisabb felület
 kevésbé poláris mozgófázis
 vizes NP-HPLC
-

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
 folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- 2. Apoláris-, hidrofób-, vagy diszperziós kölcsönhatás
 - a. RP-HPLC
 - apolárisabb felület-
 - polárisabb mozgófázis
 - b. HIC= hidrophob interaction chromatography
 az RP-HPLC-nél kevésbé poláris felület (C-4,
 C-6, RP-HPLC fázis)-
 nagy sótartalmú, vizes mozgófázis

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- **3. Ionos kölcsönhatás**
 - a. RP-IPHPLC
 - állófázis: apoláris
 - Mozgó fázis: víz-szerves oldószerbe tett hidrofób ion
 - b. Ioncserés kromatográfia
 - állófázis: felületen rögzített ion
 - mozgó fázis: víz+só vagy puffer

A vizsgált molekula és az állófázis közötti kölcsönhatás az alapja a
folyadékkromatográfiai módszerek beosztásának

- **c: ioncserélővel kialakított gyenge hidrofób és H-hidas kölcsönhatás**
- **Ionkizárásos kromatográfia**
- **Állófázis: nagy ioncserélő kapacitású H-formában lévő kationcserélő**
- **Mozgó fázis: 0,01-0,001 mól/l ásványi sav tartalmú víz**

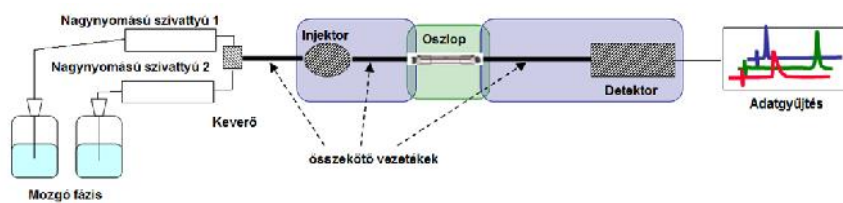
- állófázis: nagy ioncserélő kapacitású H-formában lévő anioncserélő
- mozgófázis: 0,01-0,001 mól/l ásványi lúg tartalmú víz

Nincs kölcsönhatás

- Méret kizárásos kromatográfiai módszerek (SEC)
- állófázis: nagy pórusátmérőjű szerves és szervetlen porózus anyag,
- Mozgófázis:
 - a. víz+puffer: vizes méretkizárásos kromatográfia, nagynyomású gélszűrés (gel filtration)
 - b. szerves oldószer: nem vizes méretkizárásos kromatográfia, gélermeációs kromatográfia (gel permeation)
- Két mód: SEC és UHPSEC

- SFC és UHPSEC
- HPLC és UHPLC

Grádienselúciós rendszer felépítése



$V_R = 1 \text{ cm}^3 \quad N = 1000 \quad N = \frac{V_R^2}{\sigma_w^2}$

Ekkor: $\sigma_E^2 = 0,1 \mu\text{l} = 100 \text{ nl} \quad \sigma_w^2 = \frac{10^6}{10^6} = 1 \mu\text{l}$

σ_E^2 Összetevői

$\sigma_E^2 = \sigma_A^2 + \sigma_\delta^2 + \sigma_{Dcell}^2 + \sigma_{Dr}^2$

- σ_{Dr}^2 : detektor elektronika okozta zónaszélesedés
- σ_{Dcell}^2 : detektorcella okozta zónaszélesedés
- σ_δ^2 : összekötő vezeték okozta zónaszélesedés

A new generation of SFC system : UPC²

DWELL VOLUME : V_D

EXTRA-COLUMN VOLUME : V_{ext}

	SFC	UHPLC	UPC ²
Dwell volume (V_D)	2270 μL	90 μL	440 μL
Isocratic step for generic conditions	68 sec <small>($F = 2.0 \text{ mL/min}$)</small>	15 sec <small>($F = 0.36 \text{ mL/min}$)</small>	12 sec <small>($F = 2.4 \text{ mL/min}$)</small>
Extra column volume (V_{ext})	118 μL	13 μL	60 μL
Suitable column dimensions	150 x 4.6 mm <small>(volume ~ 1750 μL)</small>	50 x 2.1 mm <small>(volume ~ 120 μL)</small>	To be assessed

Általános elvek

Elválasztás feltétele:

- Oldhatóság a mozgófázisban
- Szerkezeti állandóság
- Detektor megszabta koncentráció

- SFC és UHPSFC
- Mozgófázis fő összetevő: CO₂, apoláris
- Segéd oldószerek: MeOH, EtOH, 2-PrOH és egyéb poláris oldószerek
- Állófázis : poláris
- Általános elv, hogy az álló és mozgófázis polaritásának el kell térnie!

Journal of Chromatography A, 1074 (2005) 163–173

Integration of supercritical fluid chromatography drug discovery as a routine support tool Part I. Fast chiral screening and purification

Craig White*

*Analytical Technologies, Eli Lilly and Company Limited, Lilly Research Centre, Erl Wood Manor
Sunninghill Road W., Windlesham, Surrey GU20 6PH, UK*

Received 21 January 2005; received in revised form 17 March 2005; accepted 22 March 2005
Available online 12 April 2005

Journal of Chromatography A, 1269 (2012) 122–13



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchroma

Review

Chiral drug analysis using mass spectrometric detection practice in clinical and forensic toxicology

Andrea E. Schwaninger^a, Markus R. Meyer^b, Hans H. Maurer^{b,*}

^a Department of Forensic Pharmacology and Toxicology, Institute of Forensic Medicine, University of Zurich, Zurich, Switzerland

^b Department of Experimental and Clinical Toxicology, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

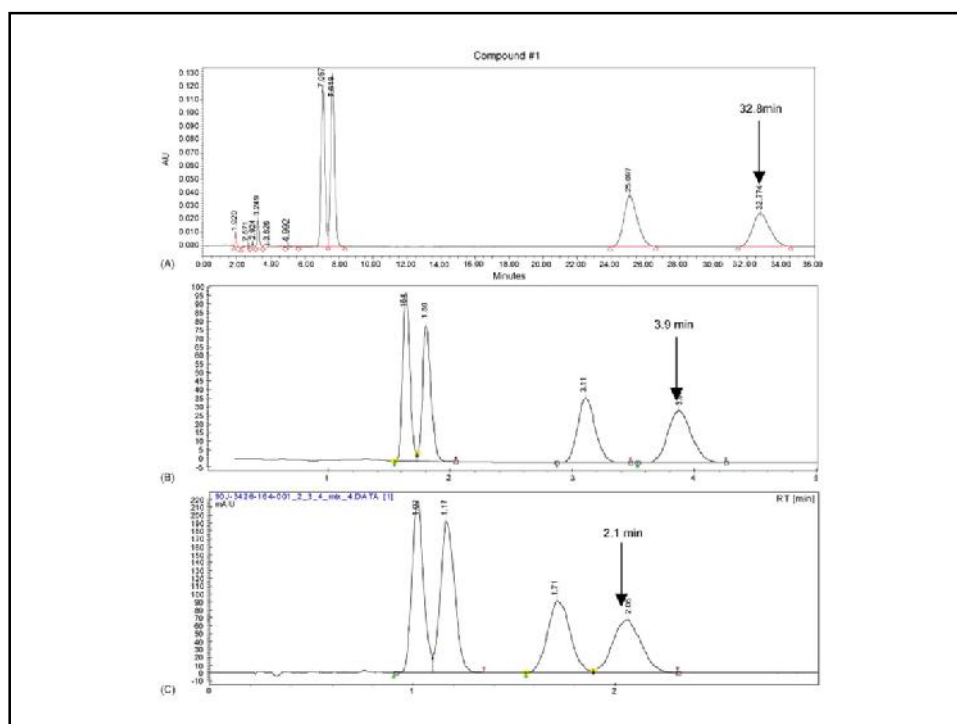


Fig. 1. Compound 1 containing two chiral centres analysed isocratically by HPLC (A) using 85% Heptane, 15% Ethanol each with 0.2% DEA on the chiral AD-H 150 mm \times 4.6 mm column, flow rate 1 ml/min; SFC (B) using a modifier of 15% MeOH containing 0.4% DEA on the AD 250 mm \times 4.6 mm column, flow rate 5 ml/min; SFC (C) using a modifier of 12% MeOH containing 0.2% IPAm on the AD-H 100 mm \times 4 mm column, flow rate 5 ml/min. SFC outlet pressure was set to 100 bar and temperature was 35 °C. Detection by UV, 260 nm for HPLC and 220 nm for SFC.

Paraméter	gáz	szuperkritikus fluid	folyadék
diffúziós koefficiens [cm ² /sec]	10 ⁻¹	10 ⁻⁴ ÷ 10 ⁻³	10 ⁻⁵
s r ség [g/cm ³]	10 ⁻³	0,3 ÷ 0,8	1
viszkozitás [poise]	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ ÷ 10 ⁻³	10 ⁻²
Reynolds szám	10	-	10 ²

$$\Delta p = \frac{W y L u}{d_p^2}$$

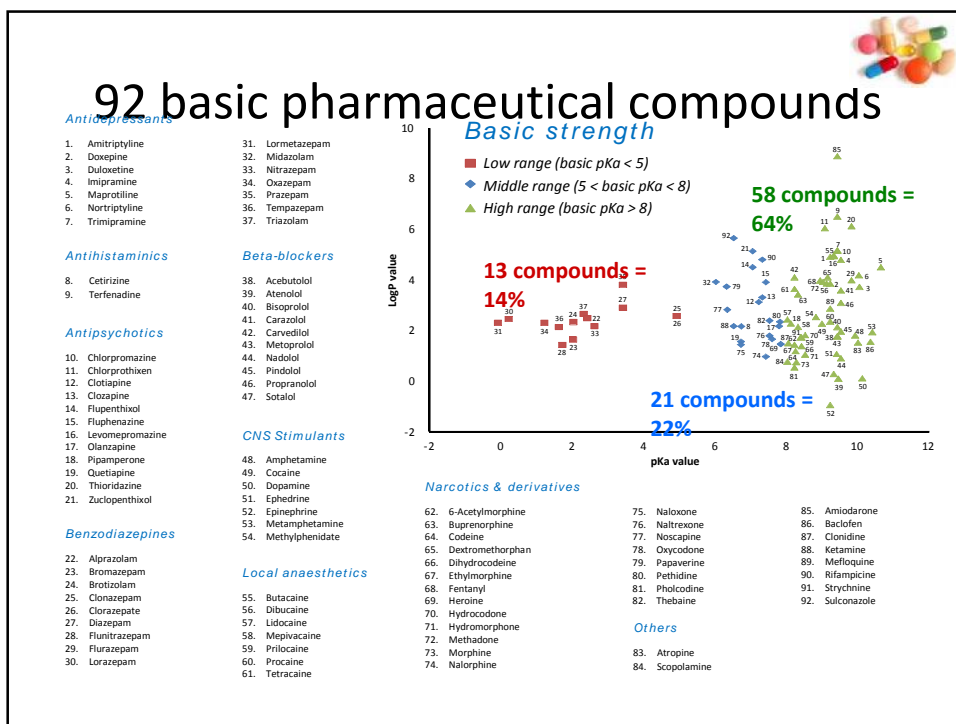
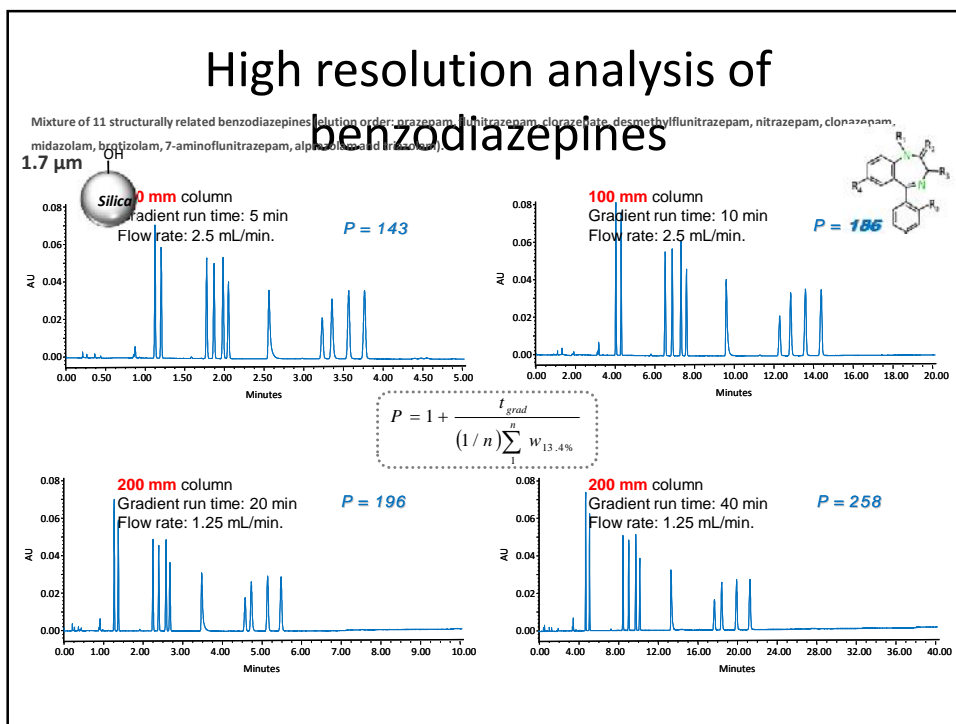
- W** kolonna áramlási ellenállása
y mozgófázis viszkozitása
L kolonna hossza
d_p töltet átlagos szemcseátmérője

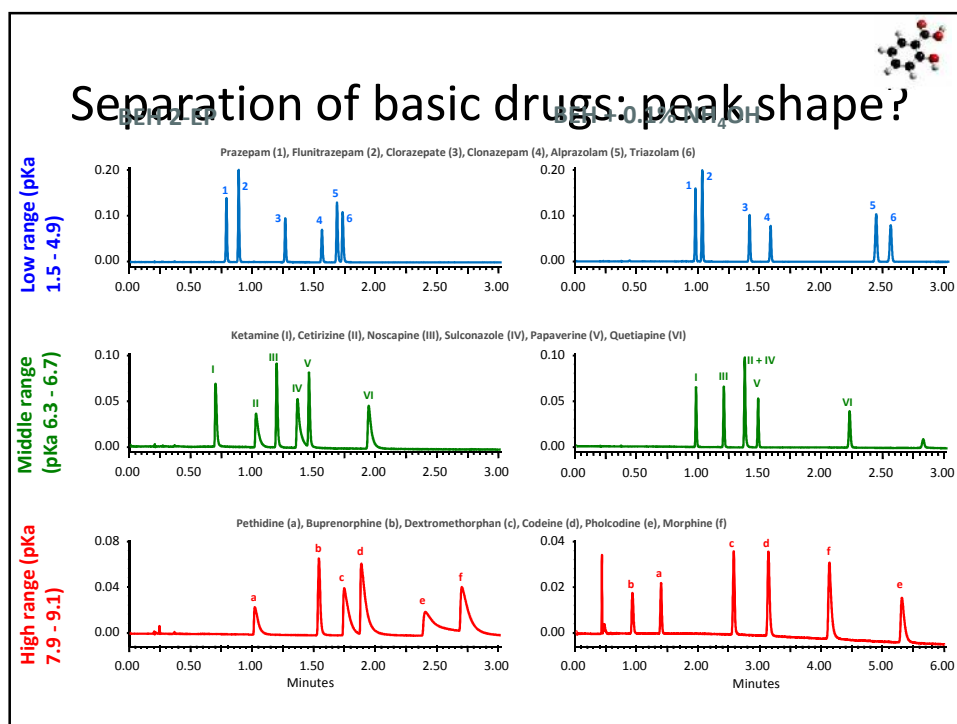
Összevetés:

		viszkozitás:
• SFC	CO ₂	10 ⁻⁴ – 10 ⁻³ cP
• NPLC cP	n-hexán	3,3 x10 ⁻¹ cP

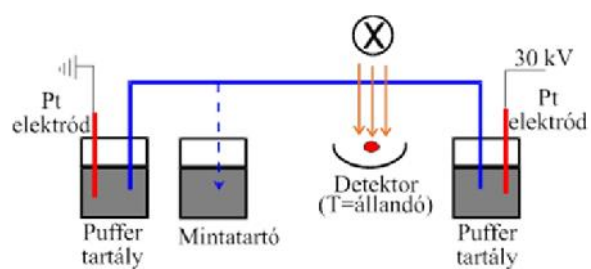
Állófázis felületi fizikai-kémiája szerint:

- szilikagél és egyéb poláris adszorbens
- polárisan módosított szilikagélek, királisak és akirálisak
- hagyományos RP töltetek kis borítottsággal
- emmedd, shield töltetek
- "AQ" töltetek





Kapilláris elektroforézises rendszer felépítés(CE,CZE)

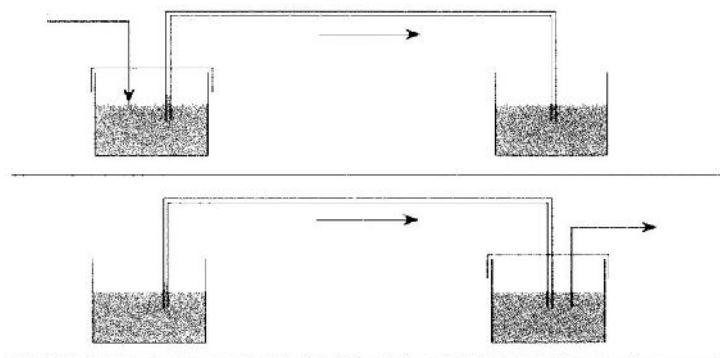


Hidrodinamikus adagolás:

a.nyomás adása a mintára

b.vákuum alkalmazása a detektor oldalon

Az injektált minta térfogata a Hagen-Poiseuille egyenlet alapján számítható:



$$Q = (\mu_e + \mu_o) V^2 r C t / L$$

μ_e = a részecske elektroforetikus mozgékonyága

μ_{EOF} = az EOF mozgékonyága

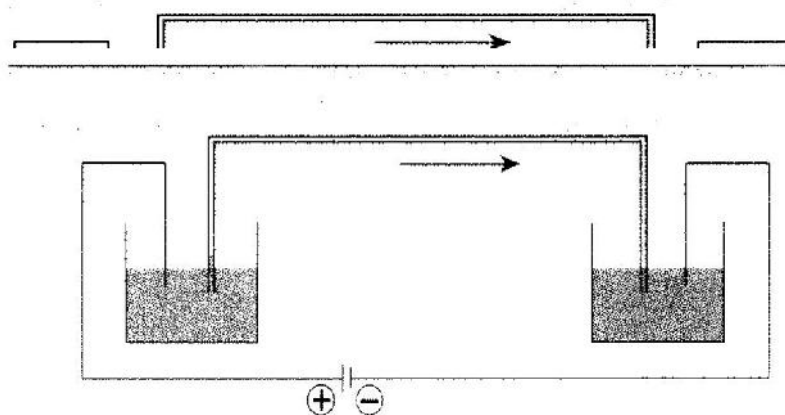
V = feszültség

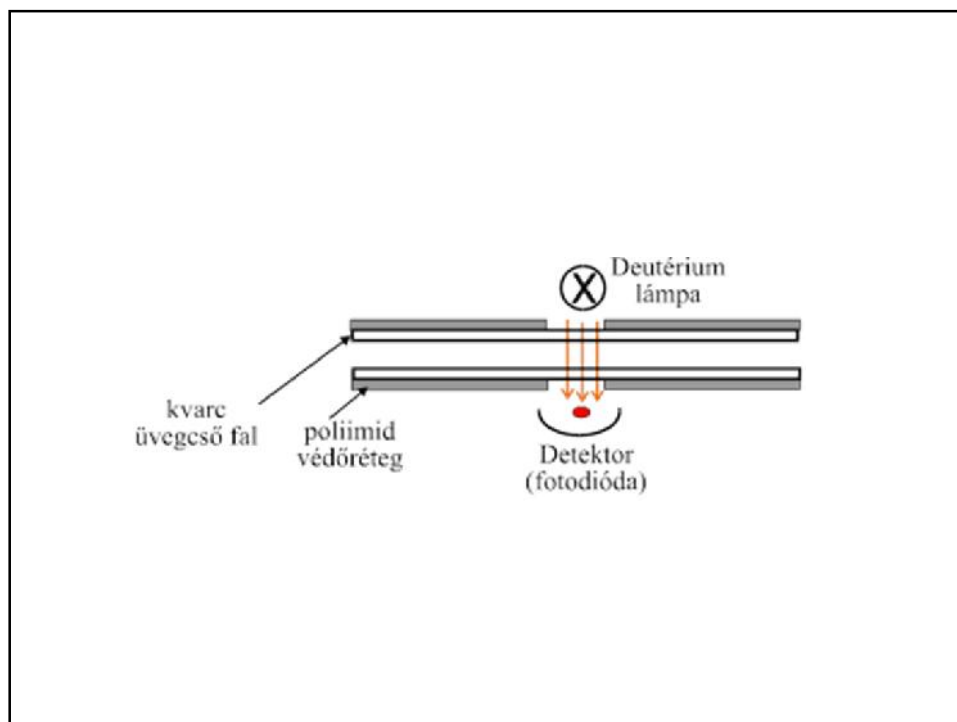
r = kapilláris sugara

C = a részecske koncentrációja

t = idő

L = a kapilláris teljes hossza





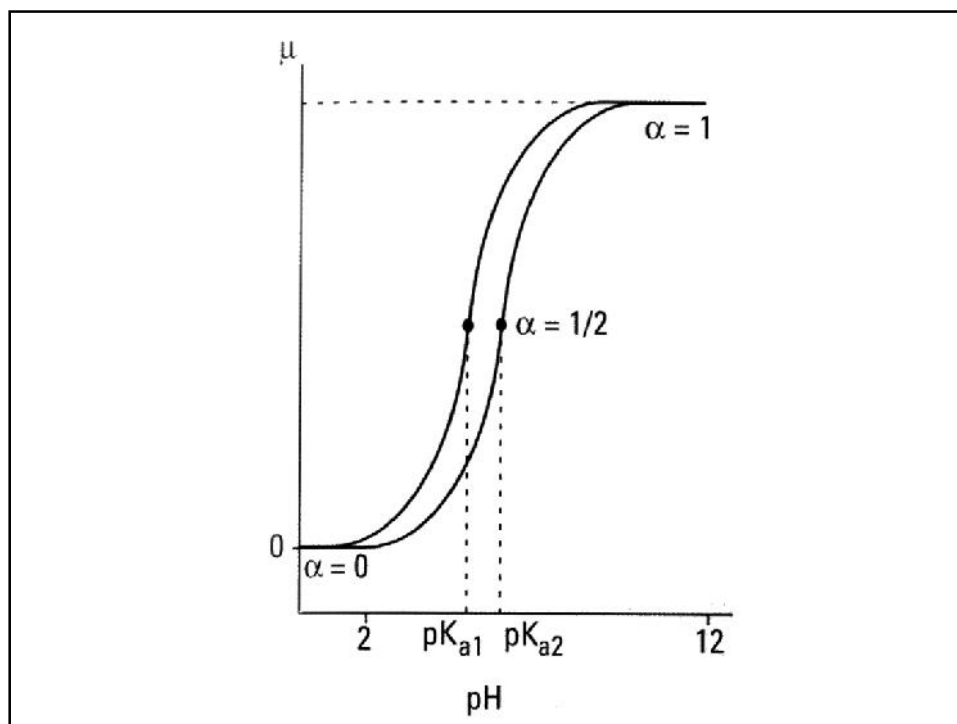
UV-látható fényelnyelés
• a diódasor spektrális
információkat nyújt

- MS illesztése még további, finomított megoldást igényel

Elektroforetikus mozgékonyág

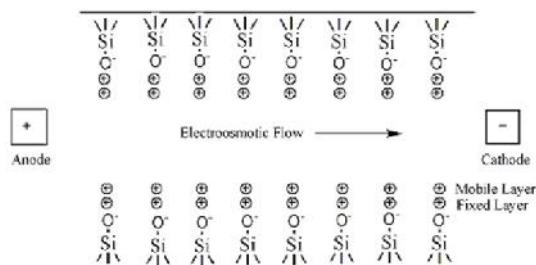
- pH
- Ionerősség
- hőmérséklet
- mozgékonyág = sebesség/egységnyi térerősség

$$\mu_{ep,A} = \frac{Q_{eff,A}}{6\pi\eta R_A}$$



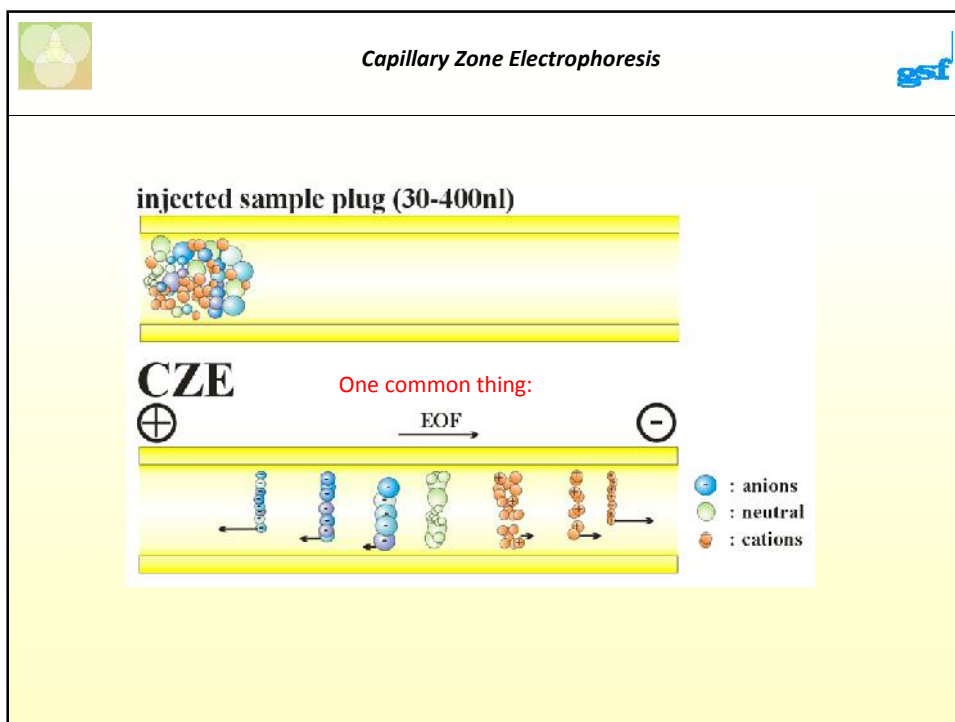
- $\text{pH} < 3$, csak elektroforetikus vándorlás
- Vizsgálandó vegyületek: csak töltéssel rendelkezők
- -kvaterner ammónium sók
- -szerves szulfonsavak
- -aminok, melyek $\text{pK}_a < 5$
- -szervetlen kationok

Elektroozmózis eredete



pH>3, elektroosmotikus áramlás

- Mozog a csőben, mind a pozitív, mind a
- negatív töltésű szerves és szervetlen vegyület,
- a semlegesek is, csak egyforma sebességgel!
- Ahhoz, hogy a töltéssel nem rendelkező vegyületek mozogjanak: a pufferbe, oldott formában a semleges anyaggal kölcsönható anyagot kell tenni.



Capillary Zone Electrophoresis

⊕ EOF ⊖

● : anions
● : neutral
● : cations

Flexibility ...

injected sample plug (30-400nl)

CZE

CD-CZE

MEKC

CD-MEKC

Bioaffinity-CE

NOM-ACE

Módszer Az elválasztás alapja

Kapilláris zónaelektroforézis Szabad részecskék mozgékonyága (CE, vagy CZE)

Elektrokinetikus kromatográfia (EKC)**Micelláris elektrokinetikus kromatográfia**

Hidrofób/ionos kölcsönhatások micellákkal(MEKC)

Kapilláris gélelektroforézis Méret és töltés**Kapilláris izoelektromos fókuszálás**

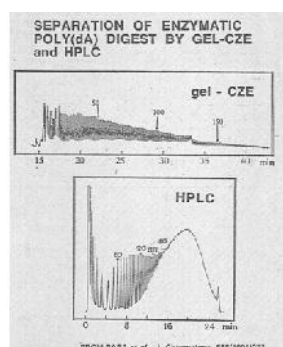
Izoelektromos pont(CITH)

Kapilláris izotachoforézis Határfelületek

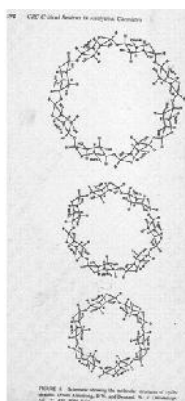
Mozgása

Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)

Miben tud többet?



Miben tud többet?



Miben tud többet?

