

Folyadékkromatográfia

Analitikai Kémia II. és Gyógyszeranalitika
2021.

Tóth Blanka

toth.blanka@vbk.bme.hu

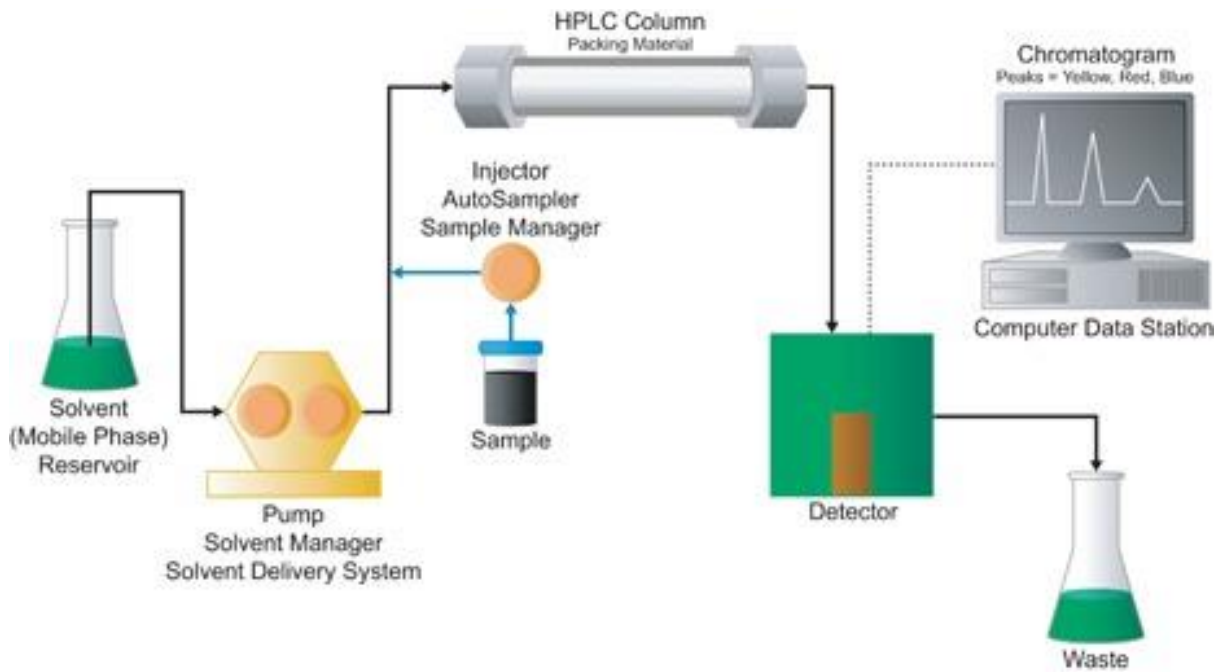
A folyadékkromatográfia (HPLC) szerepe a gyógyszeriparban

- Gyógyszerhatóanyagok és -készítmények hatóanyagtartamának meghatározása
- Gyógyszerhatóanyagok és -készítmények tisztaságának ellenőrzése
- Gyógyszerhatóanyagok oldhatóságának és gyógyszerkészítmények kioldódás vizsgálatának analitikai támogatása
- Gyártó berendezések tisztaságának ellenőrzése.
- Teljes szintézisút követés
- Környezetvédelmi és munkabiztonsági mérések

A folyadékkromatográfia (HPLC) szerepe a gyógyszerfejlesztésben és egyéb területeken

- Farmakokinetikai vizsgálatok (biológiai mátrix: vér, vizelet, agyhomogenátum...)
- CYP450 vizsgálatok, metabolitkutató (sejtszuszpenzió, máj mikroszóma)
- Élelmiszeranalitika (pl.: növényvédőszer-maradványok, zsírsavprofil)
- Környezetvédelmi analitika (vízminták, talajminták)
- ...

HPLC készülék

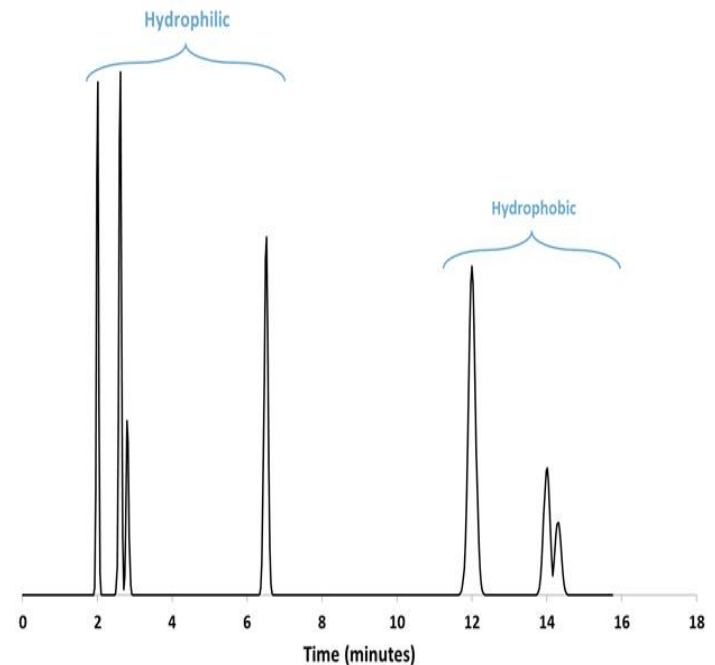


HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis	Apoláris C18, C8, C4, ciano, amino	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben oldhatatlan vegyületek	Normál fázis	Poláris Szilikagél Alumínium oxid	Apoláris Szerves oldószerek/poláris módosítók
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár	C18, C8	Víz/szerves oldószerek- ionpárképzők
Ionos vegyületek, szervetlen ionok	Ioncsere	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes/puffer ellenion
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol szilika	Gél szűrés - vizes Gél permeációs – szerves
Királis vegyületek	Királis	Királis szelektorral	Vizes vagy szerves (lehet NP vagy RP is)

Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)

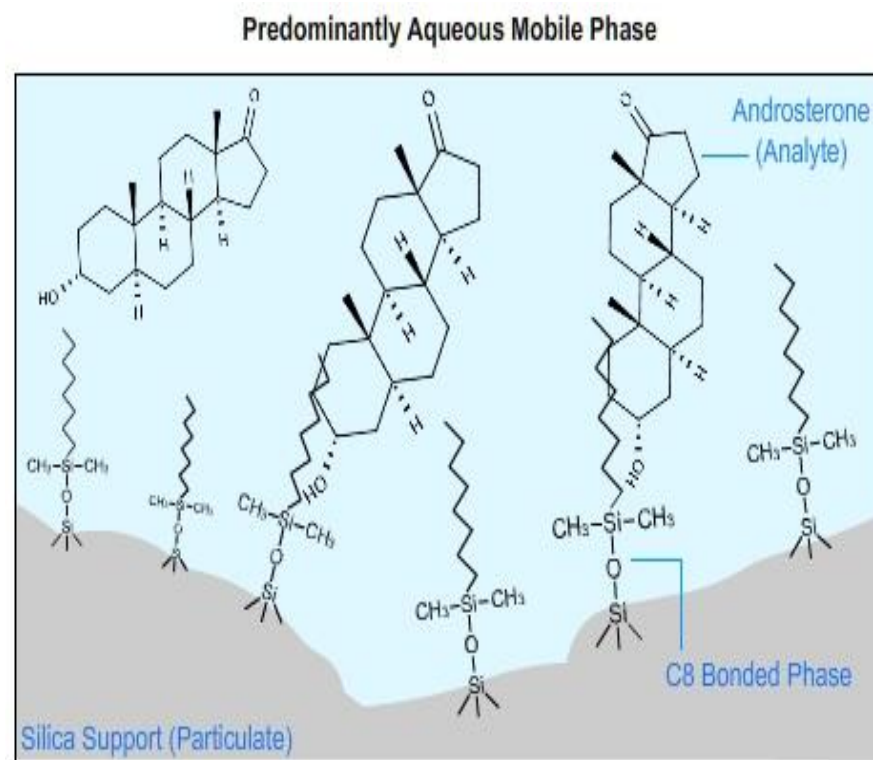
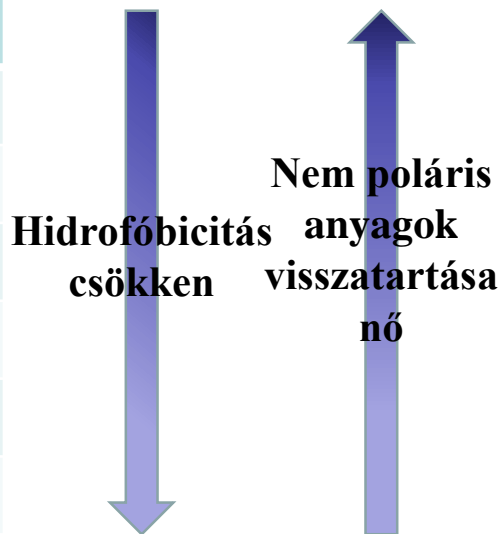
- Fordított: a korábban kidogozott „normál”-hoz képest
- A mozgó fázis *polárisabb*, mint az állófázis
- A leggyakrabban használt módszer



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 töltetknél 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.

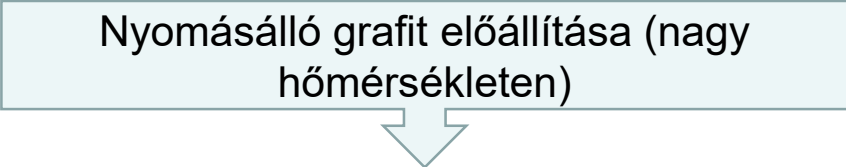
- **Szerves polimer alapú töltetek**
 - Sztírol – divinil-benzol kopolimerek (létezik C18-as módosított változata is)
 - pH-nak nincs szerepe (pH=9 felett is használhatók)
 - Nyomásnak kevésbé állnak ellen
 - Előállítás során mikropórusok is keletkeznek -> zónaszélesedés
 - 20-100% szerves oldószer kell 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
- Adszorpciós 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

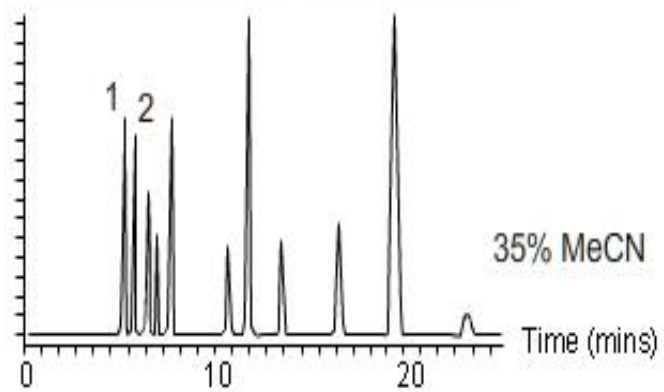
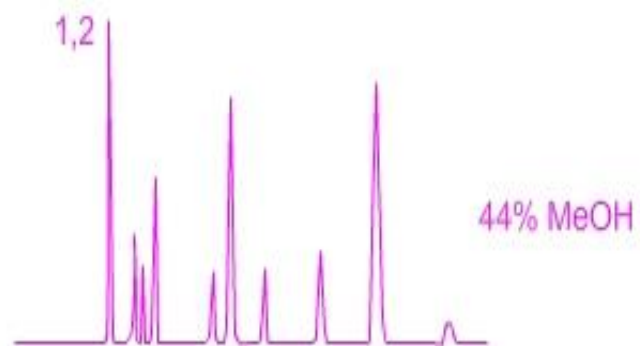
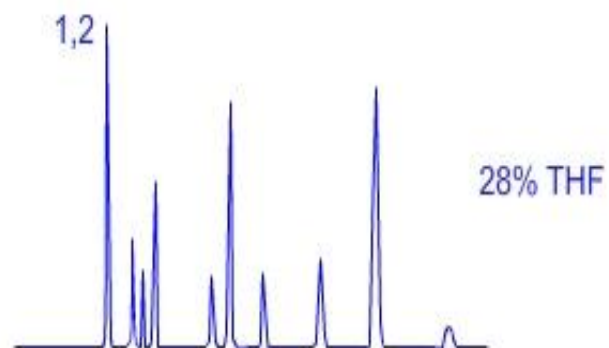
Eluenserősség

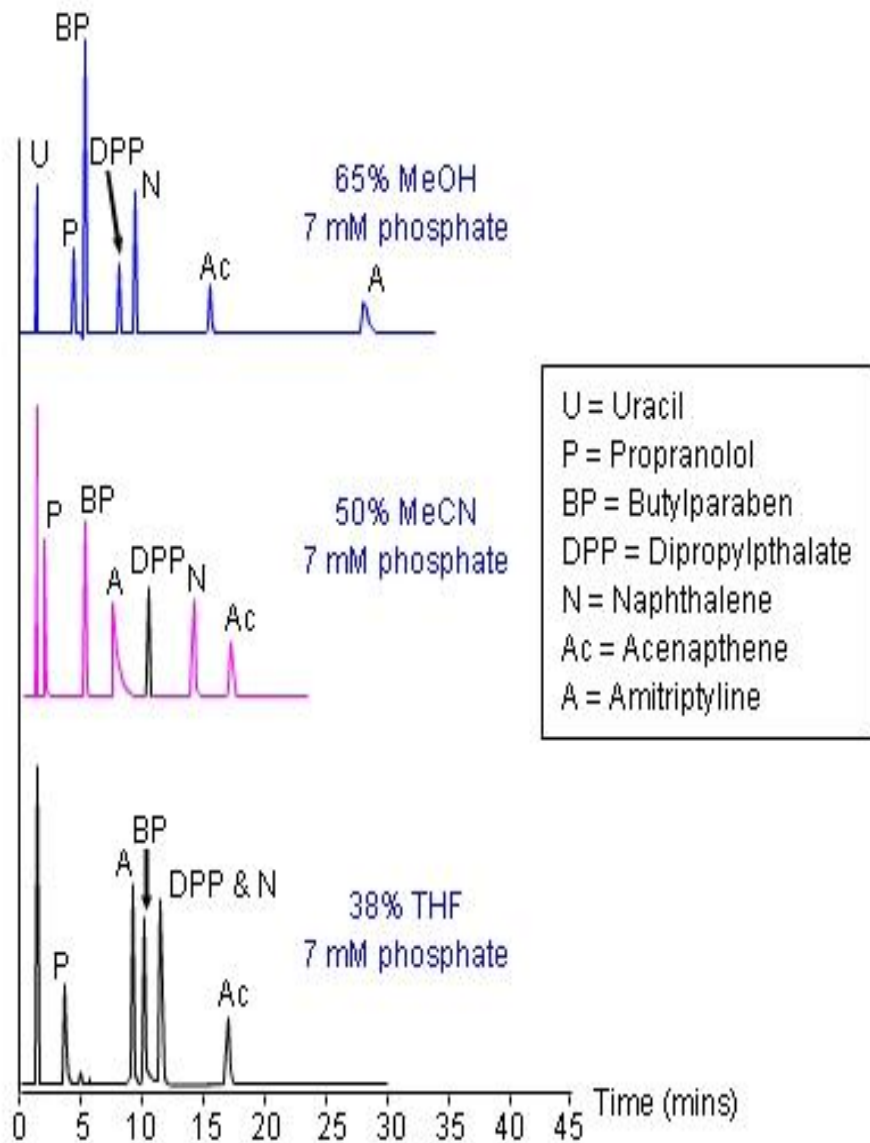
- Tekintsünk egy tökéletes borított felületű, nagy sűrűségű állófázist! Ilyen körülmények között csak diszperziós kölcsönhatás léphet fel az állófázis és a vizsgált molekula között. Ilyen körülmények között az alábbi eluotróp sor írható fel:



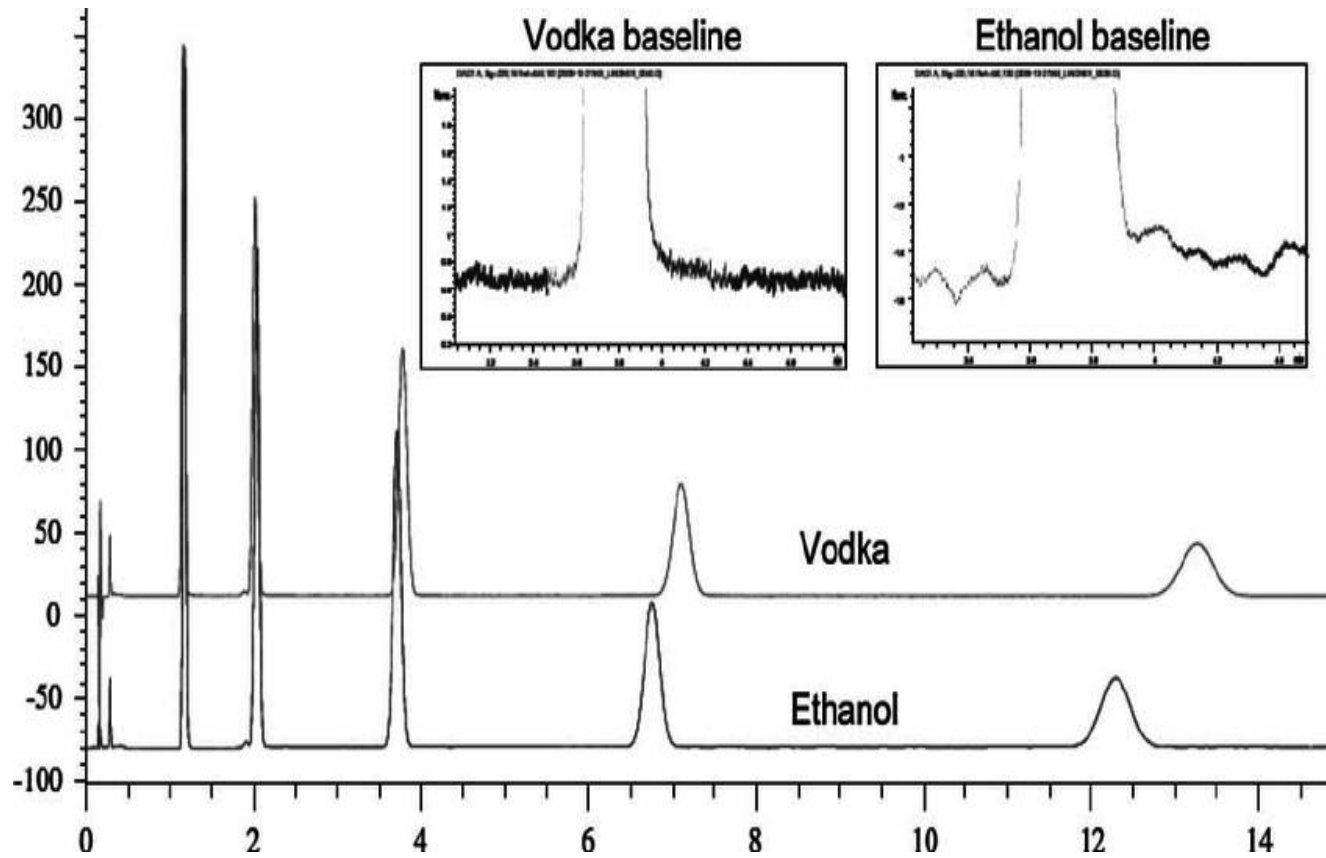
- **víz < metanol < acetonitril < etanol < 2-propanol < tetrahydrofuran**







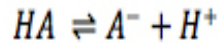
Oldószer tisztaság



Pufferek használata

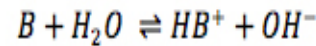
- Ionos és könnyen ionizálható anyagok vizsgálata esetén elengedhetetlen a pH kontroll
- A pufferekkel szemben támasztott általános követelmények:
 - Alacsony hullámhosszú UV cut-off
 - Adott mérési körülmények között nagy pufferkapacitás
 - Szilárdanyag mentesség (szűrés)
 - Tisztaság
 - Kompatibilitás: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

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 kiemelve a több gyűrűsek)
 - Policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok)
 - Halogénezett aromás és alifás szénhidrogének

1. b. csoport

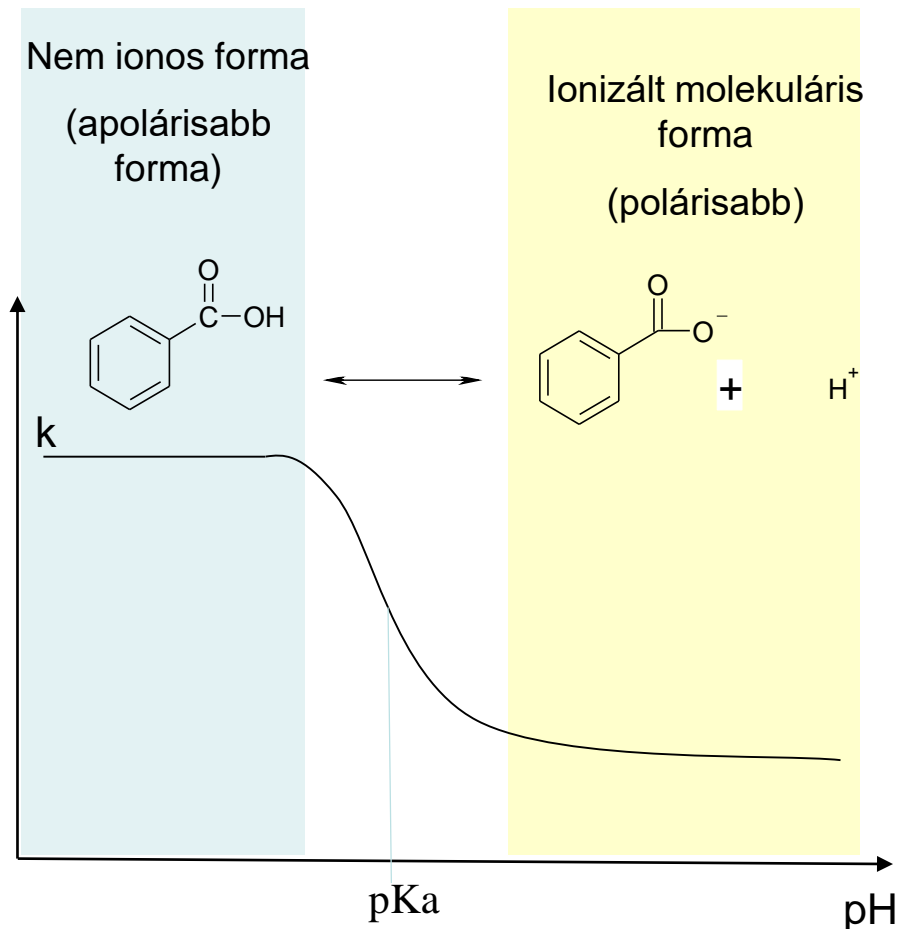
- Minden esetben tartalmaznak poláris csoportot vagy csoportokat. Ezek a csoportok vagy H-hidas kötést alakítanak ki az állófázis szilanol csoportjaival, vagy dipól-dipól kölcsönhatásba lépnek azokkal. Ezeket a kölcsönhatásokat együttesen polárisként adjuk meg a folyadékkromatográfiás gyakorlatban. Ezek 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.
 - Alkohokok
 - Éterek
 - Aldehidek
 - Ketonok
 - Nitrilek
 - Nitro-vegyületek
 - Azo vegyületek

Azonos váz esetén a visszatartást a csoportok H-hidas kölcsönhatásra való hajlama szabja meg. Az alkohokok 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

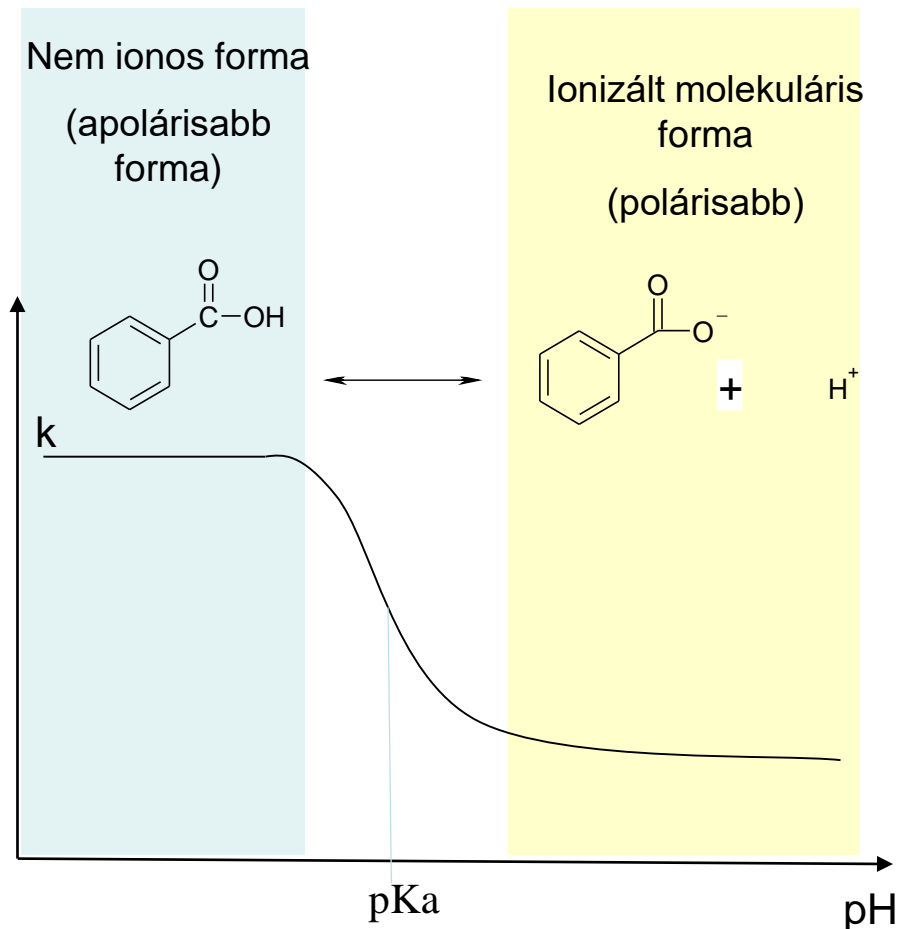
- pH-tól függően két molekuláris állapotban lehetnek jelen, s ezeknek a mozgófázisban való oldhatósága eltérő. Ebből következik, hogy ha pH kontroll nélkül próbálnánk mérni, és a körülmények valami miatt megváltoznak, akkor a molekuláris formák aránya is változni fog, ami pedig a visszatartási tényező 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

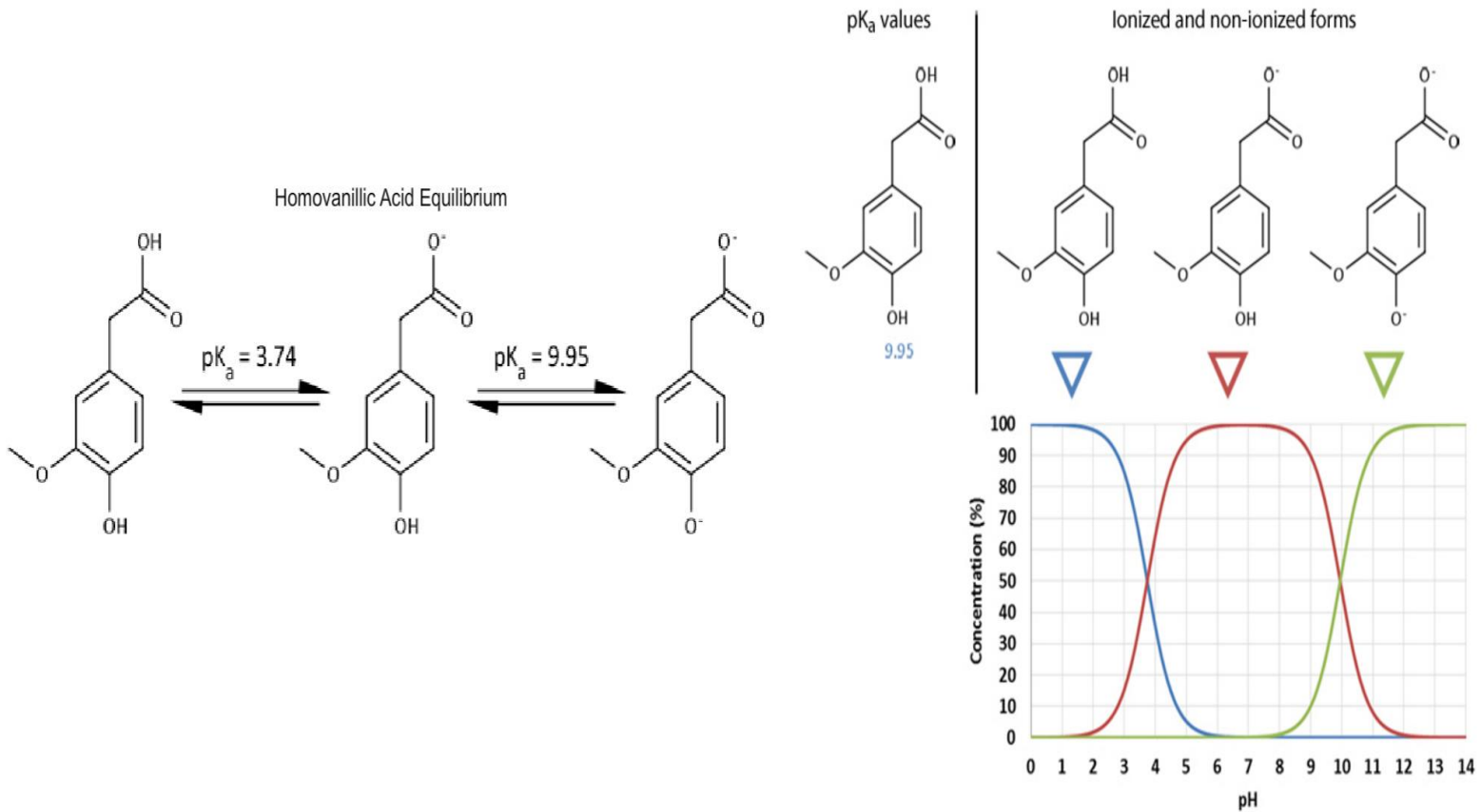
Savas vegyület: retenciós tényező pH függése RP-HPLC-ben



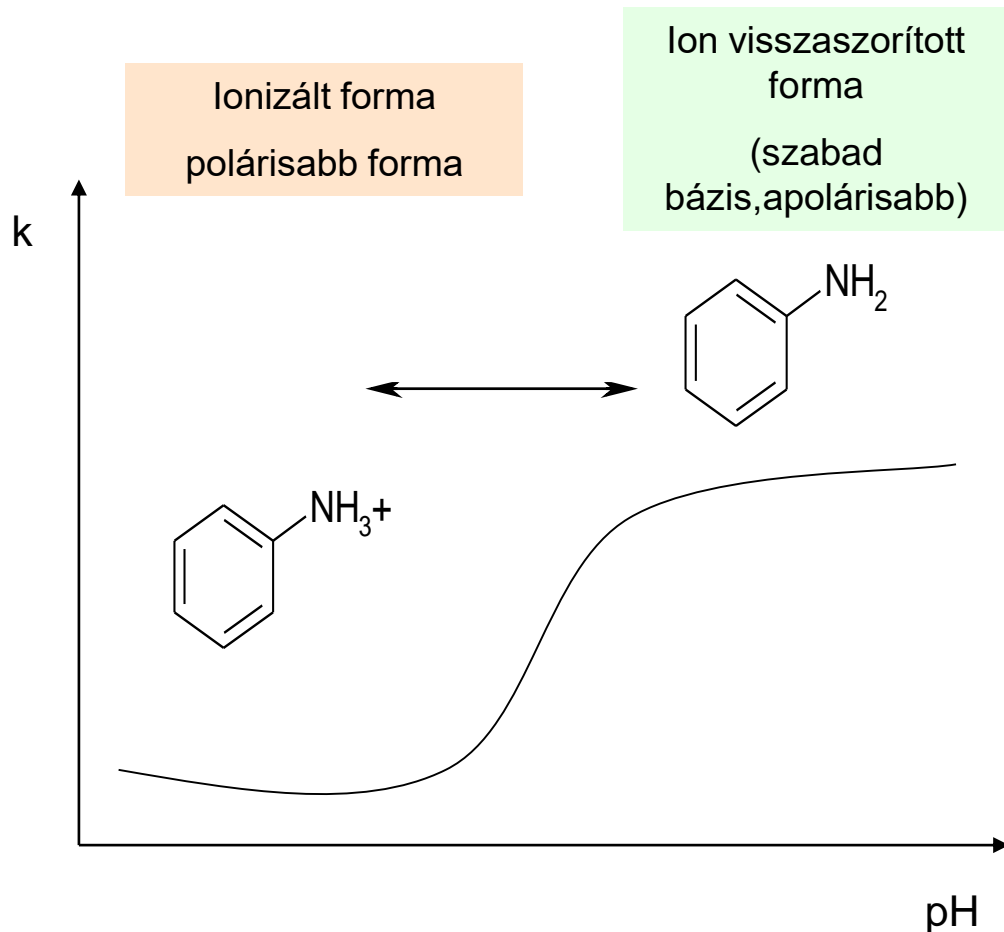
2. A $\text{pH} > \text{pKa} + 2$ értéknél lúgosabb tartományban a molekula ionos formában van, a kölcsönhatási formák száma kicsi, jó a csúcsalak, kicsi a visszatartás, robusztus a módszer. Kérdés, hogy a $k > 1$ kritérium teljesül-e. A szilikagél alapú állófázisoknál a másik korlát a kolonna felső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

3. A $\text{pH} = \text{pKa} \pm 2$ 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

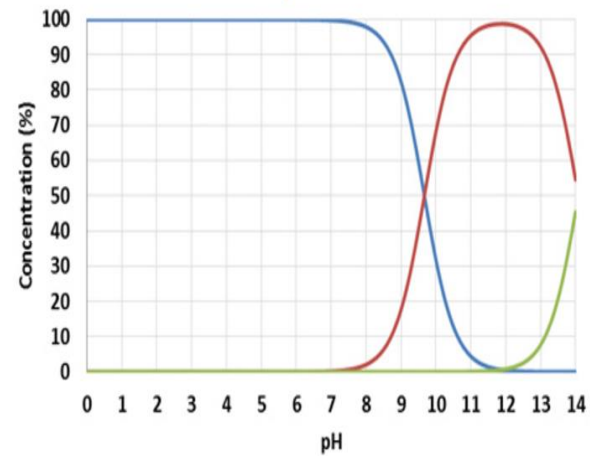
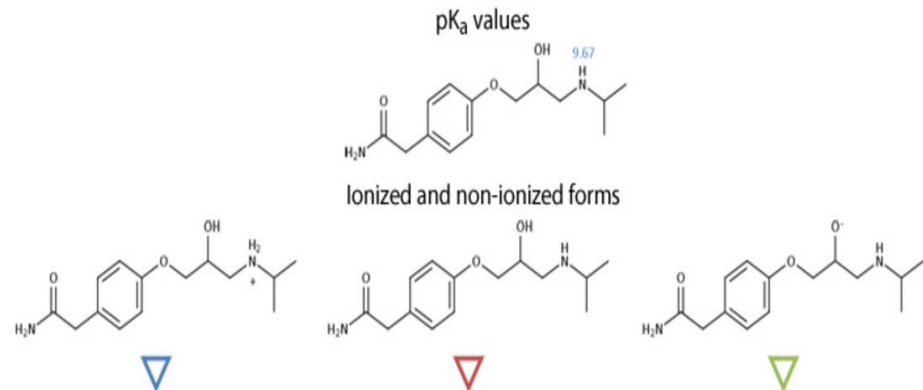
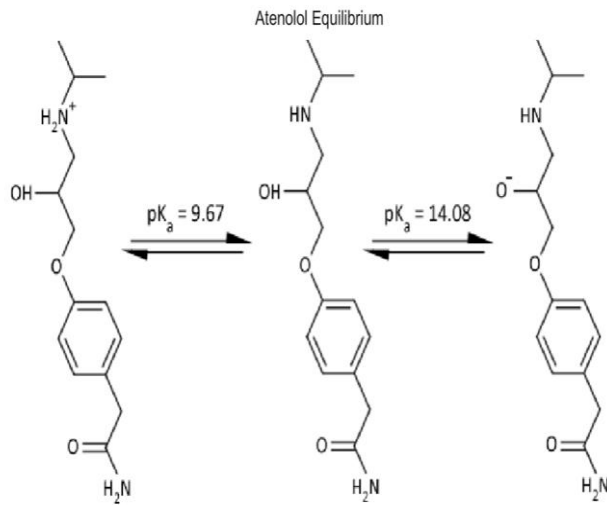


Bázikus vegyület: retenciós tényező pH függése



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



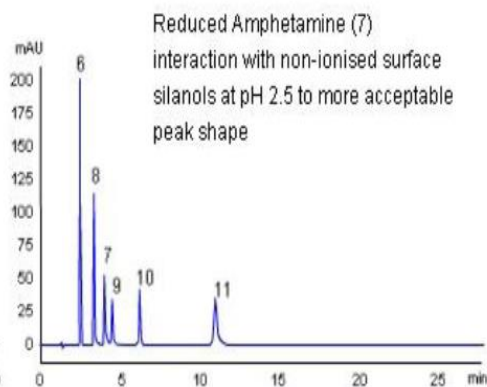
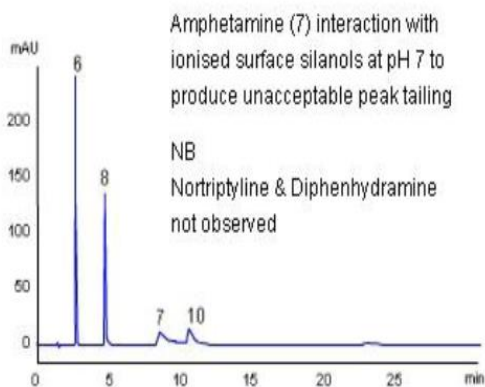
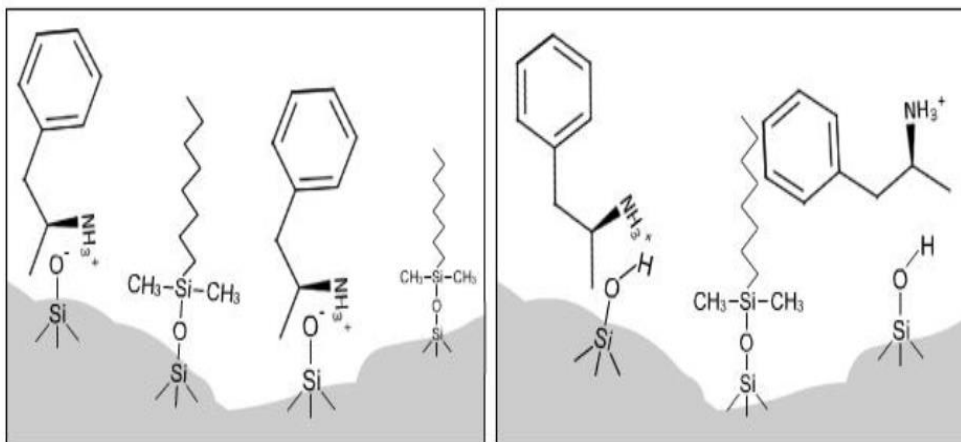
Bázikus anyagok - ionelnyomás

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

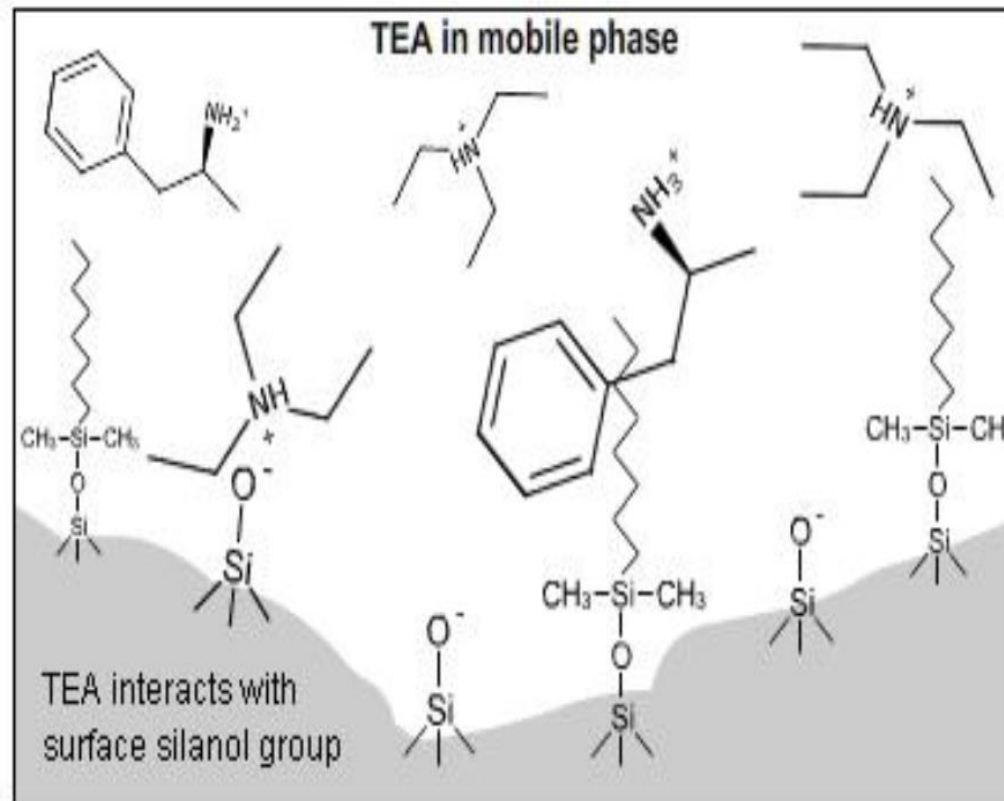
Kiküszöbölése:

- pH csökkentése
- Trietilamin (TEA) adagolása

Bázikus anyagok csúcsalakjának javítása a pH csökkentésével

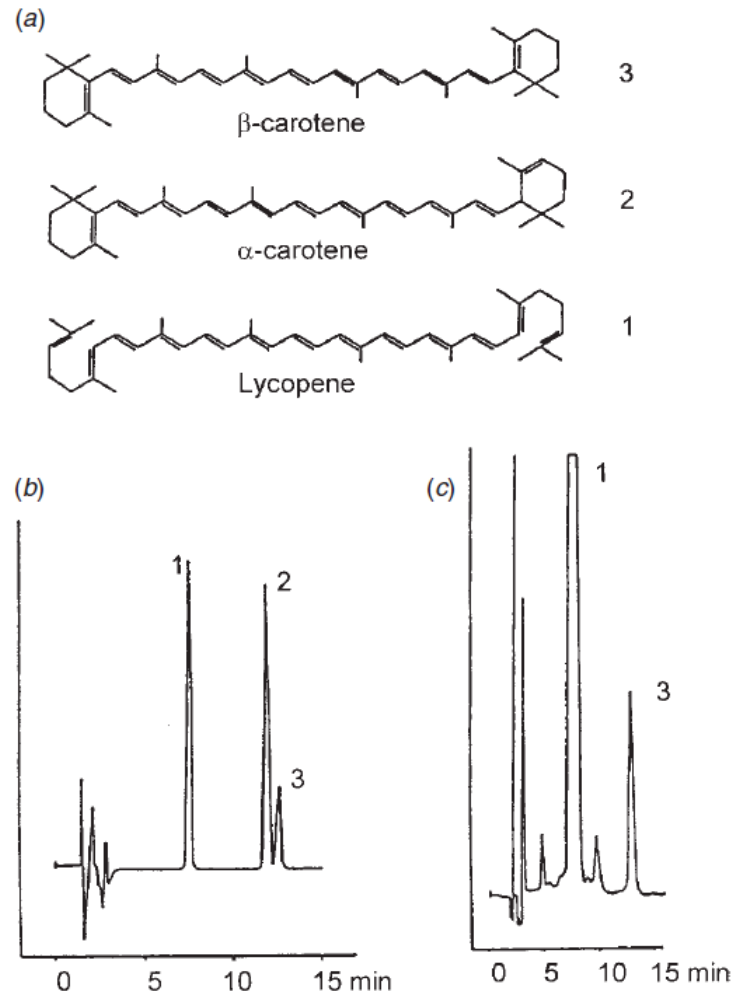


TEA



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

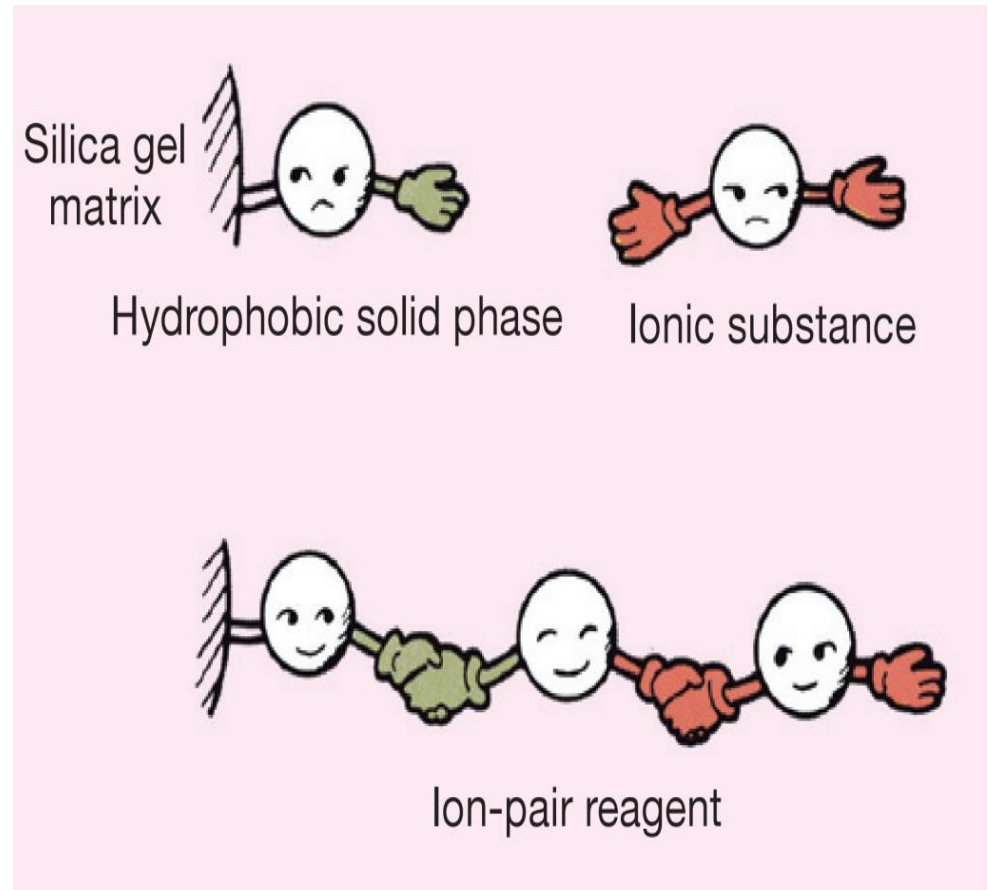
- Nagyon hidrofób komponensek esetén, amik nagy retencióval rendelkeznek, 100% AcN esetén sem eluálódnak (pl.: lipidek, szintetikus polimerek)
- A oldószer: polárisabb (AcN vagy metanol), B oldószer: kevésbé poláris (THF, diklór-metán, kloroform, MTBE)
- pl.: C18 oszlop, AcN-kloroform, b: standard, c: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



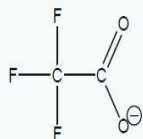
Fordított fázisú ionpár kromatográfia

RP-IP-HPLC

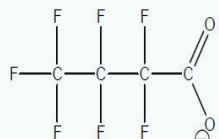
- Ionos vagy könnyen ionizálható vegyületek visszatartása RP-HPLC-ben kicsi.
- Visszatartás növelése: 1-100 mM ionpárképző, hidrofób részt tartalmazó ionos anyag adagolása az eluenshez. Az ionpárképző megváltoztatja az állófázis felületét, valamint ion-asszociátumot képez a mérendő molekulával. Az asszociátum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



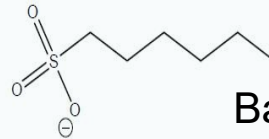
RP-IP-HPLC, ionpárképzők



Trifluoroacetic acid
(TFA)

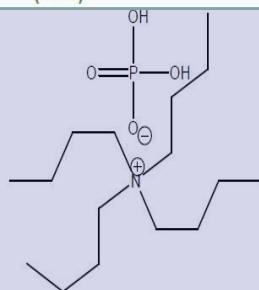


Heptafluorobutyric acid
(HFTBA)

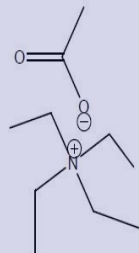


Hexanesulfonic acid

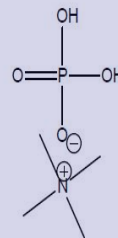
Bázikus anyagokhoz



Tetrabutylammonium
phosphate (TBA)



Triethylammonium
acetate (TEAA)



Tetramethylammonium
phosphate (TMA)

Savas anyagokhoz

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

Kontrollálható paraméterek:

szerves oldószer minősége, mennyisége

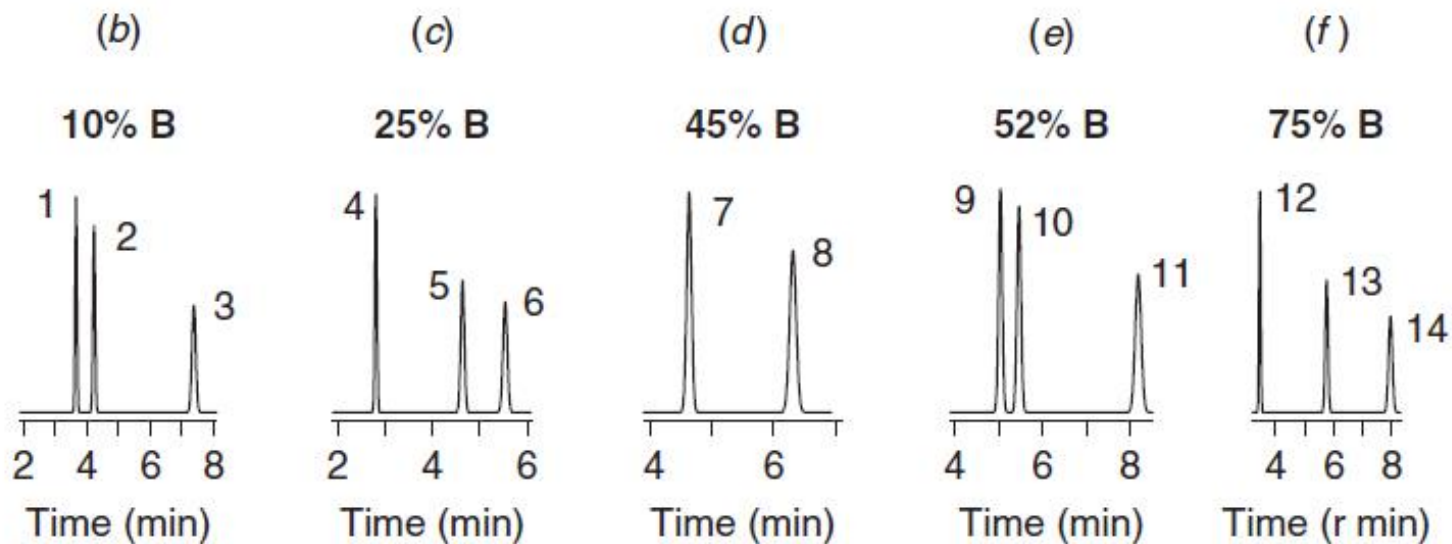
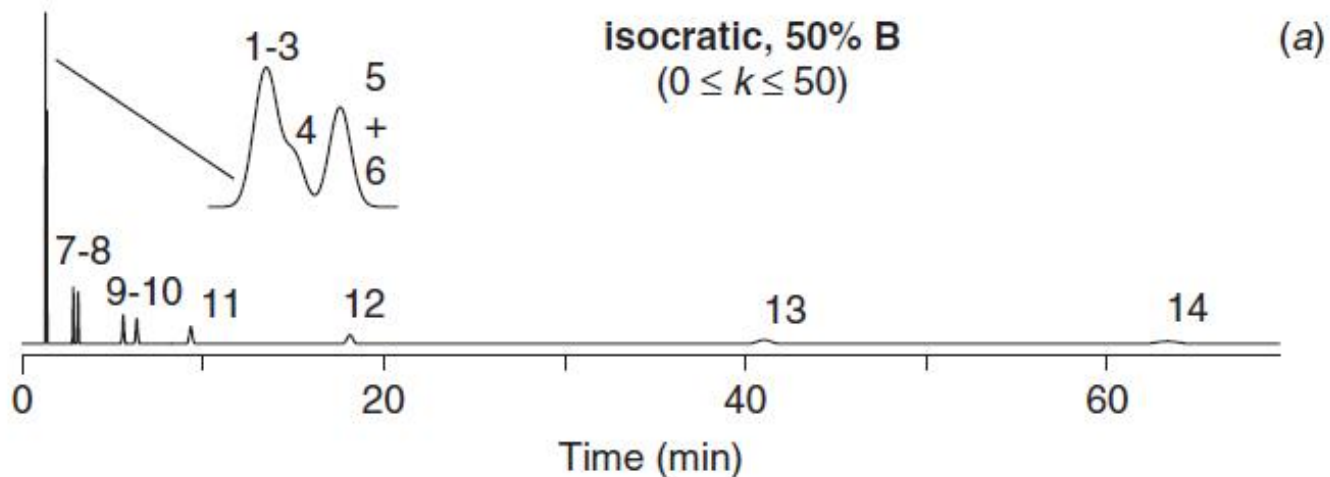
pH (puffer típusa és koncentrációja)

idegen só koncentrációja

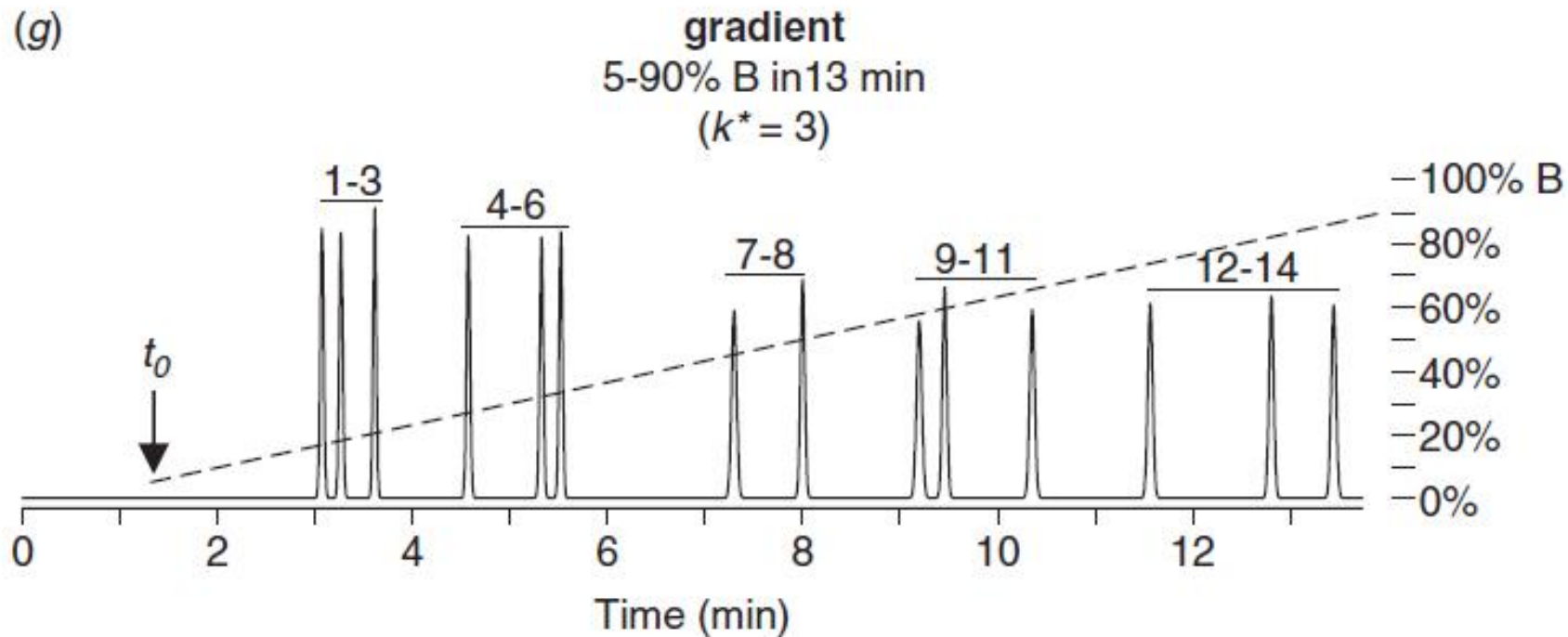
ionpárképző koncentrációja, jellege (láncossz, elágazó/nem elágazó, só vagy ionizálható)

hőmérséklet

Gradiens elúció



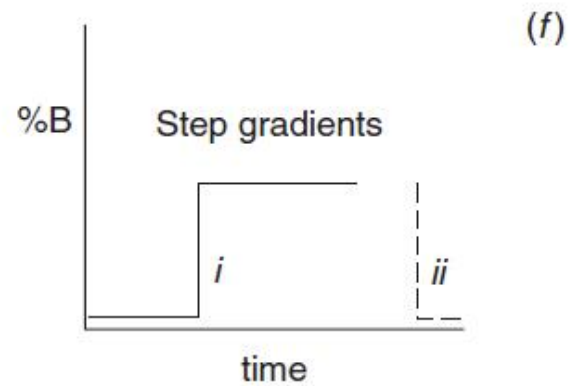
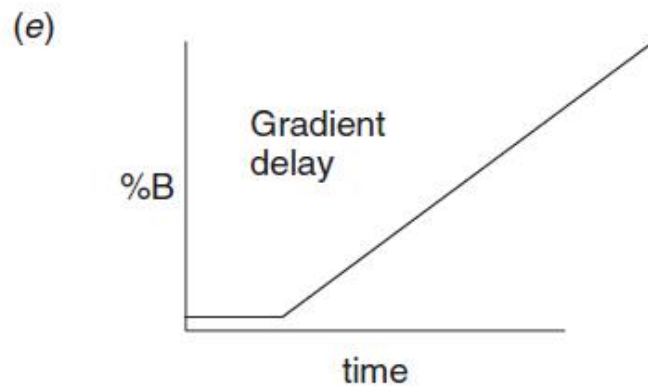
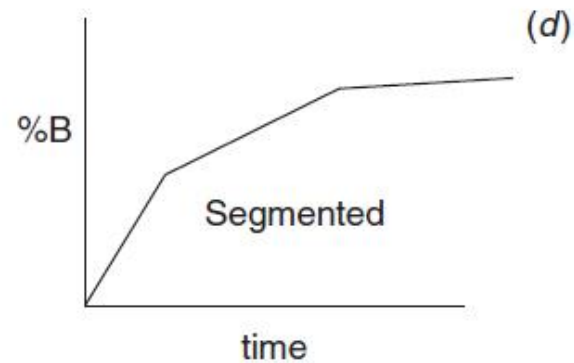
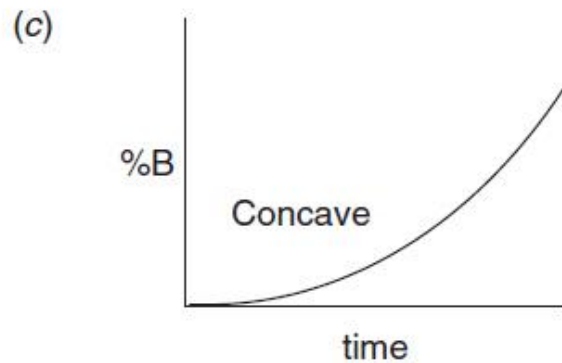
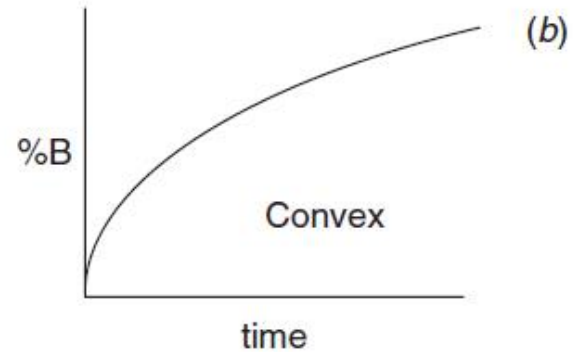
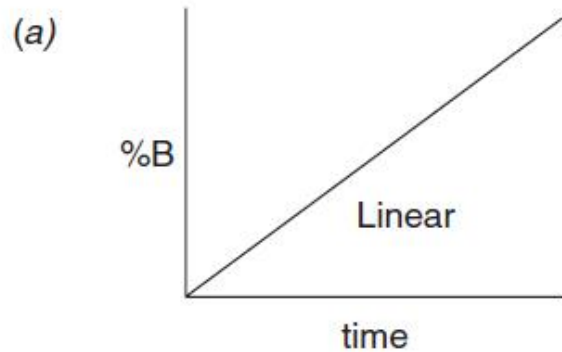
(g)



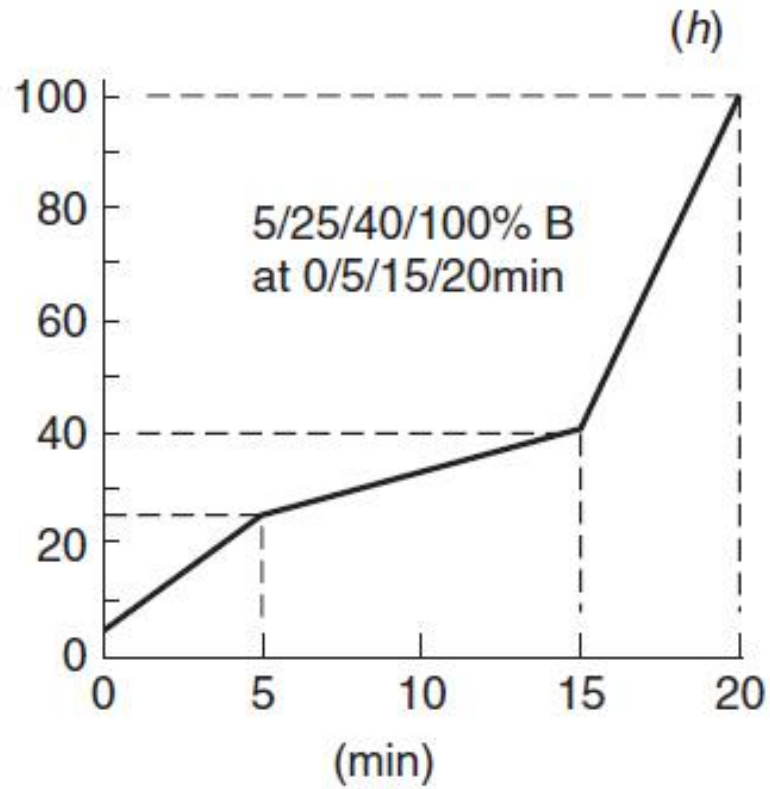
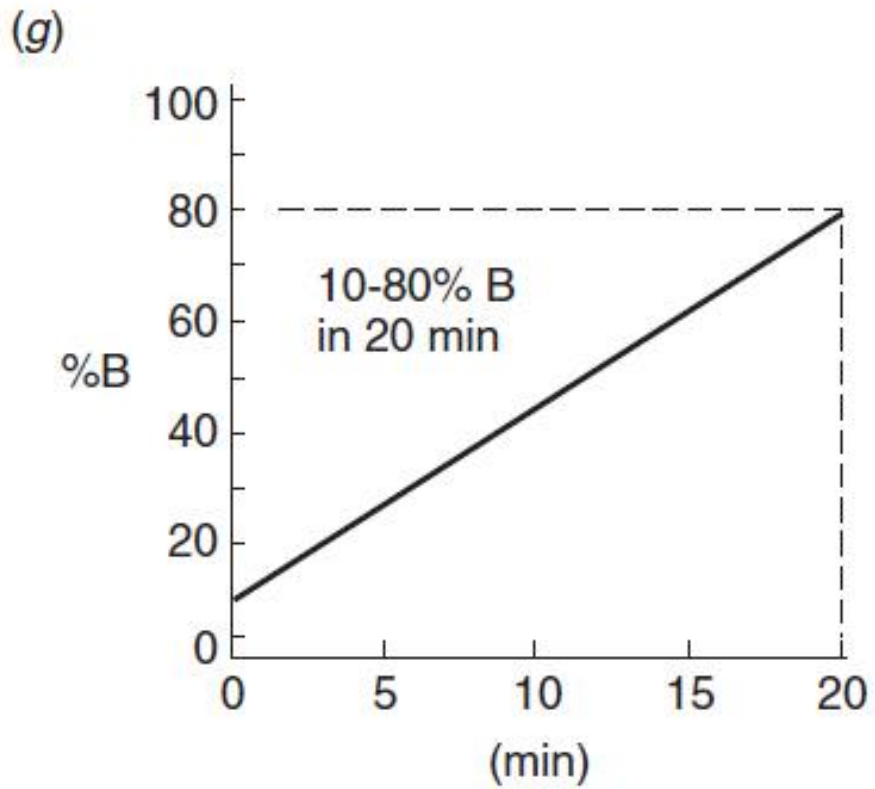
1-3 csúcs keresztülhalad a kolonnán $k \approx 3$ értékkel, amíg a 4-14 anyag a kolonna elején marad

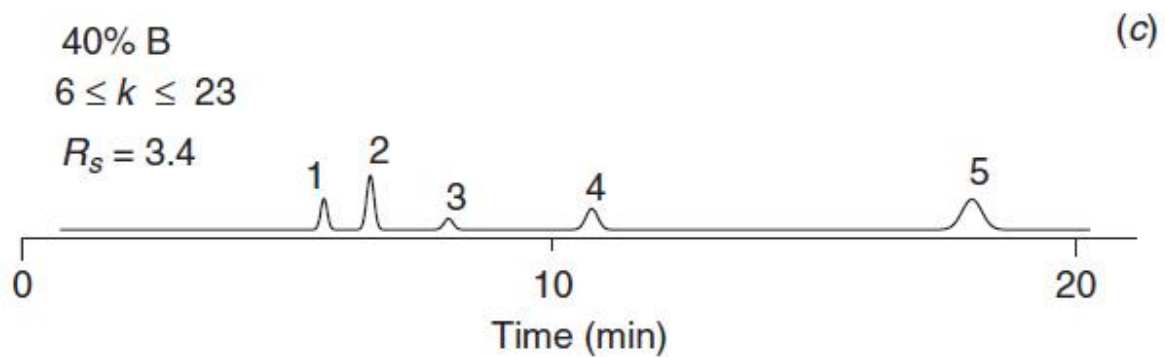
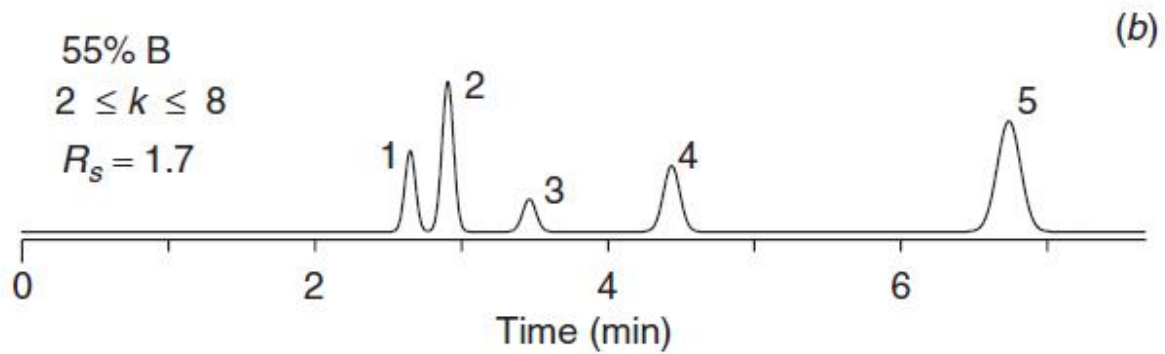
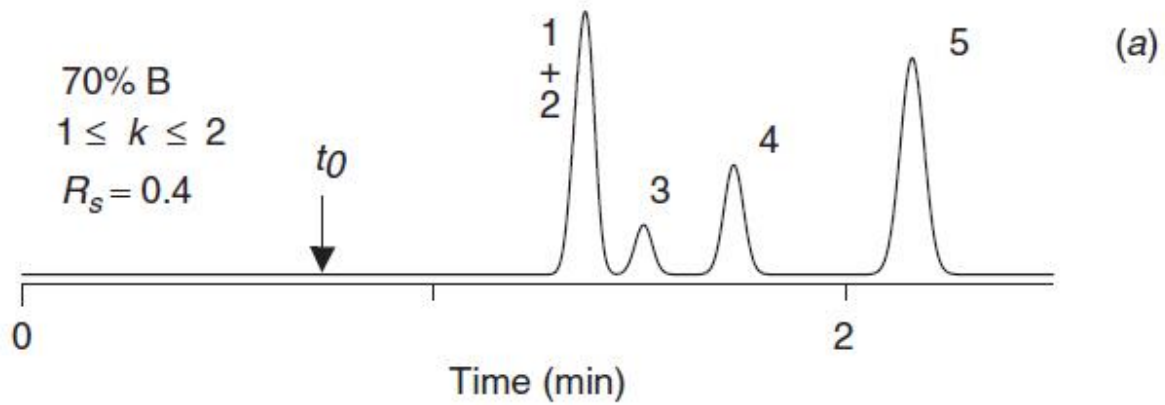
A körülmények megfelelő megválasztásával elérhető, hogy a többi anyag is $k \approx 3$ értékkel eluálódjon -> azonos szélességű csúcsok

Különböző lefutású gradiensek

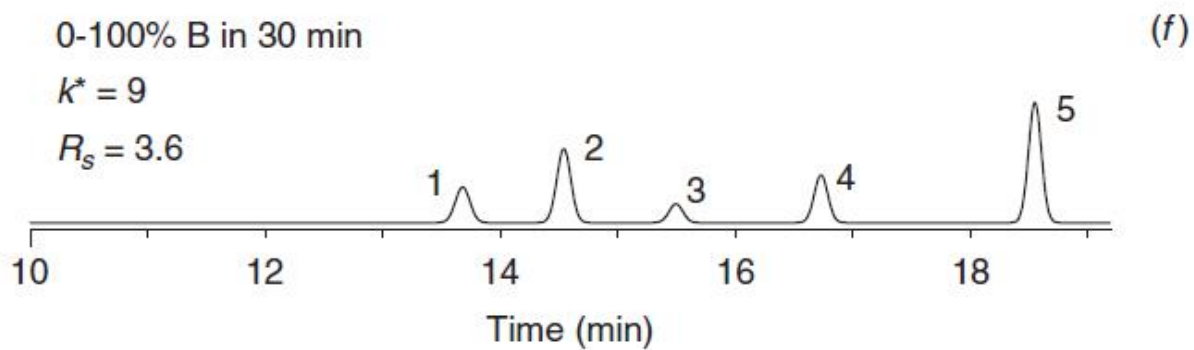
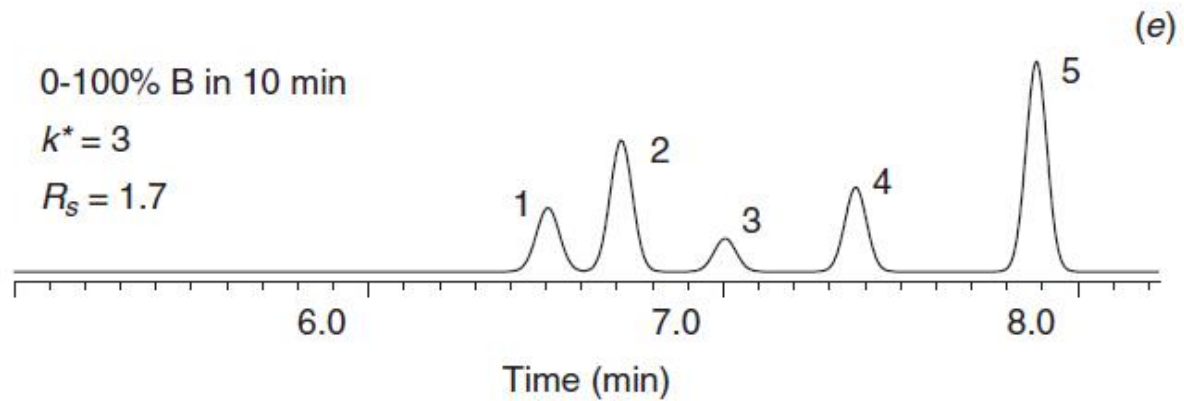
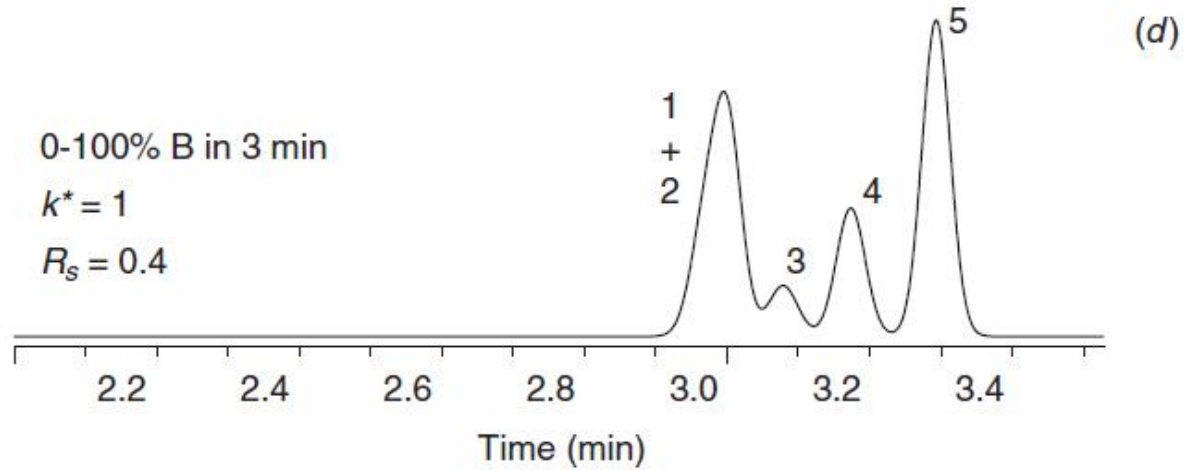


Általánosan használt gradiensprogramok

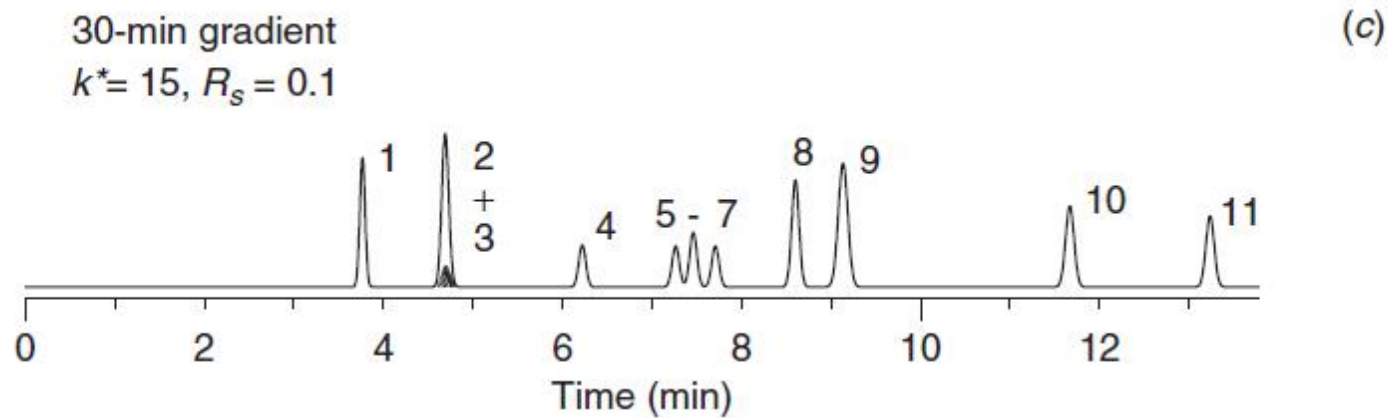
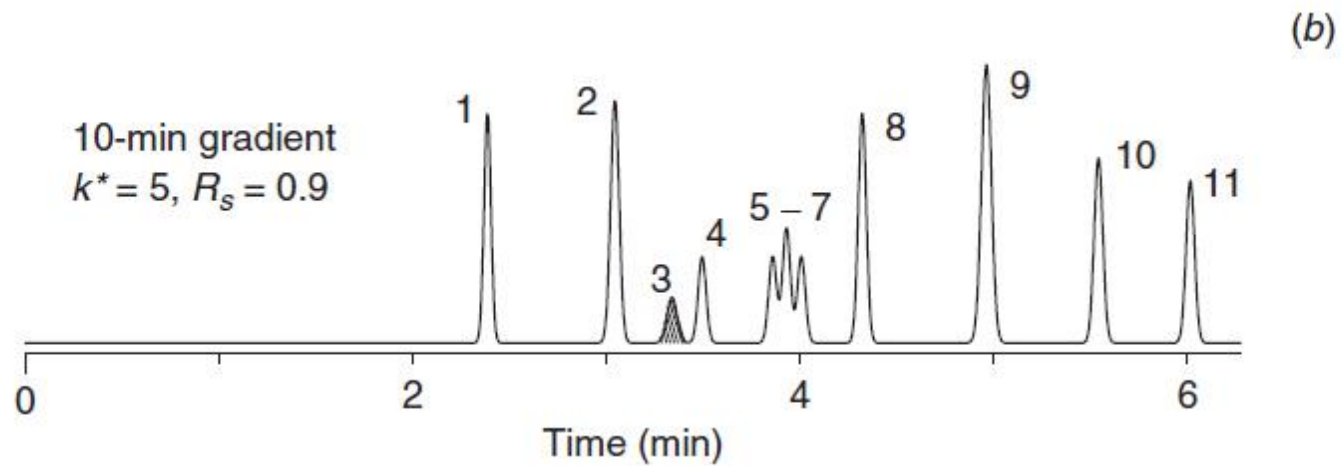
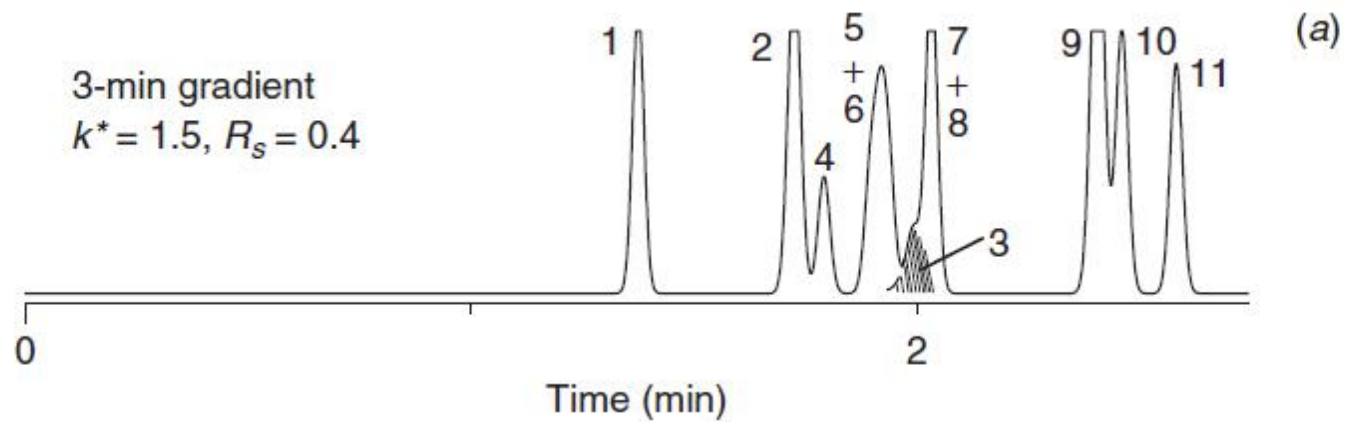




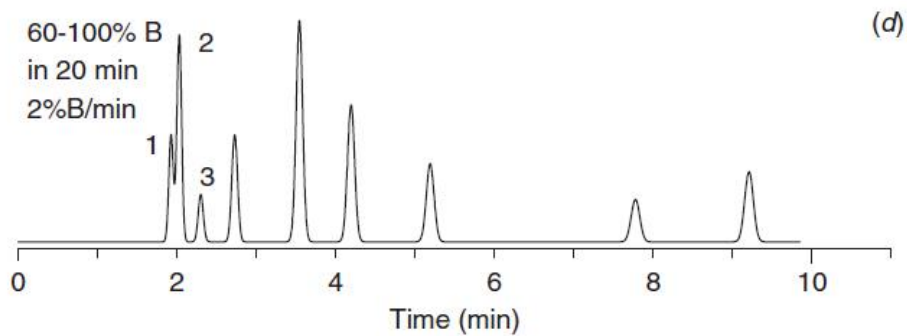
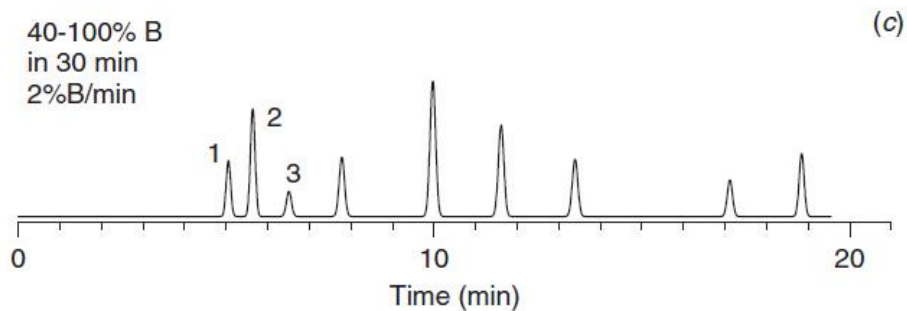
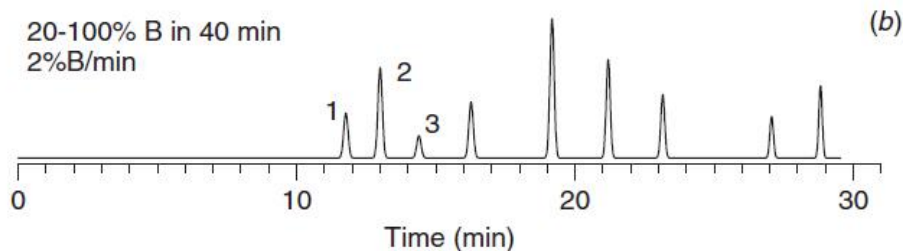
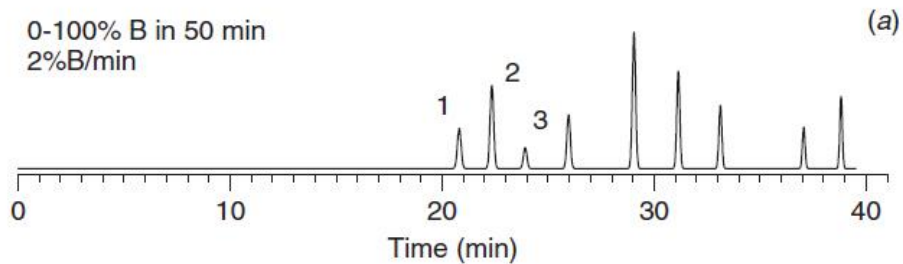
Izokratikus elválasztás különböző erősségű eluensekkel



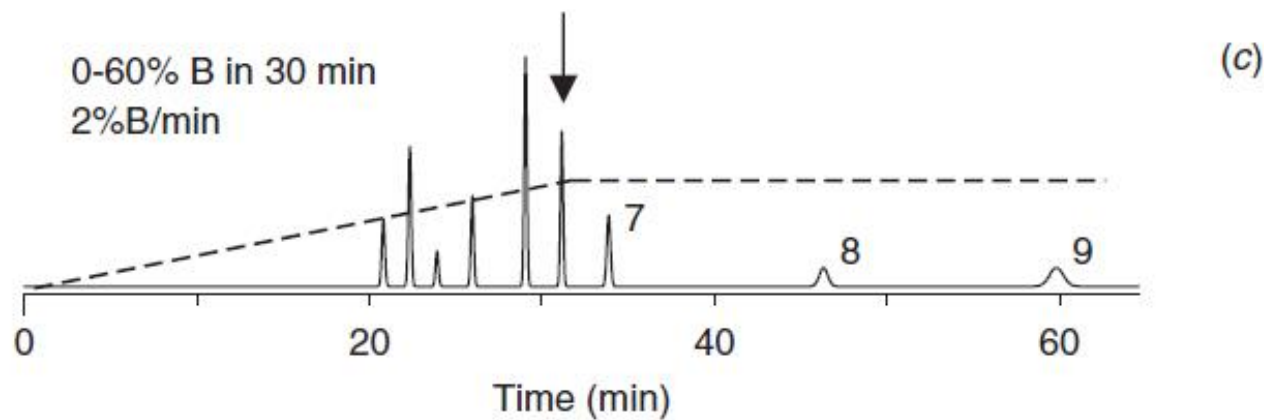
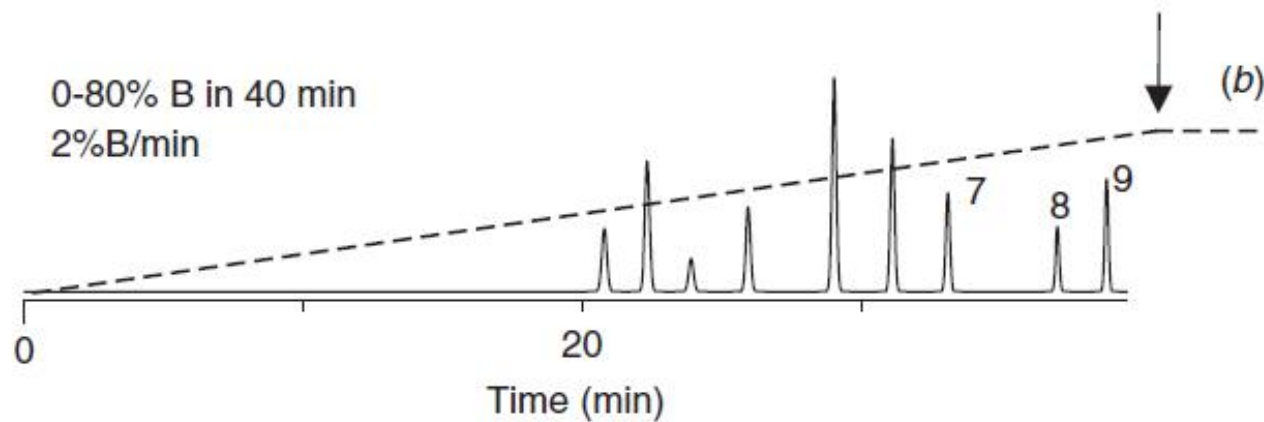
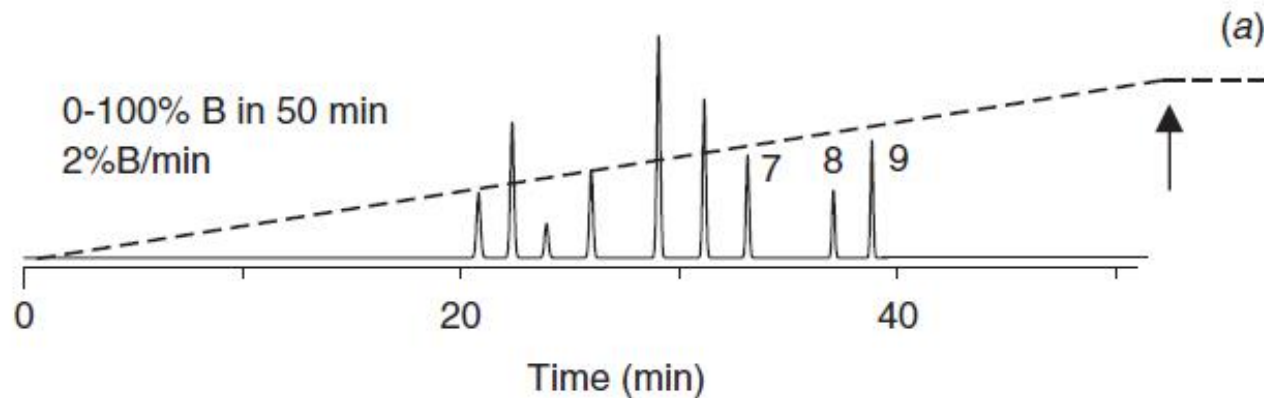
Gradiens elválasztás különböző gradiensidőkkel



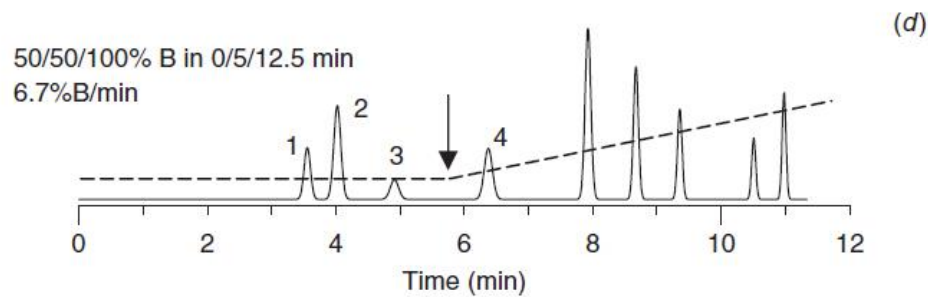
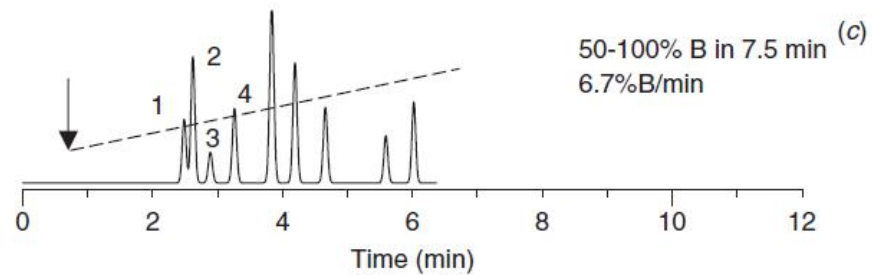
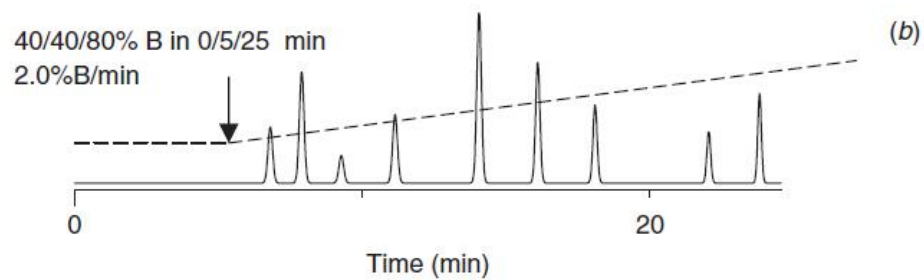
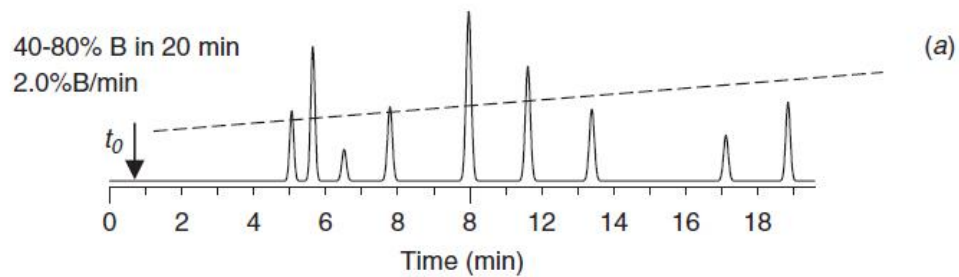
Kiindulási B% változtatása (minta herbicidek)



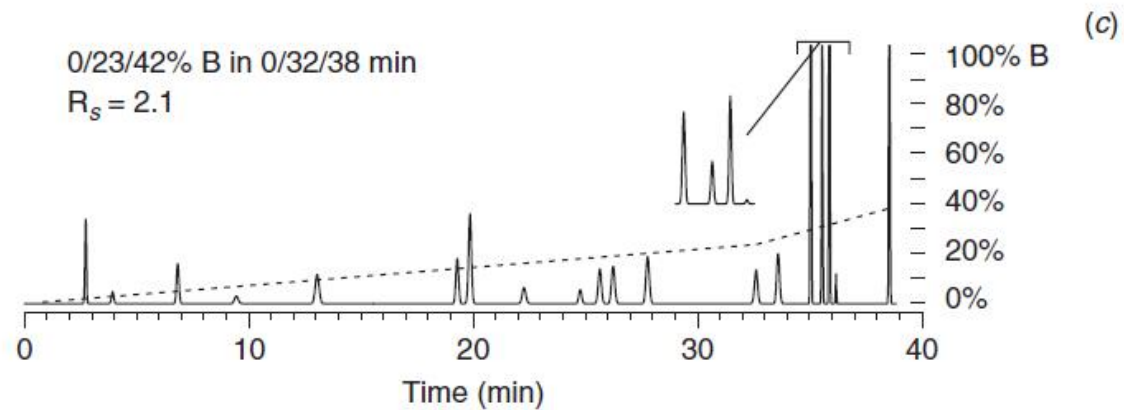
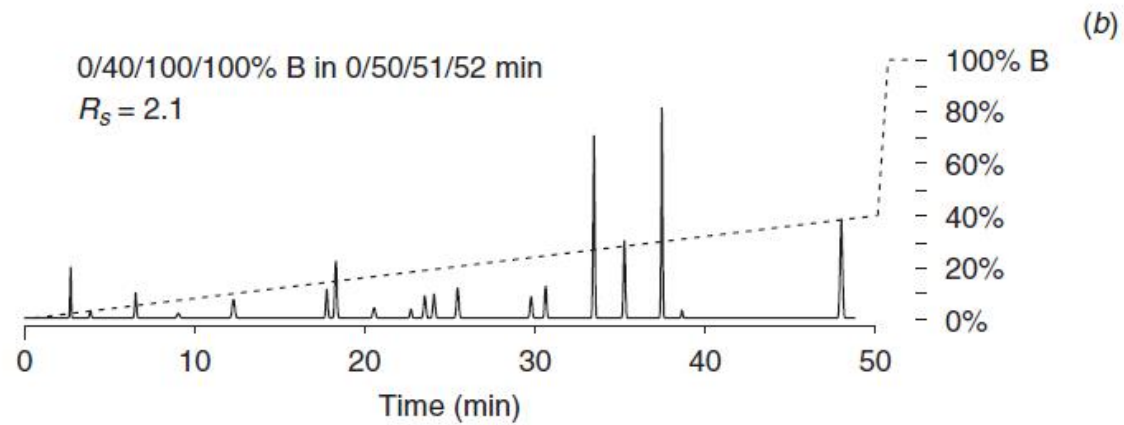
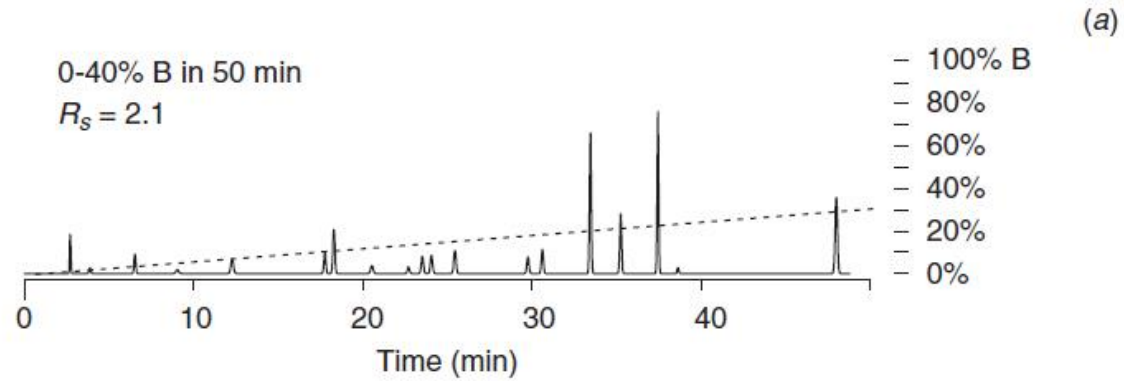
Végső B% változtatása

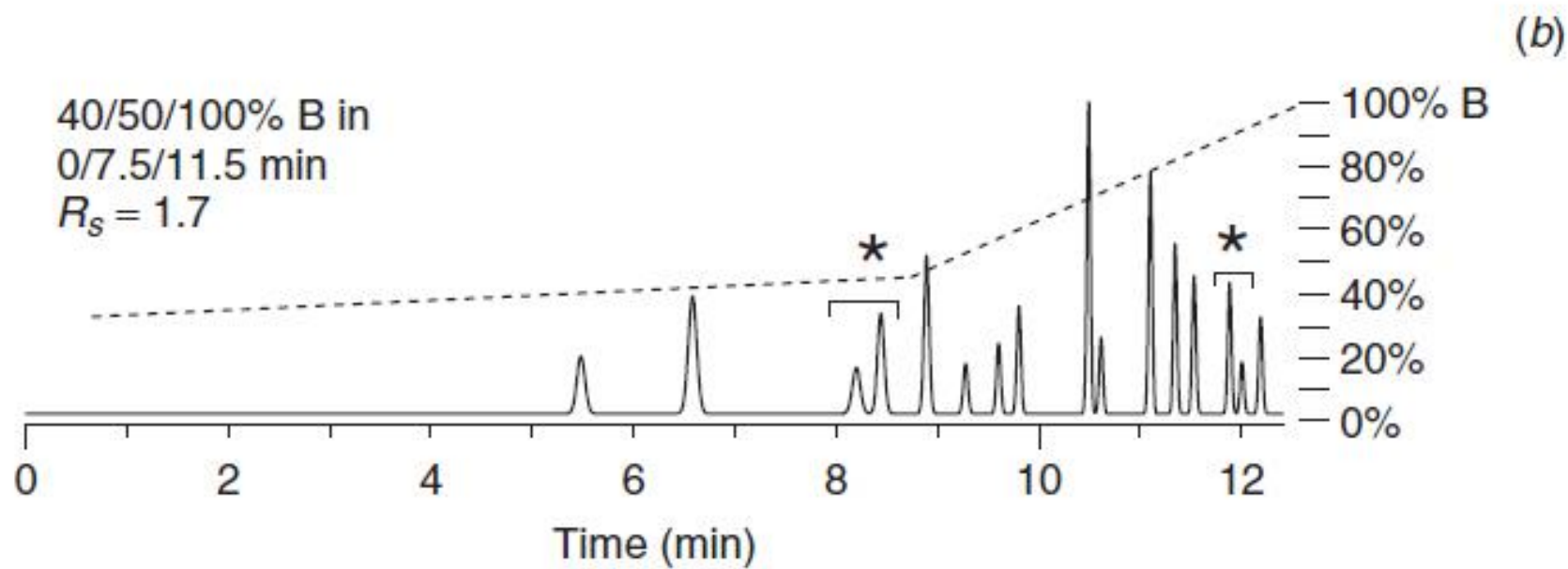
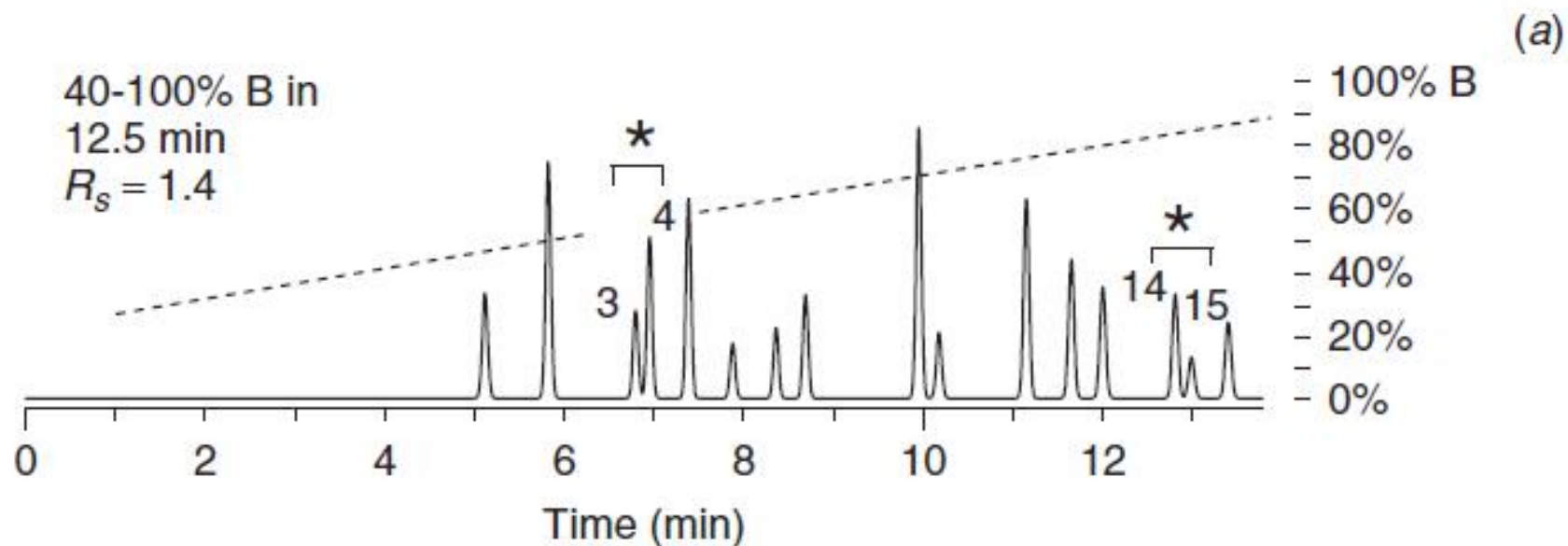


Gradienskésés változtatása



Szakaszos gradiensek





Gradiens elúció megvalósítása

Kisnyomású gradiens (dinamikus keverő):

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

Nagynyomású gradiens (statikus keverő):

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

Mitől gyors az elválasztás?

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

Ahol

t_r – retenciós idő

t_0 – holtidő

k – visszatartási tényező

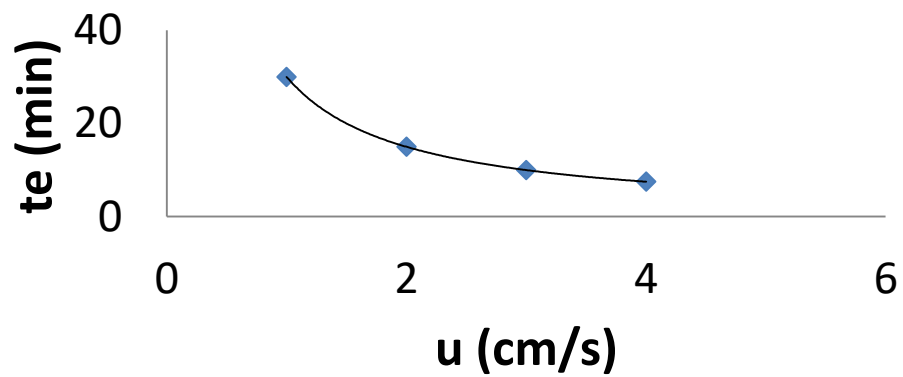
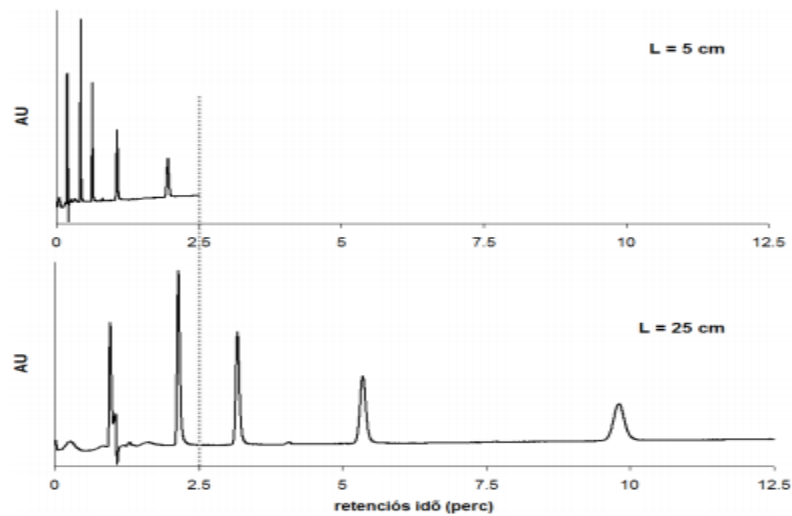
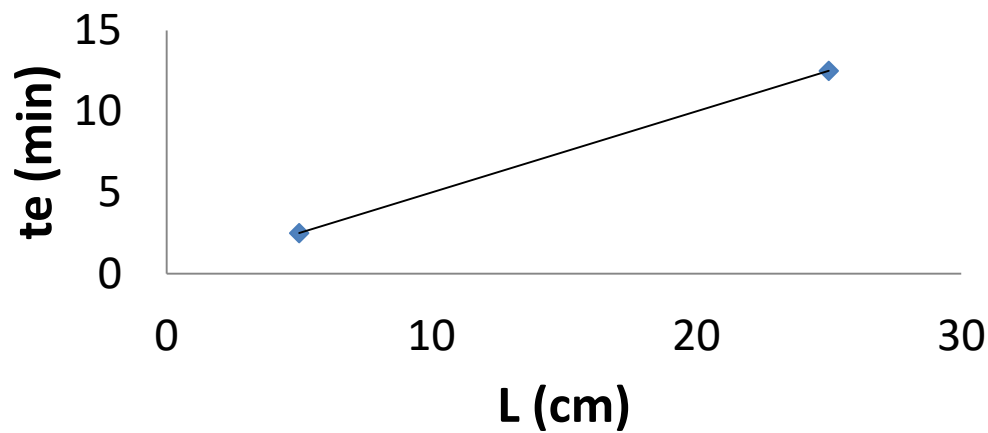
$$t_0 = \frac{L}{u}$$

Ahol

L – oszlop hossza

u – lineáris áramlási sebesség (cm/s)

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



Darcy egyenlet:

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

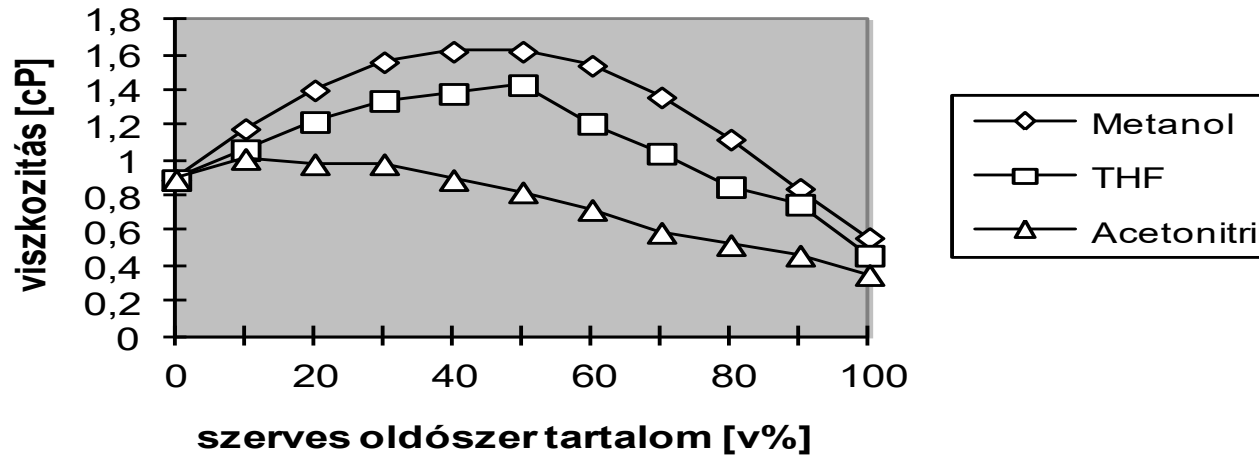
Ahol:

Φ – kolonna áramlási ellenállása

η – mozgófázis viszkozitása

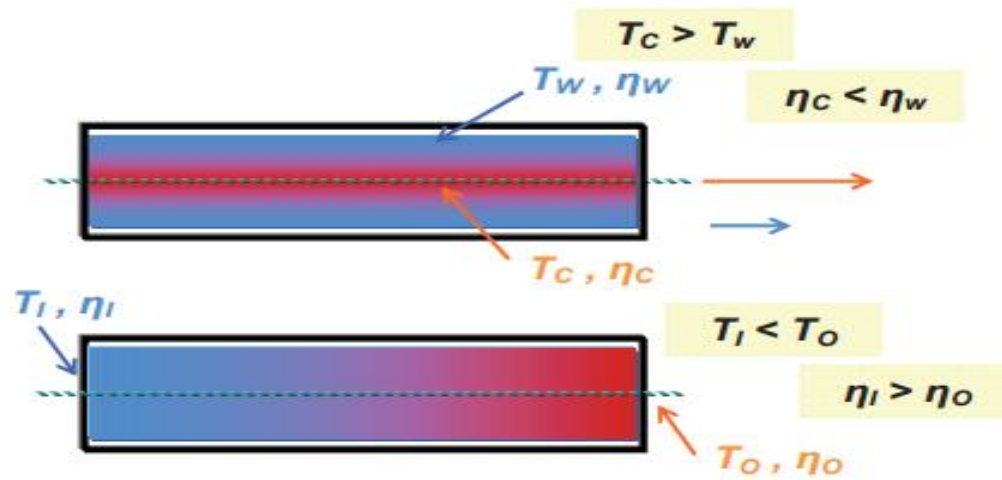
d_p – töltet szemcseátmérője

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



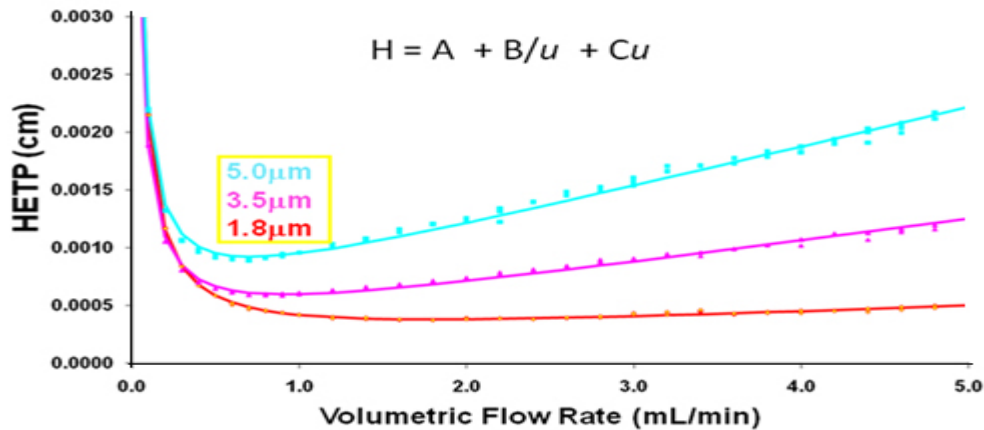
Hatékonyságot csökkentő tényezők I.

1.) Hőgradiens



Hatékonyságot csökkentő tényezők II.

2.) Megnövekedett örvénydiffúzió és anyagátadási ellenállás



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

Gyors elválasztás megvalósításának lehetőségei I.

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

1.) megoldás:

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

Korlátok:

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

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

Gyors elválasztás megvalósításának lehetőségei II.

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

2.) megoldás:

- Δp – nő

- d_p – szub-2 μm

- d_c – 2 mm alatt



UHPLC (1000 – 1400 bar)

Oszlopon kívüli zónaszélesítő hatások



Zónaszélesítő hatások:

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

$$Q_{\Sigma}^{sc} = Q_{\Sigma}^i + Q_{\Sigma}^{öv} + Q_{\Sigma}^{cs} + Q_{\Sigma}^{de}$$

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

ec: extra column

c: column

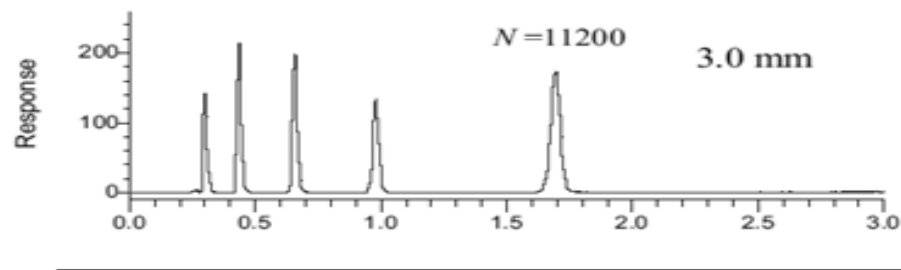
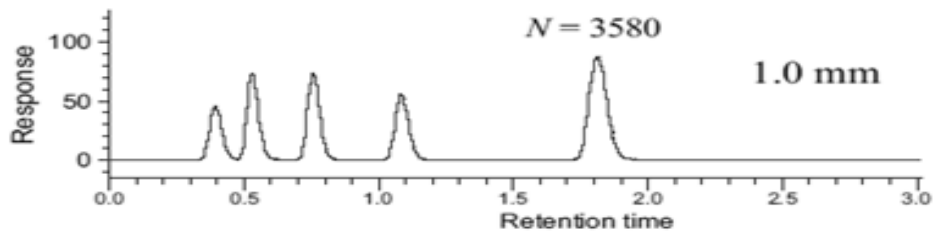
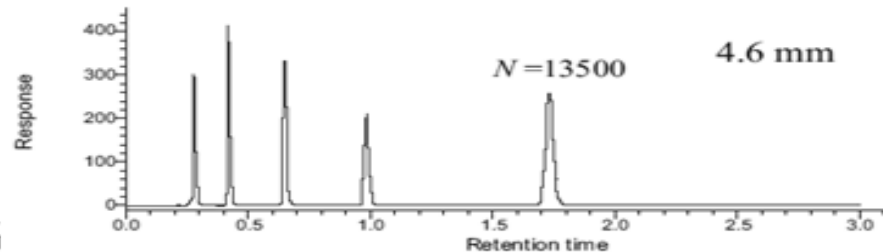
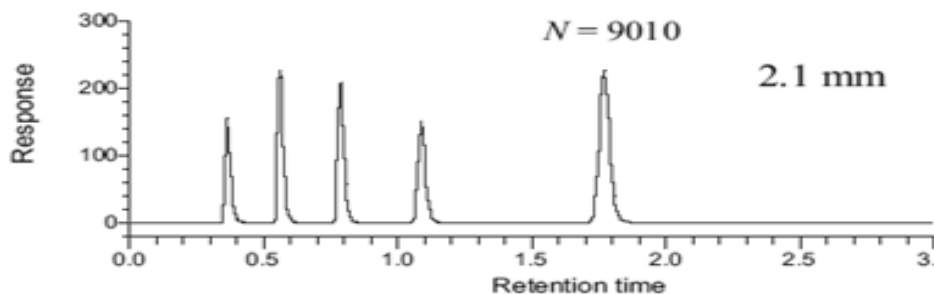
i: injektor

öv: összekötő vezetékek

cs: csatlakozók, fittingek

de: detektorcella

Mit jelent ez a gyakorlatban?



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

Mit tehetünk:

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

Adagolható minta mennyisége

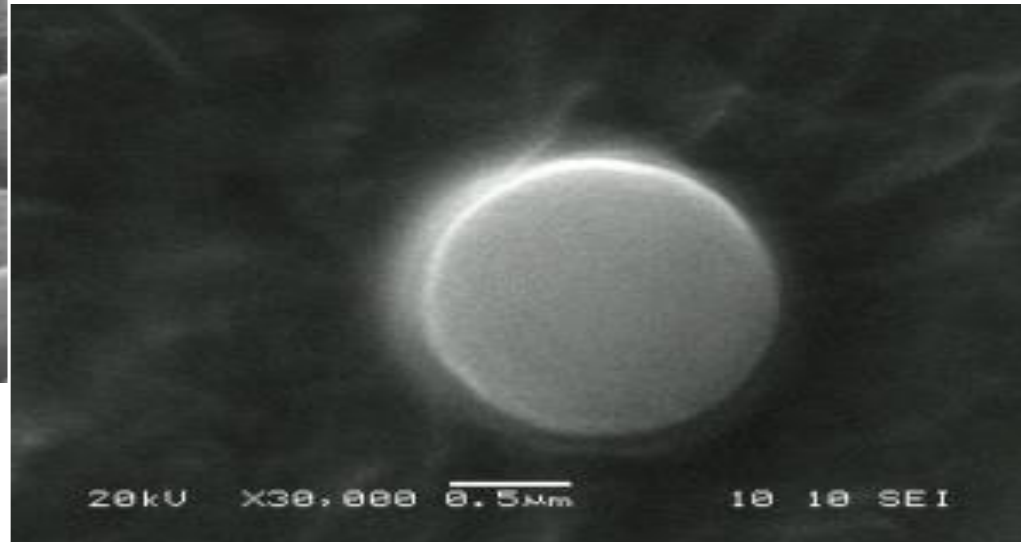
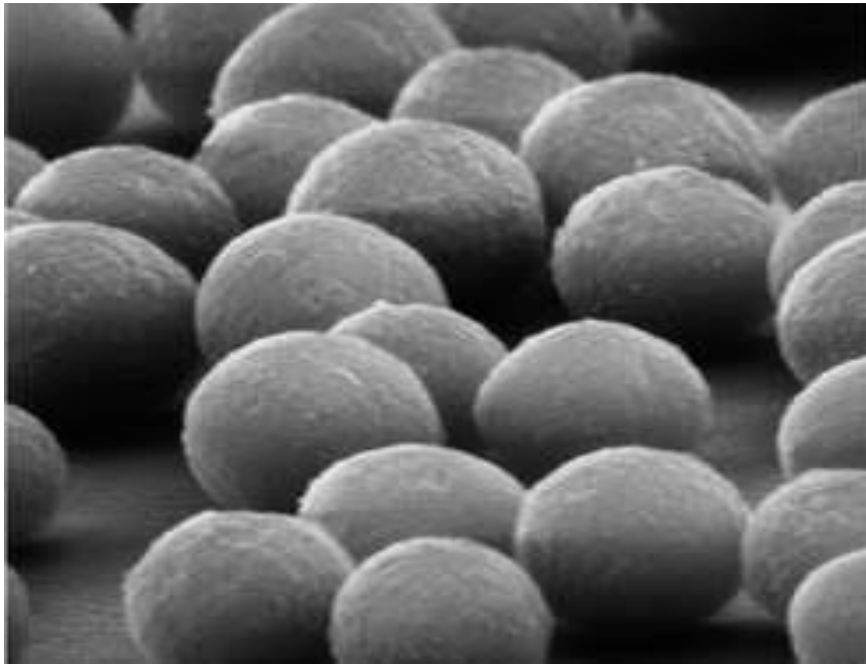
Minta oldószer: azonos v. gyengébb összetételű, mint a mozgófázis (molekuláris forma azonos a mintaoldószerben és a mozgófázisban!)

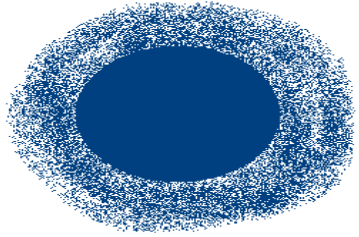
Adagolható minta mennyisége:

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

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

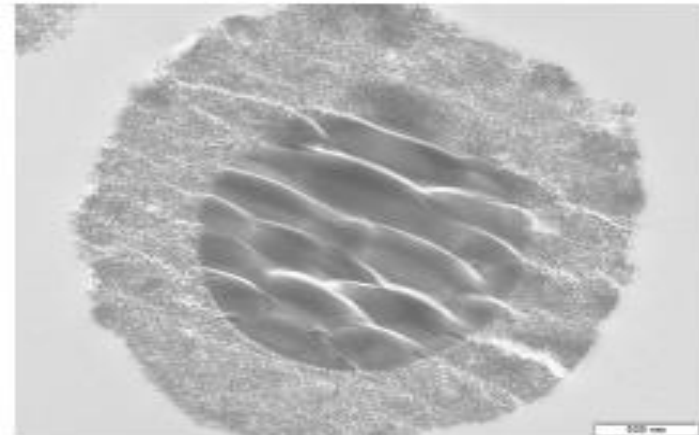
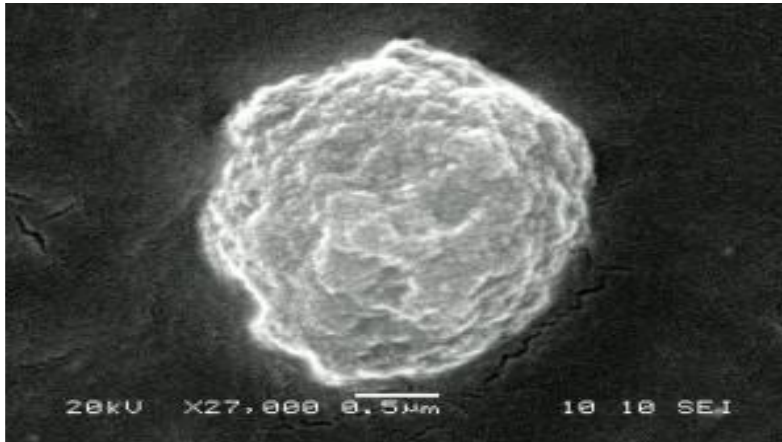
Teljesen porózus kis szemcseátmérőjű töltetek





Héjszerkezetű töltetek

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



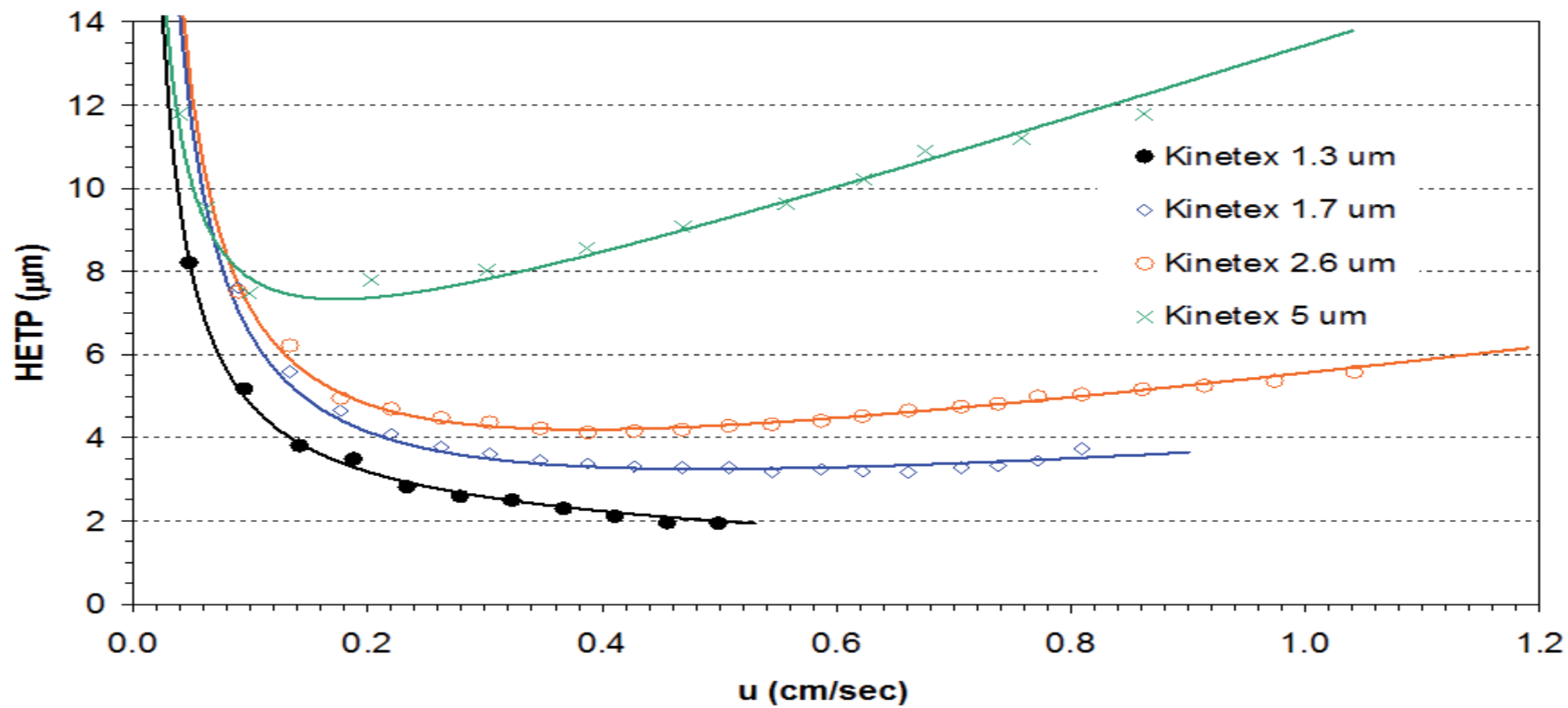
Héjszerkezetű töltetek

Előnyök:

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

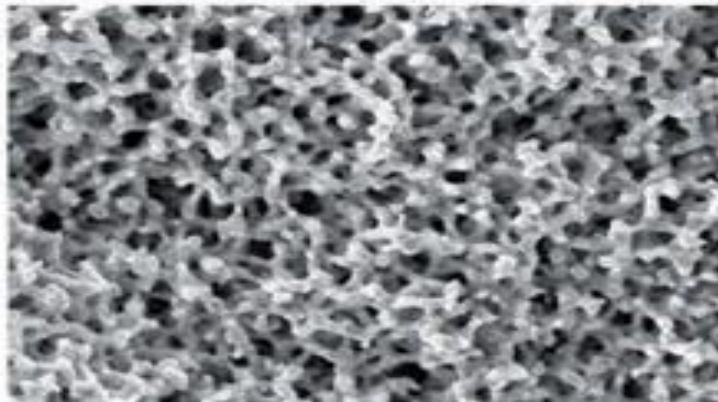
Hátrány:

- Terhelhetőség

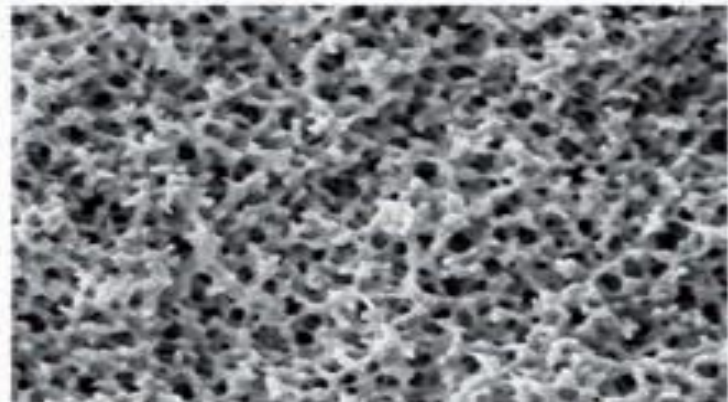


Monolit töltetek

- A gyors analízis alapja a csökkent áramlási ellenállás



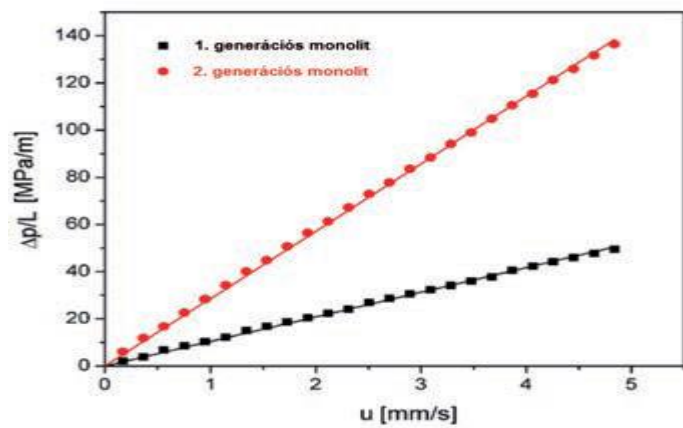
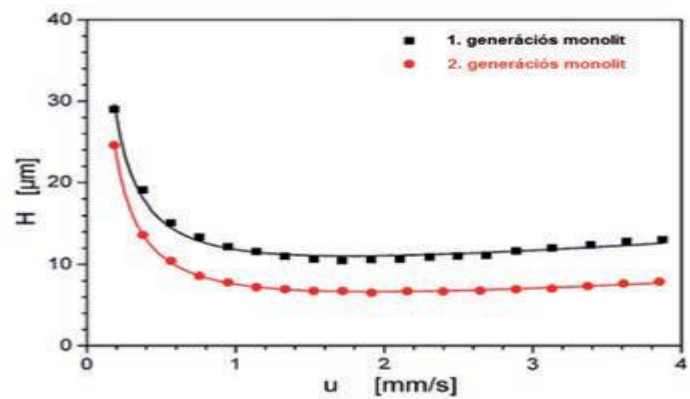
Első generációs monolit



Második generációs monolit

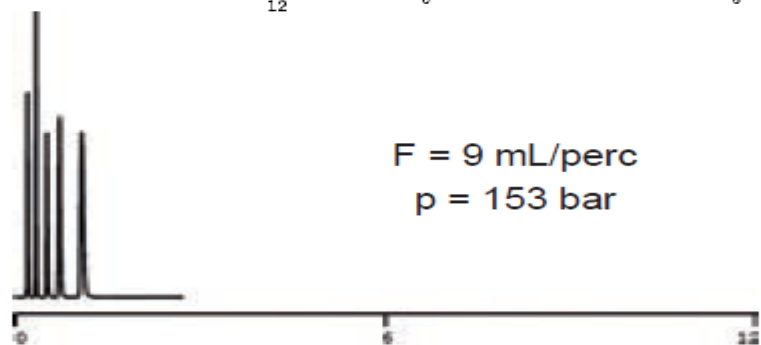
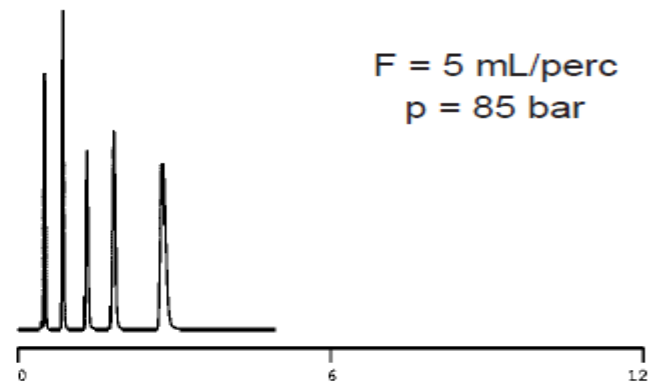
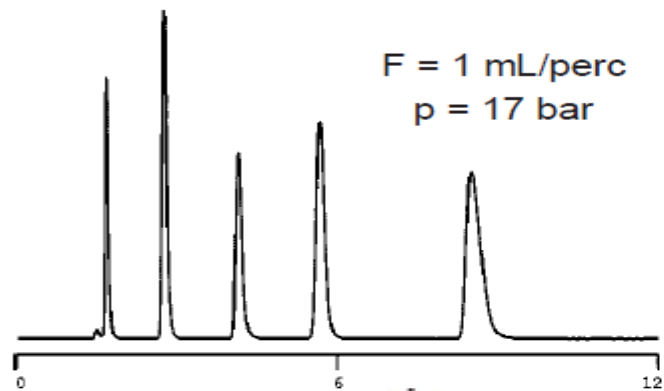
- A hatékonyságuk hasonló az 5 μm szemcseátmérőjű töltetekkel kisebb nyomásesés mellett!

Monolit töltetek



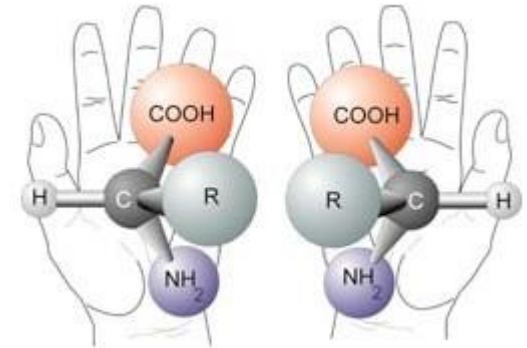
Monolit töltetek

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



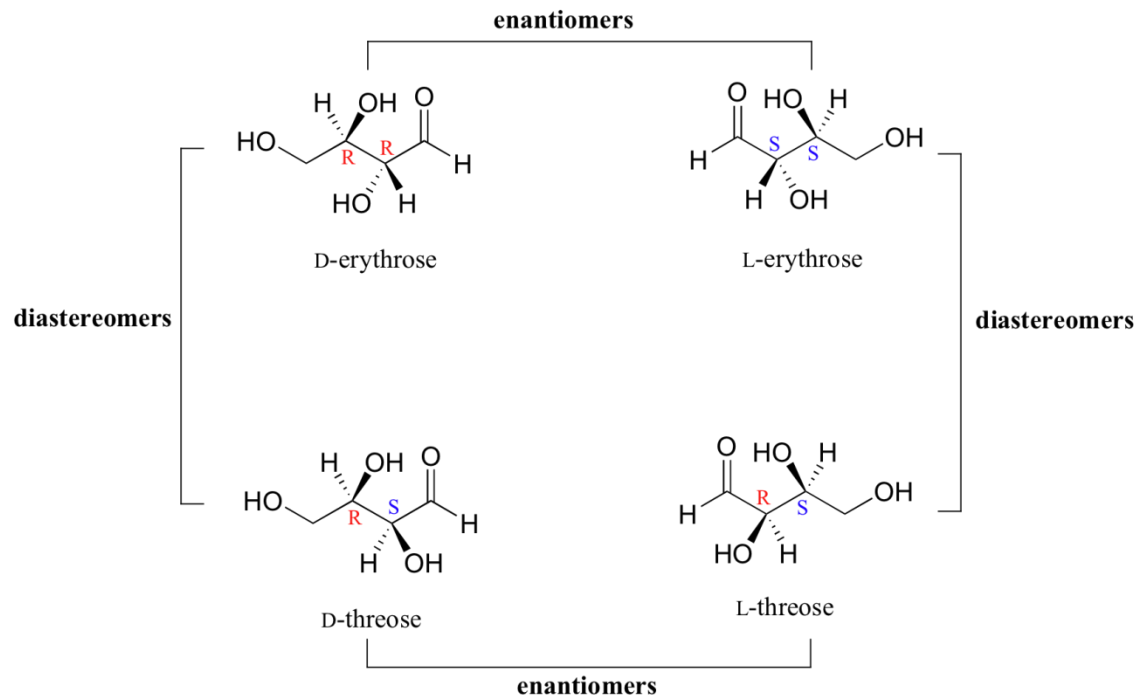
Királis kromatográfia

- Királis vegyületek
- Enantiomerek (tükörképi párok)
- Diasztereomerek (nem tükörképi párok)



Sztereoizomerek csoportosítása

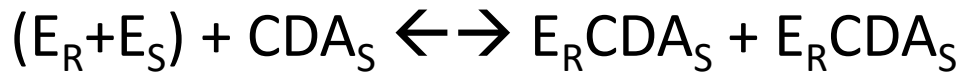
- Enantiomer: az optikai forgatóképesség irányán kívül minden fizikai és akirális környezetben minden kémiai tulajdonságukban megegyeznek
- Diasztereomer: fizikai-kémiai tulajdonságaik különböznek



Királis kromatográfia

- HPLC:
 - Közvetett meghatározás (származékképzés)
 - Közvetlen meghatározás (királis álló- vagy mozgófázis)
- GC: optikailag aktív állófázis (valin származék vagy ciklodextrin alapú)
- Szuperkritikus illetve CEC illetve VRK királis állófázisok is léteznek

- Közvetett módszer:



CDA: Chiral Derivatizing Agent – úgy választjuk meg, hogy az elválasztandó enantiomerek egyik funkciós csoportjával (pl. amin, hidroxil, karboxil, stb.) reakcióba lépjen, diasztereomer párt képezve.

Használható normál-, fordított fázisú valamint ioncserés kromatográfiában is.

A királis kolonnák elterjedésével háttérbe szorult, de nyomanalitikában használják, különösen kromofor vagy fluorofor csoportot tartalmazó származékképzők alkalmazásával.

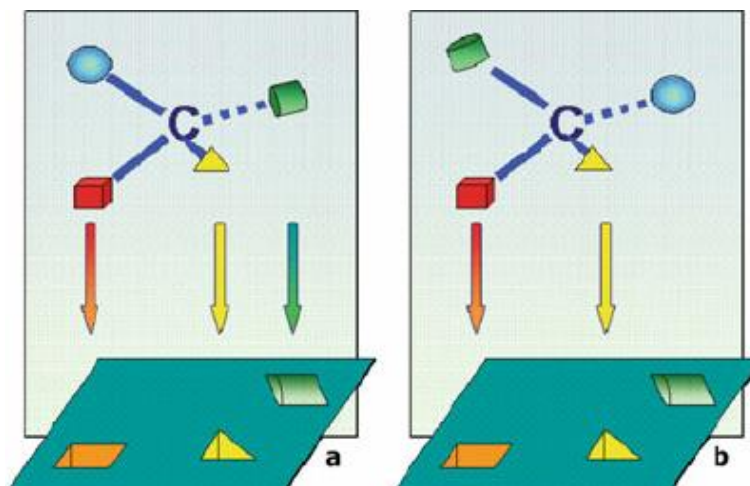
Előnyök/hátrányok

- Az elválasztás általában egyszerűbb
 - Az elúciós sorrend következtethető illetve megfordítható
 - A detektálás alsó határa csökkenthető
 - Akirális kolonna olcsóbb
- A módszerfejlesztés kevésbé időigényes
- A szelektivitás növelhető (előtisztítás)

- A származékképző enantiomer tisztasága kritikus
- A képződött diasztereomerek moláris abszorbananciája különbözhet
- A származékképzés során racemizáció léphet fel
- A reagens feleslege és a melléktermékek zavaró csúcsként jelentkezhetnek
- Az enantiomerek visszanyerése további műveleteket igényel
- A származékképzés időigényes lehet

- A hárompontos kötődés modellje

A szelektor és az elválasztandó vegyület között akkor jön létre stabil kapcsolat, ha az elválasztandó molekula legalább 3 ponton tud kötődni (Dalgliesh, 1952). A három kölcsönhatás közül legalább egynek sztereoszelektívnek kell lennie (Pirkle és Pochapsky, 80-as évek)



- Közvetlen meghatározás

Királis mozgófázis

A mozgófázisba bevitt optikailag aktív adalékanyag tulajdonságaitól függően adszorbeálódik az állófázison, így lehet egyszerre az álló- és a mozgófázis is optikailag aktív. Ezesetben az állófázis-hatás nagy. Ahány állófázis, annyi eltérő adszorpciós tulajdonság -> változik az állófázis borítottsága és enantiomer szelektivitása.



Gyógyszeriparban nem jellemző a használata

Királis állófázisok

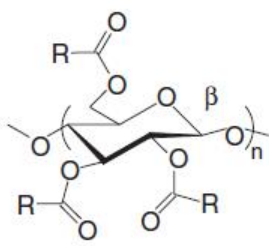
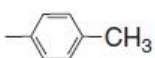
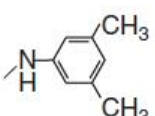
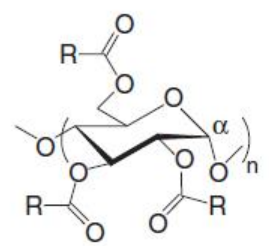
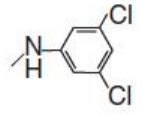
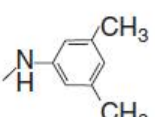
- A királis szelektor kovalens kötéssel kötött vagy esetleg fizikailag erősen adszorbeálva van állófázisra (legtöbbször szilika állófázisra)
- A mozgófázis akirális, mentes bármilyen királis összetevőtől
- Ahogy a minta keresztülhalad az oszlopon az egyes enantiomer úgy tartódnak vissza, hogy asszociátumokat képeznek a királis szelektorral. Így diasztereomer komplexek képződnek az állófázison
- Sikeres elválasztáshoz olyan királis állófázisra van szükség, ami az egyik enantiomerrel erősebben kölcsönhat, mint a másikkal
- Előnye, hogy a királis szelektor tisztasága nem kritikus
- Hátrány: drága oszlop, jellemzően rövidebb élettartammal, mint egy fordított fázisú; kis szelektivitás strukturális analógokra
- Hatékonyság rossz – nem is javítható, mert a lassú kinetikából, és sokszor a nemlineáris adszorpciós izotermából adódik

Poliszacharid alapú CSP-k

1973 Hesse és Hagel – cellulóz triacetát, hordozó nélkül -> jó enantioszelektívás, kapacitás, de rossz nyomástűrés, hatékonyság
 1984 Okamoto – szilika hordozóra vitte fel 20 %-ban a poliszacharid réteget -> jó mechanikai stabilitás, hatékonyság

A legelterjedtebb manapság az észter és karbamát származék

Általában normál fázisú rendszerekben használják, de léteznek olyan változatok, amik használhatók RP körülmények közt.

Polymer backbone	Residue	Name	Tradename
 <p>Cellulose</p>		Cellulose tris (4-methylbenzoate)	a
		Cellulose tris (3,5-dimethylphenyl-carbamate)	b
 <p>Amylose</p>		Cellulose tris (3,5-dichlorophenyl-carbamate)	c
		Amylose tris (3,5-dimethylphenyl-carbamate)	d
Tradenames	Coated	Immobilized	
a	Chiracel OJ	not available	
b	Chiracel OD	Chiralpak IB	
c	not available	Chiralpak IC	
d	Chiralpak AD	Chiralpak IA	
	Restricted solvent range	Full solvent range	

Bár széles körben alkalmazzák őket, a királis felismerés mechanizmusának leírása nem pontos.

3 okra vezetik vissza:

- királis centrumok a monoszacharidban
- konformációs kiralitása a polimer váznak
- különbéle polimerláncok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése miatt kialakuló királis üregek

Különbéle származékképzéssel a szelektivitás növelhető.

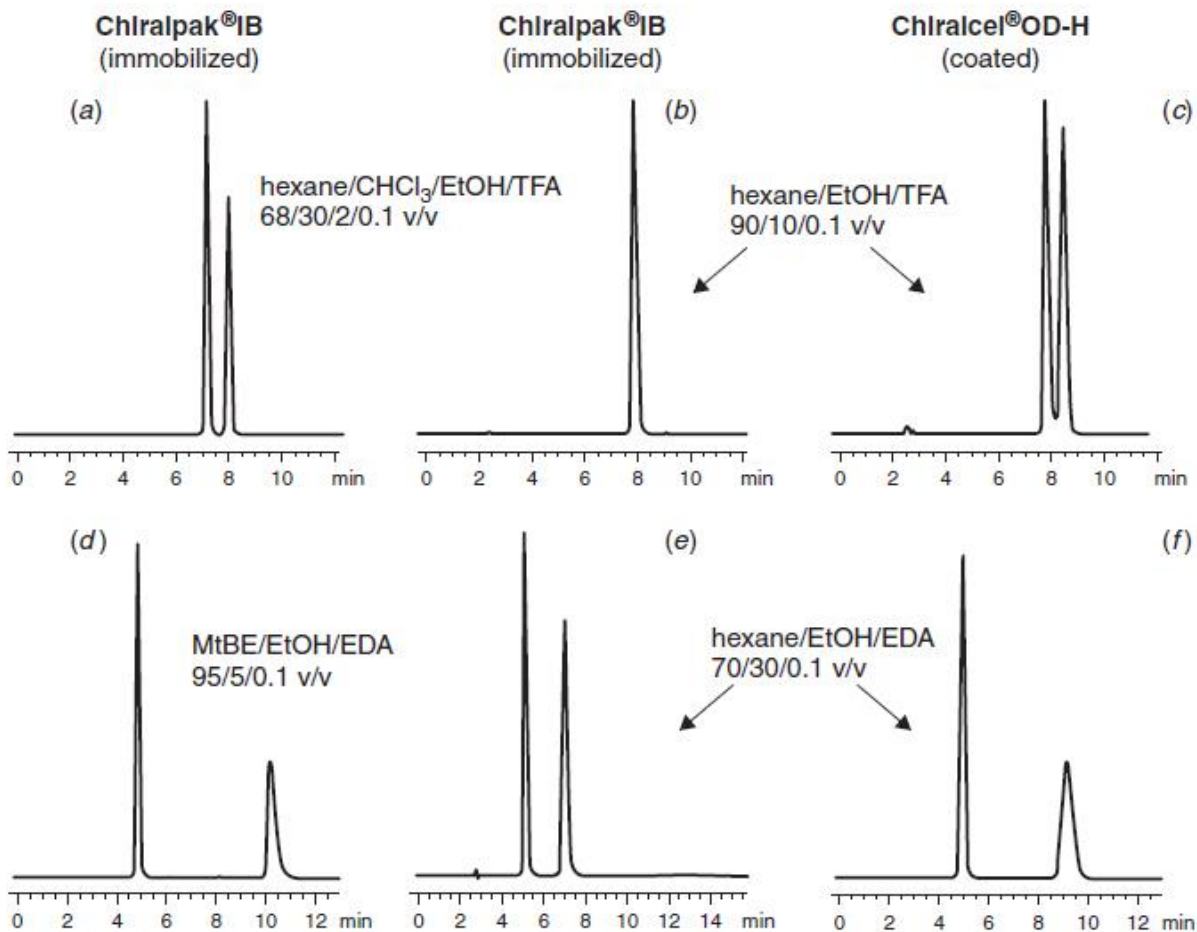
Előállítás körülményei (hőmérséklet, feloldás-újra kicsapás) jelentősen befolyásolják a szelektivitást.

A mechanizmus bonyolultsága megnehezíti a módszerfejlesztést. Javaslat:

Chiralpak AD>Chiralcel OD>Chiralcel OJ

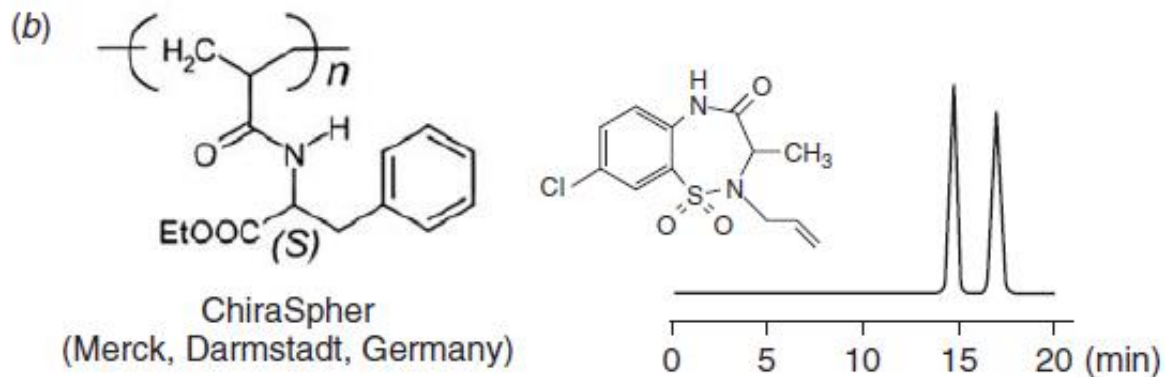
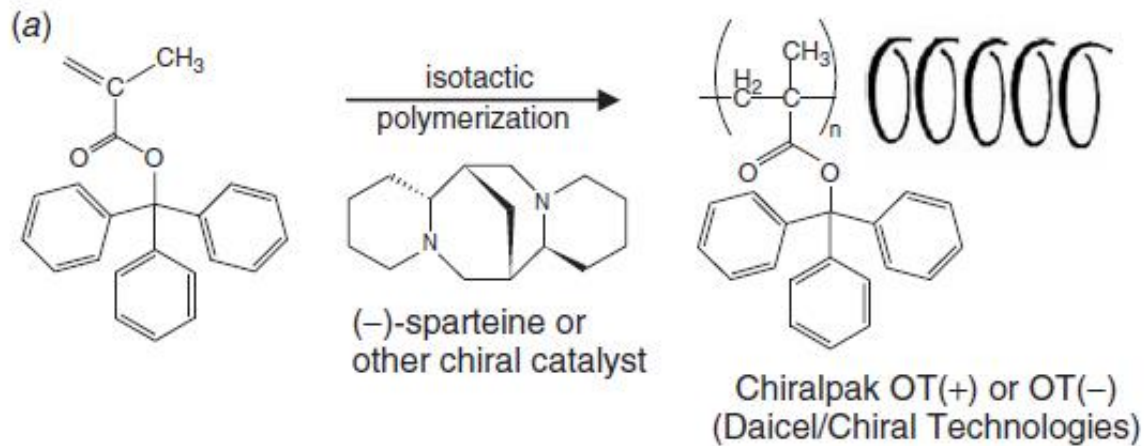
Normál fázisban használják; hexán vagy heptán eluenssel, izopropanol vagy etanol „B” mozgó fázissal

Kolonna típusának hatása az elválasztásra

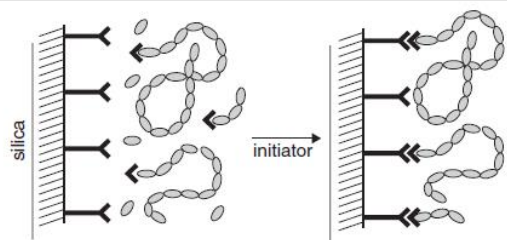


N-benzyloxycarbonyl-phenylalanine (a–c) and laudanosine (d–f)

Szintetikus polimer típusú CSP-k

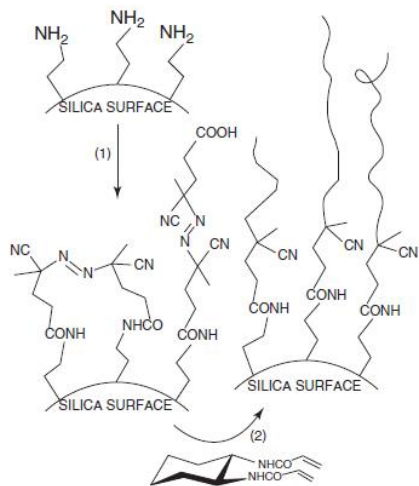
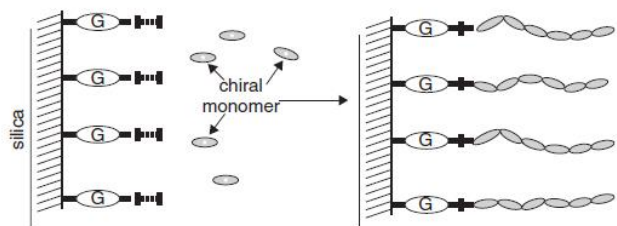


Gyengébb enantioszelektivitás, mint a természetes alapú fázisoknak, kevésbé rendezett polimerláncaik miatt

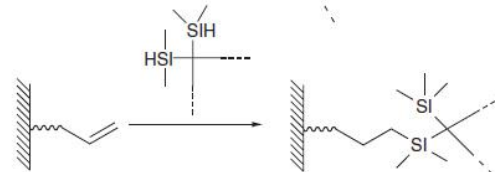
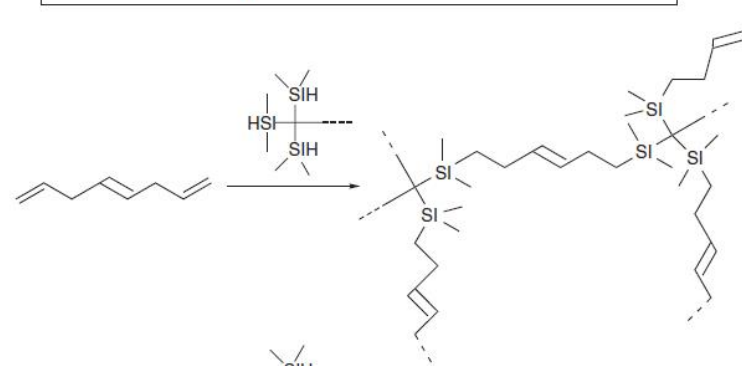
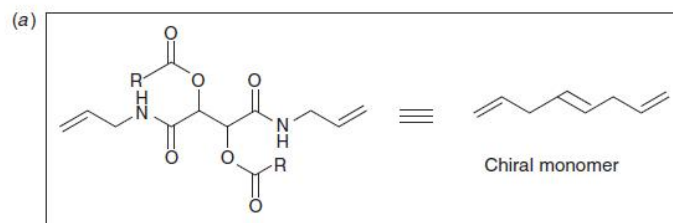


Grafting-from

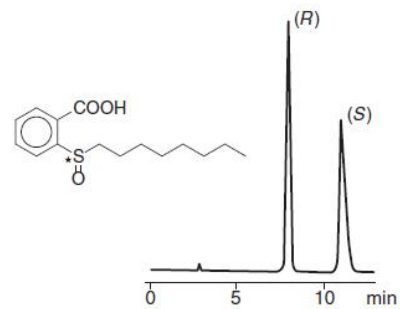
(b)



(c)



(b)



Protein fázisok

A királis komponensek szelektív kötődése különböző proteinekhez ismert a biokémiából

Sok protein alapú CSP-t írtak le, de kereskedelmi forgalomban csak néhány típus kapható.

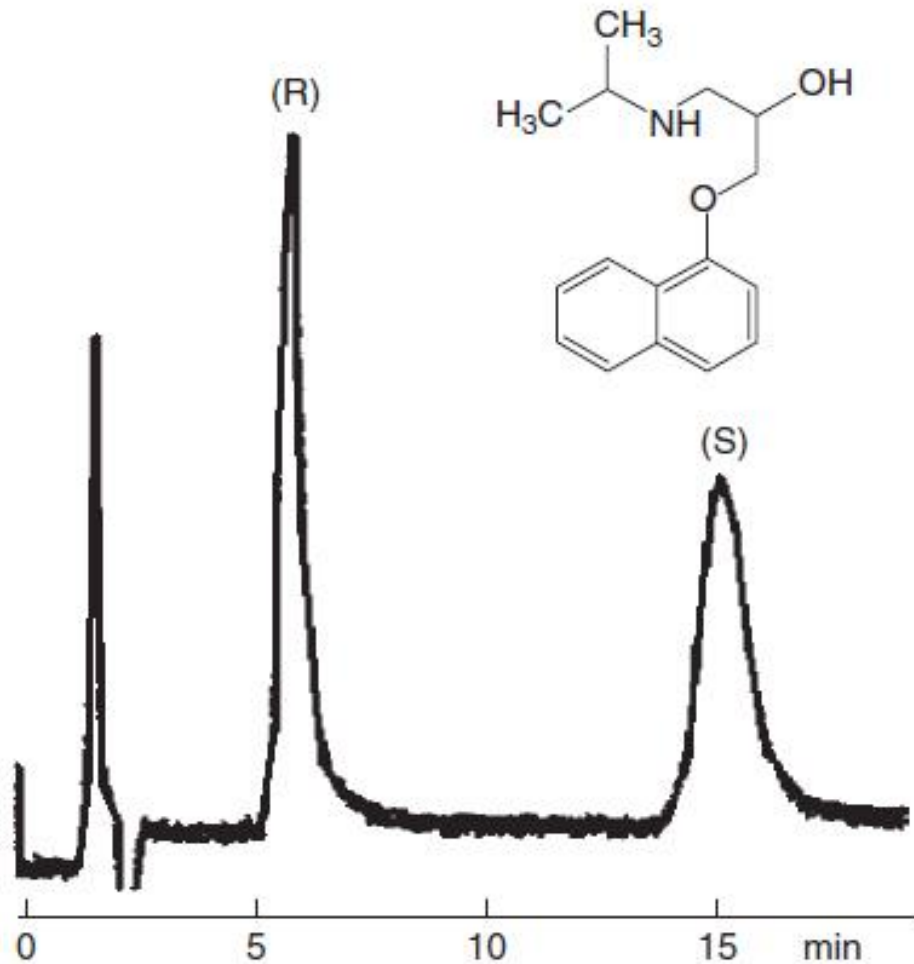
Mindig vizes közegben használják (vagy vizes-szerves közegben) -> optimálás a pH állításával, puffer típusával, koncentrációjával és a szerves fázis minőségével, mennyiségével lehetséges.

Szerves fázis hozzáadása csökkenti a retenciót. Az enantioszelektivitás nőhet és csökkenhet is, attól függően, hogy a hidrofób kölcsönhatások csökkentése befolyásolja-e a királis helyekhez való kötődést

Table 14.2

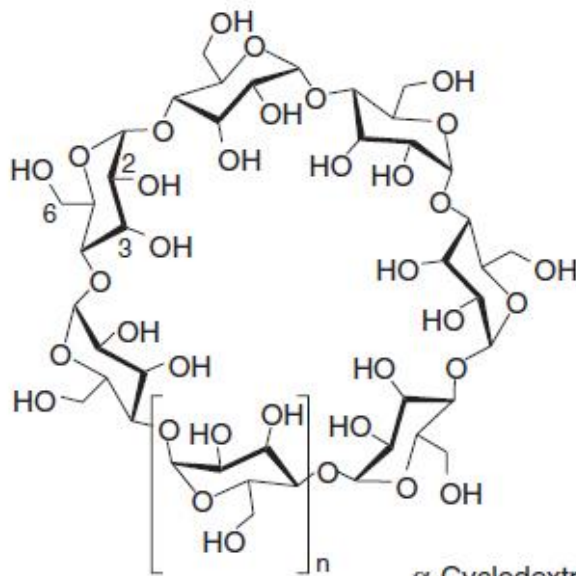
Important Protein-Type CSPs and Column Trade Names, with Some Characteristics of the Protein Selectors

Protein	Molecular Weight (kDa)	Carbohydrate (%)	Isoelectric Point	Column Trade Name (Supplier)
Serum albumin				
Human (HSA)	67	0	4.7	Chiral HSA (ChromTech)
Bovine (BSA)	68	0	4.7	Resolvosil BSA (Macherey Nagel)
α_1 -Acid glycoprotein (AGP)	44	45	2.7	Chiral AGP (ChromTech)
Ovomucoid (OVM)	28	17-34	4.5	Ultron ES-OVM (Shinwa Chemical)
Cellobiohydrolase I (CBH)	60–70	6	3.6	Chiral CBH (ChromTech)
Avidin	66	20.5	9.5–10	Bioptic AV-1 (GL Sciences)
Pepsin	70–78	-	6.1–6.6	Ultron ES-Pepsin (Shinwa Chemical)

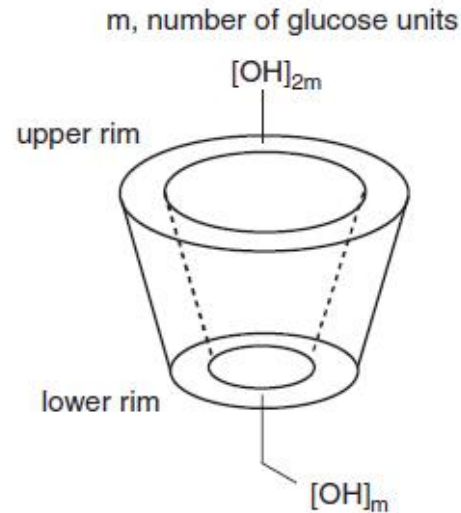


propranolol enantiomerek elválasztása protein kolonnán (cellobiohydrolase I; Chiral CBH I, ChromTech). Eluens: 0,01M acetate puffer, pH 5.

Ciklodextrin alapú CSP-k



α -Cyclodextrin	$n = 0, m = 6$
β -Cyclodextrin	$n = 1, m = 7$
γ -Cyclodextrin	$n = 2, m = 8$



Commercial columns:

Cyclobond I (native β -CD), *II* (native γ -CD), and *III* (native α -CD) (from ASTEC)

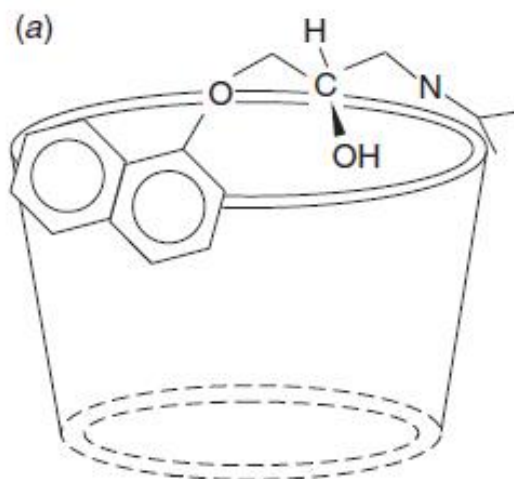
Cyclobond I SP or *RSP* [(*S*)- or (*RS*)-2-hydroxypropylether- β -CD] (ASTEC)

Cyclobond I RN or *SN* [(*R*)- or (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylcarbamate- β -CD] (ASTEC)

ChiraDex (native β -CD) and *ChiraDex Gamma* (native γ -CD) (from Merck)

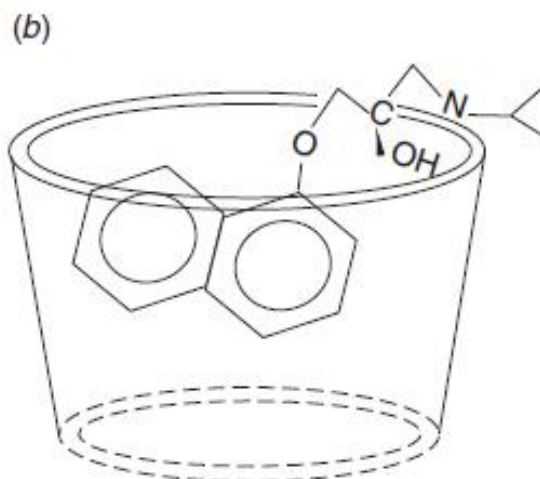
Ultron ES-CD (native β -CD) and *Ultron ES-PhCD* (phenylcarbamoylated β -CD)
(from Shinwa)

Felismerés mechanizmusa



polar-organic &
normal-phase mode

A CD belseje blokkolva van az oldószermolekulákkal, hidrofil csoportok a poláris részhez kötődnek

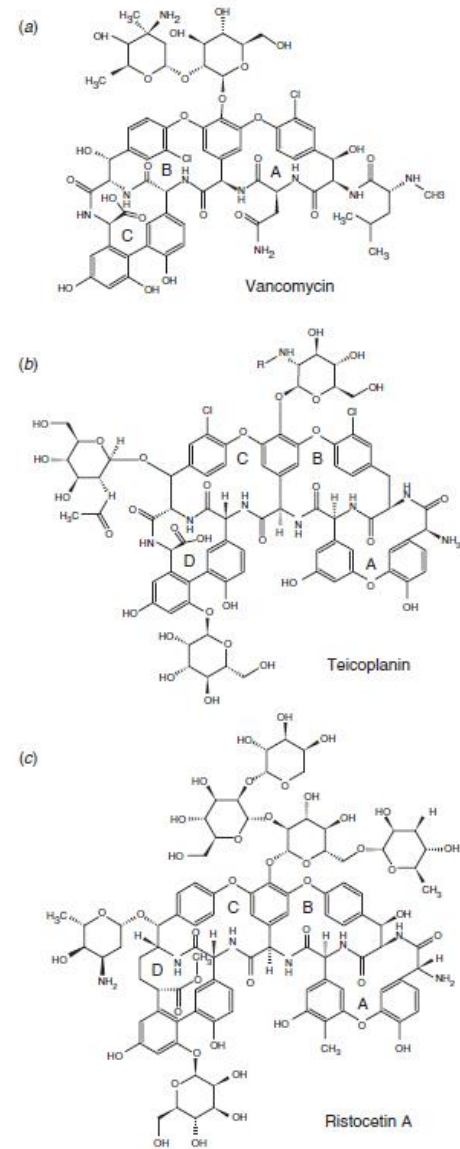
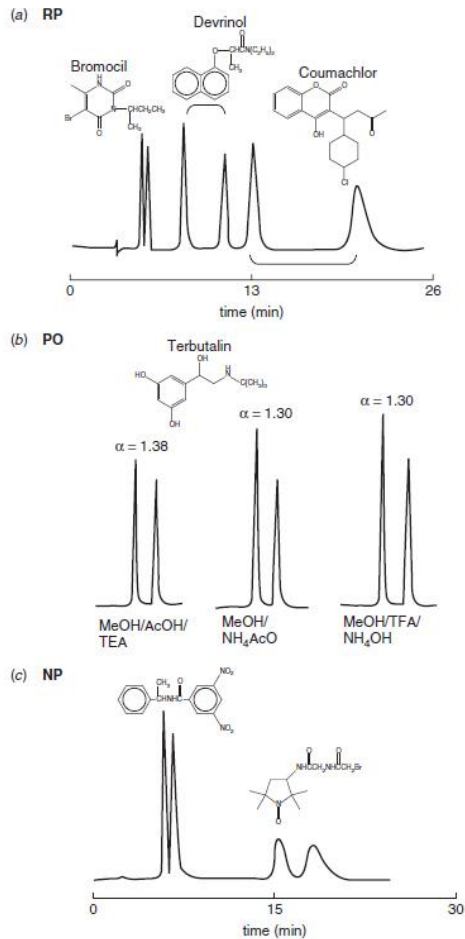


reversed-phase mode
(inclusion complexation)

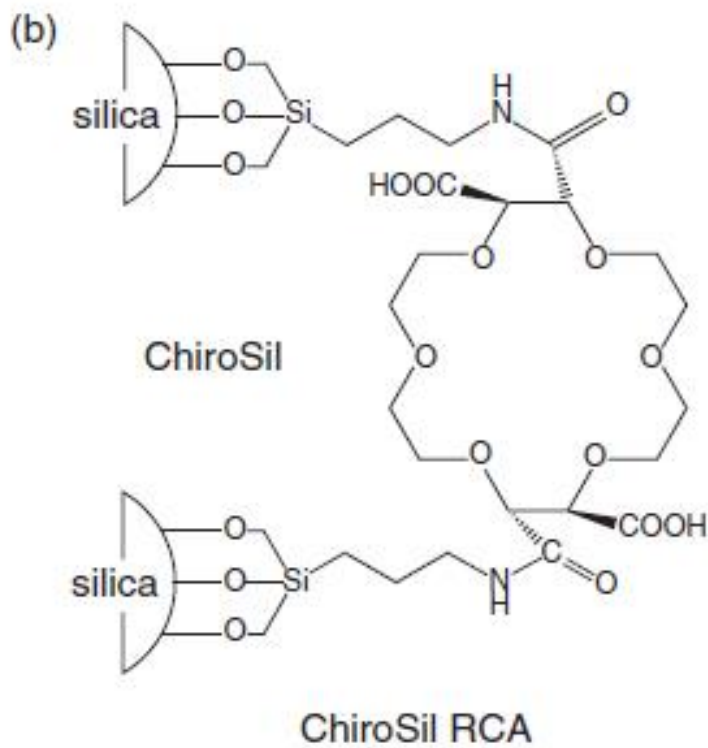
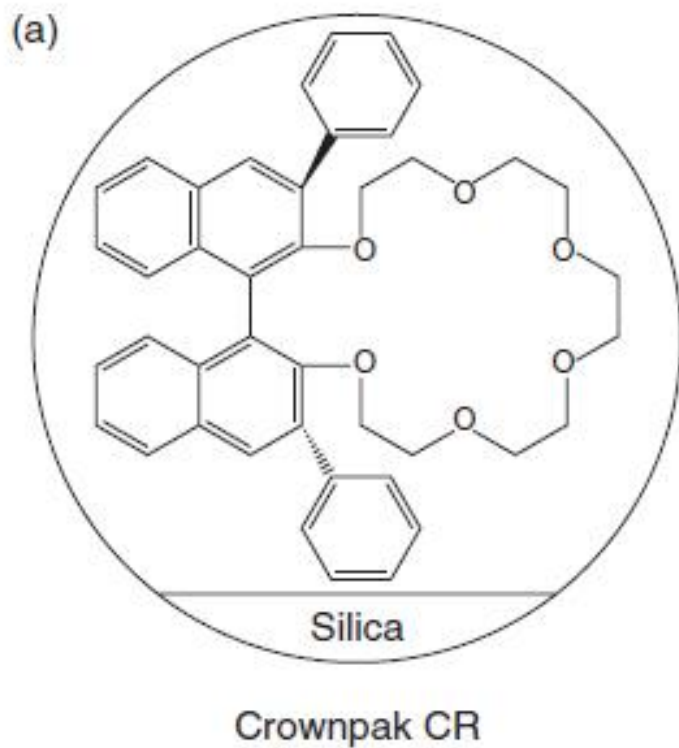
Molekula hidrofób része a a CD belsejében, hidrofil csoportok a poláris részhez kötődnek

Makrociklusos antibiotikum alapú CSP-k

Használhatók RP, PO és NP módban, de a polár/organic módban értek el legjobb szelektivitásokat

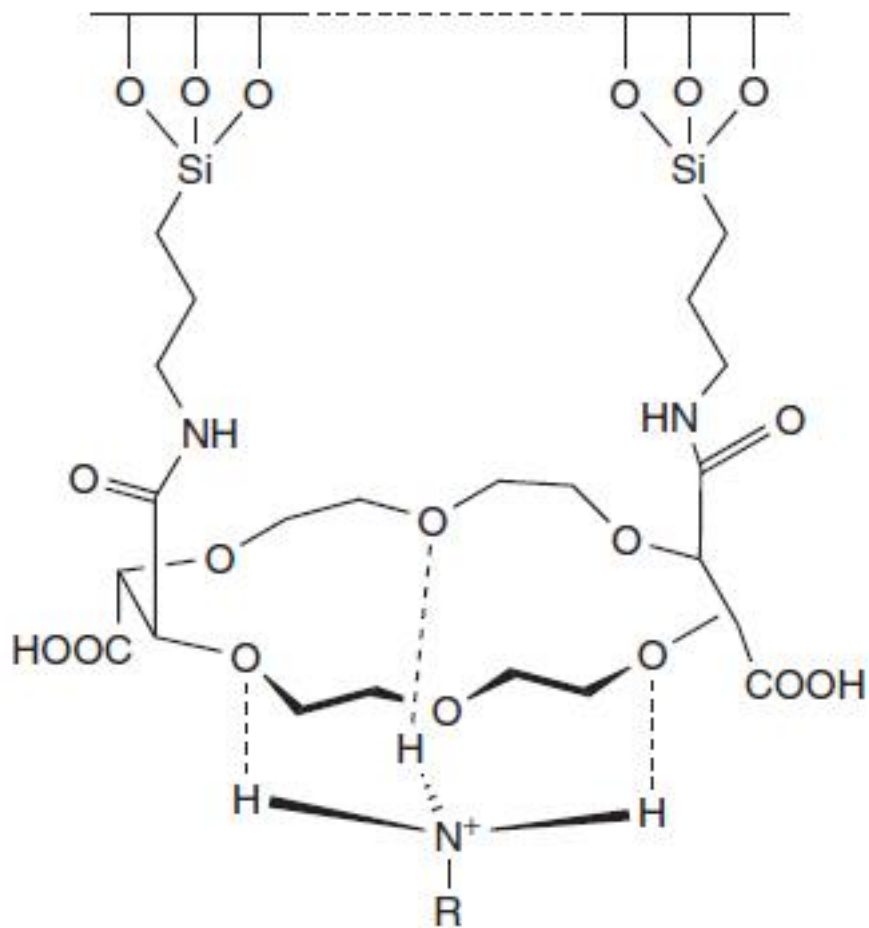


Királis koronaéter típusú CSP-k



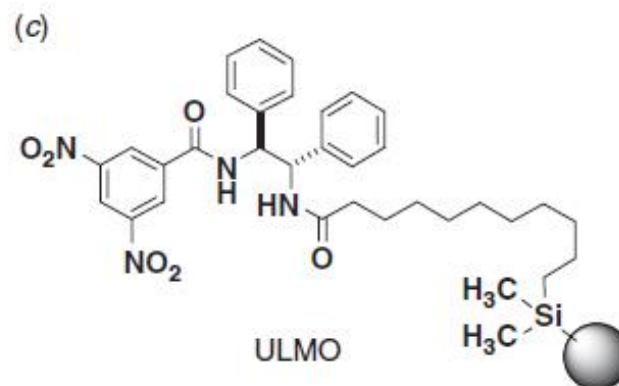
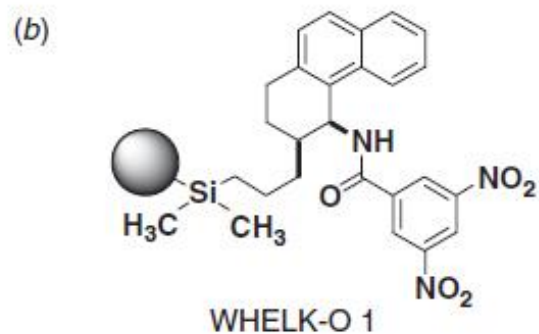
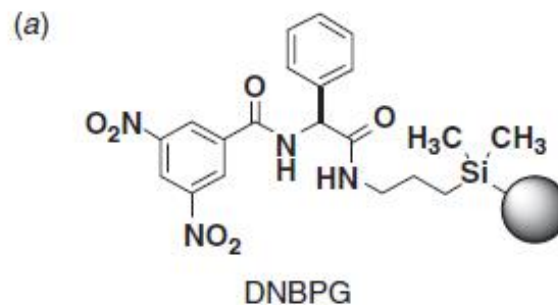
Elsősorban primer aminok elválasztásához (aminosavak, aminosav-észterek, amino alkoholok)
Vizes közegben pH=1-3,5, a teljes protonálódáshoz

Mechanizmus: a királis ammónium ionok meg tudnak kötődni 3 H kötéssel a koronaéter 3 oxigén atomjához. Az enantioszelektiviás sztérikus okokra vezethető vissza

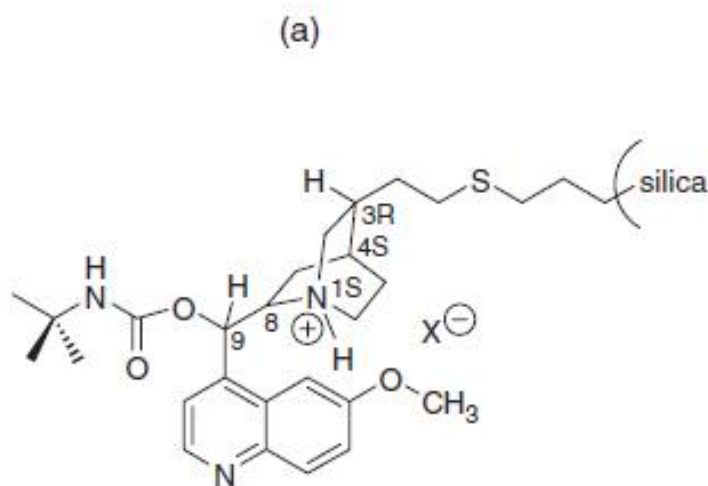


Donor-akceptor típusú CSP-k

Alapja: királis, kis molekulatömegű szelektorok, amik semlegesek, szintetikusak és NP módban használhatósak.

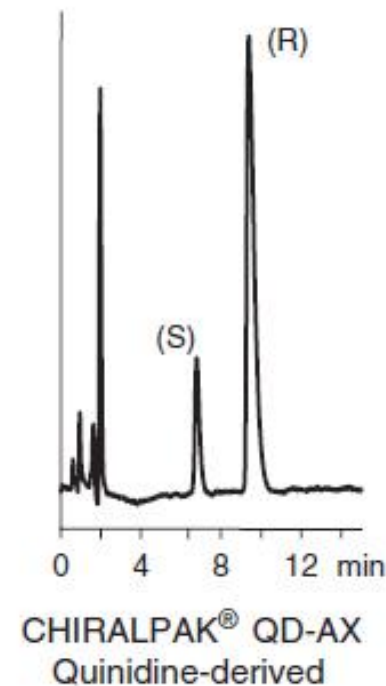
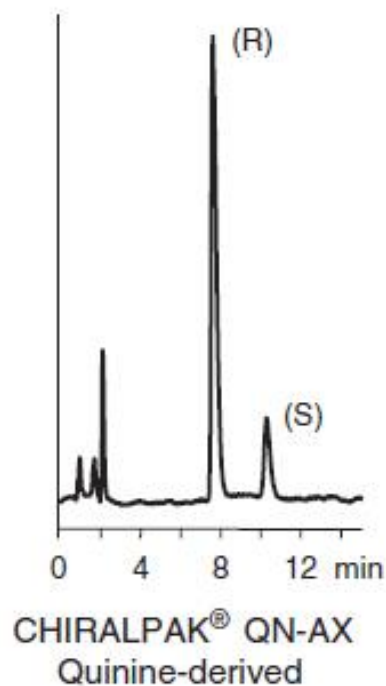
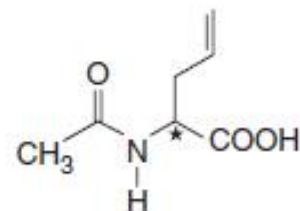


Királis ioncserélők

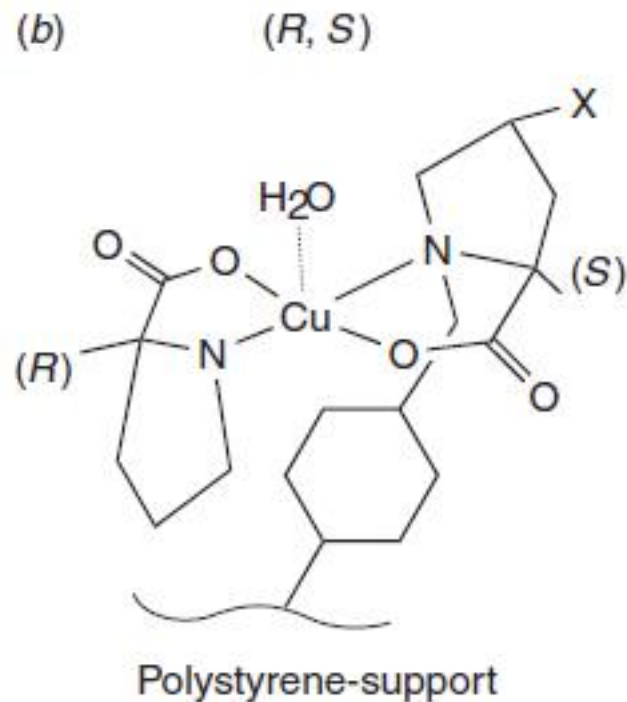
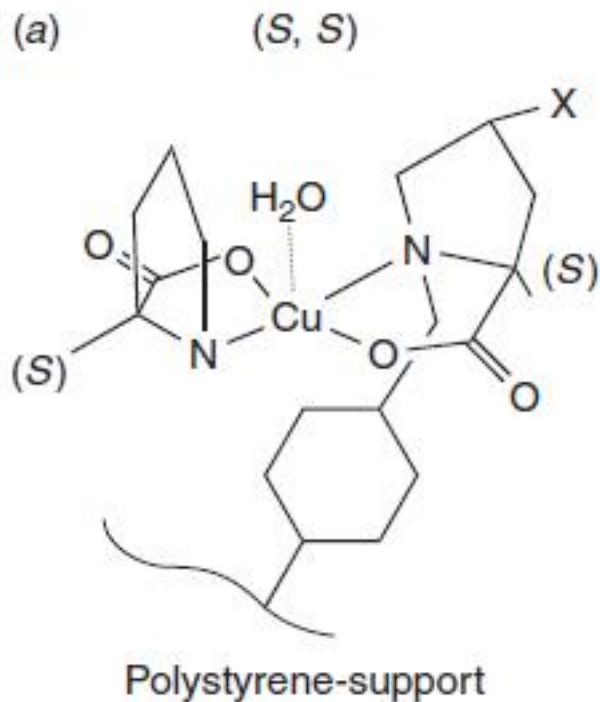


Ionizálható szelektorok- ionos kölcsönhatás a szelektor és analát között.

A szelektor nagy enantioszelektivitással rendelkezik.

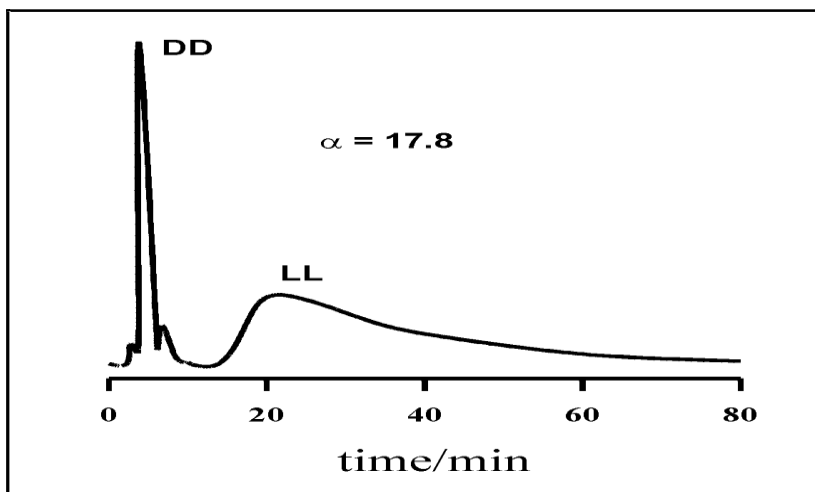
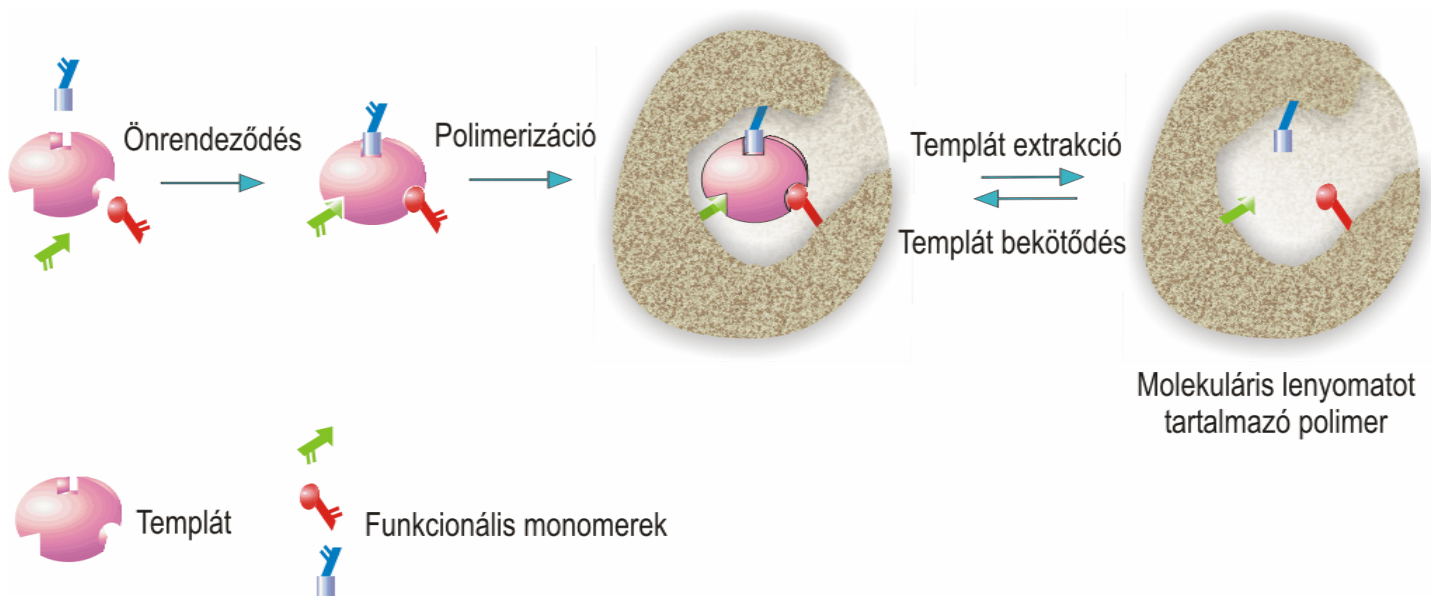


Királis ligandum cserélő CSP-k

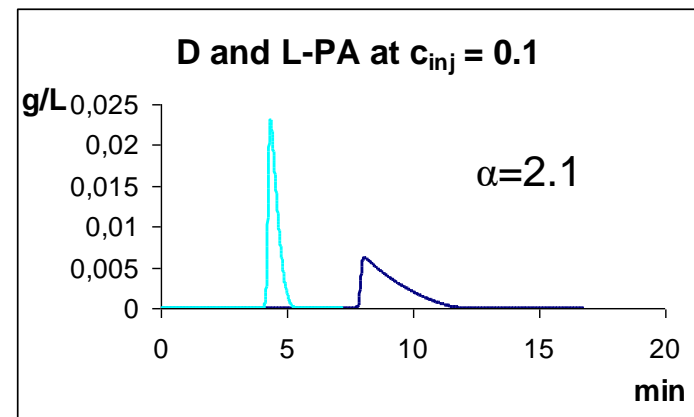
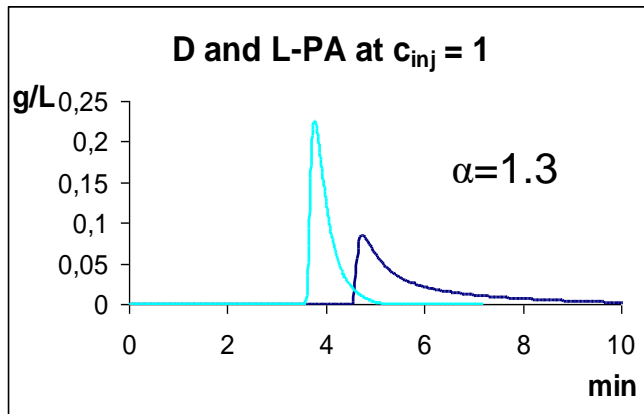


Prolin immobilizálása polisztirol vázra 1960 Davankov
Ma már kevésbé használatos

Molekuláris lenyomatú polimerek



N-acetil-Phe-Trp-OMe LL és DD enantiomerjeinek elválsztása az LL izomerre imprintelt oszlopon



Racém elegy kromatogramja különböző koncentrációknál **az izotermák alapján szimulálva** (PA: phenylalanine anilide)

Dependence of the chromatographic enantioselectivity, α , on the column length L (left panel) and on the column i.d. (right panel)

L (cm)	d (cm)	α	L (cm)	d (cm)	α
5	0.46	1.92	10	0.2	1.48
10	0.46	2.13	10	0.3	1.82
20	0.46	2.31	10	0.46	2.13