

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Biomérnök és gyógyszervegyész-mérnök hallgatók számára

Kormány Róbert

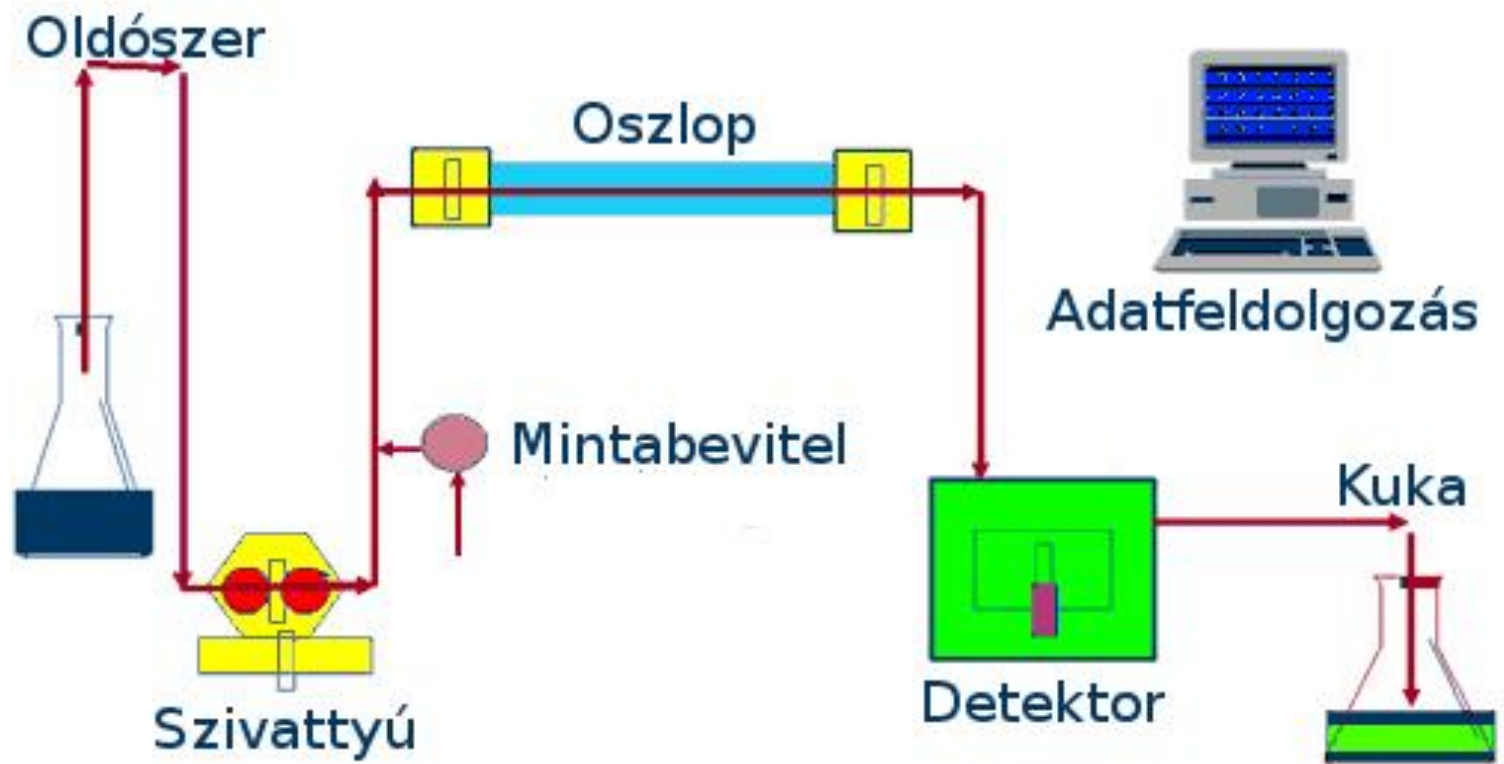
2019. április

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Kényszeráram, UV detektor



Horváth Csaba
(1930-2004)



(U)HPLC

(Ultra) High Performance
Pressure Precision
Price Liquid Chromatography

Fontos folyadékkromatográfiás mérföldkövek – I.

- 1903 Mihail Szemjonovics Cvet orosz botanikus növényi színanyagok tanulmányozására kifejlesztette az oszlopkromatográfiás eljárást, ezzel megalkotta az első folyadékkromatográfiás rendszert (oszlopkromatográfia).
- 1937-ben az Erzsébet Tudományegyetemen (Pozsonyból helyezték Pécsre 1921-ben) Zechmeister László és Cholnoky László a karotinoidok vizsgálatával, azok kromatográfiás elválasztásával foglalkozott. Megjelentették az első kromatográfiás könyvet: „Die chromatographische Adsorptionsmethode” címmel.
- 1952-ben, a megoszlási kromatográfia terén végzett munkásságukért Archer John Porter Martin és Richard Laurence Millington Synge, Nobel-díjat kaptak.
- A '60-as évek közepére a mezőgazdaság és gyógyszeripar számára olyan elválasztási technika kifejlesztése vált szükségessé, amellyel megvalósítható a nem illékony komponensek elválasztása és pontos mennyiségi meghatározása. 1964-65-ben az első ilyen készüléket Horváth Csaba építette meg a Yale Egyetemen. A módszert nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiának (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) nevezte el.
- A HPLC „gyermekora” az 1960-70-es évekre tehető. Az első HPLC készülékek a '60-as évek végén kerültek kereskedelmi forgalomba. A kezdeti HPLC-elválasztások folyadék-folyadék megoszláson vagy adszorpción alapultak és szabálytalan alakú, 50-300 μm szemcseméretű ipari szorbenseket (szilikagél, alumínium-oxid, aktív szén) alkalmaztak.

Fontos folyadékkromatográfiás mérőkövek – II.

- A '70-es években megoldották a kis szemcseméretű (10-15 μm) szorbensek előállítását és hatékony oszlopok töltését. A kémiai kötött állófázisok kifejlesztése a folyadék-folyadék megoszlásos kromatográfia sok problémáját megoldotta. A hidrofób csoportokkal borított, ún. fordított fázisú töltetek széles körben kerültek alkalmazásra, megnövelve az elválasztható komponensek körét, lehetővé tették a gradiens elúció alkalmazását.
- Hosszú ideig csak a számítógépes vezérlés és adatgyűjtés jelentette a fejlesztést. Ez a rendszer lett a gyógyszeripar fő analitikai módszere. A kolonna töltetek viszont, amelyek döntő többségét a szilikagél alapúak jelentették, a nagy fémion tartalmuk, nagy szilanolcsoport aktivitás és a kis borítottságuk miatt számos feladat megoldásánál nehezen reprodukálhatóvá tették a módszereket. Sokszor sarszról sarsra változtak a kolonnák felületi fizikai-kémiai tulajdonságai és ez visszaköszött az elválasztásban. Ekkor a fő feladat a kolonnatechnológia fejlesztése volt. Kisebb fémion tartalmú, kisebb szilanolcsoport aktivitású, jól borított állófázisok és sarszról sarsra való azonosság jelentették a fő célokat. A '90-es évek végére, a 2000-es évek elejére a kolonnatechnológia területén sikerült ezeket elérni, sőt megjelentek az 5 μm alatti szemcseátmérőjű töltetek és a monolitok.
- 2004-ben kereskedelmi forgalomba kerül az első 1000-bar nyomásesést bíró, kis zónadiszperziójú folyadékkromatográfiás rendszer, melyet UPLC™-nek (Ultra Performance Liquid Chromatograph) neveztek el. A készülék megjelenésével egy időben megjelenik az első sub-2- μm -es töltet is.
- 2007-ben Halo™ néven forgalomba hozzák az első modern héjszerkezetű töltet, majd két évvel később, 2009-ben „világhódító” útjára indul Kinetex™.

The „Hungarians” (Hungarian Mafia)



Fig. 95. As Fig. 83. The “Hungarians”: I. Molnár, Cs. Horváth, L. S. Ettore, G. Szekely, I. Halász and E. sz. Kováts.

Kromatográfiás technikák csoportosítása

A komponens vándorlását (migrációját) okozó erő

nyomáskülönbség
hatására mozgó fázis

elektromos erőter
hatására mozgó fázis

mozgófázis

állófázis

elnevezés

gáz

folyadék

gáz-folyadék kromatográfia

gáz

adszorbens

gáz-szilárd kromatográfia

folyadék

szilárd

folyadék

folyadékkromatográfia

fluid

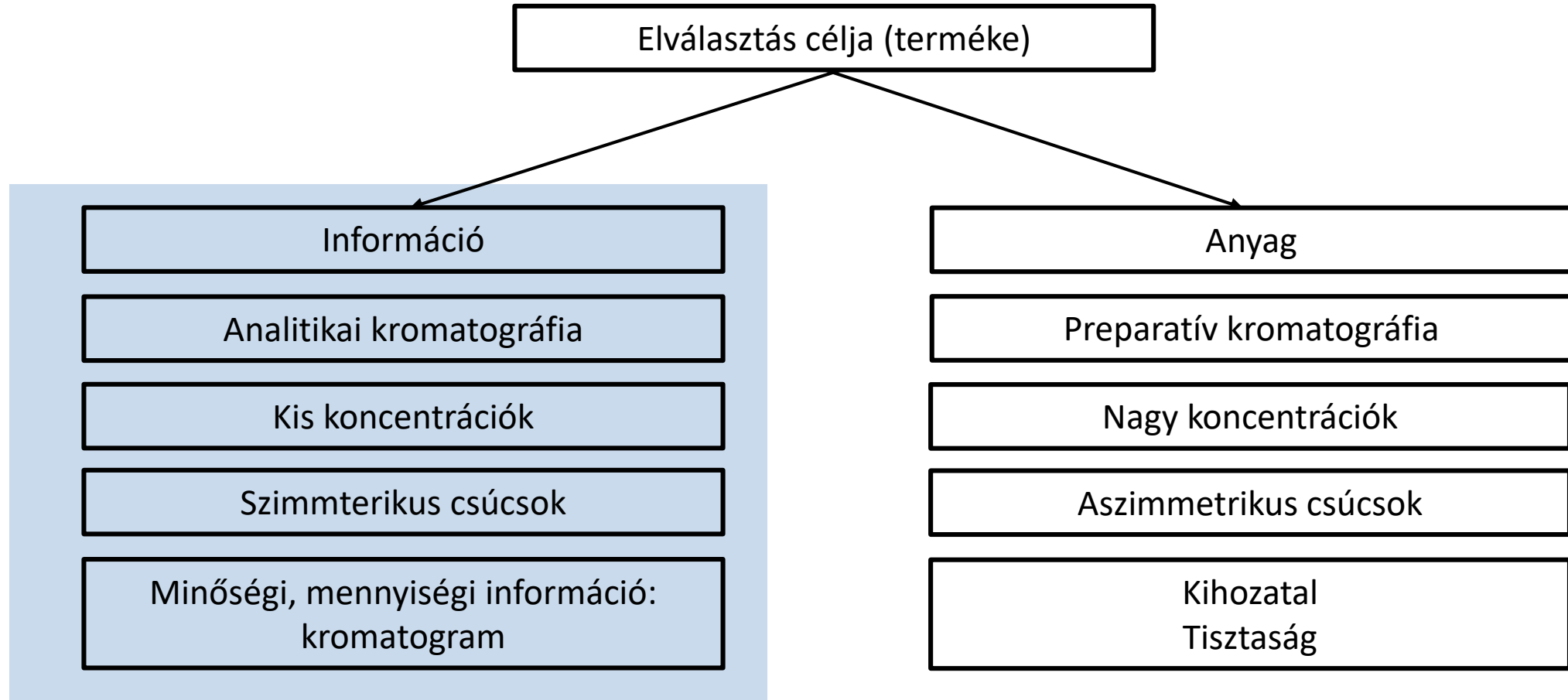
szilárd

folyadék

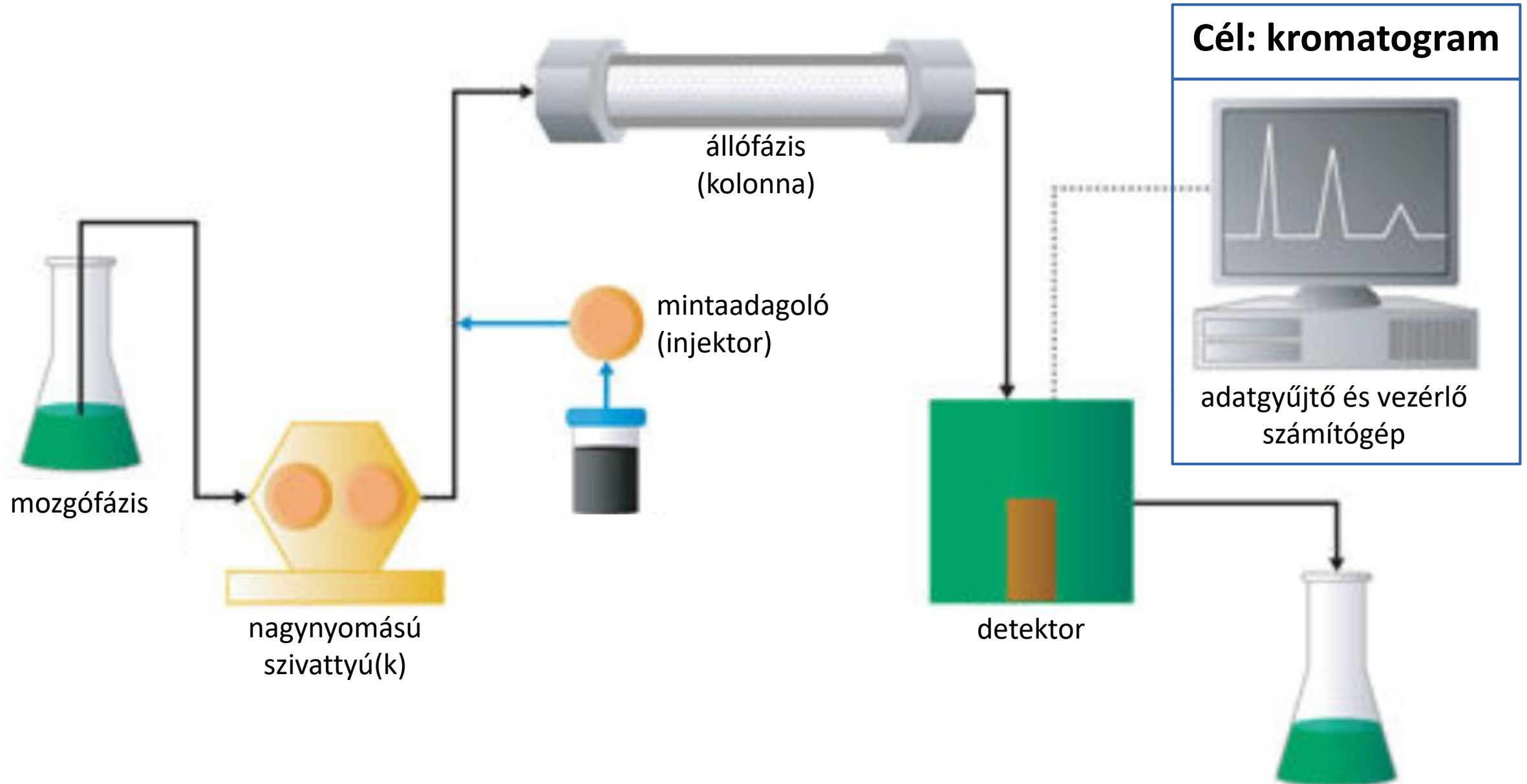
szuperkritikus kromatográfia

kapilláris elektroforézis
micelláris elektrokinetikus kromatográfia
kapilláris gélelektroforézis
elektrokromatográfiás módszerek

Kromatográfiás technikák csoportosítása

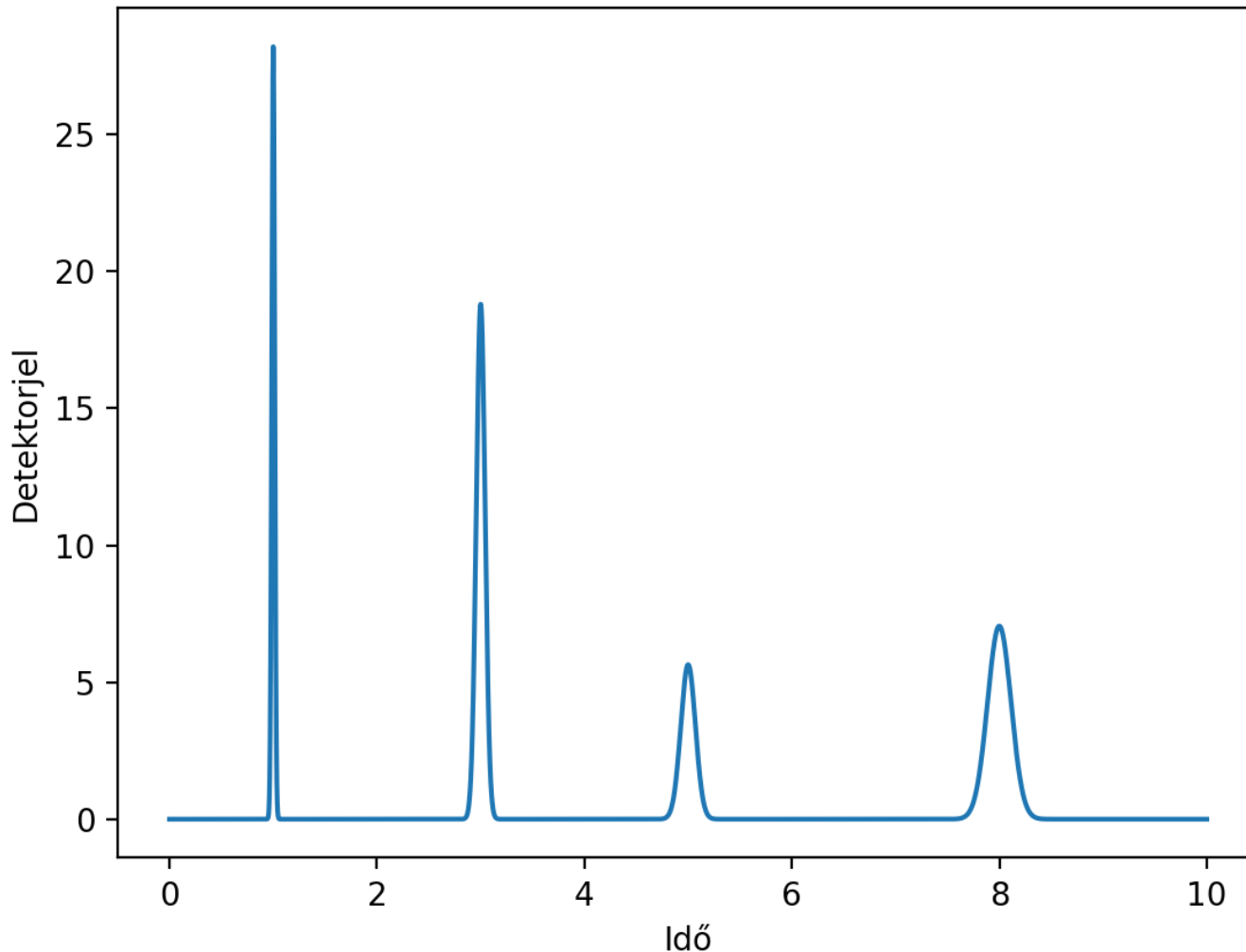


Analitikai folyadékkromatográfia



Kromatogram

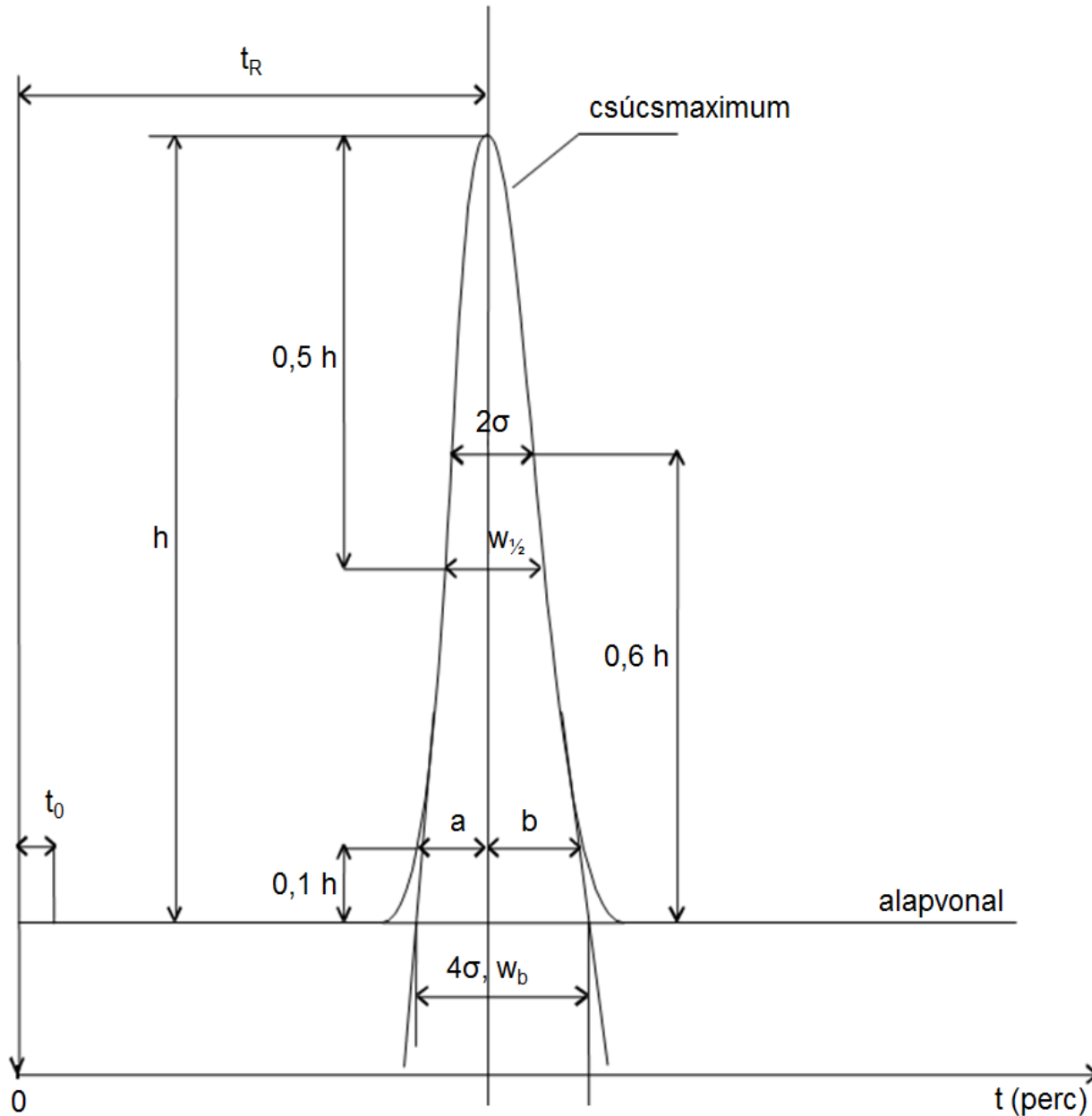
Detektor által szolgáltatott elektromos jel az idő függvényében ábrázolva



Kromatogram alapján:

- minta összetétel (minőségi analízis)
- alkotók koncentrációja (mennyiségi analízis)
- elválasztás hatékonysága
- elválasztás szelektivitása
- elválasztás mechanizmusa (izoterma, speciális esetekben)

Kromatográfiás csúcs (sáv)



- t_R – retenciós idő
- h – csúcsmagasság
- w – csúcsszélesség
- σ – szórás

Retenció, visszatartás

Eltérő vándorlási sebesség → eltérő idő az oszlopon történő keresztülhaladásra

Retenciós idő, t_R : az analízis kezdete és a komponens detektorban történő megjelenése között eltelt idő, komponensre jellemző → minőségi információt hordoz

$$t_R = t_0 + t'_R$$

- t_0 – holtidő, a mozgó fázisban eltöltött idő
- t'_R – nettó retenciós idő, az állófázison eltöltött idő

$$u_A = u_0 \frac{n_m}{n_m + n_s} = u_0 \frac{1}{1 + \frac{n_s}{n_m}} = \frac{u_0}{(1+k)}$$

- u_0 – mozgófázis lineáris sebessége (pl. cm/perc)
- n_m – komponens mennyisége a mozgóf.-ban
- n_s – komponens mennyisége az állóf.-ban

$$t_R = \int_0^L \frac{dz}{u_A} = \frac{L}{u_A} = \frac{L}{u_0} (1+k) = t_0 (1+k)$$

ha k állandó az analízis során!!!

Retenció, visszatartás

Retenciós térfogat, V_R : a retenciós idő alatt felhasznált mozgófázis mennyisége (ml)

$$V_R = t_R F$$

- F – mozgófázis térfogatárama (ml/perc)

Retenciós tényező, k : komponensek vándorlási sebességét befolyásoló paraméter

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{V_s c_s}{V_m c_m} = \varphi K = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

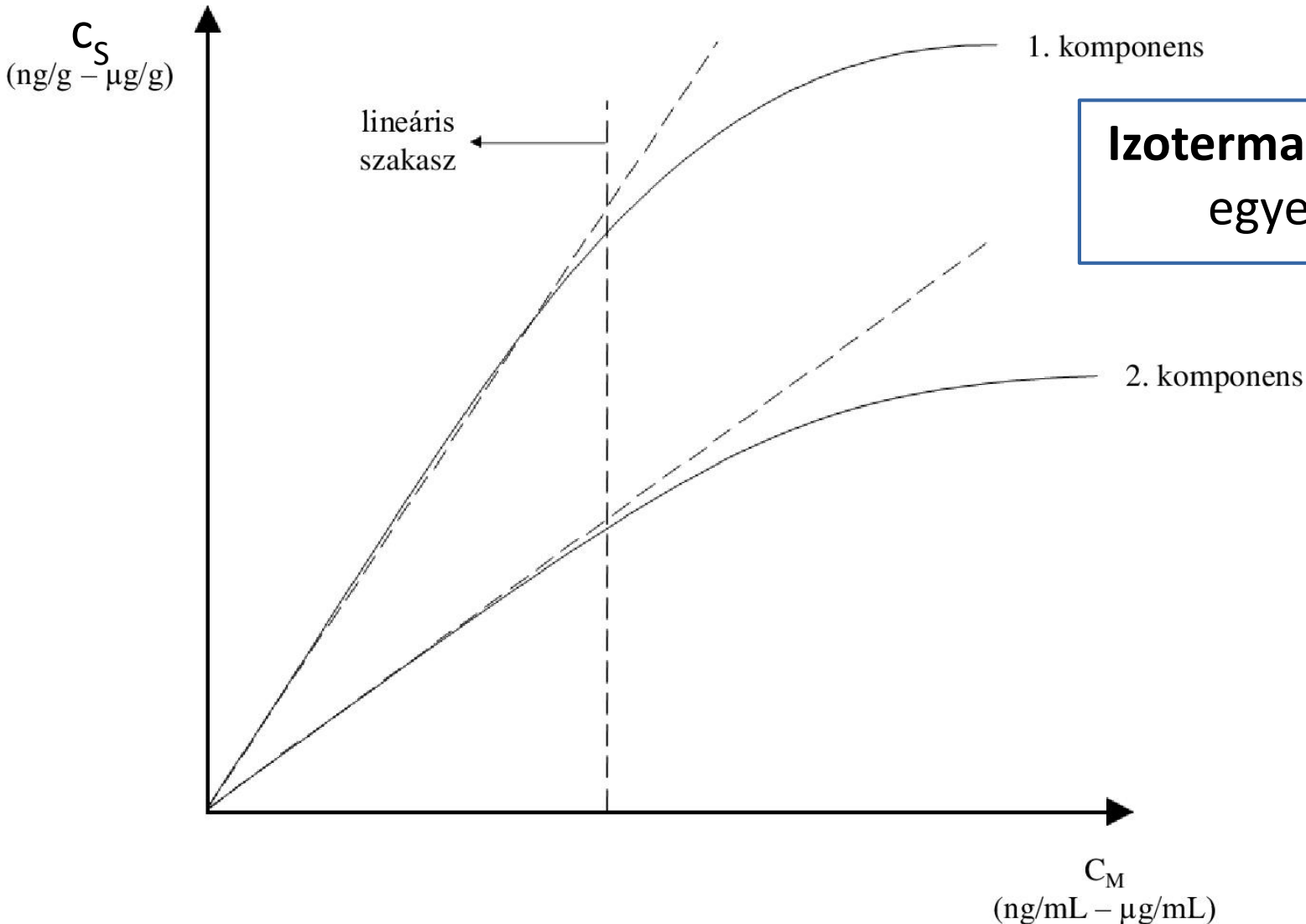
- K – megoszlási hányados, Henry-állandó: termodinamikai egyensúlyi állandó
- φ - fázisarány

Retenciós idő, t_R : függ a mozgófázis sebességétől, oszlophossztól, retenciós tényezőtől

Retenciós térfogat, V_R : függ az oszlophossztól, retenciós tényezőtől

Retenciós tényező, k : függ a retenciós tényezőtől

Retenció jellemzése



Izoterma: kapcsolat az álló és mozgófázisbeli egyensúlyi koncentrációk között

Lineáris (kis koncentrációk)

$$c_s = q_s b_s c_m = K c_m$$

Langmuir (egyrétegű)

$$c_s = \frac{q_s b_s c_m}{1 + b_s c_m}$$

BET (többrétegű)

$$c_s = \frac{q_s b_s c_m}{(1 - b_l c_m)(1 - b_l c_m + b_s c_m)}$$

Elválasztás sikere

Sikeres az elválasztás, mert. . .

- a komponensek különböző időpontban érkeznek a detektorba
- keskenyek a csúcsok (sok komponens választható el)

Szelektivitás

Az elválasztás termodinamikai lehetőségét mutatja meg

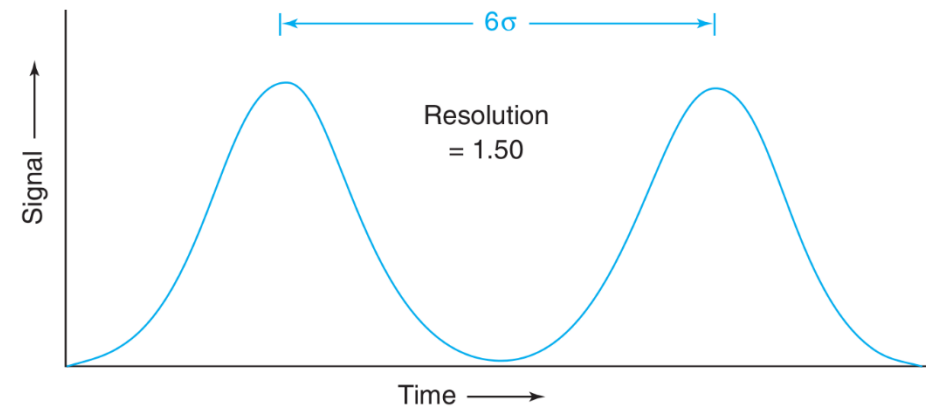
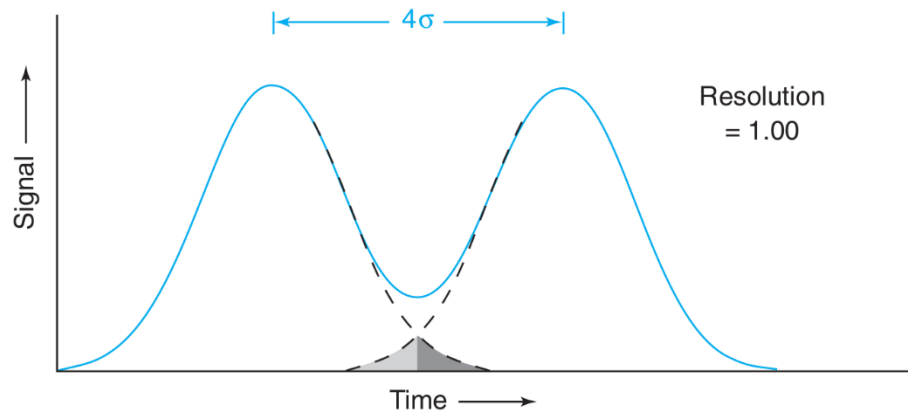
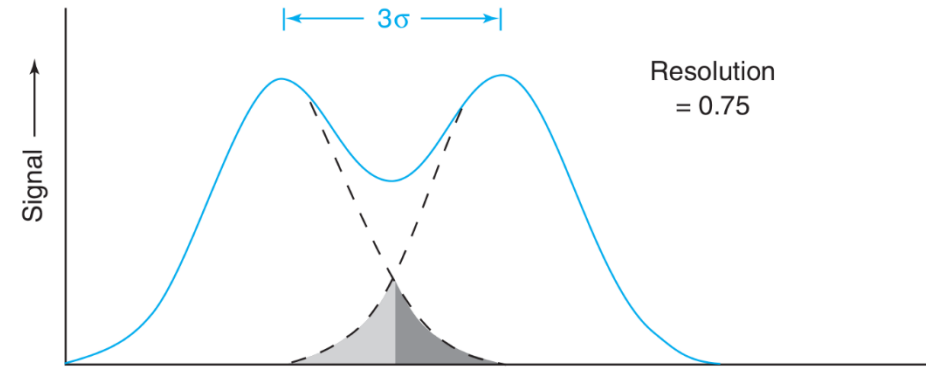
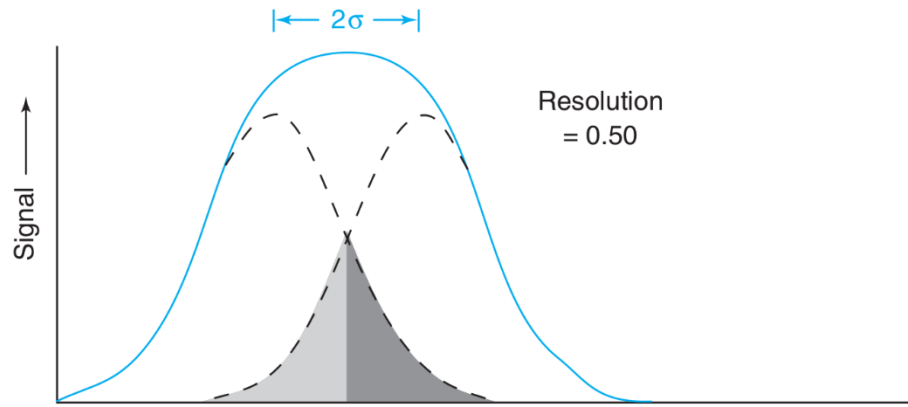
$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t'_{R,B}}{t'_{R,A}} \geq 1$$

- ha = 1, elválasztás nem lehetséges
- ha > 1, elválasztás lehetséges

Elválasztás hatékonysága

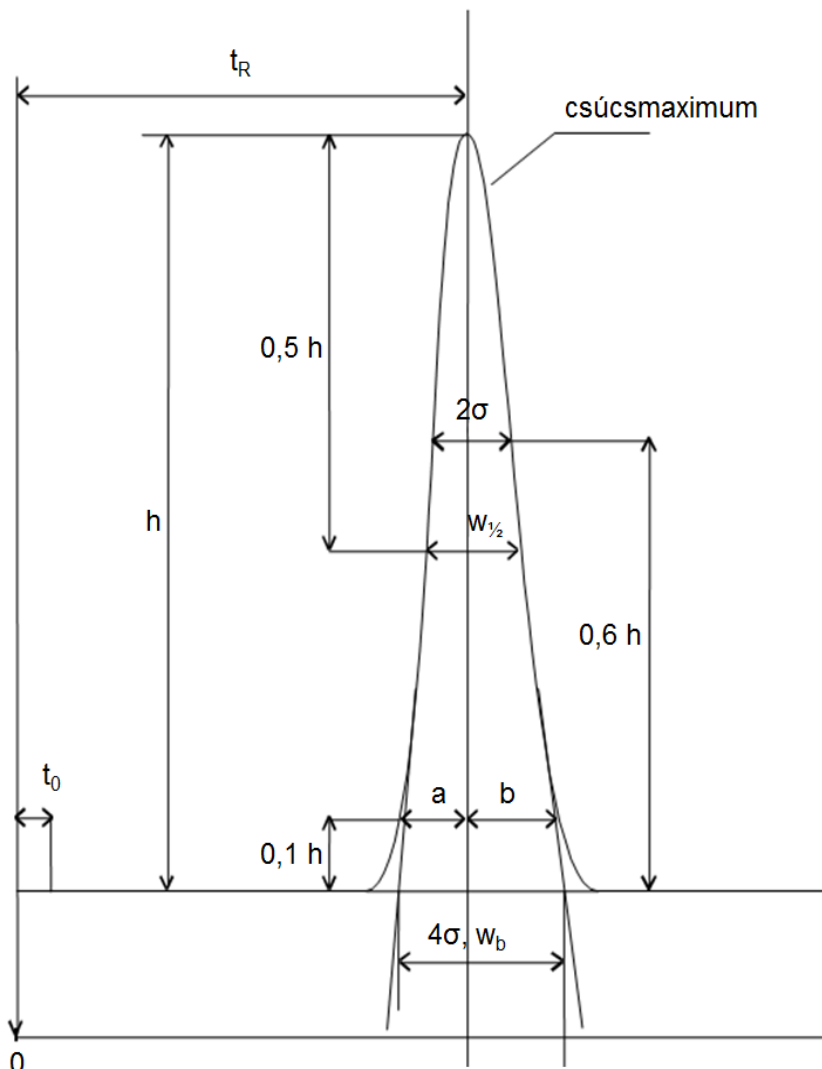
- Felbontás -

$$R_S = \frac{\Delta t_R}{W} = 2 \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{W_B + W_A}$$



Elválasztás hatékonysága

- elméleti tányérszám, elméleti tányérmagasság -



$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \approx 16 \frac{t_R^2}{w^2} \approx 5.55 \frac{t_R^2}{w_{1/2}^2}$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma_z^2}{L}$$

Kromatográfiás csúcs szórása (szélessége):

- a komponens sávjának szórása az oszlopban, σ_z
- a sáv kilépési sebessége, u_A

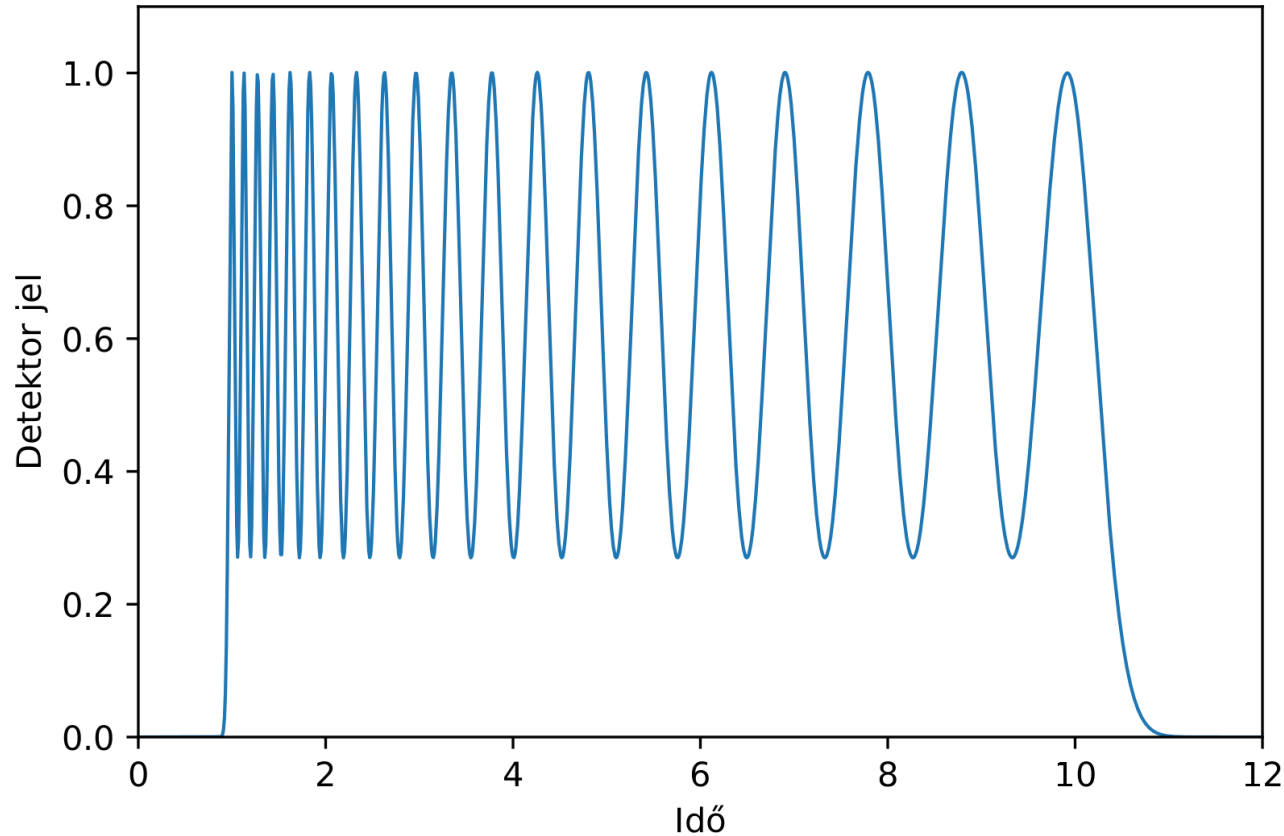
$$\sigma_z^2 = H L = \frac{L^2}{N} \quad \text{Mindegyik komponens sávja ugyanolyan széles!!!}$$

$$\sigma = \frac{\sigma_z}{u_A} = \frac{\sigma_z}{u_0} (1+k) = \frac{\sigma_z}{L} t_0 (1+k) = \frac{\sigma_z}{L} t_R = \frac{1}{\sqrt{N}} t_R$$

A csúcshélesség egyenesen arányos a retenciós idővel

Elválasztás hatékonysága

- csúcskapacitás -



$$n \sim \frac{t_{R,n} - t_{R,1}}{W}$$

$$n = 1 + \int_{t_1}^{t_n} \frac{1}{W} dt$$

$$n = 1 + \frac{\sqrt{W}}{4} \ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}}$$

Maximálisan (potenciálisan) elválasztható komponensek száma

Zónaszéleledés okai

Sávszéleledés:

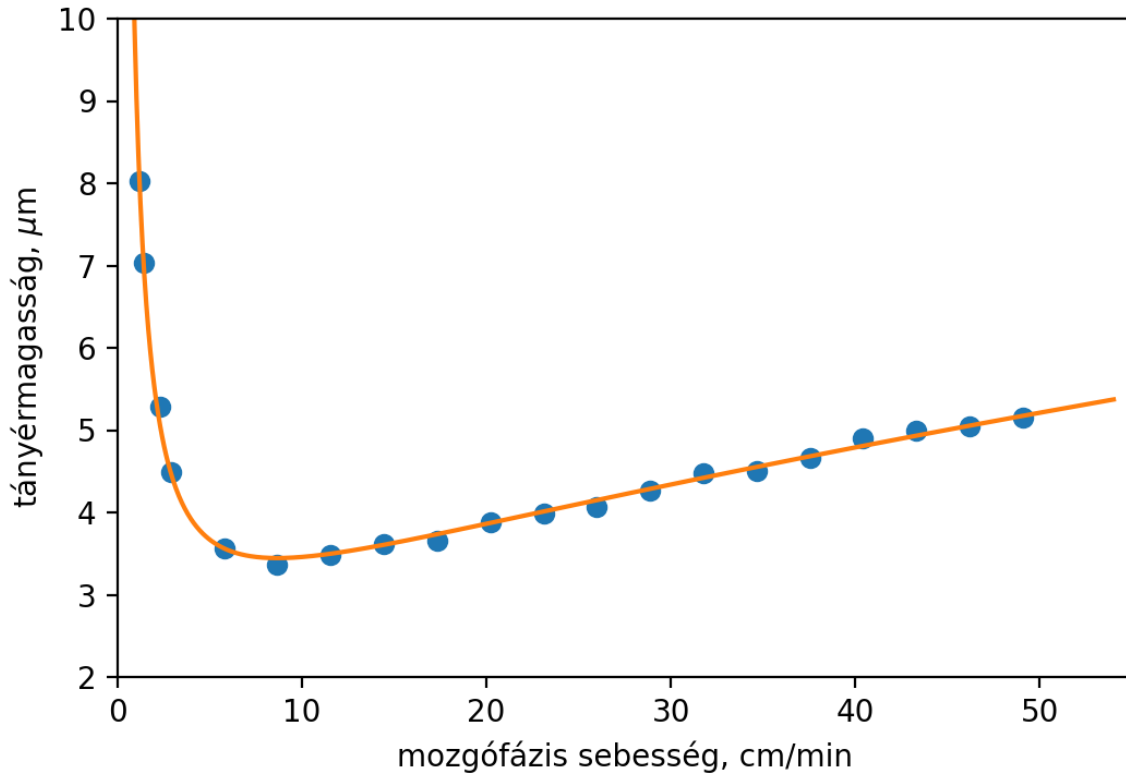
- oszlop előtti hatások (injektálás, csövek, összeköttetések)
- **oszlopon belüli sávszéleledés**
- oszlop utáni hatások (detektor, csövek, összeköttetések)

Kromatográfiás rendszer hatékonyságában
mindhárom tényező kiemelten fontos szerepet játszik!

Zónaszélesedés okai

- oszlopon belüli sávszélesedés -

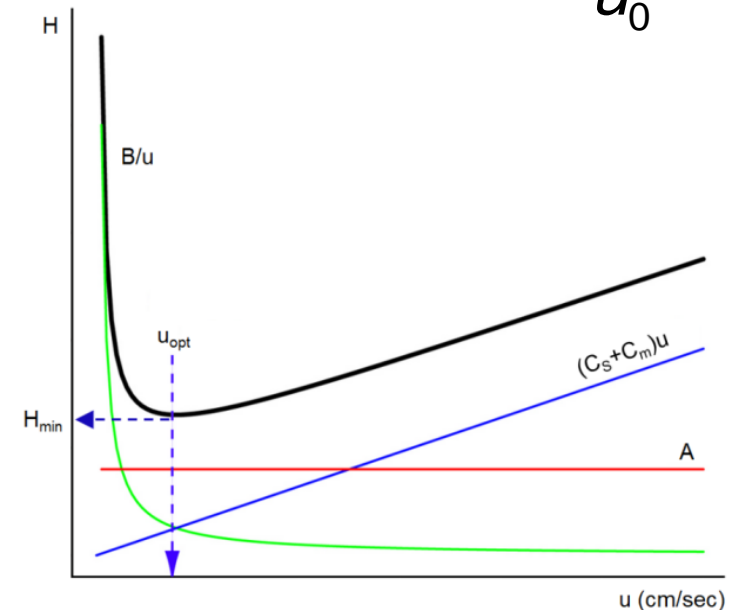
$$\sigma_z^2 = H L$$



Knox-egyenlet:

$$H = A u_0^{1/3} + \frac{B}{u_0} + C u_0$$

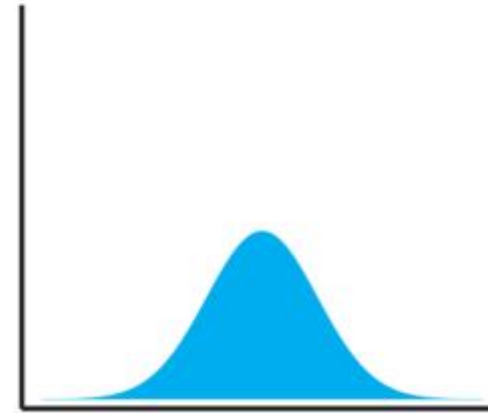
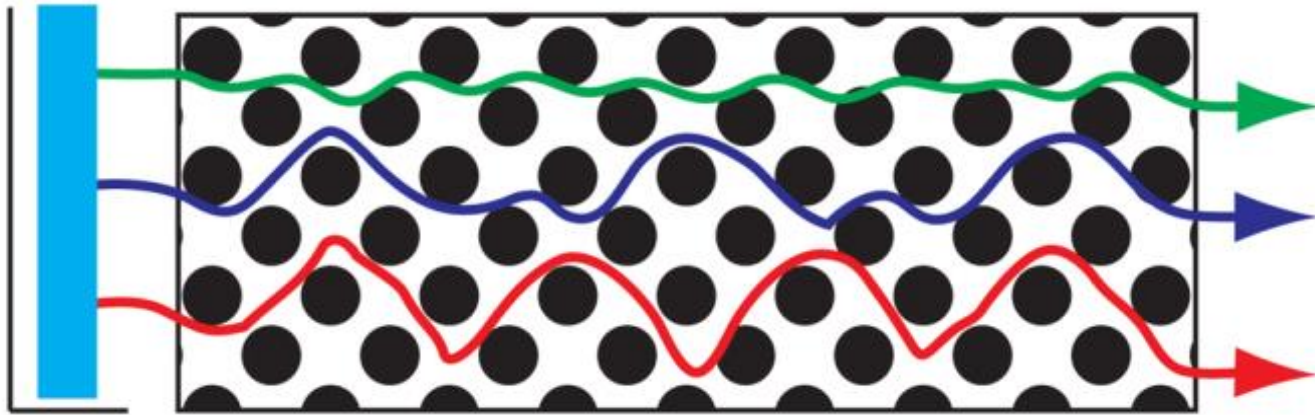
van Deemter-egyenlet: $H = A + \frac{B}{u_0} + C u_0$



Zónaszélesedés okai

- „örvény diffúzió” -

Befutott utak különböznek

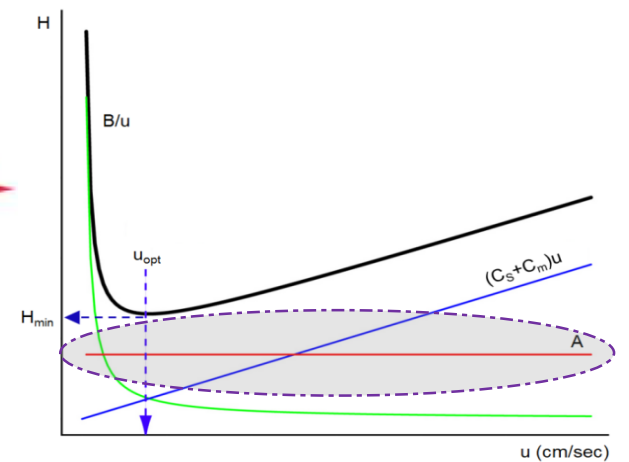


induló zóna

végső zóna



$H = A$ vagy $H = A u_0^{1/3}$



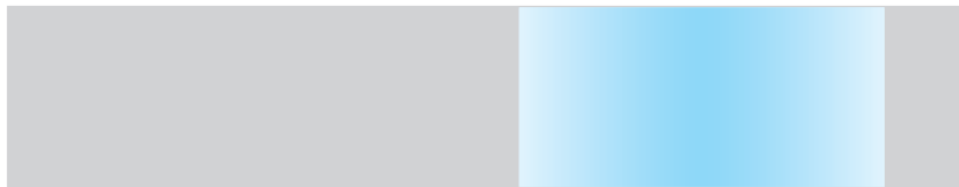
Zónaszélesedés okai

- molekuláris diffúzió -

Sávszélesedés koncentráció gradiens miatt



Komponens zónája
rövidebb tartózkodási idő után

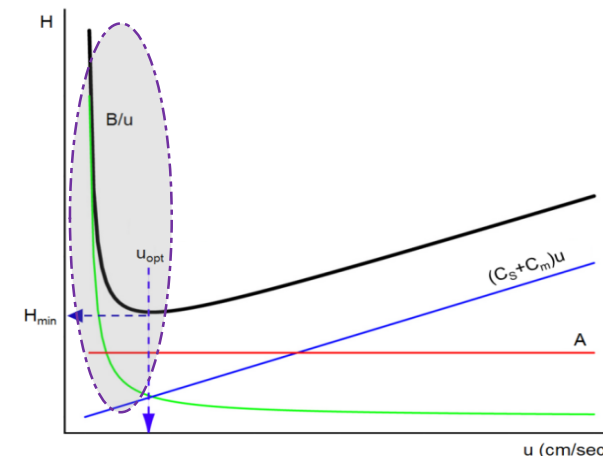


Komponens zónája
hosszabb tartózkodási idő után

→
Áramlás iránya

$$\sigma_z^2 = 2 D_m t = 2 D_m \frac{L}{u_0}$$

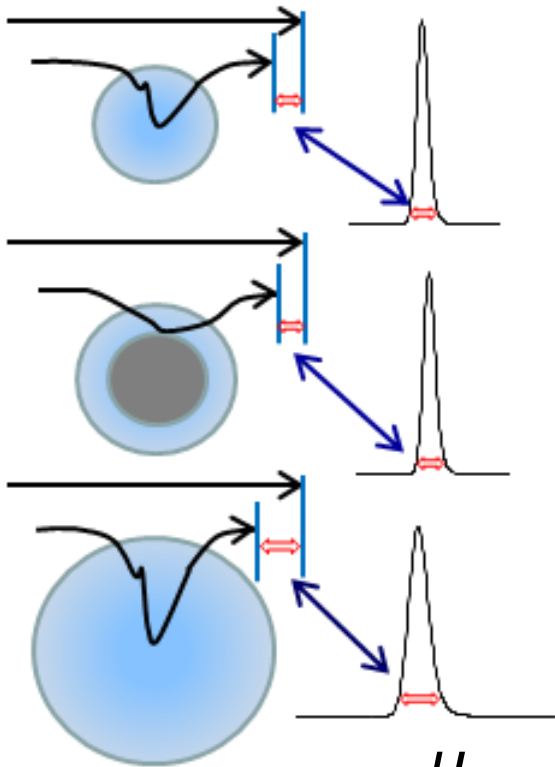
$$H = \frac{\sigma_z^2}{L} = \frac{2 D_m}{u_0} = \frac{B}{u_0}$$



Zónaszélesedés okai

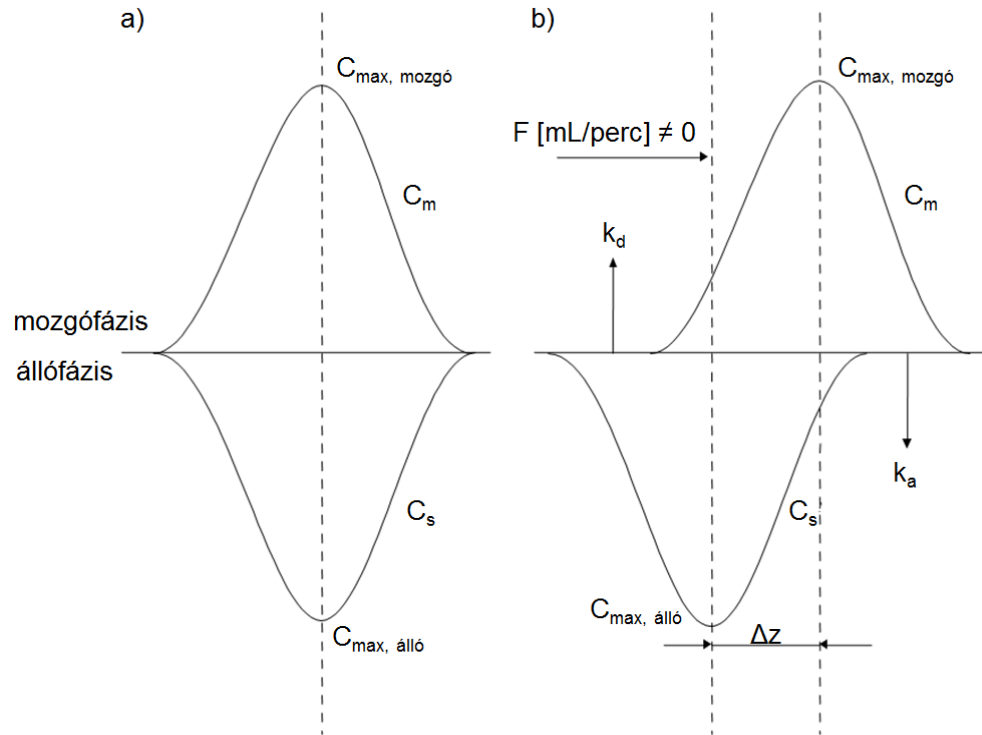
- anyagátadási gátlás -

Pórusdiffúzió



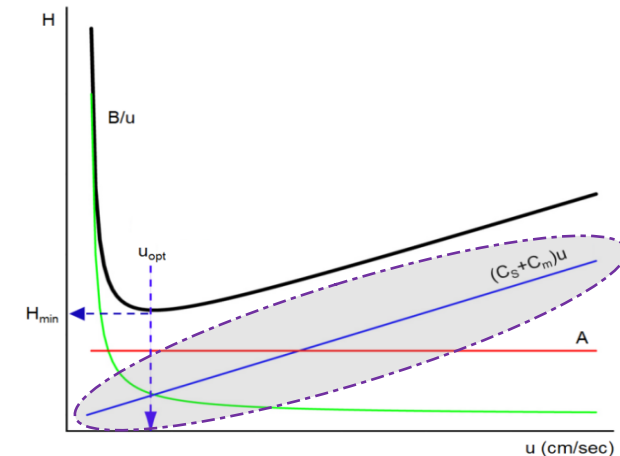
$$H \propto \frac{u_0}{r_p^2}$$

Adszorpció kinetikája



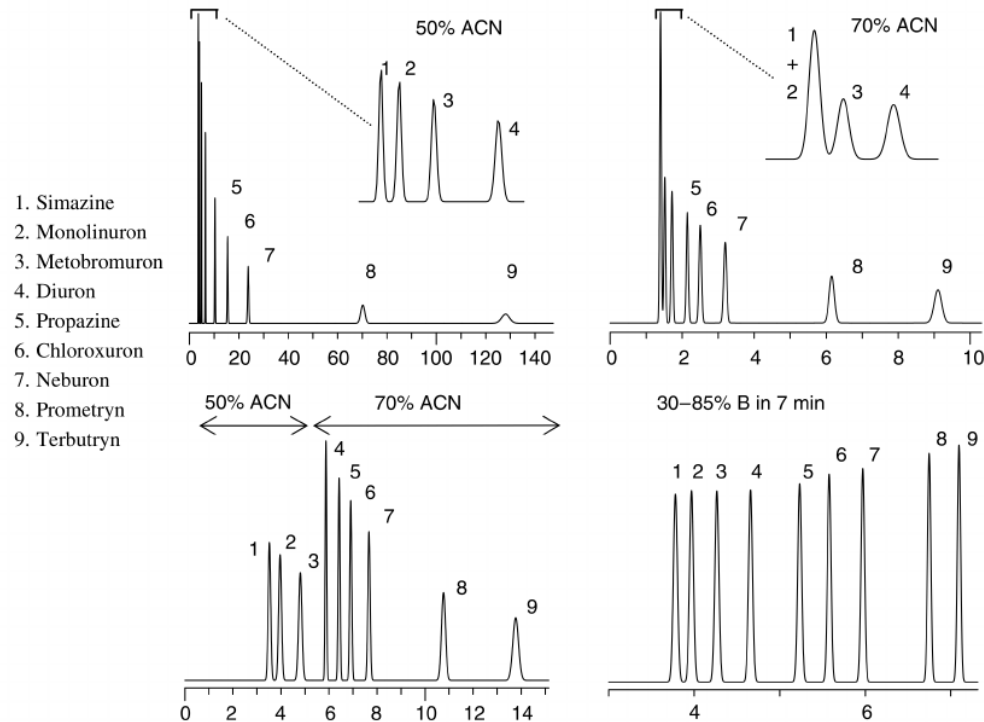
$$H \propto \frac{u_0}{k_{ads}}$$

$$H = C u_0$$

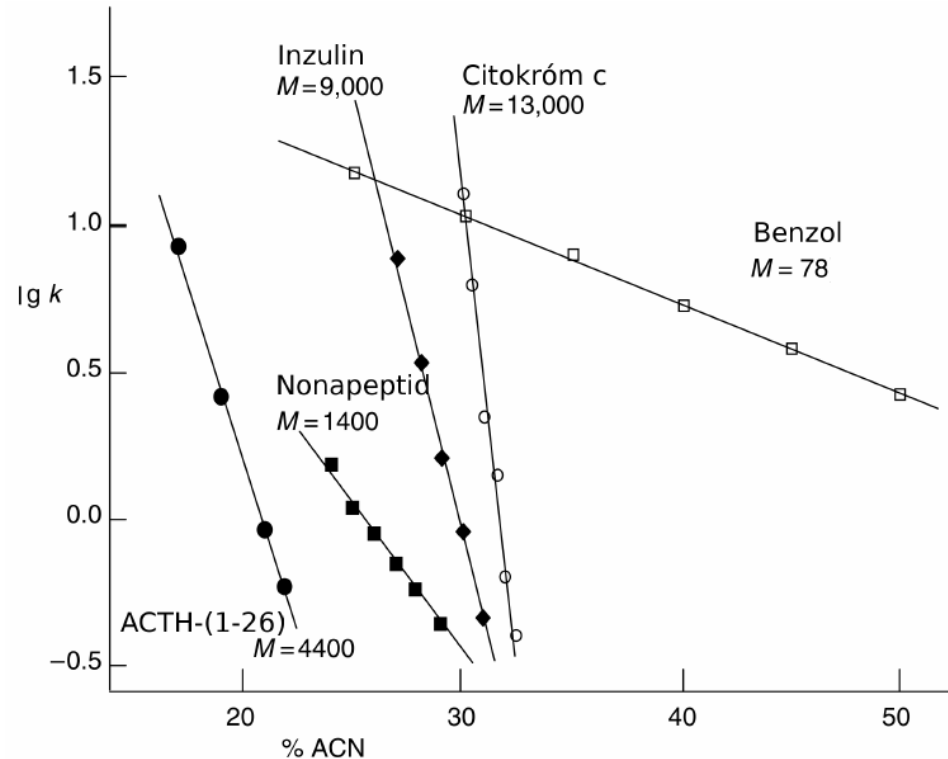


Gradiens elúció

Az elválasztás során a mozgófázis összetételének megváltoztatása a mintakomponensek retenciójának fokozatos csökkentése céljából.



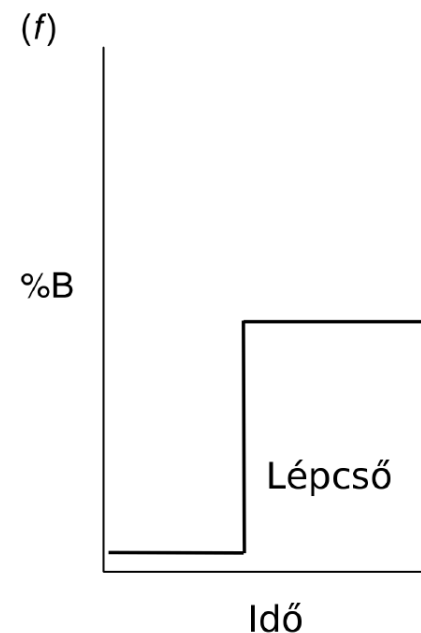
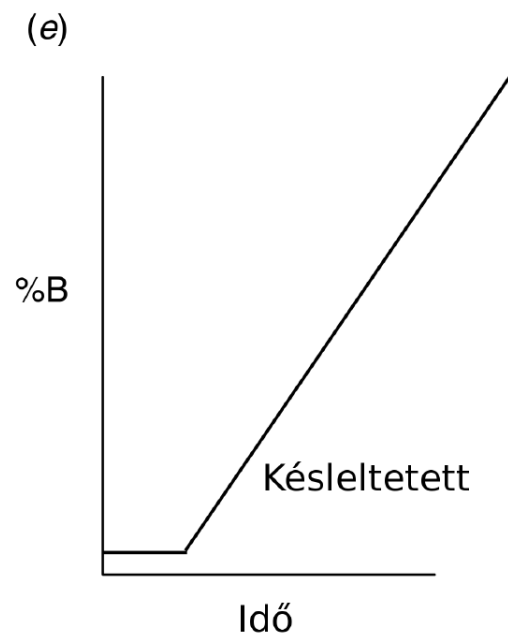
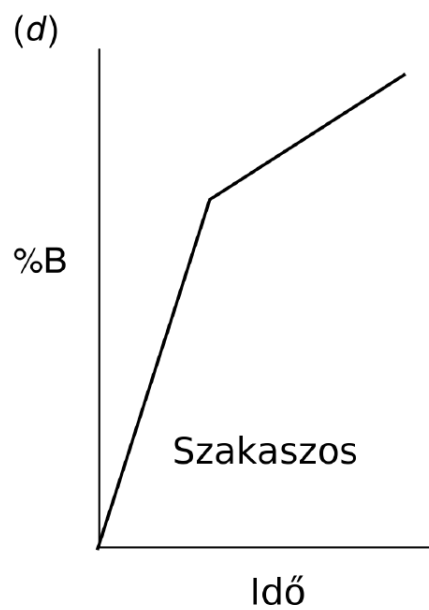
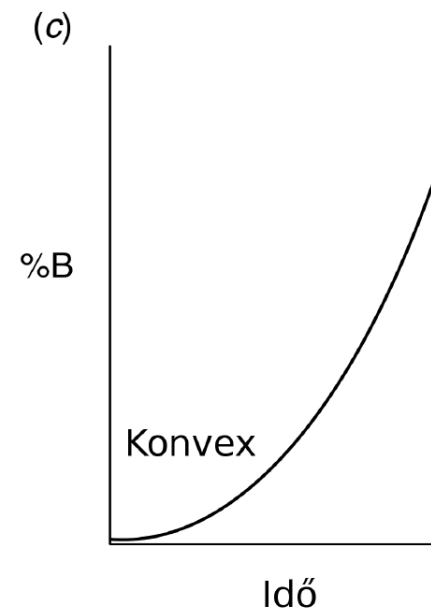
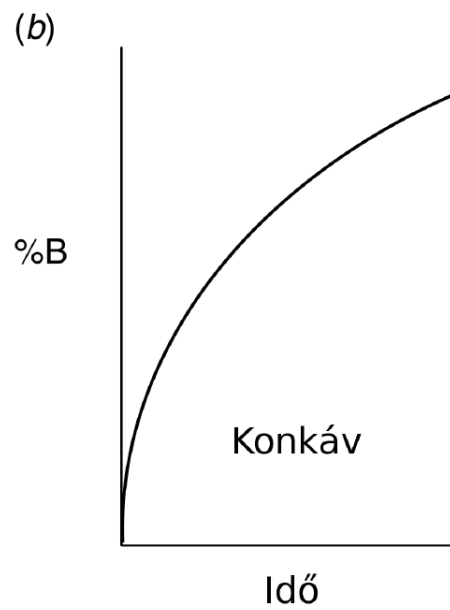
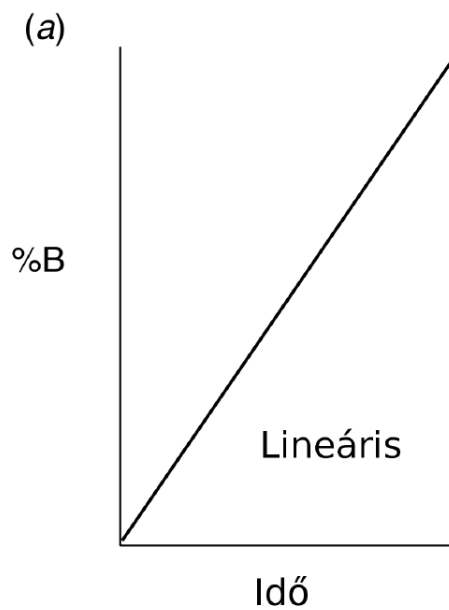
1. Általános elúciós probléma



2. Nagymolekulák elválasztása

3. Univerzális analitikai módszer

Gradiens kivitelezése



Retenció a gradiens kromatográfiában

Izokratikus

$$u = \frac{u_0}{1 + k}$$

$$k = \frac{n_s}{n_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$

$$t_R = \frac{L}{u} = t_0 (1 + k)$$

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Gradiens

$$\int_0^{t_R - t_0} \frac{dt}{k(t)} = t_0$$

$$k[\varphi] = k_w \exp(-S \varphi)$$

$$\varphi[t] = \varphi_0 + \frac{\Delta\varphi}{t_G} t$$

$$b = S t_0 \frac{\Delta\varphi}{t_G}$$

$$t_R = t_0 \left(1 + \frac{\ln(k_{\varphi_0} b + 1)}{b} \right)$$

Hatékonyág a gradiens kromatográfiában

Izokratikus

$$\sigma_z^2 = H z$$

$$\sigma_t^2 = H z \left(\frac{1+k}{u_0} \right)^2$$

$$w \simeq \frac{4}{\sqrt{N}} t_0 (1+k) >$$

Gradiens

$$\sigma_z^2 = H z G$$

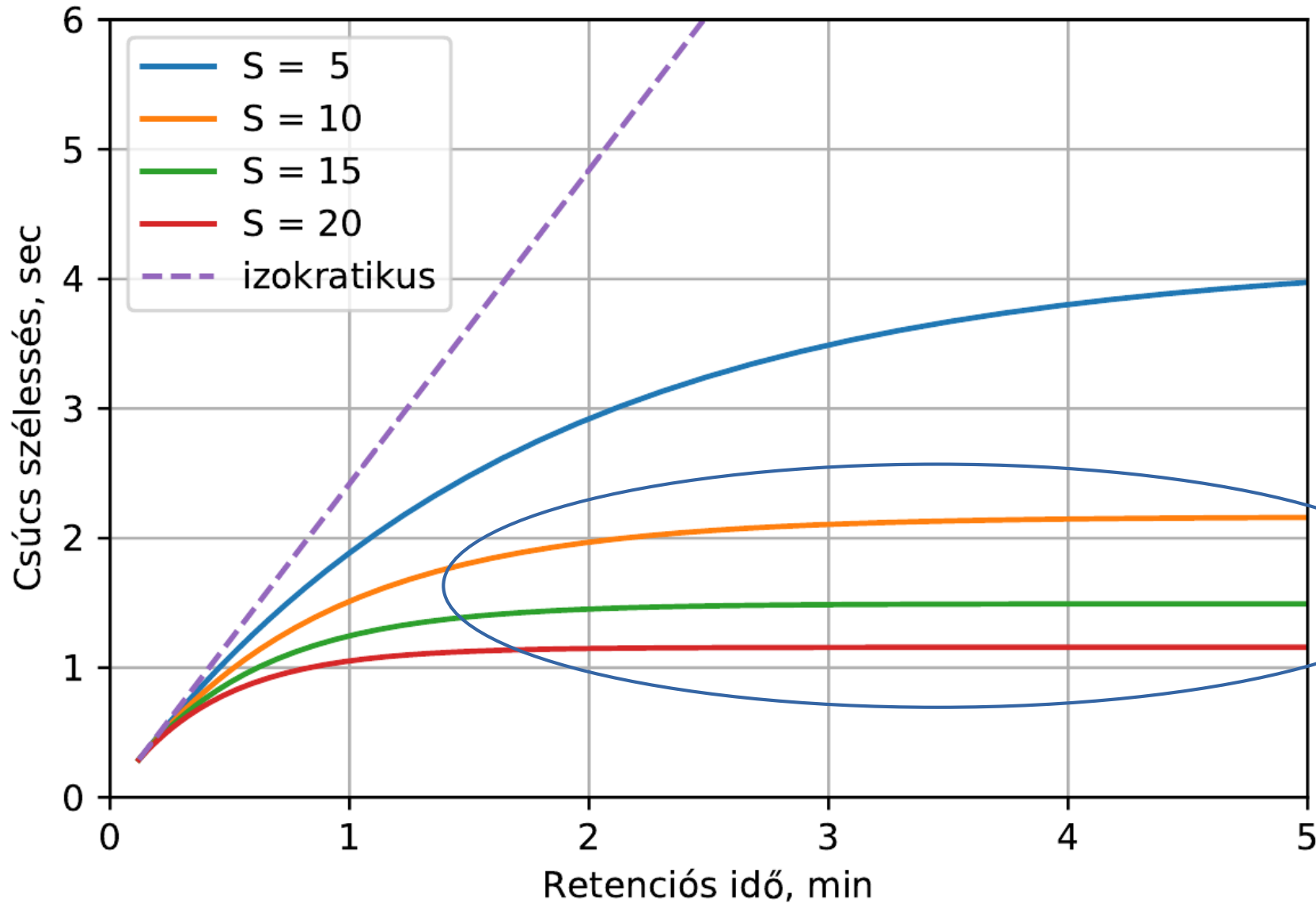
$$\sigma_t^2 = H z \left(\frac{1+k[L]}{u_0} \right)^2 G$$

$$w \simeq \frac{4}{\sqrt{N}} t_0 (1+k[L]) G$$

$$G = \frac{1+p+\frac{1}{3}p^2}{(1+p)^2}$$

$$p = \frac{S L \Delta\varphi}{u_0 t_G} \frac{k[0]}{1+k[0]}$$

Csúcsszélesség a gradiens kromatográfiában



Csúcsok kevésbé, vagy egyáltalán nem szélesednek (szemben az izokratikussal)

Csúcskapacitás a gradiens kromatográfiában

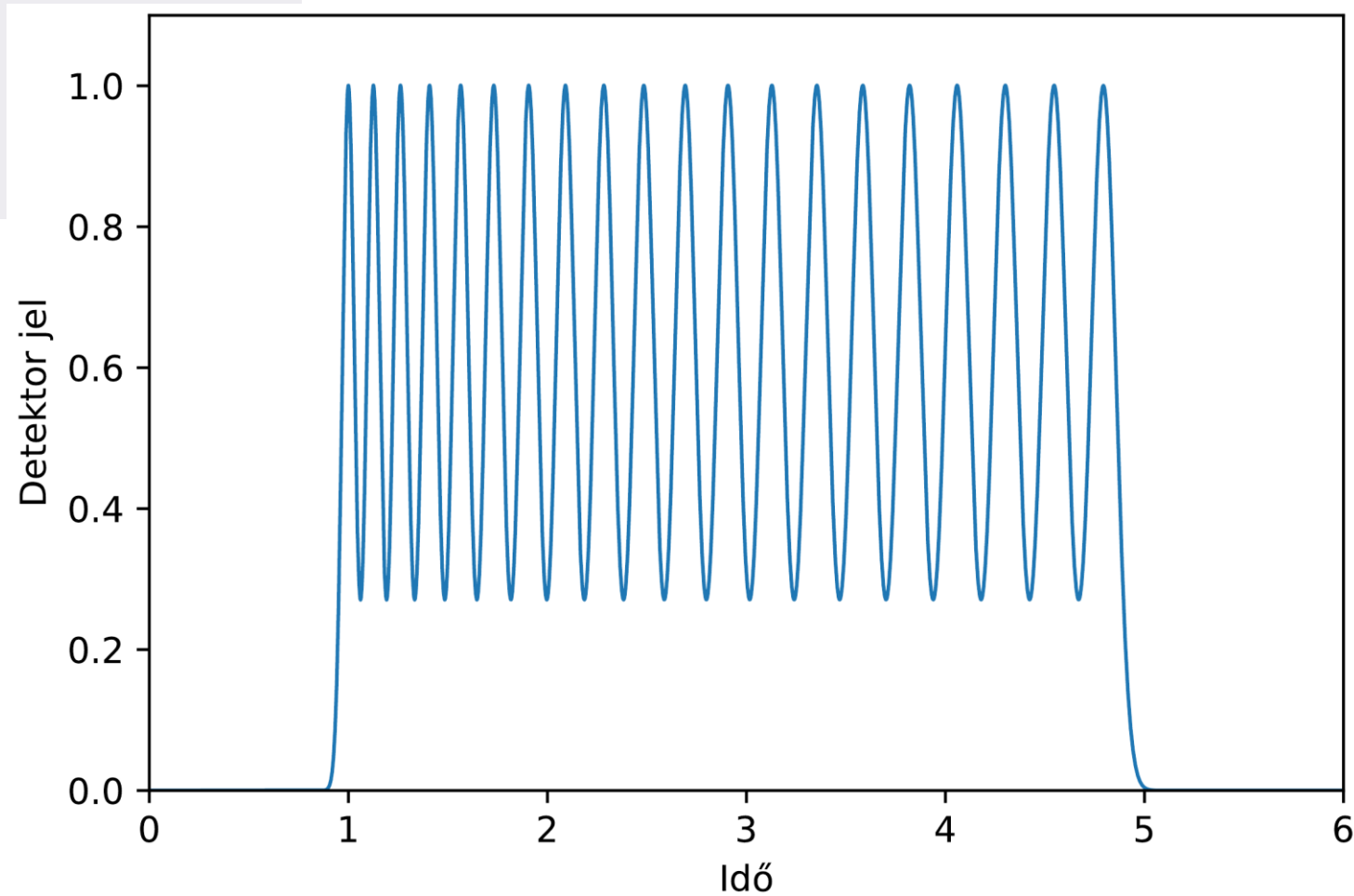
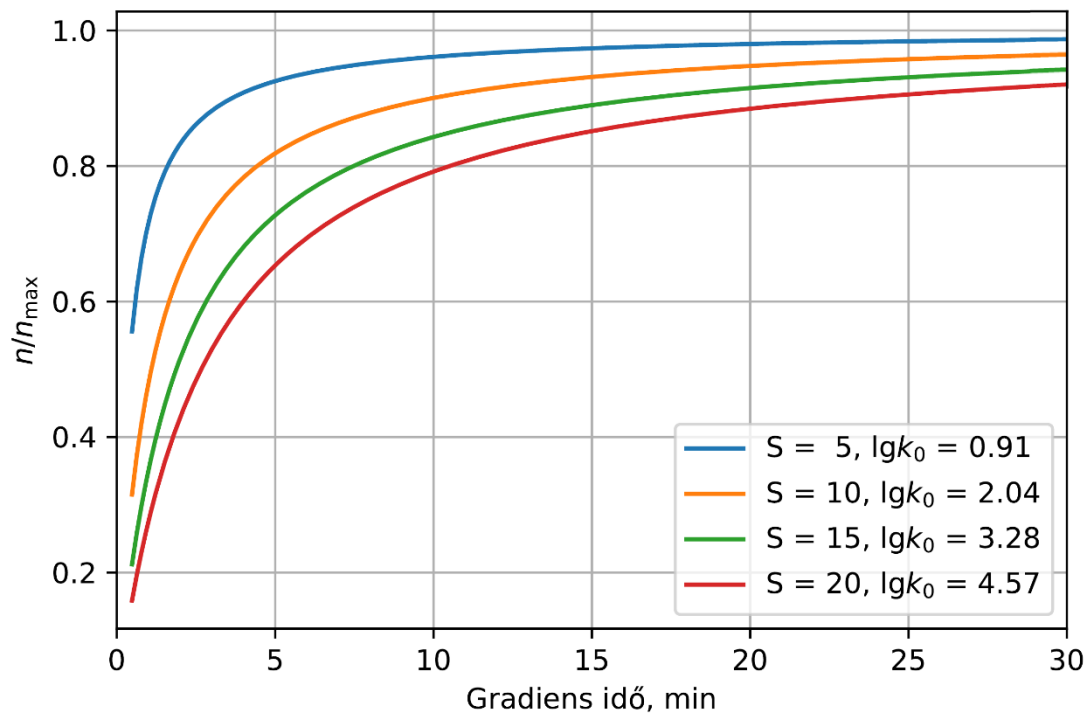
$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{1}{Q} \ln \left(\frac{\frac{b}{6} + \frac{1}{b} (Q^2 \tau_n - 1) + \Theta_n Q \tau_n (1 + k_{L,n})}{1 + \frac{b}{2} + Q} \right)$$

$$b = S t_0 \frac{\Delta\varphi}{t_G}$$

$$Q = \sqrt{1 + b + \frac{1}{3} b^2}$$

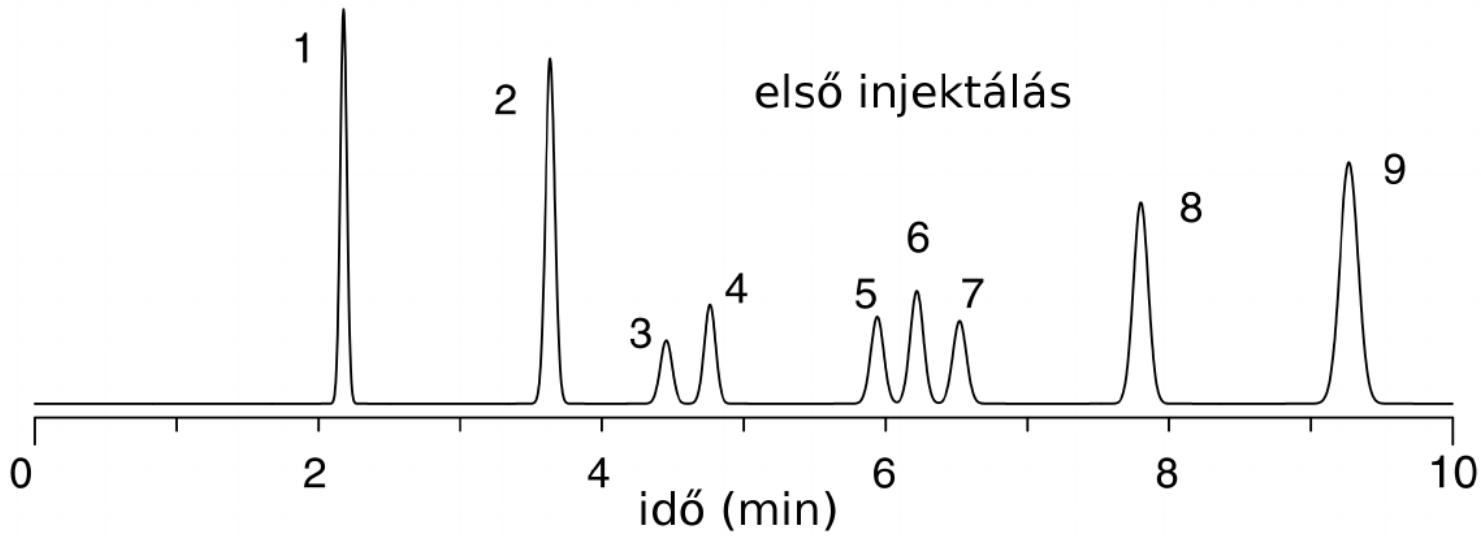
$$\tau_n = \exp \left[b \left(\frac{t_n}{t_0} - 1 \right) \right]$$

$$n_{\max} = \lim_{t_G \rightarrow \infty} n_{\text{grad}} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(1 + k_{\varphi_0,n})$$



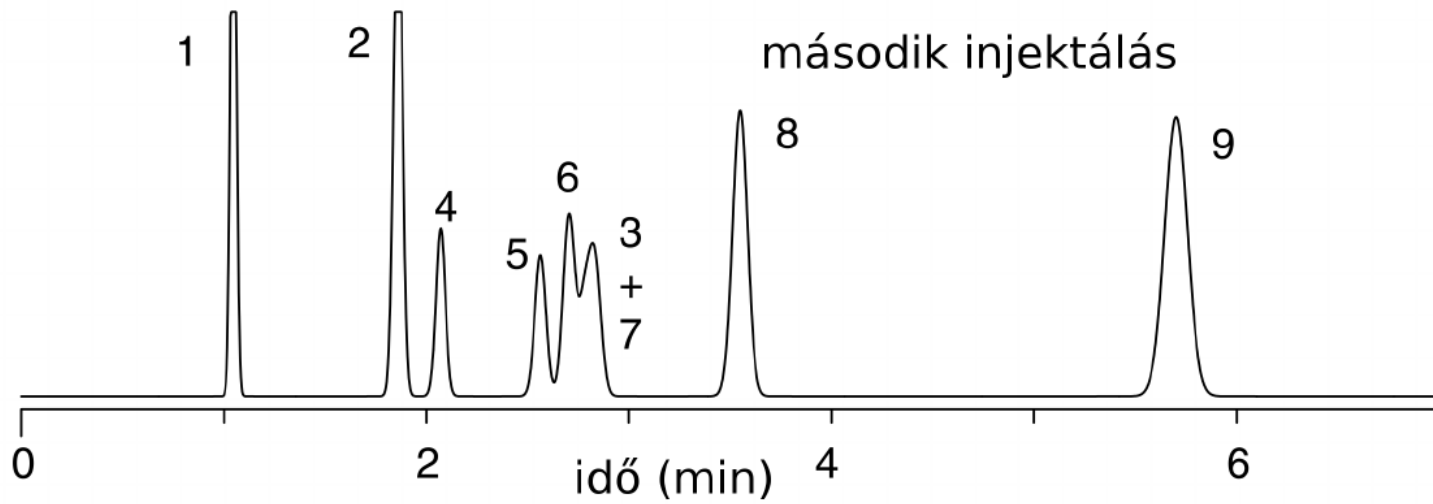
Oszlop egyensúlyba hozása

- két injektálás között -

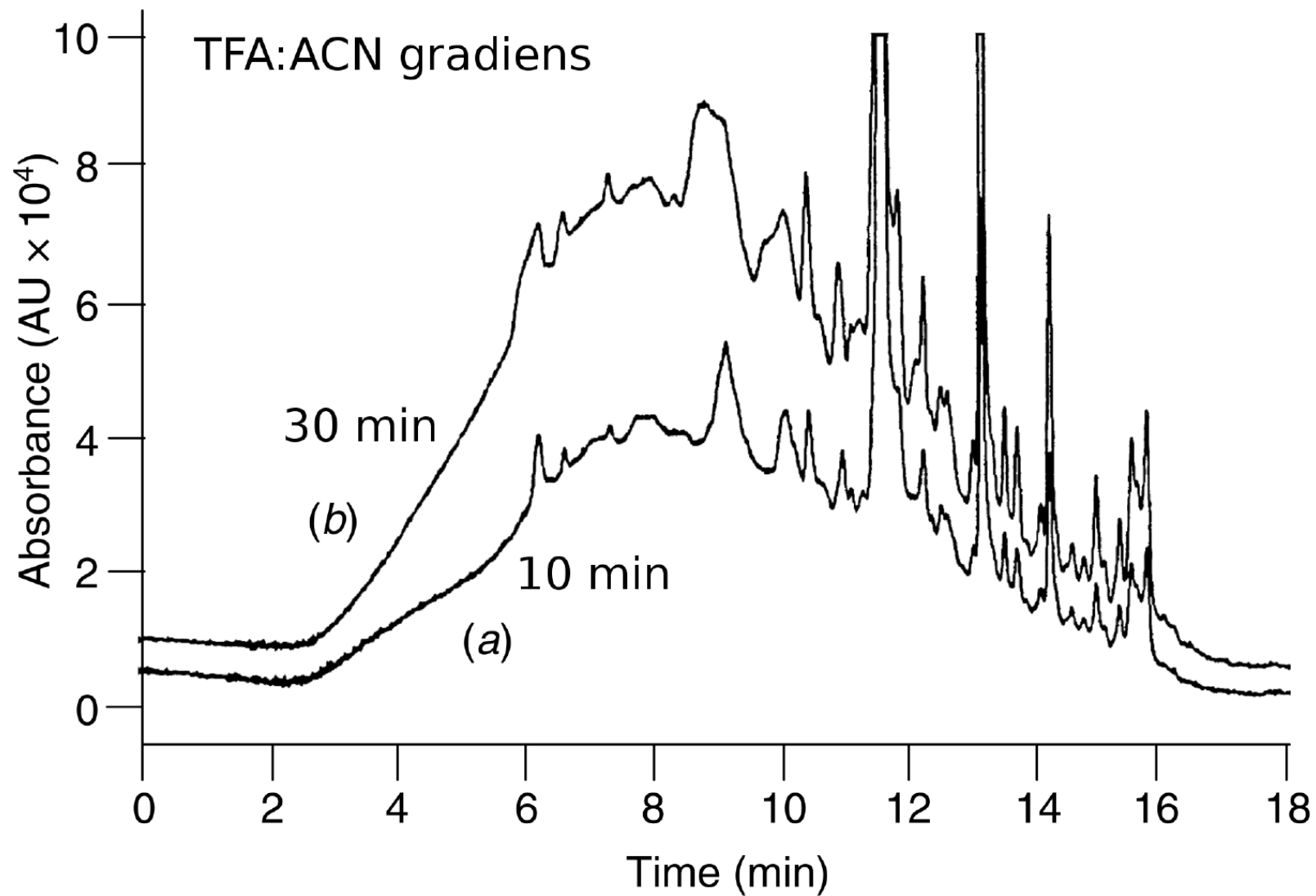


ekvilibrálási idő:

$$t_{eq} > 2 t_0$$

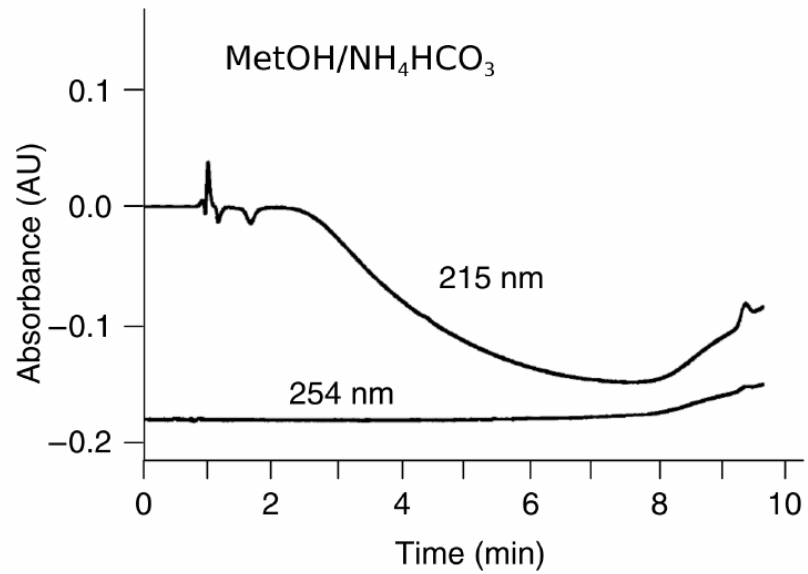
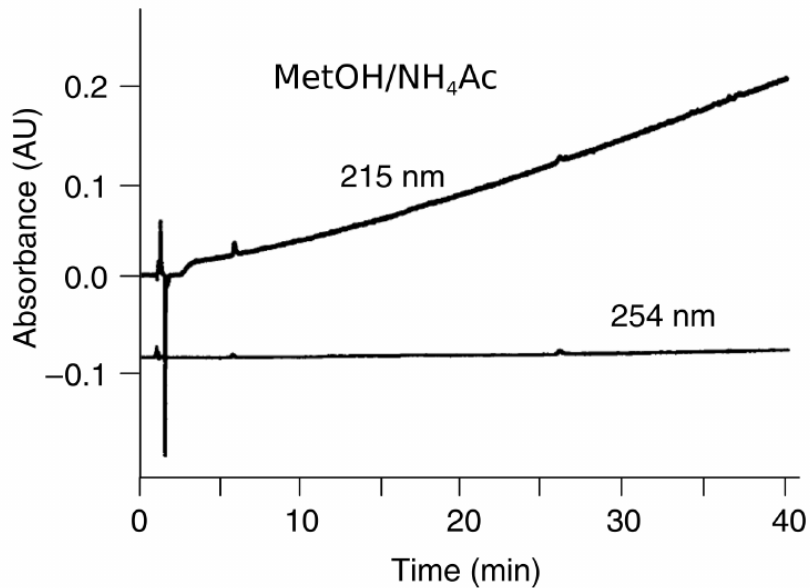
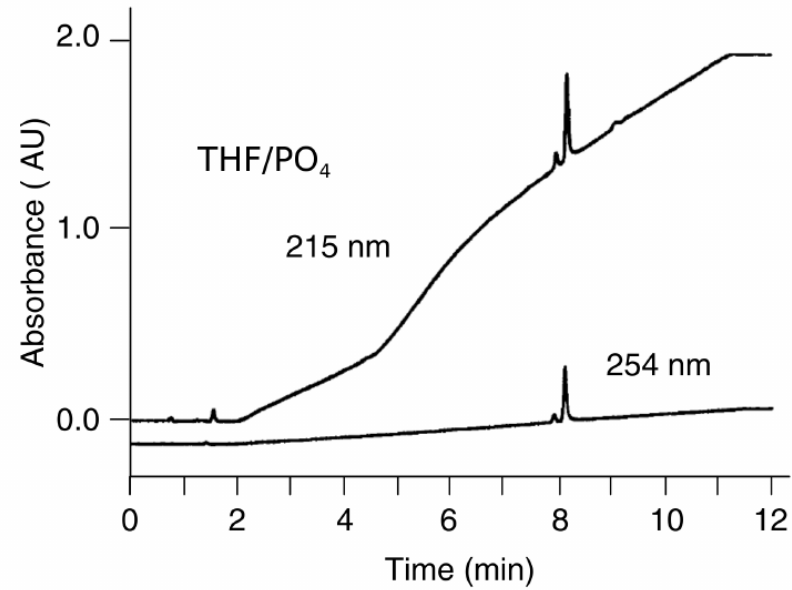
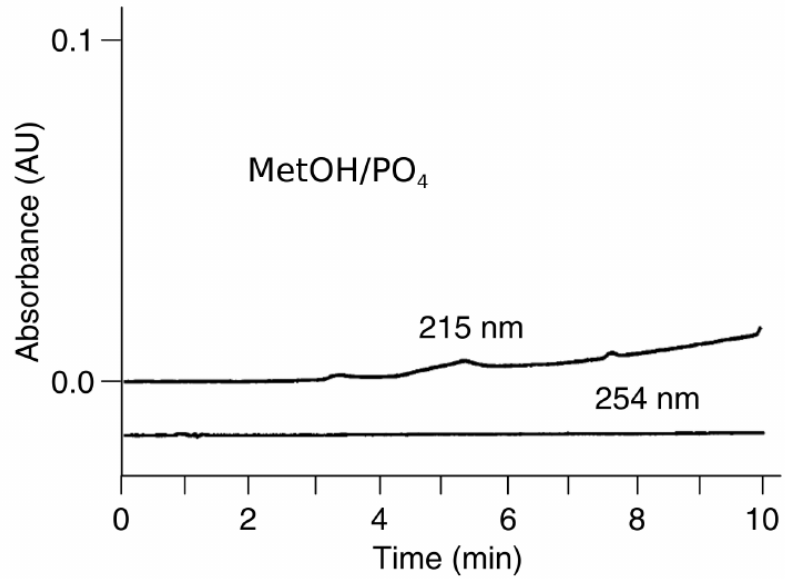


Oldószer tisztaság



Mindig végezzünk
"blank" analízist!

Alapvonal torzulás



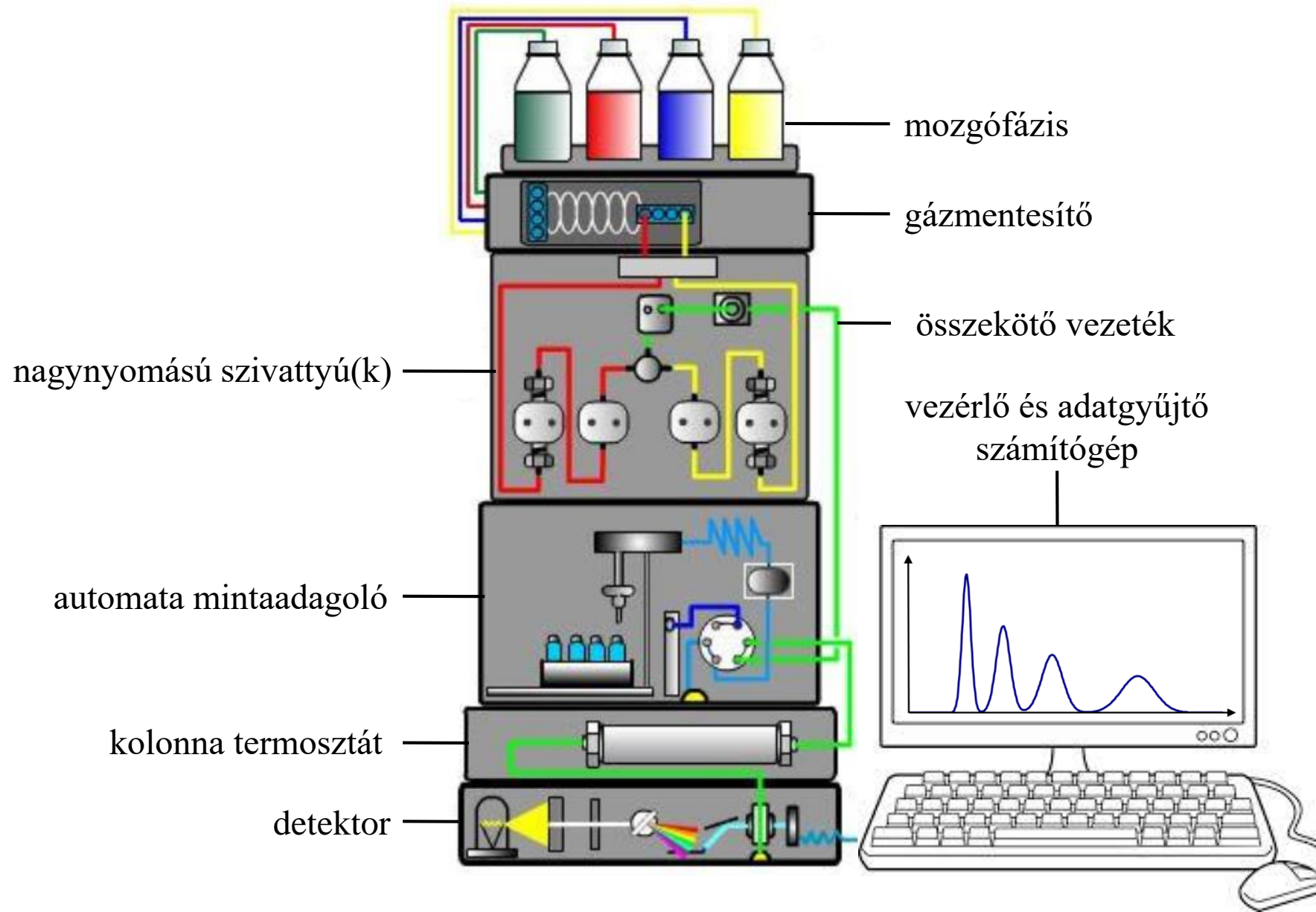
Mozgófázis “detektálhatósága” befolyásolja → törésmutató nem lehet!

Folyadékkromatográfiásan vizsgálható vegyületek

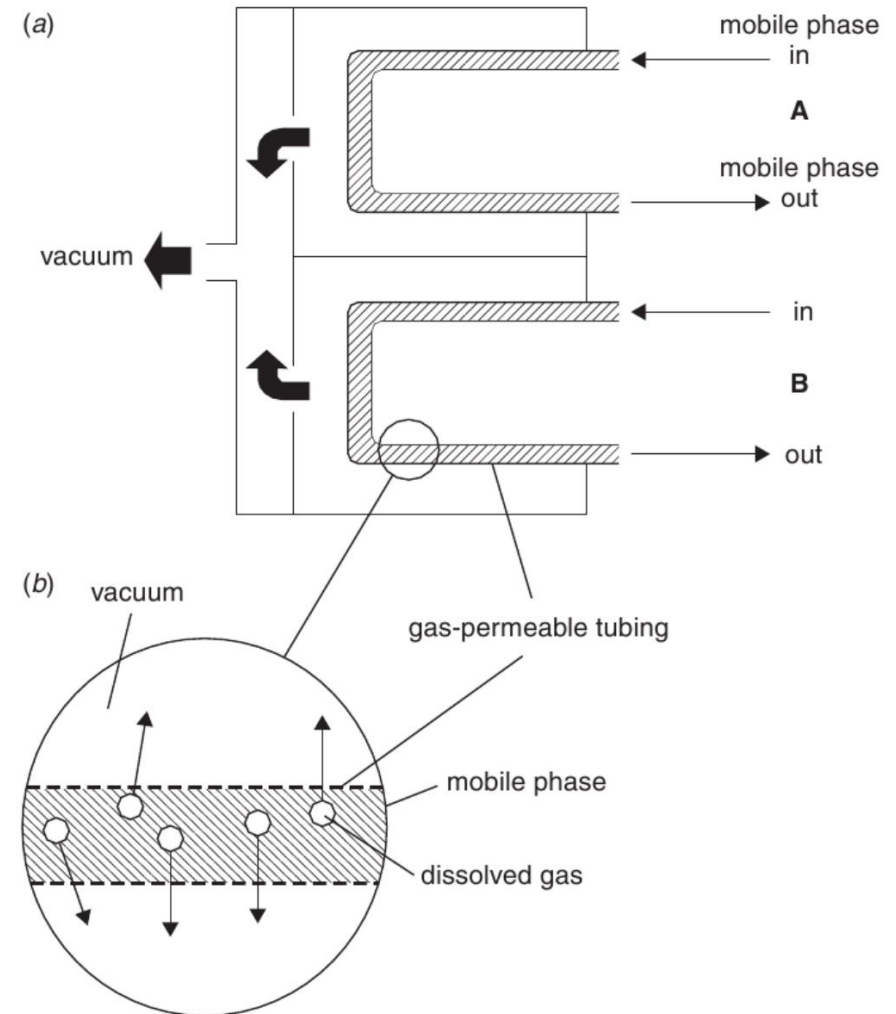
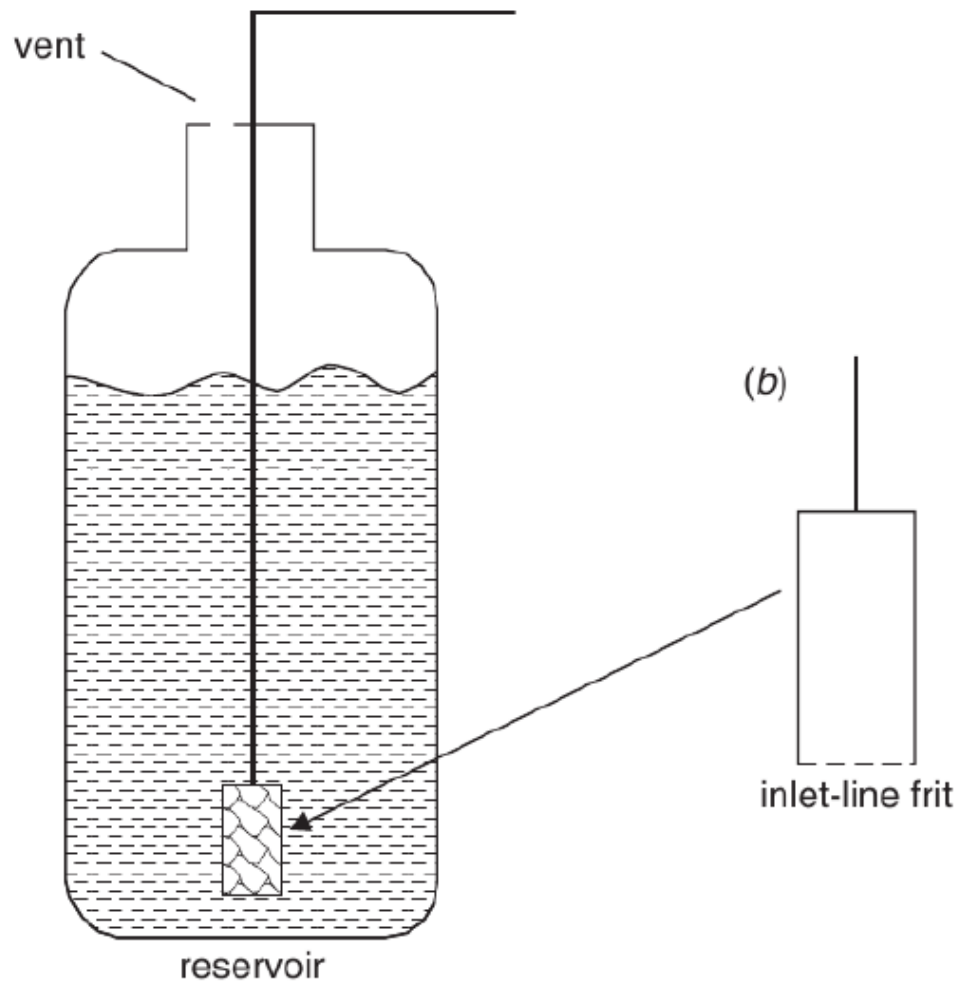
Alapfeltételek (szükséges, de az elválasztáshoz nem elégséges):

- oldani tudjuk a mozgófázisban a vegyületet vagy vegyületeket,
- oldás közben ne történjék kémiai átalakulás,
- az oldhatóság mértéke megfeleljen a detektálás megszabta követelményeknek,
- oldatban az elemzés időtartama alatt ne változzon a szerkezete,
- a meghatározandó komponenseknek legyen megfelelő visszatartása.

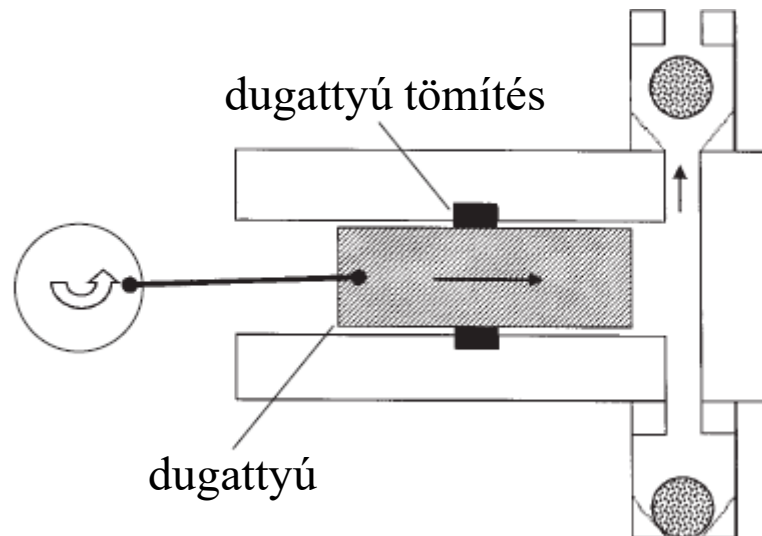
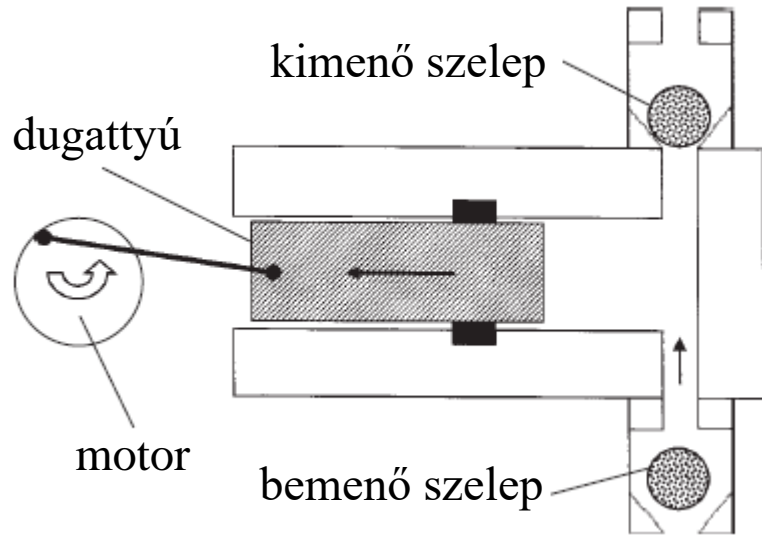
Folyadékkromatográfiás rendszer



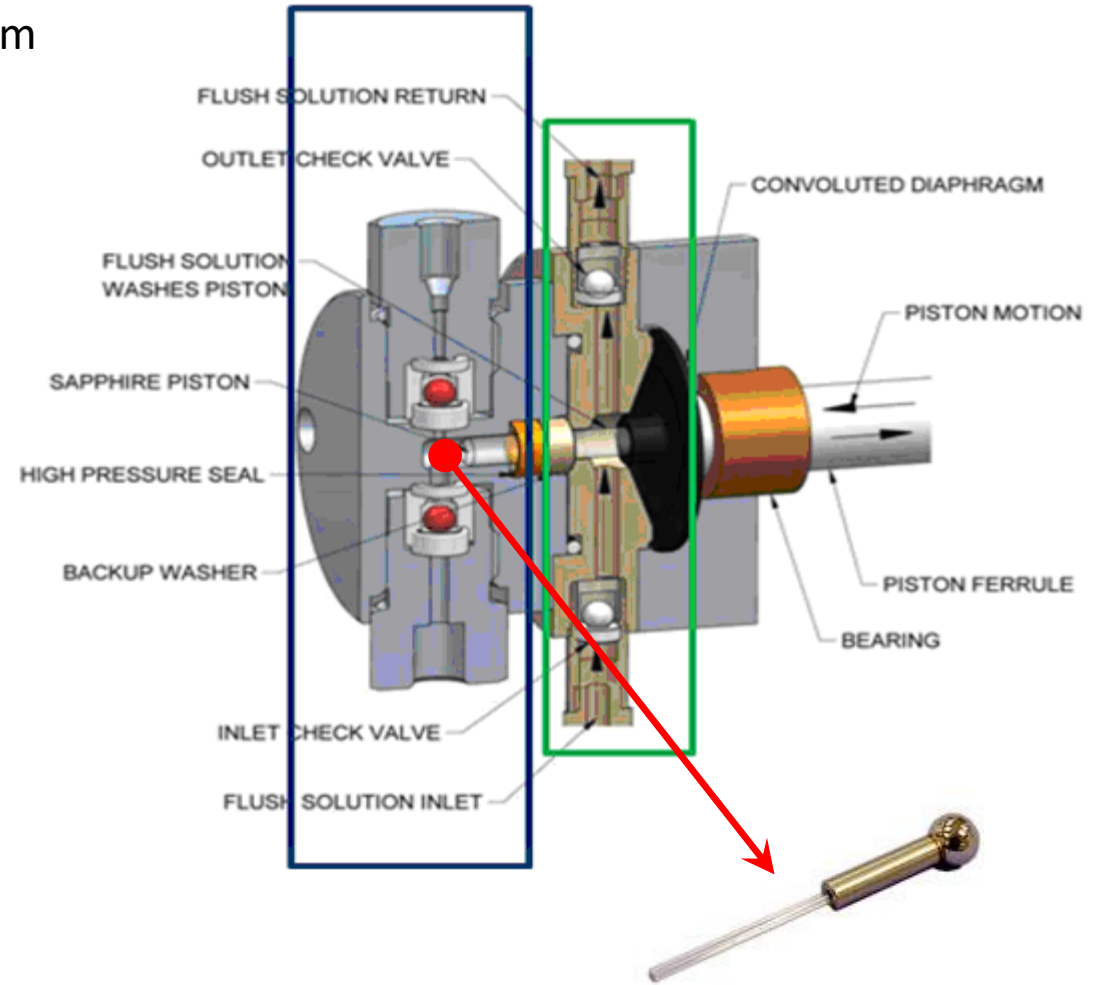
Mozgófázis tárolása és gáztalanítása



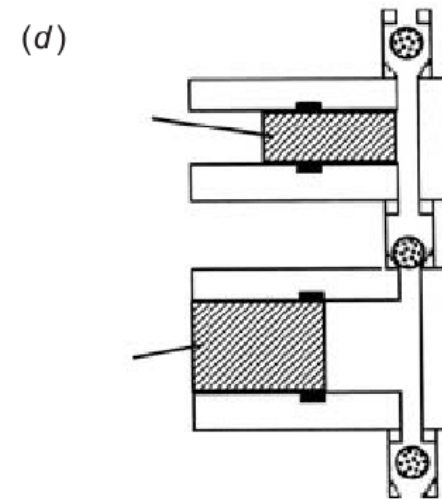
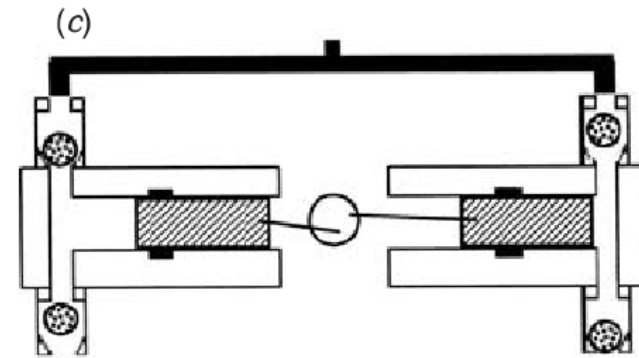
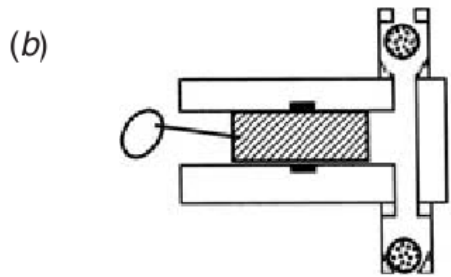
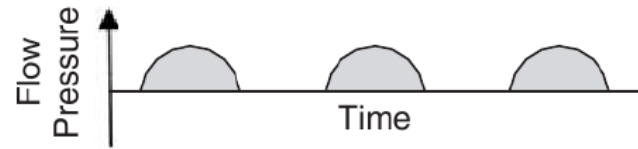
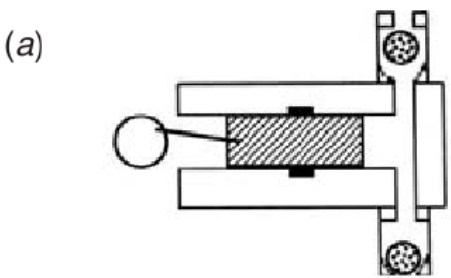
A mozgófázist szállító rendszer



- egyenletes térfogatáram
- pontos
- nagy nyomás:
HPLC: 150-400 bar
UHPLC: 550-1200 bar
- kémiai ellenállás
- mechanikai stabilitás



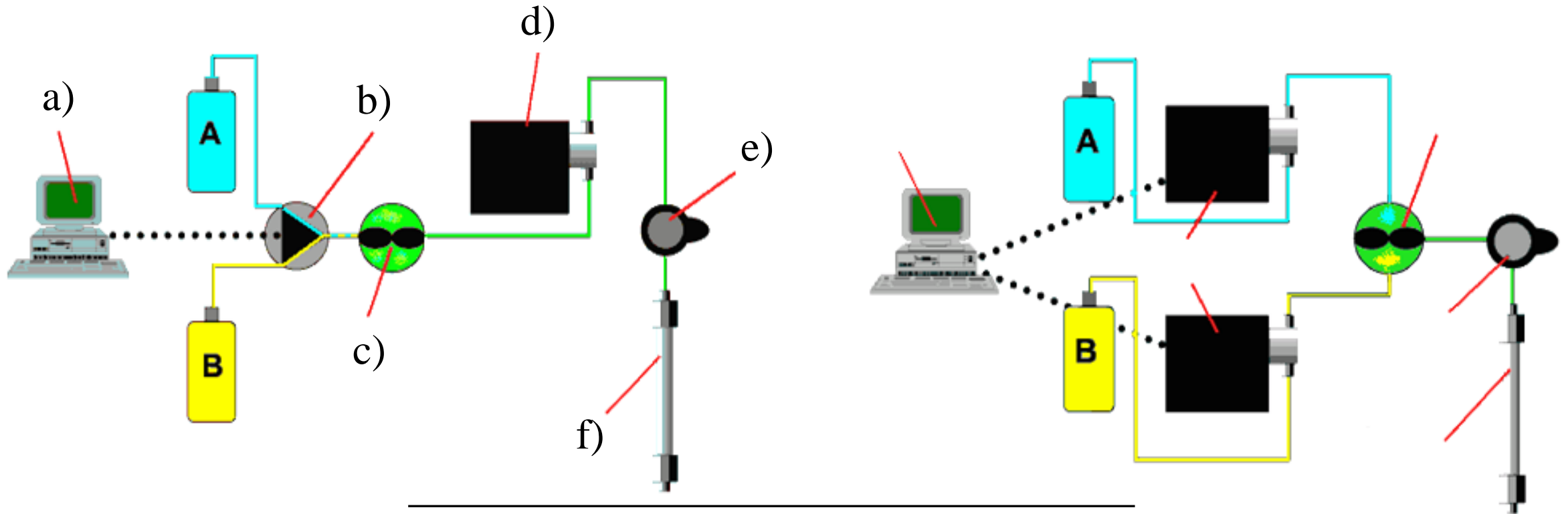
A mozgófázist szállító rendszer



Gradiens rendszerek

kisnyomású, kvaterner

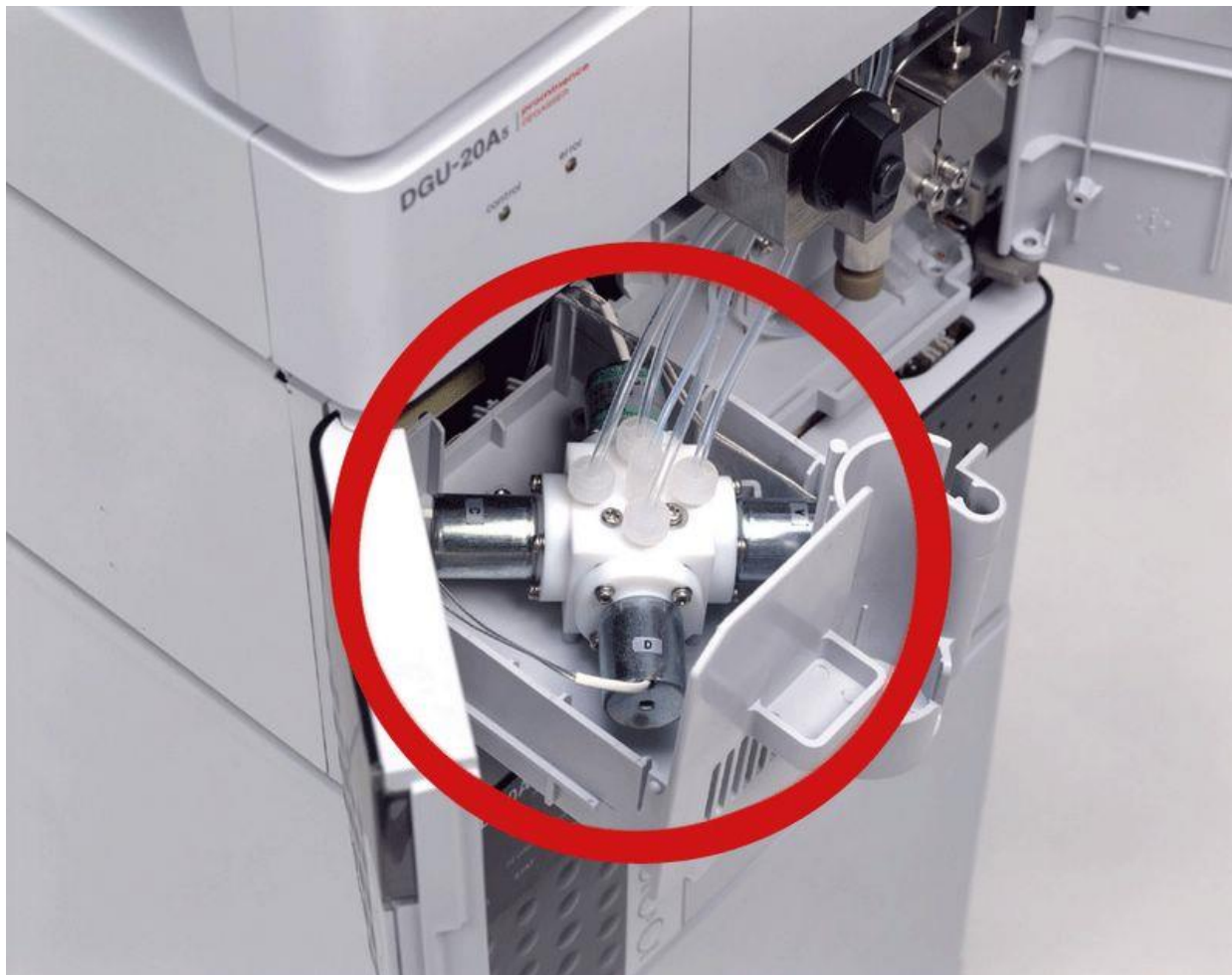
nagynyomású, bináris



	Nagynyomású	Kisnyomású
Készletelési térfogat	Kisebb	Nagyobb
Levegő mentesítés	Nem szükséges	Szükséges lehet
Pontosság (%B)	$\pm 1\%$	$\pm 1\%$
Pontosság (F)	Érintett	Kevésbé érintett
Komplex keverékek	1 pumpa/oldószer	3–4 oldószer

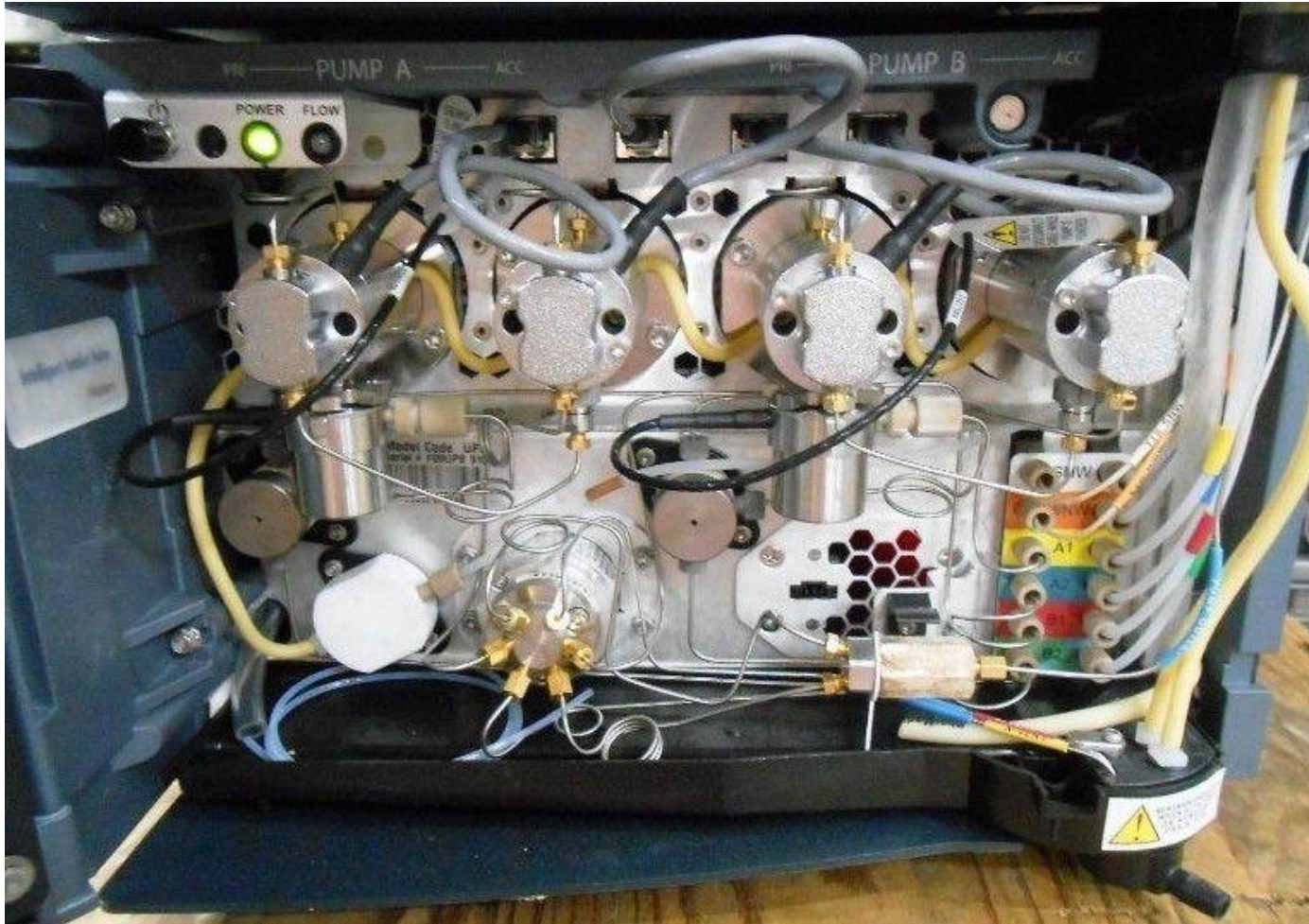
A mozgófázist szállító rendszer

Alacsony nyomású gradiens

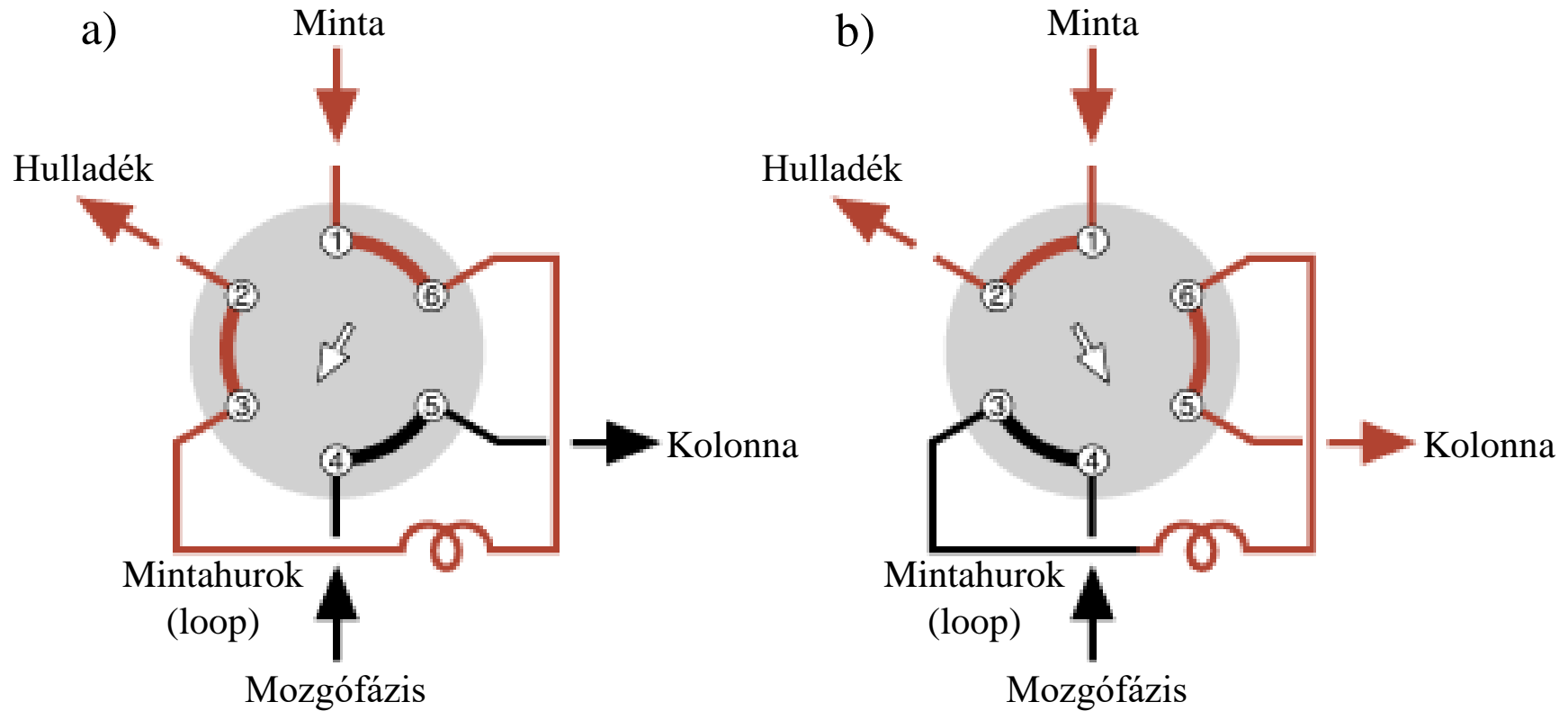


A mozgófázist szállító rendszer

Magas nyomású gradiens



Mintaadagolás – I.



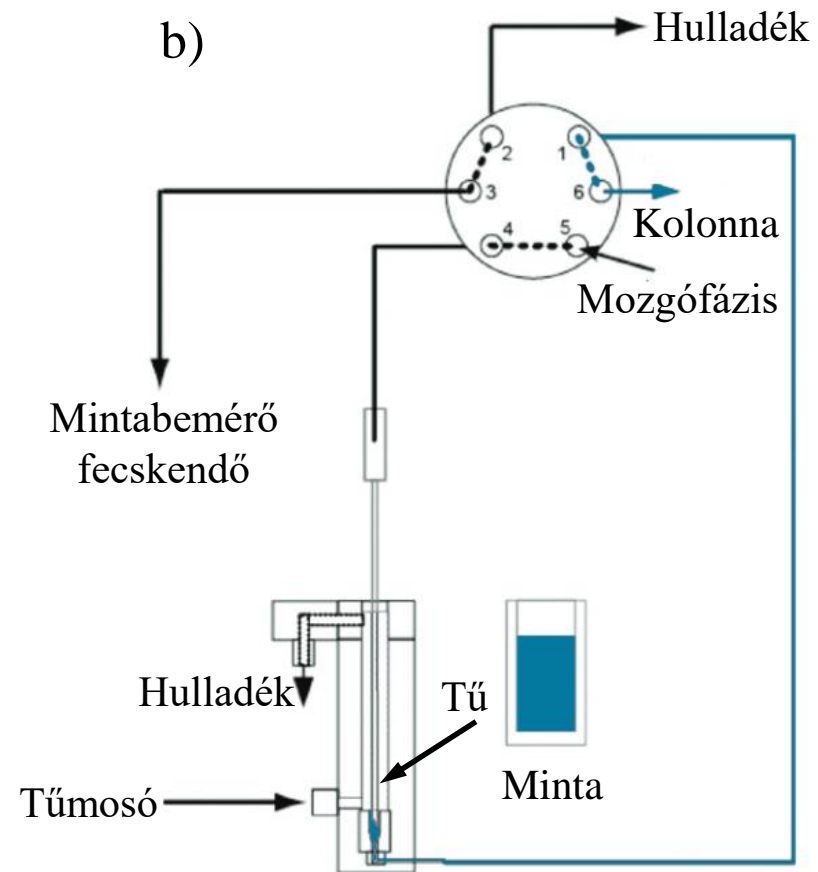
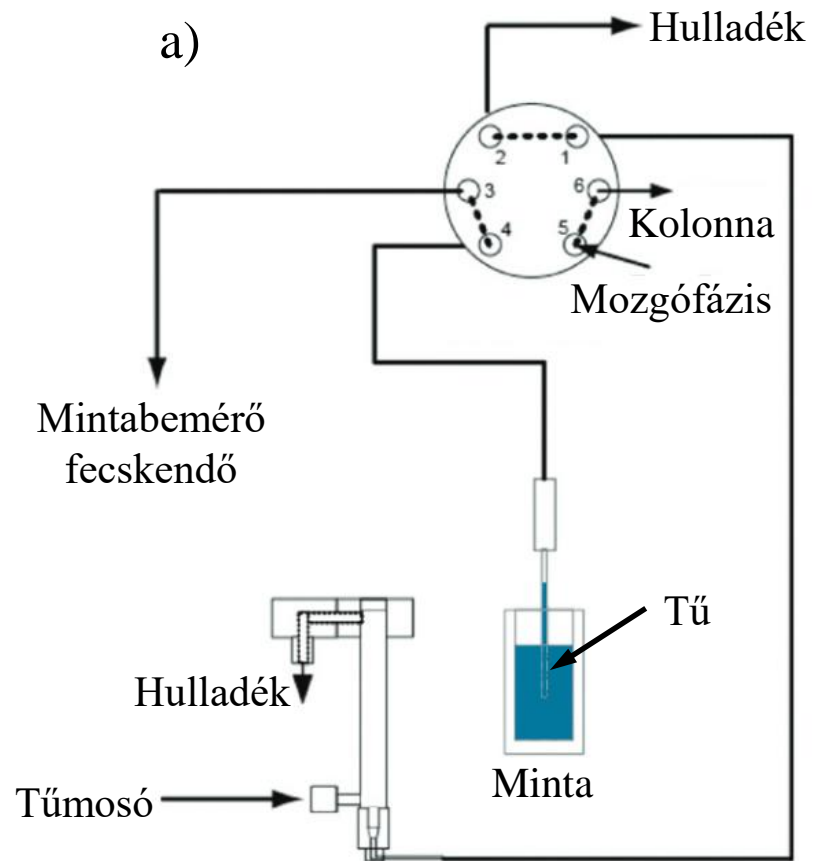
Mintaadagolás – I.



Mintaadagolás – I.

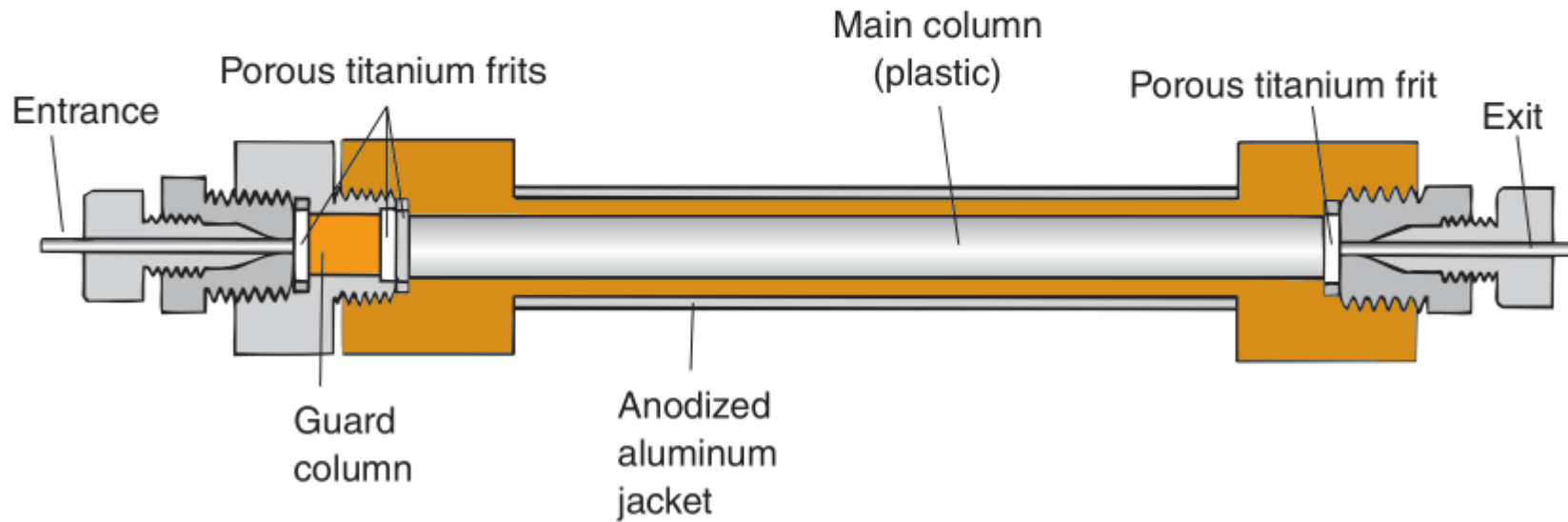


Mintaadagolás – II.



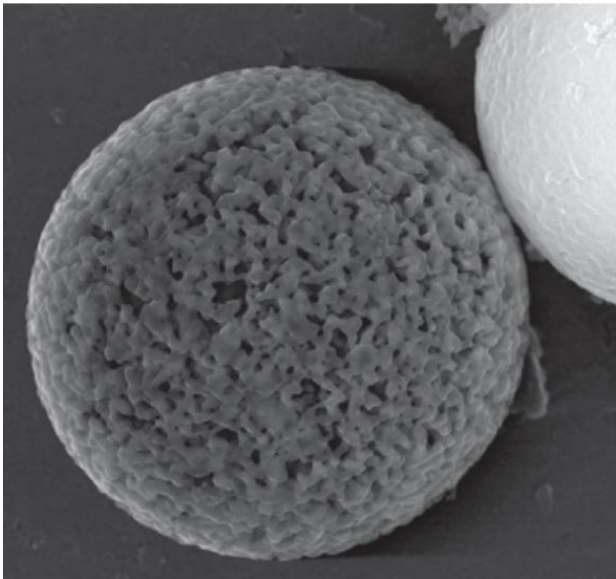
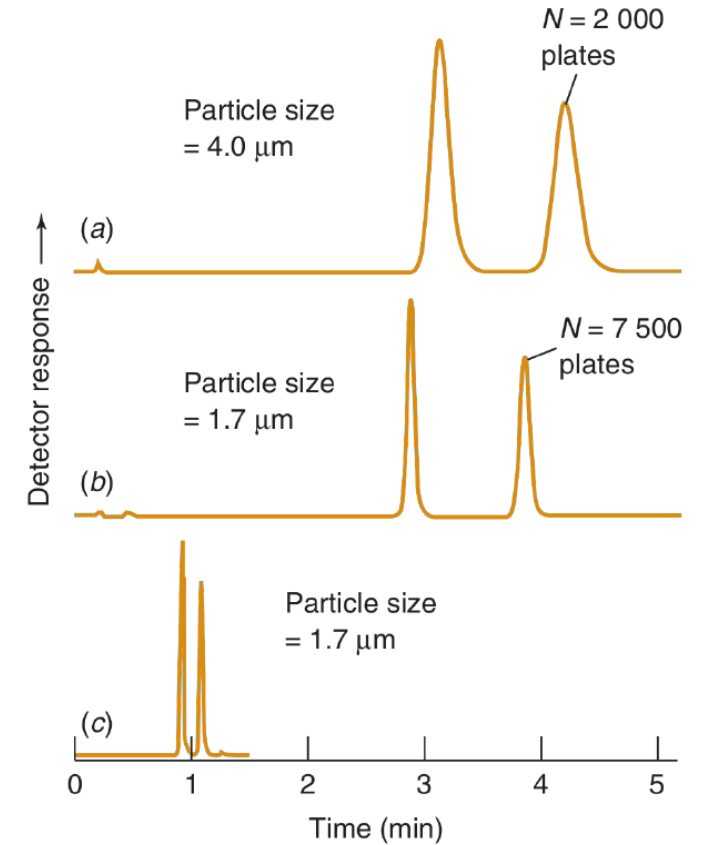
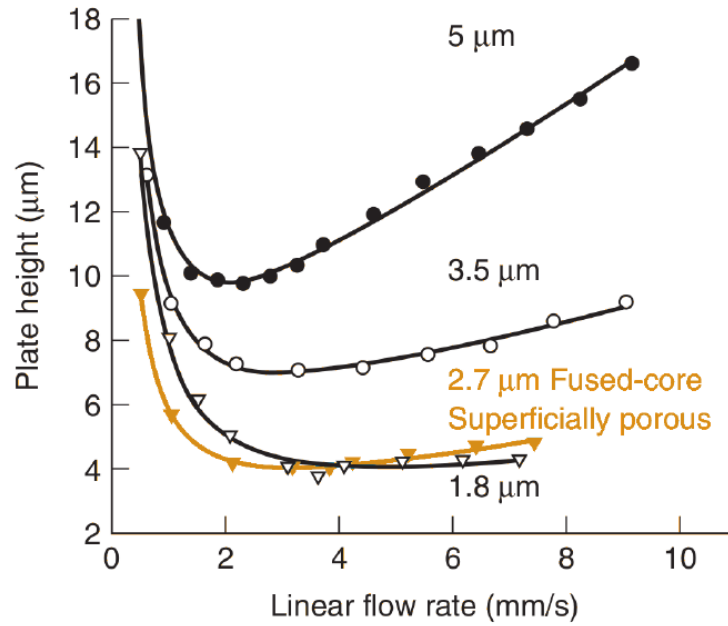
Folyadékkromatográfiás oszlop

Az elválasztás helyszíne.



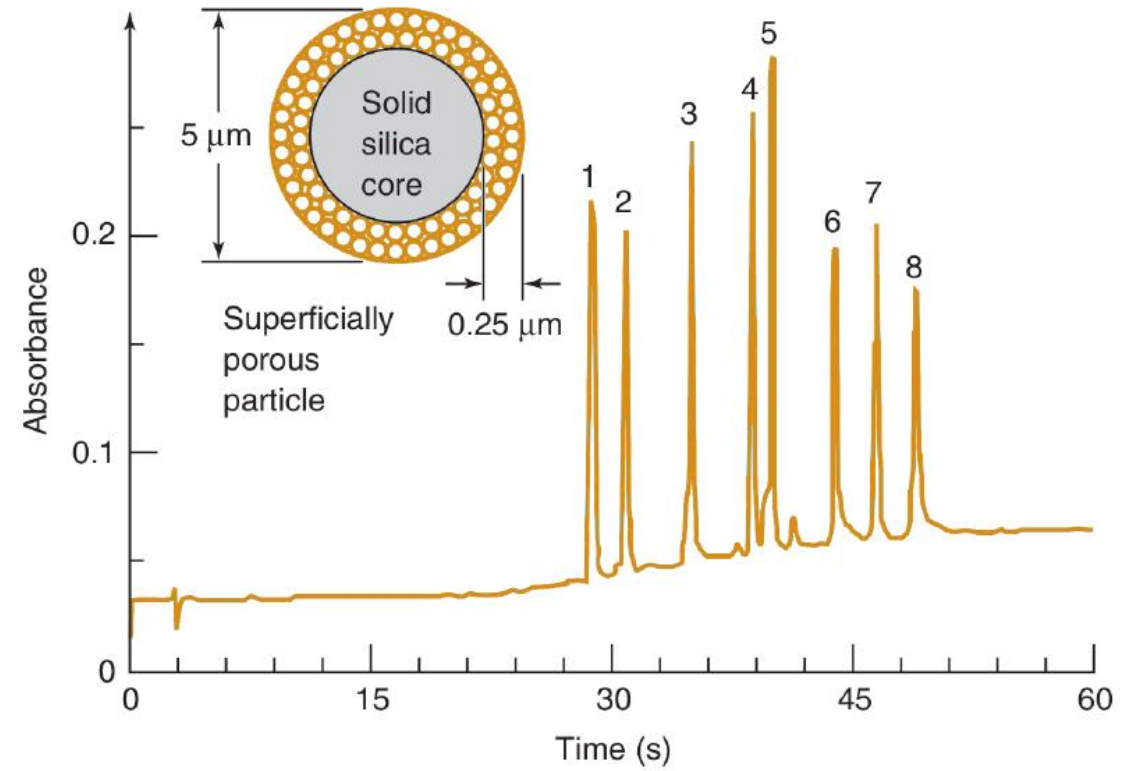
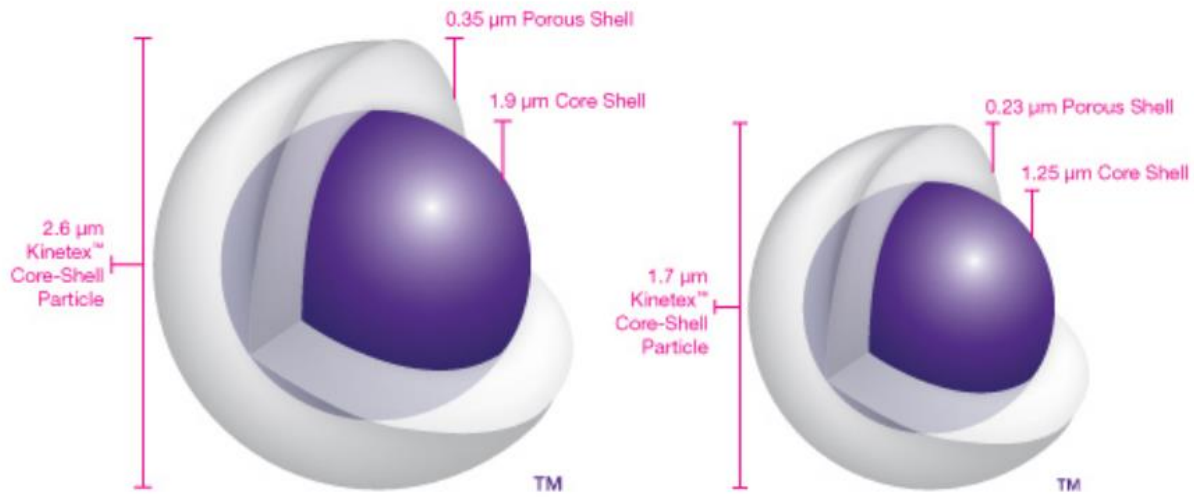
Töltetes oszlopok

- $H_{\min} \sim 2 \cdot d_p$
- $H \sim 3 - 5 \cdot d_p$
- HPLC: <400 bar
- UHPLC: <1200 bar

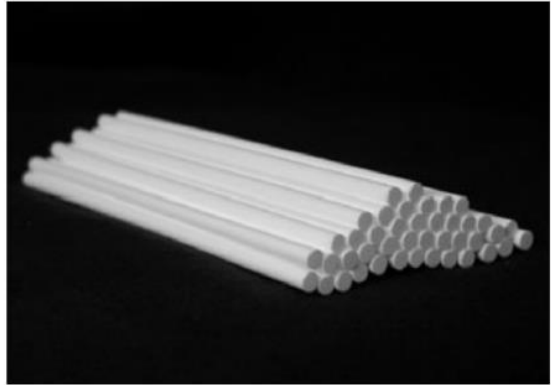


Particle size d_p (μm)	Retention time (min)	Plate number (N)	Required pressure (bar)
5.0	30	25 000	19
3.0	18	42 000	87
1.5	9	83 000	700
1.0	6	125 000	2 300

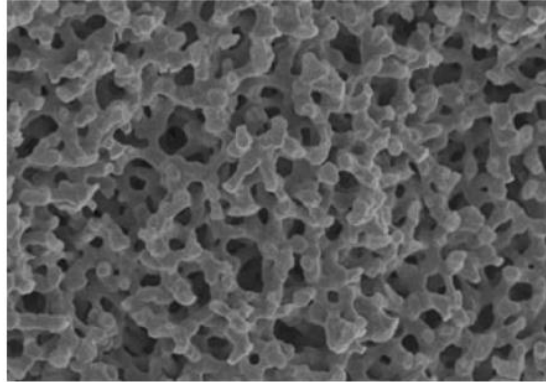
Tömörmagvú töltetek



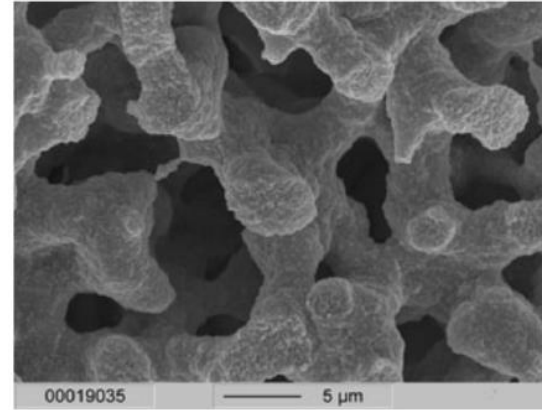
Monolit oszlopok



Monolithic silica rods.

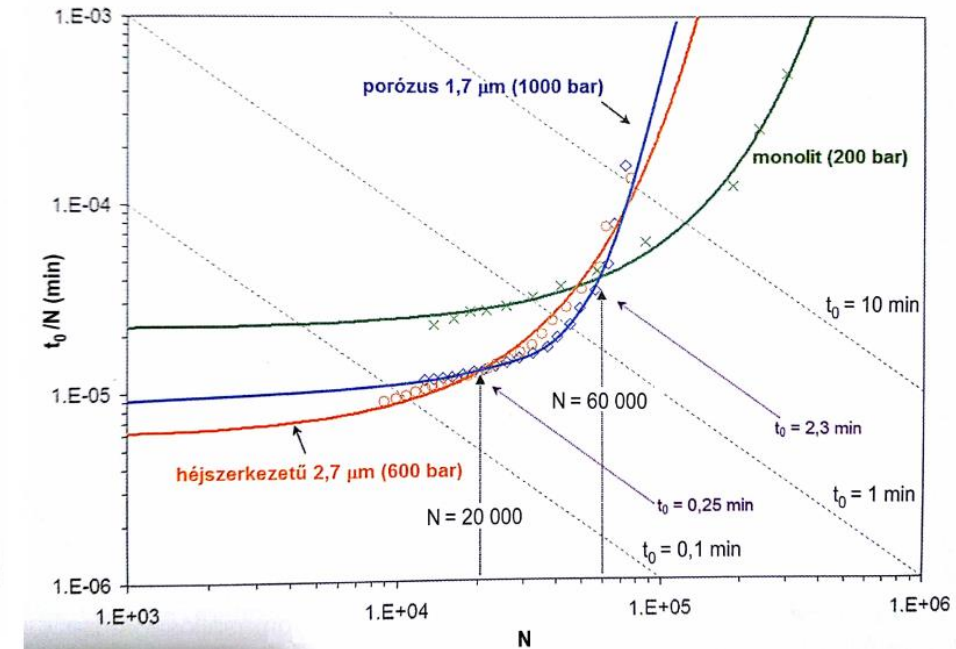
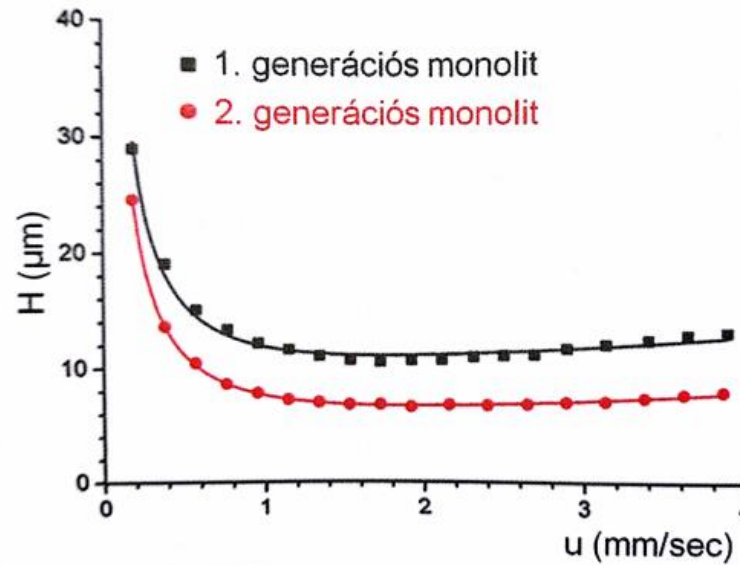
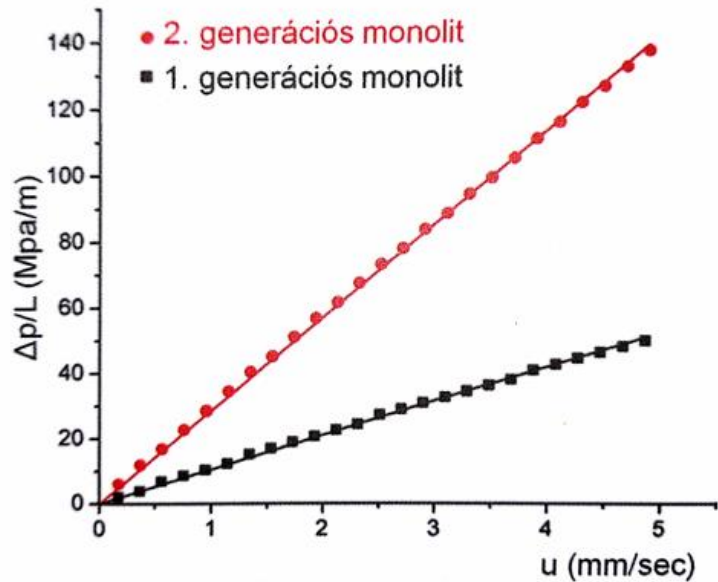


Structure of rod showing ~2- μm pores.



Enlarged view. Invisible 13-nm pores are located within the silica skeleton.

- kis nyomásesés
- viszonylag nagy H
- hosszú oszlop \Rightarrow nagy hatékonyság

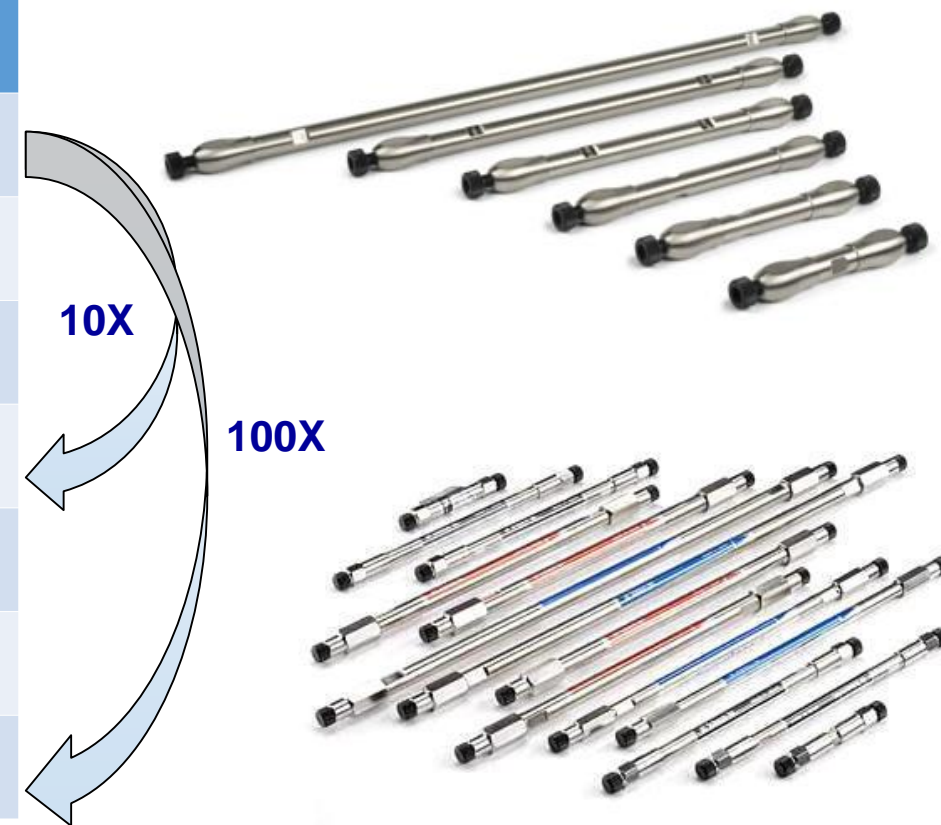


Oszlop választás



hossz (mm)	átmérő (mm)	térfogat (mL)	állófázis tömege (g)
250	4,6	1,32	2,9
50	4,6	0,26	0,58
50	2,1	0,056	0,121

	Oszlop méret	$V_0 (\epsilon_T=0.65) / \mu\text{L/}$
HPLC	250 x 4,6 mm	2699
	100 x 4,6 mm	1080
	100 x 3 mm	459
UHPLC	100 x 2,1 mm	225
	50 x 2,1 mm	113
	30 x 2,1 mm	68
	50 x 1 mm	26



Detektálás

Detektor: jelátalakító

A rajta keresztül folyó oldat valamely fizikai-kémiai tulajdonságát alakítja át koncentráció arányos, mérhető elektromos jellé.

Detektorok minőségi követelményei:

- nagy érzékenység, megjósolható jel nagyság
- minden mintára válaszjelet ad, vagy előre látható szelektivitás
- nem befolyásolja jelentősen a hőmérséklet és térfogatáram
- működését nem befolyásolja a mozgófázis összetétele
- kis hozzájárulás az oszlopon kívüli térfogathoz
- megbízható, egyszerű használat
- koncentrációarányos jel
- nem destruktív
- minőségi információt is szolgáltat
- gyors válaszidő (nagy frekvencia)

Minta specifikus

- UV-vis
- fluoreszcenciás
- elektrokémiai
- radiokémiai
- vezetőképességi
- kemilumineszcens
- királis

Tömb fázis

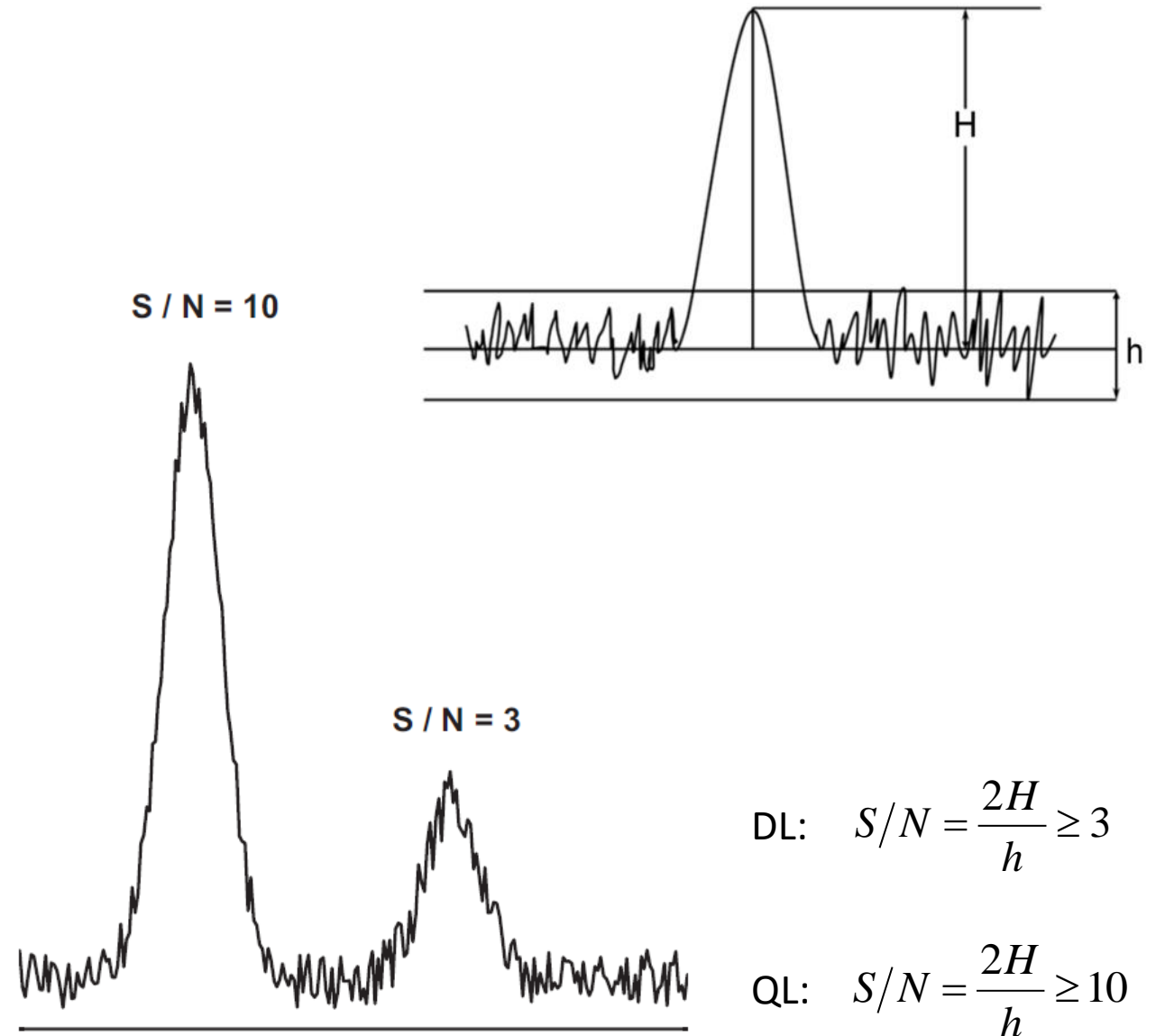
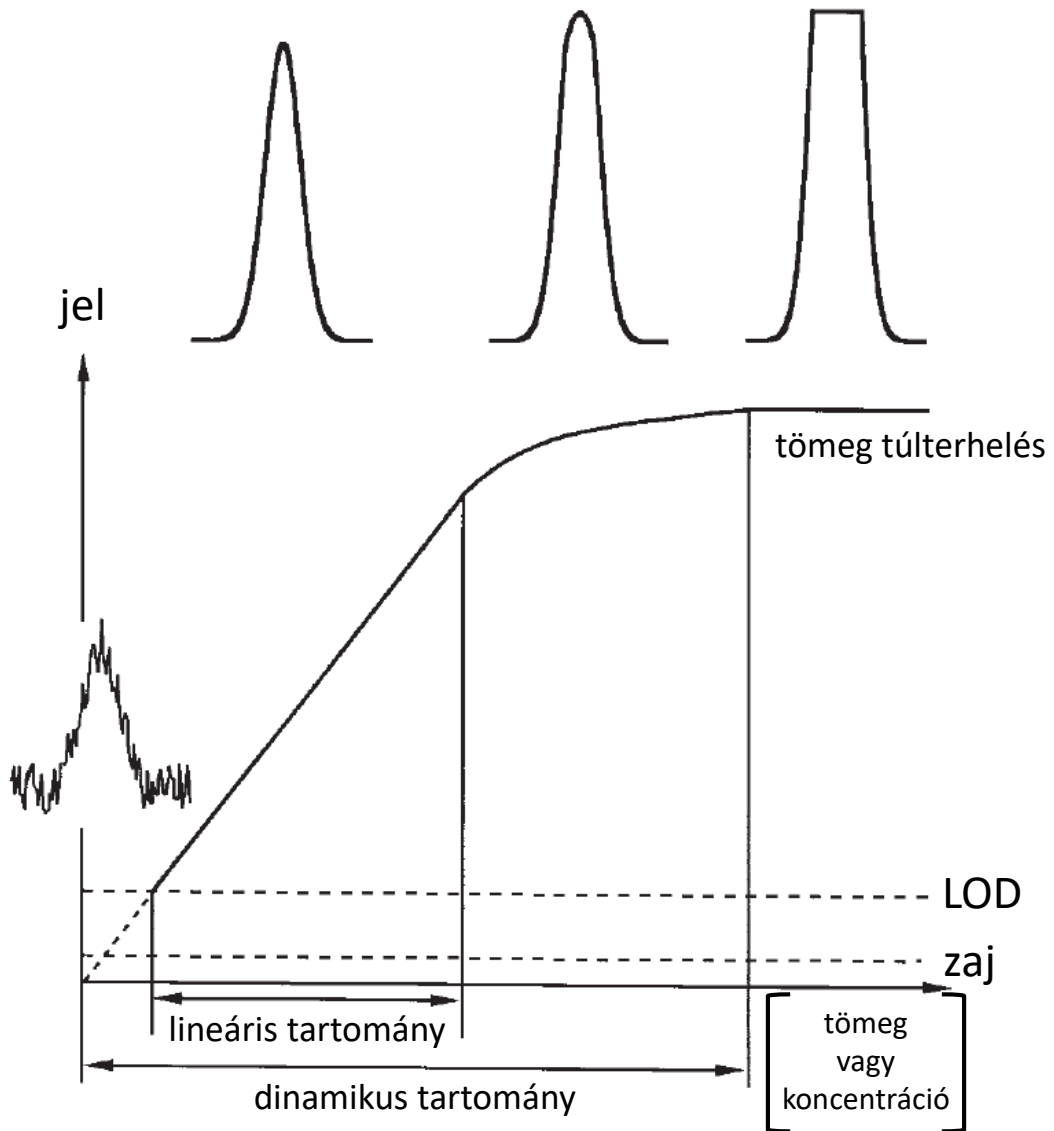
- törésmutató
- fényszórás
- korona kisülési

Csatolt technikák

- MS
- FTIR
- NMR

Nincs olyan detektor, ami mindegyik kritériumnak megfelel!

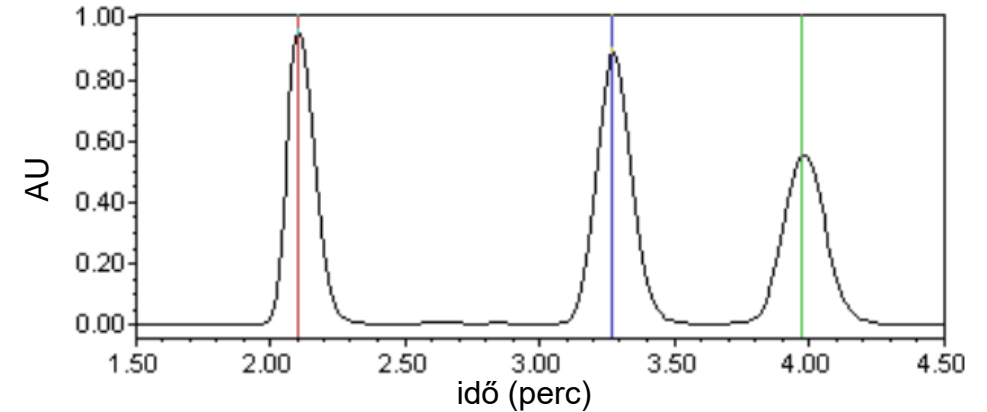
Detektálás



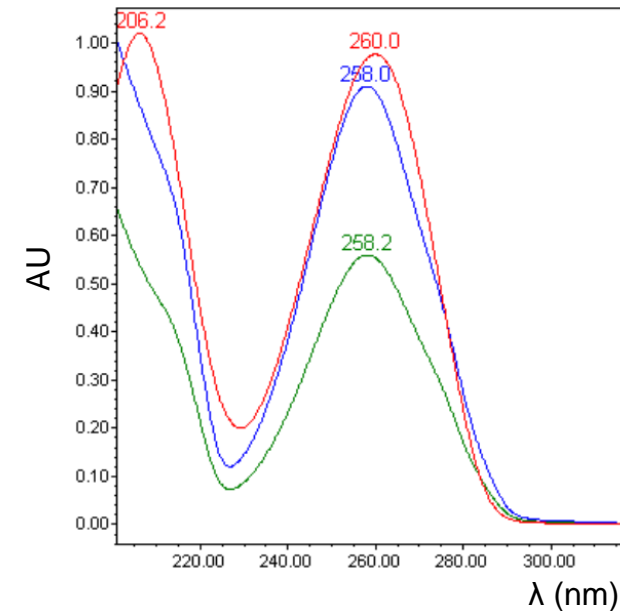
Detektálás (UV-Vis)

- nagy érzékenység (ϵ függő)
 - széles lineáris tartomány
 - kis cellatérfogat
 - kevésbé érzékeny a hőmérséklet és a mozgófázis térfogatáram változására
 - megbízható
 - egyszerűen kezelhető
 - nem destruktív
 - válaszjel változtatható (hullámhossz váltással)
 - gradiens elúcióval kompatibilis
-
- rögzített hullámhosszú (manapság már nem)
 - változtatható hullámhosszú (előre beállítható, akár több is)
 - dióda-soros (széles hullámhossz tartomány)

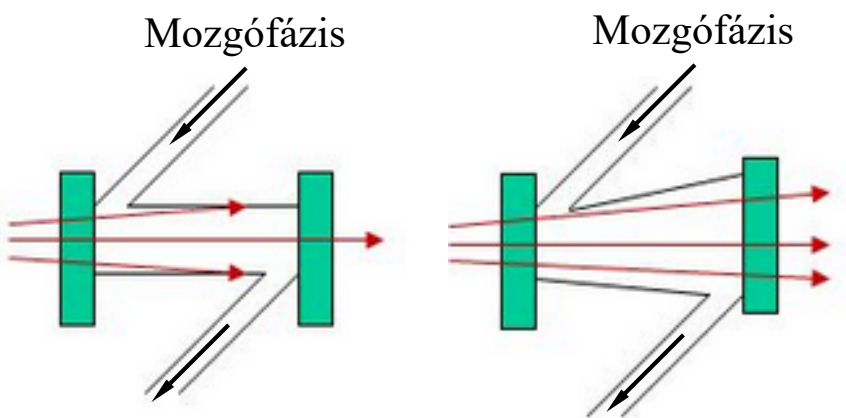
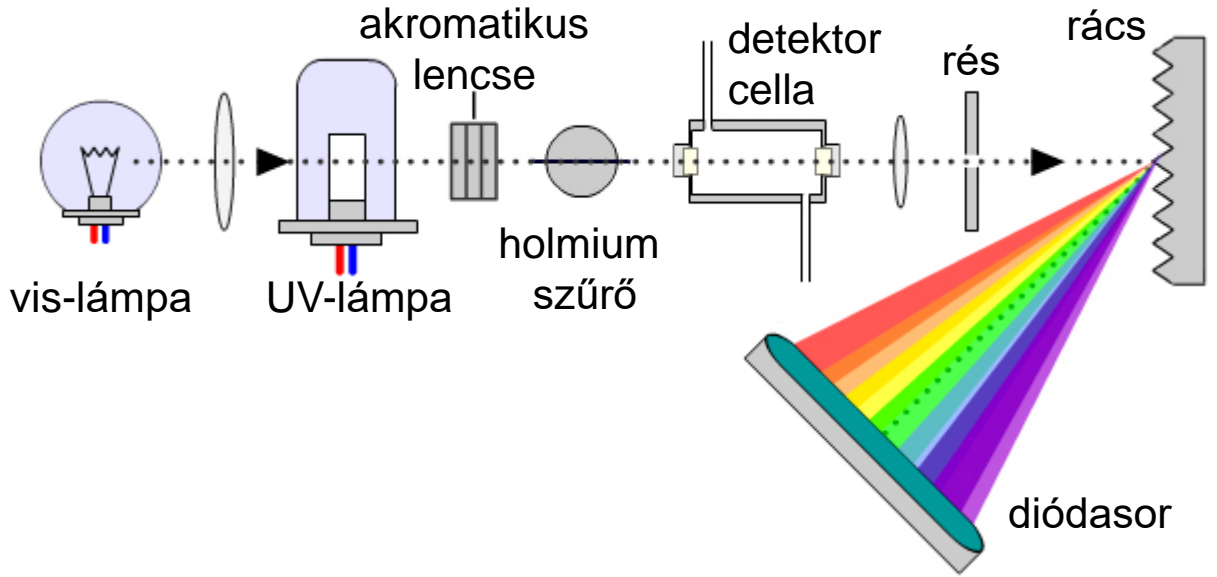
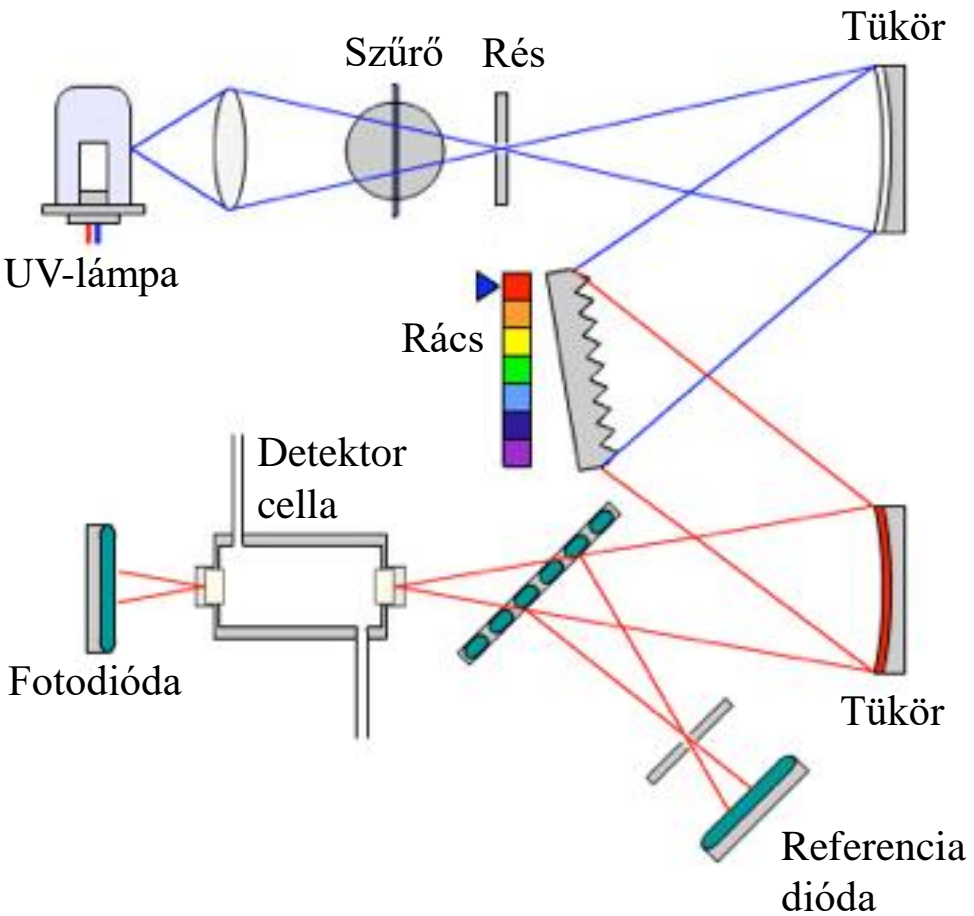
Kromatogram



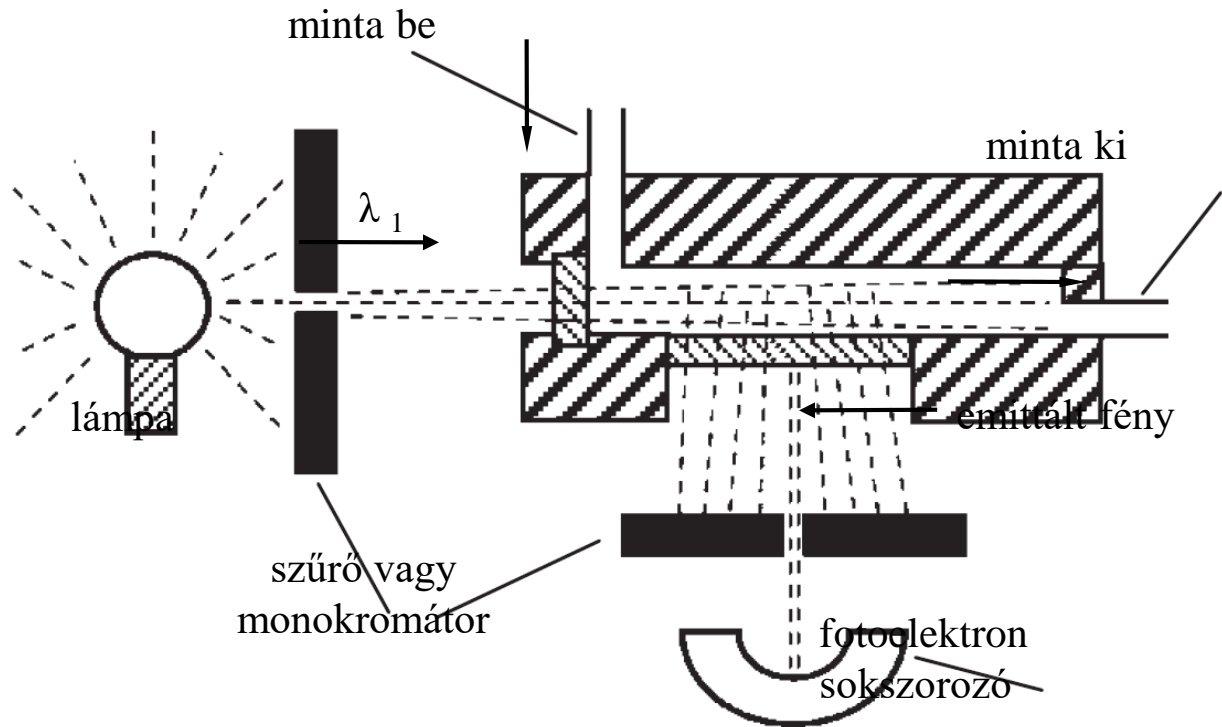
UV-spektrum



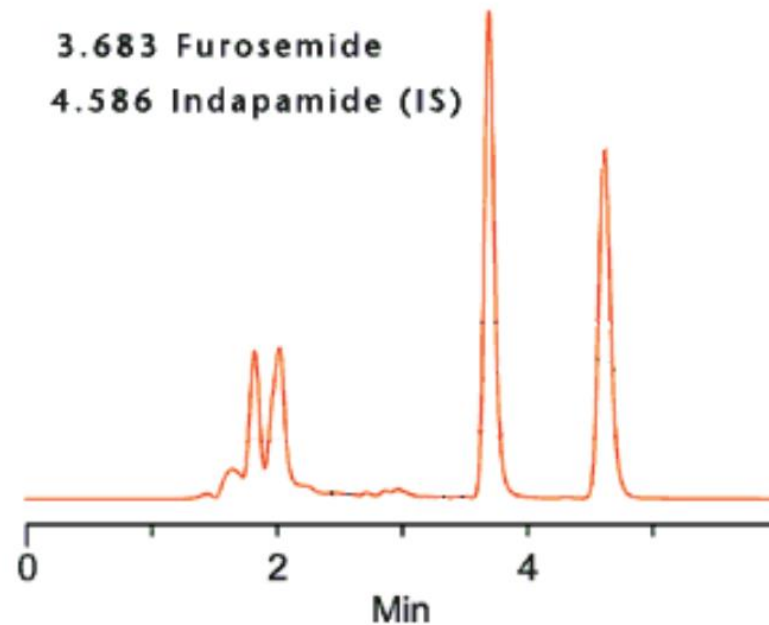
Detektálás (UV-Vis)



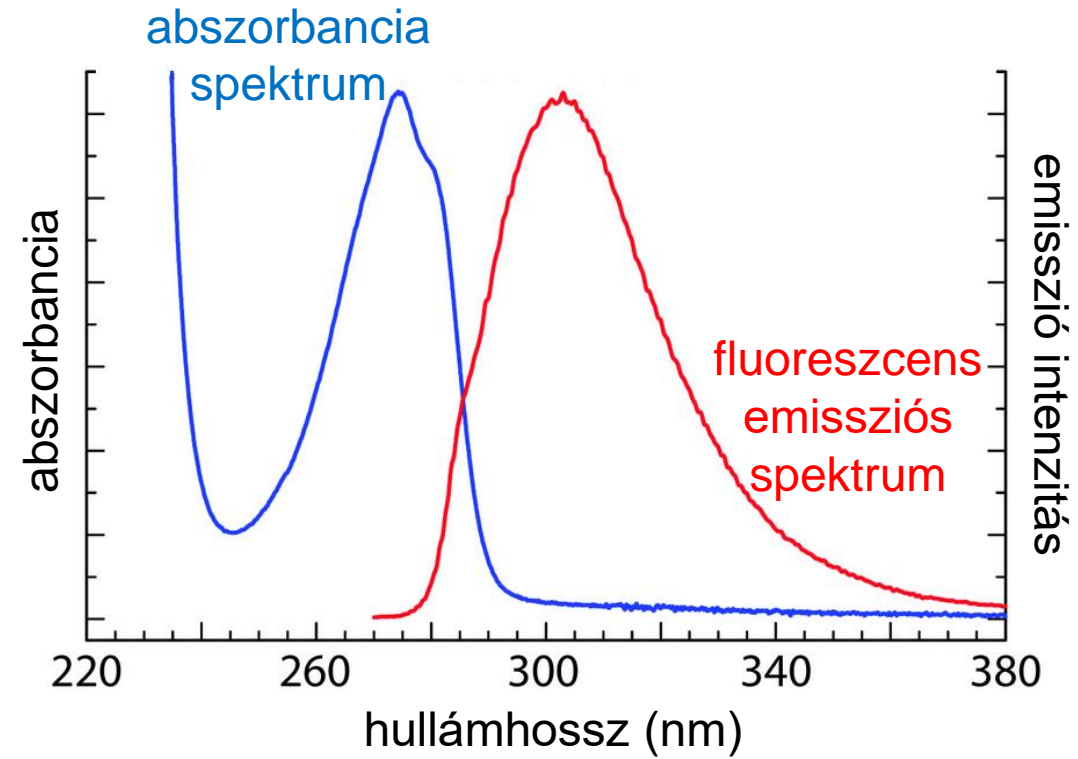
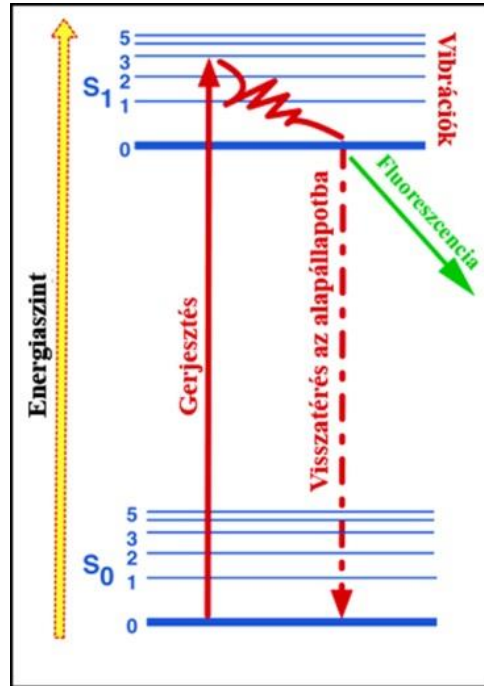
Detektálás (fluoreszcens)



- UV besugárzás \Rightarrow fluoreszcencia
- 100 \times érzékenyebb, mint az UV-vis (ha a minta fluoreszcens)
- kevésbé széles lineáris tartomány (nyomanalitikára elég)
- eluens t, V : nem túl érzékeny
- gradiens kompatibilis (ha az eluens nem fluoreszcens)
- limitált alkalmazási kör

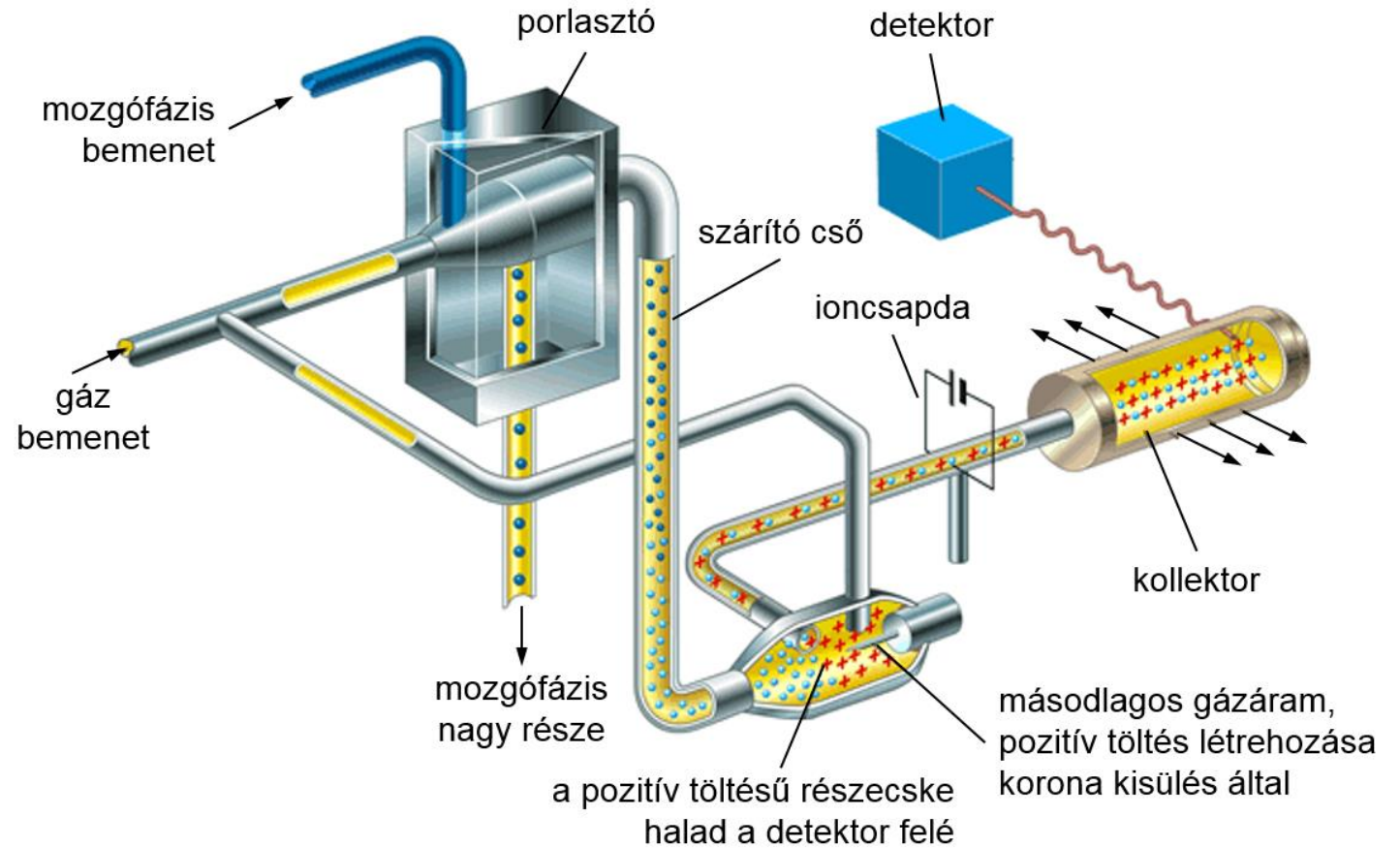
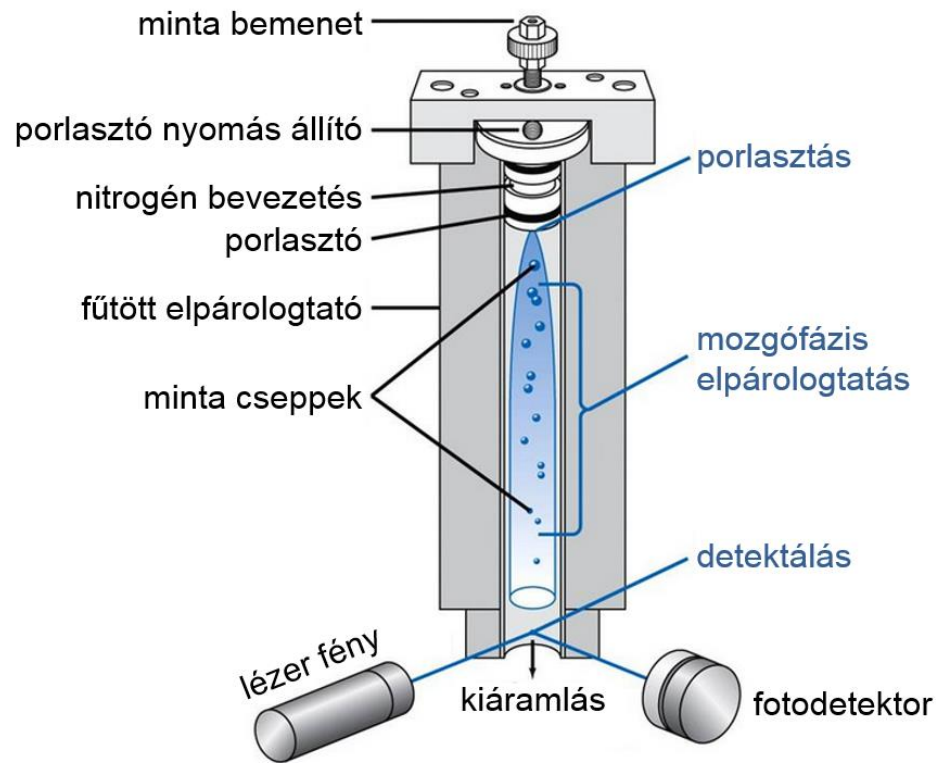


Detektálás (fluoreszcens)



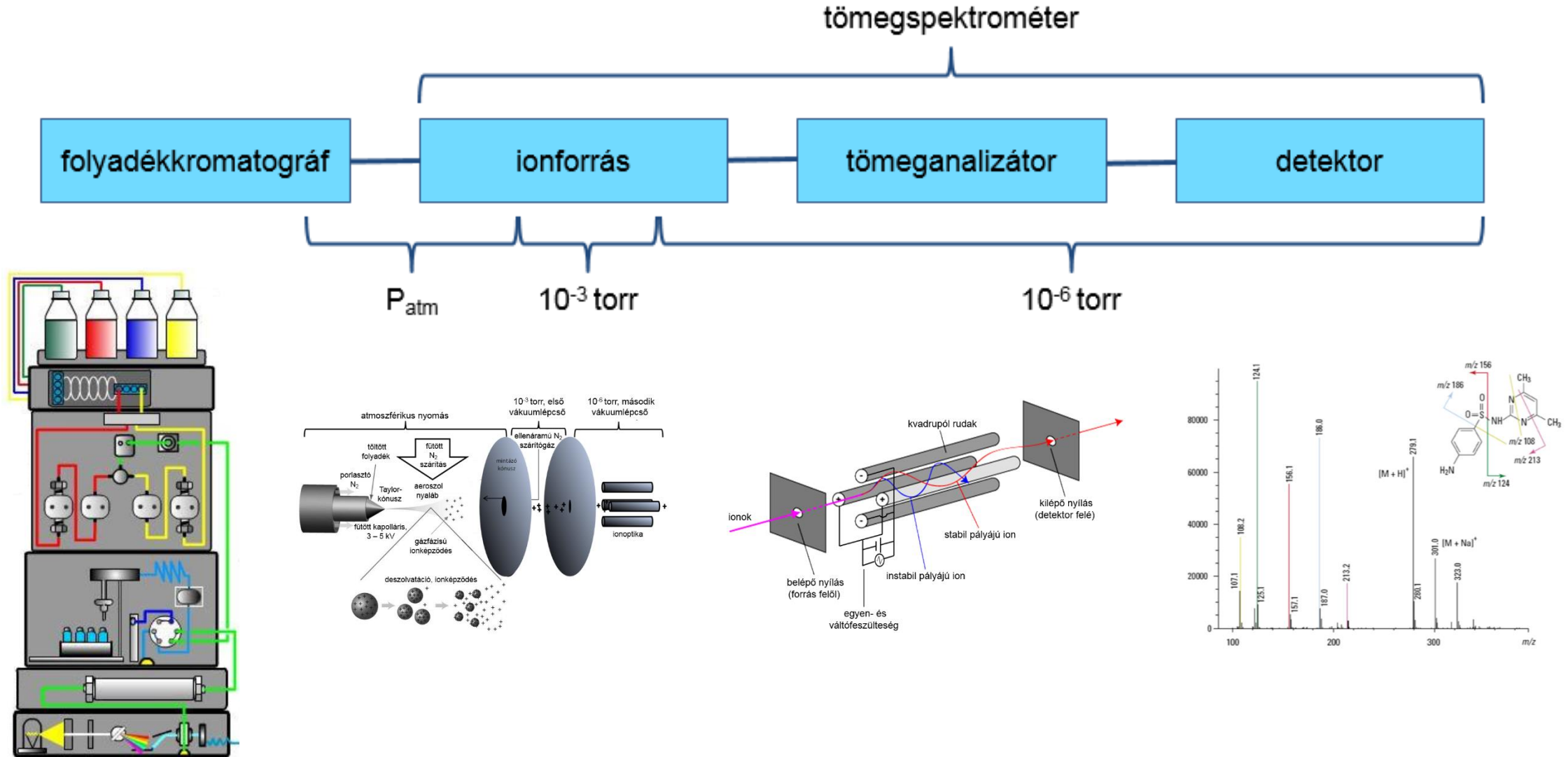
Detektálás (ELSD, Corona CAD)

Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)



Corona Charged Aerosol Detector (Corona CAD)

Detektálás (MS)



Folyadékkromatográfiás módszerek osztályba sorolása a mozgó- és állófázis szempontjából

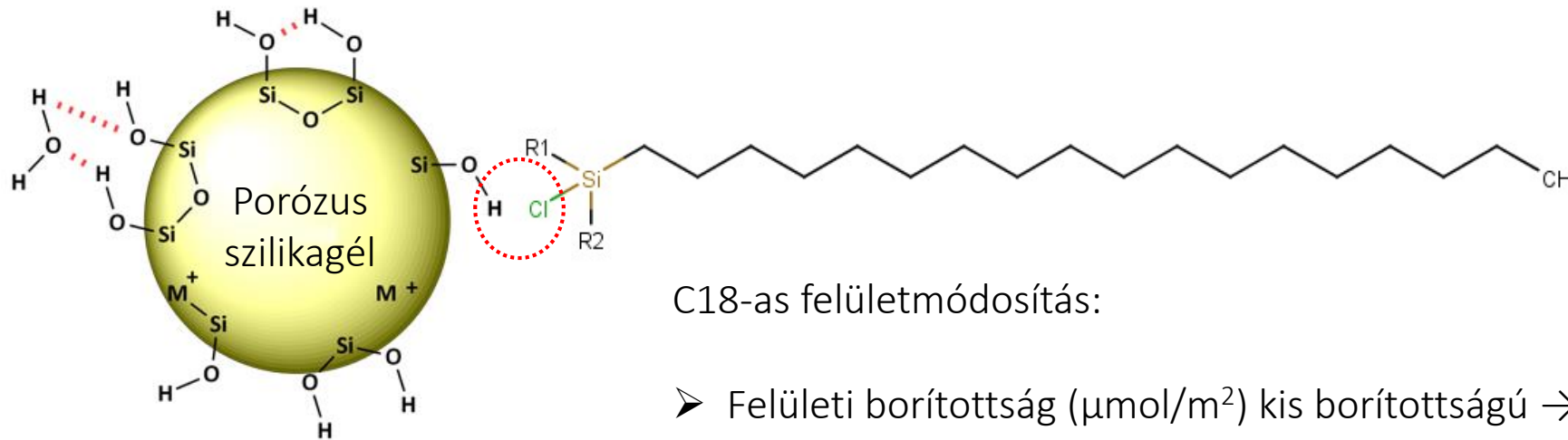
Elnevezés	Állófázis	Mozgófázis
normál fázisú folyadékkromatográfia (NP-HPLC, NPLC)	polárisabb	apolárisabb
fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC, RPLC)	apolárisabb	polárisabb
fordított fázisú ionpár-folyadékkromatográfia (RP-IP-HPLC, RP-IP-LC)	apolárisabb	polárisabb + hidrofób ion
hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (HILIC)	polárisabb	kevésbé poláris
optikai izomerek elválasztása (királis HPLC)	optikailag aktív	NP, RP, PO
ioncserés nagyhatékonyságú kromatográfia (IEC, IE-PLC)	ionos	puffer, vagy ion tartalmú víz és szerves oldószer
nem vizes méretkizárásos kromatográfia (SEC) (régébbi nevén gél permeációs kromatográfia, GPC)	apoláris, nagy pórus átmérőjű	szerves oldószer
vizes méretkizárásos kromatográfia (SEC) (régébbi nevén gél szűrés, GFC)	poláris, nagy pórus átmérőjű	puffer
hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (HIC)	mérsékelten apoláris	negatív sógradiens (1-4 mol/L)

Folyadékromatográfiás módszerek osztályba sorolása a mozgó- és állófázis szempontjából

Módszer	Vegyület jellege	Kizáró ok
NPLC	közepesen poláris	ionos jelleg, nincs poláris csoport a vegyületben, nagy polaritású anyagok
RPLC	apoloráris	ionos jelleg kis apoláris résszel, nagy polaritás
RP-IP-LC	ionos	nem ionos vagy nem ionizálható
HILIC	nagy polaritású, ionos	apoláris, és ionos állapotba nem hozható
Királis	enantiomerek	
IEC	ionos	nem ionos vagy nem ionizálható
SEC/GPC	apoláris polimer	poláris polimer ionos vagy ionizálható csoporttal
SEC/GFC	biopolimerek	apoláris polimerek
HIC	biopolimerek	kis molekula

Fordított fázis (Reversed Phase, RP)

Szilikagél alapú állófázisok



C18-as felületmódosítás:

- Felületi borítottság ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) kis borítottságú \rightarrow nagy borítottságú
- Felületmódosító jellege: pl. mono-, di- vagy triklór szilán / „árnyékoló” csoportok / kontrollált polaritás (embedded)...
- Utószilanizálás (endcap) jellege

A szilikagél főbb tulajdonságai:

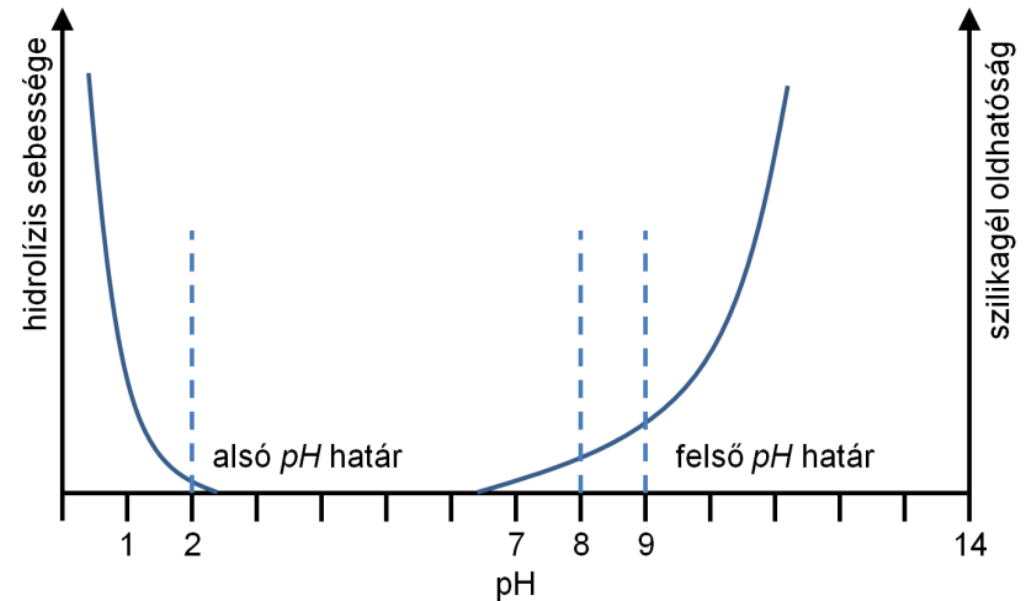
- Szilikagél típusa: A, B vagy C
- Átlagos pórusátmérő (d_p) mikropórus \rightarrow makropórus
- Fajlagos felület (m^2/g)
- Fajlagos pórustérfogat (V_p)

Szilikagél alapú állófázisok

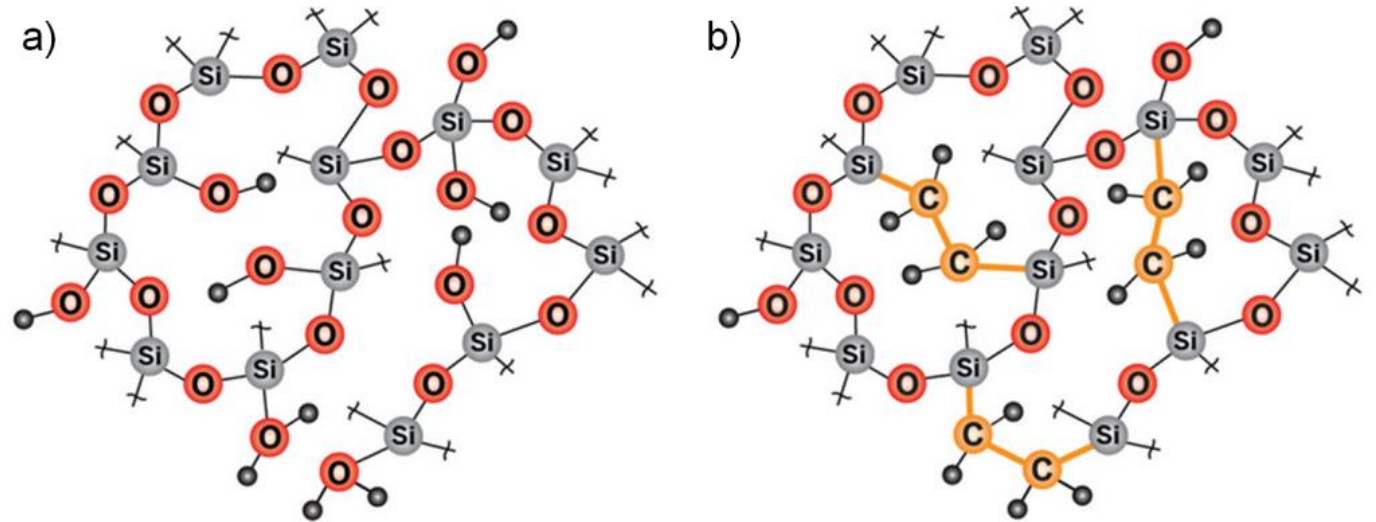
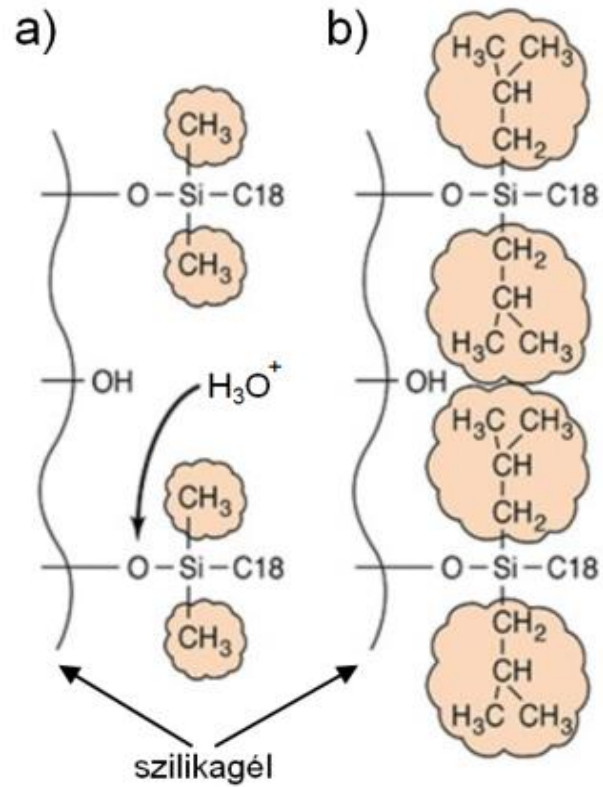
A módosított szilikagél pH térése

Az alkalmazható pH tartomány felső korlátját a szilikagél oldhatósága szabja meg, amely 8-9-es pH fölött jelentősen nő. A kétszeres utószilanizálással kezelt, illetve a hibrid fázisok esetében, a felső pH -határ 10-12-ig tolható ki.

Alacsonyabb pH -n viszont a szilanizálással a felületre felvitt csoportok hidrolízisének sebessége jelentősen megnő, így az alkalmazhatóság alsó korlátja $pH = 1-2$ között van. A szilikagél felületén lévő fémionok gyengítik a közelükben lévő $Si-O-Si(CH_3)_2-R$ kötést, ami a hidrolízis sebességét megnöveli, az alkalmazhatóság alsó pH -értékét növeli.



„pH-tűrő” állófázisok



„Hagyományos” a) és etilénhidas-hibrid b)
szilikagél alapú állófázisok szerkezete (pl. XBridge).

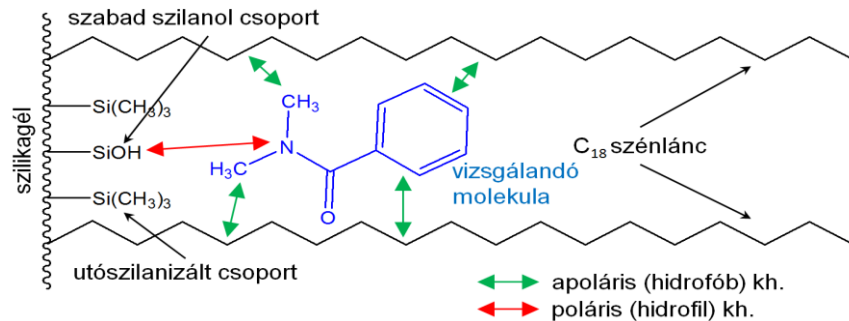
„Hagyományos” a) és „leárnycolt” b)
felületmódosítású szilikagél alapú
állófázisok (pl. Zorbax-SB).

Szilikagél alapú állófázisok

Monomer módosítású állófázisok

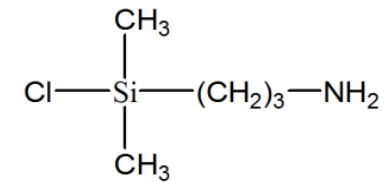
A monomer módosítású szilikagél állófázisokat ez alapján három kategóriába sorolhatjuk:

- nagy felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $> 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$
- közepes felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $\sim 2 - 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$
- kis felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $< 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$



Kölcsönhatási lehetőségeket a vizsgálandó anyag és az állófázis felülete között.

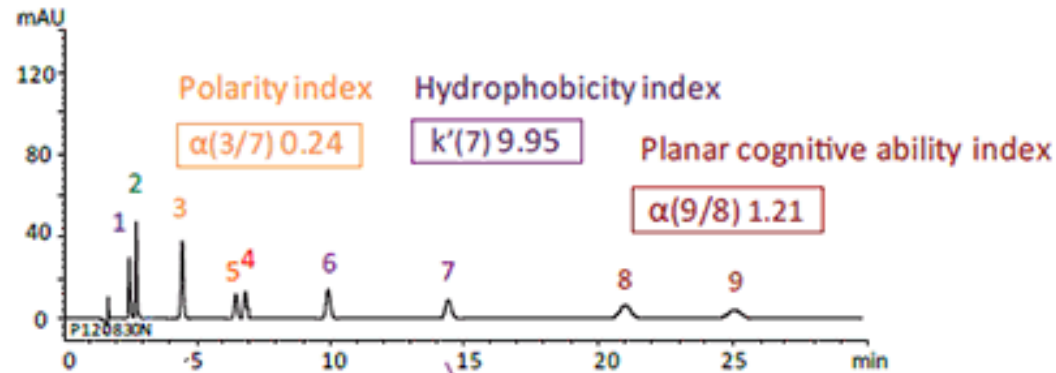
Ha a nem reagált szilanol csoportok hatásának kiküszöbölésére utóreakciót alkalmaznak, akkor utószilanizált, fázist kapunk és ezzel lecsökkentjük a hozzáférhető szilanol csoportok számát. Ha az utóreakciót monofunkciós szilánnal hajtjuk végre ún. *end capped* fázisokat kapunk. Átmeneti és polimer módosításnál a legnagyobb mértékű a változás. Az utószilanizálás hatására teljesen eltérő tulajdonságú töltetet alakul ki, így az *end capped* és nem *end capped* állófázisok nem felcserélhetők.



A dimetil-propil-amino-klórszilán speciális utószilanizáló szer.

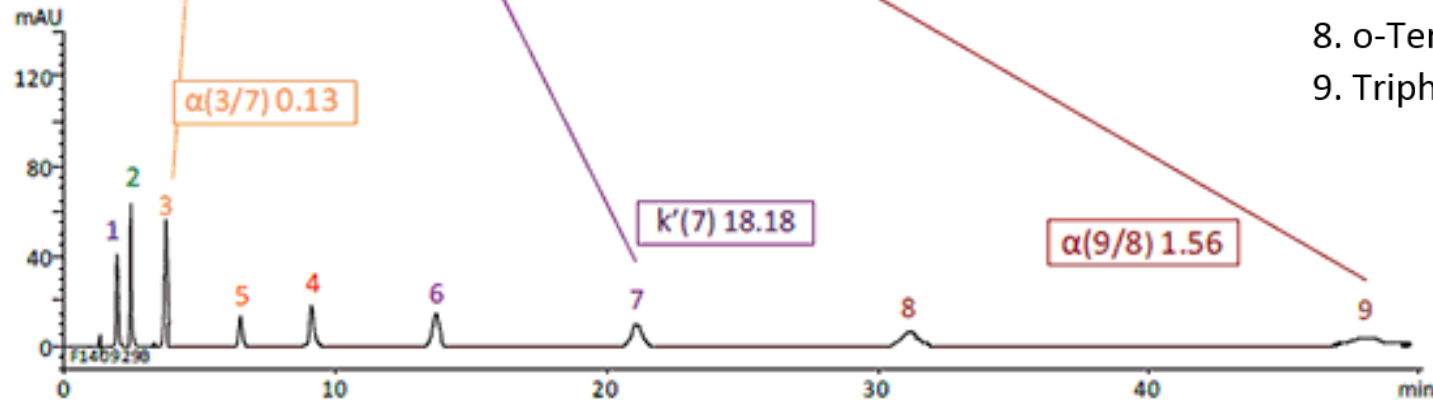
„Hagyományos” C18-as állófázisok

Triart
C18



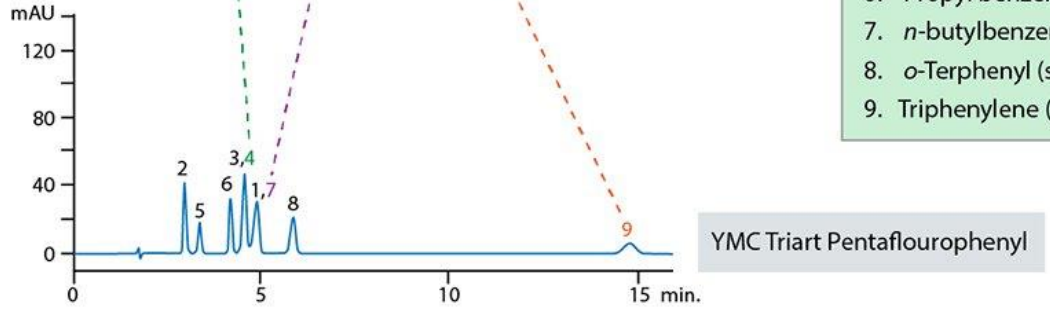
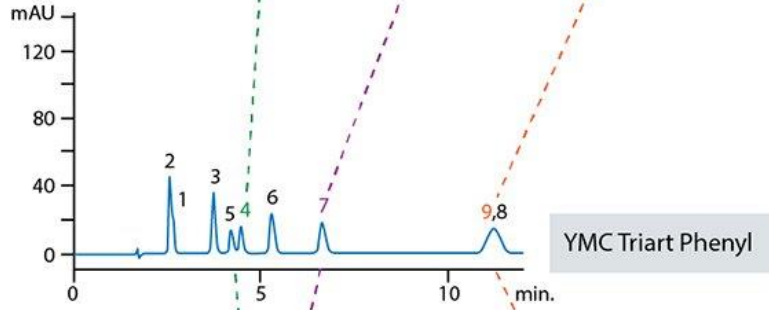
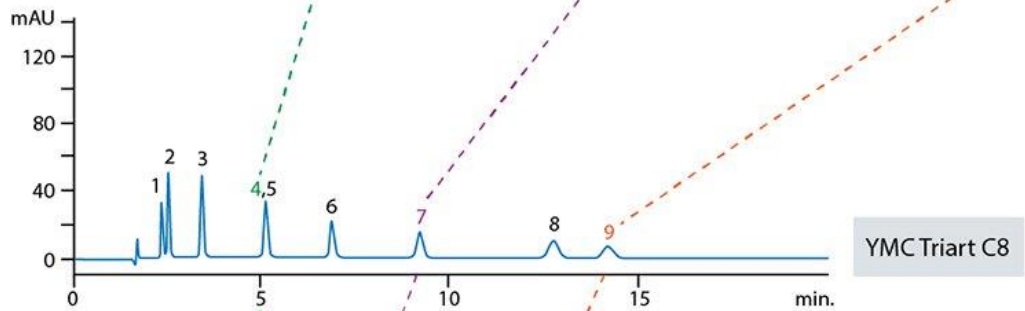
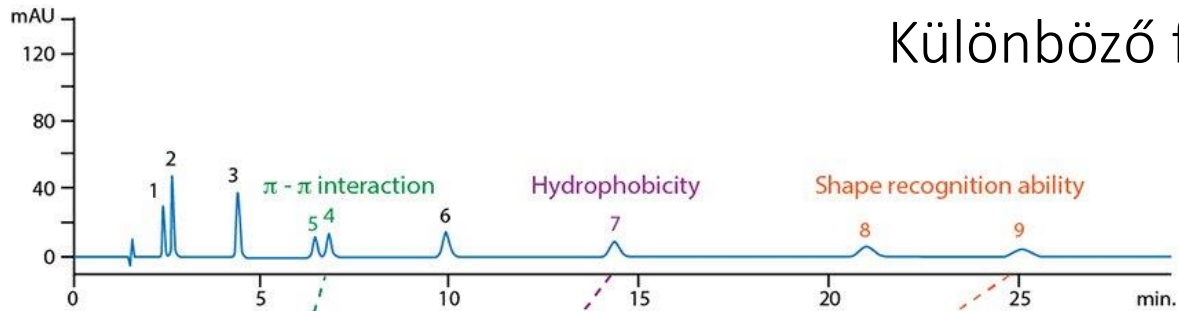
1. Amitriptyline (basic compound)
2. 8-Quinolol (coordination compound)
3. Testosterone (polar compound)
4. Naphthalene (π - π interaction)
5. Ibuprofen (acidic compound)
6. Propylbenzene (hydrophobicity)
7. n-Butylbenzene (hydrophobicity)
8. o-Terphenyl (planar cognitive ability)
9. Triphenylene (planar cognitive ability)

Triart
C18 ExRS



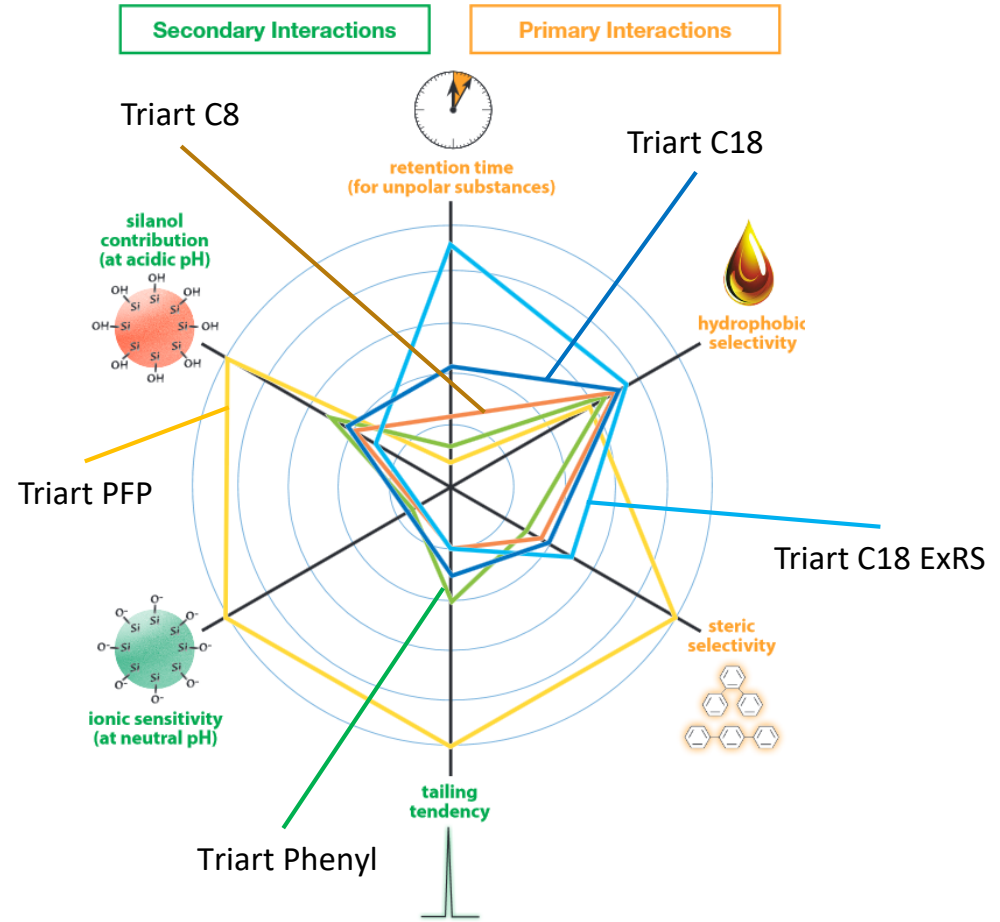
Column : 5 μ m, 150 X 3.0 mm I.D.
 Eluent : 20 mM KH_2PO_4 - H_3PO_4 (pH 3.1)/methanol (25/75)
 Flow rate : 0.425 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : UV at 265 nm
 Injection : 4 μ L

Különböző felületmódosítás



1. Amitriptyline (basic compound)
2. 8-Quinolol (coordination compound)
3. Testosterone (polar compound)
4. Napthalene ($\pi - \pi$ interaction)
5. Ibuprofen (acidic compound)
6. Propyl benzene (hydrophobic compound)
7. *n*-butylbenzene (hydrophobic compound)
8. *o*-Terphenyl (shape selectivity probe)
9. Triphenylene (shape selectivity probe)

Column : 5 μ m, 150 X 3.0 mmI.D.
Eluent : 20 mM KH_2PO_4 - H_3PO_4 (pH 3.1)/methanol (25/75)
Flow rate : 0.425 mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV at 265 nm
Injection : 4 μ L



RP mozgófázis

A fordított fázisú folyadékkromatográfiában alkalmazott mozgófázisokkal szemben támasztott általános követelmények a következők:

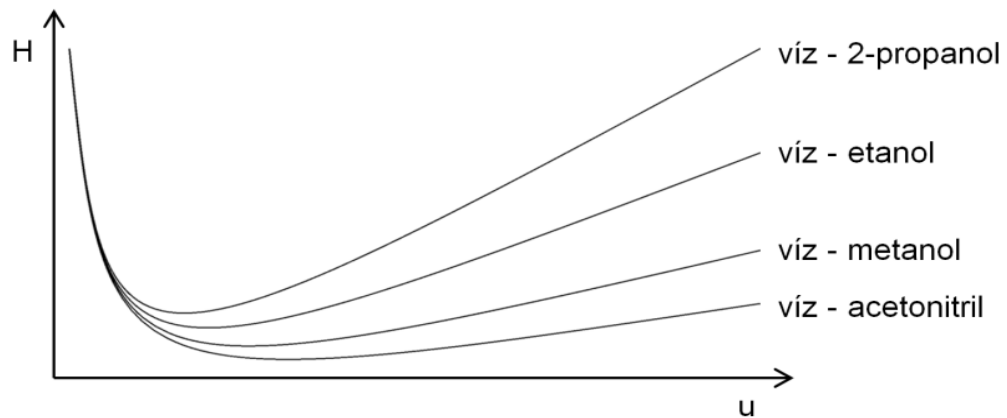
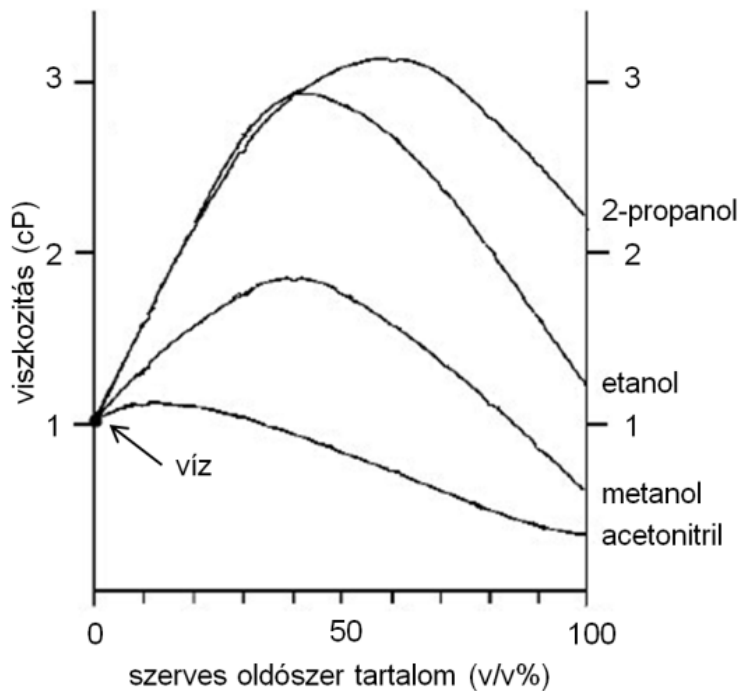
- tisztasági követelmény:
 - a lehető legtisztább oldószert kell használni,
 - az oldószer nem tartalmazhat szilárd anyagot,
- jó UV-fény áteresztőképesség (UV cut-off),
- kis viszkozitás,
- a mintakomponenseknek jól kell oldódniuk a mozgófázisban,
- kis toxicitás,
- módszer specifikus követelmény, hogy a mozgófázisnak polárisabbnak kell lennie, mint az állófázisnak.

Ezeknek a kritériumoknak a víz általában megfelel, hiszen kellő tisztaságban 190 nm-ig nem nyel el UV-fényt és kis viszkozitású ($\eta = 1$ cP).

A szerves molekulák tekintélyes része azonban nem oldódik vízben, a mozgófázis oldóképességének növelését tehát vízzel elegyedő oldószerek hozzáadagolásával oldjuk meg.

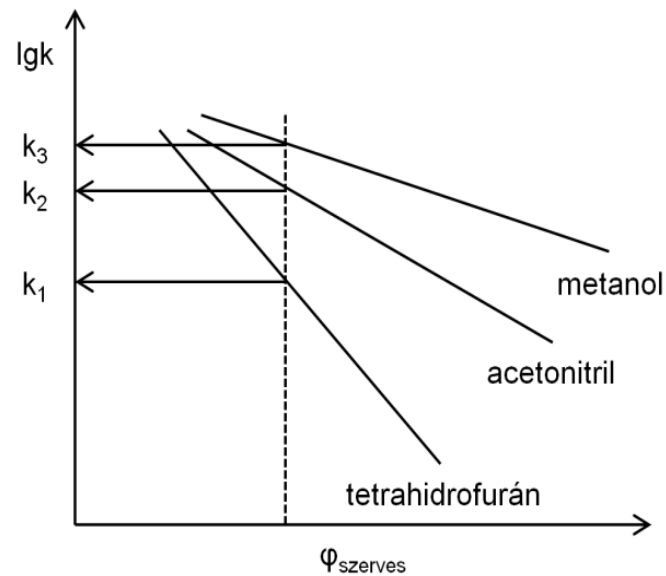
Oldószer	UV cut-off (nm)	Törésmutató (20°C)	Viszkozitás (cP)	Forráspont (°C)	Polaritás (P')
Acetonitril	190	1,3441	0,38	81,6	5,8
Dioxán	215	1,4224	1,37	101,3	4,8
Etanol	210	1,3614	1,20	78,0	n.a.
Metanol	205	1,3284	0,55	64,7	5,1
2-Propanol	205	1,3772	2,40	82,3	3,9
Tetrahidrofurán	212	1,4072	0,55	66,0	4,0
Víz	190	1,3330	1,00	100,0	10,2

RP mozgófázis



$$D_M = \frac{A(\Psi M)^{1/2} T}{\eta V^{0,6}}$$

Wilke-Chang összefüggés

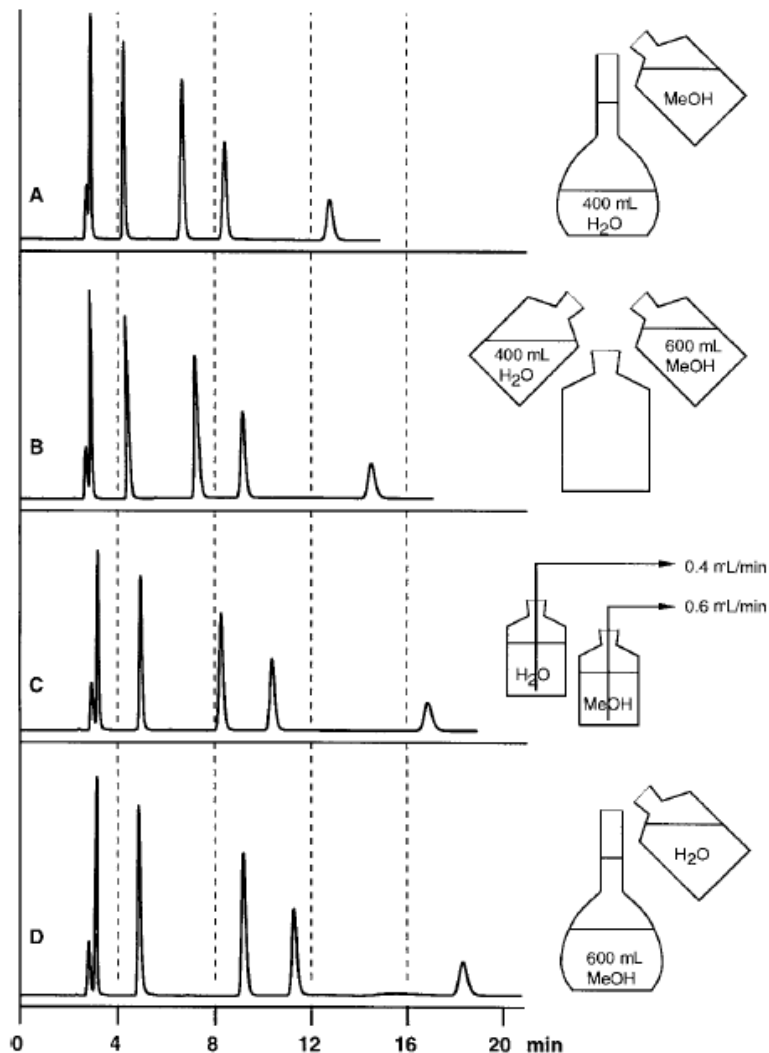


$$\Delta p = \frac{\phi \eta L u}{d_p^2}$$

Darcy-törvény

$$H = A \cdot d_p + f_1(k) \frac{D_M}{u} + f_2(k) \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M}$$

RP mozgófázis



Kálium-foszfát (pH=7,0) oldhatósága különböző összetételű víz-szerves oldószer elegyekben.

%B	MeOH	AcN	THF
50	> 50 mM	> 50 mM	25 mM
60	> 50 mM	45 mM	15 mM
70	35 mM	20 mM	10mM
80	15 mM	5 mM	< 5 mM
90	5 mM	0 mM	0

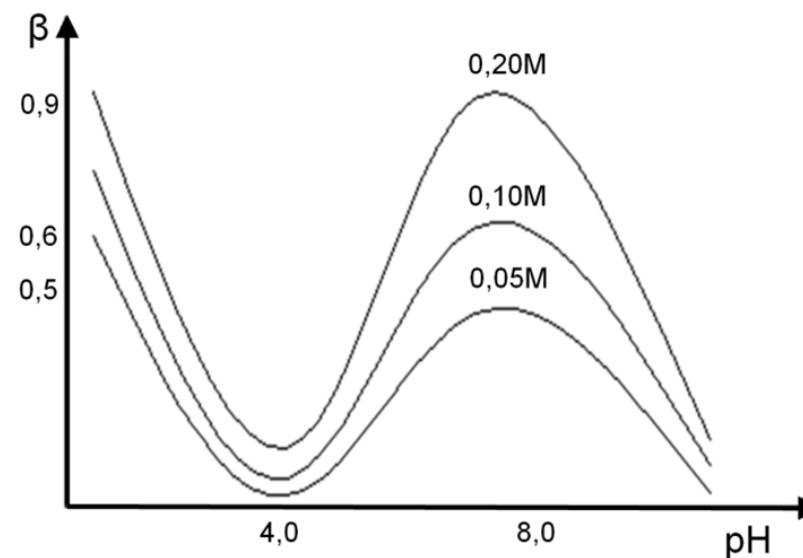
Különböző pufferek oldhatósága különböző összetételű víz-acetonitril elegyben.

%B	ammónium- acetát pH=5,0	ammónium- foszfát pH=3,0	kálium- foszfát pH=3,0	ammónium- foszfát pH=7,0	kálium- foszfát pH=7,0
60	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	45 mM
70	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	25 mM	20 mM
80	> 50 mM	35 mM	20 mM	5 mM	0 mM
90	25 mM	5 mM	0 mM	0 mM	0 mM

RP mozgófázis

Néhány vegyület pK_a értéke vizes környezetben.

Puffer	pK_a	pH tartomány	UV cut-off
Trifluoecetsav	< 2	< 2,5	210nm (0,1%)
Foszfát (pK_1)	2,1	1,1 – 3,1	< 200nm (10mM)
Citrát (pK_1)	3,1	2,1 – 4,1	230nm (10mM)
Formiát	3,8	2,8 – 4,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_2)	4,7	3,7 – 5,7	230nm (10mM)
Acetát	4,8	3,8 – 5,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_3)	5,4	4,4 – 6,4	230nm (10mM)
Karbonát (pK_1)	6,4	5,4 – 7,4	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_2)	7,2	6,2 – 8,2	< 200nm (10mM)
Trietanolamin	7,8	6,8 – 8,8	200nm (10mM)
Tris	8,3	7,3 – 9,3	205nm (10mM)
Dietanolamin	8,9	7,9 – 9,9	200nm (10mM)
Ammónia	9,2	8,2 – 10,2	200nm (10mM)
Etanolamin	9,5	8,5 – 10,5	200nm (10mM)
Karbonát (pK_2)	10,3	9,3 – 11,3	< 200nm (10mM)
Dietilamin	10,5	9,5 – 11,5	< 200nm (10mM)
Trietilamin	11,0	10,0 – 12,0	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_3)	12,3	11,3 – 13,3	< 200nm (10mM)



A pufferkapacitás változása a pH-val és a koncentrációval foszfát puffereknél.

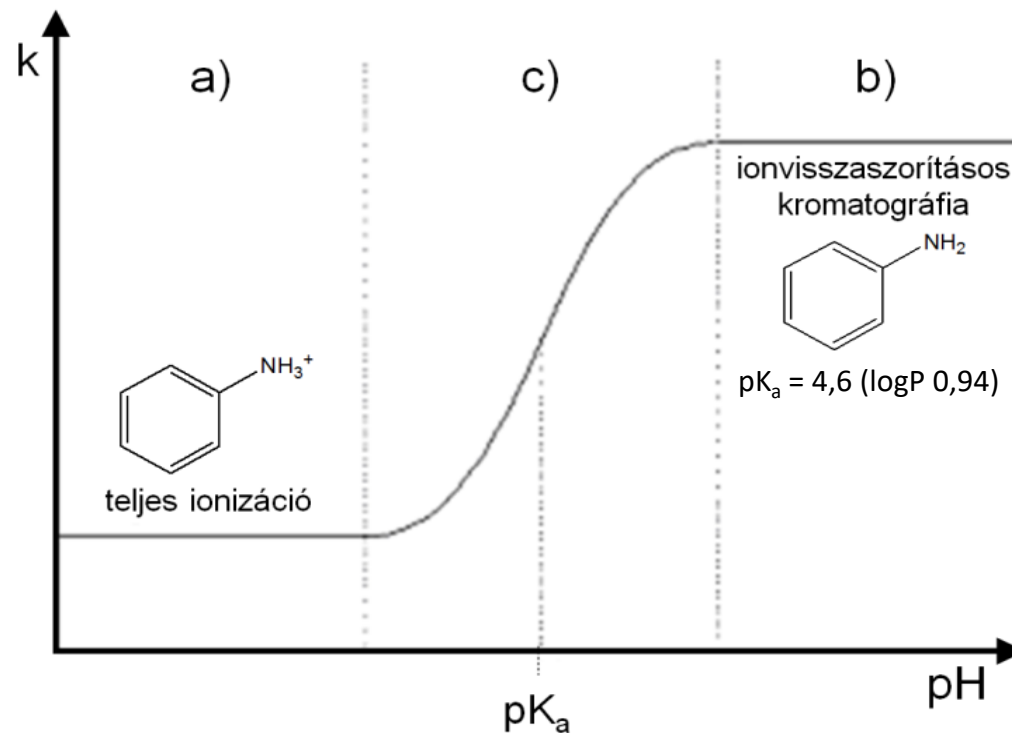
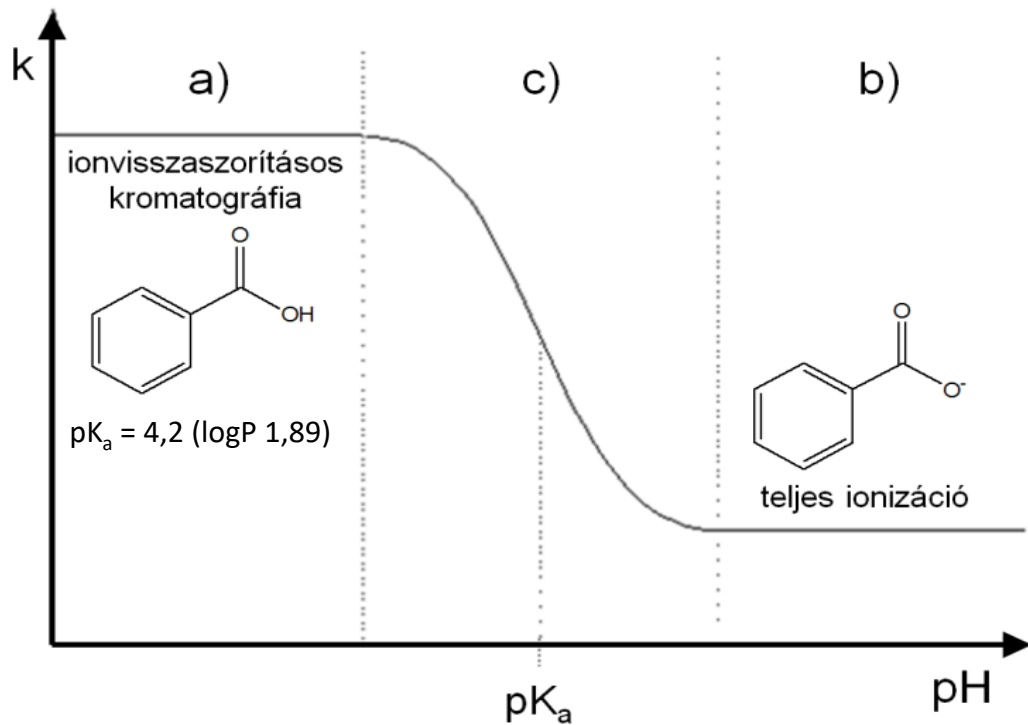
RP mozgófázis

Kromatográfiai szempontból a vegyületek négy csoportra oszthatók:

- kromatográfiai szempontból semleges vegyületek, a) és b) csoport
 - a) csoport: aromás és alifás szénhidrogének, halogénezett aromás és alifás szénhidrogének
 - ✓ **nem szüksége pH kontroll**
 - b) csoport: alkoholok, éterek, észterek, aldehidek, ketonok, nitrilek, nitro-vegyületek, azo-vegyületek
 - ✓ **állófázis szempontjából szükség lehet pH kontrollra**
- savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
 - ✓ **pH kontroll szükséges**
- bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
 - ✓ **pH kontroll szükséges**
- ionos vagy ionizálható vegyületek
 - ✓ **pH kontroll szükséges**



RP mozgófázis



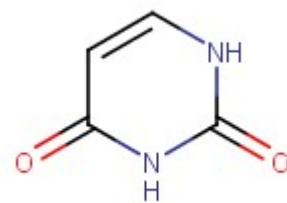
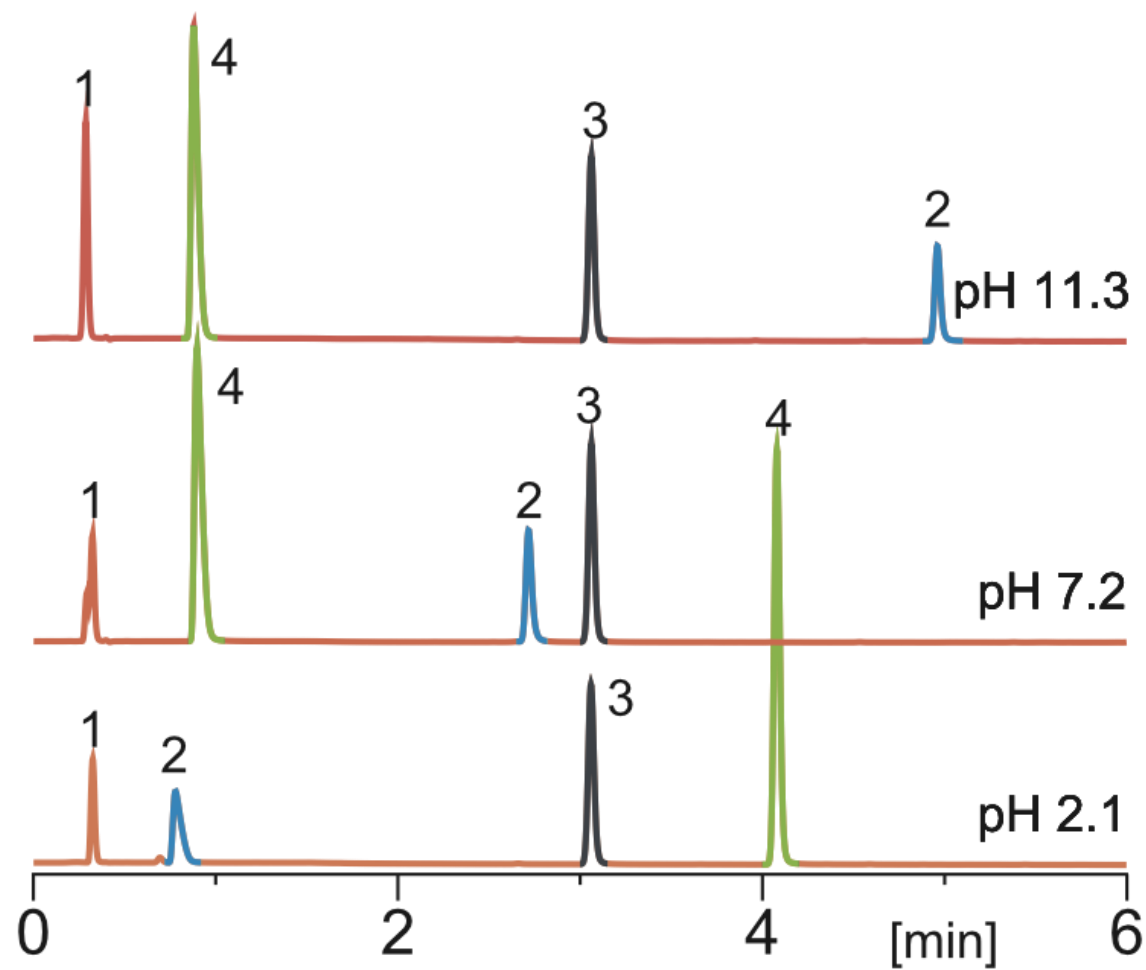
A pH-retenciós tényező függvény savas vegyületek esetében.

- a) ionvisszaszorított forma
- b) teljesen ionizált forma
- c) mindkét forma jelen van a mozgófázisban

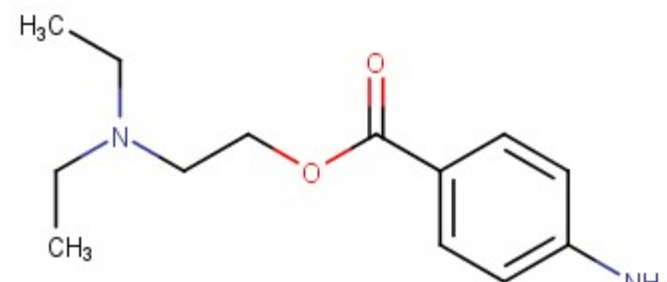
A pH-retenciós tényező függvény bázikus vegyületek esetében.

- a) teljesen ionizált forma
- b) ionvisszaszorított forma
- c) mindkét forma jelen van a mozgófázisban

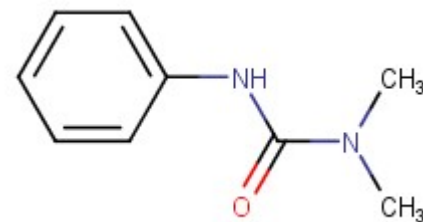
RP mozgófázis



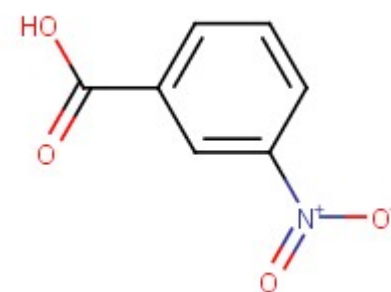
1: Uracil



2: Prokain (pKa=8,05)



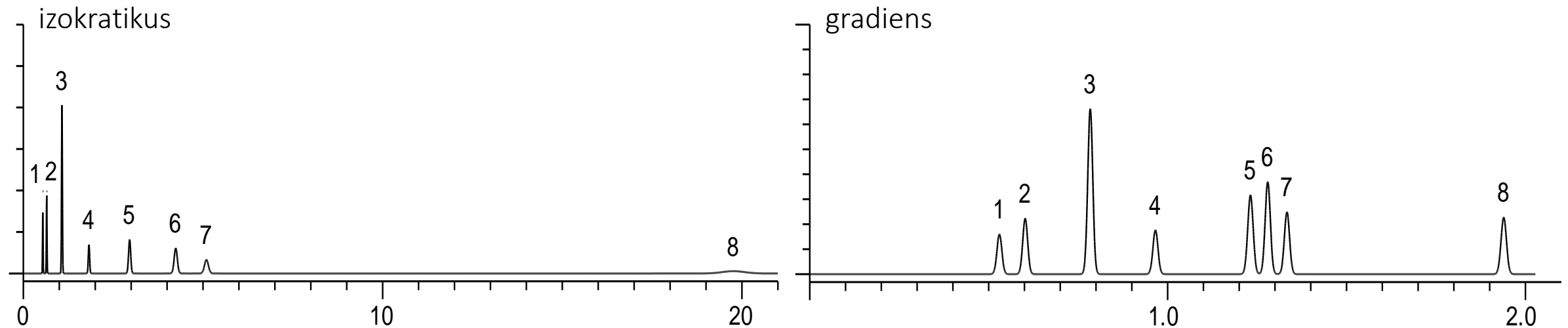
3: Fenuron



4: 3-nitrobenzoésav (pKa=3,36)

Gradiens elúció szükségessége a fordított fázisú folyadékkromatográfiában

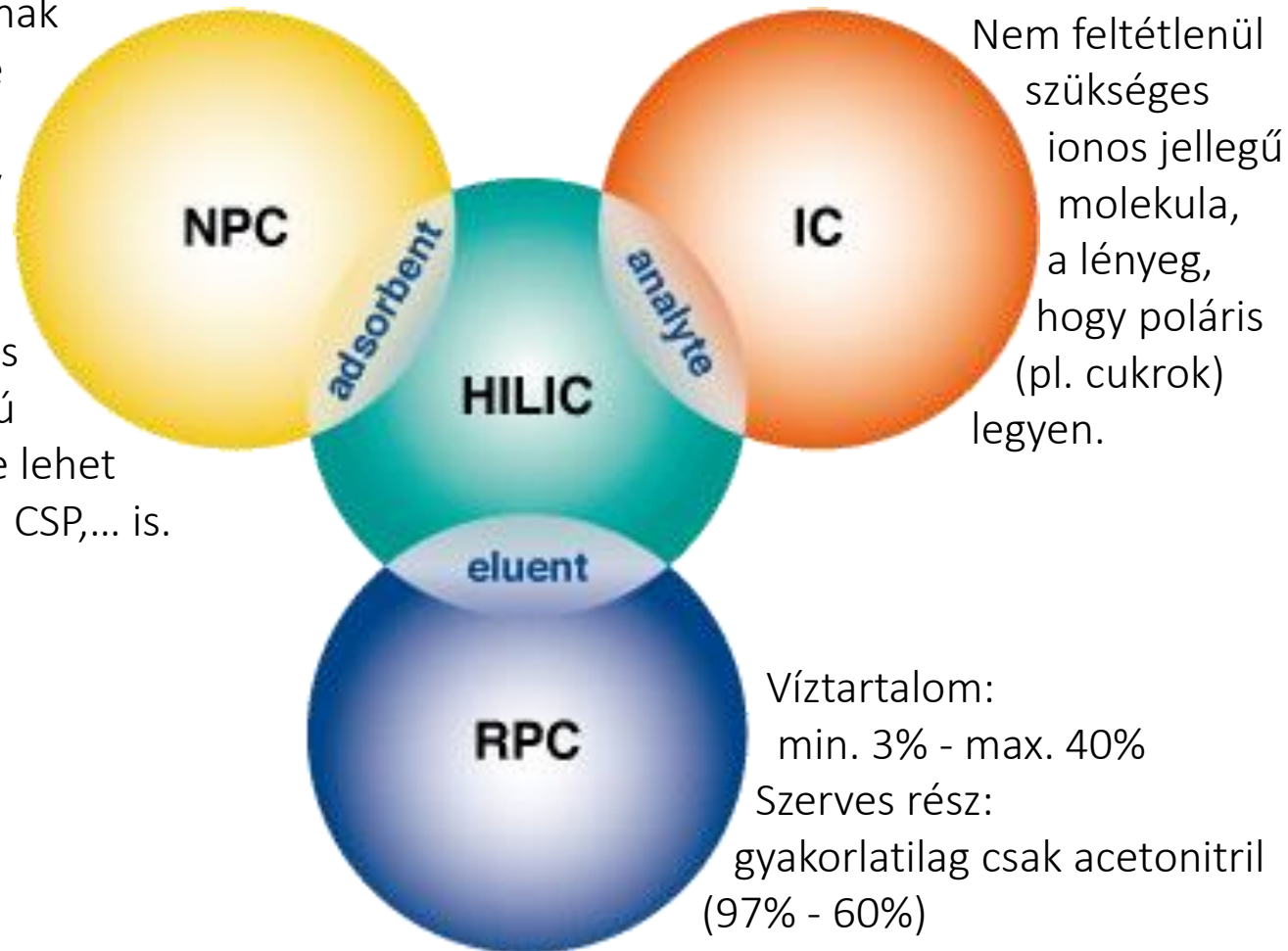
A kromatográfiás gyakorlatban sokszor előfordul, hogy az elválasztani kívánt vegyületek kromatográfiás tulajdonságai nagyon eltérnek egymástól, ilyenkor az izokratikus elválasztás nem lehetséges, mert izokratikus rendszerben a nagyobb megoszlási hányadossal jellemzett komponensek nagy retencióval eluálódnak, szélesednek és szinte beleolvadnak az alapvonalba. Az eluenserősség növelésével viszont a kevésbé visszatartott komponensek között romlik a felbontás, koelúció jöhet létre. Ezt nevezzük általános elúciós problémának.



Erre a problémára jelenthet megoldást a gradiens elúció alkalmazása. A gradiens elúció alkalmazásával jelentősen le tudjuk csökkenteni az elemzési időt eltérő kromatográfiás tulajdonságú komponensek esetén és elérhető, hogy azonos szélességű kromatográfiás csúcsokat kapjunk.

Hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC)

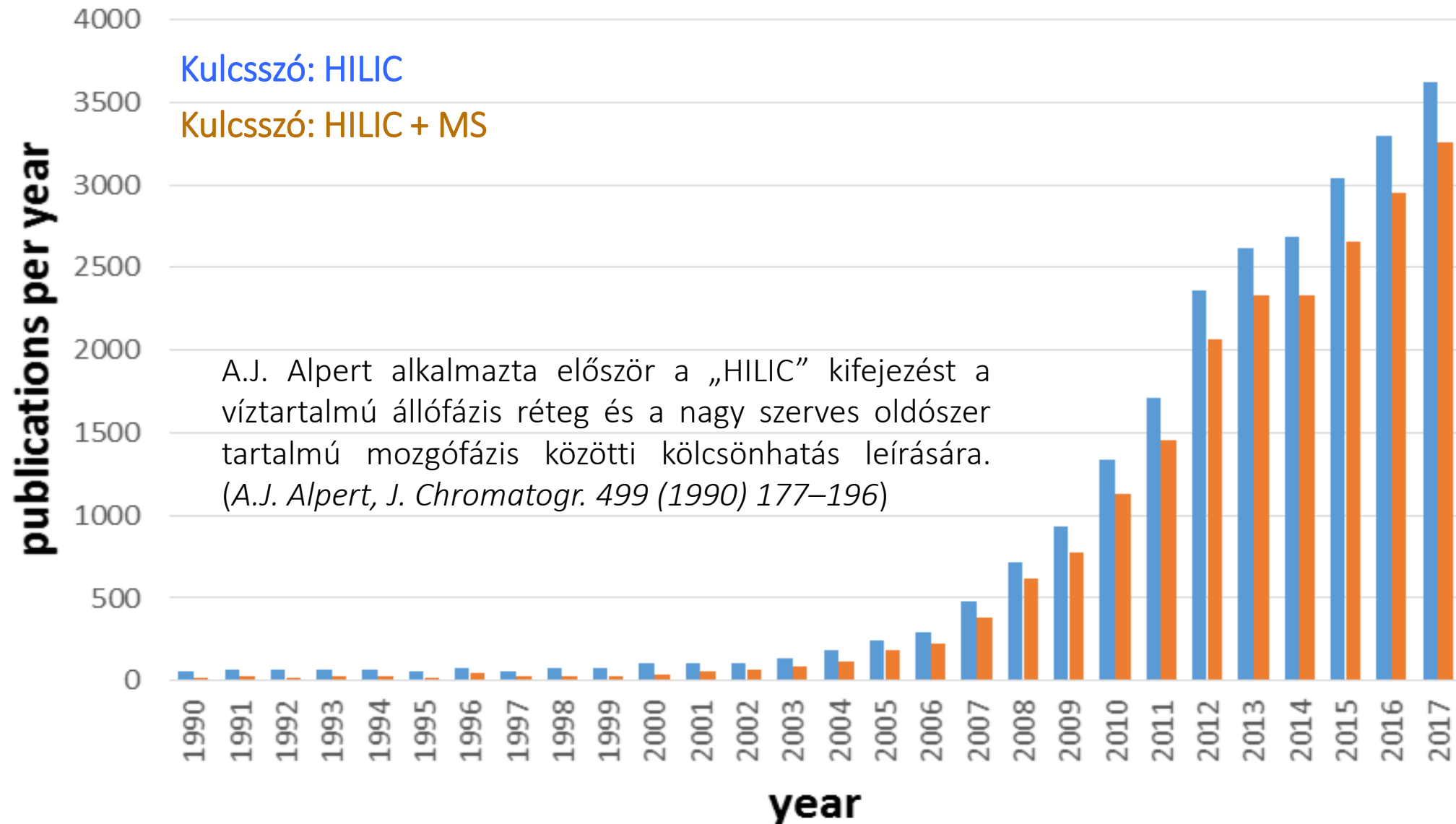
Poláris kölcsönhatás kialakításának lehetősége szükséges. Lehet nagy szilanol aktivitású vagy poláris módosítású RP fázis, de lehet ioncserélő, CSP,... is.



Nem feltétlenül szükséges ionos jellegű molekula, a lényeg, hogy poláris (pl. cukrok) legyen.

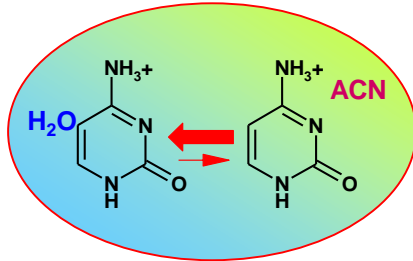
Víztartalom:
min. 3% - max. 40%
Szerves rész:
gyakorlatilag csak acetonitril
(97% - 60%)

A HILIC „népszerűsége”



Retenciós mechanizmus

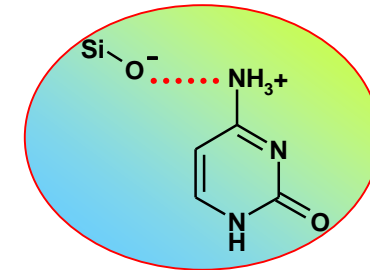
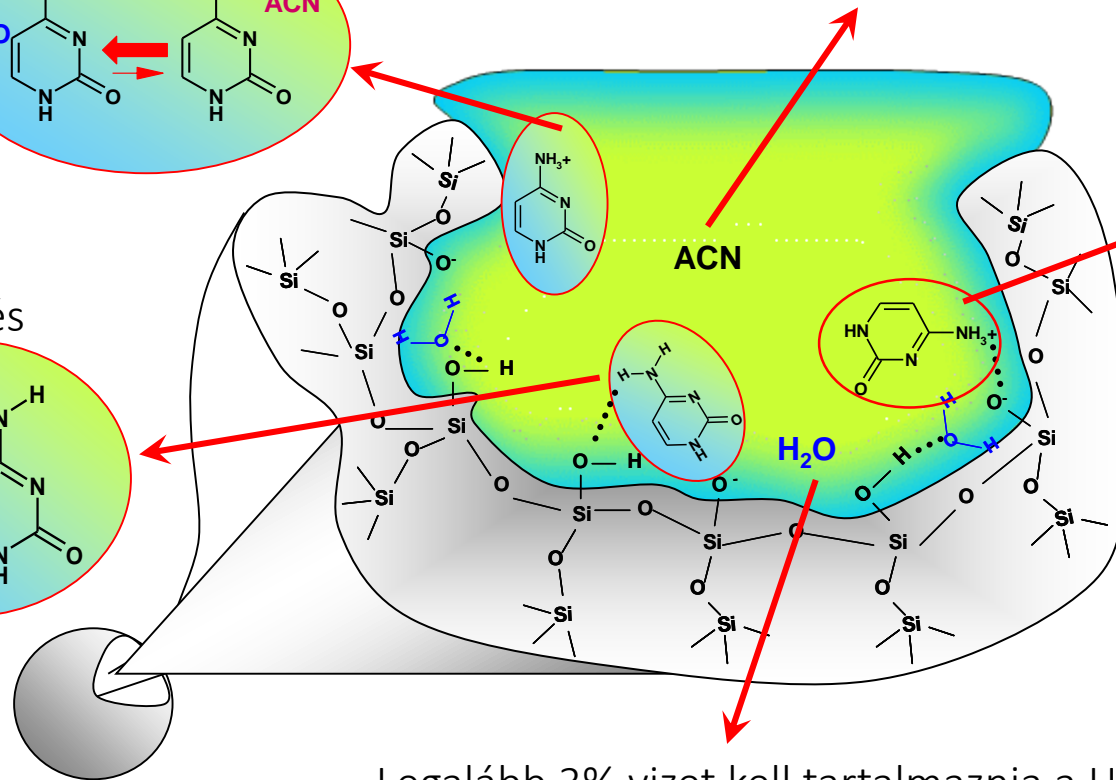
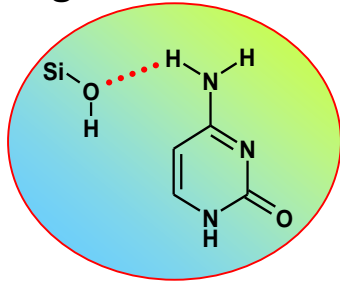
Hidrofil megoszlás a felületen lévő vízréteg és az aprotikus szerves oldószer között



Mozgófázis szerves rész gyakorlatilag csak acetonitril (97% - 60%)

A felületen lévő szilanol csoportok alacsony pH-n semlegesek, de magasabb pH-n kation cserélő jellegűek

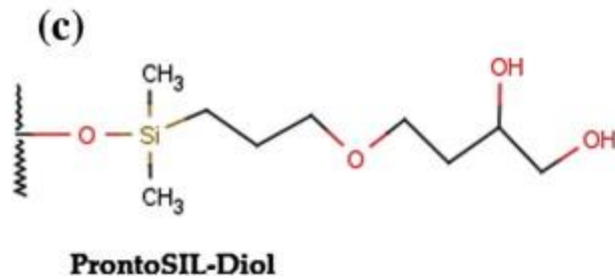
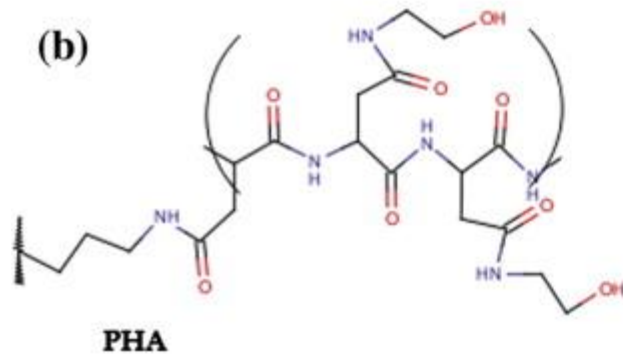
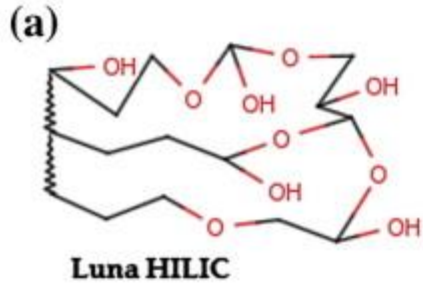
Hidrogén kötés



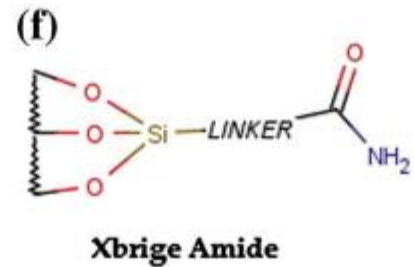
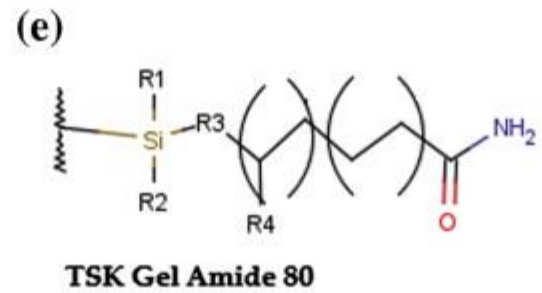
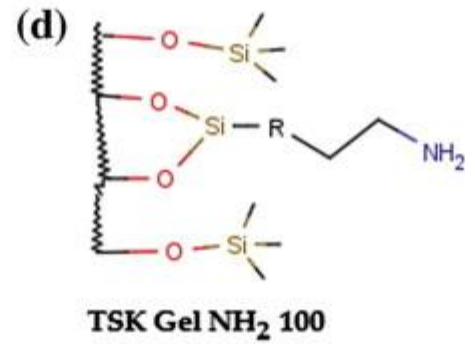
Legalább 3% vizet kell tartalmaznia a HILIC mozgófázisnak, hogy visszatartás kialakuljon.

HILIC állófázisok

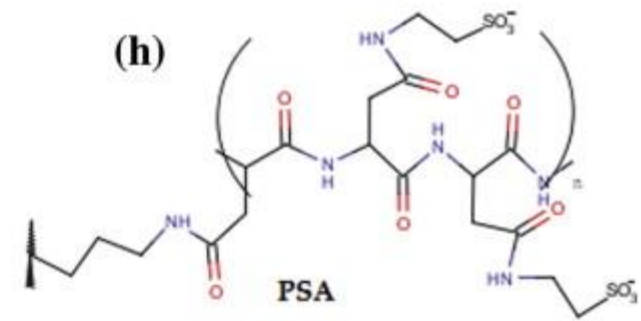
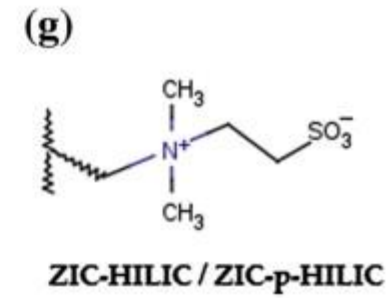
Hydroxylated columns



Amine and amide columns



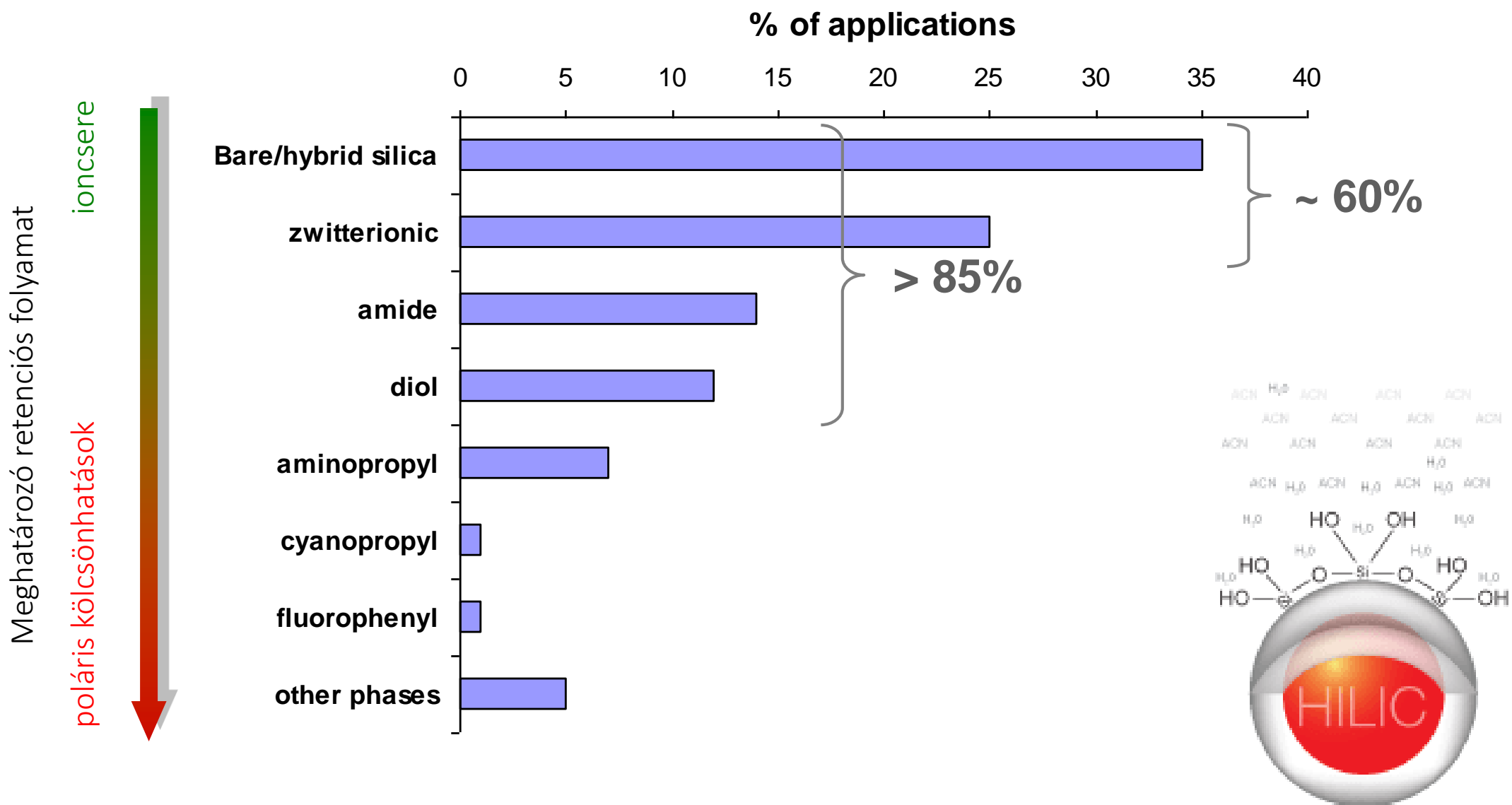
Charged columns



Other columns



HILIC állófázisok



HILIC mozgófázis

A mozgófázissal szemben támasztott követelmények a HILIC-ban:

- A HILIC-ban használt mozgófázisoknak is eleget kell tenni azoknak az általános feltételeknek, amelyeket akár a normál, akár a fordított fázisú folyadékkromatográfiában megköveteltünk. Az általánosan megadott követelmények mellé jön az a HILIC megszabta követelmény, hogy kevésbé kell polárisnak lenni, mint az állófázis felületén kialakult vízrétegnek.
- A HILIC módszernél a mozgófázisnak kis mennyiségű vizet minden esetben kell tartalmaznia, mivel általánosan elfogadott, hogy az állófázis felületén kialakult vízréteg és a kevésbé poláris mozgófázis közötti eltérő megoszlás eredményezi a komponensek eltérő vándorlási sebességét.
- A HILIC gyakorlata szempontjából fontos oldószerek elúciós erőssége: víz > metanol > acetonitril > tetrahidrofurán
- A nagy szerves oldószer tartalom miatt a puffer típus megválasztása kritikus. A szerves pufferok, így a foszfát pufferok a nagy szerves oldószer tartalmú mozgófázisokban nem oldódnak. Más szavakkal inkompatibilisek a mozgófázissal. A pufferok közül csak a szerves komponens tartalmúak jöhetnek szóba.

*Különböző pufferok oldhatósága
különböző összetételű víz-acetonitril elegyben.*

%B	ammónium- acetát pH=5,0	ammónium- foszfát pH=3,0	kálium- foszfát pH=3,0	ammónium- foszfát pH=7,0	kálium- foszfát pH=7,0
60	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	45 mM
70	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	25 mM	20 mM
80	> 50 mM	35 mM	20 mM	5 mM	0 mM
90	25 mM	5 mM	0 mM	0 mM	0 mM

- pH tompító hatású anyagokként, azaz a folyadékkromatográfiás gyakorlatban pufferként használatosak a következő anyagok: ammónium-acetát, hangyasav, ecetsav, trifluorecetsav.

HILIC mozgófázis

Mozgófázis pH-ja

- A pH jelentős befolyással van a protonfunkciós csoportot tartalmazó molekulák töltésállapotára, polaritására. Ezáltal a pH befolyásolja az ionos kölcsönhatásokat és a molekulák hidrofíliáját.
- A pH befolyásolja az állófázis felületén lévő szilanol csoportok aktivitását.

Pufferek és a puffer koncentráció hatása

- A HILIC-ban a puffer koncentráció hasonló hatást fejt ki a mint az ioncserés kromatográfia (IEX) esetén. A puffer koncentráció növelése csökkenti a bázikus jellegű molekulák retencióját.
- Legtöbb esetben az ammónium-formiátot és ammónium-acetátot alkalmazzák pH tompítónak a HILIC gyakorlatában.

MeCN (V/V%)	NH ₄ OAc (mM) pH = 5,0	NH ₄ OAc (mM) pH = 7,0
70%	>50	>50
80%	>50	45
90%	25	20
95%	15	10
97%	10	5

HILIC mozgófázis

aprotikus

protikus

aceton

ACN

IPA

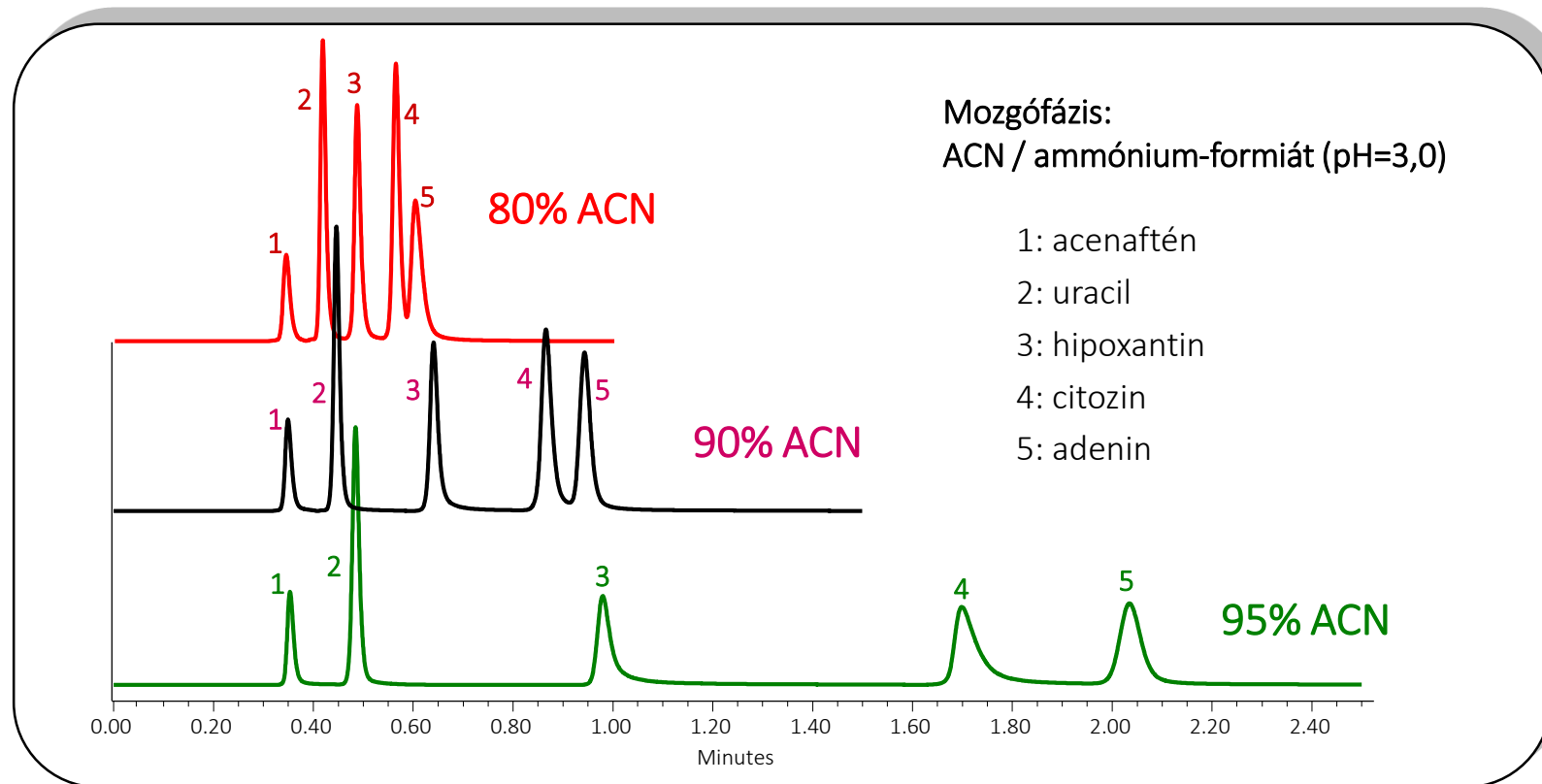
EtOH

MeOH

víz

gyenge eluens

erős eluens



Az acetonitril a legszélesebb körben használt oldószer a HILIC gyakorlatában.

Milyen kolonnatechnológiát használjunk?

A nagy szerves oldószer tartalom miatt a HILIC technikánál 2-3-szor kisebb viszkozitás várható, mint a fordított fázisnál.

- Monolitok:

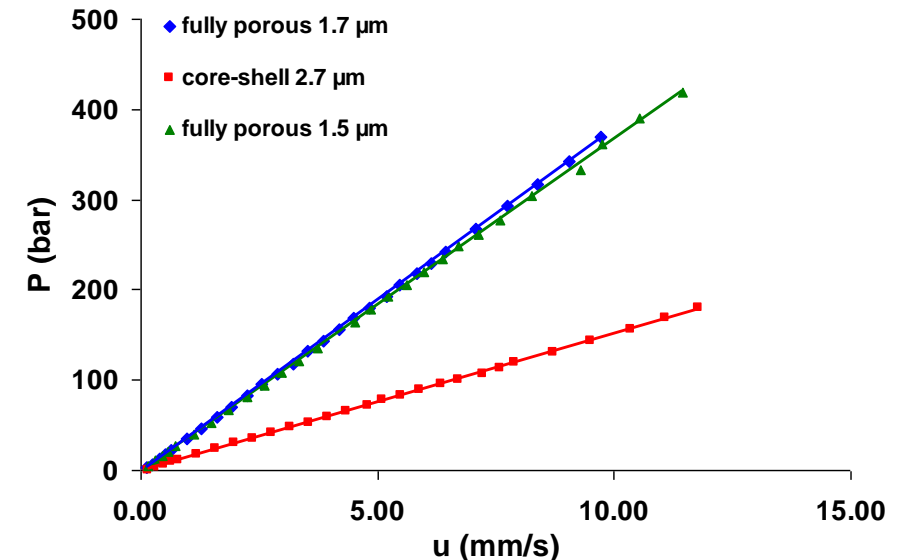
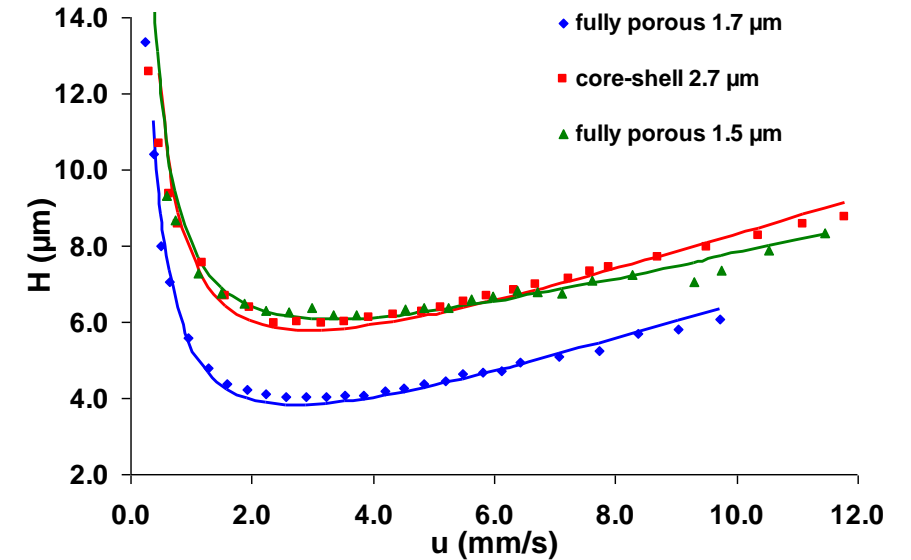
Kevésbé érdekes, hiszen a mozgófázis viszkozitása nem korlátozó tényező.

- Sub-3 μm héjszerű töltetek:

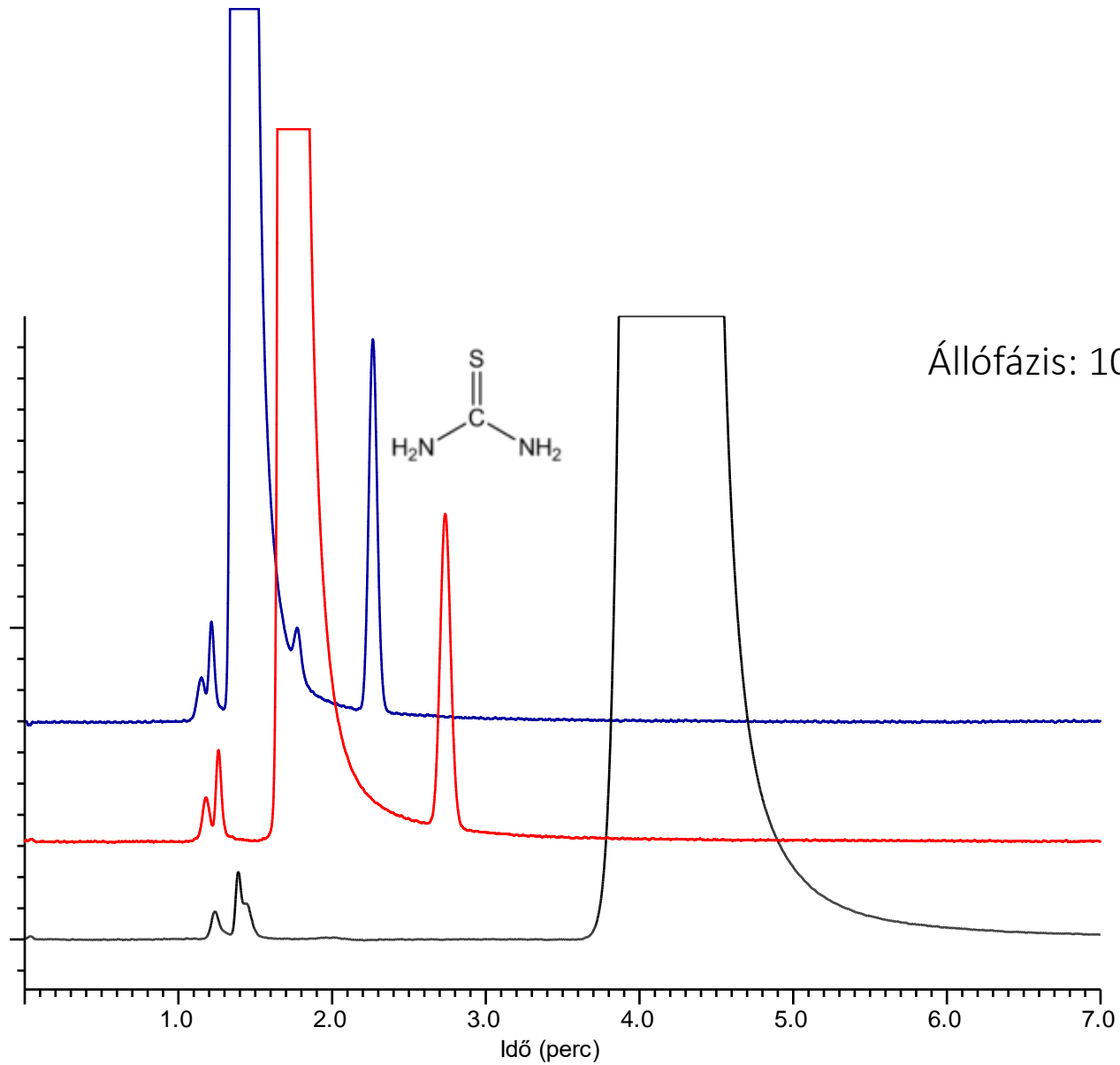
Ki lehet használni a héjszerkezet előnyeit a HILIC esetében is, de még viszonylag kevés héjszerkezetű HILIC állófázis van kereskedelmi forgalomban.

- Sub-2 μm teljesen porózus töltetek:

Legelterjedtebben használt kolonna típus, ugyanis az UHPLC technika két nagy hátránya a megnövekedett nyomásesés és az ebből eredő súrlódási hő nem releváns a HILIC esetében.



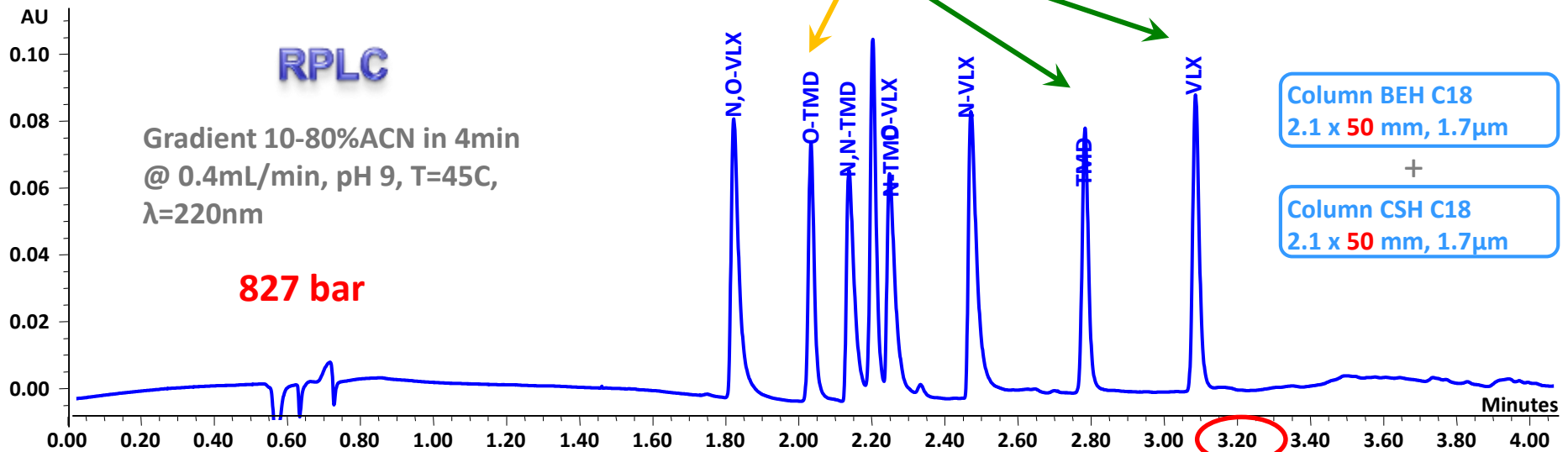
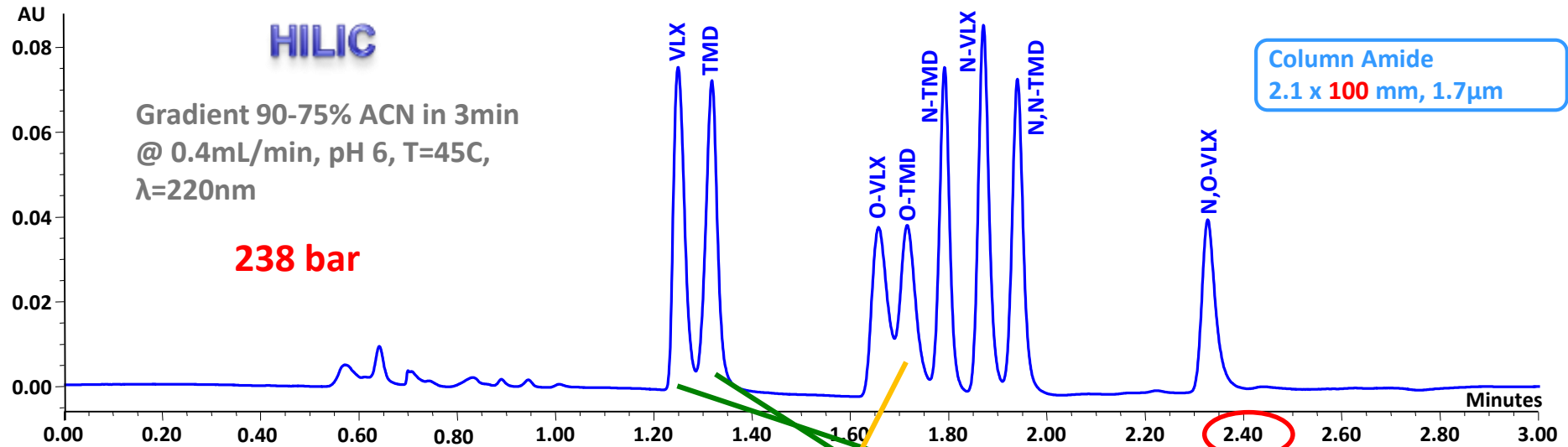
HILIC alkalmazások



Állófázis: 100x4,6 mm ZIC-HILIC, 5 μm

- AcN/víz = 85/15 (v/v%)
- AcN/víz = 90/10 (v/v%)
- AcN/víz = 95/5 (v/v%)

HILIC alkalmazások - gyógyszeranalitika (HILIC vs. RPLC)



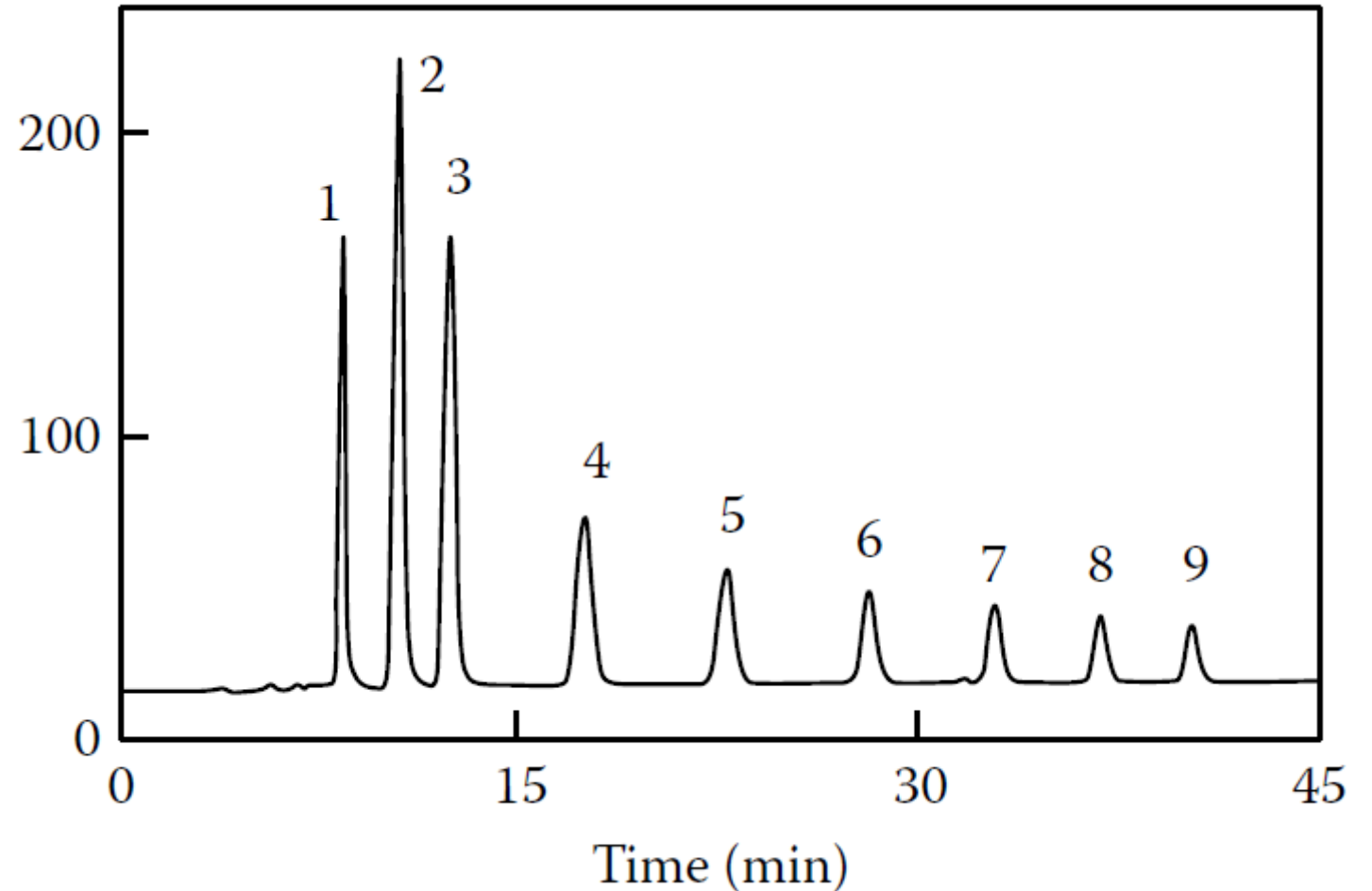
HILIC alkalmazások – szénhidrátok analízise

Simultaneous separation of three **monosaccharides** and six **oligosaccharides**.

A TSK-Gel Amide-80 column was used at 80°C together with post-column labeling by benzamidine followed by fluorescence detection. linear gradient, 80%–60% acetonitrile, in water.

Peaks:

- (1) d-ribose
- (2) d-fructose
- (3) d-glucose
- (4) laminaribose
- (5) laminaritriose
- (6) laminaritetraose
- (7) laminaripentaose
- (8) laminarihexaose
- (9) laminariheptaose

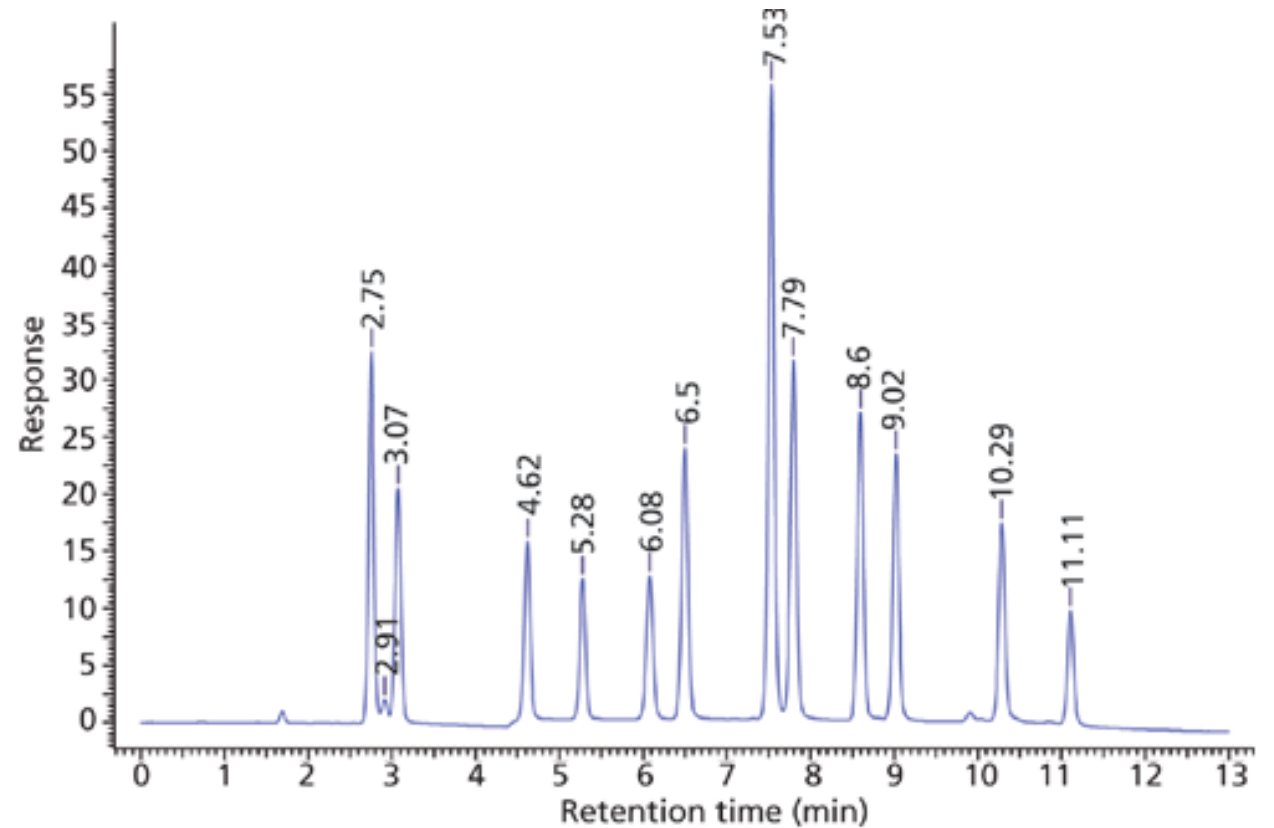


HILIC alkalmazások – nukleozidok analízise

Optimized separation of nucleosides.

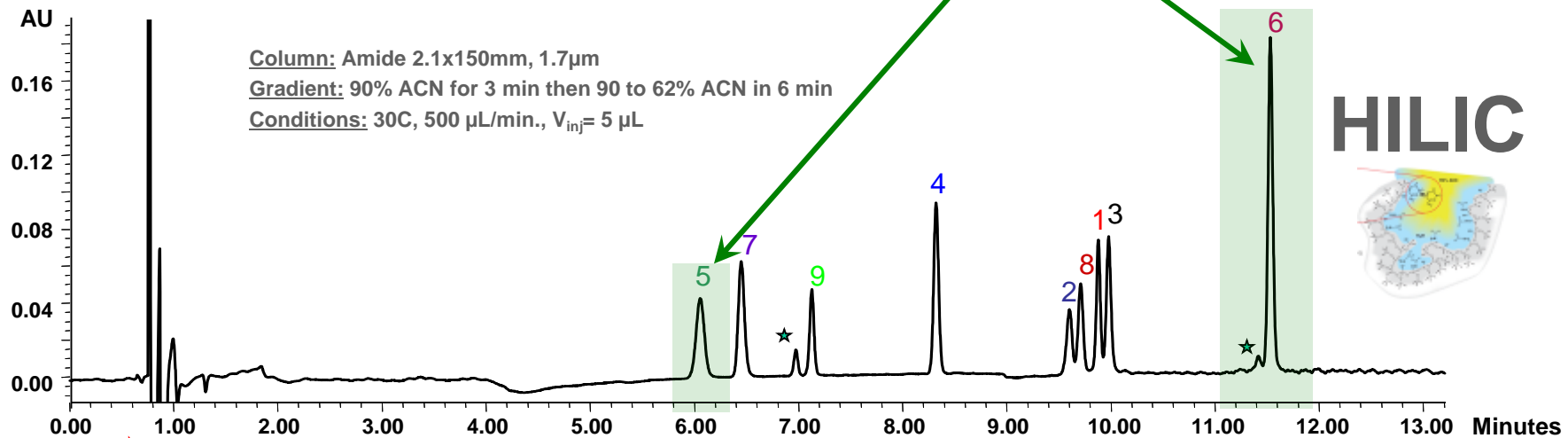
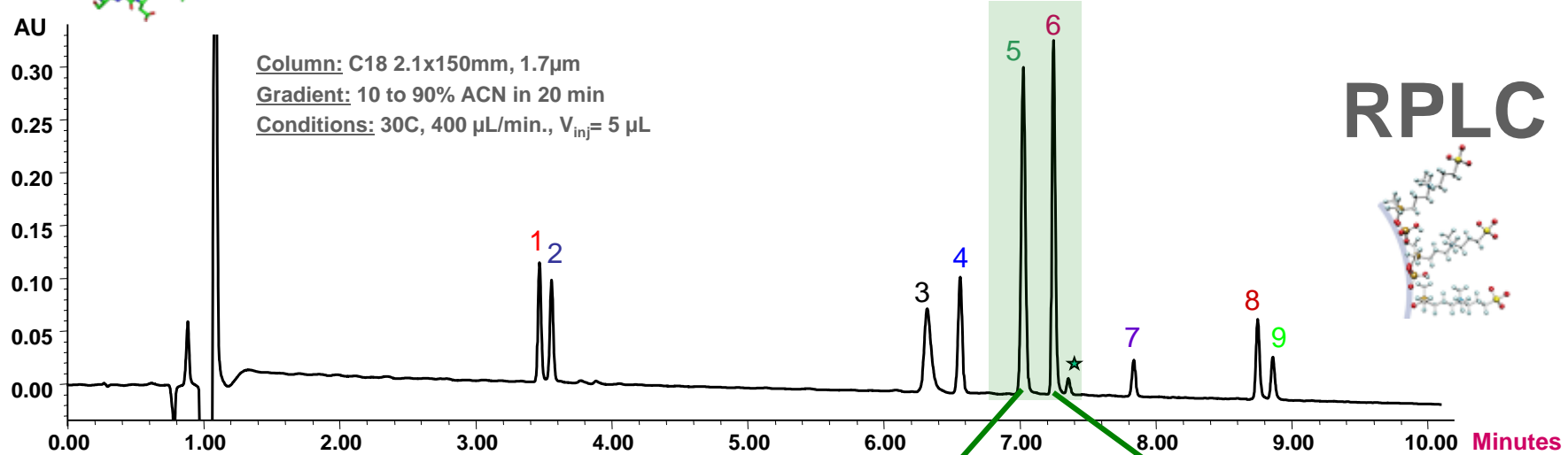
Column: 10 cm × 2.1 mm, 2.7- μ m d_p Ascentis Express OH5 (Sigma-Aldrich); mobile-phase A: 5 mM ammonium acetate, adjusted to pH 5.0 with acetic acid, in 95:5 acetonitrile–water; mobile-phase B: 5 mM ammonium acetate, adjusted to pH 5.0 with acetic acid, in 80:20 acetonitrile–water; gradient: 0% B held for 1 min, 0–100% B in 10 min, held at 100% B for 1 min; flow rate: 0.3 mL/min; column temperature: 25 °C; detection: UV absorbance at 250 nm; injection volume: 2 μ L; sample concentration: 10–100 μ g/mL.


Peaks: ribothymidine, 2.75 min; uridine, 3.07 min; 2-thiocytidine, 4.62 min; 2'-O-methylcytidine, 5.28; pseudouridine, 6.08 min; inosine, 6.50 min; 5-methylcytidine, 7.53 min; cytidine, 7.79 min; guanosine, 8.60 min; 3-methylcytidine, 9.02 min; 1-methyladenosine, 10.29 min; 7-methylguanosine, 11.11 min.



HILIC alkalmasok – peptidek analízise (HILIC vs. RPLC)

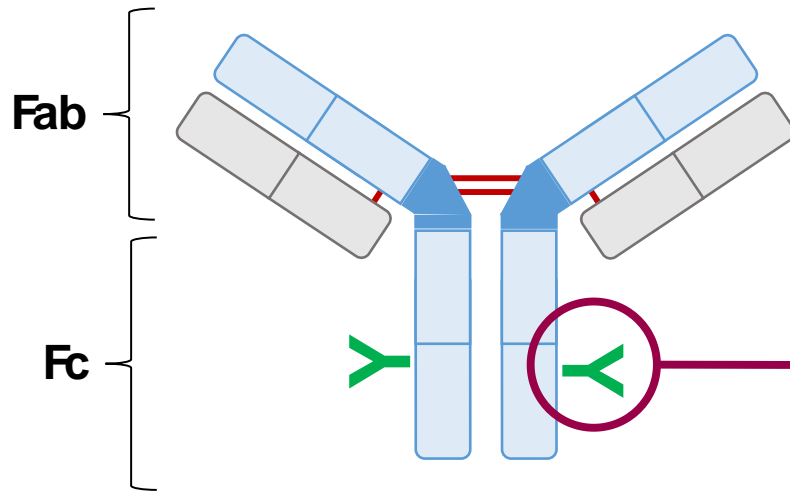
 **The model peptides have molecular weight between 1 and 6 kDa**



 **Very distinct elution order between RPLC and HILIC but similar peak shape**

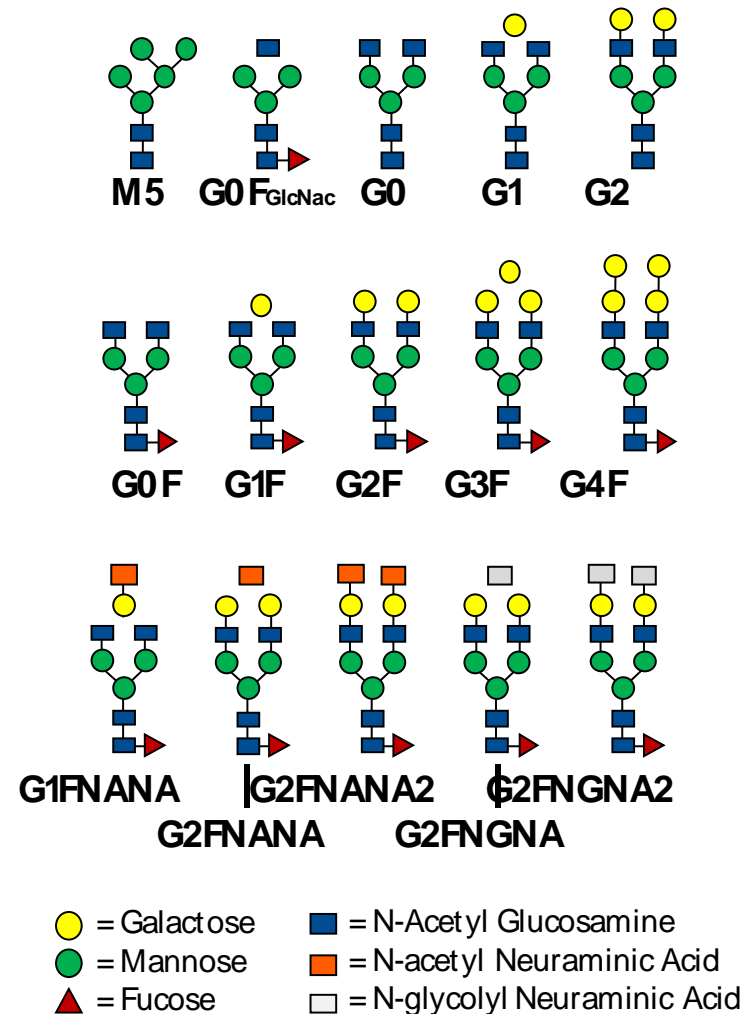
HILIC alkalmazások – mAb glikán analízis

Glycosilation profile is one of the main critical quality attributes (CQA) of a mAb (toxicity, efficacy)



IgG-based glycoprotein structure composed of around 95% protein and 5% glycans

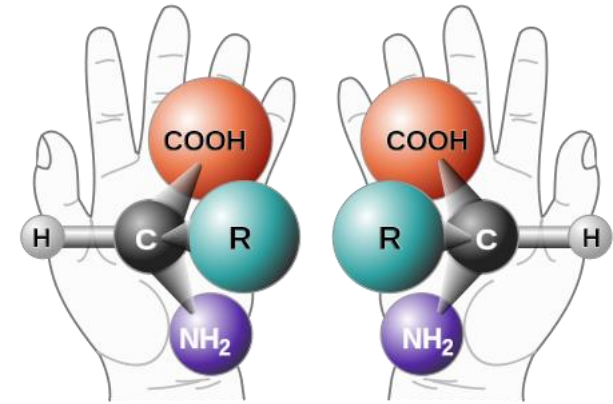
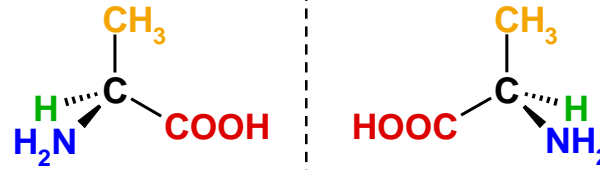
Wide range of glycans:



Optikai izomerek elválasztása (királis HPLC)

Kiralitás; enantiomerek

Vegyületek,
amelyek **tükröképükkel nem azonosak:**



egymással fedésbe nem hozható tükröképek
= **enantiomerek**

azonos: - a legtöbb fizikai tulajdonság

(olvadáspont, szín, oldhatóság, UV elnyelés bármely hullámhosszon, ...)

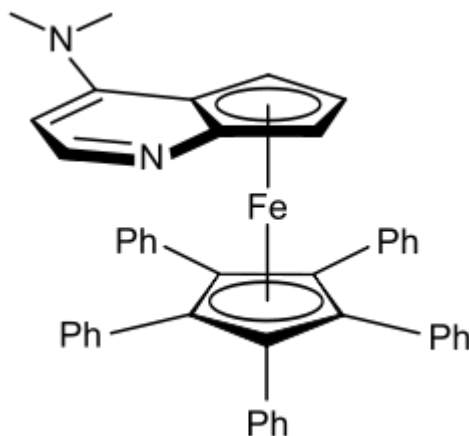
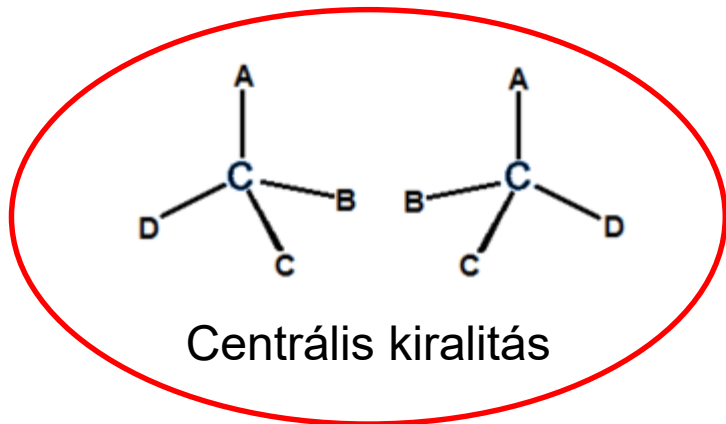
- kémiai reakciók nemkirális reakciópartnerrel

eltérő: kölcsönhatás másik királis szerkezettel!

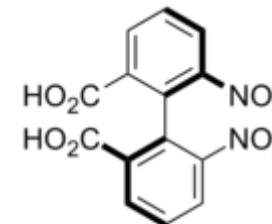
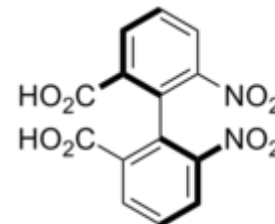
- így például az élő szervezet építőelemeivel

Két, különbözőnek tekintendő vegyület!

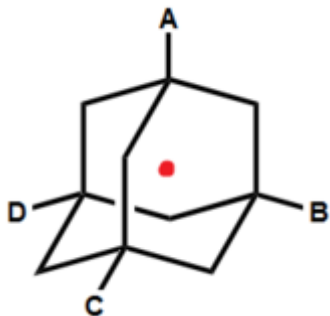
Kiralitás; enantiomerek



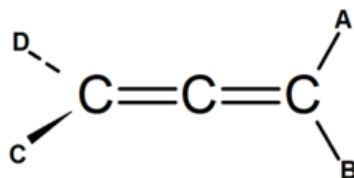
Planáris kiralitás
(királis ferrocénszármazék)



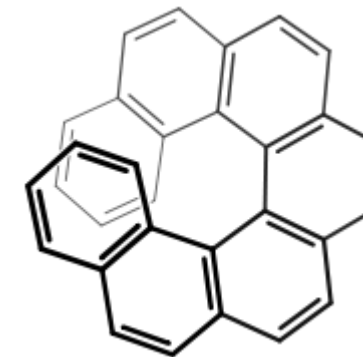
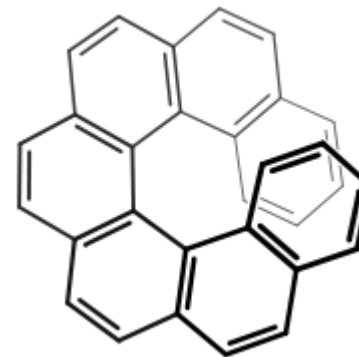
S_a *R_a*
Atropizoméria



Királis adamantánszármazék



Axiális kiralitás
(királis allénszármazék)

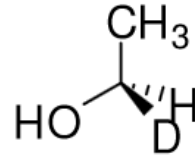


Helikális kiralitás
(*P*-heptahelicén és *M*-heptahelicén)

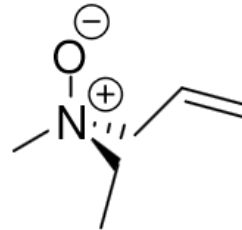
Centrális kiralitás

Centrális kiralitás: az aszimmetriacentrumok vagy kiralitáscentrumok leggyakrabban olyan atomok, amelyek körül legalább négy különböző ligandum található (a nemkötő elektronpár is ligandumnak számít).

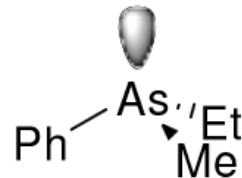
- Vegyületek királis szénatommal



- Vegyületek négy vegyértékű egyéb királis atommal

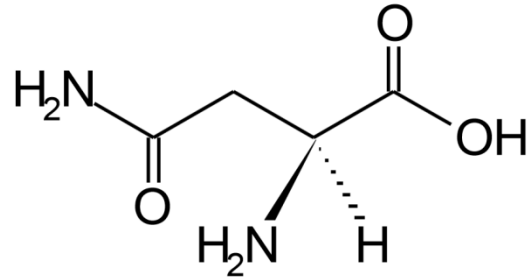


- Vegyületek három vegyértékű királis atommal (megjegyzés: a N ilyen típusú vegyületeinek enantiomerei általában igen könnyen egymásba alakulnak, nem izolálhatók.)

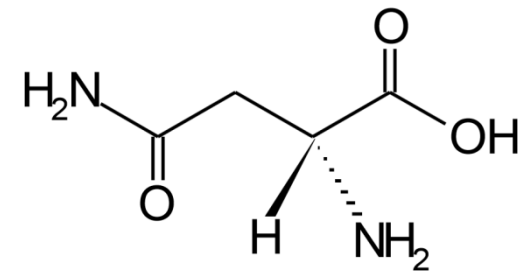


Királis toxikológia

Ízlelhető kiralitás:

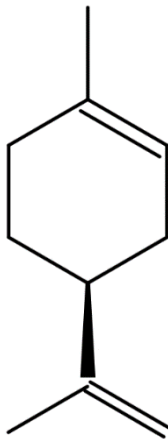


S-aszparagin (édes)

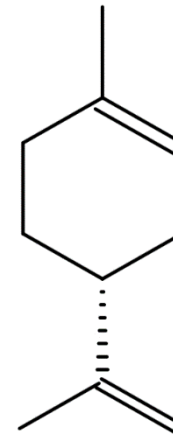


R-aszparagin (keserű)

Szagolható kiralitás:

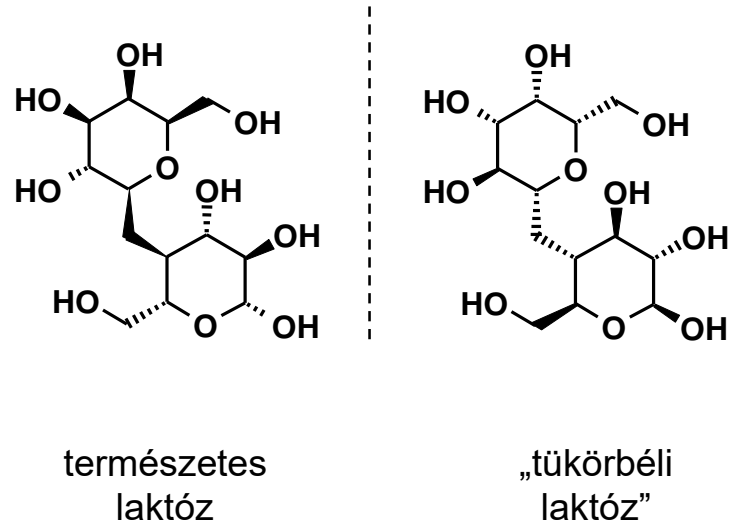


S-limonén (citrom illat)



R-limonén (narancs illat)

Királis toxikológia



10 független kiralitáscentrum

$2^{10} = 1024$ lehetséges konfiguráció, 1024 sztereoizomer

megkülönböztetett, számunkra fontos („jó enantiomer”):

- **eutomer**, 1 db

ehhez képest, pontos tükörkép („rossz enantiomer”):

- **disztomer**, 1 db

nem tükörkép, de nem is azonos

- **diasztereomer**, 1022 db

A diasztereomerek már akirális rendszerben is elvál(hat)nak!

akirális kolonnán elvi maximum: 512 csúcs (mindegyikben egy tükörképi pár)

királis kolonnán elvi maximum: 1024 csúcs

Királis toxikológia

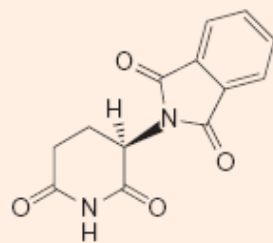
Box 1 | The thalidomide tragedy: the myth of a missed opportunity

The thalidomide tragedy of 1961 is a landmark in drug regulation. Thalidomide is a racemate — of a glutamic-acid derivative — and in 1984, in the foreword of a book about X-ray crystallography¹³⁰, the following statement appeared: “The thalidomide tragedy would probably never have occurred if, instead of using the racemate, the (*R*)-enantiomer had been brought on to the market. In studies ... it was shown that after i.p. administration only the (*S*)-(-)-enantiomer exerts an embryotoxic and teratogenic effect. The (*R*)-(+)-enantiomer is devoid of any of those effects under the same experimental conditions”. This quote has been widely used subsequently, and was even alluded to in the citation for the 2001 Nobel Prize in Chemistry, which was awarded to Knowles, Noyori and Sharpless for the development of catalytic asymmetric synthesis, and has had a great impact on the development of new drugs¹³¹.

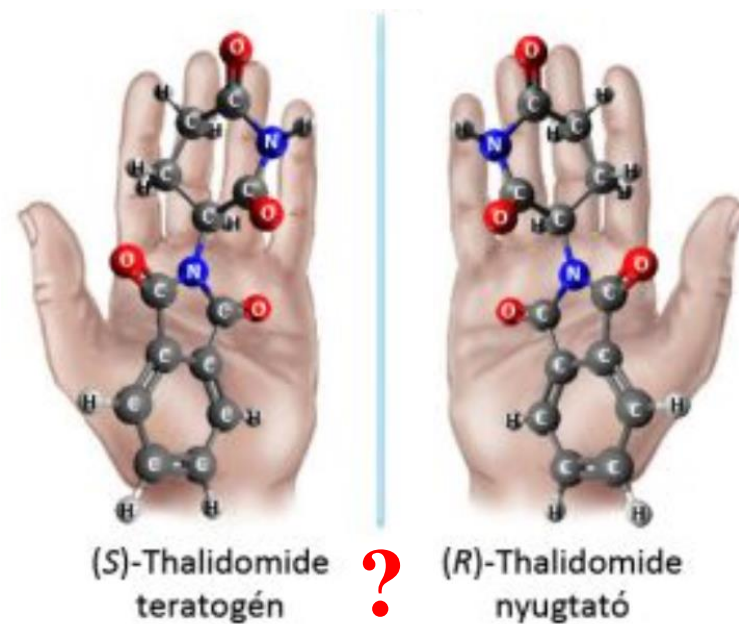
Regrettably, the proposal that the thalidomide tragedy could have been avoided if the single enantiomer had been used is misleading, for two reasons. First, it is based on unreliable biological data: the studies purporting to show that (*S*)-(-)-thalidomide is more teratogenic were in the mouse — a species that is generally regarded as unresponsive — and involved very high doses¹³². However, earlier work in the rabbit, the species that is most sensitive to thalidomide, showed clearly the equal teratogenic potency of its enantiomers¹³³. Second, the chiral centre in thalidomide is unstable in protonated media and undergoes a rapid configurational inversion¹³⁴.

So, the individual enantiomers of thalidomide are both inverted rapidly to the racemic mixture and also degraded rapidly by opening of the glutarimide ring — processes that occur faster *in vivo* than *in vitro*¹³⁵.

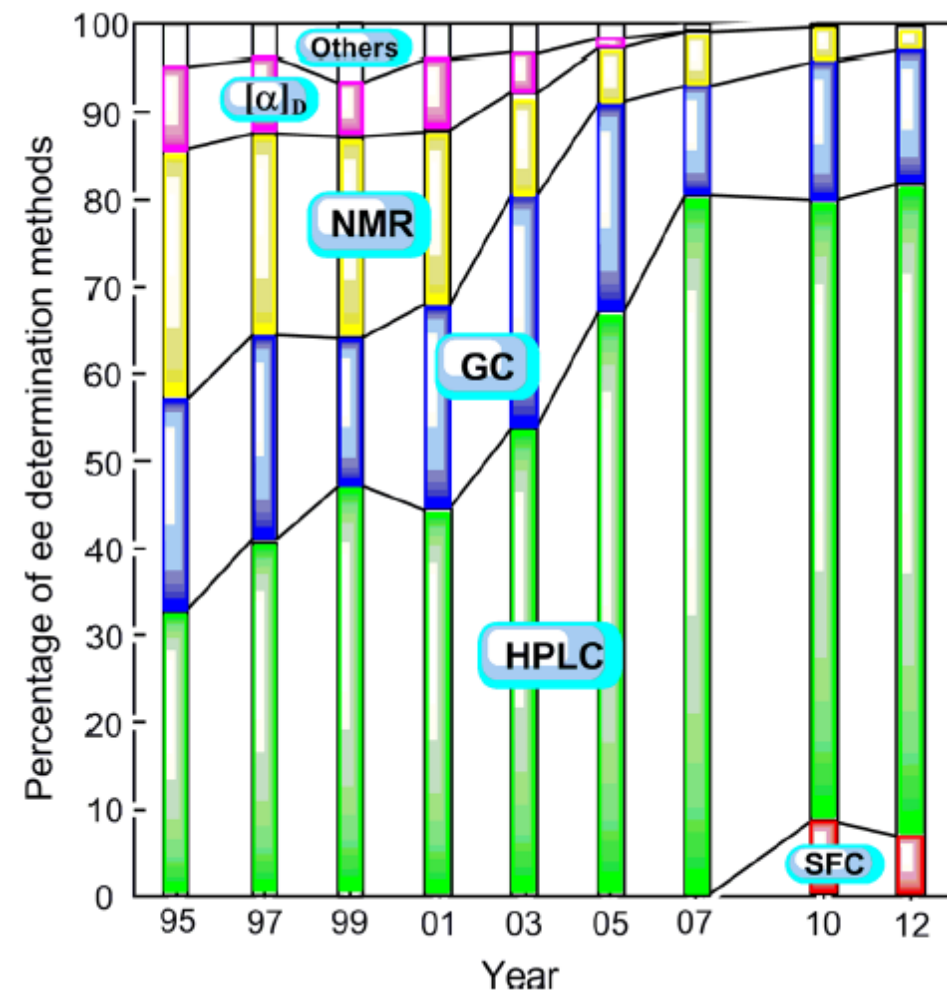
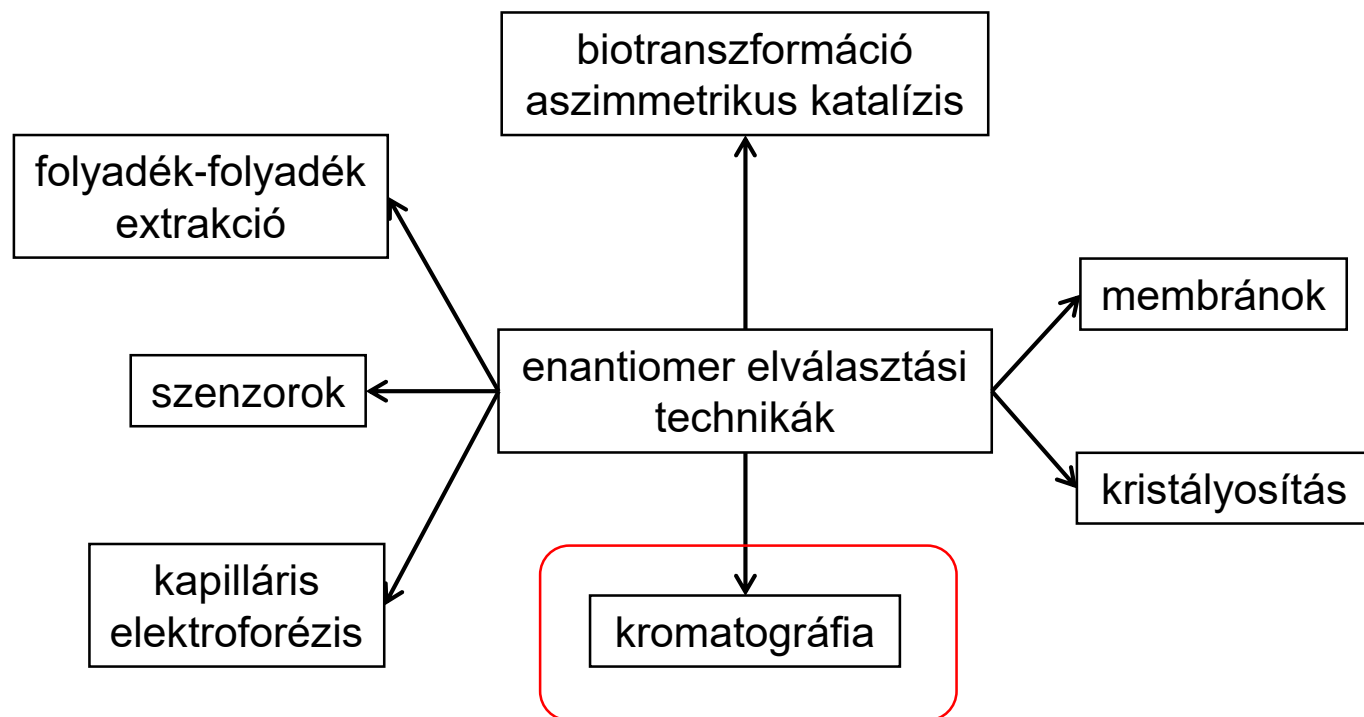
Therefore, even if there were differences in the toxicity of the enantiomers of thalidomide, their rapid racemization *in vivo* would blunt them such that they could not be exploited. This case shows the importance of considering data in full and not leaping to conclusions, however tempting these might be.



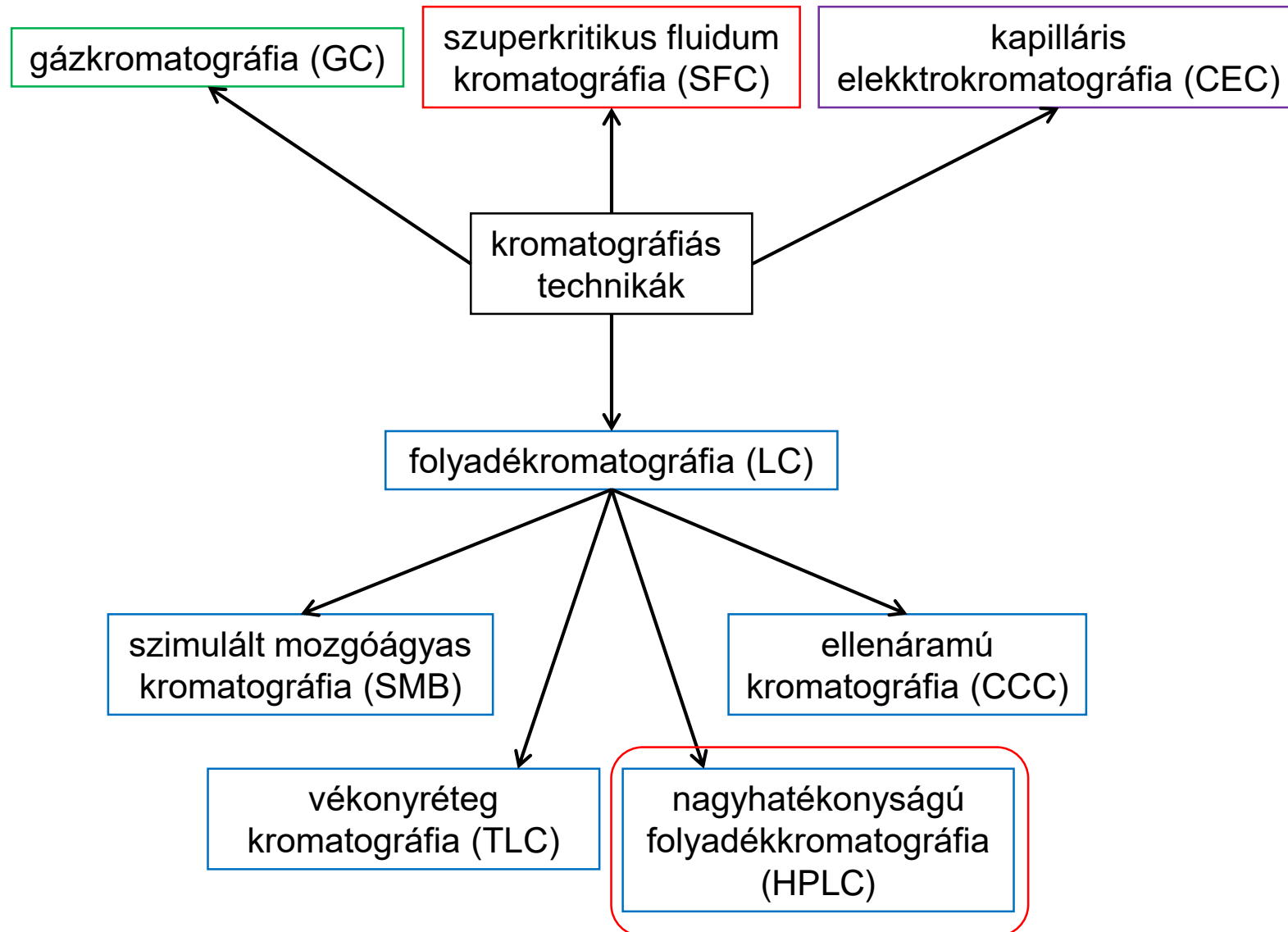
(*R*)-(+)-Thalidomide



Enantiomer elválasztási lehetőségek



Kromatográfiás módszerek az optikailag aktív izomerek elválasztására



Folyadékkromatográfiás módszerek az optikailag aktív izomerek elválasztására

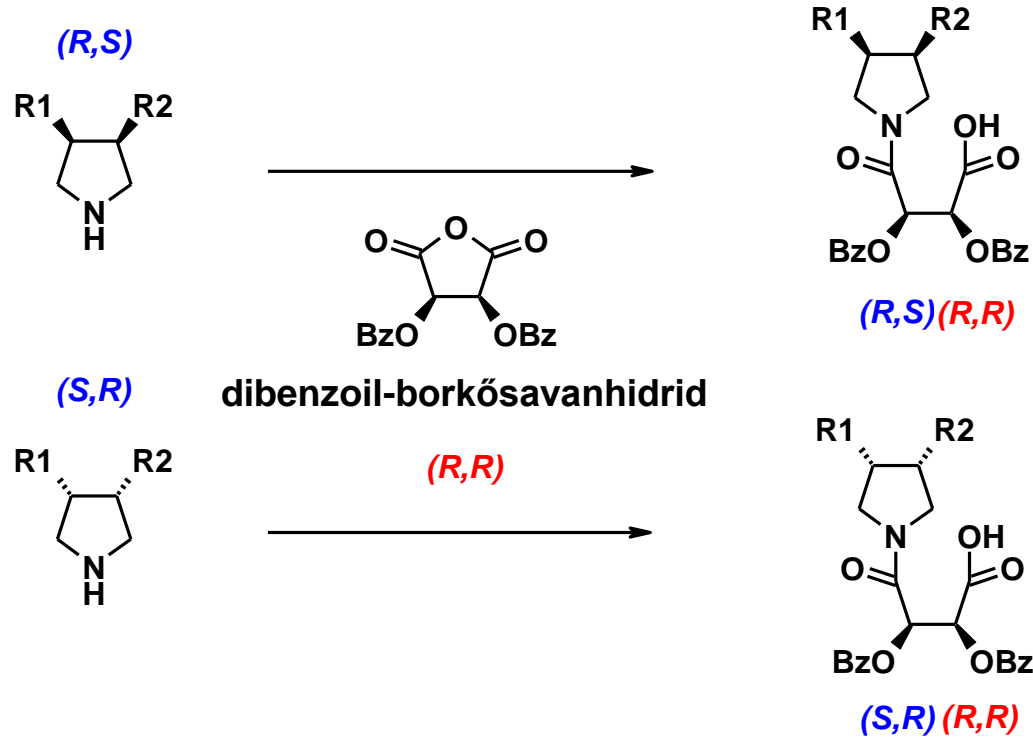
A folyadékkromatográfia a módszerek könnyű változtatása, a sok eltérő jellegű kolonna választhatósága miatt az optikailag aktív anyagok egyik fő elválasztási módszere. Bármilyen kromatográfiás módszernél az elválasztás alapja a diasztereomer pár képzés a vizsgált vegyület és a származékképző, illetve az állófázis vagy a mozgófázis optikailag aktív komponense között. Az optikai izomerek elválasztására alkalmazható kromatográfiás módszereket két fő típusba lehet sorolni:

- közvetett (indirekt)
- közvetlen (direkt) meghatározás.

Történetileg a közvetett meghatározás alakult ki először. A közvetett meghatározás során az enantiomerek elválasztását diasztereomer elválasztásra vezetjük vissza, akirális közegben, a kolonna előtti származékképzéssel, amit „precolumn” technikának is neveznek.

Közvetlen meghatározás során a királis molekulákat királis közegben választjuk el, így lehet az álló- vagy a mozgófázis királis. Tehát az elválasztandó enantiomerek eltérő kölcsönhatása az állófázissal, illetve a mozgófázisba tett királis szelektorról szabja meg az elválasztást.

Közvetett (indirekt) meghatározás



diasztereomerek,
akirális kolonnán is elválaszthatók

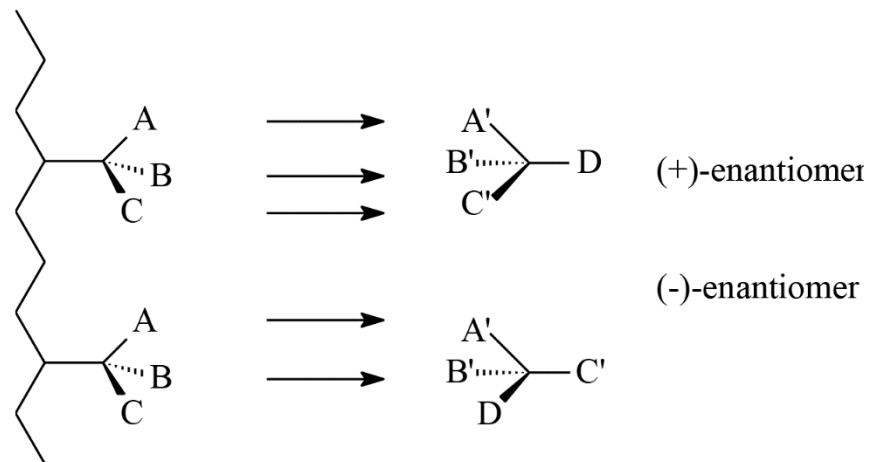
- Előnyök:
- „olcsó” kolonna
 - detektálás (a diasztereomerek fajlagos UV elnyelése eltér!)
 - megfordítható sorrend a tükörképi reagenssel

- Hátrányok:
- a reakciósebesség eltérhet
 - munkaigényes

Közvetlen (direkt) meghatározás

-Az elválasztandó vegyület és a szelektor között akkor jön létre a stabilis kapcsolat, ha az elválasztandó molekula legalább három ponton tud kötődni. Ezt az úgynevezett hárompontos kötődés modelljét Dalglish írta le először 1952-ben és a mai napig ez az elmélet a legelfogadottabb a minta és a szelektor közötti kölcsönhatások értelmezésére.

-A 80-as években Pirkle és Pochapsky a modellt úgy módosította, hogy a három kölcsönhatás közül legalább egynek sztereoselektívnek kell lennie.



- Direkt meghatározás esetén elég, ha ideiglenes a kapcsolat a királis megkülönböztetést adó anyaggal!
- Királis (pontosabban: enantiomertiszta) **adalék** a mozgófázisban folyamatos költség, zavarhatja a detektálást.
- Királis (pontosabban: enantiomertiszta) **állófázis** egyszeri költség, kényelmes.

A közvetett és közvetlen királis folyadékkromatográfiás módszerek összehasonlítása

Előnyök	
Közvetett módszerek	Közvetlen módszerek
Az elválasztás általában egyszerűbb, a felbontás nagyobb.	A királis szelektor nagy enantiomer tisztasága biztosított.
Az elúciós sorrend következtethető illetve megfordítható (antipód reagens).	Az enantiomerek azonos moláris abszorbanciával rendelkeznek.
A detektálás alsó határa csökkenthető megfelelő származékképző reagens alkalmazásával.	Racemizáció ritka az analízis során.
Az akirális kolonna olcsóbb.	Funkciós csoporttal nem rendelkező racemátok is elválaszthatók.
A módszerfejlesztés kevésbé időigényes.	Preparatív célra egy lépésben hasznosítható.
A szelektivitás növelhető (előtisztítás).	A hőmérséklet változtatásával jobban befolyásolható a szelektivitás, mint közvetett módszerek esetén.
	Egyszerű mintaelőkészítés és kromatografálás.

A közvetett és közvetlen királis folyadékkromatográfiás módszerek összehasonlítása

Hátrányok	
Közvetett módszerek	Közvetlen módszerek
<p>A származékképző enantiomer tisztasága kritikus.</p> <p>A képződött diasztereomerek moláris abszorbanciája különbözik (bár a különbség lehet kicsi is).</p> <p>A származékképzés során racemizáció léphet fel.</p> <p>A reagens feleslege és a melléktermékek zavaró csúcsként jelentkezhetnek.</p> <p>Az enantiomerek visszanyerése további műveleteket igényel.</p> <p>A származékképzés időigényes lehet.</p>	<p>Az elméleti tányérszám kisebb, mint a hasonló szemcseátmérőjű RP fázisok esetén.</p> <p>A deszorpció kinetikája egyes esetekben igen lassú.</p> <p>Az elúciós sorrend és a királis kölcsönhatások mibenléte nem jelezhető előre.</p> <p>Nincs általánosan használható kolonna.</p> <p>A királis kolonnák rendkívül érzékenyek a munkakörülmények változtatására.</p> <p>Drága az állófázis.</p>

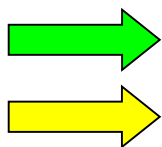
Királis állófázisok csoportosítása

Állófázis típusa		Tipikus szelektor	Főbb kölcsönhatások
I.	Ligandum cserés	aminosav-fém komplex	komplexbépződés
II.	Donor-akceptor (Pirkle-típusú)	π -savas, π -bázisos csoportok	π - π és dipól
III.	Polimer	módosított cellulóz és amilóz	poláris (H-híd) és π - π
IV.	Zárványkomplex	ciklodextrinek	zárványkomplex-képzés, H-híd, sztérikus, π - π
		királis koronaéterek	
		ciklofruktánok	
V.	Makrociklusos antibiotikum	makrociklusos glikopeptid	elektrosztatikus, H-híd, π - π , hidrofób, sztérikus
VI.	Ioncsere-alapúak	anion-, kation és "zwitter-ion" alapúak	ionos, poláris, π - π és sztérikus
VII.	Fehérje	természetes fehérje	ionos és hidrofób
VIII.	Molekulalenyomat	szelektív szorbens (pl.: szerves molekula, makromolekula, sejt)	sztérikus

Közvetlen királis folyadékkromatográfia

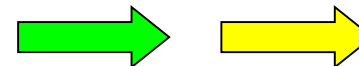
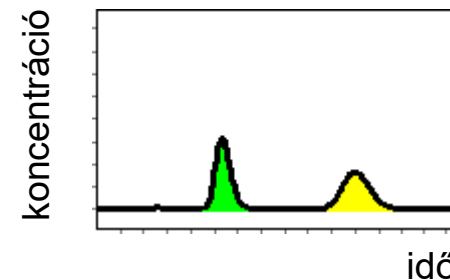
A már megismert elv:

eltérő kölcsönhatás **másik királis** szerkezettel



enantiomertiszta királis töltet

a tükörképi párt eltérő mértékben tartja vissza



Állófázis:

széleskörű szelektivitás a hasznos

legjobban beváltak: módosított poliszacharidok (gyógyszeripari alkalmazások ~ 90 %-a)

Mozgófázis:

különféle eluensek → eltérő királis üregek → sokféle eltérő szelektivitás

a mozgófázis polaritása szerint **különféle módok**

A különböző állófázisok használatának gyakorisága

amino-tetrahydro-fenantrén alapúak

ciklodextrinek

cinkona alkaloid ionos fázisok

ciklofruktánok

makrociklusos (gliko)peptidek

glikoprotein fehérje fázisok

együttesen a gyógyszeripari alkalmazások 10 %-át adják

90%: poliszacharid alapúak!

erősen poláros, illetve ionos anyagokra kevésbé jók

ilyen esetekre: QN-AX / QD-AX, ZWIX(+) / ZWIX(-)

Poliszacharid alapú királis állófázisok

Történeti áttekintés

Természetes homokirális poliszacharidok felhasználása:

1951 Kotake aminosav-származékok elválasztása papírkromatográfiával

Általánosabb királis felismerő képesség:

1973 Hesse, Hagel mikrokristályos cellulóz-triacetát
amorf: sokkal gyengébb felismerés

1984 Okamoto szilikagélre borítás: megváltozott szelektivitás + mechanikai stabilitás

1986 Okamoto (Daicel) Chiralpak AD = **ADMPC** (DMPC = 3,5-dimetil-fenil-karbamát)
Chiralcel OD = **CDMPC**

2004 Francotte (Daicel) immobilizált változatok: Chiralpak IA = **ADMPC**

Chiralpak IB = **CDMPC**

Chiralpak IC = **CDCPC**

... további szelektorok, generikus változatok

pl. **ADMPC** = Lux Amylose-1 borított, Lux i-Amylose-1 immobilizált

CDMPC = Lux Cellulose-1 borított

CDCPC = Lux i-Cellulose-5 immobilizált

A természetes alapanyag hátránya: nem áll rendelkezésre a tükörképi kolonna.

A sorrend pedig fontos! Könnyebb a dolgunk, ha a kicsi csúcs eluálódik előbb.

Bizonyos komplementaritás kimutatható ADMPC és CDMPC között.

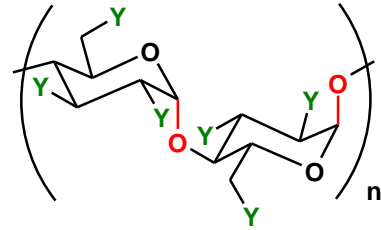
Poliszacharid alapú királis állófázisok

~ 80 % szilikagél, ~ 20 % királis szelektor

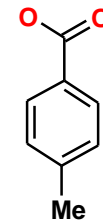
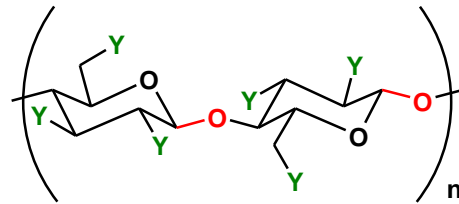
Módosítás: **Y** = észter

Y = karbamát

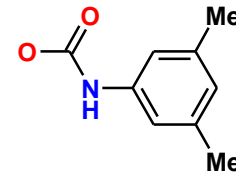
amilóz: **Y** = OH



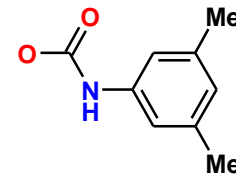
cellulóz: **Y** = OH



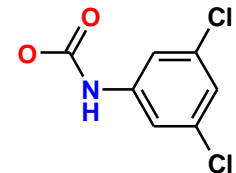
Chiralcel OJ
Lux Cellulose-3



Chiralpak AD
Lux Amylose-1



Chiralcel OD
Lux Cellulose-1



Chiralpak IC
Lux i-Cellulose-5

borított: film a szilikagél felületén oldhatatlansága tartja meg a kolonnában

immobilizált: a szilikagélhez rögzítve, vagy keresztkötésekkel, túl jól oldódó szelektorok (pl. IC) csak ebben a változatban

lehetséges kölcsönhatások:

H-kötés akceptor, H-kötés donor, dipól-dipól, π - π , sztérikus (királis üregek)

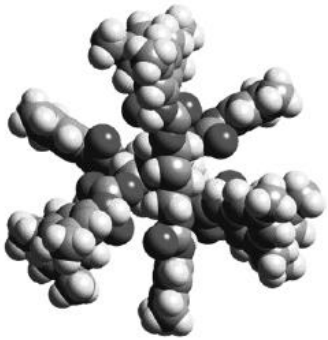
Sokféle lehetőség – széleskörű szelektivitás – az előrejelzés szinte lehetetlen

Leggyakrabban használt poliszacharid alapú királis állófázisok

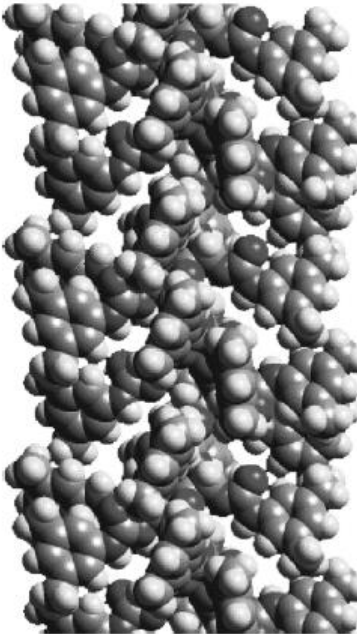
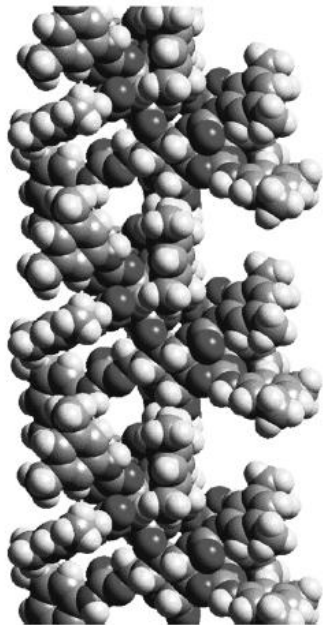
	Gyártó	Phenomenex (Lux)		Chiral Technologies (Daicel)		YMC (Chiral Art)	
Láncvég	Típus	borított	immobilizált	borított	immobilizált	borított	immobilizált
3,5-dimetil-fenil-karbamát	amilóz	Amylose-1	i-Amylose-1	Chiralpak AD	Chiralpak IA	Amylose-C	Amylose-SA
	cellulóz	Cellulose-1	-	Chiralcel OD	Chiralpak IB	Cellulose-C	Cellulose-SB
5-klór-2-metil-fenil-karbamát	amilóz	Amylose-2	-	Chiralpak AY	-	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
3-klór-4-metil-fenil-karbamát	amilóz	-	-	Chiralpak AZ	Chiralpak IF	-	-
	cellulóz	Cellulose-2	-	Chiralcel OZ	-	-	-
3-klór-5-metil-fenil-karbamát	amilóz	-	-	-	Chiralpak IG	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
4-klór-3-metil-fenil-karbamát	amilóz	-	-	-	-	-	-
	cellulóz	Cellulose-4	-	Chiralcel OX	-	-	-
(S)-alfa-metil-benzil-karbamát	amilóz	-	-	Chiralpak AS	Chiralpak IH	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
3-klór-fenil	amilóz	-	-	-	Chiralpak ID	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
3,5-diklór-fenil	amilóz	-	-	-	Chiralpak IE	-	Amylose-SE
	cellulóz	-	i-Cellulose-5	-	Chiralpak IC	-	Cellulose-SC
4-metil-benzoát	amilóz	-	-	-	-	-	-
	cellulóz	Cellulose-3	-	Chiralcel OJ	-	-	Cellulose-SJ

Poliszacharid alapú királis állófázisok

a)



b)



- **poláros** csoportok a szelektor **belsejében**
- **apoláros** aromás gyűrűk a szelektor **külső részén**

- **királis üregek**
alapvető a szerepük a megkülönböztetésben
függnek az előállítási technológia apró különbségeitől
→ azonos szelektorú kolonnák elválasztása kissé eltérhet,
lehet egy racemátra jobb, egy másikra rosszabb

a) cellulóz 3,5-dimetil-fenil-karbamát (CDMPC)

b) amilóz 3,5-dimetil-fenil-karbamát (ADMPC)

Multimodális működés

Normál fázisú, NP mód: alapoldószer: heptán, hexán

poláros módosító: tipikusan 5-40 % ROH (IPA, EtOH, MeOH/EtOH=1/1)

CSAK immobilizáltaknál: nem-standard eluensek DKM, EtOAc, THF, toluol, aceton, ...

(10 µl etil-acetát injektálása tönkretesz egy 250 x 4,6 mm-es borított kolonnát!)

Leggyakoribb az alkalmazások között, jól kihasználja az elsősorban poláris kölcsönhatást

Fordított fázisú, RP mód: MeCN / víz (puffer), MeOH / víz (puffer)

ritkább a megfelelő elválás, nagyon poláros az eluens

borított: vizet akkumulál

Poláris szerves oldószer, PO mód: MeOH, EtOH, IPA, MeCN és ezek keverékei

Előnyök: - általában jobb oldhatóság (gyógyszeripari környezetben)

- jellemzően kis nonspecifikus kölcsönhatás (alapkoncepció)

- jól automatizálható

- persze a holtidő közelsége nem jó ...

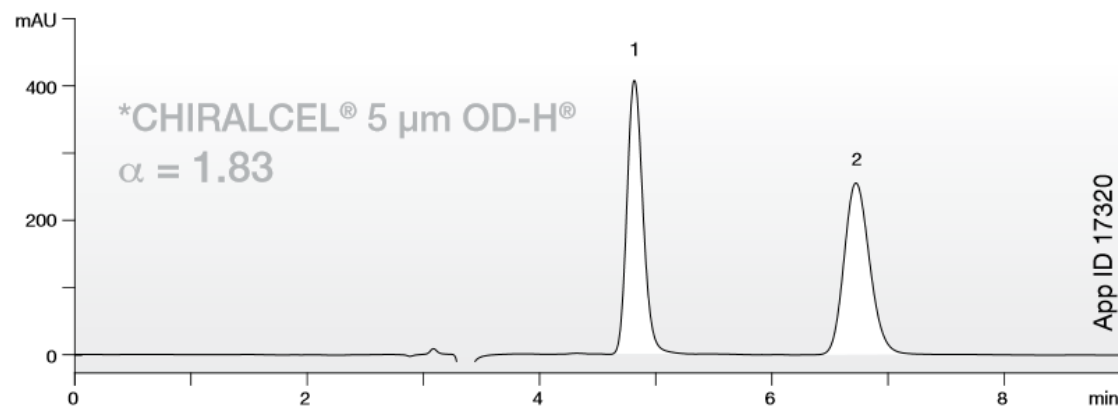
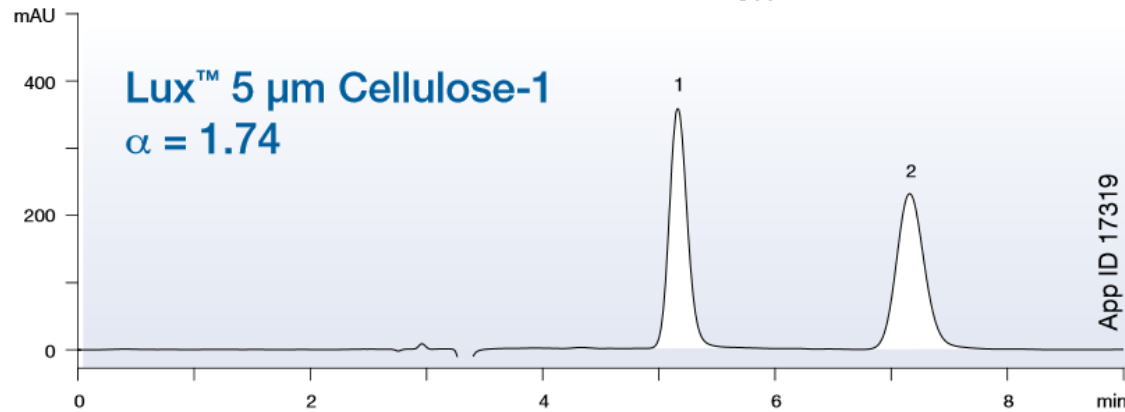
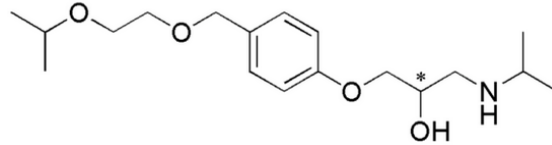
Módszerátadásnál szívesebben fogadottak, mint az NP módszerek

A szelektor oldhatósága is változik az összetétellel, nemcsak az elúciós erő!

Megengedett tartomány – kolonnaleírás. Megengedett eluensek bizonyos összetételeit tilthatják.

Poliszacharid alapú királis állófázisok

Bisoprolol



Conditions for both columns:

Dimensions: 250 x 4.6 mm

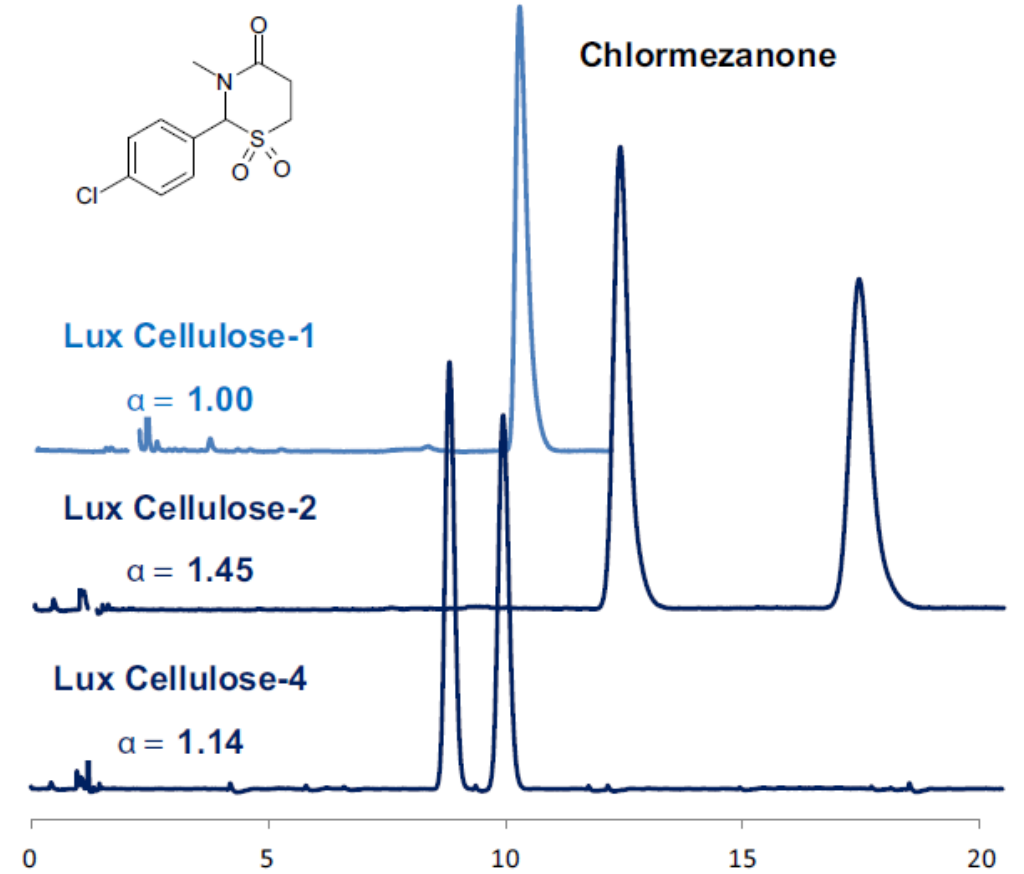
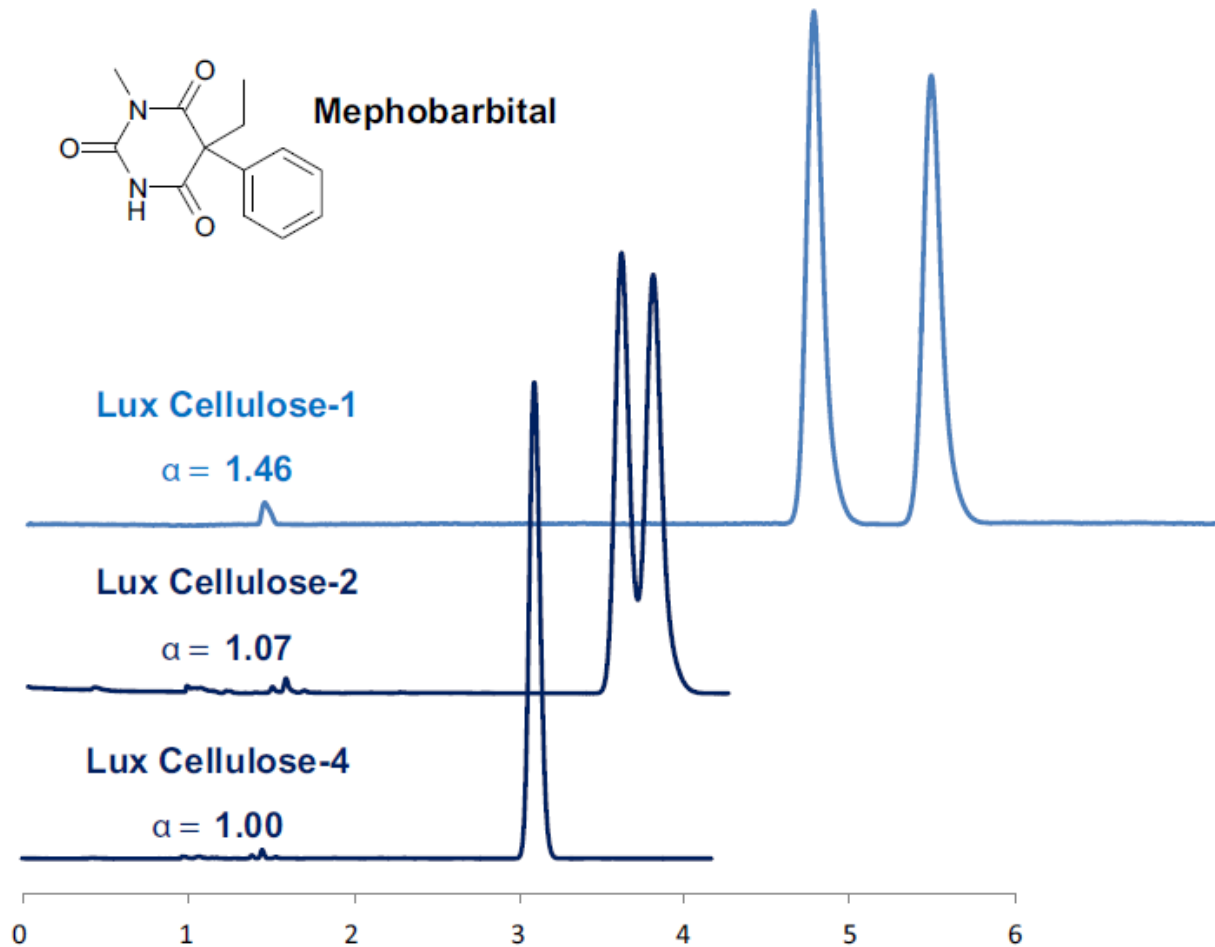
Mobile Phase: 0.1 % Diethylamine in Hexane /
0.1 % Diethylamine in Isopropanol (80:20)

Flow Rate: 1 mL/min

Detection: UV @ 220 nm

Temperature: Ambient

Poliszacharid alapú királis állófázisok





ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



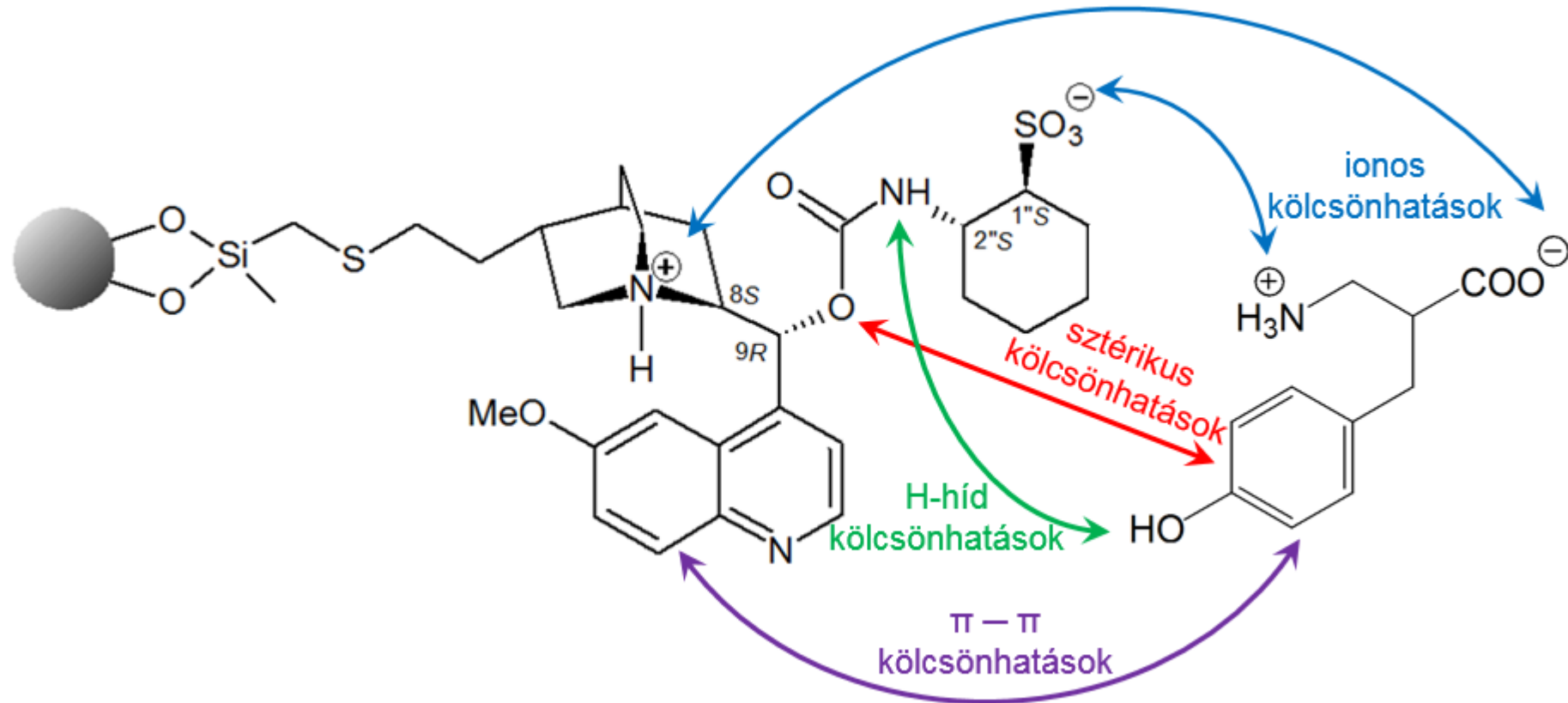
Review

Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers

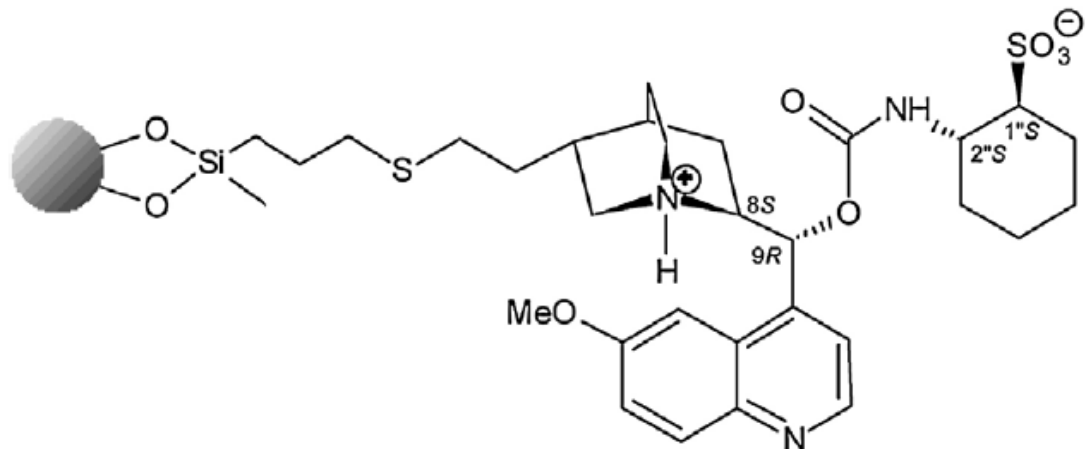
Bezhana Chankvetadze*

Institute of Physical and Analytical Chemistry, School of Exact and Natural Sciences, Tbilisi State University, Chavchavadze Ave 1, 0179 Tbilisi, Georgia

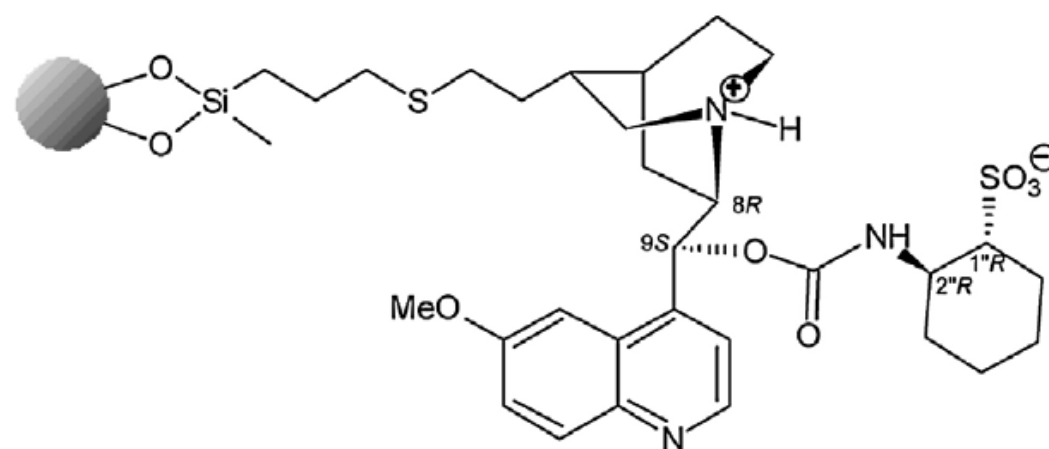
Ioncserélő királis állófázisok



Ioncserélő királis állófázisok



Chiralpak ZWIX(+)TM
(8*S*, 9*R*)
(1''*S*, 2''*S*)

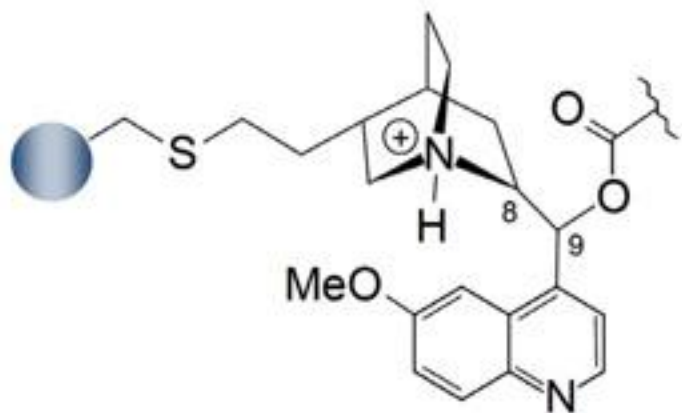


Chiralpak ZWIX(-)TM
(8*R*, 9*S*)
(1''*R*, 2''*R*)

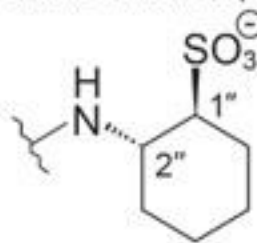
Chiralpak ZWIX(+)
Quinine-based (8*S*, 9*R*, 1''*S*, 2''*S*)

Chiralpak ZWIX(-)
Quinidine-based (8*R*, 9*S*, 1''*R*, 2''*R*)

Ioncserélő királis állófázisok



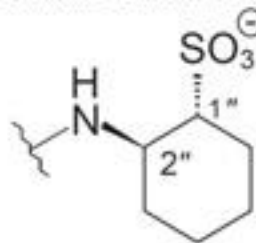
CHIRALPAX ZWIX(+)
Quinine-derivatized (8S,9R)



(1''S, 2''S)

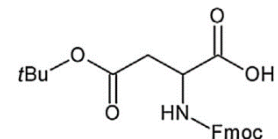
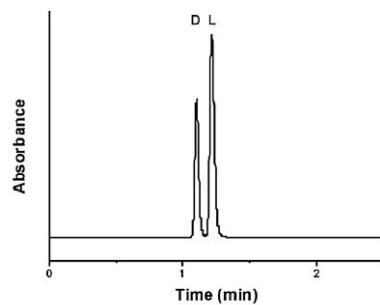
Chiral selectors of CHIRALPAK ZWIX

CHIRALPAX ZWIX(-)
Quinidine-derivatized (8R,9S)



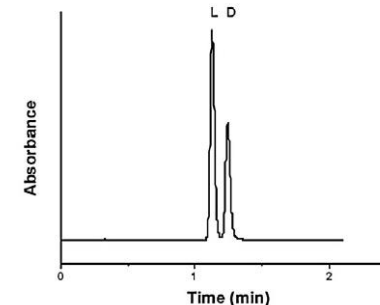
(1''R, 2''R)

ZWIX(+)TM

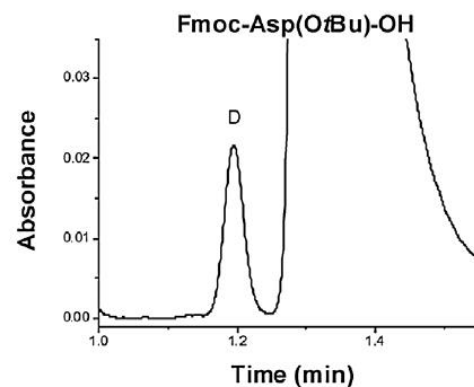


Fmoc-Asp(OtBu)-OH

ZWIX(-)TM



ZWIX(+)TM



ZWIX(-)TM

