

# Kromatográfia

A kromatográfia alapjai, vékonyréteg  
kromatográfia

Dr. Horváth Viola

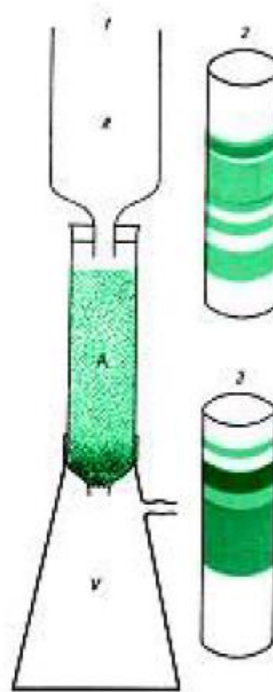
2022. március 29.

# A kromatográfia története

1900-as évek eleje:



Russian Botanist  
Mikhail Tswett (1872-1919)



From Tswett's notebook (1910) on early chromatographic experiments



# A kromatográfia története

## Folyadék-folyadék megoszlási kromatográfia

- 1941: A.J. P. Martin és R. L. M. Synge (1952 Nobel díj, aminosavak szétválasztása)

## Papírkromatográfia

- 1943: A.J.P. Martin

## Vékonyréteg kromatográfia

- 1938-1950: J. Kirchner szilikagél keményítő kötőanyaggal üveglapon

## Gázkromatográfia

- 1947: E. Cremer és F. Prior CO<sub>2</sub> és O<sub>2</sub> elválasztása

## Gáz-folyadék megoszlási kromatográfia

- 1950-es évek: Martin és A.T. James (illékony zsírsavak elválasztása)

## Nagynyomású folyadékkromatográfia - HPLC

- 1960-as évek: Horváth Csaba – USA
- Joseph Huber – Európa
- az első kereskedelmi HPLC készülékek

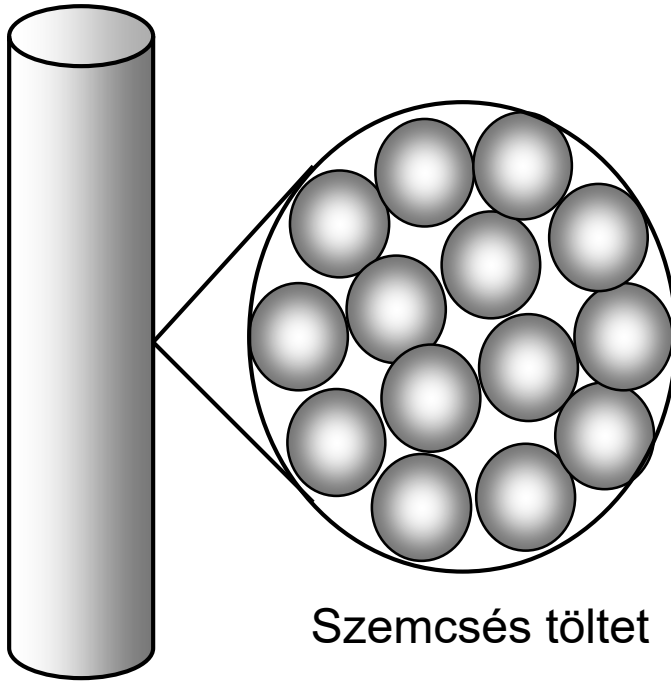
# Mi a kromatográfia?

*IUPAC definíció:*

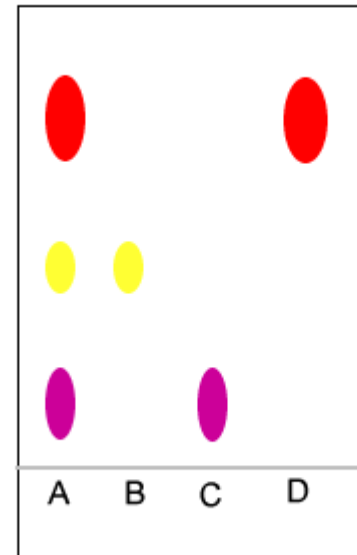
fizikai elválasztási módszer, ahol az elválasztandó komponensek két fázis között megoszlanak, az egyik álló fázis, a másik meghatározott irányba mozog.

# A kromatográfia felosztása technikai elrendezés szerint

Elválasztó oszlop



Oszlop kromatográfia



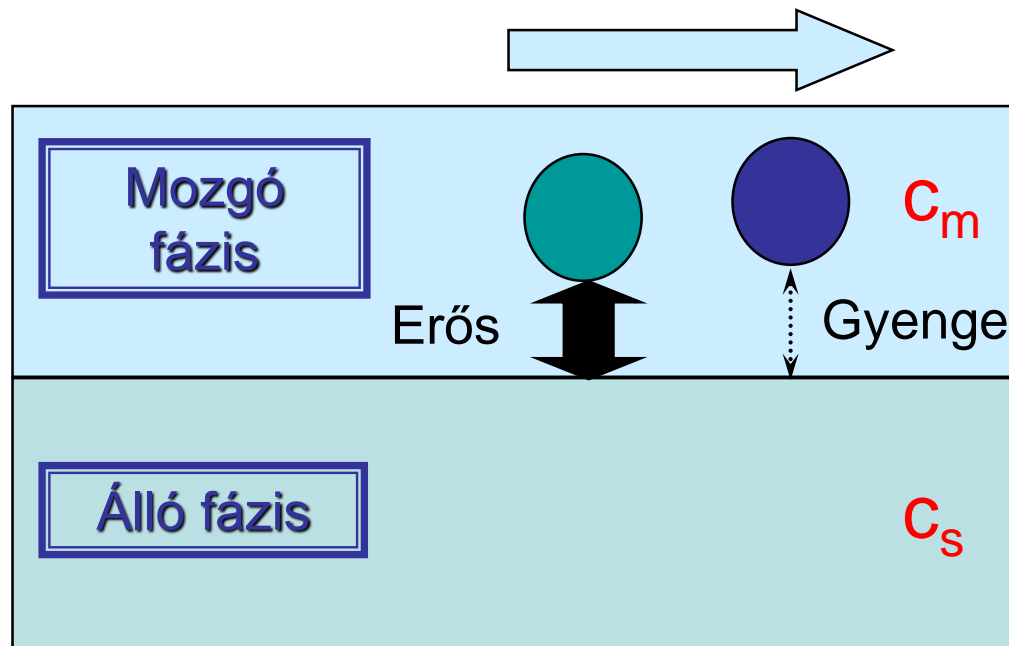
Papír, vagy szemcsékkel borított szubsztrát

Papír kromatográfia  
Vékonyréteg kromatográfia (VRK)

# A mozgó és állófázis állapota szerinti felosztás

		Mozgó fázis		
		Gáz	Folyadék	Szilárd
Álló fázis	Gáz			
	Folyadék	Gáz-kromatográfia	Folyadék kromatográfia	
	Szilárd			

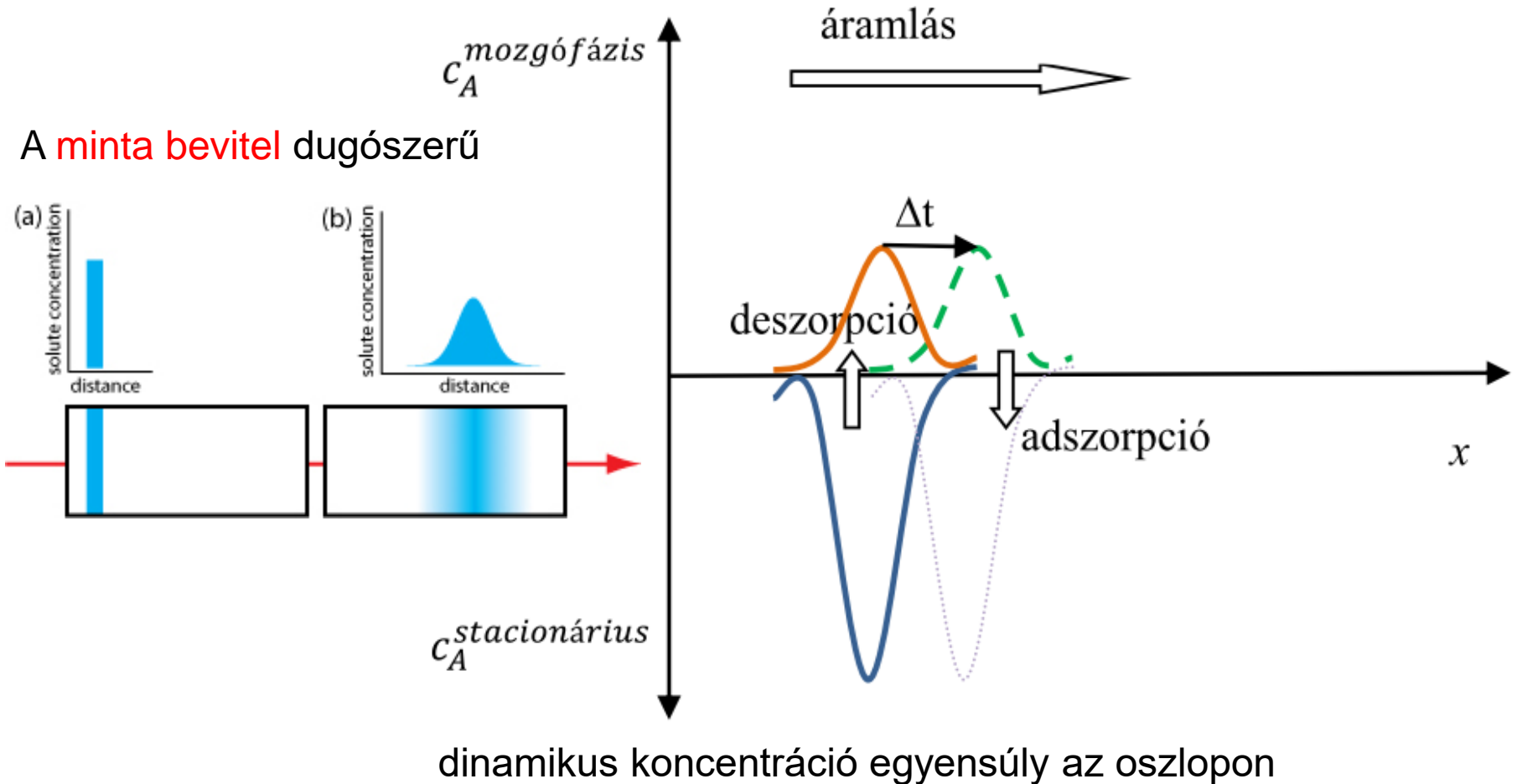
# A kromatográfiás elválasztás alapja: megoszlás a mozgó fázis és álló fázis között



Megoszlási hányados:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

# Az elválasztás folyamata



A **mozgó fázis** az **álló fázissal** érintkezik egy határfelületen. Egyenletesen áramlik. Átlagos szorpciója kisebb mértékű, mint a legkevésbé kötődő minta komponensé



# .....tehát a kromatográfiás elválasztás lényege:

van egy állófázis

ezen át folyamatosan áramlik egy mozgófázis

a mozgófázisba pillanatszerűen, nagyon kis térfogatban bejuttatjuk a mintát az állófázisra érve a minta különböző komponensei megkötődnek, majd deszorbeálódnak, majd megint megkötődnek, megint deszorbeálódnak és így haladnak végig, majd jutnak a detektorba

a különböző komponensek eltérő idő alatt érnek végig az állófázison és jutnak a detektorba, mert eltérő erősséggel kötődnek az állófázishoz

a gyengébben kötődő komponens előbb ér a detektorba, mint az erősen kötődő komponens, így elválnak egymástól.

# Az elválasztás folyamata és a kromatogram

## Introduction to Chromatography 5 - Chromatogram

### Output - the Chromatogram

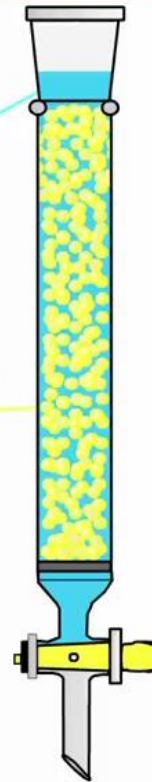
If we plot the amount of each pigment against the time it takes for the pigment to drip out from the bottom of the column, we produce a two-dimensional plot known as a chromatogram. When only the mobile phase passes through the detector, the signal output moves in a straight line. This is called the baseline.

When a pigment passes through the end of the column, the line moves up and then down forming a 'peak'. Each pigment is represented by a peak in the chromatogram.

Mobile Phase

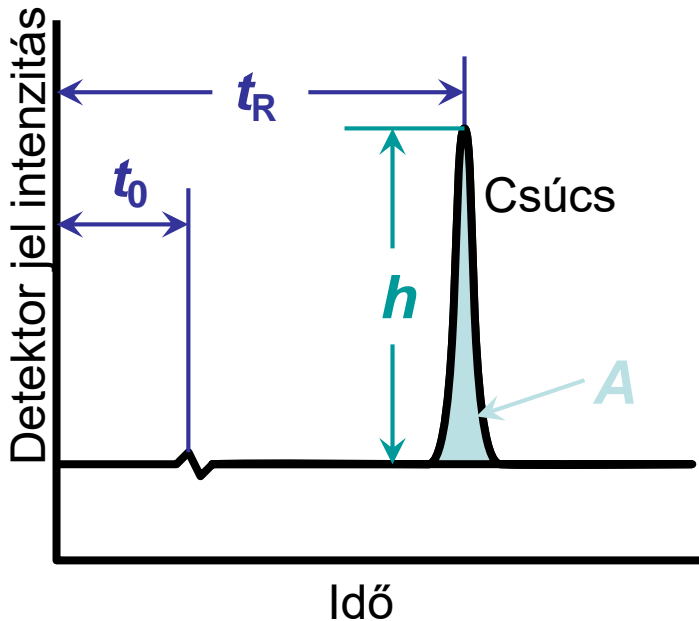
Stationary Phase

play



$$K = \frac{c_s}{c_m} > K = \frac{c_s}{c_m} > K = \frac{c_s}{c_m}$$

# A kromatogram



$t_R$  : Retenciós idő

$t_0$  : Holtidő

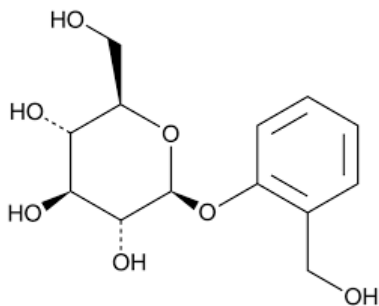
csúcsok minőségi azonosítása  
(tiszta anyagok, ú.n. referencia  
standardok segítségével)

$A$  : Csúcs terület

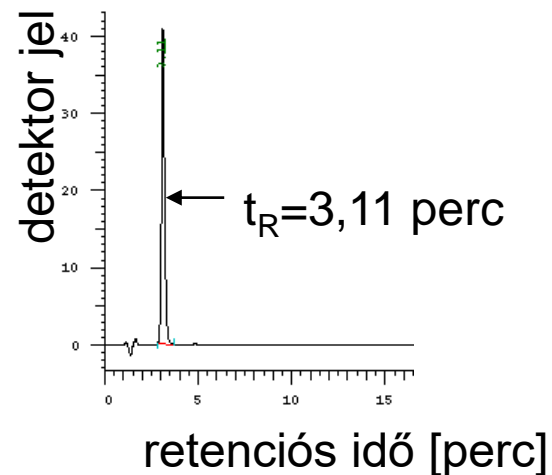
$h$  : Csúcs magasság

mennyiségi meghatározás (tiszta  
anyagok, ú.n. referencia  
standardok segítségével)

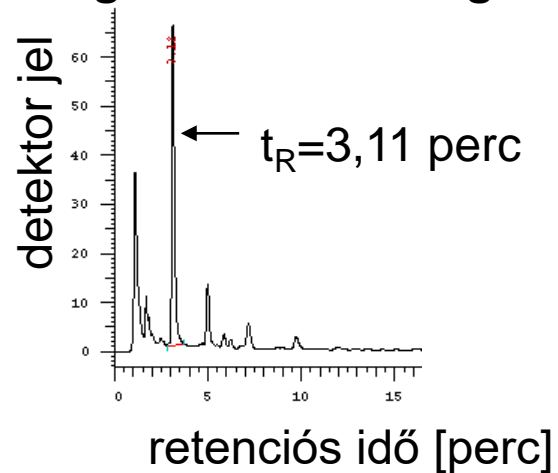
# Szalicin azonosítása fűzfakéreg mintából referencia standard segítségével



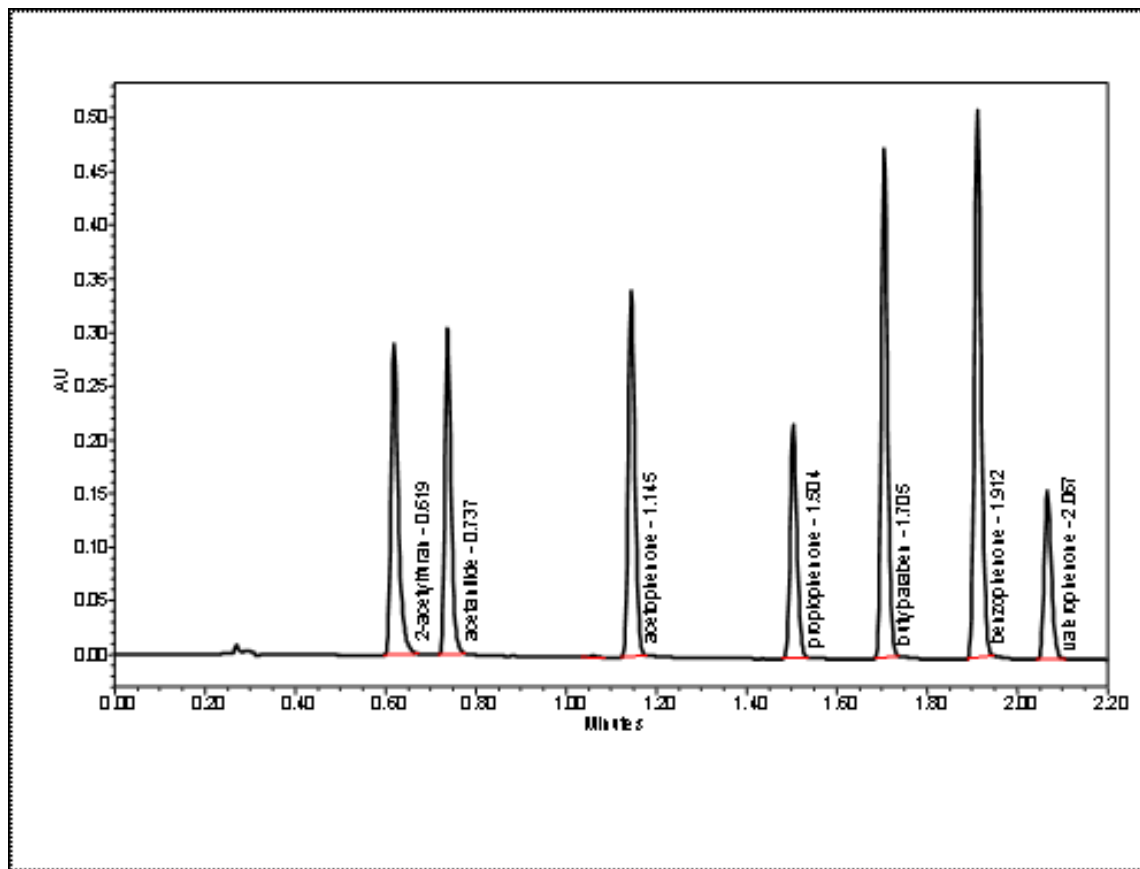
## referencia standard kromatogramja



## fűzfakéreg minta kromatogramja

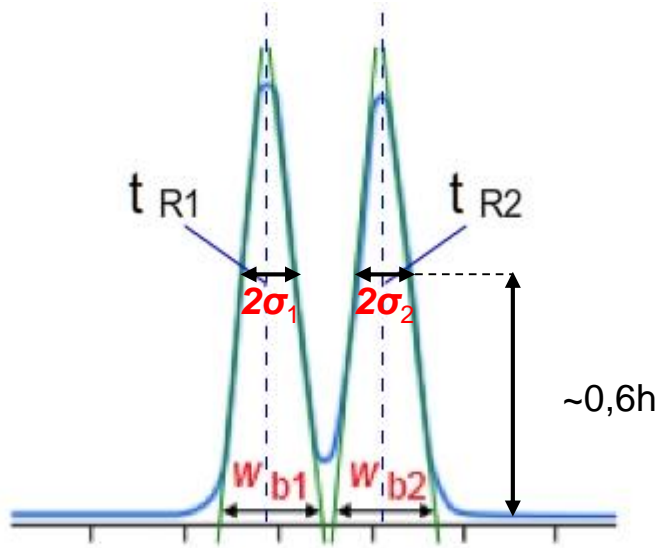


**Cél:** a legrövidebb idő alatt megfelelően elválasztani a komponenseket



A megfelelő elválasztás a kromatográfiás felbontással jellemezhető

# A kromatográfiás felbontás ( $R_s$ – resolution)



$$w_b = 4\sigma$$

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

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{2(\sigma_1 + \sigma_2)}$$

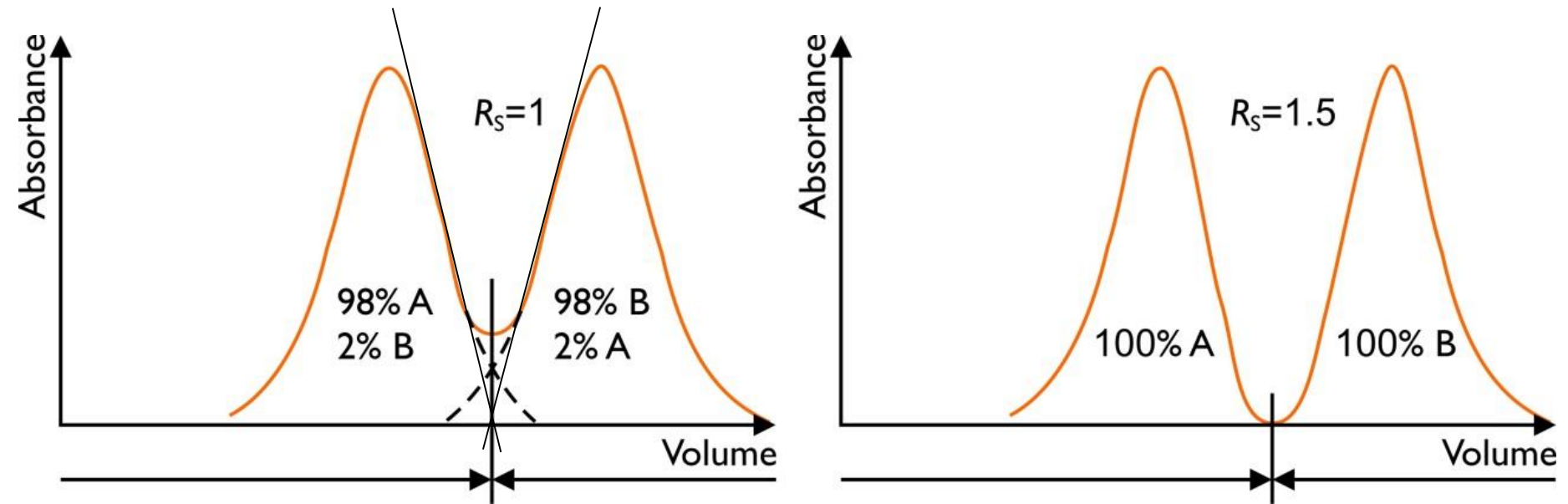
Alapvonalon mért csúcsszélességből:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_{b1} + w_{b2})/2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})}$$

Félérték szélességből:

$$R_s = \frac{1,177(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{1/2(1)} + w_{1/2(2)})}$$

# A kromatográfiás felbontás



$R_s = 1,5$  esetén alapvonal elválasztás (ha a csúcsok nagyjából egyformák)

# A kromatográfiás elválasztást befolyásoló tényezők

Az elválasztás alapegyenlete:

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

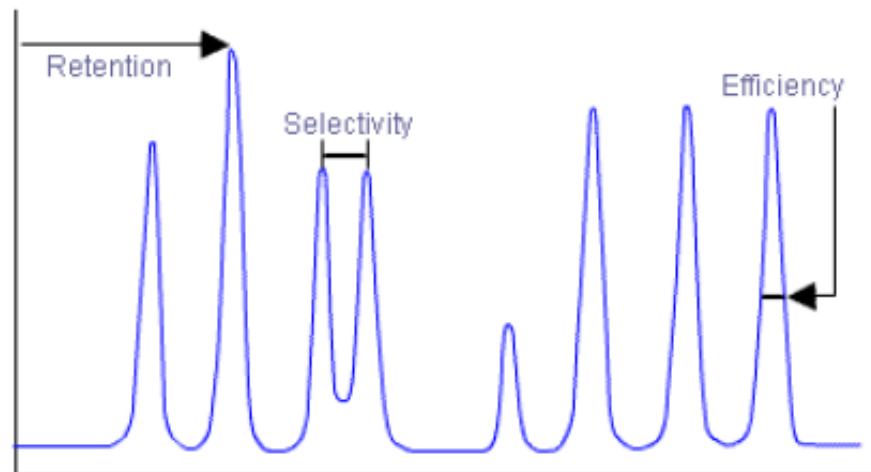
hatékonyság                      szelektivitás                      visszatartás

ahol:

$N$  = elméleti tányérszám

$\alpha$  = szelektivitási tényező

$k$  = a két komponens átlagos retenciós tényezője





# A komponens visszatartásának jellemzése

$k$  : retenciós (visszatartási) tényező

a komponens álló- és mozgófázisbeli mennyiségének hányadosa

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_0} = K \frac{V_s}{V_0}$$

ahol  $n_s$  és  $n_m$  a komponens móljainak száma az álló, illetve mozgófázisban  
 $c_s$  és  $c_m$  a komponens koncentrációja az álló, illetve mozgófázisban  
 $K$  a megoszlási hányados  
 $V_s/V_0$  a fázisarány

levezethető a komponensek vándorlási sebességéből, hogy  $t_R = t_0 \left(1 + K \frac{V_s}{V_0}\right)$

$$\longrightarrow k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R'}{t_0} = \frac{\text{állófázison töltött idő}}{\text{mozgófázisban töltött idő}}$$

# Hogyan befolyásolja az elválasztást a retenció változtatása?

Mivel tudjuk a retenciót befolyásolni?

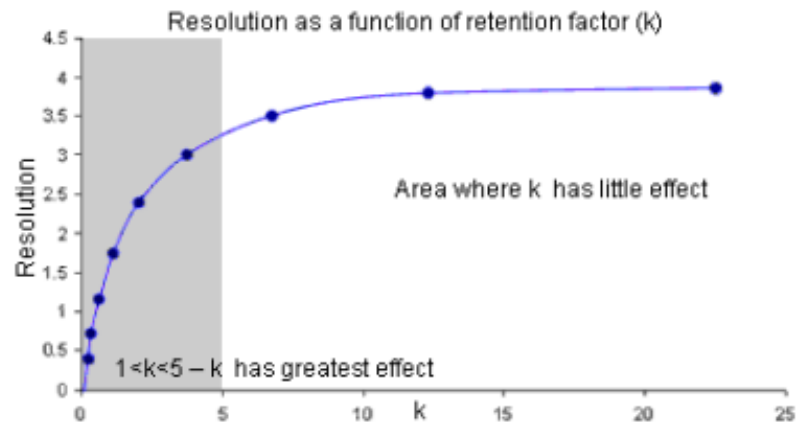
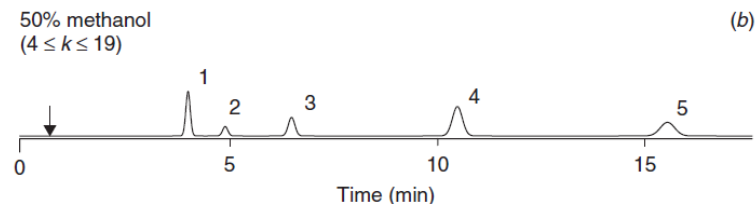
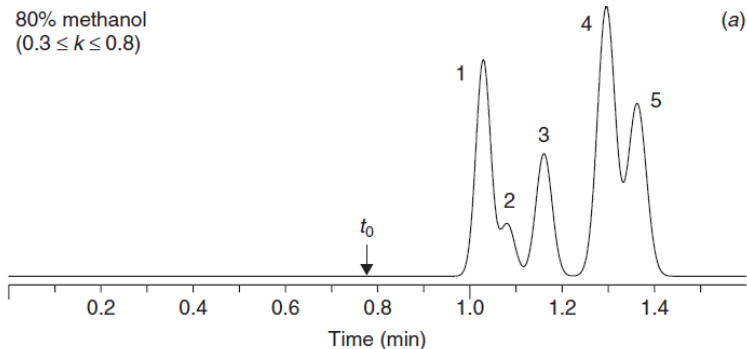
Paraméter

Eluens összetétel

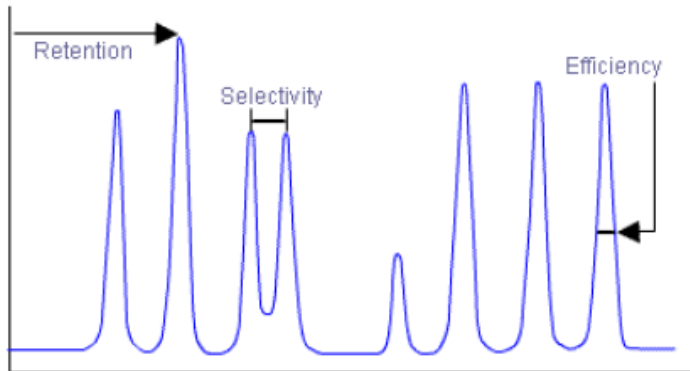
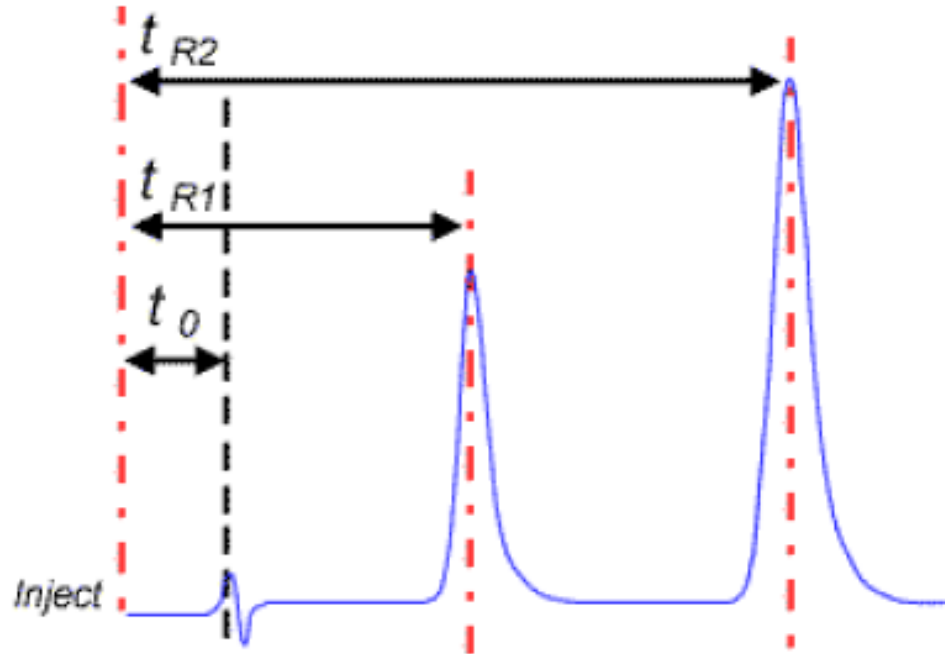
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \left( \frac{k}{k+1} \right)$$

Célszerű tartomány:  $1 < k < 10$

$$t_R = (k \times t_0) + t_0 = \begin{matrix} 2.0 \text{ min} \\ (k=1) \end{matrix} \quad t_0 \quad \begin{matrix} 11.0 \text{ min} \\ (k=10) \end{matrix}$$



# Szelektivitás



$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2 \frac{V_s}{V_m}}{K_1 \frac{V_s}{V_m}} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

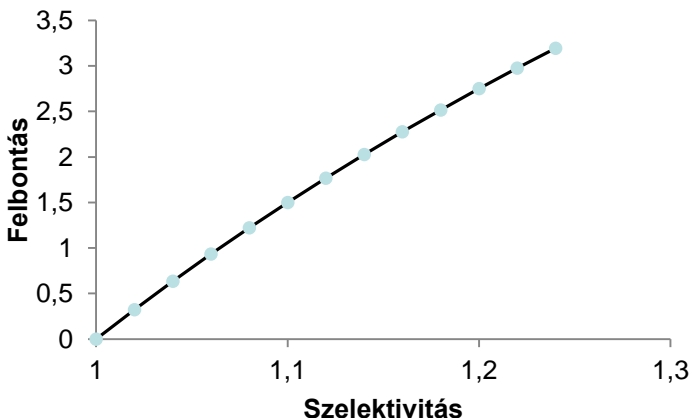
Egymás melletti csúcsokra vonatkozik.

# Hogyan befolyásolja az elválasztást a szelektivitás változtatása?

**Mivel tudjuk a szelektivitást befolyásolni?**

*mindennel, ami megoszlási hányadosokat befolyásolja*

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



Paraméter

**Állófázis**

**Szerves oldószer típusa**

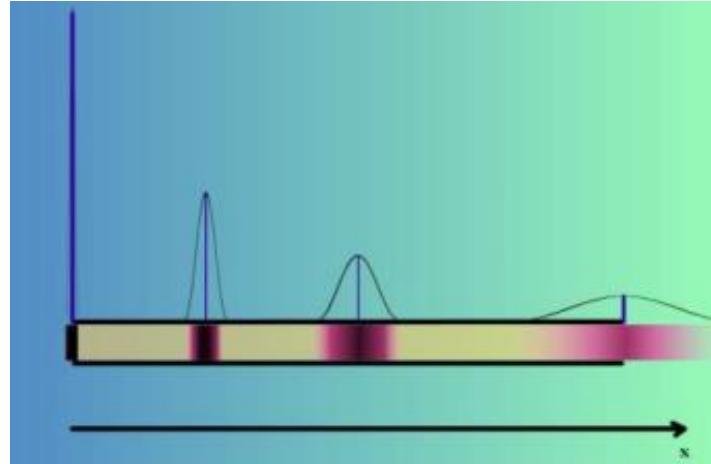
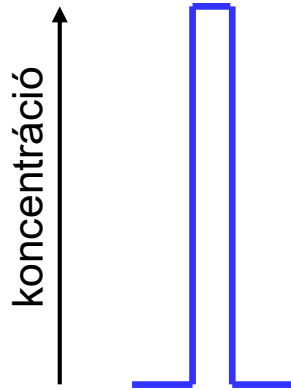
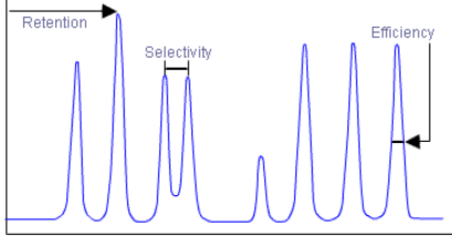
**Mozgófázis pH-ja** (csak ionizálható vegyületek)

**Eluens erősség**

**Hőmérséklet**

- Ha  $\alpha = 1$ , nincs elválasztás
- Ha  $\alpha$  1,1-ről 1,15-re nő, akkor a felbontás ~1,5-szörösére nő!
- $\alpha = 1,1$  feletti szelektivitás értékek már a rutin HPLC-ben jó elválasztást biztosítanak,  $R_s > 1,5$ .  $\rightarrow K_2$  10%-kal nagyobb, mint  $K_1$

# Hatékonyság



$$\sigma = \sqrt{H \cdot x}$$

csúcsszélesedés  
v.  
zónaszélesedés

A zónaszélesedés mértékét az elméleti tányérmagassággal ( $H$ ), illetve az elméleti tányérszámmal ( $N$ ) jellemezhetjük.

*Szemléletesen:*

$N$  megadja, hogy a molekula hányszor lép kölcsönhatásba az állófázissal.

$H$  megadja, hogy mekkora távolságot tesz meg két interakció között.

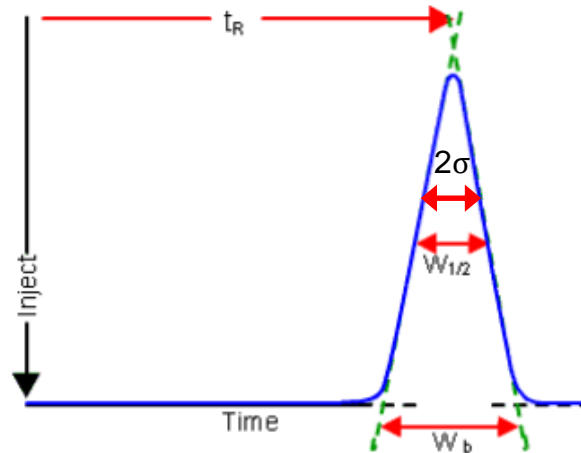
$$N = \frac{L}{H}$$

$H$  - elméleti tányérmagasság

$N$  - elméleti tányérszám

$L$  - oszlop hossza

# Hatékonyság



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

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

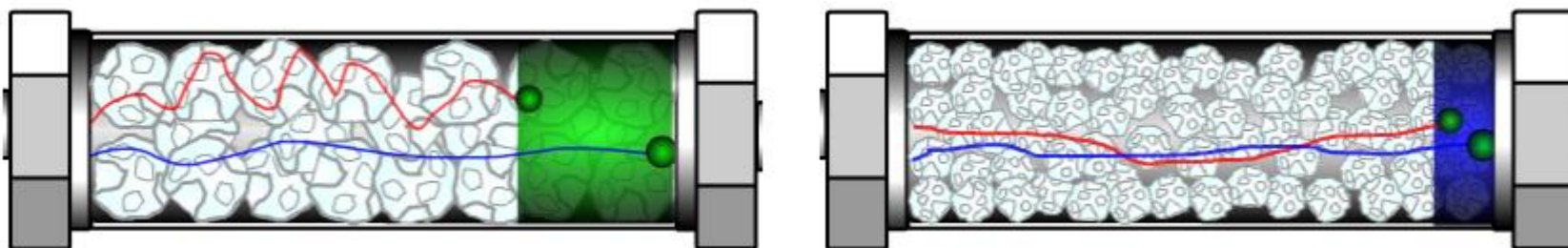
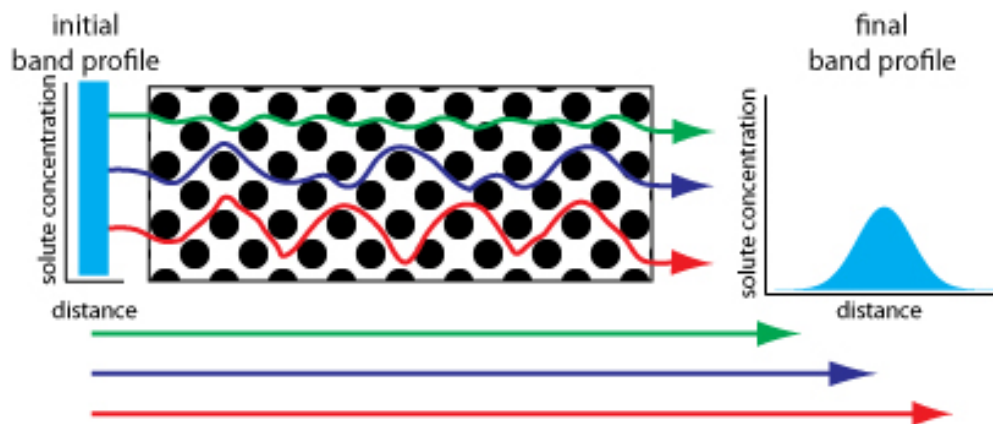
$$W_b = 4\sigma$$

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

# Mi okoz zónaszélesedést?

## 1. Örvénydiffúzió - A

- eltérő áramlási csatornahosszak és keresztmetszetek
  - kolonna töltés inhomogenitásai
  - szemcseátmérő nem teljesen egyforma



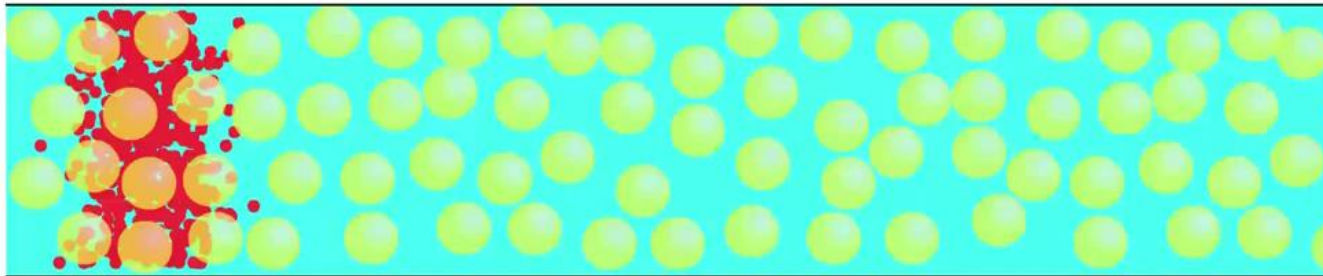
az áramlási sebességtől független

$H \sim A$

# Mi okoz zónaszélesedést? 2. Hosszirányú diffúzió - $B$

a beinjektált mintadugó szélein a koncentrációgradiens miatt longitudinális (hosszirányú) diffúzió történik

Play the animation and watch especially as the molecules spread apart as the flow is lowered. You may even want to stop the flow altogether. The faster the flow, the less time the molecules will have to spread out in the column. High flow equals sharp peaks.



play

zero Flow high

10 number of molecules 600

**Ardent**  
scientific

az áramlási sebességgel fordítottan arányos

$H \sim B/u$



# Mi okoz zónaszélesedést?

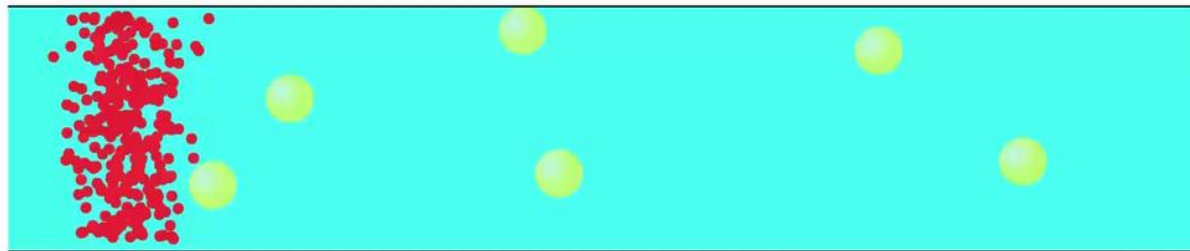
## 3. Anyagátadási ellenállás - C

az állófázisból a mozgófázisba történő anyagátmenet nem pillanatszerű (kvázi-egyensúly kialakulása)

### Fundamentals of HPLC 32 - Band Broadening

#### Mass Transfer

There are deliberately less packing particles in this animation to demonstrate the effect more clearly. Play the animation and watch especially as the molecules spread apart as the flow is increased. The slower the flow, the more time the molecules will have to diffuse out of the particle and stay with the other molecules which are in the mobile phase and have not entered the particle. Low flow equals sharp peaks.



play

zero Flow high

10 number of molecules 600

**Ardent**  
scientific

az áramlási sebességgel egyenesen arányos

$H \sim C_u$

# Mi okoz zónaszéleledést?

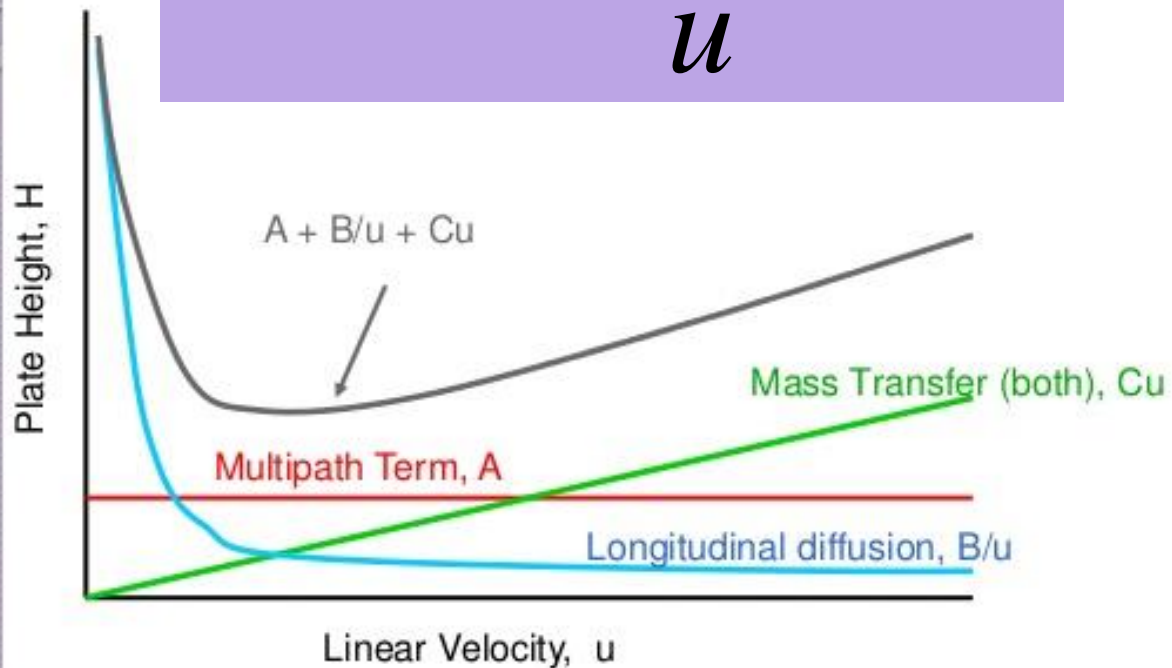
## 3. Anyagátadási ellenállás - C

az állófázisból a mozgófázisba történő anyagátmenet nem pillanatszerű, mert a szemcsék felületén tapadó folyadékréteg van, a pórusokon belül szintén nem áramlik a folyadék

- a szemcsék, illetve a pórusok felületére diffúzióval jut a molekula
- a molekula az állófázisban/ból is diffundál (abszorpciós kromatográfia)
- az adszorpció/deszorpció is időbe telik (adszorpciós kromatográfia)

# A zónaszélesedés áramlási sebesség függése - A van Deemter egyenlet

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$



# Hogyan befolyásolja az elválasztást a hatékonyság változtatása?

Mivel tudjuk a hatékonyságot befolyásolni?

Paraméter

oszlophossz növelése ( $N \approx L$ )

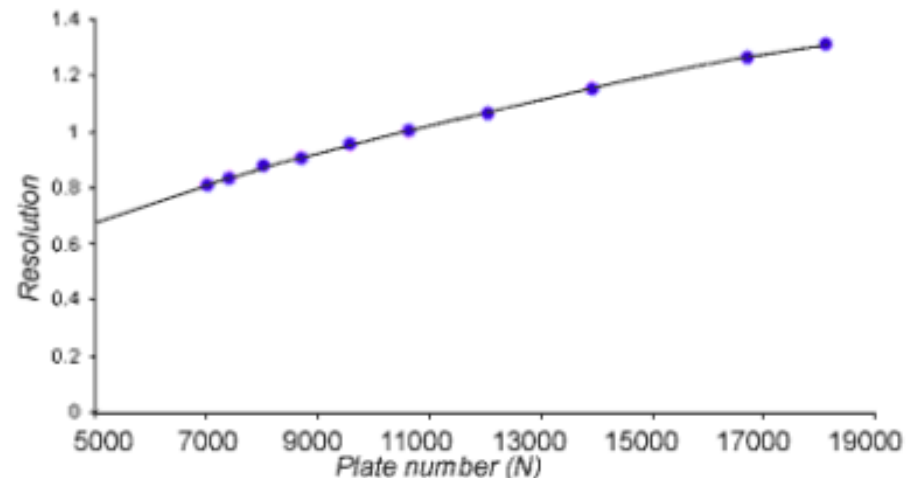
állófázis szemcseméret csökkentése ( $H_{\min} \sim 2d_p$ )

szűk szemcseméret eloszlás, egyenletes oszloptöltés

optimális áramlási sebesség

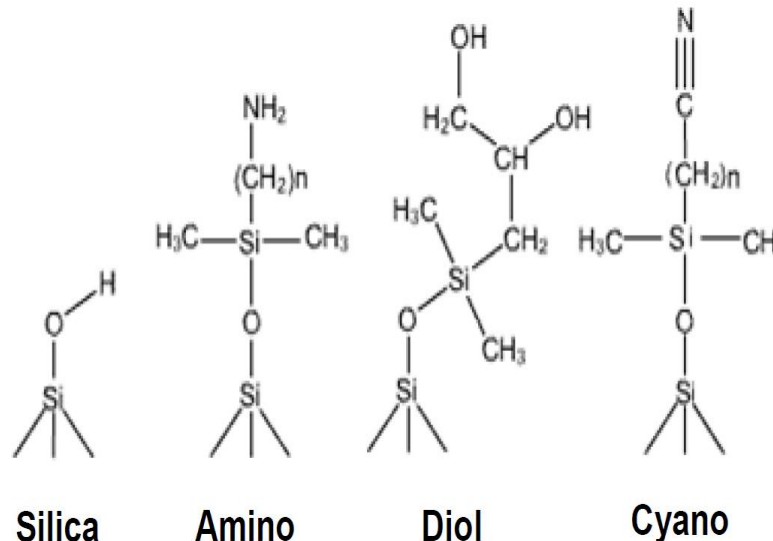
kolonnahőmérséklet emelése (gyorsabb diffúzió)

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



# Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)

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



# Mozgófázisok az NP-HPLC-ben

## Alap oldószerek:

- Hexán, Heptán, Izooktán

## Oldhatóságot növelő oldószerek:

- Diklórmétán, Diklóretán, Kloroform

## Módosító szerek (modifikátorok):

- Éterek, Észterek, Alkoholok

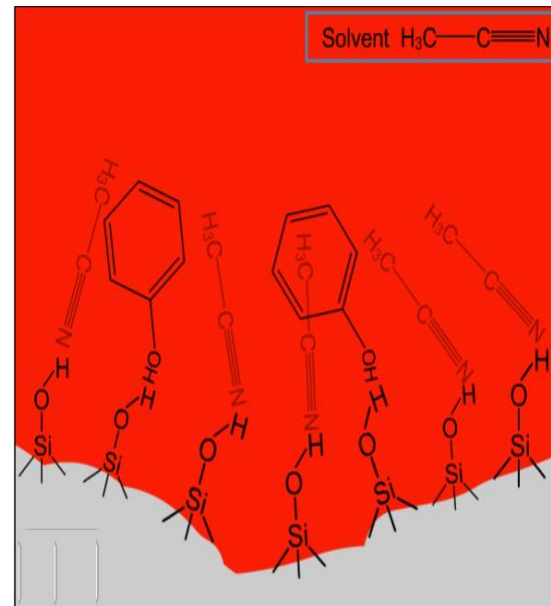
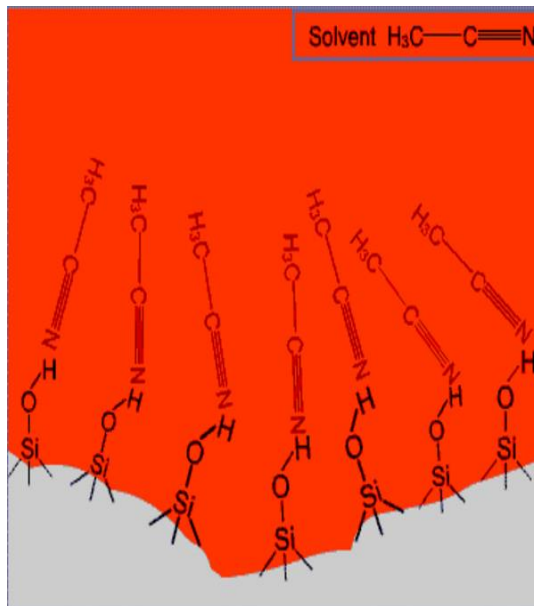
Az állófázis legaktívabb helyein kötődnek meg. Modifikátorokat akkor alkalmazunk, ha a mérendő anyag túl erős kölcsönhatásba lép az állófázissal.

Eluenserősség, polaritás

Retenció, szelektivitás

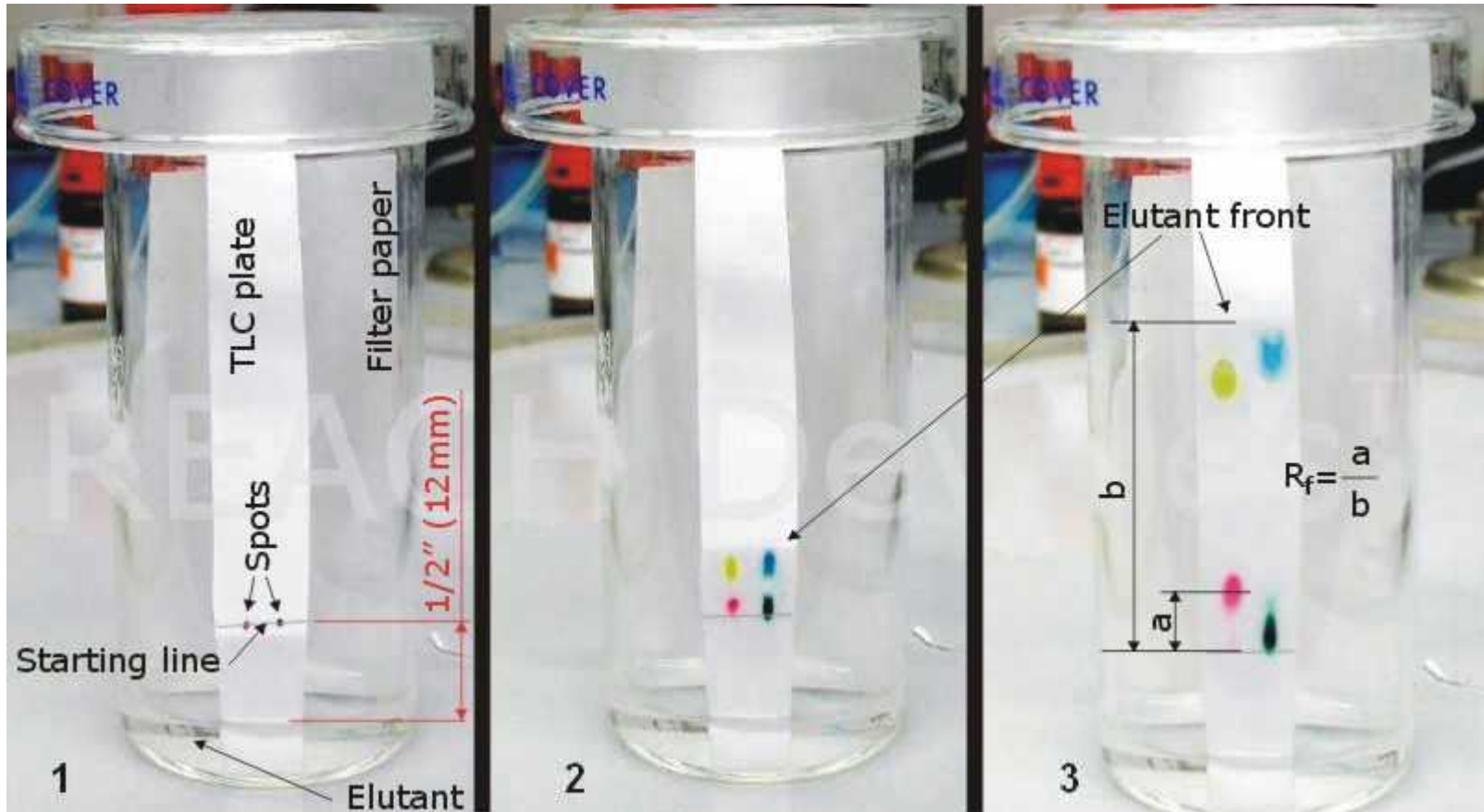
# Retenciós mechanizmus a normál fázisú kromatográfiában

- Retenciós mechanizmus: minta illetve az oldószer adszorpciója az állófázison
- Poláris csoporttal rendelkező molekulák kötődnek az állófázison
- Kevésbé poláris anyagok előbb eluálódnak, mint az erősen poláris anyagok



# Vékonyréteg kromatográfia-VRK

## Thin-layer chromatography-TLC





# Vékonyréteg kromatográfia

## *Hordozó*

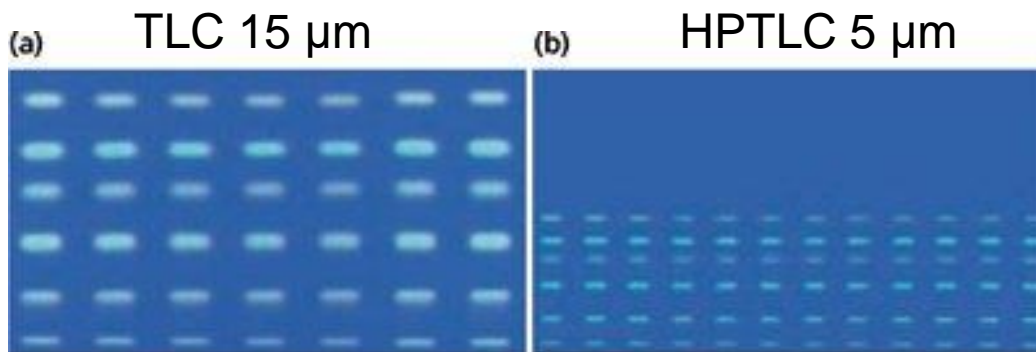
alumínium lemez, üveglap, műanyag

## *Állófázisok*

### **Rétegvastagság**

analitikai: 100; 200; 250  $\mu\text{m}$ , preparatív: 0,5-2 mm

### **Szemcseméret**



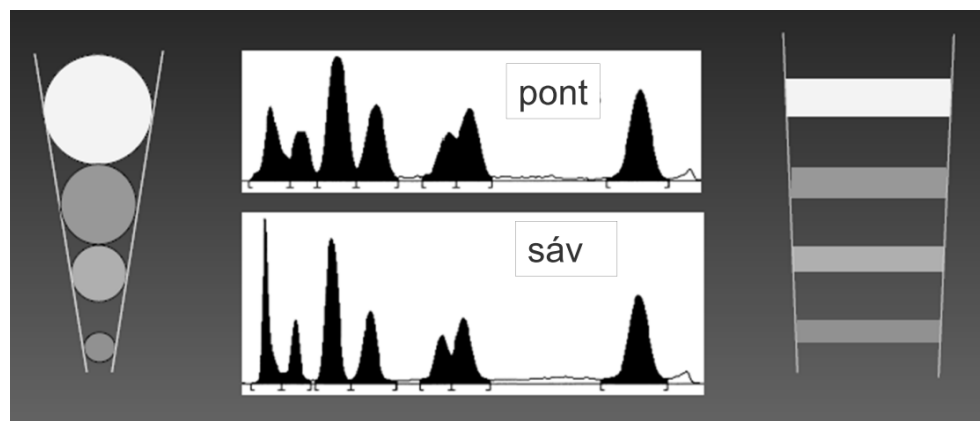
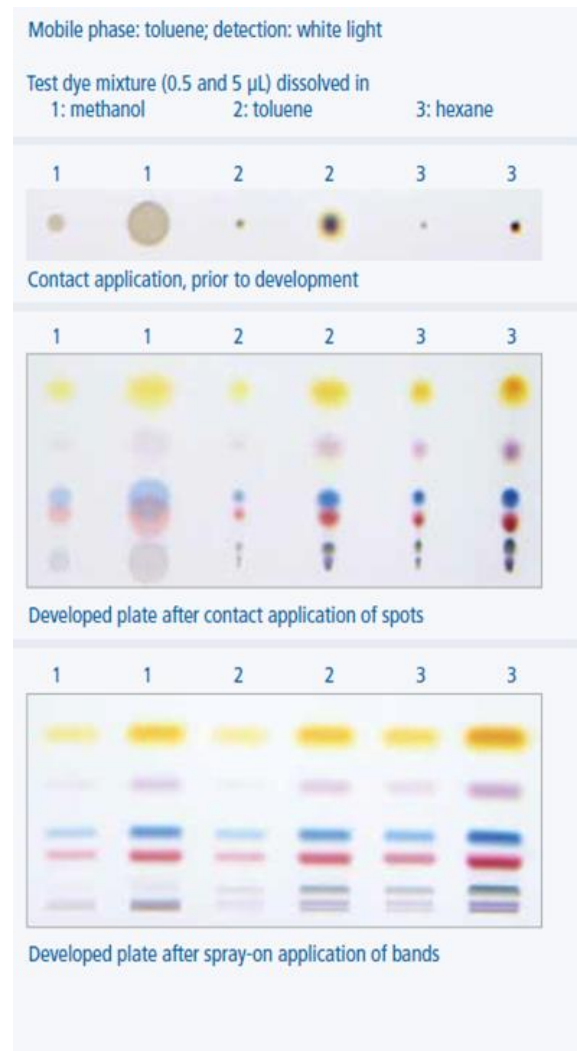
(a) TLC szilikagél 60 (b) HPTLC szilikagél 60. Mintatérfogat: TLC, 4  $\mu\text{L}$ ; HPTLC, 0.3  $\mu\text{L}$ ; eluens: etilacetát–metanol–propionsav (22:10:3,v/v/v); futási távolság: TLC, 10 cm; HPTLC, 5 cm; analízis idő: TLC, 42 min; HPTLC, 13 min 45 s; detektálás: UV 366 nm.

# Állófázisok

Állófázis	Elválasztási mód	Alkalmazás
Szilikagél	normál	szteroidok, lipidek, aminosavak, festékek, alkaloidok, fenolos vegyületek, gyógyszer intermedierek
Módosított szilikagél C2, C8, C18, fenil	fordított	
Módosított szilikagél ciano, amino, diol	normál/fordított	
Cellulóz/módosított	fordított, ioncsere	ionos vegyületek
Alumíniumoxid bázikus/semleges/savas	normál	C-C kettős kötés, aromás szénhidrogének
Poliamid	H-hidak	flavonoidok, fenolok

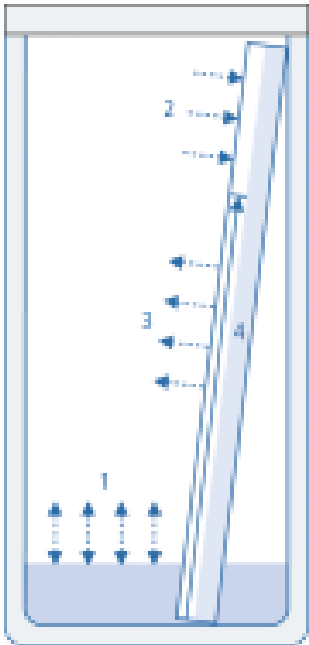


# Automatikus mintafelvitel



# Futtatás

- A mozgófázis áramlása a kapilláris erők következtében történik. → Lassul!
- Az álló- és mozgófázis mellett gőztér is van, ami befolyásolja az elválasztást!



Mozgófázis párolgása a kamra gőztérébe (1). A mozgófázis és a gőztér összetétele nagyon eltérhet.

Az elpárolgott mozgófázis gőzeinek adszorpciója a rétegre (2).

Lepárolgás a rétegről (3).

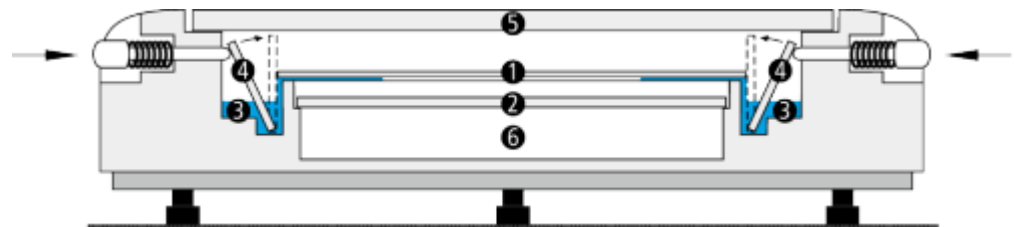
Mozgófázis komponenseinek megoszlása az állófázison (4). (Másodlagos frontok)

## Felszálló kifejlesztés

Szűrőpapír

Várakozás egyensúly beállításra

VRK lap prekondicionálása

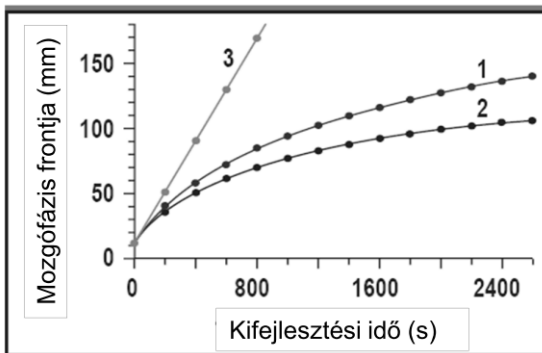


## Horizontális kifejlesztés

# Túlnyomásos rétegkromatográfia

1977: Tyihák E., Mincsovics E., Kalász H. - OPLC, overpressured layer chromatography

- Zárt állófázison történik a szétválasztás. Nincs gőztér.
- A mozgófázis (a HPLC-hez hasonlóan) kényszeráramlással mozog.
- Állandó és optimális áramlási sebesség.
- Nagy kifejtési távolság (akár 20 cm).
- Gyors elválasztás. (10 perc/20 cm)



- 1 – telített gőzterű felszálló kamra
- 2 - telítetlen gőzterű felszálló kamra
- 3 - OPLC



# Előhívás

Komponens	Előhívószer
Színes	Szabad szemmel
UV elnyelő	UV lámpa $\lambda=254$ nm VRK lap fluoreszcens indikátorral ( $\text{Zn}_2\text{SiO}_4$ )
366 nm-en fluoreszkáló	UV lámpa $\lambda=366$ nm
Kb. 50%, alkánok, redukáló vegyületek	$\text{I}_2$ kamra
univerzális	foszfomolibdénsav
univerzális	$\text{KMnO}_4$
univerzális	$\text{H}_2\text{SO}_4$
univerzális	cérium (IV)
fenolok	Fe(III)klorid
aminosavak	ninhidrin
aldehidek, ketonok	2,4-dinitrofenilhidrazin

# Kvalitatív VRK

Minőségi azonosítás a retenciófaktor alapján – önmagában nem elég



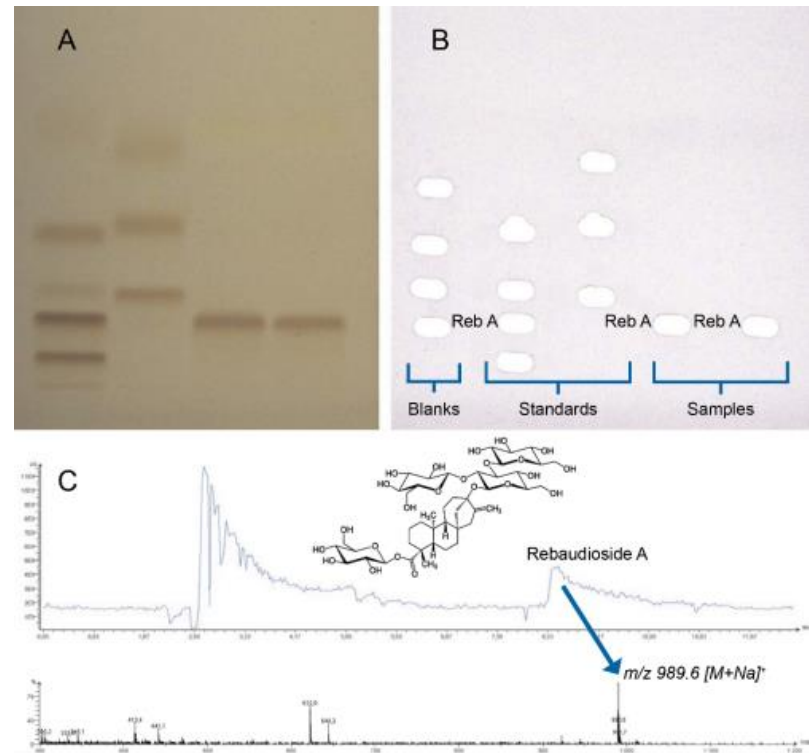
Standard anyag felcseppentése

Futtatás más mozgó-, vagy állófázissal

A folt lekaparása, extrahálása, centrifugálás/szűrés után szerkezet azonosítás (NMR, IR, MS)



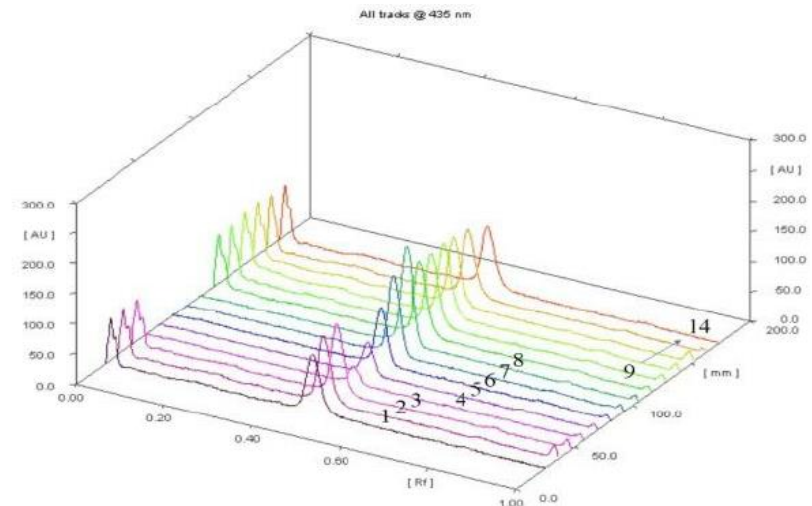
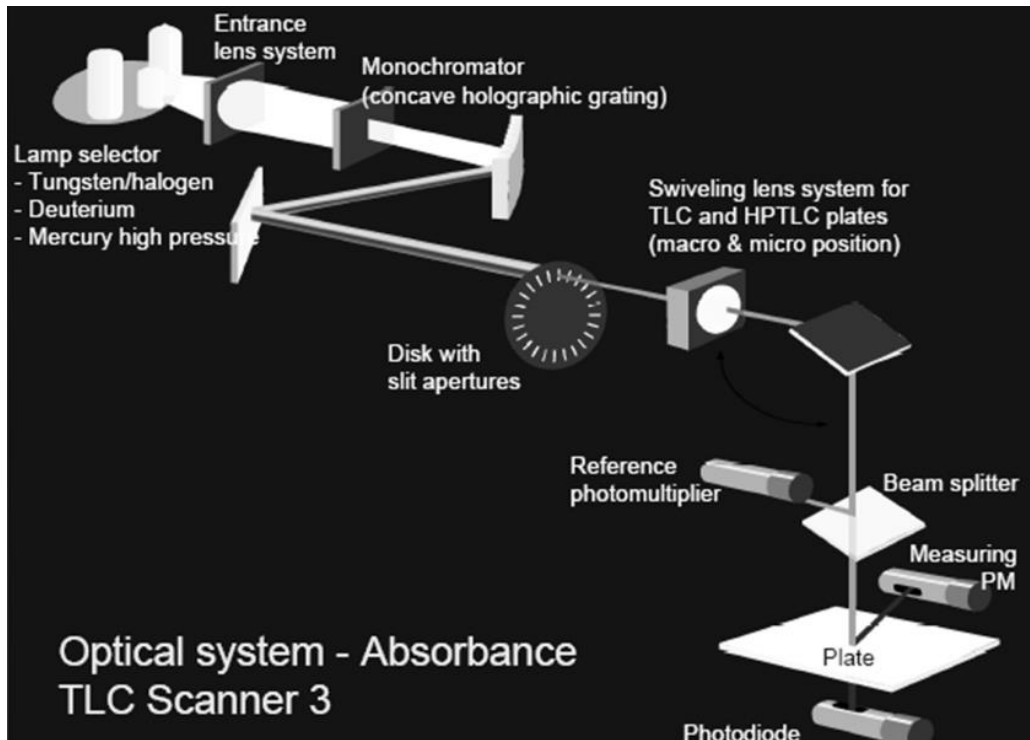
# VRK-MS kapszolat



# Kvantitatív VRK

- Mennyiségi információ: a foltok optikai sűrűsége (színintenzitás)
- Denzitometria: a kromatográfiás foltok optikai sűrűségének mérése

## Denzitométer



# Vékonyréteg kromatográfia

## Előnyei

- Egyszerre akár 20 minta is futtatható egyazon VRK lapon
- Egyszerű, nem igényel drága műszerezettséget
- Futás után a lap 90°C-kal elfordítható és másik eluenssel futtatható → 2 dimenziós VRK, jobb felbontás
- Minden minta komponens látszik a futtatás után

## Hátrányai

- Nem annyira jó az elválasztás hatékonysága
- Lassú a kromatogram kifejtése főleg a gyors kromatográfiás HPLC módszerekhez képest

## **komplementer módszerek**

főleg NORMÁL fázisú elválasztások ----- főleg FORDÍTOTT fázisú elválasztások

	Elméleti tányérszám	Elméleti tányérmagasság
VRK	2000	12 $\mu\text{m}$
HPLC	15000	3-4 $\mu\text{m}$

*A HPLC és a VRK maximális elválasztóképessége 10 cm-es elválasztási távolságon.*

# A VRK alkalmazási területei

- Gyógyszer gyártási folyamat nyomonkövetése, in process ellenőrzés
- Tabletta hatóanyag azonosság vizsgálat HPLC mellett megerősítésként IR, vagy UV helyett
- Gyógyszerkönyvi módszerekből egyre inkább kiszorul – gyógynövénykivonatoknál használják
- Élelmiszer ellenőrzés, élelmiszer biztonság – szennyezők, adalékok
- Toxikológiai laboratórium – tiltott szerek gyors, olcsó azonosítása