

Kromatográfia

2017 március 14.

Tematika

2017 március 14.: A kromatográfia rövid története, alapfogalmak, a kromatográfiás módszerek csoportosítása, vékonyréteg kromatográfia

2017 március 21.: Gázkromatográfia

2017 március 28.: Fehérjekromatográfia

2017 április 4-11.: Folyadékkromatográfia

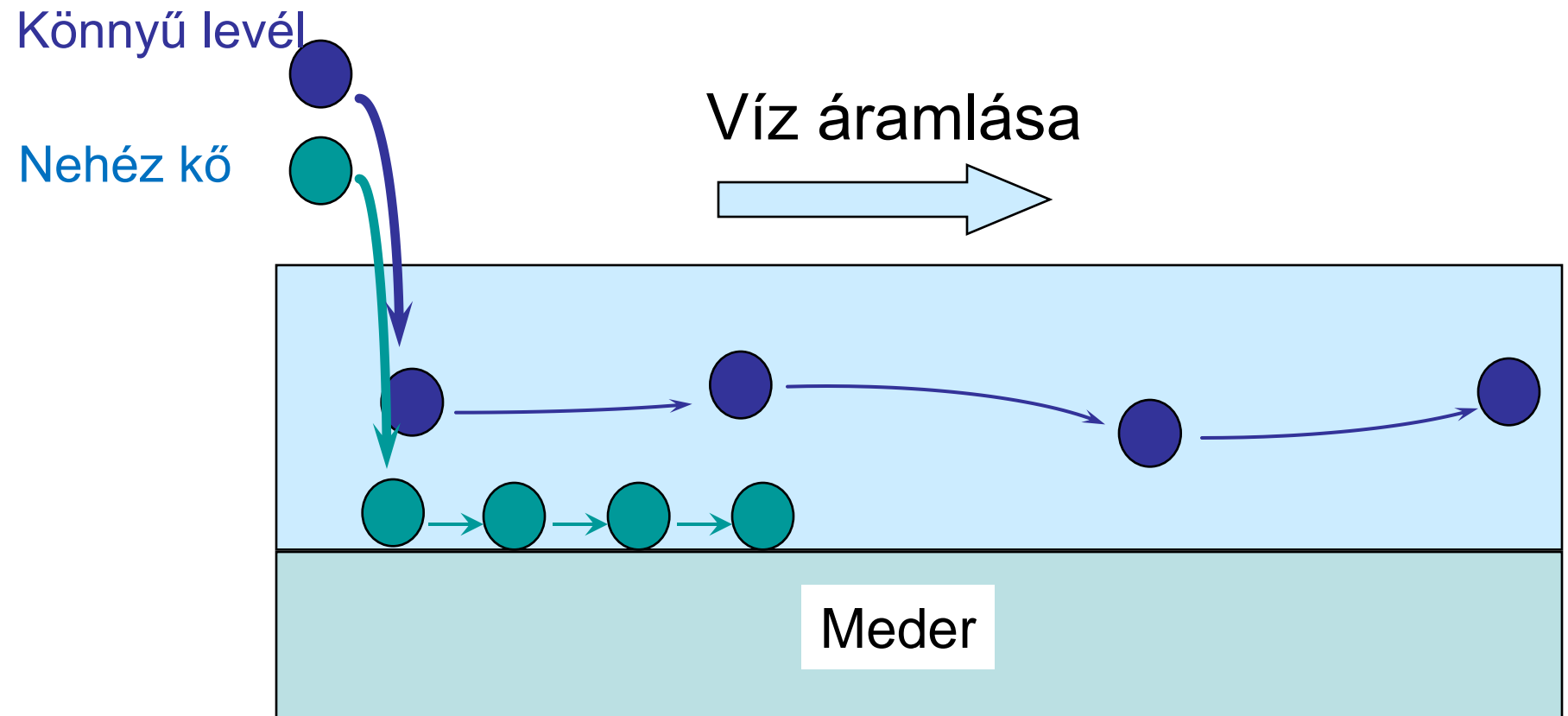
Az ábrák több, részben szerzői jogokkal védett műből, oktatási célra lettek kivéve.

Mi a kromatográfia?

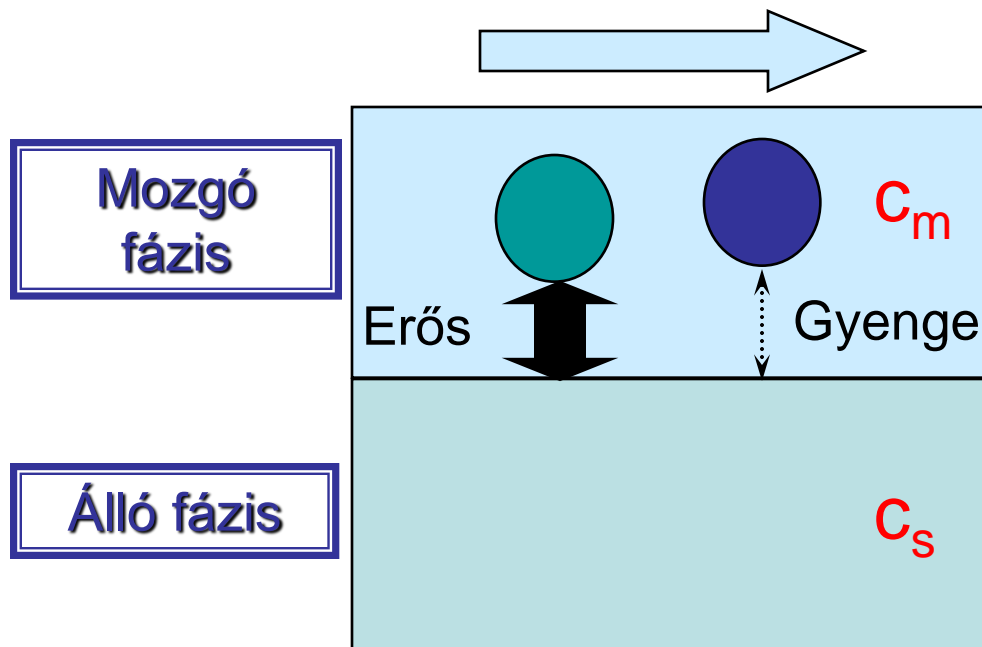
IUPAC definíció:

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

A kromatográfia egy folyóhoz hasonlít



Mozgó fázis/Álló fázis



A **mozgó fázis** az **álló fázissal** érintkezik egy határfelületen.

Egyenletesen áramlik.

Átlagos szorpciója kisebb mértékű, mint a legkevésbé kötődő minta komponensé.

→ **elúciós technika**

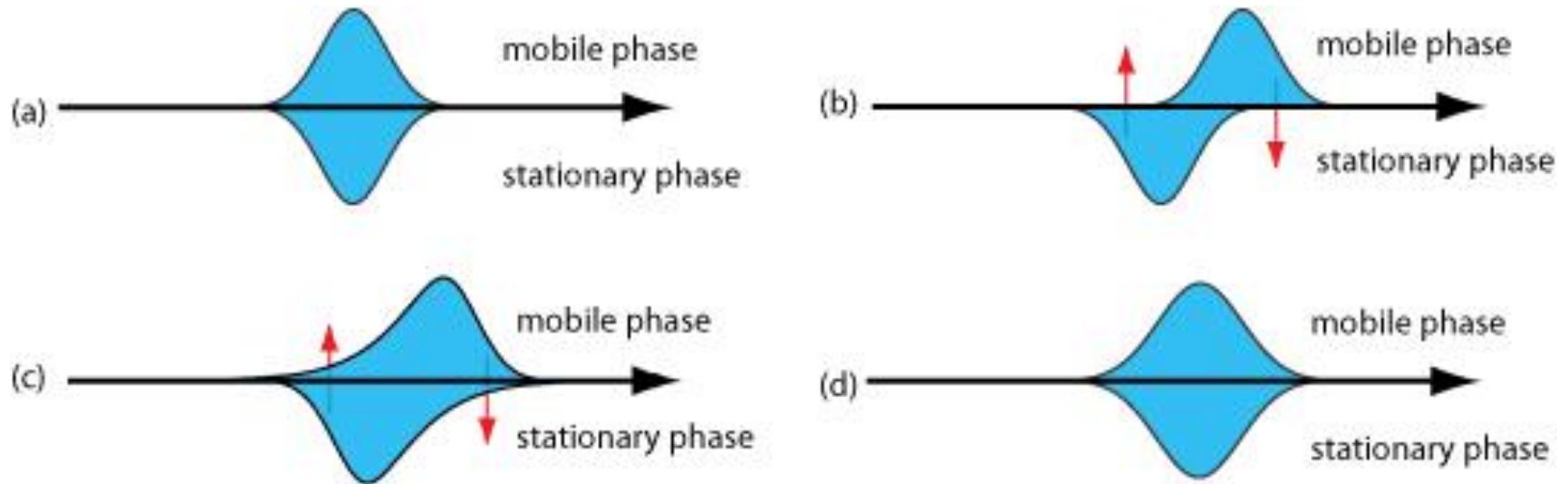
A **minta** bevitel dugószerűen történik.

A különböző anyagoknak más-más a megoszlási hányadosa az álló fázison.

→ **Elválasztás** történik az anyagok különböző sebessége következtében.

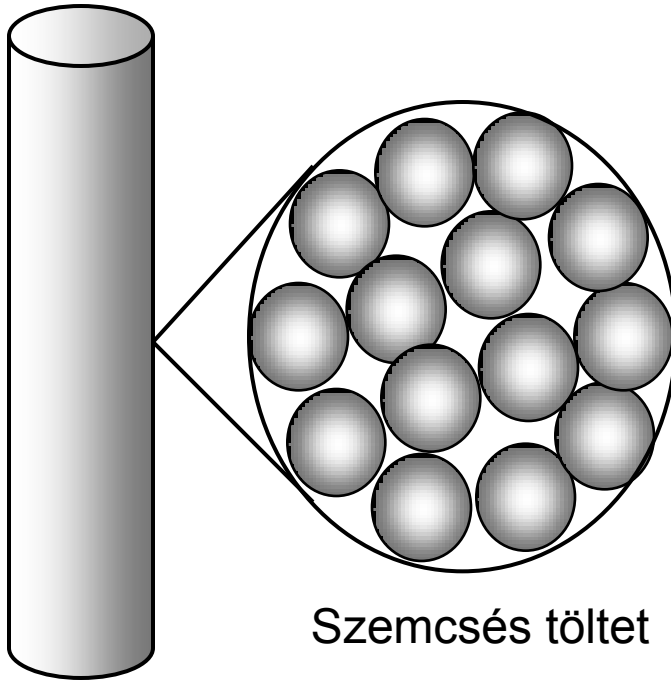
$$\text{Megoszlási hányados: } K = \frac{c_s}{c_m}$$

Az elválasztás folyamata

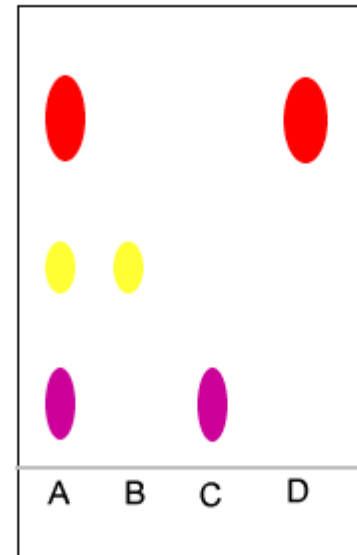


A kromatográfia felosztása technikai elrendezés szerint

Elválasztó oszlop



Oszlop kromatográfia



Papír kromatográfia
Vékonyréteg kromatográfia (VRK)

A mozgó és állófázis állapota szerinti felosztás

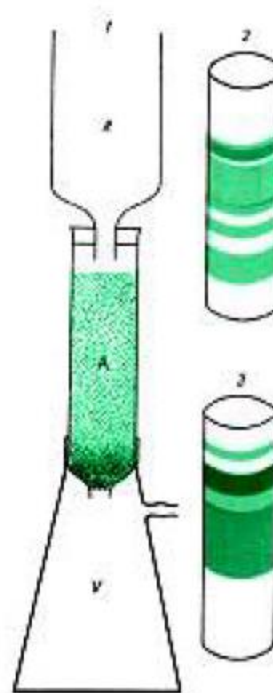
		Mozgó fázis		
		Gáz	Folyadék	Szilárd
Álló fázis	Gáz			
	Folyadék	Gáz-kromatográfia	Folyadék kromatográfia	
	Szilárd			

A kromatográfia története

1900-as évek eleje:

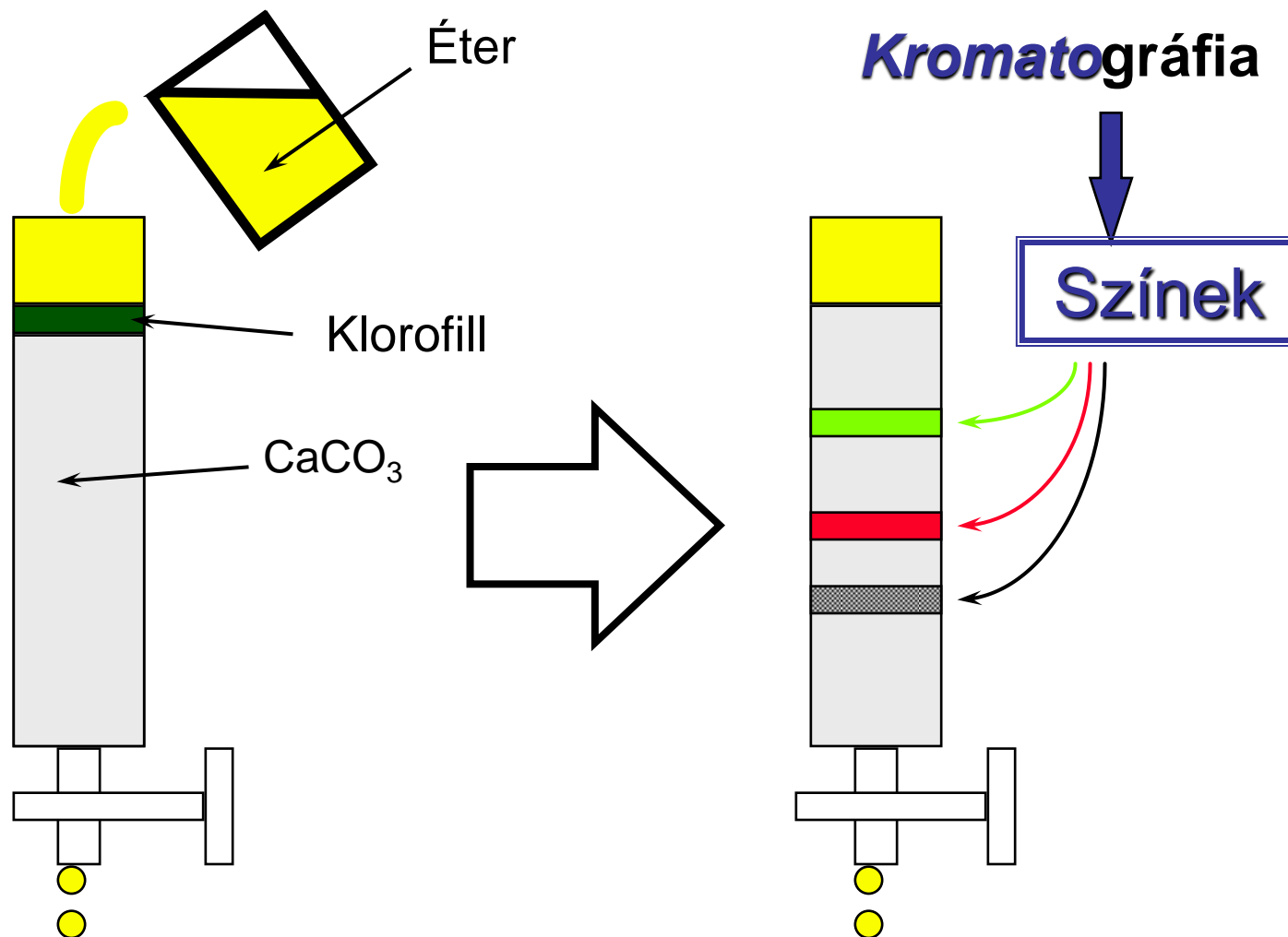


Russian Botanist
Mikhail Tswett (1872-1919)



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

Adszorpciós oszlopkromatográfia



A kromatográfia története

- Cvet módszerét sokáig nem fogadták el, legnagyobb ellenzője Richard Willstätter volt, aki 1915-ben Nobel díjat kapott a klorofill és más növényi színanyagok vizsgálatáért.
- 1931: Richard Kune (Wilstatter tanítványa) ezt a módszert használta polién pigmentek izomerjeinek elválasztására.
- Dr. Heinrich Wieland (Nobel díjas): „Mostanáig megtanultunk nagy fáradsággal desztillálni, kristályosítani, átkristályosítani, most pedig jönnek egyesek és csak átöntik az anyagot egy kis csövön.”

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_2 és O_2 elválasztása

Gáz-folyadék megoszlási kromatográfia

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

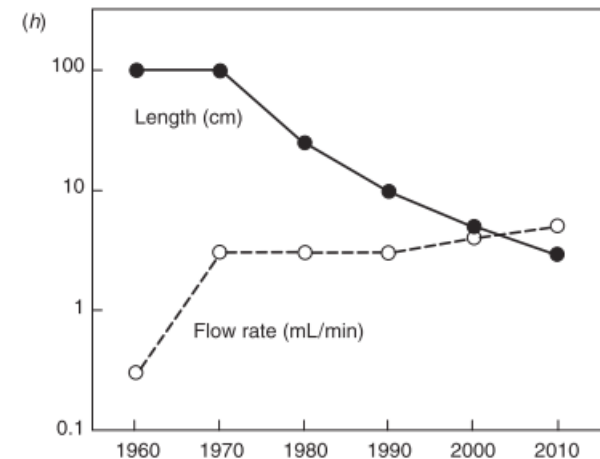
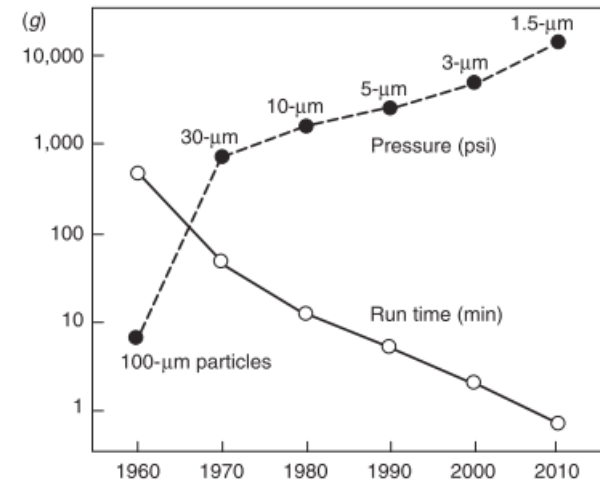
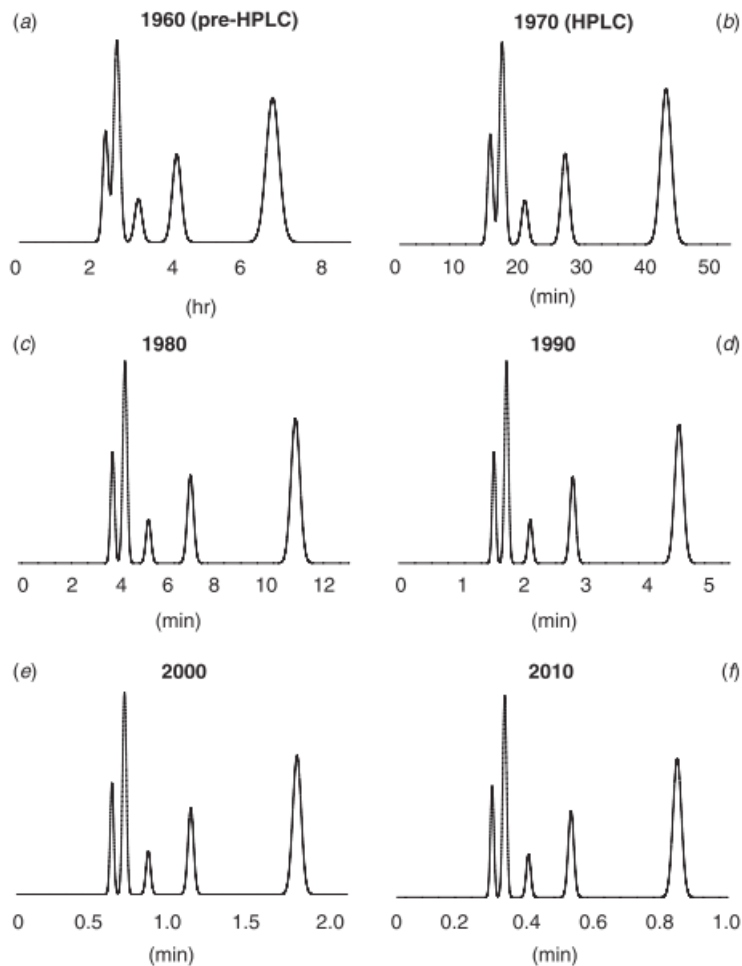
A kromatográfia története

- 1950-es évek vége: aminosav analízátor – ioncserés kromatográfia – aminosav keverékek vizsgálata
- Moore és a Waters cég: Gélpermeációs kromatográfia – szintetikus polimerek molekulaméret eloszlásának meghatározása

Nagynyomású folyadékkromatográfia - HPLC

- 1960-as évek: Horváth Csaba – USA
Joseph Huber – Európa
- 1960-as évek vége: az első kereskedelmi HPLC készülékek (Waters és Du Pont)

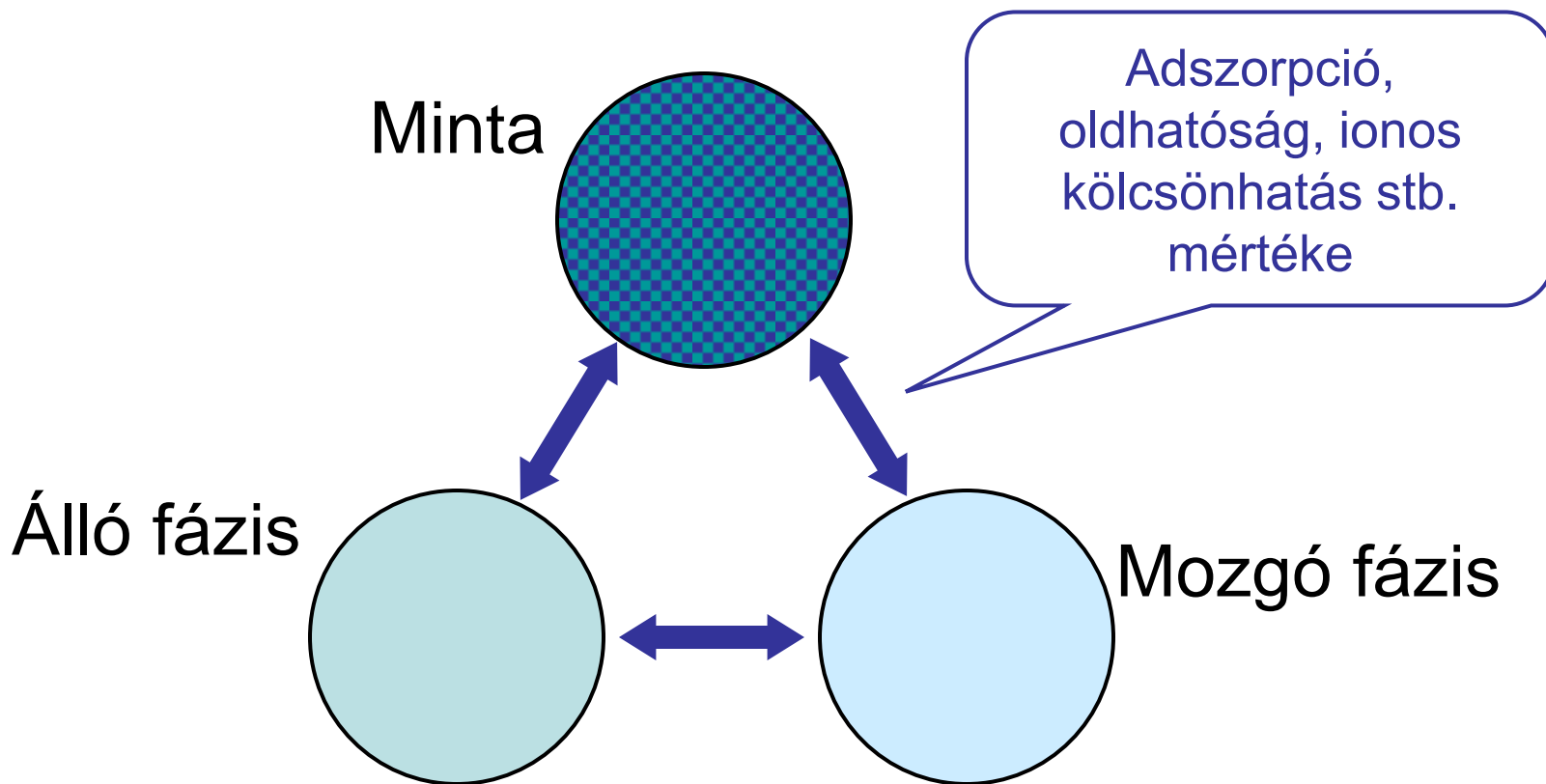
A HPLC fejlődése 1960-tól 2010-ig



Minta: öt gyomirtószer. Körülmények: 50% metanol-víz, szobahőmérséklet.

A minta, az álló fázis és a mozgó fázis közötti kölcsönhatások

A különböző mintamolekulák és az álló, vagy mozgó fázis közötti kölcsönhatások különbözősége teszi lehetővé az elválasztást.

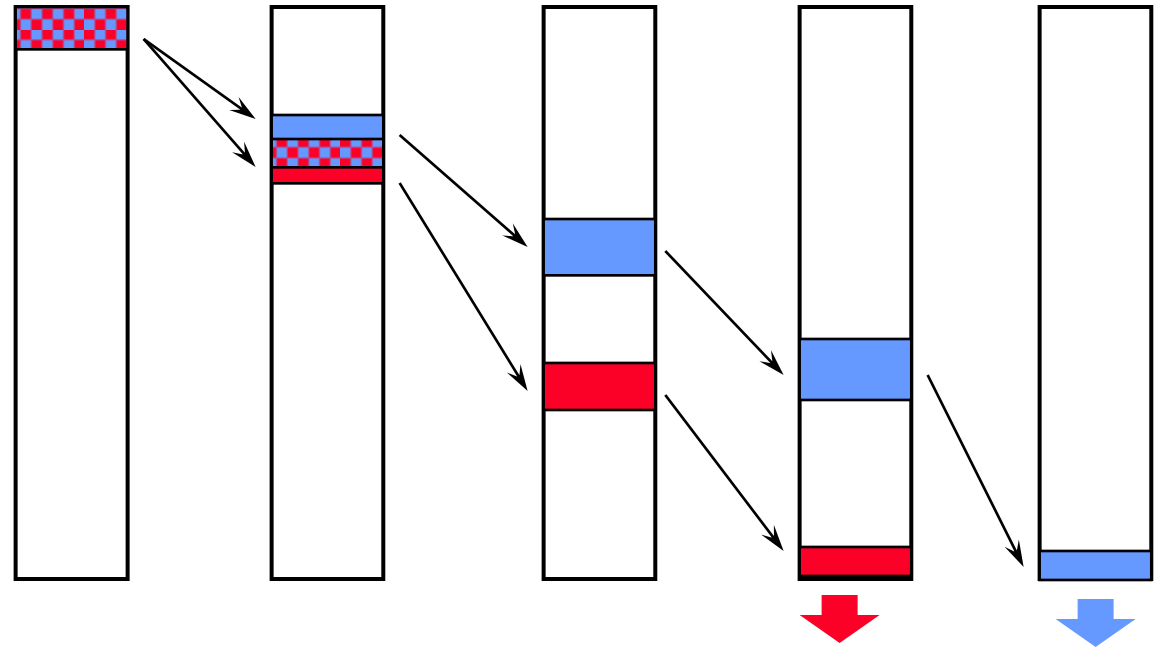


Folyadékkromatográfiás elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis	Apoláris C18, C8, C4, ciano, amino, diol	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Szerves oldószerek/poláris módosítók
Ionos szerves vegyületek, szervetlen ionok	Ioncsere	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes/puffer ellenion
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs - szerves

Az elválasztás folyamata és a kromatogram

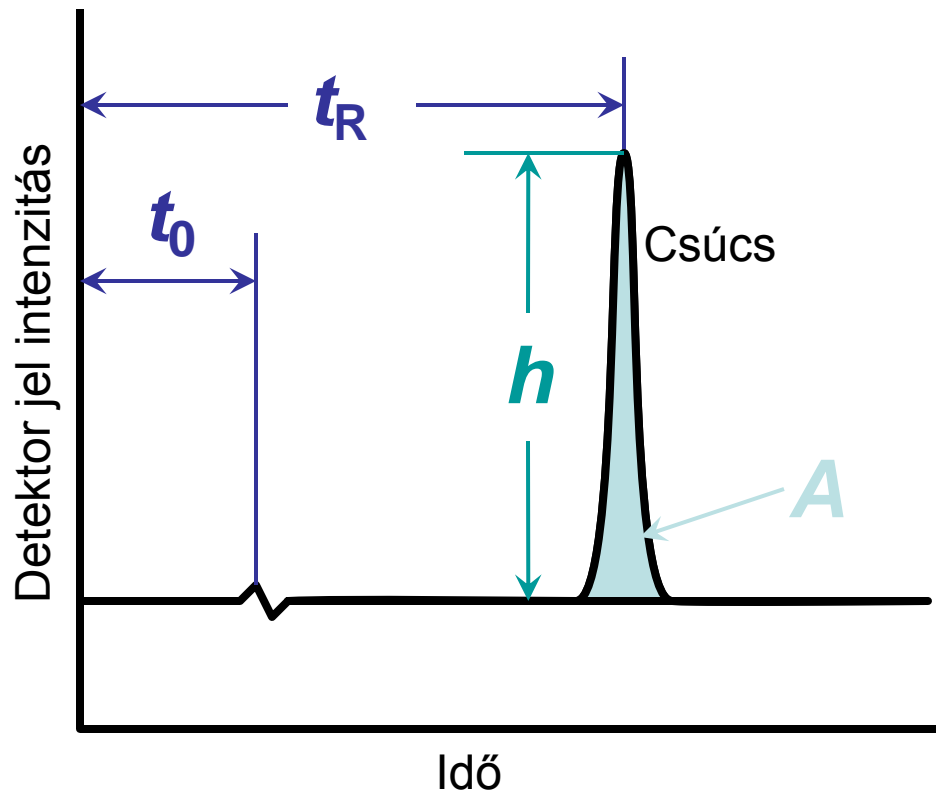
$$K = \frac{c_s}{c_m} > K = \frac{c_s}{c_m}$$



Koncentráció
arányos jel



A kromatogram



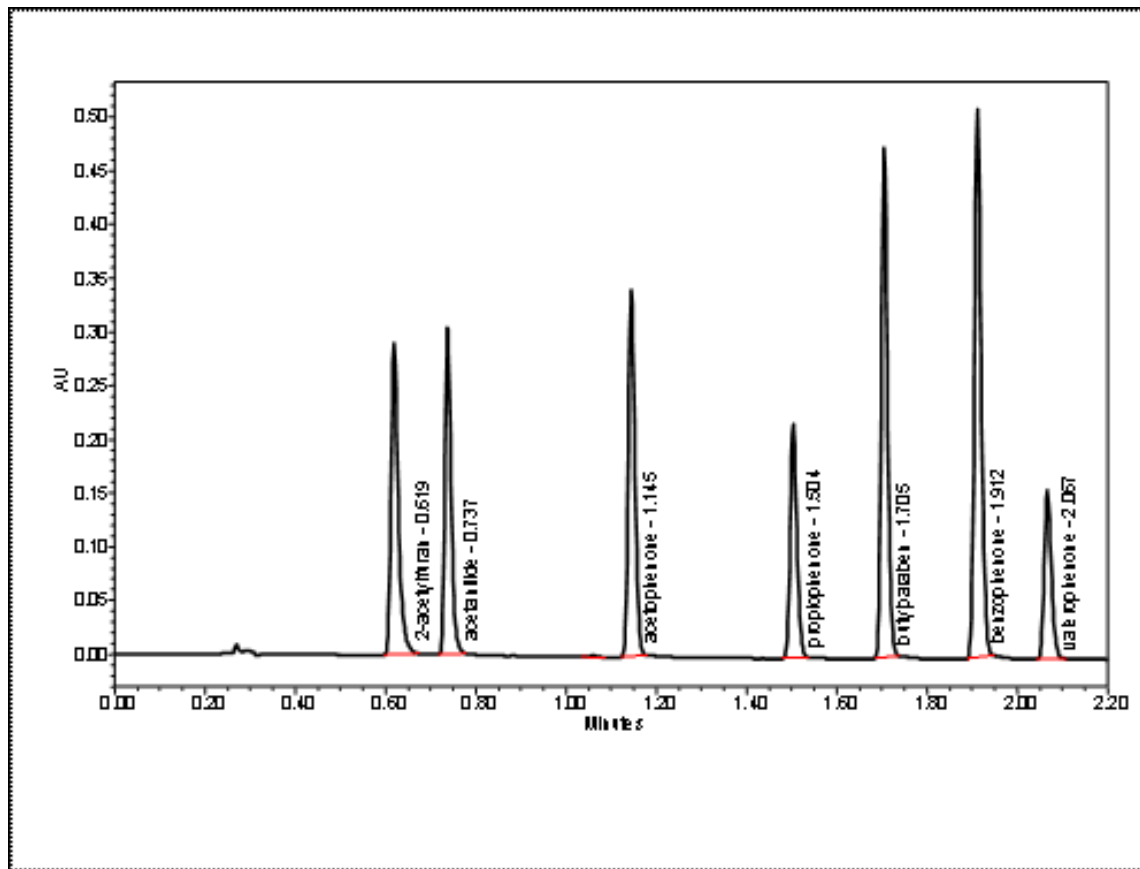
t_R : Retenciós idő

t_0 : Holtidő

A : Csúcs terület

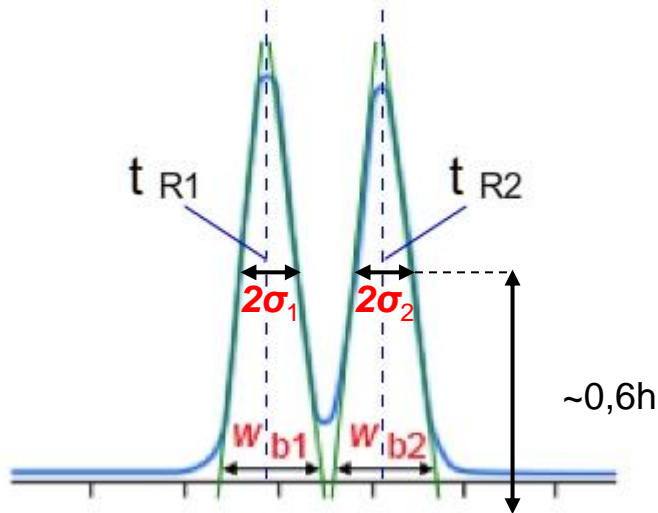
h : Csúcs magasság

Cél: a legrövidebb idő alatt megfelelően elválasztani a komponenseket



A megfelelő elválasztás a kromatográfiás felbontással jellemezhető

A kromatográfiás felbontás (R_s – resolution)



$$w_b = 4\sigma$$

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

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

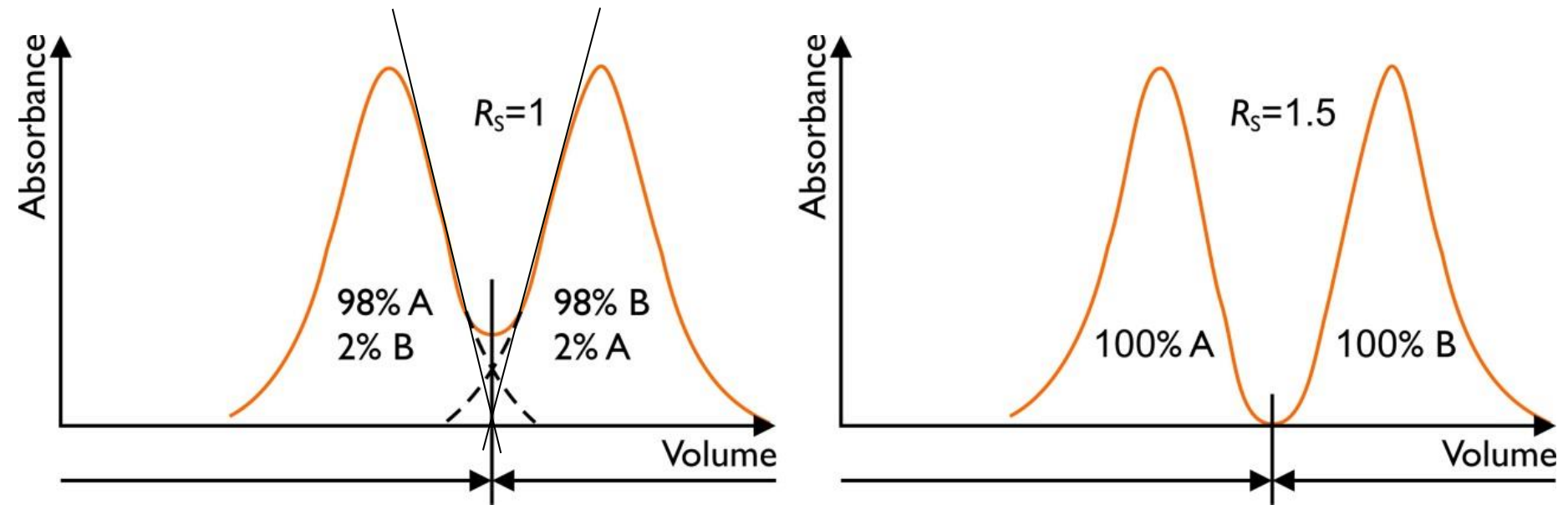
Alapvonalon mért csúcsszélességből:

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

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:

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

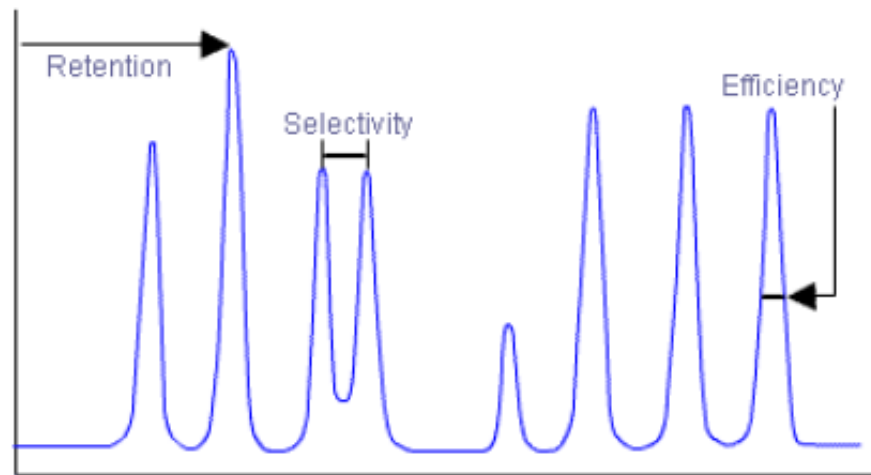
ahol:

N = elméleti tányérszám

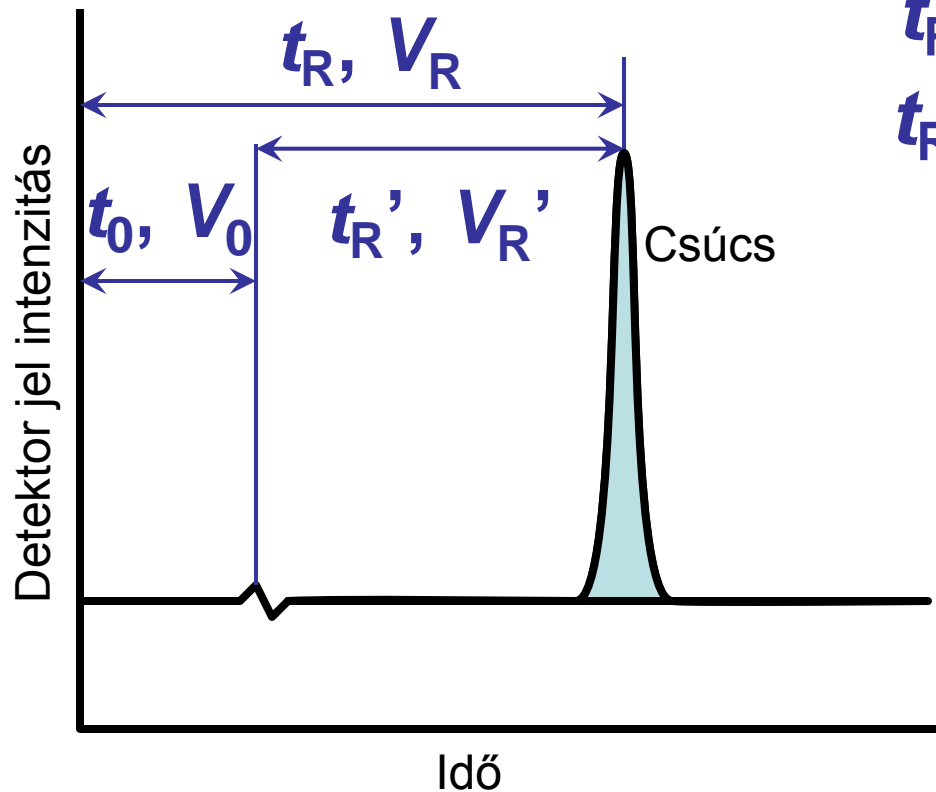
α = szelektivitási tényező

k = komponens visszatartása, retenciós tényező

hatékonyság szelektivitás visszatartás



A komponens visszatartásának jellemzése



t_0 : eluens retenciós ideje

t_R : komponens retenciós ideje

t_R' : redukált retenciós idő

$$t_R' = t_R - t_0$$

V_0 : holtterfogat

V_R : retenciós térfogat

V_R' : redukált retenciós
térfogat

$$V_R = t_R w \text{ és } V_0 = t_0 w, \text{ ahol } w \text{ a térfogat-áramlási sebesség}$$

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 befolyásolhatjuk az elválasztást a retenciós tényezővel?

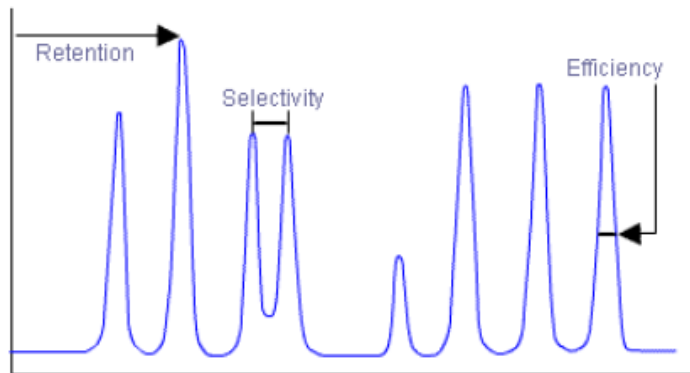
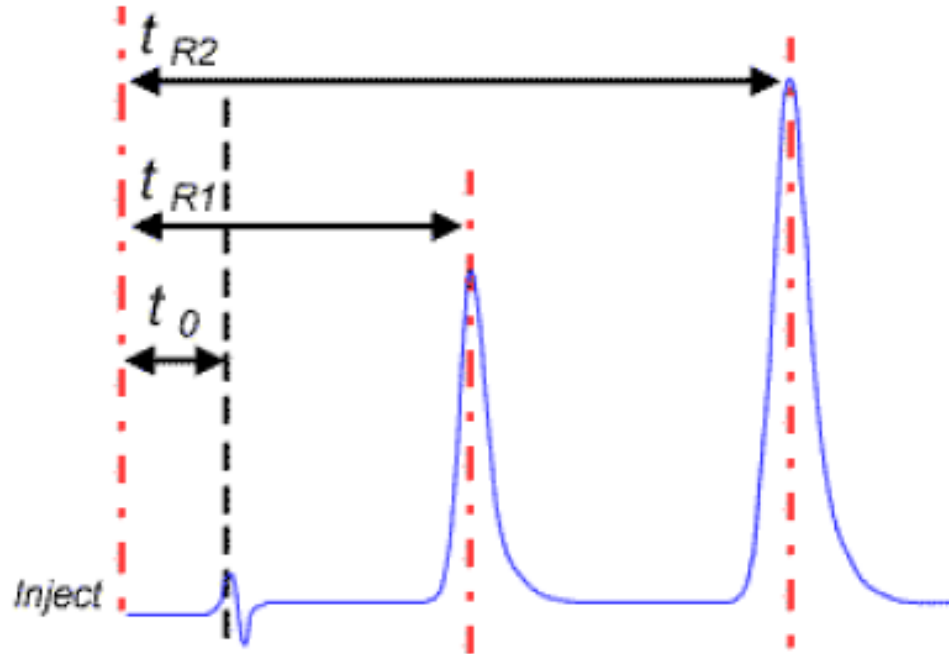
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

Retenciós tényező változtatása: eluenserősség változtatásával
pl. fordított fázisú HPLC esetén a szerves komponens arányát változtatjuk

Célszerű tartomány: $1 < k < 10$

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

Szelektivitás



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

Egymás melletti csúcsokra vonatkozik.

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Mivel tudjuk a szelektivitást befolyásolni?
mindennel, ami megoszlási hányadosokat befolyásolja:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1} \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2 \frac{V_s}{V_m}}{K_1 \frac{V_s}{V_m}} = \frac{K_2}{K_1}$$

Paraméter

Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

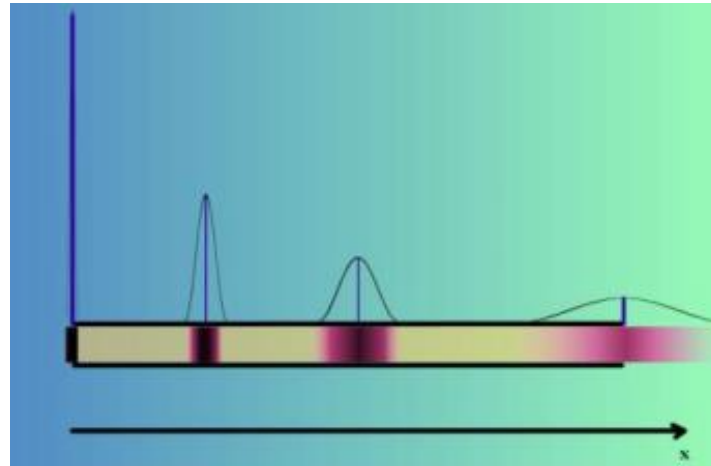
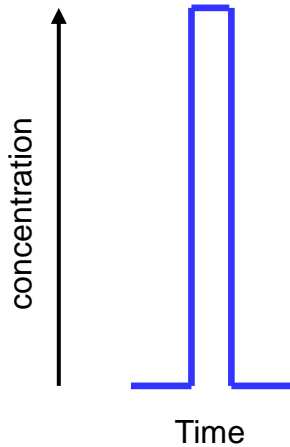
Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

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

Hatékonyság



zónaszélesedés
v.
zónadiszperzió

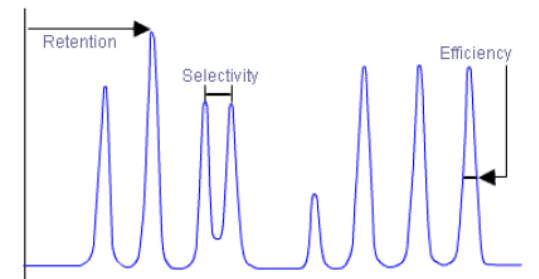
$$N = \frac{L}{H}$$

H - elméleti tányérmagasság
 N - elméleti tányérszám
 L - oszlop hossza

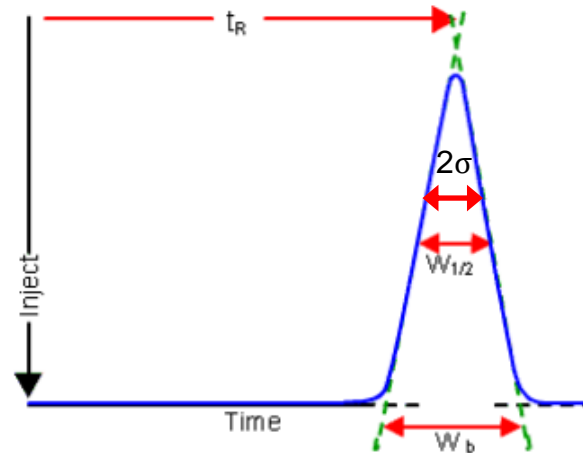
Ökölszabály: $N \approx 3000 L/d_p$,
ahol

L a kolonnahossz cm-ben,
 d_p a szemcseméret μm -ben

Pl. egy 4.6×100 mm oszlop $5 \mu\text{m}$ -es töltettel
 N 6000 (5000 és 8000 között van)



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

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

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a hatékonysággal?

A hatékonyság változtatása:

Oszlop:

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

Oszlopon kívüli tényezők:

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

Zónaszélesedés

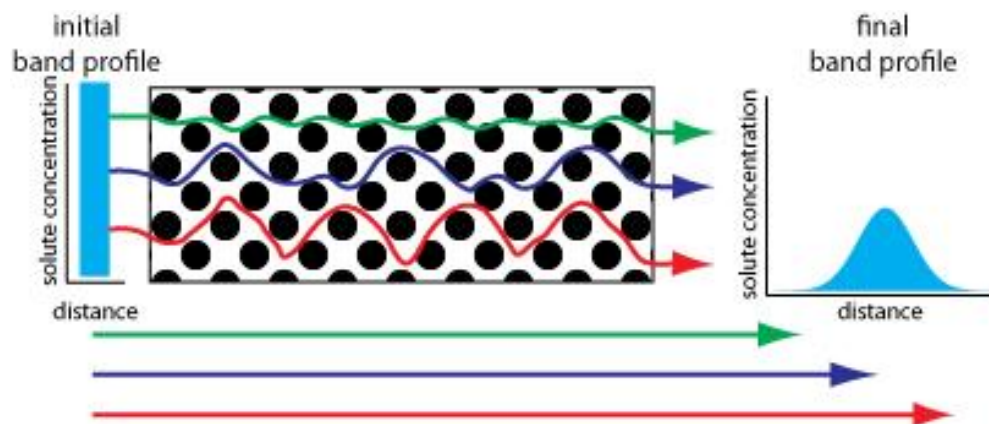
A zónaszélesedés mértéke az elméleti tényérmagasság (H)

Az elválasztás annál jobb, minél kisebb a zónaszélesedés, és minél nagyobb az elméleti tényérszám.

Mi okoz zónaszélesedést?

1. Örvénydiffúzió - A

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



CHROMacademy
e-learning for the analytical chemistry community

a service of
LC/LGC

 crawfordscientific

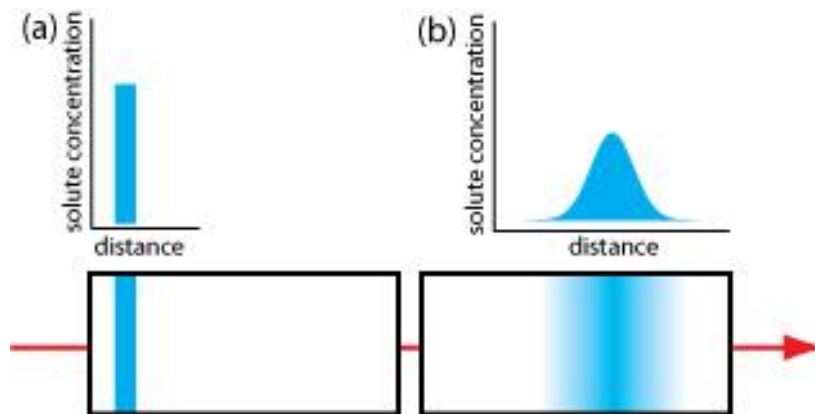
Band broadening - Eddy diffusion

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



CHROMacademy
e-learning for the analytical chemistry community

a service of
LC|GC

 crawfordscientific

Longitudinal diffusion

az áramlási sebességgel fordítottan arányos

$H \sim B/u$

Mi okoz zónaszélesedést?

3. Anyagátadási ellenállás - C

az állófázisból a mozgófázisba történő anyagátmenet nem pillanatszerű

- a szemcsék felületén álló 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



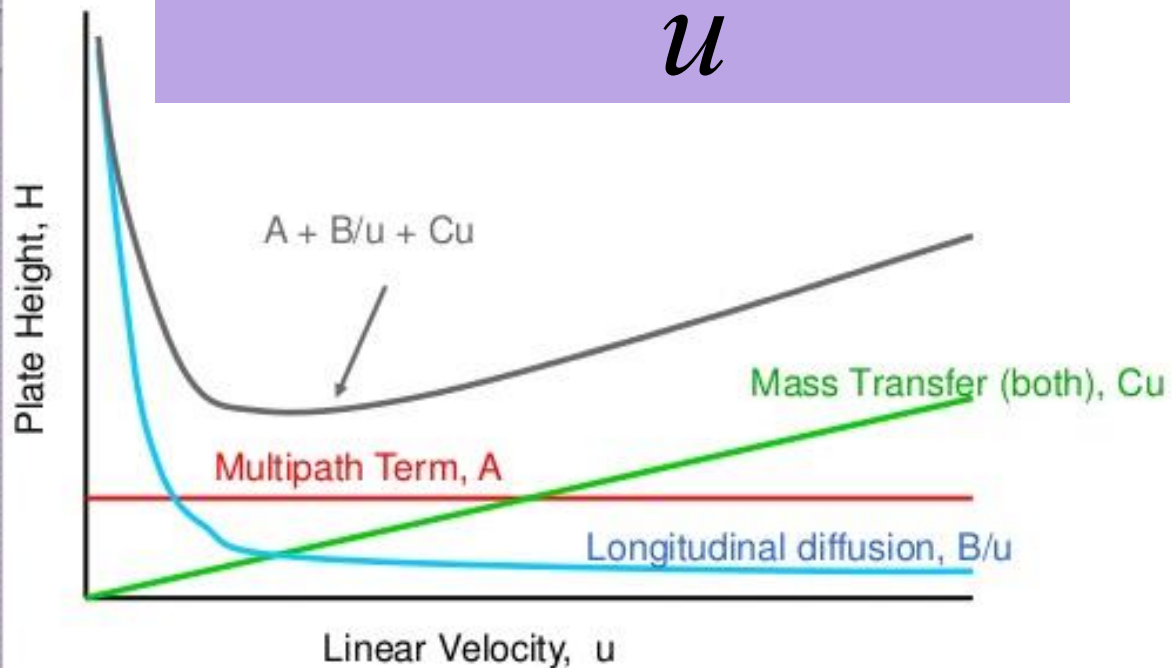
Band broadening – mass transfer

az áramlási sebességgel egyenesen arányos

$H \sim Cu$

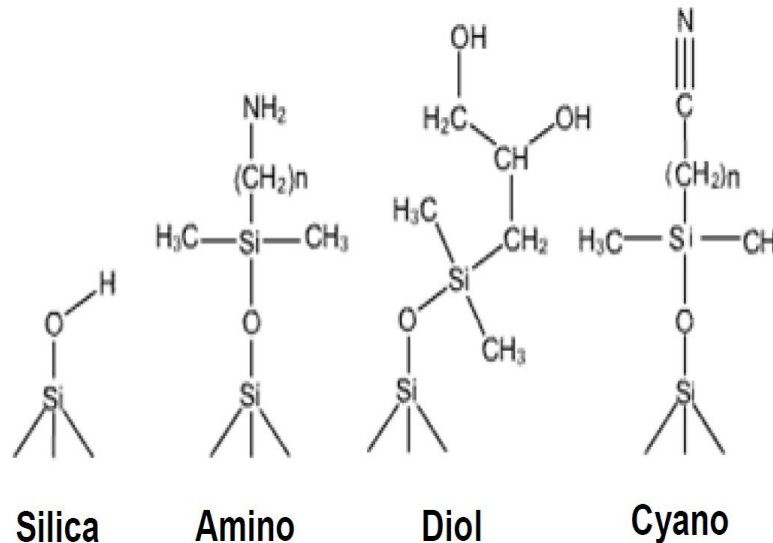
A zónaszélesedés áramlási sebesség függése - A van Deemter egyenlet

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



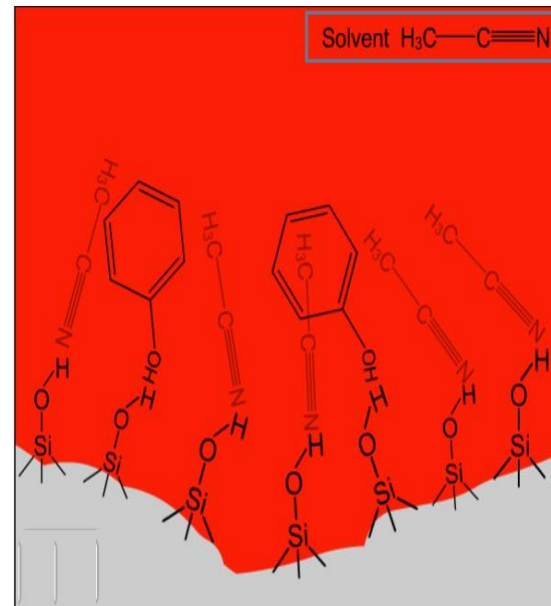
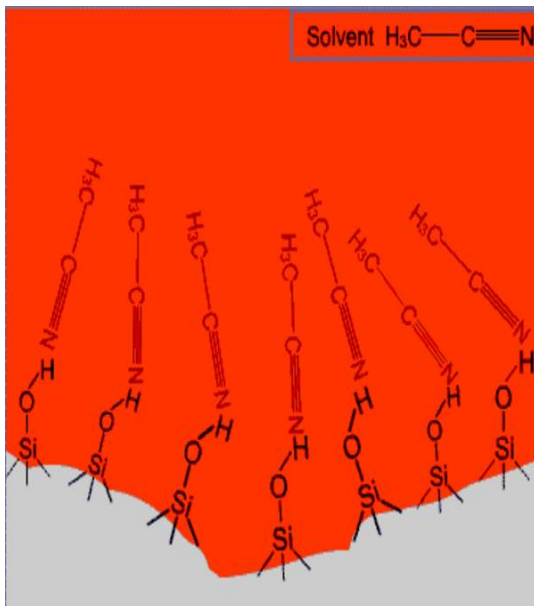
Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)

- 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



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



Mozgófázisok az NP-HPLC-ben

Alap oldószerek:

- Hexán, Heptán, Izooktán

Oldhatóságot növelő oldószerek:

- Diklórmétán, Diklóretán, Kloroform

Módosító szerek (modifikátorok):

- Éterek, Észterek, Alkoholok

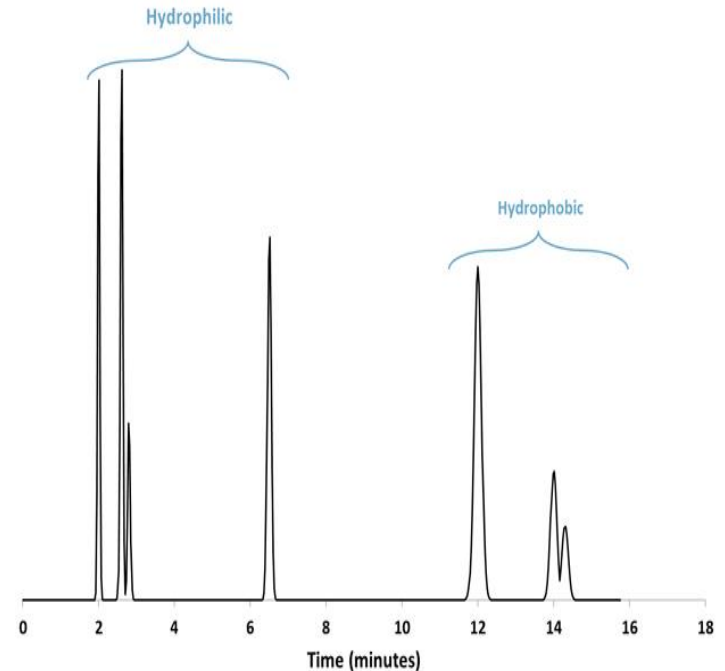
Az állófázis legaktívabb helyein kötődnek meg. Modifikátorokat akkor alkalmazunk, ha a mérendő anyag túl erős kölcsönhatásba lép az állófázissal.

Eluenserősség, polaritás

Retenció, szelektivitás

Fordított fázisú (reversed phase) kromatográfia

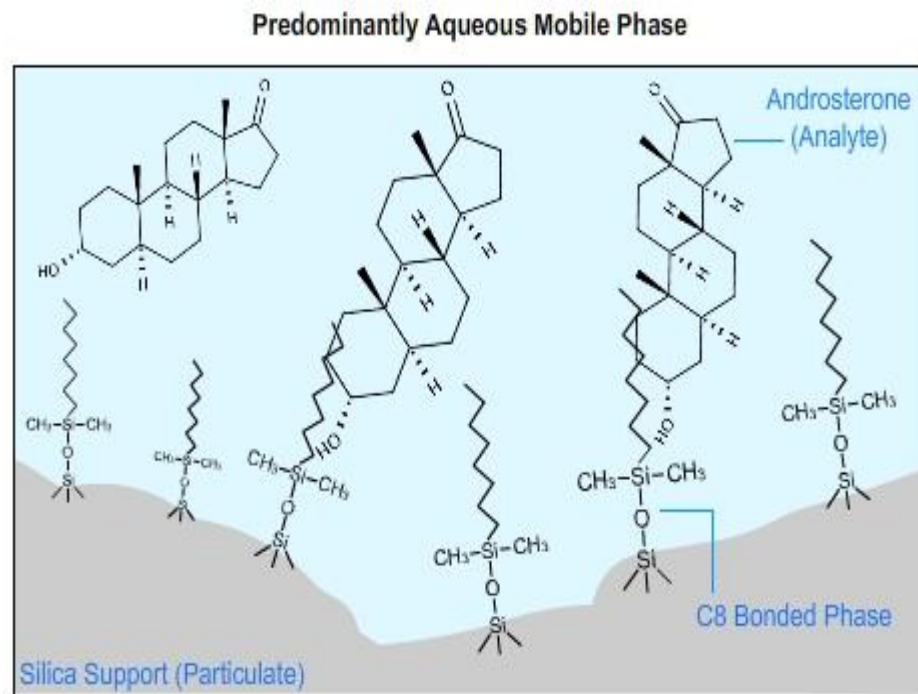
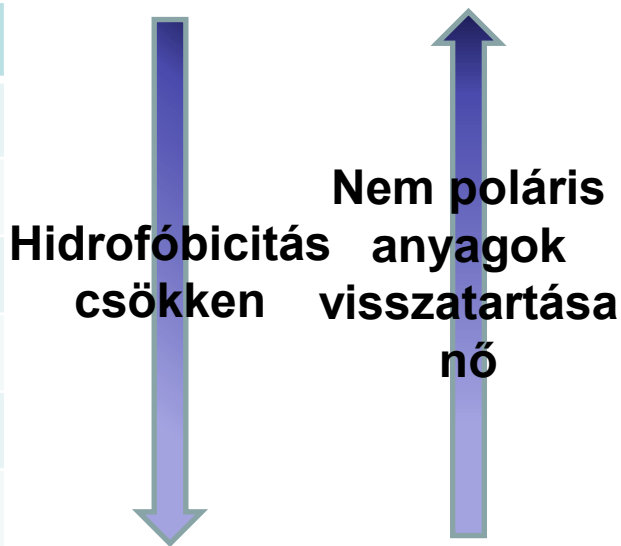
- Fordított: a korábban kidogozott „normál”-hoz képest
- A mozgó fázis *polárisabb*, mint az állófázis
- A leggyakrabban használt módszer HPLC-ben



Állófázisok a fordított fázisú kromatográfiában

- Módosított szilikagél állófázisok

Módosítás
C18
C8
C4
ciano
fenil
amino



Mozgófázisok a fordított fázisú kromatográfiában

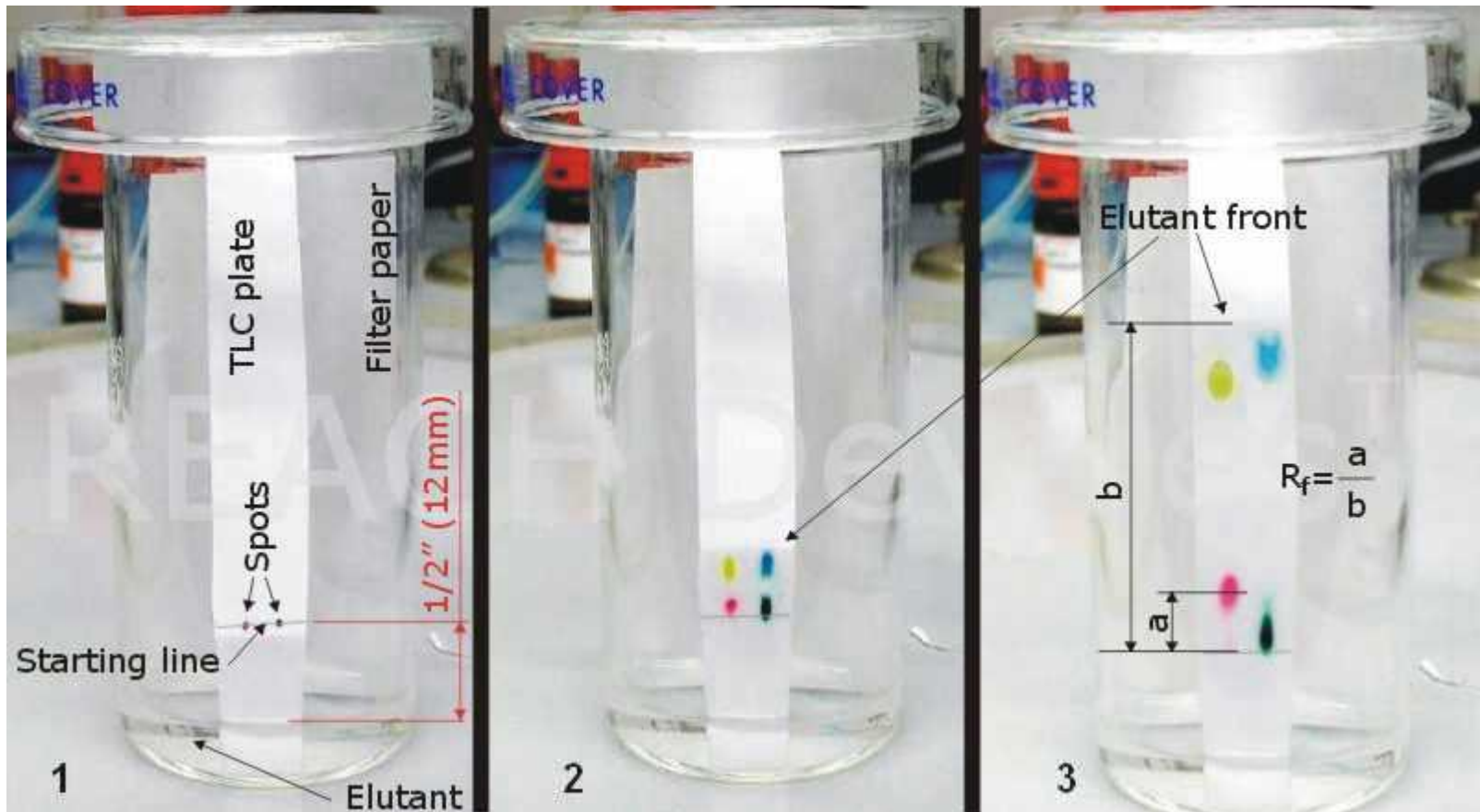
Alap oldószer a víz.

A szerves vegyületek nagy részét azonban nem oldja, ezért szükség van szerves oldószerekre:

- Etanol, 2-propanol: nagy a viszkozitásuk -> ritkán használatosak
- Dioxán: poláris, de reaktív és mérgező -> használata nem jelentős
- THF: állás közben peroxidosodik (stabilizálószerrel adnak hozzá, ez azonban rontja az UV cut-off értéket) -> csak akkor használják, ha szelektivitásnövelés érhető el vele
- **Leggyakrabban tehát acetonitrilt és metanolt használnak, ezek kis viszkozitása, megfelelő tisztasága miatt**

Vékonyréteg kromatográfia-VRK

Thin-layer chromatography-TLC



Vékonyréteg kromatográfia

Hordozó

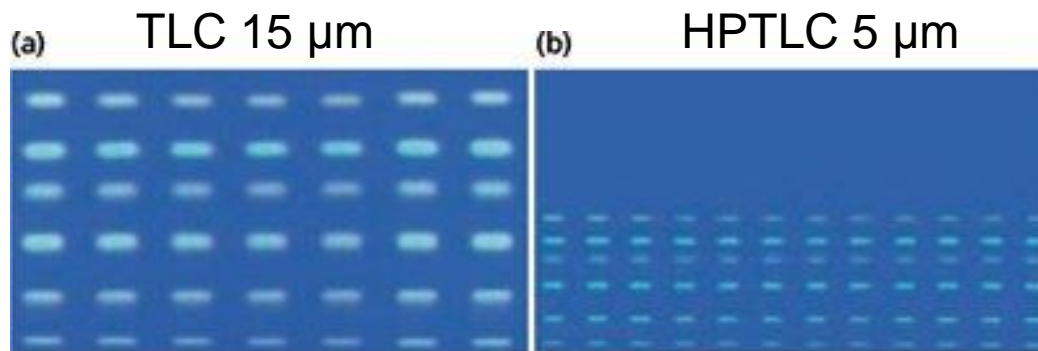
alumínium lemez, üveglap, műanyag

Állófázisok

Rétegvastagság

analitikai: 100; 200; 250 μm , preparatív: 0,5-2 mm

Szemcseméret



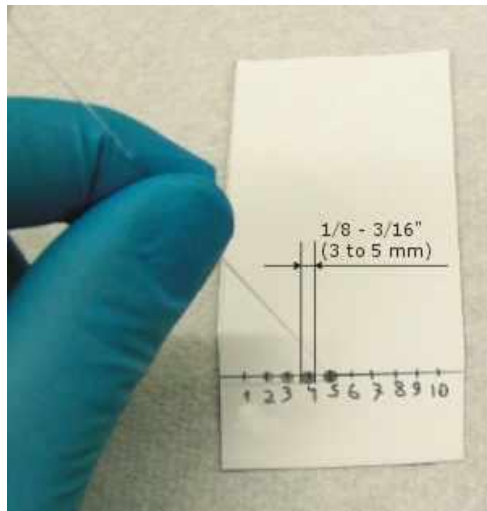
(a) TLC szilikagél 60 (b) HPTLC szilikagél 60. Mintatérfogat: TLC, 4 μL ; HPTLC, 0.3 μL ; eluens: etilacetát–metanol–propionsav (22:10:3,v/v/v); futási távolság: TLC, 10 cm; HPTLC, 5 cm; analízis idő: TLC, 42 min; HPTLC, 13 min, 45 s; detektálás: UV 366 nm.

Állófázisok

Állófázis	Elválasztási mód	
Szilikagél	normál	
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




Manuális mintafelvétel

kapillárisal (0,7-1 mm Ø) minőségi elemzéshez
Hamilton fecskendővel mennyiségi elemzéshez

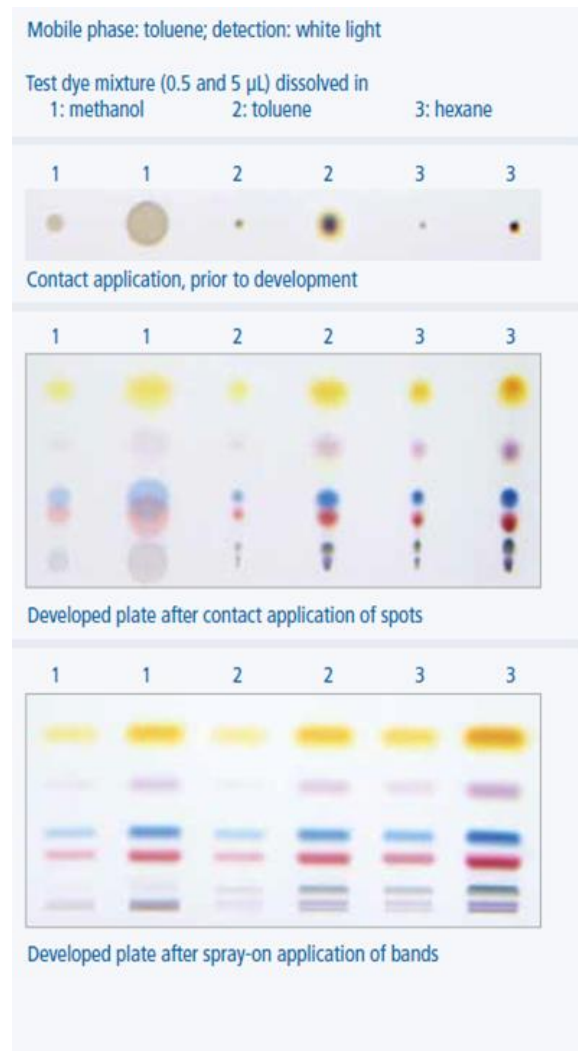
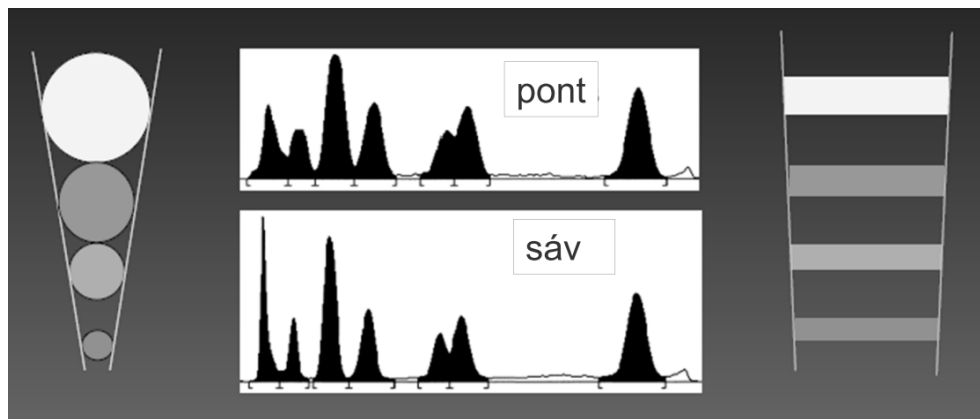


Illékony oldószerben oldott minta
Koncentráció: 0,5-5 v/v%
Felvitt mintamennyiség: 2 µg- 1 mg

Koncentráló zónás VRK lemezek

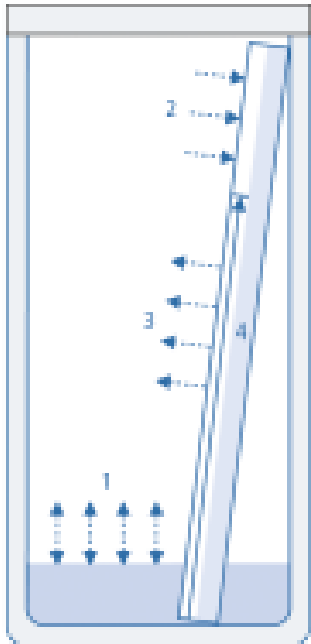
A. Sample Application	B. Concentration	C. Separation
		

Automatikus mintafelvétel



Futtatás

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



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

Az elpárolgott mozgófázis gőzeinek adszorpciója a rétegre (2).

Lepárolgás a rétegről (3).

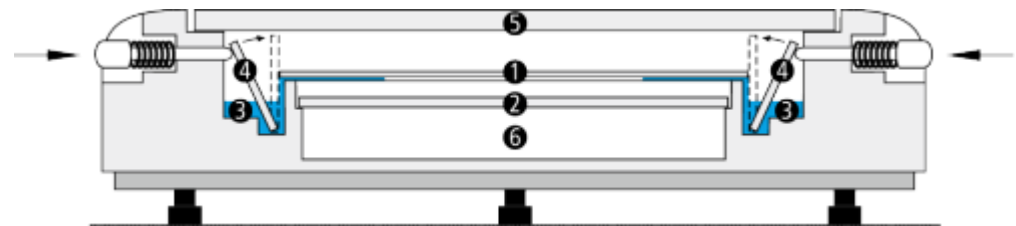
Mozgófázis komponenseinek megoszlása az állófázison (4). (Másodlagos frontok)

Felsőálló kifejlesztés

Szűrőpapír

Várakozás egyensúly beállításra

VRK lap prekondicionálása

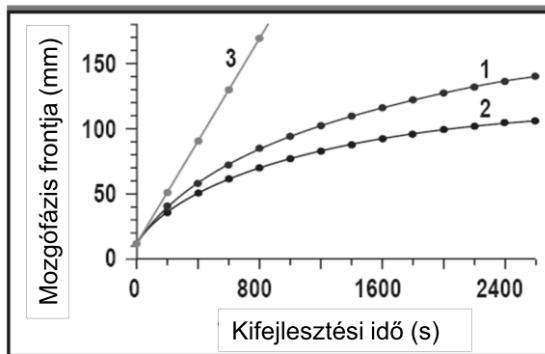


Horizontális kifejlesztés

Túlnyomásos rétegekromatográfia

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 kifejlesztési 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, 366 nm VRK lap fluoreszcens indikátorral (ZnSiO_3 ; fluoreszcein)
366 nm-en fluoreszkáló	UV lámpa $\lambda=366$ nm
Kb. 50%, alkánok, redukáló vegyületek	I_2 kamra
univerzális	foszfomolibdénsav
univerzális	KMnO_4
univerzális	H_2SO_4
univerzális	cérium (IV)
fenolok	Fe(III)klorid
aminosavak	ninhidrin
aldehidek, ketonok	2,4-dinitrofenilhidrazin

Kvalitatív VRK

Minőségi azonosítás a retenciós faktor alapján – önmagában nem elég

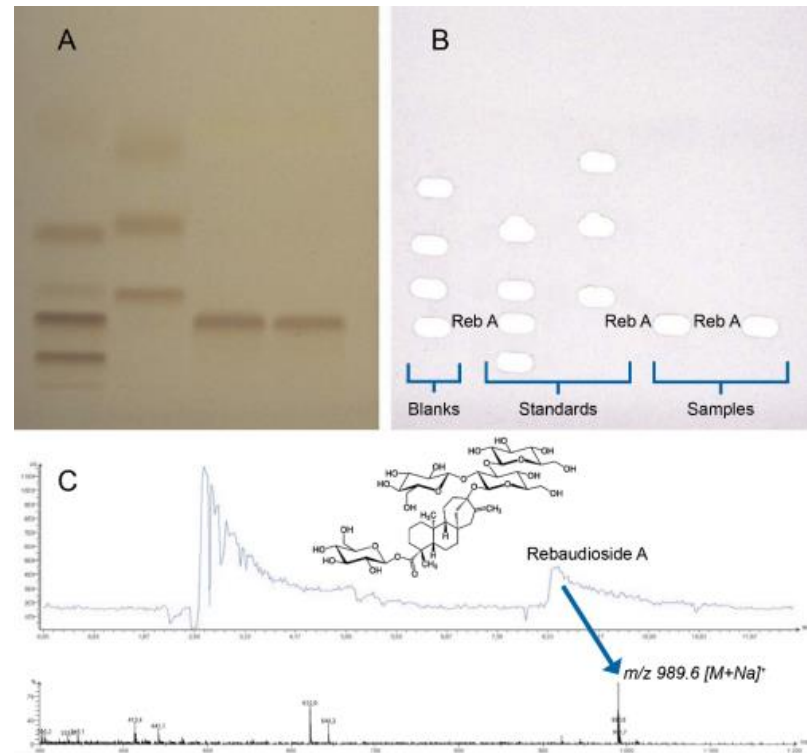


Standard anyag felcseppentése

Futtatás más mozgó-, vagy állófázissal

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

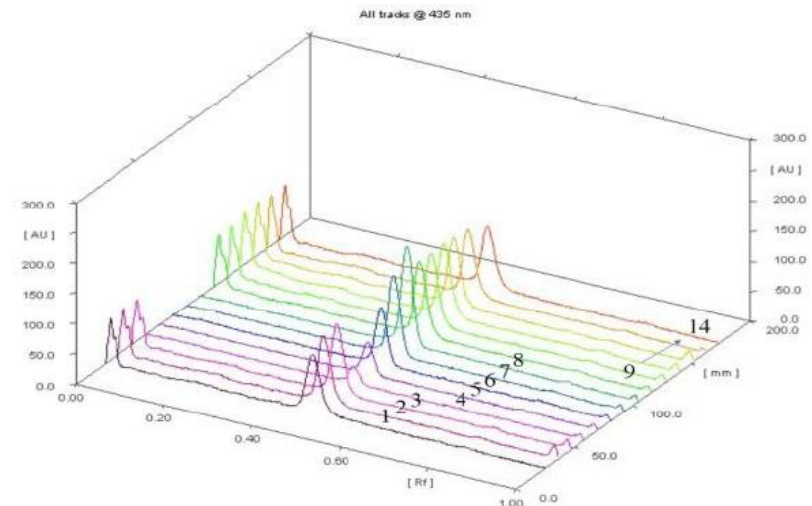
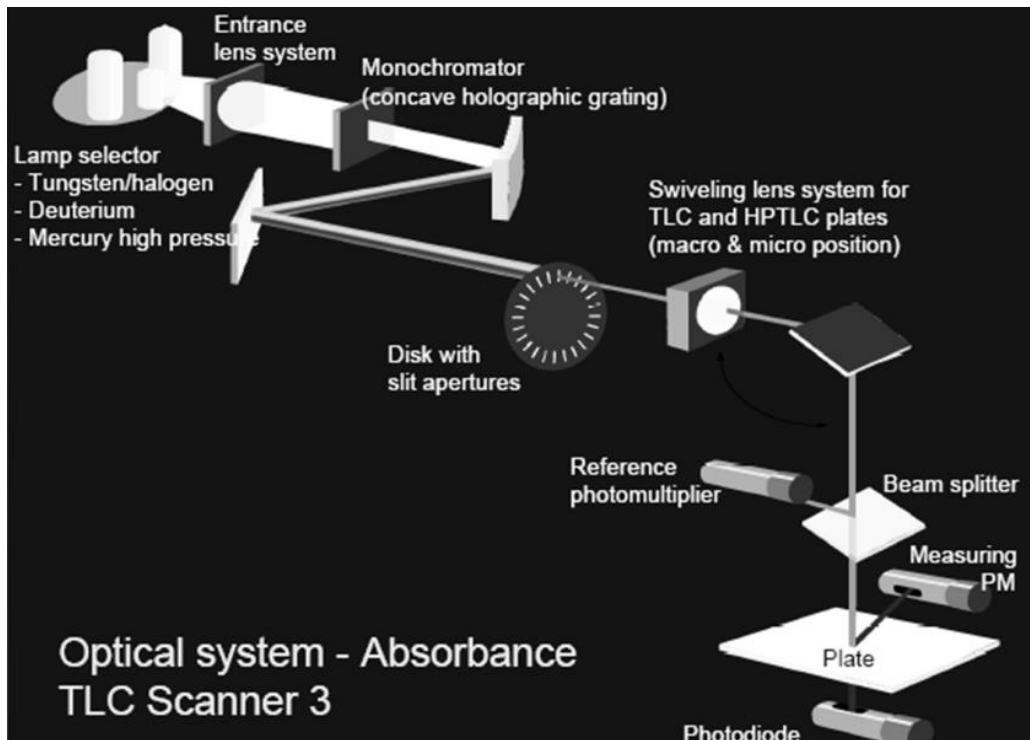
VRK-MS kapszolat



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 kifejlesztése főleg a gyors kromatográfiás HPLC módszerekhez képest

komplementer módszerek

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

	Elméleti tányérszám	Elméleti tányérmagasság
VRK	2000	12 μm
HPLC	15000	0.1-0.2 μm

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