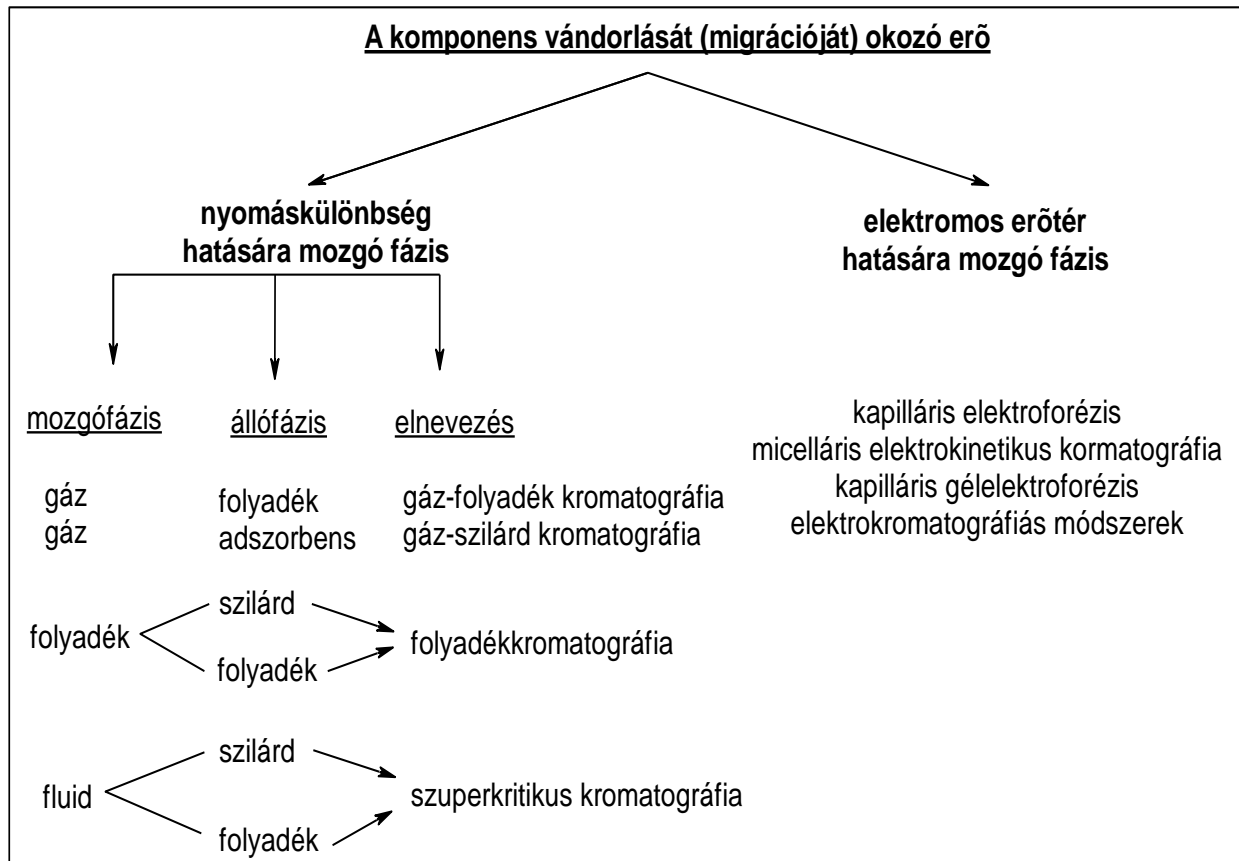


UHPSFC és CE

Folyadékkromatográfia

Folyadékkromatográfia helye az elválasztástechnikai módszerek között



- SFC újra „feltalált”
- CE „feledjem vagy ne feledjem”
- „imádjam vagy elutasítsam”
- VRK milyen új szerepet tölthet be

Általános elvek

Elválasztás feltétele:

- A vizsgált anyagnak a mozgófázissal azonos állapotba kell kerülnie
- Szerkezeti állandóság
- Detektor megszabta koncentráció

...and the first recorded use of ion-exchange is from the Old Testament of the Holy Bible in the book of Exodus, Chapter 15, verses 22–25, which describes Moses leading the children of Israel from bondage into the wilderness.

1.1. From Moses . . .

The first recorded use of ion-exchange is from the Old Testament of the Holy Bible in the book of Exodus, Chapter 15, verses 22–25, which describes Moses leading the children of Israel from bondage into the wilderness.

22: So Moses brought Israel from the Red sea, and they went out into the wilderness of Shur; and

they went three days in the wilderness, and found no water.

23: And when they came to Marah, they could not drink of the waters of Marah, for they were bitter: therefore the name of it was called Marah.

24: And the people murmured against Moses, saying, What shall we drink?

25: And he cried unto the LORD; and the LORD shewed him a tree, which when he had cast into the waters, the waters were made sweet.

Tswett's original work. This year also marks the 151st anniversary of J. Thomas Way's lecture to the Royal Agricultural Society where the principles of ion-exchange were first enunciated [3]. Again, one would find it incredulous that Way's study "*On the Power of Soils to Absorb Manure*" was the forerunner of modern ion chromatography.

lacking. In *Problematica* (Book 23 Part 20), Aristotle suggested that desalination resulted from density effects:

... water which flows readily can percolate through the earth; and if water can percolate, the thickest and heaviest part of it is always carried to the bottom, while the light and clean element becomes separated. For salt water is heavy and fresh water is light. And so flowing water is fresh. It is for the same reason that salt water, when it is set in motion and undergoes change, becomes fresher; for it becomes lighter and weaker owing to motion.

The versatility of these resins was soon recognized by many academic and industrial chemists, leading to the rapid development of a wide variety of new and unique applications of ion-exchange. However, it was within the Manhattan Project that these synthetic ion-exchangers made their greatest impact [13]. In particular, the analysis of reactor fission products was essential to plutonium production. Among the

Fogalmak

Reneszánsz:

- eredet [*reneszánsz*
 - < francia: *renaissance* (újjászületés)
 - < latin: *renascor* (újjászületik, újra kezdődik)
 - < *re-* (újra) + *nascor* (születik, kezdődik)]

SFC helye és szerepe az elválasztástechnikai módszerek között

Amit biztosítani kell

- **Retenció állandóság**
- **Csúcsszélesség állandósága**

Alapötlet, ami népszerűvé tette a technikát

GC:

Előnyök

- univerzális nagy érzékenyséű detektor:FID
- Nagy kinetikai hatékonyság

Hátrányok:

- Hőérzékeny vegyületek nem vizsgálhatók
- Nagy molekulatömegű anyagok szintén nem vizsgálhatók

LC:

Előnyök

- **Nagy molekulatömegű anyagok vizsgálhatók**
- **Hőérzékeny anyagok vizsgálhatók**

Hátrányok

- **Nincs általános, nagy érzékenyséű detektor**
- **Kisebb a kinetikai haékonyság**

Megoldások:

- **Legyen CGC és FID**
- **Legyen LC és FID-en kívüli egyéb detektor**

Miben tud elvileg többet az SFC az analitikai gyakorlatban:

- **Mozgófázis viszkozitása a gáz és folyadék között van.**

Miben tud elvileg többet az SFC a preparatív gyakorlatban

- **Könnyű a minta kinyerése**

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

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

- ϕ kolonna áramlási ellenállása
- η mozgófázis viszkozitása
- L kolonna hossza
- d_p töltet átlagos szemcseátmérője

Evaluation of Waters UPC² system and UPC²/MS for pharmaceutical applications

Davy GUILLARME

SFC in theory and in practice

SFC in theory:

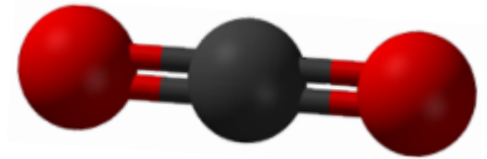


- Excellent **kinetic performance** (low mobile phase viscosity)
- **Green** technology (CO₂ is non toxic, cheap and easy to purchase)
- Can operate with both NPLC and RPLC phases
- Chiral/achiral + analytical/semi-preparative separation on one unique system

SFC in practice:



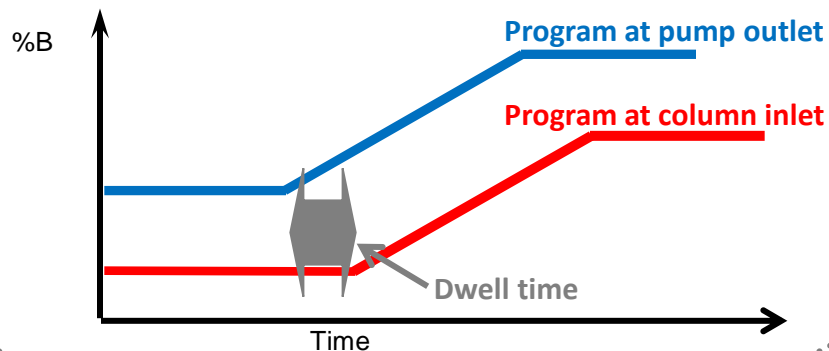
- Limited **sensitivity** compared to HPLC
- Poor **robustness** and **reliability** of SFC instruments
- SFC systems are not adapted to the analytical scale
- Too much choice of column chemistries (no universal support like the C18)
- Old-fashion SFC is not competitive with state-of-the-art LC (core-shell, UHPLC)
- Important carry-over from SFC injectors
- **Poor quantitative** performance (precision and accuracy)



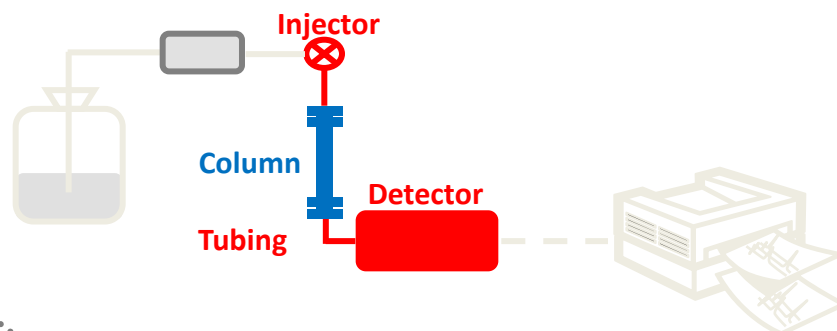
Need a new generation of instruments and columns




A new generation of SFC system : UPC²

DWELL VOLUME : V_D

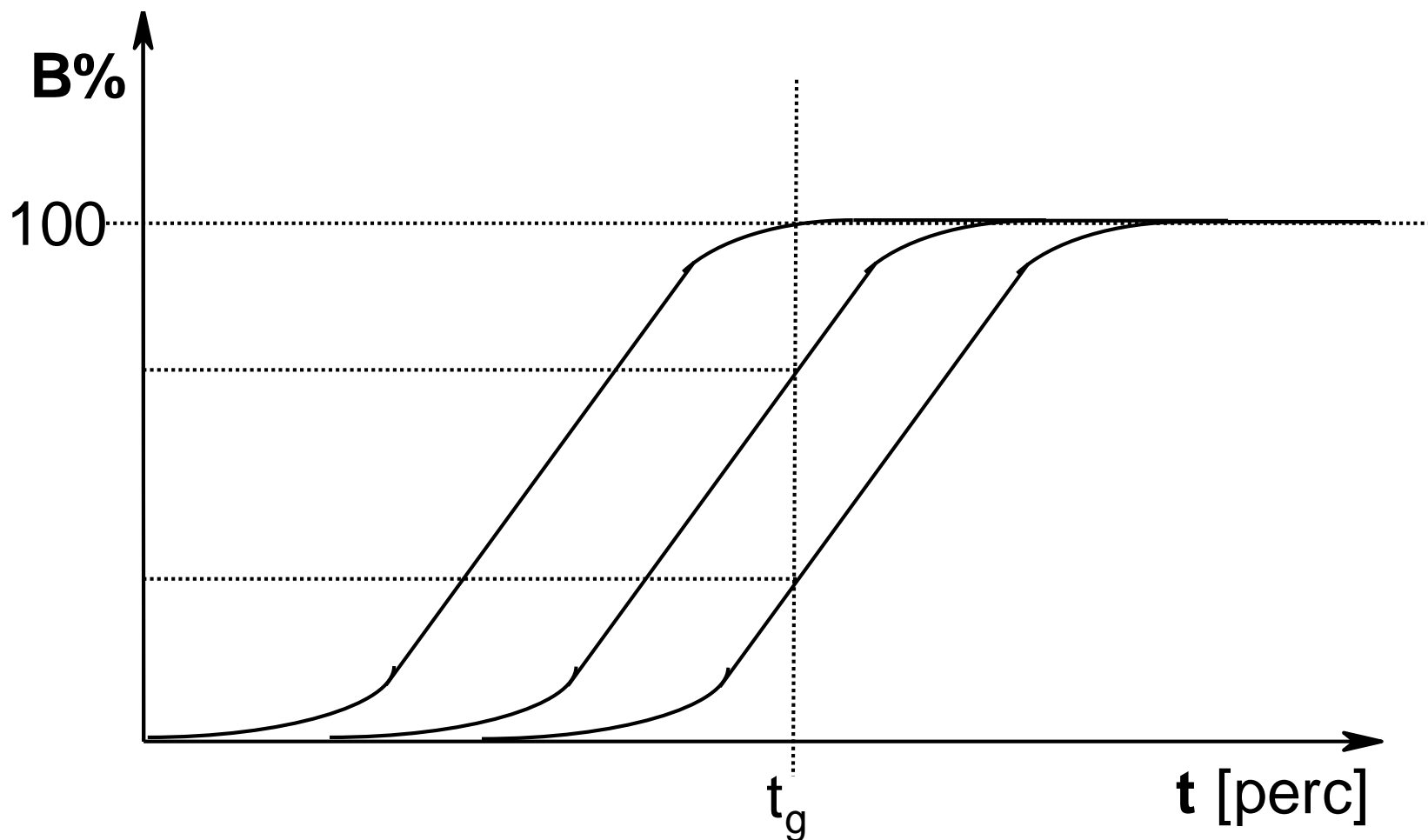


EXTRA-COLUMN VOLUME : V_{ext}

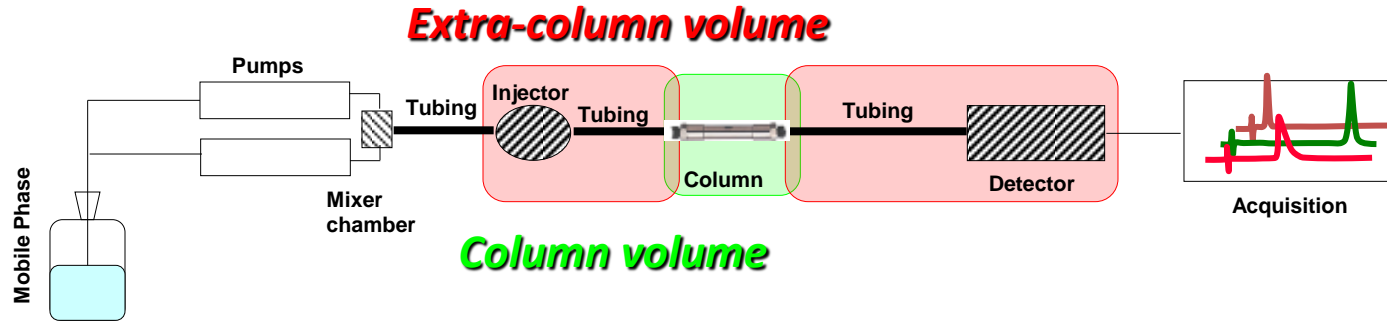


	 SFC	 UHPLC	 UPC²
Dwell volume (V_D)	2270 μL	90 μL	440 μL
Isocratic step for generic conditions	68 sec <i>(F = 2.0 mL/min)</i>	15 sec <i>(F = 0.36 mL/min)</i>	12 sec <i>(F = 2.4 mL/min)</i>
Extra column volume (V_{ext})	118 μL	13 μL	60 μL
Suitable column dimensions	150 x 4.6 mm <i>(volume ~ 1750 μL)</i>	50 x 2.1 mm <i>(volume ~ 120 μL)</i>	To be assessed

A kolonna végén elért B%, amennyiben eltérő késleltetési térfogatú (dwell volume) keverővel ellátott gradiens készülékkel dolgozunk.
Nagy térfogatú késleltetési térfogattal NINCS GYORS LC vagy USFC



Extra-column variance and band broadening



$\sim 85 \mu\text{L}^2$

$$\sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2 = \sigma_{total}^2$$

$$\sigma_{col}^2 = \frac{V_r^2}{N_{col}} = \frac{(V_0 \times (1+k))^2}{N_{col}}$$

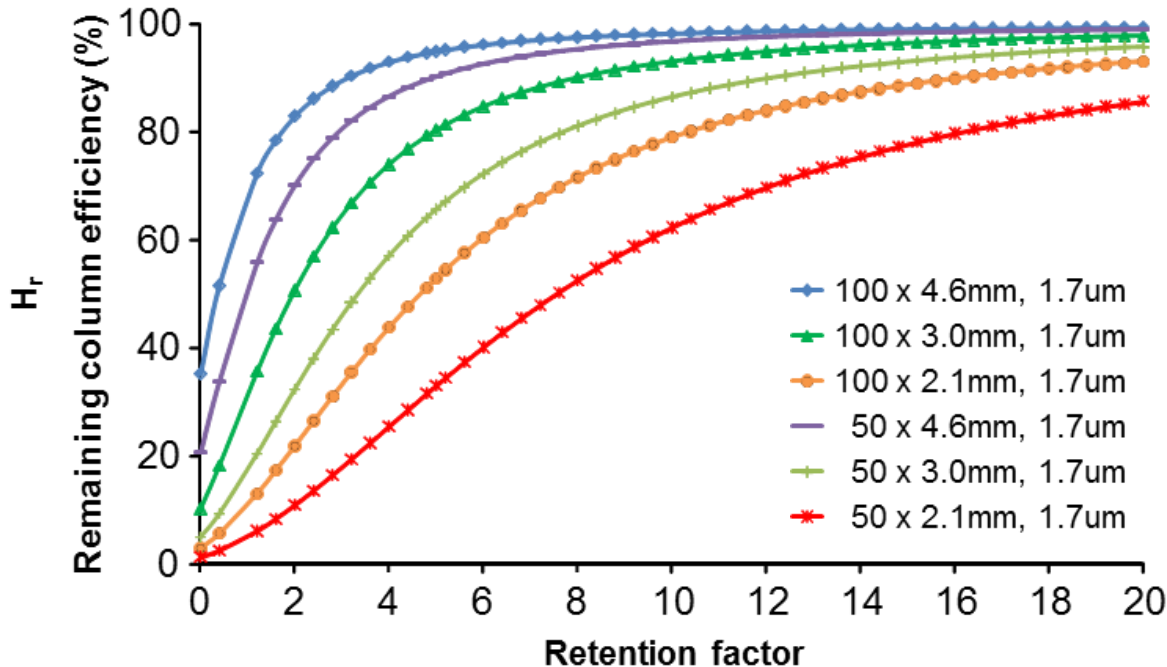
$$\sigma_{ext}^2 = K_{inj} \frac{V_{inj}^2}{12} + K_{cell} \frac{V_{cell}^2}{12} + \tau^2 F^2 + \frac{r_c^4 \times l_c \times F}{7.6 \times D_m}$$

Injector
Detector
Tubing

Column variance and band broadening

$$\sigma_{col}^2 = (1+k)^2 \times \frac{V_0^2}{N_{col}}$$

Column V_0	2.1 mm	3 mm	4.6 mm
50 mm	113 μL	230 μL	540 μL
100 mm	225 μL	459 μL	1080 μL



Fixed $\sigma_{ext}^2 : 85 \mu\text{L}^2$

$$H_r = 100 \times \frac{\sigma_{col}^2}{\sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2}$$



Narrow bore columns should be avoided in UPC²
Columns of 100 x 3 mm I.D are ideal

Kinetic performance with modern SFC I

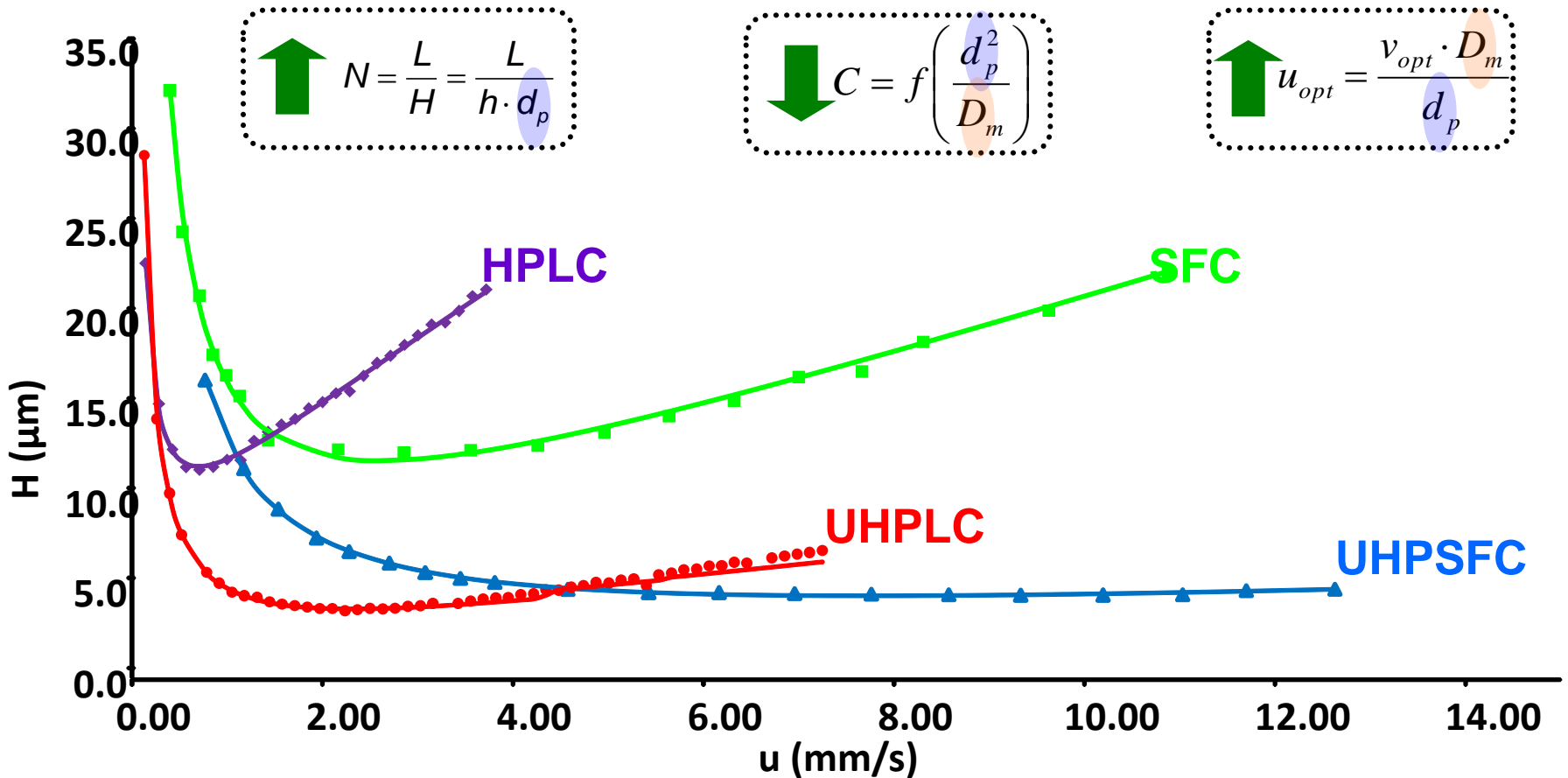
Injection of 50 ppm of butylparaben (dissolved in water and heptane for LC and SFC systems, respectively). Isocratic compositions were set at 40% of ACN in water for LC systems and 5% and 4% MeOH in CO₂ for SFC systems, respectively. T= 40°C, BPR = 150 bar.

SFC: Viridis 2EP - 4.6 x 150mm, 5µm

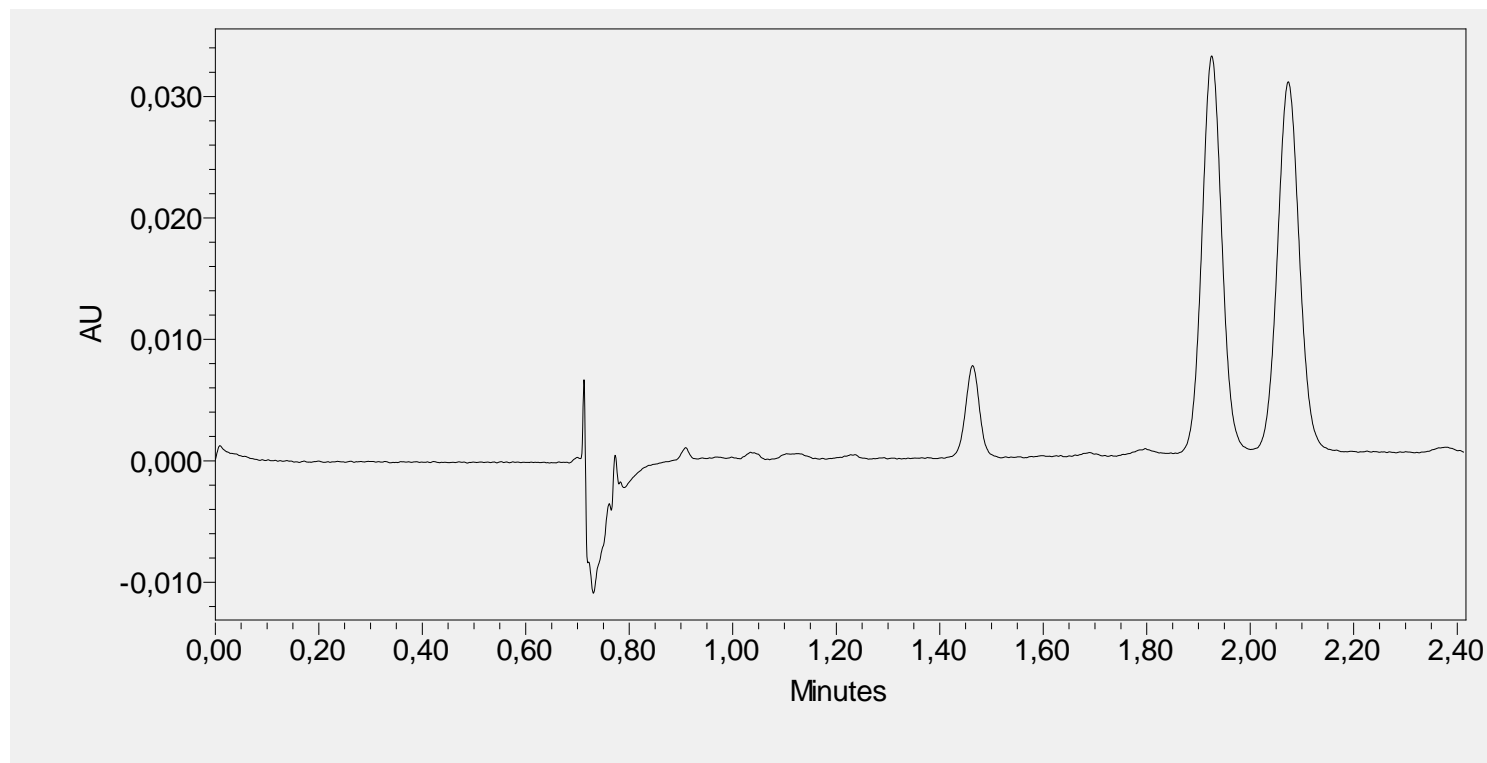
HPLC: RP18 XTERRA - 4.6 x 150mm, 5µm

UHPSFC: UPC² BEH 2EP - 3.0 x 100mm, 1.7µm

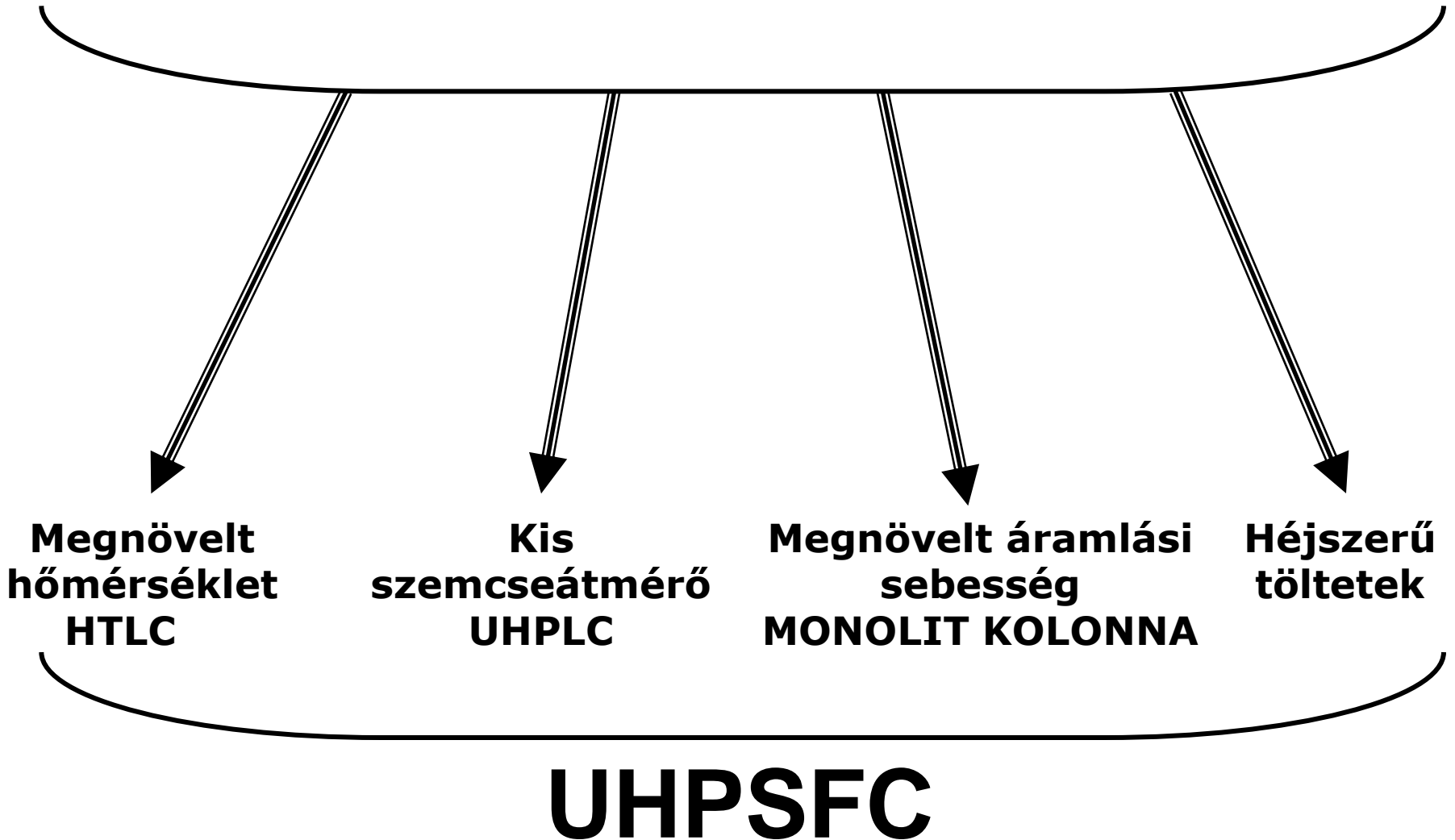
UHPLC: Acquity BEH Shield RP18 - 2.1 x 50mm, 1.7µm



Lux 4, 4ml/min, 10% IPA, 35 °C, 1. csúcs: furturil alkohol (ISTD), második csúcs: s-sotolon, 3. csúcs: r-sotolon.



Gyors kromatográfiás módszerek



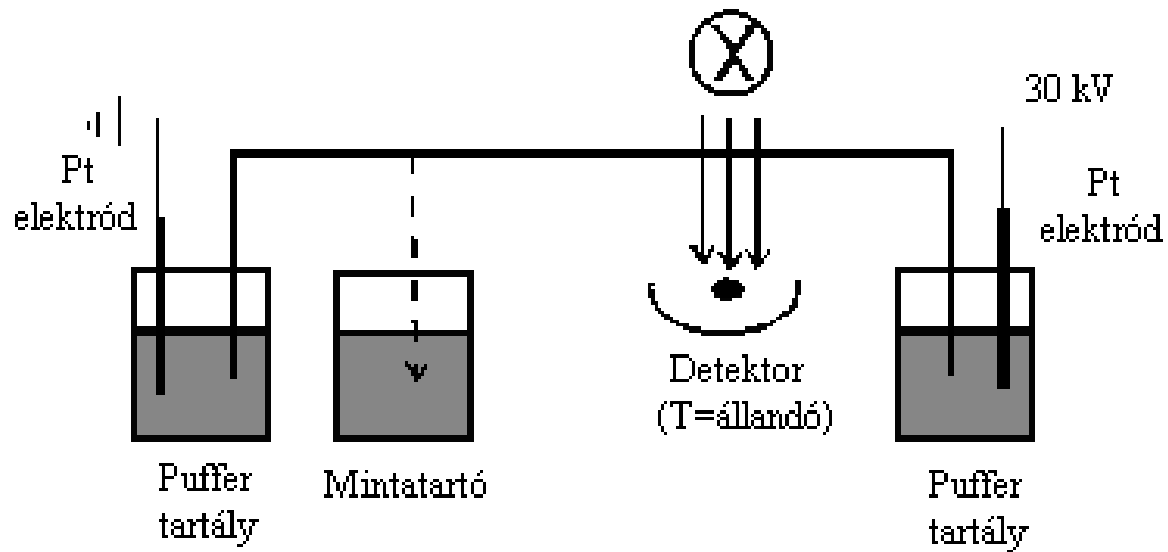
- Félpreparatív elválasztás lehetősége.

- Konklúzió:
- UHPSFC kielégíti az UHPLC követelményeket!
- UPLC2 UHPLC kategóriás készülék.
- Jövő????
- Válasz: attól függ, hogy a gyógyszeripar elfogadja-e rutin módszernek!

Kapilláris zóna elektroforezis(CZE,CE)

- 1937 Arne Tiselius Nobel díj
- 1981,1983 Jorgenson és Lukacs CE
- Electrophoresis

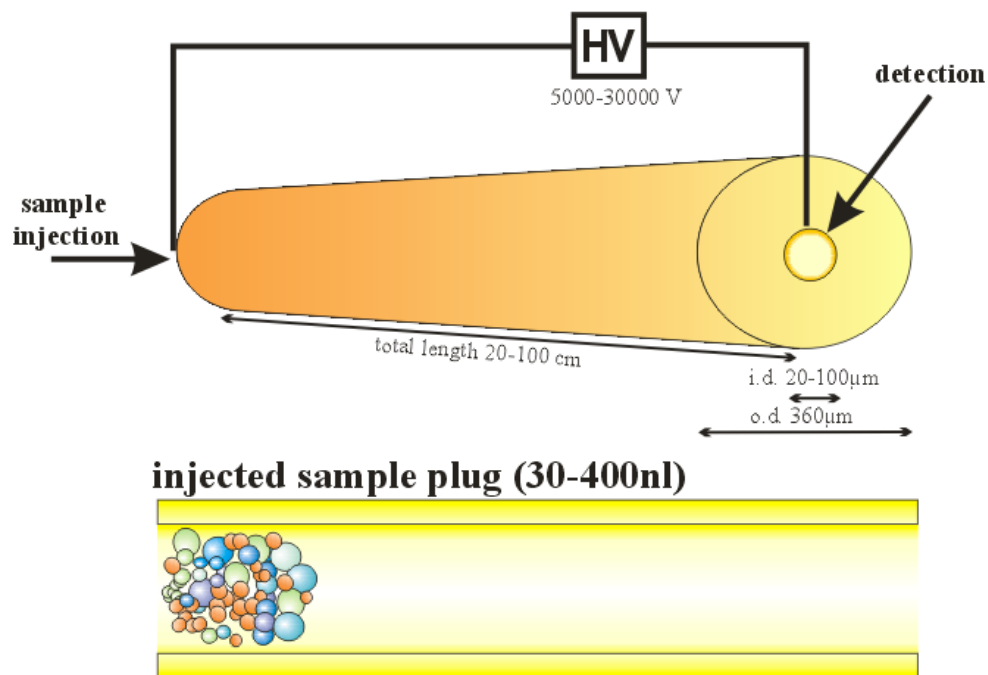
Alapfelépítés





Capillary Electrophoresis

Instrumental setup



Capillary length: 20 cm to 100 cm
coated uncoated capillary
Capillary i.d.: 50 µm to 75 µm
Hydrodynamic injection
Applied voltage: -30 to 30 kV
pH range: 2 to 12
Aqueous, non aqueous

Detection:

- **Optical:** direct, indirect UV-Vis, laser induced fluorescence (LIF), Chemoluminescence
- **Electrochemical:** potentiometric, conductivity, amperometric,
- **Mass selective** with APCI, ESI, CI
- **Radioactivity** (β)



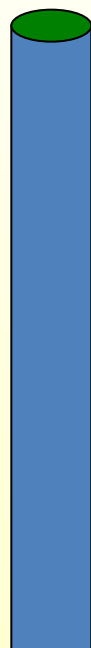
Keep in mind ... small !



CE

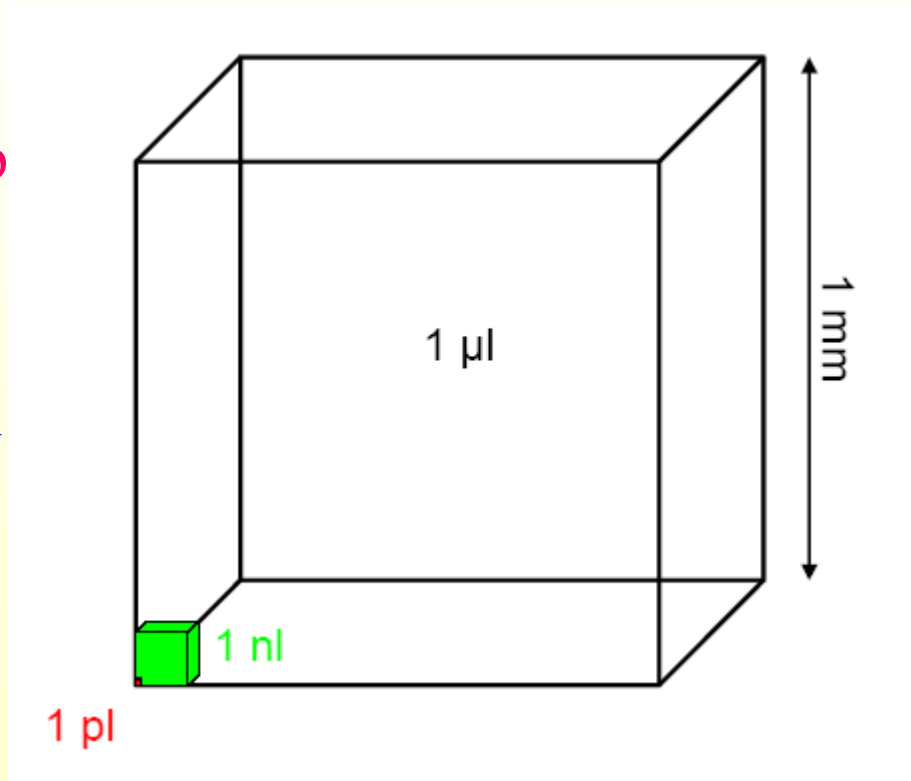
50 μm i.d.

50 cm L



6.5 nl samp
(3.3 mm)

20 cm/min
6.5 nl/sec



Total volume
980 nl

$$V_{inj} = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L} \cdot 10^3 \quad (1)$$

were ΔP is the difference in pressure across the capillary (in Pa), d is the capillary inner diameter, t is the time of pressure application, η is the viscosity, and L is the capillary length.

Table 1. Effect of column length on the total volume, injected volume, and corresponding injected amounts of sample

Column length (cm)	Total volume 50 μm ID (μL)	Volume injected (nL)	Total volume 75 μm ID (μL)	Volume injected (μL)	Total volume 100 μm ID (μL)	Volume injected (nL)
40	0.8	16.6	1.7	84	3.1	264
50	1.0	13.2	2.2	67	3.9	211
60	1.2	11.0	2.6	56	4.7	176
70	1.4	9.5	3.1	48	5.4	151
80	1.6	8.3	3.5	42	6.3	132
90	1.8	7.3	3.9	37	7.1	117
Column length (cm)	50 μm ID (fmol)	(pg)	75 μm ID (fmol)	(pg)	100 μm ID (fmol)	(pg)
40	55	16.6	280	84	883	264
50	44	13.2	224	67	706	211
60	37	11.0	186	56	589	176
70	32	9.5	159	48	504	151
80	28	8.3	140	42	441	132
90	25	7.3	124	37	392	117

Assuming 10 s/0.5 psi hydrodynamic injection of a 300 g/mol sample 1 ppm in water

- Mozgás a csőben:
- Elektroforetikus hatás
- $u_p = \mu_p E$
- ahol: μ_p az elektroforetikus mozgékonyság
- E =elektromos térerő

- $\mu_p = z/r \times 1/\eta \times 1/6\pi$

- ahol: z =töltésszám

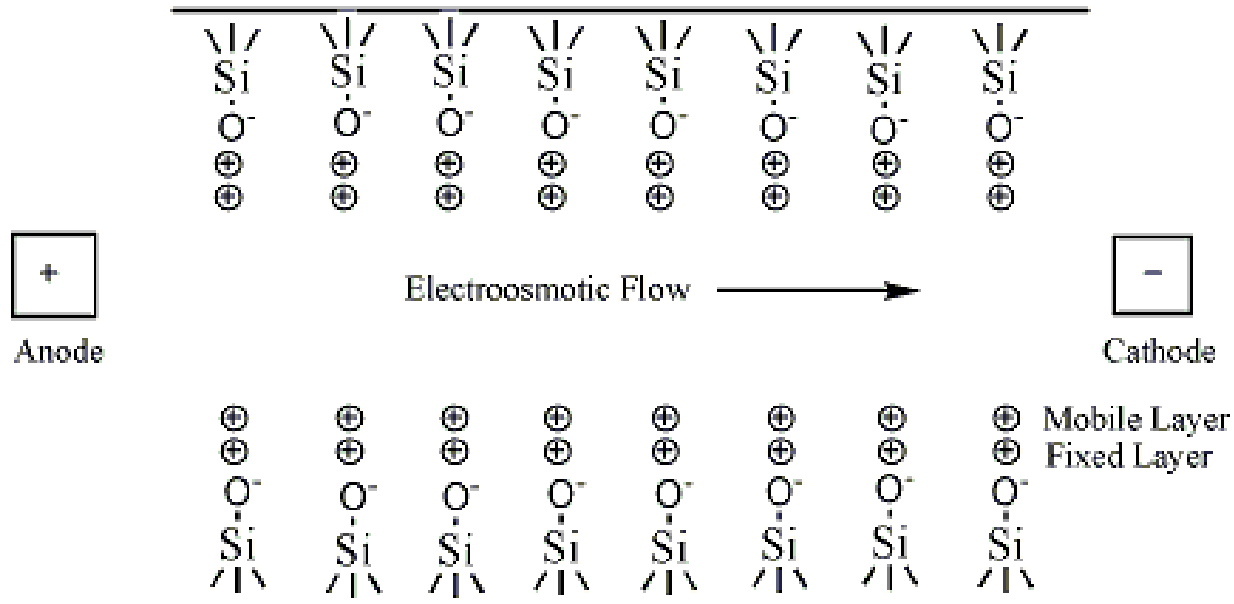
- r =az ion hidrodinamikus sugara

- η =a közeg viszkozitása

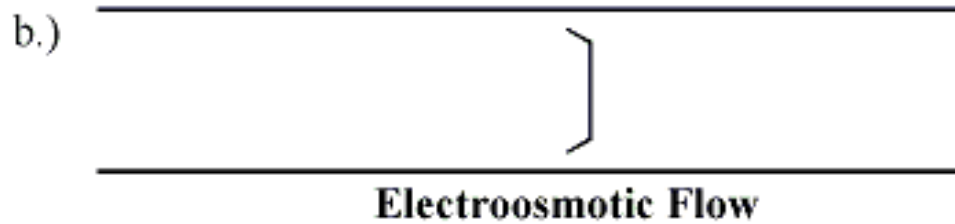
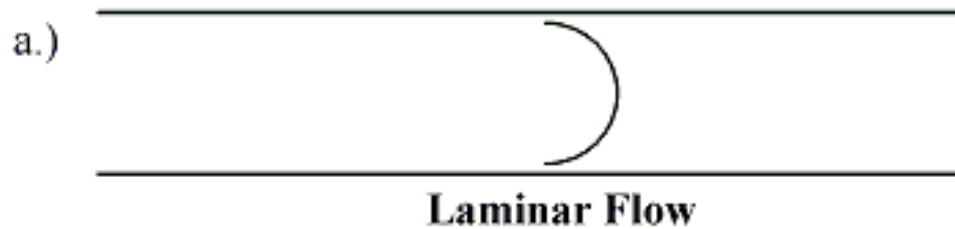
-

-

A kapillárisban a folyadék mozog



Lamináris és az elektroosmotikus áramlási profil közti különbség



- Elméleti tényérszám kérdése:
- Klasszikus megközelítés: van Deemter
- $H=A+B/u+Cu$
- $A=0$ nincs töltet
- $C=0$ nincs megoszlás
- $H=B/u$, értéke szabja meg a zónaszélesedést

- $H=B/u$ értékét
- megszabja az elektroforetikus vándorlási sebesség
- Növelni kell az u értékét, ez az E (V) növelésével tudjuk
- Gát: a felszabaduló Joule hő

- Diffúziós állandó és a zónaszélesedés kapcsolata:
- Minél kisebb a D értéke, annál kisebb a zónadiffúzió
- D értéke a molekulatömeg (M) függvénye:
- Nagy M , kis D , kis zónaszélesedés

- Ha az elválasztáskor változik a D, akkor kiszélesedik a zóna,
- ezért termosztálni kell
- és kis belső átmérőjű fused silica csövet kell alkalmazni

- Pozitív töltésű anyagok elválasztása:
- Adagoló: anód
- Detektor oldal:katód
- $\text{pH} < 4$ csak elektroferetikus vándorlás
- Ha, r azonos, akkor sorrend: +++, ++, +
- Ha z azonos, akkor sorrend $r_1 < r_2 < r_3$

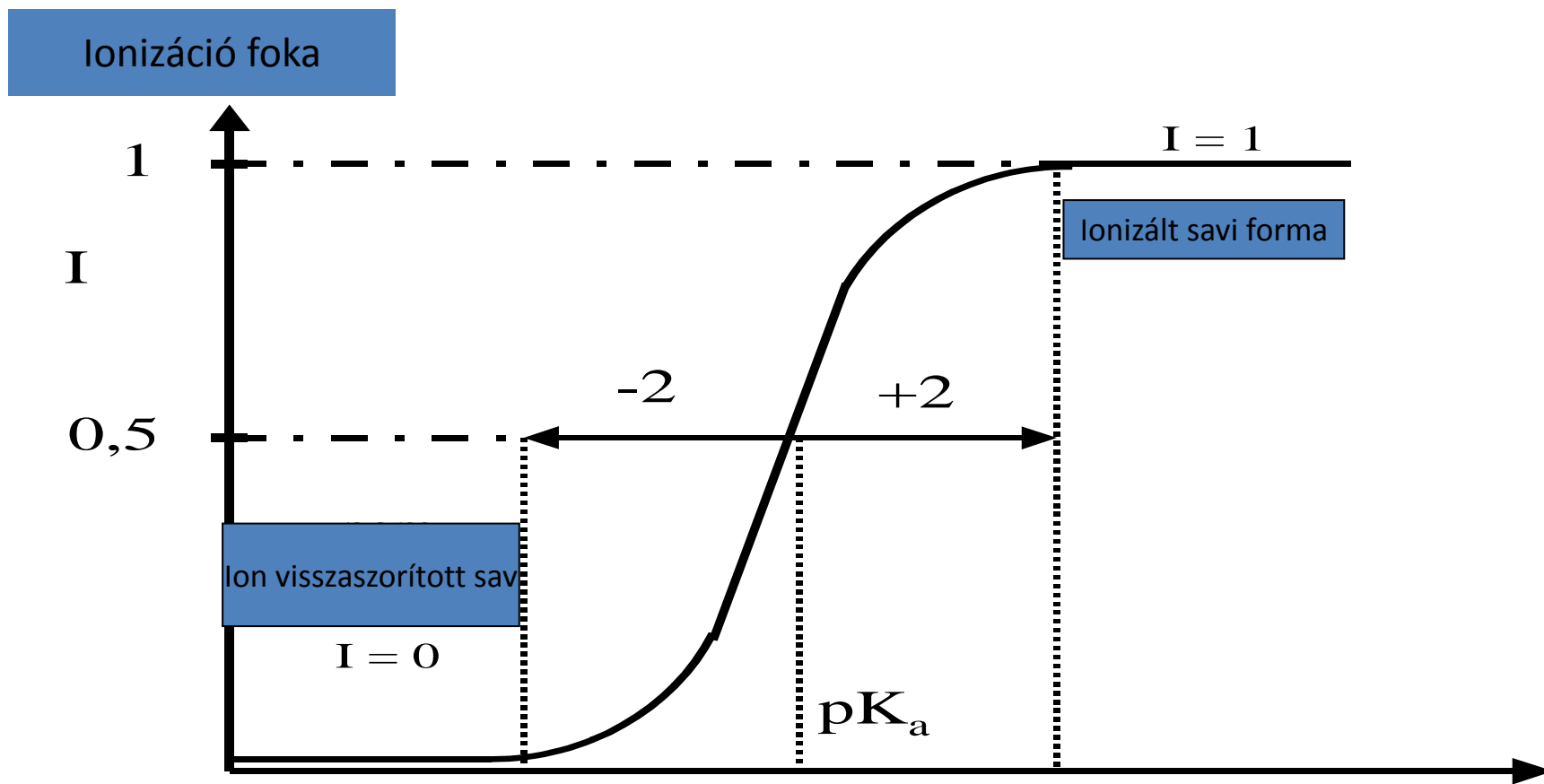
- Negatív töltésű anyagok elválasztása:
- **polaritás csere**
- Ha, r azonos, akkor ---, --, -
- Ha z azonos, akkor sorrend $r_1 < r_2 < r_3$

- ionizációs diagramot ismerni kell:

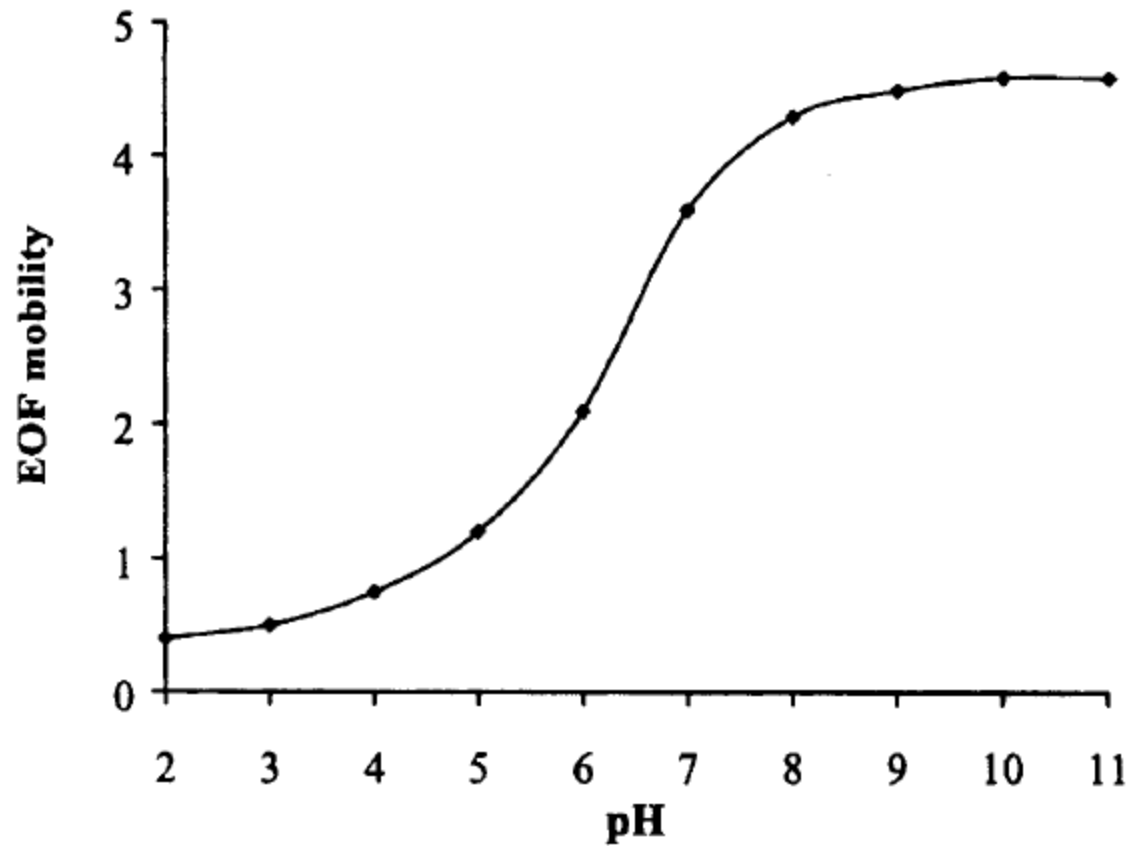
Savas csoportot tartalmazó vegyületek elválasztása

A savas csoportot ionizált formába kell hozni

A pK_a értéket ismerni kell. Ha nem ismert, akkor \rightarrow előrejelzés a Pallas szoftverrel



Elektroozmotikus vándorlás pH függése



- Pozitív töltésű anyagok elválasztása, ha $\text{pH} > 4$
- Vándorlást az elektroforetikus (u_p) és az elektroosmotikus (u_{EO}) együtt szabják meg!
- $u = u_{EO} + u_p$
- Elektroosmotikus vándorlás kimérése kis molekulatömegű anyaggal.



Capillary Zone Electrophoresis

injected sample plug (30-400nl)

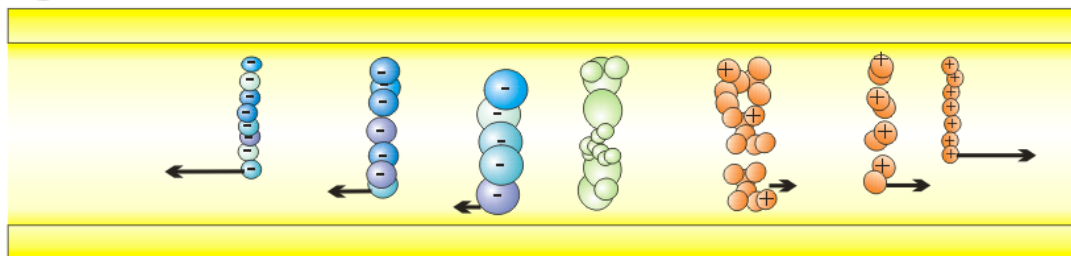


CZE

One common thing:



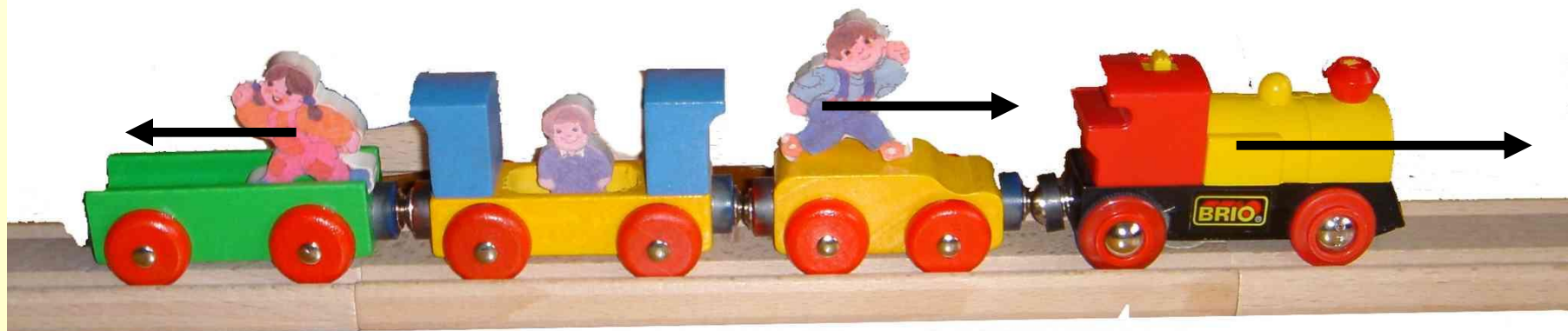
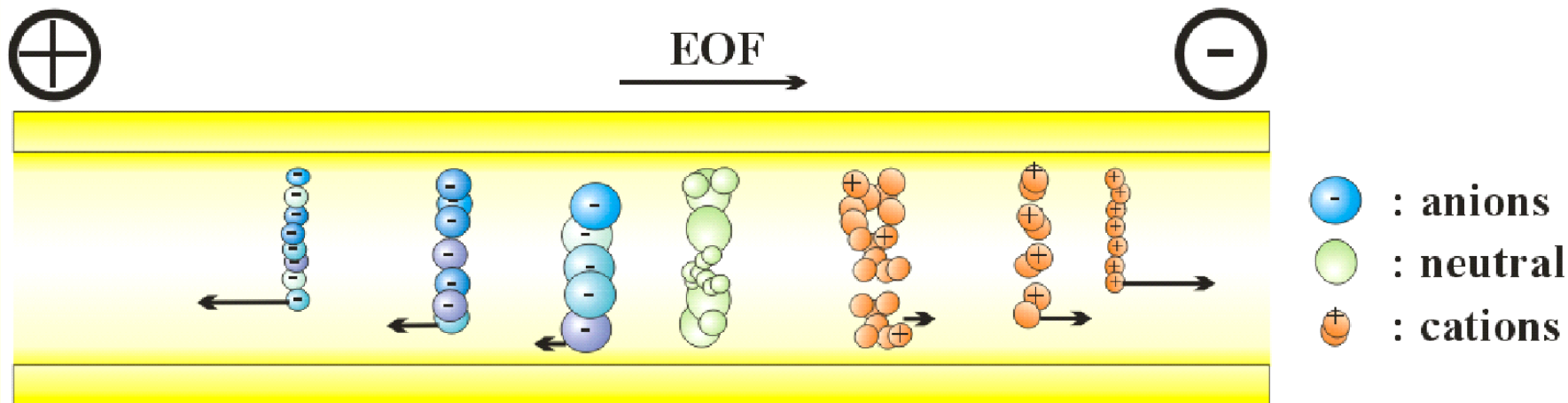
EOF



- : anions
- : neutral
- : cations



Capillary Zone Electrophoresis



Electroosmotic velocity (v_{eo}) is given by the equation

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \times \left(\frac{V}{L} \right)$$

ϵ = dielectric constant of the buffer,

ζ = zeta potential of the capillary surface.

The velocity of the solute (v) is given by:

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times l}{2 \times D \times L}$$

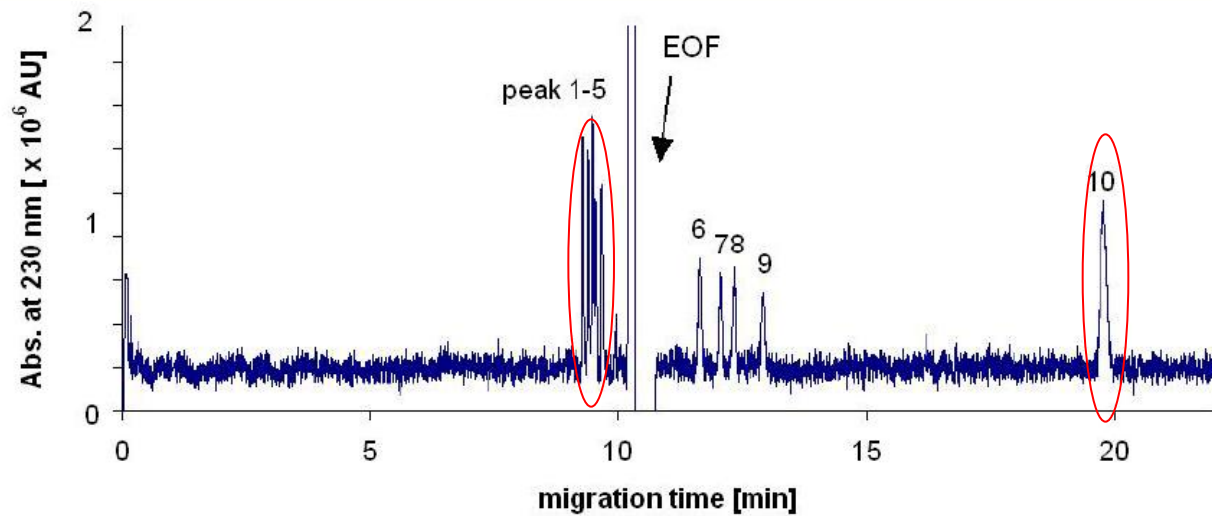
$$R_s = \frac{\sqrt{N} (\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4 (\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}$$

and μ_{epb} = electrophoretic mobilities of the
2 analytes separated,
= mean electrophoretic mobility of the
2 analytes $\bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2} (\mu_{epb} + \mu_{epa})$.

- Biopolimereknél:
- A felületet borítani kell, hogy az ionizált és nem ionizált szilanol és a fehérje bázisos csoportja közti erős kölcsönhatást kikerüljük.
- Ezt nem tudjuk megtenni!
- Az N,k és R is a szilanolcsoportok számától és aktivitásától függ!



Capillary Electrophoresis



- Negatív töltésű anyagok elválasztása, ha $\text{pH} > 4$,
Nem kell porítás csere!
- Retenciósorrend:
- ha, r azonos, akkor -, --, ---
- ha azonos, akkor $r_1 < r_2 < r_3$

Semleges molekulák elválasztási lehetősége: micellaképzés a pufferben

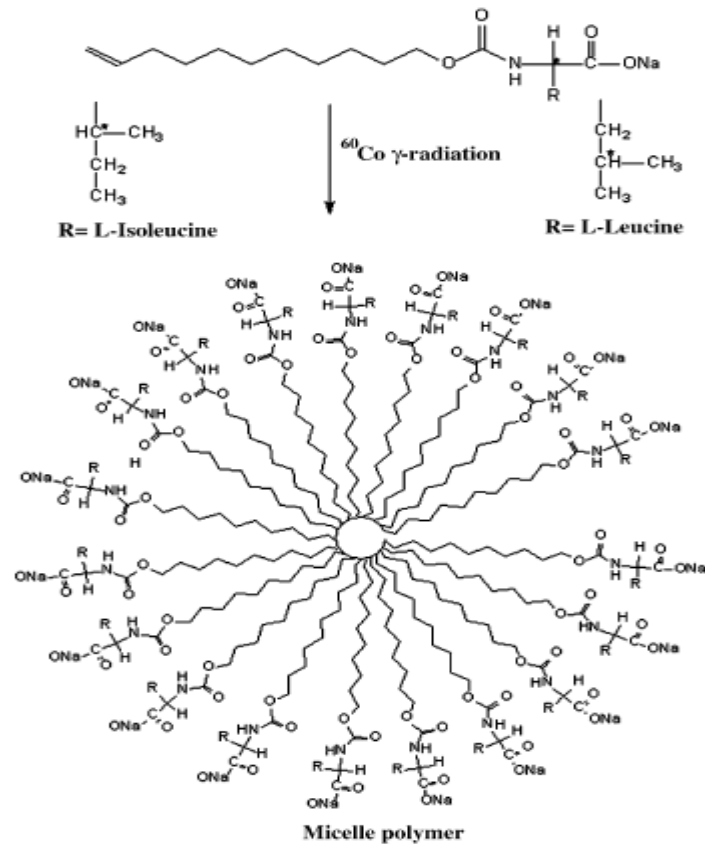
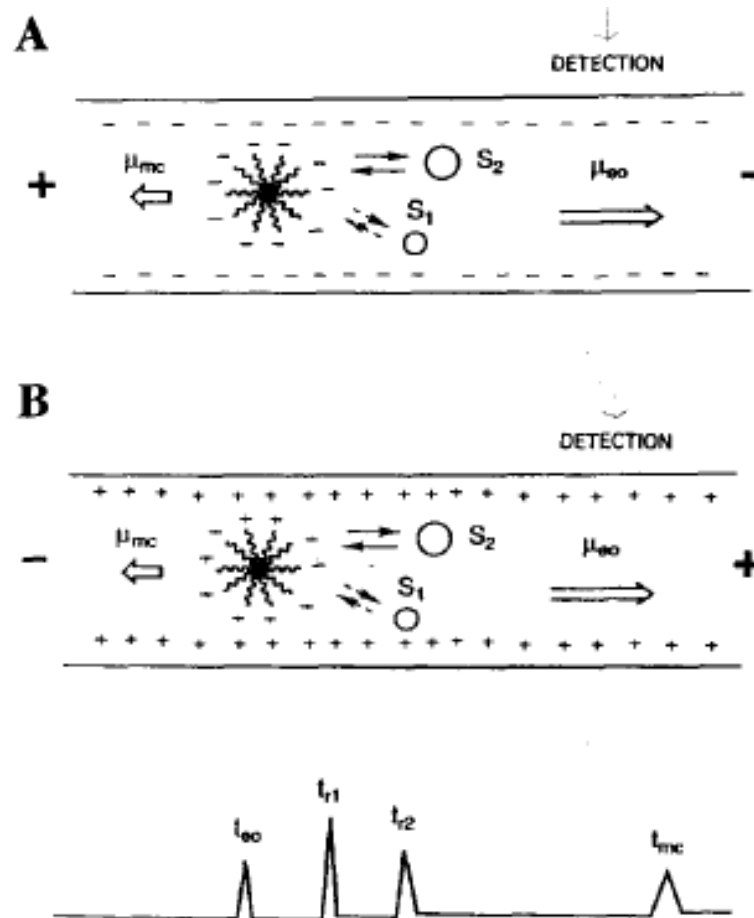


Fig. 4. Structure of monomer and micelle polymer of alkenoxy surfactants.
Reprint with permission from [106].

Időablak a MEKC-ben, eltérés a szabad oldatos CE-től



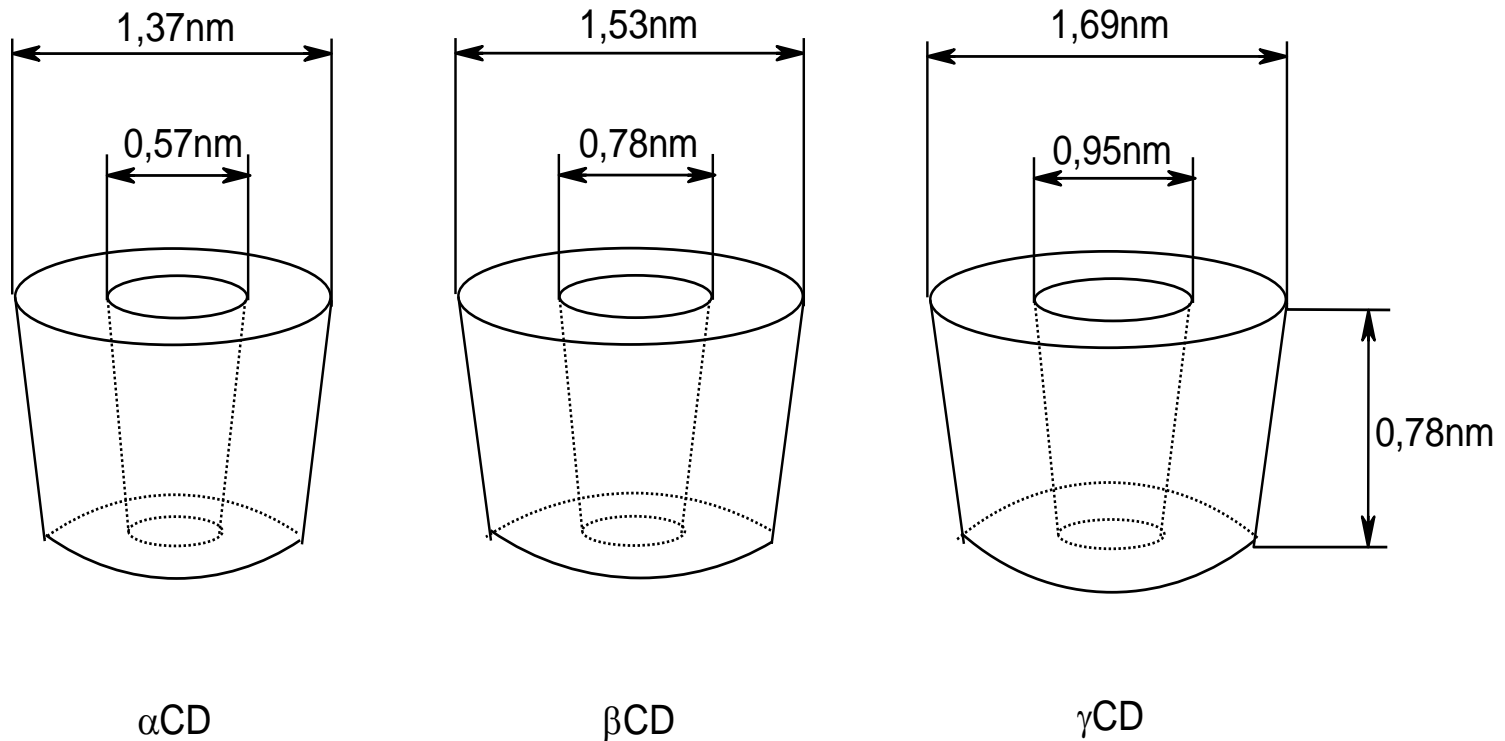
- MEKC-ban alapvető az elektroosmotikus vándorlás!
- Anionaktiv micellaképző:
- EP irány: anód
- EO irány: katód
- $\text{pH} > 4$
- $\text{EO} > \text{EP}$

$$R = \left(\frac{N^{1/2}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left(\frac{1 - \left(\frac{I_{eo}}{I_{mc}} \right)}{1 + \left(\frac{I_{eo}}{I_{mc}} \right) k'_1} \right) \quad (2)$$

Enantiomer elválasztás általános aspektusai

Ciklodextrinek és származékaik I.

Ciklodextrin alaptípusok



Advantages and disadvantages of capillary electrophoresis (CE) comparing with chromatographic methods

-advantages:

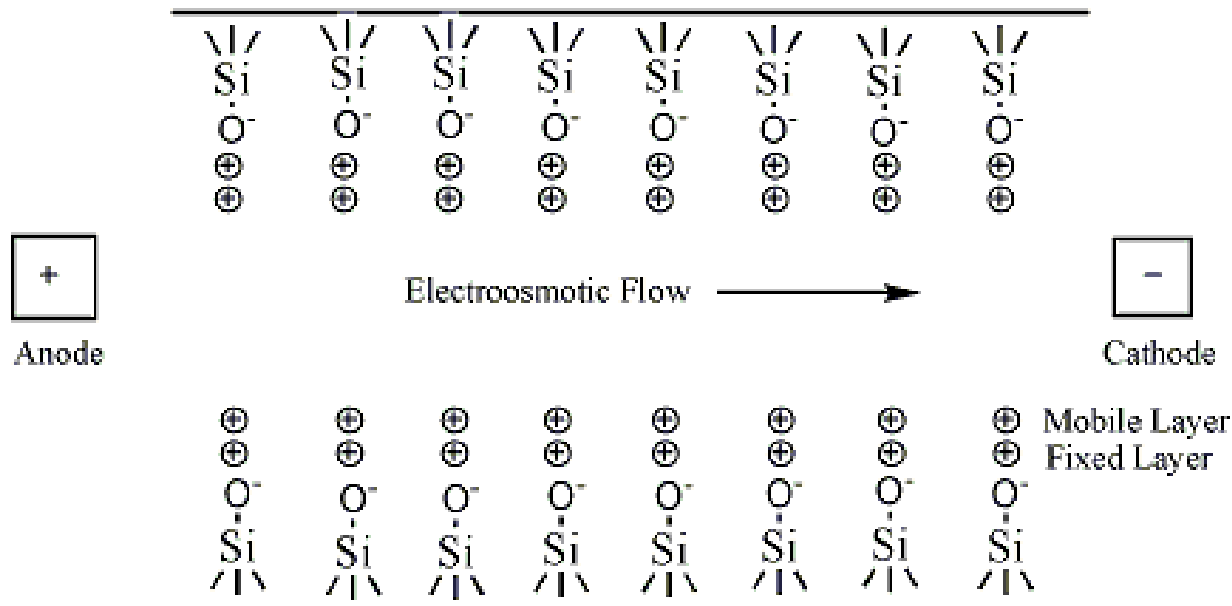
- low analysis time
- high efficiency
- high number of theoretical plates
- low running costs
- high flexibility
- easy capillary changing
- low sample and solvent consumption
- versatile possibility to influence the separation quality

-disadvantages:

- higher limit of detection
- lower accuracy of identification parameter

- A legnagyobb problémája a migrációs idő állandósága!
- Kis molekula tömegű anyagoknál:

A kapillárisban a folyadék mozog, ennek sebessége a fused silica felületén lévő szilanol csoportok számától függ



Electroosmotic velocity (v_{eo}) is given by the equation

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \times \left(\frac{V}{L} \right)$$

ϵ = dielectric constant of the buffer,

ζ = zeta potential of the capillary surface.

The velocity of the solute (v) is given by:

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

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

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

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