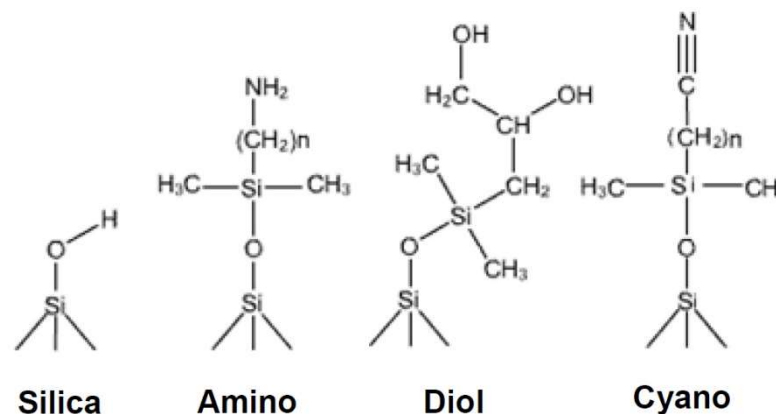


Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)

- Az első folyadékkromatográfiai 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)

Állófázisok alkalmazási gyakorisága:

- Szilikagél (80-90%)
- Alumínium-oxid (5-10%)
- Módosított szilikagél: pl.: amino, ciano, diol, nitro, stb. (5-10%)



Szilikagél állófázis „vízérzékenysége”

- Szilikagélek jó vízmegkötő anyagok
- Kromatográfiás szempontból: a felületen adszorbeálódott víz erősen kötődik a szilanol csoportokhoz, dezaktiválja azokat (kizárva a komponens hozzáférhetőségét).
- Igen kis mennyiségű víz is jelentős mértékben dezaktiválja a kolonnát, ezért a mozgófázisok nem tartalmazhatnak vizet, vagy csak kontrollált mennyiségben.

Aktiválás lehetőségei:

- Lassabb módszer: a kolonnán egyre apolárisabb vízmentes mozgófázisokat áramoltatunk keresztül. Gyakorlatban: először alkoholt, majd étert, azt követően klórozott szénhidrogént, végül hexánt.
- Hatékonyabb, gyorsabb módszer: a kolonnát 150-200 fokon tartva, száraz, állandó nitrogénárammal vízmentesítjük.

Polárisan módosított szilikagél állófázisok előnyei

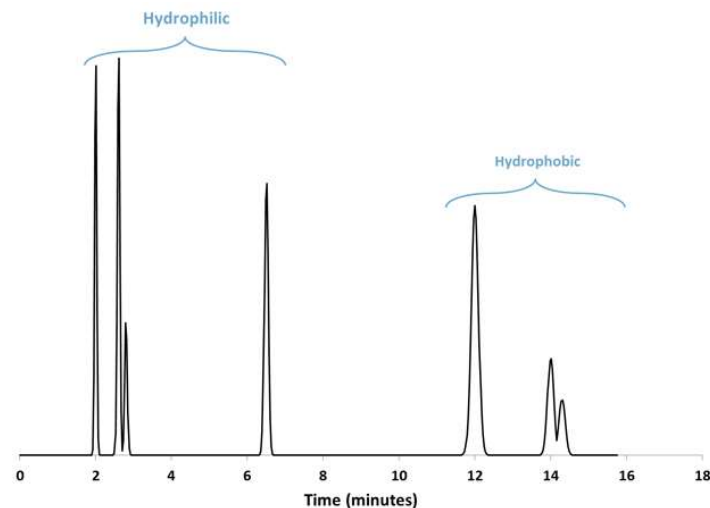
- A mozgófázis nyomnyi víztartalmát nem kell kontrollálni
- Gyorsabb egyensúlybeállítás
- Gradiens elúció kivitelezhető
- Polaritás, szelektivitás széles tartományban változtatható
- Energetikailag homogénebb felület
- Kevésbé „tailinges” csúcsok, mint szilikagél esetén
- Ezek a fázisok a mozgó fázis polaritásától függően használhatók normál- és fordított fázisként is

Mozgófázisok az NP-HPLC-ben

Alkánok	Hexán, Heptán, Izooktán
Klórozott szénhidrogének	Diklórmétán, Diklóretán, Kloroform
Éterek	Diizopropil-éter, Diizobutil-éter, MTBE, THF, Dioxán
Észterek	Metil-acetát, Etil-acetát
Alkoholok	Etanol, Izopropanol
Nitrilek	Acetonitril
Aminok	Trietil-amin, Butil-amin
Savak	Ecetsav
Víz	Víz

Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)

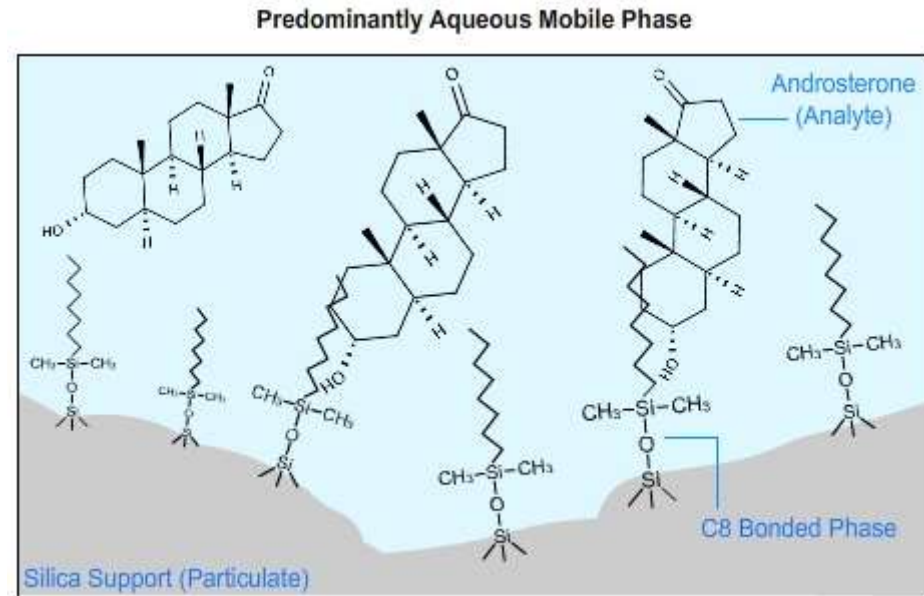
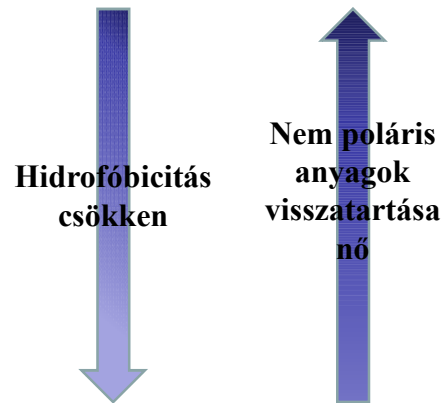
- Fordított: a korábban kidogozott „normál”-hoz képest
- A mozgó fázis *polárisabb*, mint az állófázis
- A leggyakrabban használt módszer



Állófázisok az RP-HPLC-ben

- Módosított szilikagél állófázisok

Módosítás
C18
C8
C4
ciano
fenil
amino



Állófázisok

Általános követelmények

- mechanikailag stabilnak kell lennie, hogy a szemcsék ne roppanjanak meg az alkalmazott nyomás hatására
- a töltetágyaknak homogénnek kell lennie (egyenletes áramlási csatornák a szemcsék közt: ld. Van Deemter egyenletben az örvénydiffúzió)
- a szemcsék átmérője kicsi legyen és kicsi legyen a szemcseátmérő eloszlása lehetőleg szűk eloszlást mutasson. Kis szemcsék az alkalmazható nyomást (Darcy-tv.), míg a nagy szemcsék az elválasztás hatékonyságát (Van Deemter-egyenlet) korlátozzák, ha szemcseátmérő eloszlás nagy, akkor heterogén töltetágy jöhet létre.
- a szemcsék pórusméretének olyannak kell lenni, hogy ne gátolja a vizsgálandó anyagok diffúzióját. Ne tartalmazzon mikropórusokat, mert ún. mikropórusokban $d_p < 2$ nm az anyagátadási ellenállás nagy, és széles kromatográfiás csúcsokat kapunk
- a töltet felületének energetikailag homogénnek kell lennie (a nagyon különböző kölcsönhatási erősséget biztosító kötődési helyek száma ne legyen összemérhető, különben a csúcsalak torzul, az elválasztás romlik.)
- módszerspecifikus követelmény: a módszernek megfelelő kémiai tulajdonsággal rendelkezzen a felület

Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

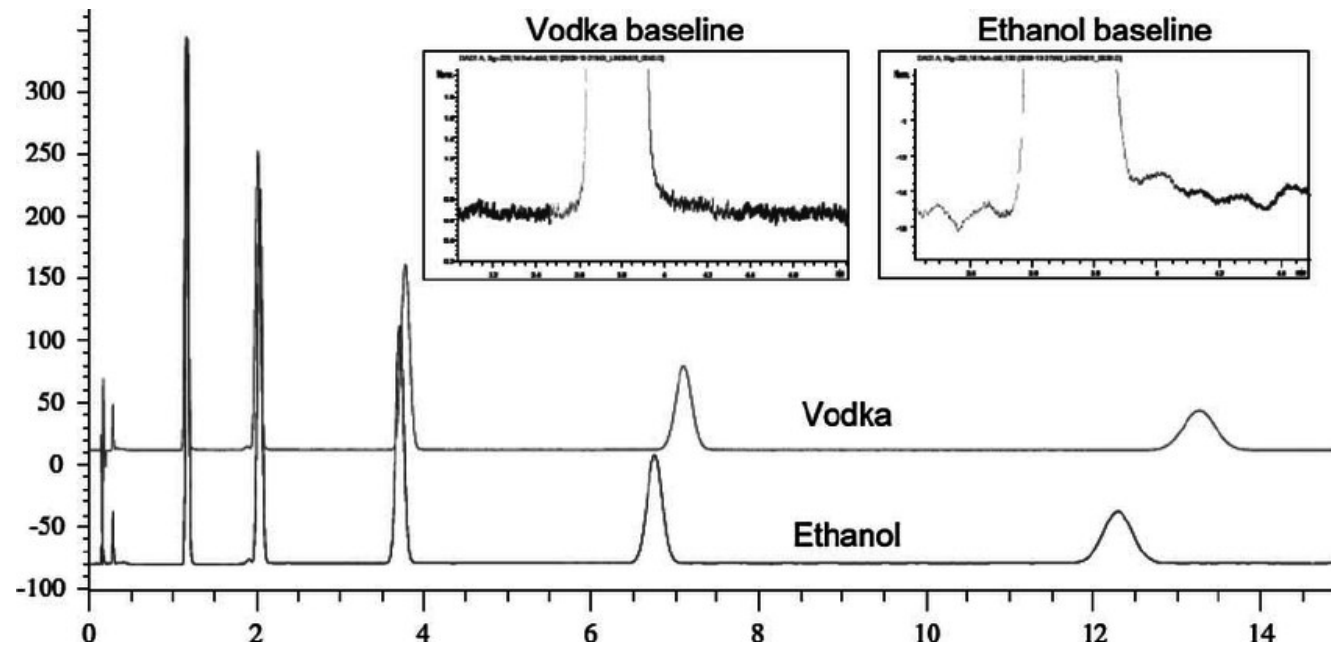
Általános követelmények

- Tisztasági követelmény
- Jó UV áteresztőképesség (UV cut-off)
- Kis viszkozitás
- A minta komponenseinek jól kell oldódniuk a mozgófázisban
- Nem tartalmazhat szilárd anyagot
- Kis toxicitás
- Nem tartalmazhat oldott gázokat (gázmentesítés)
- Módszerspecifikus követelmény: polárisabb legyen, mint az állófázis

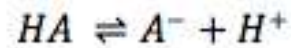
Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

- Általános követelményeknek a víz megfelel, hiszen kis viszkozitású, 190 nm felett nem nyel el.
- A szerves vegyületek nagy részét azonban nem oldja, ezért szükség van szerves oldószerekre:
 - Etanol, 2-propanol: nagy a viszkozitásuk -> ritkán használatosak
 - Dioxán: poláris, de reaktív és mérgező -> használata nem jelentős
 - THF: állás közben peroxidosodik (stabilizálószerrel adnak hozzá, ez azonban rontja az UV cut-off értéket) -> csak akkor használják, ha szelektivitásnövelés érhető el vele
 - Leggyakrabban tehát **acetonitril** és **metanol** használnak, ezek kis viszkozitása, megfelelő tisztasága miatt

Oldószer tisztaság

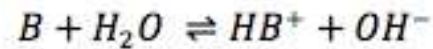


pH szerepe az RP-HPLC-ben



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$$pK_a = -\log_{10} K_a$$

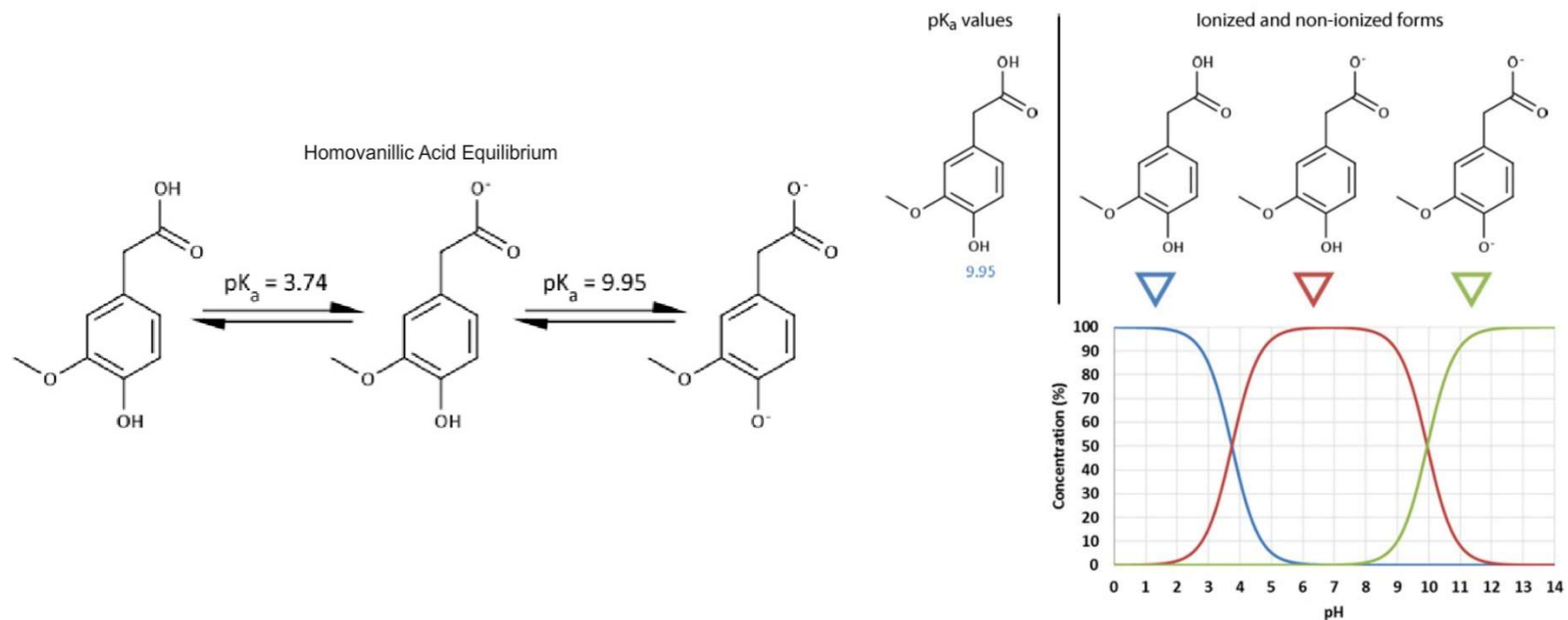


$$K_b = \frac{[OH^-][HB^+]}{[B]}$$

$$pK_b = -\log_{10} K_b$$

- Gyenge bázis egyensúlyban van a konjugált savval, megegyezés szerint gyenge bázisok jellemzésére a konjugált sav pK_a értékét használjuk (ugyanúgy, ahogy pH-t használunk, és nem pOH-t).
- Minél erősebb a sav, annál kisebb a pK_a értéke.
- Minél erősebb a bázis, annál nagyobb a pK_a értéke.

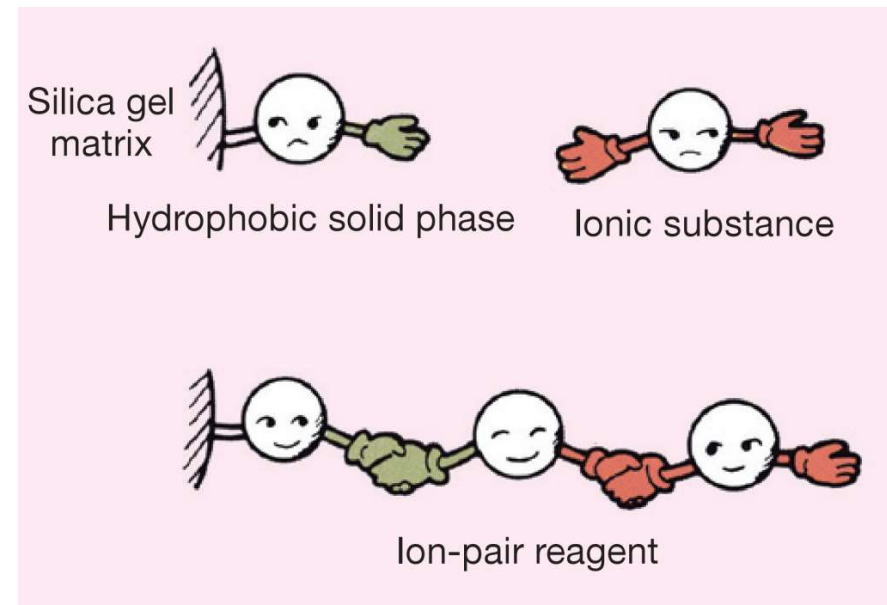
Savas vegyület



Fordított fázisú ionpár kromatográfia

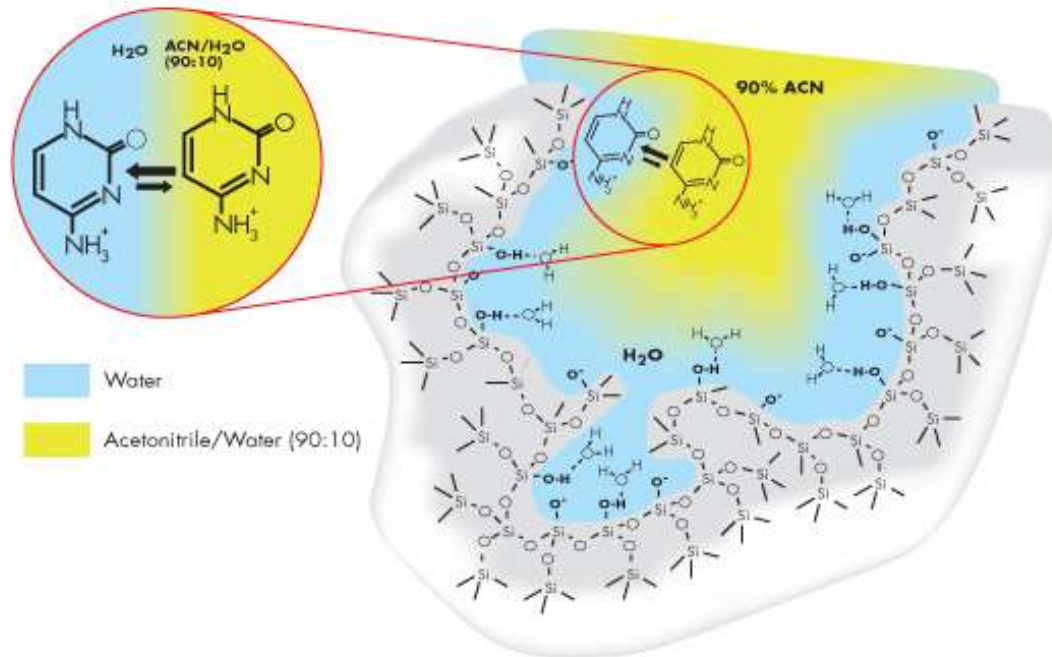
RP-IP-HPLC

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



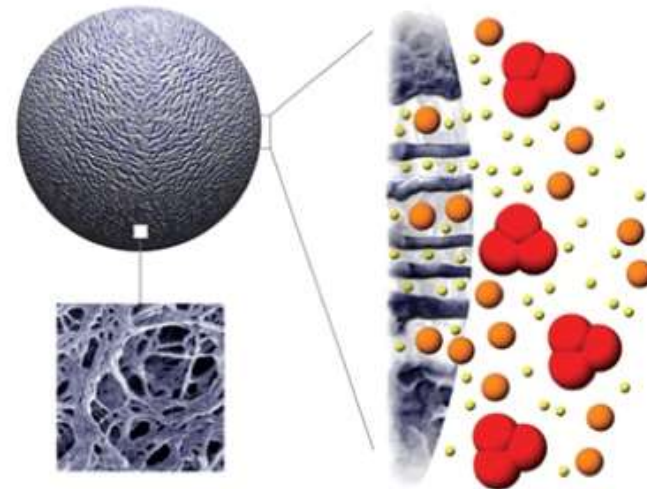
HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography)

Állófázis: poláris (szilikagél vagy polárisan módosított szilikagél)
Mozgófázis: vizes – szerves (tipikusan: 30%:70%)
A polaritásviszonyok miatt „fordított fordított fázisú kromatográfiának” is hívják



Méretkizárásos kromatográfia

- Size Exclusion Chromatography (SEC)
- A molekulákat nagy pórusátmérőjű tölteteken méretük szerint választjuk szét
- Nagy molekulák kizáródnak – kisebb méretű molekulák méretüktől függő ideig tartózkodnak a pórusokban
- Állófázis: inaktív, nem alakít ki kölcsönhatást az elválasztandó molekulákkal az adott eluensben

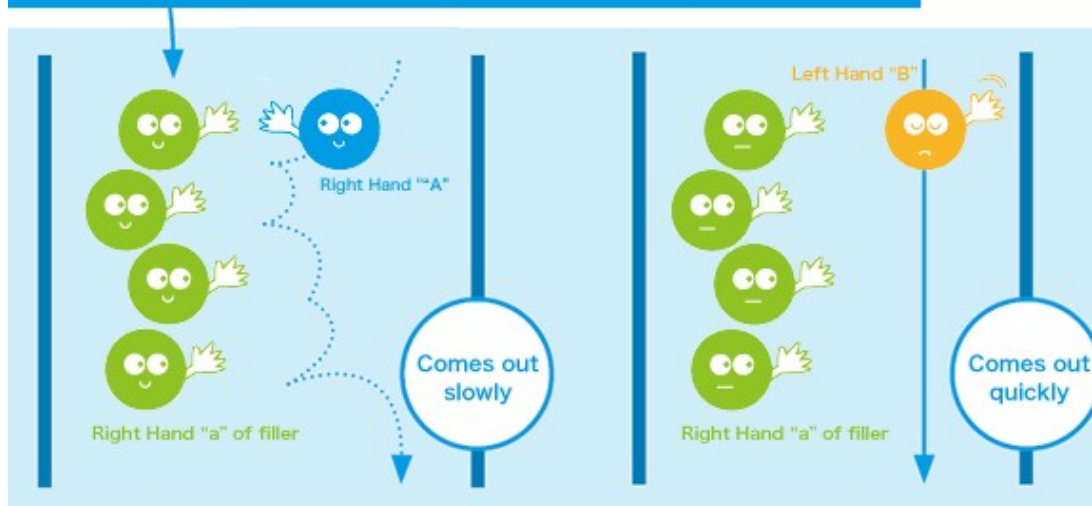


Királis kromatográfia

- Indirekt: mérendő komponens derivatizálása királis reagenssel -> diasztereomerek keletkeznek az enantiomerekből
- Direkt:
 - A mozgófázis királis módosítót tartalmaz (chiral mobile phase additive, CMPA)
 - Az állófázis királisan módosított
 - Kisebb molekulákkal, pl.: leucin, fenilglicin
 - Fehérjékkel, pl.: AGP, CBH
 - Ciklodextrinekkel
 - Molekuláris lenyomatú polimerekkel

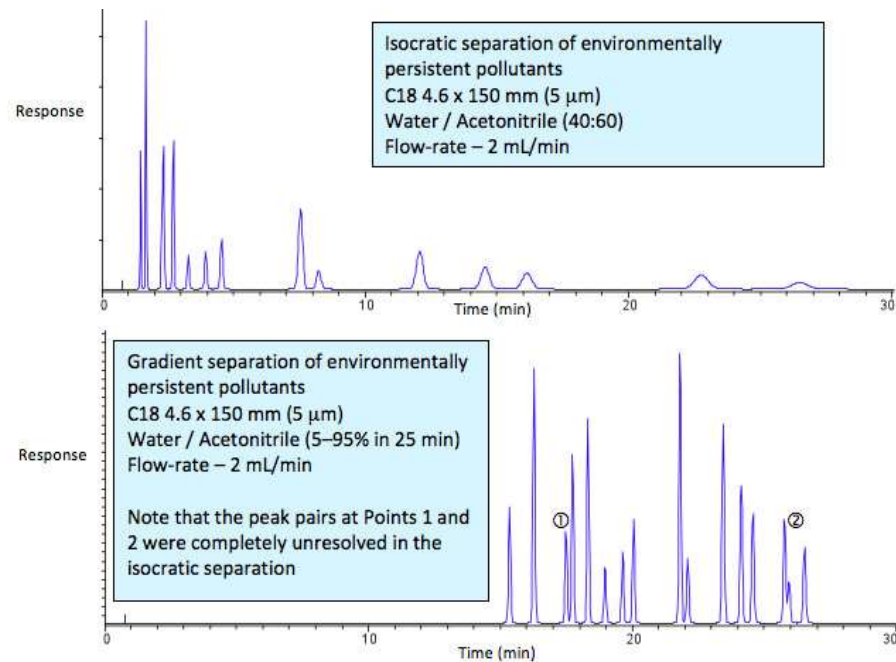
Királis állófázis

A filler (Right Hand "a," a silica gel coated with polysaccharide [cellulose, etc.] derivatives) that attracts one of the twins in the racemic mixture



Gradiens elúció

- HPLC-s méréseknél gyakran előfordul, hogy az elválasztandó komponensek kémiai tulajdonságai, polaritás értékei széles tartományban mozognak.
- Állandó összetételű eluens alkalmazásakor (izokratikus módszer) ezekben az esetekben nem megfelelő az elválasztás.
- Ilyenkor gradiens elúcióra van szükség
- A mozgó fázis szerves fázis tartalma változik a mérés során



Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Mivel tudjuk a szelektivitást befolyásolni?

mindennel, ami megoszlási hányadost befolyásolja:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2 \frac{V_s}{V_m}}{K_1 \frac{V_s}{V_m}} = \frac{K_2}{K_1}$$

Paraméter

Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

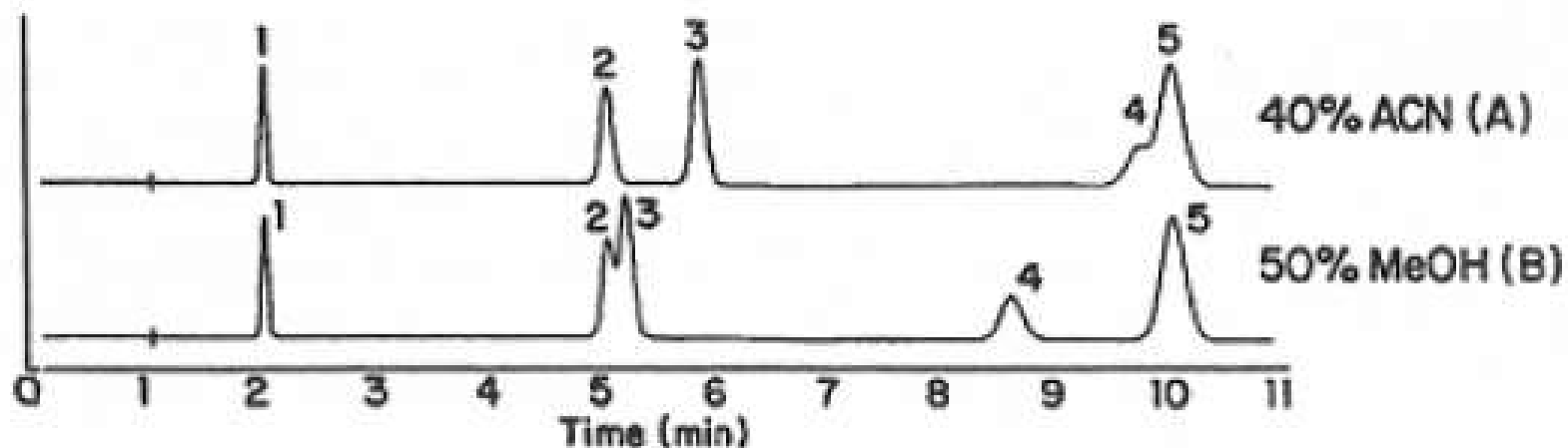
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

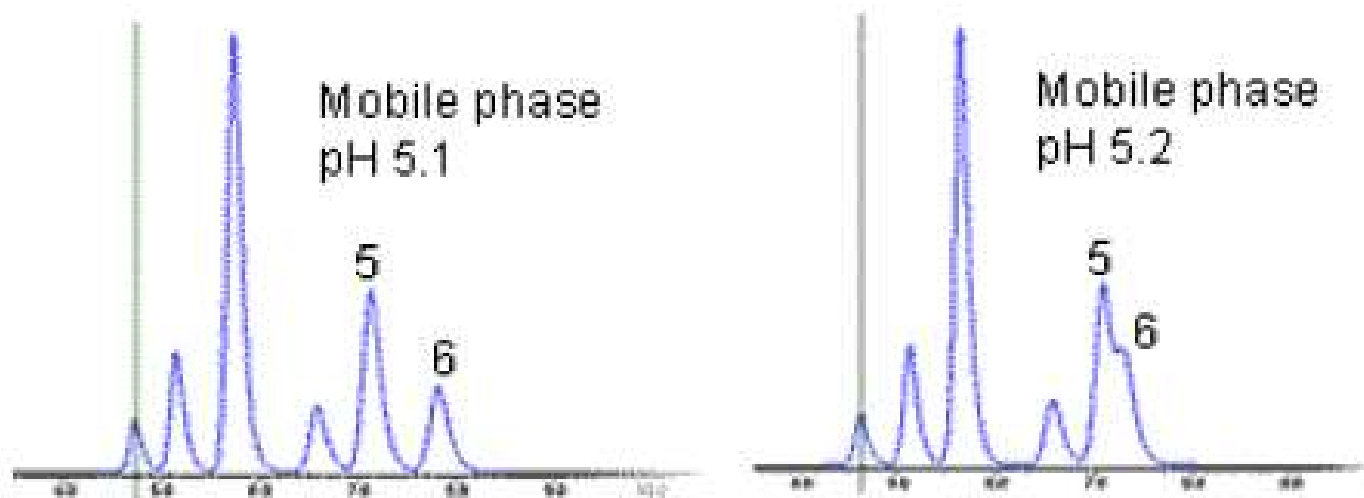
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

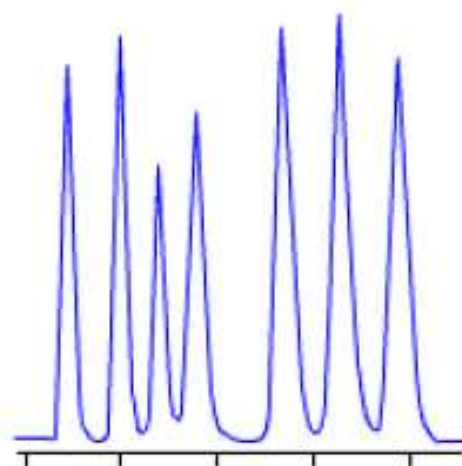
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

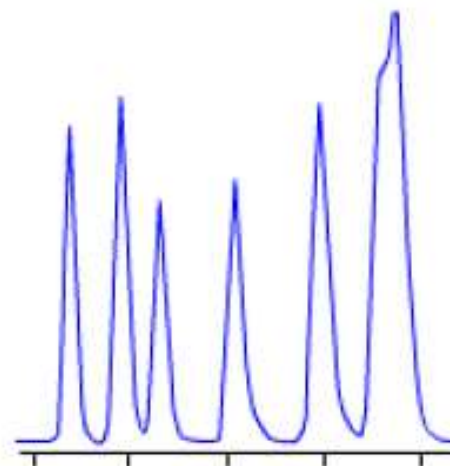
Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Mobile phase octane
sulphonic acid conc.: 57mM



Mobile phase octane
sulphonic acid conc.: 60mM

Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

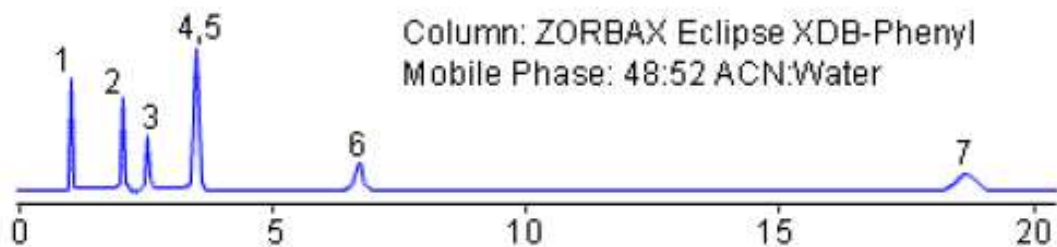
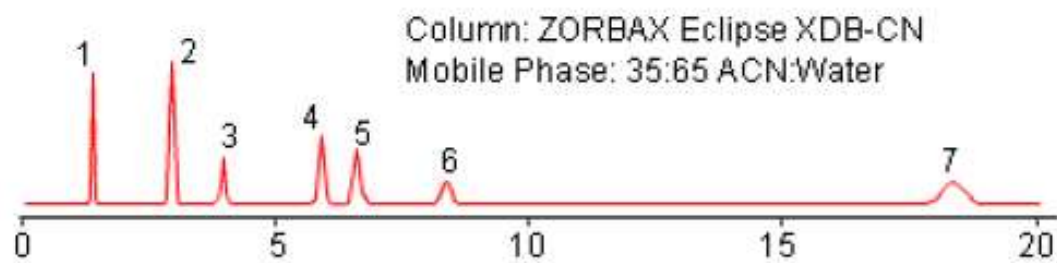
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásoljuk az elválasztást a szelektivitással?

Paraméter

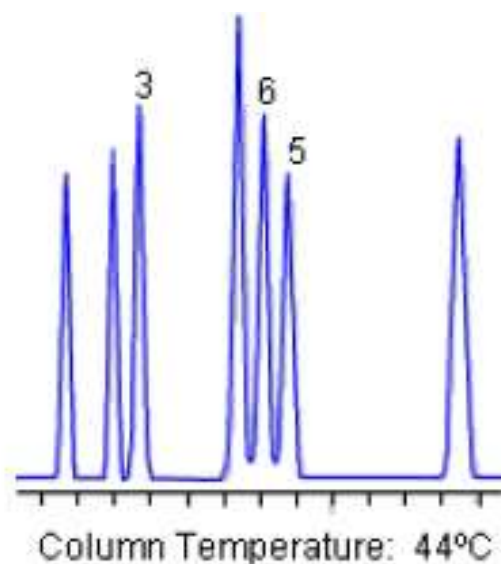
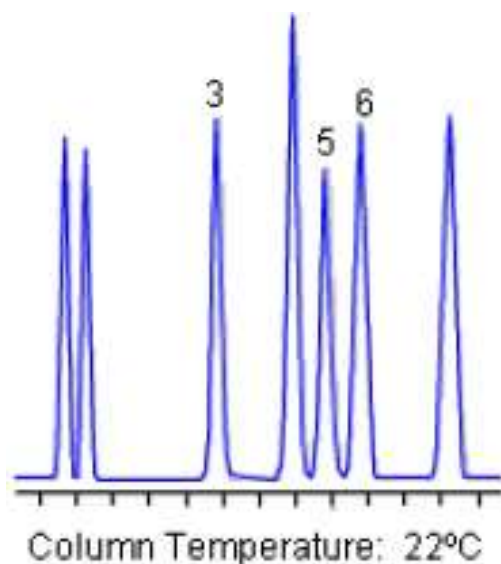
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Hogyan befolyásolja az elválasztást a szelektivitás?

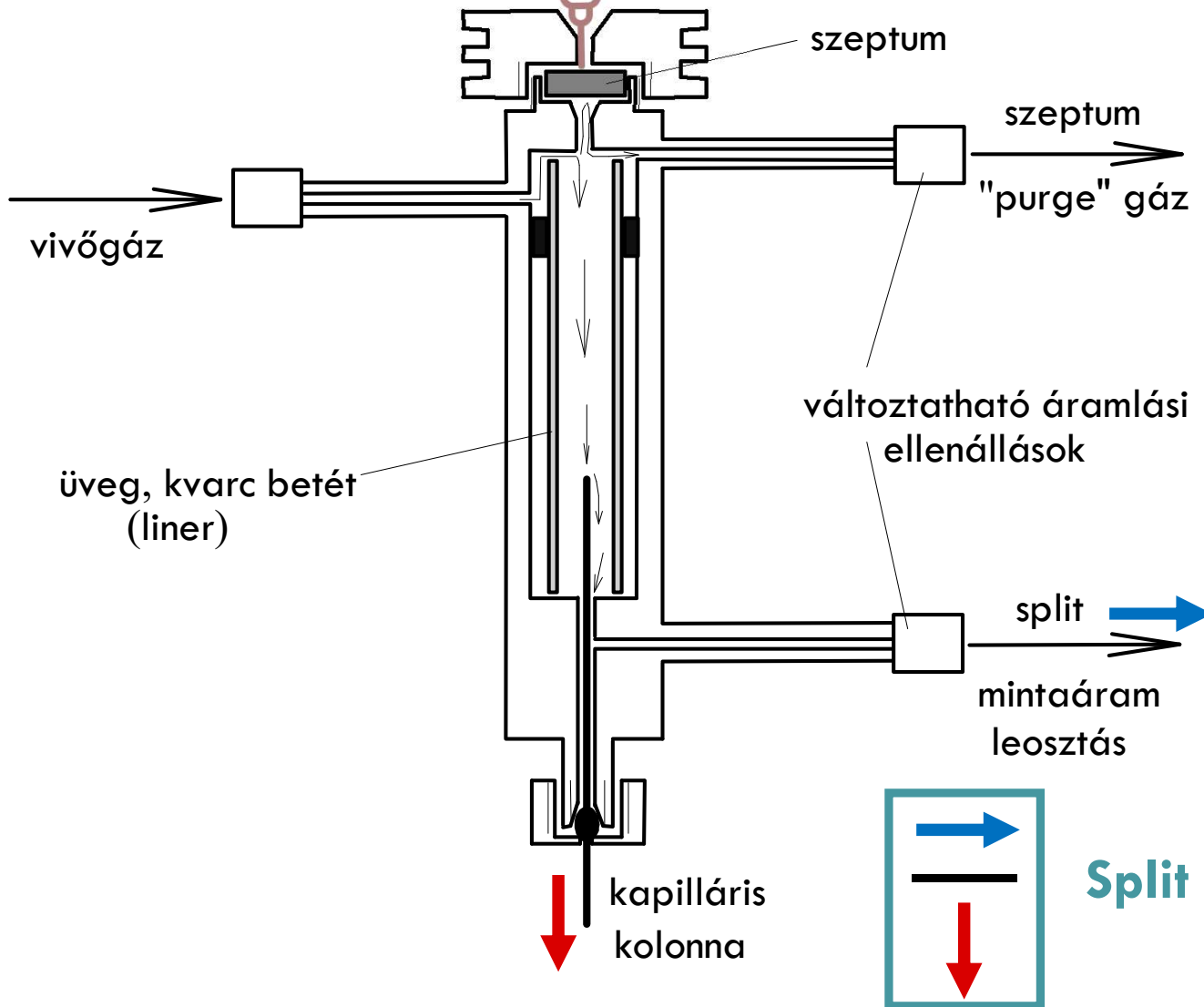
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

- 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 .
- Folyadék-folyadék extrakciónál, hogy 99% tisztaságot elérjünk 2 anyagra, az kell, hogy
- $K_1 = 100$ és $K_2 = 0,01$, vagyis $\alpha = 10.000$ kellene.

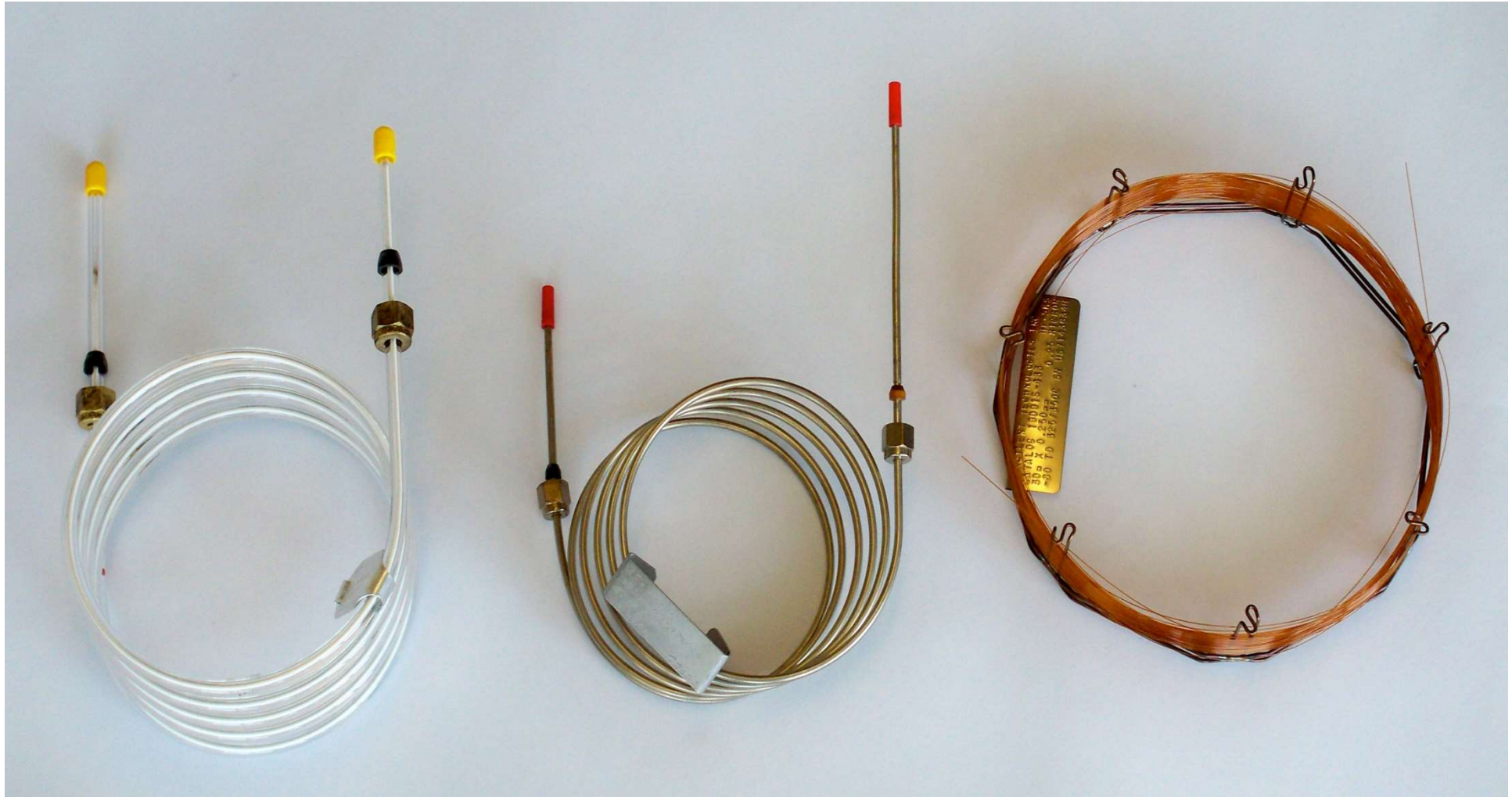
Split/splitless injektor



- **Folyadék** bomlás nélkül!
- **Gáz**



Töltött kolonnák, kapilláris kolonna



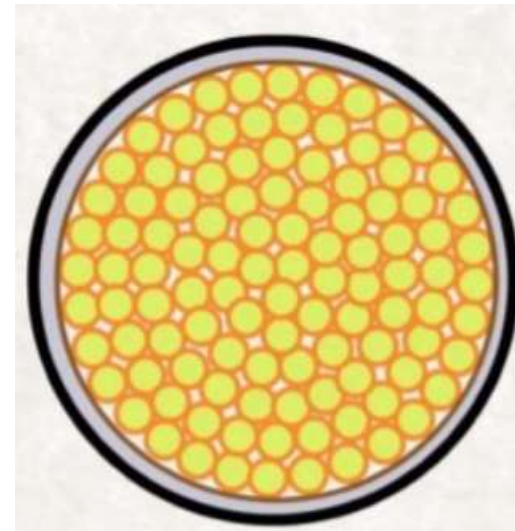
$D_{id} = 2 \text{ mm}$

$D_{id} = 2 \text{ mm}$

$D_{id} = 0,25 \text{ mm}$ 28

Kolonnák

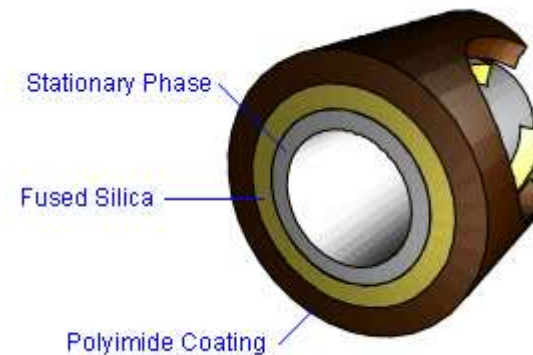
1. Szemcsés töltetű kolonna



2. Kapilláris kolonna

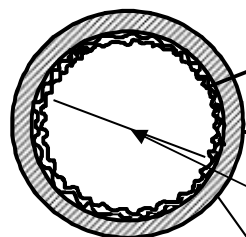
Felépítése: Kvarcüveg vékony cső
belső felületén az állófázissal
külső felületén poliimid bevonat

Állófázis: Szilárd (a**d**sz.)
Folyadék (a**b**sz.)
Szilárd hordozón folyadék (a**b**sz.)



Kapilláris kolonnák (OT open tubular)

PLOT
Porous Layer OT



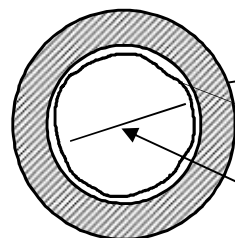
porózus adszorbens réteg 5-50 μm

kapilláris cső fala

belső átmérő 0,25-0,53 mm

adszorpció

WCOT
Wall Coated OT



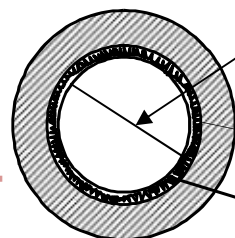
poliimid bevonat

megosztófolyadék 0,01- 5 μm

belső átmérő 0,05-0,53 mm

abszorpció
(megoszlásos)

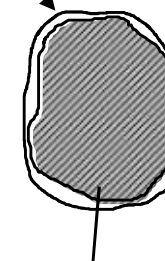
SCOT
Support Coated OT



hordozó

megosztófolyadék, 0,015 mm

megosztófolyadék 5-20 μm



hordozó 0,1-3 mm

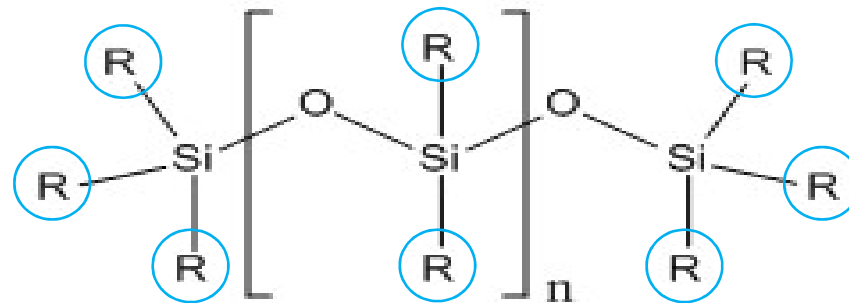
Megosztófolyadékok

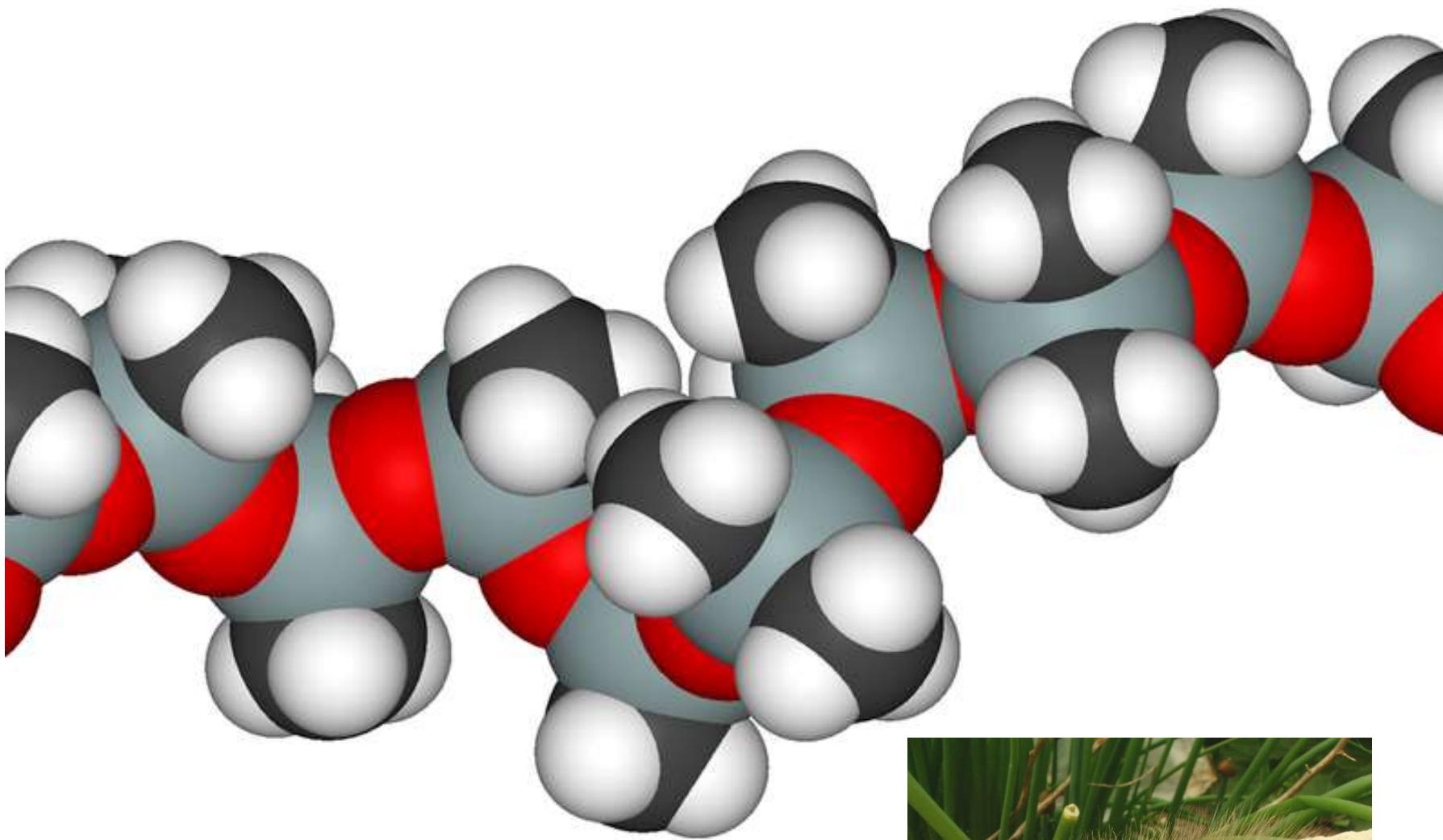
SZILIKON ÁLLÓFÁZISOK

Polisziloxán vázas megosztófolyadékok

R minőségétől függően lehet

- APOLÁRIS
- POLÁRIS





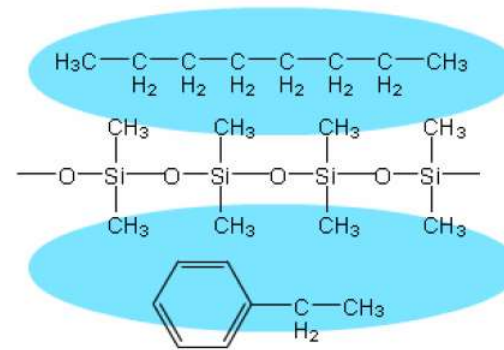
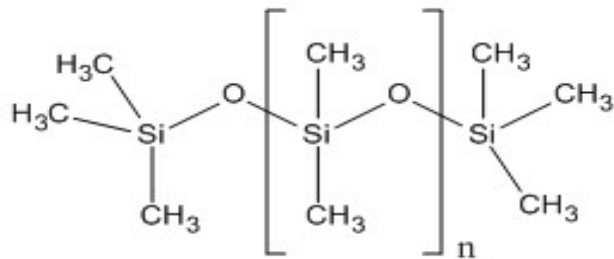
dimetil-polisziloxán



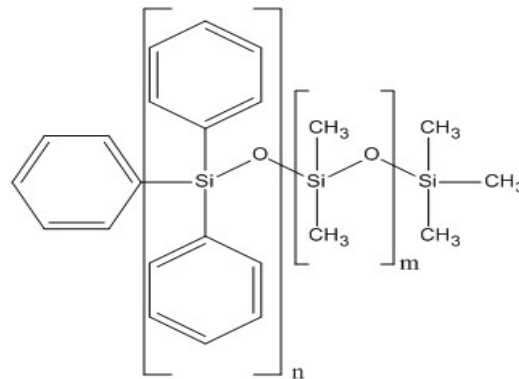
Polisziloxán állófázisok:

- **100% Dimetil-polisziloxán (pl. Rtx-1, ZB-1, DB-1)**

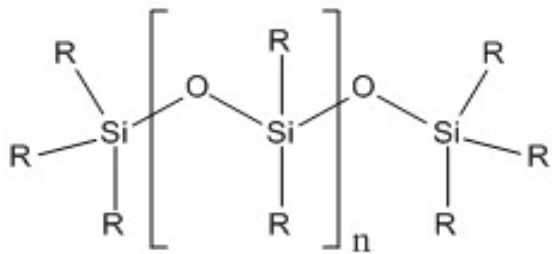
Apoláris állófázis, szterikus gát miatt O nem hozzáférhető, **diszperziós** kh.
Általában fp. szerinti sorrendben kötődnek meg az alkotók.



- **5% Difenil-dimetil-polisziloxán (pl. Rtx-5, ZB-5, DB-5)**

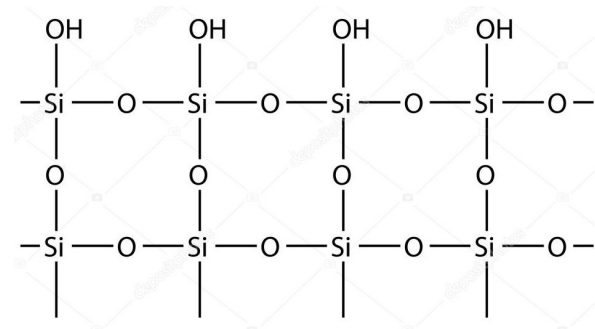


~~SZILIKON = SZILIKAGÉL~~



Viszkózus folyadék
vagy gumi

GC állófázis



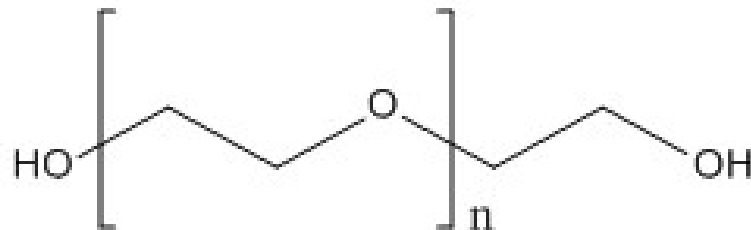
Szárzégél

LC állófázis

Polietilén glikol (Stabilwax, ZB-wax)

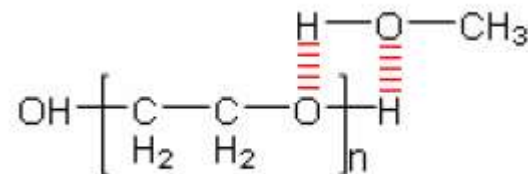
Erősen poláris.

Diszperziós, indukciós és H-hidas kh. kialakulása is lehetséges.



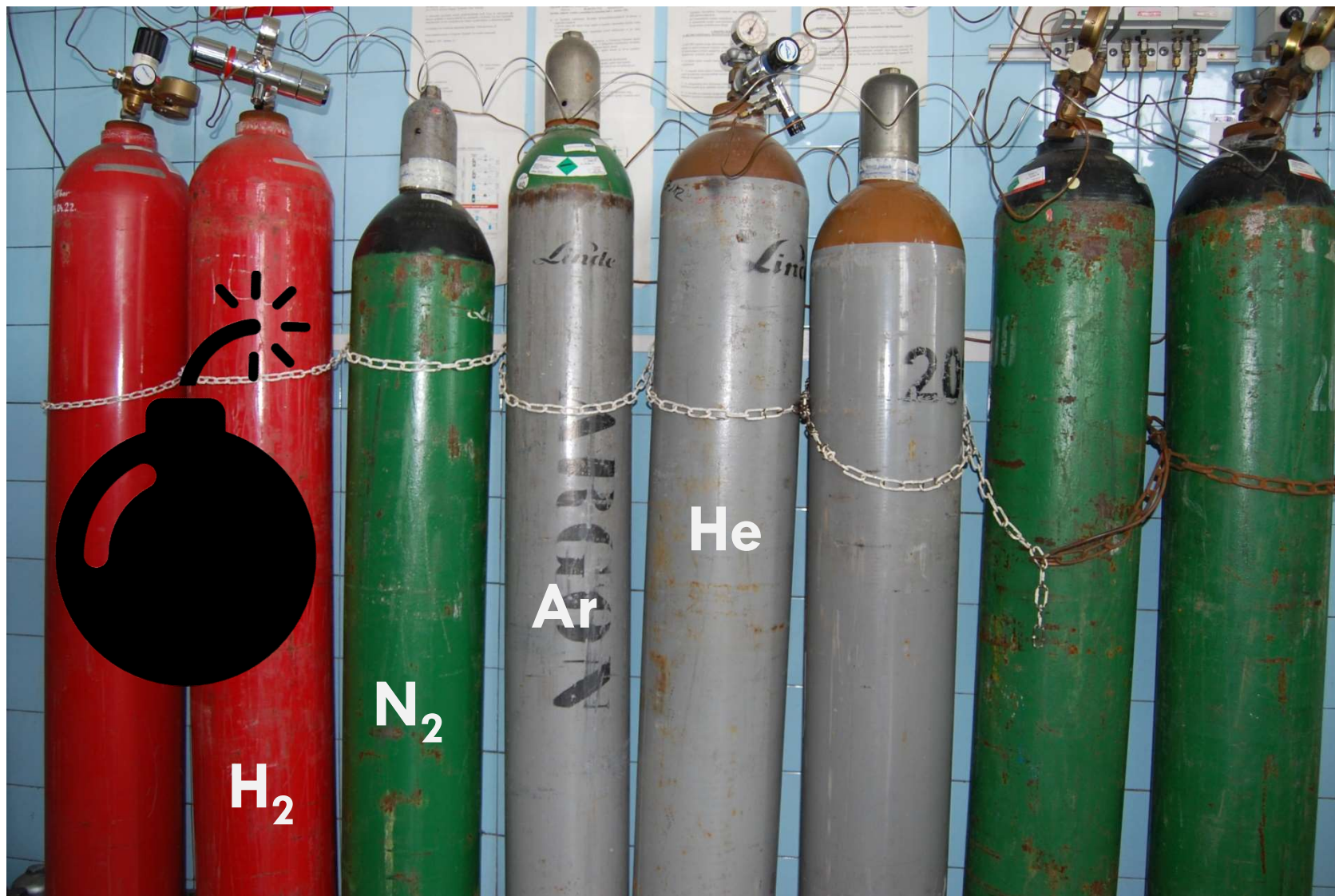
Carbowax 400	(n=9)
Carbowax 600	(n=13)
Carbowax 1000	(n=22)
Carbowax 1500	(n=34)
Carbowax 4000	(n=90)
Carbowax 6000	(n=136)
Carbowax 20M	(n=450)

A glikol egységek oxigén atomja képes H atomot akceptálni, erős kh., nagy visszatartás alkoholokra, pl. metanolra.

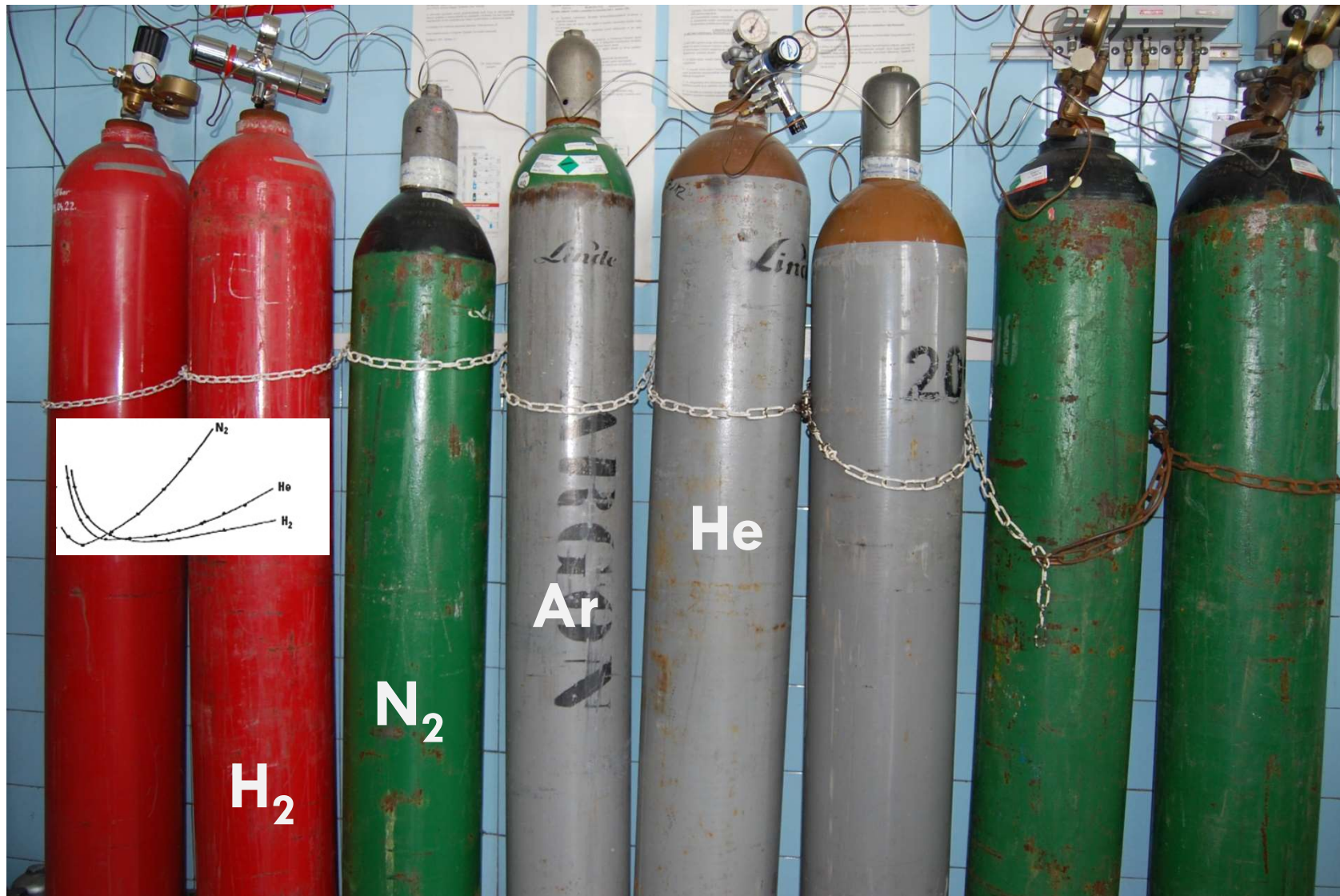


Apoláris komponensek csak diszperzióval képesek a $-\text{CH}_2-$ csoportokhoz kötődni. Különböző polaritásúak, kicsi a visszatartás, rossz a szelektivitás alkánokra nézve.

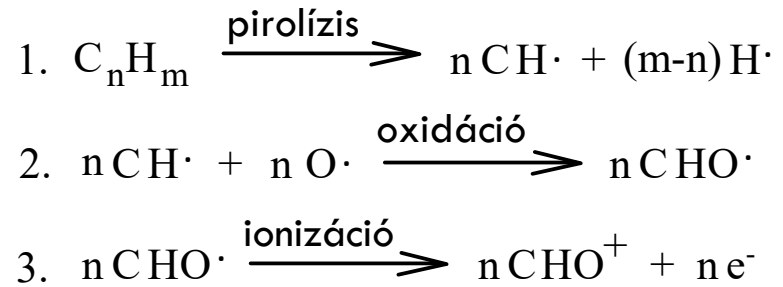
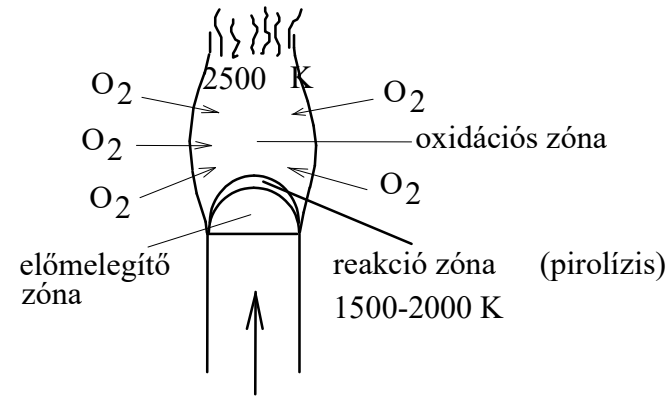
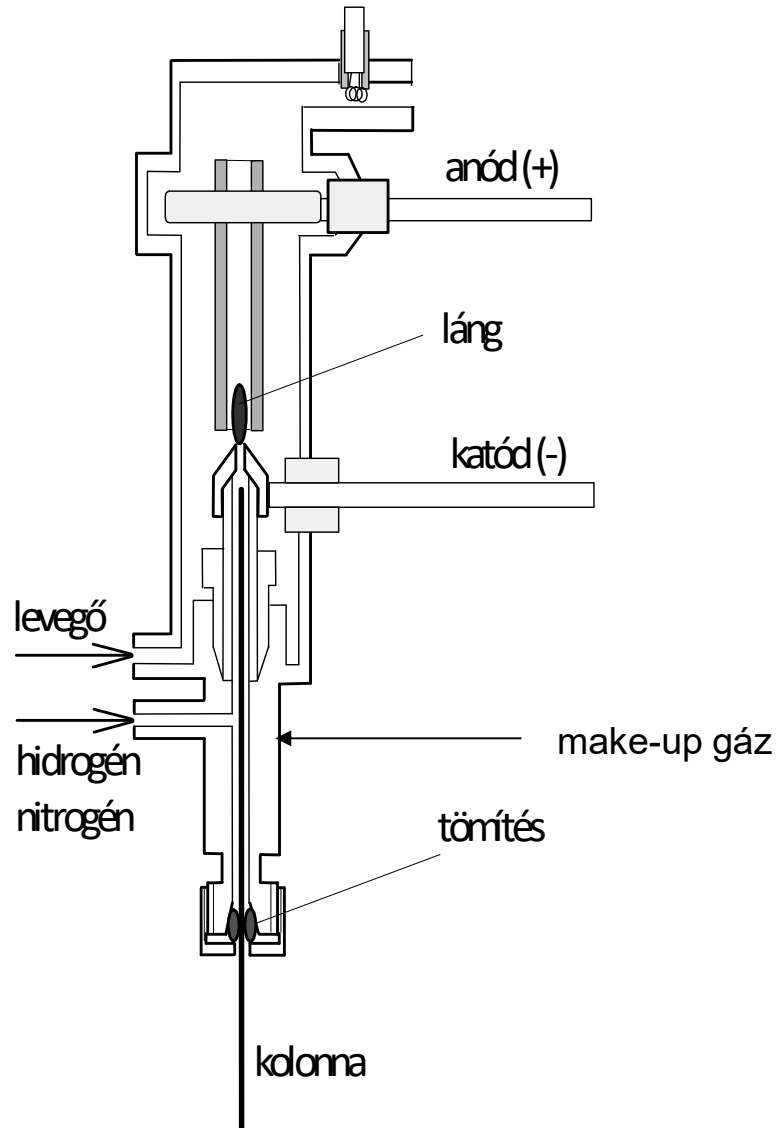
Mozgófázisok (vivőgázok)



Mozgófázisok (vivőgázok)



FID (flame ionization detector): hidrogén láng ionizációs detektor

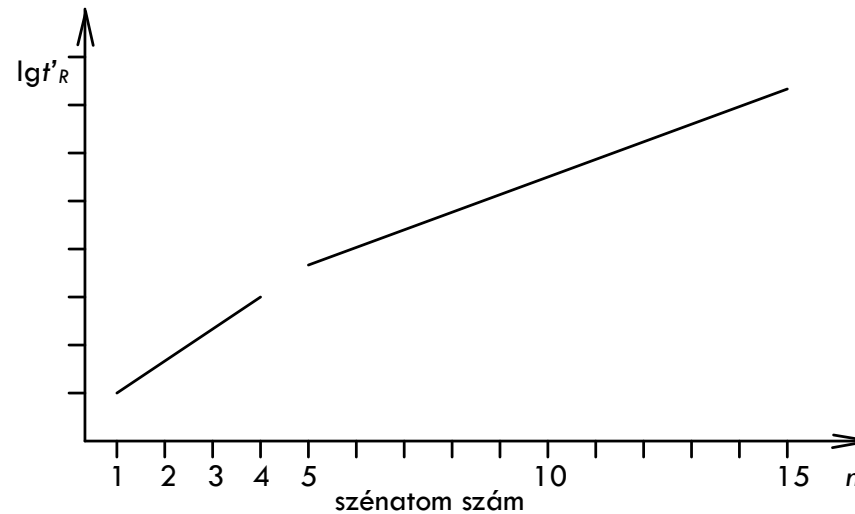
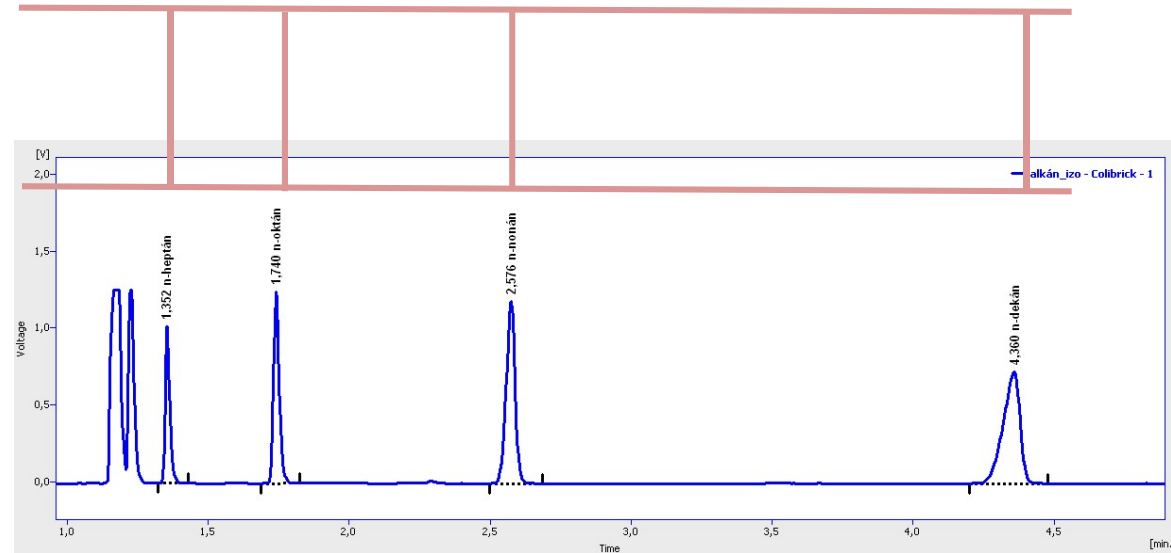


- **CH gyök** produkció eltérő
- ~~hangyasav, formaldehid~~
- **CCl₄** 😊

Minőségi azonosítás „SKÁLA”

retenciós indexekkel, Kováts-féle retenciós indexek

Linearitási törvény



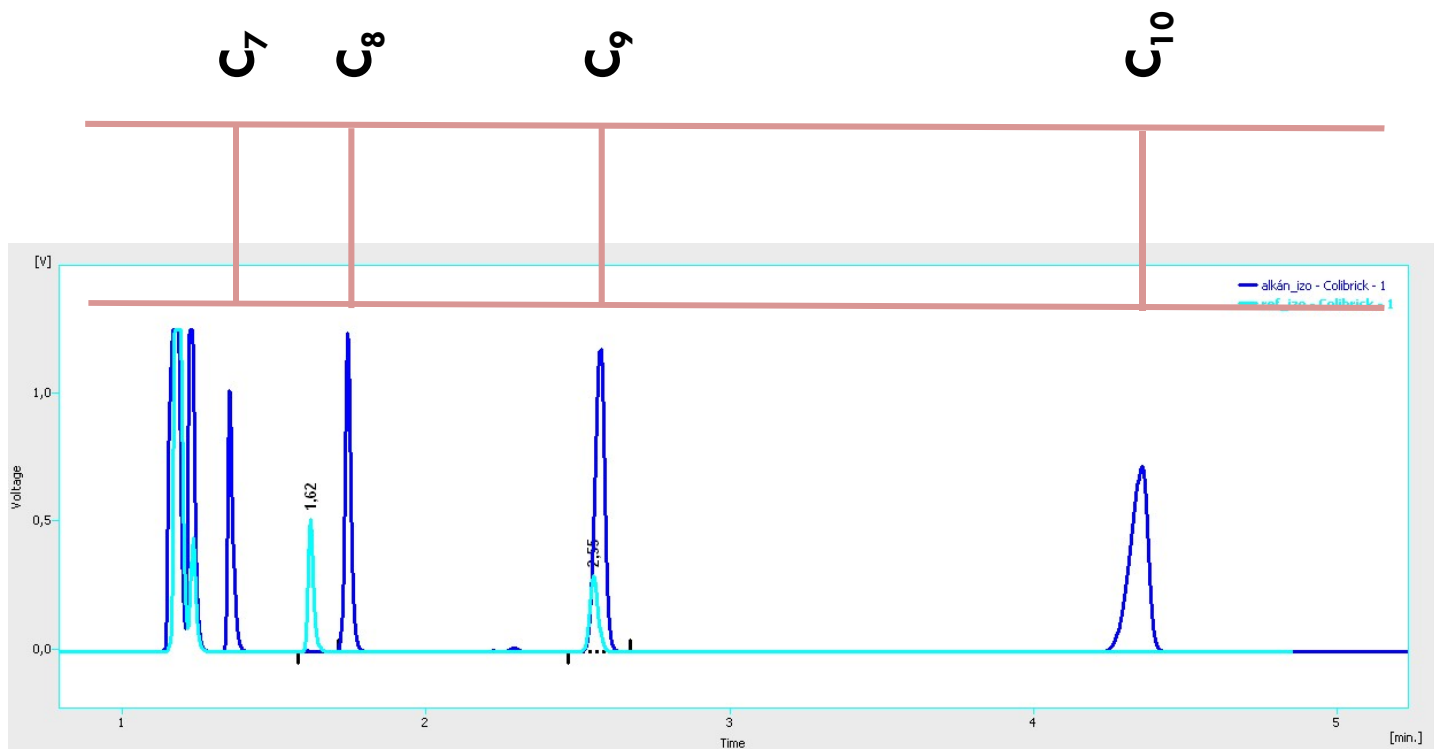
Minőségi azonosítás

retenciós indexekkel, Kováts-féle retenciós indexek

Retencios indexek SE-54 fazison 70 C homersekleter

Nev	RI
i-butyl-acetat	773.3
toluol	774.2
1;1;2-triklor-etan	775.5
dimetil-formamid	782.6
3-hexanol	794.3
ciklopentanon	795.1
2-hexanol	798.1
mezitil-oxid	800.4
terc-pentil-acetat	809.6
2;2-dimetil-1-propil-acetat	812.3
n-butyl-acetat	813.7
tetraklor-etilen	816.5
3-metil-2-butyl-acetat	830.5
etil-ciklohexan	839.2
1-nitro-butan	841.6
diaceton-alkohol	842.7
3-pentil-acetat	848.6
4-metil-2-hexanon	849.2
klor-benzol	852.4
5-metil-2-hexanon	858.4
etil-benzol	866.4
n-hexanol	867.7
m-xilol	873.6
p-xilol	874.0
3-metil-1-butyl-acetat	876.6
2-metil-1-butyl-acetat	879.1
dibutyl-eter	883.1
ciklohexanol	886.4
bromofora	890.2
2-heptanon	891.0
sztirol	894.8
o-xilol	897.1
ciklohexanon	897.4
etilenglikol-monobutyl-eter	906.4
etilcelloszolv-acetat	907.6
n-pentil-acetat	914.3
i-propil-benzol	927.8
3-hexil-acetat	935.6
5-metil-3-heptanon	942.5
3-metil-2-heptanon	945.3
2-hexil-acetat	946.0
n-propil-benzol	955.8
m-etil-toluol	963.7
p-etil-toluol	965.2
n-heptanol	969.8
1;3;5-trimetil-benzol	970.4
2;6-dimetil-4-heptanon	971.0
o-etil-toluol	981.5
terc-butyl-benzol	993.9
1;2;4-trimetil-benzol	994.6

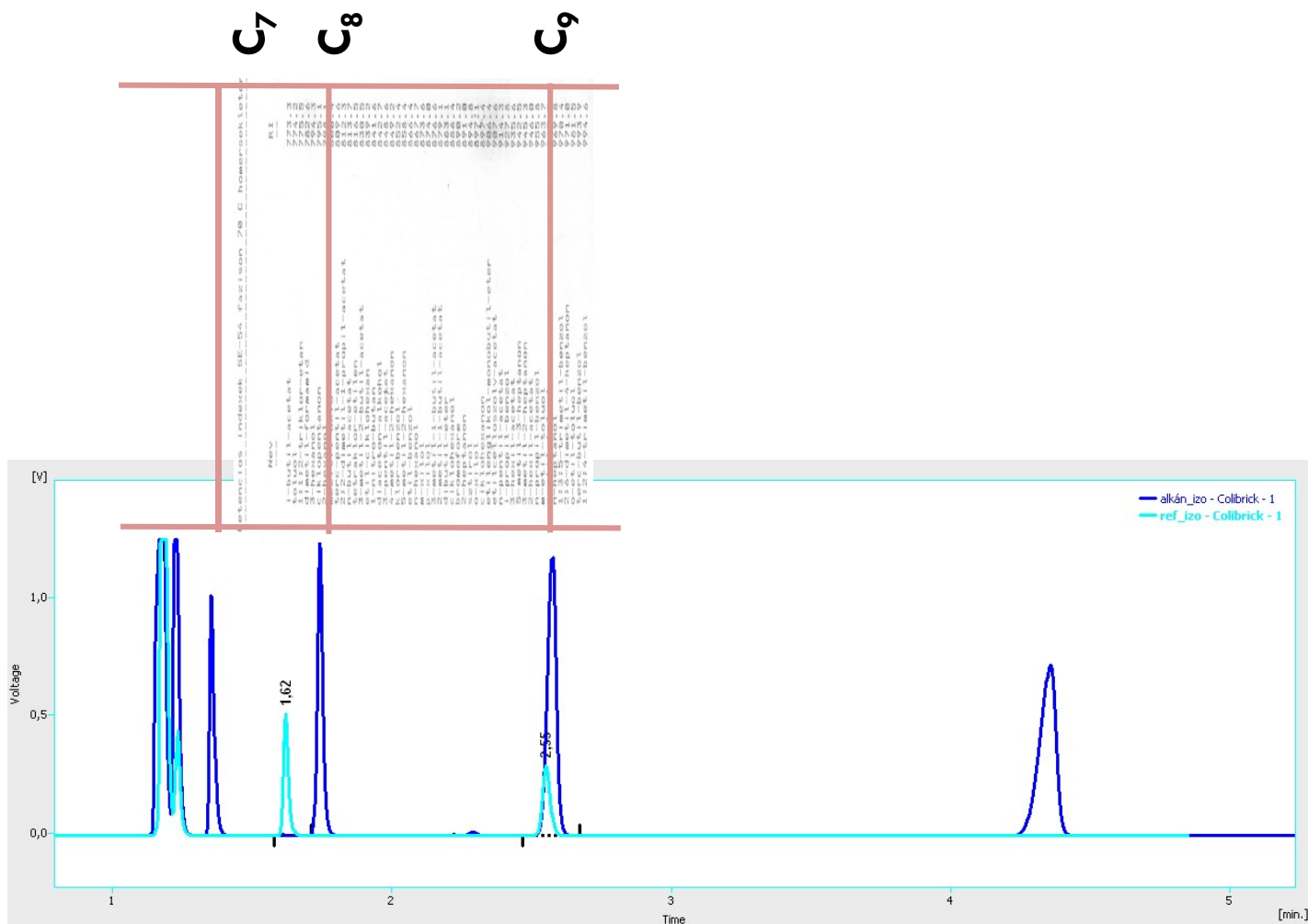
4. Minőségi azonosítás retenciós indexekkel, Kováts-féle retenciós indexek



t_M meghatározása

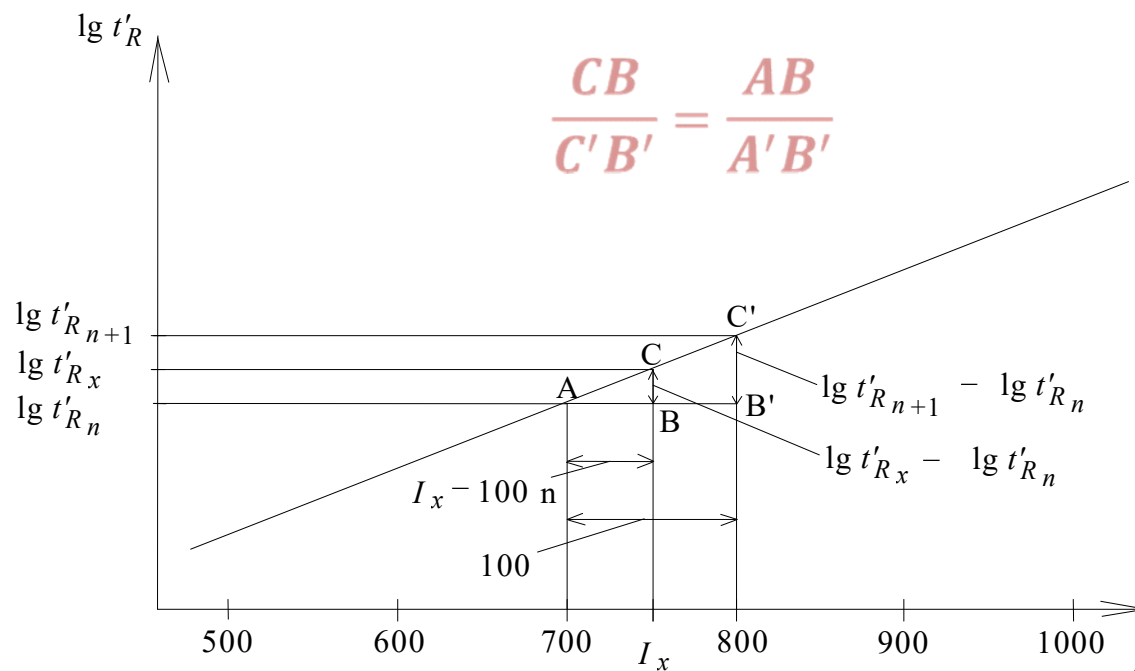
$$t_{R,x} \longrightarrow t_{R,x}' \longrightarrow \lg t_{R,x}' \longrightarrow I_x$$

4. Minőségi azonosítás retenciós indexekkel, Kováts-féle retenciós indexek



Minőségi azonosítás

retenciós indexekkel, Kováts-féle retenciós indexek



$$I_x = 100 \frac{\lg t'_{R,x} - \lg t'_{R,n}}{\lg t'_{R,n+1} - \lg t'_{R,n}} + 100n$$

$$t'_{R,n} < t'_{R,x} < t'_{R,n+1}$$

A mennyiségi elemzés módszerei

Csoportosítás az **érzékenység** felhasználása szerint:

1. kalibráció

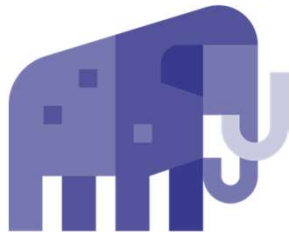
- egypontos
- többpontos

2. addíció

- egypontos
- többpontos

3. belső standard

- egypontos
- többpontos
- komponens addíciós módszer



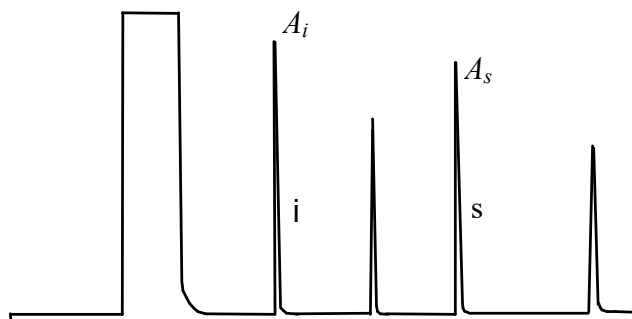
3. Belső standard módszer

A. Egy pontos belső standard módszer

1. Belső standard választása meghatározandó alkotóhoz

1. Mérhető legyen
2. Retenciós ideje hasonló legyen a meghatározandó alkotóhoz
3. Fizikai kémiai tulajdonságai legyenek hasonlóak a vizsgálandó komponenshez → jelképzése a detektorban legyen hasonló

2. Relatív érzékenység meghatározása standardok segítségével; ismert összetételű oldat gázkromatografálása



$$A = a m$$

*ismeretlen
belső std*

$$A_i = a_i m_i$$

$$A_s = a_s m_s$$

$$\frac{A_i}{A_s} = \frac{a_i m_i}{a_s m_s}$$

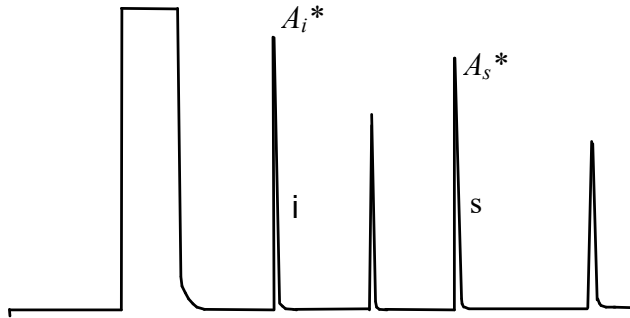
$$f = \frac{A_i m_s}{A_s m_i}$$

f

3. Belső standard módszer

A. Egy pontos belső standard módszer

3. Minta mérése, melyhez ismert mennyiségben adtuk a belső standardot



minta $A_i^* = a_i^* m_i^*$

belső std $A_s^* = a_s^* m_s^*$

$$\frac{A_i^*}{A_s^*} = \frac{a_i^* m_i^*}{a_s^* m_s^*}$$

$f^* = f$

$$m_i^* = \frac{A_i^* m_s^*}{A_s^* f}$$

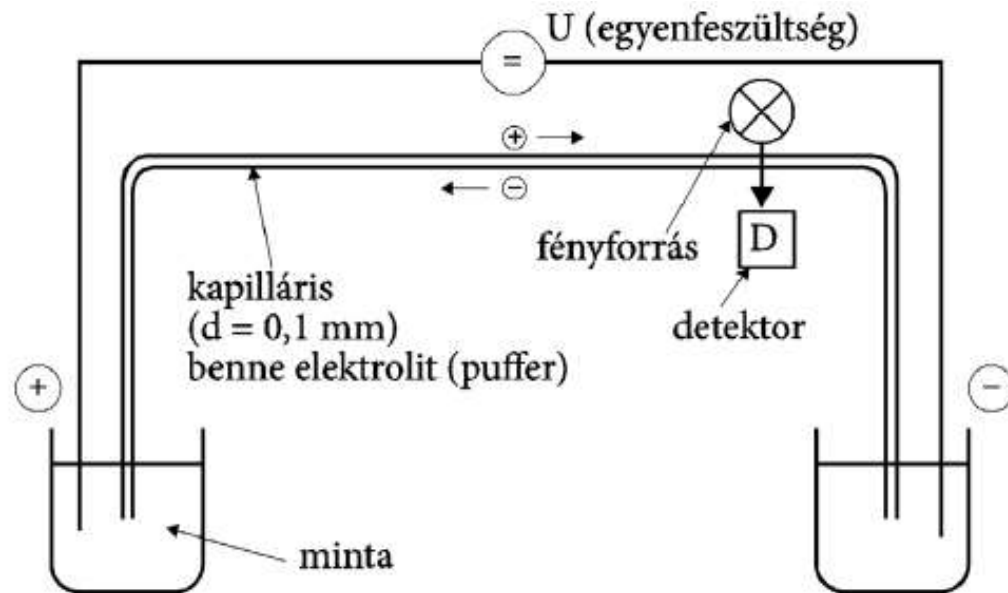
Az eredmény számítása és megadása

$$m_i = \frac{m_s A_i^*}{f_i A_s^*}$$

$$m_{i,x} = \frac{\bar{m}_i}{\eta} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (m_j - \bar{m}_j)^2}{n-1}}$$

m_i ; m_s : tömegek, i a mérendő, s a belső standard
 A_i ; A_s : csúcsterületek, * a mintában mért mennyiség
 f_i : relatív érzékenység
 t : Student-paraméter
 s : korrigált tapasztalati szórás
 n : mérések száma
 η : visszanyerési hatások

Elektroforézis



18.1.1. ábra. Kapilláris elektroforézis berendezés

(A minta felirat a minta helyét mutatja, de a minta bevitelekor a feszültség nincs ráadva a rendszerre. Mérés közben viszont nem a minta, hanem puffer van a bal oldali edényben.)