

# **Folyadékkromatográfiás gyakorlat**

**Bevezető előadás**

**Dr. Tóth Blanka**

**Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék**

2017/2018. tavaszi félév

## **Gyakorlatok helye: Ch. Alagsor és Tanszéki Könyvtár**

**Laborjegy:** beugró zh, jegyzőkönyv minősége alapján +/- 1 jegy

Minden megkezdett hét késésért -1 jegy jár

**Beugró zh.:**

- Analitika I.
- HPLC előadás anyaga (a diasor plusz az elhangzottak!)
- laborleirat

(<http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/anal/AnalLabor/HP LC%20laborleirat.pdf>)

**Gyakorlat témája:**

## **1. Különböző italok koffein tartalmának a meghatározása**

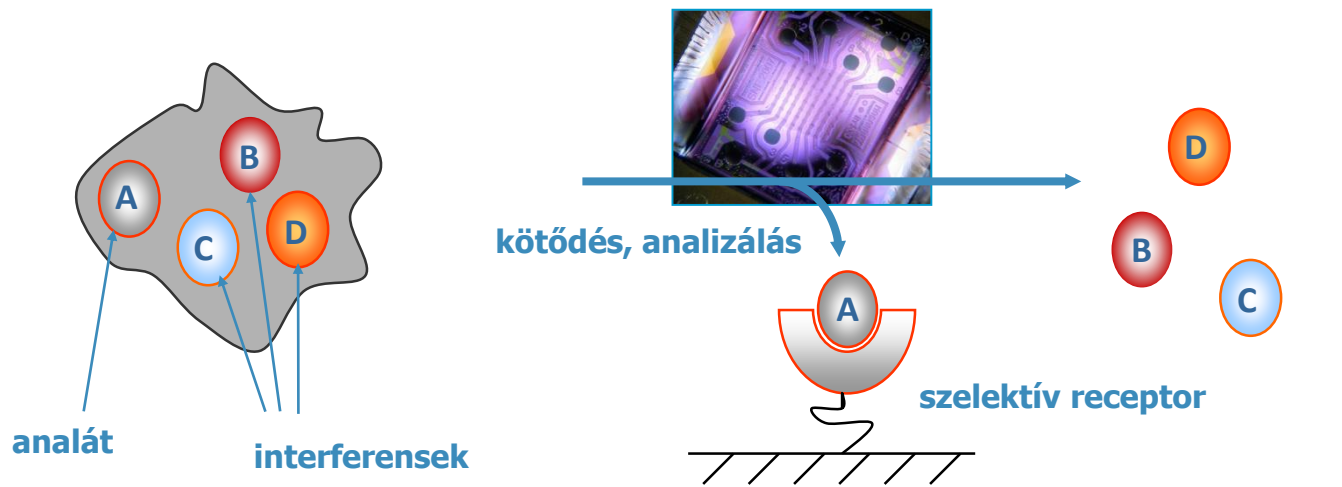
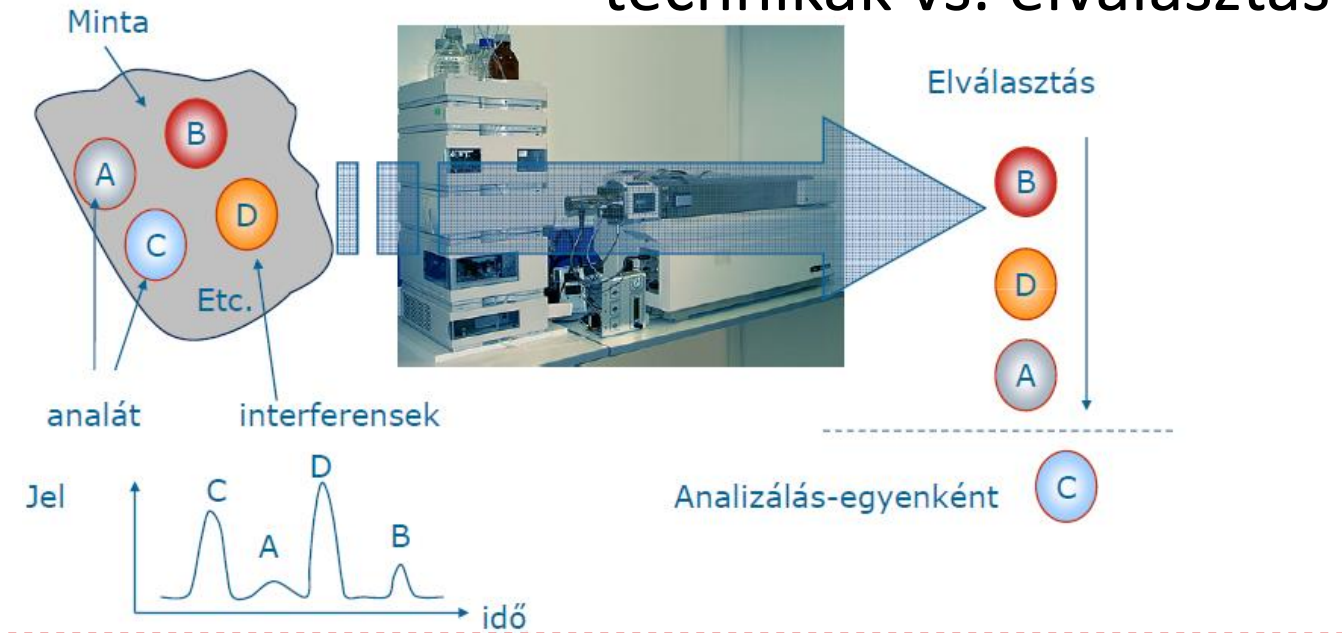
**(kávében, teában: 1 csésze kávéban 80-100 mg koffein)**

## **2. Kromatográfiás paraméterek meghatározása**

Bemutatott eszközök:

Folyadékkromatográf: Pumpa, Injektor, HPLC oszlop, UV detektor, adatfeldolgozó szoftver

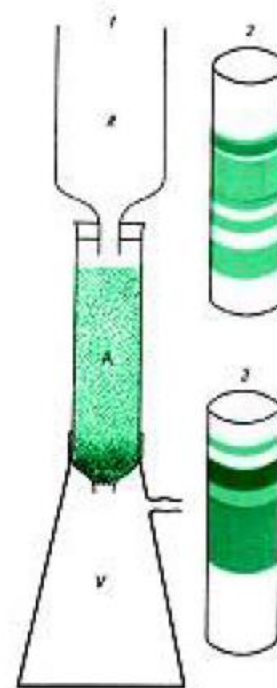
# Nem-szelektív, elválasztáson alapuló mérési technikák vs. elválasztás nélküli, szelektív módszerek



# Cvet, az első kromatográfus



Russian Botanist  
Mikhail Tswett (1872-1919)



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

# GC összehasonlítása HPLC-vel I.



Tipikus GC kapilláris oszlop  
30 m x 0,25 mm i.d.



Tipikus HPLC oszlop  
15 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m

## Meghatározható anyagok

- illékonyság (250°C alatt megfelelő tenzió)
- derivatizálás hibát vihet be a kvantitatív mérésbe
- molekulatömeg: < 500 Da
- oldékonyság a mozgófázisban
- széles polaritási tartomány, ionos vegyületek is elemezhetők
- molekulatömeg: nincs felső korlát, fehérjék is

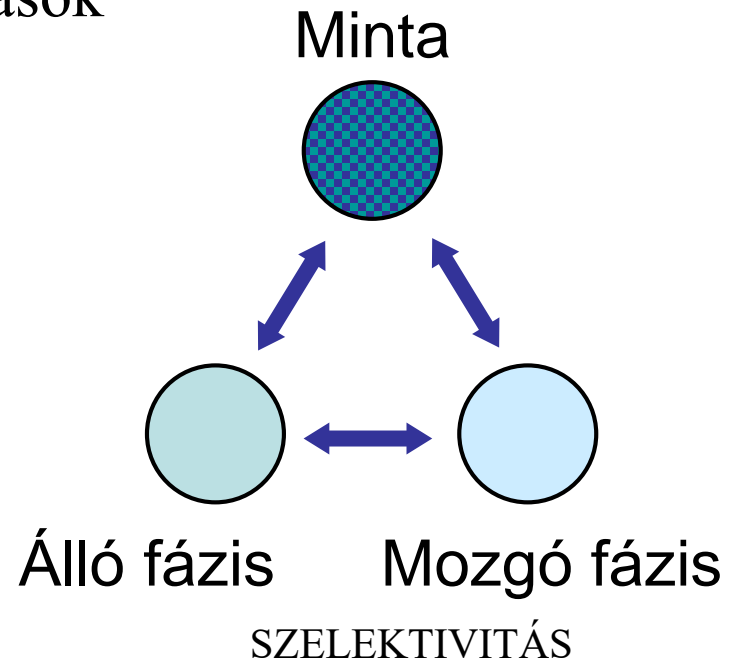
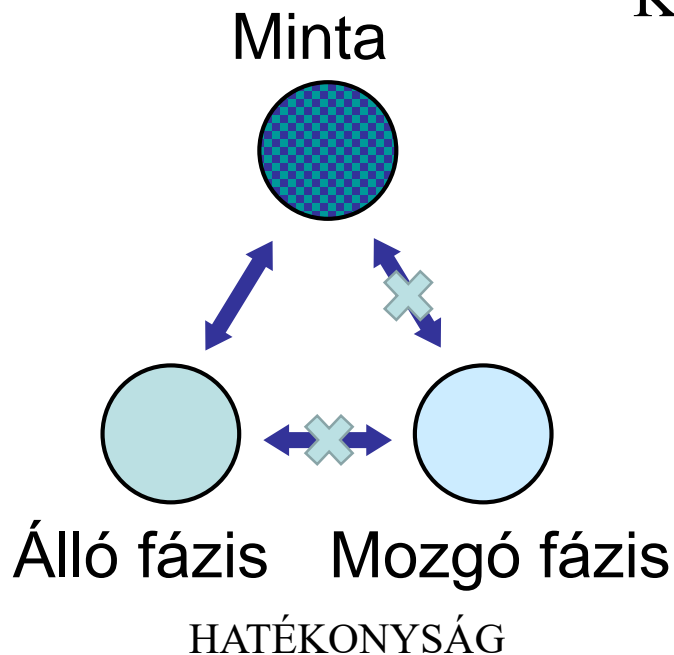
# GC összehasonlítása HPLC-vel II.

## Körülmények

magas hőmérséklet (akár 350°C)  
→ hőstabilitás  
sok GC detektor (pl. FID) destruktív  
tipikus érzékenység: ng-pg

szobahőmérséklet (80°C-ig)  
az UV detektor nem destruktív  
tipikus érzékenység: ng

## Kölcsönhatások



# Kromatográfiás paraméterek:

*Bruttó retenciós idő*

$$t_R \text{ [min]}$$

*Holtidő*

$$t_M, t_o \text{ [min]}$$

*Redukált retenciós idő (az állófázisban eltöltött idő)*

$$t'_R = t_R - t_M$$

*Kolonnahossz*

$$L \text{ [m]}$$

*Lineáris áramlási sebesség*

$$u \text{ [cm/s]}$$

*Megoszlási hányados*

$$K = C_s / C_m$$

*Retenciós tényező*

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{n_s}{n_m}$$

*Csúcshélesség (alapvonal)*

$$w / t_R$$

*Relatív csúcshélesség*

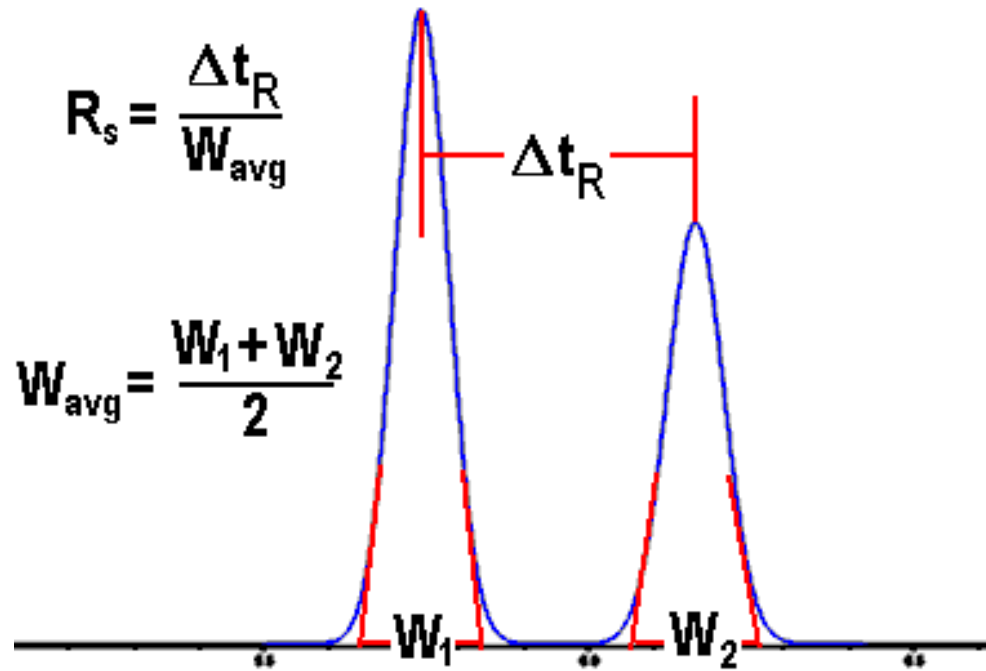
*Tányérszám*

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

*Elméleti tányérmagasság*

$$H = \text{HETP} = L / N$$

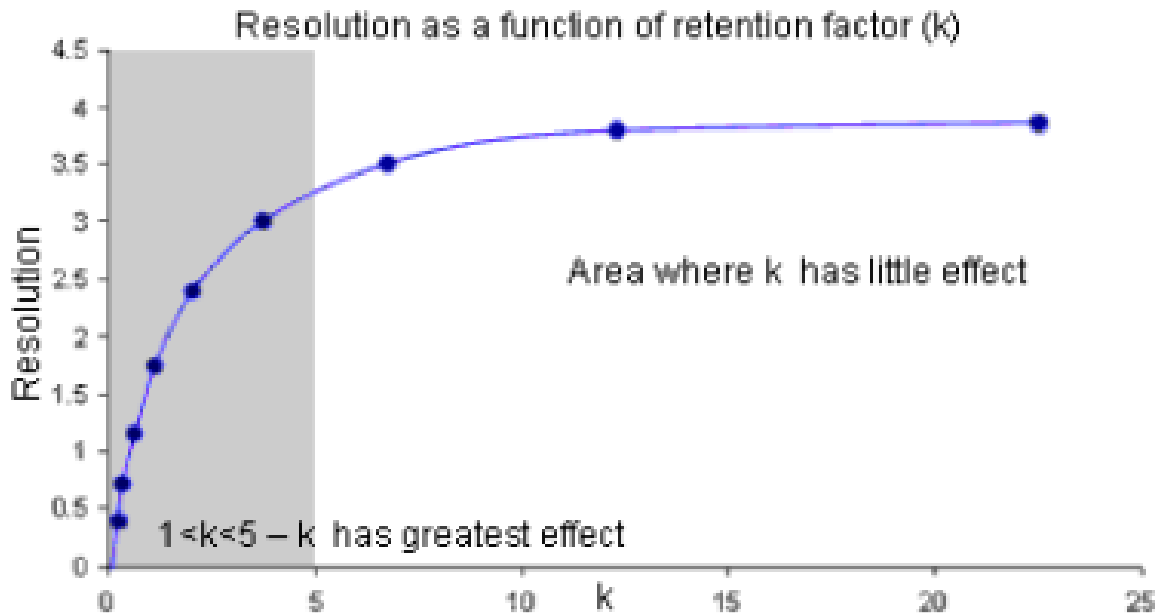




$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k + 1} \geq 1,5$$

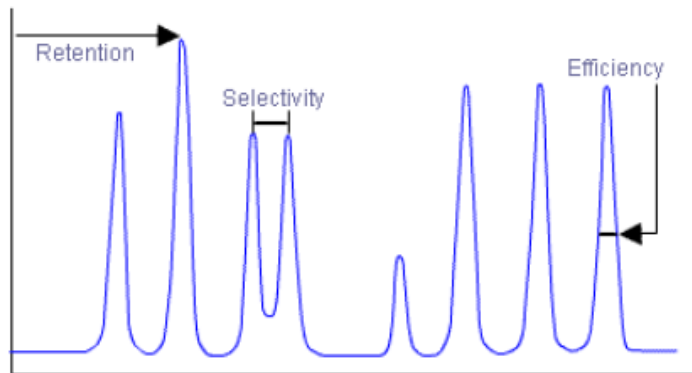
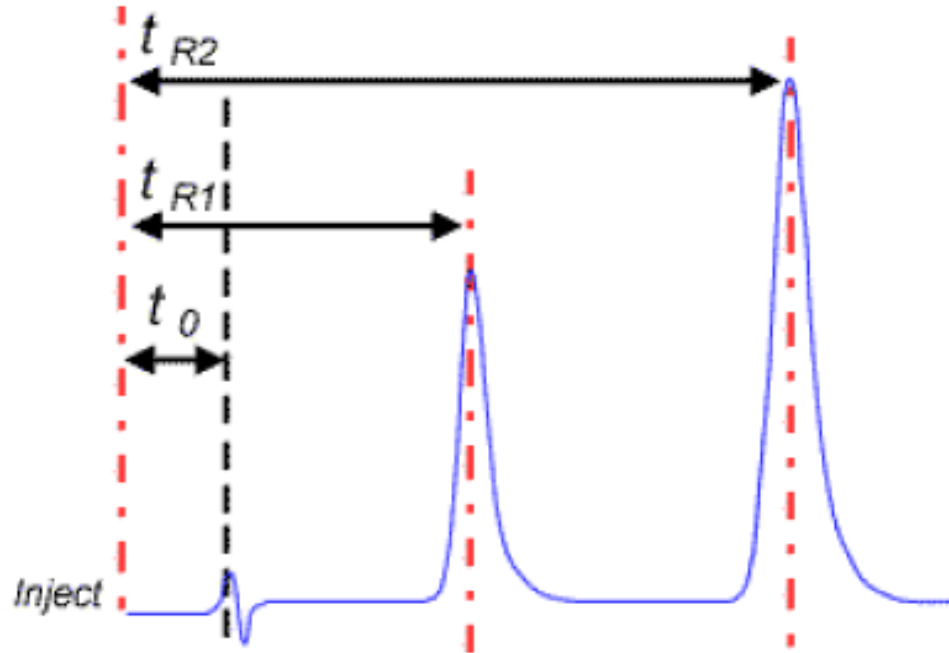
# Hogyan befolyásolja az elválasztást a retenciós tényező?

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



$$1 < k < 10$$

# Szelektivitás



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

# 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

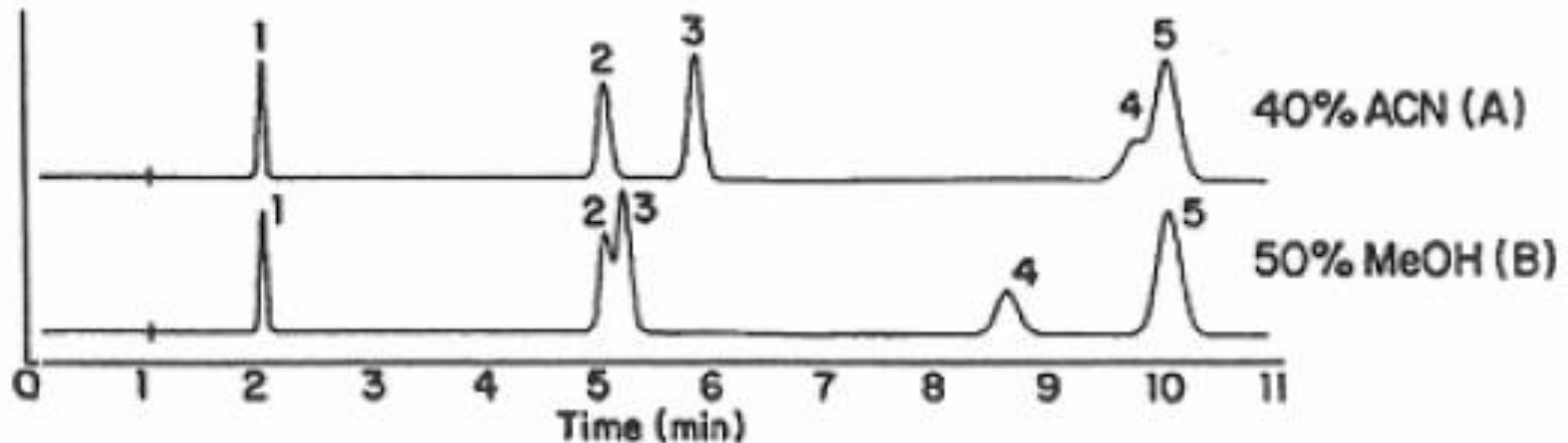
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

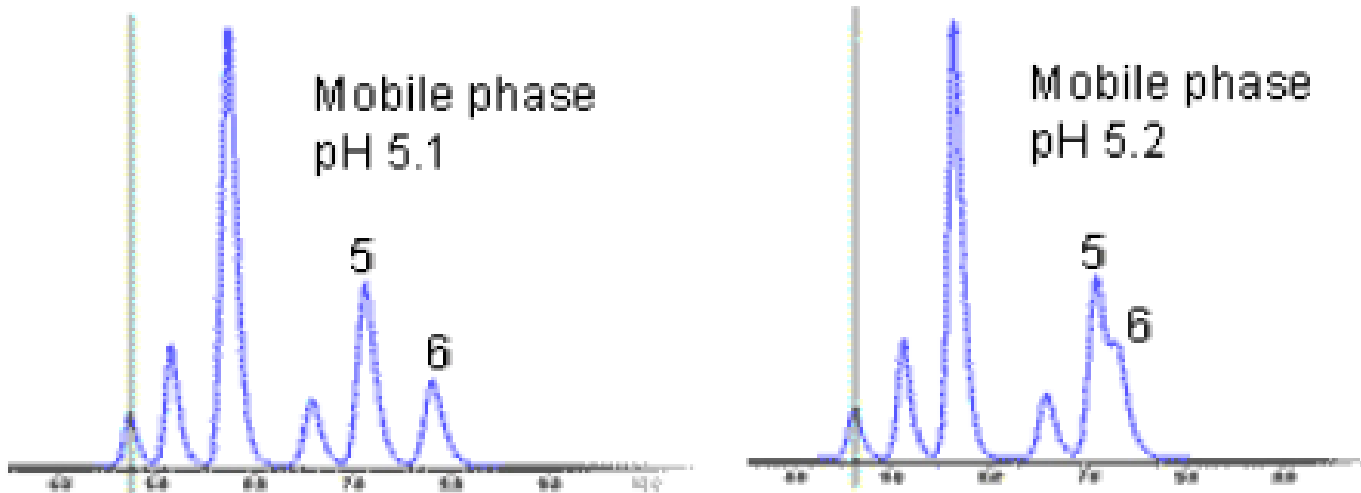
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

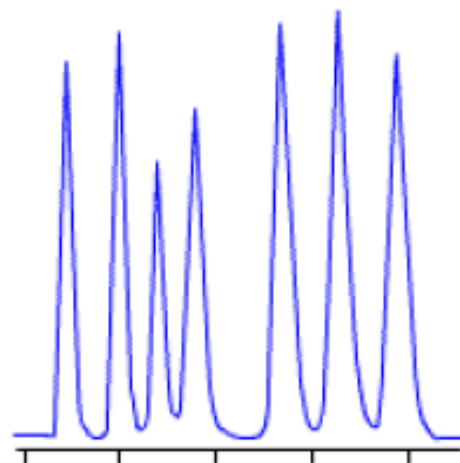
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

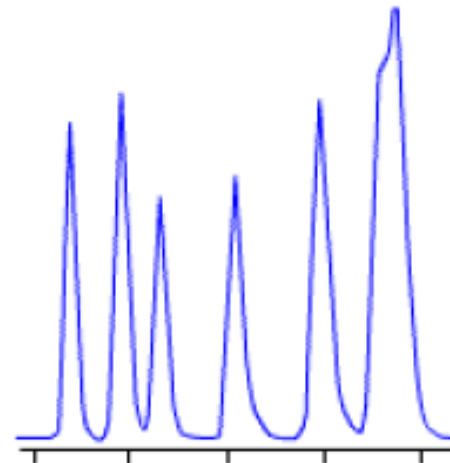
Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet



Mobile phase octane  
sulphonic acid conc.: 57mM



Mobile phase octane  
sulphonic acid conc.: 60mM

# Hogyan befolyásolhatjuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

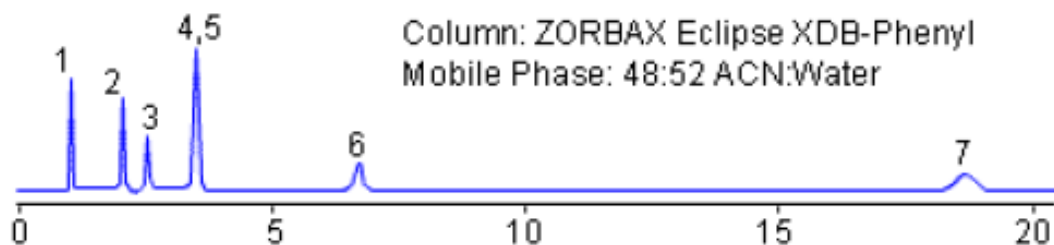
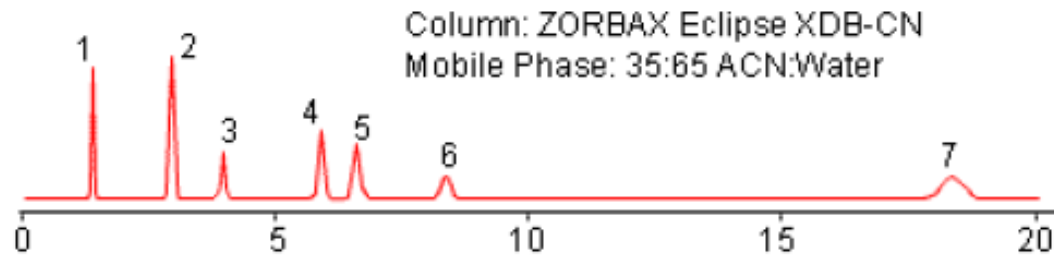
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet





# Hogyan befolyásoljuk az elválasztást a szelektivitással?

## Paraméter

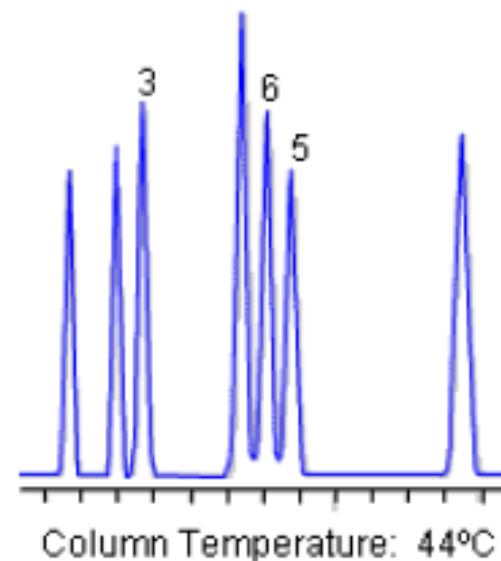
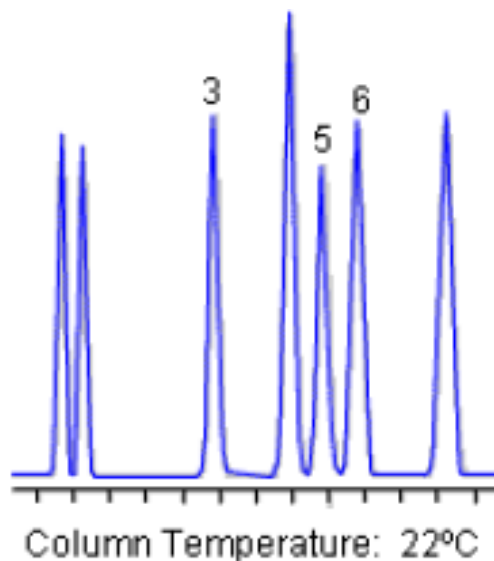
Szerves oldószer típusa

Mozgófázis pH-ja

Eluens erősség és adalékok

Állófázis

Hőmérséklet

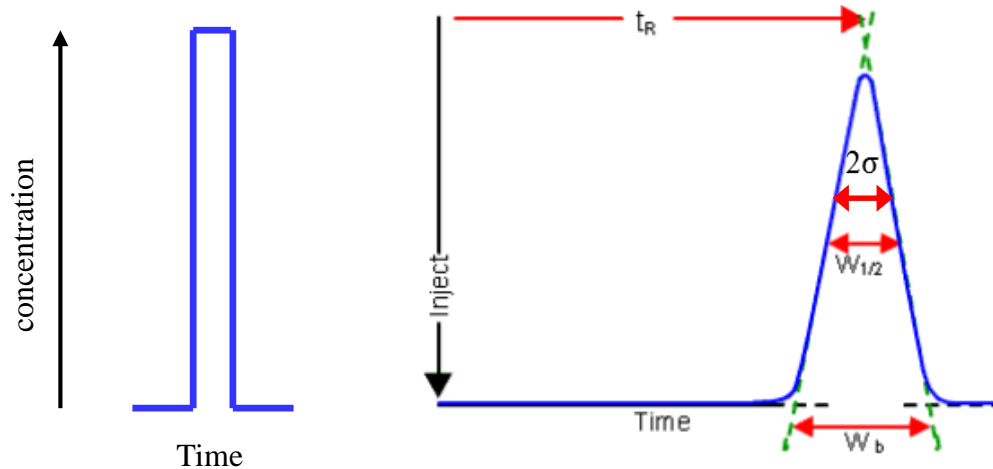


# Hogyan befolyásolja az elválasztást a szelektivitás?

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

- Ha  $\alpha = 1$ , nincs elválasztás
- Ha  $\alpha$  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  $K_1$ .
- 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.

# Hatékonyság



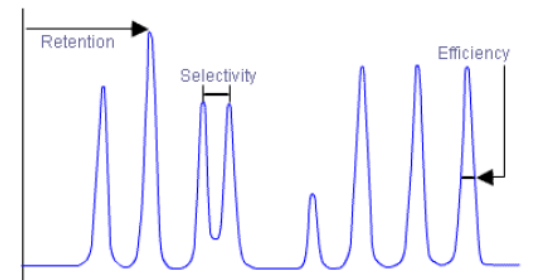
zónaszélesedés v.  
zónadiszperzió

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

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

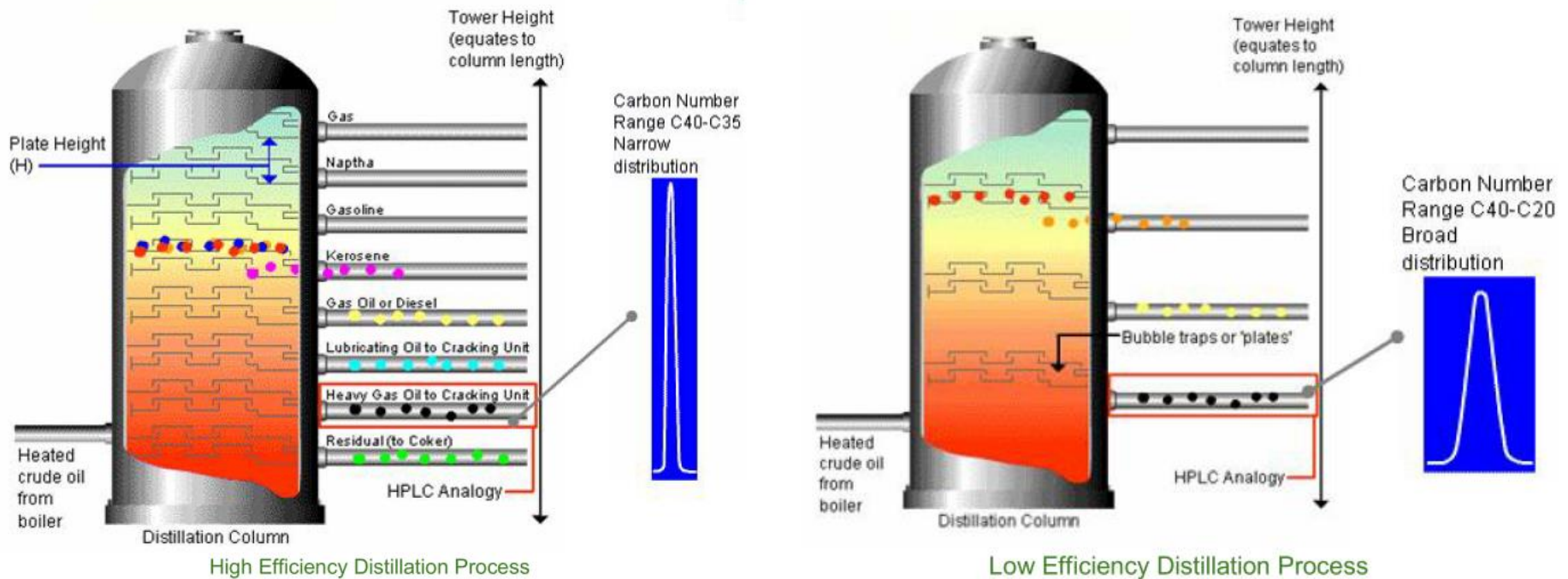
$$w_b = 4\sigma$$

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



# Hatékonyság

Elméleti tányérszám: analógia frakcionált desztilláció



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

$H$  elméleti tányérmagasság HETP height equivalent to a theoretical plate  
 $L$  oszlop hossza

# Mi befolyásolja a zónaszélesedést?

## Oszlop:

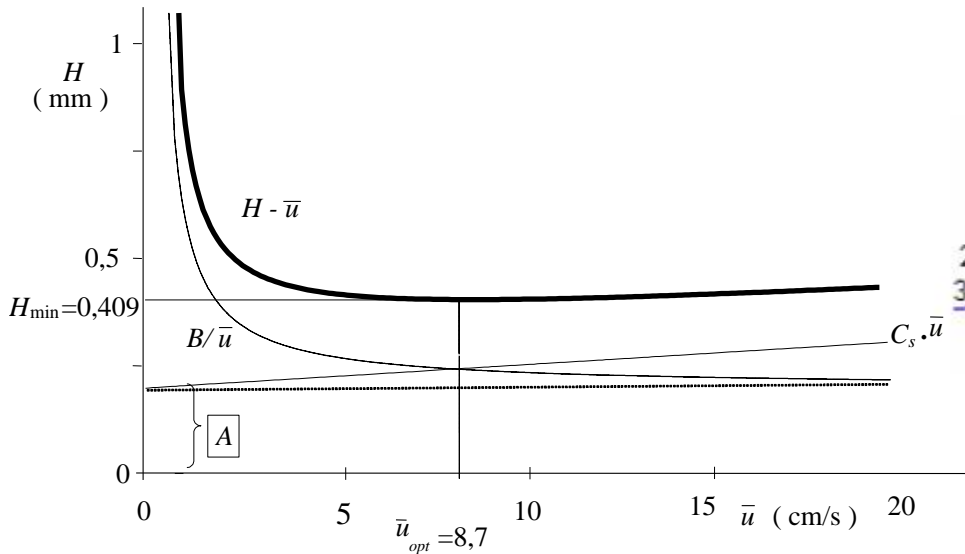
- oszlop hossza ( $N=L/H$ )
- részecskeméret ( $H_{\min} \sim 2d_p$ )
- állófázis minősége és felületi fizikai-kémiai tulajdonsága
- oszloptöltés minősége, esetleges holtterek

## Oszlopon kívüli tényezők:

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

# van Deemter egyenlet (HPLC kolonnákra és töltött GC oszlopra!)

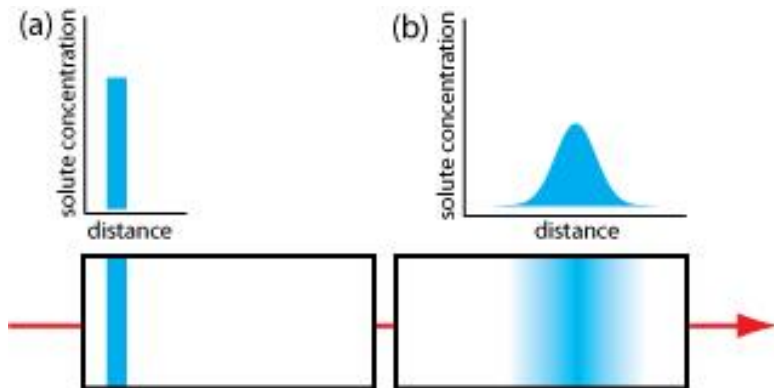
$$H = A + B/u + C_s u$$



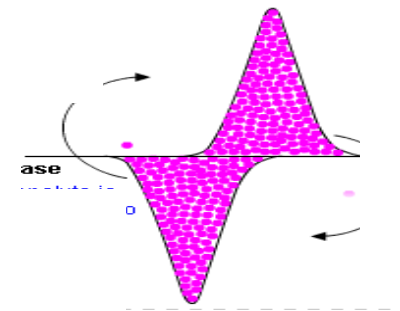
„A” tag: eddy (angolul örvény) „diffúzió”



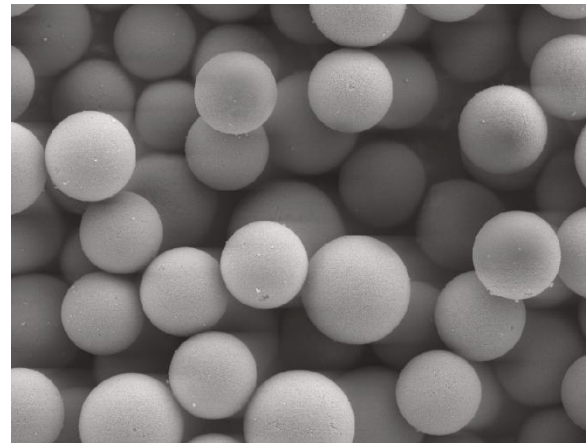
„B” tag: lineáris diffúzió



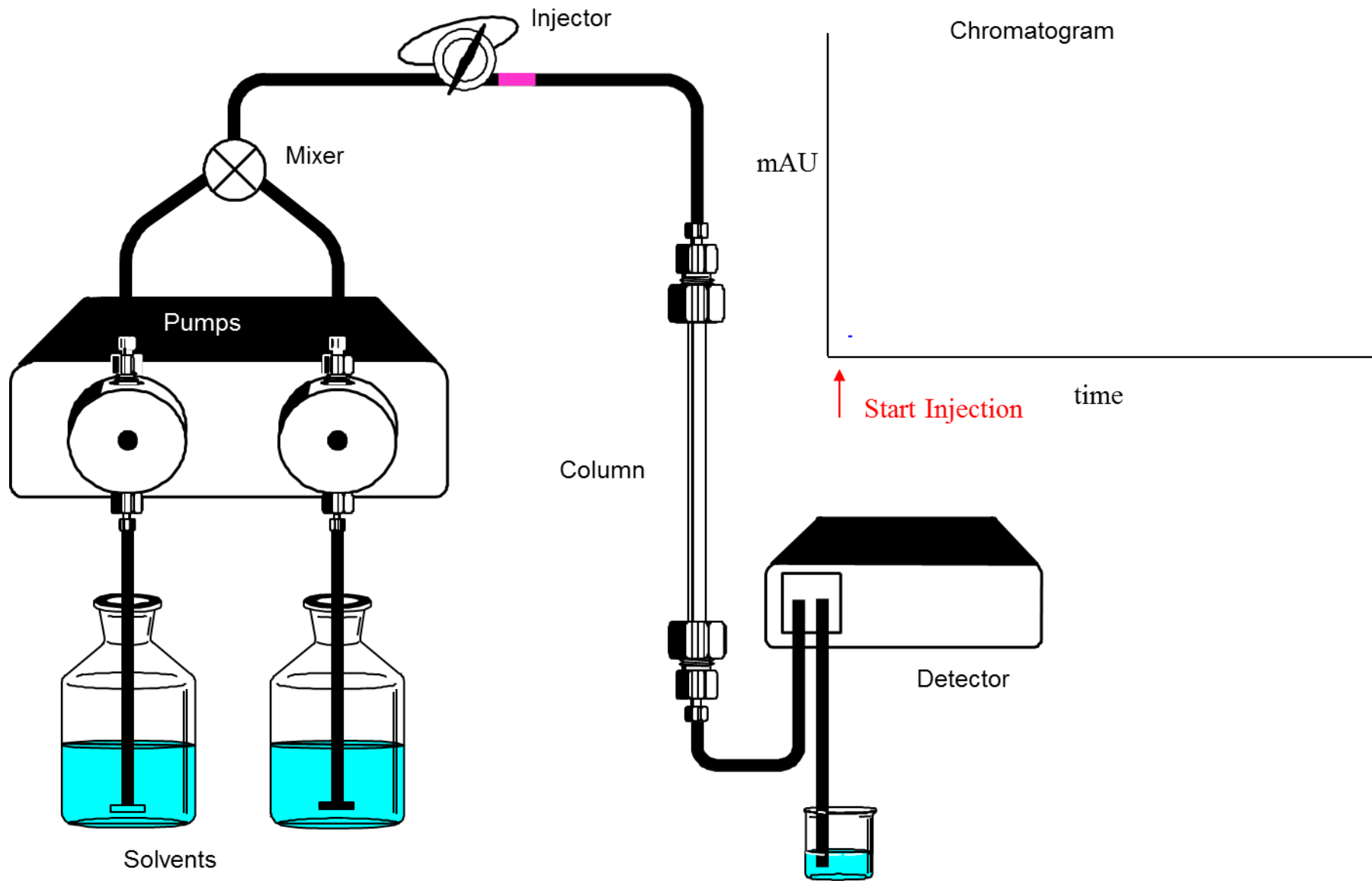
„C<sub>s</sub>” tag: állóf. → mozgóf. anyagátmenet ellenállása

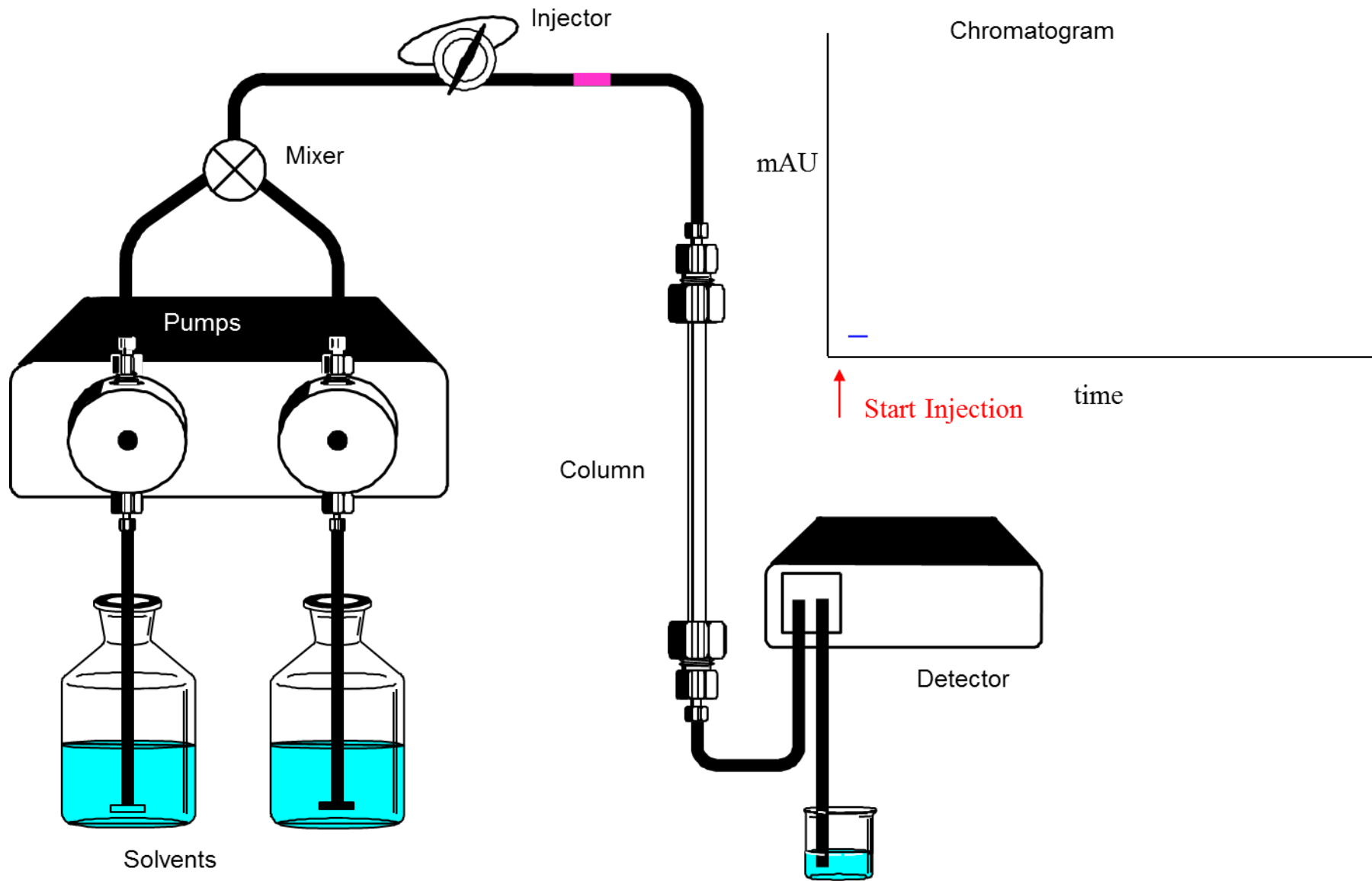


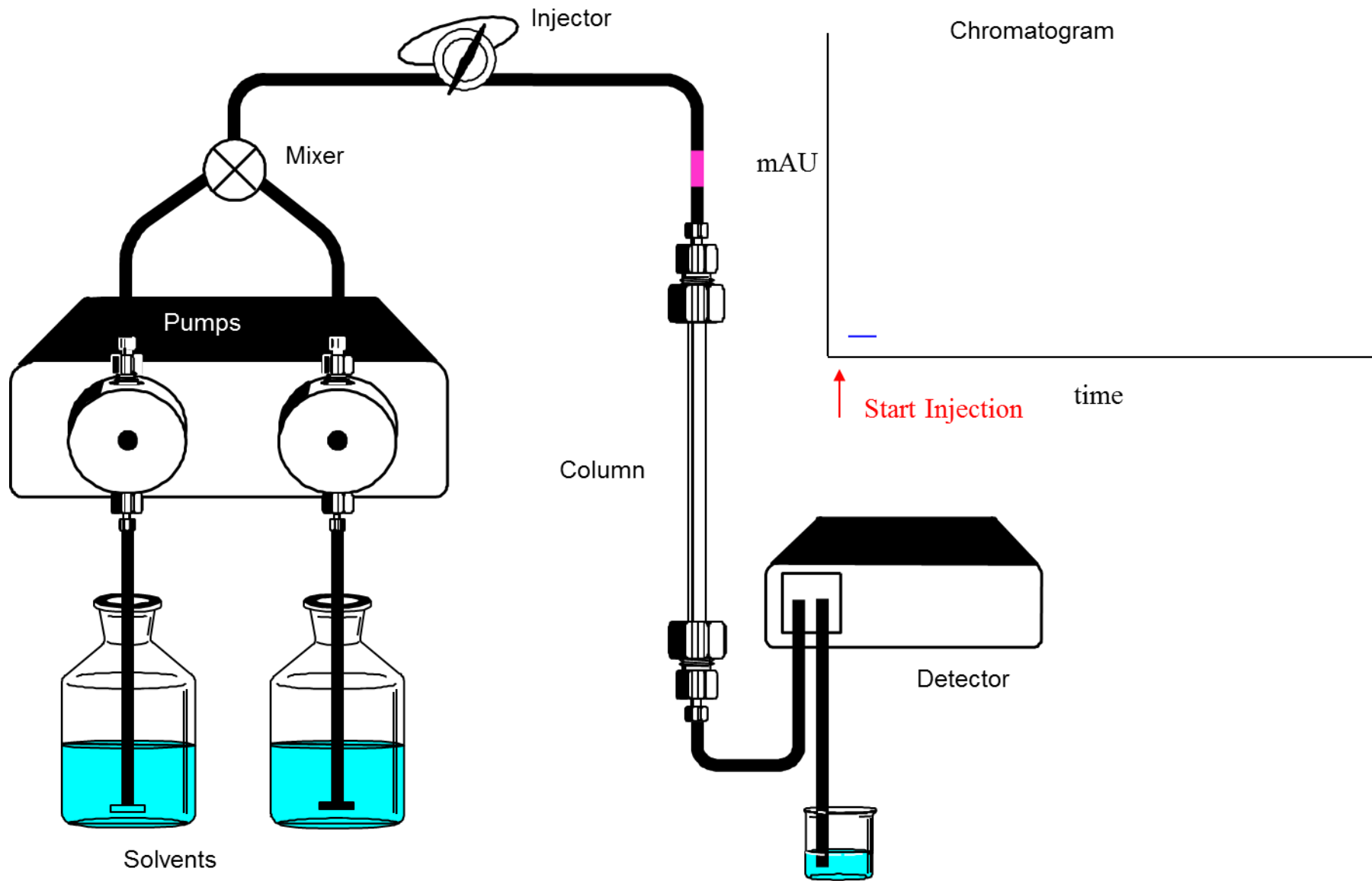


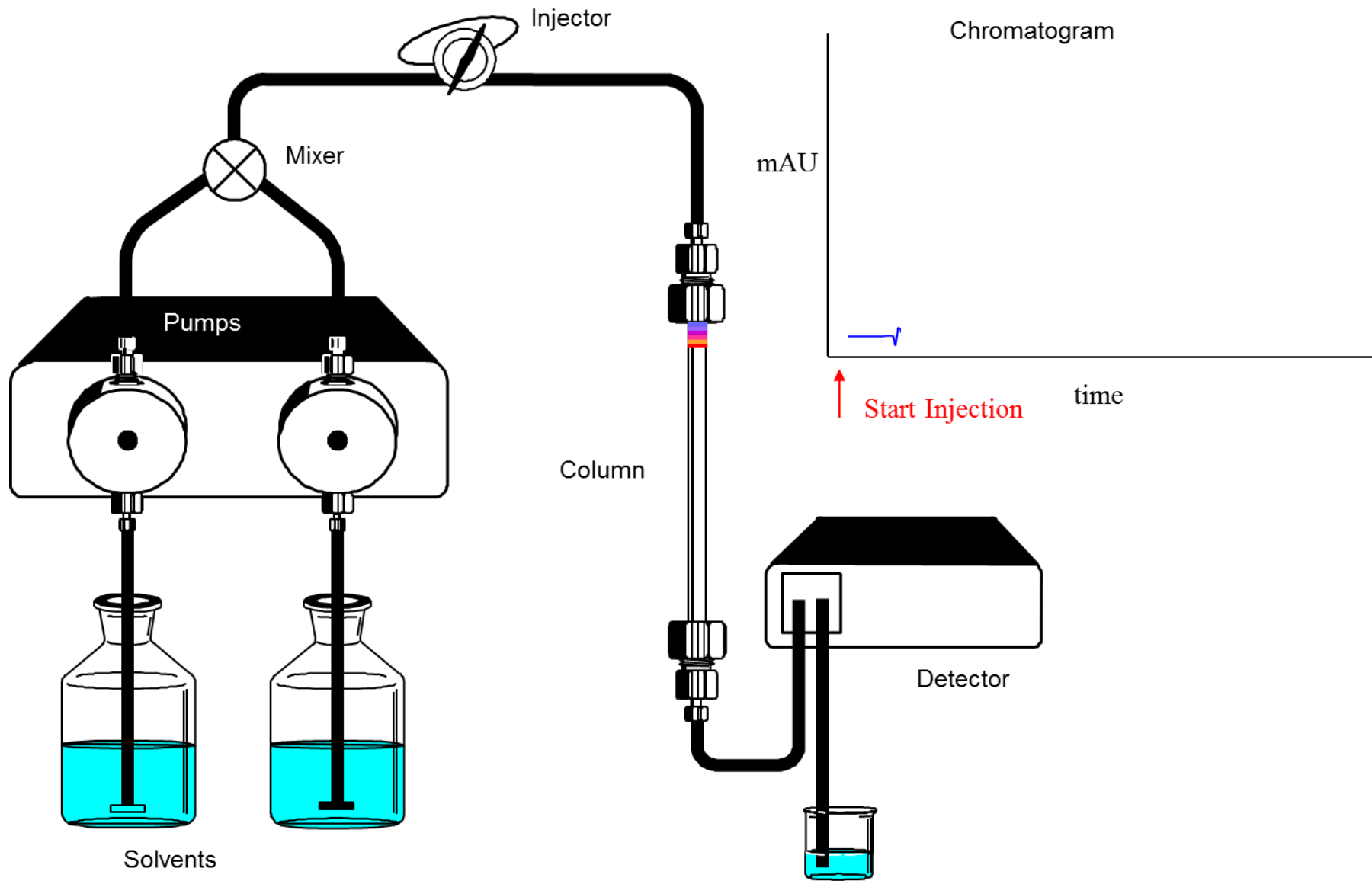


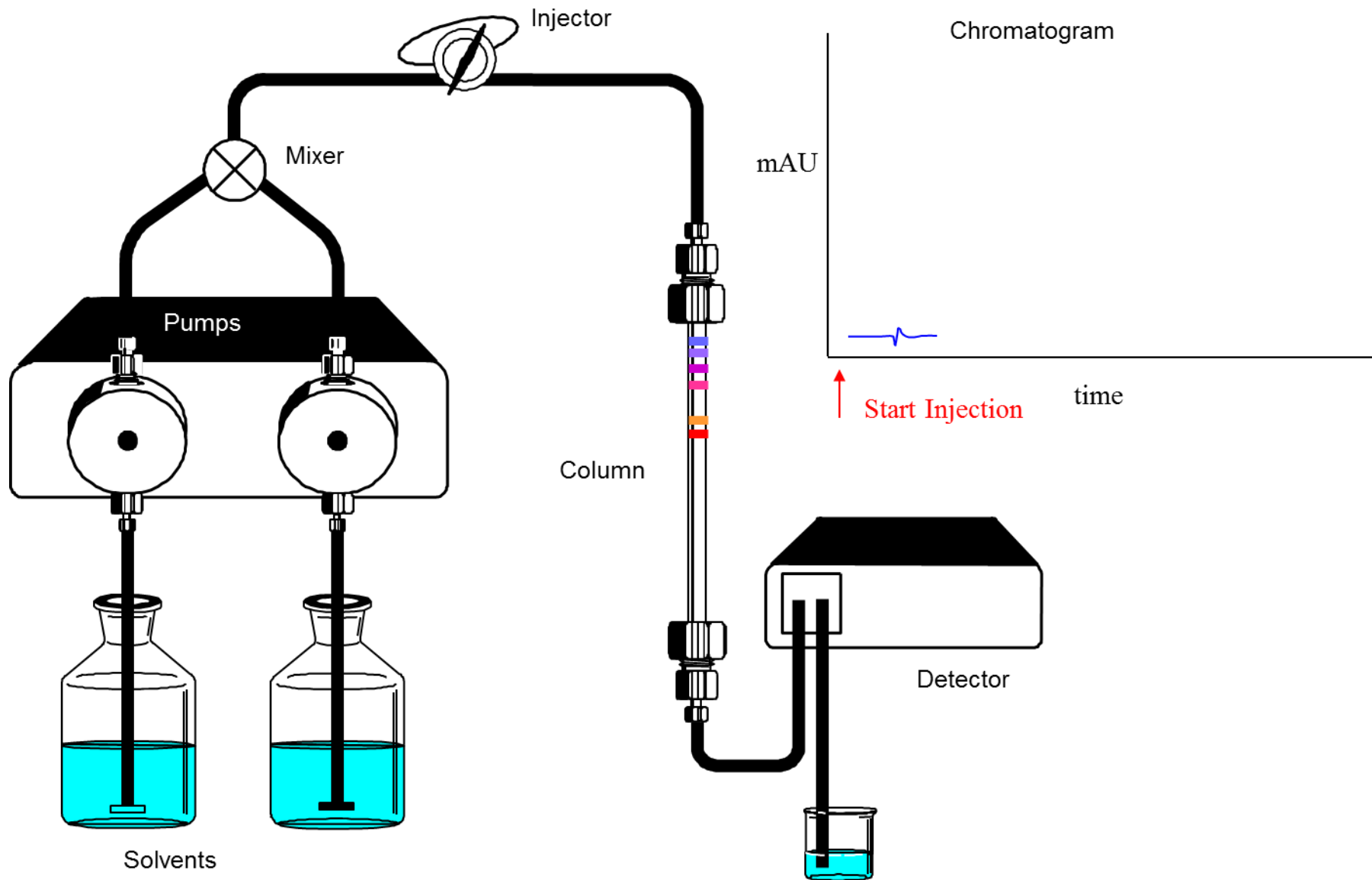


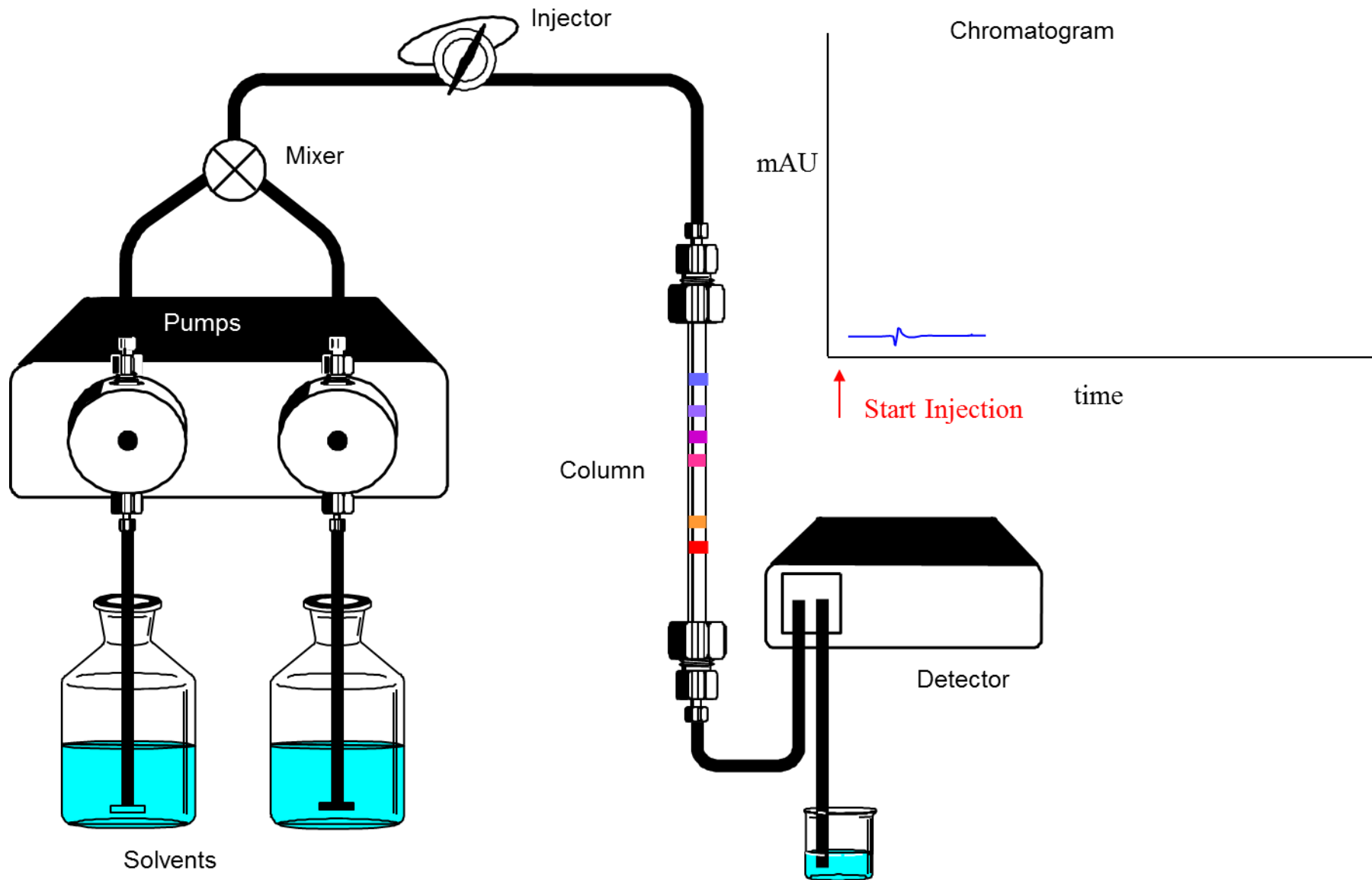


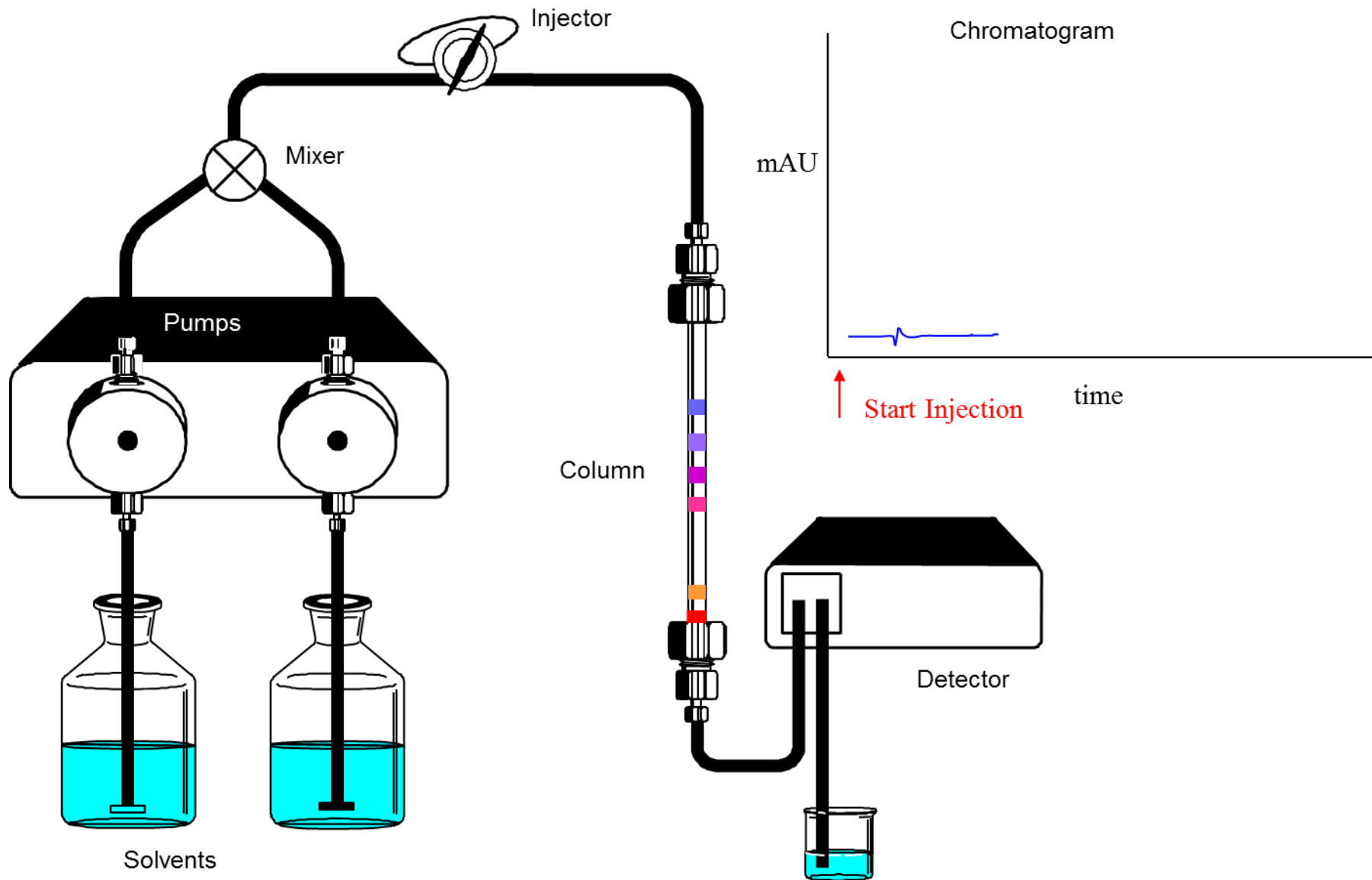


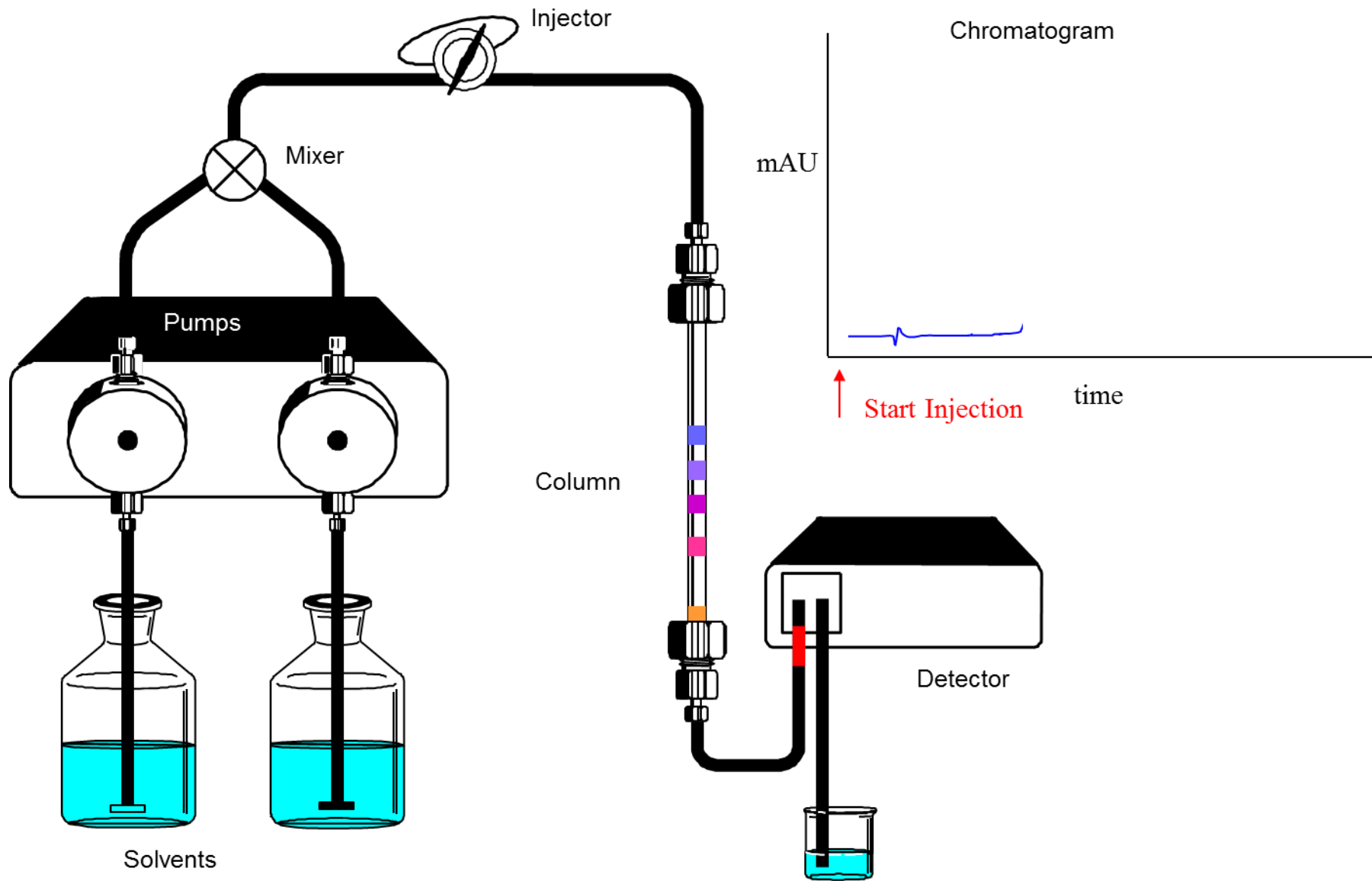




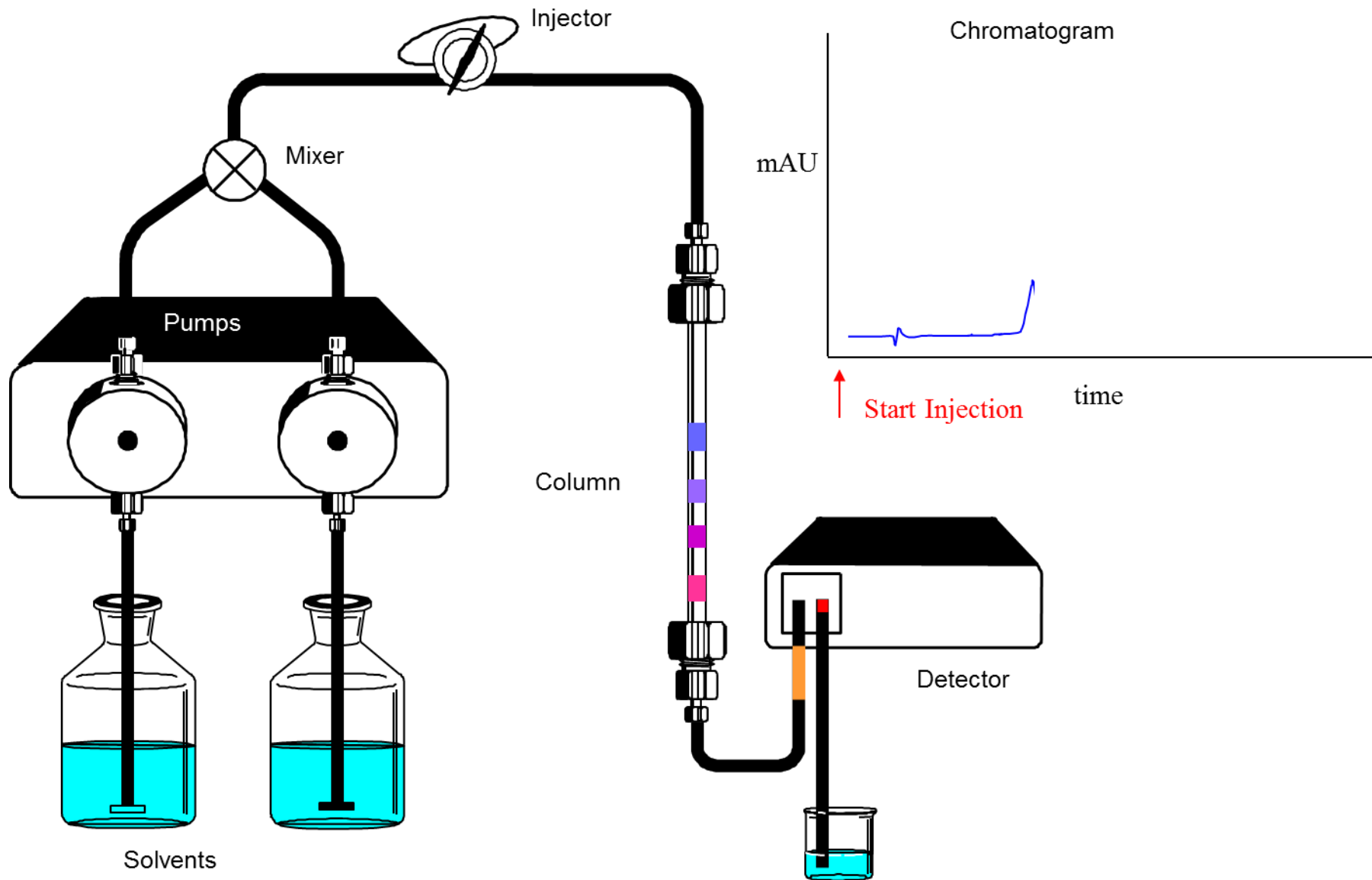


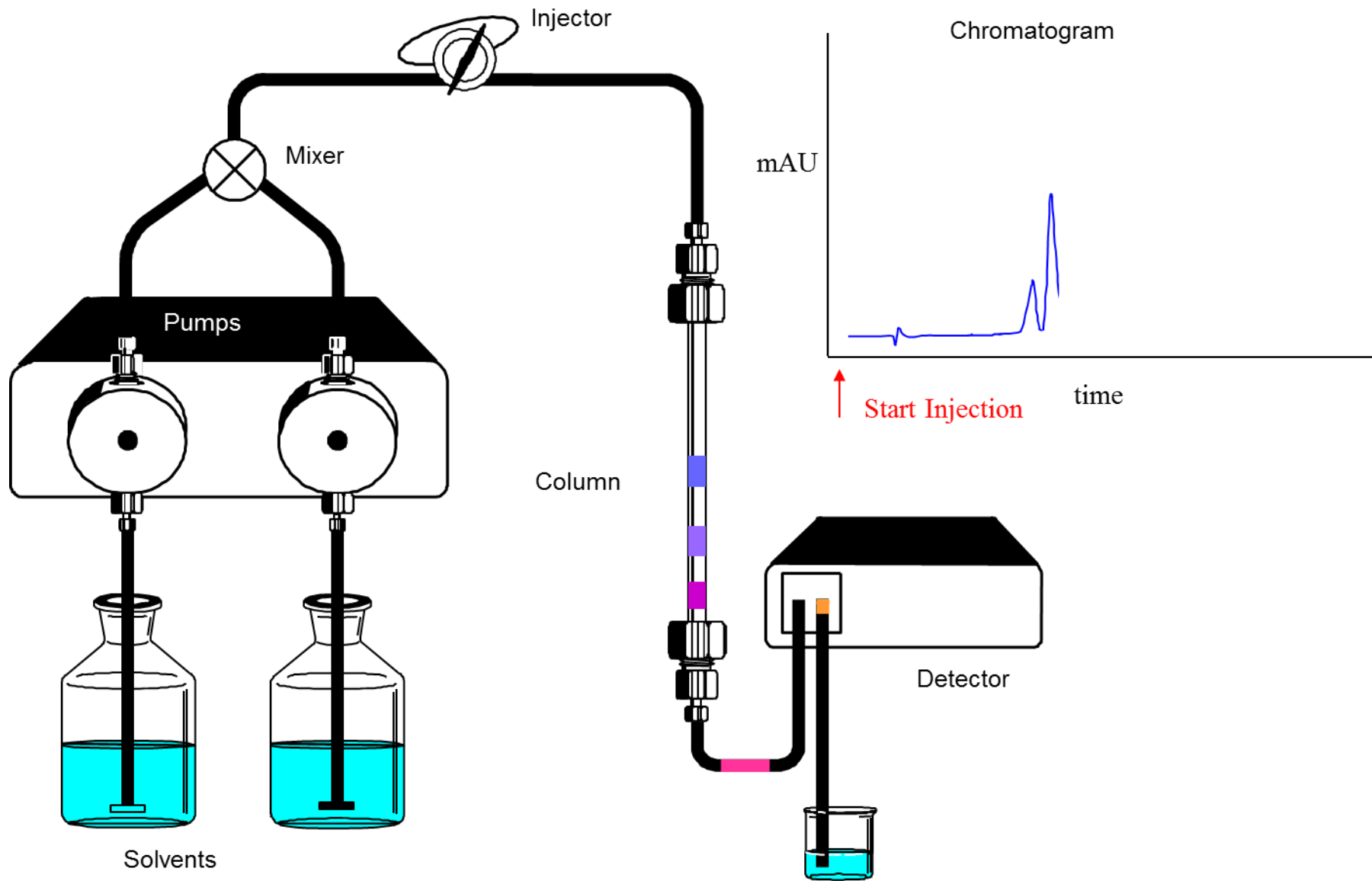


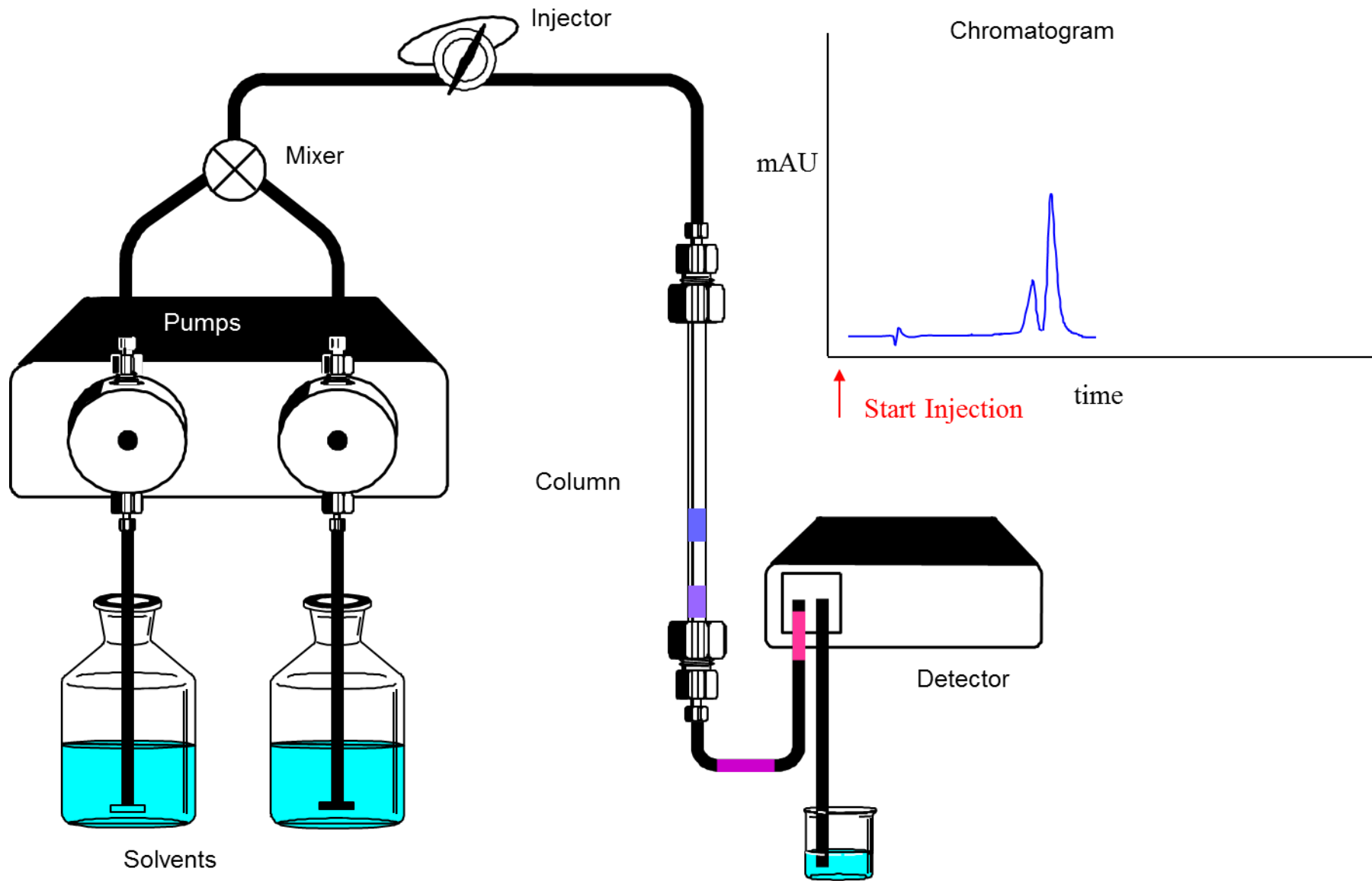


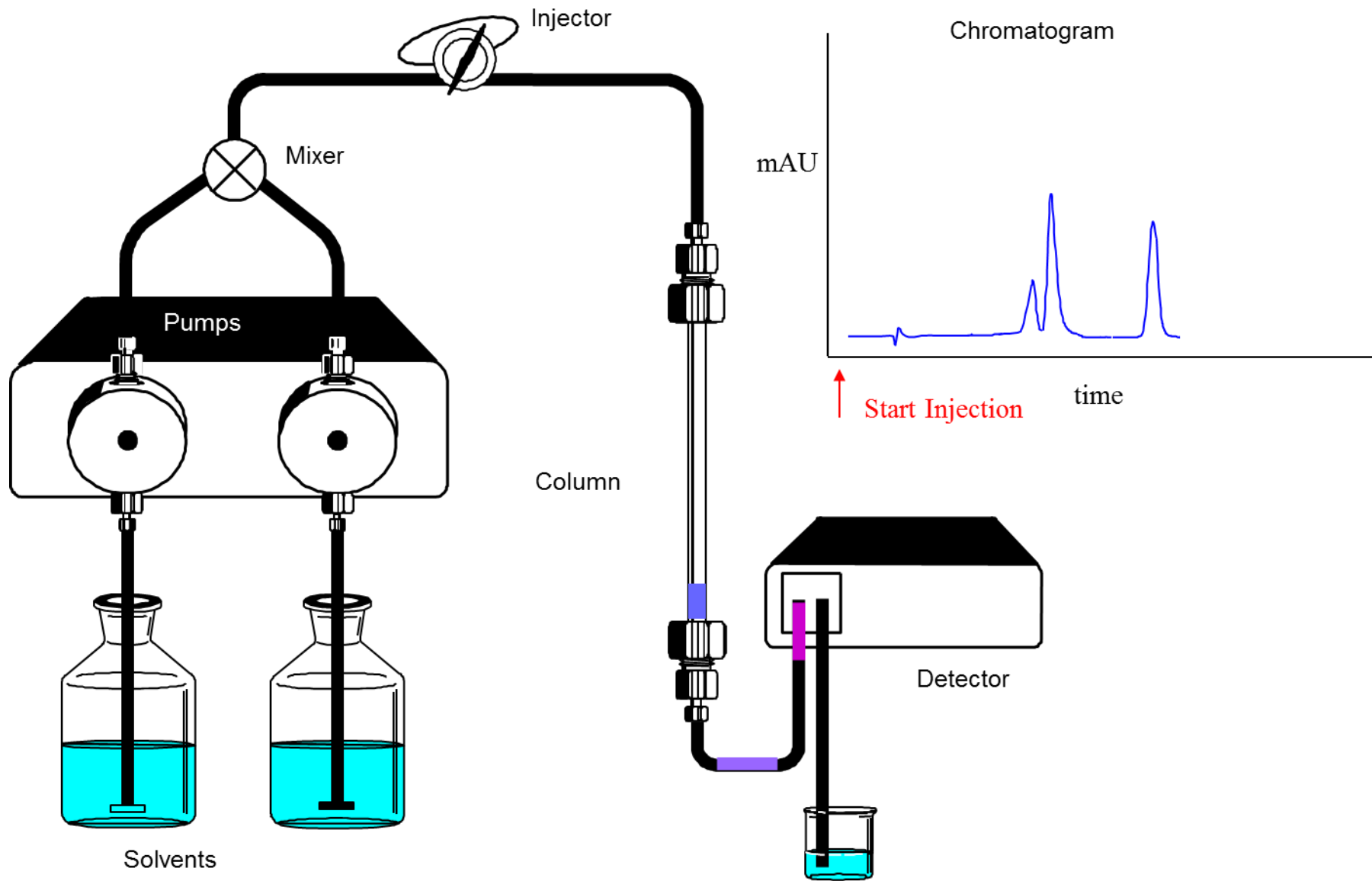


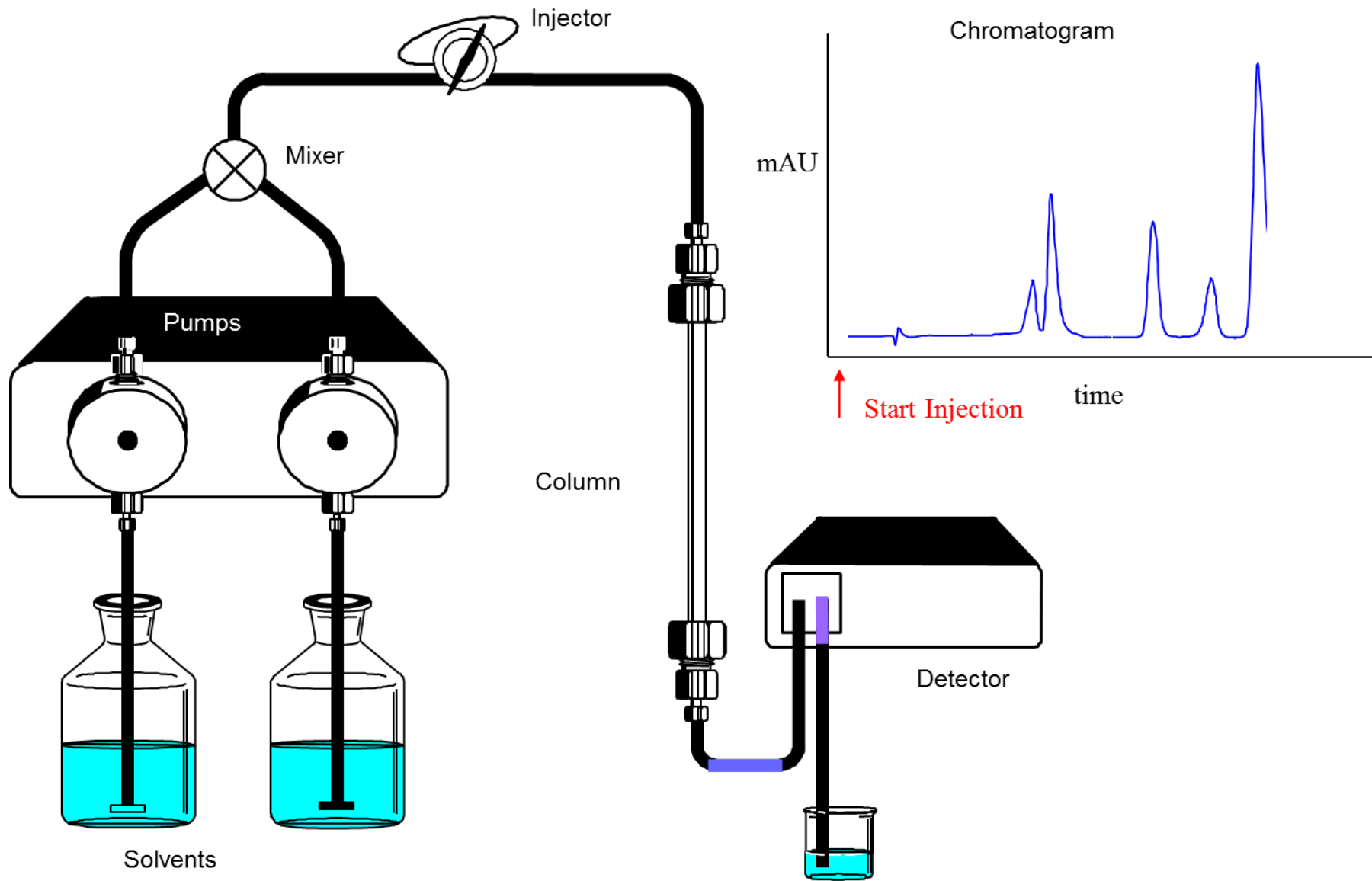


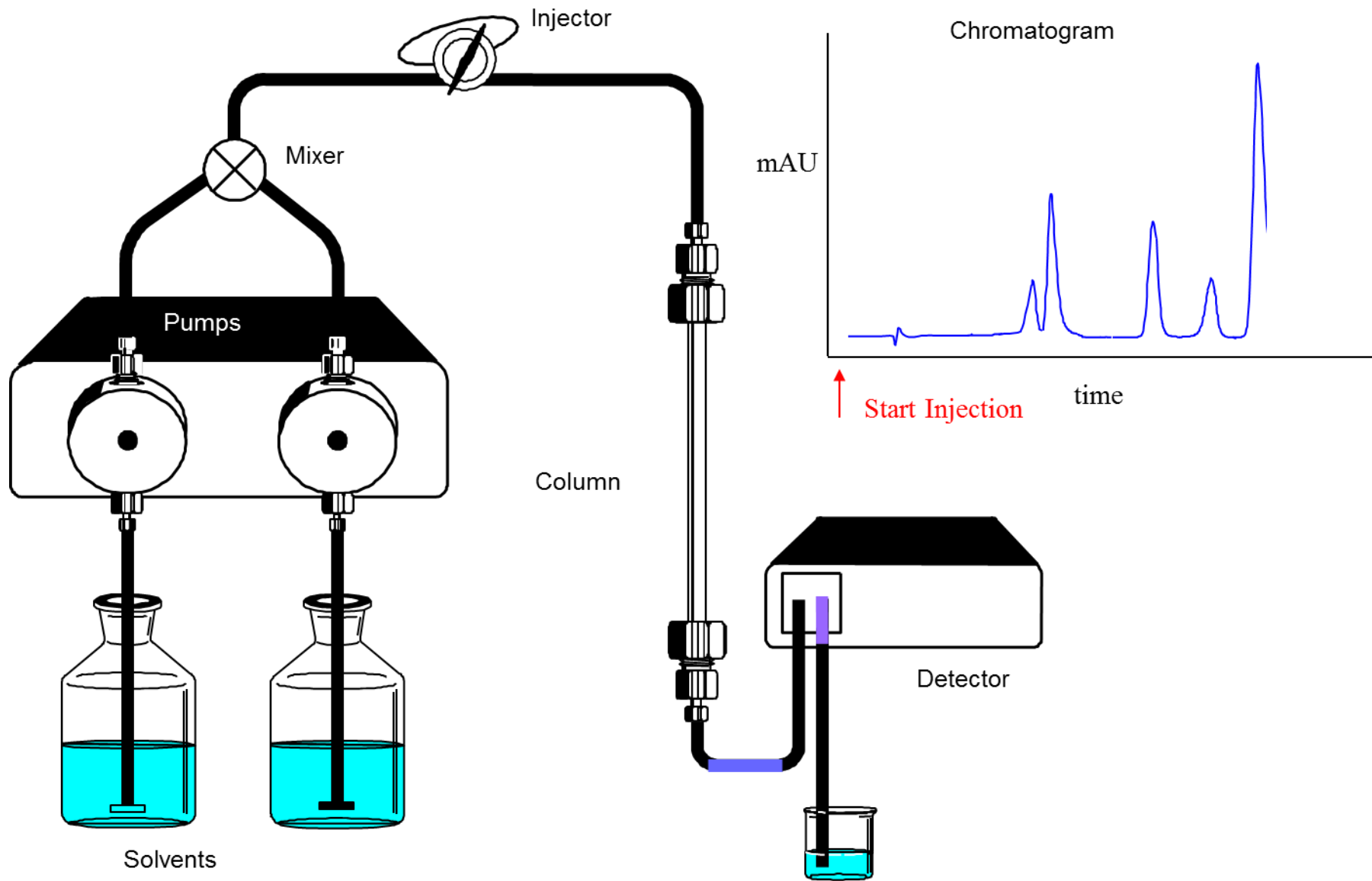


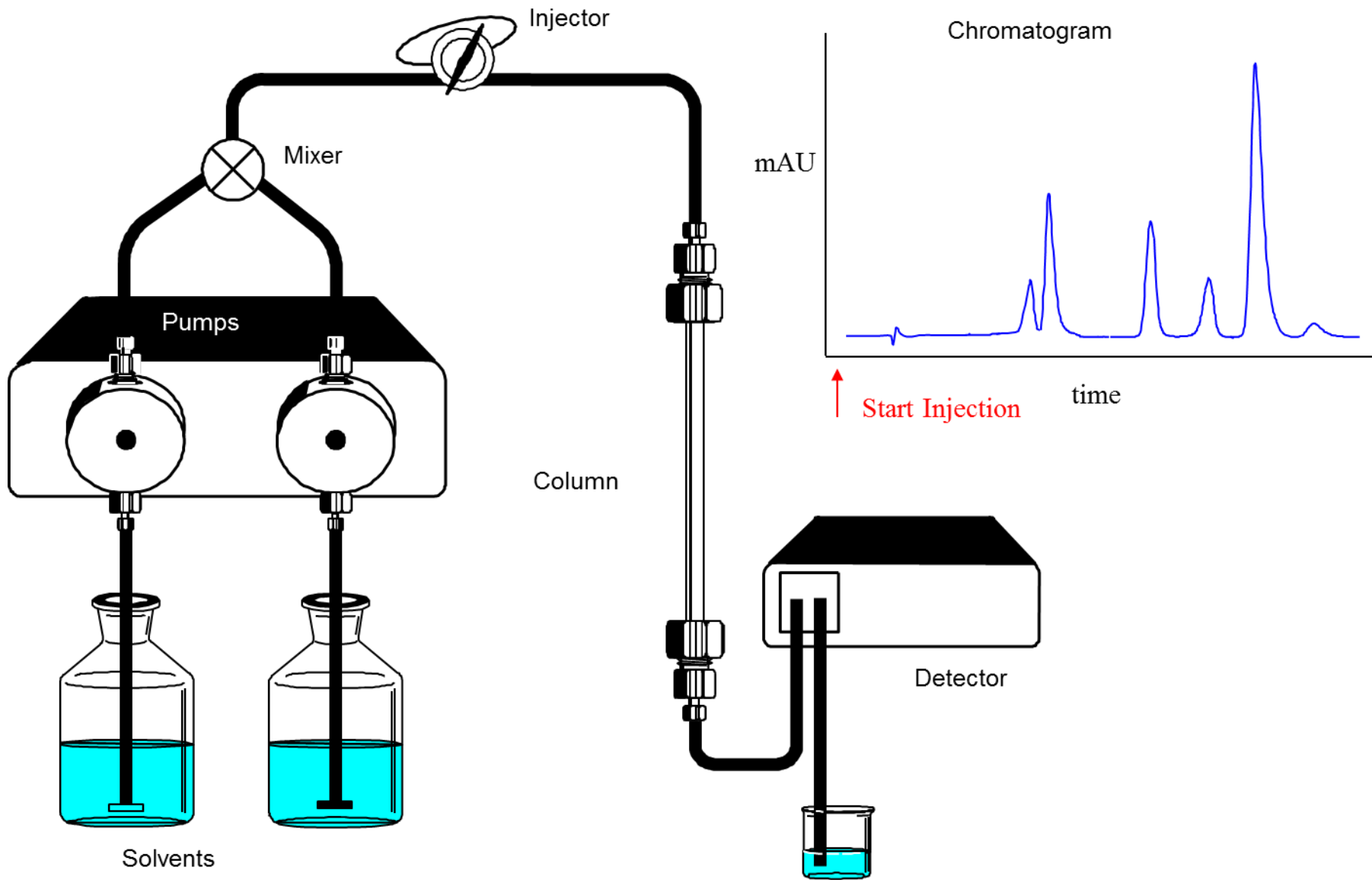










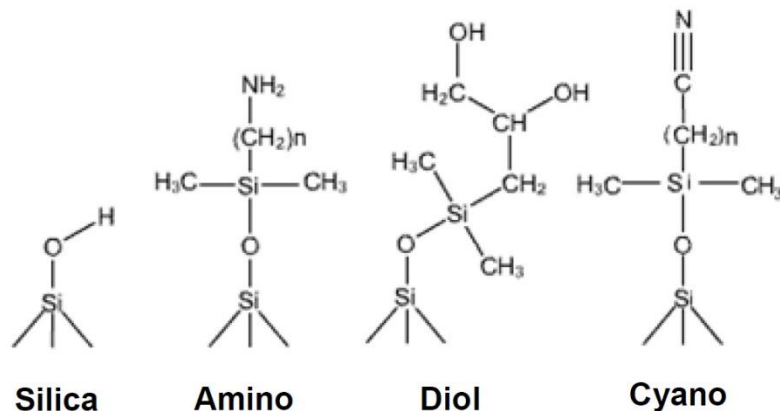


# Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)

- 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

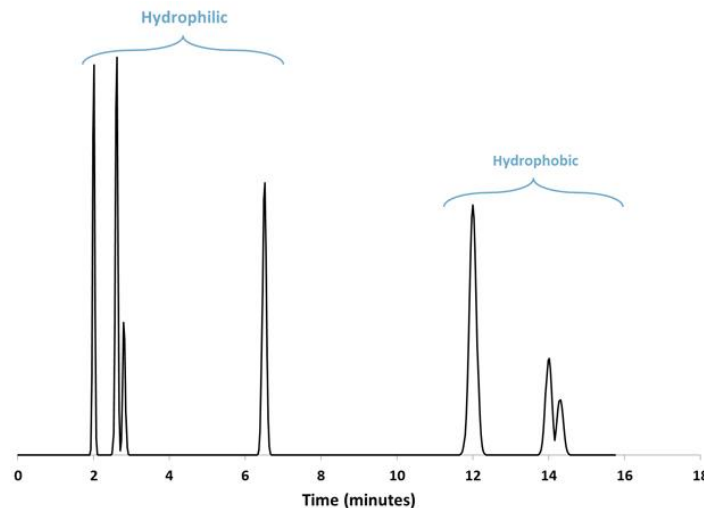
- A mozgófázis nyomnyi víztartalmát nem kell kontrollálni
- Gyorsabb egyensúlybeállítás
- Gradiens elúció kivitelezhető
- Polaritás, szelektivitás széles tartományban változtatható
- Energetikailag homogénebb felület
- Kevésbé „tailinges” csúcsok, mint szilikagél esetén
- Ezek a fázisok a mozgó fázis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

# Mozgófázisok az NP-HPLC-ben

Alkánok	Hexán, Heptán, Izooktán
Klórozott szénhidrogének	Diklórmetán, 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)

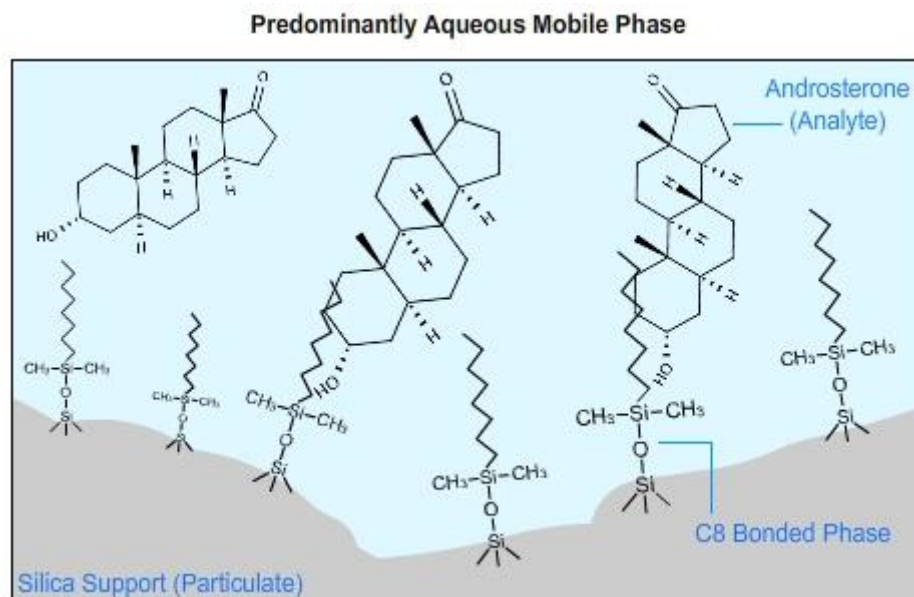
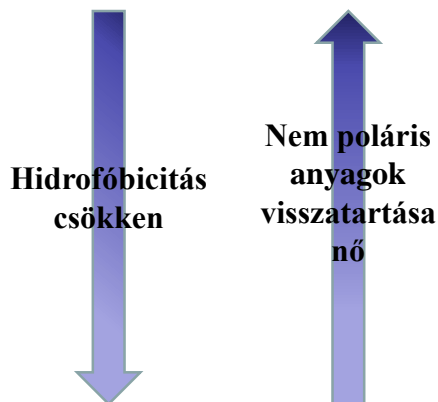
- Fordított: a korábban kidogozott „normál”-hoz képest
- A mozgó fázis *polárisabb*, mint az állófázis
- A leggyakrabban használt módszer



# 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 töltetágnak 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

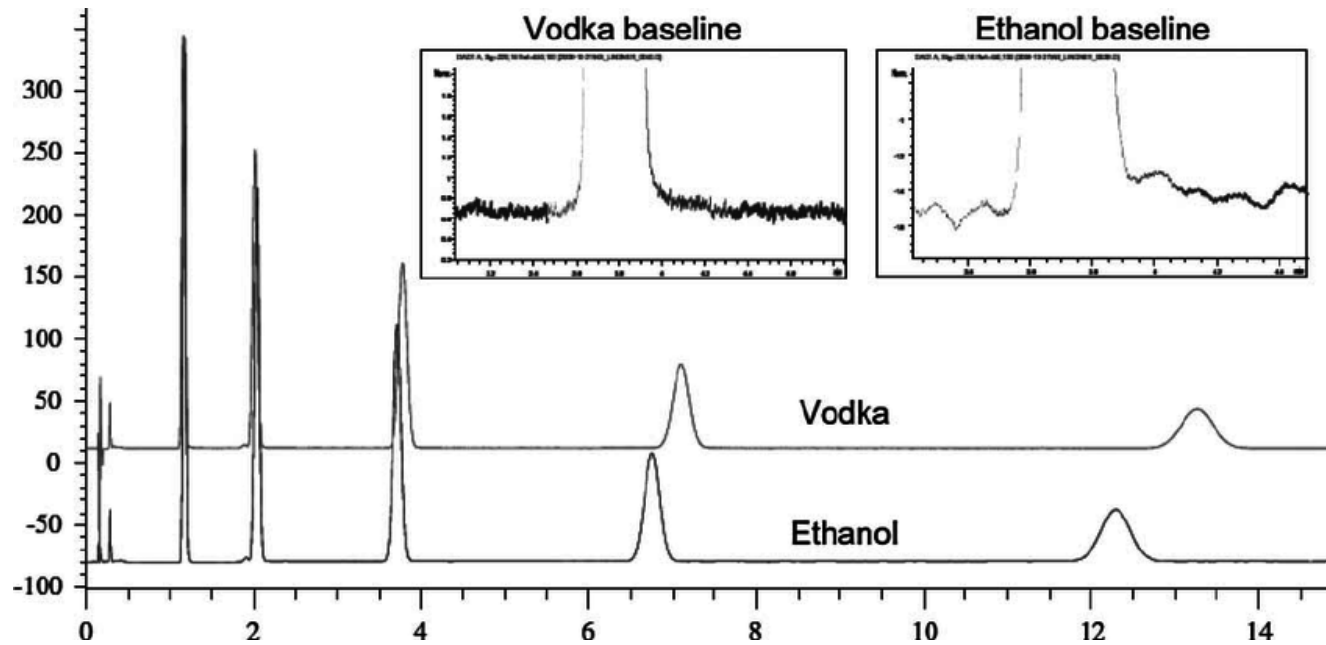
- Tisztasági követelmény
- Jó UV áteresztőképesség (UV cut-off)
- Kis viszkozitás
- A minta komponenseinek jól kell oldódniuk a mozgófázisban
- Nem tartalmazhat szilárd anyagot
- Kis toxicitás
- Nem tartalmazhat oldott gázokat (gázmentesítés)
- Módszerspecifikus követelmény: polárisabb legyen, mint az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

# Mozgófázisok az RP-HPLC-ben

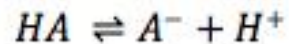
- Általános követelményeknek a víz megfelel, hiszen kis viszkozitású, 190 nm felett nem nyel el.
- A szerves vegyületek nagy részét azonban nem oldja, ezért szükség van szerves oldószerekre:
  - Etanol, 2-propanol: nagy a viszkozitásuk -> ritkán használatosak
  - Dioxán: poláris, de reaktív és mérgező -> 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

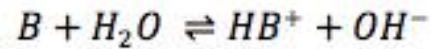


# pH szerepe az RP-HPLC-ben



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

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

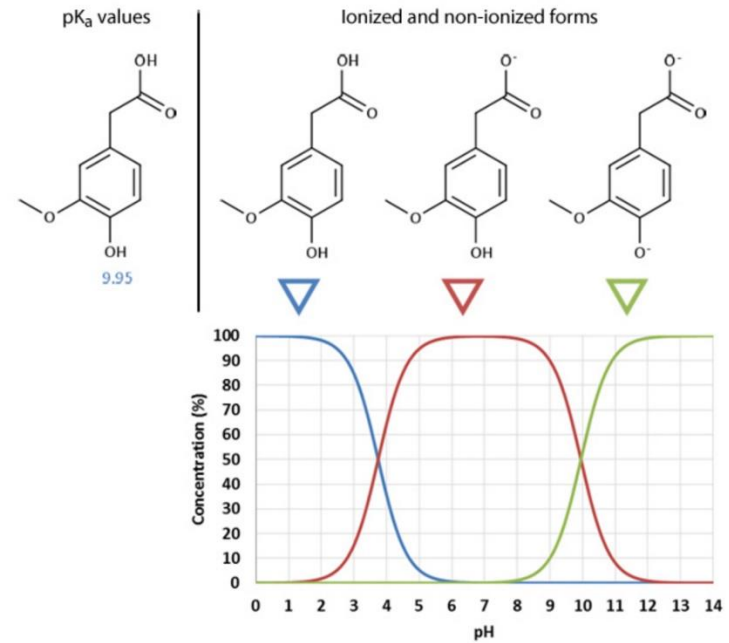
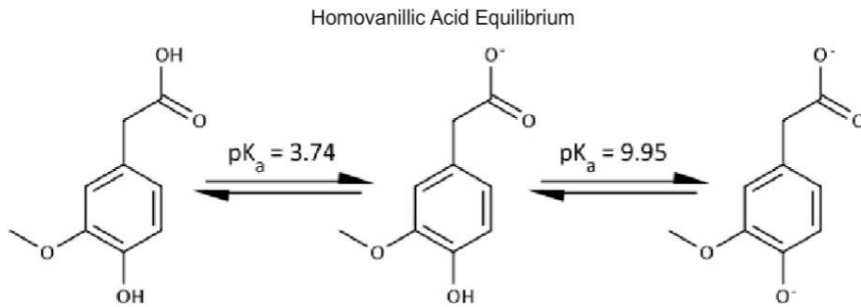


$$K_b = \frac{[OH^-][HB^+]}{[B]}$$

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

- 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.

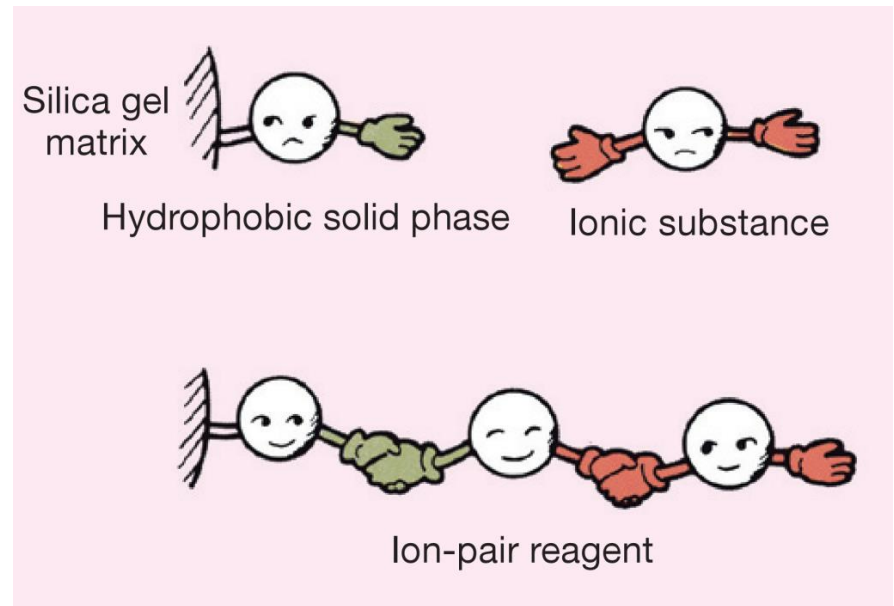
# Savas vegyület



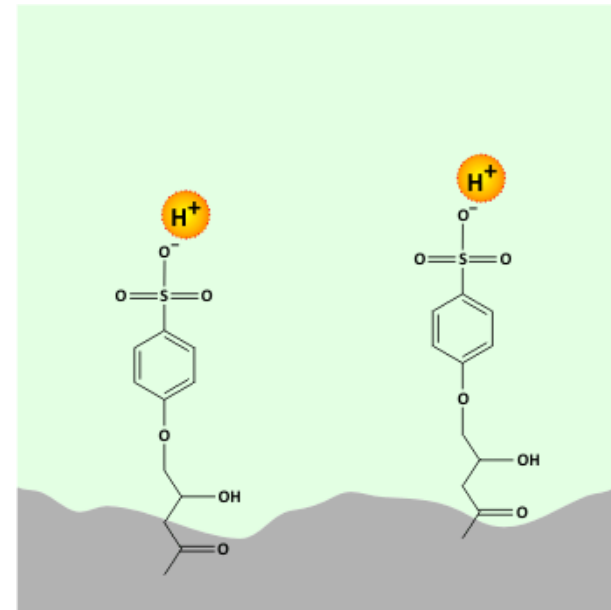
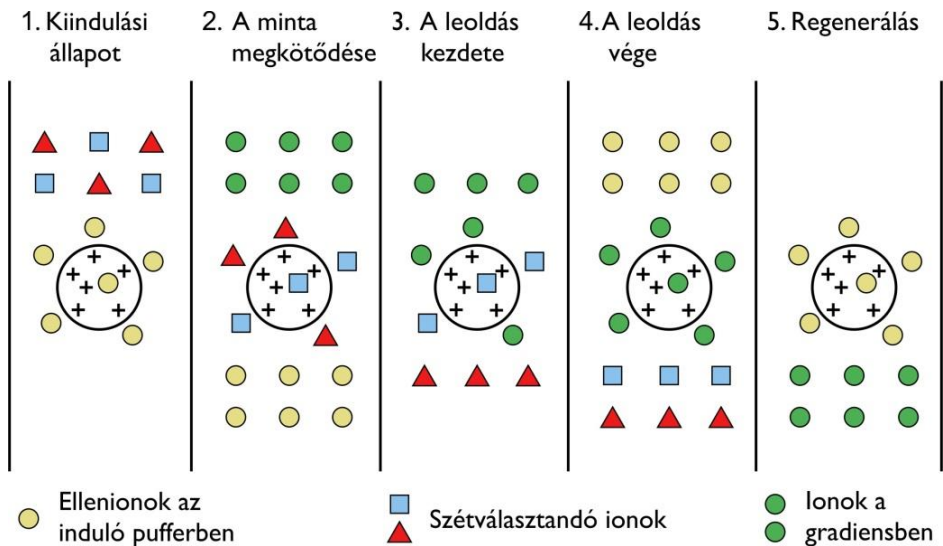
# Fordított fázisú ionpár kromatográfia

## 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.



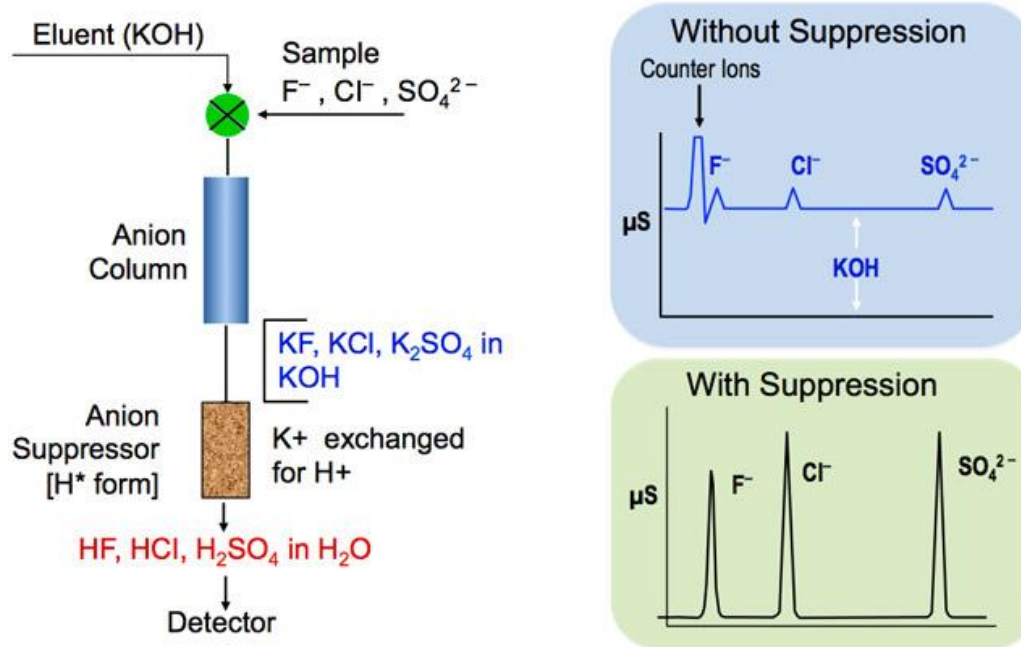
# Ioncserés kromatográfia



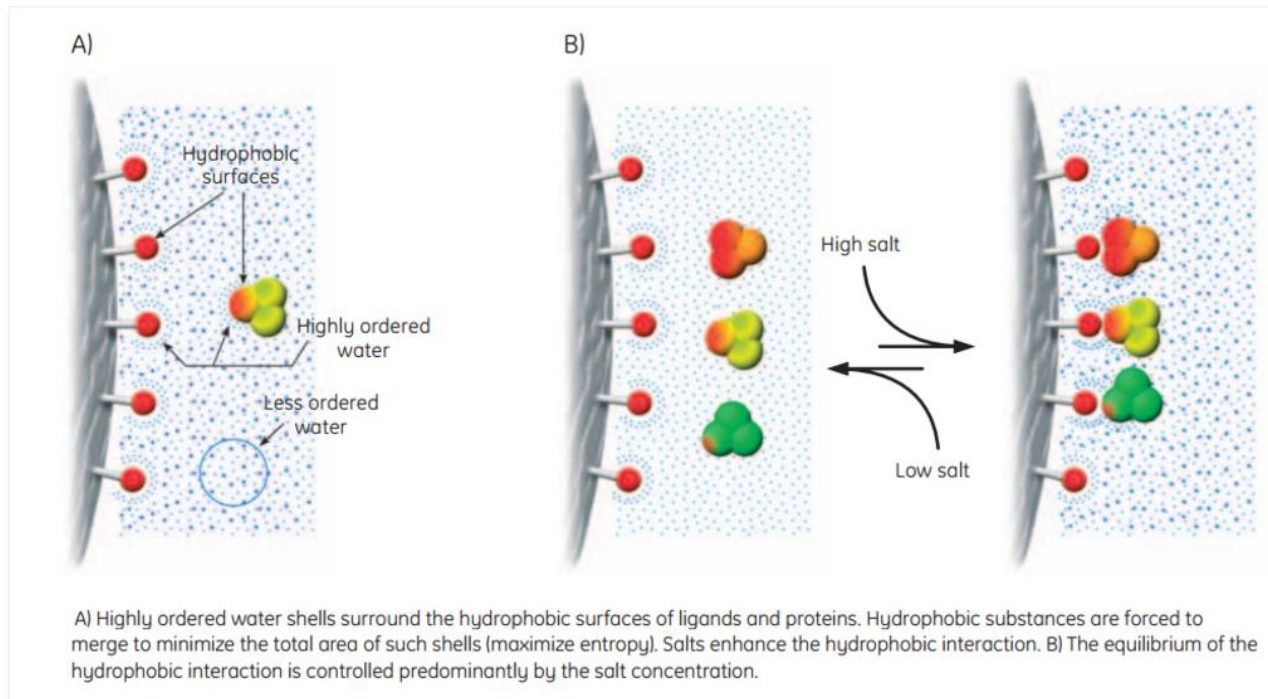
# Ionkromatográfia

- Anionok elválasztásában döntő szerepe van
- Műtrágyázás miatt elnitrátosodott, foszfátosodott talajvíz, rétegvíz mérése
- Állófázis: ionos karakterű, speciális, kis kapacitású
- Alapja: ioncsere egyensúly
- Detektálás: elsősorban vezetőképességi méréssel

# IC vezetőképeségi detektálással



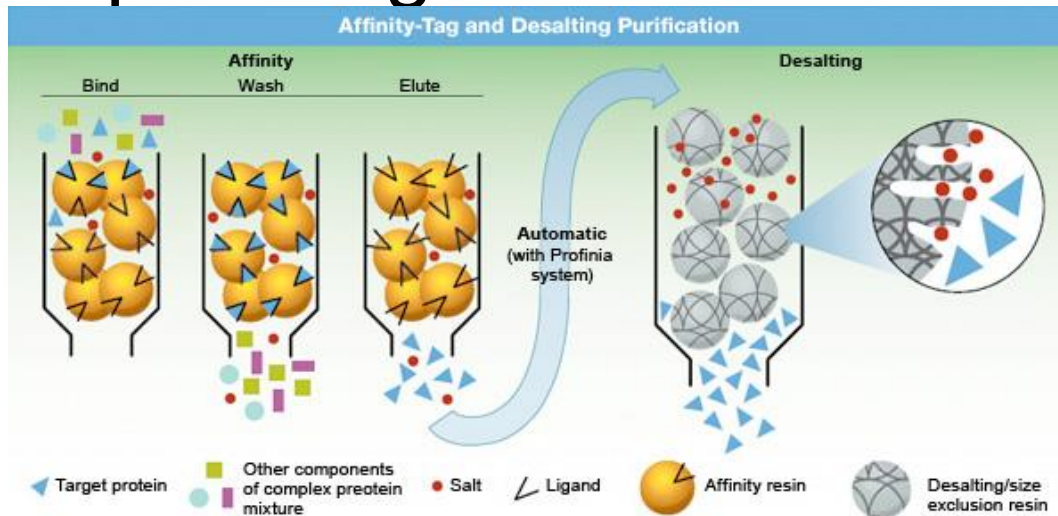
# HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)





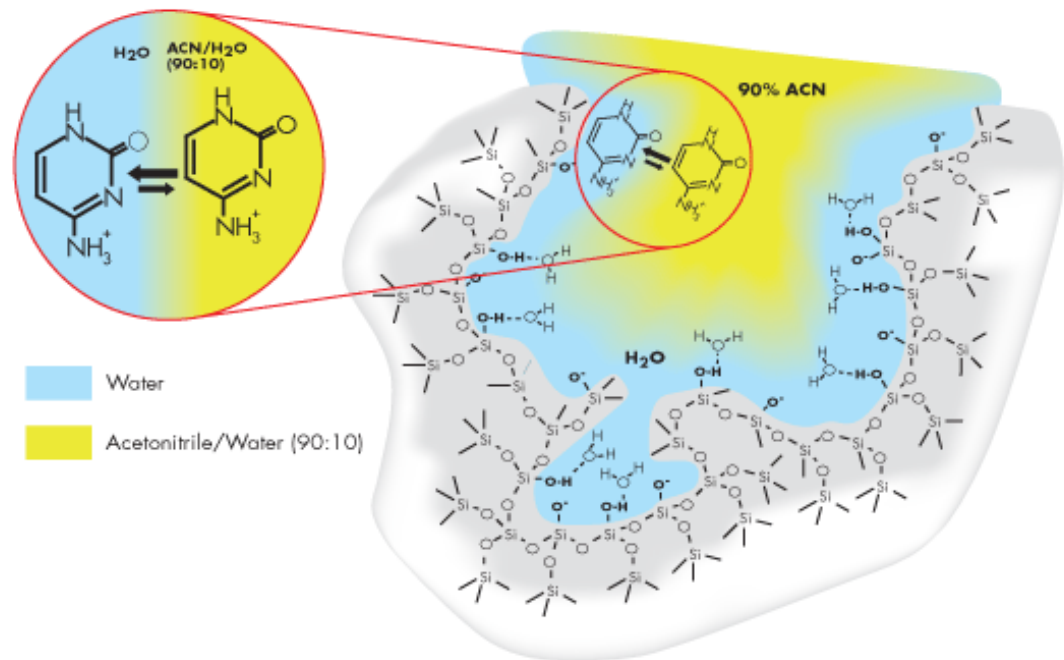
# Affinitáskromatográfia

- Antitest – antigén, enzim – szubsztrát, receptor – ligand kölcsönhatáson alapul



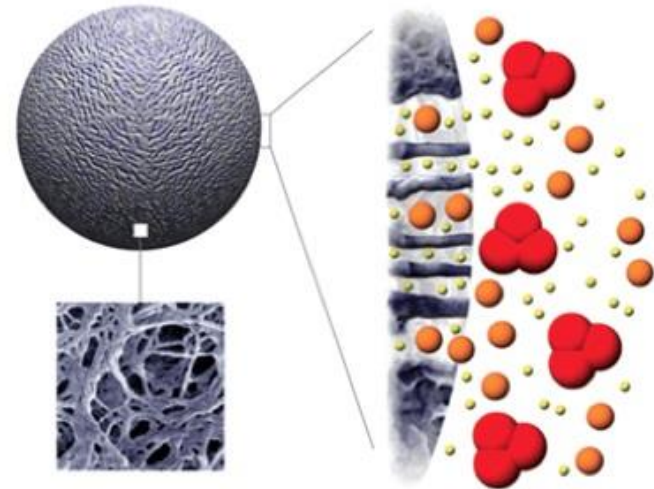
# HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography)

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

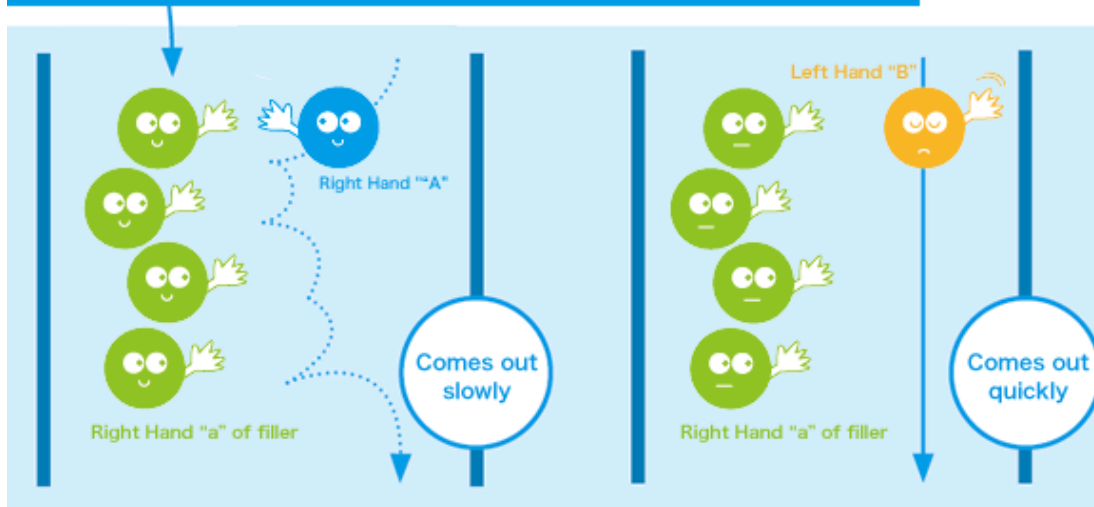


# Királis kromatográfia

- 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

