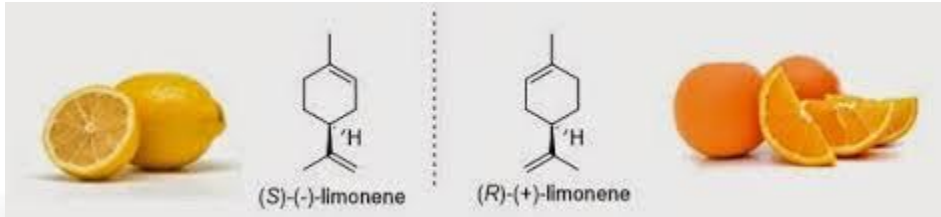
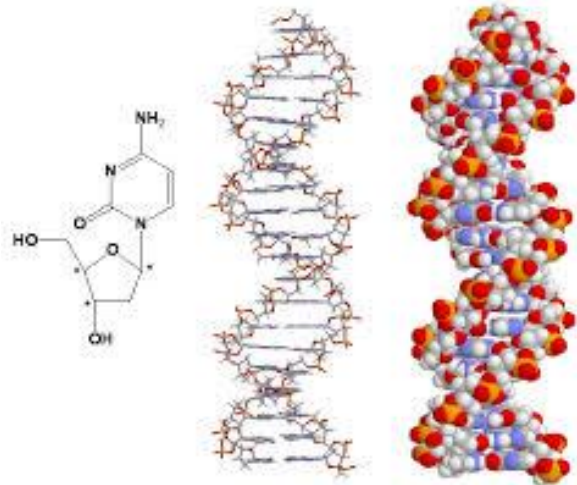


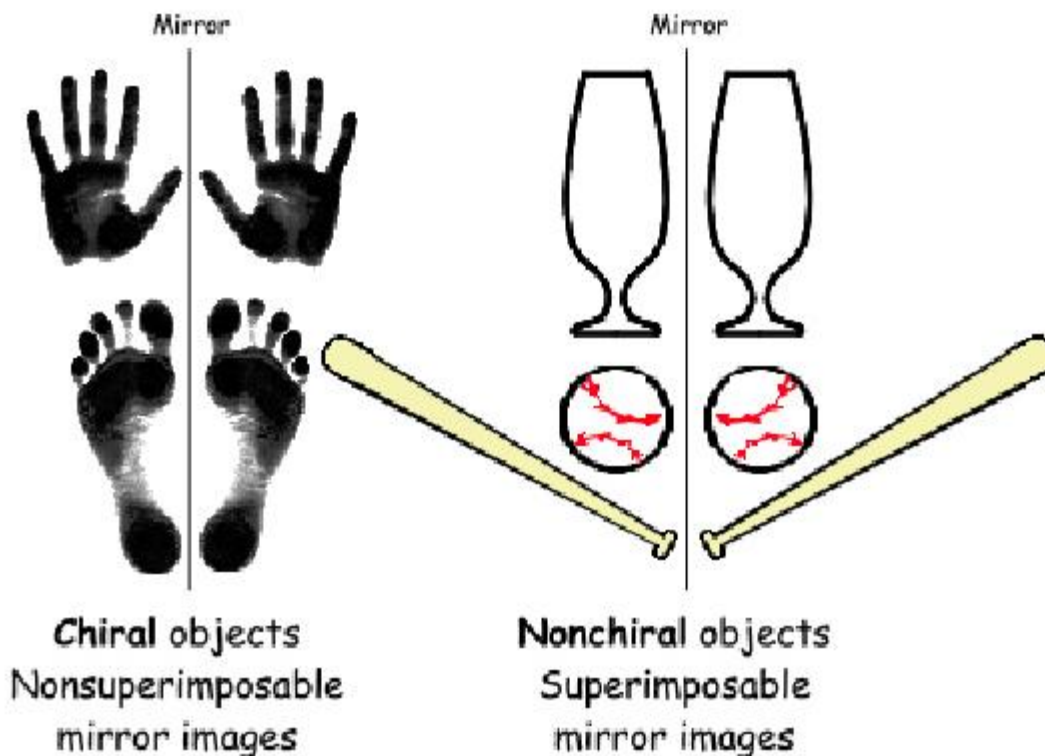
Királis elválasztások

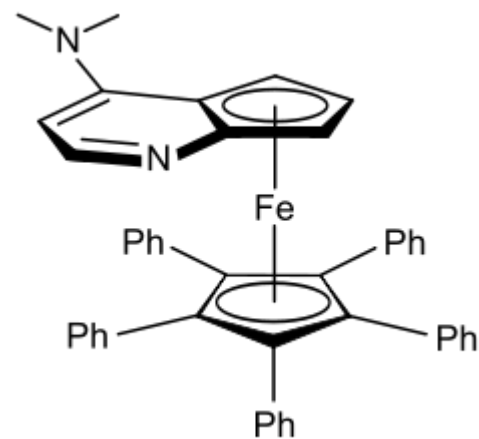
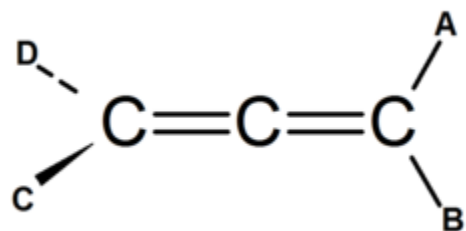
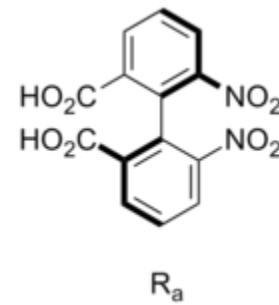
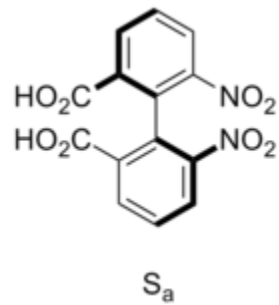
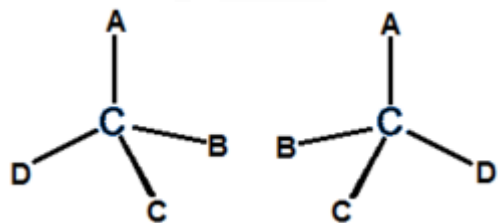
Dr. Varga-Oláh Erzsébet



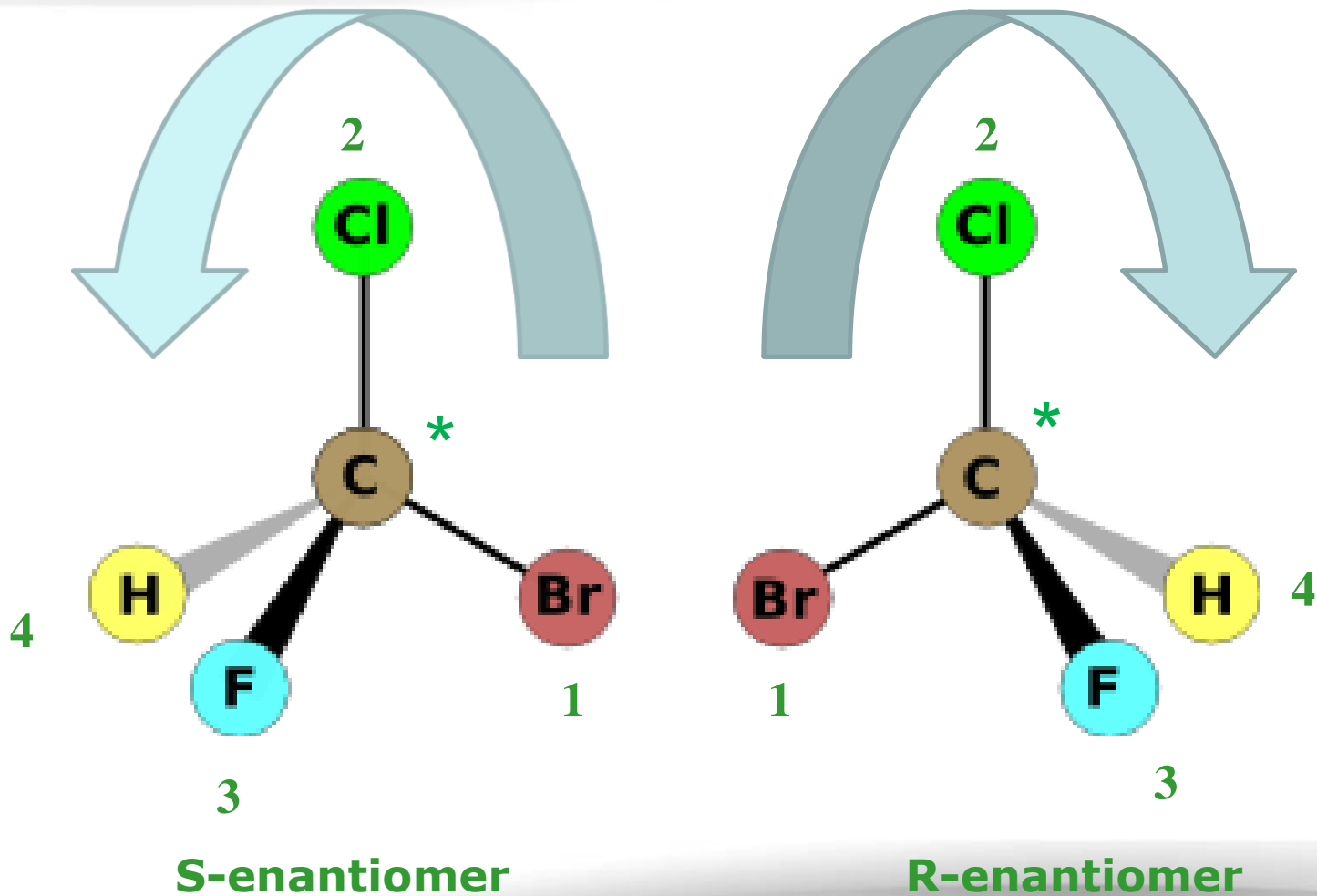
CHIRALITY

An object that cannot be superimposed on its mirror image is called chiral

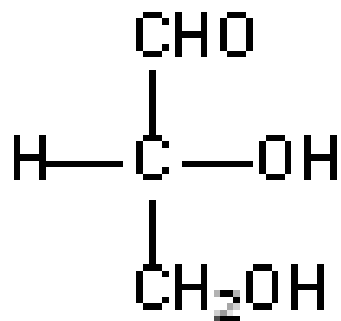




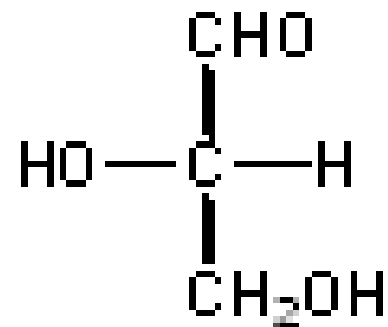
Kiralitás - alapfogalmak



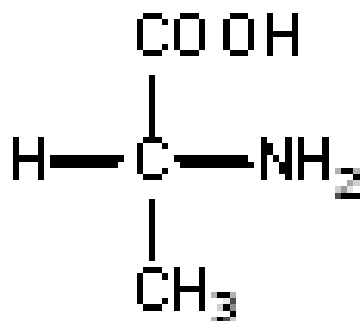
Kiralitás - alapfogalmak



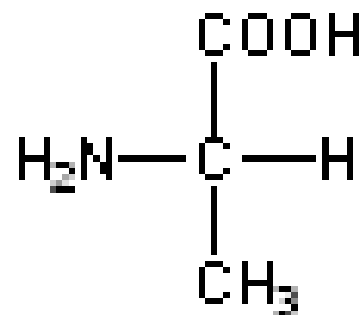
D-(+)-glicerinaldehid



L-(-)-glicerinaldehid

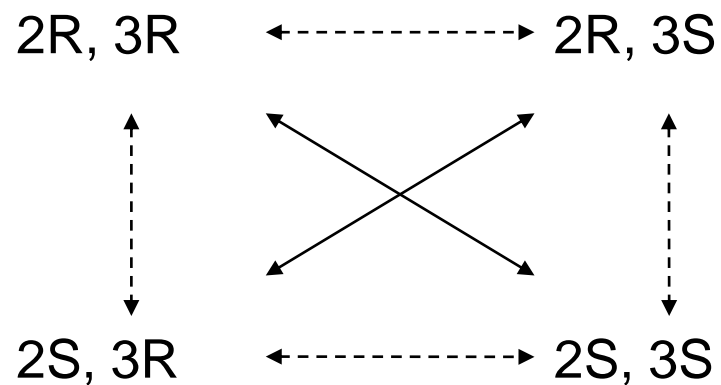


D-alanin



L-alanin

Sztereoizomerek csoportosítása

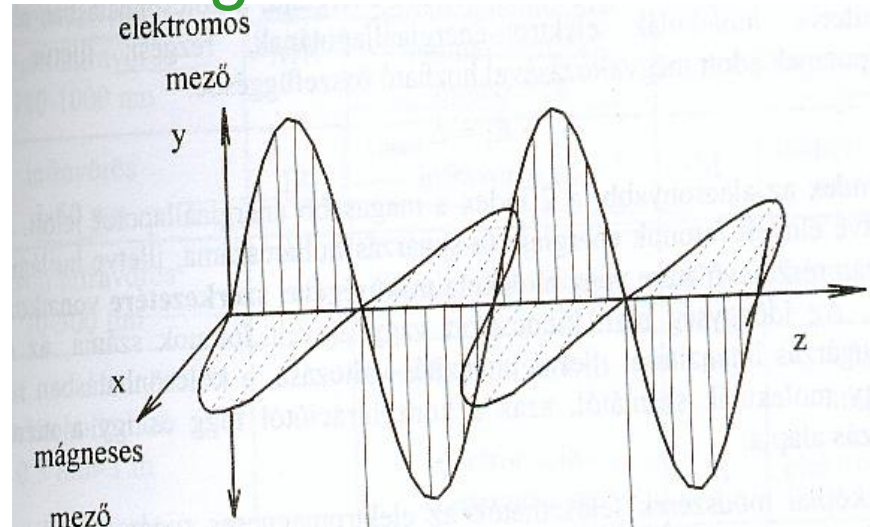


←→ enantiomerek

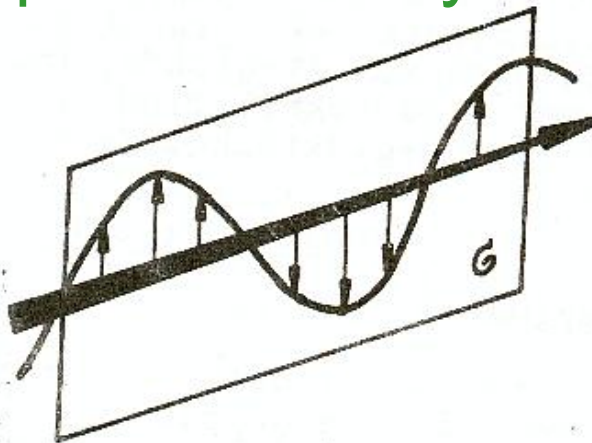
←- - - - -> diasztereomerek

Fényforgatás

Fény, mint elektromágneses



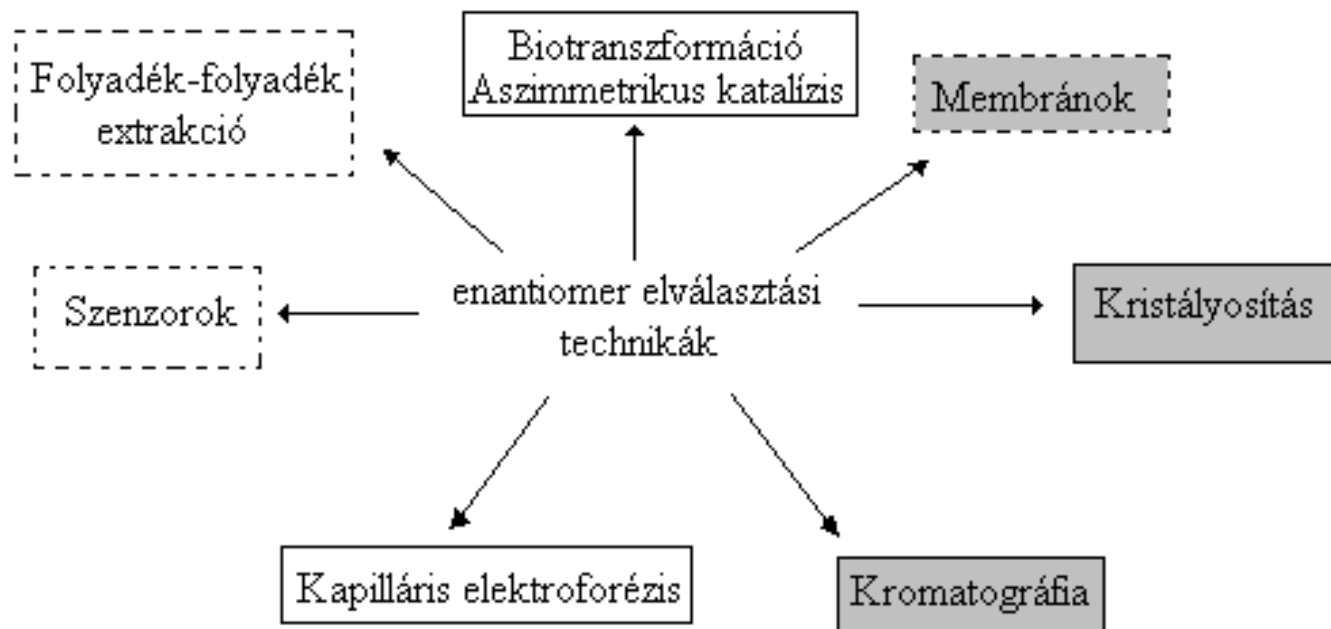
Síkban polarizált fény



$$\alpha = \frac{[\alpha]}{100} \cdot l \cdot c_g$$

$$\alpha = [M] l c_m \text{ e } 8$$

Elválasztási lehetőségek



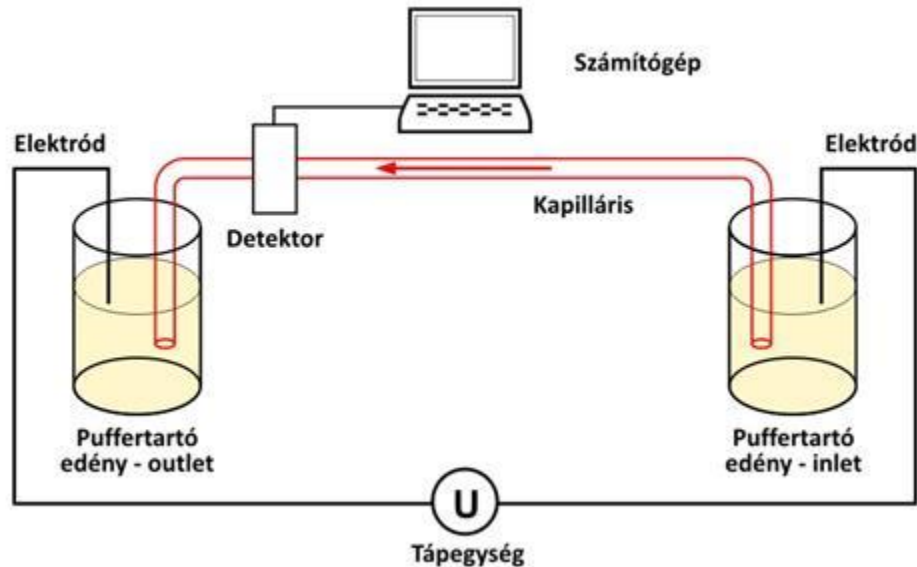
■ Analitikai/Preparatív

----- Ritkán alkalmazott

□ Analitikai

———— Gyakran alkalmazott

Kapilláris elektroforézis I.



Elválasztás királis szelektorokkal

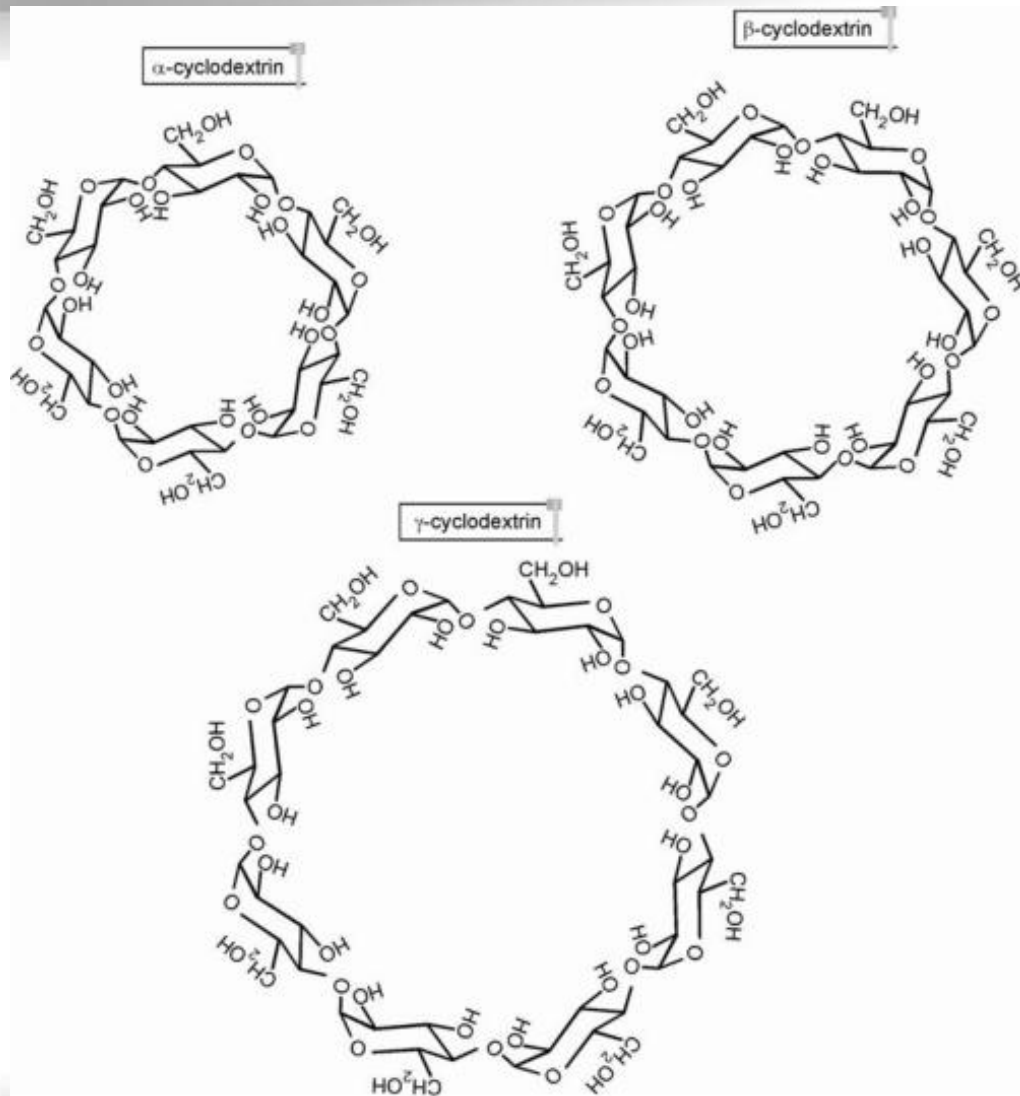
- Töltéssel rendelkezők komponensek elválasztása (enantiomer vagy a szelektor)
- Enantiomerek kölcsönhatása a szelektorral különbözzön
- Enantiomer – szelektor komplexek mobilitása térjen el egymástól

Kapilláris elektroforézis II.

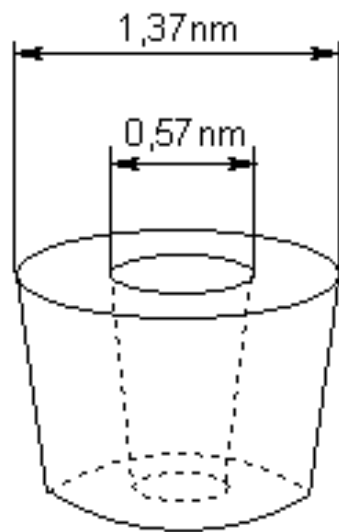
Alkalmazott szelektorok:

- Ciklodextrinek
- Korona éterek
- Optikailag aktív micellák
- Makrociklusos antibiotikumok
- Fehérjék
- Ion pár szelektorok

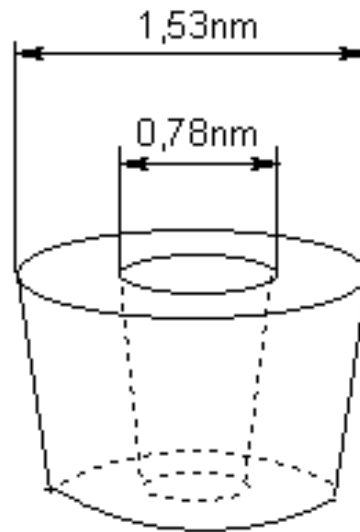
Ciklodextrinek I.



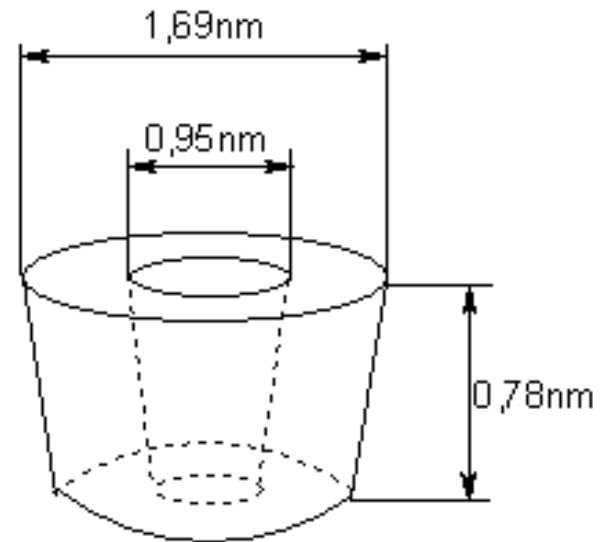
Ciklodextrinek II.



α CD

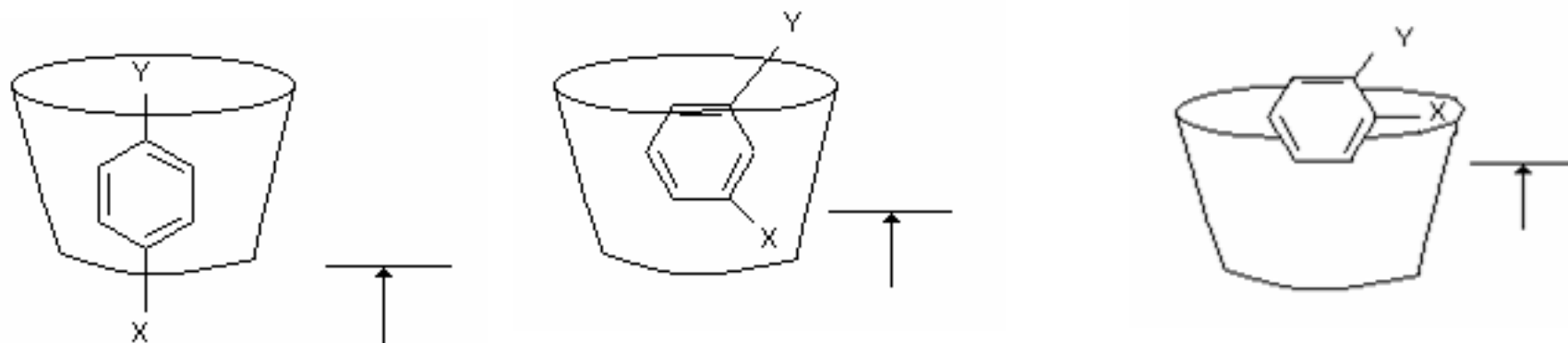


β CD

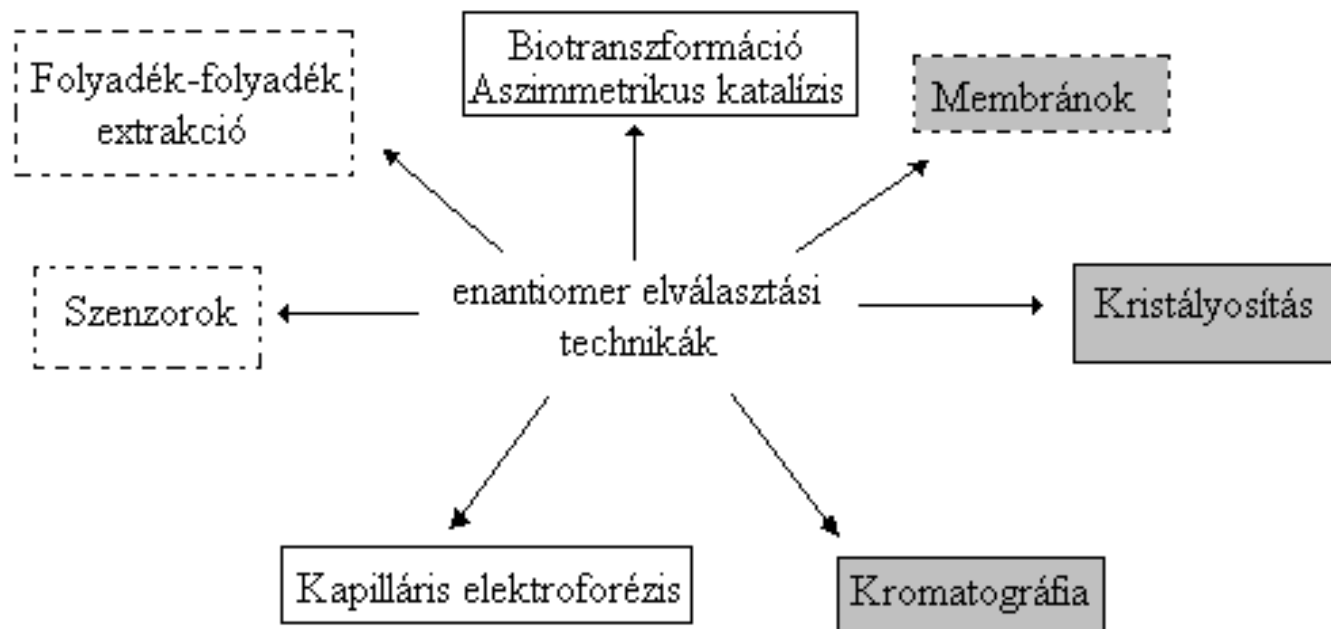


γ CD

Sztérikus gátlás



Elválasztási lehetőségek



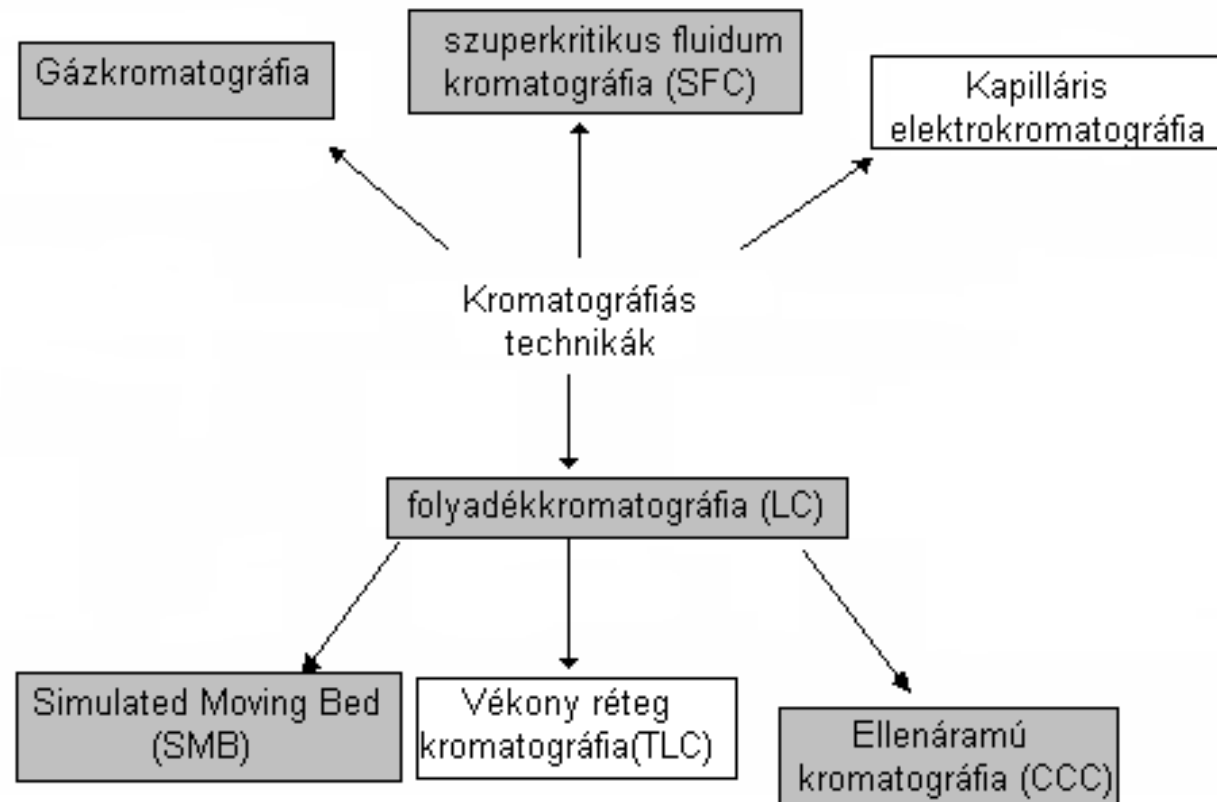
■ Analitikai/Preparatív

----- Ritkán alkalmazott

□ Analitikai

———— Gyakran alkalmazott

Kromatográfiás technikák



■ Analitikai/Preparatív

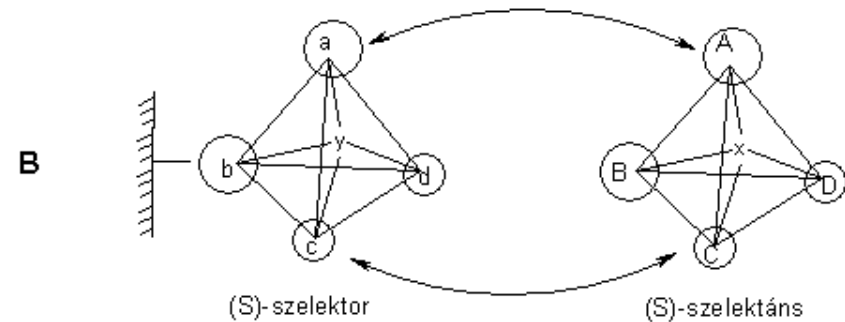
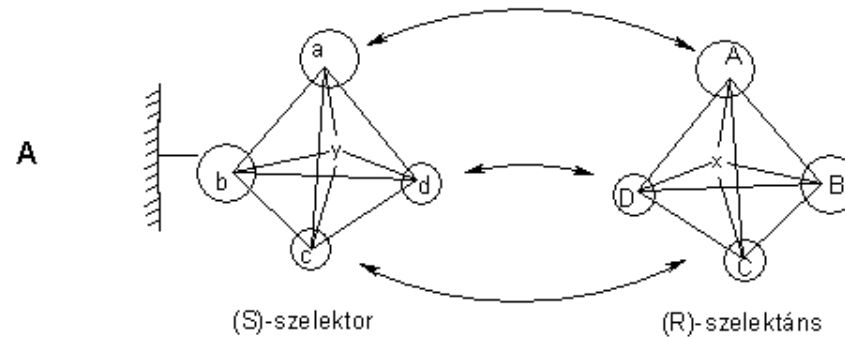
□ Analitikai

----- Ritkán alkalmazott

———— Gyakran alkalmazott

Három pontos modell

Dalglish



Kölcsönhatási lehetőségek:

a - A = H-hidas

d - D = $\pi - \pi$

c - C = diszperziós

Gáz kromatográfia

Gázkromatografálhatóság feltételei:

- Hőstabilitás
- 350-400°C elpárologtathatóság

Alkalmazott állófázisok:

- CD
- Aminosav alapú

Előnyök és hátrányok

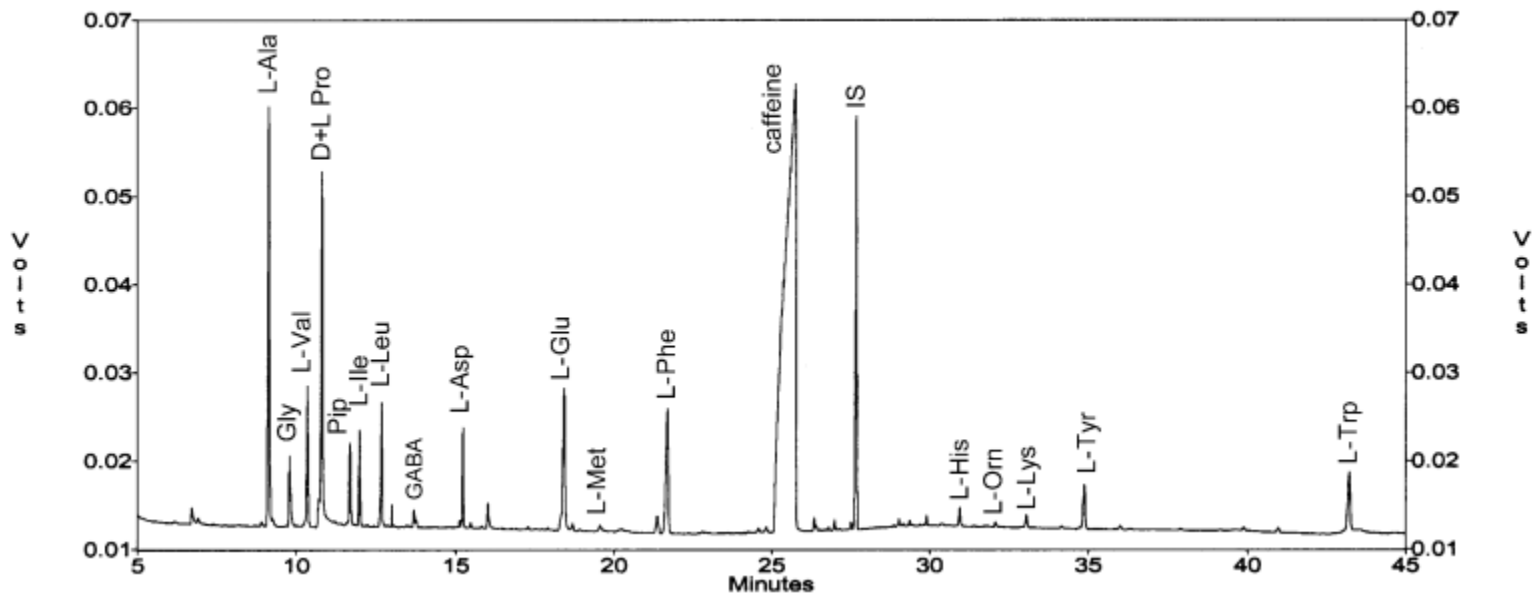
Előnyök:

- Hatékony elválasztás (N= 12 000 – 60 000)
- Gyors elválasztás, nagy csúcs- és mintakapacitás
- MS kapcsolat

Hátrányok:

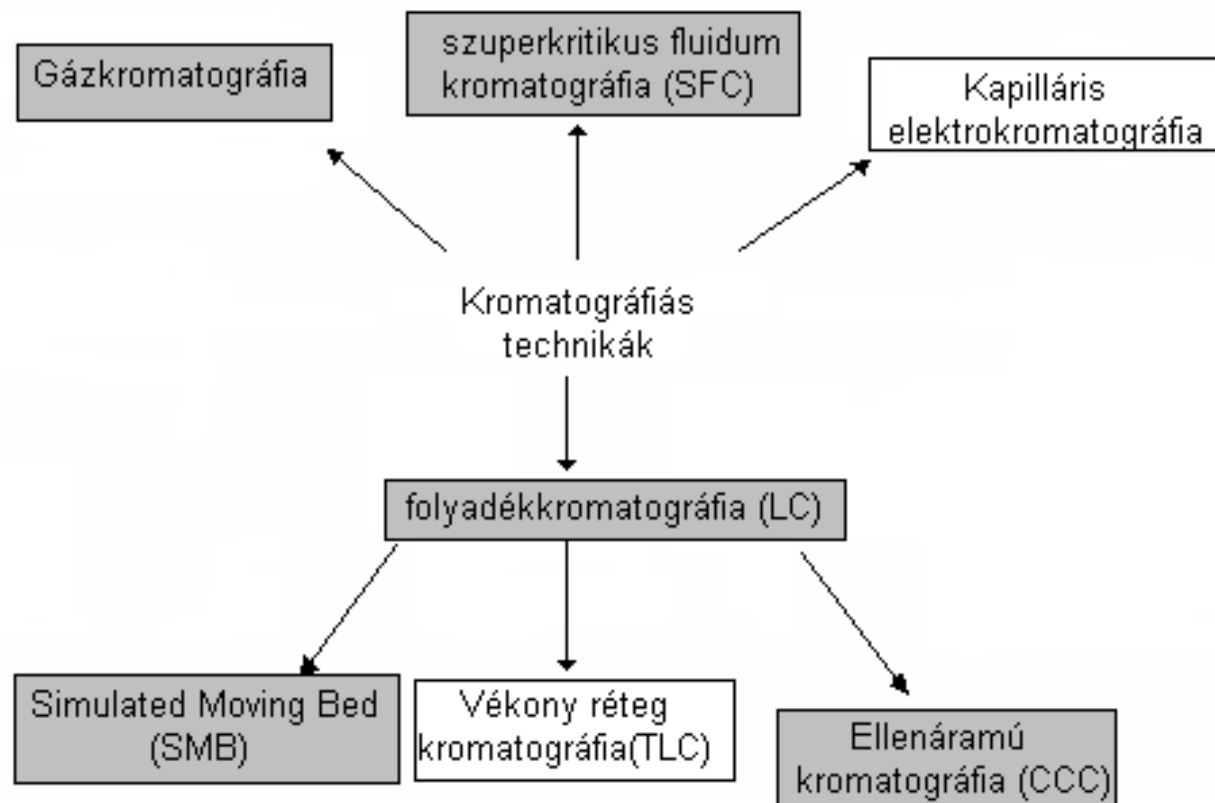
- Termikusan stabil vegyületek elválasztása
- Hő hatására ne racemizálódjon a vegyület
- Preparatív alkalmazás nem lehetséges

Arabica zöld kávé aminosav összetétele



Separation was achieved on a Chirasil L-Val (25 m × 0.25 mm i.d.) fused-silica capillary column with a 0.12 μm film coating (Chrompack) with programmed temperature: increase from 80 °C (1 min hold) to 150 °C, at 5 °C/min (7 min hold), followed by an increase to 195 °C at 7 °C/min (15 min hold). The temperatures of the injector and detector were 250 and 280 °C, respectively, and splitless injection was used with a purge time delay of 0.8 min. Helium was used as the carrier gas at an initial inlet flow of 0.7 mL/min programmed to increase to 1.7 mL/min after 36 min

Kromatográfiás technikák



■ Analitikai/Preparatív

□ Analitikai

----- Ritkán alkalmazott

———— Gyakran alkalmazott

Indirekt elválasztás - származékképzés

Származékképzésről általában

Miért alkalmazunk származékképzőket?

- Érzékenység növelés (UV/VIS, FL, MS)
- Szelektivitás növelés

Megvalósítás lehetőségei

- Kolonna előtti származékképzés (pre-column derivatization)
- Kolonna utáni származékképzés (post column derivatization)

Kolonna előtti származékképzés

- Álló- és mozgófázis nagy variabilitása
- Növelt szelektivitás

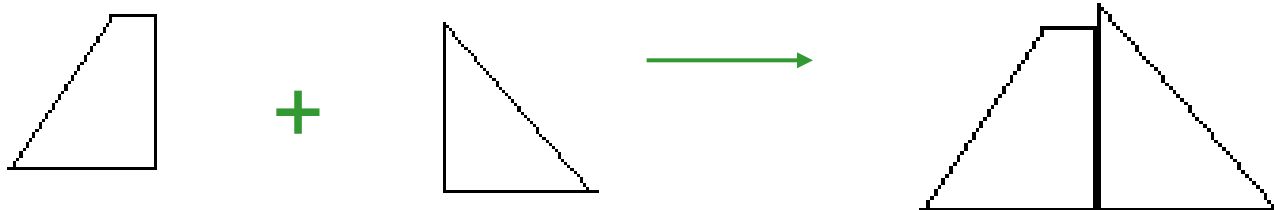
Kolonna utáni származékképzés

- Speciális készülék kialakítás
- Mozgófázis kompatibilitása a származékképzővel
- Gyors reakció (csúcsfelbontás)
- Megfelelő keverés (gyors, hatékony, zóna diszperzió)
- Reprodukálhatóság

Elválasztás alapjai

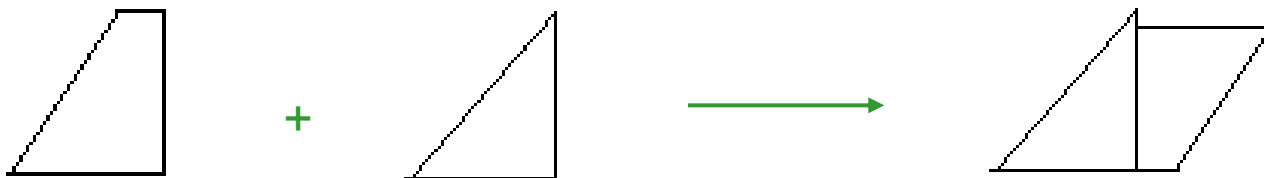
Indirekt elválasztás

- Származékképzés az elválasztás előtt



Királis reagens

R-enantiomer



Királis reagens

S-enantiomer

Elválasztás alapjai

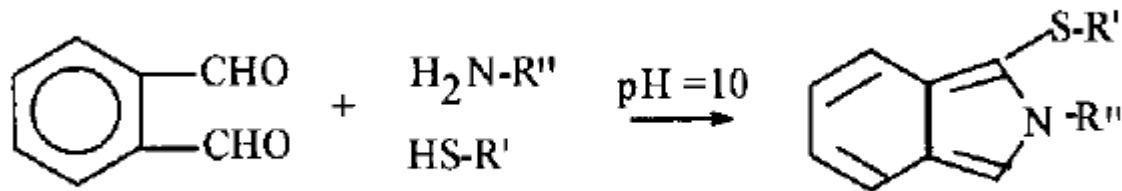
Indirekt elválasztás

A származékképző szemben támasztott követelmények:

- Nagy optikai tisztaság (0,01%)
- A két enantiomerrel azonos reakciósebességgel reagáljon
- Stabil származékot képezzen az elválasztandó izomerekkel
- Megfelelő kromofort, fluorofort tartalmazzon

Származékképző csoportosítása

Királis tiolok + OPA



Származékolható komponensek:

- Aminosavak
- Királis aminok
- Amino-alkoholok

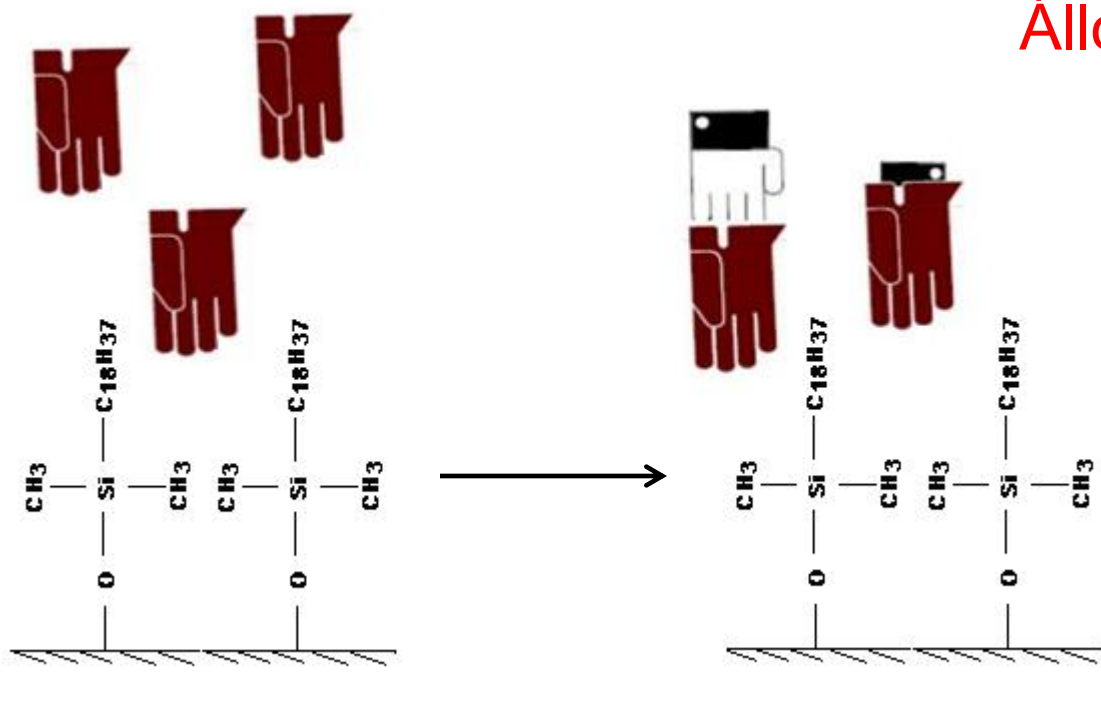
Elválasztást befolyásolja: N-acil csoport hossza

Direkt elválasztás

Elválasztás alapjai

Direkt elválasztás

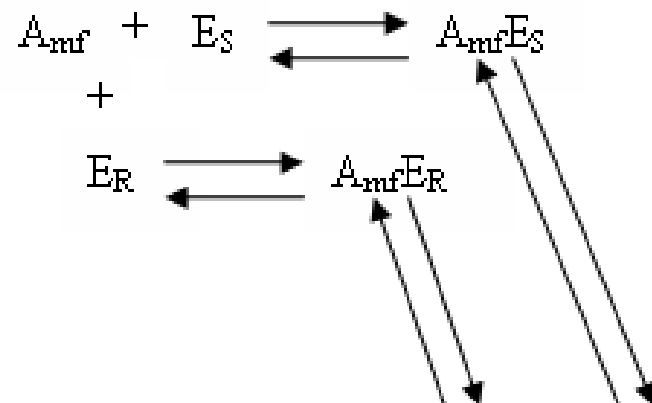
- Mozgófázis optikailag aktív



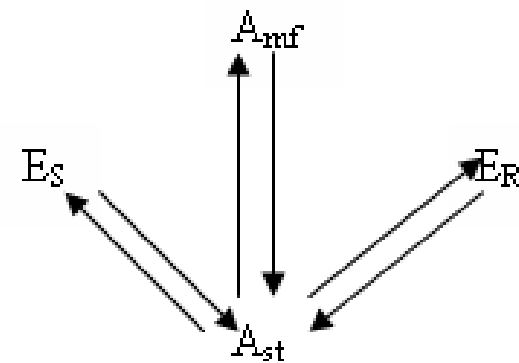
Állófázis hatás!

Állófázis hatás!

mozgófázis - hatás



állófázis - hatás

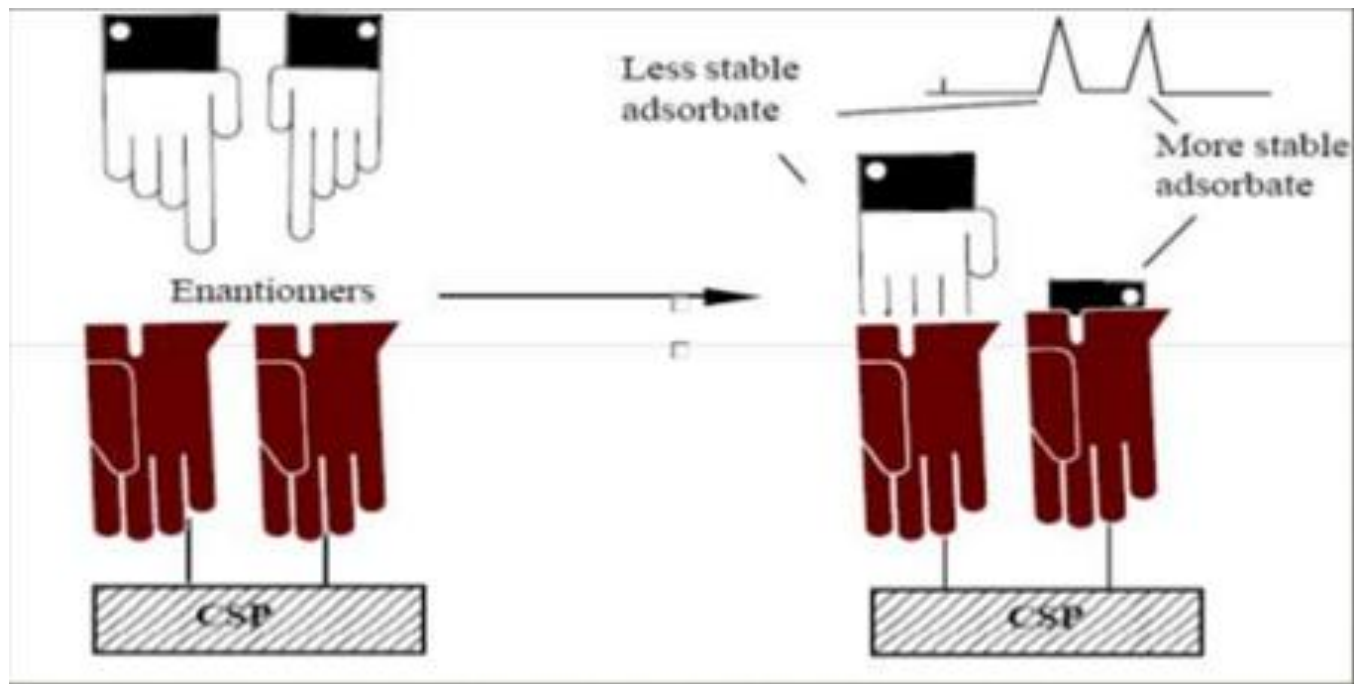


Állófázis

Elválasztás alapjai

Direkt elválasztás

- Állófázis optikailag aktív



Folyadékkromatográfiás állófázisok I.

1.) Természetes alapúak

- fehérjék (BSA, avidin)
- poliszacharidok (cellulóz, amilóz, keményítő, dextrán)
- oligoszacharidok (ciklodextrinek)
- antibiotikumok (vancomycin, teicoplanin)
- kis molekulatömegű molekulák (aminosavak, alkaloidák)

2.) Félszintetikus

- módosított oligoszacharidok,
- módosított poliszacharidok,
(poliszacharid karbamátok, észterek)
- poliszacharid szulfátok
- módosított kis molekulatömegű
molekulák (ioncserélő szelektorok)

3.) Szintetikus

- szintetikus kis molekulatömegű molekulák
- koronaéterek
- helikális szerkezetű polimerek (poliakrilátok, poliakrilamidok)

Folyadékkromatográfiás állófázisok

Elválasztási mechanizmus alapján:

- Ligandumcserés (Davankov-féle)
- Donor-akceptor, illetve Pirkle-féle (brush típusúak)
- Zárvány komplexképzők
- Poliszacharid alapúak
- Fehérje alapúak
- Molekulalenyomat (imprinted) alapúak
- Makrociklikus molekulák

Direkt vs. Indirekt elválasztás

Direkt elválasztás

Előnyök

- Nincs racemizáció
- Validálhatóság
- Preparatív célra is alkalmazható

Hátrány

- Nehéz a módszer optimálás
- Oszlopok rövid élettartama
- Drága

Indirekt elválasztás

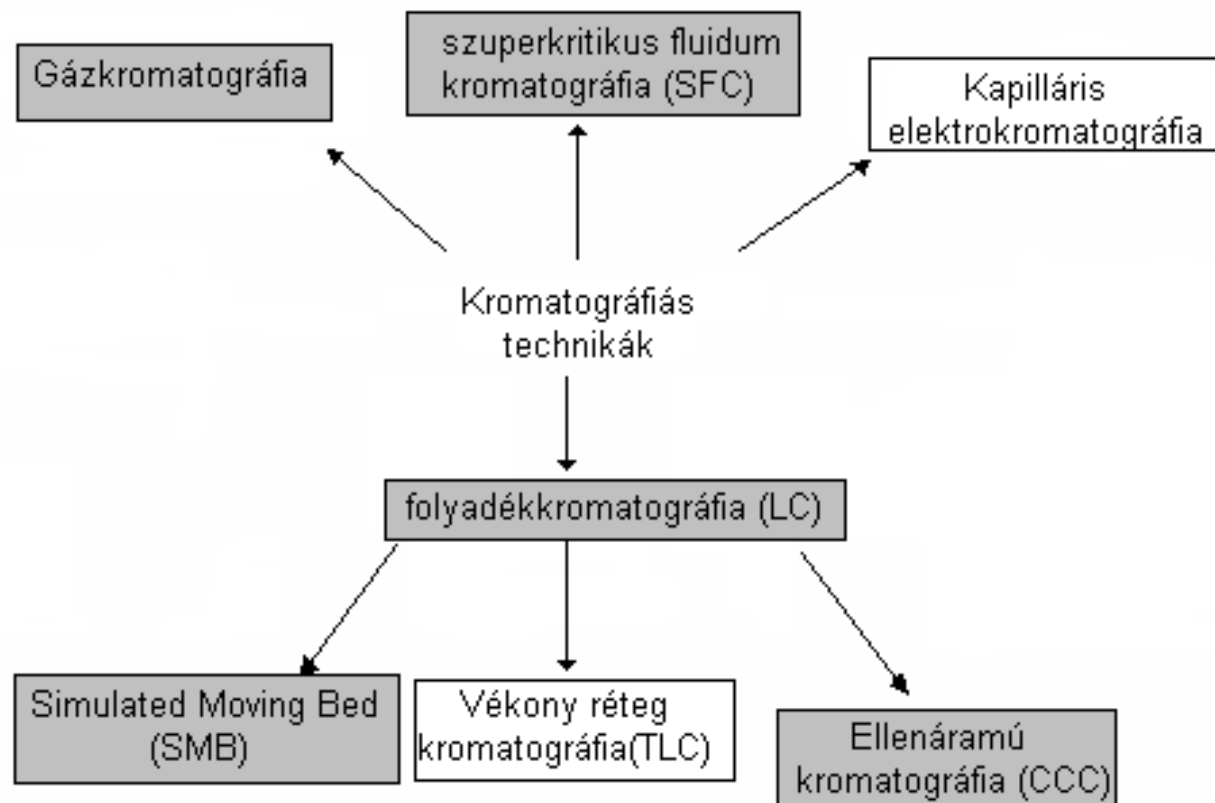
Előnyök

- Diasztereomerek elválasztása egyszerűbb, könnyebb optimalizálni (általában RP-HPLC)
- Variabilitás
- Megnövelt érzékenység
- Változtatható elúciós sorrend, felcserélhetőség

Hátrány

- Összetett mátrixok vizsgálata
- Időigényes lehet

Kromatográfiás technikák



■ Analitikai/Preparatív

□ Analitikai

----- Ritkán alkalmazott

———— Gyakran alkalmazott

Fázis diagram

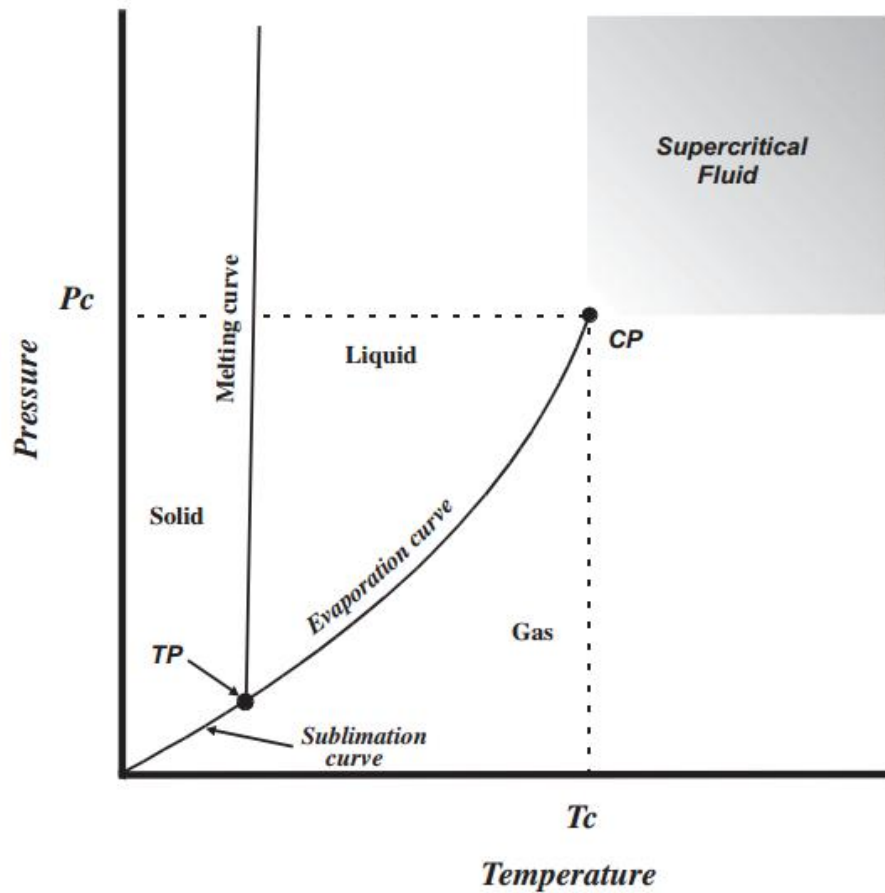
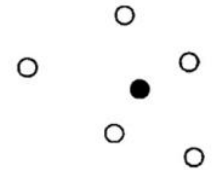
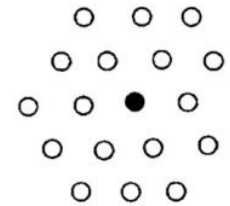


FIG. 1. Phase diagram of pure substance. TP : triple point; CP : critical point; P_c : critical pressure; and T_c : critical temperature. These parameters are specific to each substance.

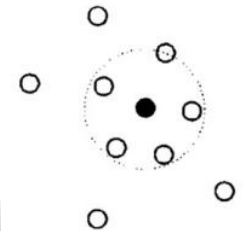
Gáz



Folyadék



Szuperkritikus fluidum



Szuper/szubkritikus állapot

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

- Folyadékhoz hasonló sűrűség (jó oldóképesség)
- Gázhoz hasonló viszkozitás(diffúzivitás, kis áramlási ellenállás)
- Diffúzivitás: gáz-folyadék között (hatékony anyagátadás, C-tag kisebb)

SFC helye és jelentősége

GC

Előnyök:

- univerzális, érzékenyen, gyors
FID detektor
- Nagy kinetikai hatékonyság

Hátrányok:

- hőérzékeny vegyületek mérése
- ionos/nagy molekulatömegű
vegyületek mérése

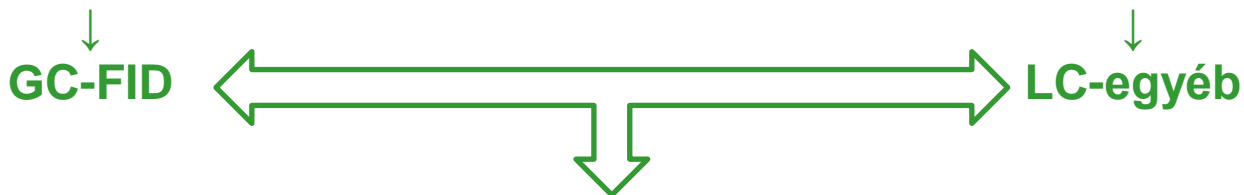
LC

Előnyök:

- hőérzékeny vegyületek mérése
- ionos/nagy molekulatömegű
vegyületek mérése

Hátrányok:

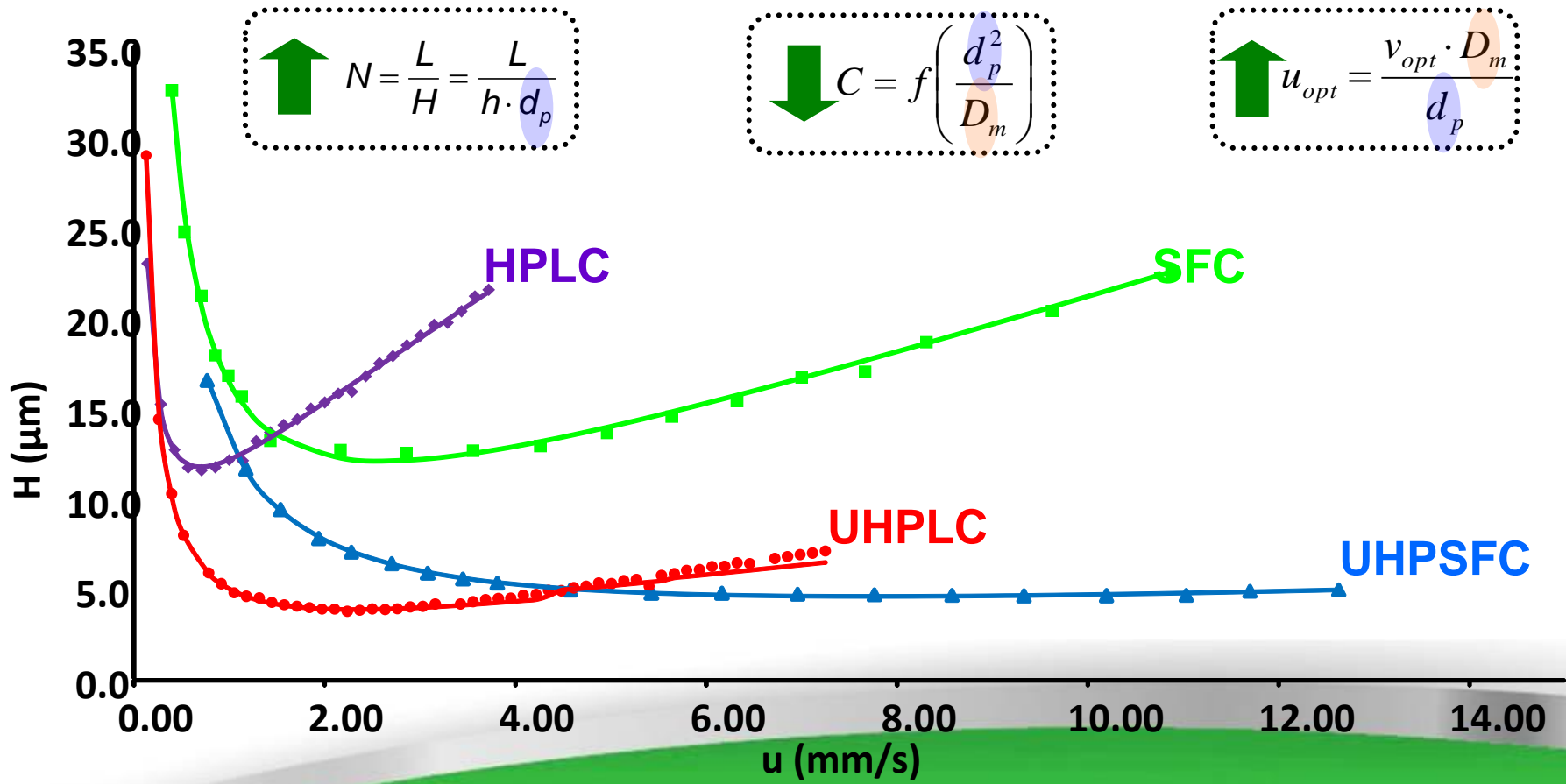
- Nincs általános, nagy
érzékenységgű detektor
- Kisebb kinetikai hatékonyság



SFC

- mozgófázis jellege: gáz és folyadék
között
 - nagy hatékonyság
- hőérzékeny anyagok vizsgálata

Hatékonyság növelés



Kromatográfiás körülmények

Mozgófázis:

- CO₂ (apoláris, hexánhoz hasonló, alacsony T_c/P_c, „nem mérgező”, olcsó)
- Poláris módosítók: DKM, MeOH, MeCN, iPr-OH, THF (2-25%)
- pH-kontrol: savak (TFA, hangyasav), bázisok (TEA, DEA), sók

Állófázis:

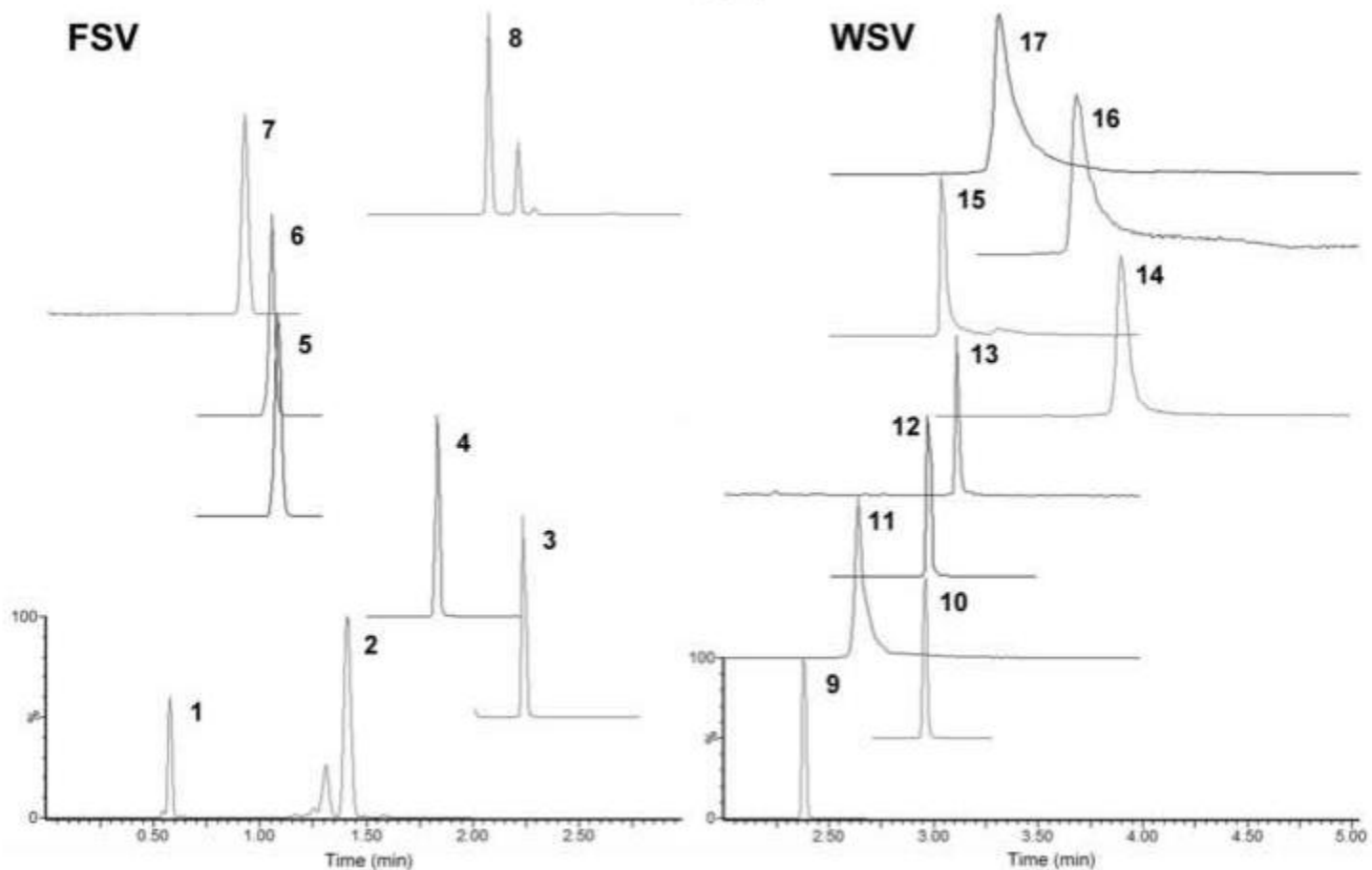
- Polárisan módosított szilika, vagy szilika (NP-LC)
- Apolárisan módosított szilika (RP-LC, NARP-LC)
- Királis állófázisok (pl. amilóz, cellulóz)

Mintaoldószer:

- Általában heptán + poláris modifikátor

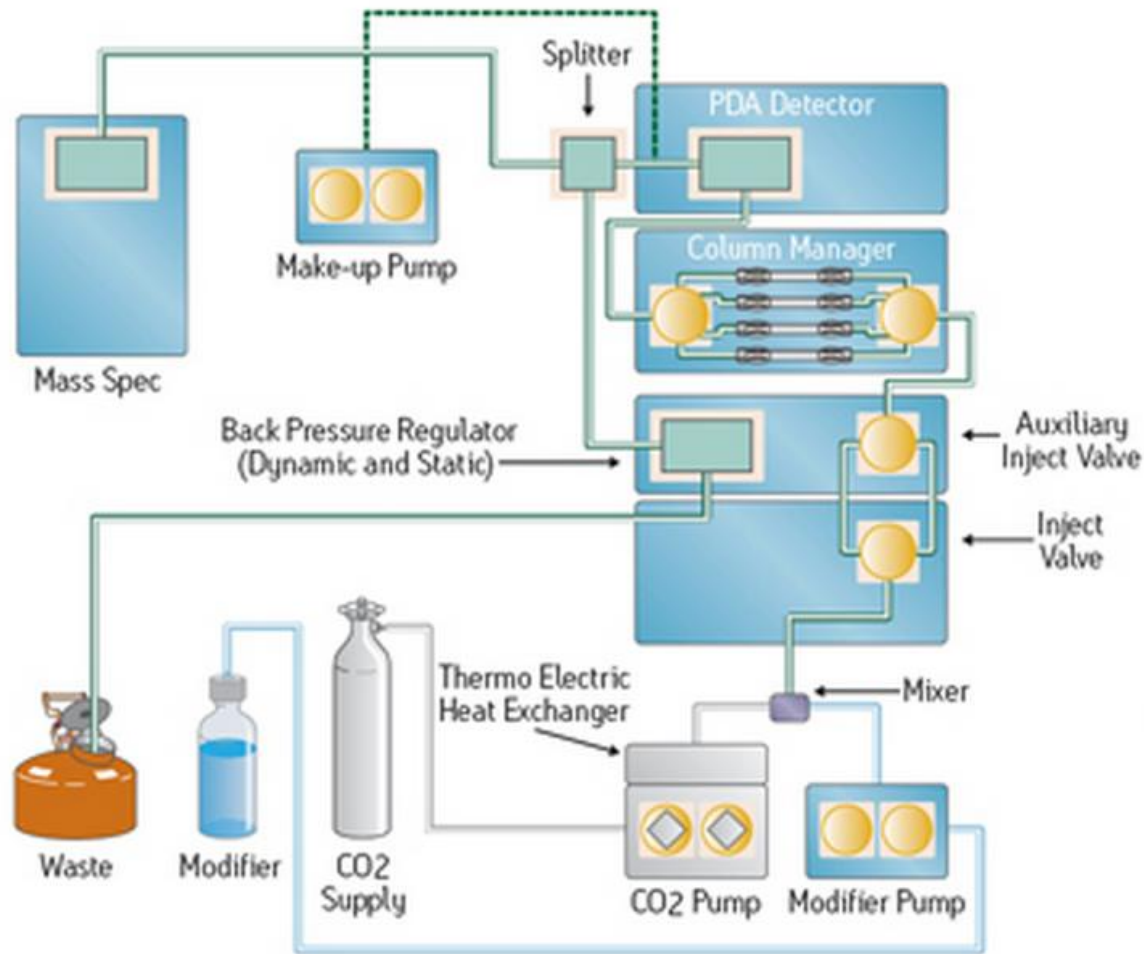
Vizsgálható komponensek

- oldható a mozgófázisban
 - kémiai átalakulás nélkül
 - a detektálás megszabta koncentrációnak megfelelően
-
- Apoláris karakterű anyagok (aril, alkil, stb.), amelyek tartalmazhatnak poláris csoportokat (-OH, -COOH, -NH₂, -CN, stb.)
 - Ma már peptidek elválasztásra is van példa



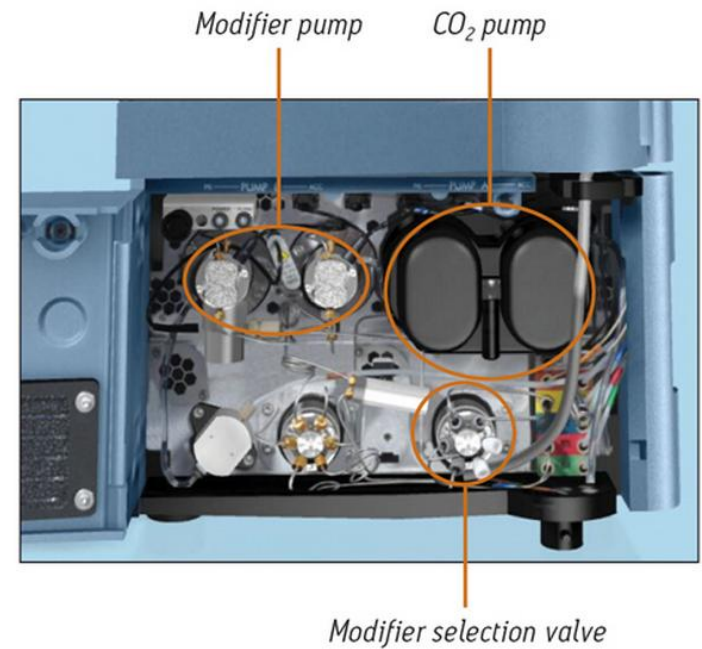
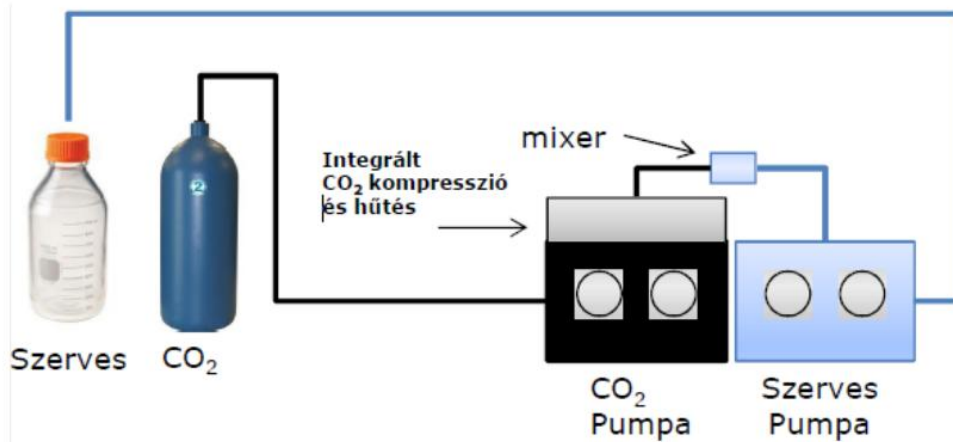
MRM chromatograms of 17 vitamins. 1: A acetate, 2: A palmitate, 3: D2, 4: α -Tocopherol, 5: K2, 6: K1, 7: α -Tocopherol acetate, 8: β -Carotene, 9: Nicotinamide, 10: Nicotinic acid, 11: Pyridoxine, 12: D-Pantothenic acid, 13: Biotin, 14: Thiamine, 15: Riboflavin, 16: B12, 17: VC. Method conditions as follows; modifier: methanol/water (95/5, v/v) with 0.2% ammonium formate; gradient condition: 2% (0.5 min), 2–30% (2.0 min), 30–85% (0.8 min), 85% (2.7min), 85–100% (0.2 min), 100% (1.3 min), 100–2% (1 min), 2% (1.5 min); flow rate: 1.2 mL/min at a column temperature of 40°C; back pressure: 15.2 MPa (6.0 min), 15.2–10.3 MPa (0.2 min), 10.3 MPa (1.6min), 10.3–15.2 MPa (0.5min), 15.2 MPa (1.7min).

Készülék felépítése (UPC²)

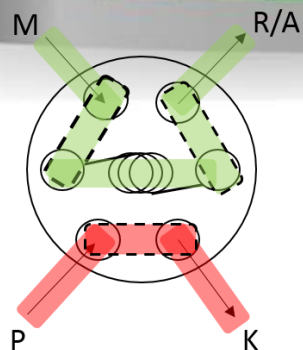


- Hűtött pumpafej a CO₂ szállítására
- Injektálás kiegészítő forgószelepen keresztül
- Aktív előmelegítés (opcionális UHPLC-ben)
- Nyomásszabályozás az UV/DAD detektor után, CO₂ kezelése

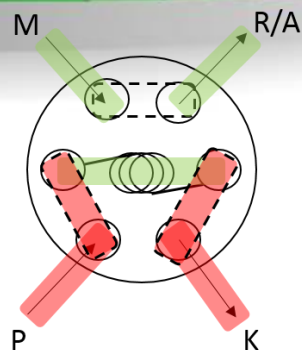
Hűtött pumpafej



Injektálás



Minta betöltése (load)



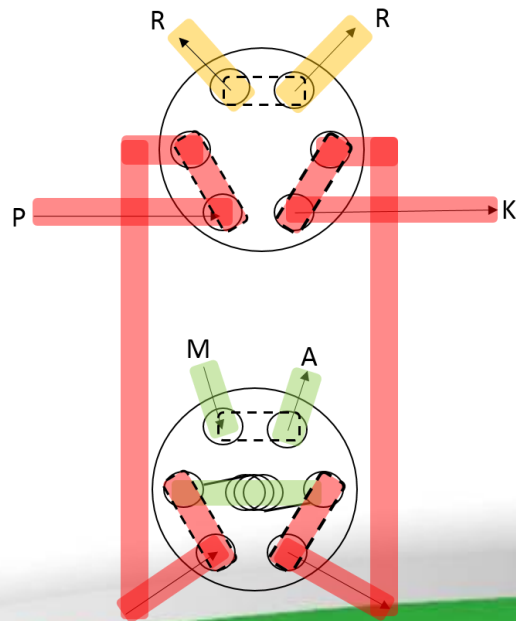
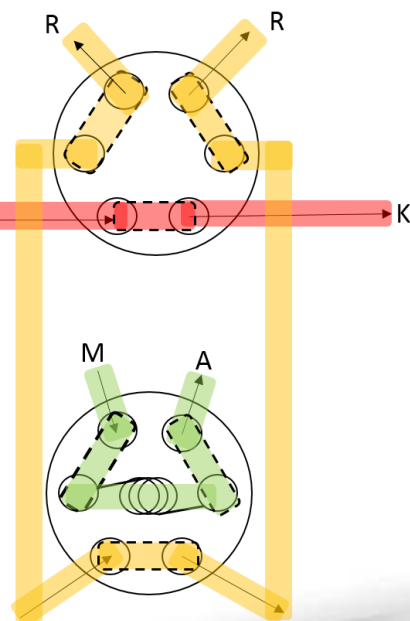
Injektálás (inject)

LC:

- nincs fáziskülönbség a minta és a mozgófázis között
- töltés alatt a mozgófázis nem jut a mintahurokba (nem diffundál bele)

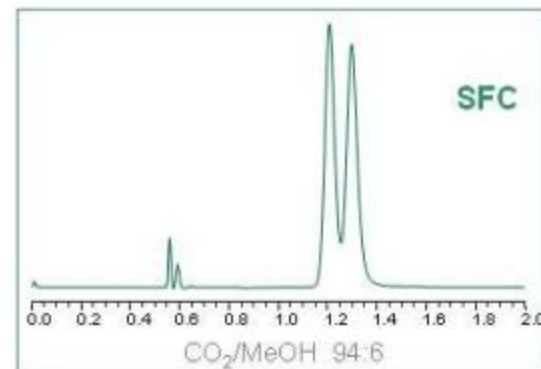
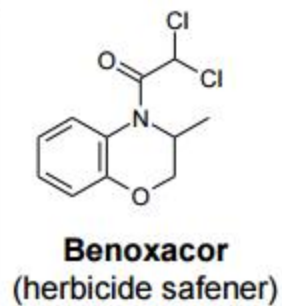
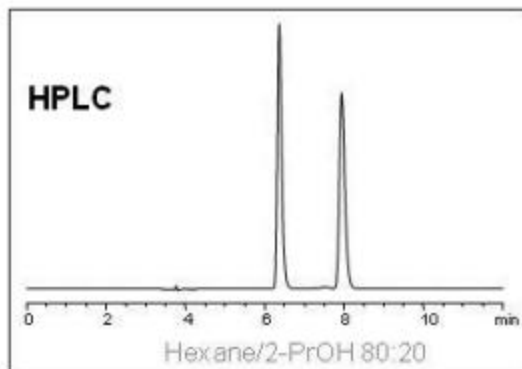
SFC:

- van fáziskülönbség a minta és a mozgófázis között
- töltés alatt (néhány sec) a mozgófázis bediffundálhatna a mintahurokba (reprodukálhatóság csökkenése)
- A segédszelep (1) töltés alatt atm. nyomáson tartja a 2-es szelepet
- Injektálás először a 2-es, majd az 1-es szelep fordul



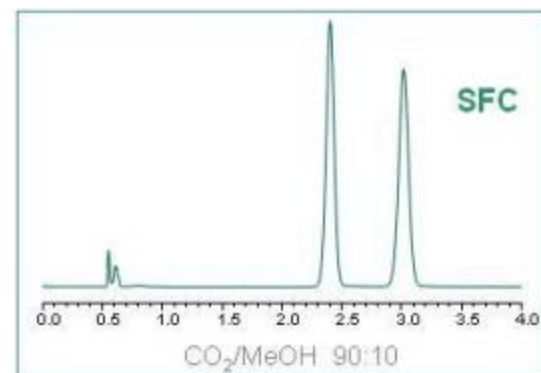
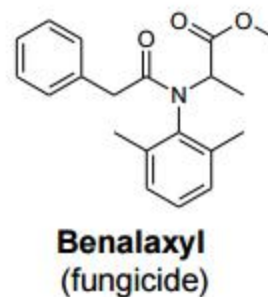
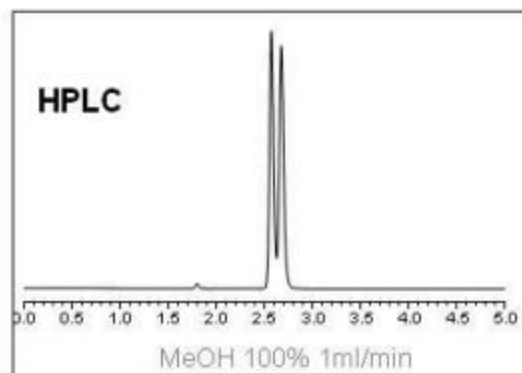
HPLC és SFC királis elválasztás

CHIRALPAK ID



CHIRALPAK ID

CHIRALPAK IC-3



CHIRALPAK IC-3

Köszönöm a figyelmet!