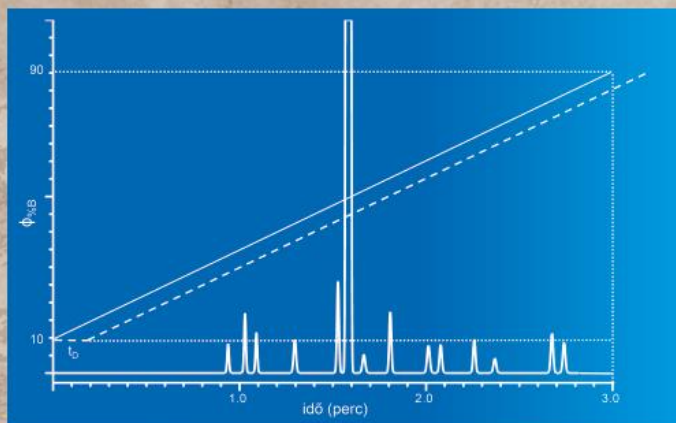


Dr. Kormány Róbert
Folyadékkromatográfia
Biomérnök és gyógyszervegyész-mérnök
hallgatók számára
2018. 03. 27 és 2018. 04. 24



Szakkönyv ajánlat

Modern folyadékkromatográfia



Szerkesztette:

Prof. Fekete Jenő

Dr. Kormány Róbert

Dr. Fekete Szabolcs

Lektorálta:

Dr. Bobály Balázs



2017 tavaszán megjelent a
Modern folyadékkromatográfia
című tan- és szakkönyv.

Minden további információ
megtalálható az alábbi
elérhetőségek egyikén:

Tel: +36 30 579 5356

E-mail: info@kromkorm.hu

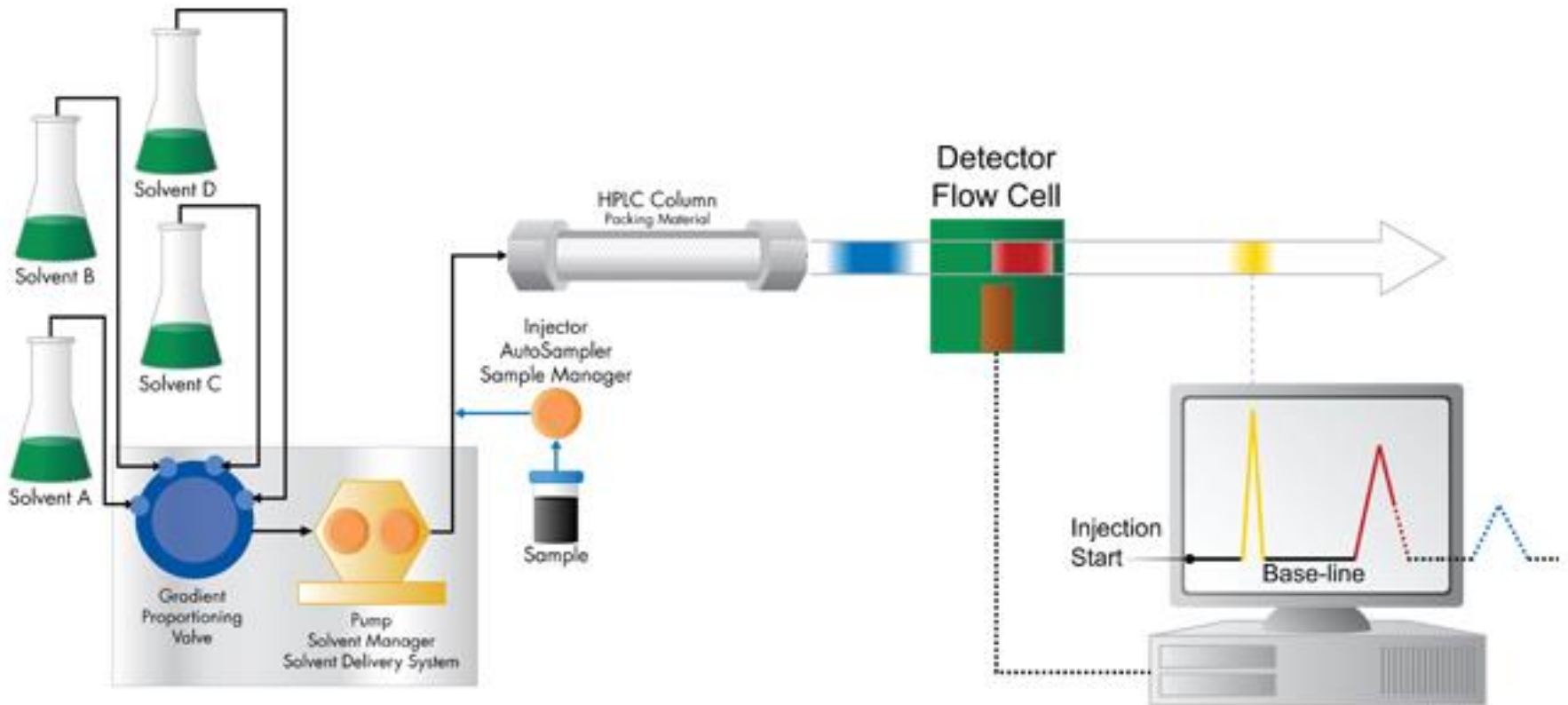
Web: www.kromkorm.hu

Krom
Korm

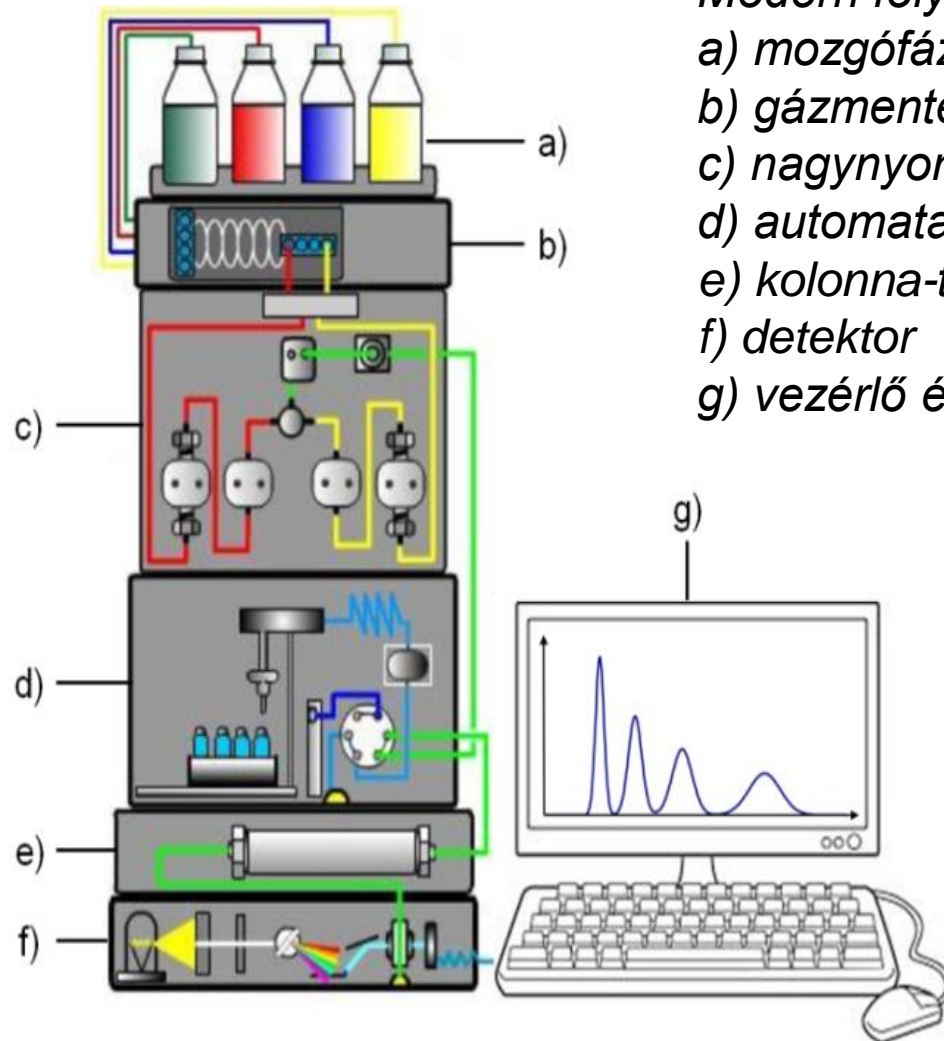
A folyadékkromatográfia (HPLC) szerepe a gyógyszeriparban

- Gyógyszerhatóanyagok és -készítmények hatóanyagtartamának meghatározása.
- Gyógyszerhatóanyagok és -készítmények tisztaságának ellenőrzése.
- Gyógyszerhatóanyagok oldhatóságának és gyógyszerkészítmények kioldódás vizsgálatának analitikai támogatása.
- Gyártó berendezések tisztaságának ellenőrzése.
- Teljes szintézisút követés.
- Környezetvédelmi és munkabiztonsági mérések.

A HPLC felépítése



A HPLC felépítése



Modern folyadékkromatográfiás rendszer

a) mozgófázis

b) gázmentesítő

c) nagynyomású szivattyú

d) automata mintaadagoló

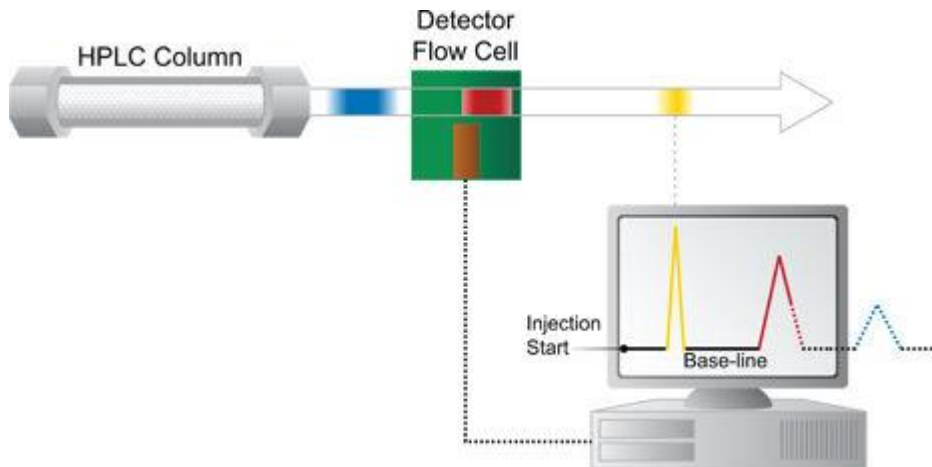
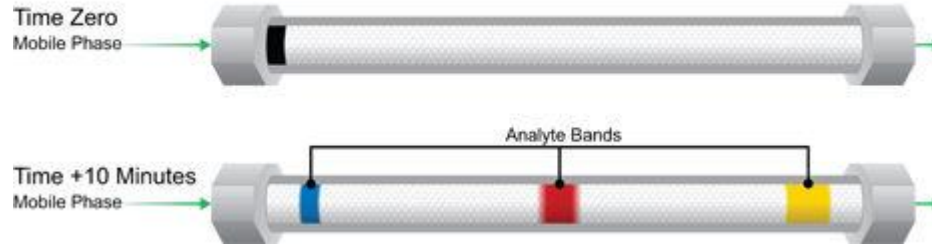
e) kolonna-termosztát

f) detektor

g) vezérlő és adatgyűjtő számítógép

Az állófázis (kolonna)

Injected Sample Band (Appears "Black") (Blue, Red, Yellow)



A hagyományos folyadékkromatográfiai módszerek besorolása az álló- és a mozgófázis fázisviszonya alapján

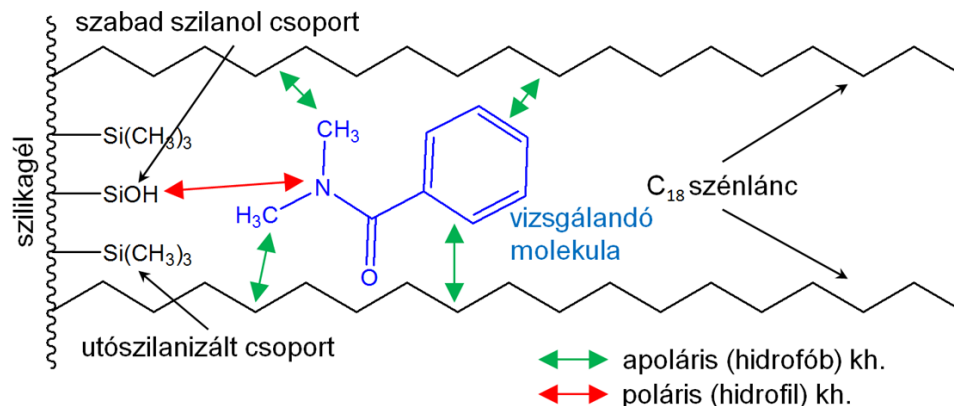
Elnevezés	Állófázis	Mozgófázis
normál fázisú folyadékkromatográfia (NP-HPLC, NPLC)	polárisabb	apolárisabb
fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC, RPLC)	apolárisabb	polárisabb
fordított fázisú ionpár-folyadékkromatográfia (RP-IP-HPLC, RP-IP-LC)	apolárisabb	polárisabb + hidrofób ion
hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (HILIC)	polárisabb	kevésbé poláris
ioncserés nagyhatékonyságú kromatográfia (IEC, IE-PLC)	ionos	puffer, vagy ion tartalmú víz és szerves oldószer
nem vizes méretkizárásos kromatográfia (SEC) (régibbi nevén gél permeációs kromatográfia, GPC)	apoláris, nagy pórus átmérőjű	szerves oldószer
vizes méretkizárásos kromatográfia (SEC) (régibbi nevén gélszűrés, GFC)	poláris, nagy pórus átmérőjű	puffer
hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (HIC)	mérsékelten apoláris	negatív sógradiens (1-4 mol/L)
Optikai izomerek elválasztása (királis)	királis szelektor	állófázis típusától függően: NP / RP / PO

Az egyes folyadékkromatográfiás módszerek alkalmazhatósága a vegyületek jellege szerint

Módszer	Vegyület jellege	Kizáró ok
NPLC	közepesen poláris	ionos jelleg, nincs poláris csoport a vegyületben, nagy polaritású anyagok
RPLC	apoláris	ionos jelleg kis apoláris résszel, nagy polaritás
RP-IP-LC	ionos	nem ionos vagy nem ionizálható
HILIC	nagy polaritású, ionos	apoláris, és ionos állapotba nem hozható
IEC	ionos	nem ionos vagy nem ionizálható
SEC/GPC	apoláris polimer	poláris polimer ionos vagy ionizálható csoporttal
SEC/GFC	biopolimerek	apoláris polimerek
HIC	biopolimerek	kis molekula
Királis	optikai izomerek	

Fordított fázis (Reversed Phase, RP)

- Fordított fázisú kromatográfiás elválasztásról akkor beszélünk, ha az állófázis polaritását tekintve apolárisabb, mint az alkalmazott mozgófázis.
- Jellemző RP állófázis a C18



- Jellemző mozgófázisok az RP-ben

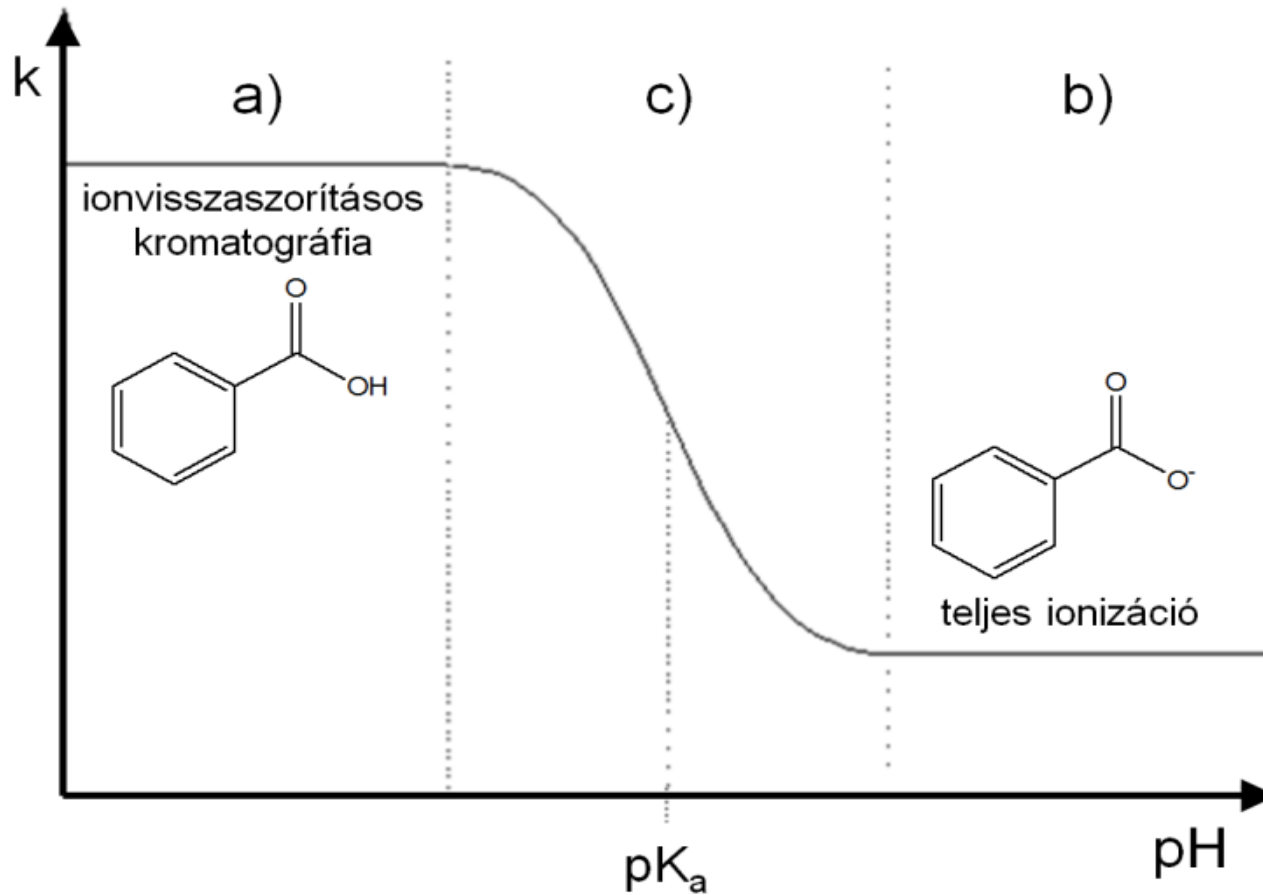
Oldószer	UV cut-off (nm)	Refraktív index (20°C)	Viszkozitás (cP)	Forráspont (°C)	Polaritás (P')
Acetonitril	190	1,3441	0,38	81,6	5,8
Dioxán	215	1,4224	1,37	101,3	4,8
Etanol	210	1,3614	1,20	78,0	n.a.
Metanol	205	1,3284	0,55	64,7	5,1
2-Propanol	205	1,3772	2,40	82,3	3,9
Tetrahidrofurán	212	1,4072	0,55	66,0	4,0
Víz	190	1,3330	1,00	100,0	10,2

Vizsgálandó anyagok csoportba sorolása

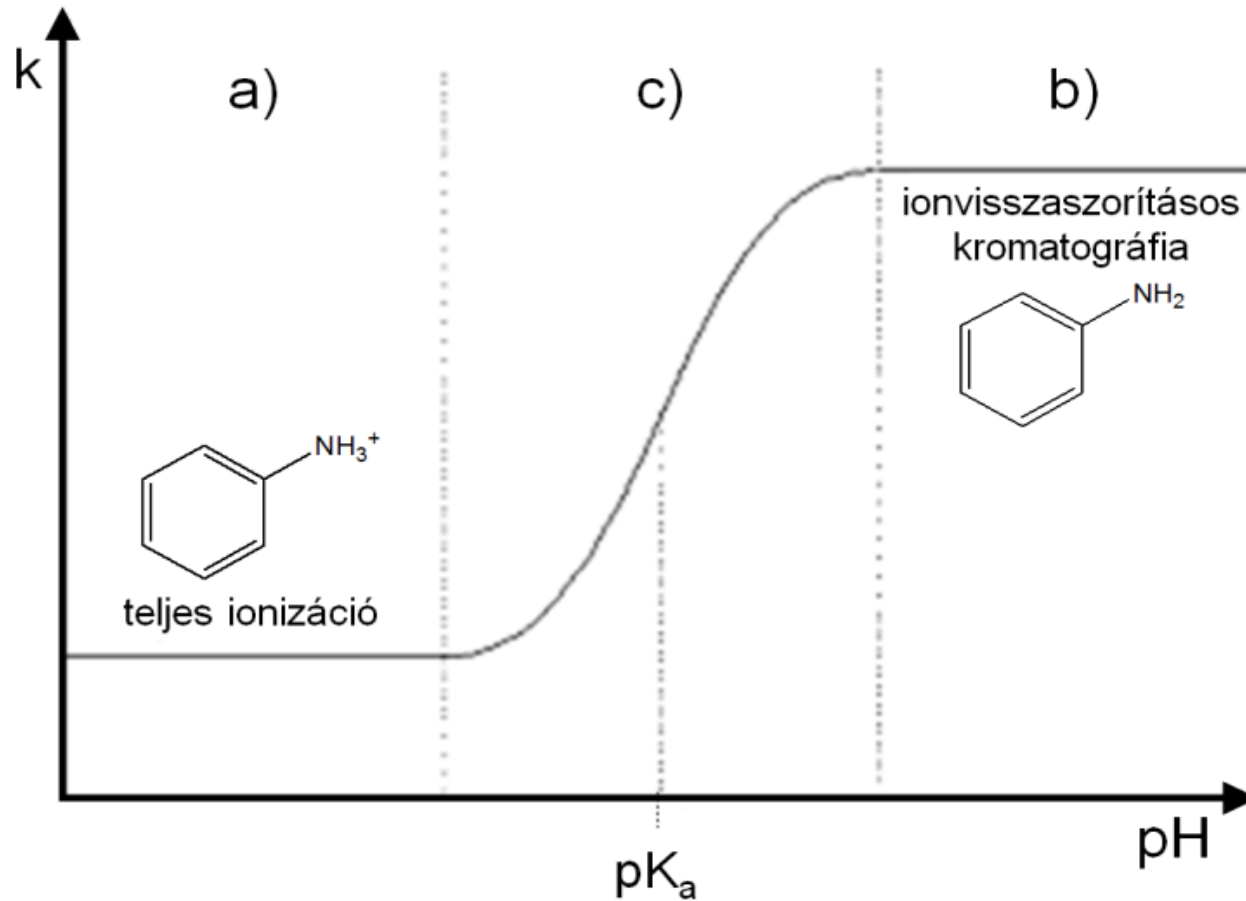
Kromatográfias szempontból a vegyületek négy csoportra oszthatók:

- kromatográfias szempontból semleges vegyületek, a) és b) csoport
 - a) csoport: aromás és alifás szénhidrogének, halogénezett aromás és alifás szénhidrogének
 - ✓ **nem szüksége pH kontroll**
 - b) csoport: alkoholok, éterek, észterek, aldehidek, ketonok, nitrilek, nitro-vegyületek, azo-vegyületek
 - ✓ **állófázis szempontjából szükség lehet pH kontrollra**
- savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
 - ✓ **pH kontroll szükséges**
- bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
 - ✓ **pH kontroll szükséges**
- ionos vagy ionizálható vegyületek
 - ✓ **pH kontroll szükséges**

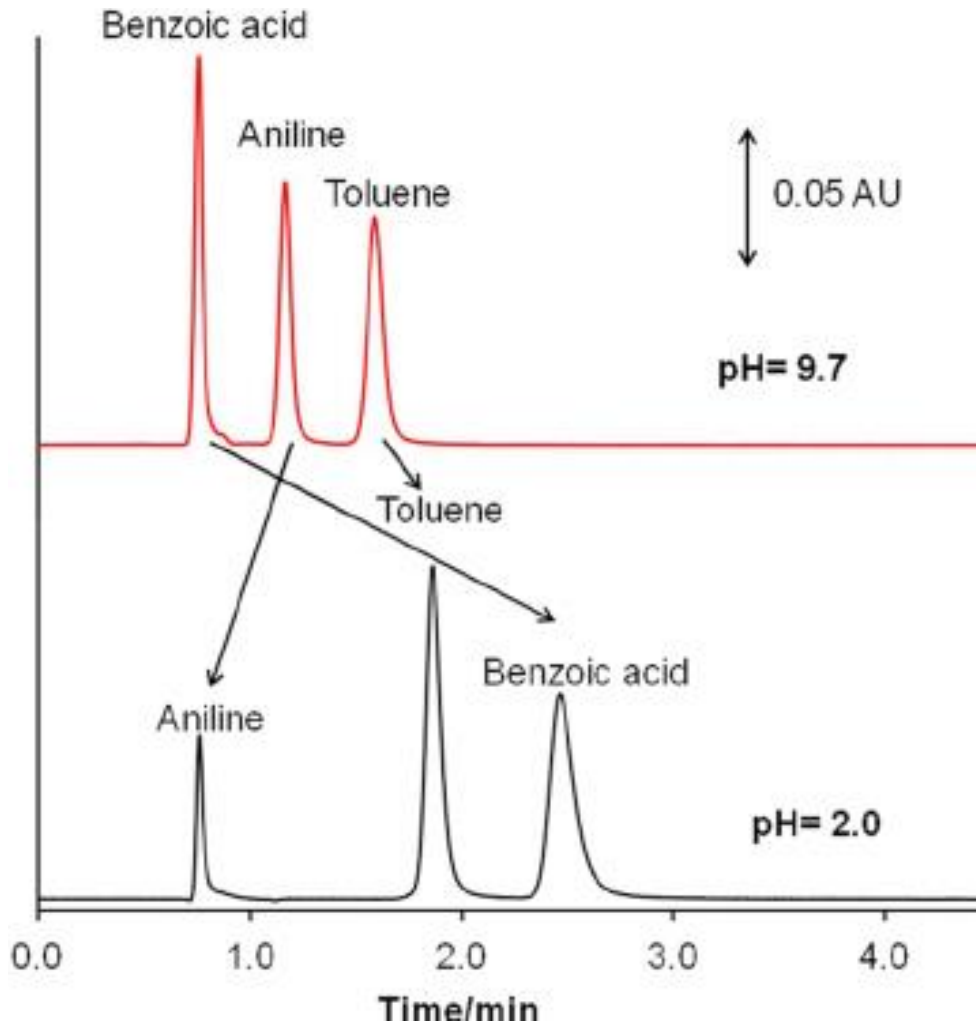
Savas jellegű funkció csoportot tartalmazó vegyületek



Bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek



pH hatása a folyadékkromatográfiás elválasztásra



benzoesav $pK_a = 4,2$ ($\log P 1,89$)

Ionvisszaszorított forma ($pK_a - 2$)
 $pH < 2,2$

Ionos forma ($pK_a + 2$)
 $pH > 6,2$

anilin $pK_a = 4,6$ ($\log P 0,94$)

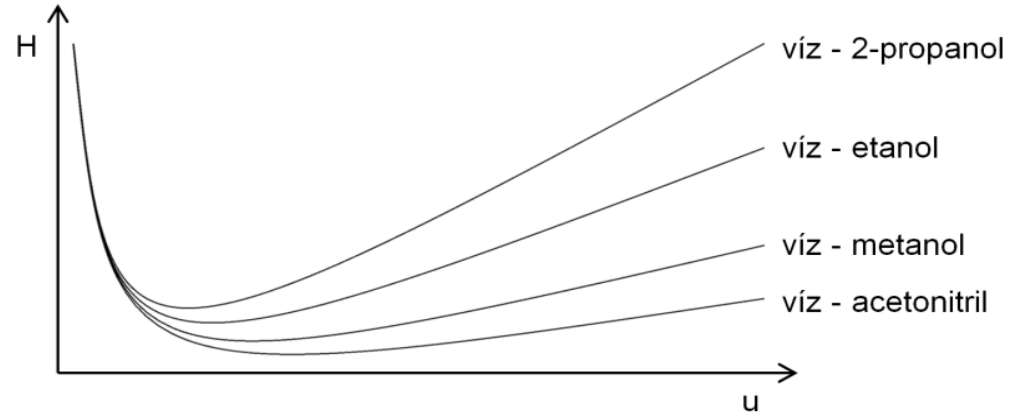
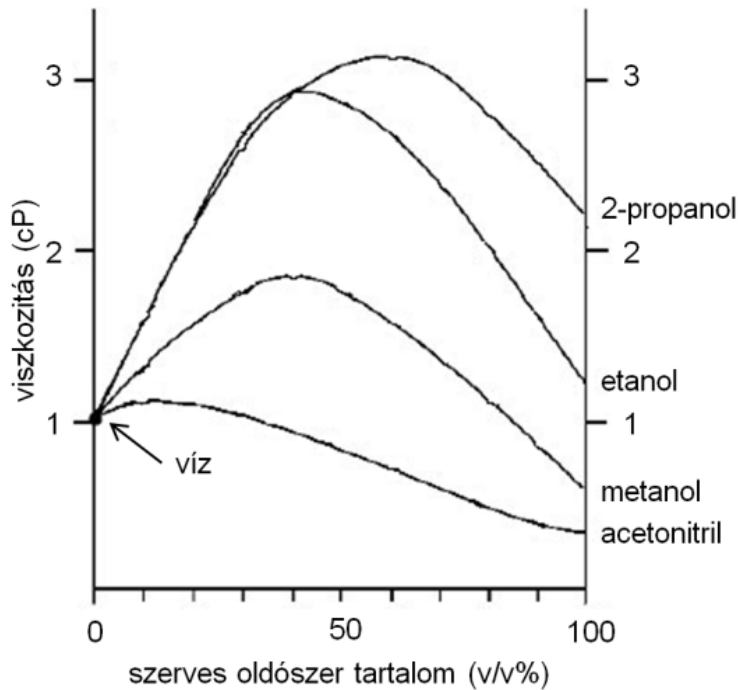
Ionvisszaszorított forma ($pK_a + 2$)
 $pH > 6,4$

Ionos forma ($pK_a - 2$)
 $pH < 2,4$

Mozgófázissal szemben támasztott követelmények

- tisztasági követelmény:
 - a lehető legtisztább oldószert kell használni
 - az oldószer nem tartalmazhat szilárd anyagot
- jó UV-fény áteresztőképesség (UV cut-off)
- kis viszkozitás
- a mintakomponenseknek jól kell oldódniuk a mozgófázisban
- kis toxicitás
- módszer specifikus követelmény, hogy a mozgófázisnak polárisabbnak kell lennie, mint az állófázis felülete

Mozgófázissal szemben támasztott követelmények



$$D_M = \frac{A(\Psi M)^{1/2} T}{\eta^{0,6}}$$

Wilke-Chang összefüggés

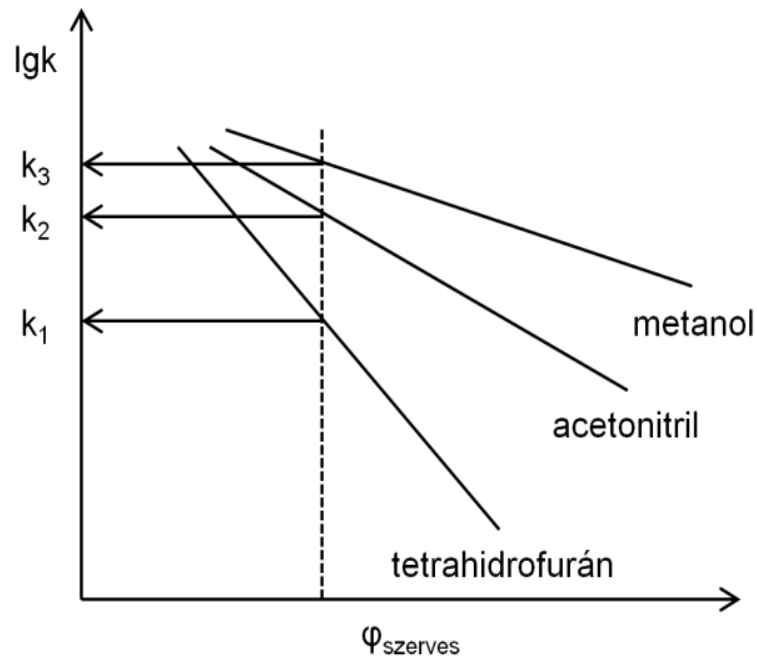
$$\Delta p = \frac{\phi \eta L u}{d_p^2}$$

Darcy-törvény

$$H = A \cdot d_p + f_1(k) \frac{D_M}{u} + f_2(k) \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M}$$

Mozgófázissal szemben támasztott követelmények

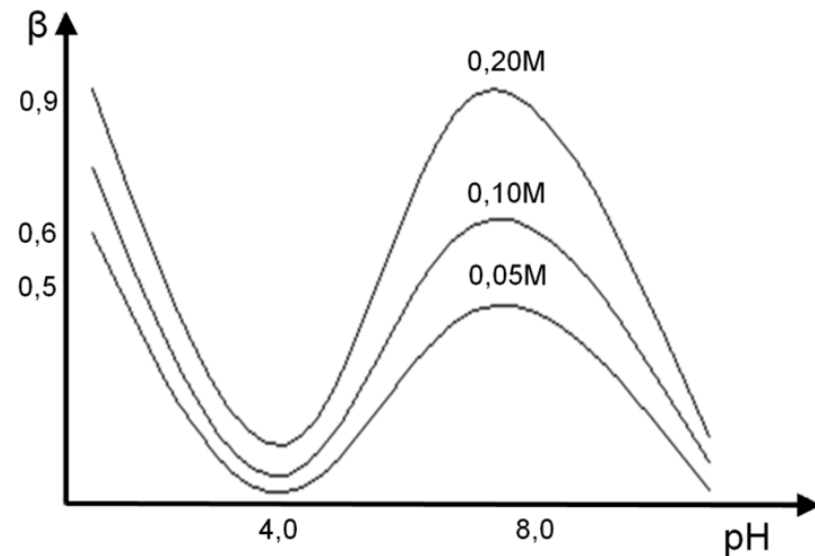
————— elúciós erő —————▶
víz – metanol – acetonitril – etanol – 2propanol – tetrahydrofuran
◀ ————— szelektivitás —————



Mozgófázissal szemben támasztott követelmények

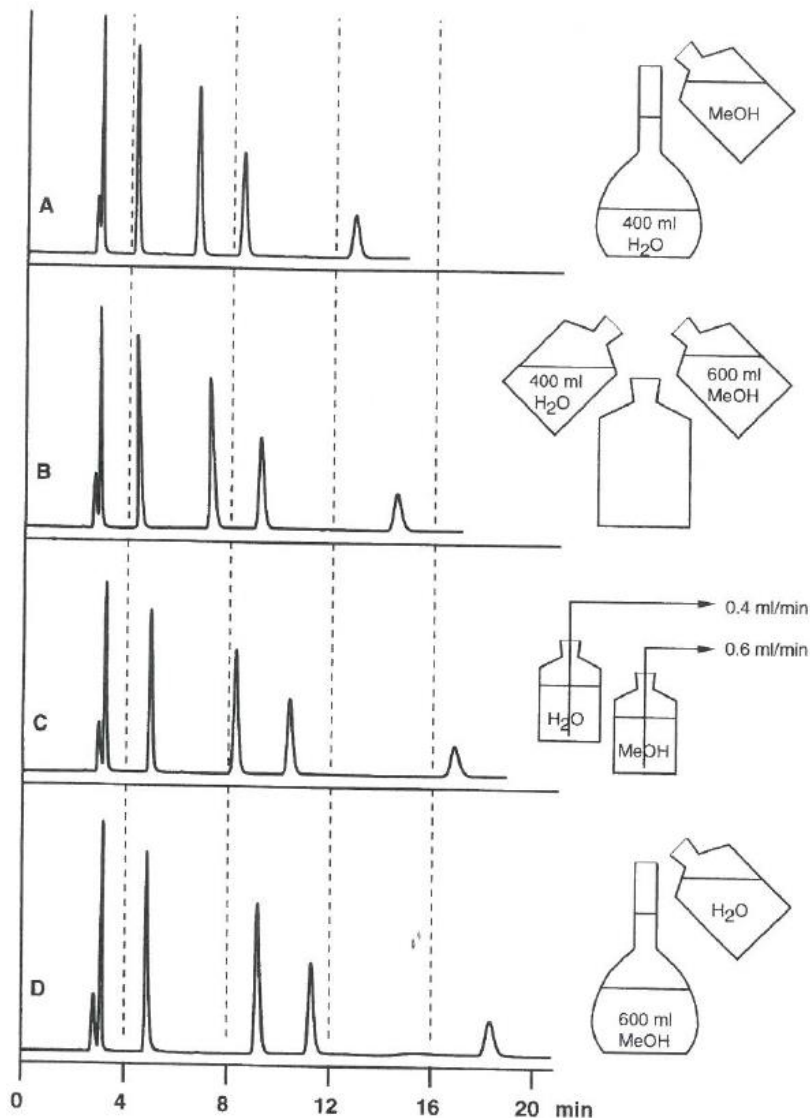
Néhány vegyület pK_a értéke vizes környezetben.

Puffer	pK_a	pH tartomány	UV cut-off
Trifluoecetsav	< 2	< 2,5	210nm (0,1%)
Foszfát (pK_1)	2,1	1,1 – 3,1	< 200nm (10mM)
Citrát (pK_1)	3,1	2,1 – 4,1	230nm (10mM)
Formiát	3,8	2,8 – 4,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_2)	4,7	3,7 – 5,7	230nm (10mM)
Acetát	4,8	3,8 – 5,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_3)	5,4	4,4 – 6,4	230nm (10mM)
Karbonát (pK_1)	6,4	5,4 – 7,4	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_2)	7,2	6,2 – 8,2	< 200nm (10mM)
Trietanolamin	7,8	6,8 – 8,8	200nm (10mM)
Tris	8,3	7,3 – 9,3	205nm (10mM)
Dietanolamin	8,9	7,9 – 9,9	200nm (10mM)
Ammónia	9,2	8,2 – 10,2	200nm (10mM)
Etanolamin	9,5	8,5 – 10,5	200nm (10mM)
Karbonát (pK_2)	10,3	9,3 – 11,3	< 200nm (10mM)
Dietilamin	10,5	9,5 – 11,5	< 200nm (10mM)
Trietilamin	11,0	10,0 – 12,0	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_3)	12,3	11,3 – 13,3	< 200nm (10mM)



A pufferkapacitás változása a pH-val és a koncentrációval foszfát puffereknél.

Mozgófázissal szemben támasztott követelmények



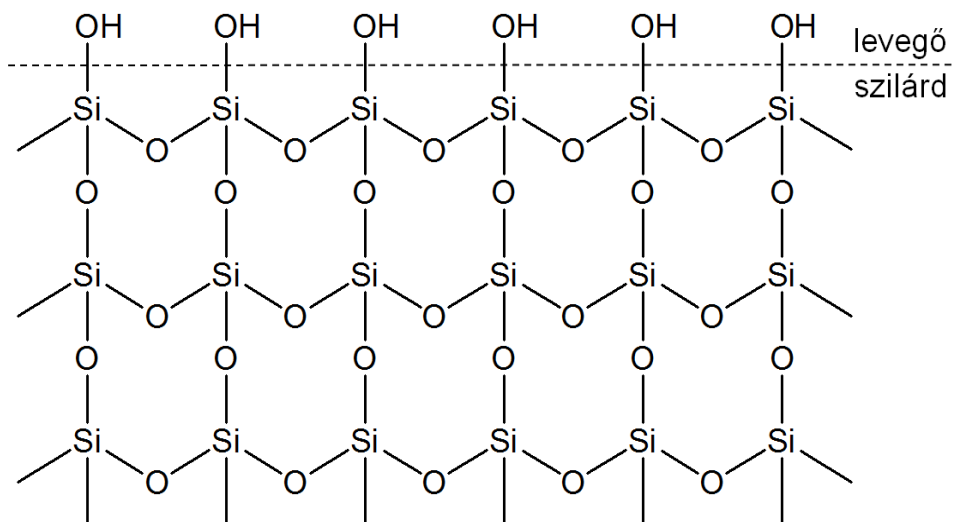
Kálium-foszfát (pH=7,0) oldhatósága különböző összetételű víz-szerves oldószer elegyekben.

%B	MeOH	AcN	THF
50	> 50 mM	> 50 mM	25 mM
60	> 50 mM	45 mM	15 mM
70	35 mM	20 mM	10mM
80	15 mM	5 mM	< 5 mM
90	5 mM	0 mM	0

Különböző pufferek oldhatósága különböző összetételű víz-acetonitril elegyekben.

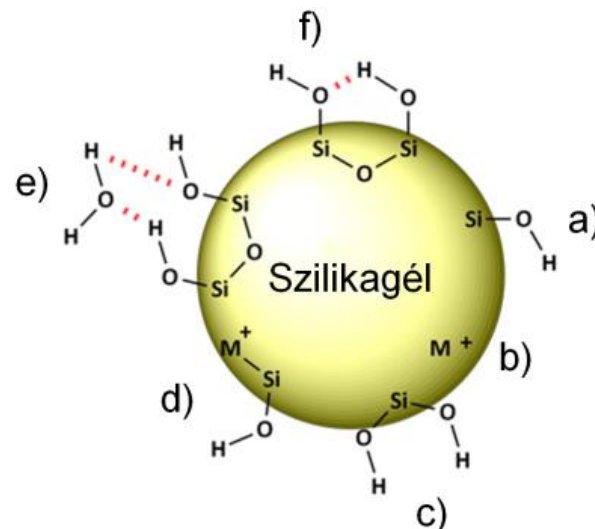
%B	ammónium- acetát pH=5,0	ammónium- foszfát pH=3,0	kálium- foszfát pH=3,0	ammónium- foszfát pH=7,0	kálium- foszfát pH=7,0
60	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	45 mM
70	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	25 mM	20 mM
80	> 50 mM	35 mM	20 mM	5 mM	0 mM
90	25 mM	5 mM	0 mM	0 mM	0 mM

Állófázissal szemben támasztott követelmények



A porózus szilikagél jellemzői:

- az átlagos pórusátmérő: d_p
- a fajlagos felület: A_s
- a fajlagos pórustérfogat: V_p



- szabad szilanol csoport a)*
- szabad fémion b)*
- geminális szilanol csoport c)*
- fémion által aktivált szilanolcsoport d)*
- dezaktivált szilanol csoport e)*
- vicinális szilanol csoport f)*

Állófázissal szemben támasztott követelmények

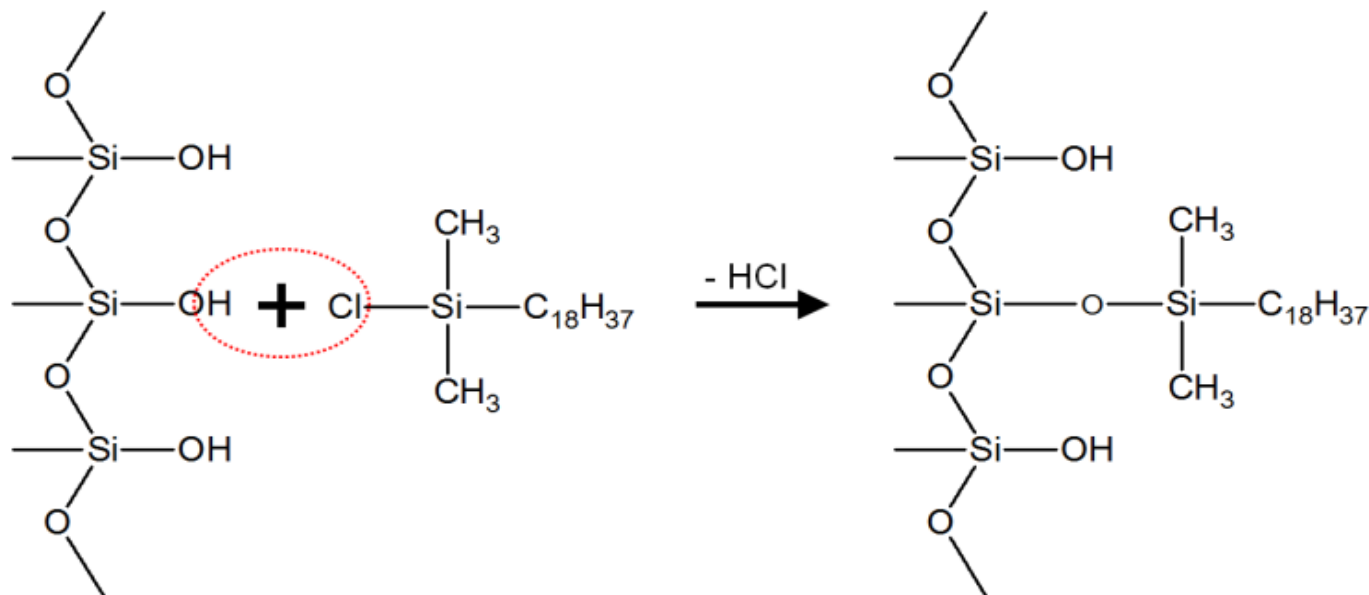
Szilikagélek csoportosítása:

- Első generációs szilikagélek, fémiontartalom: 150 – 200 ppm
- Második generációs szilikagélek, fémiontartalom: 10 – 100 ppm
- Harmadik generációs szilikagélek, fémiontartalom: 1 – 10 ppm
- Negyedik generációs szilikagélek, fémiontartalom: < 1 ppm

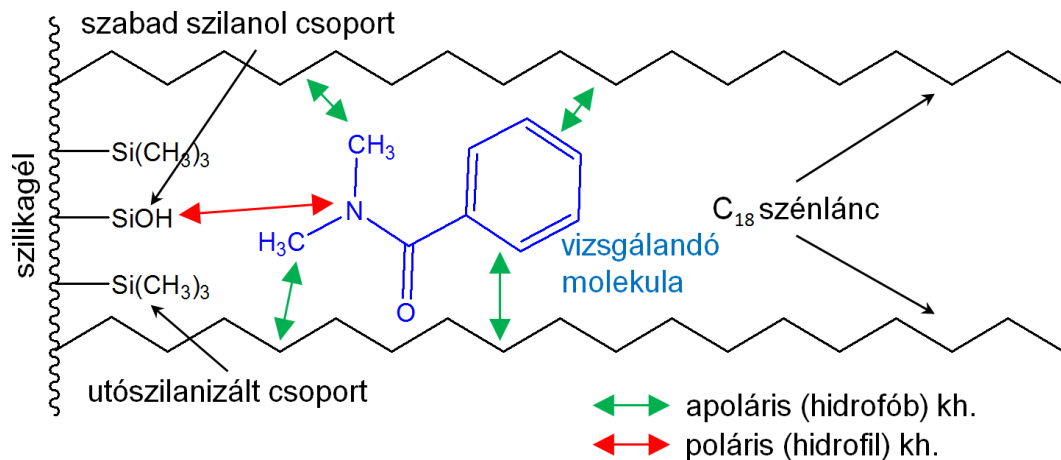
A Hypersil fordított fázisú töltetcsalád fémion tartalma.

Kolonna töltet	Fe (ppm)	Na (ppm)	Al (ppm)	Mg (ppm)	Ti (ppm)	Ca (ppm)	K (ppm)	Összes fémiontartalom (ppm)
Hypersil ODS	240	2000	250	31	57	27	10	2615
Hypersil BDS	88	1350	130	10	28	10	10	1626
Hypersil Elite	66	259	11	11	19	10	5	381
HyPurity	<12	<2	<1	<1	<1	<2	<1	<20

Állófázissal szemben támasztott követelmények



Felületmódosítás monofunkciós klór-szilánnal.



Állófázissal szemben támasztott követelmények

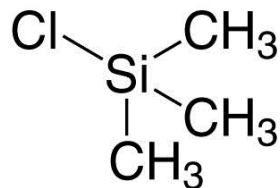
A hidrofób (apoláris) felület a fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztásoknál elsődleges cél, vagyis hogy a vegyületeket apoláris jellegükből eredő állófázis-komponens kölcsönhatás alapján válasszuk el. Ez egyben azt is jelenti, hogy a maximális felületi borítottságot érjük el.

Ez szilikagélnél a 40 – 50%-os konverziót figyelembe véve $\sim 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

A monomer módosítású szilikagél állófázisokat ez alapján három kategóriába sorolhatjuk:

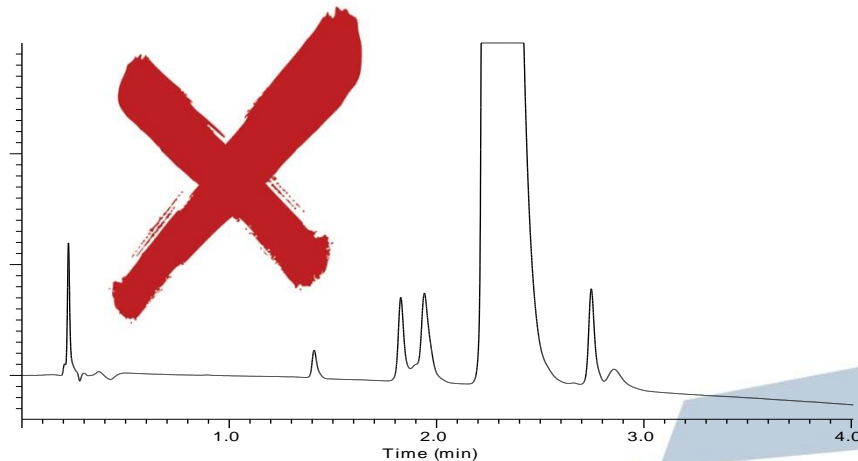
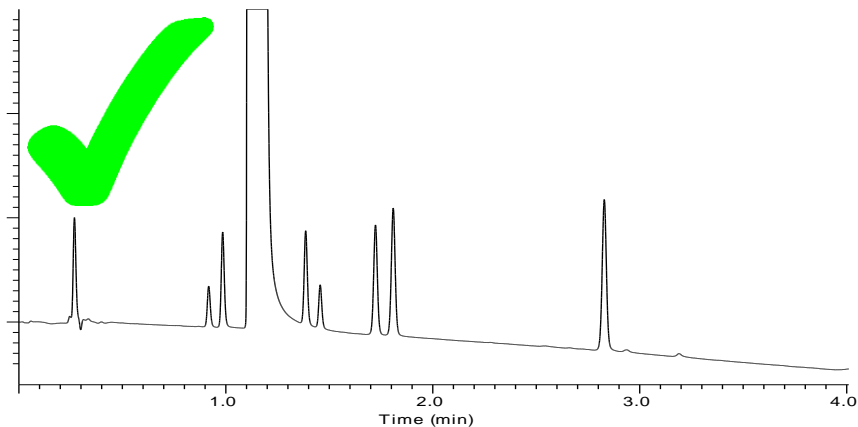
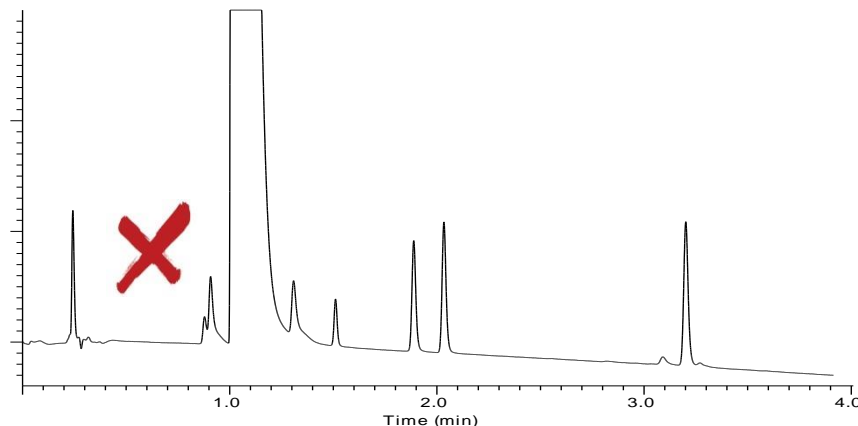
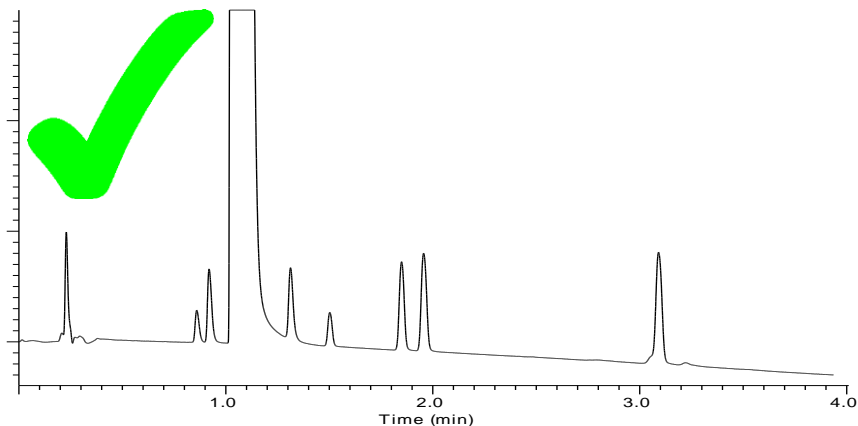
- nagy felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $\sim 3 - 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$
- közepes felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $\sim 2 - 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$
- kis felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $< 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$

Utószlanizálási reakció trimetil klór-szilánnal

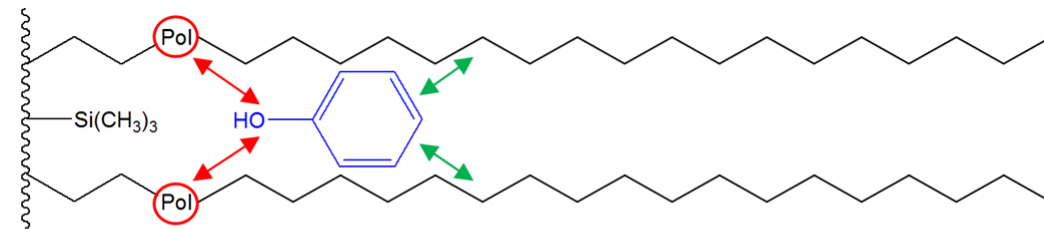
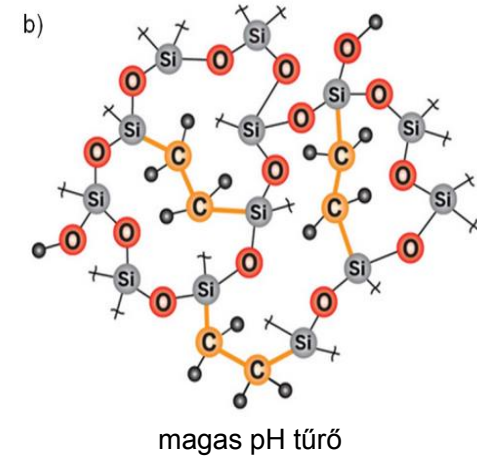
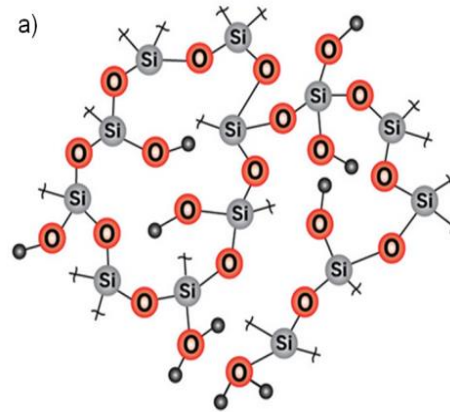
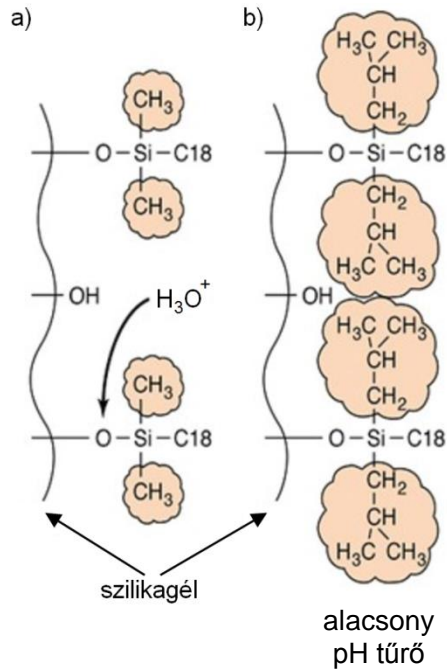


Állófázissal szemben támasztott követelmények

Legfontosabb a megfelelő állófázis kiválasztása!

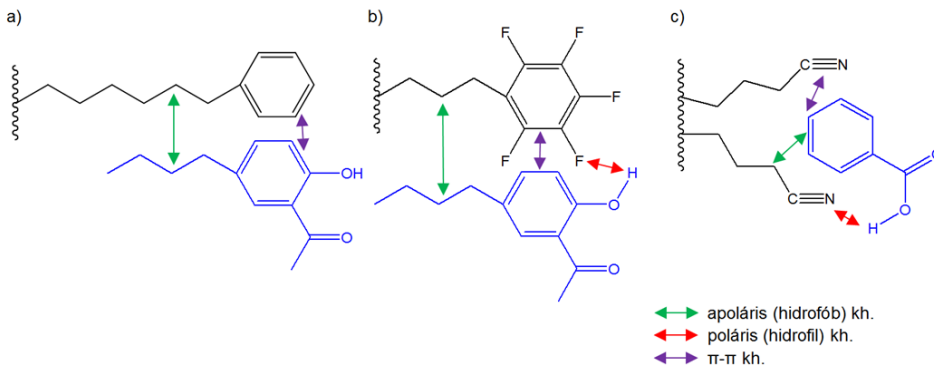


Speciális módosítású állófázisok



↔ apoláris (hidrofób) kh.
↔ poláris (hidrofil) kh.

Kontrollált polaritású (embedded) állófázis.

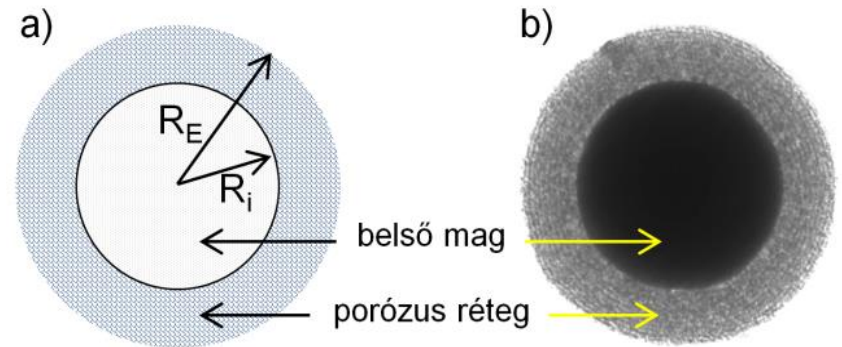


Nem alkil módosítású fordított fázisú állófázisok.
Fenil-hexil a), perfluorozott-fenil b) és ciano fázis c).

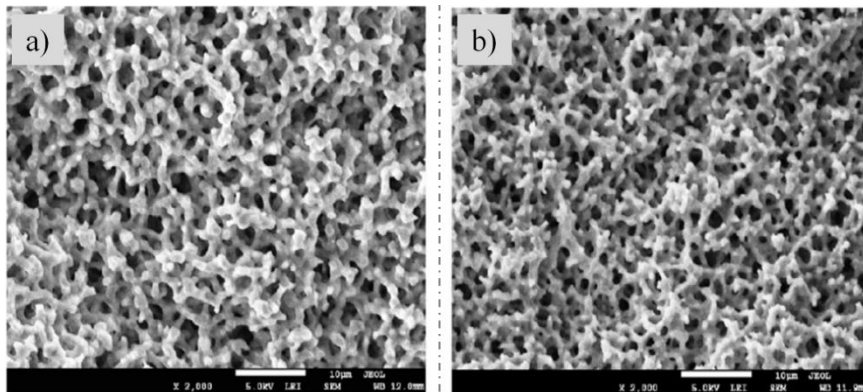
Modern szilikagél alapú állófázisok



teljesen porózus $2\mu\text{m}$
szemcseátmérő
alatti töltetek

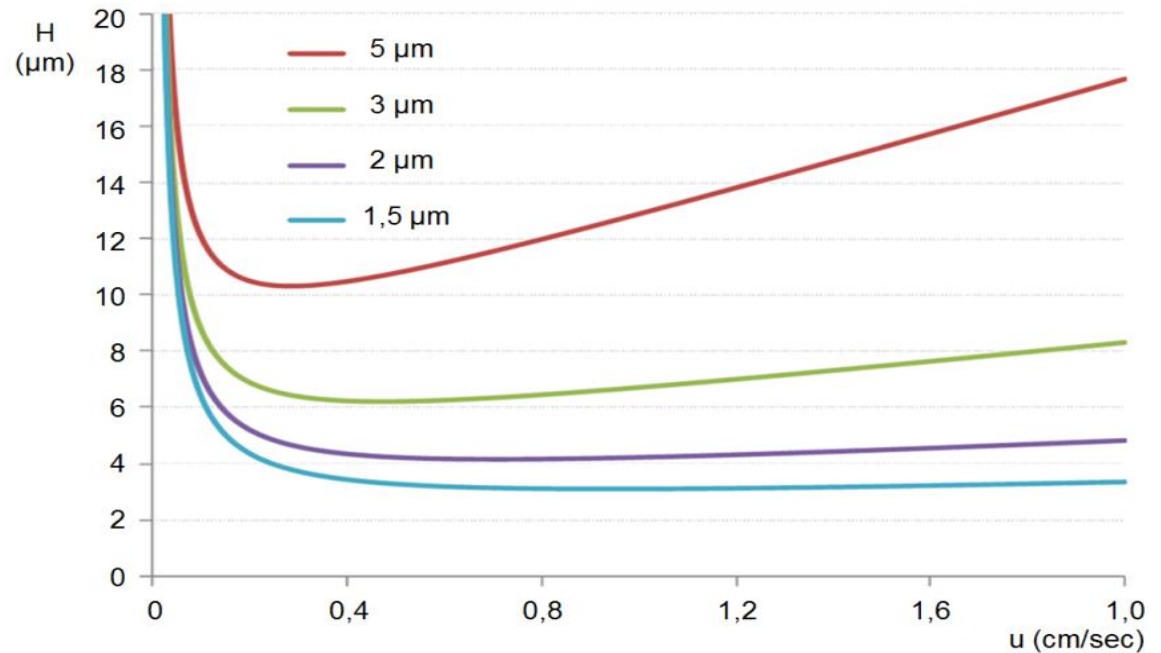
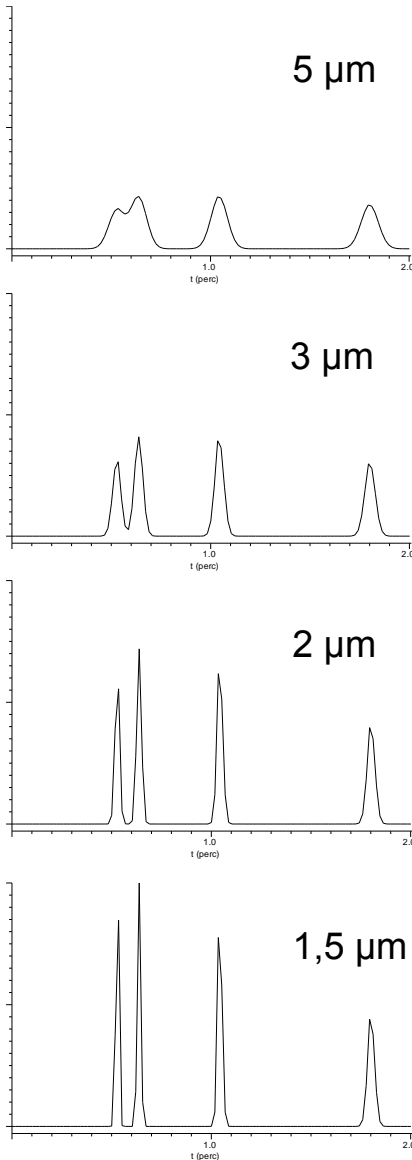


héjszerkezetű töltetek



monolitok

Teljesen porózus 2 μm szemcseátmérő alatti töltetek

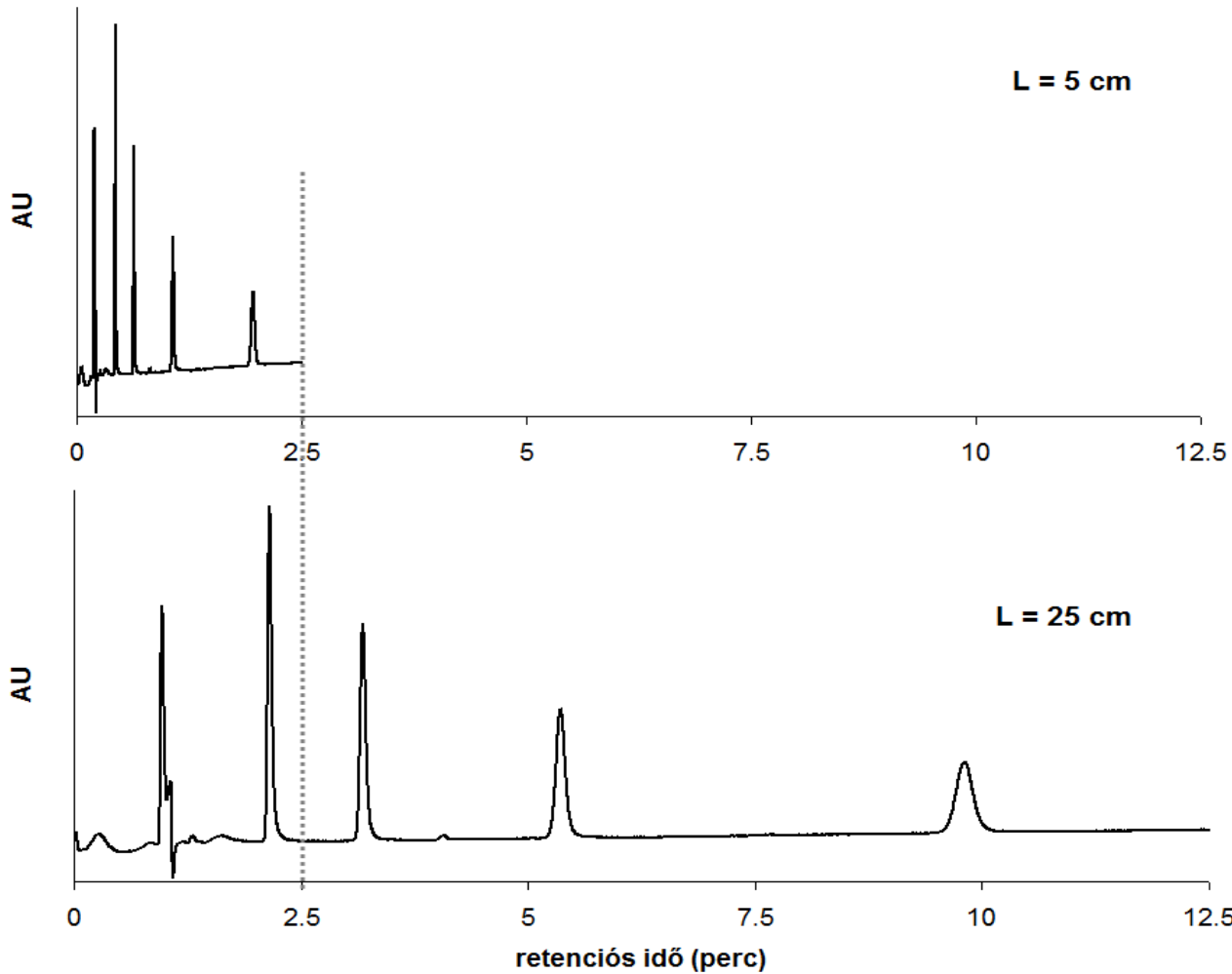


$$H = A \cdot d_p + f_1(k) \frac{D_M}{u} + f_2(k) \frac{d_p^2 u}{D_M}$$

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

Darcy-törvény

Teljesen porózus 2 μ m szemcseátmérő alatti töltetek



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

↑ Csökken
↓ Nő

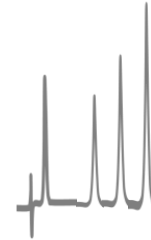
↓ Állandó

Teljesen porózus 2 μ m szemcseátmérő alatti töltetek



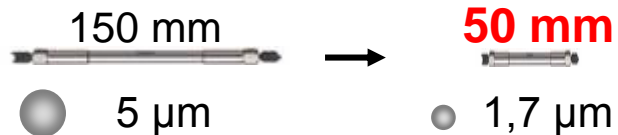
Gyors elválasztások

$N \approx 10'000$
 $t_{ana} < 2$ perc (k=10)



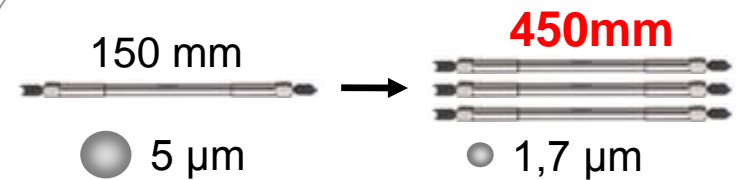
Nagy felbontás

$N \approx 90'000$
 $t_{ana} < 20$ min (k=10)



\rightarrow $N \approx \text{HPLC}$

\downarrow $t_{anal} \div 9$



\uparrow $N \times 9$

\rightarrow $t_{anal} \approx \text{HPLC}$

Speciális készülék kialakítások

HPLC rendszer



Alkalmazható
bemenő nyomás

400 bar

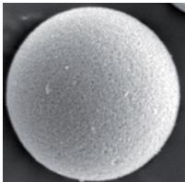
>1000 bar

Kolonnán kívüli
variancia

>50 μL^2

<10 μL^2

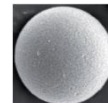
Jellemző kolonnaméret: 150x4,6mm
Jellemző szemcseátmérő: 3-5 μm



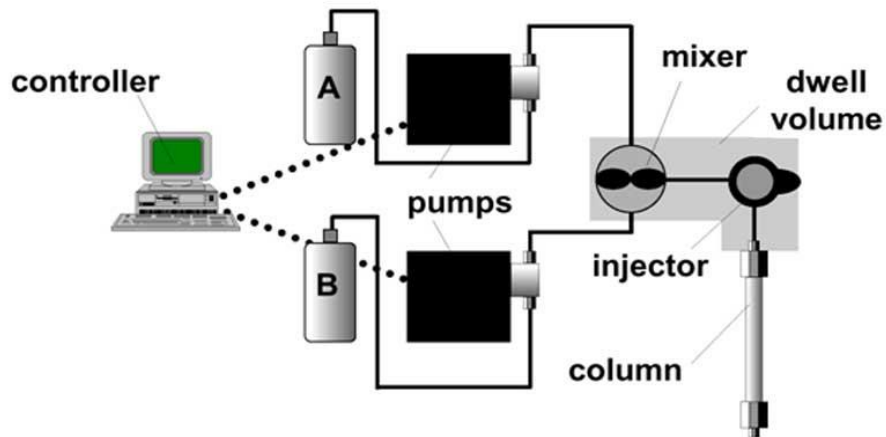
UHPLC rendszer



Jellemző kolonnaméret: 50x2,1mm
Jellemző szemcseátmérő: 1,7 μm



Speciális készülék kialakítások

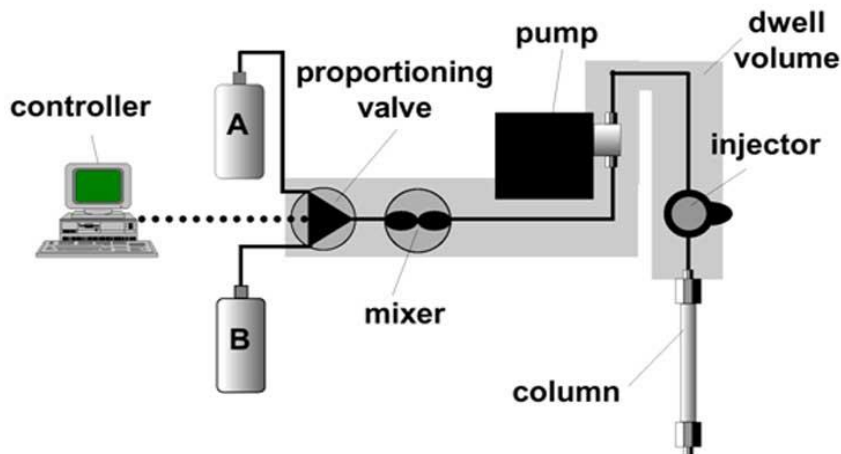


Magas nyomású gradiens

A szivattyú (pumpa) után kever
(annyi pumpa kell ahány
oldószert keverünk)

Kis késési térfogat

A megnevezés a mozgófázis
keverési módjára vonatkozik,
nem a készülék nyomás
teljesítményére!

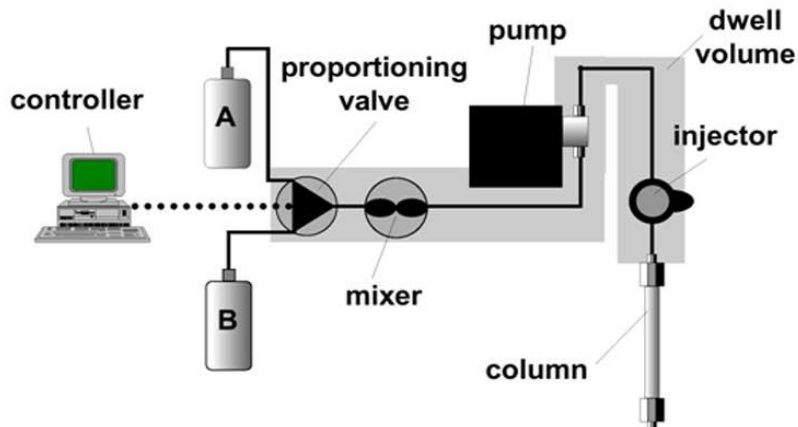
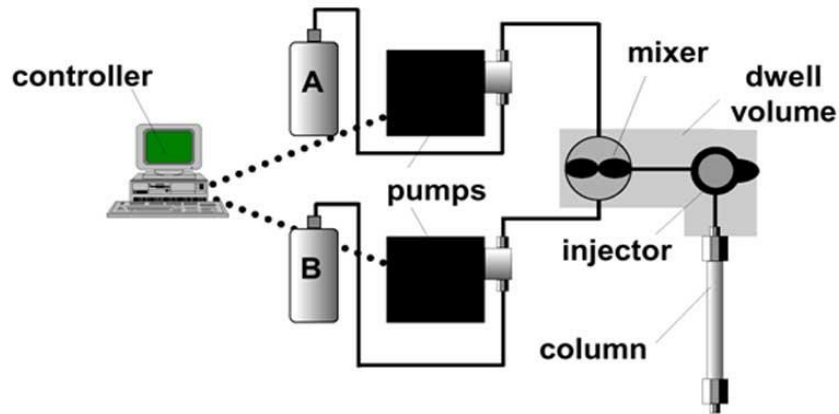


Alacsony nyomású gradiens

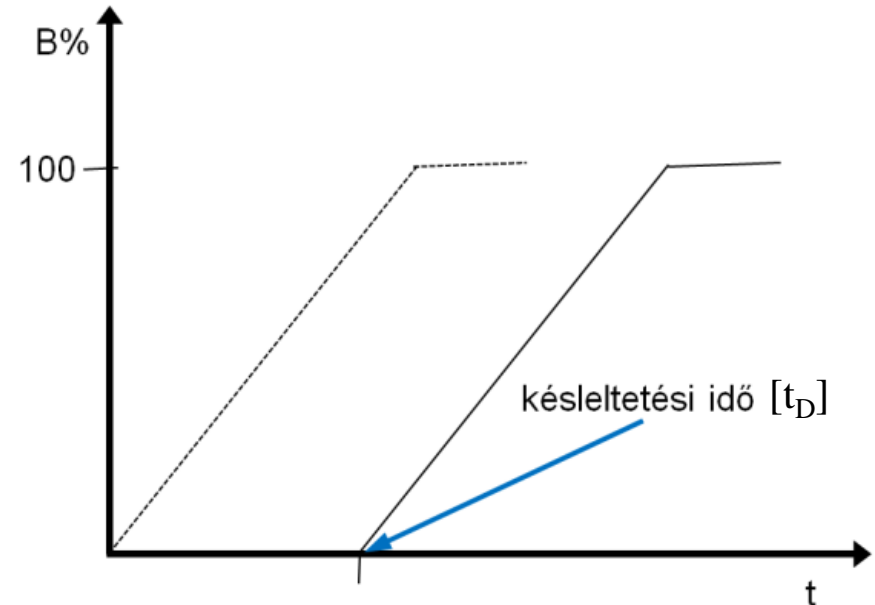
A szivattyú (pumpa) előtt kever
(elég egy pumpa)

Nagy késési térfogat

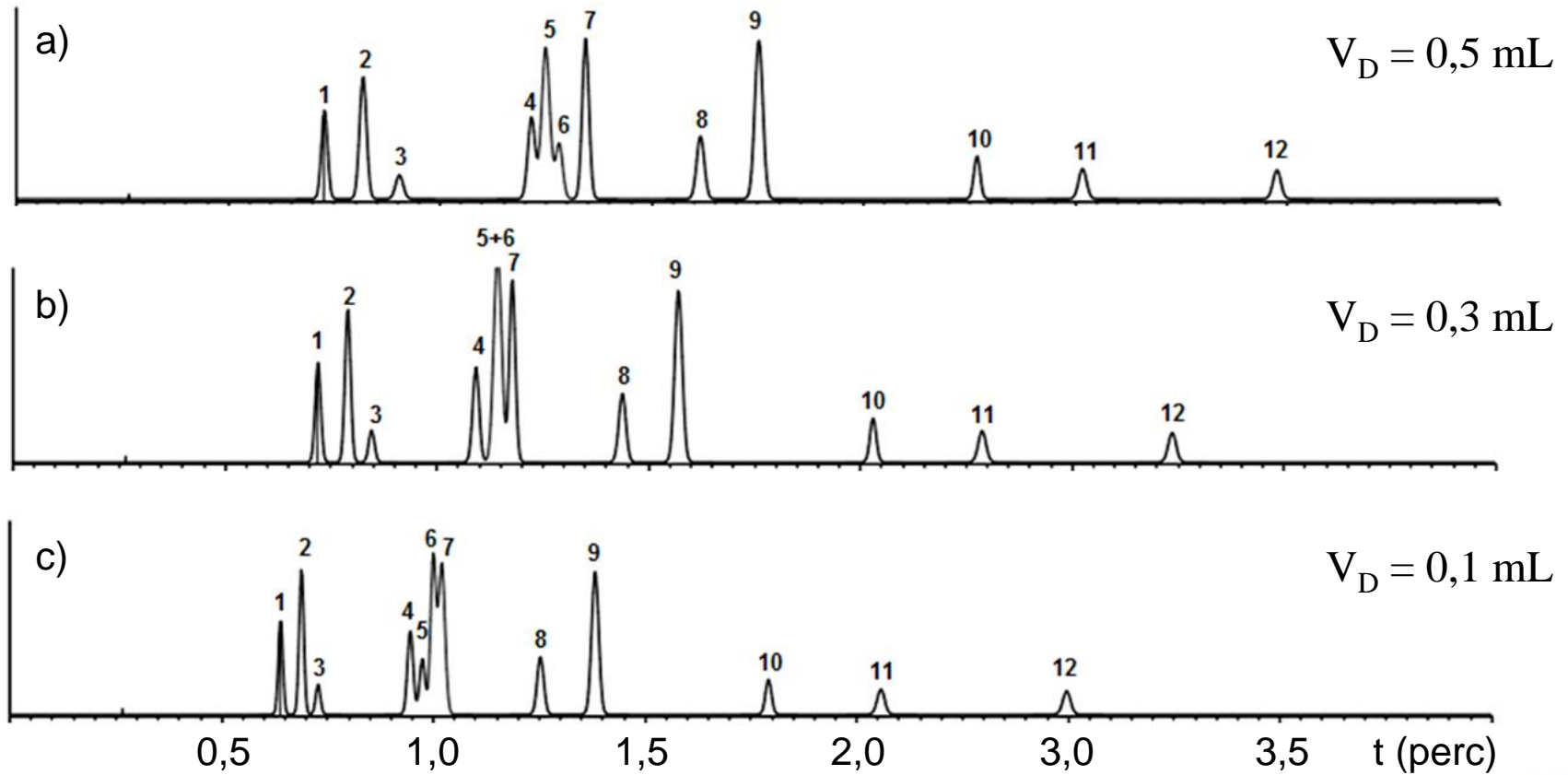
Késleltetési térfogat (dwell volume, V_D)



$$V_D [\text{mL}] = t_D [\text{perc}] \times F [\text{mL/perc}]$$



Késleltetési térfogat (dwell volume, V_D)

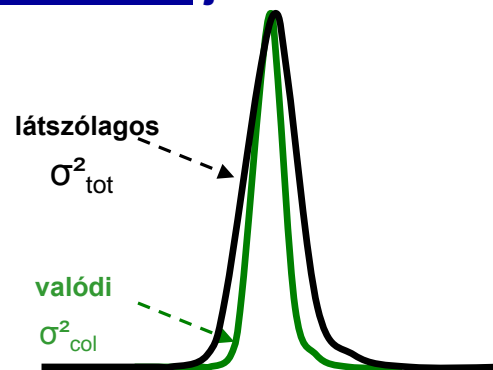


Teljesen porózus 2 μ m szemcseátmérő alatti töltetek

A kromatogram bonyolult fizikai-kémiai folyamatok eredménye, a koncentráció profil pontos leírása nem lehetséges.

Tekintsük eloszlásnak a zónát, amit *várható értékkel* és *varianciával* jellemezhetünk.

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

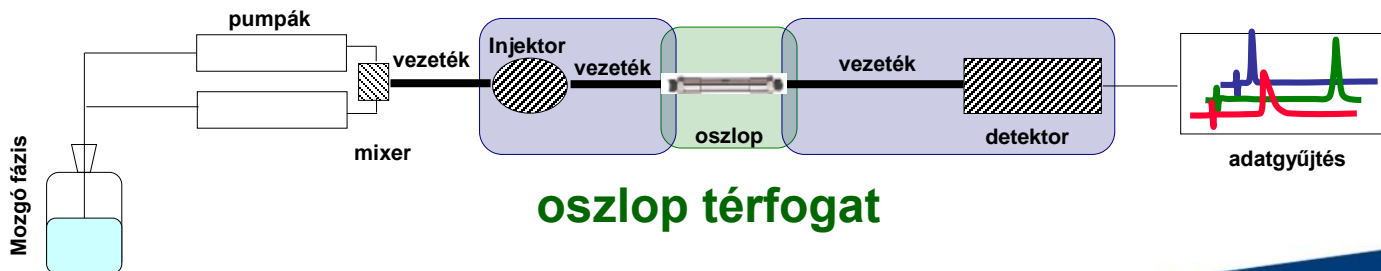


$$\sigma_{col}^2 = \frac{V_r^2}{N_{col}} = \frac{(V_0 \cdot (1+k))^2}{N_{col}}$$

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

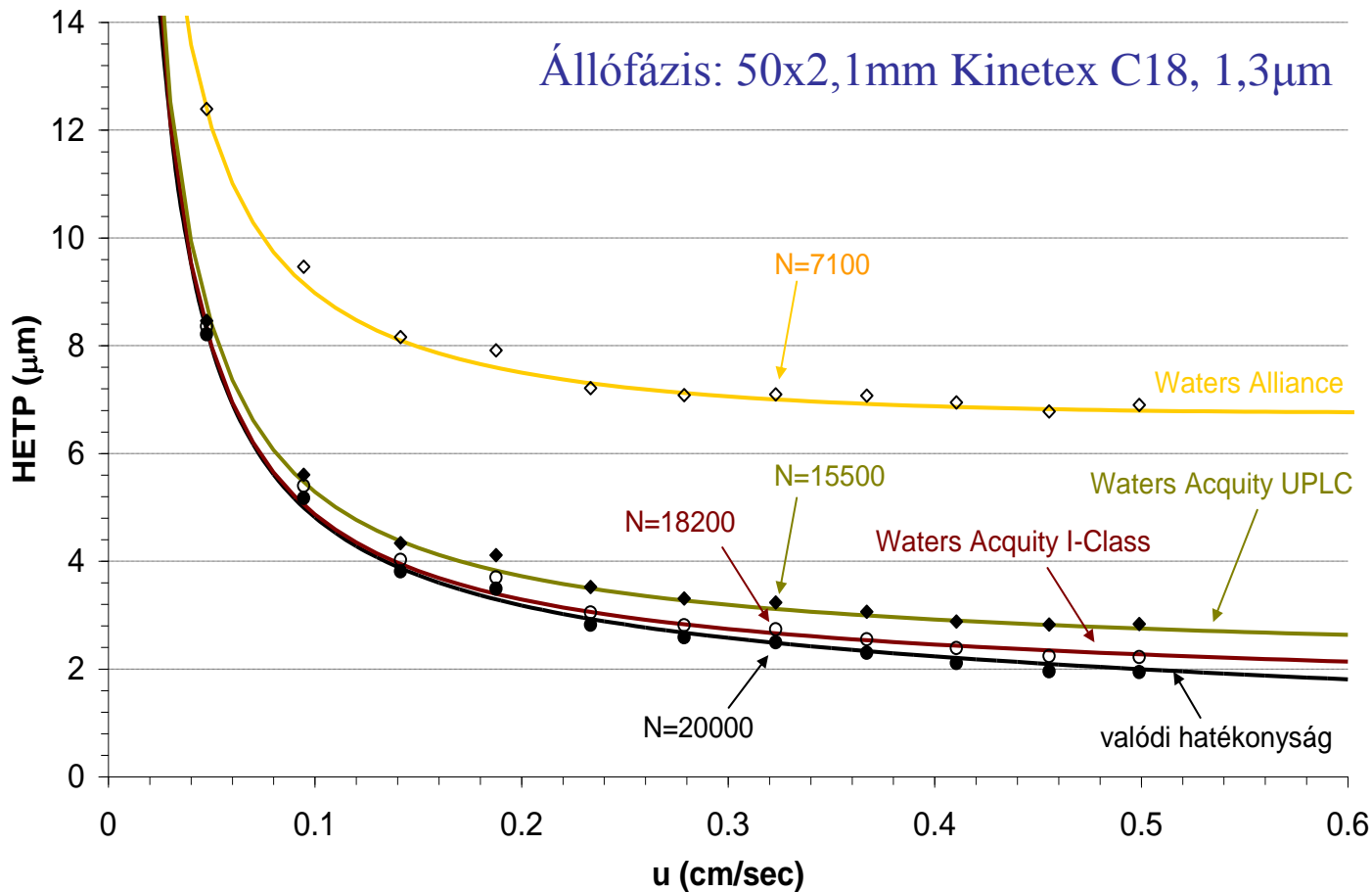
Injektor Detektor vezetékek

oszlopon kívüli térfogatok

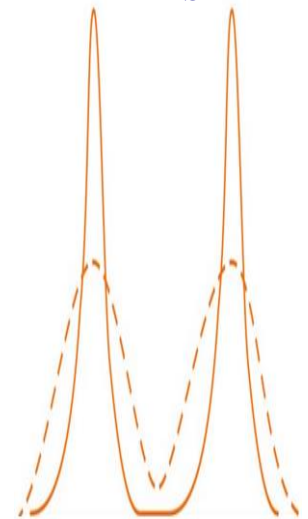


$$\frac{\sigma_{ext}^2}{\sigma_{tot}^2} \leq 10\%$$

Kolonnán kívüli térfogatok (extra column volume, V_{ec} , σ^2_{ext})

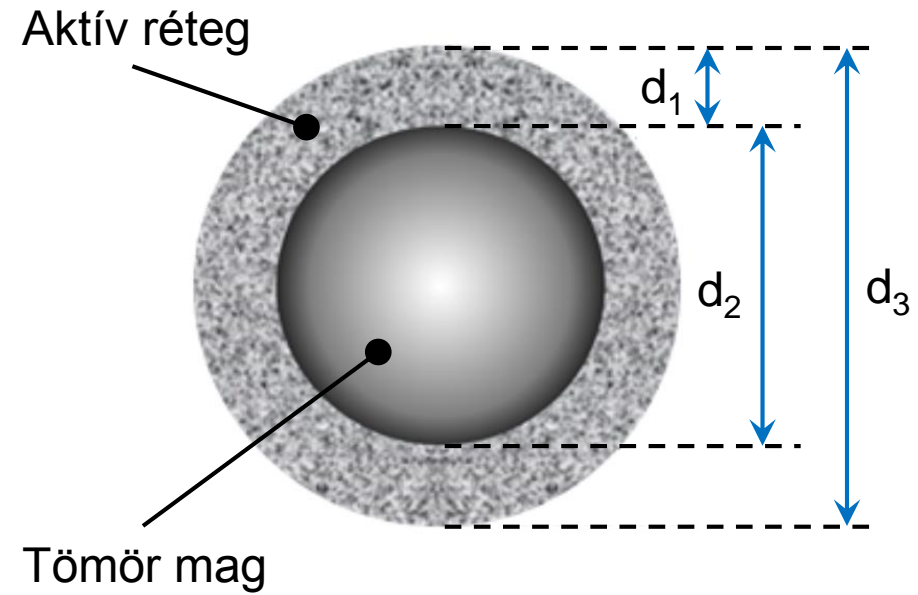
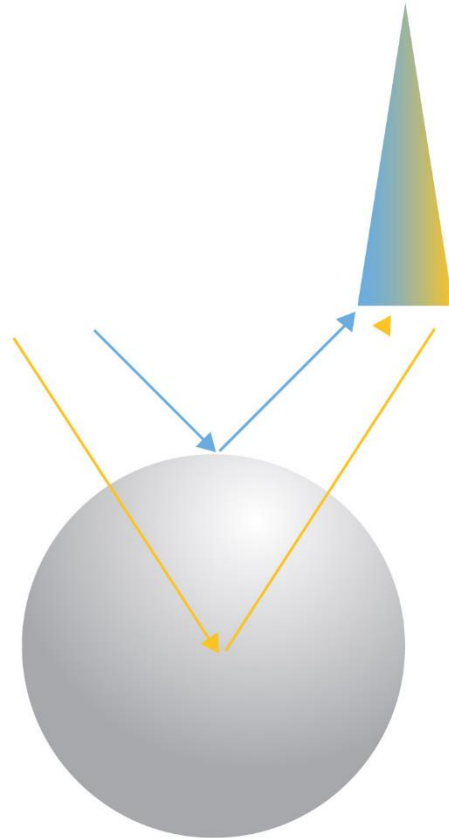
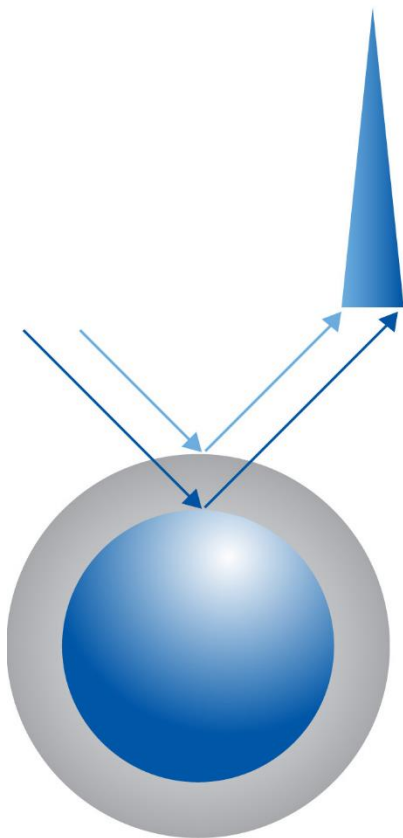


UPLC: $R_s > 2,5$



HPLC: $R_s < 1,5$

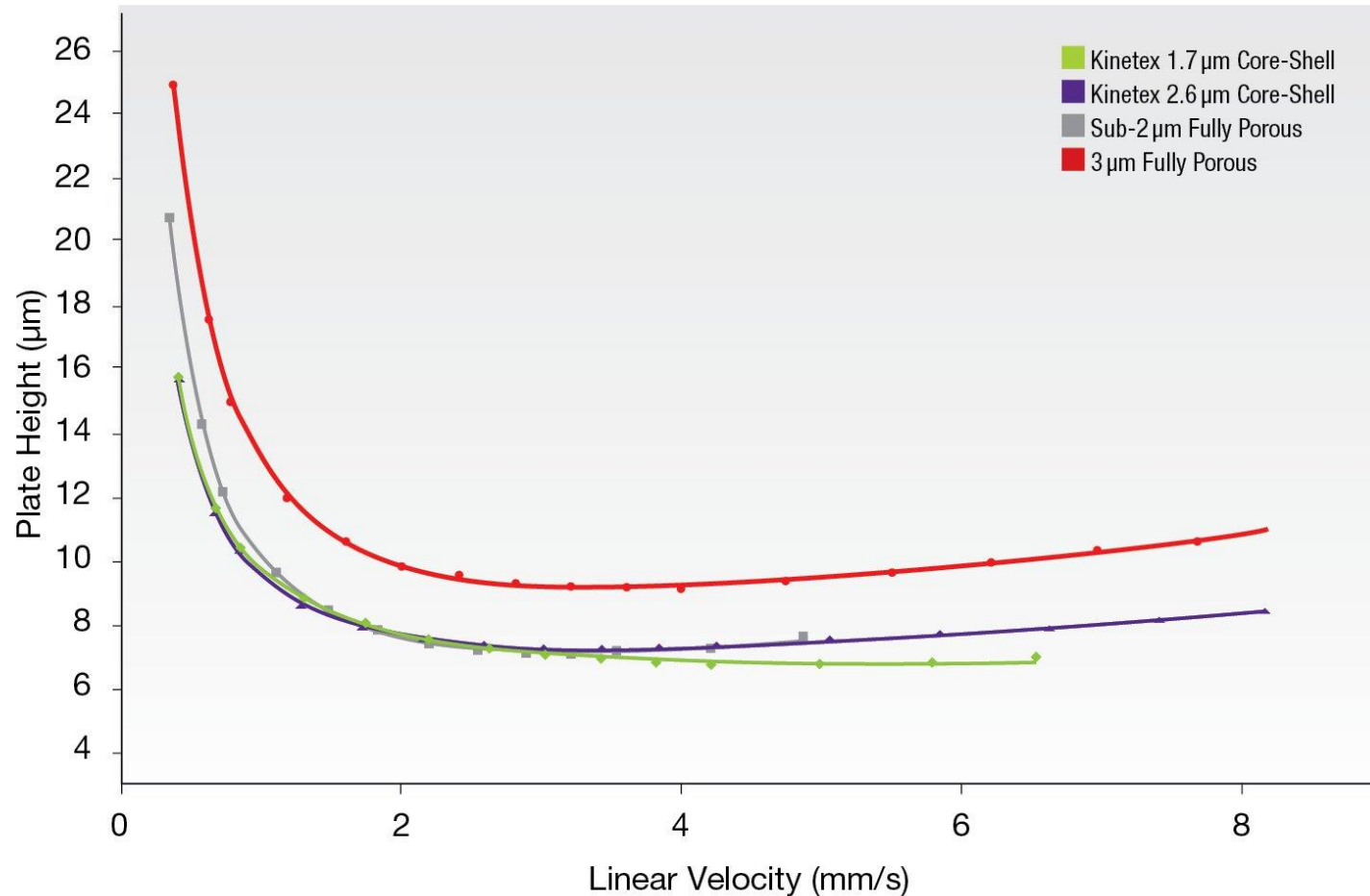
Héjszerkezetű töltetek



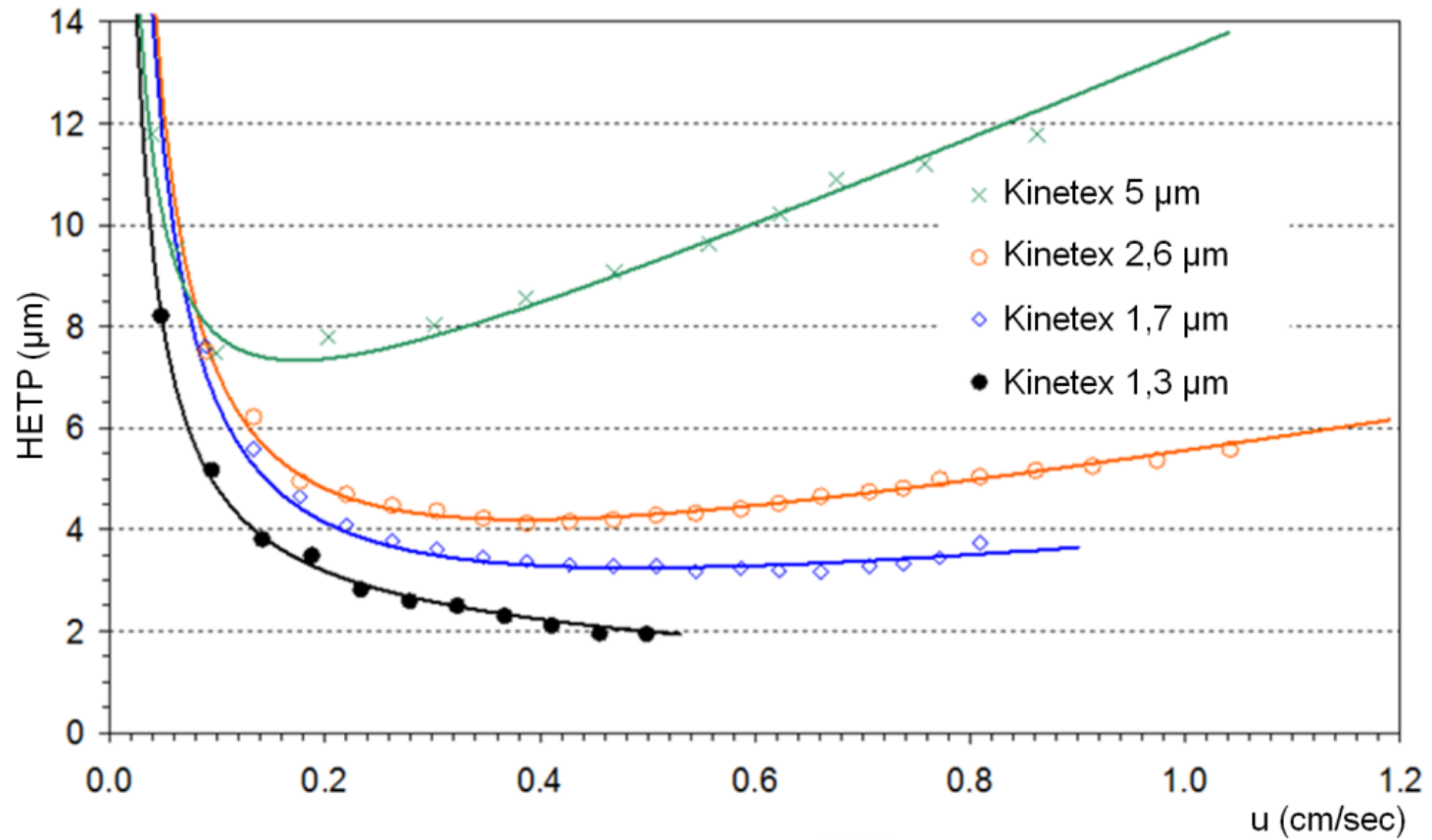
Héjszerkezetű töltetek

Performance of Kinetex Core-Shell Particles

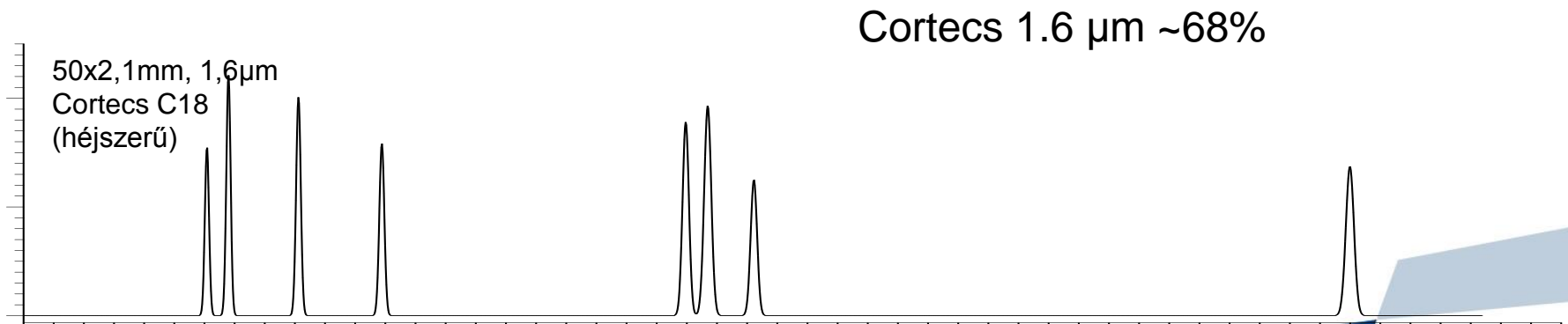
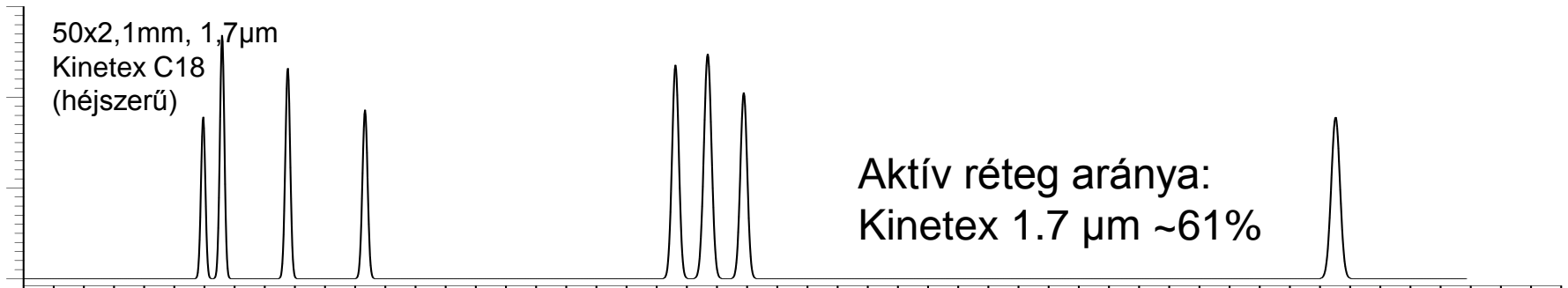
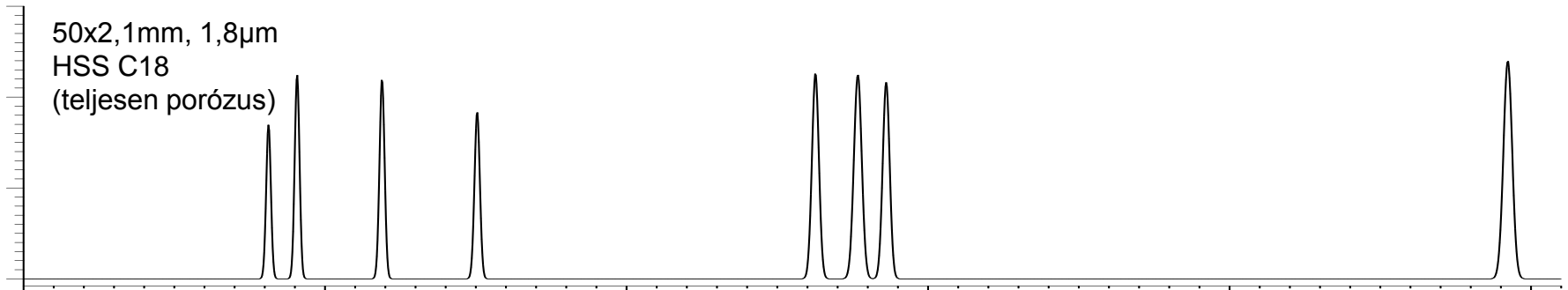
Compared to Fully Porous Sub-2 μm and 3 μm Particles



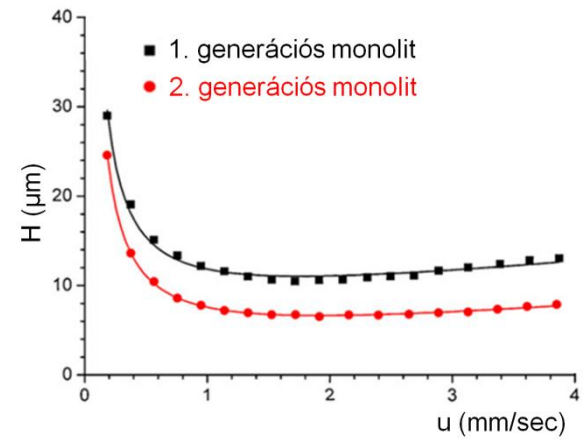
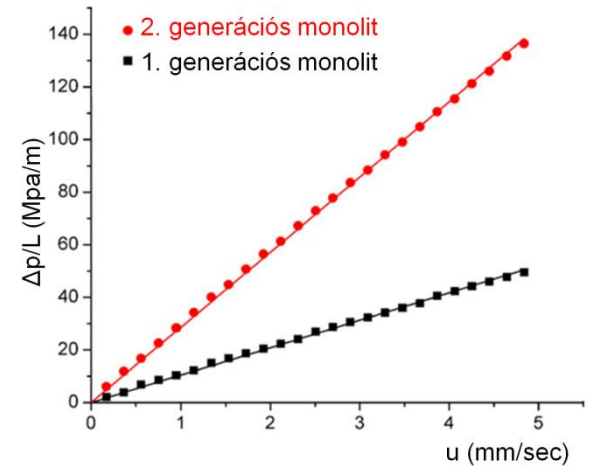
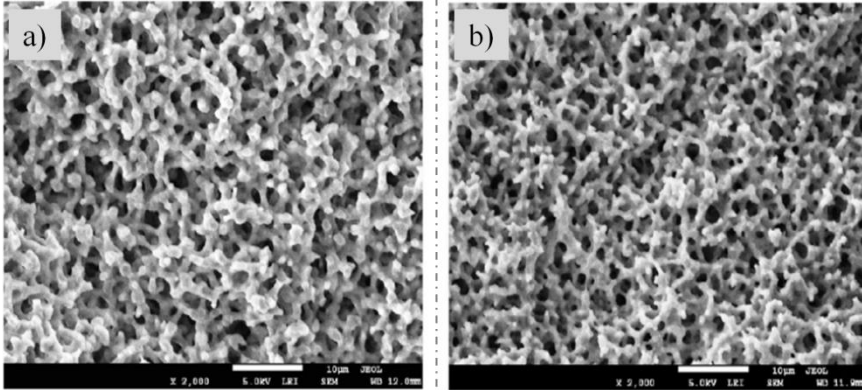
Héjszerkezetű töltetek



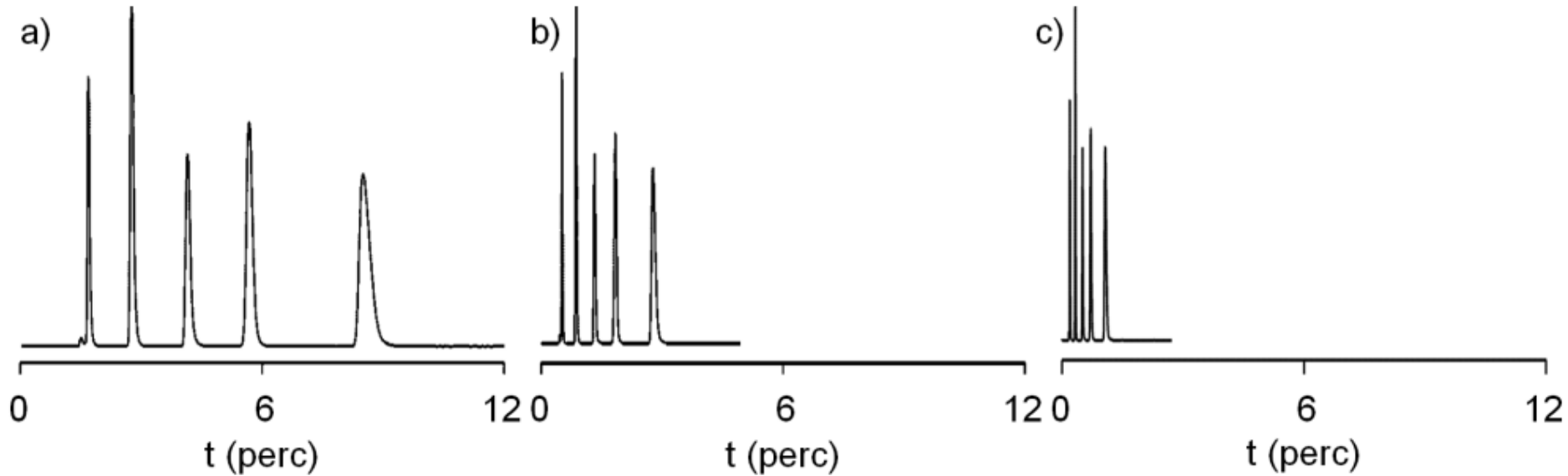
Héjszerkezetű töltetek



Monolitok



Monolitok



Elválasztás (100x4,6mm) monolit oszlopon.

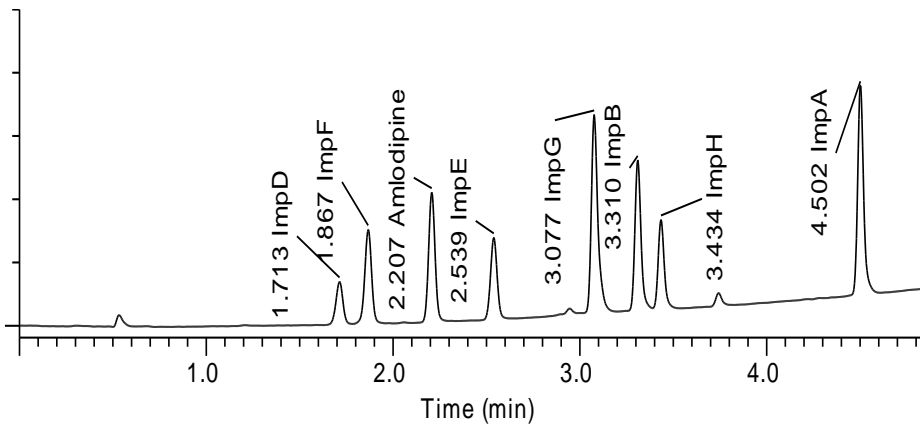
F = 1 mL/perc; p=18bar a)

F = 5 mL/perc; p=85bar b)

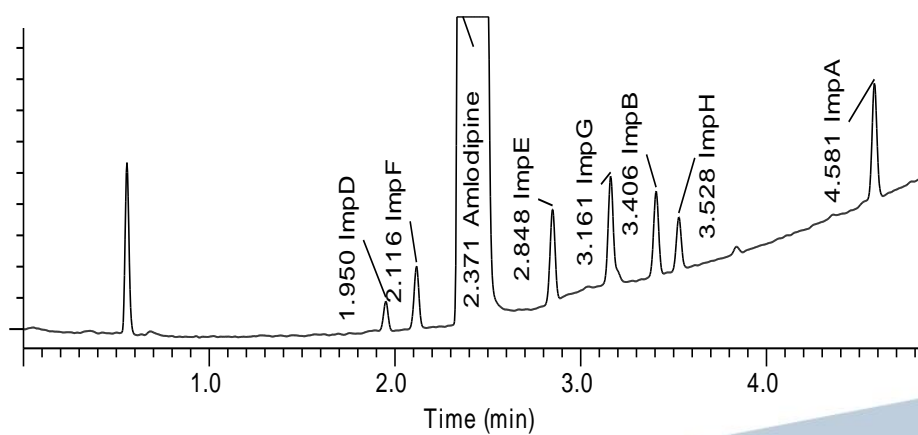
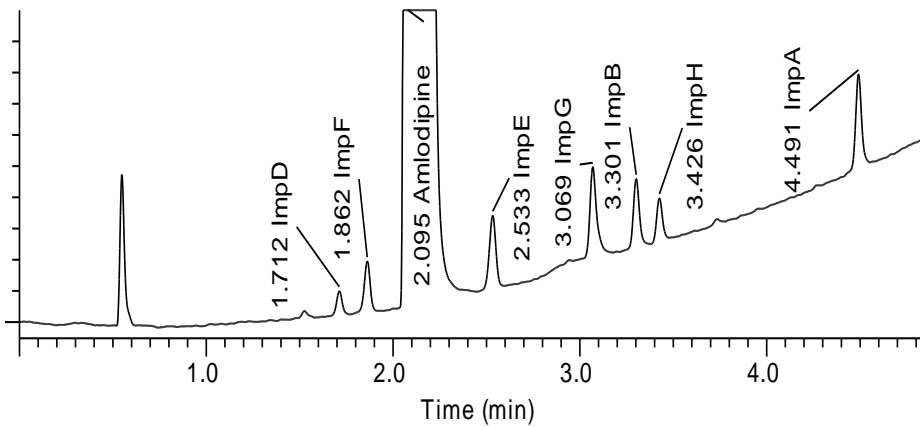
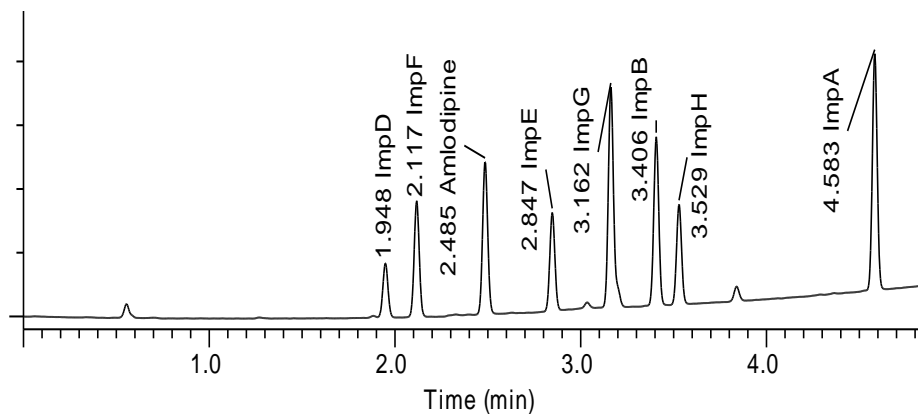
F = 9 mL/perc; p=153bar c)

Monolitok

a)

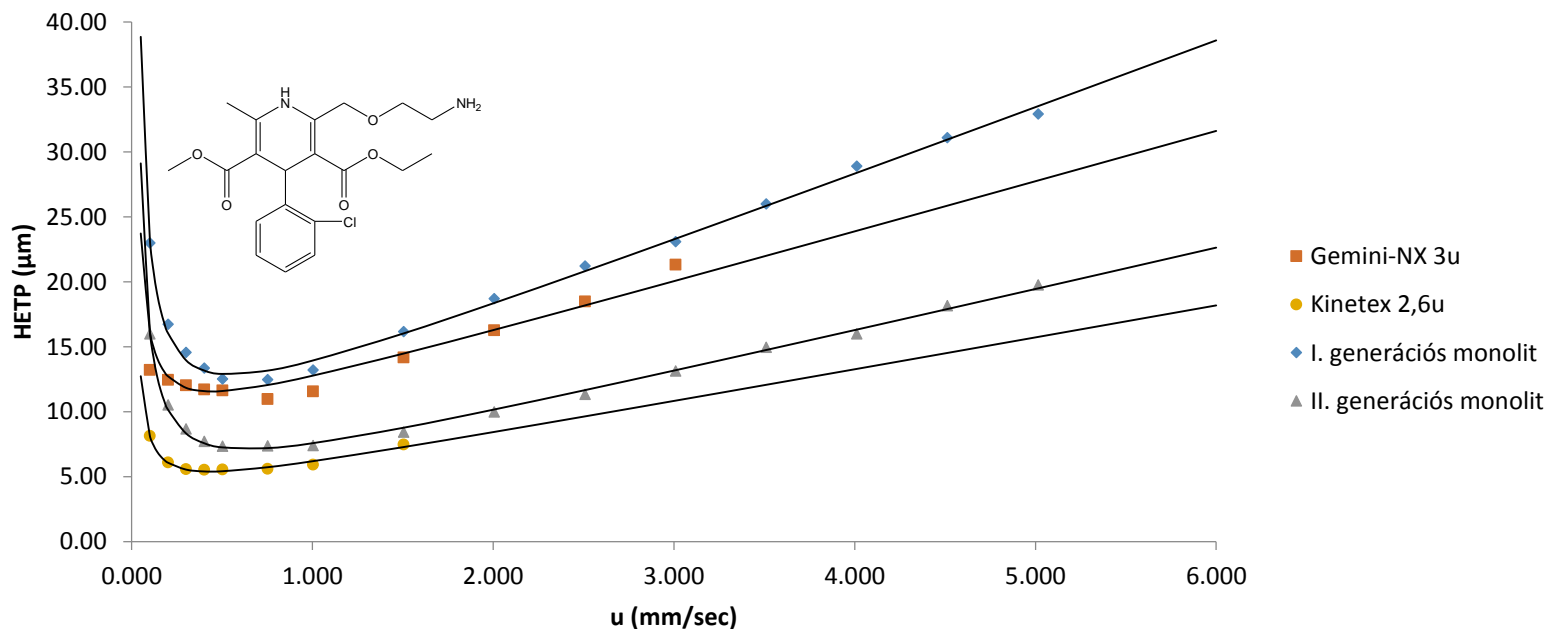


b)



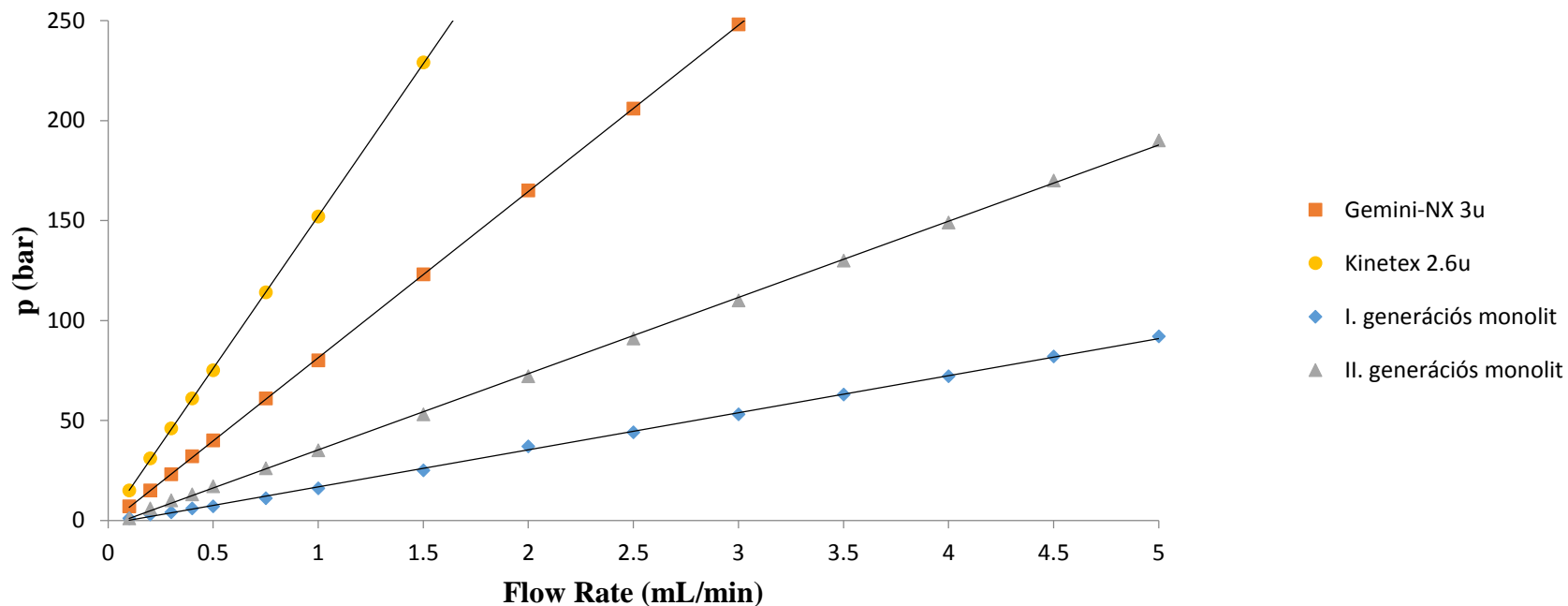
Monolitok

100x4,6 mm kolonnák összehasonlítása
„hagyományos” HPLC rendszerben



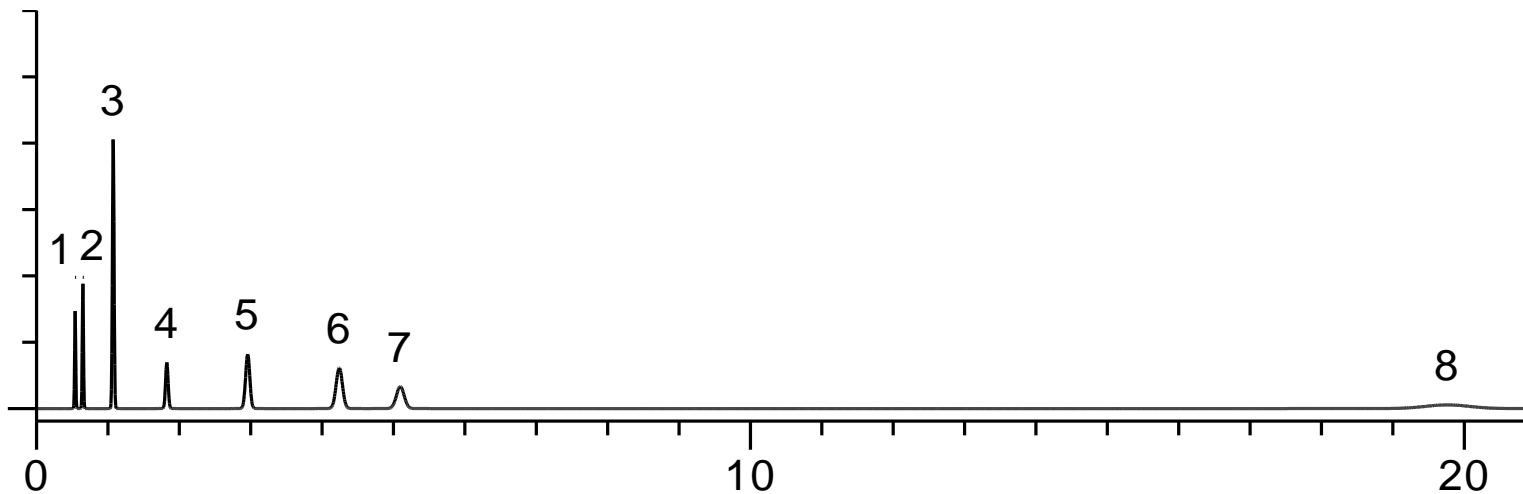
Monolitok

100x4,6 mm kolonnák összehasonlítása
„hagyományos” HPLC rendszerben



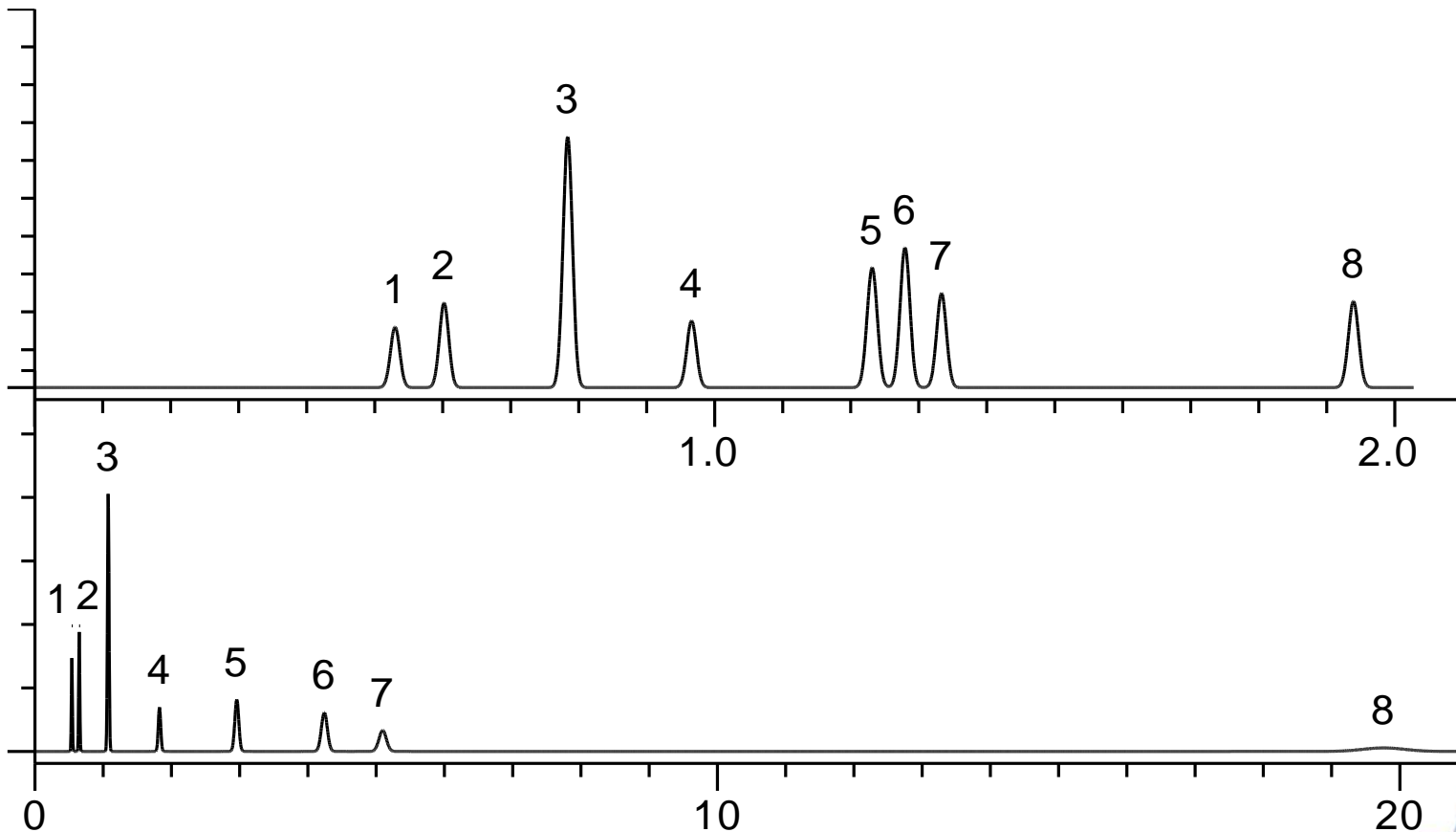
Gradiens elúció

A kromatográfiás gyakorlatban sokszor előfordul, hogy az elválasztani kívánt vegyületek kromatográfiás tulajdonságai nagyon eltérnek egymástól, ilyenkor az izokratikus elválasztás nem lehetséges, mert izokratikus rendszerben a nagyobb megoszlási hányadossal jellemzett komponensek nagy retencióval eluálódnak, szélesednek és szinte beleolvadnak az alapvonalba. Az eluenserősség növelésével viszont a kevésbé visszatartott komponensek között romlik a felbontás, koelúció jöhet létre. Ezt nevezzük általános elúciós problémának.



Gradiens elúció

Erre a problémára jelenthet megoldást a gradiens elúció alkalmazása. A gradiens elúció alkalmazásával jelentősen le tudjuk csökkenteni az elemzési időt eltérő kromatográfiás tulajdonságú komponensek esetén és elérhető, hogy azonos szélességű kromatográfiás csúcsokat kapjunk.

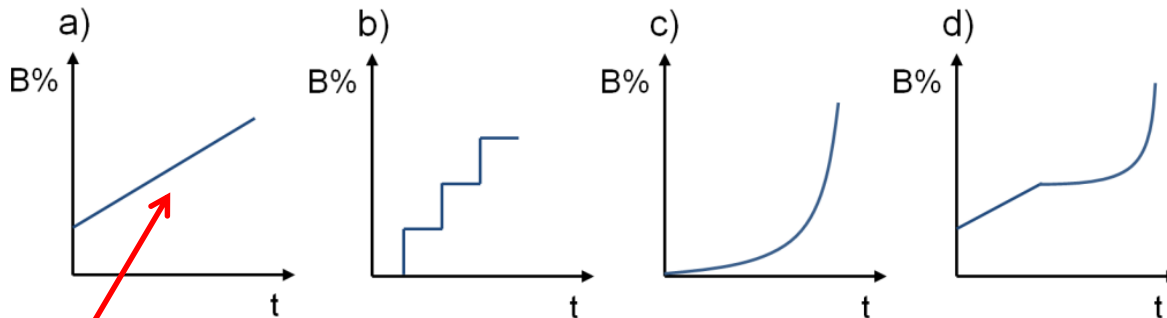


Gradiens elúció

Attól függően, hogy milyen paraméter változtatásával csökkentjük a visszatartást, beszélhetünk:

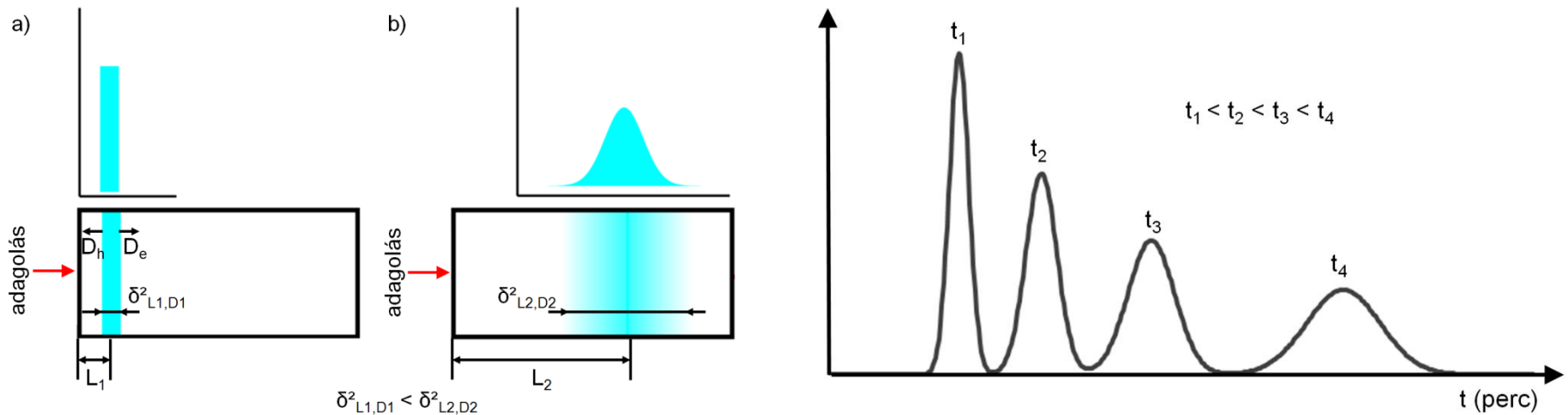
- oldószer gradiensről
- hőmérséklet gradiensről
- pH gradiensről (peptidek esetén jelentős)
- ionpár kromatográfiában ionpár- (elvi) vagy só gradiensről
- szerves vegyület ioncserés elválasztásánál oldószer-, só- vagy hőmérséklet gradiensről

Azt a függvényt, amely szerint változtatjuk a paramétert nevezzük gradiens alaknak:



lineáris a), lépcsős b), egyéb függvény szerinti (pl. $C_B = A e^n$) c) és kombinált d)

Gradiens elúció

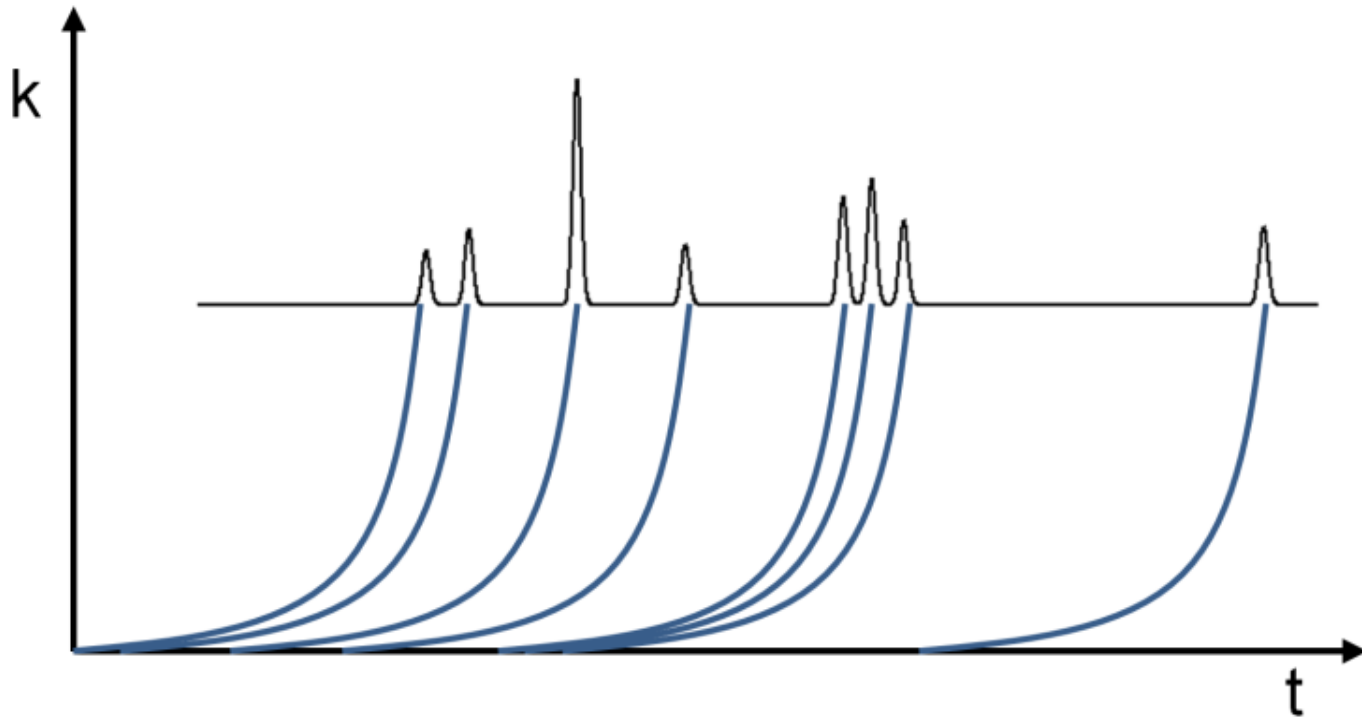


Izokratikus elemzés

Az izokratikus rendszer hatékonysága az ún. elméleti tányérszámmal (N) jellemezhető:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Gradiens elúció

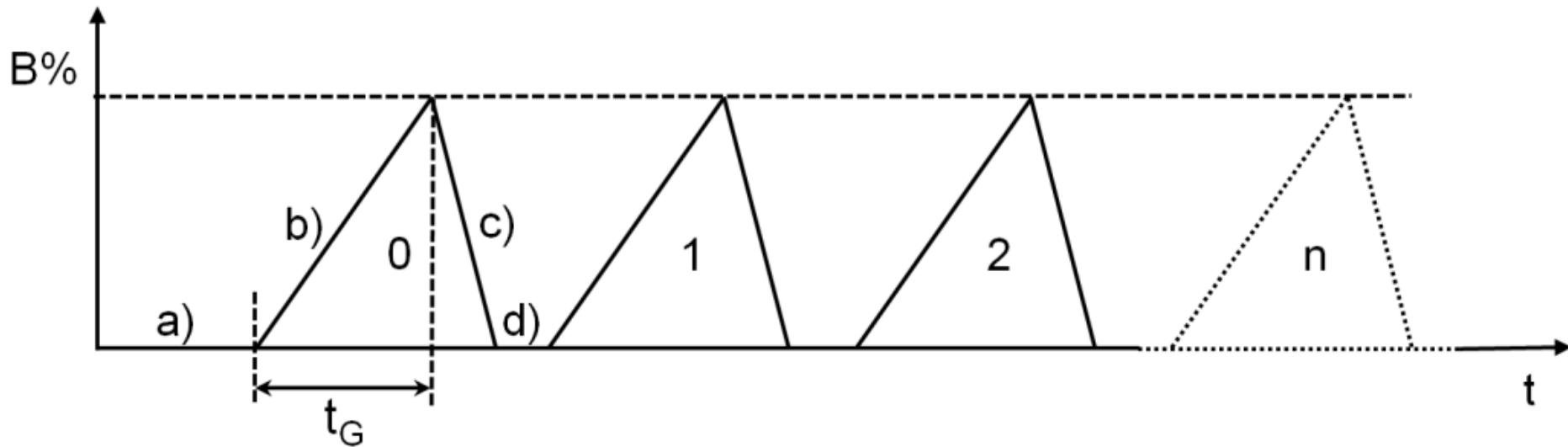


Zóna kompresszió a gradiens elúcióban

A gradiens rendszer hatékonysága az ún. csúcskapacitással (n) jellemezhető:

$$n = 1 + \frac{t_G}{1,699 \cdot w_{1/2}}$$

Gradiens elúció



Gradiens elúciós technika alkalmazása.

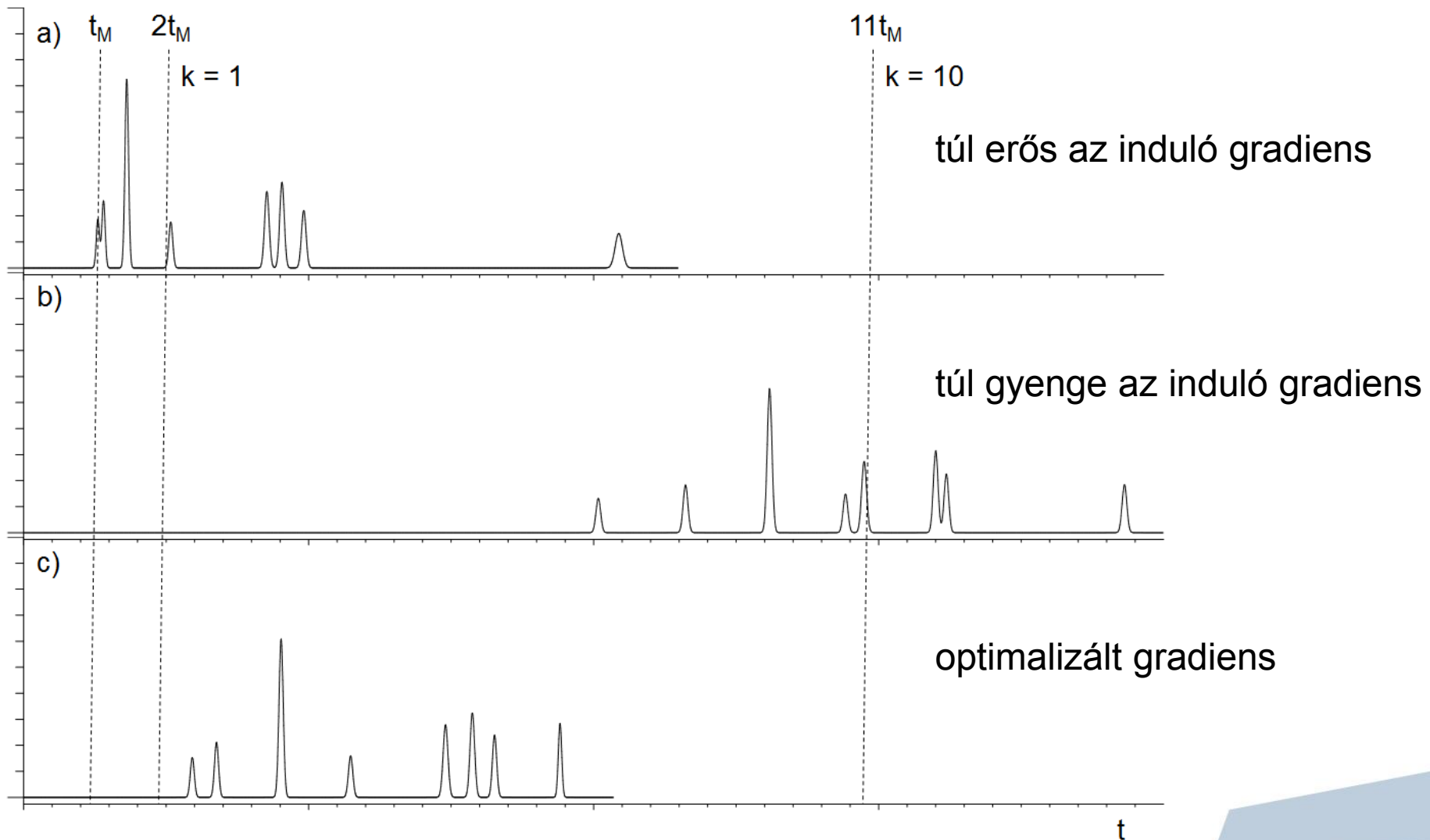
mérés előtti szakasz a)

az erősebb mozgófázis összetevő növelése b)

visszaállási szakasz a kiinduló mozgófázisra c)

beállási idő az új mérés előtt d)

Gradiens elúció



Detektálási lehetőségek a folyadékkromatográfiában

HPLC méréseknél a detektort a célkomponensnek megfelelően kell megválasztani!

- UV/Vis detektálás (UV, PDA, DAD)
- Fluoreszcenciás detektálás (FLD)
- Törésmutató mérés (RI)
- Elektrokémiai detektálás (ED)
- Fényszórásos detektálás (ELSD)
- Korona kisülésidetektálás (Corona CAD)
- Tömeg szerinti detektálás (MS, MS/MS)

UV-Vis detektor

HPLC méréseknél a detektort a célkomponensnek megfelelően kell megválasztani. Számos közülük fényelnyelésen alapszik, mint az UV/Vis abszorbancia detektor és fotodióda soros (PDA) detektor.

Az abszorbancia detektorok tulajdonságai az alábbiak:

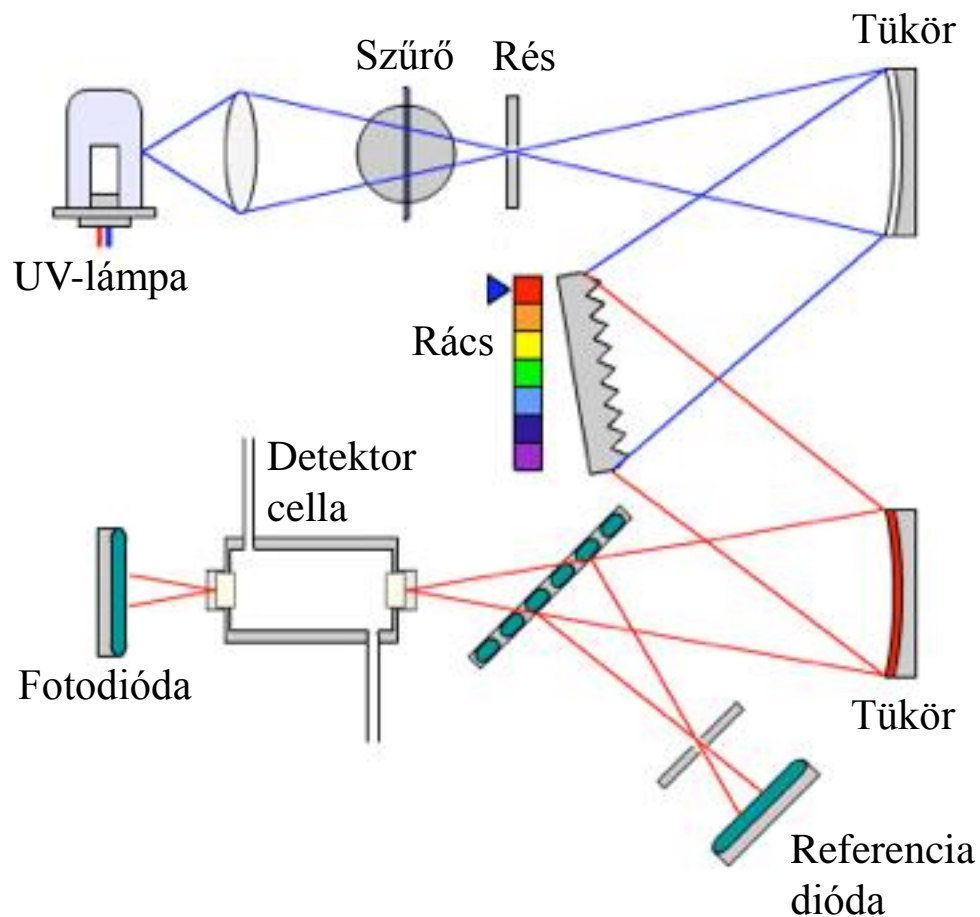
- A detektor érzékenysége és szelektivitása változtatható a megfelelő hullámhossz beállításával.
- Relatív nagy érzékenység (bár ez függ a moláris extinkciós koefficienstől).
- A koncentráció és a detektor jel közötti összefüggés széles koncentráció tartományban lineáris (Lambert-Beer törvény).
- Gradiens programot lehet alkalmazni.

UV-Vis detektor

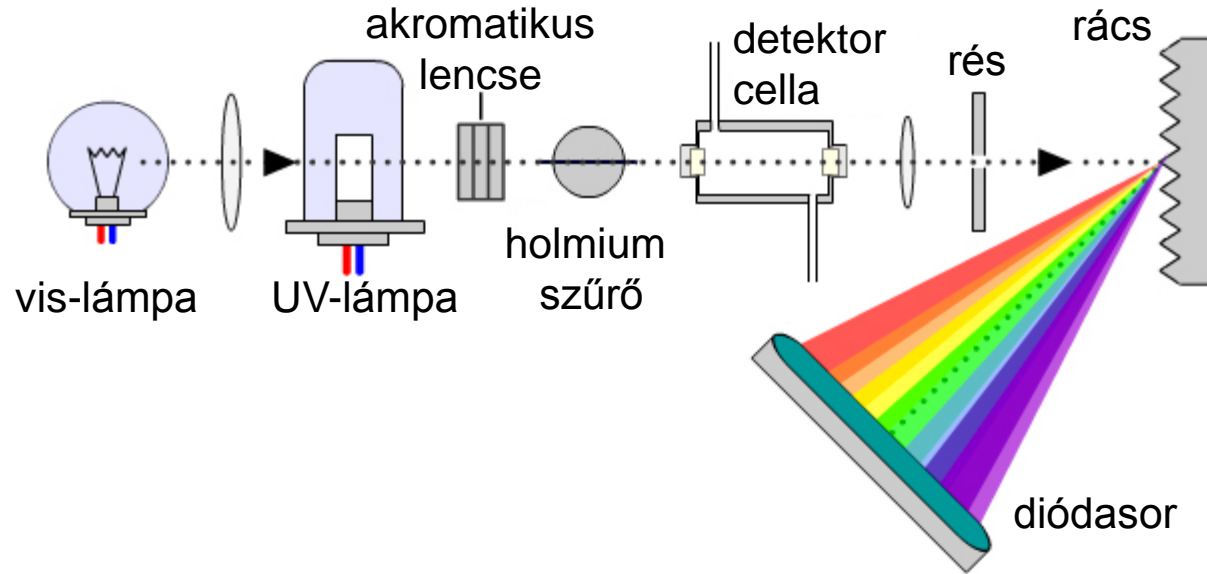
Az UV/Vis detektorok elve:

- Ha az adott hullámhosszú fényt egy cellán vezetjük át, akkor a cellában levő anyag a fény egy részét elnyeli. A cellát elhagyó fény intenzitása kisebb lesz, mint a bemenőé.
- A detektor ennek az intenzitás-csökkenésnek (abszorbancia) a mértékét méri. A mérés közben a mozgófázis és a minta folyamatosan áramlik át a cellán, a detektor valós időben rögzíti az elnyelést és ezekből az adatpontokból rajzolódik ki a kromatogram.
- Az abszorbancia az adott komponens koncentrációjától függ, ezért a csúcsterületekből becsülni lehet a célkomponens koncentrációját.

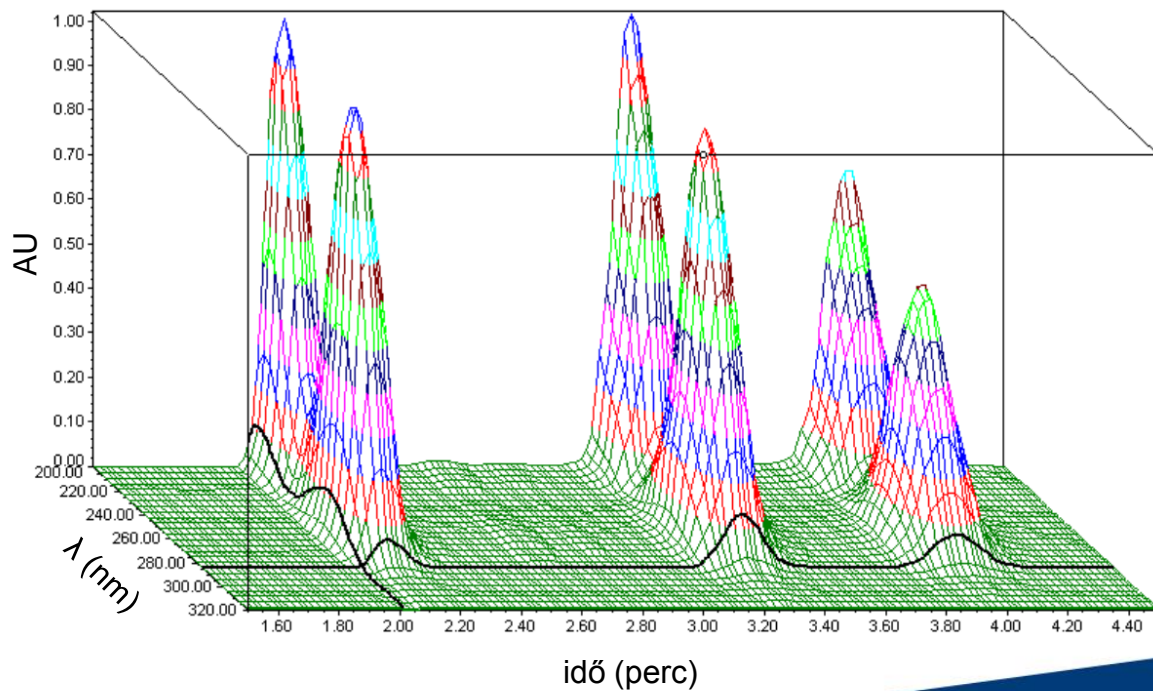
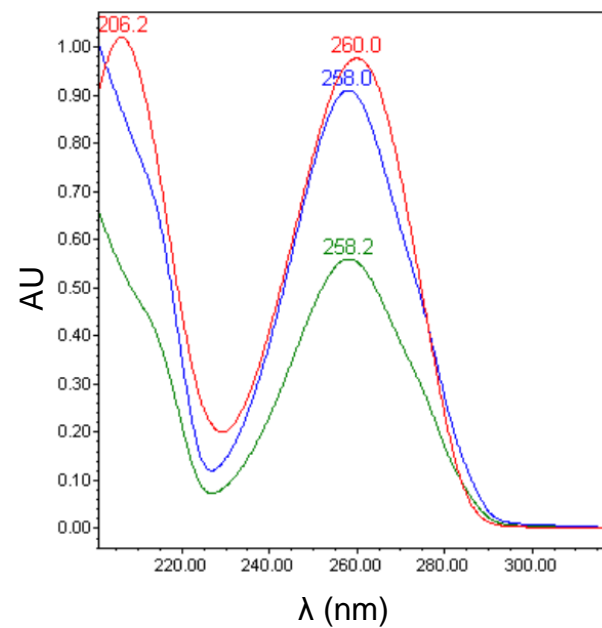
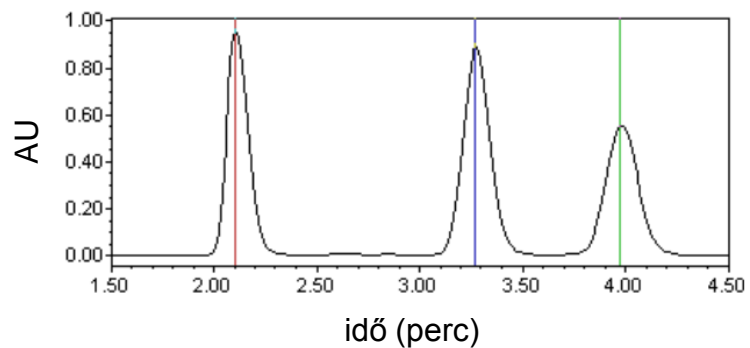
Az UV-Vis detektor felépítése



A PDA detektor felépítése

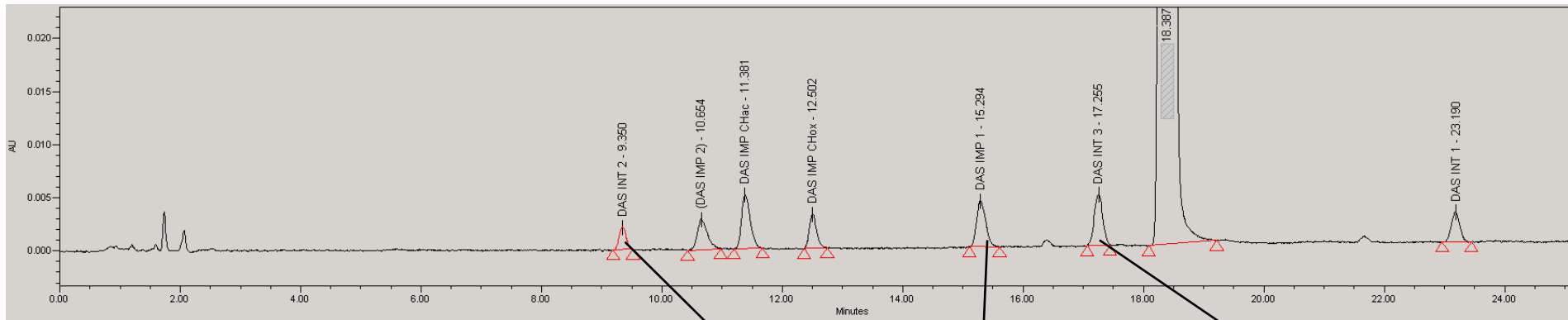


Az UV kromatogram

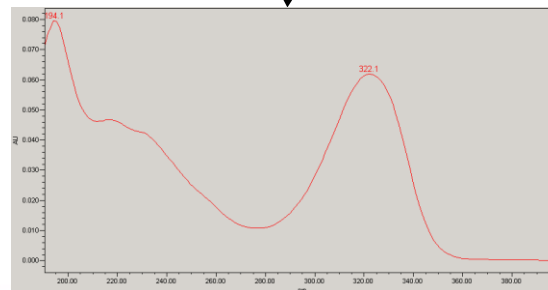
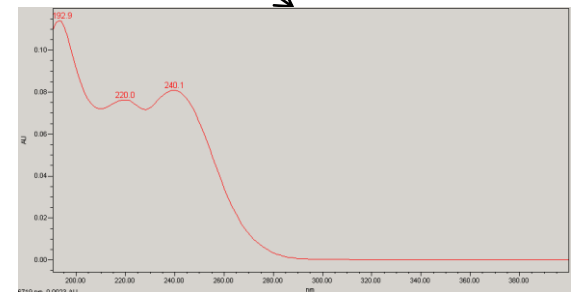
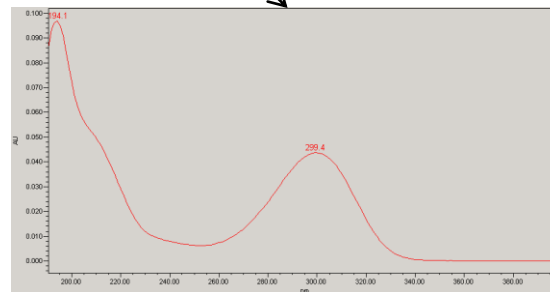


Az UV kromatogram

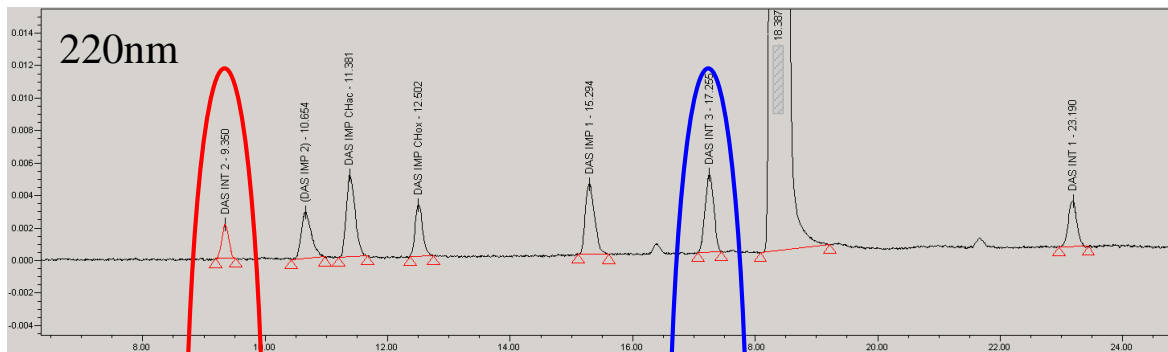
Minőségi és mennyiségi információ



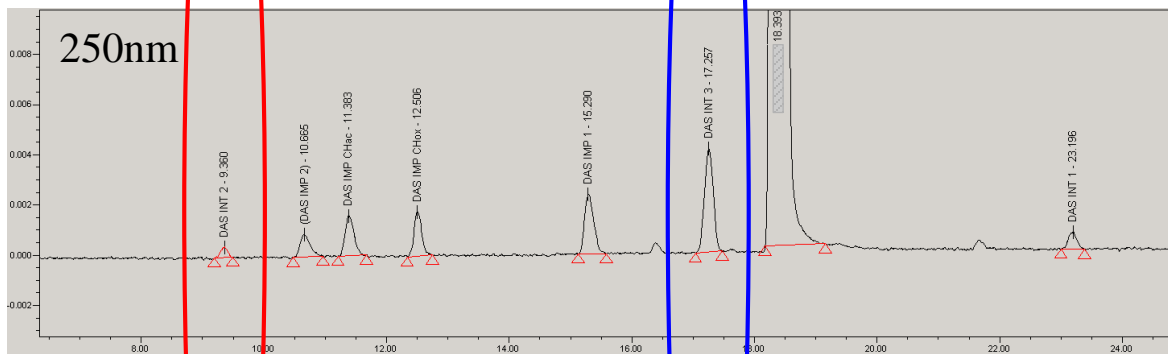
	Name	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V}^*\text{sec}$)	% Area
1	DAS INT 2	9.350	16491	0.07
2	(DAS IMP 2)	10.654	32995	0.14
3	DAS IMP CHac	11.381	50435	0.22
4	DAS IMP CHox	12.502	26926	0.12
5	DAS IMP 1	15.294	45289	0.19
6	DAS INT 3	17.255	47140	0.20
7		18.387	23057525	98.94
8	DAS INT 1	23.190	27012	0.12



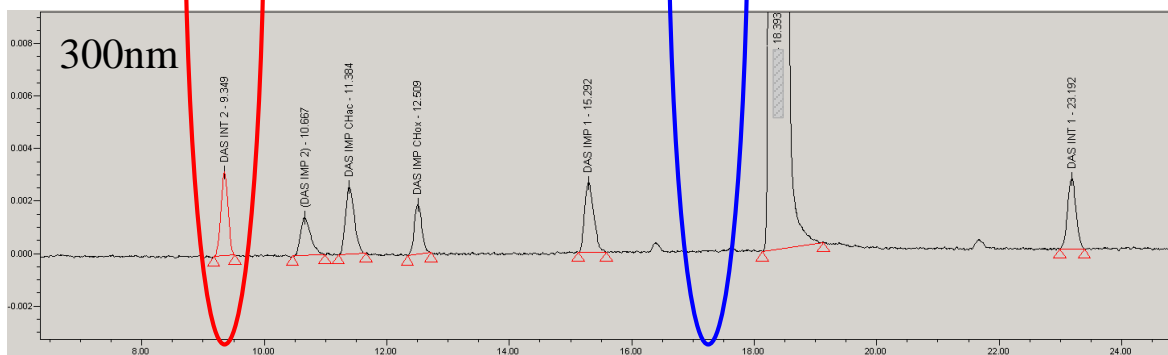
Az UV kromatogram



Name	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V}^*\text{sec}$)	% Area
DAS INT 2	9.350	16491	0.07
(DAS IMP 2)	10.654	32995	0.14
DAS IMP CHac	11.381	50435	0.22
DAS IMP CHox	12.502	26926	0.12
DAS IMP 1	15.294	45289	0.19
DAS INT 3	17.255	47140	0.20
	18.387	23057525	98.94
DAS INT 1	23.190	27012	0.12

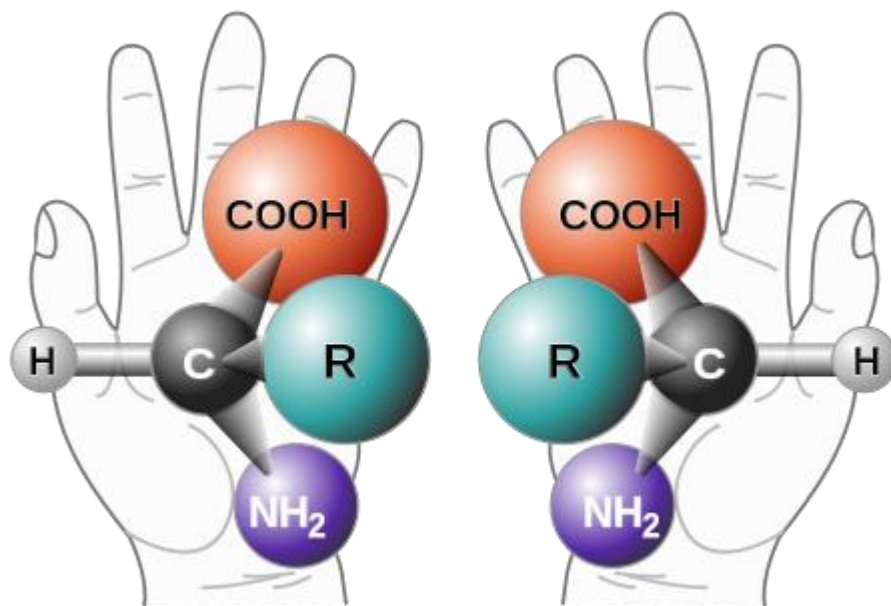


DAS INT 2	9.360	3194	0.02
(DAS IMP 2)	10.665	10078	0.07
DAS IMP CHac	11.383	16025	0.11
DAS IMP CHox	12.506	15315	0.10
DAS IMP 1	15.290	24730	0.17
DAS INT 3	17.257	41451	0.28
	18.393	14621720	99.20
DAS INT 1	23.196	6644	0.05



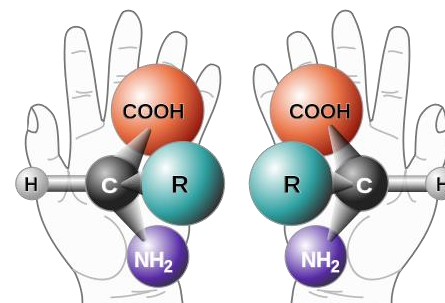
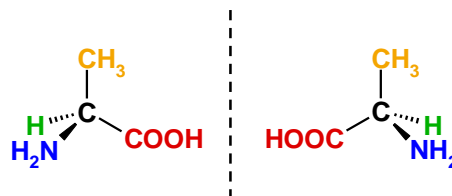
DAS INT 2	9.349	25895	0.18
(DAS IMP 2)	10.667	16733	0.12
DAS IMP CHac	11.384	25643	0.18
DAS IMP CHox	12.509	16195	0.11
DAS IMP 1	15.292	27504	0.19
DAS INT 3	17.420		
	18.393	14022675	99.03
DAS INT 1	23.192	25773	0.18

Királis HPLC



Kiralitás; enantiomerek

Vegyületek,
amelyek **tükrképükkel nem azonosak:**



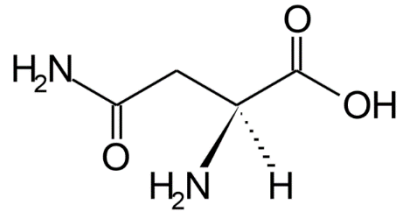
egymással fedésbe nem hozható tükrképek
= **enantiomerek**

- azonos:**
- a legtöbb fizikai tulajdonság
(olvadáspont, szín, oldhatóság, UV elnyelés bármely hullámhosszon, ...)
 - kémiai reakciók nemkirális reakciópartnerrel

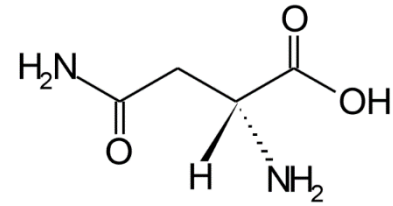
- eltérő:**
- kölcsönhatás másik királis szerkezettel !
 - így például az élő szervezet építőelemeivel
- Két, különbözőnek tekintendő vegyület !

Királis toxikológia

Ízlelhető kiralitás:

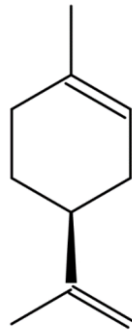


S-aszparagin (édes)

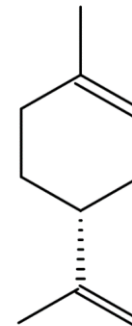


R-aszparagin
(keserű)

Szagolható kiralitás:

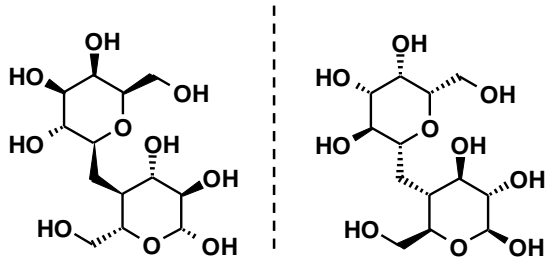


S-limonén (citrom
illat)



R-limonén (narancs illat)

Királis toxikológia



természetes
laktóz

„tükörbéli
laktóz”

10 független kiralitáscentrum

$2^{10} = 1024$ lehetséges konfiguráció, 1024 sztereoizomer

megkülönböztetett, számunkra fontos („jó enantiomer”):

- **eutomer**, 1 db

ehhez képest, pontos tükörkép („rossz enantiomer”):

- **disztomer**, 1 db

nem tükörkép, de nem is azonos

- **diasztereomer**, 1022 db

A diasztereomerek már akirális rendszerben is elvál(hat)nak!

akirális kolonnán elvi maximum: 512 csúcs (mindegyikben egy tükörképi pár)

királis kolonnán elvi maximum: 1024 csúcs

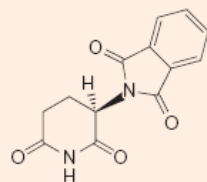
Királis toxikológia

Box 1 | The thalidomide tragedy: the myth of a missed opportunity

The thalidomide tragedy of 1961 is a landmark in drug regulation. Thalidomide is a racemate — of a glutamic-acid derivative — and in 1984, in the foreword of a book about X-ray crystallography¹³⁰, the following statement appeared: “The thalidomide tragedy would probably never have occurred if, instead of using the racemate, the (*R*)-enantiomer had been brought on to the market. In studies ... it was shown that after i.p. administration only the (*S*)-(–)-enantiomer exerts an embryotoxic and teratogenic effect. The (*R*)-(+)-enantiomer is devoid of any of those effects under the same experimental conditions”. This quote has been widely used subsequently, and was even alluded to in the citation for the 2001 Nobel Prize in Chemistry, which was awarded to Knowles, Noyori and Sharpless for the development of catalytic asymmetric synthesis, and has had a great impact on the development of new drugs¹³¹.

Regrettably, the proposal that the thalidomide tragedy could have been avoided if the single enantiomer had been used is misleading, for two reasons. First, it is based on unreliable biological data: the studies purporting to show that (*S*)-(–)-thalidomide is more teratogenic were in the mouse — a species that is generally regarded as unresponsive — and involved very high doses¹³². However, earlier work in the rabbit, the species that is most sensitive to thalidomide, showed clearly the equal teratogenic potency of its enantiomers¹³³. Second, the chiral centre in thalidomide is unstable in protonated media and undergoes a rapid configurational inversion¹³⁴.

So, the individual enantiomers of thalidomide are both inverted rapidly to the racemic mixture and also degraded rapidly by opening of the glutarimide ring — processes that occur faster *in vivo* than *in vitro*¹³⁵. Therefore, even if there were differences in the toxicity of the enantiomers of thalidomide, their rapid racemization *in vivo* would blunt them such that they could not be exploited. This case shows the importance of considering data in full and not leaping to conclusions, however tempting these might be.

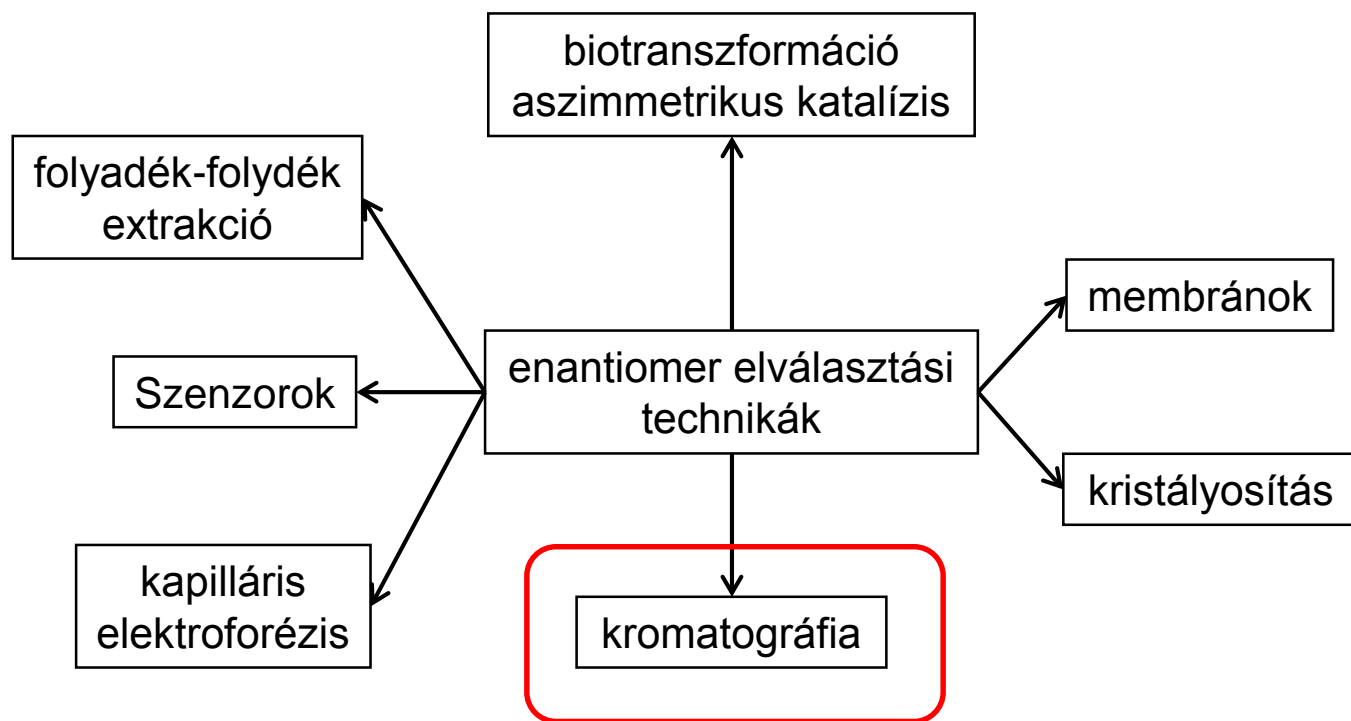


(*R*)-(+)-Thalidomide

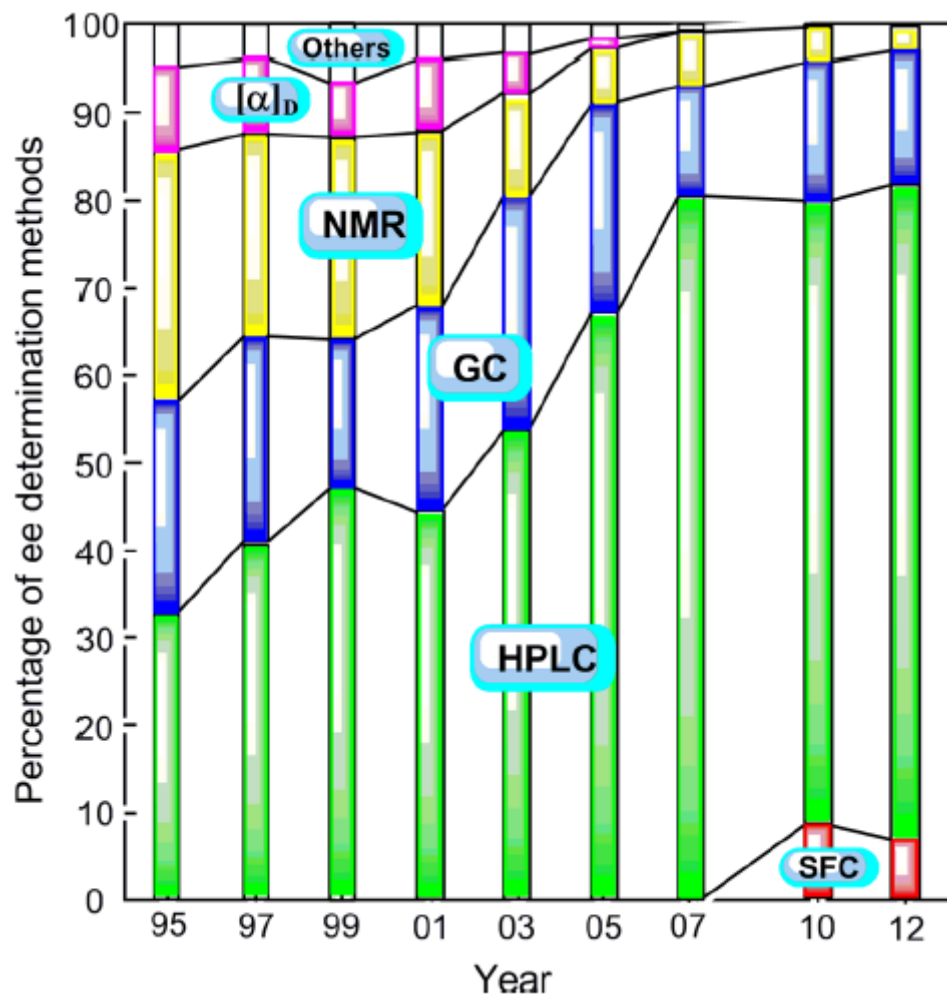


Agranat, I., Caner, H., Goldwell, J. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002, 1, 752-768 (p.757)

Enantiomer elválasztási lehetőségek

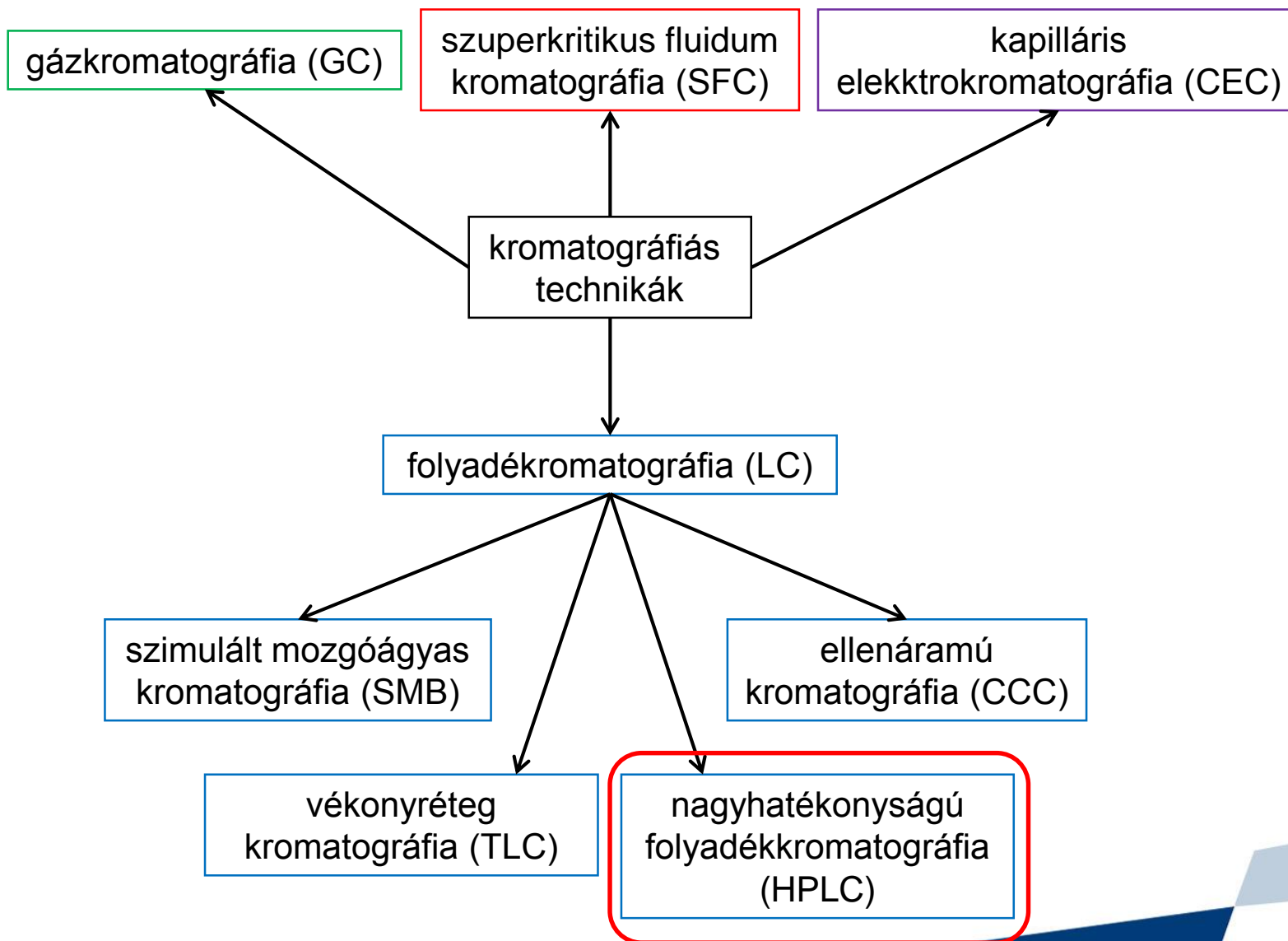


Enantiomer elválasztási lehetőségek



Shen, J., Okamoto, Y. *Chem. Rev.* 2016, 116, 1094-1038

Kromatográfias elválasztási módszerek az optikailag aktív izomerek elválasztására



Folyadékkromatográfiás módszerek az optikailag aktív izomerek elválasztására

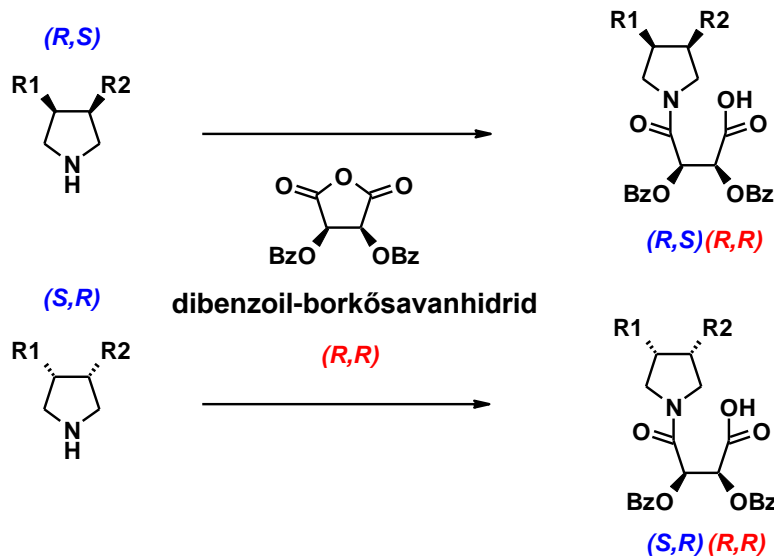
A folyadékkromatográfia a módszerek könnyű változtatása, a sok eltérő jellegű kolonna választhatósága miatt az optikailag aktív anyagok egyik fő elválasztási módszere. Bármilyen kromatográfiás módszernél az elválasztás alapja a diasztereomer pár képzés a vizsgált vegyület és a származékképző, illetve az állófázis vagy a mozgófázis optikailag aktív komponense között. Az optikai izomerek elválasztására alkalmazható kromatográfiás módszereket két fő típusba lehet sorolni:

- közvetett (indirekt)
- közvetlen (direkt) meghatározás.

Történetileg a közvetett meghatározás alakult ki először. A közvetett meghatározás során az enantiomerek elválasztását diasztereomer elválasztásra vezetjük vissza, akirális közegben, a kolonna előtti származékképzéssel, amit „precolumn” technikának is neveznek.

Közvetlen meghatározás során a királis molekulákat királis közegben választjuk el, így lehet az álló- vagy a mozgófázis királis. Tehát az elválasztandó enantiomerek eltérő kölcsönhatása az állófázissal, illetve a mozgófázisba tett királis szelektorról szabja meg az elválasztást.

Közvetett (indirekt) meghatározás



diasztereomerek,
akirális kolonnán is elválaszthatók

Előnyök:

- „olcsó” kolonna
- detektálás (a diasztereomerek fajlagos UV elnyelése eltér!)
- megfordítható sorrend a tükörképi reagenssel

Hátrányok:

- a reakciósebesség eltérhet
- munkaigényes

Közvetlen (direkt) meghatározás

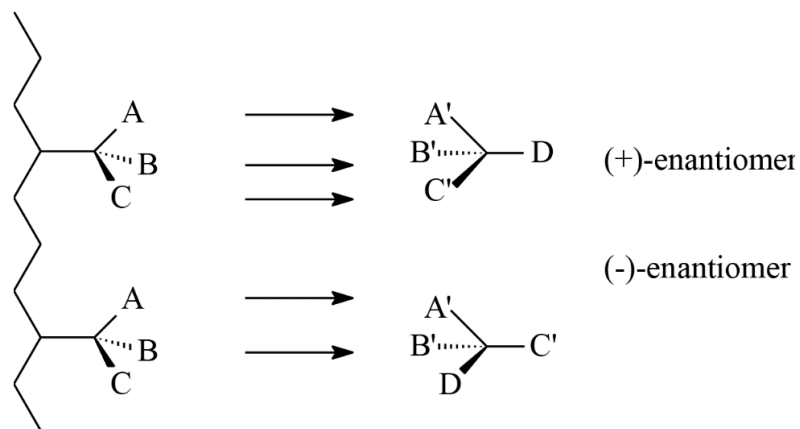
- Az elválasztandó vegyület és a szelektor között akkor jön létre a stabilis kapcsolat, ha az elválasztandó molekula legalább három ponton tud kötődni. Ezt az úgynevezett hárompontos kötődés modelljét Dalglish írta le először 1952-ben és a mai napig ez az elmélet a legelfogadottabb a minta és a szelektor közötti kölcsönhatások értelmezésére.
- A 80-as években Pirkle és Pochapsky a modellt úgy módosította, hogy a három kölcsönhatás közül legalább egynek sztereoszelektívnek kell lennie.

Előnyök:

-Direkt meghatározás esetén elég, ha ideiglenes a kapcsolat a királis megkülönböztetést adó anyaggal!

-Királis (pontosabban: enantiomertiszta) **adalék** a mozgófázisban folyamatos költség, zavarhatja a detektálást.

-Királis (pontosabban: enantiomertiszta) **állófázis** egyszeri költség, kényelmes.



A közvetett és közvetlen királis folyadékkromatográfiás módszerek összehasonlítása

Előnyök	
Közvetett módszerek	Közvetlen módszerek
<p>Az elválasztás általában egyszerűbb, a felbontás nagyobb.</p> <p>Az elúciós sorrend következtethető illetve megfordítható (antipód reagens).</p> <p>A detektálás alsó határa csökkenthető.</p> <p>Az akirális kolonna olcsóbb.</p> <p>A módszerfejlesztés kevésbé időigényes.</p> <p>A szelektivitás növelhető (előtisztítás).</p>	<p>A királis szelektor enantiomer tisztasága nem kritikus.</p> <p>Az enantiomerek azonos moláris abszorbanciával rendelkeznek.</p> <p>Racemizáció nem valószínű az analízis során.</p> <p>Funkciós csoporttal nem rendelkező racemátok is elválaszthatók.</p> <p>Preparatív célra is hasznosítható.</p> <p>A hőmérséklet változtatása gyakran kedvező az elválasztás szempontjából.</p> <p>Egyszerű mintaelőkészítés és kromatografálás.</p>

A közvetett és közvetlen királis folyadékromatográfiás módszerek összehasonlítása

Hátrányok	
Közvetett módszerek	Közvetlen módszerek
<p>A származékképző enantiomer tisztasága kritikus.</p> <p>A képződött diasztereomerek moláris abszorbanciája különbözhet.</p> <p>A származékképzés során racemizáció léphet fel.</p> <p>A reagens feleslege és a melléktermékek zavaró csúcsként jelentkezhetnek.</p> <p>Az enantiomerek visszanyerése további műveleteket igényel.</p> <p>A származékképzés időigényes lehet.</p>	<p>Az elméleti tányérszám általában kicsi.</p> <p>A deszorpció kinetikája egyes esetekben igen lassú.</p> <p>Az elúciós sorrend és a királis kölcsönhatások mibenléte nem tisztázott.</p> <p>Nincs általánosan használható kolonna.</p> <p>A királis kolonnák rendkívül érzékenyek a munkakörülmények változtatására.</p> <p>Drága az állófázis.</p>

Királis állófázisok felosztása

Állófázis típusa		Szelektor	Főbb kölcsönhatások
I.	Ligandum cserés	aminosav-fém komplex	komplekképződés
II.	Donor-akceptor (Pirkle-típusú)	π -savas, π -bázisos csoportok	π - π és dipol
III.	Polimer	módosított cellulóz és amilóz	poláris és diszperziós
IV.	Zárványkomplex	ciklodextrinek	zárványkomplex- képzés, H-híd, sztérikus, π - π
		királis koronaéterek	
		ciklofruktánok	
V.	Makrociklusos antibiotikum	makrociklusos glikopeptid	elektrosztatikus, H- híd, π - π , hidrofób, sztérikus
VI.	Ioncsere-alapúak	anion-, kation és "zwitter-ion" alapúak	ionos, poláris, π - π és sztérikus
VII.	Fehérje	természetes fehérje	ionos és hidrofób
VIII.	Molekulalenyomat	szelektív szorbens (pl.: szerves molekula, makromolekula, sejt)	sztérikus

Poliszacharid alapú királis állófázisok

Történeti áttekintés

Természetes homokirális poliszacharidok felhasználása:

1951 Kotake aminosav-származékok elválasztása papírkromatográfiával

Általánosabb királis felismerő képesség:

1973 Hesse, Hagel mikrokristályos cellulóz-triacetát
amorf: sokkal gyengébb felismerés

1984 Okamoto szilikagélre borítás: megváltozott szelektivitás + mechanikai stabilitás

1986 Okamoto (Daicel) Chiralpak AD = **ADMPC** (DMPC = 3,5-dimetil-fenil-karbamát)

Chiralcel OD = **CDMPC**

2004 Francotte (Daicel) immobilizált változatok:

Chiralpak IA = **ADMPC**

Chiralpak IB = **CDMPC**

Chiralpak IC = **CDCPC**

... további szelektorok, generikus változatok

pl. **ADMPC** = Lux Amylose-1 borított, Lux i-Amylose-1 immobilizált

CDMPC = Lux Cellulose-1 borított

CDCPC = Lux i-Cellulose-5 immobilizált

A természetes alapanyag hátránya: nem áll rendelkezésre a tükörképi kolonna.

A sorrend pedig fontos! Könnyebb a dolgunk, ha a kicsi csúcs eluálódik előbb.

Bizonyos komplementaritás kimutatható ADMPC és CDMPC között.

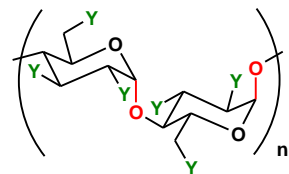
Poliszacharid alapú királis állófázisok

~ 80 % szilikagél, ~ 20 % királis szelektor

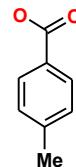
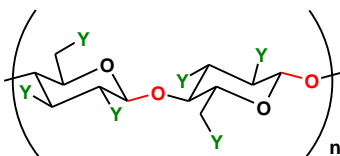
Módosítás: **Y** = észter

Y = karbamát

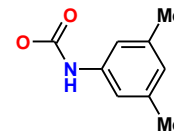
amilóz: **Y** = OH



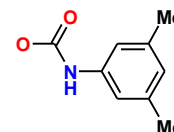
cellulóz: **Y** = OH



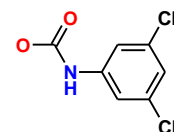
Chiralcel OJ
Lux Cellulose-3



Chiralpak AD
Lux Amylose-1



Chiralcel OD
Lux Cellulose-1



Chiralpak IC
Lux i-Cellulose-5

borított: film a szilikagél felületén oldhatatlansága tartja meg a kolonnában

immobilizált: a szilikagélhez rögzítve, vagy keresztkötésekkel, túl jól oldódó szelektorok (pl. IC) csak ebben a változatban

lehetséges kölcsönhatások:

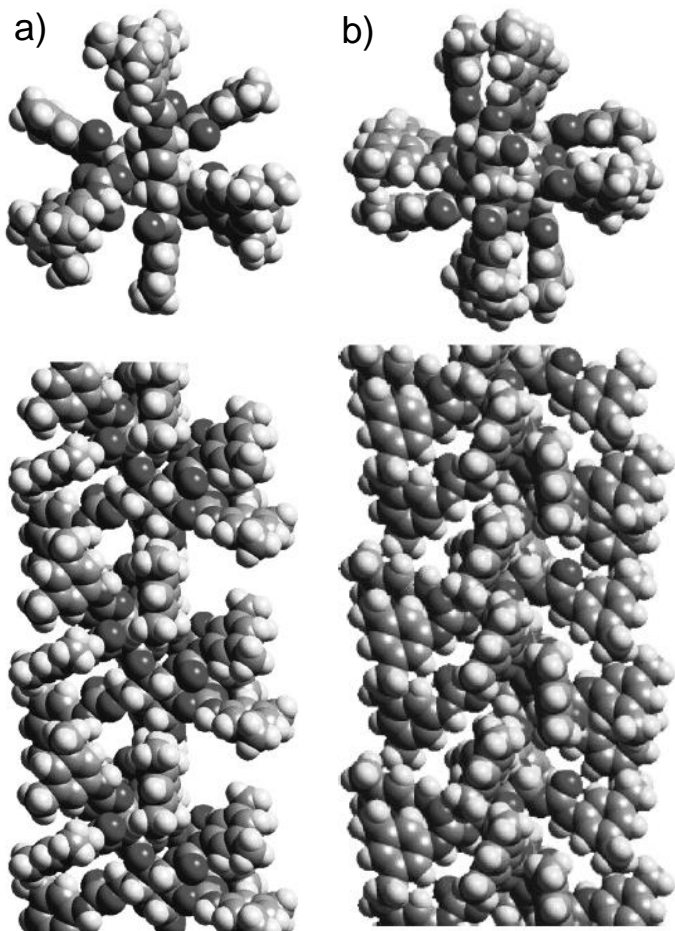
H-kötés akceptor, H-kötés donor, dipól-dipól, π - π , sztérikus (királis üregek)

Sokféle lehetőség – széleskörű szelektivitás – az előrejelzés szinte lehetetlen

Leggyakrabban használt poliszacharid alapú királis állófázisok

Láncvég	Gyártó	Phenomenex (Lux)		Chiral Technologies (Daicel)		YMC (Chiral Art)	
	Típus	borított	immobilizált	borított	immobilizált	borított	immobilizált
3,5-dimetil-fenil-karbamát	amilóz	Amylose-1	i-Amylose-1	Chiralpak AD	Chiralpak IA	Amylose-C	Amylose-SA
	cellulóz	Cellulose-1	-	Chiralcel OD	Chiralpak IB	Cellulose-C	Cellulose-SB
5-klór-2-metil-fenil-karbamát	amilóz	Amylose-2	-	Chiralpak AY	-	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
3-klór-4-metil-fenil-karbamát	amilóz	-	-	Chiralpak AZ	Chiralpak IF	-	-
	cellulóz	Cellulose-2	-	Chiralcel OZ	-	-	-
4-klór-3-metil-fenil-karbamát	amilóz	-	-	-	-	-	-
	cellulóz	Cellulose-4	-	Chiralcel OX	-	-	-
(S)-alfa-metil-benzil-karbamát	amilóz	-	-	Chiralpak AS	-	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
3-klór-fenil	amilóz	-	-	-	Chiralpak ID	-	-
	cellulóz	-	-	-	-	-	-
3,5-diklór-fenil	amilóz	-	-	-	Chiralpak IE	-	Amylose-SE
	cellulóz	-	i-Cellulose-5	-	Chiralpak IC	-	Cellulose-SC
4-metil-benzoát	amilóz	-	-	-	-	-	-
	cellulóz	Cellulose-3	-	Chiralcel OJ	-	-	-

Poliszacharid alapú királis állófázisok



- **poláros** csoportok a szelektor **belsejében**
- **apoláros** aromás gyűrűk a szelektor **külső részén**
- **királis üregek**
alapvető a szerepük a megkülönböztetésben
függnek az előállítási technológia apró különbségeitől
→ azonos szelektorú kolonnák elválasztása kissé eltérhet,
lehet egy racemátra jobb, egy másikra rosszabb

- a) cellulóz 3,5-dimetil-fenil-karbamát (CDMPC)
b) amilóz 3,5-dimetil-fenil-karbamát (ADMPC)

Multimodális működés

Normál fázisú, NP mód:

alapoldószer: heptán, hexán

poláros módosító: tipikusan 5-40 % ROH (IPA, EtOH, MeOH/EtOH=1/1)

CSAK immobilizáltaknál: nem-standard eluensek DKM, EtOAc, THF, toluol, acetone, ...
(10 µl etil-acetát injektálása tönkretesz egy 250 x 4,6 mm-es borított kolonnát!)

Leggyakoribb az alkalmazások között, jól kihasználja az elsősorban poláris kölcsönhatást

Fordított fázisú, RP mód:

MeCN / víz (puffer), MeOH / víz (puffer)

ritkább a megfelelő elválás, nagyon poláros az eluens
borított: vizet akkumulál

Poláris szerves oldószer, PO mód:

MeOH, EtOH, IPA, MeCN és ezek keverékei

Előnyök:

- általában jobb oldhatóság (gyógyszeripari környezetben)
- jellemzően kis nemspecifikus kölcsönhatás (alapkoncepció)
- jól automatizálható
- persze a holtidő közelsége nem jó ...

Módszerátadásnál szívesebben fogadottak, mint az NP módszerek

A szelektor oldhatósága is változik az összetétellel, nemcsak az elúciós erő!
Megengedett tartomány – kolonnaleírás. Megengedett eluensek bizonyos összetételeit tilthatják.

Journal of Chromatography A, 1269 (2012) 26–51



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Review

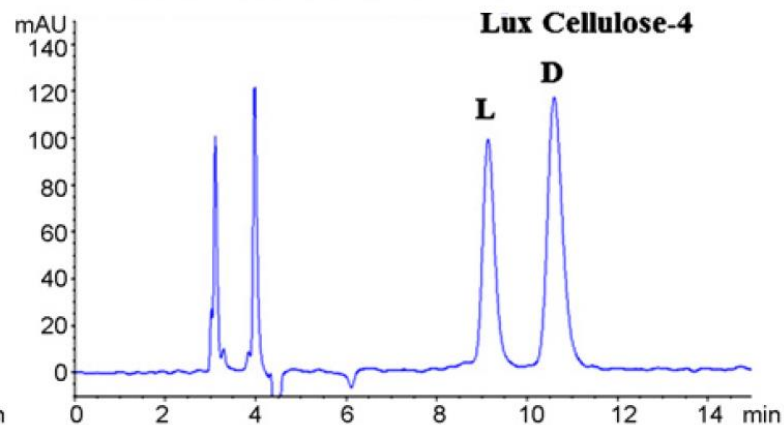
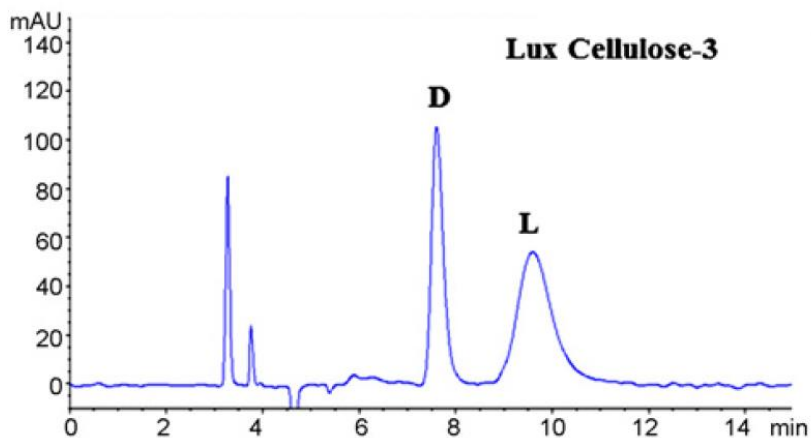
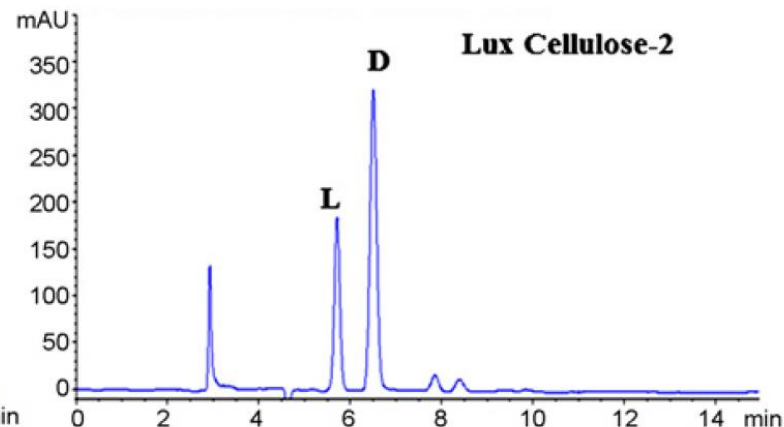
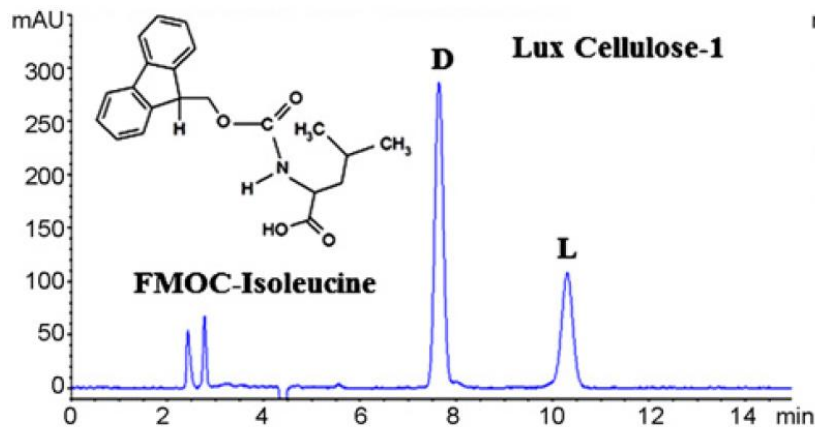
Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers

Bezhan Chankvetadze*

Institute of Physical and Analytical Chemistry, School of Exact and Natural Sciences, Tbilisi State University, Chavchavadze Ave 1, 0179 Tbilisi, Georgia

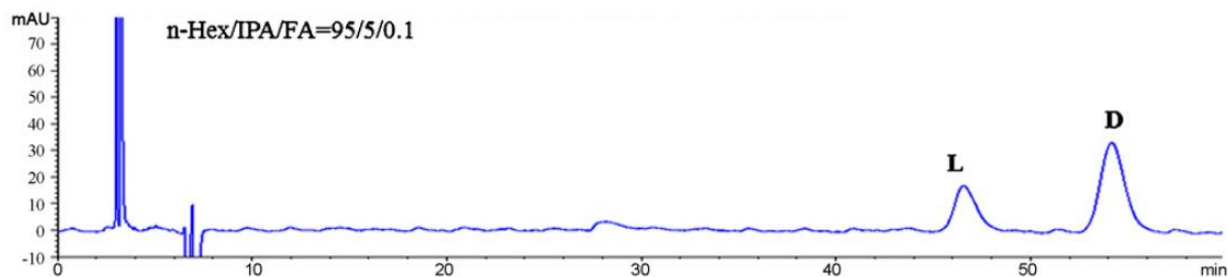
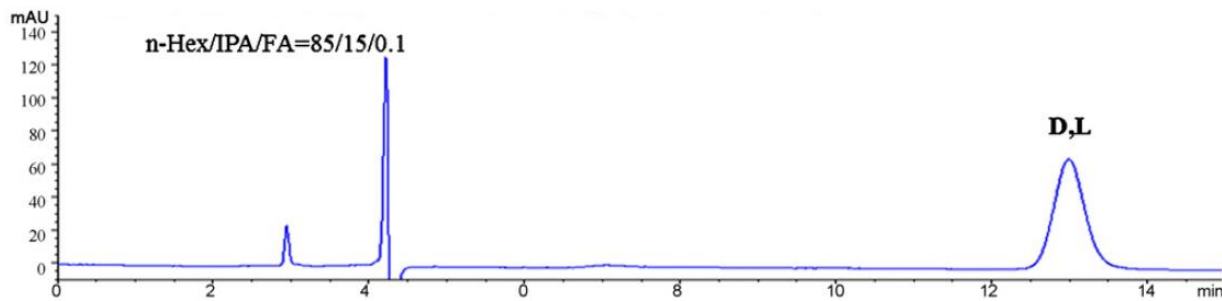
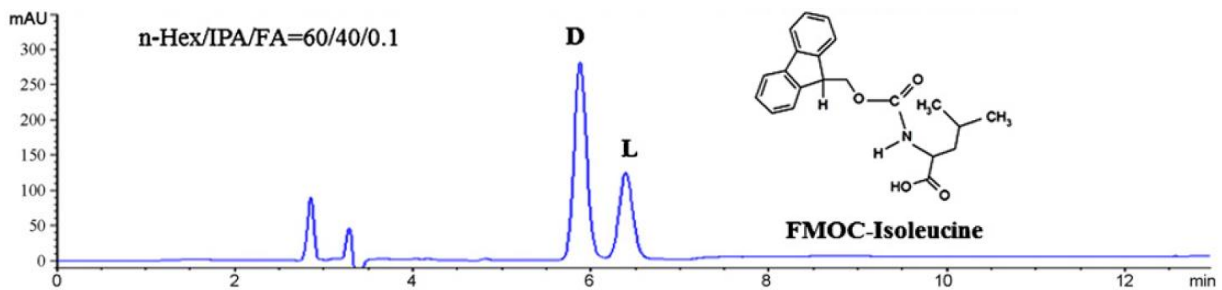


Királis elválasztás különböző típusú állófázisokon



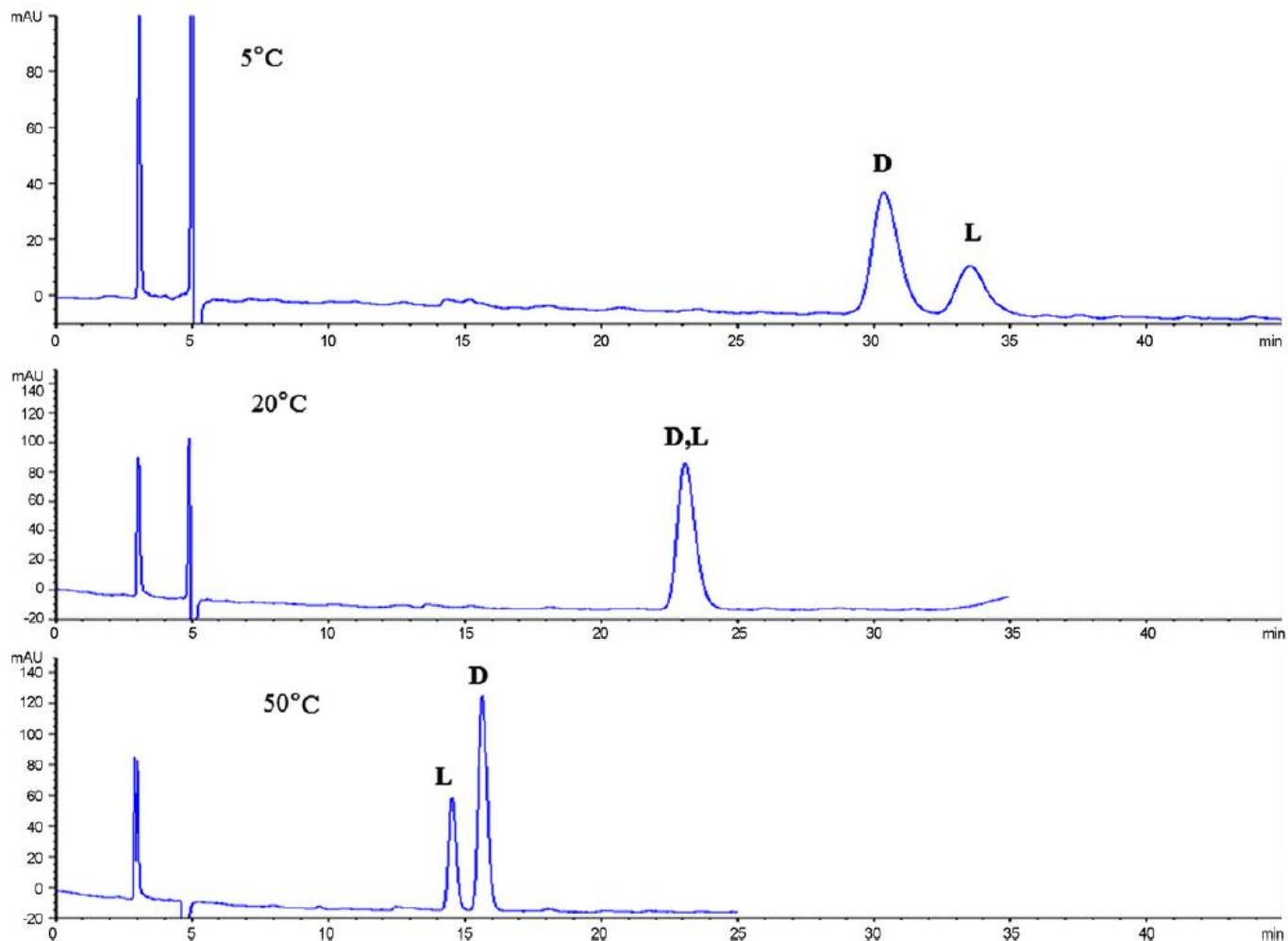
Mobile phase: n-hexane/ethanol/FA 80/20/0.1% (v/v/v)
Separation temperature: 20 °C

Királis elválasztás különböző típusú állófázisokon



Column: Lux Cellulose-1
Separation temperature: 20 °C

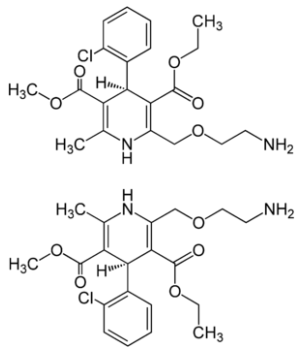
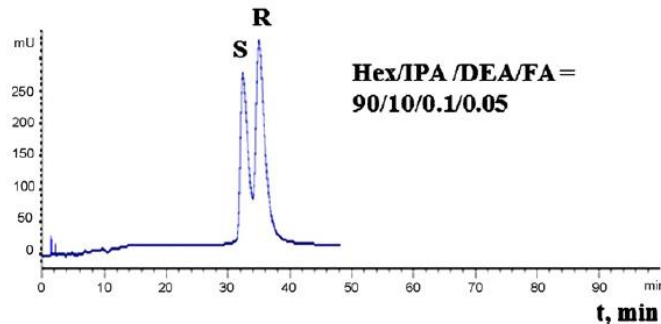
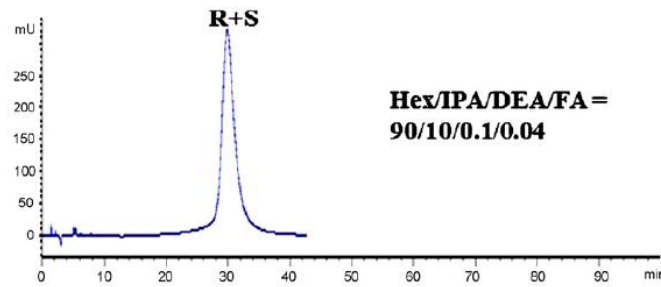
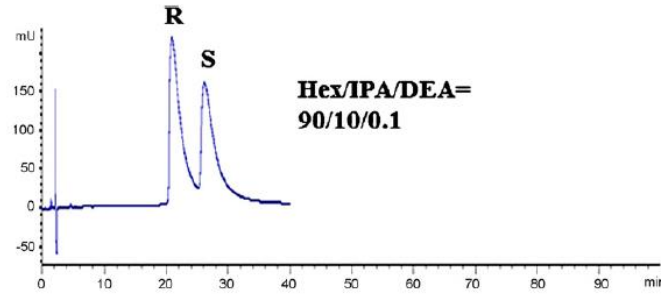
Királis elválasztás különböző hőmérsékleten



Column: Lux Cellulose-1
Mobile phase: n-hexane/IPA/FA 90/10/0.1% (v/v/v)

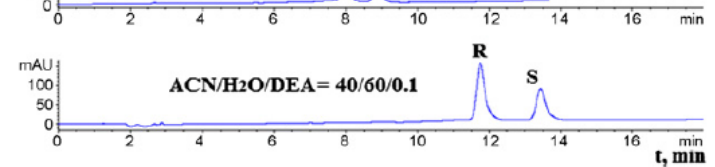
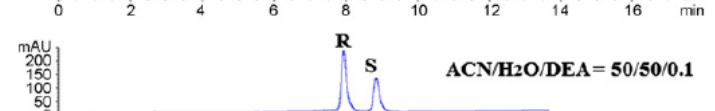
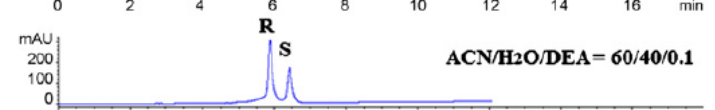
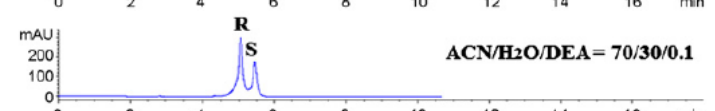
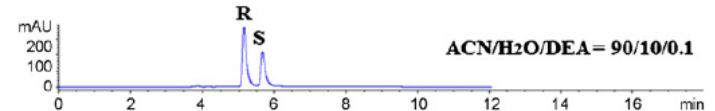
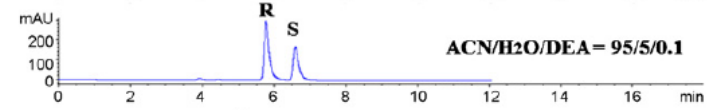
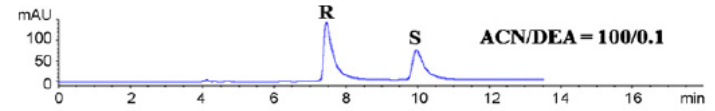
NP – RP módok összehasonlítása

Lux Cellulose-2 NP-mód



Amlodipin

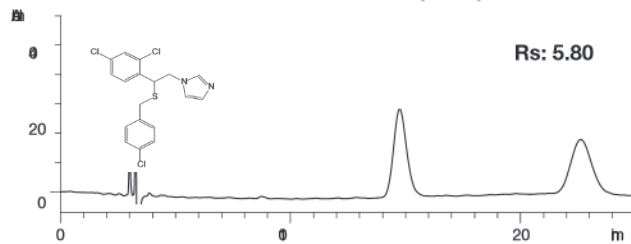
Lux Cellulose-4 RP-mód



NP – PO módok összehasonlítása

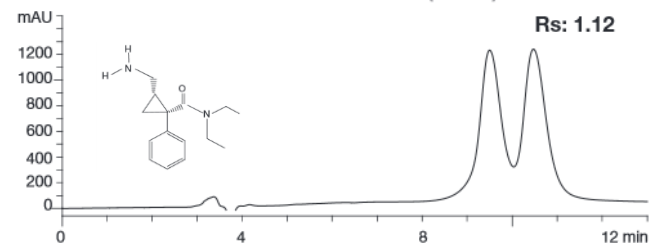
Sulcanozole on Lux Cellulose-2

0.1 % DEA in Hexane / 0.1 % DEA in IPA (60:40)



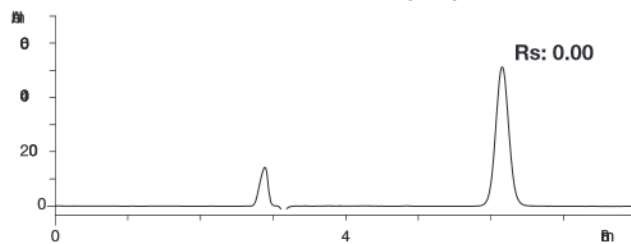
Milnacipran on Lux Cellulose-2

0.1 % DEA in Hexane / 0.1 % DEA in IPA (80:20)



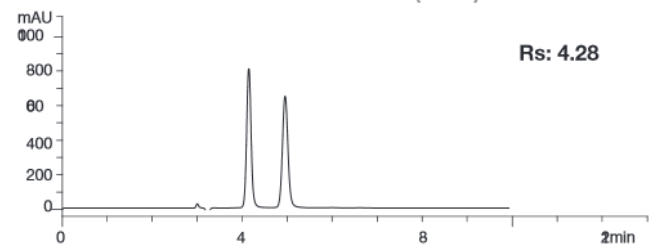
Sulcanozole on Lux Cellulose-2

0.1 % DEA in MeOH / 0.1 % DEA in IPA (95:5)



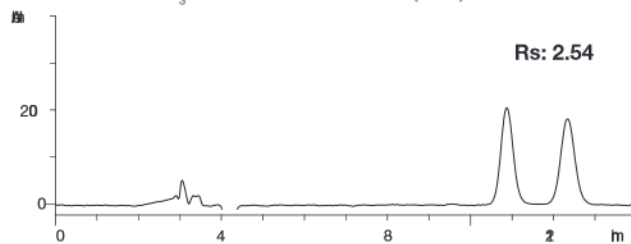
Milnacipran on Lux Cellulose-2

0.1 % DEA in MeOH / 0.1 % DEA in IPA (90:10)



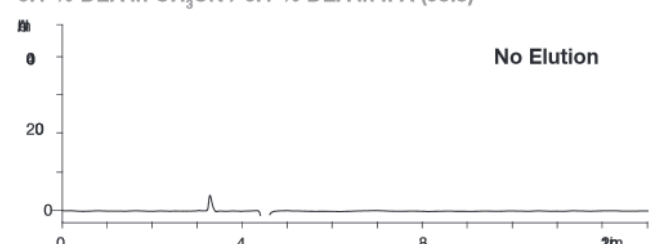
Sulcanozole on Lux Cellulose-2

0.1 % DEA in CH₃CN / 0.1 % DEA in IPA (95:5)



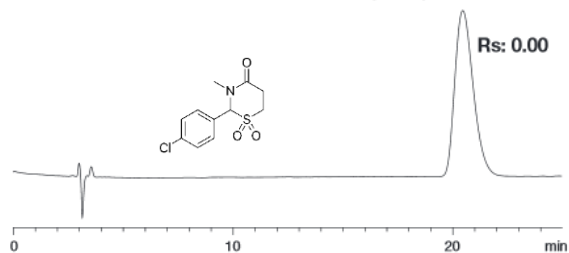
Milnacipran on Lux Cellulose-2

0.1 % DEA in CH₃CN / 0.1 % DEA in IPA (95:5)

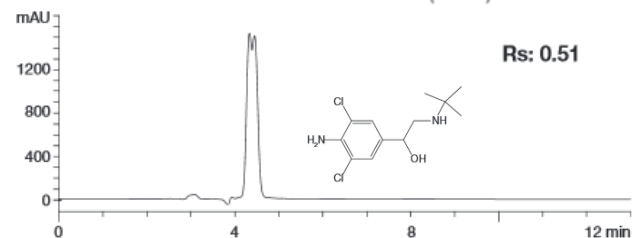


PO – RP módok összehasonlítása

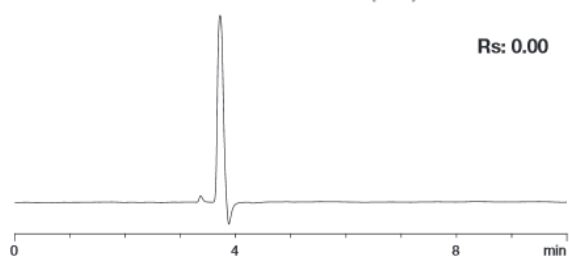
Chlormezanone on Lux Cellulose-1
0.1 % DEA in CH₃CN / 0.1 % DEA in IPA (60:40)



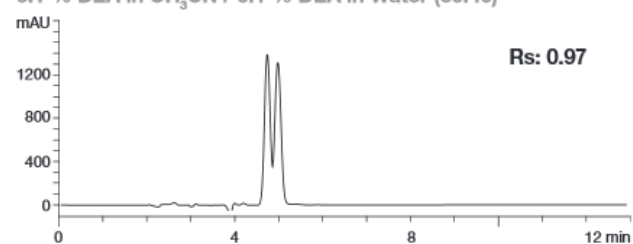
Clenbuterol on Lux Cellulose-2
0.1 % DEA in MeOH / 0.1 % DEA in Water (80:20)



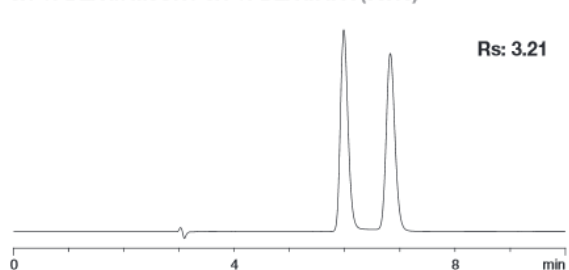
Chlormezanone on Lux Cellulose-1
0.1 % DEA in CH₃CN / 0.1 % DEA in IPA (95:5)



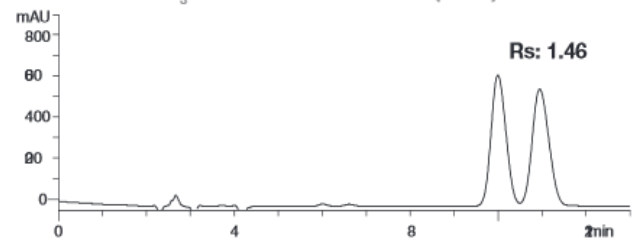
Clenbuterol on Lux Cellulose-2
0.1 % DEA in CH₃CN / 0.1 % DEA in Water (60:40)



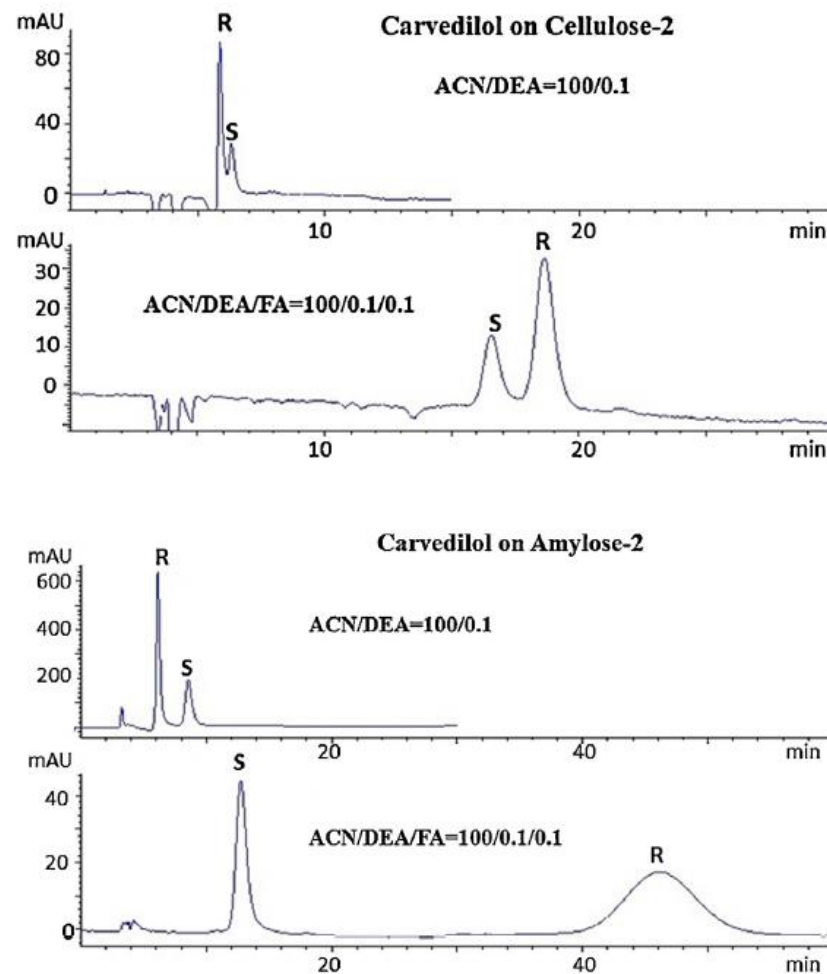
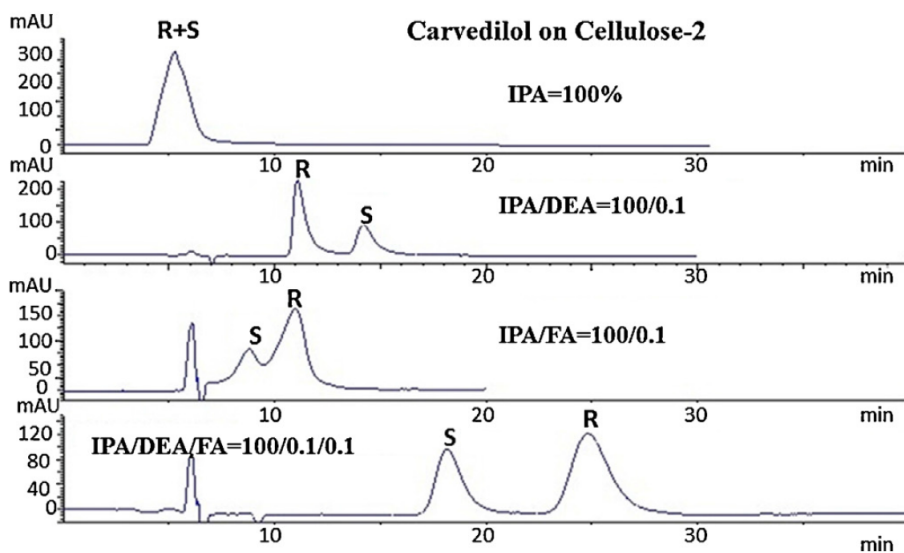
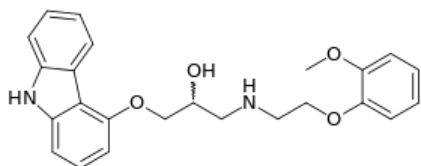
Chlormezanone on Lux Cellulose-1
0.1 % DEA in MeOH / 0.1 % DEA in IPA (90:10)



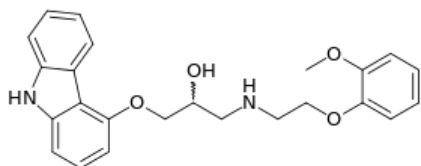
Clenbuterol on Lux Cellulose-2
0.1 % DEA in CH₃CN / 0.1 % DEA in Water (40:60)



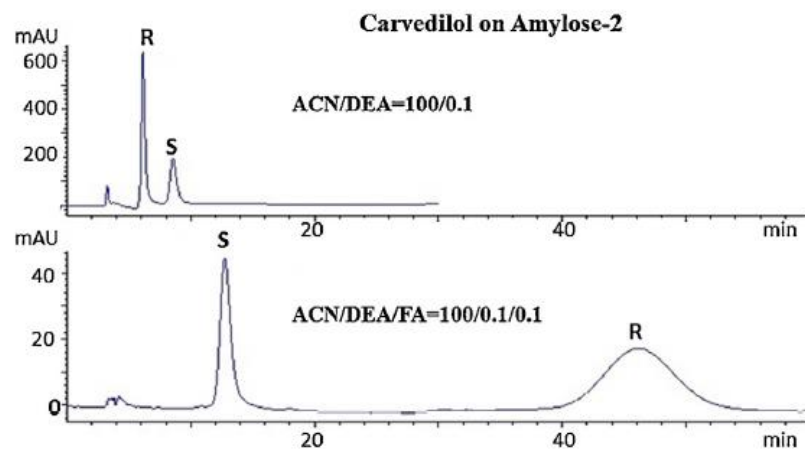
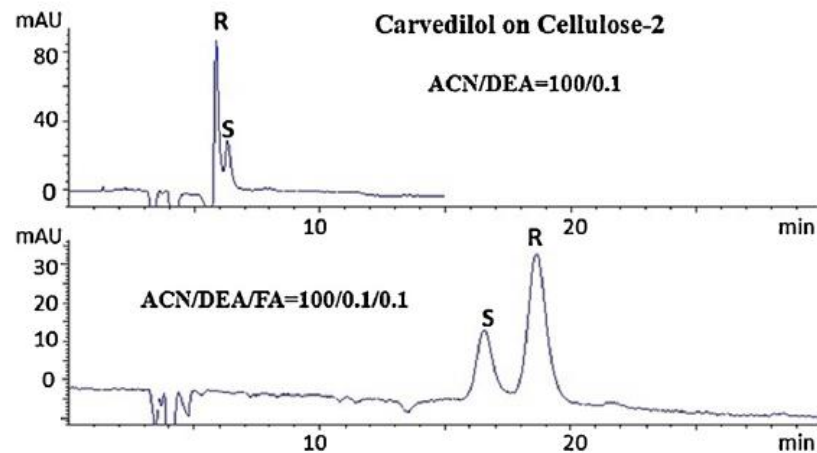
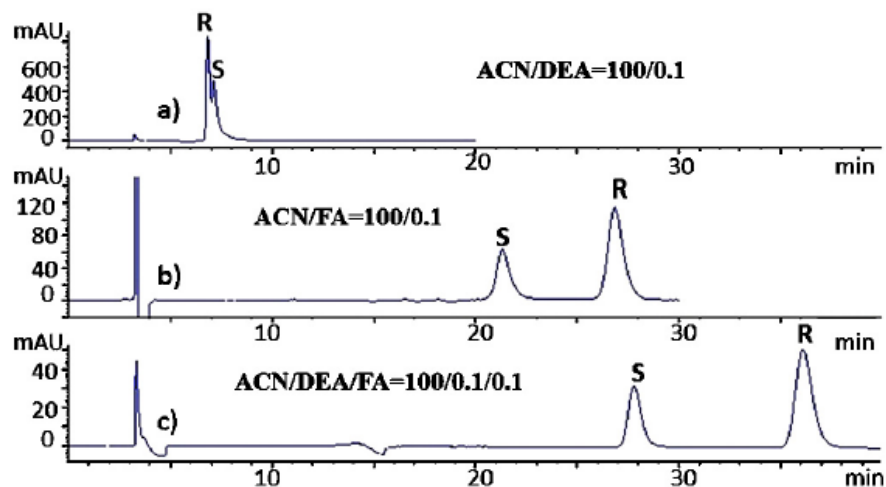
Mozgófázis adalékok hatása PO módban



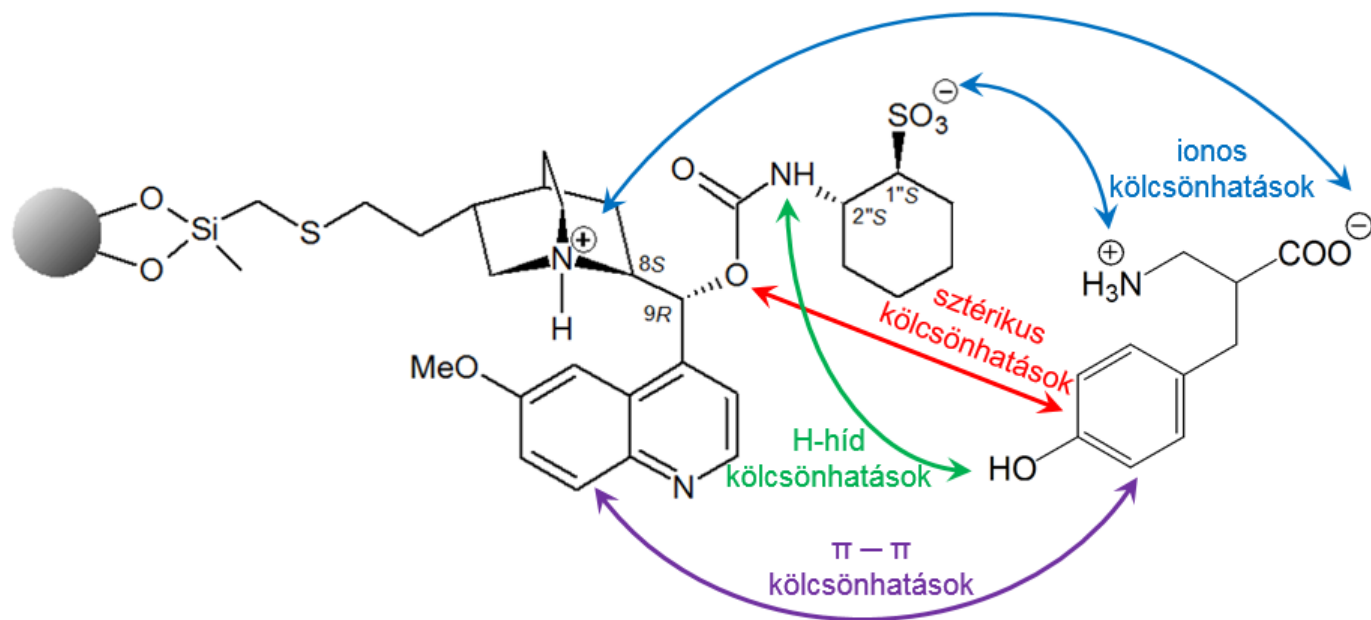
Mozgófázis adalékok hatása PO módban



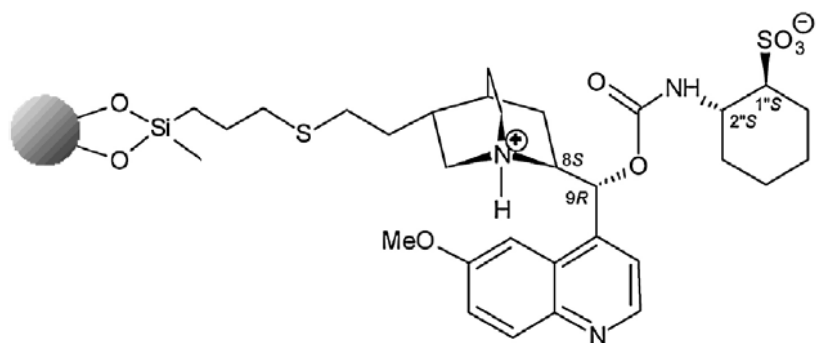
Carvedilol on Cellulose-4



Ioncserélő királis állófázisok



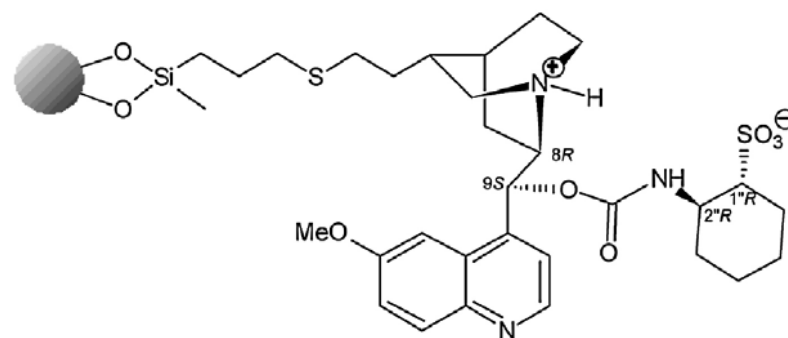
Ioncserélő királis állófázisok



Chiralpak ZWIX(+)TM
(8*S*, 9*R*)
(1''*S*, 2''*S*)

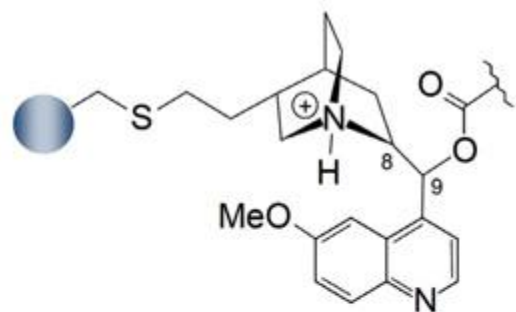
Chiralpak ZWIX(+)
Quinine-based (8*S*, 9*R*, 1''*S*, 2''*S*)

Chiralpak ZWIX(-)
Quinidine-based (8*R*, 9*S*, 1''*R*, 2''*R*)

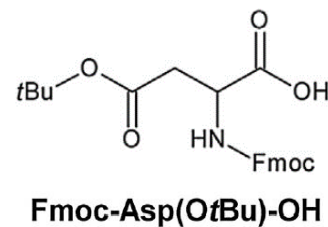
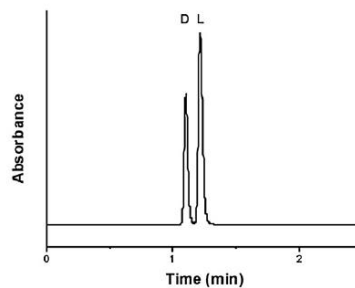


Chiralpak ZWIX(-)TM
(8*R*, 9*S*)
(1''*R*, 2''*R*)

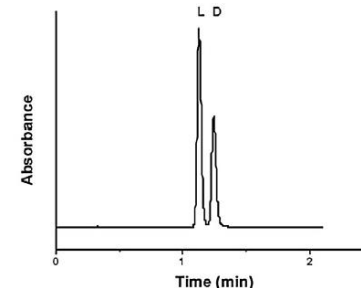
Ioncserélő királis állófázisok



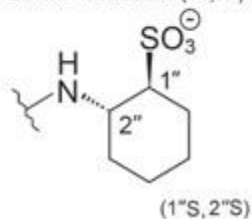
ZWIX(+)TM



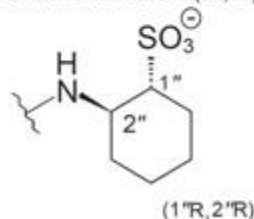
ZWIX(-)TM



CHIRALPAX ZWIX(+)
Quinine-derivatized (8S,9R)

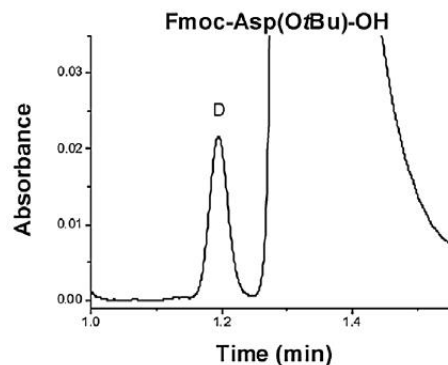


CHIRALPAX ZWIX(-)
Quinidine-derivatized (8R,9S)



Chiral selectors of CHIRALPAX ZWIX

ZWIX(+)TM



ZWIX(-)TM

