

Műszeres analitika I. Folyadékkromatográfia

Dr. Andrási Melinda



**DEBRECENI
EGYETEM**



Álló fázis	Mozgó fázis	Fizikai jelenség	Kromatográfia
folyadék	folyadék	megoszlás	HPLC, VRK, PC
szilárd	folyadék	adszorpció, ioncsere, méretkizárás, affinitás, hidrofób kölsönhatás	HPLC, VRK, gélkromatográfia, ionkromatográfia, affinitás kromatográfia, hidrofób kölsönhatás kromatográfia

- Folyadékkromatográfia esetén a mozgófázis mindig folyadék, az állófázis lehet folyadék, illetve szilárd halmazállapotú.
- **Izokratikus elúció:** eluens összetétele az elválasztás alatt állandó.
- **Gradiens elúció:** eluens összetétele elválasztás alatt változik.

Folyadék-szilárd (adszorpciós) kromatográfia:

- Az állófázis nagy fajlagos felületű, 3-10 μm méretű részecskéket tartalmazó töltet.
- Az elválasztandó komponensek a szilárd fázis felületén eltérő erősséggel kötődnek. A megkötött komponensek alkalmas oldószerekkel eluálhatók az oszlopról, a kötődés erősségétől függően különböző időpontban jelennek meg az oszlopról távozó oldószerben.

NORMÁL FÁZIS:

- poláris állófázis,
- az állófázis polárisabb, mint a mozgófázis,
- a mozgófázis apolárisabb, mint állófázis
- pl. szilikagél, alumínium-oxid

FORDÍTOTT FÁZIS:

- apoláros állófázis,
- az állófázis apolárosabb, mint a mozgófázis,
- a mozgófázis polárosabb, mint az állófázis
- pl. C8 vagy C18 szénhidrogénláncsal módosított szilikagél

Folyadék-szilárd (adszorpciós) kromatográfia:

- Oldószerek eluotróp sora: poláris adszorbensen az oldószerek növekvő polaritás szerinti sora, ami megfelel a növekvő dielektromos állandó sornak.
- A mozgófázis megfelelő polaritású oldószer, ill. oldószerkelet.
- Poláris oldószerek: H_2O , MeOH, dimetilformamid, MeCN, stb.
- Apoláris oldószerek: hexán, propiléter, CCl_4 , stb.

Mozgó fázis szempontok

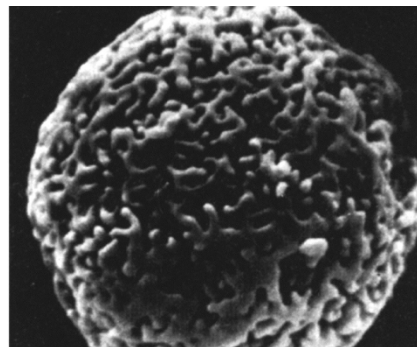
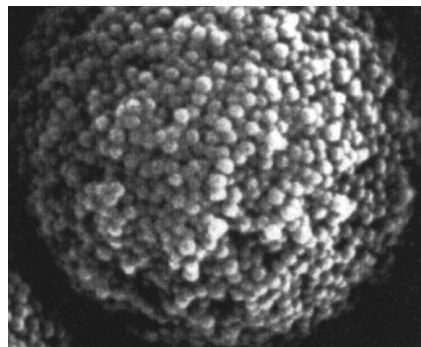
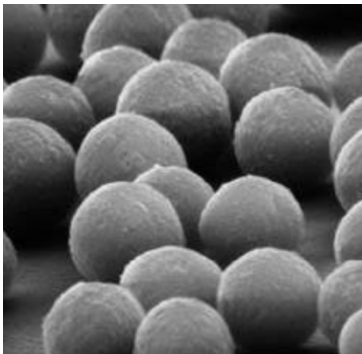
- Polaritás (módszerspecifikusság)
- Vízviszkozitás (Darcy törvény)
- UV fény áteresztés (UV cut-off)
- Tisztaság
- Illékonyság (forráspont)
- Toxicitás
- Oldott oxigén tartalom
- Víztartalom
- Elegyíthetőség
- Ártényezők

Állófázis általános jellemzése:

- Mechanikai stabilitás
- Kis szemcseátmérő
- Szűk szemcseátmérő eloszlás
- Energetikai homogenitás
- Ismert pórusátmérő és pórusalak
- Szűk pórusátmérő eloszlás
- Nagy fajlagos felület







Állófázis pórusszerkezetét jellemző paraméterek:

- Átlagos pórusátmérő
- Fajlagos felület
- Fajlagos pórustérfogat



Close-up SEM of a typical silica gel surface showing pore structure.

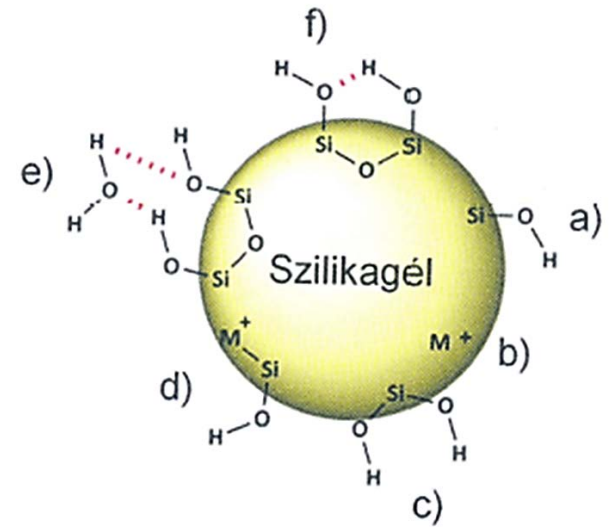
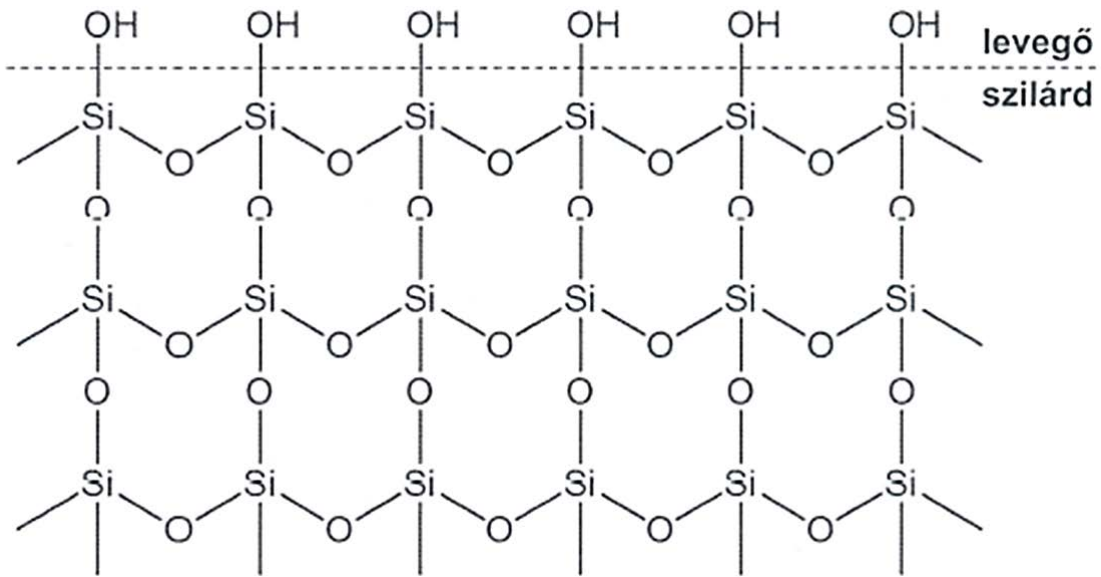
Szemcseátmérő fejlesztésének történeti áttekintése

Megjelenés éve	Szemcse méret	Nominalis méret	Tányérszám / 5cm
1969		100µm	170
1973		57µm (pellicular)	350
1975		10µm	2,000
1985		5µm	4,000
1992		3.5µm	7,500
2003		< 1.8 µm	12,000



Agilent Technologies

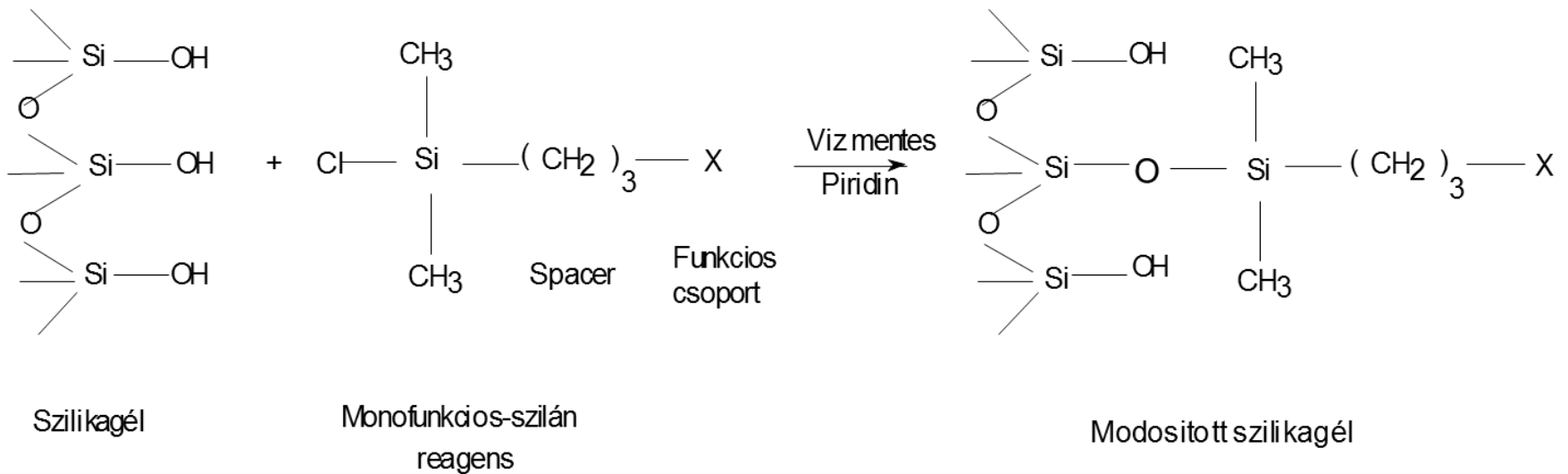
Szilikagél szerkezete



Szilikagél felületi módosítása

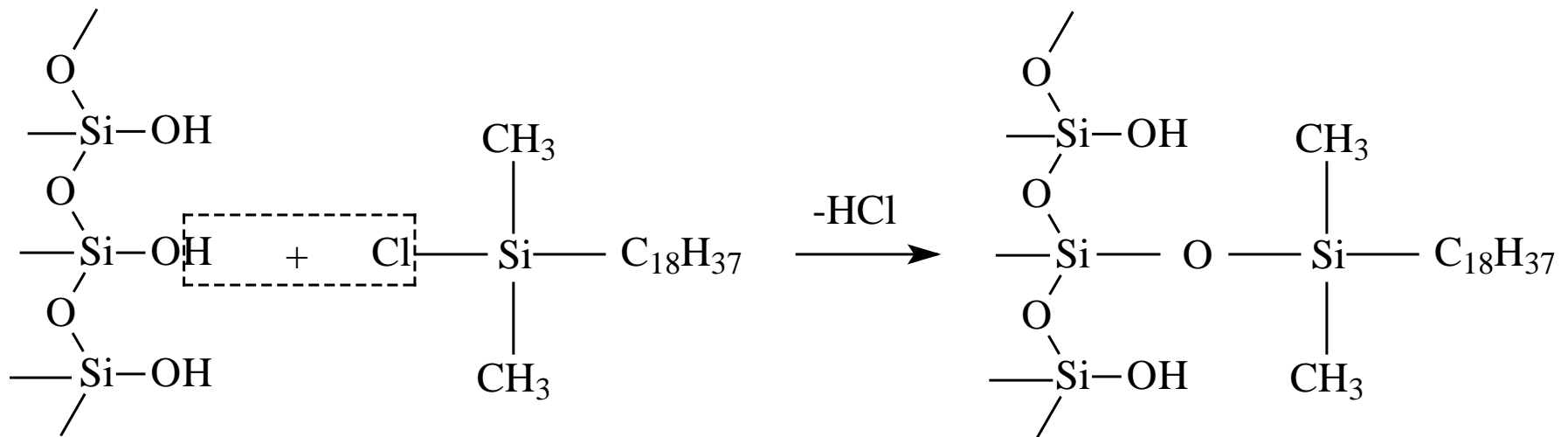
Poláris módosítás (monomer)

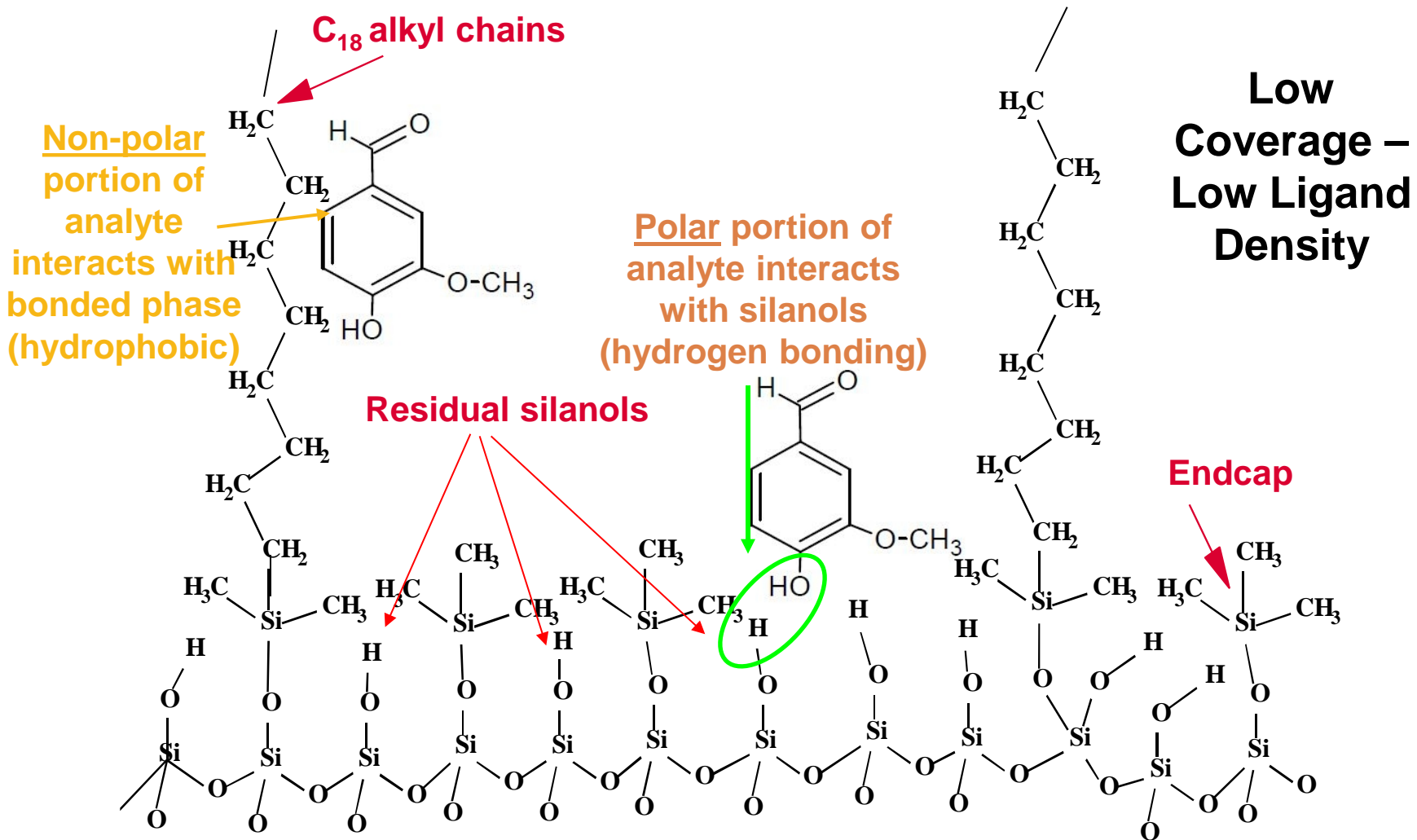
X: $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2(\text{OH})$, $-\text{NO}_2$...stb.



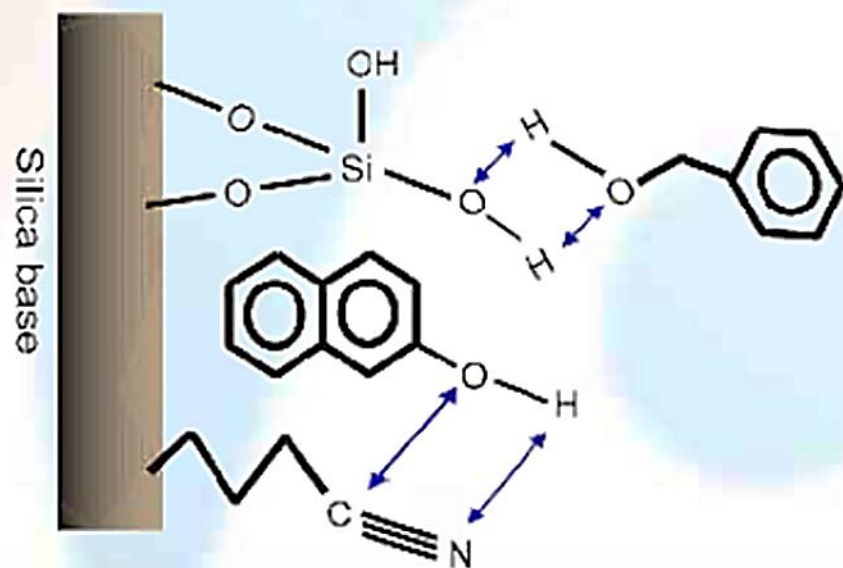
Szilikagél felületi módosítása

Apoláris módosítás (monomer)



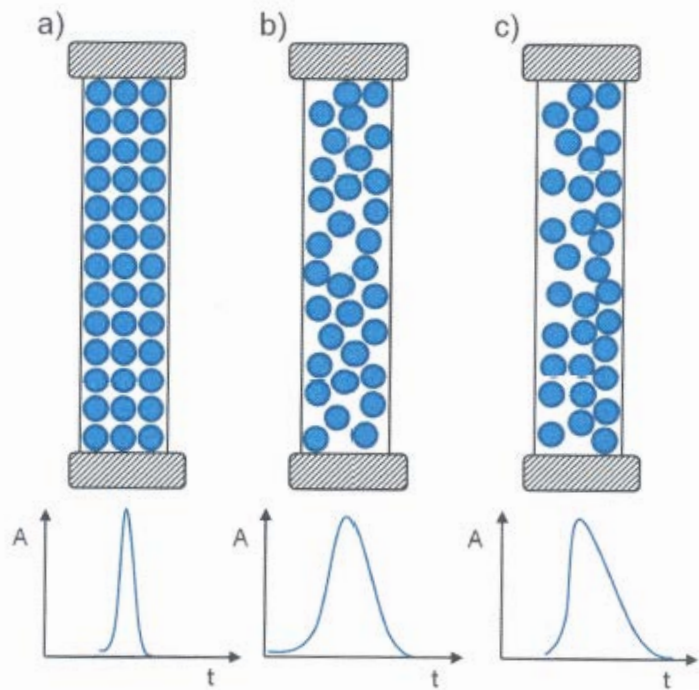


Hydrophilic / Polar / Normal Phase
Interactions with SI and CN
Functional Groups

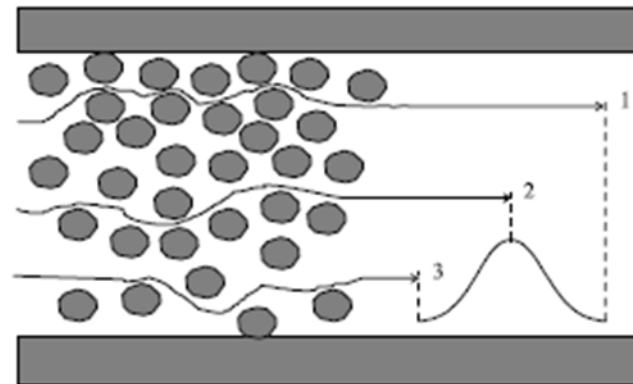


↔ Hydrogen bonding and Dipole - Dipole interactions

Kolonna töltése



Zónaszélesedés



Folyadék-folyadék (megoszlásos) kromatográfia:

- Az állófázis dezaktivált, szilárd hordozóra egyenletesen felvitt nem illékony folyadék (szilárd hordozó felületén filmként).
- A mozgófázis megfelelő polaritású oldószer, ill. oldószerkeverék.
- Poláris oldószerek: H_2O , MeOH, dimetilformamid, MeCN, stb.
- Apoláris oldószerek: hexán, propiléter, CCl_4 , stb.
- Az álló- és mozgófázis, illetve a mintakomponensek polaritása határozza meg a komponensek fázisok közötti megoszlását.
- Ha az álló- és mozgófázis polaritása hasonló, a minta mindkettővel azonos erősségű kölcsönhatást alakít ki, ami gyenge felbontást eredményez.
- Poláris komponensek poláris állófázisról apoláris mozgófázissal vizsgálhatók megfelelően. → **NORMÁL FÁZIS**
- Apoláris komponensek apoláris állófázisról poláris eluenssel választhatók el optimálisan. → **FORDÍTOTT FÁZIS**

Megoszlásos (folyadék-folyadék) kromatográfia

Normál fázisú kromatográfia: mozgó < álló

- Elúciós sorrend: a legkevésbé poláris komponens először.
- Mozgófázis polaritásának növelése: retenciós idő csökken.

Fordított fázisú kromatográfia: álló < mozgó

- Elúciós sorrend: a legpolárosabb komponens az első.
- Mozgófázis polaritásának növelése: retenciós idő nő.

Az összes HPLC elválasztások 75%-át fordított fázisú oszlopokon végzik (C8, C18)
eluens: MeOH/MeCN/THF – H₂O oldószerkelegyek.

RP-HPLC

- az álló fázis apolárisabb, mint a mozgó fázis
- a mozgó fázis polárisabb, mint az álló fázis

	Normál	Fordított
állófázis polaritása	nagy / poláros	kicsi / apoláros
mozgófázis polaritása	kicsi-közepes / apoláros	közepes-nagy / poláros
tipikus mozgófázis	heptán, kloroform	metanol, víz
elúciós sorrend	legkevésbé poláros először	legpolárosabb először
retenciónövelés módja	csökkenő polaritású mozgófázis	növekvő polaritású mozgófázis

Nagynyomású folyadékkromatográfia, HPLC

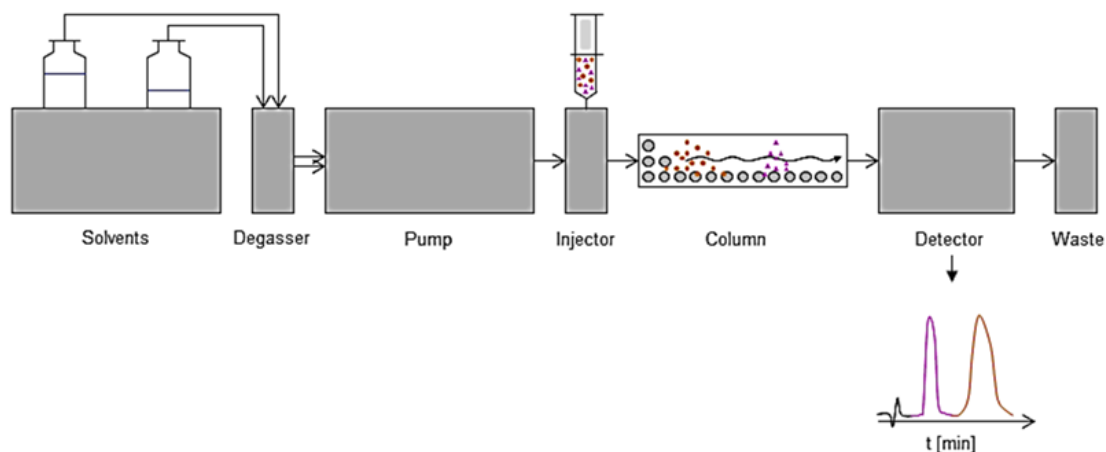
Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
(high performance liquid chromatography)

vagy

nagynyomású folyadékkromatográfia (high pressure liquid chromatography)

- Vegyületek (szerves, szervetlen, biológiai mintakomponensek) elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására használt kromatográfiás eljárás.

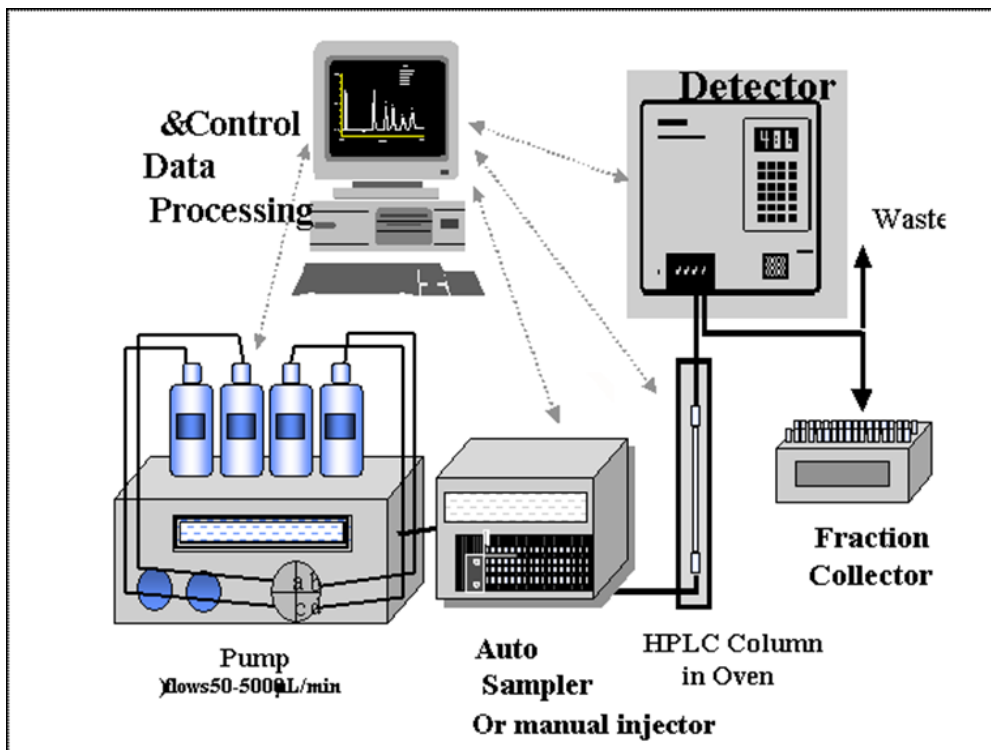
HPLC készülék felépítése:





Horváth Csaba (1930-2004)

- 1952 vegyészmérnöki diploma BME
- 1964 Yale Egyetem (School of Medicine) megépítette az első HPLC-t
- Elsőként ismerte fel a HPLC egyedülálló jelentőségét a biokémia, a molekuláris biológia és a modern bioanalitika területein.
- Fordított fázis alkalmazása
- Első microbore HPLC-oszlop, melyet biológiai minták ioncserélő elválasztásához fejlesztett ki
- Kiszorításos preparatív HPLC



HPLC részei:

- | | |
|--------------------|----------------------|
| 1. Oldószertárolók | 5. Automata injektor |
| 2. Pumpák | 6. Kolonna |
| 3. Szűrő | 7. Termosztálás |
| 4. Kolonna | 8. Detektorok |

Oldószertárolók:

Oldószer gázmentesítése, szűrése.

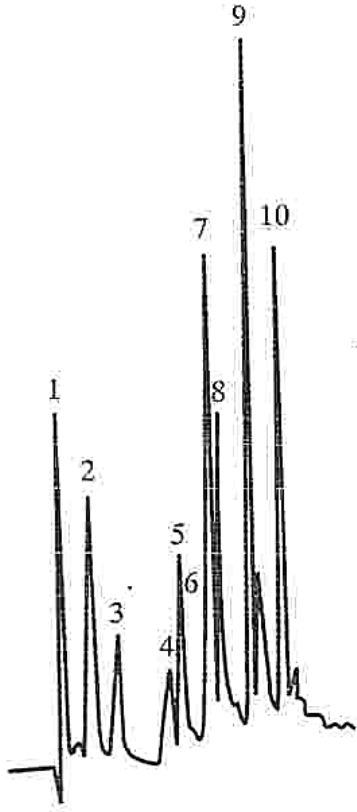
- Tárolóedények és csövek kémiaailag teljesen inert legyen az oldószerekkel szemben (üveg, PEEK, teflon).
- Az eluentároló zárt legyen, de nem légmentesen zárt.
- Maximum 4 oldószertároló (grádiens elúció).
- Oldószer gázmentesítése, lehet ultrahangos, héliumos, vákuumos.

Pumpák:

- A folyadék szállítását biztosítja.
- Pulzálásmentes eluens áramlás.
- Kémiaileg ellenálló (szerves oldószerek).
- Nyomás biztosítása, szokásos nyomástartomány 0-500 bar, mozgófázis áramoltatása túlnyomással a kis szemcseméretű (3-10 μm) állófázis ellenállása miatt.
- Térfogati áramlási sebesség: 0,1 -10 ml/perc.
- Áramlási sebesség kiváló reprodukálhatósága (< 0.5 % eltérés).
- Gradiens képzés: az oldószerek meghatározott arányú keverése.
- UPLC (ultrahigh pressure liquid chromatography) 1200 bar (1-2 mm belső átmérőjű, nagyon kis szemcseméretű kolonnához).

Gradiens elúció: A mozgófázis összetételének mérés közbeni változtatása, megadott arányú keverése. Két vagy több eltérő polaritású eluens keverékével (programozott változtatás).

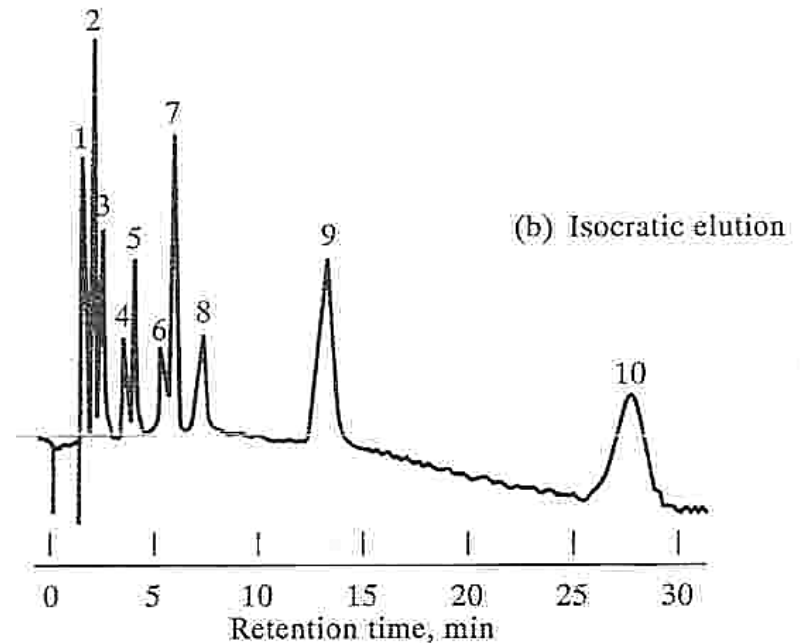
Izokratikus elúció: A mozgófázis összetétele az elválasztás során állandó.



(a) Gradient elution

Peak identity

1. Benzene
2. Monochlorobenzene
3. Orthodichlorobenzene
4. 1,2,3-trichlorobenzene
5. 1,3,5-trichlorobenzene
6. 1,2,4-trichlorobenzene
7. 1,2,3,4-tetrachlorobenzene
8. 1,2,4,5-tetrachlorobenzene
9. Pentachlorobenzene
10. Hexachlorobenzene



(b) Isocratic elution

Szűrő:

- Az oldószervezetékben helyezkedik el.
- A szilárd szennyezők kiszűrésére szolgál, melyek a pumpát károsítják, a kolonnát eltömik.

Kolonna:

Preparatív, félpreparatív, analitikai

Előtétkolonna: lazább, darabosabb állófázissal töltött oszlop, analitikai kolonna védelmét biztosítja, megoszlásos kromatográfiában a mozgófázis állófázissal való telítését szolgálja.



Kolonna:

Állófázist tartalmazó 10-30 cm hosszú, 4-10 mm átmérőjű acélcső.

5-10 μm szemcseméretű töltet (N= 40000-60000).

(3 μm -nél kisebb szemcseméret UPLC-nél)

Kolonnatöltetek:

- **Szilikagél (Si):** normál fázisú töltet.
- **Oktil (C8, RP-8), oktadecil (C18, RP-18):** legelterjedtebb fordított fázisú töltetek. Apoláris komponenssel szemben legnagyobb a visszatartás.
- **Fenil (C6H5):** fordított fázisú töltetet, nagy szelektivitás aromás vegyületekkel szemben.
- **Cianopropil (CN):** fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Gradiens elúcióhoz különösen alkalmas.
- **Aminopropil (NH₂):** fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Anioncserélő töltet is. NF-ként szelektivitása hasonló szilikához, előnye, hogy a víz nem dezaktiválja a felületet.

HPLC oszlop csoportosítása

	I.D. (mm)	Minta mennyisége	Áramlási sebesség	Szelektivitás	Alkalmazása
Analitikai	4.6	0.1-1.5 mg	0.5-3 ml/min		standard elválasztás
Solvent Saver	3.0	150-500 ug	0.3-1.5 ml/min	+	oldószer takarékos
NarrowBore	2.1	50-120 ug	0.1-0.5 ml/min	++	oldószer takarékos LC-MS
Microbore	1.0	10-50 ug	10-100 ul/min	++++	LC-MS
Kapilláris	0.5, 0.3	1-10 ug	1-15 ul/min	+++++	peptidek, proteinek LC-MS
Nano	0.1, 0.075	100-200 ng	200-500 nl/min	++++++	peptidek, proteinek LC-MS
Semi-Prep	9.4	1-10 mg	5-10 ml/min		félpreparatív elválasztás
Preparatív	21.2	20-250 mg	20-60 ml/min		preparatív elválasztás

Autamata injektor (autosampler):

- Fecskendő (gyengébb reprodukálhatóság)
- Mintahurok (kiváló reprodukálhatóság)
- A mintabemérő hurokból a minta veszteség nélkül jut a nagynyomású folyadékáramlásba.
- Mintatérfogat: 5-500 μl .
- Tű és a csövek tisztítása a keresztzennyezés kizárása miatt.

Detektorok:

Legyen univerzális, nagy érzékenységű.

Minta jellege meghatározó

Leggyakoribb detektortípusok:

- UV-VIS spektrofotometriás
- Fluoreszcenciás
- Törésmutató
- Elektrokémiai: amperometriás, voltometriás
- Vezetőképességi
- On-line csatolt szerkezetvizsgáló műszerek:
 - tömegspektrométer (MS),
 - FT-IR

HPLC detektorok teljesítőképessége

HPLC Detector	Commercially Available	Mass LOD (commercial detectors)*	Mass LOD (state of the art)†
Absorbance	Yes‡	100 pg–1 ng	1 pg
Fluorescence	Yes‡	1–10 pg	10 fg
Electrochemical	Yes‡	10 pg–1 ng	100 fg
Refractive index	Yes	100 ng–1 µg	10 ng
Conductivity	Yes	500 pg–1 ng	500 ng
Mass spectrometry	Yes	100 pg–1 ng	1 pg
FTIR	Yes	1 µg	100 ng
Light scattering	Yes	10 µg	500 ng

Source: From E. S. Yeung and R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 1238. With permission. Copyright American Chemical Society.

*Mass LOD (limit of detection) is calculated for injected mass that yields a signal equal to five times the standard deviation of the noise, using a molar mass of 200 g/mol, 10 µL injected for conventional or 1 µL injected for microbore HPLC.

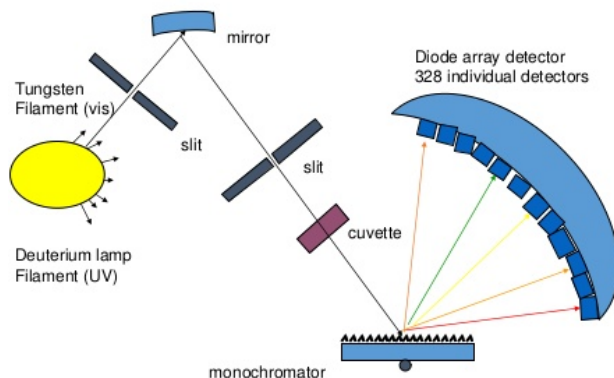
†Same definition as above, but the injected volume is generally smaller.

‡Commercially available for microbore HPLC also.

UV-VIS spektrofotometriás detektor, diódasoros detektor:

- UV tartomány: $\lambda = 200\text{-}400\text{ nm}$, VIS tartomány $\lambda = 400\text{-}800\text{ nm}$
- Mintán a teljes spektrumú fény áthalad, amelyet rács segítségével a minta után bontanak fel, minden hullámhossz érzékelését más-más dióda végzi.
- Spektrum felvétele.
- 1-5 rögzített hullámhosszon való detektálás.
- Lehetséges minden vegyület saját elnyelési maximumán való detektálása.
- Szerves kromofórok.

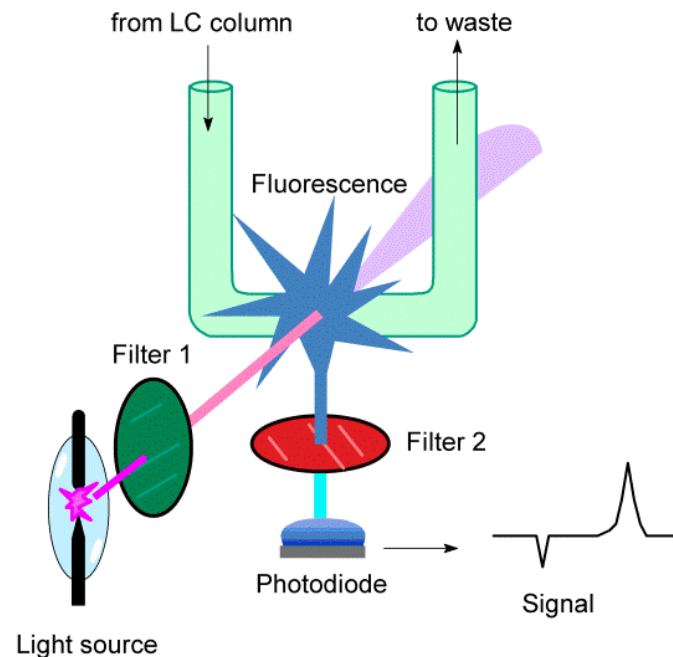
HPLC Detectors:



PRADEEP JAISWAL
M.SC.PART- 1
SEM-1
(2015-2016)
ROLL NO. 6

Fluoreszcens detektor:

- Vegyületet kiválasztott hullámhosszú fényel gerjesztik, és a gerjesztett vegyület által kibocsátott fényt detektálják (a kibocsátott fény hullámhossza nagyobb, mint gerjesztő fényé).
- Érzékenyebb az UV-VIS detektornál.
- Detektorcellát termosztálni kell.

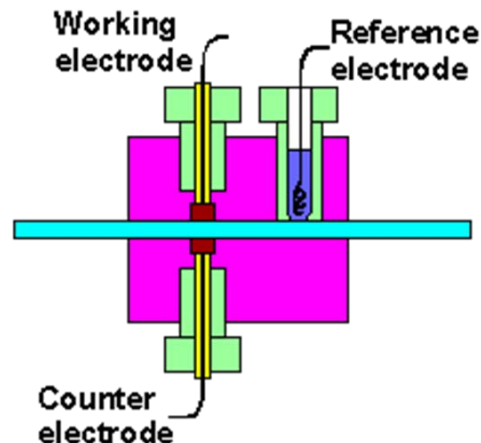


Elektrokémiai detektor, vezetőképességi detektor:

- Elektrodreakcióba vihető anyagok detektálása, oldata vezeti az elektromos áramot.
- Nagy érzékenység.
- Fordított fázisú rendszerrel (egyik eluens víz).

Amperometria: Állandó feszültség mellett folyamatosan mérik a cellán áthaladó áram erősségét.

Voltametria: Cellára adott feszültséget változtatják és közben mérik az áthaladó áramerősséget.



Vezetőképességi detektor:

- A cella két platinalamezkét tartalmaz, melyen váltakozóáramot vezetnek át.
- Áram intenzitása arányos az oldott anyag mennyiségével.
- Gradiens elúció esetén csak akkor lenne használható, ha az eluens vezetőképessége állandó marad a gradiens során, ezért gyakorlatban izokratikus elúcióknál alkalmazzák.

Kapcsolt technika: HPLC-MS, tömegspektrométerrel való kapcsolás:

- A kolonnáról lejövő mintakomponensek az ionforrásban ionizálódnak, a töltött ionok tömeg/töltés (m/z) szerinti szétválasztását az analizátor végzi, végül a detektor az analizátor felől érkező ionokat felfogja.
- Nagyfokú szelektivitás.
- Univerzális (a tömegmérés univerzális detektálást tesz lehetővé).
- Szerkezeti információk szolgáltatása.
- Nagy érzékenység.

