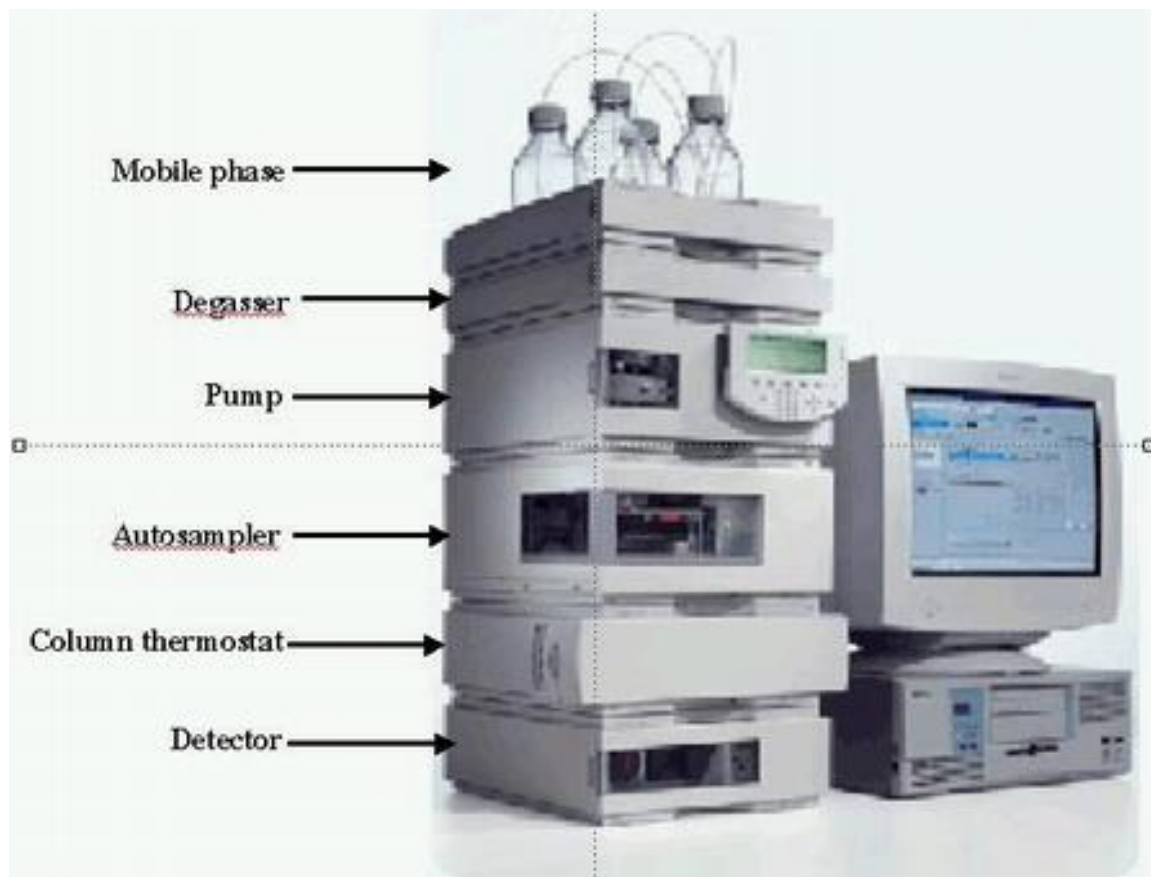


HPLC II

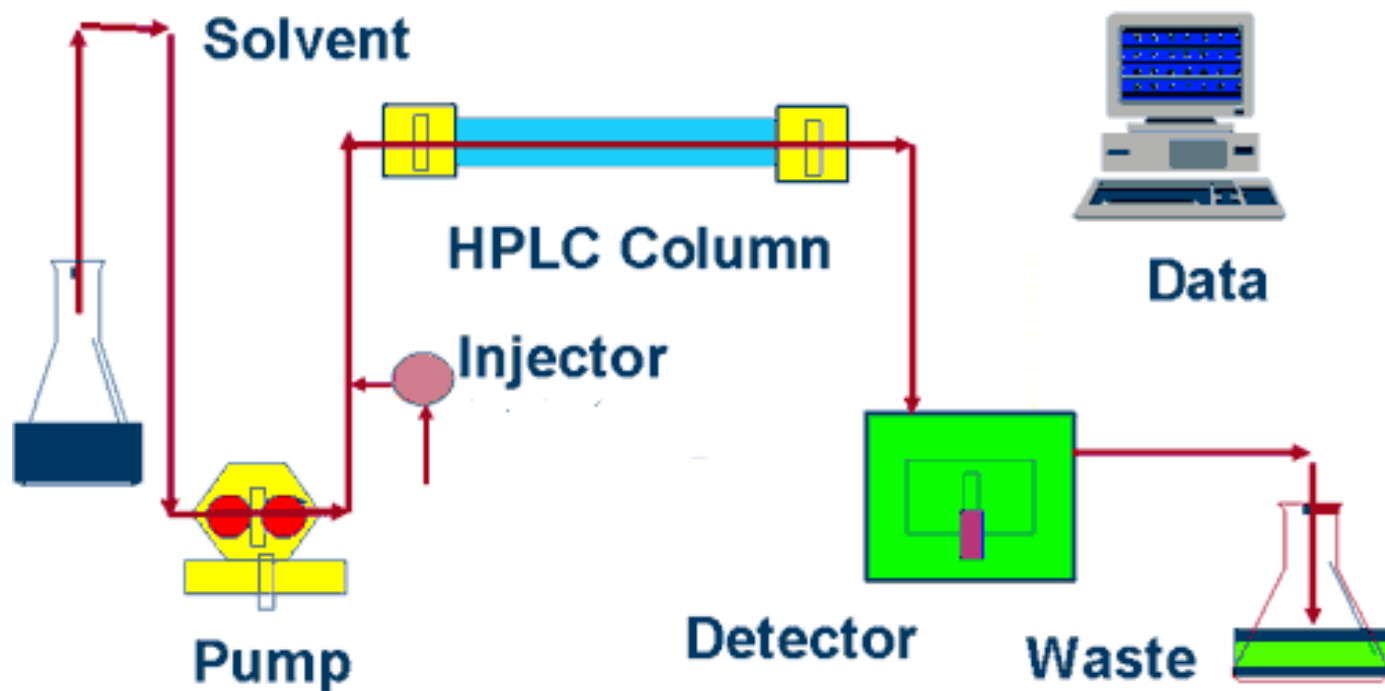
- A HPLC módszerfejlesztés alapjai -

Hámori Csaba

HPLC



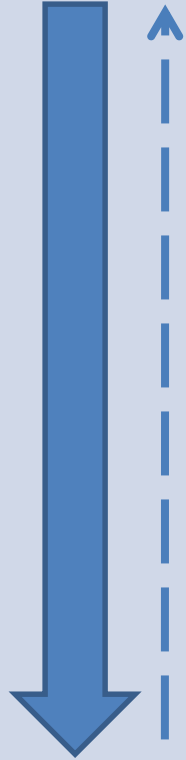
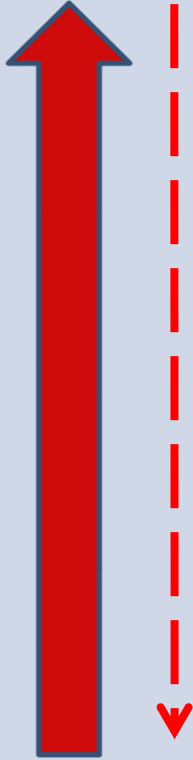
HPLC System



Alkalmazott oldószeresek

- RP-HPLC
 - Apoláros állófázis
 - Polárosabb mozgófázis
 - Víz/vizes puffer + szerves módosítók
- NP-HPLC
 - Poláros állófázis
 - Apolárosabb mozgófázis
 - Különböző polaritású oldószeresek keveréke
 - Víz nem alkalmazható
 - HILIC

Oldószererősség, szelektivitás

NP-HPLC		RP-HPLC
	Hexán	
	CCl4	
	Kloroform	
	Diklórmétán	
	THF	
	Dietil-éter	
	Etil-acetát	
	Acetonitril	
	2-PrOH	
	MeOH	
	Víz	

Oldószerekkel szemben támasztott követelmények

- Tisztaság
- Inertség
- Kompatibilitás
 - Oszlop
 - Detektor
 - Minta
- Viskozitás
- Elegyíthetőség
- Oldott oxigén tartalom
- Toxicitás
- Ár



Common HPLC Solvents

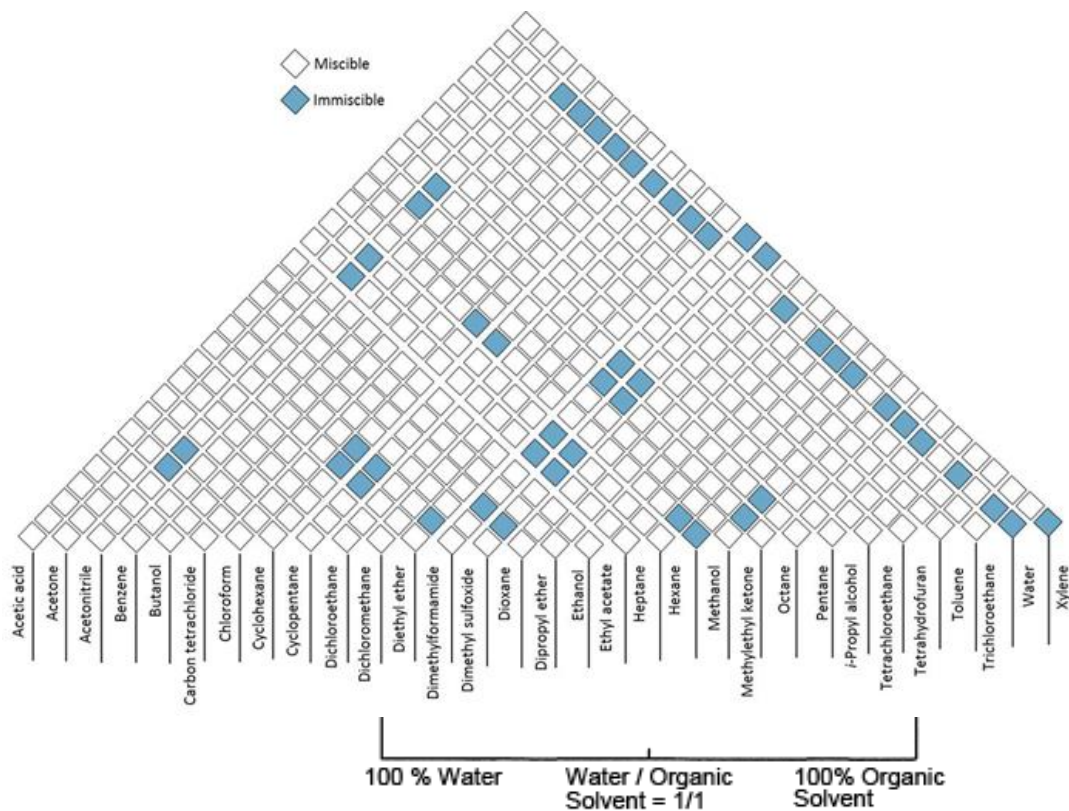
Solvent	UV cut off (nm)	Viscosity (mPa s)	B.P. (°C)	Polarity (P) ¹
Water	200	1.00	100	9.0
Methanol	205	0.6	65	6.6
Acetonitrile	190	0.37	82	6.2
THF	215	0.55	65	4.2
IPA	210	2.35	83	4.3
Hexane	195	0.313	69	0

THF "Tetrahydrofuran" (not compatible with PEEK)

IPA "Isopropyl Alcohol"

Oldószerekkel szemben támasztott követelmények

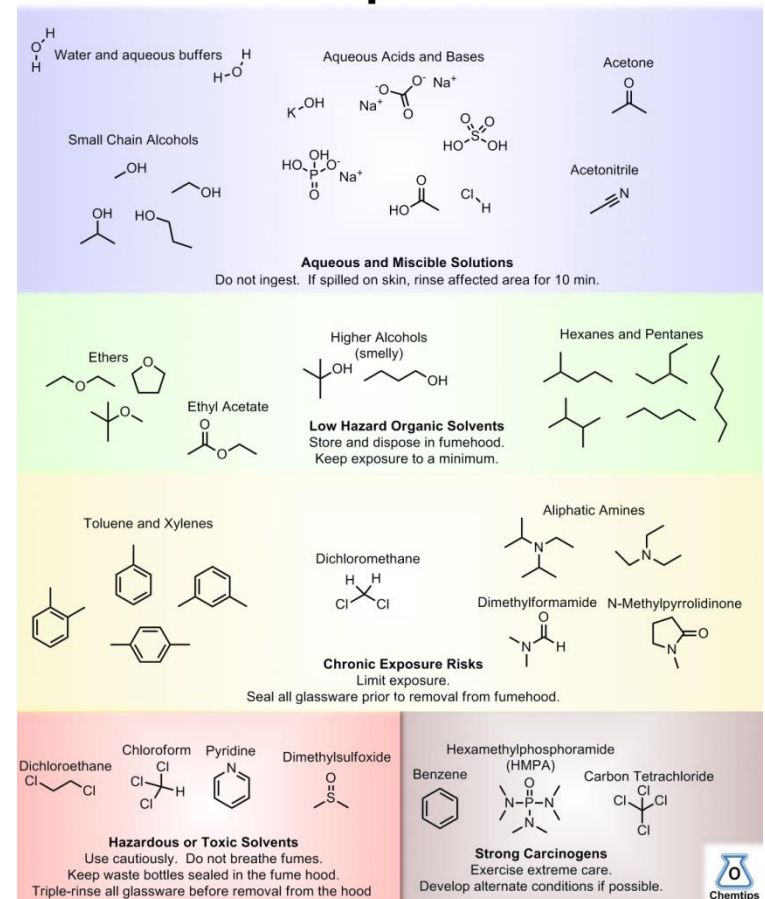
- Tisztaság
- Inertség
- Kompatibilitás
 - Oszlop
 - Detektor
 - Minta
- Elegyíthetőség
- Viskozitás
- Oldott oxigén tartalom
- Toxicitás
- Ár



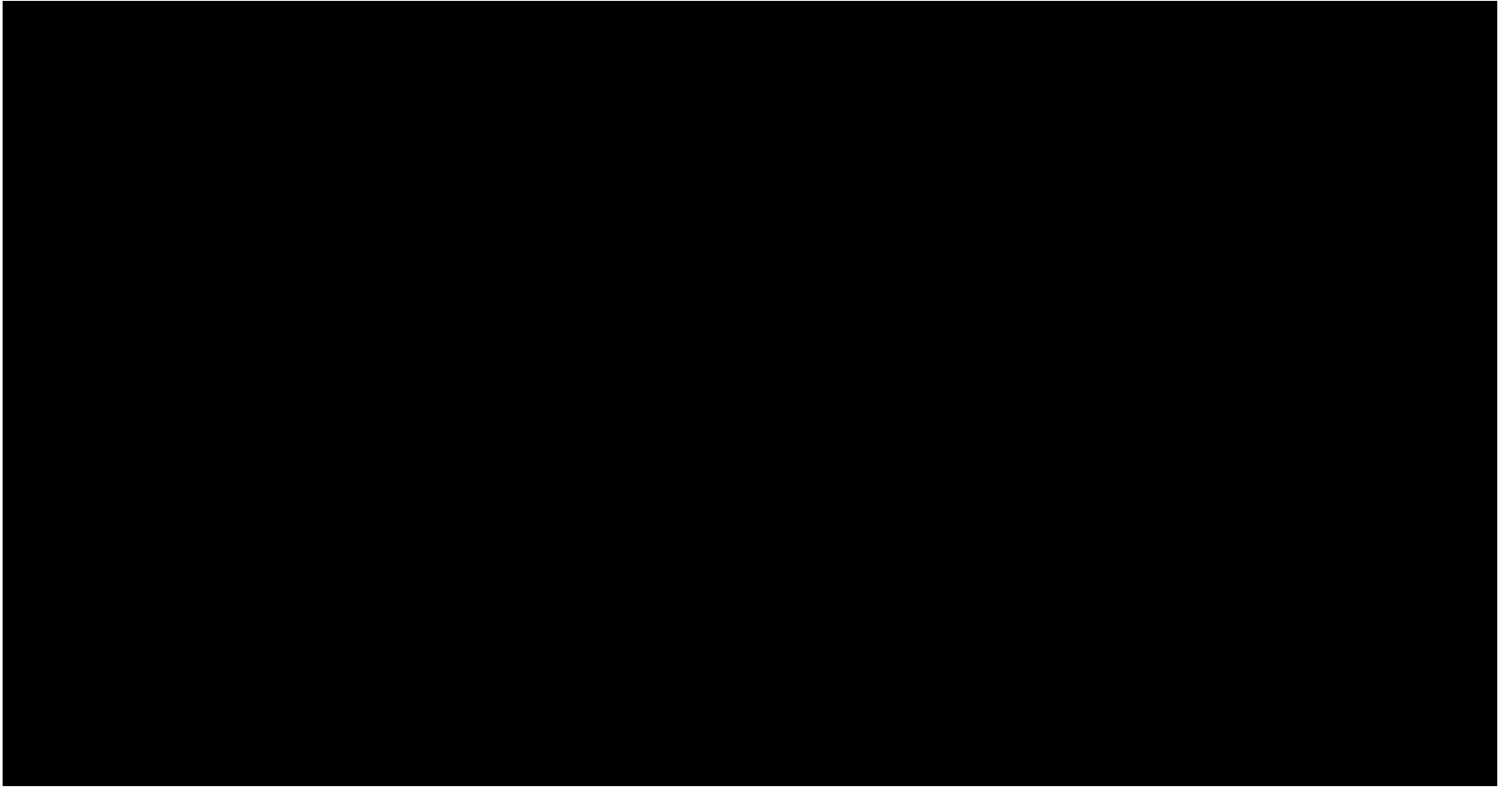
Oldószerekkel szemben támasztott követelmények

- Tisztaság
- Inertség
- Kompatibilitás
 - Oszlop
 - Detektor
 - Minta
- Elegyíthetőség
- Viskozitás
- Oldott oxigén tartalom
- Toxicitás
- Ár

Solvent Exposure Chart



Automata injektor működése

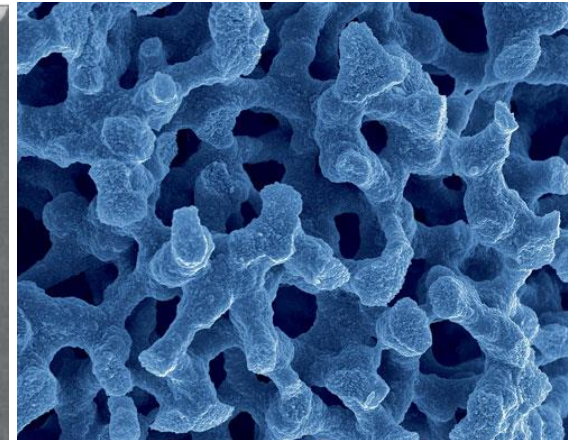
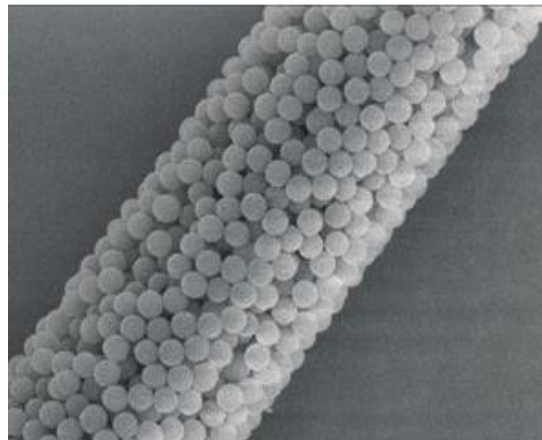


HPLC-ben használt állófázisok

- Töltetes oszlop
 - Szemcsék alakja
 - Szemcseméret
 - Szemcseméret eloszlás
 - Pórusméret, pórustérfogat
 - Hossz, átmérő
- Polimer oszlop
 - Szerves polimer
 - Monolit

Felhasználás típusa szerint:

- Analitikai
- Preparatív



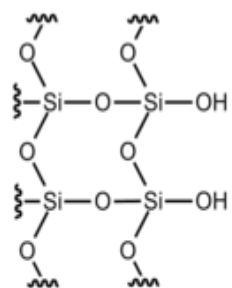
Állófázisok

- NP-HPLC

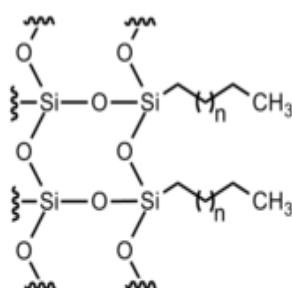
- Poláros csoportok
- Szilikagél (szilanol csoportok)
- Módosított szilikagél

- RP-HPLC

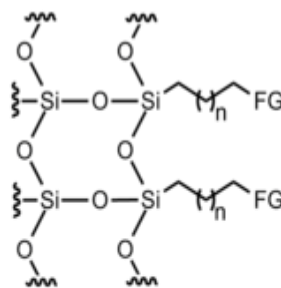
- Apoláros csoportok
- Módosított szilikagél



Normal phase silica

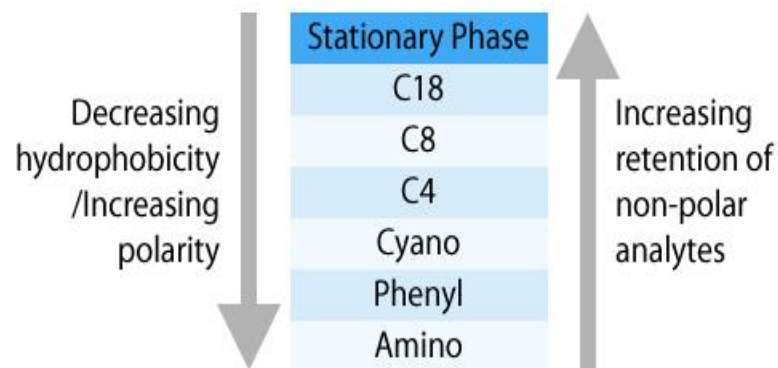


Reversed phase silica



Functionalized silica

FG = -NH₂
-CN



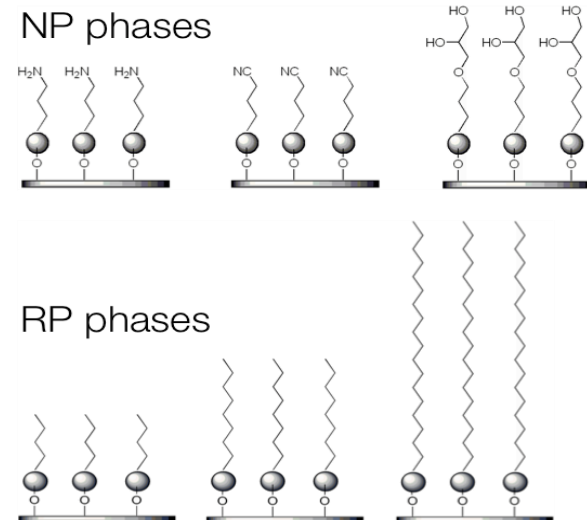
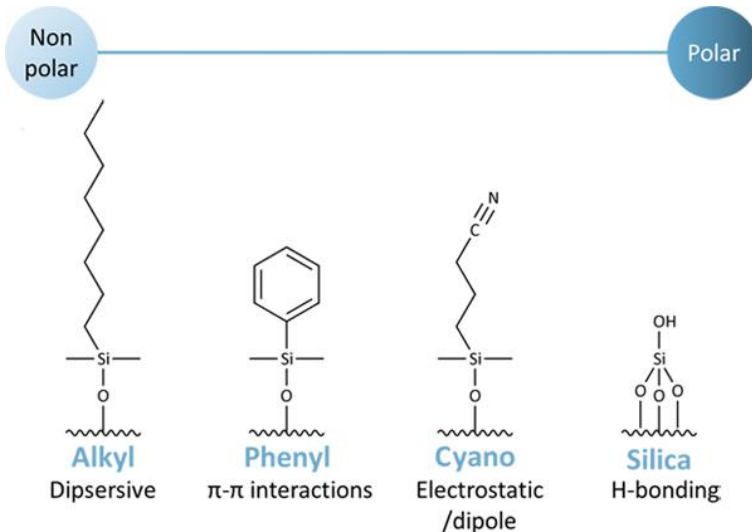
Állófázisok

- NP-HPLC

- Poláros csoportok
- Szilikagél
- Módosított szilikagél

- RP-HPLC

- Apoláros csoportok
- Módosított szilikagél



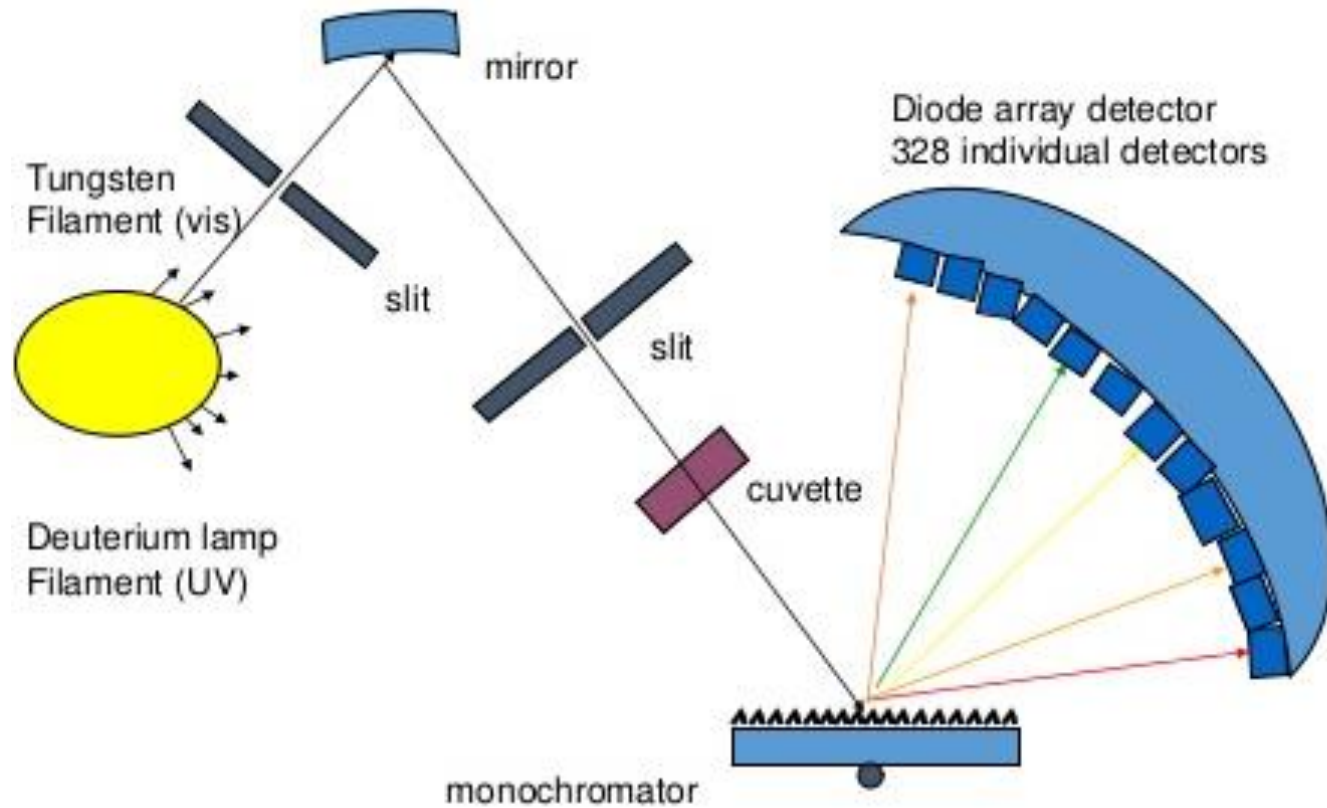
NP-HPLC vs. RP-HPLC

HPLC - Normal Phase HPLC vs Reverse Phase HPLC

Detektorok

Name	Advantage	Disadvantage
UV-Vis	Works w/all molecules	Non-specific; complex samples; absorption wavelength
DAD	Works for all wavelengths	High LOD
Fluorescence	Very specific; low LOD	Not everything fluoresces
IR	Works w/all molecules	Many solvents IR active
Refractive Index	Works w/nearly all molecules	Temperature sensitive; high LOD
Scattering	Uniform response; 5ng/25 μ L LOD	Non-specific; interference from solvent
Electrochemical	Commercially available	Non-specific; high LOD
Mass Spec	Low LOD; analyte identification	Ability to ionize analyte

DAD detektor



HPLC szimulátor

- Angol nyelvű ingyenes oktatóprogram
- Java keretprogramot igényel
- Sok szabadon kombinálható komponens
- Valós kromatográfiás összefüggések alapján
- Minden kromatográfiás paraméter beállítható
- Az eredmény rögtön látszik a kromatogramon

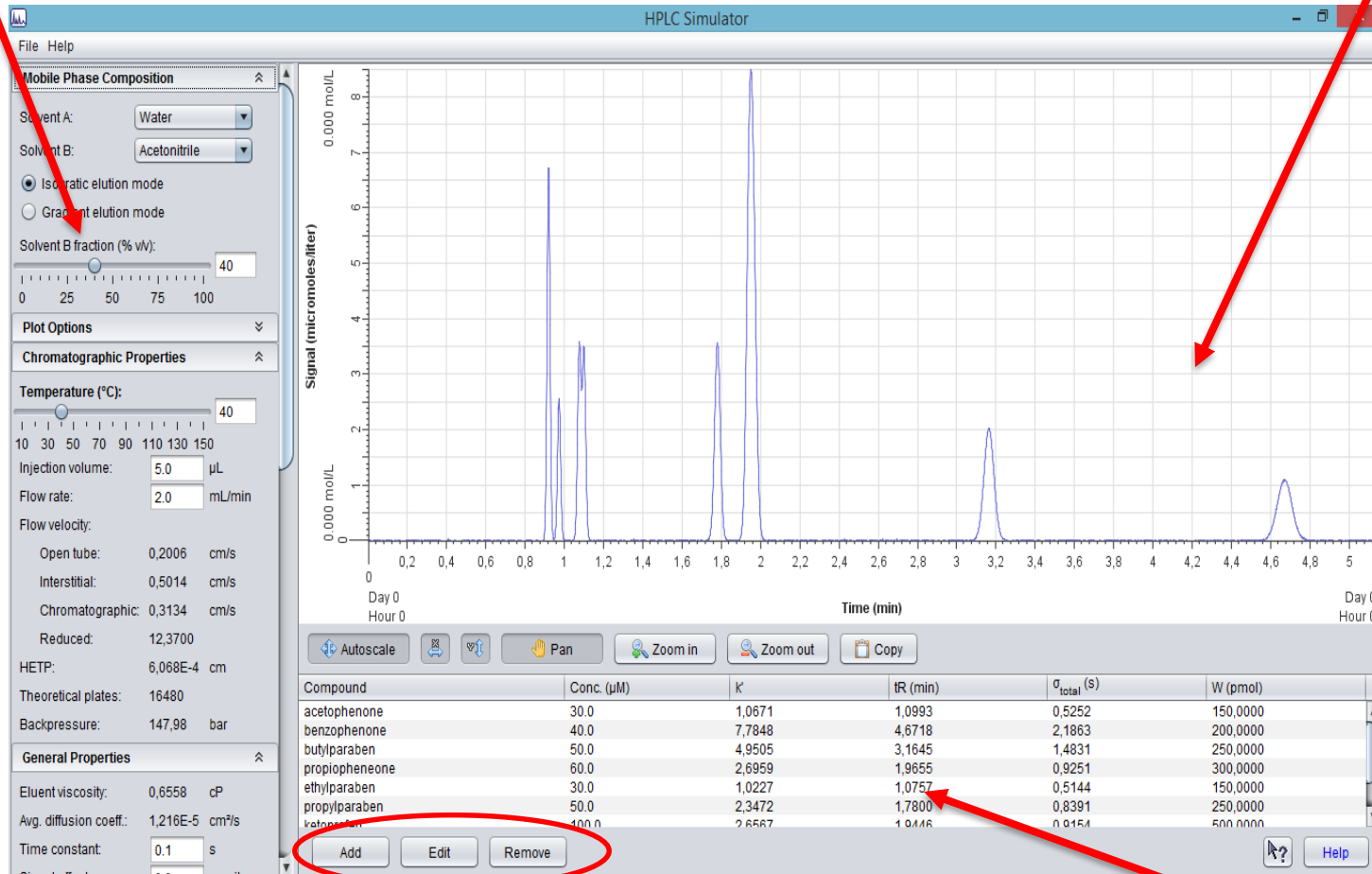
- Telepítő fájl és telepítési segédlet a honlapról letölthető!

www.hplcsimulator.org

Mérési
paraméterek

HPLC szimulátor

Kromatogram

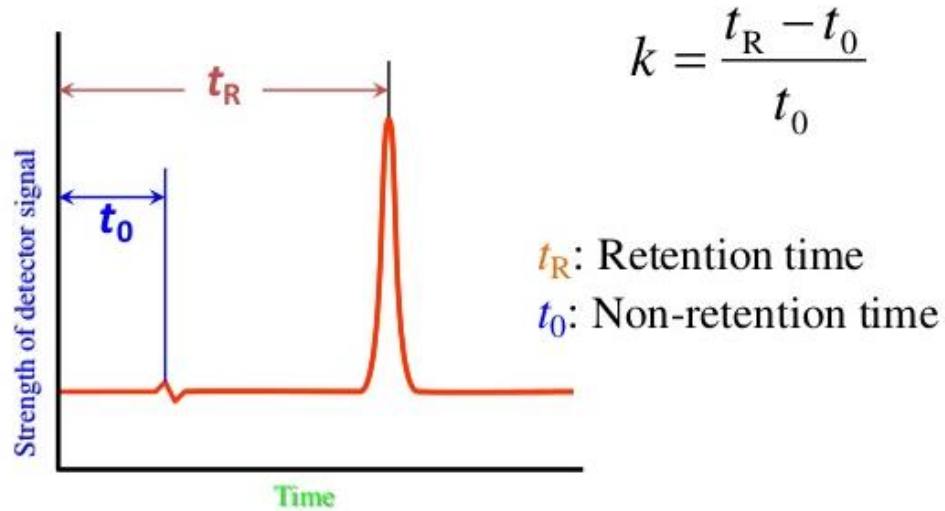


Elválasztandó komponensek + adatok

A gyakorlat során változtatható és számítandó paraméterek

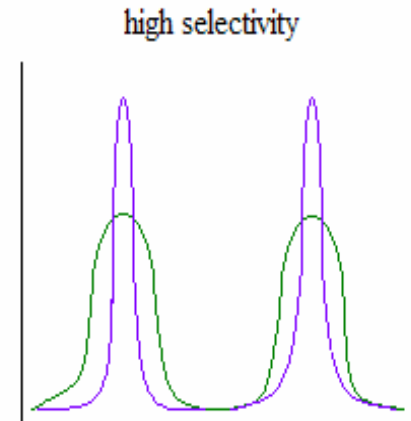
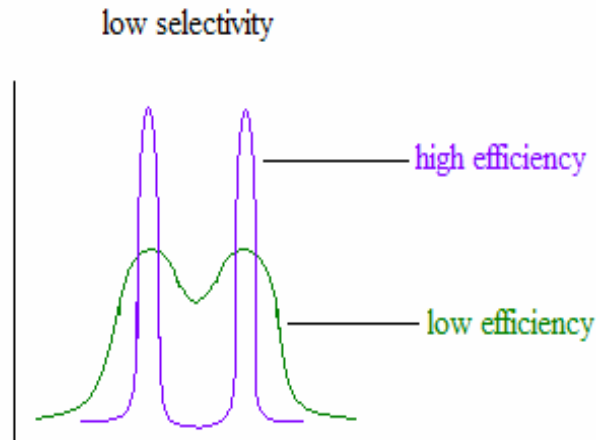
- **Oszlop paraméterek**
 - **Hossz** (length)
 - **Átmérő**
(internal diameter)
 - **Pórusméret**
(particle size)
- **Eluens összetétel**
(Solvent fractions %)
- **Áramlási sebesség**
(flow rate)
- **Injektált térfogat**
(injection volume)
- **Izokratikus/gradiens elúció**
- **Hőmérséklet** (temperature)
- **Elméleti tányérszám**
(theoretical plates)
- **Elméleti tányérmagasság**
(HETP)
- **Retenció idő** (t_R)
- **Holtidő**
(void time)
- **Kapacitási faktor** (k')
- **Nyomás**
(backpressure)
- **Felbontás** (R)
- **Szelektivitás** (α)
- **Csúcsszélesség** (σ)

Retention Factor, k



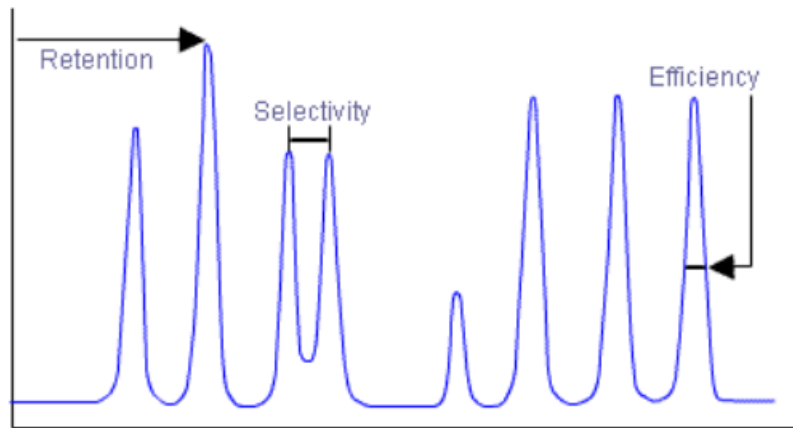
$$R_s = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{(w_{b,1} + w_{b,2})}$$

$$\alpha = \frac{n_s}{n_m} = \frac{k_2}{k_1}$$

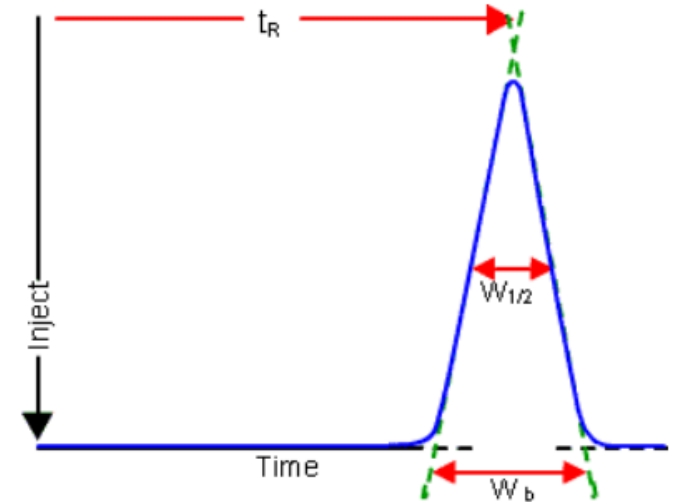


$$R_S = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{Efficiency}} \times \underbrace{\frac{\alpha-1}{\alpha}}_{\text{Selectivity}} \times \underbrace{\frac{k}{1+k}}_{\text{Retention}}$$

The Fundamental Resolution Equation



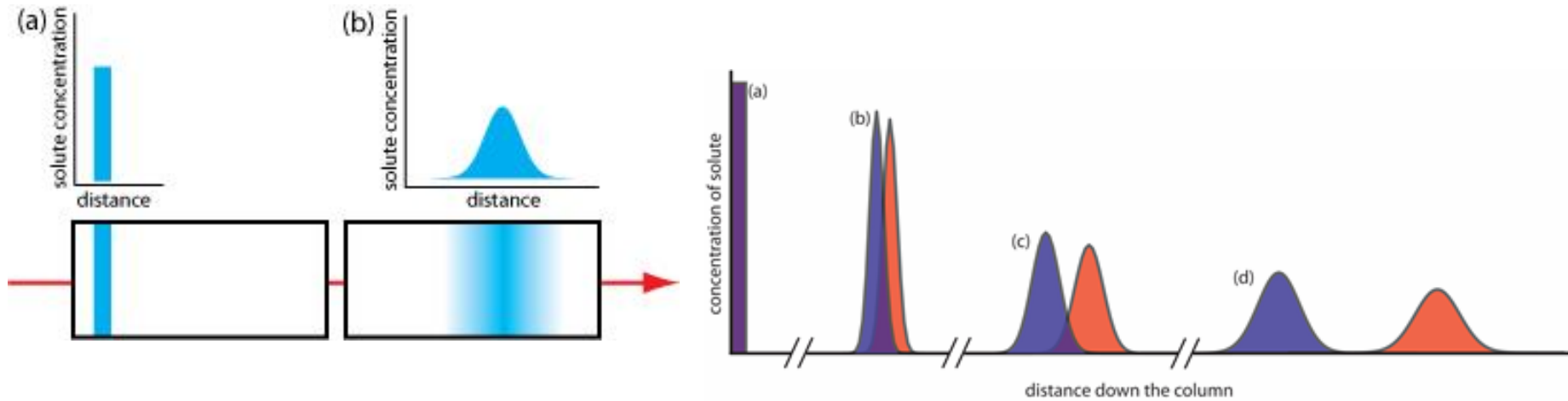
The Fundamental Resolution Equation and contributing parameters



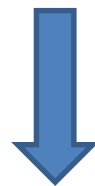
Determination of Efficiency (N)

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Csúcsszélesedés



Jellemzésére vezették be az elméleti tényezőt (N)

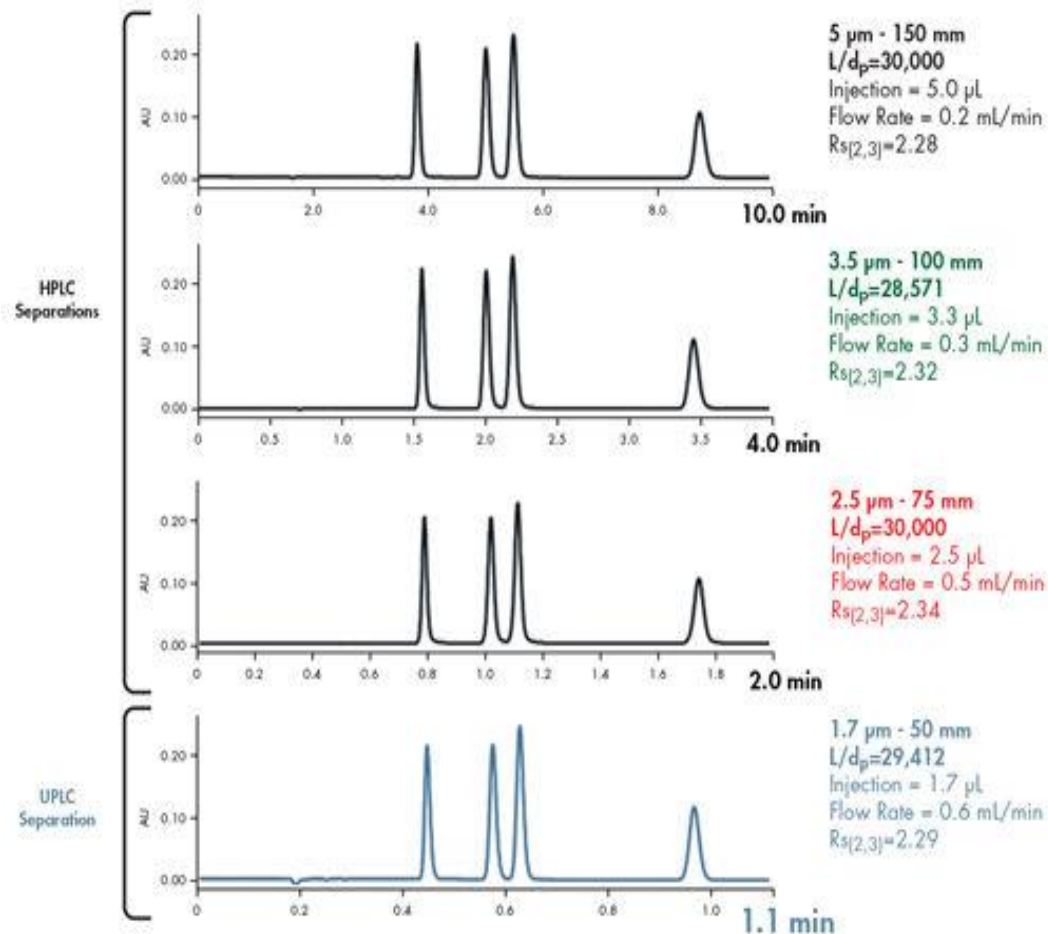


Adott rendszerre és komponensre vonatkozik

Az elméleti tányérszám (N) változásának hatása

- Hatékonyság
- Csúcsszélesedést leíró paraméter
- Elméleti tányérmagasság (H)
- Változtatása
 - Oszlop hossz
 - Töltet szemcseátmérő
 - Áramlási sebesség
 - Injektált térfogat
 - Hőmérséklet

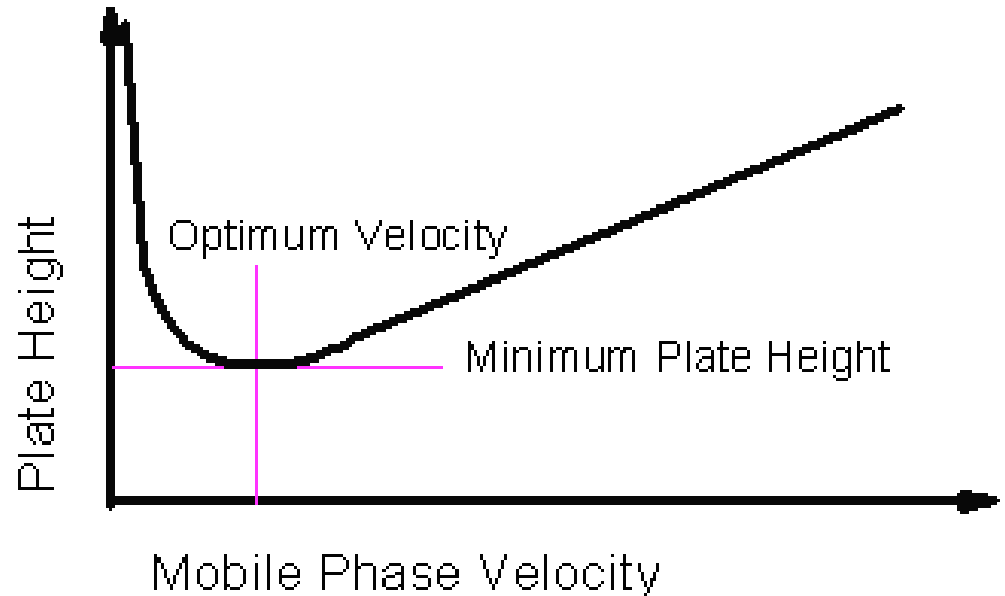
$$H = \frac{L}{N}$$



Az elméleti tányérszám (N) változásának hatása

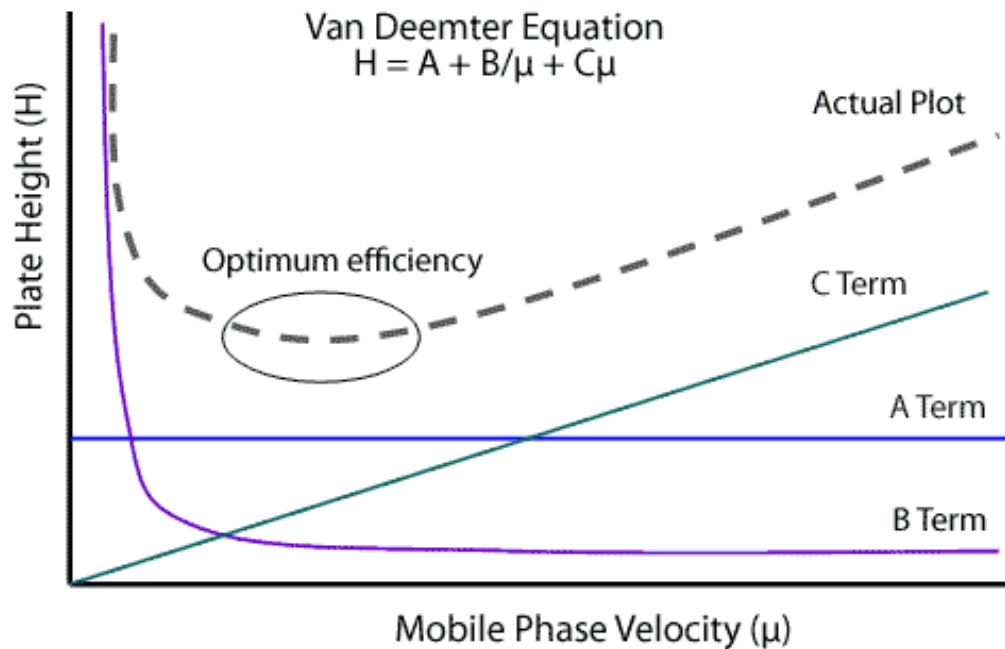
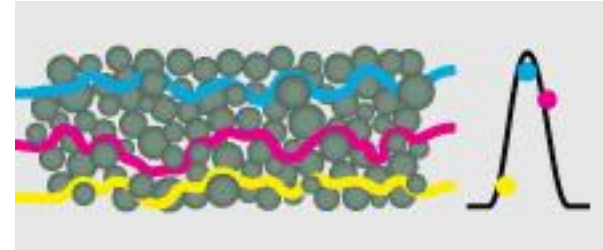
- Hatékonyság
- Csúcshéledést leíró paraméter
- Elméleti tányérmagasság (H)
- Változtatása
 - Oszlop hossz
 - Töltet szemcseátmérő
 - Áramlási sebesség
 - Injektált térfogat
 - Hőmérséklet

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



A kromatográfia sebességi elmélete

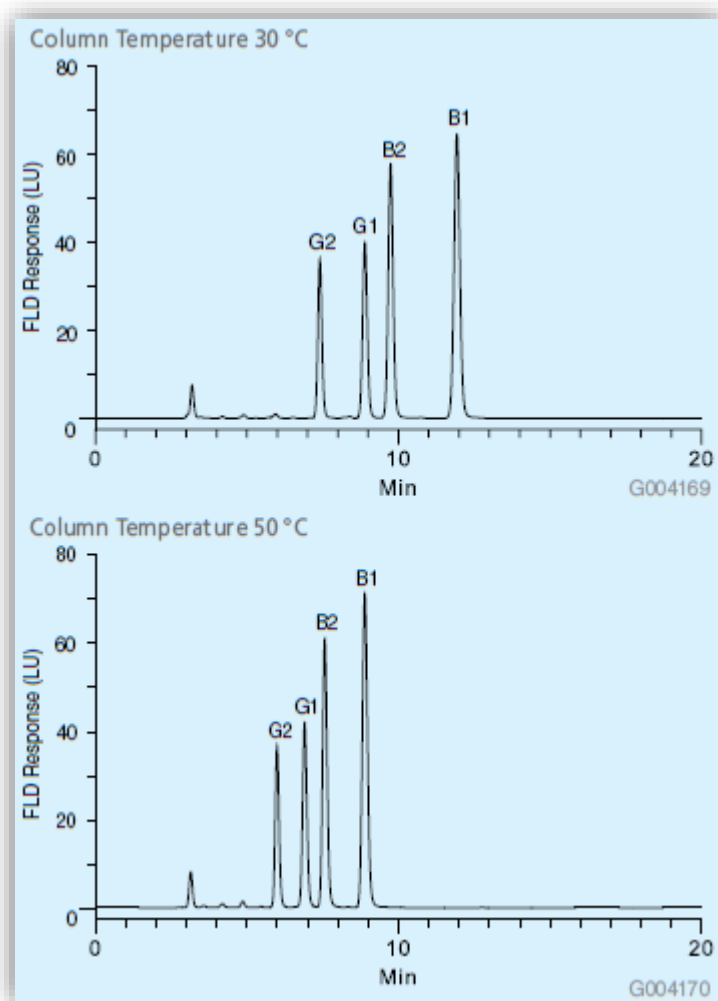
- Van Deemter összefüggés
 - A: Eddy diffúzió
 - B: hosszirányú diffúzió
 - C: anyagátadási ellenállás



Az elméleti tányérszám (N) változásának hatása

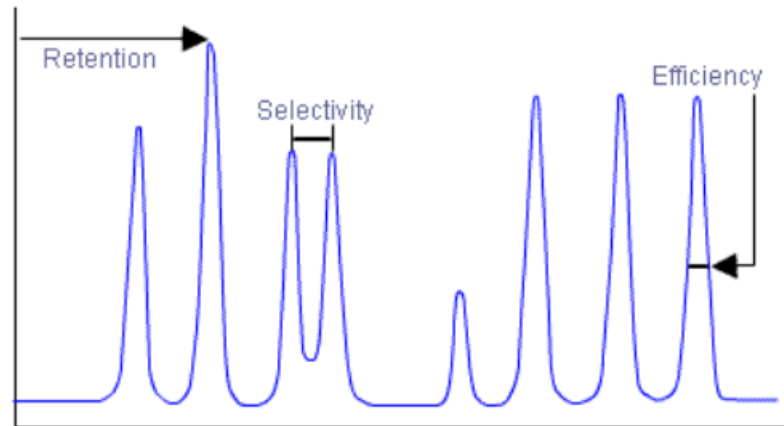
- Hatékonyság
- Csúcsszélesedést leíró paraméter
- Elméleti tányérmagasság (H)
- Változtatása
 - Oszlop hossz
 - Töltet szemcseátmérő
 - Áramlási sebesség
 - Injektált térfogat
 - Hőmérséklet

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



$$R_S = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{Efficiency}} \times \underbrace{\frac{\alpha-1}{\alpha}}_{\text{Selectivity}} \times \underbrace{\frac{k}{1+k}}_{\text{Retention}}$$

The Fundamental Resolution Equation



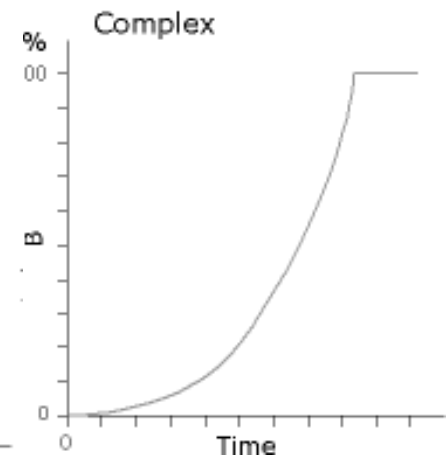
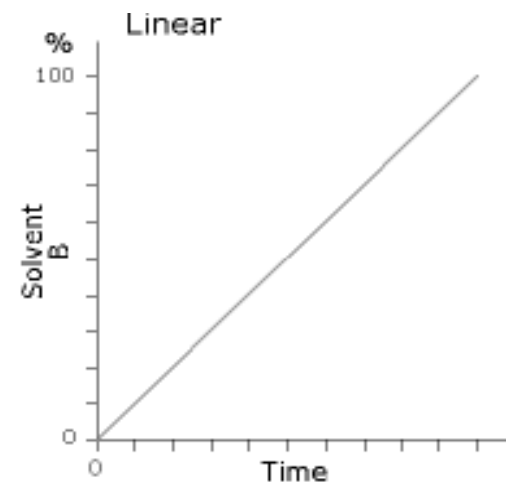
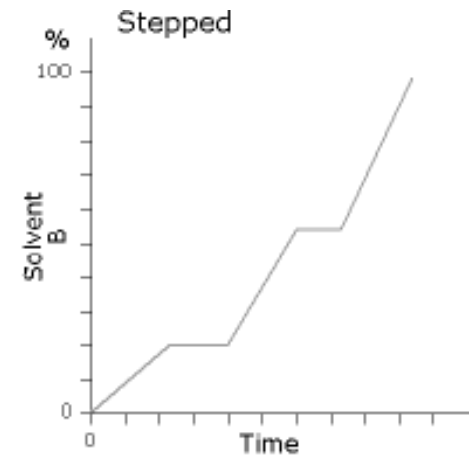
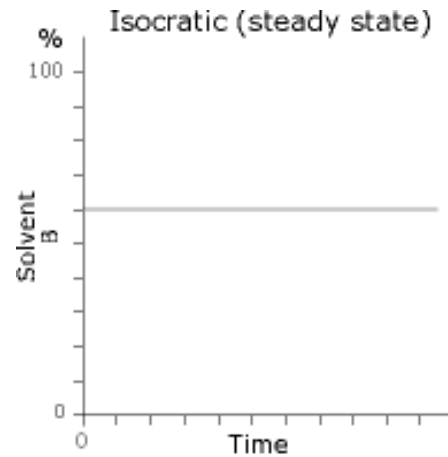
The Fundamental Resolution Equation and contributing parameters

Állófázis hatás

Mozgófázis hatás

Izokratikus/gradiens elúció

- Hasonló/eltérő komponensek
- Erősödő eluens
- Különböző elúciós profilok
- Ekvilibrálási idő



Gyakorlati feladat

- Polaritási sor felállítása
- Kiindulási paraméterek kiszámítása
- Fő paraméterek hatásának vizsgálata
 - Eluens összetétel vizsgálata
 - Áramlási sebesség vizsgálata
 - Oszlop paraméterek változtatásának a hatása
 - Hőmérséklet hatása
 - Gradiens elúció optimalizálása
- Összefoglaló esszé

Jegyzőkönyvbe: adatok, képek, magyarázatok és esszé!

A gyakorlati feladatnál elérendő célértékek

$$1 < k < 10 \quad (2 < k < 5)$$

$$R \geq 1,5$$

($R < 1,5$ nem tökéletes az elválasztás)

$$\alpha > 1,05$$

($\alpha = 1$ nincs elválás)

$$N > 1000$$

Jegyzőkönyv

- Egyéni jegyzőkönyvek (A-W csoport)
 - Mindenki a Neptun kódja alapján tudja meg a csoportot:
 - **Neptun kód 1. karaktere (pl.: A3PO1I)**
- A sablonok letölthetőek a gyakorlat honlapjáról (pdf/xls)
- **Jegyzőkönyv leadási határidő: október 12. 12.00**
- **Kinyomtatva, 4. emeleti polc**