

FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA

PH-KONTROLL

Krusper László
DEBRECENI EGYETEM

Szilikagél szerkezete

2

Az ábrák több, részben szerzői jogokkal védett műből, oktatási célra lettek kivéve. Továbbmásolásuk, terjesztésük nem megengedett.

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Ajánlott irodalom

3

Fekete Jenő:

Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata

Kremmer Tibor - Torkos Kornél:

Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata

Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W Dolan:

Introduction to Modern Liquid Chromatography Third Edition

Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs:

A folyadékkromatográfia fejlesztési irányjai

Gyors folyadékkromatográfia, HILIC 2014, Merck Kft

www.sepscience.com , www.chromatographyonline.com/john-w-dolan

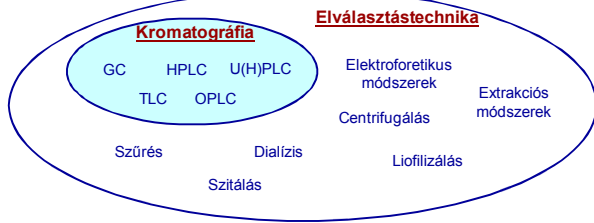
Cégek honlapjai

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Elválasztástechnika - Kromatográfia

4

Olyan módszerek, ill. folyamatok gyűjtőneve, melyekben a komponenseknek egy **álló fázis** és egy azon keresztül áramló **mozgó fázis közötti megoszlása** következtében megy végbe a komponensek térbeli elkülönülése (**szétválása**).



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

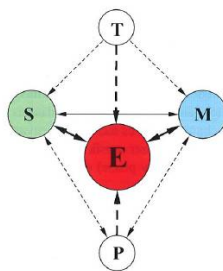
5

A folyadékkromatográfiai rendszerek „lelke”, legfontosabb egysége a kromatográfiai oszlop, ahol a tényleges elválasztás történik.

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Bűvös háromszög

6



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Fázisviszonyok

7

Állófázis	Mozgófázis	Enevezés
polárisabb	apolárisabb	normálfázisú folyadékkromatográfia (NP-HPLC, NPLC)
apolárisabb	polárisabb	fordítottfázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC, RPLC)
apolárisabb	polárisabb + hidrofób ion	fordítottfázisú ionpár- folyadékkromatográfia (RP-IP-HPLC, RP/PLC)
ionos	puffer vagy ion tartalmú víz és szerves oldószer	ioncserés nagyhatékonyságú kromatográfia (IEC, IE-PLC)
polárisabb	kevésbé poláris	hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (HILIC)
apoláris, nagy porus átmérorjú	szerves oldószer	nem vizes meretkizáras kromatográfia (SEC), rejtőbű nevén gel permeációs kromatográfia (GPC)
poláris, nagy porus átmérorjú	puffer	vizes meretkizáras kromatográfia (SEC), rejtőbű nevén gelszűrés
C4-C6 RP	Só (1-4 mol/l)	HIC hidrofób kölcsönhatási LC

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Vizsgálható vegyületek

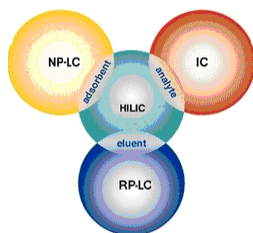
8

Módszer	Vegyület jellege	Kizáró ok
NP-HPLC	közepesen poláris	ionos jelleg, nincs poláris csoport a vegyületben, nagy polaritású anyagok
RP-HPLC	apoláris	ionos jelleg kis apoláris részzel, nagy polaritás
RP-IP-HPLC	ionos	nem ionos vagy nem ionizálható
IE-HPLC	ionos	nem ionos vagy nem ionizálható
HILIC	nagy polaritású, ionos	apoláris, és ionos állapotba nem hozható
nem vizes SEC	apoláris polimer	poláris polimer ionos vagy ionizálható csoporttal
vizes SEC	biopolimerek	apoláris polimerek
HIC	biopolimerek	kis molekula

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Folyadékkromatográfia felosztása

9



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Az elválasztás alapegyenlete

10

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

Kinetika
(zónaszélesedés)

Termodinamikai
tag

Visszatartásra
jellemző tag

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Visszatartási tényező (kapacitás/retenciós faktor, k')

11

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{D_2}{D_1}$$

- Megadja, hogy egy vizsgált komponens az elválasztás során mennyi időt tartózkodott az állófázison a mozgófázisban töltött időhöz képest
- A kvázi-egyensúly megoszlási hányadosa, ha a koncentrációkat mólban adjuk meg
- Értéke **1 – 10** (esetenként **2 – 5**) között legyen

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szelektivitás

12

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \alpha = \frac{n_{s2}}{n_{s1}} = \frac{K_2}{K_1}$$

ahol

K_1 és K_2 a termodinamikai megoszlási hányadosok

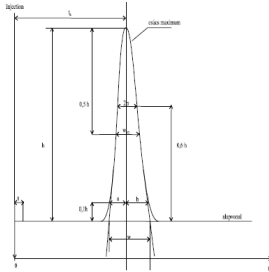
$\alpha \geq 1,05$ legyen

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Kinetikai hatékonyság

13

A Gauss görbe adatai



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Kinetikai hatékonyság

14

Elméleti tányérszám - zónaszélesedés

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

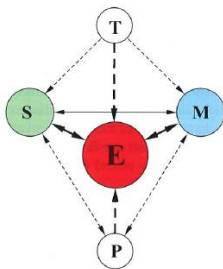
$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$N \geq 2000$ legyen

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Bűvös háromszög

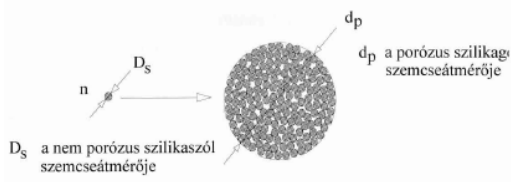
15



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Porózus szilikagél

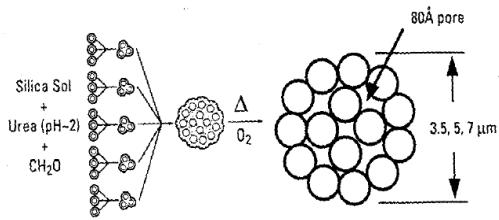
16



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Porózus szilikagél

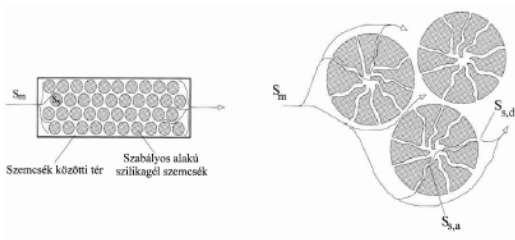
17



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Porózus szilikagél

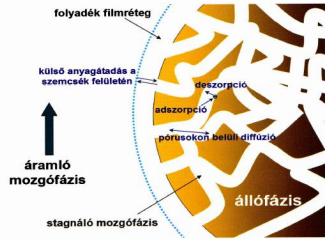
18



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Porózus szilikagél

19

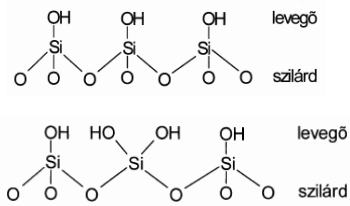


16. ábra: Az anyagátadási folyamatok szemléletes vázlata.

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél szerkezete

20

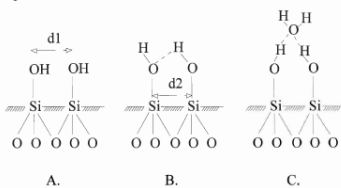


Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél szerkezete

21

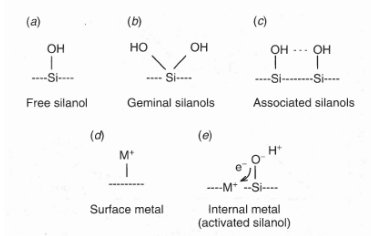
- A: izolált
- B: H-hidas
- C: dezaktivált



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél szerkezete

22



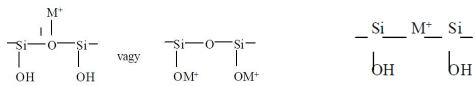
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél fémszennyezők

23

Felületi fémszennyezők

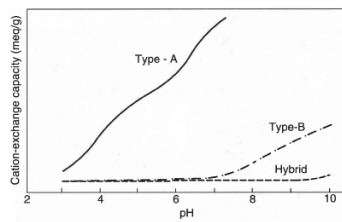
Vázba beépült fémszennyezők



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél fémszennyezés

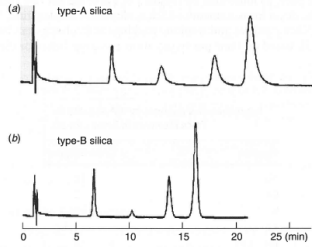
24



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél fémszennyezés

25



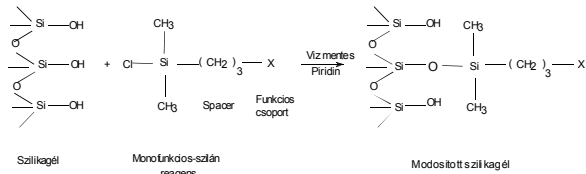
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

26

Poláris módosítás

X: -NH₂, -CN, -O-CH(OH)-CH₂(OH), -NO₂ ...stb.

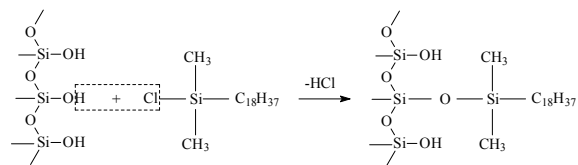


Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

27

Apoláris módosítás (monomer)

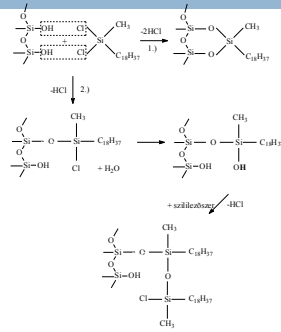


Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

28

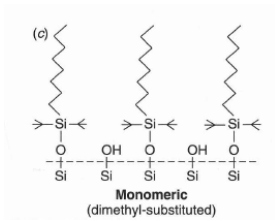
Átmeneti és/vagy polimer módosítás



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

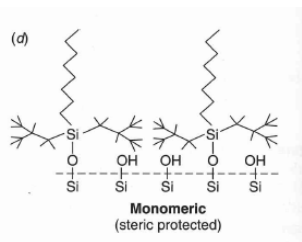
29



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

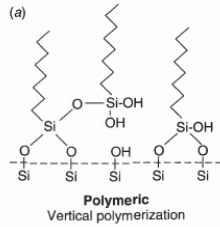
30



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

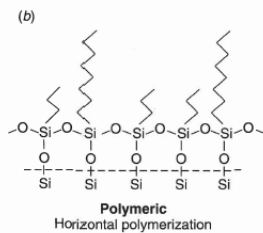
31



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilikagél felületi módosítása

32



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Utószilanizálás „end-capping”

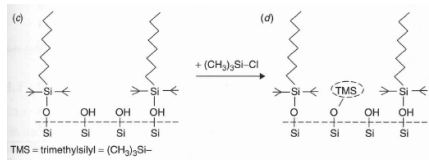
33

A módosított szilikagél előállítása során kb. 40-60 %-a a szilanol csoportoknak reagálatlan marad, így energetikailag inhomogén állófázis alakul ki. A felületen két eltérő tulajdonságú rész van jelen, az alkillánc, amely gyenge diszperziós kölcsönhatásra, és a szilanol csoport, amely erős H-hidas kölcsönhatás kialakítására képes, emellett a szabad szilanol csoport ionizációra is képes, így ioncserés kölcsönhatás is létrejöhethet.

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Endcapping

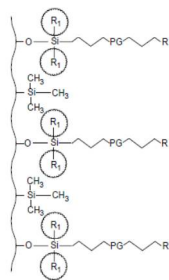
34



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Embedded polar group

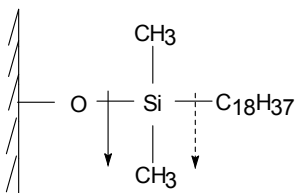
35



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Hidrolízis

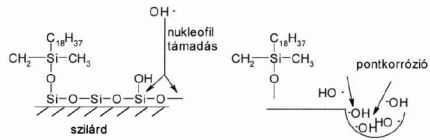
36



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Szilika váz oldódása

37



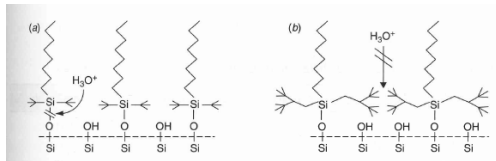
8.2. ábra

A szilikagél oldódása és az eredményeképp létrejött, jól támadható szilanol-csoportok.

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Alacsony (és magas) pH-hoz

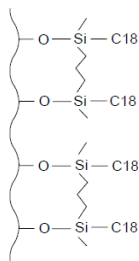
38



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Alacsony (és magas) pH-hoz

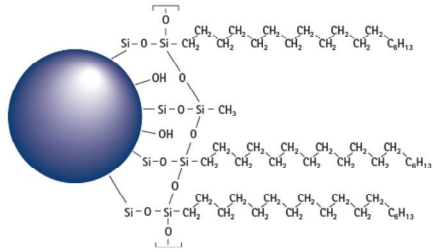
39



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Alacsony és magas pH-hoz

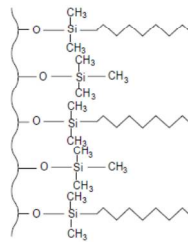
40



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Duble endcapped

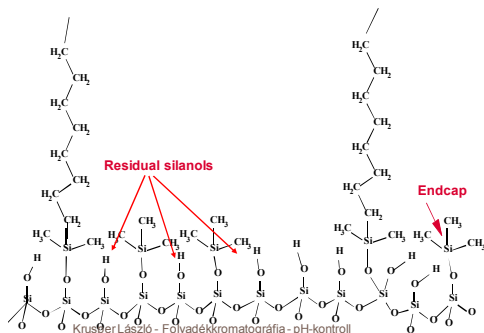
41



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

A felület endcapping után

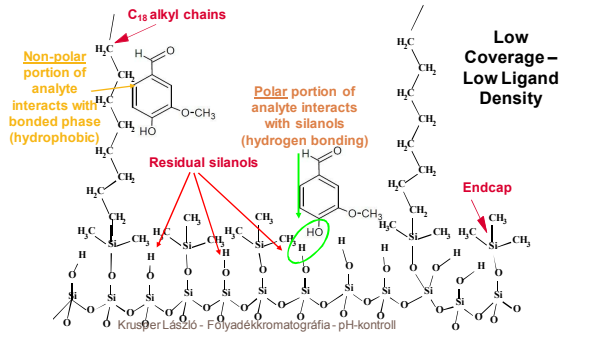
42



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

És jön egy molekula

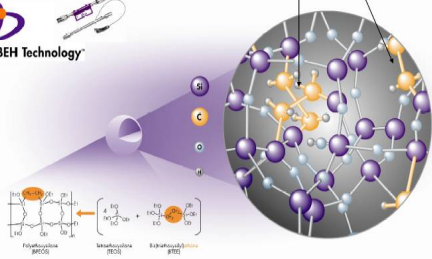
43



U.S. Patent No. 6,686,035 B2



Bridged Ethanes within a silica matrix



44

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

■ BEH C1

- Trifunctionally - bonded C18
- Widest pH range for maximum selectivity [pH 1 - 12]
- Superior peak shape and efficiency in buffered mobile phases



■ BEH C8

- Trifunctionally - bonded C8
- Wide pH range [pH 1-12]
- Lower hydrophobicity than C18



■ BEH Shield RP18

- Monofunctionally bonded, embedded carbamate phase [pH 2 - 11]
- Alternate selectivity compared to alkyl chain columns



■ BEH Phenyl

- Trifunctionally - bonded C6-Phenyl
- Wide pH range [1-12]
- Complementary selectivity for aromatic species



45

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

- **HSS T**
 - Low ligand density, trifunctionally - bonded C₁₈ [pH 2 – 8]
 - Aqueous - compatible C₁₈ chemistry with long column lifetimes
 - Recommended for maximum polar compound retention RPLC
- **HSS C₁₈**
 - High coverage, trifunctionally - bonded C₁₈ [pH 1 – 8]
 - Universal, high performance C₁₈
 - Proprietary endcapping technique for superior peak shape and lifetime
- **HSS C₁₈ SB [Selectivity for Bases]**
 - Low ligand density, trifunctionally - bonded C₁₈ [pH 2 – 8]
 - Non-endcapped C₁₈ designed for silanophilic interactions and alternate selectivity with exceptional peak shape for bases

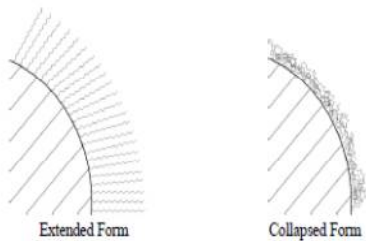
46

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

- **ACQUITY UPLC CSH C₁₈**
 - Mid/high coverage trifunctional C₁₈
 - End capped
 - High pH stable
 - Superior peak shape for bases
 - Lower retentivity for bases (vs. BEH C₁₈)
 - pH range: 1 – 11
- **ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl**
 - Most 'different' selectivity (vs. CSH C₁₈ & Phenyl-Hexyl)
 - Excellent reproducibility
 - Not end capped
 - Superior peak shape and lower retentivity for bases
 - pH range: 1 – 8
- **ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl**
 - Trifunctional phenylhexyl
 - End capped
 - High pH stable
 - Superior peak shape for bases
 - Different selectivity (vs. BEH Phenyl)
 - pH range: 1 – 11

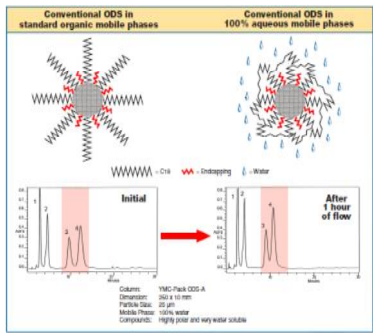
47

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

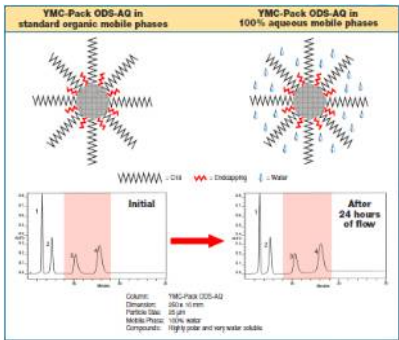


48

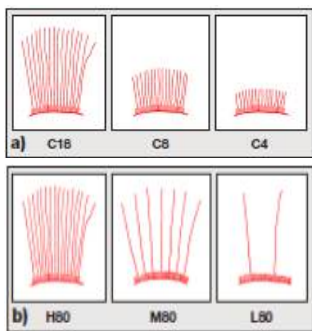
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll



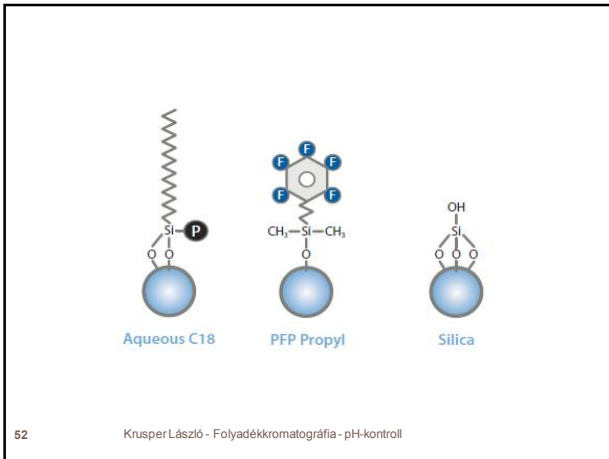
49 Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

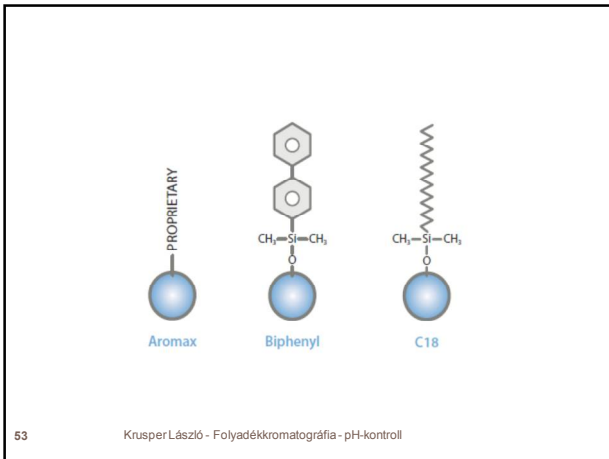


50 Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll



51 Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll



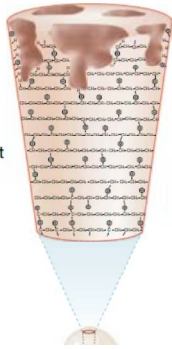


Silica Particle
 Silica particles possess excellent mechanical strength and efficiencies, but are limited in pH stability, (2-7).

54 Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Polymer Particle

Polymer particles possess excellent pH stability (1-14) but are less mechanically strong and less efficient as compared to silica particles.

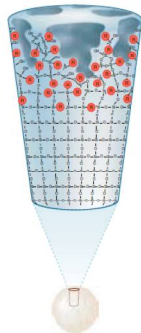


55

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

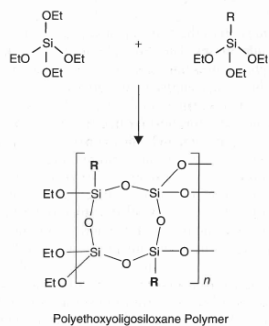
Gemini® with TWIN™ Technology

Introduced in 2004, Gemini was the first media to use TWIN™ (Two-In-One) Technology, which provided high efficiencies and mechanical strength with the extended pH stability from 1-12. This was done by grafting organo-silica layers onto a pure silica core.



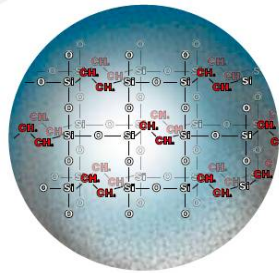
56

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll



57

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll



58

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Pufferek használata

59

Mikor használunk puffert?

- Felületi szilanolszoprtok egységesítése
- A vizsgálándó komponensek egységesítése

**Akkor és csak akkor használunk puffert,
ha elengedhetetlenül szükséges!**

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

A vegyületek csoportosítása folyadékkromatográfias szempontból

60

1. Kromatográfias szempontból semleges vegyületek
2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
3. Bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
4. Ionos vagy ionizálható vegyületek

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

1. Kromatográfias szempontból semleges vegyületek

61

1.a csoport:

Szénből, hidrogénből és kovalens kötésű
halogénből állnak

A visszatartást az apoláris felülettel való
kölcsonhatás szabja meg

Csak diszperziós kölcsonhatás!

Alifás és aromás szénhidrogének

Többgyűrűs aromás szénhidrogének (PAH)

Halogénezett alifás és aromás szénhidrogének

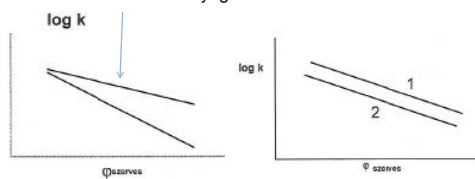
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

1. Kromatográfias szempontból semleges vegyületek

62

A visszatartás függése az eluens összetételétől

erősebben hidrofób anyag



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

1. Kromatográfias szempontból semleges vegyületek

63

A hidrofobicitás jellemzése

n-oktanol/víz rendszerben mért megoszlási
hányadossal jellemezzük

(a n-oktánollal modellezzük az állófázist)

Mérőszáma IgP

Fejlesztésnél a kiindulási paraméterek becslésére
szolgál – [I_gP kontrollált elválasztás](#)

Pallas programmal számolható

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

1. Kromatográfias szempontból semleges vegyületek

64

1.b csoport:

H-hidas és/vagy dipól-dipól kölcsönhatás is

- ❖ Alkohokok
- ❖ Éterek
- ❖ Észterek
- ❖ Nitro-vegyületek
- ❖ Aldehidek, ketonok
- ❖ Nitrilek
- ❖ Azo-vegyületek

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

1. Kromatográfias szempontból semleges vegyületek

65

1.b csoport:

Elválasztás lehetősége:

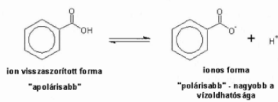
- ❖ Különbség az apolaritásban
- ❖ Különbség a poláris csoportokban

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

66

A pH-tól függően két molekuláris állapotban lehetnek jelen



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

67

Hidrofób savak

Ionvisszaszorított forma – IgP kontrollált elválasztás

Hidrofil savak

Elválasztásuk poláris részeket tartalmazó állófázison valósítható meg

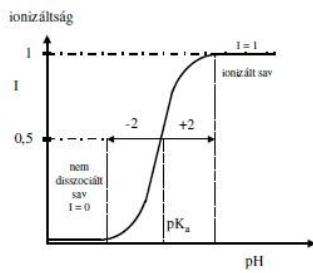
- ❖ Maradék szilanol
- ❖ Embedded fázisok

HILIC

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

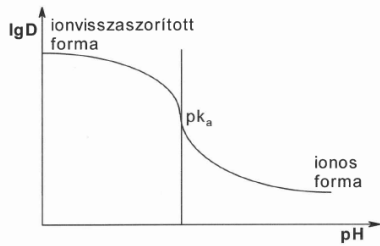
68



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

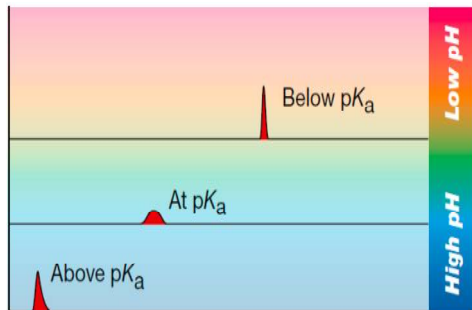
69



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

70



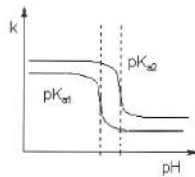
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

2. Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

71

A szelektivitás pH-függése

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \rightarrow \lg \alpha = \lg k_2 - \lg k_1 \quad [15.3]$$



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

72

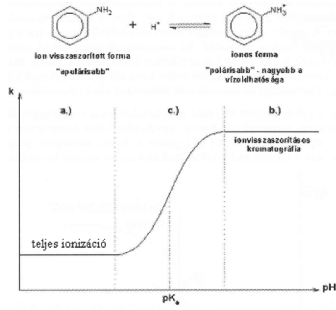
Elválasztásuk poláris részeket tartalmazó állófázison valósítható meg (?)

A pH-től függően két molekuláris állapotban lehetnek jelen

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkcióscsoportot tartalmazó vegyületek

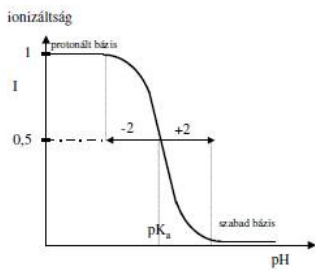
73



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkcióscsoportot tartalmazó vegyületek

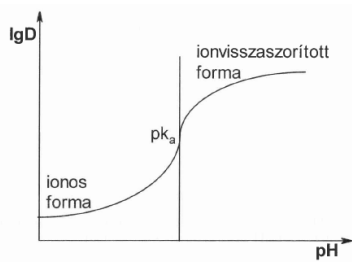
74



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkcióscsoportot tartalmazó vegyületek

75



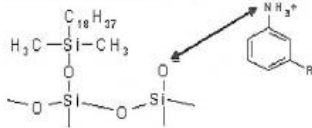
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

76

Kölcsönhatások a poláris állófázissal

Ionos kölcsönhatás – nagyon erős



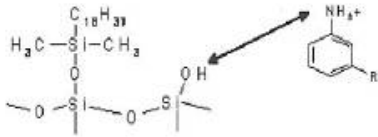
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

77

Kölcsönhatások a poláris állófázissal

Kölcsönhatás nem ionizált szilanollal – közepesen erős



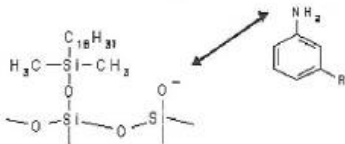
Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

78

Kölcsönhatások a poláris állófázissal

Szabad bázis kölcsönhatása ionizált szilanollal – közepesen erős



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkációs csoportot tartalmazó vegyületek

79

Maszkírozás

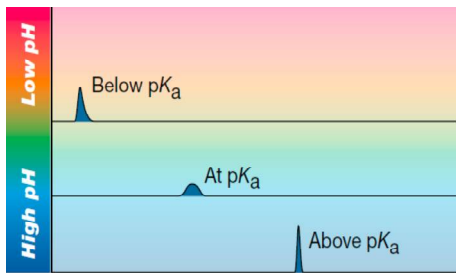
A szabad szilanol lefedése kismolekulájú aminnal

Gyakorlat: 0,1% trietilamin tartalmú eluens

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

3. Bázikus jellegű funkációs csoportot tartalmazó vegyületek

80



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

4. Ionos vagy ionizálható vegyületek

81

Elválasztásuk az ionpár kromatográfiával valósítható meg

IC/HILIC

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

A pH fogalma

82

- $pH = -\lg a_{H^+} = -\lg(m_{H^+} \gamma_{H^+} / m^\circ)$
 - a_{H^+} : hidrogénion aktivitás
 - γ_{H^+} : moláris aktiválási koefficiens
 - m° : standard molalitás
- Gyakorlatban → pH-munkadefiníciója
 - $pH = pH(S) + [(E(S) - E(X)) / 59]$
 - pH(S): kalibráló puffer pH-ja
 - E(S): kalibráló puffer elektródpotenciálja (mV)
 - E(X): mintában mért elektródpotenciál (25°C-on)

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

pH standard

83

Elsődleges standard (PS)	Hőmérséklet									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50
Kálium-hidrogéntartarát (25°C) 0,05 mol/kg kálium- dihidrogén-citrát	3,863	3,840	3,820	3,802	3,788	3,776	3,766	3,759	3,754	3,749
0,05 mol/kg kálium- hidrogén-tartarát	4,000	3,998	3,997	3,998	4,000	4,005	4,011	4,018	4,027	4,050
0,025 mol/kg dinátrium- hidrogén-foszfát + 0,025 mol/kg kálium- dihidrogén-foszfát	6,984	6,951	6,923	6,900	6,881	6,865	6,853	6,844	6,838	6,833
0,03045 mol/kg dinátrium- hidrogén-foszfát + 0,006695 mol/kg kálium- dihidrogén-foszfát	7,534	7,500	7,472	7,448	7,429	7,413	7,400	7,389	7,380	7,367
0,01 mol/kg dinátrium- tetraborát	9,464	9,395	9,332	9,276	9,225	9,180	9,139	9,102	9,068	9,011
0,025 mol/kg nátrium- hidrogén-karbonát + 0,025 mol/kg nátrium-karbonát	10,32	10,25	10,179	10,12	10,06	10,012	9,966	9,926	9,889	9,828

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

» Mozgófázis pH-mérésének lehetőségei:

- > 1.) MÉRJÜK A PUFFER pH JÁT ÉS EHEZ ADJUK A SZERVES OLDÓSZERT (v_pH)
- > 2.) Kalibráljuk az üvegelektrodát az elsődleges és/vagy másodlagos pufferekre, és utána a kész mozgófázisban mérjük a pH-t (s_pH)
- > 3.) A kalibrációnál az elsődleges és/vagy másodlagos puffereket a mozgófázisba mérjük be, és a mérést is a mozgó fázisban végezzük el (s_pH)

A három módszer három eltérő eredményt ad!

84

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

» A hidrogénion aktivitása oldószer függő!!!

$$\log \gamma_H = - \frac{A \cdot I^2}{1 + A \cdot I^2}$$

A,B: oldószertől és hőmérséklettől függő konstansok

$$\left(a_0^s \cdot B^s \right) = 1,5 \left[\frac{w_B \cdot \rho}{s_B \cdot w_{\rho}} \right]^{1/2}$$

% MeOH (v/v)	x_{MeOH}	ρ (kg dm ⁻³)	$\log \rho / \rho^0$	A	a, B	$\delta = -\log(\gamma_H^0)$	pK_w
0	0.000	0.995	-0.002	0.33	1.50	0.00	14.00
10	0.047	0.983	-0.008	0.36	1.53	0.01	14.08
20	0.100	0.969	-0.014	0.39	1.57	0.03	14.08
30	0.160	0.955	-0.020	0.64	1.61	0.05	14.07
40	0.229	0.939	-0.027	0.70	1.66	0.09	14.09
50	0.308	0.921	-0.036	0.77	1.72	0.13	14.14
60	0.400	0.901	-0.045	0.87	1.79	0.18	14.23
70	0.509	0.878	-0.057	1.01	1.88	0.18	14.39
80	0.640	0.852	-0.070	1.20	1.99	0.05	14.63
85	0.800	0.822	-0.085	1.48	2.13	-0.34	15.04
100	1.000	0.787	-0.104	1.87	2.31	-2.00	16.77

Pufferoldat

86

- ☐ **pufferoldatnak** tekintjük azokat az oldatokat, amelyek pH-ja az oldathoz adott erős sav vagy erős bázis hatására csak viszonylag kis mértékben változik meg
- ☐ **Összetétele:**
 - ☐ egy gyenge sav és a hozzá konjugált bázis, vagy ennek sója, pl.: CH₃COOH/NaAc
 - ☐ egy gyenge bázis, és a hozzá konjugált sav, vagy ennek sója, pl.: NH₃/NH₄Cl
 - ☐ amfoter molekulák oldata is lehet puffer

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

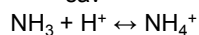
Pufferoldat

87

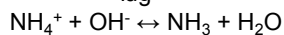
Az oldatban egy konjugált sav-bázis pár található, melyek között fennálló egyensúly képes tompítani az oldathoz adott erős sav vagy erős bázis pH változtató hatását.

pl.: NH₃/NH₄⁻ rendszer

+ sav



+ lúg



Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Pufferoldat

88

□ Pufferoldatok pH-jának kiszámítása:

- gyenge sav + gyenge sav konjugált bázisa/sója
 $\text{pH} = \text{pK}_s + \log (c_A/c_{\text{HA}})$

- gyenge bázis + gyenge bázis konjugált sava/sója
 $\text{pH} = \text{pK}_s + \log (c_B/c_{\text{BH}^+})$

$$\text{pK}_s = 14 - \text{pK}_b$$

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Pufferoldat

89

A pufferoldatok jellemzésére az oldat **pH-ját**
és **pufferkapacitását** használjuk

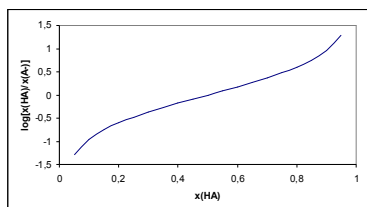
Pufferkapacitás

egyértékű erős savnak vagy bázisnak az a
mennyisége mólokban kifejezve, amit az adott
pufferoldat 1 dm³-éhez adva 1 egységnyi pH
változást idéz elő

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

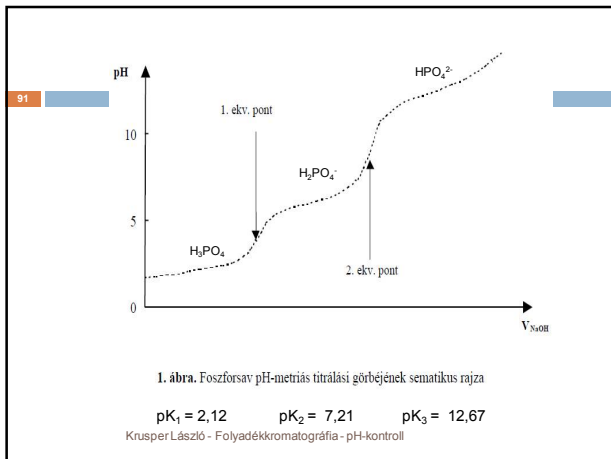
Pufferoldat

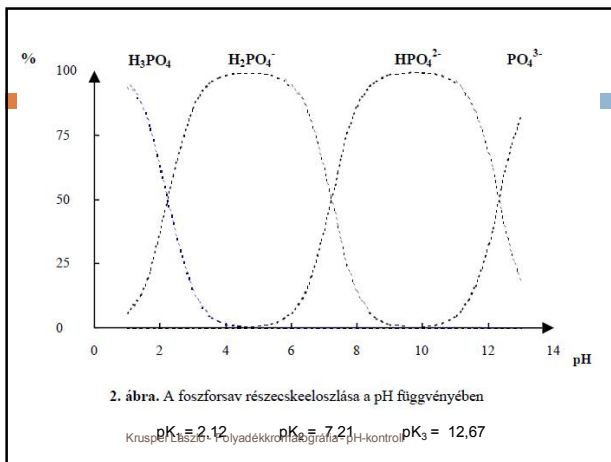
90



$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log (c_A/c_{\text{HA}})$$

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll





A folyadékkromatográfiában leggyakrabban alkalmazott pufferek

93

Puffer	pKa	puffer - tartomány	Puffer	pKa	puffer - tartomány
trifluorecetsav	< 2	< 2,5	TRIS = trisz(hidroxometil)-aminometán	8,3	7,3 - 9,3
foszforsav	2,1	1,1 - 3,1	dietanolamin	8,9	7,9 - 9,9
citromsav (pK_1)	3,1	2,1 - 4,1	ammónia	9,2	8,2 - 10,2
hangyasav	3,8	2,8 - 4,8	etanolamin	9,5	8,5 - 10,5
citrát (pK_2)	4,7	3,7 - 5,7	karbonát (pK_2)	10,3	9,3 - 11,3
ecetsav	4,8	3,8 - 5,8	dietilamin	10,5	9,5 - 11,5
citrát (pK_3)	5,4	4,8 - 6,8	trietilamin	11,0	10,0 - 12,0
karbonát (pK_1)	6,4	5,4 - 7,4	piperidin	11,1	10,1 - 12,1
foszfát (pK_2)	7,2	6,2 - 8,2	foszfát (pK_3)	12,3	11,3 - 13,3
trietanolamin	7,8	6,8 - 8,8			

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll

Pufferek UV cut-off értékei

94

puffer	UV cut-off (nm)
ecetsav	235
foszforsav	195
Trisz(hidroxi-meti)-amino-metán	228
Dihidrogén-foszfát	195
Piperazin-foszfát	195
citromsav	225

Krusper László - Folyadékkromatográfia - pH-kontroll
