

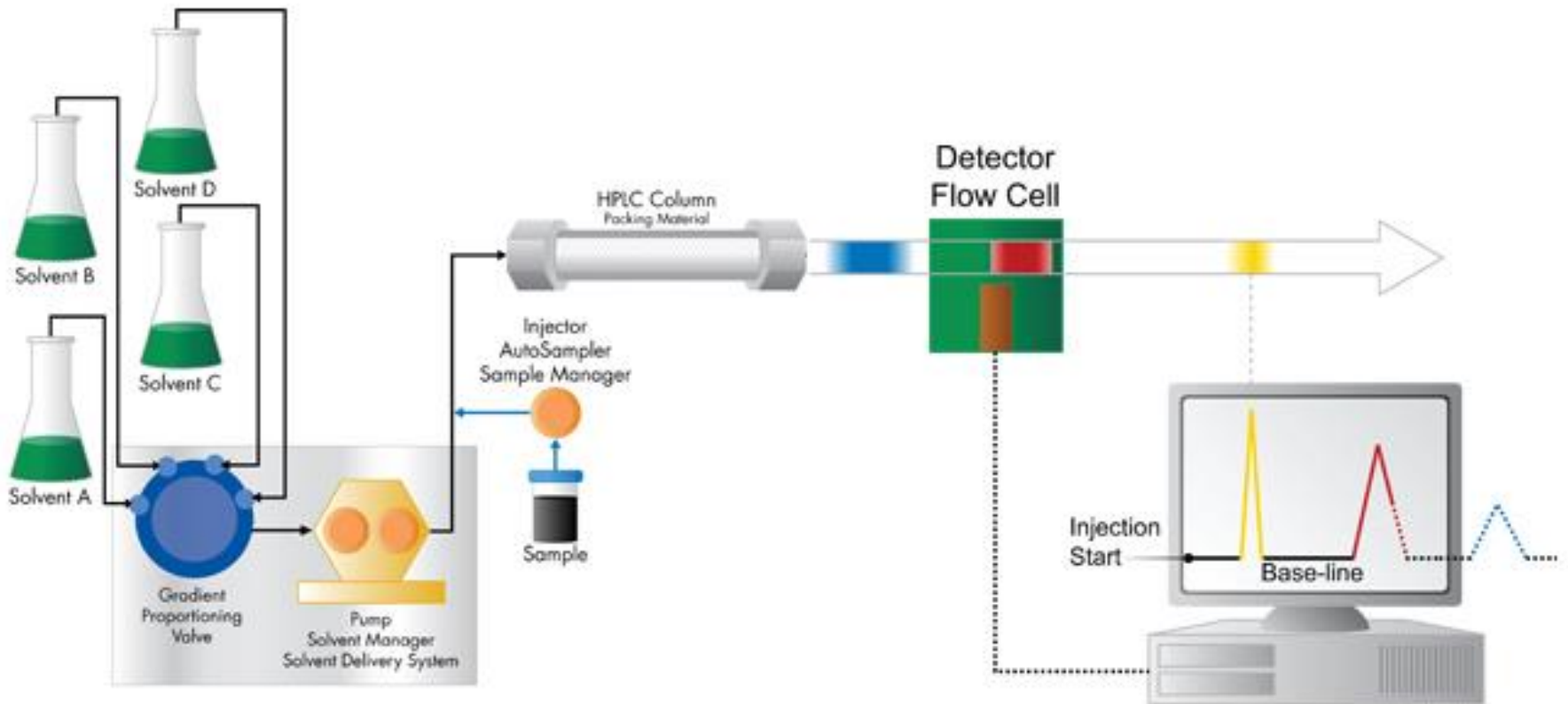
Dr. Kormány Róbert
Folyadékkromatográfia
Gyógyszervegyész-mérnök hallgatók számára
2017. 04. 04
2017. 04. 11



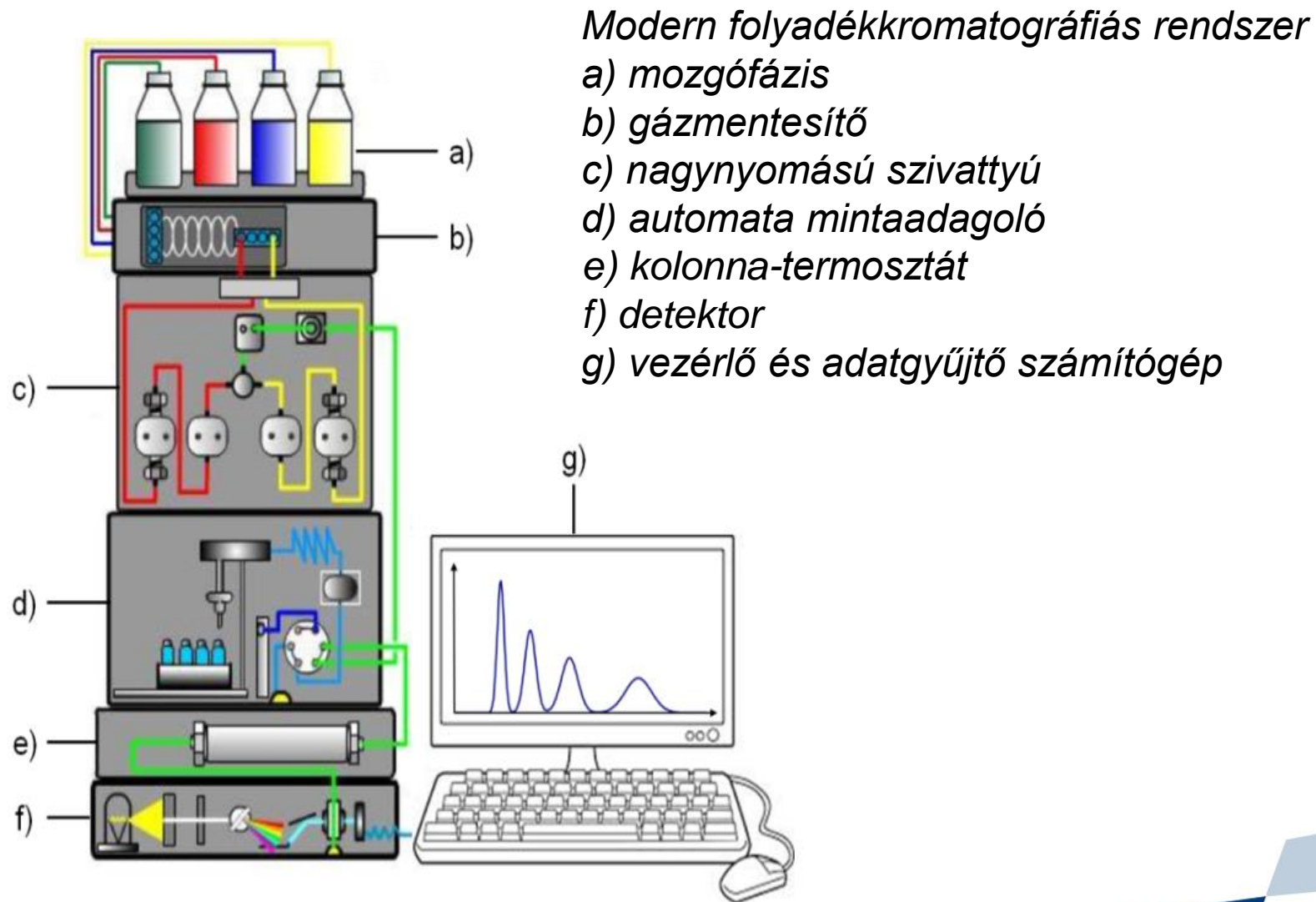
A folyadékkromatográfia (HPLC) szerepe a gyógyszeriparban

- 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

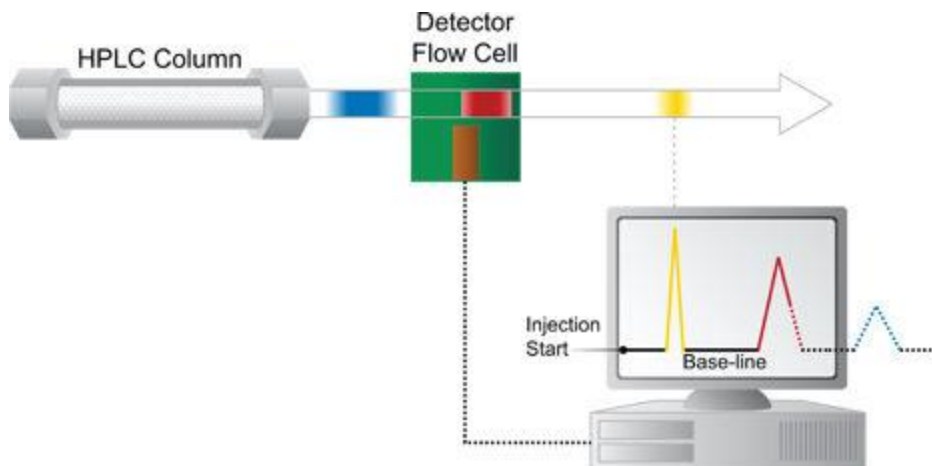
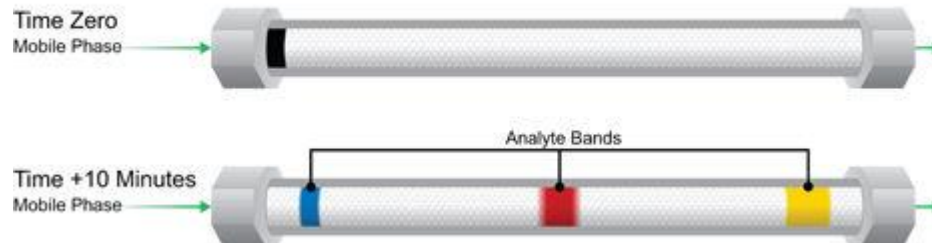


A HPLC felépítése



Az állófázis (kolonna)

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



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

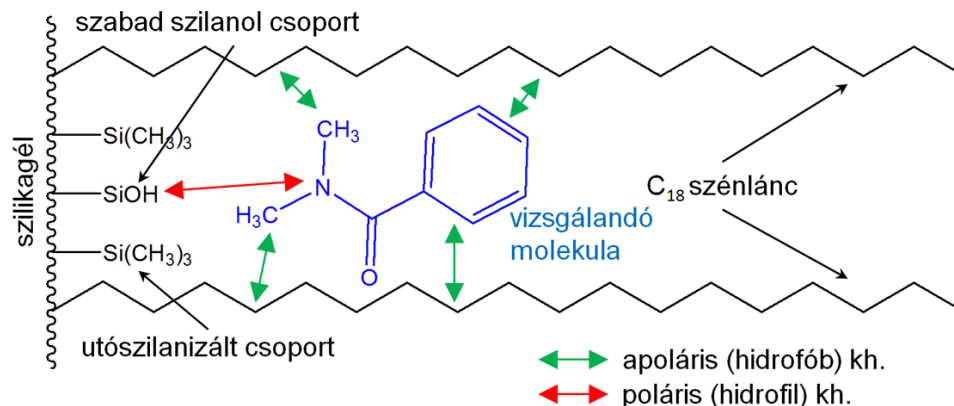
Elnevezés	Állófázis	Mozgófázis
normál fázisú folyadékkromatográfia (NP-HPLC, NPLC)	polárisabb	apolárisabb
fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC, RPLC)	apolárisabb	polárisabb
fordított fázisú ionpár-folyadékkromatográfia (RP-IP-HPLC, RP-IP-LC)	apolárisabb	polárisabb + hidrofób ion
hidrofil kölcsönhatási 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) (régebbi nevén gél permeációs kromatográfia, GPC)	apoláris, nagy pórus átmérőjű	szerves oldószer
vizes méretkizárásos kromatográfia (SEC) (régebbi 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 folyadékkromatográfiai 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

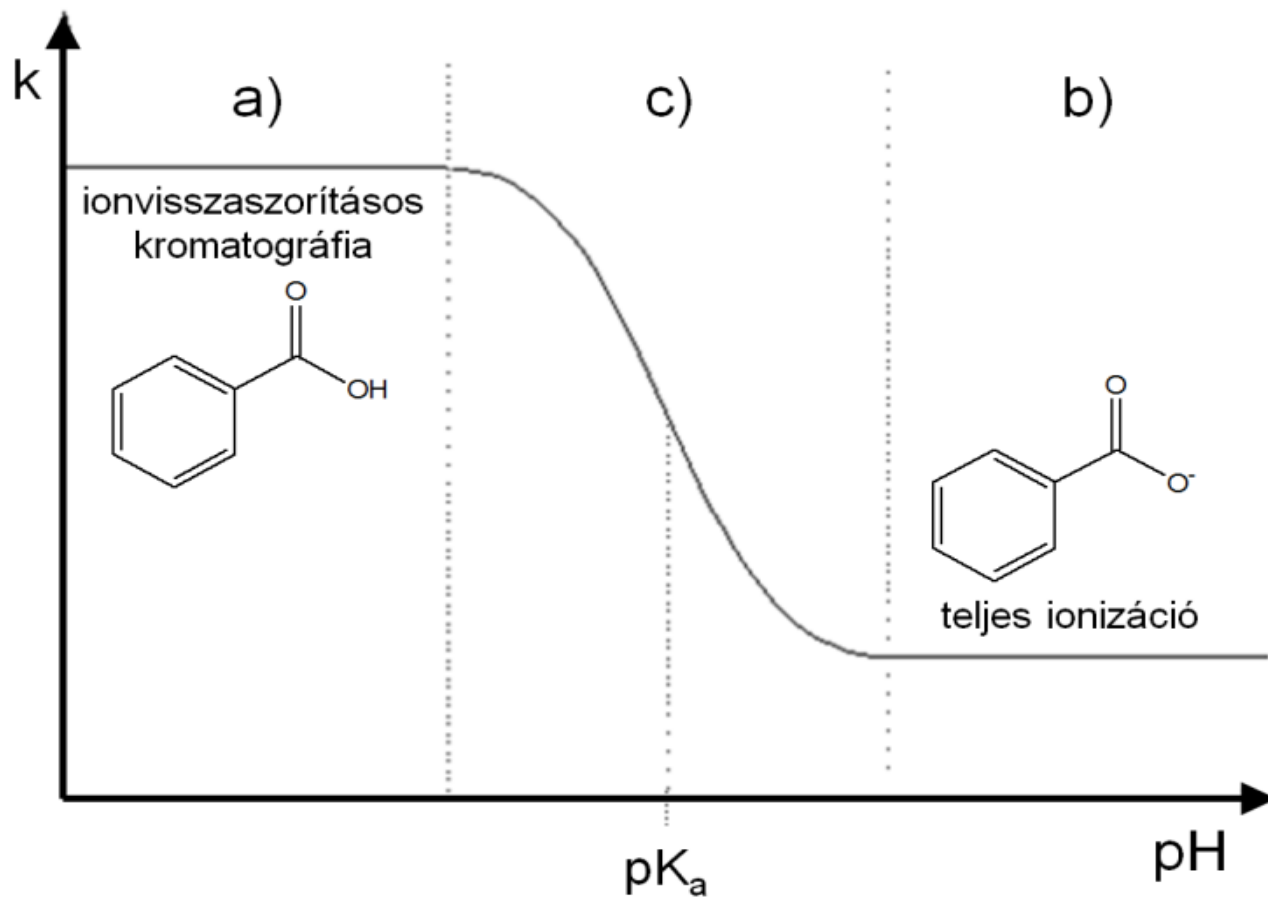
Oldószer	UV cut-off (nm)	Refraktív index (20°C)	Viszkozitás (cP)	Forráspont (°C)	Polaritás (P')
Acetonitril	190	1,3441	0,38	81,6	5,8
Dioxán	215	1,4224	1,37	101,3	4,8
Etanol	210	1,3614	1,20	78,0	n.a.
Metanol	205	1,3284	0,55	64,7	5,1
2-Propanol	205	1,3772	2,40	82,3	3,9
Tetrahidrofurán	212	1,4072	0,55	66,0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

Vizsgálandó anyagok csoportba sorolása

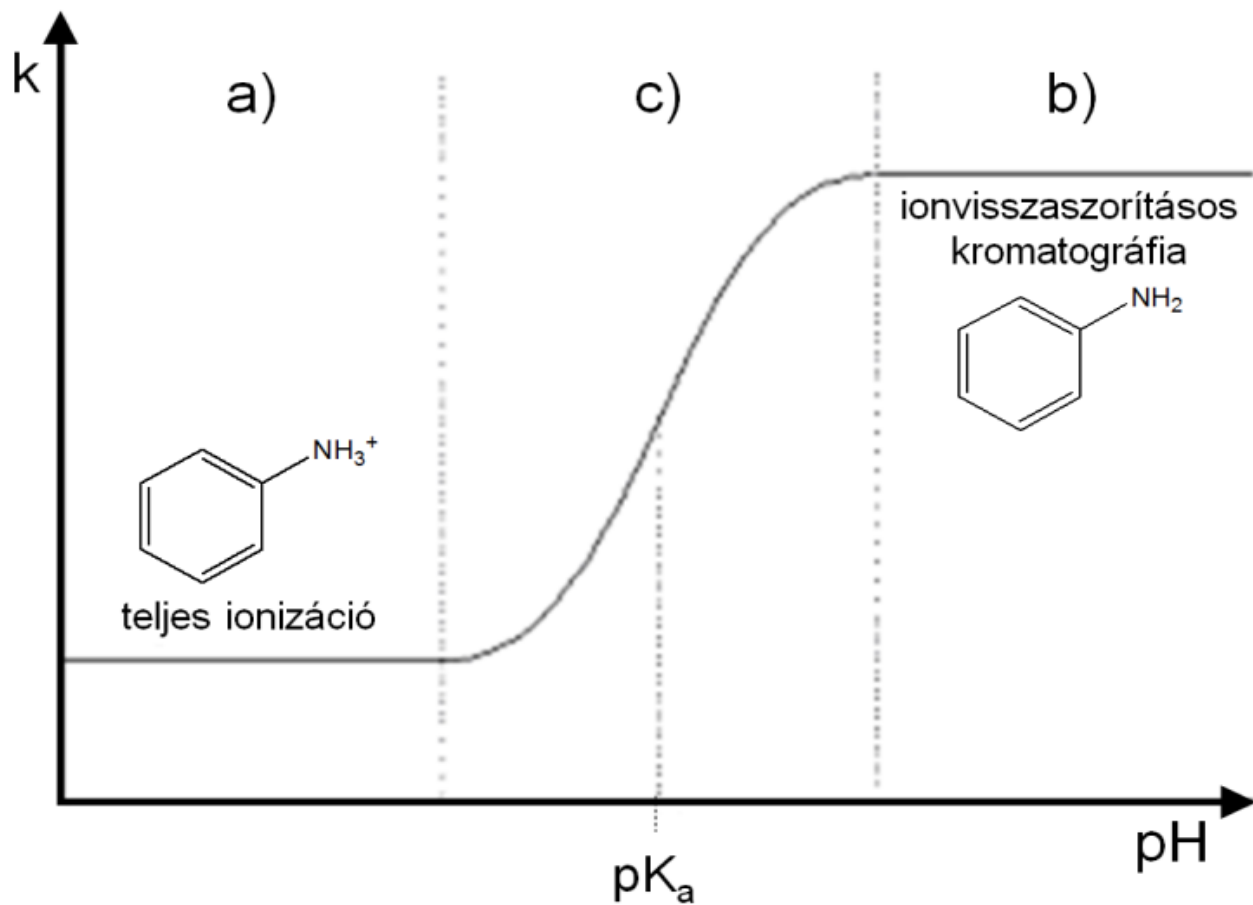
Kromatográfiás szempontból a vegyületek négy csoportra oszthatók:

- kromatográfiás 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**

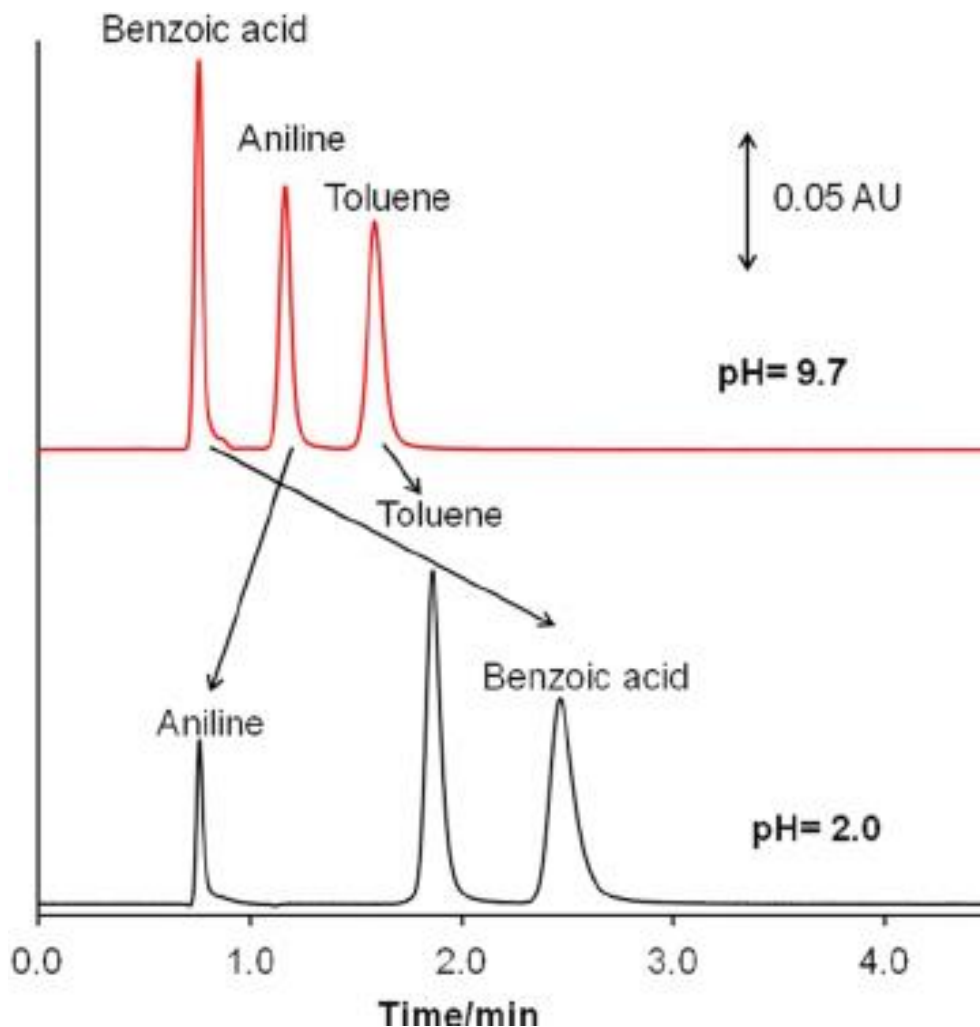
Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek



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

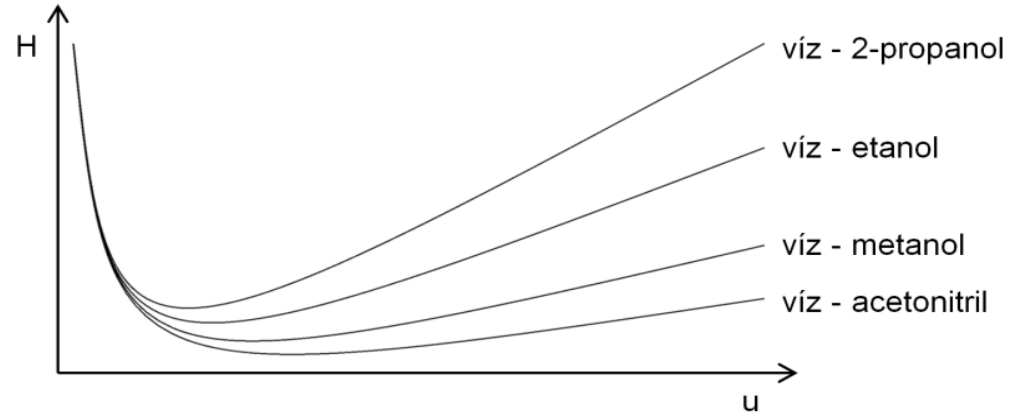
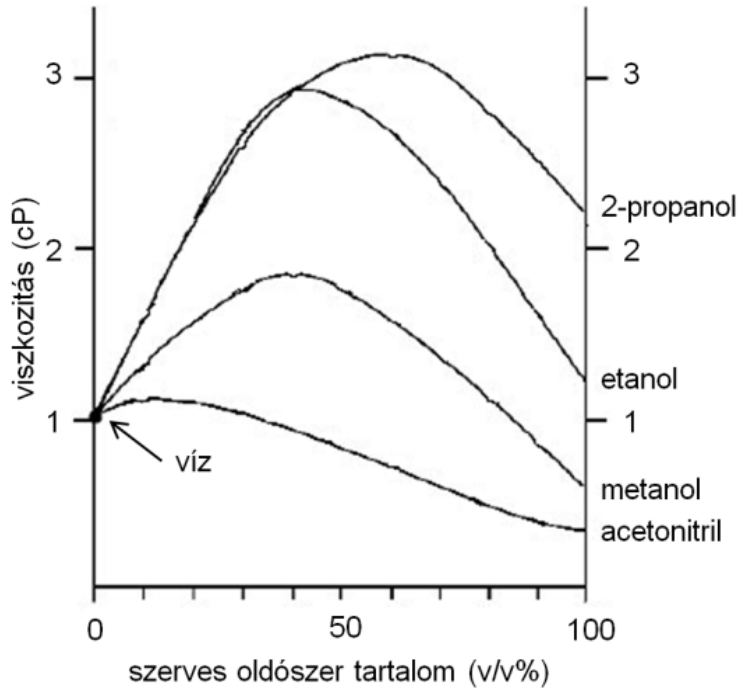
Ionvisszaszorított forma ($pK_a + 2$)
 $pH > 6,4$

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

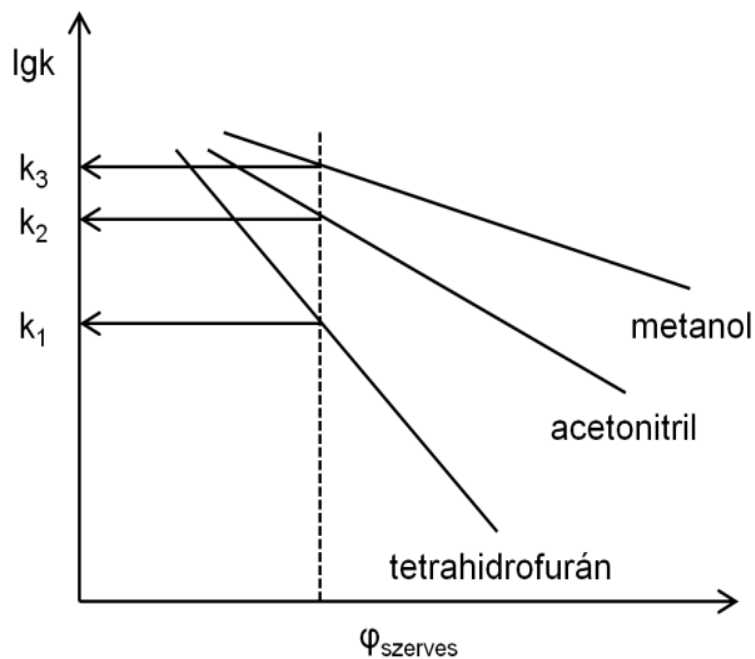
$$\Delta p = \frac{\phi \eta L u}{d_p^2}$$

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

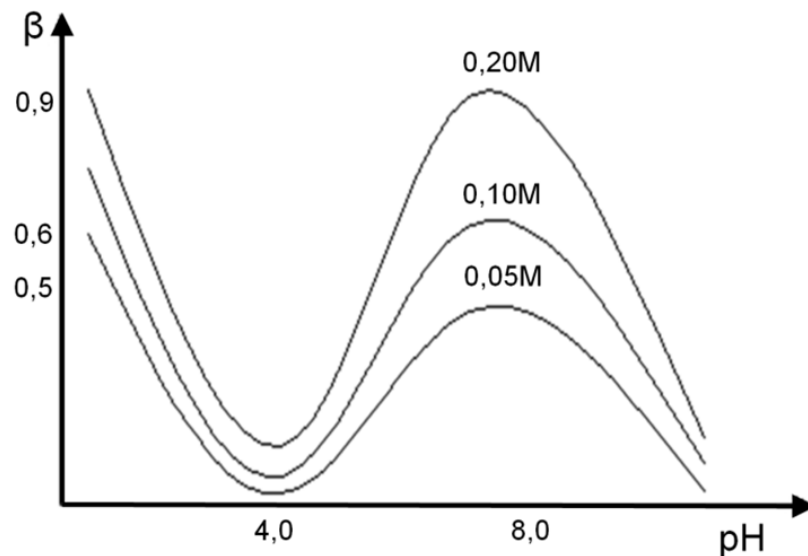
————— elúciós erő —————▶
víz – metanol – acetonitril – etanol – 2propanol – tetrahidrofurán
◀————— szelektivitás —————



Mozgófázissal szemben támasztott követelmények

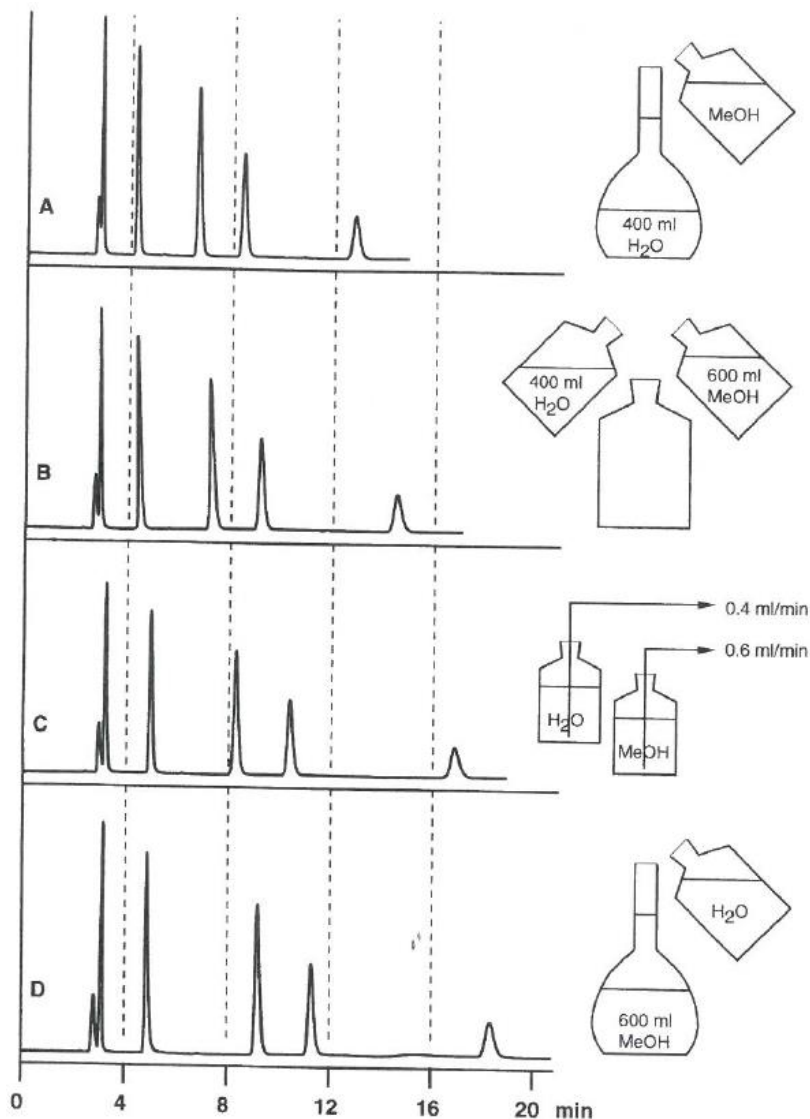
Néhány vegyület pK_a értéke vizes környezetben.

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



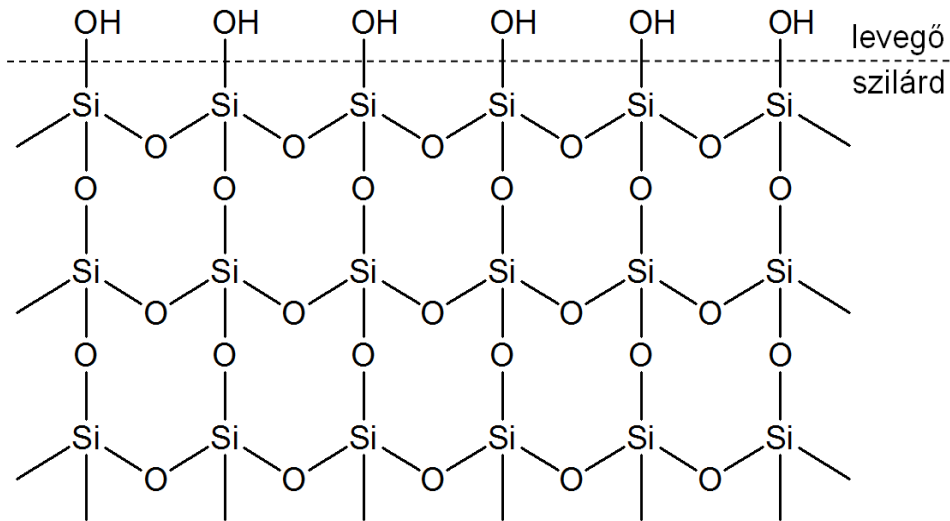
Kálium-foszfát (pH=7,0) oldhatósága különböző összetételű víz-szerves oldószer elegyekben.

%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 elegyben.

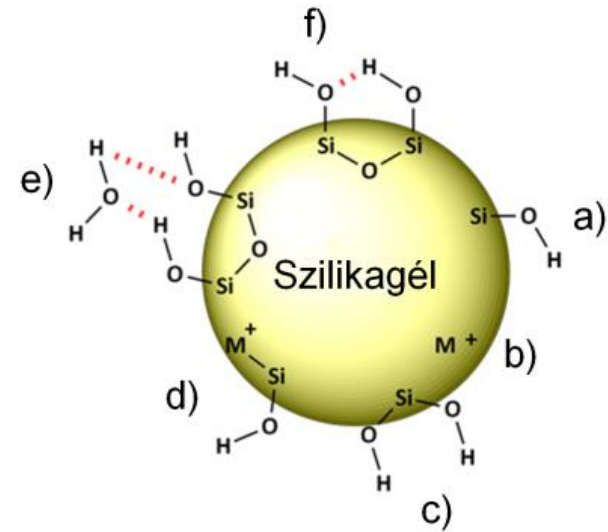
%B	ammónium- acetát pH=5,0	ammónium- foszfát pH=3,0	kálium- foszfát pH=3,0	ammónium- foszfát pH=7,0	kálium- foszfát pH=7,0
60	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	45 mM
70	> 50 mM	> 50 mM	> 50 mM	25 mM	20 mM
80	> 50 mM	35 mM	20 mM	5 mM	0 mM
90	25 mM	5 mM	0 mM	0 mM	0 mM

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

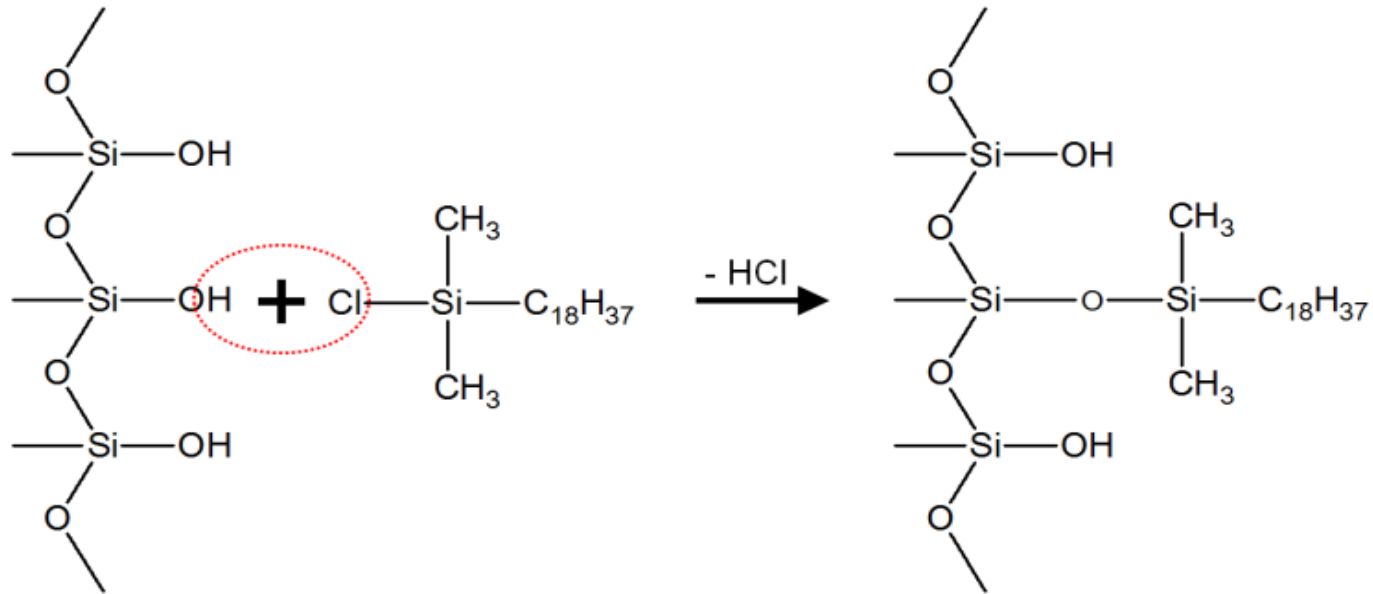
Szilikagélek csoportosítása:

- 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

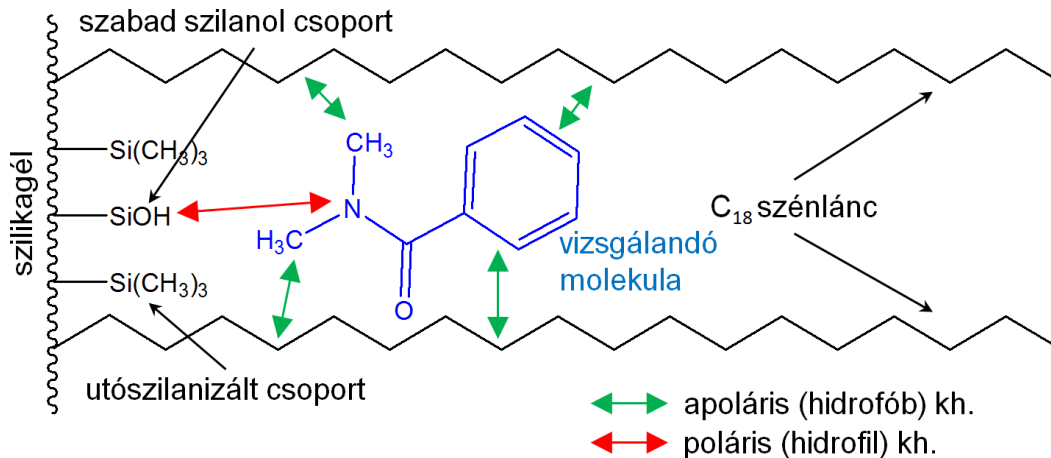
A Hypersil fordított fázisú töltetcsalád fémion tartalma.

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

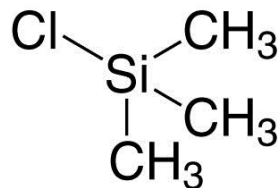
A hidrofób (apoláris) felület a fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztásoknál elsődleges cél, vagyis hogy a vegyületeket apoláris jellegükből eredő állófázis-komponens kölcsönhatás alapján válasszuk el. Ez egyben azt is jelenti, hogy a maximális felületi borítottságot érjük el.

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:

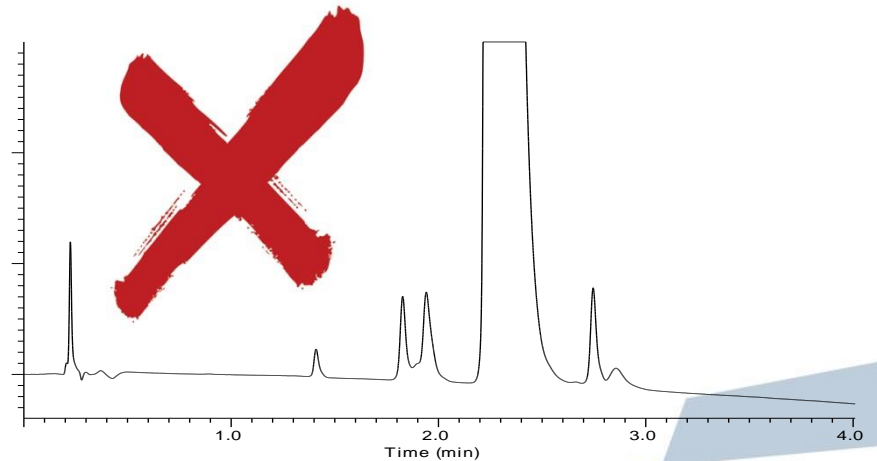
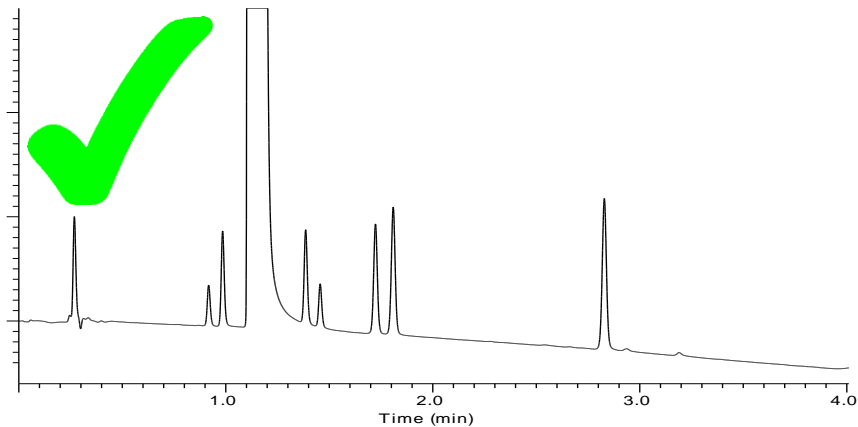
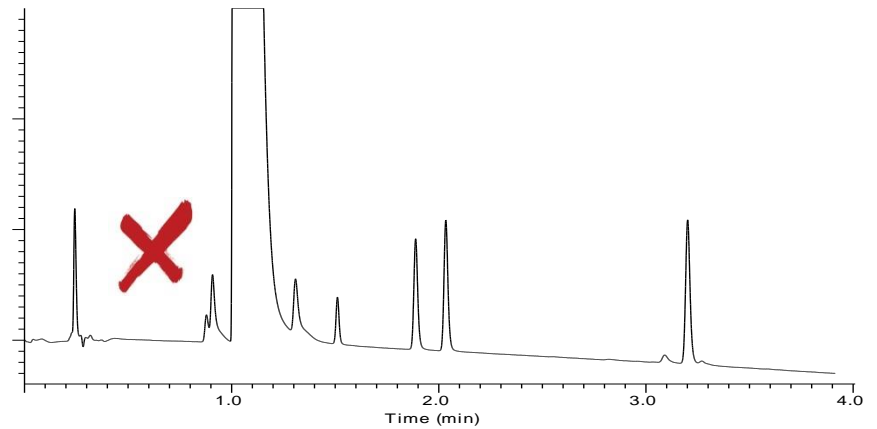
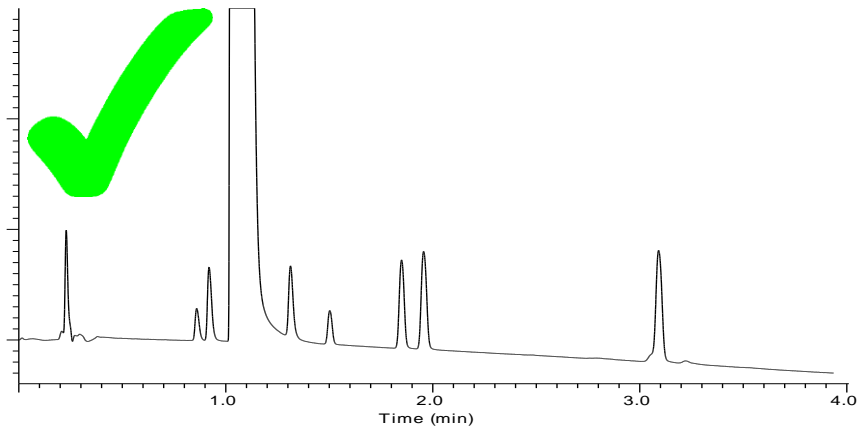
- nagy felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $\sim 3 - 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$
- közepes felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $\sim 2 - 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$
- kis felületi borítottságú: alkilcsoport felületi koncentráció $< 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$

Utószlanizálási reakció trimetil klór-szilánnal

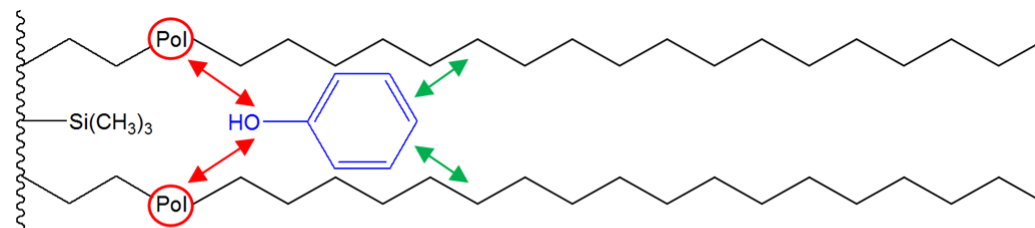
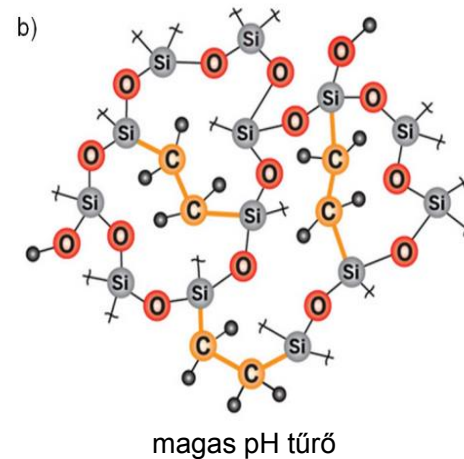
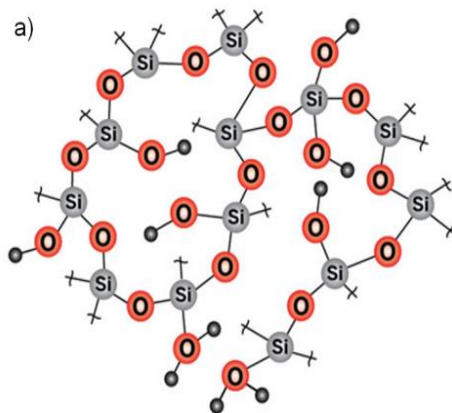
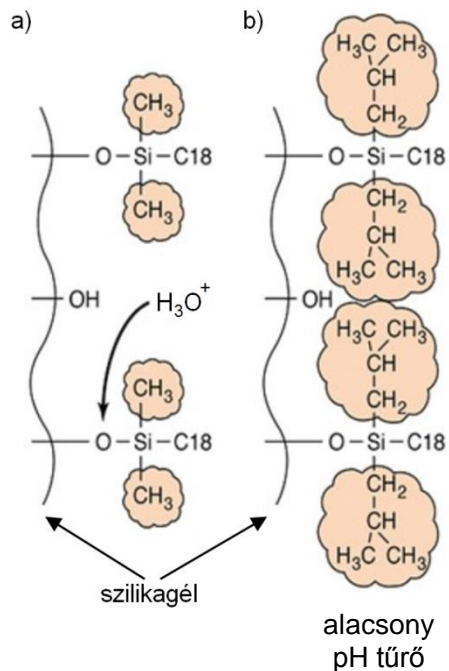


Állófázissal szemben támasztott követelmények

Legfontosabb a megfelelő állófázis kiválasztása!

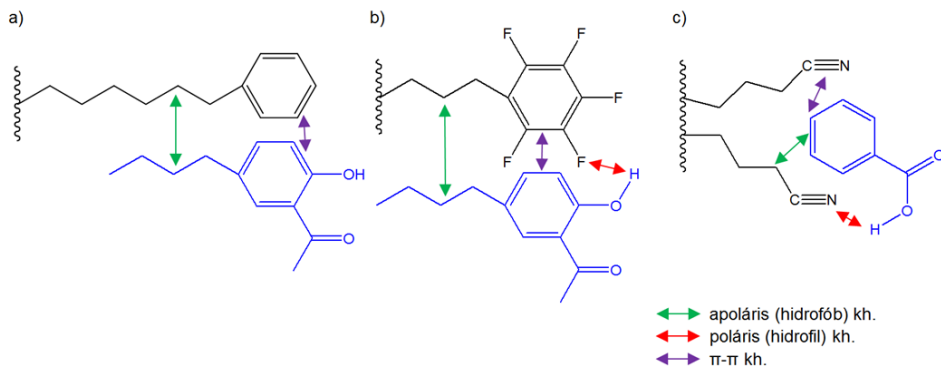


Speciális módosítású állófázisok



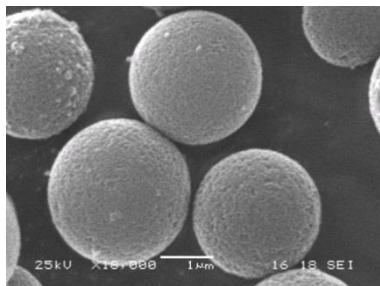
↔ apoláris (hidrofób) kh.
↔ poláris (hidrofil) kh.

Kontrollált polaritású (embedded) állófázis.

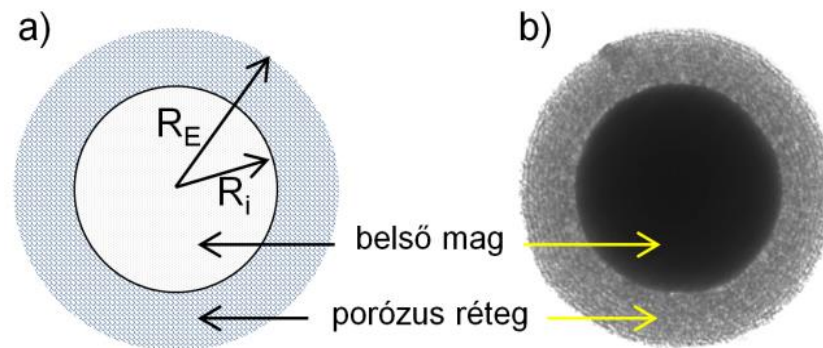


Nem alkil módosítású fordított fázisú állófázisok.
Fenil-hexil a), perfluorozott-fenil b) és ciano fázis c).

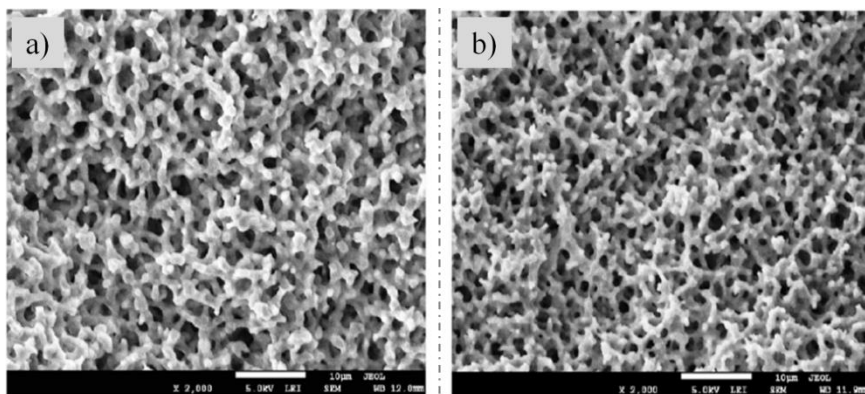
Modern szilikagél alapú állófázisok



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

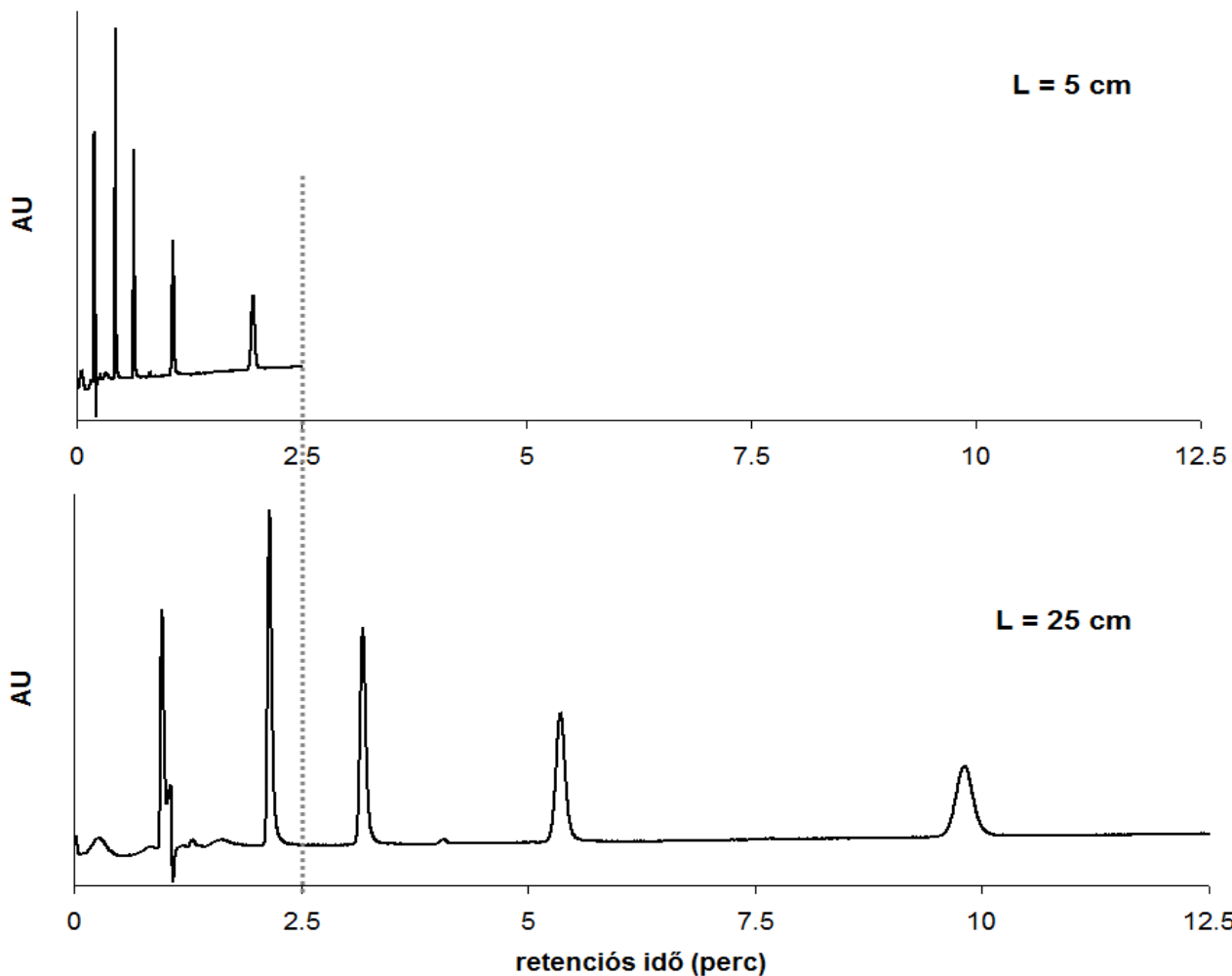


héjszerkezetű töltetek



monolitok

Teljesen porózus 2 μ m szemcseátmérő alatti töltetek



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

↑ Csökken
↓ Nő

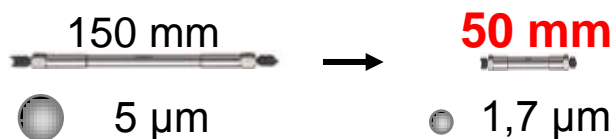
↓ Állandó

Teljesen porózus 2 μ m szemcseátmérő alatti töltetek



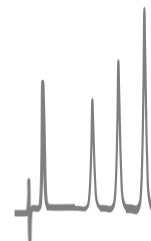
Gyors elválasztások

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



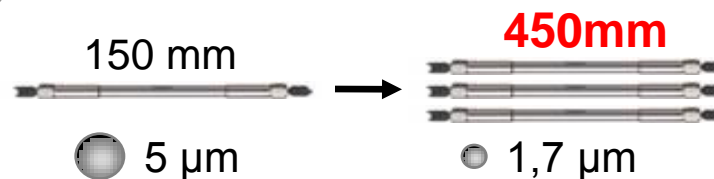
$N \approx \text{HPLC}$

$t_{anal} \div 9$



Nagy felbontás

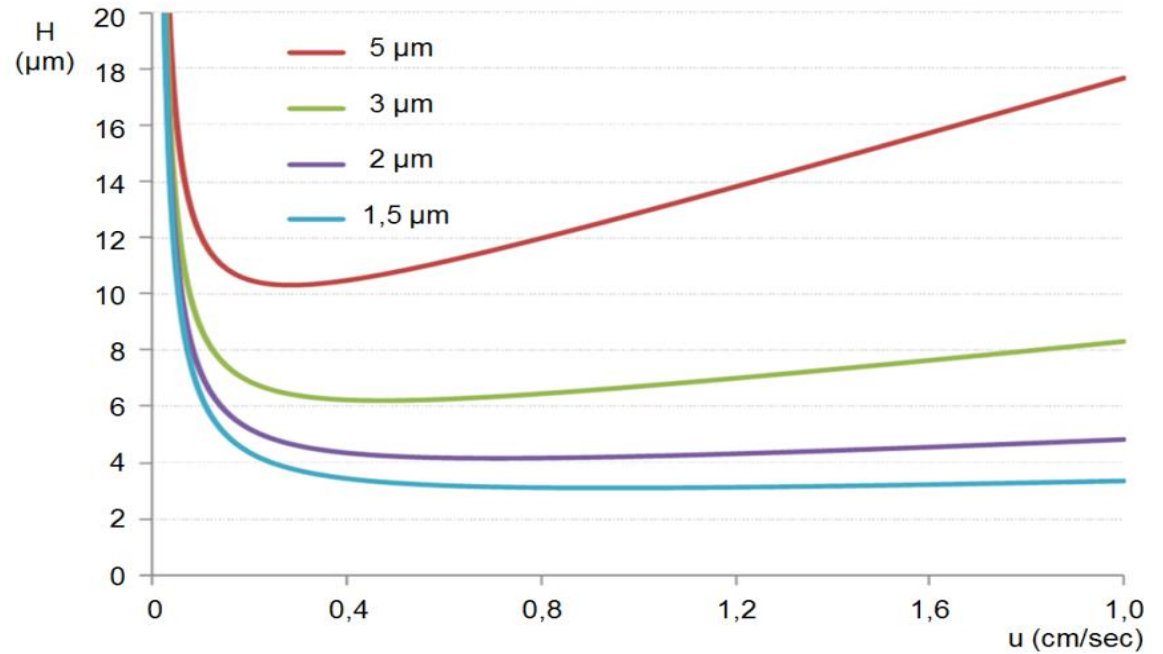
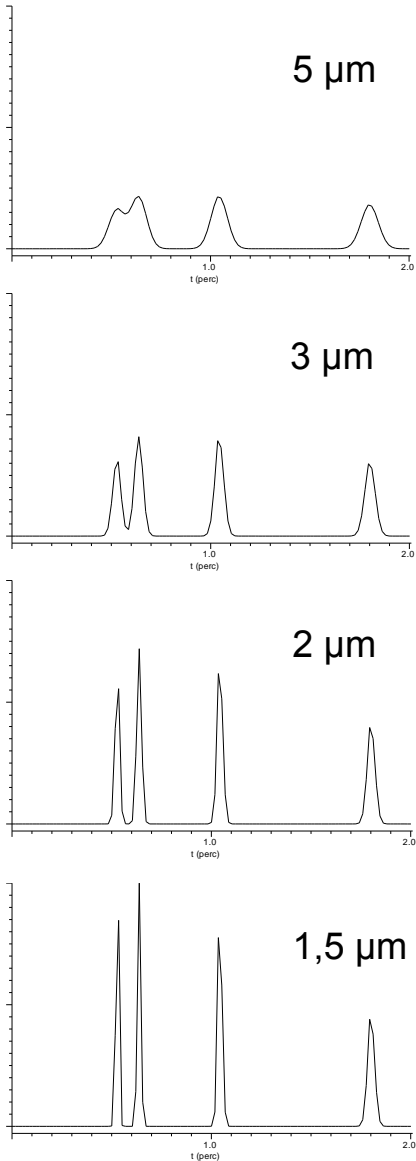
$N \approx 90'000$
 $t_{ana} < 20$ min (k=10)



$N \times 9$

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

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

Speciális készülék kialakítások

HPLC rendszer



Alkalmazható
bemenő nyomás

400 bar

>1000 bar

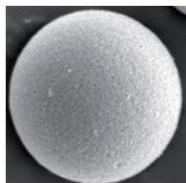
Kolonnán kívüli
variancia

>100 μ L²

<10 μ L²

Jellemző kolonnaméret: 150x4,6mm

Jellemző szemcseátmérő: 3-5 μ m

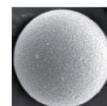


UHPLC rendszer



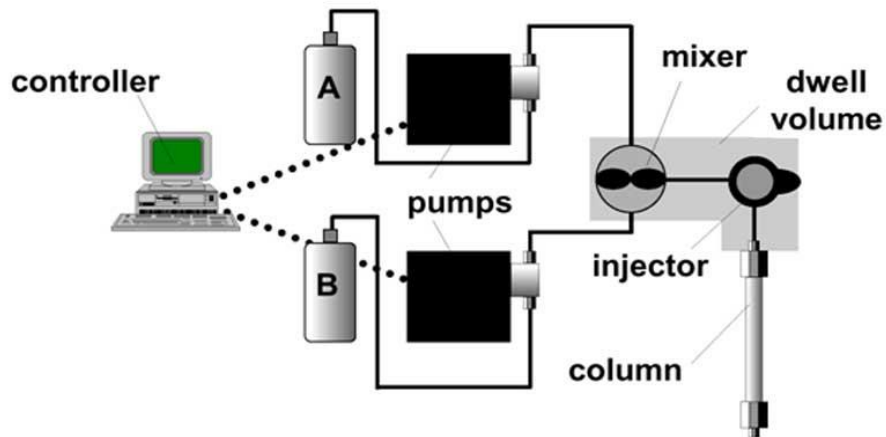
Jellemző kolonnaméret: 50x2,1mm

Jellemző szemcseátmérő: 1,7 μ m



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

Speciális készülék kialakítások

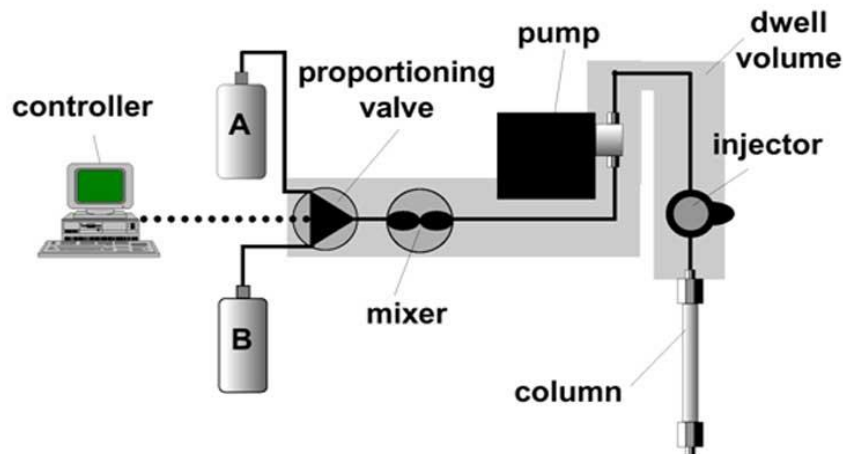


Magas nyomású gradiens

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!**

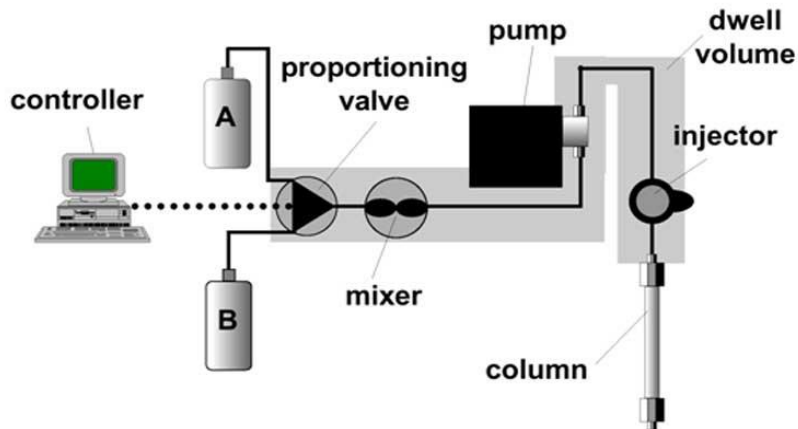
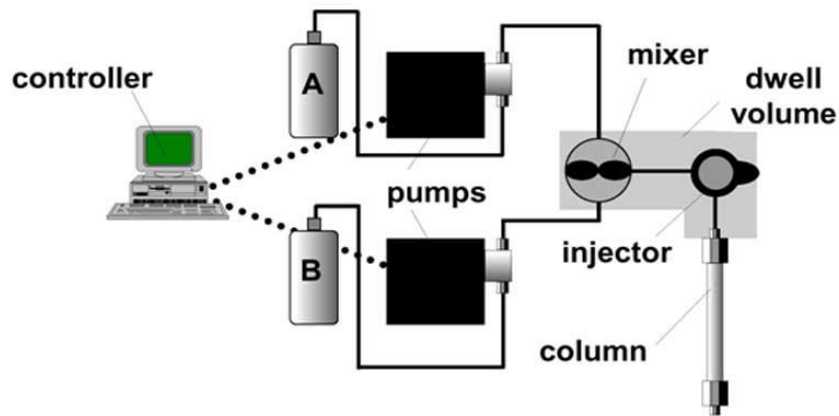


Alacsony nyomású gradiens

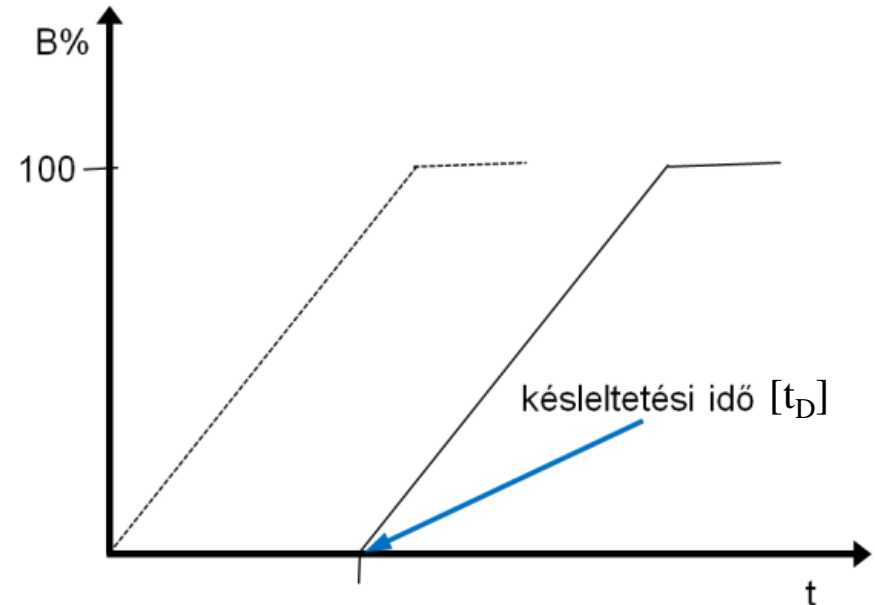
A szivattyú (pumpa) előtt kever
(elég egy pumpa)

Nagy késési térfogat

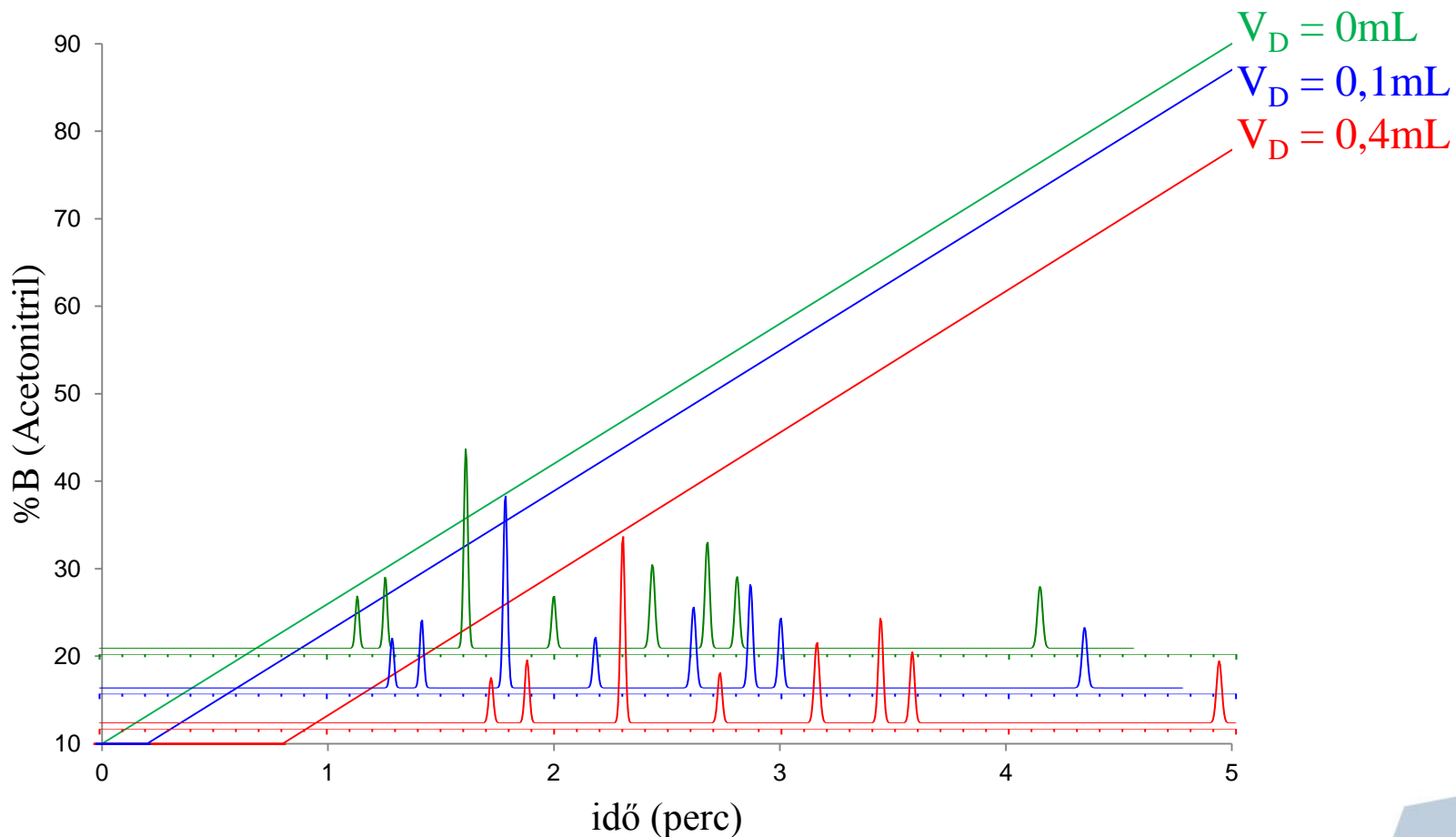
Késleltetési térfogat (dwell volume, V_D)



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

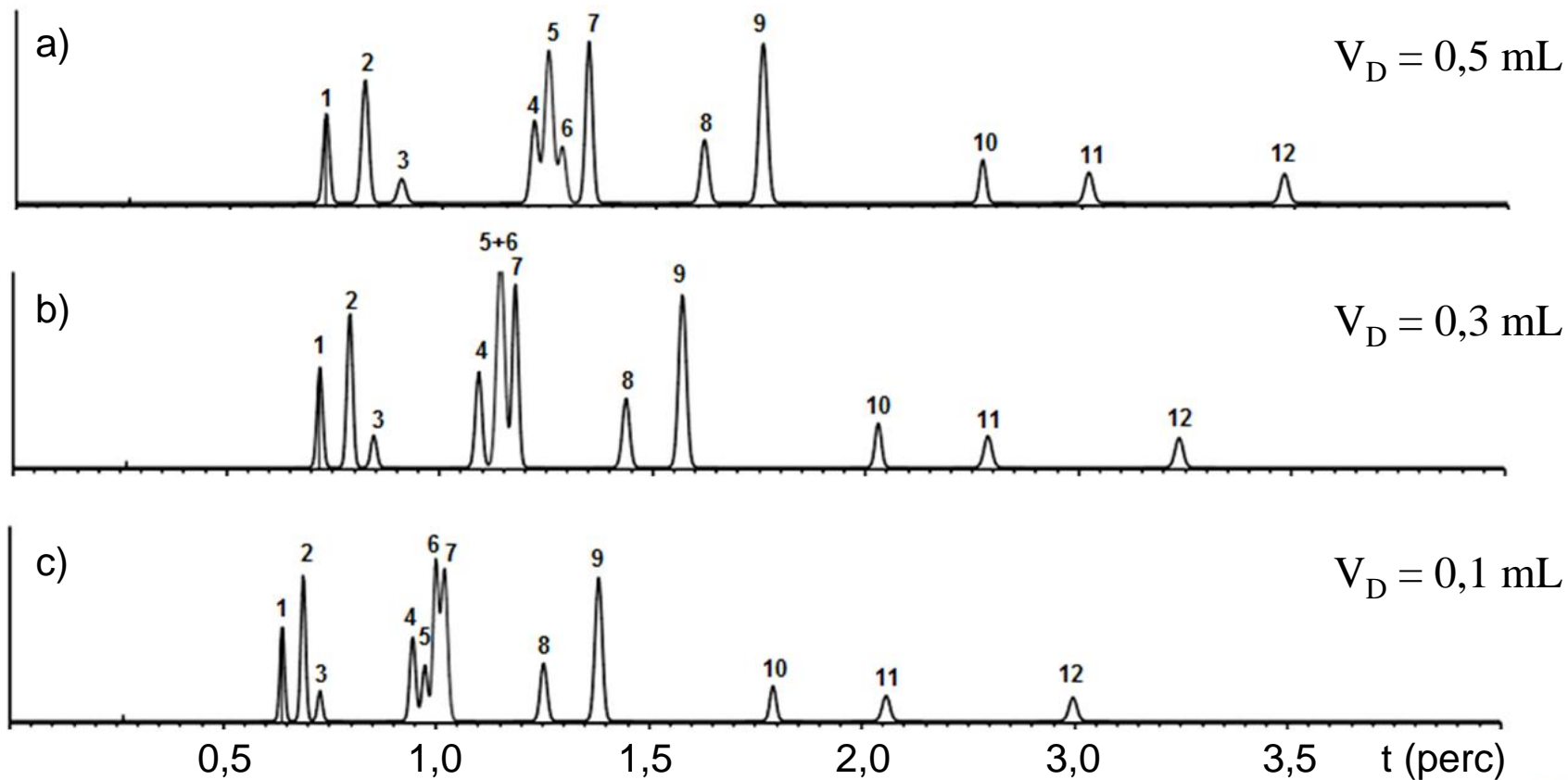


Késleltetési térfogat (dwell volume, V_D)



Áramlási sebesség: 0,5mL/perc

Késleltetési térfogat (dwell volume, V_D)

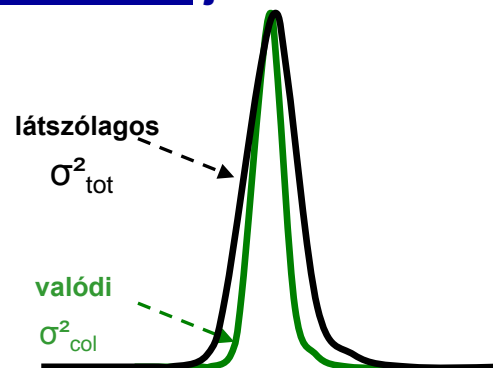


Teljesen porózus 2μm szemcseátmérő alatti töltetek

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

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

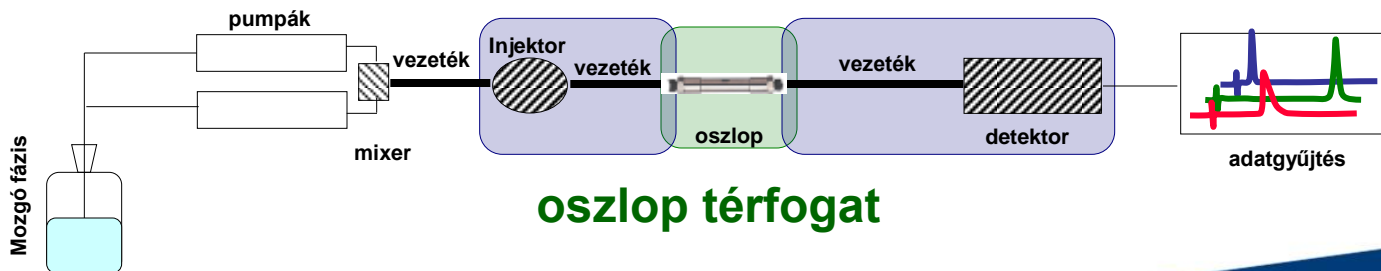
$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2$$



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

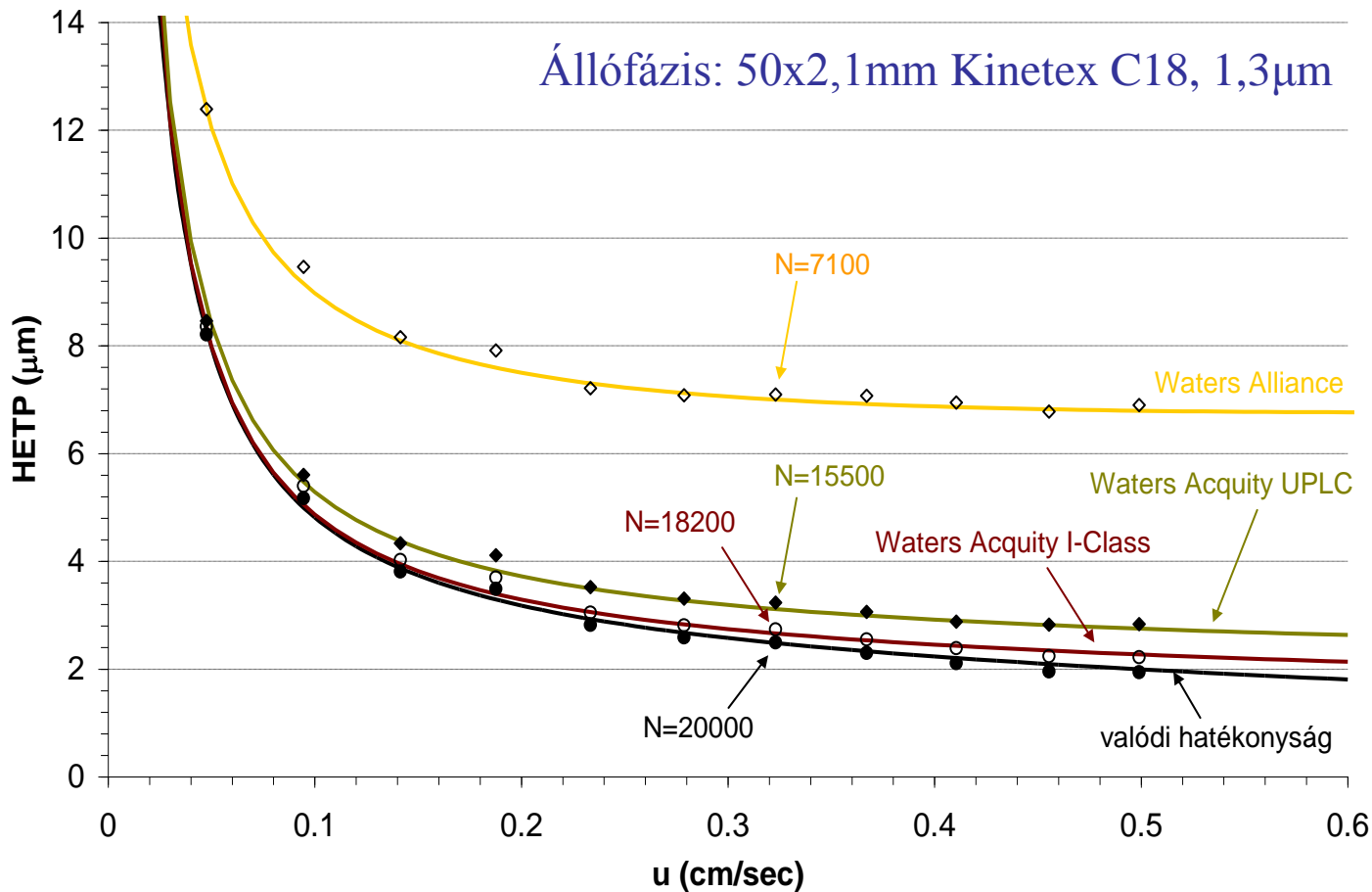
$$\sigma_{ext}^2 = K_{inj} \frac{V_{inj}^2}{12} + K_{cell} \frac{V_{cell}^2}{12} + \tau^2 F^2 + \frac{r_c^4 \cdot l_c \cdot F}{7.6 \cdot D_m}$$

oszlopon kívüli térfogatok

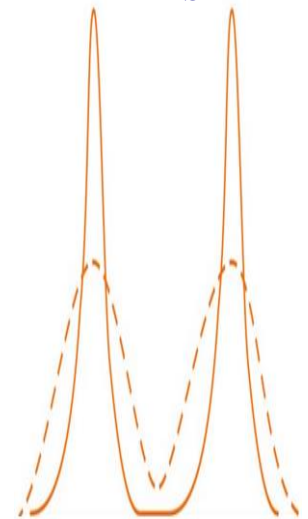


$$\frac{\sigma_{ext}^2}{\sigma_{tot}^2} \leq 10\%$$

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



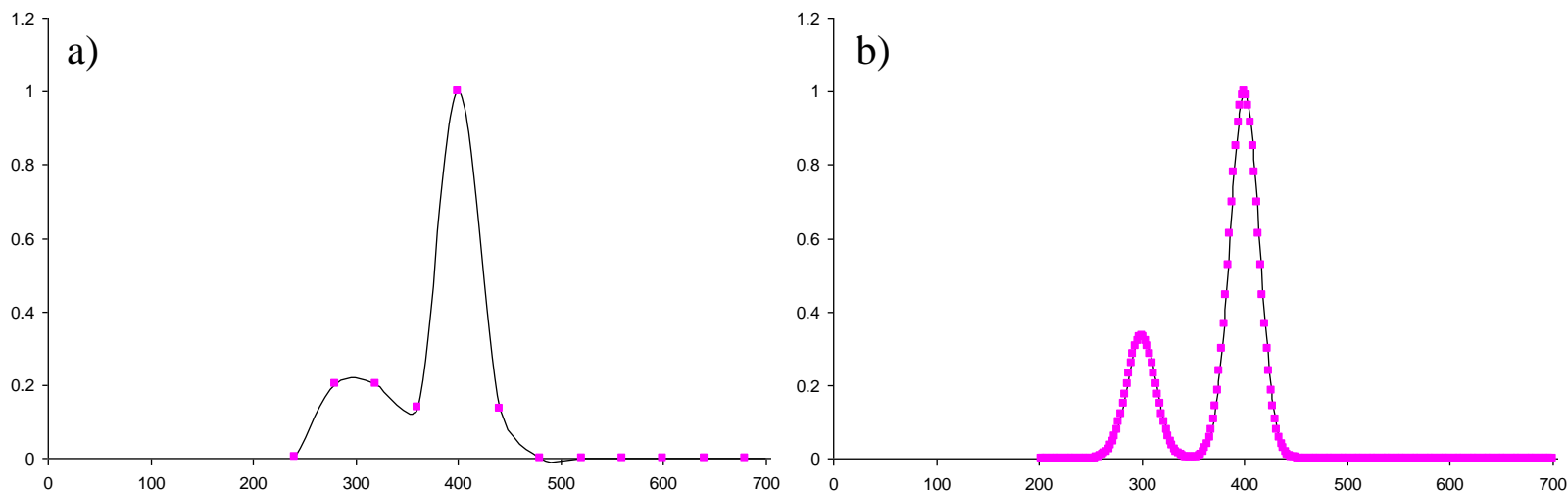
UPLC: $R_s > 2,5$



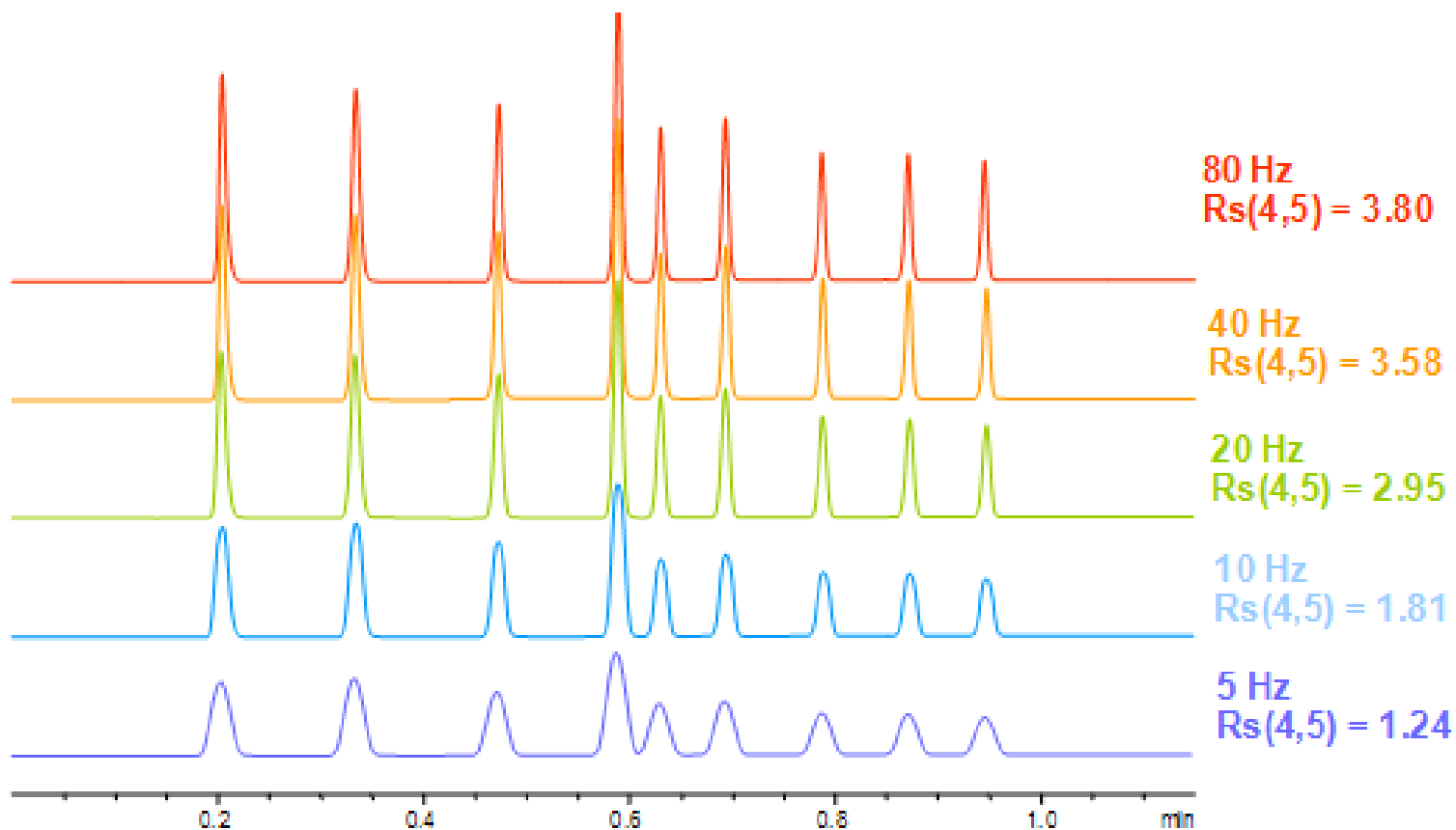
HPLC: $R_s < 1,5$

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

Detektálás során legalább 20 pont/csúcs
mintavételi sebességet kell beállítani!



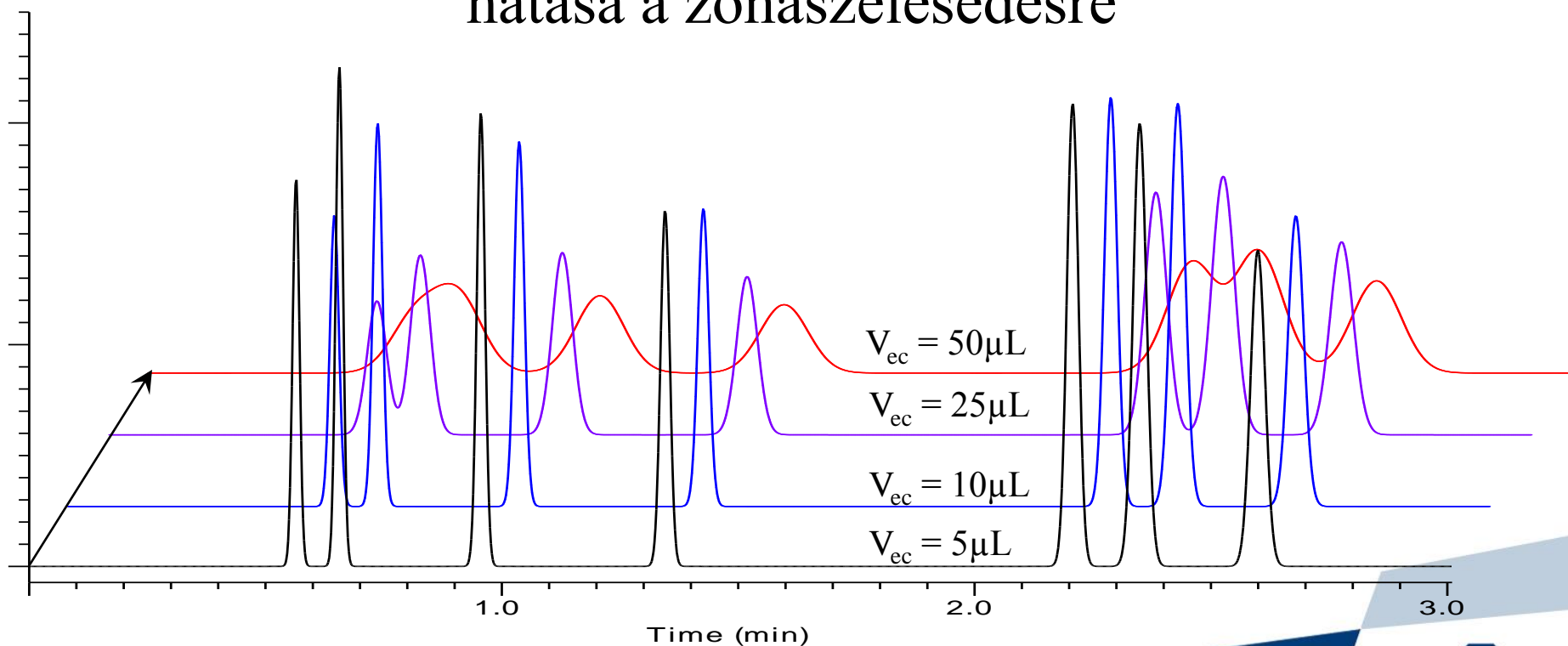
Kolonnán kívüli térfogatok (extra column volume, V_{ec} , σ^2_{ext})



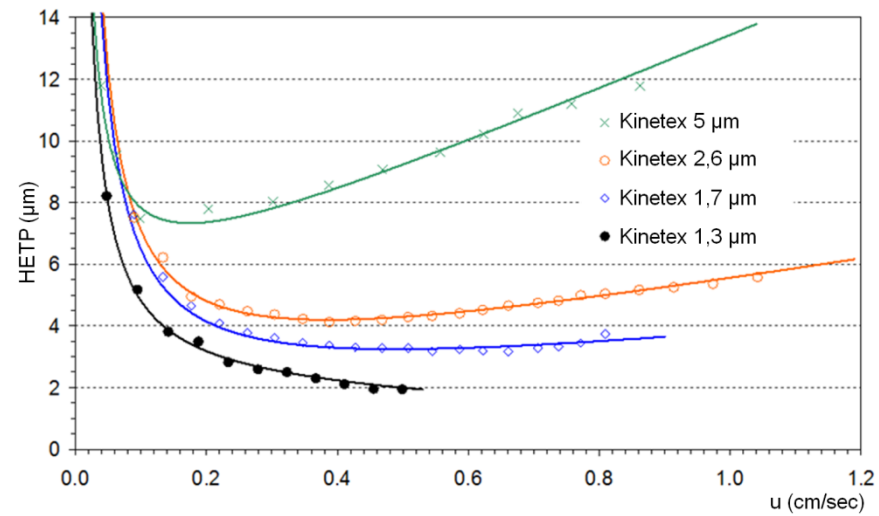
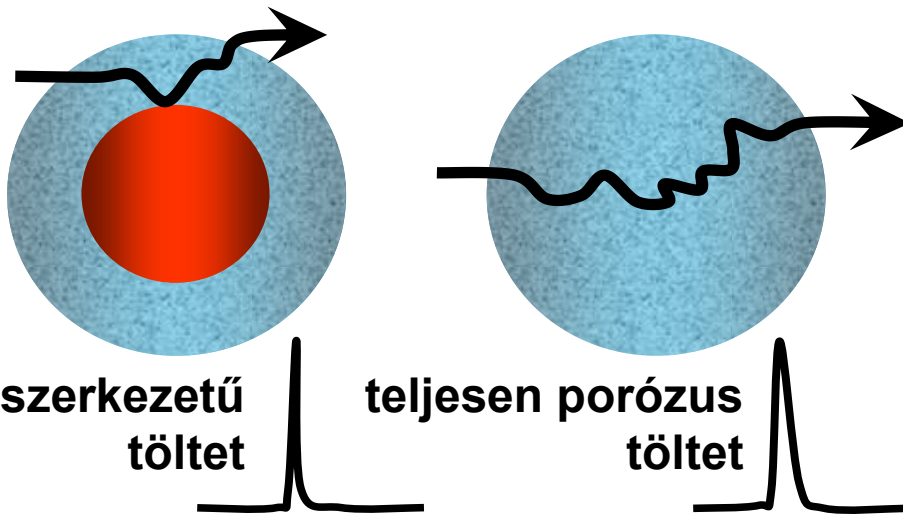
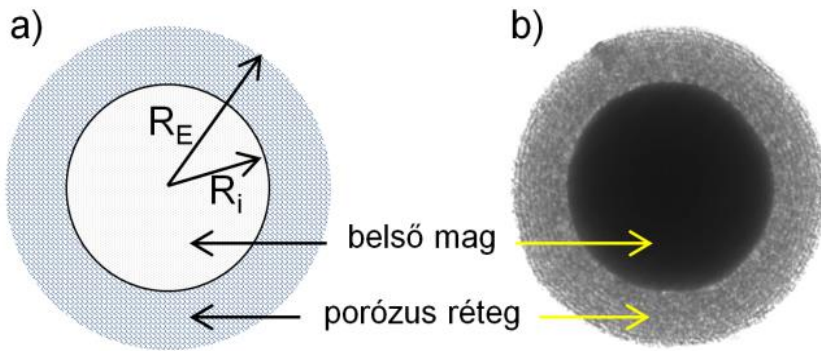
Detektor mintavételi frekvencia
hatása az elválasztás hatékonyságára

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

Az összekötő vezetékek térfogatának
hatása a zónaszélesedésre



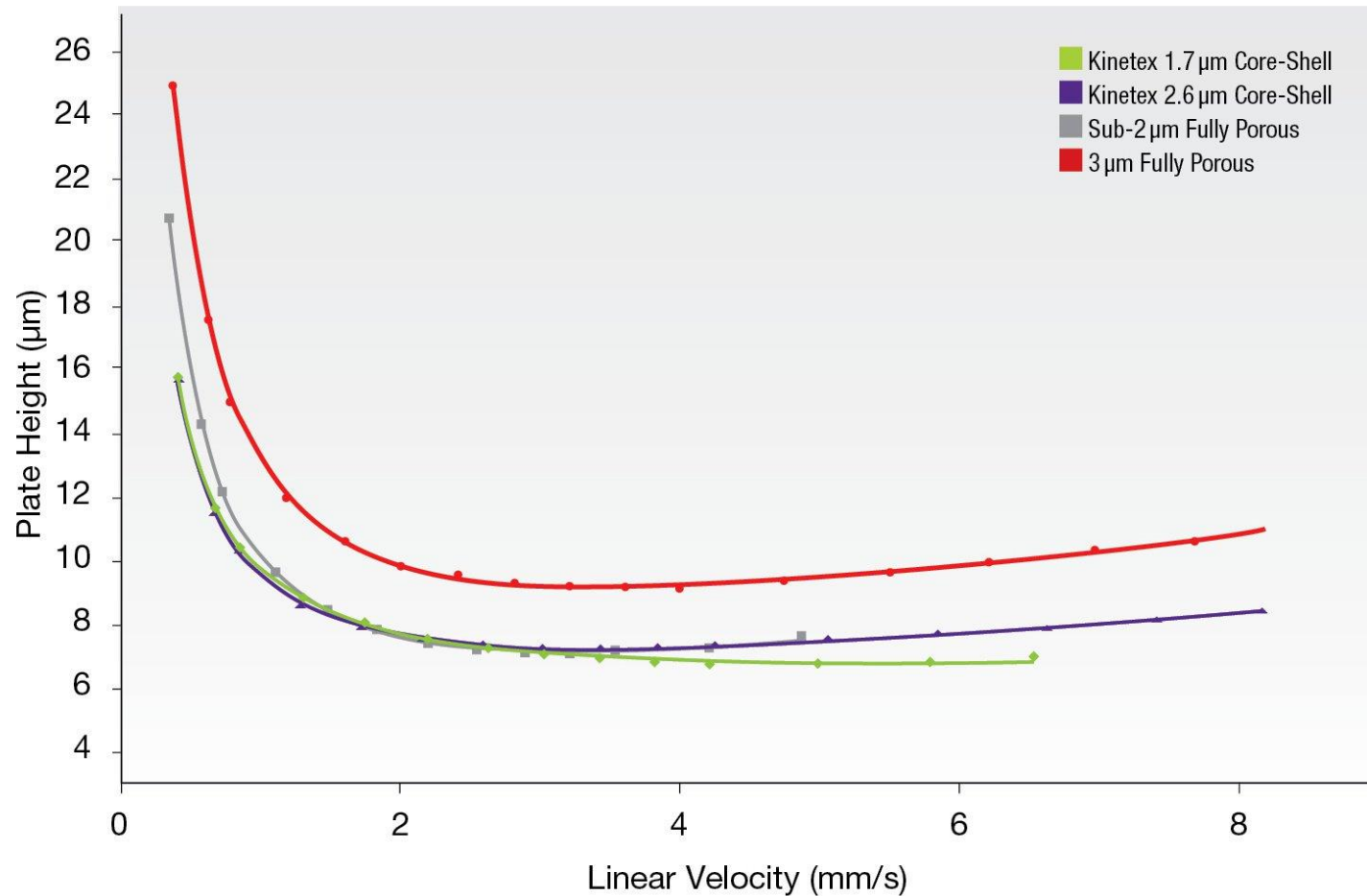
Héjszerkezetű töltetek



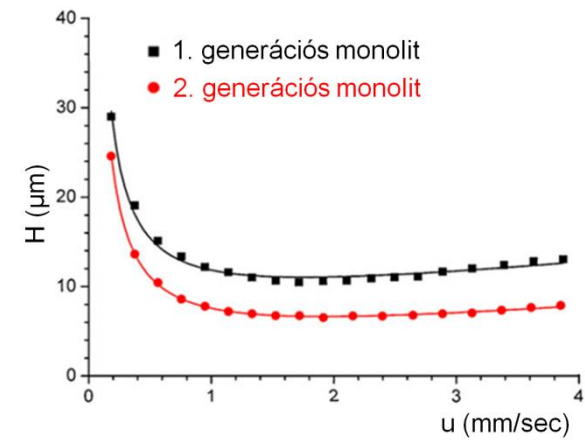
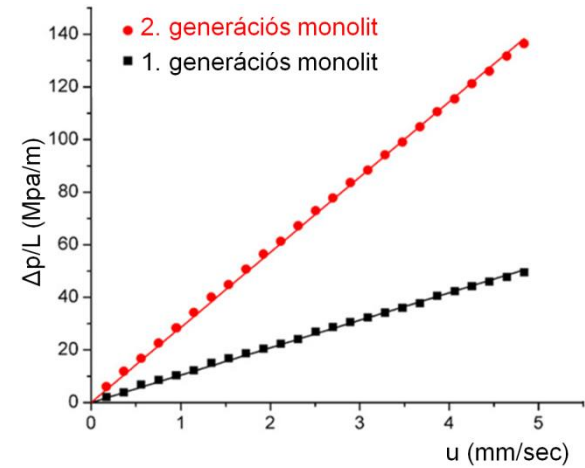
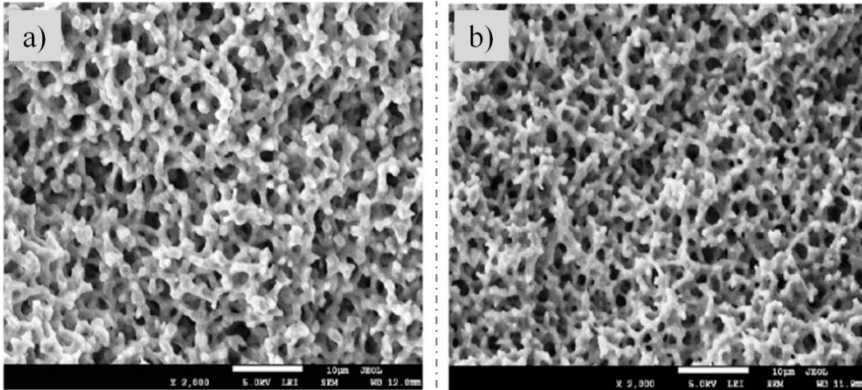
Héjszerkezetű töltetek

Performance of Kinetex Core-Shell Particles

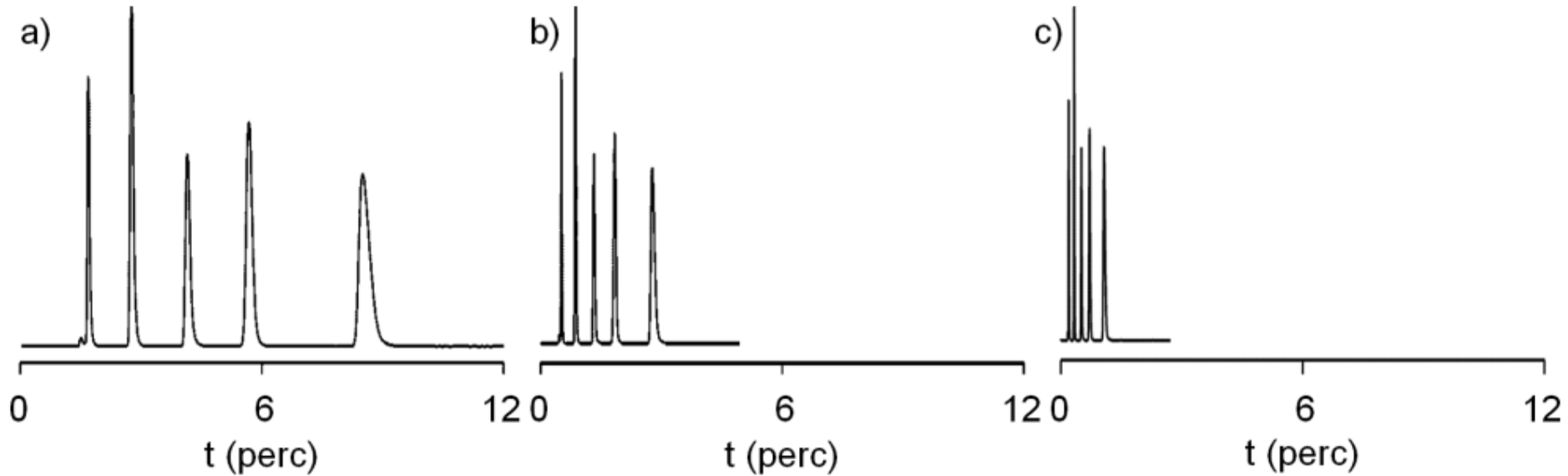
Compared to Fully Porous Sub-2 μm and 3 μm Particles



Monolitok



Monolitok



Elválasztás (100x4,6mm) monolit oszlopon.

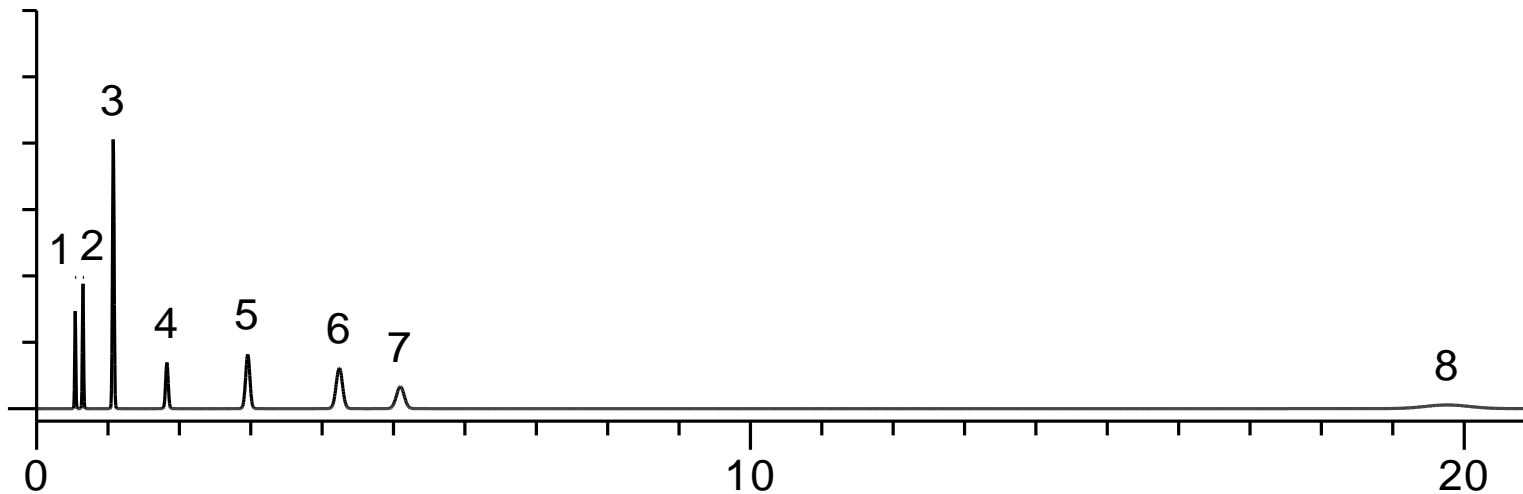
F = 1 mL/perc; p=18bar a)

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

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

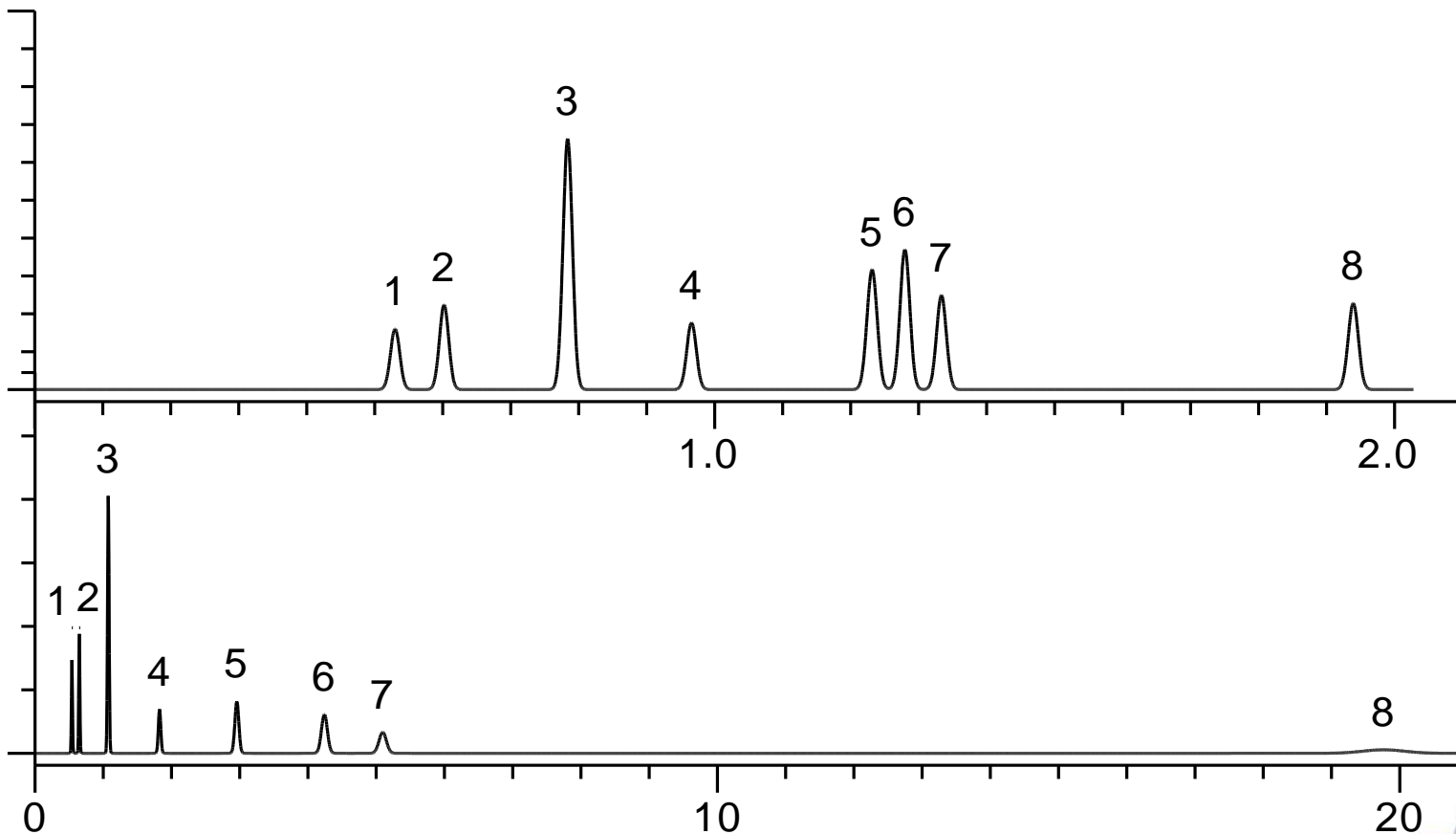
Gradiens elúció

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.

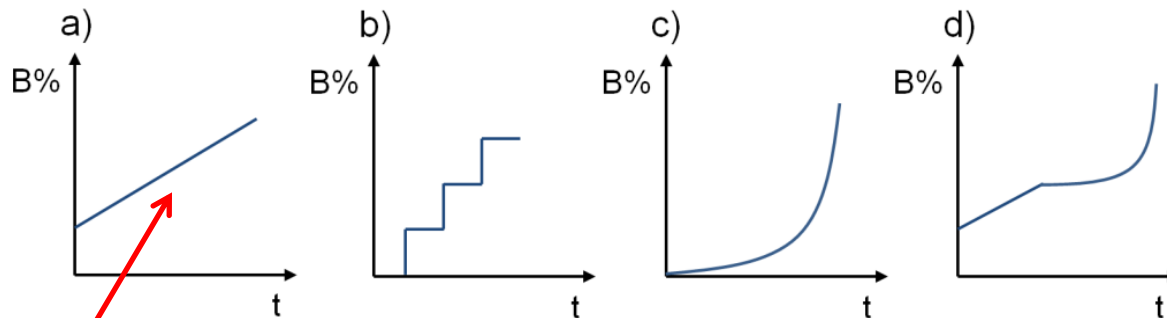


Gradiens elúció

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

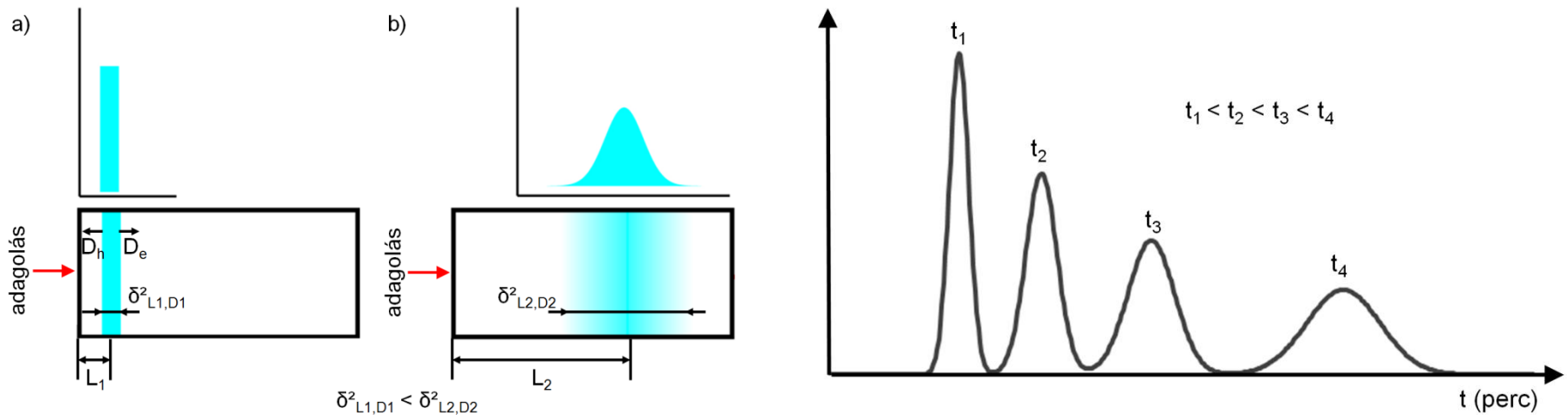
- oldószer gradiensről
- hőmérséklet gradiensről
- pH gradiensről (peptidek esetén jelentős)
- ionpár kromatográfiában ionpár- (elvi) vagy só gradiensről
- szerves vegyület ioncserés elválasztásánál oldószer-, só- vagy hőmérséklet gradiensről

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

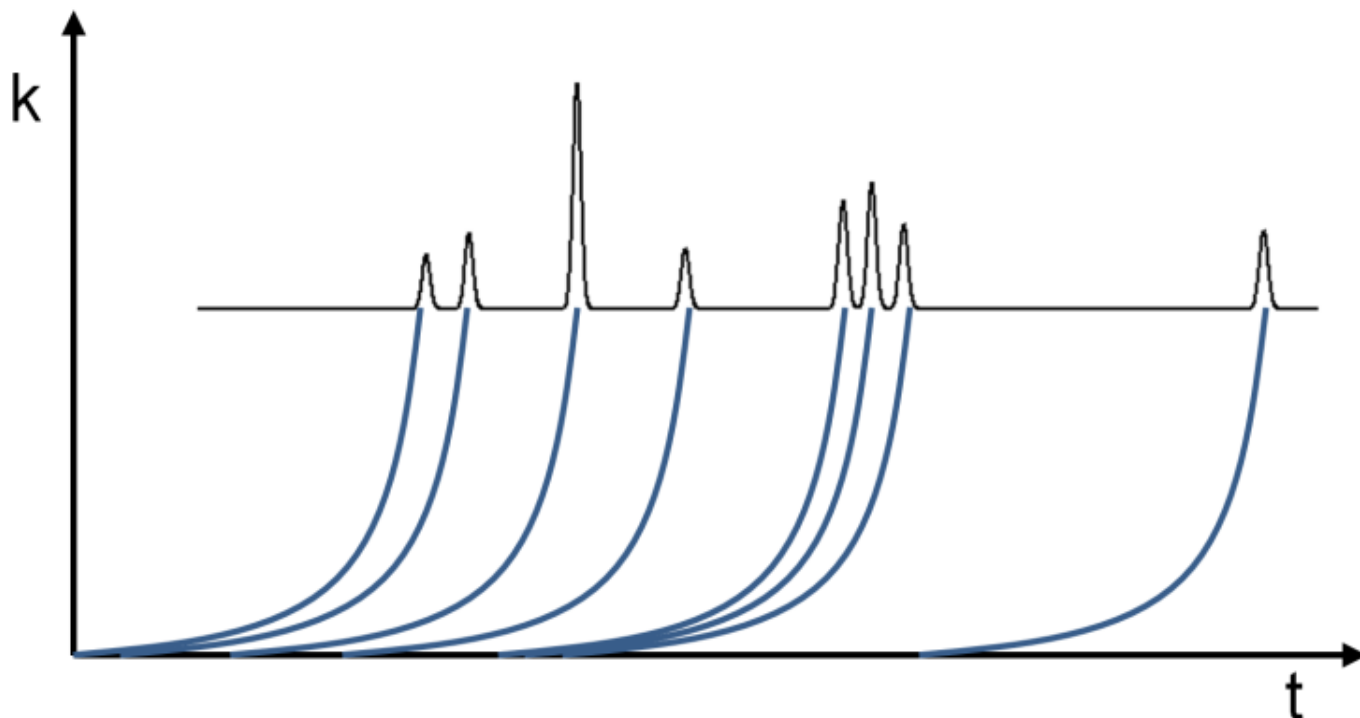


Izokratikus elemzés

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

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

Gradiens elúció

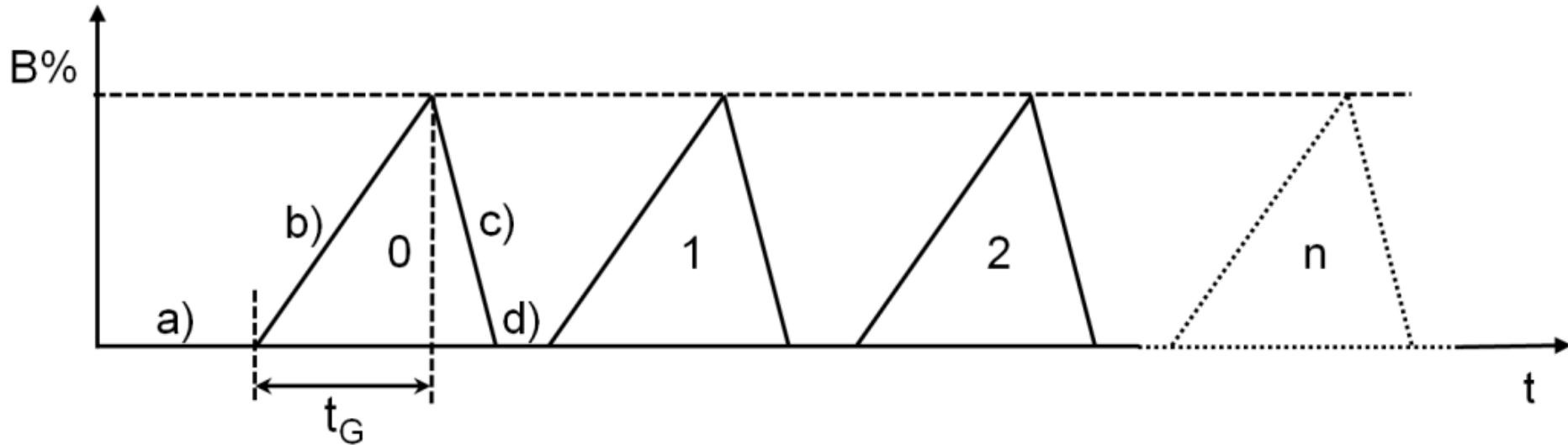


Zóna kompresszió a gradiens elúcióban

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

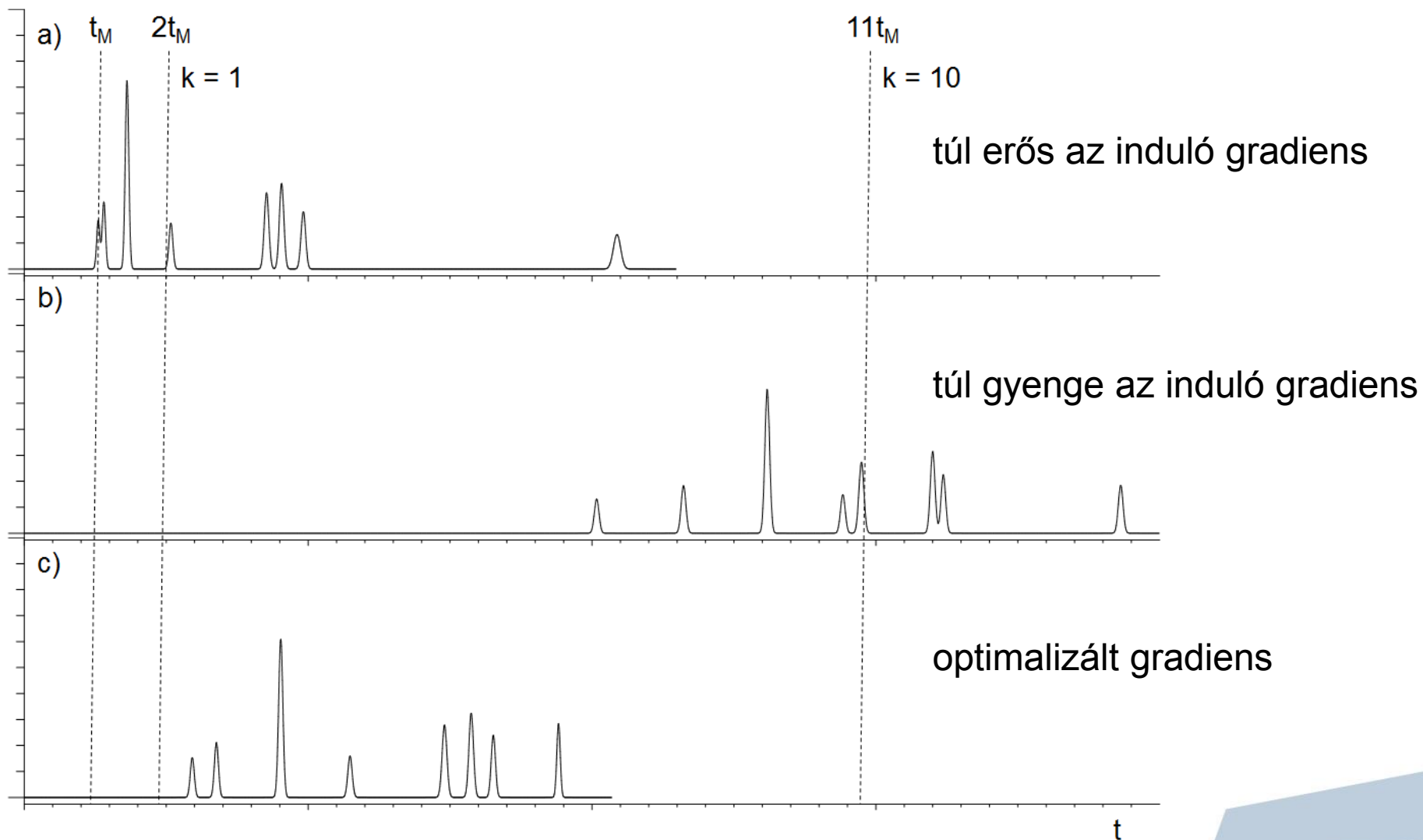
$$n = 1 + \frac{t_G}{1,699 \cdot w_{1/2}}$$

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:

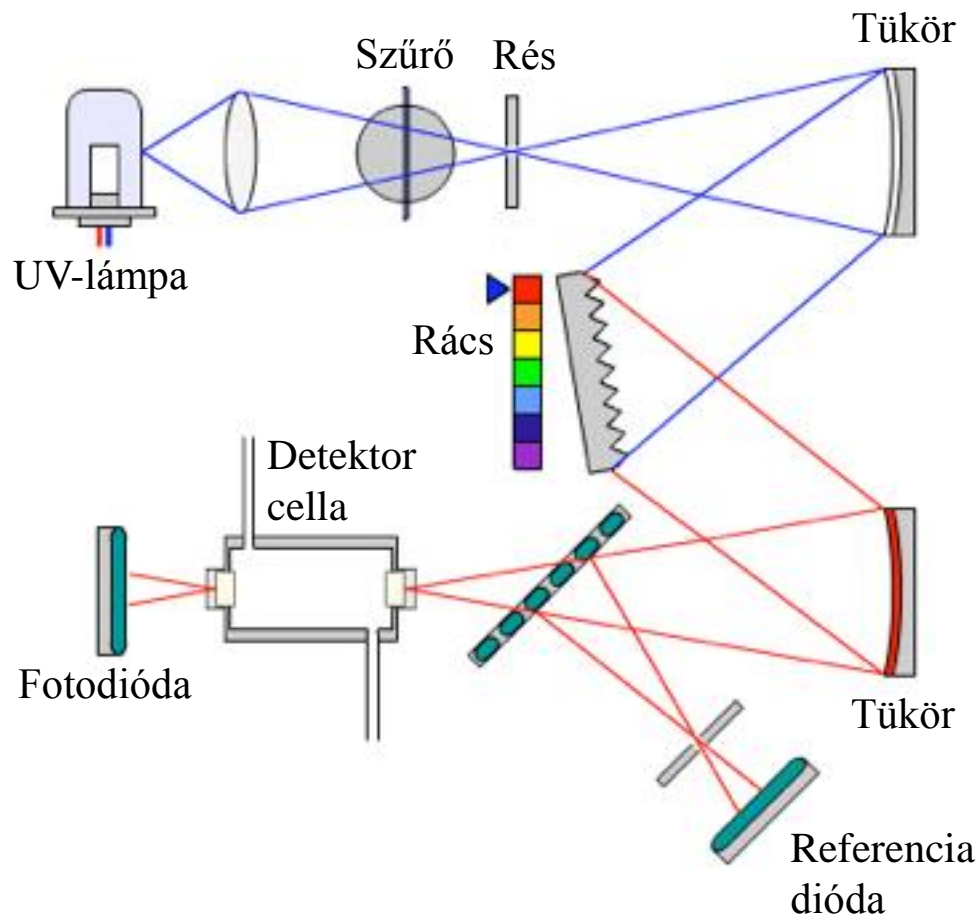
- A detektor érzékenysége és szelektivitása változtatható a megfelelő hullámhossz beállításával.
- Relatív nagy érzékenység (bár ez függ a moláris extinkciós koefficienstől).
- A koncentráció és a detektor jel közötti összefüggés széles koncentráció tartományban lineáris (Lambert-Beer törvény).
- Gradiens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

UV-Vis detektor

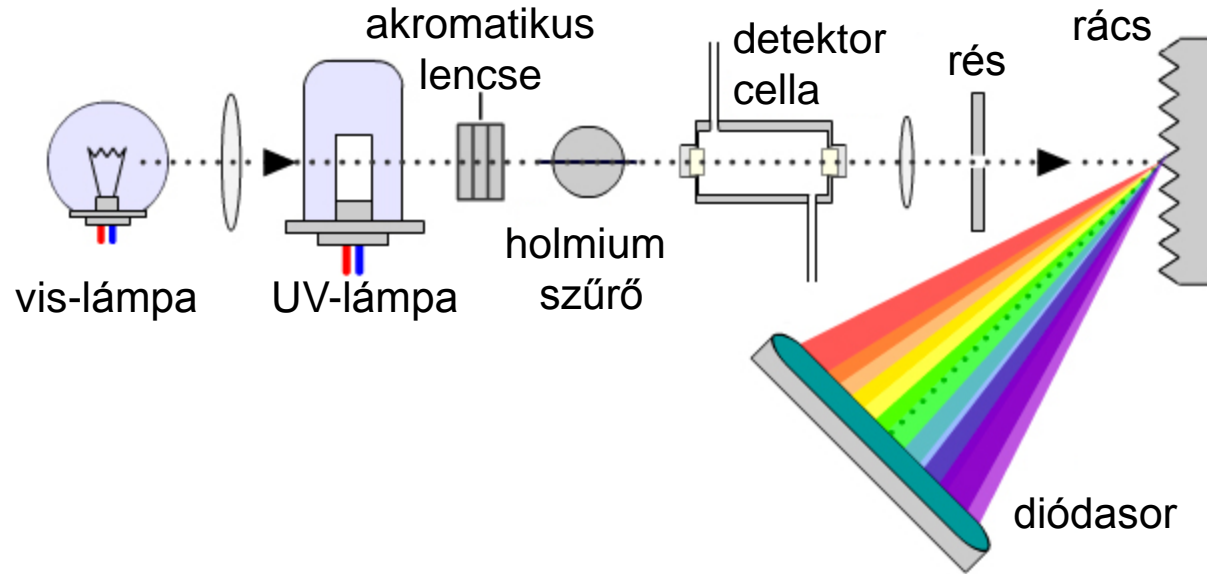
Az UV/Vis detektorok elve:

- 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.

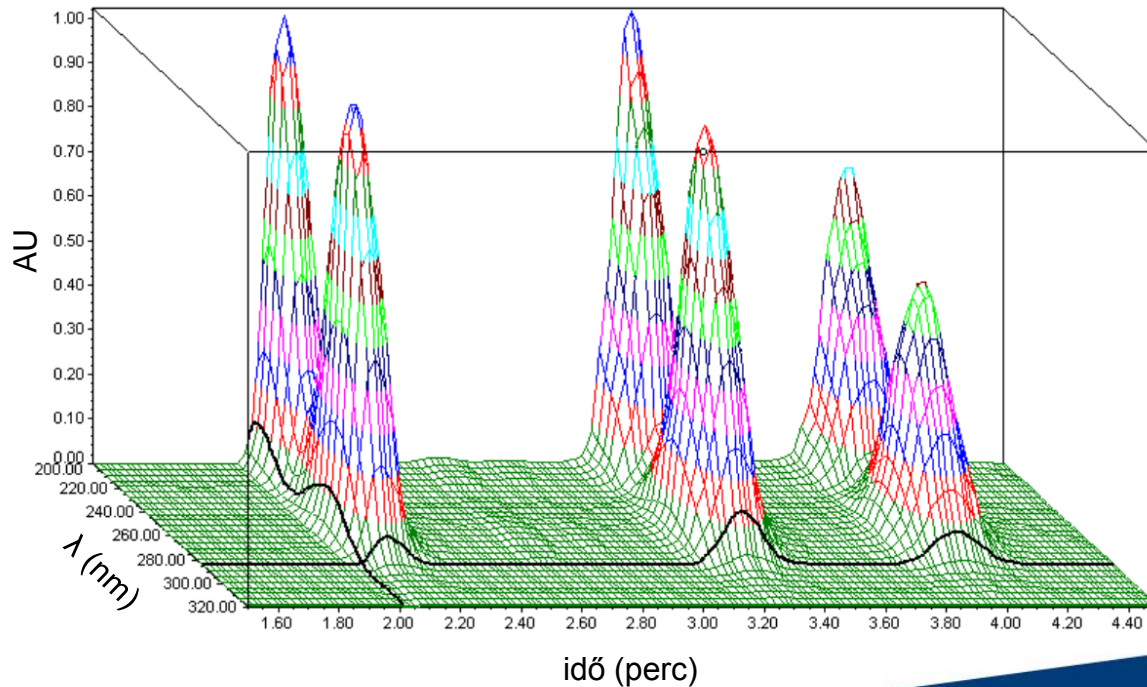
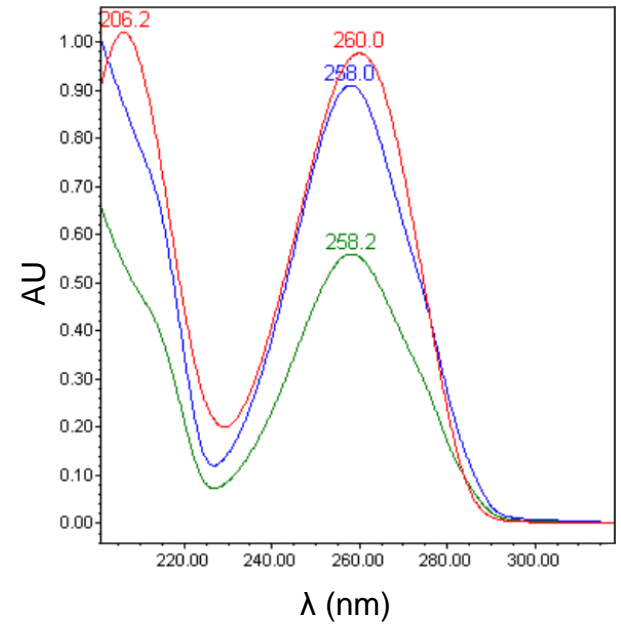
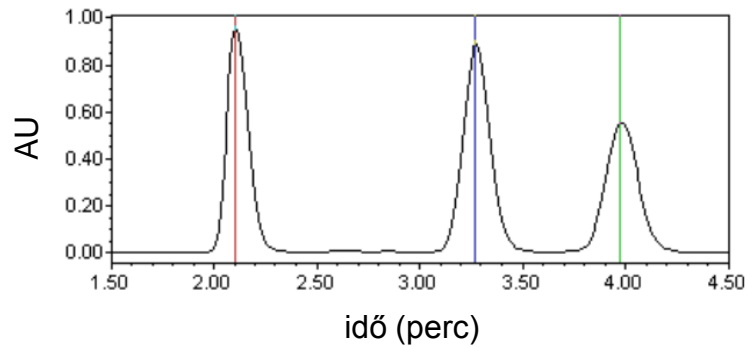
Az UV-Vis detektor felépítése



A PDA detektor felépítése

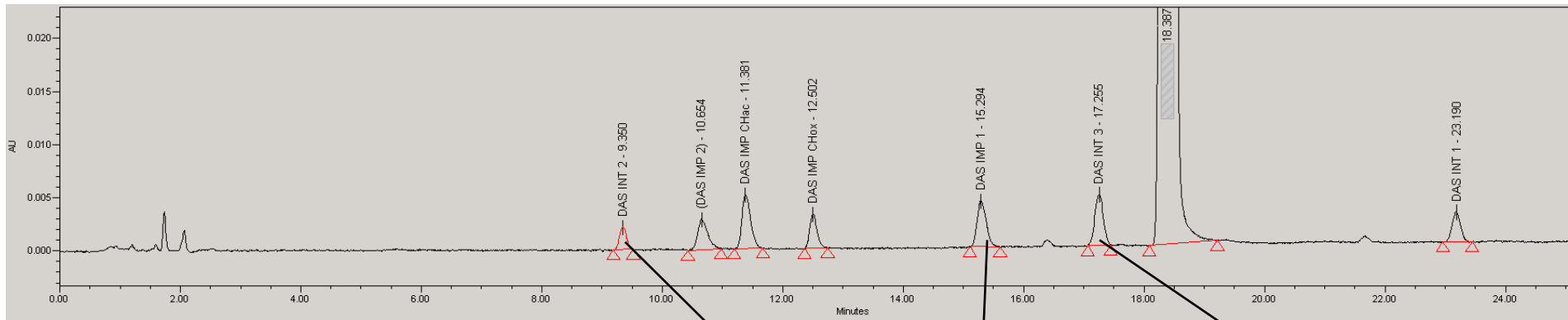


Az UV kromatogram

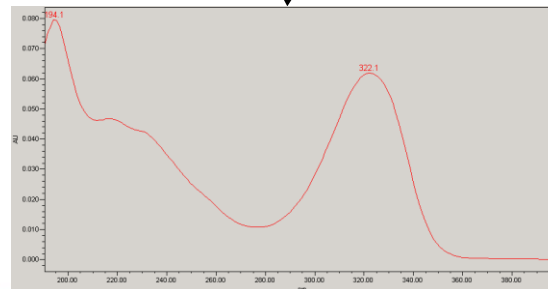
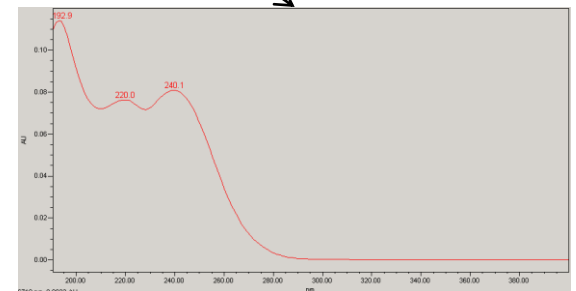
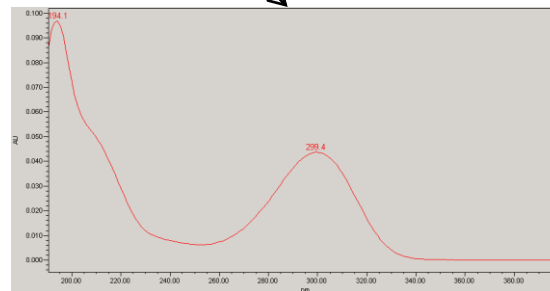


Az UV kromatogram

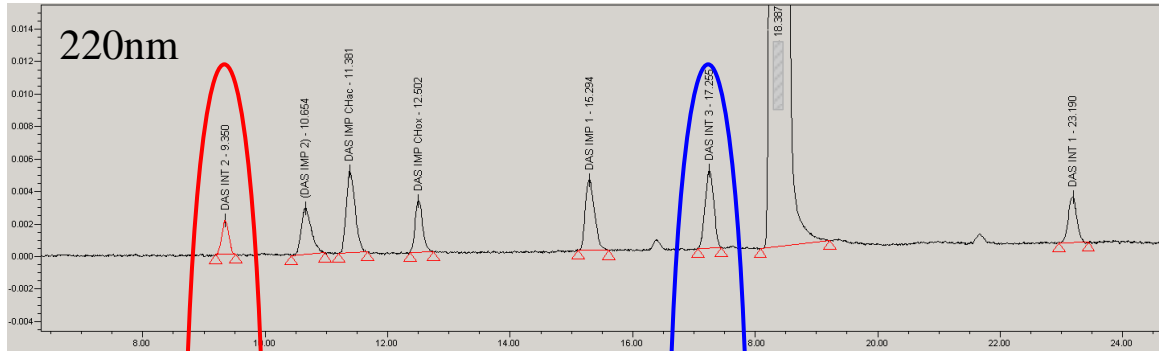
Minőségi és mennyiségi információ



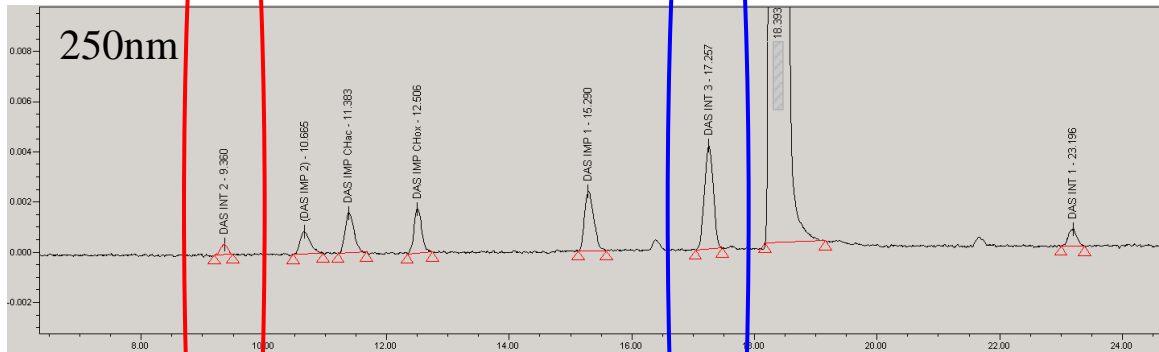
	Name	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)	% Area
1	DAS INT 2	9.350	16491	0.07
2	(DAS IMP 2)	10.654	32995	0.14
3	DAS IMP CHac	11.381	50435	0.22
4	DAS IMP CHox	12.502	26926	0.12
5	DAS IMP 1	15.294	45289	0.19
6	DAS INT 3	17.255	47140	0.20
7		18.387	23057525	98.94
8	DAS INT 1	23.190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



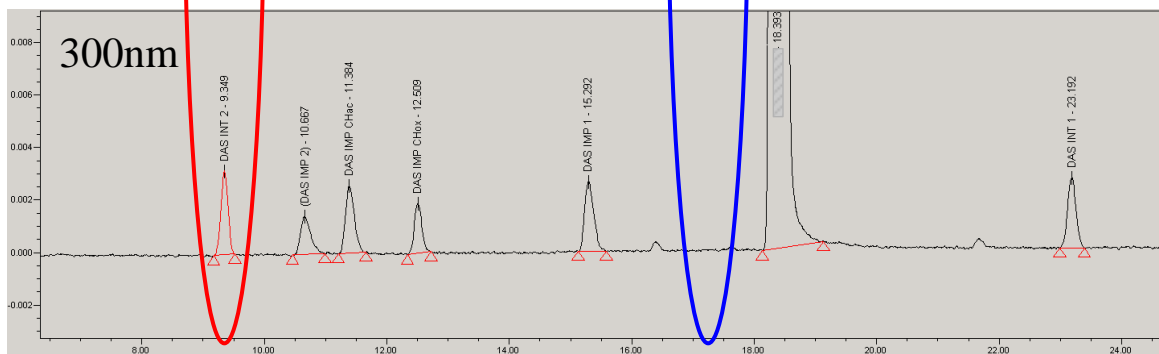
Az UV kromatogram



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

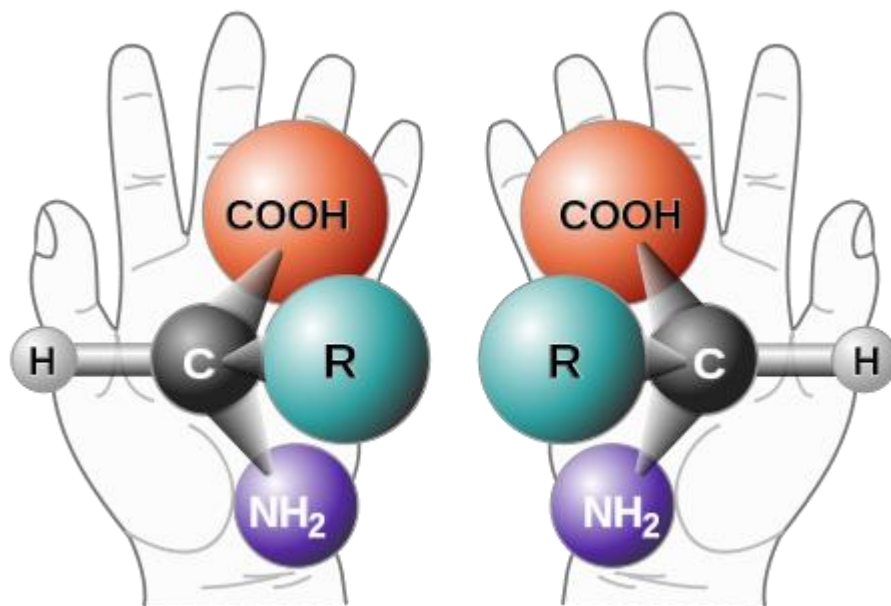


DAS INT 2	9.360	3194	0.02
(DAS IMP 2)	10.665	10078	0.07
DAS IMP CHac	11.383	16025	0.11
DAS IMP CHox	12.506	15315	0.10
DAS IMP 1	15.290	24730	0.17
DAS INT 3	17.257	41451	0.28
	18.393	14621720	99.20
DAS INT 1	23.196	6644	0.05

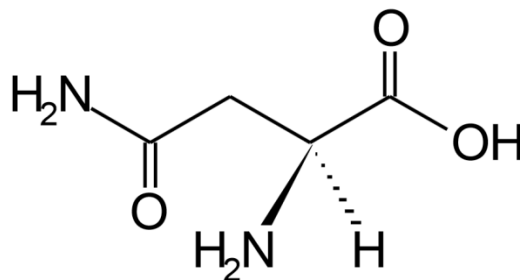


DAS INT 2	9.349	25895	0.18
(DAS IMP 2)	10.667	16733	0.12
DAS IMP CHac	11.384	25643	0.18
DAS IMP CHox	12.509	16195	0.11
DAS IMP 1	15.292	27504	0.19
DAS INT 3	17.420		
	18.393	14022675	99.03
DAS INT 1	23.192	25773	0.18

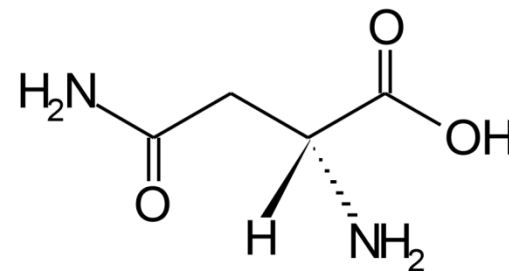
Királis HPLC



Ízlelhető kiralitás:

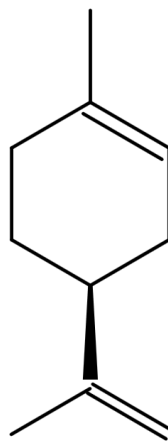


S-aszparagin (édes)

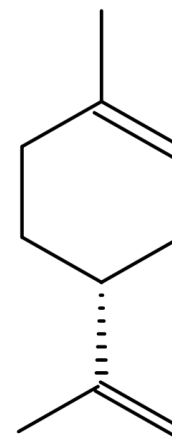


R-aszparagin (keserű)

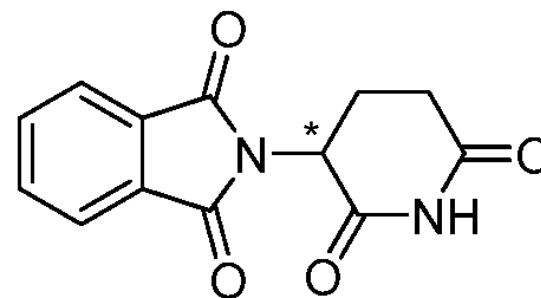
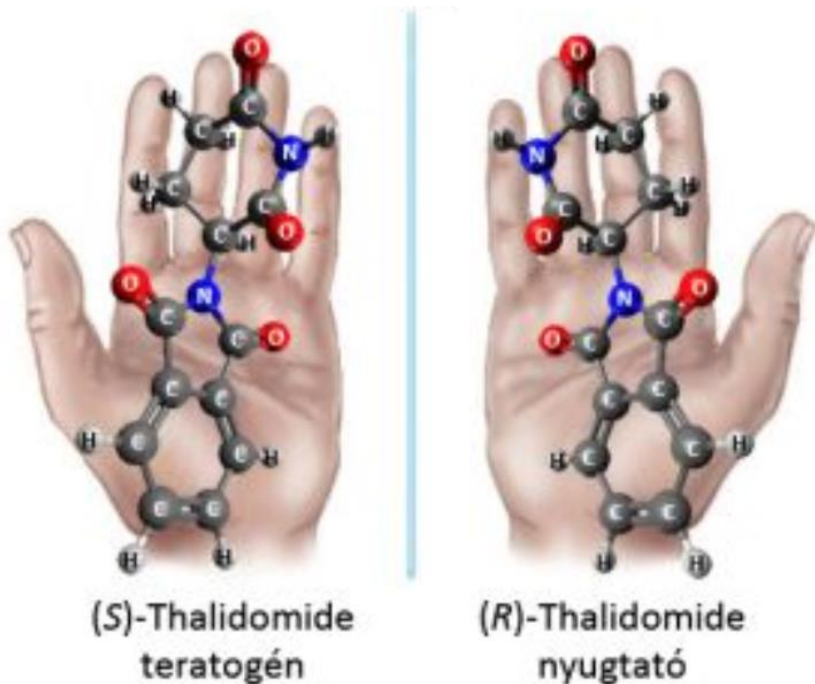
Szagolható kiralitás:



S-limonén (citrom illat)



R-limonén (narancs illat)

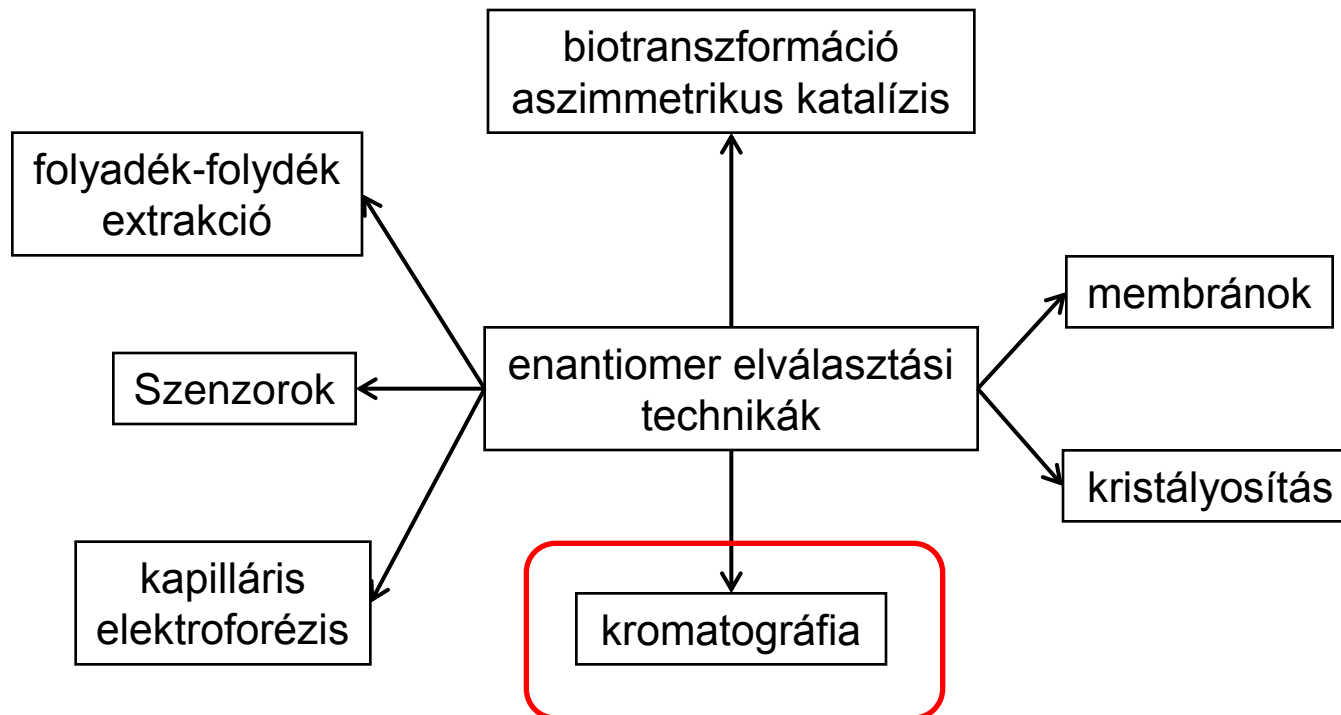


ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

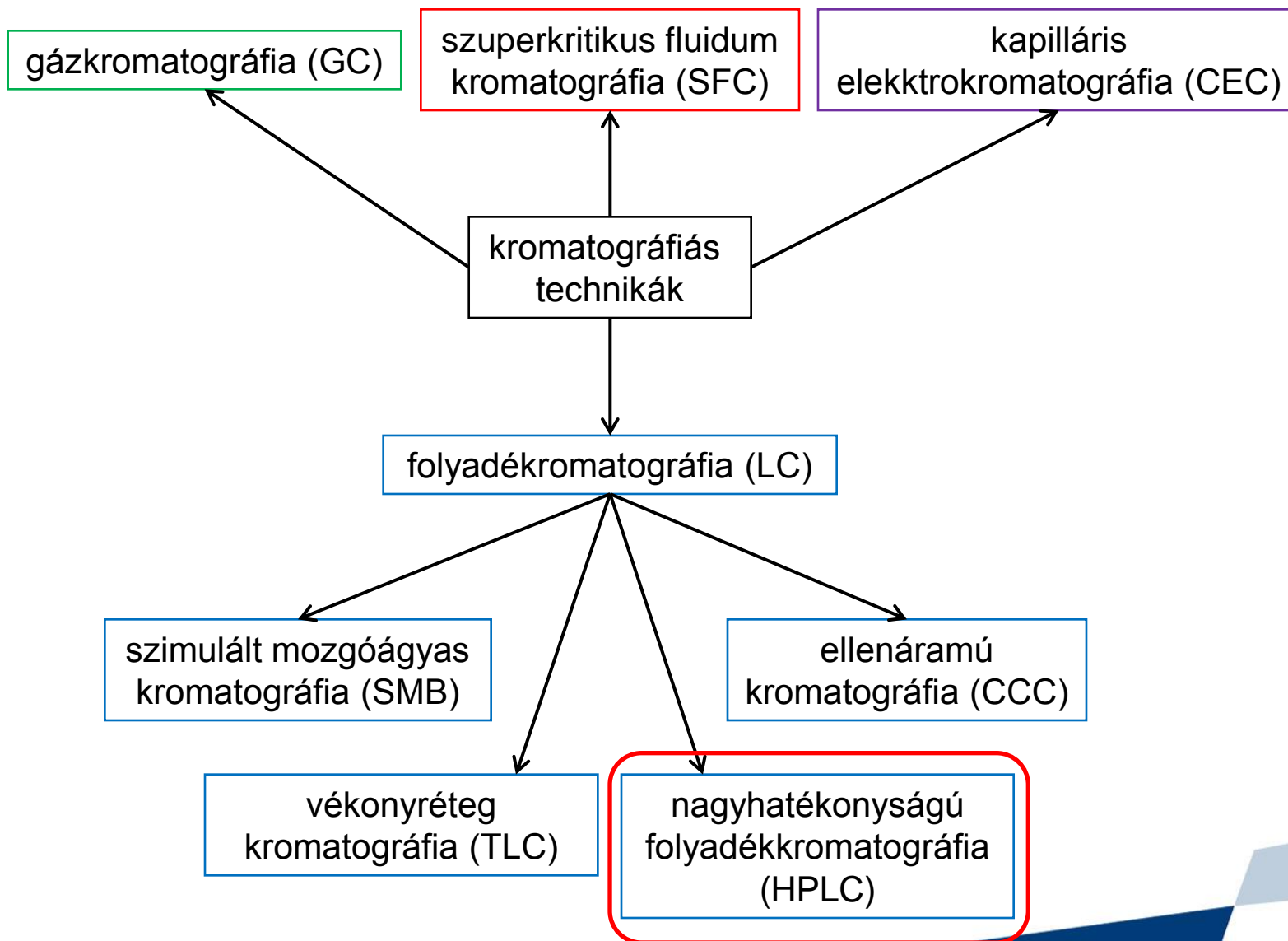
SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA
FOR NEW DRUG SUBSTANCES AND NEW DRUG PRODUCTS:
CHEMICAL SUBSTANCES

Q6A

Enantiomer elválasztási lehetőségek



Kromatográfias elválasztási 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 kromatográfias 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 kromatográfias módszereket két fő típusba lehet sorolni:

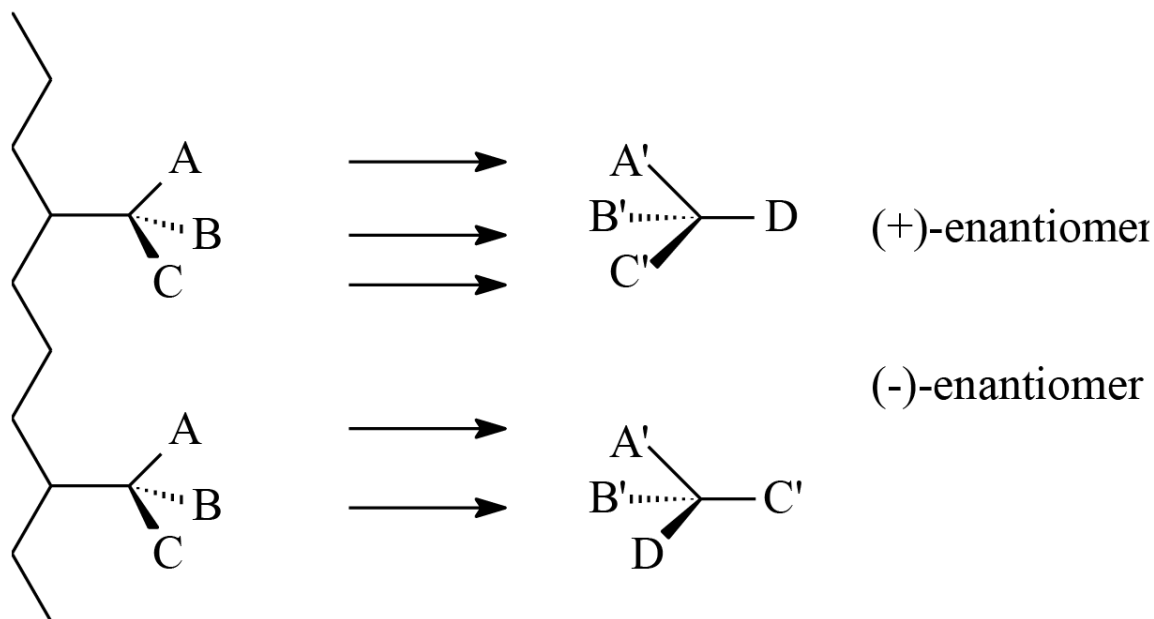
- közvetett (indirekt)
- közvetlen (direkt) meghatározás.

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.

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.



A közvetett és közvetlen királis folyadékkromatográfiai 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

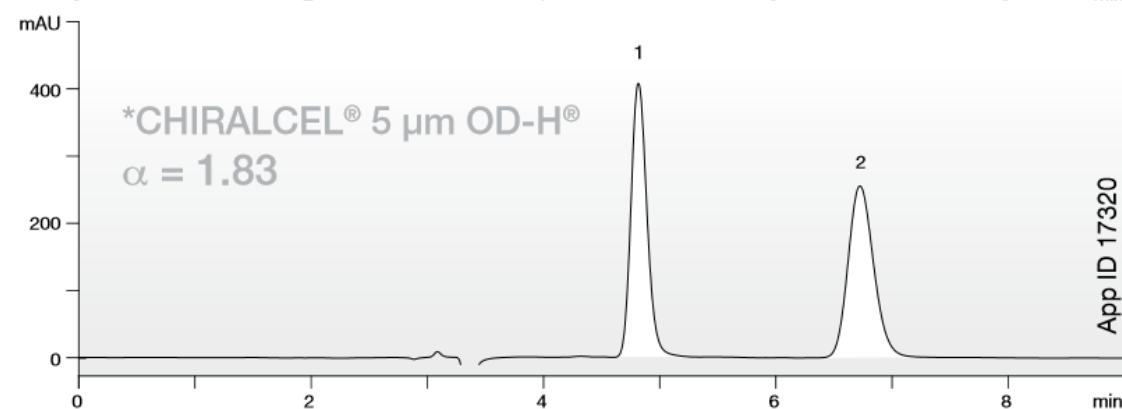
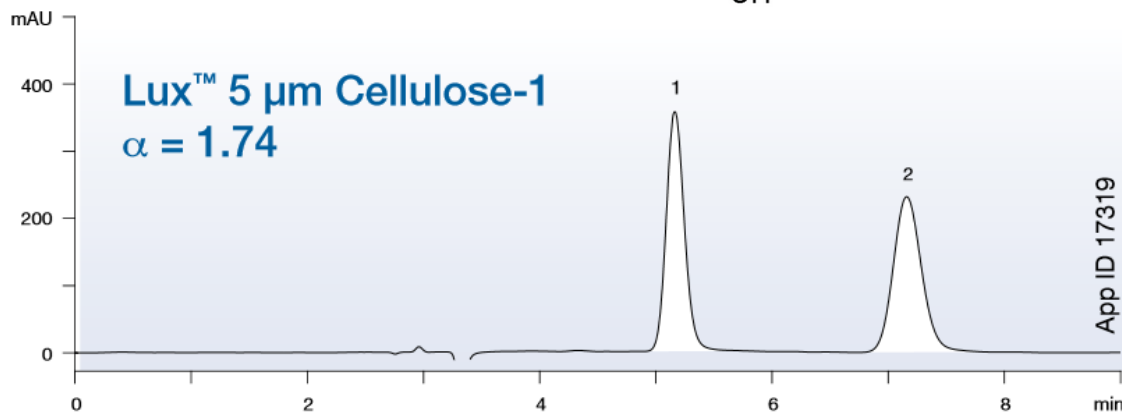
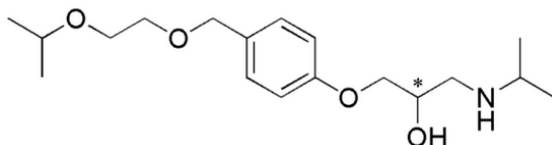
Hátrányok	
Közvetett módszerek	Közvetlen módszerek
<p>A származékképző enantiomer tisztasága kritikus.</p> <p>A képződött diasztereomerek moláris abszorbanciája különbözhet.</p> <p>A származékképzés során racemizáció léphet fel.</p> <p>A reagens feleslege és a melléktermékek zavaró csúcsként jelentkezhetnek.</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

Királis kromatogram

Bisoprolol



Conditions for both columns:

Dimensions: 250 x 4.6 mm

Mobile Phase: 0.1 % Diethylamine in Hexane /
0.1 % Diethylamine in Isopropanol (80:20)

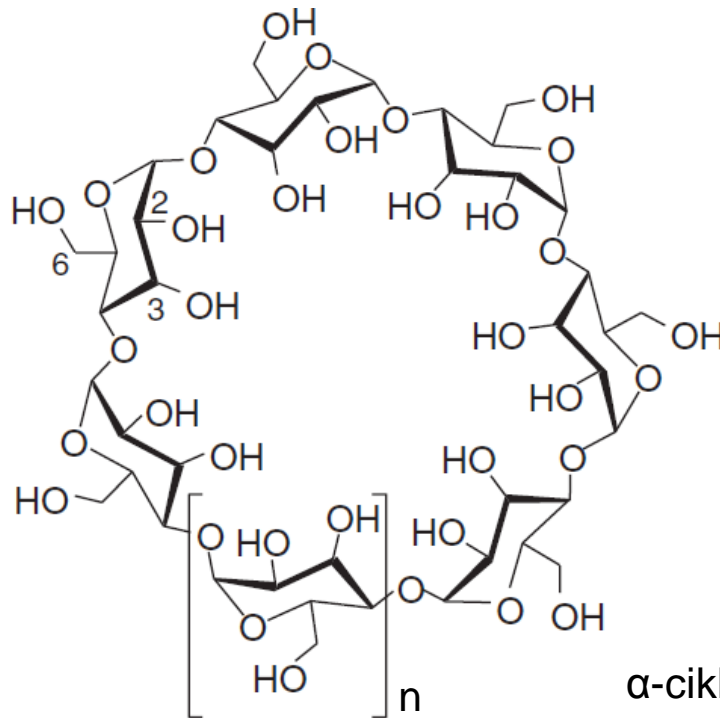
Flow Rate: 1 mL/min

Detection: UV @ 220 nm

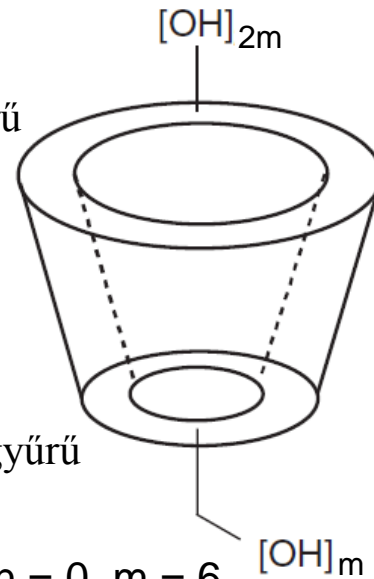
Temperature: Ambient

Királis állófázisok

Ciklodextrinek



felső gyűrű



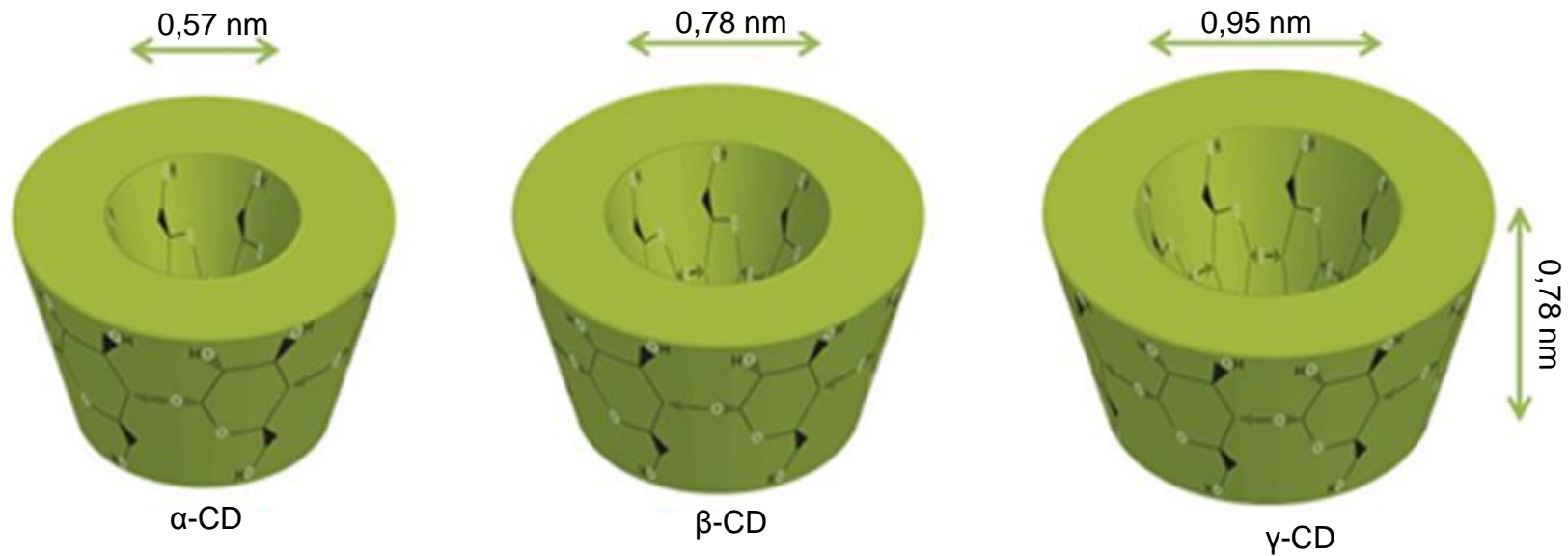
α -ciklodextrin $n = 0, m = 6$

β -ciklodextrin $n = 1, m = 7$

γ -ciklodextrin $n = 2, m = 8$

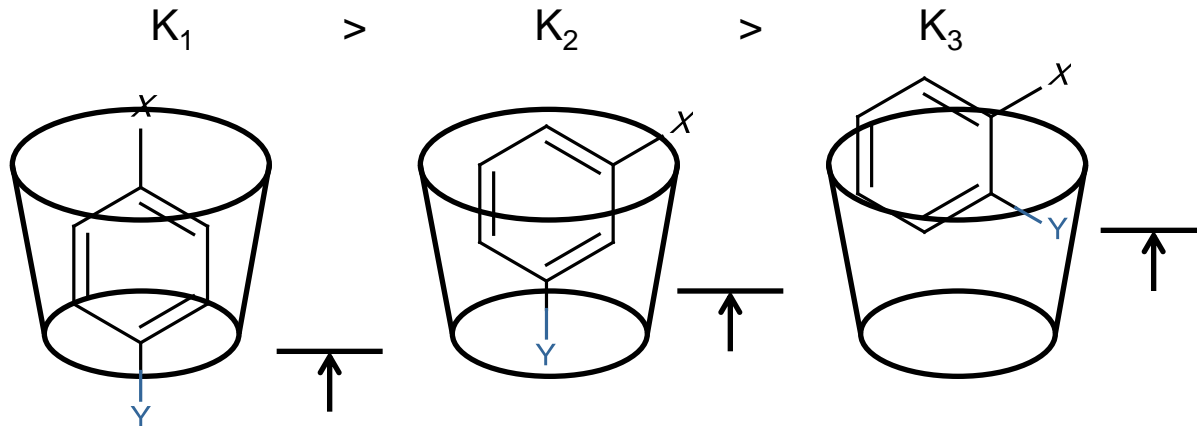
Királis állófázisok

Ciklodextrinek



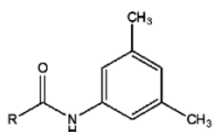
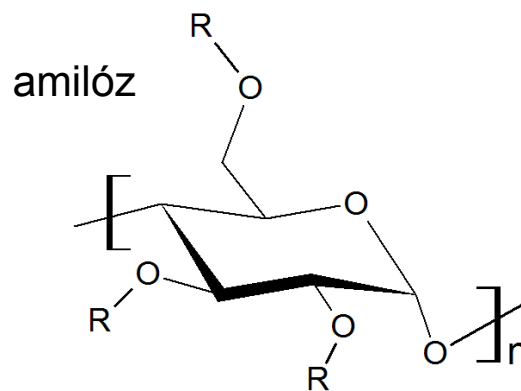
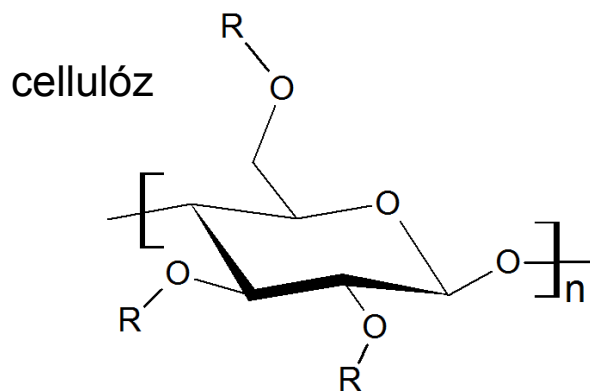
Királis állófázisok

Ciklodextrinek

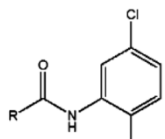


Királis állófázisok

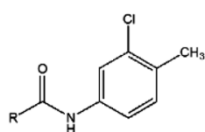
Poliszacharid alapú állófázisok



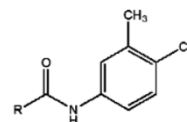
3,5-dimetil-fenil-karbamát



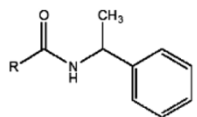
5-klór-2-metil-fenil-karbamát



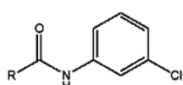
3-klór-4-metil-fenil-karbamát



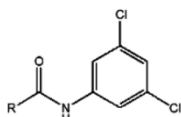
4-klór-3-metil-fenil-karbamát



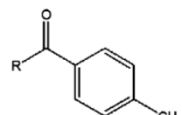
(S)-alfa-metil-benzil-karbamát



3-klór-fenil-karbamát



3,5-diklór fenil-karbamát

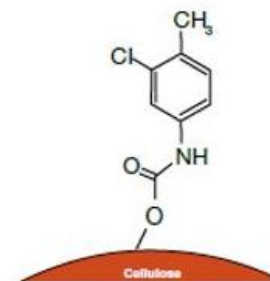
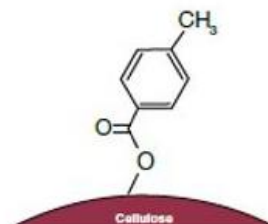
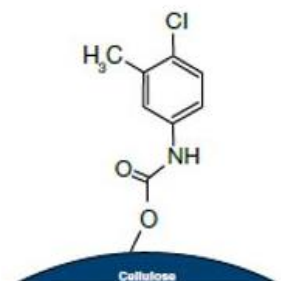
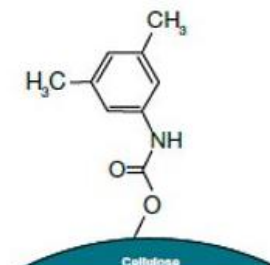
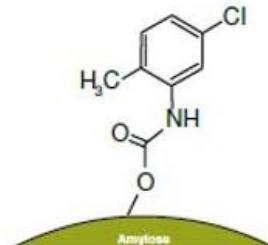
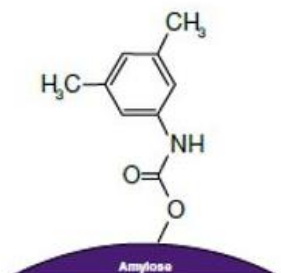
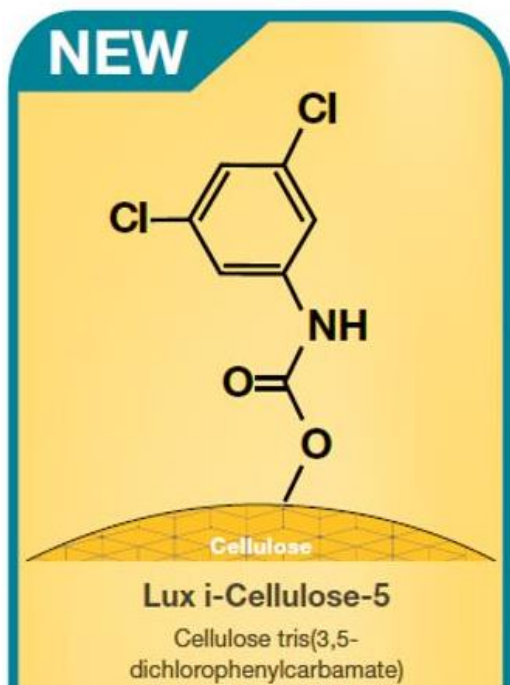


4-metil-benzoát



Királis állófázisok

Poliszacharid alapú állófázisok



Királis állófázisok

Poliszacharid alapú állófázisok

Láncvég	Gyártó Típus	Phenomenex (Lux)		Chiral Technologies (Daicel)		YMC (Chiral Art)	
		borított	immobilizált	borított	immobilizált	borított	immobilizált
3,5-dimetil-fenil-karbamát	amilóz	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	Cellulose-5	-	-	Chiralpak IC	-	Cellulose-SC
4-metil-benzoát	amilóz	-	-	-	-	-	-
	cellulóz	Cellulose-3	-	Chiralcel OJ	-	-	-

Királis állófázisok

Ioncserélő királis állófázisok

