

Fordított fázisú ionpár- kromatográfia (Reversed Phase Ion-Pair Chromatography, RP-IP-HPLC)

Az ionos vagy ionizálható vegyületek visszatartása az RP-HPLC-ben kicsi. A visszatartás növelésére és egyúttal a fordított fázisú kromatográfias rendszer szelektivitásának növelésére az eluensbe 1-100 mmol/dm³ koncentráció tartományban ionpárképző hidrofób iont tesznek. A hidrofób ionok nagy része ionos jellegű felületaktív anyagból származik. A hidrofób ion töltése ellentétes, mint a meghatározandóé.

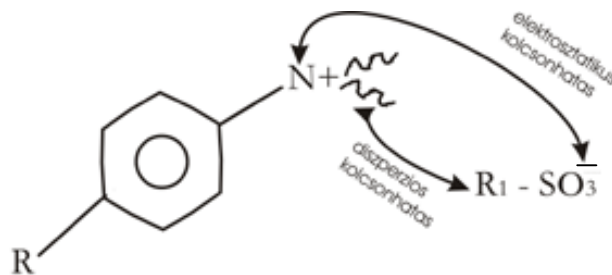
Például egy alkalmazható mozgófázis lehet RP-IP-HPLC-ben :CH₃-(CH₂)_n-SO₃-Na⁺ + víz+MeOH. Aromás vegyületet nem lehet hidrofób ionként alkalmazni., mert az lehetetlenné tenné a detektálást, mivel ezek a vegyületek 190-300 nm tartományban elnyelik az UV-fényt.

Az elválasztás több, egymás mellett lejátszódó folyamat eredménye:

1. Változások a mozgó fázisban

A meghatározandó ionos formában lévő vegyület molekulája és a hidrofób ion között kétféle kölcsönhatás alakul ki:

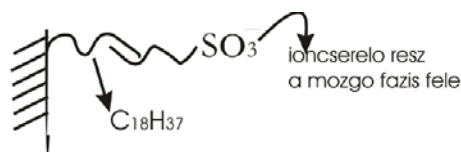
- elktrosztatikus kölcsönhatás a molekulák poláris (töltéssel rendelkező) része között
- diszperziós (apoláris, hidrofób) kölcsönhatás a molekulák apoláris részei között



A két „egyesült” molekula egy közös szolvátburokba kerül, amely kifelé semleges töltéssel rendelkezik. Ez tehát egy apoláris molekula-asszociátum, amely kölcsönhatásba lép az apoláris állófázissal. Az állófázis lehet például egy alkilmódosított szilikagél. A szorbeálódó apoláris molekula-asszociátum és az állófázist apoláris jellegét alkilláncok között apoláris-apoláris kölcsönhatás alakul ki(diszperziós kölcsönhatás).

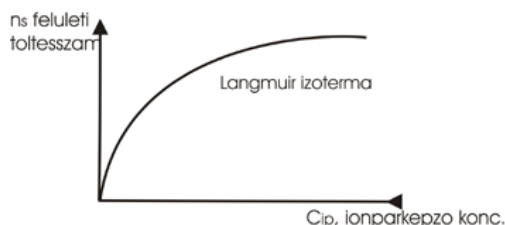
2. Változások az állófázisban

A hidrofób ion adszorbeálódik az állófázis felületén, s mivel a hidrofób ion töltéssel rendelkező poláris része fordul a mozgófázis felé, apoláris része pedig az állófázis



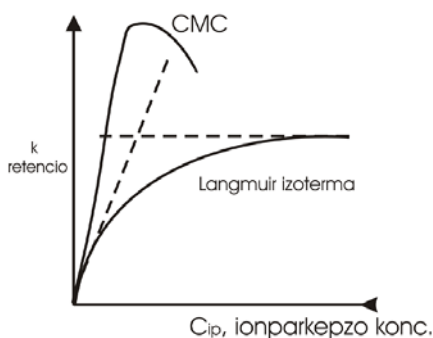
alkilláncaival lép kapcsolatba, ioncserélő hely alakul ki az amúgy apoláris állófázis felületén. Az ioncserélő helyen pedig lehetőség van a meghatározandó ionos vegyület megkötődésére.

Összességében megállapíthatjuk, hogy minél nagyobb az állófázison a felületi töltéssűrűség, annál nagyobb lesz a rendszer visszatartása, tehát annál hatékonyabb lesz a rendszer. A felületi töltéssűrűség az ionpárképző hidrofób ion mozgó fázisban lévő koncentrációjától függ, mégpedig a következőképpen:

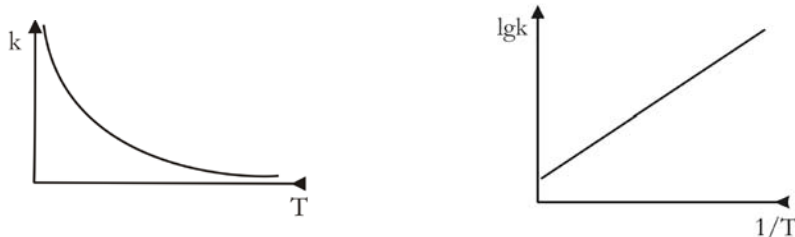


A változás tehát egy úgynevezett Langmuir- típusú görbével írható le. Minél több ionpárképző adszorbeálódik az állófázison, annál nagyobb a retenció.

Az ionpárképző koncentrációjával az ellentétes töltésű vegyület visszatartása nő, majd egy idő után állandó értéket ér el, sőt csökkenhet is.



Ez a görbelefutás akkor jellemző, ha a hidrofób ion (felületaktív anyag) micellákat képez a mozgófázisban. A micella ugyanis megnöveli a meghatározandó vegyület oldhatóságát az adott fázisban (mozgófázisban), s így csökken a visszatartás. A görbe maximum pontjához tartozó koncentráció érték a kritikus micella koncentráció (CMC). Fontos paraméter még az ionpárképző láncossza. A hidrofób ion láncosságának növelésével az adszorpciója nő az apoláris állófázis felületén. A nyílt láncú alkil-csoportot tartalmazók jobban adszorbeálódnak, mint az elágazók, tehát azonos szénatomszám mellett nagyobb lesz a vegyület retenciója. Szintén fontos paraméter a hőmérséklet, amely az egyensúlyi állapotokat befolyásolja, ezért állandó értéken kell tartani, termosztálásra van szükség. A visszatartás hőmérsékletfüggésére felírható a következő összefüggés: $\lg k = -A/T + B$ Látható, hogy a hőmérséklet növelésével

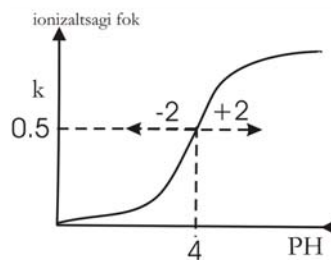


csökken a retenció.

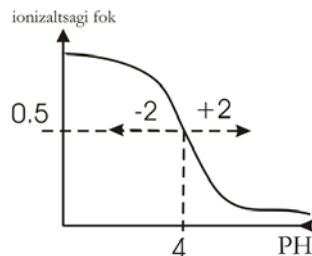
A szerves oldószer forráspontja alá maximum 10-20 °C lehet elmenni, az alsó határ a víz kifagyása. Például Víz – Acetonitril mozgófázis esetén a hőmérséklettartomány: 5 – 60 °C.

Mivel a vegyületek csak bizonyos pH tartományban fordulnak elő ionos formában, ezért ügyelni kell arra is, hogy a rendszert megfelelő pH-n tartsuk. Ezt a pH-kontrollt pufferek segítségével érhetjük el. A vegyületek ionizáltsági fokát különböző pH értékeknél szemlélteti a következő ábra :

a) Savak esetén:



b) Bázisok esetén:



Következtetésként levonhatjuk, hogy mind savas, mind bázikus vegyületek esetén $pK_a \pm 2$ -es értéken kell tartani a pH-t ,mert itt teljesen ionos formában vannak a meghatározandó vegyületek.

A mérés kivitelezéséhez valamilyen információhoz kell jutni a pK_a értékekről. Ezek a források a következők lehetnek:

- irodalomból vett értékek
- mérés (sav-bázis titrálással, potenciometrikus titrálással, UV-VIS spektrometriával)
- szerkesztői programok segítségével a képletből. Ez a legegyszerűbb és pontossága megegyezik a mérési eredményekkel (a hibalehetőség $\pm 0,5 pK_a$). A szakértői programok rendezett formában tartalmazzák a tudomány adatait, soha nem nyújtanak annál több információt.

Ilyen szoftverek például a Hammet, Taft összefüggésen alapulnak.

Ha ismerjük egy alapvegyület pK_a értékét, ez a szoftver adatbankjában van tárolva, akkor a program kiszámítja az alapvegyület különböző szubsztituensekkel módosított formájának pK_a értékét. Tehát $pK_a = pK_{aAlap} + \text{szubsztituenshatás}$.

Az úgynevezett zwitter (kettős) ionok meghatározása nehéz ezekkel a szoftverekkel.

logKow modell megoszlások az oktanol és víz között. Ez az érték a környezeti analitikában több fajta megoszlás előrejelzésére alkalmas.

A vegyületek megkötődését, oldódását például talajban, üledékben befolyásolja a vegyületek apolaritása. Ennek modellezésére használatos módszer a logKow modell. Mi a modell alapja a hasonlóság az egyes rendszerek között.

modell rendszerünk: n-oktanol (apoláris) : víz (poláris)

hasonló rendszerek:

- sejtmembrán (apoláris) : sejtvíz (poláris)
- RP- (IP)-HPLC rendszer: állófázis (apoláris) : mozgófázis (poláris)
- talaj: huminanyagok (apoláris) : pórusvíz (poláris)

Collendar állapította meg, hogy az imént felírt rendszerek rokonrendszerek, mert hasonlóak egymáshoz.

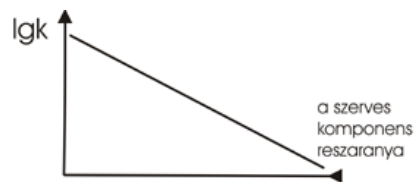
Ekkor felírható a következő összefüggés: $\lg K_2 = a \cdot \lg P + b$

Tehát az első rendszer az összes többi rendszerrel kapcsolatba hozható, ily módon modellezhetők, becsülhetők, akár RP-IP-HPLC -vel is, például az élő szervezetekben, a talajban lejátszódó kémiai folyamatok.

lgP:

A vegyületek lipofil jellegét adja meg. A lipofilitás a vegyületek zsírokban való oldódását jellemzi. Ez azért fontos számunkra, mert nagyon sok olyan vegyület, amellyel az ember kapcsolatba kerül zsírolható, így az emberi zsírszövetekben felhalmozódik (bioakkumuláció). Ezek közül a vegyületek közül számos mérgező. Tehát nagyon fontos ismernünk a különböző anyagok lgP értékeit. Ennek meghatározási módjai:

- laborban való meghatározás (a logKow alapján)



- RP-IP-HPLC segítségével
- számítógépes programok segítségével a $\sum \lg P = \lg P_{\text{alap}} + \sum \lg P_i$ összefüggés alapján. Ilyen programok például a QSSR, a SAR (Structure Activity Relationship), a QSAR (Quantitative SAR).

Ioncserés kromatográfia (Ion Exchange Chromatography, IEC)

Ioncserés kromatográfiáról beszélünk mindazon esetekben, amikor az állófázis felületén állandó értékű töltés van. Attól függően hogy pozitív vagy negatív töltésű az állófázis, anion- vagy kationcserélőről beszélünk. Az ioncserélők váza vagy szerves polimer például sztírol-divinil-benzol, vagy szilikagél.

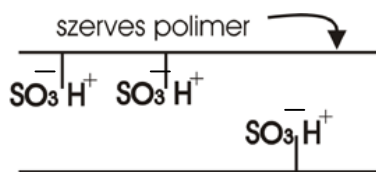
Vízoldható anionok, illetve kationok valamint szerves savak és bázisok meghatározása kis ioncserélő kapacitású ioncserélőkkel történik. A detektálási mód vezetőképességi detektoros eljárás.

Ionkizárásos folyadékkromatográfia (Ion Exclusion Chromatography)

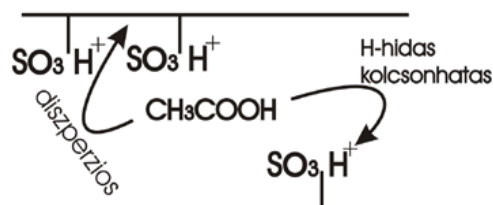
Az ionkizárásos folyadékkromatográfiában nagy ioncserélő kapacitású tölteteket használnak. Ha a vizsgált anyag nincs ionvisszaszorított állapotban, akkor nem tud bejutni az állófázis pórusaiba az ioncserélőn rögzített töltések taszítása miatt, mert az ion és az ioncserélő töltése megegyezik.

Anioncserélőket nemigen alkalmaznak. Közös jellemzőjük, hogy az ioncserélő kapacitása független a mozgó fázis pH értékétől, és ezek a töltetek kevésbé nyomástűrők.

Kationcserélők alkalmazása



Savas és kromatográfiásan semleges vegyületek elválasztására használják ezeket. Az alkoholok és szénhidrátok állapota független a pH-tól, ezért ezek akadály nélkül bejuthatnak az ioncserélő pórusaiba, és ott vagy a hidrofób felületen kötődnek meg, vagy H-hidas kölcsönhatásba lépnek a H-formában lévő ioncserélő csoportokkal. A savak nem disszociált formában tudnak bejutni a pórusokba. Példa:



Azért, hogy a savak ionvisszaszorított állapotban maradjanak, és hogy az ioncserélő csoportok H-formában legyenek, a vízhez 0,01 vagy 0,001M kénsavat vagy salétomsavat adnak a mozgófázishoz.

Fontos megjegyezni, hogy a mozgófázis nem tartalmazhat fémionokat, mivel azok nagyon erősen megkötődnek az állófázis ioncserélő helyein és megváltoztatják a szelektivitást. Az alifás szerves savak visszatartása az alkilánc hosszával nő, mivel a pKa érték függ az alkilánc hosszától. Növekvő pKa értékhez nagyobb visszatartás tartozik.

A kationcserélők alkalmazási területei :

- fermentlevek analízise
- szeszesital gyártás
- üdítőital gyártás
- savak, alkoholok, cukrok egymás melletti meghatározása

Anioncserélők alkalmazása

Vízben oldható bázisok és kromatográfiásan semleges vegyületek elválasztására alkalmazzák. Mozgófázisként NaOH-t alkalmaznak, míg az állófázis funkciós csoportjai kvaterner- ammóniumsók.

Alkalmazási területei :

- élelmiszeripar

Harsányi Judit, Szabó Zsolt Sándor