

# KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat



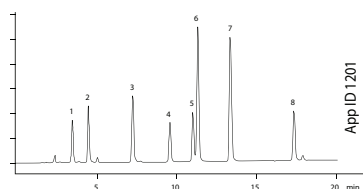
# Ön még Zorbax HPLC oszlopot használ ?

## Eljött az idő, hogy LUNA-ra váltson

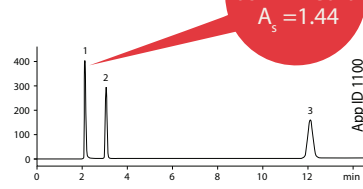
A világ egyik piacvezető HPLC oszlopa

### CSÚCS ASZIMMETRIA ÖSSZEHOSONLÍTÁSA EGY KONKURENS OSZLOPPAL

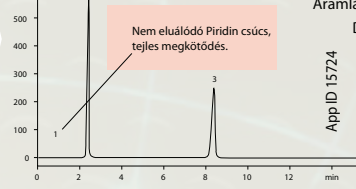
Phenomenex  
Luna 5 µm Phenyl-Hexyl



Phenomenex  
Luna 5 µm C18(2)



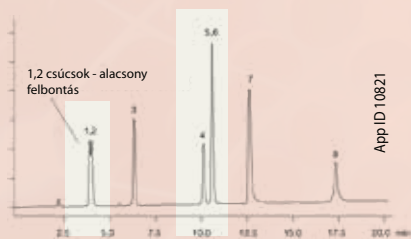
Agilent Technologies<sup>®</sup>  
ZORBAX 5 µm SB-C18



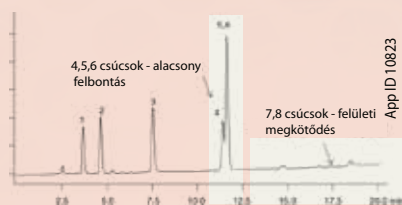
**Azonos kondíciók mindkét oszlop esetében**

Dimenziók: 150 x 4.6 mm  
Eluens: Acetonitril/Víz (50:50)  
Áramlási sebesség: 1.0ml/perc  
Detektálás: UV @ 254 nm  
Minta: 1. Pyridine  
2. Phenol  
3. Toluene

Agilent Technologies  
ZORBAX 5 µm SB-Phenyl



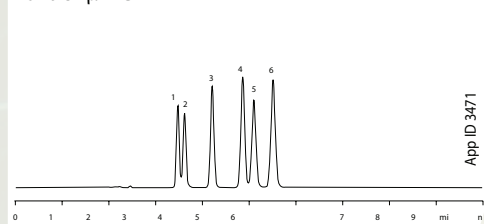
Agilent Technologies  
ZORBAX 5 µm Phenyl



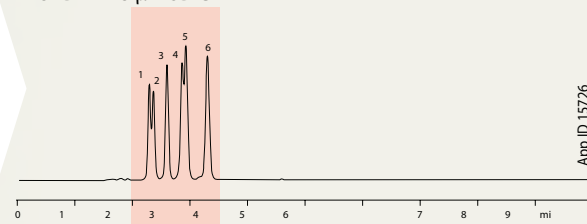
**Azonos kondíciók mindkét oszlop esetében**

Dimenziók: 150 x 4.6 mm  
Eluens: A: 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.5  
B: Acetonitril  
Gradiens: B: Acetonitril/Gradiens A/B (80:20)-ről A/B (75:25)-re 5 perc alatt majd A/B (%45)-re 15 perc alatt  
Áramlási sebesség: 1.0ml/perc  
Detektálás: UV @ 254 nm  
Hőmérséklet: 22 °C  
Minta: 1. Carbadox  
2. Thiamphenicol  
3. Furazolidone  
4. Oxolinic acid  
5. Sulfadimethoxine  
6. Sulfaquinoxaline  
7. Nalidixic acid  
8. Piromidic acid

Phenomenex  
Luna 5 µm CN



Agilent Technologies  
ZORBAX 5 µm SB-CN



**Azonos kondíciók mindkét oszlop esetében**

Dimenziók: 150 x 4.6 mm  
Eluens: A: Hexán  
B: Metilén-klorid/Metanol  
Áramlási sebesség: 1.0 mL/min  
Detektálás: UV @ 254 nm  
Hőmérséklet: Szobahőmérséklet  
Minta: 1. Di-n-octyl phthalate  
2. Bis (2-Ethylhexyl) phthalate  
3. Butylbenzyl phthalate  
4. Di-n-butyl phthalate  
5. Diethyl phthalate  
6. Dimethyl phthalate

Az Agilent Technologies és a Zorbax az Agilent Technologies Inc bejegyzett védjegyei. A Phenomenex nem hozható semmilyen kapcsolatba az Agilent Technologies céggel. Az itt látható összehasonlító adatok nem biztos, hogy más alkalmazások esetén is reprezentatívak lesznek.

**Korlátozott idejű  
kedvezmény**

**25 %**

minden Luna HPLC oszlopra, melyet még nem használt.

Promóciós kód: LUN2015

Az ajánlat más kedvezménnyel nem összevonható.

Az ajánlat alól kivételek a védőkolonnák és a 8mm-nél nagyobb átmérőjű oszlopok.

**Az akció érvényes:**

**2015.06.01 - 2015.06.30.**



Gen-Lab Általános Laboratóriumi  
Felszereléseket Forgalmazó és Szolgáltató KFT.  
Cím: H-1119 Budapest Hadak útja 41.  
Tel.: (36-1) 206-2455  
Fax: (36-1) 206-2451  
Email: info@gen-lab.hu

**phenomenex**<sup>®</sup>  
...breaking with tradition<sup>SM</sup>

[www.phenomenex.com/Luna](http://www.phenomenex.com/Luna)

# Tartalomjegyzék

**4. A héjszerkezetű (mag-héj) töltetek alkalmazási lehetőségei, 2. rész: Gradiens elválasztások hatékonysága**  
Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs

**7. pH-LC alkalmazása savas és bázikus anyagok szelektivitásának kontrollálására/szabályozására pH stabil állófázison**  
Lawrence Loo, Phil Koerner, Terrell Mathews, Jason Lam fordította: Szabó Krisztina

**9. Folyadékromatográfiai módszerfejlesztés számítógépes szimulációval**  
Kormány Róbert

**15. Hatékonyabb gélszűrés: új szemlélet a módszerfejlesztésben a Yarra gélszűrési kromatográfiai oszlopok használatával**  
Michael McGinley, Ismail Rustamov, Michael Klein fordította: Héja Kornélia

**18. Vízdíszítő N-tartalmú heterociklusok preparatív tisztítása HILIC technikával, nagy áteresztő képességű rendszeren**  
Urbán Zoltán

**20. Nagyobb gázkromatográfiai érzékenység, jobb csúcsalak és nagyobb kinetikai hatékonyság elérése**  
Matthew Trass, Sky Countryman

**24. Pentafluorofenil állófázis szelektivitásának bemutatása egy gyógyszeripari HPLC tisztaságvizsgálati módszerfejlesztés példáján**  
Könczöl Árpád, Meszlényiné Sipos Márta

**26. Kis belső átmérőjű (0,10 mm) GC kolonnák szakszerű alkalmazása**  
Sky Countryman

**27. Így főztök Ti...**  
Imrik Péter, Kaleta Zoltán

**29. Gázkromatográfia - Hogyan csökkenthető a minta torzulása üvegyapotot tartalmazó betét használatával**  
Matthew Trass

# Előszó

Kedves Olvasóink!

Legutóbbi számunk első hasábjain úgy kezdtem: "...csak az első bizonytalan lépéseket tettük meg, ezért amennyiben bármilyen ötlete lenne, hogy miként tehetnénk jobbá, színvonalasabbá kiadványunkat kérjük, ossza meg velünk."

Az első szám megjelenése után rengeteg megkeresést, ötletet és biztatást kaptunk Önöktől, hogy folytassuk a kiadvány megjelentetését és ezen felbátorodva engedjék meg, hogy legújabb számunkat figyelmükbe ajánljam remélve, hogy a Kromatográfus hasábjain mindenki talál számára érdekes, hasznos információt.

Terveink között szerepel az idei évben még egy szám kiadása és reményeink szerint jövőre már negyedéves megjelenést biztosíthatunk. Ezért szeretnénk továbbra is biztatni Önöket, hogy osszák meg velünk munkájuk során nyert tapasztalataikat, problémáikat és megoldásaikat.

Itt az előszóban szeretném kiemelten megköszönni még egyszer kollégáim, barátaim segítségét, akik nélkül nem készülhetett volna el ez a szám.

Tisztelettel,  
Imrik Péter  
ügyvezető  
Gen-Lab Kft.  
peter.imrik@gen-lab.hu

Kromatográfus

II. évfolyam 1. szám

Nyomdai előkészítés:

Mogyorósi Eszter

mogyorosi.eszter@gen-lab.hu

Nyomdai munka:

Tónus Nyomda

Lektorálta:

Fekete Jenő

Fekete Szabolcs

Kormány Róbert

Kiadja:

Gen-Lab Kft.

ISSN 2415-9042

A szerkesztőség elérhetőségei:

Cím: H-1119 Budapest Hadak útja 41.

Tel.: (36-1) 206-2455

Fax: (36-1) 206-2451

Email: info@gen-lab.hu

Web: www.gen-lab.hu

Telefon: +36-1-206-2455

Fax: +36-1-206-2451

*Tónus Nyomda Stúdió*

# A héjszerkezetű (mag-héj) töltetek alkalmazási lehetőségei

## 2. rész: Gradiens elválasztások hatékonysága

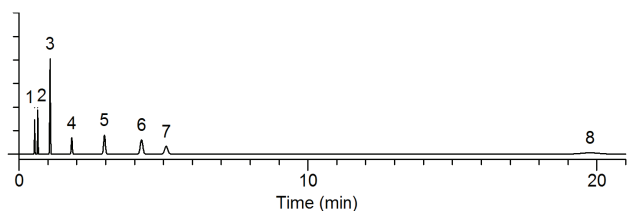
Fekete Jenő<sup>1</sup>, Kormány Róbert<sup>2</sup>, Fekete Szabolcs<sup>3</sup>

<sup>1</sup> BME Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

<sup>2</sup> Egis Gyógyszergyár Zrt., 1106 Budapest, Keresztúri út 30-38.

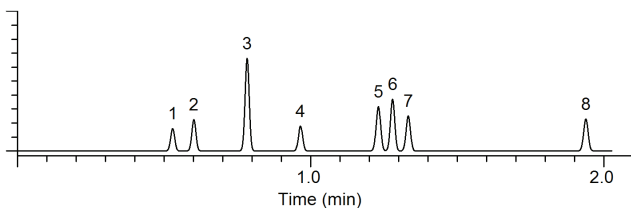
<sup>3</sup> Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Tanszék, 1211 Geneva, Boulevard d'Yvoy 20.

A kromatográfias gyakorlatban sokszor előfordul, hogy az elválasztani kívánt vegyületek kromatográfias tulajdonságai nagyon eltérnek egymástól, ilyenkor az izokratikus elválasztás nem praktikus, mert 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 (1. ábra). Ezt nevezzük általános elúciós problémának.



1. ábra: Példa eltérő tulajdonságú komponensek izokratikus elválasztására (20 perces elválasztás)

Erre jelenthet megoldást a gradiens elúció alkalmazása (itt csak a lineáris oldószer gradienst tárgyaljuk, mivel a gyakorlati alkalmazásban ennek van legnagyobb jelentősége). Ez azt jelenti, hogy a mozgófázisban az erősebb oldószer - pl. acetonitril (AcN) vagy metanol (MeOH) - koncentrációját növeljük az idő függvényében, ezáltal csökken a nagyobb megoszlási hányadossal rendelkező komponensek visszatartása. A gyengébb oldószer víz vagy valamilyen vizes puffer. A gradiens elúció alkalmazásával jelentősen le tudjuk csökkenteni az elemzési időt eltérő kromatográfias tulajdonságú komponensek esetén és elérhető, hogy többé-kevésbé azonos szélességű kromatográfias csúcsokat kapjunk (2. ábra).



2. ábra: Példa eltérő tulajdonságú komponensek gradiens elválasztására (2 perces elválasztás)

Gradiens elúció során a minta zóna „hátsó” része gyorsabban halad mint az eleje mert az eluens erősség folyamatosan nő ahogy a komponens halad végig a kolonnán. Ezt a jelenséget gradiens „csúcs-fókuszáló” hatásnak hívjuk. Ez elméletileg is jól becsülhető, annál

jelentősebb, minél meredekebb a gradiens program. A gradiens elúció egy átlagos retenció tényezővel ( $k_G$ ), gradiens idővel ( $t_G$ ), gradiens meredekséggel ( $b$ ), kiindulási és végső oldószer koncentrációval jellemezhető.

$$\log k_G = \log k_0 - b \frac{t_G}{t_0}$$

Kromatográfiasan rokon vegyületek elválasztásánál a gradiens elúció nem okoz sorrendváltozást, de a szelektivitás általában csökken, hiszen az állófázis hatásának nagy részét lecsökkentjük, csak a kezdeti kötődés mértéke a meghatározó. Kromatográfiasan nem rokon vegyületeknél pedig retenció sorrendváltozás is bekövetkezhet, a szelektivitás csökkenhet vagy javulhat is. A gradiens elválasztás hatékonyságát általában a csúcskapacitással jellemezzük. A csúcskapacitás annak a mérőszáma, hogy adott idő alatt hány darab csúcsot tudunk egymástól elválasztani egy meghatározott csúcsefelbontással (általában  $R_s = 1$ ). Számos összefüggés található az irodalomban a csúcskapacitás ( $n$ ) leírására, a gyakorlatban általában a gradiens idő ( $t_G$ ) és a csúcs félérték szélessége ( $w$ ) átlagának hányadosát vesszük alapul:

$$n = 1 + \frac{t_G}{1,699 \cdot w}$$

A csúcskapacitás sok változótól függ: a gradiens idejétől, meredekségétől, a térfogat áramlási sebességtől, a mozgófázis hőmérsékletétől vagy a kolonna hosszától. A következő összefüggés jól szemlélteti, hogy az elméleti csúcskapacitás ( $n_e$ ) a kolonna hossz négyzetgyökével arányos, illetve, hogy a csúcskapacitás összefüggésben van az izokratikus módban mért tányérmagassággal ( $H$ ) - vagy tányérszámmal ( $N$ ):

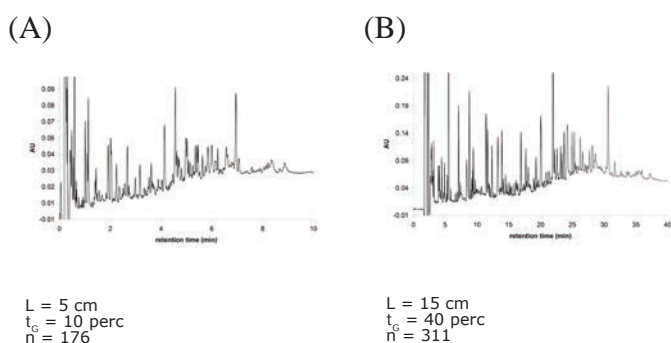
$$n_e = 1 + \frac{\sqrt{L}}{4\sqrt{H}} \cdot \frac{1}{b+1} \cdot \ln \left( \frac{b+1}{b} e^{S\Delta\Phi} - \frac{1}{b} \right),$$

ahol

$$b = \frac{t_0 \Delta\Phi S}{t_G},$$



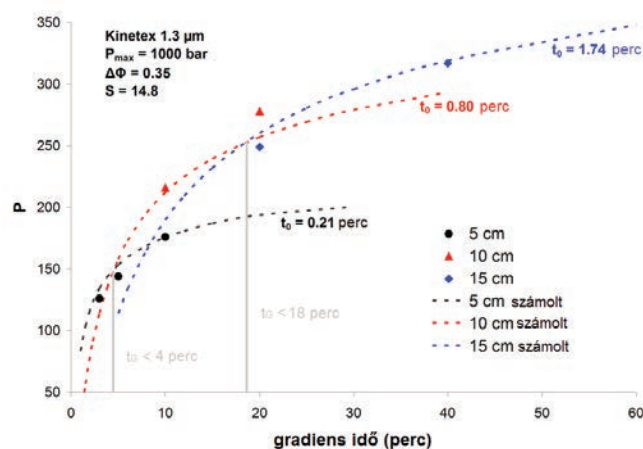
ahol  $S$  a gradiens elúcióra jellemző paraméter (az ún. lineáris oldószer-erősségi egyenlet meredeksége, értéke függ a molekula jellegétől, méretétől és a szerves módosító típusától),  $\Delta\Phi$  pedig a gradiens program során a kiindulási és végső mozgófázis összetétel közti változást fejezi ki. A következőkben néhány példával szemléltetjük, hogy milyen hatékonyság érhető el gradiens elúciós módban a legkorszerűbb héjszerkezetű töltetes kolonnákkal. Az előző részben bemutattuk az 1,3, 1,7, 2,6 és 5  $\mu\text{m}$ -es Kinetex kolonnákkal, izokratikus elúciós módban elérhető tényezőszámokat és elválasztási sebességet ( $t_0/N$ ), most pedig hasonló módon az említett kolonnákkal elérhető csúcskapacitást tárgyaljuk, külön figyelmet szentelve az 1,3  $\mu\text{m}$ -es töltet sajátos viselkedésének. A kromatográfiás zónaszélesedés nagymértékben függ az elválasztott komponensek tulajdonságaitól, elsősorban a molekula mérettől (tömegetől). A kisebb molekulák mozgékonyabbak, gyorsan áthaladnak a töltet pórusain, míg a nagyobbak, „lomhábbak” több időt töltenek a pórusokban ezért szélesebb csúccsal eluálódnak. Makromolekulák esetén a hosszirányú diffúzió hatása elhanyagolható (B tag a tényér-egyenletekben) és elsősorban a szemcsén belüli anyagátadás lesz az, ami meghatározza a zónaszélesedést (C tag állófázis járuléka). Ezért érdemes megnézni, hogy a kolonna hogyan teljesít kis- és nagymolekulákra egyaránt. Nyilvánvalóan más lesz az optimális elválasztási körülmény (térfogatáram, hőmérséklet...) kis- és nagymolekulák elválasztásakor. A nagymolekulák elválasztásának feltétele még a megfelelő pórusátmérő. Az említett kolonnák névleges pórusátmérője 100 Å, ami peptidok esetleg kisebb fehérjék (3-5 kDa) elválasztására alkalmas. A gyógyszer és biológiai iparágakban a gradiens elúciós mód egyik gyakori alkalmazása az ún. peptid-térkép vizsgálat. Ez egy nagyobb fehérje enzimatis bontásával kapott peptidok megfelelő elválasztását jelenti (tipikusan 0,3 – 2 kDa méretű molekulák). A peptid-térképeket gyakran használják a kolonnák hatékonyságának bemutatására is, hiszen a nagy fehérjék emésztésével kapott nagyszámú peptid (gyakran 50 – 150 peptid) jól szemlélteti az elválasztható csúcsok számát. A 3. ábrán egy monoklonális antitest triptikus emésztésével kapott peptidok elválasztását láthatjuk 5 cm-es (A) illetve 15 cm-es (B) Kinetex 1,3  $\mu\text{m}$ -es kolonnákon. Az 5 cm-es kolonnán 500  $\mu\text{L}/\text{perc}$  a 15 cm-es kolonnán pedig 167  $\mu\text{L}/\text{perc}$  térfogatárammal dolgoztunk (mindkét esetben a maximálisan megengedhető 1000 bar nyomáson). A mozgófázis összetétel változás  $\Delta\Phi = 0.35$  a gradiens idő pedig 10 illetve 40 perc [1].



3. ábra: Monoklonális antitest peptid-térképe 5 cm-es (A) illetve 15 cm-es (B) Kinetex 1,3  $\mu\text{m}$ -es kolonnán

A 3. ábra jól mutatja, hogy a 3-szor hosszabb kolonnán – a gradiens idő és térfogatáram megfelelő hangolása után – 2-szer nagyobb csúcskapacitás érhető el, ami jó egyeztetést mutat elméleti becslésekkel [1]. Az  $n = 176$  csúcskapacitás igen figyelemreméltó peptidokra nézve egy 5 cm-es kolonnán 10 perces gradiens idő mellett. Az  $n > 300$  csúcskapacitás pedig már ún. nagy-felbontású elválasztásnak felel meg.

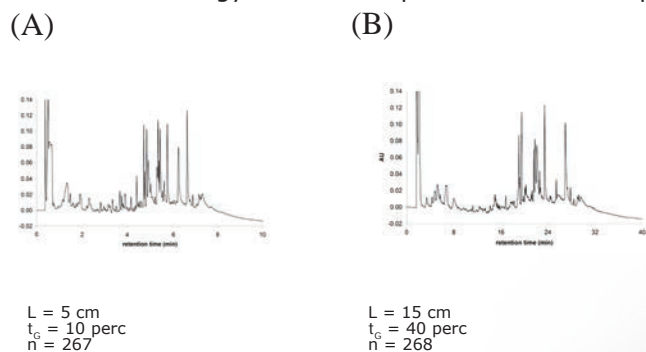
A 4. ábra az elméletileg és gyakorlatilag elérhető legnagyobb csúcskapacitást szemlélteti a gradiens idő függvényében, 1000 bar nyomáson és különböző hosszúságú kolonnákon dolgozva (peptid-térkép elválasztáshoz). Leolvasható, hogy ha gyors elválasztásra van szükségünk ( $t_c < 4$  perc), akkor az 5 cm-es kolonna adja a legnagyobb csúcskapacitást, ha 4 és 18 perc közötti gradiens futtatunk, akkor a 10 cm-es kolonna a legjobb választás, illetve a hosszú gradiens mérésekhez pedig a 15 cm-es kolonna adja a legnagyobb hatékonyságot.



4. ábra: 5, 10 és 15 cm hosszú Kinetex 1,3  $\mu\text{m}$ -es kolonnákkal elérhető csúcskapacitás (peptid-térkép méréshez)

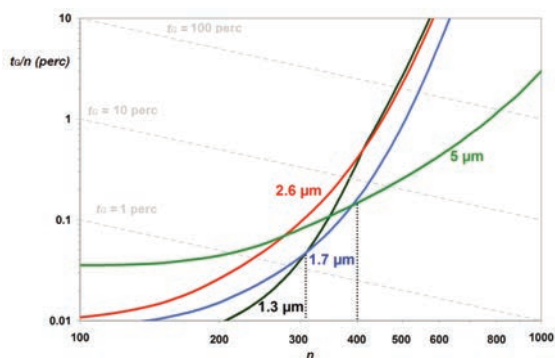
Nagyban változhat az optimális kolonnahossz megítélése, ha más méretű molekulákat akarunk elválasztani. A csúcskapacitás görbék lefutása – hasonlóan az izokratikus ún. H-u görbékhez (pl. van Deemter görbe) – jelentősen függ az elválasztandó vegyületek diffúziós tulajdonságaitól, amit elsősorban a molekula mérete határoz meg. Előző cikkünkben bemutattuk, hogy az 1,3  $\mu\text{m}$ -es Kinetex kolonna szinte már „túl hatékony”, ami úgy nyilvánul meg, hogy kis molekulák esetén a jelenlegi készülék teljesítmény mellett ( $\Delta P_{\text{max}} \sim 1000$  bar) nem ériük el a kolonna maximális hatékonyságát (pl. a van Deemter görbe minimumát). Ha gyorsan és ugyanakkor hatékonyan is akarunk dolgozni, akkor érdemes nagy nyomáson (pl. a rendelkezésre álló maximális nyomáson) dolgozni. Ezen a maximális nyomáson egy rövid kolonnán ha 1000 bar esik, akkor egy kétszer olyan hosszú kolonnával csak fele akkora térfogatáram mellett tudunk dolgozni, hiszen a hosszú kolonna áramlási ellenállása kétszer akkora. Viszont, ha a térfogatáramot felére csökkentjük, akkor sokat veszítünk az elérhető tényérmagasságból (vagy csúcskapacitásból). Olyan eset is előállhat, hogy a hosszabb kolonnát kisebb térfogatáramon üzemeltetve összességében kisebb hatékonyságot érünk el, mintha a rövidebb kolonnával nagyobb térfogatáramon

dolgozunk. Ez akkor fordulhat elő, ha adott nyomáson nem érjük el a kolonna hatékonyságának maximumát. Tipikus példa erre a nagyon hatékony 1,3 µm-es Kinetex kolonna. Az 5. ábra arra mutat példát, hogy kismolekulák elválasztásakor egy ilyen hatékony kolonnával egy 15 cm-es kolonna nem ad nagyobb csúcskapacitást, mint egy 5 cm-es kolonna. Az 5 cm-es kolonnán ráadásul a csúcskapacitás maximuma lényegesen rövidebb gradiens idő mellett érhető el. Tehát ilyen esetekben nincs szükség hosszú kolonnákra. Megjegyezzük azonban, hogy az optimális kolonnahossz megítélése nagyban változna, ha nagyobb nyomástartomány (pl. 1500 – 2000 bar) állna rendelkezésünkre. Ekkor feltehetően a hosszabb kolonna már nagyobb csúcskapacitásra lenne képes.



5. ábra: 5 és 15 cm hosszú Kinetex 1,3 µm-es kolonnákkal mért csúcskapacitás (ginkgo-biloba extraktum)

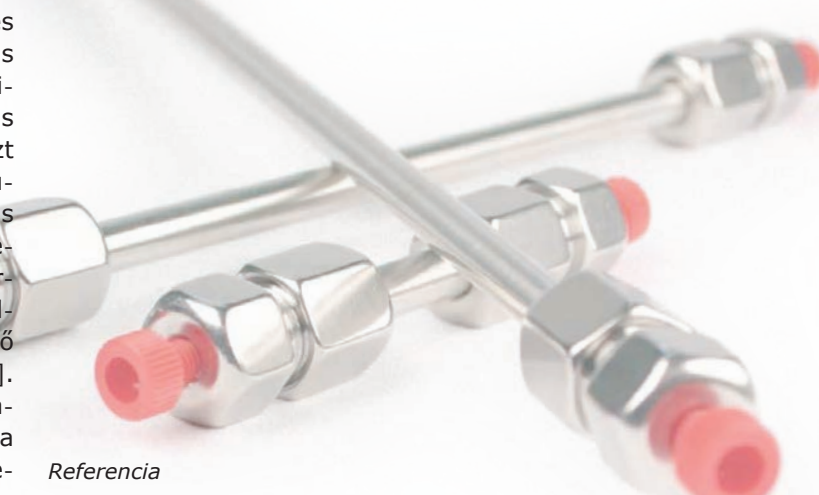
Végül pedig a rendelkezésünkre álló 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es Kinetex kolonnákat hasonlítjuk össze gradiens elúciós módban a kinetikus görbék módszerével. Gradiens elúcióban a zónaszélesedést nemcsak a mozgófázis térfogatárama szabja meg, jelentősen befolyásolja azt a gradiens meredeksége – a már említett „csúcspókuszáló” hatáson keresztül. Így az elérhető csúcskapacitás számos változótól és paramétertől függ, ennek részleteire most nem térünk ki. Az izokratikus kinetikus görbék módszeréhez hasonlóan gradiens módban is értelmezhetjük az adott maximális nyomás mellett elérhető csúcskapacitást, illetve az elválasztás időigényét [1-11]. A 6. ábrán az elvileg várható  $t_0/n$  hányadost (ami a gradiens elválasztás sebességével arányos) ábrázoltuk a csúcskapacitás függvényében egy  $\sim 200$  g/mol tömegű molekulát feltételezve (jól szemlélteti a kismolekulás gyógyszeranalitikában előforduló hatóanyagokat). A számítások izokratikus méréseken alapulnak a következő változók/paraméterek figyelembevételével:  $\Delta P_{\max} = 600$  bar az 5 és 2,6 µm-es töltetű kolonnákra, illetve 1000 bar az 1,7 és 1,3 µm töltetekre,  $\Delta\Phi = 0,9$  (5%-95% B),  $S = 6$ .



6. ábra: gradiens kinetikus görbék 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es Kinetex kolonnákra, kismolekulás elválasztásra ( $M \sim 200$  g/mol).

$\Delta P_{\max} = 600$  bar az 5 és 2,6 µm-es töltetű kolonnákra, illetve 1000 bar az 1,7 és 1,3 µm töltetekre,  $\Delta\Phi = 0,9$  (5%-95% B),  $S = 6$ .

Az ábra jól szemlélteti, hogy amennyiben  $n < 300$  csúcskapacitás elegendő akkor az 1,3 µm-es töltet adja a leggyorsabb elválasztást. Ha  $300 < n < 400$  csúcskapacitásra van szükség akkor az 1,7 µm-es kolonna a legjobb választás. A nagyfelbontású elválasztásokhoz ( $n > 400$ ) pedig az 5 µm-es töltetet kell használnunk. Ha hagyományos HPLC készüléken dolgozunk ( $\Delta P_{\max} = 400$  bar), akkor nagyban változna a kolonnák rangsorolása. Figyelembe véve a kolonnák permeabilitását és hatékonyságát, a 2,6 µm-es kolonna adná a leggyorsabb elválasztásokat a gyakorlat számára érdekes csúcskapacitás tartományban. A gradiens elúciós módnak van még egy nagy előnye, nevezetesen hogy az említett „csúcspókuszáló” hatás az oszlop előtti térfogatokból (injektor és összekötő vezeték) eredő káros zónaszélesedést kompenzálja. A legkorszerűbb UHPLC rendszerekben gradiens elúciós módban gyakorlatilag a leghatékonyabb kolonnák is hatékonyság veszteség nélkül üzemeltethetők. Végül megint csak arra a következtetésre juthatunk, hogy a kolonnákat nem lehet abszolút skálán rangsorolni, mindig az adott feladat igényeinek megfelelően kell választani. Továbbá érdemes megjegyezni, hogy nem mindig a hosszabb kolonna adja a hatékonyabb elválasztást, sok esetben célravezetőbb egy 5 cm-es rövid kolonna.

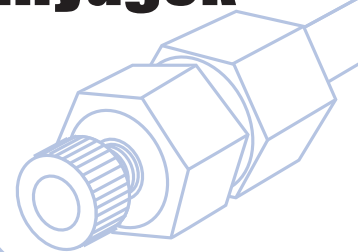


#### Referencia

1. S. Fekete, D. Guillaume, J. Chromatogr. A, 1320 (2013) 86.
2. X. Wang, W.E. Barber, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1107 (2006) 139.
3. S. Fekete, R. Berky, J. Fekete, J.L. Veuthey, D. Guillaume, J. Chromatogr. A 1236 (2012) 177.
4. S. Fekete, J. Fekete, Talanta 84 (2011) 416.
5. S. Fekete, J.L. Veuthey, S. Eeltink, D. Guillaume, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 3137.
6. K. Broeckhoven, D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2787.
7. K. Broeckhoven, D. Cabooter, S. Eeltink, G. Desmet, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 20.
8. X. Wang, D.R. Stoll, P.W. Carr, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. A 1125 (2006) 177.
9. Y. Zhang, X. Wang, P. Mukherjee, P. Petersson, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4597.
10. T.J. Causon, E.F. Hilder, R.A. Shellie, P.R. Haddad, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5063.
11. J. Ruta, D. Guillaume, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Sep. Sci., 33 (2010) 2465.

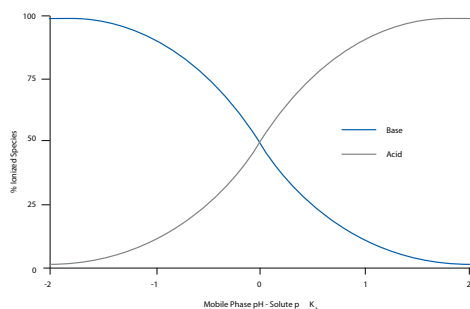
# pH-LC alkalmazása savas és bázikus anyagok szelektivitásának kontrollálására/ szabályozására pH stabil állófázison

Lawrence Loo, Phil Koerner, Terrell Mathews, Jason Lam  
Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA  
fordította: Szabó Krisztina



## Bevezetés

A fordított fázisú HPLC elválasztásokban a szelektivitás megváltoztatásának hatékony módszere, ha a mérendő molekula ionizációs formáját a mozgófázis pH-jával kontrolláljuk. Az anyag ionizált formája polárisabb, mint a semleges változata, ami a molekula várható retenciójának csökkenését eredményezi. Ez annak tulajdonítható, hogy kisebb a kölcsönhatás a hidrofób állófázissal, viszont nagyobb mértékű a kötődés a mozgófázis vizes részéhez. Az ionizált anyagok továbbá ionos kölcsönhatásba lépnek az aktivált szilanol csoportokkal, ami hatással van a csúcsalakra és a reprodukálhatóságra. A másodlagos kölcsönhatások visszaszorításának gyakori módja, hogy az eluens savasításával semlegesítjük a szilanol csoportokat. Viszont ez nem oldja meg azt a problémát, hogy az ionizált molekula és a hidrofób állófázis között gyengébb a kölcsönhatás, főleg a magas pKa értékkel rendelkező bázikus anyagok esetében. Ezen kívül a felületen található szilanol csoportoknak nem feltétlenül egyezik a pKa értéke, azaz ugyanazon a pH-n nem lesz mindegyik semleges formában. A mozgófázis pH-ja és a molekula ionizációs formái közötti összefüggést szemlélteti a 1-es ábra.



1. ábra: Összefüggés eluens pH és az oldott anyag ionizációs formái között

Az ábrán látható, hogy a mozgófázis azon pH értékei, ahol a savak és bázisok részlegesen disszociált állapotban vannak, a molekula pKa értékéhez képest  $\pm 2$  pH egységen belüli tartományban vannak. Ahhoz, hogy túlnyomórészt egyetlen ionizációs forma legyen jelen az oldatban, az eluens pH-jának legalább két egységgel a mérendő molekula pKa értéke felett kell lennie. A pH-LC technika hatékonyságát savas (naproxén), bázikus (amitriptilin) és semleges (toluol) jellegű anyagok keverékével tanulmányoztuk Gemini NX-C18 5  $\mu\text{m}$  (150x4,6 mm) oszlopon, amely azzal a céllal lett kifejlesztve, hogy tolerálja az eluens pH változásait a kolonna degradálódása nélkül. A szerkezeti képleteket és pKa értékeket az 1. táblázat tartalmazza.

## Kísérleti körülmények

### Rendszer

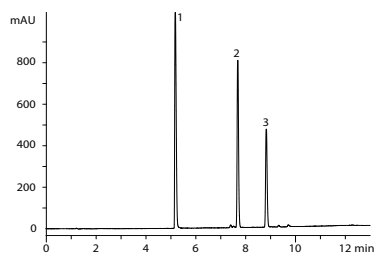
Agilent HP1100 HPLC rendszer-kvaterner pumpa (G1311A), degasser (G1322A), autosampler (G1313A) és DAD detektorral (G1315B). Fűtő/hűtő egység és 6-os kolonna váltó (POWERSelector) az Analytical Sales and Services-től. Az eredmény kiértékelése ChemStation software-rel történt. (Rev.A.10.02).

### Anyagok

Hangyasav, 98%-os, ACS minőség EMD (FX0440-11)  
Ammónium-acetát, HPLC minőség Fluka (17836)  
Kálium-dihidrogén-foszfát, ACS minőség Fluka (P285-3)  
Ammónium-bikarbonát, >99% Fluka (09832)  
Amitriptilin-hidroklorid, >98% Sigma (A8404)  
Naproxén, 98% Aldrich (284785)  
Toluol, 99,5% Sigma (179418)

### Eredmények és diszkusszió

Jelen tanulmány a mozgófázis pH-jának hatásait mutatja be különböző pufferek alkalmazásával savas, bázikus és semleges karakterisztikájú anyagok keverékén.



### 2. ábra

pH 2,7

Eluens: A: 0,1% hangyasav vízben

B: 0,1% hangyasav acetonitrilben

Gradiens:	t (perc)	A%	B%
	0	95	5
	10	5	95
	12	5	95

Áramlási sebesség: 1,5 ml/perc

Hőmérséklet: szobahőmérséklet

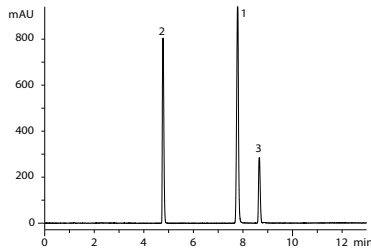
Detektálás: UV@254 nm

Minta: 1.amitriptilin

2.naproxén

3.toluol

2,7-es pH-n a bázikus amitriptilin ( $pK_a=9,4$ ) ionizált állapotban van, és 5,2 perces retenció jellemzi. A savas naproxén ( $pK_a=4,5$ ) semleges állapotban van és 7,7 perc-nél eluálódik. A semleges minta, a toluol majdnem változatlan retenciót (8,7 perc) mutat az egész pH tartományban.



### 3. ábra

pH 7

Eluens: A: 20mM kálium-foszfát, pH 7

B: acetonitril

Gradiens:	t (perc)	A%	B%
	0	95	5
	10	5	95
	12	5	95

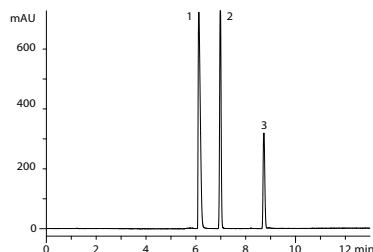
Hőmérséklet: szobahőmérséklet

Áramlási sebesség: 1,5 ml/perc

Detektálás: UV@254 nm

Minta: 1. amitriptilin  
2. naproxén  
3. toluol

7-es pH-n a bázikus naproxén enyhe retenció növekedést mutat (7,8 perc), miközben a savas naproxénnek, aminek túlnyomórészt ionizált formája van most már jelen, csökken a retenciója (4,8 perc).



### 4. ábra

pH 4,8

Eluens: A: 10mM Ammónium-acetát, pH 4,8

B: acetonitril

Gradiens:	t (perc)	A%	B%
	0	95	5
	10	5	95
	12	5	95

Áramlási sebesség: 1,5 ml/perc

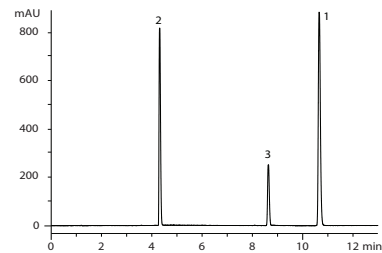
Hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: UV@254 nm

Minta: 1. amitriptilin  
2. naproxén  
3. toluol

4,8-as pH értéken a bázikus amitriptilin-nek megnő a retenciója (6,1 perc), amely az aktív szilanokkal való ionos kölcsönhatásnak tulajdonítható. A savas naproxén részlegesen disszociált állapotban van (ionizált és semleges

forma is jelen van) és csökkenő retenciót mutat (7,0 perc). A semleges toluol retenciója változatlan.



### 5. ábra

pH 10,5

Eluens: A: 10mM Ammónium-bikarbonát, pH 10,5

B: acetonitril

Gradiens:	t (perc)	A%	B%
	0	95	5
	10	5	95
	12	5	95

Áramlási sebesség: 1,5 ml/perc

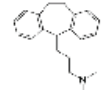


Hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: UV@254 nm

Minta: 1. amitriptilin  
2. naproxén  
3. toluol

10,5-ös pH-n a bázikus amitriptilin túlnyomóan semleges formában van, és ekkor mutatja a legnagyobb retenciót (10,6 perc), ami majdnem duplája a 2,7-es pH-n mért retenciónak. A savas naproxén retenciója minimálisan csökken (4,3 perc), mivel főleg ionizált formája van jelen. A toluol retenciója továbbra sem változott.

1. táblázat: A szerkezeti képletek és a  $pK_a$  értékek listája alább található: bázikus, savas és semleges vizsgált minták és a megfelelő  $pK_a$  értékek

Probe	Analyte	$pK_a$
Basic	Amitriptyline 	9.5
Acidic	Naproxen 	4.5
Neutral	Toluene 	n/a

## Összegzés

Fordított fázisban, ionizálható anyagok esetén, a pH stabil Gemini NX-C18 oszlopon az eluens pH-jának változtatásával jelentős mértékben tudjuk irányítani a szelektivitást. A legtöbb bázikus anyag esetén növelni tudjuk a retenciót, ha az eluens pH-ját a  $pK_a$  értékénél magasabbra állítjuk. Ugyanezt az előnyt ki tudjuk használni savas jellegű anyagoknál, ha a pH-t a  $pK_a$  értékünkénél kisebbre állítjuk. A módszer rugalmassága és a jobb szelektivitás, ami elérhető ezekkel a technikákkal mind amellettszólnak, hogy a Gemini NX-C18 oszlop ideális új módszerek fejlesztésére, ahol az optimalizált anyag-függő módszer kidolgozása előtt a kolonna különböző pH körülményeknek van kitéve.



# Folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés számítógépes szimulációval

**Kormány Róbert**

**Egis Gyógyszergyár Zrt., 1106 Budapest, Keresztúri út 30-38.**

A kísérlettervezés (Design of Experiment, DoE) célja, hogy méréseinkből valamilyen információt nyerjünk vagy következtetéseket vonjunk le, illetve, hogy a körülmények megfelelő megválasztásával a kísérletek lefolyását optimalizáljuk. További cél, hogy az adott információ megszerzéséhez a lehető legkevesebb kísérletet kelljen elvégeznünk. A DoE-ben faktornak (független változó) nevezzük az olyan mérhető, változó mennyiséget, amely adott időpontban meghatározott értéket vesz fel, és segítségével a vizsgált objektum működése befolyásolható. A faktorkok lehetnek mennyiségiek (pl. hőmérséklet, mozgófázis összetétel), illetve minőségiek (pl. állófázis, készülék). A DoE legjellemzőbb vonása, hogy egyszerre több faktor szintjét változtatjuk. A teljes faktoriális kísérlet egy olyan módszer, amely lehetővé teszi az egyes faktorkok és ezek együttes hatásának vizsgálatát a minőségi jellemzőre vonatkozóan. Az egyfaktoros módszerrel szemben itt egyszerre több faktort változtatunk. Ezáltal lehetővé válik a beállításokhoz kapcsolódó középértékek és az ún. hatások számítása. Megkülönböztetjük a főhatásokat, amelyek az egyes faktorkok beállításából erednek, és a kölcsönhatásokat, amelyek több faktor egyidejű változtatása eredményeképpen keletkeznek.

A faktorkok kiválasztását követő lépés a szintek számának és értékeinek meghatározása. A szintek azon faktorértékek, amiket kipróbálunk a kísérletek során. Elsőként tisztáznunk kell, hogy milyen értékhatárok között változtathatjuk a kísérletek során az egyes befolyásoló tényezők értékeit. Legtöbbször két értéket jelölünk meg feltételezve, hogy közöttük lineárisan viselkedik a folyamat. Amennyiben nem vagyunk biztosak a lineáris viselkedésben, három vagy több szint kijelölése szükséges [1].

Az International Conference on Harmonization (ICH) Q8(R2) és Q11 irányelvei a gyógyszer hatóanyagok és készítmények fejlesztési irányait egyértelműen megfogalmazzák [2, 3]. Ez azt jelenti, hogy a gyártásnál és a folyamatok ellenőrzésénél minden olyan paramétert, amely az eredményeket befolyásolja, a tudományos ismeretek alapján előre kell jelezni. Ezt a megközelítést nevezik tervezett minőségnek, más néven Quality by Design (QbD) elvnek. Ez vonatkozik a gyártást ellenőrző analitikai eljárásokra, így a legtöbbet alkalmazott hagyományos nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és a korszerűbb ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) módszerekre is. A folyadékkromatográfiás gyakorlatban ez azt jelenti, hogy olyan vizsgálati módszert kell fejleszteni, amely a készülék típusától függetlenül bárhol és bármikor reprodukálható eredményt ad ugyanarra az analitikai feladatra. A kifejlesztett és optimalizált analitikai módszert csak abban az esetben lehet felhasználni nyersanyagok, intermedierek, hatóanyagok vagy készítmények kvanti-

tatív minősítésére, ha a módszer alkalmazhatósága előzetesen bizonyításra került. A módszerek alkalmazhatóságának bizonyítását validálásnak hívják [4]. A validálás irányelveit az ICH Q2(R1) guideline foglalja össze [5].

## **A QbD elvű folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés alaplépései [6]:**

- Pontosan definiálni kell a vizsgálati módszer célját. A folyadékkromatográfiás módszerfejlesztésben a legfontosabb cél a kritikus csúcspár alapvonalas elválasztása. A kritikus csúcspárra leggyakrabban az  $R_{S,krit} > 1,5$  feltételt szabjuk meg, ezt tekintjük alapvonalas elválasztásnak.
- Kockázatelemzés alkalmazása, amely során meghatározzuk, melyik változóknak van negatív hatása a módszer alkalmazhatóságára, vagyis melyik mérési paraméter rontja a felbontás értéket a kritikus csúcspárra nézve.
- Kísérleti értékelése annak, hogy a kritikus változók hogyan tudják befolyásolni a módszer alkalmazhatóságát. Ez szisztematikus, multifaktoriális módon elvégezhető a kísérletek tervezésével Design of Experiments, DoE, használatával. A kísérletek eredményeként egy tervezési tér (Design Space, DS) készíthető, amely leírja a paraméterek tartományát, ahol a módszer kezdetben megszabott céljai teljesülnek.
- Amikor a végső módszer elkészült a fent leírt lépések alapján, egy robusztussági vizsgálatot is el lehet végezni annak becslésére, hogy a módszer céljait (kritikus felbontás) mennyire befolyásolják a megállapított módszer paraméterek beállított eltérései.
- A robusztusság vizsgálat eredményei segítenek, hogy a módszerhez vagy a kritikus elválasztáshoz szabályozó stratégiát alakítsunk ki (a QbD elvű módszerfejlesztés következő fontos lépése).
- Mivel az alapkísérleteket már meghatároztuk, ezért a beállítások könnyen elvégezhetőek, ha megismételjük a kísérleteket és megkeressük az aktuális DS-t. Normál esetben kis eltérések lesznek csak. A DS-n belül a változók módosítása a szabályozó hatóságok szerint nem minősül „változtatásnak”, ezért a módszert nem kell újra validálni.

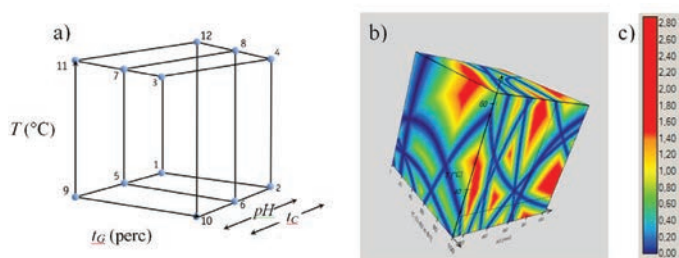
1986-ban DryLab név alatt elindult egy számítógépes folyadékkromatográfiás módszermodellezés [7], amely kezdetben a retenciók idők ( $t_R$ ), a visszatartási tényező ( $k$ ) és a kritikus felbontás ( $R_{S,krit}$ ) egy dimenziós számításából indult. Közben kromatogramokat vizualizálva, negyed századdal később eljutott a három mért és nyolc számított dimenzióig [8]. A szakirodalom ezt a három dimenziós modellt „Cube”-nak vagyis kockának nevezi. A szoftver a Horváth Csaba és munkatársai által kidolgozott szolvofób elméleten alap-

szik, mely a víz fontos, retenciót szabályozó szerepét magyarázza fordított fázisú körülmények között [9].

$$\ln k = A + B\varepsilon + C\gamma + D(\kappa^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln(RT / P_0V)$$

Az egyenletben A, B, C, D és E kísérletileg meghatározható konstansok,  $\varepsilon$  az oldószer statikus dielektrikus állandója,  $\gamma$  a felületi tenzió,  $\kappa^e$  az energia, ami ahhoz szükséges, hogy a megfelelő üreg kialakuljon a kötőhely felületén, V az oldószer térfogata,  $P_0$  az atmoszférikus nyomás. Az elmélet szerint, a víz nagy lipofóbicitású (dibenzantracénnel igazolva C8-as tölteten  $k_{\text{vízben}} \sim 4000$ ,  $k_{\text{AcN-ben}} \sim 1$ ), felületi tenzióját lehet csökkenteni szerves oldószerekkel, pl. MeOH-lal, AcN-lal. Az elmélet szerint nagy energia szükséges, hogy az apoláris molekulák oldódjanak a sokkal polárosabb vízben, ezért a visszatartás nagymértékben a víznek köszönhető. Gradiens módszerek esetén csökkentve a felületi tenziót, egyre kisebb energia szükséges a molekulák oldódásához, aminek eredményeként csökken a visszatartás. A DryLab szoftver egy lehetséges megoldást kínál a QbD folyadékromatográfiás alkalmazására [10].

A DryLab kocka felépítése (1. ábra) a modell alapú kísérlettervezés első szakasza (DoE). Faktorok a hőmérséklet (T), a gradiens idő ( $t_G$ ), a pH vagy a terner mozgófázis összetétel ( $t_c$ ). Két típusú kocka elkészítésére van lehetőség. A  $t_G$ -pH kocka protonfunkciós csoportot tartalmazó komponensek elválasztásánál ad fontos információt a komponensek pH függésére, míg a  $t_G$ -T- $t_c$  kockával a terner elegy szelektivitást befolyásoló hatását vizsgálhatjuk. A T-t és  $t_G$ -t elegendő két szinten vizsgálni, mert feltételezzük a lineáris kapcsolatot, a pH és  $t_c$  esetében három szint kijelölése szükséges. Így alakul ki a kockánkenti 12 kísérlet. A kísérletek kromatogramjait átvisszük egy elektronikus exportáló file típusba, ezt követi a kromatográfiás csúcsok azonosítása (peak tracking) [11].



1. ábra: A kocka modelljének felépítése.

A Az egyes pontok az alkromatogramokat szimbolizálják.

B Miután minden egyes kromatogram különböző komponens retenciót mutat, ahol a kromatográfiás szelektivitás különböző, így a kockával a szelektivitási változásokat kitűnően lehet tanulmányozni.

C A színekódolásból kiolvashatjuk, mely tartományokban dolgozhatunk a kritikus felbontás érték megtartásával.

Az 1.A ábrán lévő körök a kocka sarkain ill. élein jelzik a mérési pontokat. Az 1, 5, 9, 3, 7 és 11 pontok tartoznak a rövid-, míg a 2, 6, 10, 4, 8 és 12 pontok a hosszú gradiens időhöz ( $t_G$ -hez). Az 1, 5, 9, 2, 6 és 10 pontok tartoznak az alacsony, míg a 3, 7, 11, 4, 8 és 12 pontok a magas hőmérséklethez (T-hez).

A három különböző pH-jú vagy terner összetételű ( $t_c$ ) mozgófázishoz három különböző, ún.  $t_G$ -T-sík tartozik. Az azonos pH-hoz/ $t_c$ -hez tartozó  $t_G$ -T-síkok a következők: (1, 2, 3 és 4); (5, 6, 7 és 8); a (9, 10, 11 és 12). A szoftver a 3 mért  $t_G$ -T-sík mellé kiszámít további 97-et, ami által a kocka teljessé válik (1.B ábra). A modellben minden ponthoz rendelhető egy kromatogram, dimenzióként  $\sim 100$  pont képzelhető el, ami azt jelenti, hogy a háromdimenziós modellből 12 kísérlet alapján  $\sim 10^6$  szimulált kromatogramot lehet kinyerni. Az 1.C ábrán látható színekódolás segít tájékozódni a kockában a megfelelő mérési pont kiválasztásához. A gyakorlatban úgy határozhatjuk meg legegyszerűbben a mérési paramétereket, hogy olyan induló és végső eluens összetételt választunk, ahol a legkevésbé visszatartott komponensnek is van megfelelő visszatartása, illetve az összes komponens eluálódjon  $t_G$ -n belül, mind a 12 kísérletben. Amennyiben harmadik dimenzióként a pH-t választottuk, célszerű az alacsonyabb és magasabb pH-n is elvégezni ugyanazokat a kísérleteket, mert a komponensek ionizáltsági viszonyai nagymértékben befolyásolják a retenciót. Előfordulhat, hogy egy bázikus csoportot tartalmazó molekula magasabb pH-n még megfelelő visszatartással rendelkezik, de a pH csökkentésével megnövekszik az ionizáltsági foka és csökken a retenciója, vagyis már nem teljesül a minimum visszatartásra megszabott követelmény. Ugyanez mondható el savas csoportot tartalmazó molekula esetén, csak itt meg kell fordítani a gondolatot, vagyis a pH növelésével növekszik az ionizáltsági fok és csökken a retenció. Ugyanezeket a szabályokat alkalmazzuk az utolsóként eluálódó komponensekre is. Ezek szerint úgy válasszuk meg a pH-t és a gradiens összetételét, hogy az összes komponens eluálódjon. Ha kiválasztottuk a kiindulási pontot (1. ábrán az 1-es pont), akkor néhány egyszerű szabály betartásával könnyen meghatározhatjuk a többi kísérleti pontot is. Az első szabály: a hosszabb  $t_G$  háromszorosra legyen a rövidebb  $t_G$ -nek, második szabály: a két hőmérséklet ( $T_1$  és  $T_2$ ) között ne legyen 30 °C-nál nagyobb különbség, harmadik szabály:  $\Delta pH \leq 0,6$  legyen. Hasonlóan kell eljárunk, ha harmadik dimenzióként a terner összetételt ( $t_c$ ) választjuk. Itt az előkísérletek során a pH helyett a szerves módosítóra kell helyeznünk a hangsúlyt. A megfelelő visszatartás feltétel teljesülését AcN-t tartalmazó rendszerben célszerű elvégezni, mivel az AcN erősebb eluens, mint a MeOH, vagyis a komponensek korábban eluálódnak. Ugyanezen ok miatt a gradiens idejét és meredekségét a MeOH-t tartalmazó rendszerben érdemes meghatározni.

Sok esetben a terner mozgófázis összetétel eltérő szelektivitást eredményez a folyadékromatográfiában, mintha külön-külön alkalmaznánk a módosítókat. Tipikus terner mozgófázis a víz/puffer-AcN-MeOH különböző arányú elegye, de sok esetben segíthet kis mennyiségű tetrahydrofuran vagy izopropanol hozzáadása is a víz/puffer-AcN vagy víz/puffer-MeOH tartalmú elegyekhez, hogy megváltoztassuk a szelektivitást. Az első DryLab kocka is terner mozgófázis összetétel optimalizálására született meg, ahol a  $t_G$  és a T-tengelyek mellett egy harmadik, ún. terner koncentrációs tengelyt ( $t_c$ ) vezetettek be, amely a szerves eluens variálta amennyiben AcN és MeOH között keverékeket

mért, ill. ábrázolt. Ez azt jelenti, hogy a puffer pH-ja („A” eluens) állandó marad, ugyanakkor a szerves rész („B” eluens) összetételét pedig változtatjuk [12]. A mérések kivitelezésénél célszerű úgy eljárni, hogy az első  $t_G$ -T síkhoz (1, 2, 3 és 4) tartozó méréseknél AcN-t, a második  $t_G$ -T síkhoz (5, 6, 7 és 8) tartozó méréseknél AcN/MeOH = 50/50 (v/v) arányú elegyét, a harmadik  $t_G$ -T síkhoz (9, 10, 11 és 12) tartozó méréseknél pedig MeOH-t választunk szerves módosító oldószernek.

A  $t_G$ -T-pH elnevezés egy másik fajta kockára utal, amikor a gradiens idő ( $t_G$ ) és a hőmérséklet (T) mellett a pH értékek (mint alternatívák a  $t_G$ -hez) optimalizálása történik [13]. A  $t_G$ , ill. a szerves módosító (%B) hatása a fordított fázisú folyadékkromatográfiában hatalmas. A víz eluensben lévő mennyiségének van a legnagyobb befolyása a szelektivitásra, ill. az egyes anyagok retenciójára. Amennyiben a vizsgálandó vegyületek valamelyike rendelkezik protonfunkciós csoporttal (savas vagy bázikus karakterrel), akkor a mozgófázis pH-ját állandó értéken kell tartani, hogy a molekuláris formák egyensúlya és ezáltal a retenció idő ne változzon. Ezt a pH állandóságot tudjuk biztosítani megfelelő puffer oldatok alkalmazásával. A szelektivitás változtatása szempontjából viszont jól tudjuk használni ezt a paramétert, hiszen, ha a protonfunkciós csoporttal rendelkező vizsgálandó anyag  $pK_a \pm 2$  értéke körül állítjuk be a pH-t, akkor a retenció pH-függő lesz. Ezáltal a szelektivitás ( $\alpha$ ) és a felbontás ( $R_s$ ) szabályozható, a pH-által pontosan beállítható lesz. Fontos megemlíteni, hogy minél nagyobb arányban van jelen az ionvisszaszorított molekuláris forma, annál nagyobb retenciót várhatunk.

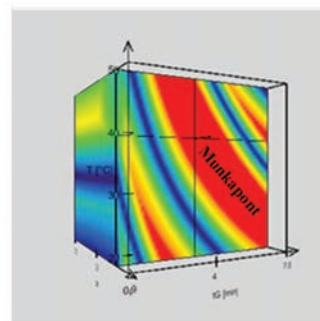
A robusztusság vizsgálat a módszer validálás része, amely arra ad választ, hogy a módszer paramétereinek kismértékű, tudatos megváltoztatása mennyiben befolyásolja a mérési eredményeket, hogyan változik az  $\alpha$  és az  $R_s$  értéke. Ha az eredményekre a változtatás nincs, vagy csak alig van hatással, azt mondjuk, hogy az adott analitikai módszer robusztus. Szignifikáns változásnak tekintendő, ha egy ismert vagy ismeretlen szennyezés főcsúcs alá kerül, vagy ha két szennyezés együtt eluálódik. A gyógyszeripari gyakorlatban úgy végezzük el a folyadékkromatográfiás módszer robusztusságának vizsgálatát, hogy az összes szennyezőt a rájuk vonatkozó limitek szintjén szpájkoljuk (addicionáljuk), vagyis olyan mintaoldatot készítünk, amely ismert mennyiségben tartalmazza az API összes szennyezőjét. Az alkalmazott módszertől függ, hogy melyik kromatográfiás paramétert milyen mértékben változtassuk. Változtatható kromatográfiás paraméterek lehetnek például: pH, puffer koncentráció, oszlop hőmérséklet, eluens összetétel, áramlási sebesség és gradiens módszer esetén a gradiens ideje és meredeksége. Ennek a módszernek nagy hátránya, hogy időigényes és a különböző faktorok egymásra gyakorolt hatását nem tudjuk vizsgálni. A DryLab szoftver legújabb verziója (DryLab4) lehetővé teszi egy tervezett módszer robusztusság vizsgálatát, ahol a gradiens elúcióban leggyakrabban alkalmazott körülmények hatásait tudjuk modellezni. Ezek lehetnek a  $t_G$ , T, pH vagy  $t_G$ , térfogat áramlási sebesség, induló és végső eluens összetétel. A szoftver robusztusság vizsgáló modulja a 6 mérési paramétert három szinten vizsgálja (-1, 0, +1) és kombinálja azokat, vagyis  $3^6 = 729$  teljes faktoros terv szimulációját végzi el [14].

Példaként egy fejlesztés alatt álló gyógyszermolekula folyadékkromatográfiás módszerfejlesztésének lehetőségét szeretném bemutatni, követve a QbD elvet, vagyis a fejlesztés korai szakaszától követtem a fázistermékek mennyiségét a köztitermékekben, valamint a végtermékben, illetve vizsgáltam a szintézis során keletkező egyéb szennyezőket is. A vizsgált minta (API) két ismert (Imp1 és Imp2) és a módszerfejlesztés pillanatában két ismeretlen (Imp3 és Imp4) szerkezetű szennyezőt tartalmaz, a kiindulási anyagok (Stm1 és Stm2) és fázistermékek (Int1-Int7) mellett. Itt kell megjegyezni, hogy a DryLab szoftverrel történő fejlesztéshez nem kell feltétlenül ismerni a szerkezeteket, csupán a retenciójukat kell követni a kromatográfiás rendszerben [15]. A kísérlettervezéshez használt modell az 1.A ábrán látható. A mérési pontokat és a hozzájuk tartozó mérési paramétereket a könnyebb érthetőség kedvéért az 1. táblázatban foglaltam össze. A mérésekhez UHPLC készüléket és 50 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m C18 teljesen porózus töltetű kolonnát használtam. A mozgófázis 10 mM Na-citrát puffer (eluens „A”) és acetonitril (eluens „B”) volt, 0,8 mL/perc térfogat áramlási sebesség mellett.

1. táblázat: DryLab mérési paraméterek.

Mérési pont	$t_G$ (perc)	T (°C)	pH
1	1,5	20	5,2
2	4,5	20	5,2
3	1,5	50	5,2
4	4,5	50	5,2
5	4,5	20	5,8
6	1,5	50	5,8
7	4,5	50	5,8
8	1,5	20	6,4
9	4,5	20	6,4
10	1,5	50	6,4
11	4,5	50	6,4
12	4,5	20	5,8

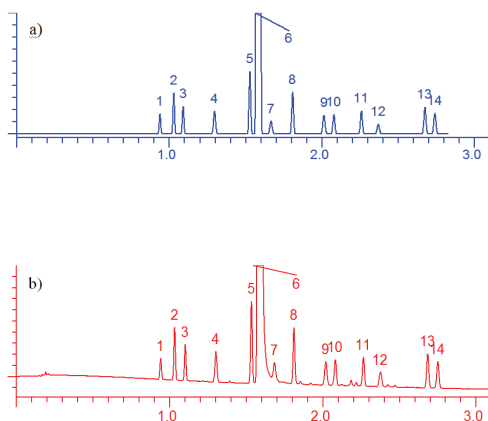
A kockából (2. ábra) meghatározott munkapont koordinátái a következők: pH = 6,2, T = 40 °C és  $t_G$  = 4,0 perc, 10 %B → 80 %B. Az így kapott gradiens meredekség értéke 17,5 %B/perc. A 2. ábrán szereplő, munkaponthoz tartozó kromatogramokból (3. a) ábra) megállapítható, hogy az elemzéshez szükséges idő 3 perc. Ez azt jelenti, hogy nem kell megvárni a 4 perces elemzési időt 80 %B-ig elég, ha 10 %B-ról indulunk és hozzáadjuk a 3 perc x 17,5 %B/perc = 52,5 %B eluens összetételt, így a gradiens paraméterei a következően módosíthatóak:  $t_G$  = 3,0 perc, 10 %B → 62,5 %B.



2. ábra: DryLab kocka a munkaponttal.



A szimulált (3. A ábra) és mért (3. B ábra) kromatogramok nagyon jó egyezést mutatnak, a szimulált és mért retenciós idők közötti átlagos különbség kisebb, mint 0,02 perc.



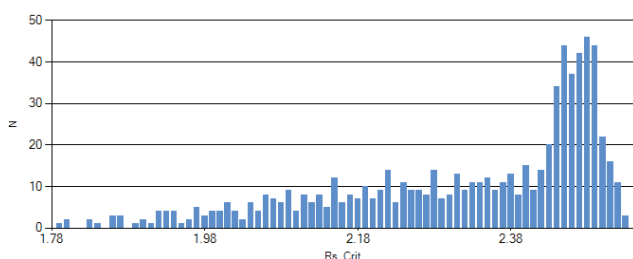
3. ábra: A szimulált A és mért B kromatogramok. Retenciós sorrend: Imp1, Int7, Imp2, Stm1, Imp3, API, Int2, Imp4, Int1, Int4, Int6, Stm2, Int5, Int3

A fejlesztett módszer szimulált robusztusság vizsgálatának elvégzéséhez be kell állítani az elválasztást befolyásoló paraméterek tolerancia szintjét, vagyis, hogy mennyi eltérést engedünk meg az eredeti módszerhez képest (2. táblázat).

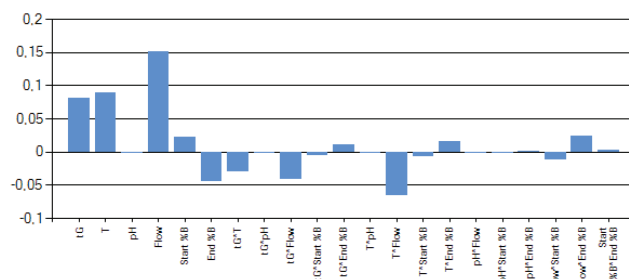
2. táblázat: Kromatográfiai paraméterek és megengedett eltérés értékeik.

Paraméterek	Értékek	± Eltérés
$t_c$ (perc)	4,0	± 0,1
T (°C)	40	± 1
pH	6,2	± 0,2
Áramlási sebesség (mL/perc)	0,80	± 0,04
Induló %B	10	± 1
Végző %B	80	± 1

A beállított robusztusság paramétereken elvégzett szimuláció eredményeit látjuk a 4. és 5. ábrákon. Mind a 729 kísérleti paraméter teljesíti az  $R_{s,krit} > 1,5$  feltételt. Ilyen körülmények között az áramlási sebességnek (Flow), a hőmérsékletnek (T) és a gradiens időnek ( $t_c$ ) és ezek kombinációjának ( $t_c \cdot Flow$  és  $T \cdot Flow$ ) van legnagyobb hatása az elválasztásra. Azt meg kell jegyezni, hogy a gyakorlatban nem kell minden paraméterre ilyen nagy tartományokat megadni, hiszen a mai modern készülékek nagyon reprodukálhatóan működnek rendeltetészerű használat közben.

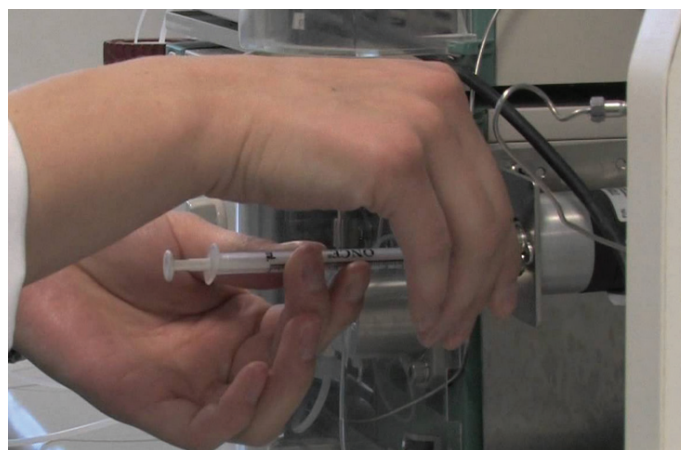


4. ábra: A 729 robusztusság vizsgáló kísérlet  $R_{s,krit}$  értékeinek eloszlása.



5. ábra: A kromatográfiai paraméterek hatása a felbontásra.

Összefoglalva elmondható, hogy az UHPLC technológia és a DryLab szoftver együttes alkalmazása rendkívül hatékony módszerfejlesztést tesz lehetővé. A fejlesztett módszerek gyorsak és robusztusak, a kísérleti modellből pedig megérthetőek a vizsgált komponensek retenciós tulajdonságai. A módszerkidolgozás, beleértve a kísérlettervezést, mintaelőkészítést, mérést és az adatok értékelését 1-2 munkanapot vesz igénybe. Az analízis ideje néhány perc, így a vizsgálati módszer a végső minősítésen kívül kitűnően alkalmazható a preparatív kutató laboratóriumokban, valamint gyártásközi ellenőrzések során.



Referencia

1. D. B. Hibbert, *J. Chromatogr. B*, 2012, 910, 2.
2. ICH Guidance for industry Q8(R2), 2009.
3. ICH Guidance for industry Q11, 2012.
4. S. Karmarkar, X. Yang, R. Garber, A. Szajkovic, M. Koberda, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, 100, 167.
5. ICH Guidance for industry Q2(R1), 2005.
6. I. Molnár, H.-J. Rieger, A. Schmidt, J. Fekete, R. Kormány, *The Column*, 2014, 10/6, 16.
7. I. Molnár, *J. Chromatogr. A*, 2002, 965, 175.
8. I. Molnár, K. E. Monks, *Chromatographia*, 2011, 73, 5.
9. Cs. Horváth, W. Melander, I. Molnár, *J. Chromatogr.*, 1976, 125, 129.
10. K. E. Monks, I. Molnár, H.-J. Rieger, B. Bogáti, E. Szabó, *J. Chromatogr. A*, 2012, 1232, 218.
11. I. Molnár, H.-J. Rieger, K. E. Monks, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 3193.
12. M. R. Eurby, G. Schad, H.-J. Rieger, I. Molnár, *Chromatography Today*, dec. 2010, 13.
13. R. Kormány, I. Molnár, H.-J. Rieger, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, 80, 79.
14. R. Kormány, I. Molnár, J. Fekete, D. Guillaume, Sz. Fekete, *Chromatographia*, 2014, 77, 1119.
15. R. Kormány, I. Molnár, J. Fekete, *LCGC Europe*, 2014, 27/5, 240.



# 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods



Húsz évvel az első Balaton Konferencia megrendezése után a Magyar Elválasztástudományi Társaság (METT) ismét megszervezi a komoly elismertségnek örvendő Balaton Szimpóziум nemzetközi konferenciát. A hagyományok szellemében a *10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods* konferenciát **2015. szeptember 2-4.** között Siófokon, a Hotel Azúrban szervezzük meg.

A Balaton Szimpóziумok sorozata mára Közép-Európa egyik legjelentősebb elválasztástudományi konferenciájává vált. A Balaton Szimpóziум két évente az egész világról Siófokra vonzza az elválasztástudomány szakembereit. A 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods alkalmat ad arra, hogy az elválasztástudomány szakértői, döntéshozói, a felhasználók és kutatók megvitassák a legfrissebbek eredményeket, a szakma újdonságait, illetve napjaink és a jövő technikai kihívásait.

A 10th Balaton Symposiumot a 2014 októberében elhunyt Georges Guiochon professzor emlékének dedikáljuk. Georges Guiochon az elválasztástudományok szinte valamennyi területén maradandót alkotott. Kapcsolata a magyar szakemberekkel az 1970-es évek óta rendkívül szoros volt, a rendezvényeinken rendszeresen részt vett és előadást tartott. 1999-ben a Társaságunk *Halász Medal Award* kitüntetésében részesült.

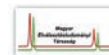
A 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods tematikája hangsúlyt fektet a különböző analitikai, preparatív és ipari eljárásokra és alkalmazásokra, a gyógyszeripari, környezeti, bioanalitikai, biotechnológiai, bűnügyi, élettudományok és ipari elválasztástechnikai módszerekre. Az új állófázisok és az oszloptechnológia, az elválasztási technikák, az elválasztástudomány elmélete és az alkalmazások területén jelentkező fejlesztések és új trendek is hangsúlyosan megjelennek a szimpóziум tematikájában.

Örömmel tájékoztatjuk, hogy a **10th Balaton Symposium** konferencián a **METT** tagjai – amennyiben a 2015. évi tagdíjat befizették – kedvezményes részvételi díjjal vehetnek részt és a részvételi díjat Ft-ban fizethetik.

Társaságunk a METT tagokat jelentős támogatásban részesíti: a teljes részvételi díjból **150 EUR**, ill. hallgatók számára **100 EUR** engedményt biztosít. A részvételi díj a METT tagok számára megegyezik a 2013-as, a 9th Balaton Symposium **díjaival**.

Részvételi díj magyar résztvevők és kedvezményes részvételi díj a METT tagjai számára.

	2015. június 30-ig	2015. június 30. után
Teljes részvételi díj	110.000 Ft	130.000 Ft
<b>METT tagok részére</b>	<b>61.000 Ft</b>	<b>77.000 Ft</b>
PhD hallgatók részére	82.000 Ft	90.000 Ft
<b>METT tag PhD hallgatók részére</b>	<b>50.000 Ft</b>	<b>63.000 Ft</b>
Kísérők részvételi díja	50.000 Ft	55.000 Ft



A díj **bruttó** összegben értendő, mely magában foglalja a konferencia tudományos programjain és a kiállításon való részvételt, a konferencia kiadványait, a kávészüneteket és az ebédet szeptember 2–4. között, a Gálavacsorán és a Kerti Partin, valamint a koncerten való részvételt. A részvételi költség szállásdíjat nem tartalmaz.

A *kísérők* részvételi díja az ebédet szeptember 2–4. között, a Gálavacsorán és a Kerti Partin, valamint a Koncerten való részvételt tartalmazza. A részvételi költség szállásdíjat nem tartalmaz.

Az online jelentkezés, az összefoglalók feltöltése és a szállásfoglalás a szimpóziум honlapján ([www.balaton.mett.hu](http://www.balaton.mett.hu)) elérhető.

A **10th Balaton Symposium** szervezőbizottsága pályázati lehetőséget hirdet meg METT tagok részére a rendezvényen való ingyenes részvételre. A részvételi költség magában foglalja a Balaton Symposium 3 napjára a szállást (2 éjszaka) kétágyas elhelyezéssel és a teljes ellátást, az előadásokon, a kiállításon, a kulturális programokon való részvételt és a nyomtatott anyagokat, de az utazási költség a pályázót terheli. A részletes pályázati felhívás a szimpóziум honlapján ([www.balaton.mett.hu](http://www.balaton.mett.hu)) elérhető.

Bízunk abban, hogy a *10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods* konferencia résztvevői között köszönthetjük. A tudományos előadás vagy poszter összefoglalóját 2015. június 30-ig várjuk.

Prof. Felinger Attila  
a szimpóziум elnöke  
METT elnök

Dr. Gazdag Mária  
METT főtitkár

# Reagecon

KÉMIAI ÉS ANALITIKAI SZTENDERDEK



- ◆ Kallibráció
- ◆ Validáció
- ◆ Kontrol
- ◆ Eszközminősítés

## Világszínvonalú Gyártó

- ◆ Elsődleges Sztenderdek
- ◆ Másodlagos Sztenderdek
- ◆ Laboratóriumi Reagensek

ICP, PHBUFFER, PESTICIDE,  
AVS, PAH...

Keresse Reagecon kapcsolattartóját, **Héja Kornéliát**  
a +36 30 239-1432-es telefonszámon,  
illetve a [kornelia.heja@gen-lab.hu](mailto:kornelia.heja@gen-lab.hu) e-mail címen!



RAKTÁRRÓL AZONNAL ELÉRHETŐ TERMÉKKÉSZLET  
KEDVEZŐ ÁRAK  
GYORS KISZÁLLÍTÁS

A Reagecon kiemelt magyarországi forgalmazója a  Kft.



# Hatékonyabb gélszűrés: új szemlélet a módszerfejlesztésben a Yarra gélszűrési kromatográfiás oszlopok használatával

**Michael McGinley, Ismail Rustamov, Michael Klein**  
**Phenomenex Inc., 411 Madrid Ave, Torrance, CA 90501 USA**  
 fordította: Héja Kornélia

A piacon megjelenő Yarra gélszűrési oszlopok nagyobb hatékonysággal bírnak, mint más típusú gélszűrési oszlopok és nagyobb ellenállást mutatnak az ionos kölcsönhatásokkal szemben. A só és puffer koncentráció jelentős hatással lehet a másodlagos kölcsönhatásokra, amelyek befolyásolhatják az elválasztásokat, ezért a módszerfejlesztést javíthatjuk a mobil fázis összetételével. Ez esetben már az újabb generációs Yarra oszlopokat javasoljuk, amelyekről a cikk további részében olvashatunk.

## Bevezetés

A gélszűrési kromatográfia fehérjék méret szerinti elválasztásán alapul (oldatban lévő méret szerinti elválasztás, amely a molekulatömeg alapján történik). A gélszűrési technika a fehérje aggregátumok mennyiségi meghatározását teszi lehetővé, amely hatással bír az átírás után kialakuló fehérjék oldatbeli szerkezetére. Egy egyszerű izokratikus elválasztásnak számos kritikus paramétere lehet egy módszer optimalizálásánál. A mozgó fázis só és puffer koncentrációja például jelentősen befolyásolhatja a retenció időt és az elválasztást (ez főként a bázikus és hidrofób fehérjéknél figyelhető meg).

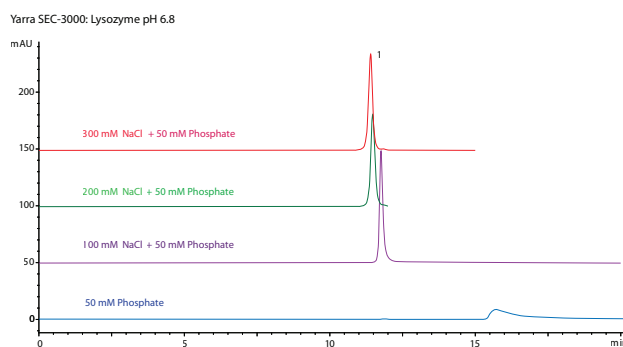
## Anyagok és módszerek

Sztenderdként eltérő típusú fehérjéket és jelölő markereket használhatunk (thyroglobin, IgA, IgG, ovalbumin, lizozim és uridin). Minden vegyszer és fehérje a Sigma-Aldrich-tól származik (St. Louis, MO, USA). Ezeket az anyagokat az állófázis felületén lejátszódó másodlagos kölcsönhatások elemzésére használják, vizsgálva a molekulatömeg linearitását. Az analízisek az Agilent által gyártott Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) HPLC készüléken (UV detektorral, automata mintaadagolóval, ChemStation szoftverrel kiegészítve) történnek. Az elválasztásokat 300x7,8 mm-es Yarra SEC-2000 3 µm és Yarra SEC-3000 3 µm dimenziójú oszlopokon végzik (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A mérési körülmények környezeti hőmérsékleten és 1 ml/perc áramlási sebességgel történnek. A mozgó fázisok pontos puffer koncentrációját jól mutatják az ábrák mellett lévő szövegek.

## Eredmények

A mozgó fázis összetétele jelentős hatással bír a gélszűrési szeparációkra. A oszlopok kötött állófázisát úgy alakították ki, hogy csökkentse a szilika felületén

a negatív töltésű szilanol csoportok és a bázikus tulajdonságú fehérjék között kialakuló kölcsönhatásokat. Számos egyéb (ionos) kölcsönhatás is megjelenhet, amely csökkenthető a mozgó fázis só koncentrációjának növelésével. Kitűnő példa erre az 1. ábrán látható lizozim (bázikus fehérje) Yarra SEC-3000 oszlopon történő elválasztása különböző eluens összetételeknél. Az eluens só koncentrációjának növelése csökkenti a lizozim retenció idejét és javítja a csúcsalakot, ezáltal a visszanyerést is. A koncentráció egy kulcsfontosságú paraméter a gélszűrési kromatográfiában.



1. ábra

Yarra SEC-3000 kolonna: lizozim elválasztás pH 6,8-as közegben

Kolonna típusa: Yarra SEC-3000 3 µm

Kolonna dimenziója: 300x7,8 mm

Kolonna katalógusszáma: 00H-4513-K0

Mozgó fázis: 50 mM Nátrium foszfát: pH 6,8 + Nátrium klorid (0 mM, 100 mM, 200 mM és 300 mM koncentrációkban)

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Detektálás: UV (220 nm)

Injektált térfogat: 5 µl

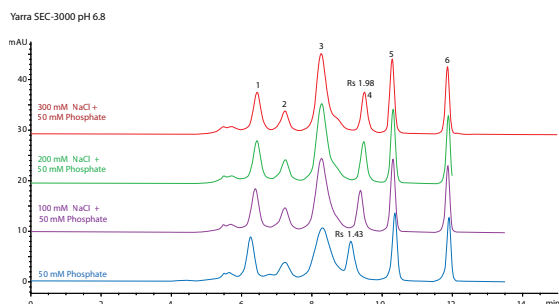
Minta:

1. Lizozim (14,7 kDa)

*Alizozim Yarra 3 µm SEC-3000 kolonnán történő detektálásánál különböző mozgó fázis összetételeket (NaCl koncentráció növelése) használnak. Az NaCl koncentráció növelésével a lizozim retenció ideje csökken, a csúcsalak és a visszanyerés is javul, valamint ionos kölcsönhatás lép fel az állófázis és a vizsgálandó fehérje között.*

Gélszűrési kromatográfiához kötött állófázist használnak, a jellemző diol funkciós csoportok miatt. A diol ligandumok a szilika felületén vannak, jelezve ezáltal a poláros funkciót. A diol csoportokat nagyon gyenge hidrofób kölcsönhatásoknál is használják: növelve az eluens sókoncentrációját, megjelenik a hidrofób kölcsönhatás a kötött állófázis és a

hidrofób fehérje között. A 2. ábrán egy fehérje sztenderd elegyet injektálnak Yarra 3  $\mu\text{m}$  SEC-3000 oszlopra növelve a mozgó fázis sókoncentrációját. Az ovalbumin (közepesen hidrofób fehérje) retenciós idejét hasonlítják össze egyéb fehérjék retenciós idejével, növelve a mozgó fázis sókoncentrációját. A többi fehérje retenciós ideje alig változik az ovalbuminhoz képest.



## 2. ábra

Yarra SEC-3000 kolonna: elválasztás pH 6,8-as közegben

Kolonna típusa: Yarra SEC-3000 3  $\mu\text{m}$

Kolonna dimenziója: 300x7,8 mm

Kolonna katalógusszáma: 00H-4513-K0

Mozgó fázis: 50 mM Nátrium foszfát: pH 6,8 + Nátrium klorid (0 mM, 100 mM, 200 mM és 300 mM koncentrációkban)

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Detektálás: UV (280 nm)

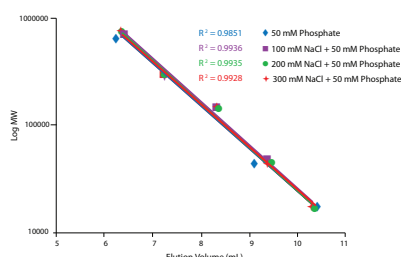
Injektált térfogat: 5  $\mu\text{l}$

Minta:

1. Tyroglobin (699 kDa)
2. IgA (300 kDa)
3. IgG (150 kDa)
4. Ovalbumin (44 kDa)
5. Miogloblin (17 kDa)
6. Uridin

Sztenderd fehérje elegy (tyroglobin, IgA, IgG, ovalbumin, miogloblin, uridin) Yarra 3  $\mu\text{m}$  SEC-3000 kolonnán történő detektálásánál különböző mozgó fázis összetételeket (NaCl koncentráció növelése) használnak. A só koncentráció növelésével nő az ovalbumin retenciós ideje, illetve a hidrofób kölcsönhatás is nő a kötött diol állófázis és az eltérő típusú fehérjék között.

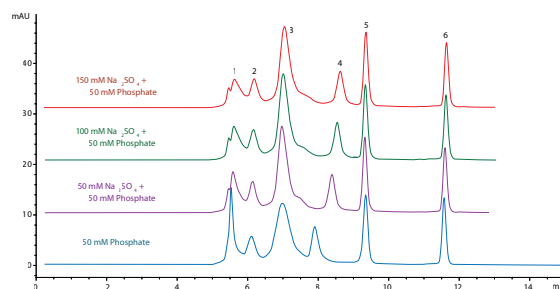
A 3. ábrán a fehérje mix kalibrációs egyenesét mutatjuk be, a molekulatömeg logaritmusát ábrázolva a viszsztatartás függvényében. Az ábrán jól látható, hogy a só koncentráció növelése nem változtat az elegyben lévő fehérjék retenciós idején, kivéve az ovalbumint. Optimális mozgó fázis megválasztásával minimálisra csökkenthető az ionos és a hidrofób kölcsönhatás is. A kísérletet megismételték kisebb pórusméretű GFC kolonnán is (Yarra SEC-2000), nátrium-szulfátot használva az eluensben.



## 3. ábra

Fehérje mix kalibrációs egyenese Yarra SEC-3000 oszlopra

A fehérje sztenderdek molekulatömeg logaritmusáról, illetve a különböző mozgófázis összetételekről a 2. ábra is ad némi információt. A legtöbb fehérje retenciós ideje minimálisan változik, ha növeljük a mozgó fázis sókoncentrációját, kivéve az ovalbumint.



## 4. ábra

Yarra SEC-2000 kolonna: elválasztás pH 6,8-as közegben

Kolonna típusa: Yarra SEC-2000 3  $\mu\text{m}$

Kolonna dimenziója: 300x7,8 mm

Kolonna katalógusszáma: 00H-4512-K0

Mozgó fázis: 50 mM Nátrium foszfát: pH 6,8 + Nátrium szulfát (0 mM, 50 mM, 100 mM és 150 mM koncentrációkban)

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

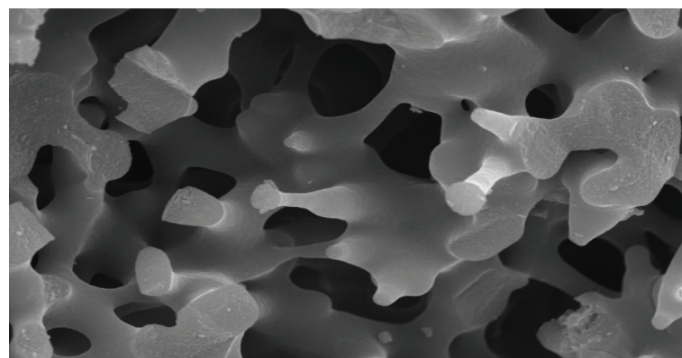
Detektálás: UV (280 nm)

Injektált térfogat: 5  $\mu\text{l}$

Minta:

1. Tyroglobin (699 kDa)
2. IgA (300 kDa)
3. IgG (150 kDa)
4. Ovalbumin (44 kDa)
5. Miogloblin (17 kDa)
6. Uridin

A 4. ábrán fehérje standard elegyet injektálnak Yarra 3  $\mu\text{m}$  SEC-2000 oszlopra, növelve a mozgó fázis sókoncentrációját (nátrium-szulfát). Hasonló retenciós időbeli eltolódást láthatunk az ovalbuminra, mint a 2. ábrán, amely arra utal, hogy az eltolódás nem só vagy oszlop típus függő.



## Konklúzió

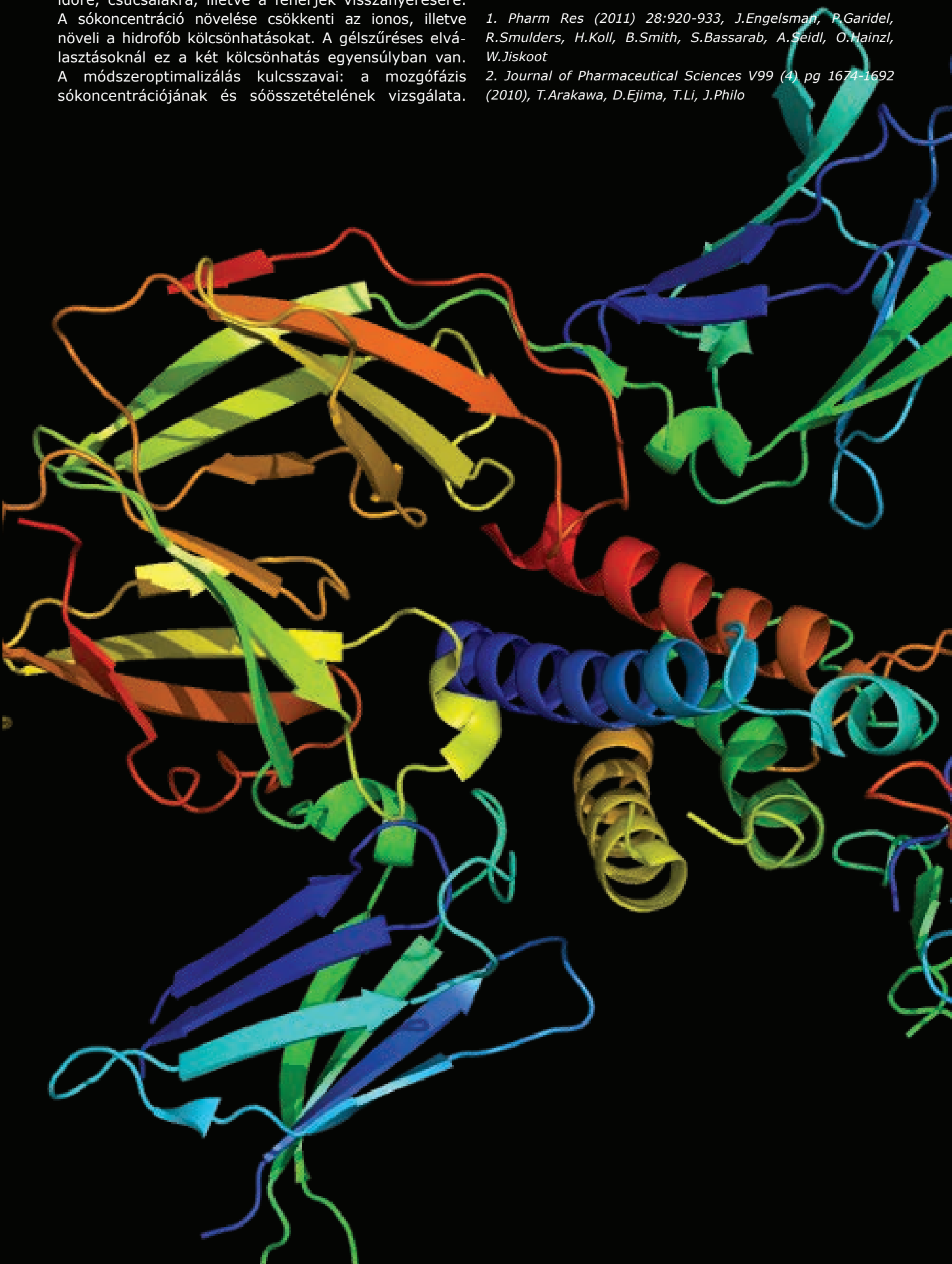
A gélszűrési kromatográfia alapvetően egy izokratikus módszer, a fehérjék oldatban történő, méret szerinti elválasztására. Az állófázis és a fehérje között kialakuló másodlagos kölcsönhatások megértése nem egyszerű feladat. A mozgó fázis összetétele jelentős szerepet játszik a fehérjék elválasztásában, az elválasztást meghatározza az ionos és a hidrofób kölcsönhatás is. A mozgó fázis pH-ja befolyásolhatja a fehérjék, illetve a felületen lévő szilanol csoportok töltését is.



A mozgó fázisban lévő sók hatással lehetnek a retenciós időre, csúcsalakra, illetve a fehérjék visszanyerésére. A sókoncentráció növelése csökkenti az ionos, illetve növeli a hidrofób kölcsönhatásokat. A gélszűrési elválasztásoknál ez a két kölcsönhatás egyensúlyban van. A módszeroptimalizálás kulcsszavai: a mozgófázis sókoncentrációjának és sóösszetételének vizsgálata.

#### Referencia

1. *Pharm Res* (2011) 28:920-933, J.Engelsman, P.Garidel, R.Smolders, H.Koll, B.Smith, S.Bassarab, A.Seidl, O.Hainzl, W.Jiskoot
2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* V99 (4) pg 1674-1692 (2010), T.Arakawa, D.Ejima, T.Li, J.Philo



# Vízoldható N-tartalmú heterociklusok preparatív tisztítása HILIC technikával, nagy áteresztő képességű rendszeren

Urbán Zoltán

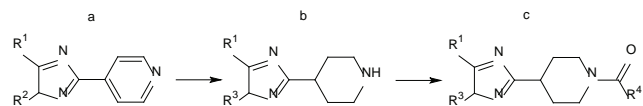
Cominnex Zrt. 1031 Budapest, Záhony u. 7.

A gyógyszerkutatás kezdeti szakaszában megtervezett és szintetizált nagyszámú „kis molekula” jelentős része valamilyen tisztítási eljárást igényel, mivel a későbbi biológiai tesztek torzítatlanságához elengedhetetlen, hogy az előállított vegyületek minél kevesebb szennyezőt tartalmazzanak. A továbbiakban a kémiai „tér” azon szegmensébe tartozó anyagok preparatív tisztításába nyelhetünk betekintést, ahol a normál és a fordított fázisú technikák is csődöt mondanak. A vízoldható bázikus vagy amfoter karakterű vegyületek preparatív tisztítása során több akadályba is ütközünk:

- A legtöbb normál fázissal kompatibilis oldószerben oldhatatlanok, valamint erősen irreverzibilisen kötődnek az állófázishoz.
- Fordított fázisú körülmények között nem tudunk olyan pH-n dolgozni, ami megfelelő visszatartást és szelektivitást biztosítana amellet, hogy az állófázisunkat ne károsítanánk. A HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) technika olyan lehetőséget ad a kezünkbe, ami a poláris vízoldható vegyületek esetében átlépi a hagyományos normál és fordított fázisú rendszerek korlátait. Lényege, hogy poláris állófázison, víz tartalmú mozgófázissal dolgozunk. A minta komponensek a poláros állófázis felületen kialakuló magas víztartalmú filmréteg és vízben szegényebb mozgófázis között oszlanak meg. A visszatartás a komponensek vízoldhatóságával (logD, logP) nő, a mozgófázis víztartalmának emelkedésével csökken.
- Az állófázis típusa szabja meg a felületi vízréteg „vastagságát” és stabilitását, így szerepet játszik a visszatartásban, a szelektivitásra gyakorolt hatása másodlagos. Lehet módosíthatatlan szilikagél ill. módosított fázisok, pl: Diol, -NH<sub>2</sub>, -PFP, stb...
- A legfontosabb műveleti paraméterek a mozgófázis víztartalma és pH-ja. A mozgófázis víztartalma állófázistól függően 5-40% között változhat. Használhatjuk a fordított fázisban alkalmazott oldószereket, pl: MeOH, EtOH, MeCN, stb...
- A pH szerepe kettős. Ionizált állapotban a vízoldhatóság megnő, az eltolt egyensúlyi állapot miatt a csúcsok alakja szimmetrikusabb lesz. Az alkalmazott puffer vagy pH módosító koncentrációja illetve a pozitív ellen ion minősége hatással van a visszatartásra és a szelektivitásra. Preparatív környezetben használjunk illékony puffereket, illetve pH módosítókat, pl: TFA, HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH, NH<sub>4</sub>HCOO, így a frakciókban visszamaradó puffer felesleg hő közléssel könnyen eltávolítható.

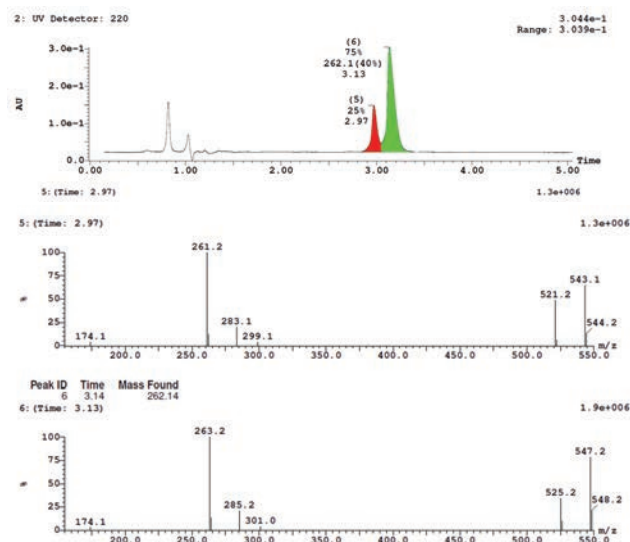
A továbbiakban egy molekula könyvtár szinteti-

zálását követő valós tisztítási problémán keresztül bemutatom a módszer hatékonyságát, valamint gyakorlati alkalmazásának előnyeit és korlátait. A szintézis sor befejező lépései során (a) anyagból redukcióval előállítottuk (b)-t, majd azt különböző savkloridokkal acileztük. Mivel az (a)-ból (b) redukció nem volt teljes, a derivatizálás során a részben redukált termék is elreagált az acilező szerrel, ami ~25% mellékterméket eredményezett a végtermékben, így egy végső tisztítási lépés közbeiktatására volt szükség.



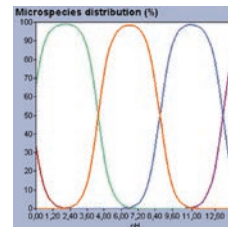
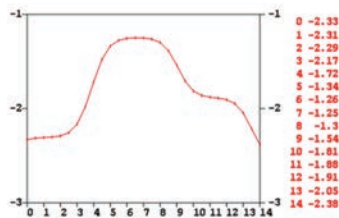
1. ábra: A szintézissor utolsó két lépésének vázlata.

A nyers termékeket feldolgozás után rutin módszerekkel C18 oszlopon pH: 7,4 -en vizsgáltuk LCMS technikával. Az elkészült molekulák ~30%-nál a ChemAxon Marvin Sketch predikciói szerint pH: 3 környékén a logD kisebb mint -1 és pH: 7-nél sem éri el a 0-át. Ezen vízoldható poláris vegyületeket HILIC technikával sikerült izolálni.



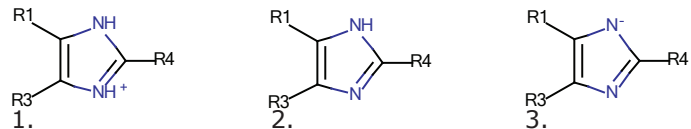
2. ábra: Az 1-es számú vízoldható termék LC/MS vizsgálata HILIC oszlopon.

Oszlop:	Kinetex HILIC 2,6 µm
Dimenzió:	100 x 4,6 mm
Eluens:	A: H <sub>2</sub> O+0,1% TFA B: MeCN+0,1% TFA
Áramlás:	0-3 min, 92-80 % B, 1,3 ml/min
Injektálás:	2 µl
Detektálás:	UV 220 MS APCI+

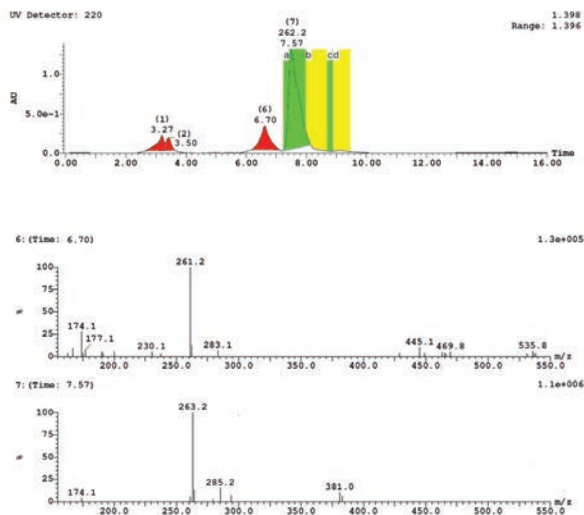


3. ábra: Az 1-es számú vízoldható termék LC/MS vizsgálatának körülményei és a logD változása a pH függvényében.

A minták tisztítása tömegspektrométerrel csatolt preparatív HPLC készüléken történt, ahol a frakciószedés az oszlopról eluálódó komponensek molekulatömege alapján történik – Mass Trigger.



6. ábra: Az 1-es számú vízoldható termék szilárd fázisú extrakciós sómentesítése és pKa diagramja.



4. ábra: Az 1-es számú vízoldható termék preparatív elválasztása HILIC oszlopon, mass triggered rendszeren.

Oszlop:	Kromasil Si 10 um	Gradiens	
Dimenzió:	250 x 30 mm	idő (min)	B %
Eluens:	A: MeCN + 0,1 % TFA	0.00	10
	B: H2O+0,1 % TFA	0.50	10
Áramlás:	40 ml/min	12.00	20
Injektálás:	1500-2000 ul	13.00	20
Detektálás:	UV 220	14.00	10
	MS APCI+	16.00	10

Minták nyers súlya 80-120 mg között volt, a feloldás 2000 µl MeCN:H2O 9:1 elegyben történt 10 µl TFA hozzáadásával. Az anyagok döntő többsége egy frakcióban (~30ml) eluálódott. Az anyagokat bepárlás után TFA só formájában kapnánk meg, amit felszabadítás után vizes rendszerből nem tudnánk elkülöníteni a nem illó szeretlen sóktól. Ezt elkerülendő a frakciókat ~30 ml vízzel hígítottuk, majd erős kation cserélő fázisra vittük fel, amiről MeCN-es mosást követően 10 mM –os pH: 7,4-es NH<sub>4</sub>HCOO puffer rendszerrel mostuk le a termékeket. Az így sómentesített anyagok súlya a befúvós bepárlást követően 40 és 70 mg között volt, tisztaságuk pedig 95 % felett.

Cartridge	Strata-X-C, 2g/20 ml
Kondicionálás	30 ml MeCN
Eqvilibrálás	30 ml MeCN:H2O +0,1 % TFA
Mosás	30ml MeCN
Szárítás	1 perc nitrogén áramban
Eluálás	30 ml 10 mM-os NH <sub>4</sub> COOH (pH 7,4)

5. ábra: Az 1-es számú vízoldható termék preparatív elválasztásának körülményei.



# Nagyobb gázkromatográfiás érzékenység, jobb csúcsalak és nagyobb kinetikai hatékonyság elérése

**Matthew Trass and Sky Countryman**  
**Phenomenex Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA, 90501 USA**

Két egyszerű módszer létezik, hogy teljesíteni tudjuk a módszer kimutatási határ (MDL) követelményét.

1. Az oldószer fókuszálással növelhetjük a módszer érzékenységét, anélkül, hogy az elválasztást rontanánk.
2. A megfelelő kolonna kiválasztásával jó csúcsalakot és kis nagyságú és zajú alapvonalat kapunk.

## Bevezető

Két egyszerű módszer áll rendelkezésre, hogy a csúcsalakot javítsuk és szélességüket csökkentsük. Az első ilyen megoldás az oldószerrel végrehajtott csúcsfókuszálás, amikor közvetlenül a kolonnára (on-column) adagolunk, vagy áramlás leosztásmentesen (splitless) végezzük el azt. A második megoldás az adott feladathoz a megfelelő kolonna kiválasztása, ahhoz, hogy az alapvonal zaja csökkenjen és megfelelő csúcsalakot és kinetikai hatékonyságot kapjunk. A két módszer együttes alkalmazásával jó gázkromatográfiás módszert kapunk, amely teljesíti a kis kimutatási határt.

## Oldószeres fókuszálás

Az oldószeres fókuszálás célja, hogy szűkebb kromatográfiás csúcsot kapjunk, anélkül, hogy áramlás leosztásos (split) adagolást alkalmaznánk. Azaz, hogy szűkebb, nagyobb kinetikai hatékonyságú csúcsokat kapunk áramlás leosztásos (split) adagolás nélkül, azért fontos, mert az érzékenység nő. A jól beállított gázkromatográfiás paraméterekkel, az oldószeres fókuszálással szűkebb és szimmetrikus csúcsokat kapunk az elemzések többségében. Az oldószeres fókuszálást két tényezőre vezetjük vissza. Az első az, amikor az áramlás leosztás mentes (splitless) adagolás után az oldószergőzök kondenzálódnak a hideg kolonnán. Mivel az oldószergőz térfogata sokkal nagyobb, mint a folyadéké, amikor a kondenzáció megtörténik, akkor a minta a kolonna kis részén található. A második megoldást alkalmazhatjuk mind áramlás leosztás mentes (split), mind közvetlenül a kolonnára történő (on-column) adagoláskor és gyors, szabályozott felfűtést igényel. Az első módszertől eltérően mind az oldószer, mind a minta komponensei kondenzálódnak az adagolás után a kolonnán. A kondenzálódott oldószer és minta szétterül a kolonna belső felületén. A szétterült zónából az oldószer lassan elpárolog, a minta komponensei, az egyre szűkülő oldószerben koncentrálnak (1. ábra). Az oldószer teljes elpárolgása után a minta komponensei egy nagyon szűk zónában koncentrálnak. Az oldószer okozta mintakomponens-koncentráció mindkét változatban, vagy a mintakomponensei, vagy az oldószer és a minta komponensei együttesen a kolonnán kondenzálódnak.

Az 1. táblázatban foglaltuk össze azokat a gázkromatográfiás paramétereket, amelyek a kondenzációt befolyásolják. Ezek a paraméterek a következők: a kiindulási hőmérséklet, egyben az adagolási, az oldószer és a minta komponensek illékonysága, a kolonna fázisaránya. A továbbiakban sorba vesszük azokat a paramétereket, amely a minta komponenseinek fókuszálását befolyásolják az előbb ismertetett oldószeres fókuszálásnál. Szintén bemutatjuk, hogy a termosztát kezdeti hőmérséklete az adagolásnál milyen könnyen eredményez keskeny, nagy kinetikai hatékonyságú kromatográfiás csúcsokat.

## Az oldószeres fókuszálást befolyásoló GC paraméterek

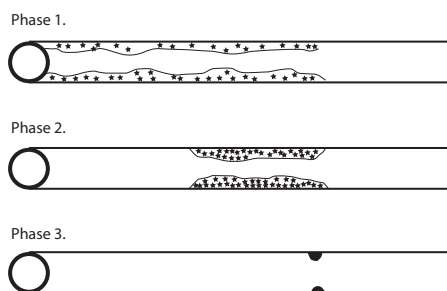
Amikor oldószeres fókuszálásra törekszünk, a termosztát kezdeti hőmérsékletének megválasztása a legfontosabb paraméter. Célszerű az induló hőmérsékletet a legelőször eluálódó komponens forráspontjánál 50 °C -kal alacsonyabb értékére beállítani. Ezt a hőmérsékletet egészen addig kell tartani, amíg az összes minta az oszlopra nem került.

A második legfontosabb paraméter a fázisarány. Ellenkéntben a kezdeti hőmérséklettel, ezen paraméter csak különböző GC kolonnák beszerelésével változtatható. Minél kisebb a fázisarány (nagyobb a filmvastagság), annál nagyobb mennyiségű mintát és oldószert tudunk az állófázis felületére juttatni. Alacsony fázisarányal dolgozva olyan fókuszálási hőmérsékletek is elérhetővé válnak, melyek korábban nem. A harmadik meghatározó változó, amely hatással van a oldószeres fókuszálásra, az maga az oldószer, bár e téren a legtöbb esetben korlátozottak a lehetőségeink. Ha van rá módunk, válasszuk meg úgy a minta oldószert, hogy a lehető legnagyobb legyen a különbség az oldószer forráspontja és a termosztát kezdeti hőmérséklete között. Például, ha a kiindulási hőmérséklet 30 °C, az etil-acetátnak (forráspont: 77,1 °C) jobb fókuszáló hatása lesz, mint a diklór-metánnak (forráspont: 39 °C).

1. táblázat. A oldószeres fókuszálást befolyásoló tényezők.

GC paraméterek	Hatása a oldószeres fókuszálásra
Termosztát kezdeti hőmérséklete	Minél kisebb, annál nagyobb a minta kondenzációjának mértéke
Fázisarány	Minél kisebb, annál nagyobb a minta kondenzációjának mértéke.
A minta és az oldószer forráspontja	Minél nagyobb a forráspont, annál nagyobb a minta kondenzációjának mértéke.



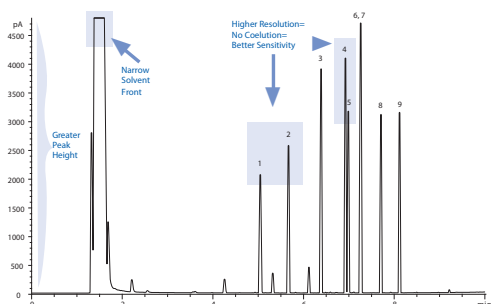
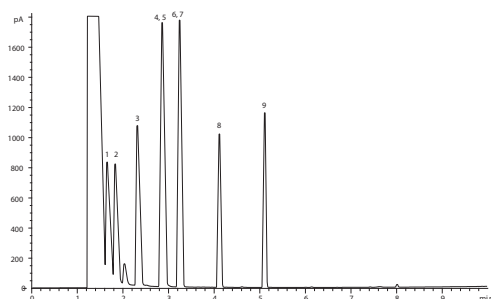


1. ábra. A minta viselkedése a hőmérséklet programozott analízis során. Az 1. fázisban még alacsony hőmérséklet uralkodik, a következőkben pedig azt láthatjuk, hogy miként távozik el az oldószer a folyamatos hőmérséklet emelés hatására.

1. fázis: A minta kondenzálódik a hideg oszlopra
2. fázis: Az illékonyabb oldószer lassanként eltávozik
3. fázis: Amint az összes oldószer elillant, a minta egy keskeny területen koncentrálnak

### Kísérleti eredmények

A kromatogramokon szereplő minták mindegyikét HP6890 gázkromatográfon analizálták, Phenomenex Zebron ZB-35 GC 30 m x 0,53 mm x 0,50 µm oszlopot alkalmazva. A további paraméterek a 2. ábrán találhatóak.



2. ábra: A kiindulási hőmérséklet változtatásának hatása a mintafókuszálásra. A teszteleg különböző szénhidrogéneket tartalmaz hexánban (forráspont: 69 °C) oldva. A: Kiindulási hőmérséklet 140 °C. B: Kiindulási hőmérséklet 60 °C.



A:

**Oszlop:** Phenomenex, Zebron ZB-35

**Dimenzió:** 30 m x 0,53 mm x 0,50 µm

**Cikkszám:** 7HK-G003-17

**Adagolás:** áramlás leosztás mentes (splitless) 0:1; 250 °C; 1 µL

**Vivőgáz:** Hélium; 5,7 mL/perc

**Hőmérsékletprogram:** 140 °C 2 percig, majd 10 °C/perccel, 200 °C-ra, majd 15 °C/perccel 230 °C-ra

**Detektálás:** FID; 350 °C

**Minta:**

1. 2-Oktanon
2. Tetradecan
3. 1-Octanol
4. Methyl decanoat
5. Methyl undecanoat
6. 1-Decanol
7. Methyl dodekanoát
8. 2,6-Dimethylaniline
9. 2,4-Dimethylphenol

B:

*Nagyobb csúcsmagasság, keskenyebb oldószer front, nagyobb felbontás = nincs koelúció = nagyobb érzékenység*

**Oszlop:** Phenomenex, Zebron ZB-35

**Dimenzió:** 30 m x 0,53 mm x 0,50 µm

**Cikkszám:** 7HK-G003-17

**Adagolás:** áramlás leosztás mentes (splitless) 0:1; 250 °C; 1 µL

**Vivőgáz:** Hélium; 5,7 mL/perc

**Hőmérsékletprogram:** 60 °C 2 percig, majd 15 °C/perccel, 100 °C-ra, majd 30 °C/perccel 260 °C-ra

**Detektálás:** FID; 350 °C

**Minta:**

1. 2-Oktanon
2. Tetradecan
3. 1-Octanol
4. Methyl decanoat
5. Methyl undecanoat
6. 1-Decanol
7. Methyl dodekanoát
8. 2,6-Dimethylaniline
9. 2,4-Dimethylphenol

### A kiindulási hőmérséklet változtatásának hatása

Az oldószeres fókuszálást, a már említett három paraméter közül a termosztát kiindulási hőmérsékletének megváltoztatásával tudjuk a legegyszerűbben befolyásolni. A 2. ábrán egy hexánban oldott, különböző szénhidrogéneket tartalmazó teszteleg kromatogramja látható. A kezdeti hőmérséklet 140 °C -ról (2A ábra.) 60 °C-ra (2B ábra) csökkentésével minden minta csúcsmagassága szignifikánsan csökkent.

### A megfelelő GC kolonna kiválasztása

Nagy érzékenységet és alacsony detektálási határokat megkövetelő analízisek esetében nagyon fontos, hogy alacsony vérvázú GC kolonnát válasszunk, amely kiváló deaktiválási eljárással készült. A kolonnavezés az állófázis kis molekulatömegű ionok megjelenését jelenti a tömegspektrumban (355, 281, 207 és 73-

as MS ionok), melyek az állófázis magas hőmérsékleten történő bomlásából, de akár a kiindulási polimer szennyeződéseiből is adódhatnak. Ezek sajnos megnövelt alapvonalat eredményeznek, amely kedvezőtlen befolyással bír a detektálási határookra, problémákat okozva ily módon az alsó kalibrálási tartományban. A pontos analízist tovább nehezítheti, ha a kolonnánk nem tökéletesen deaktivált. Mivel a kapilláris felülete nagyon aktív, a gyártóknak mindenekelőtt deaktiválnia kell azt annak érdekében, hogy elkerüljük a kedvezőtlen másodlagos kölcsönhatásokat, melyek zónaszélesedést, vagy adszorpciót (mintaletapadást) okozhatnak.

Ezeket a potenciális problémákat elkerülendő, a Phenomenex kifejlesztett egy speciális, ún. ESC technológiát, melynek első lépése a kapilláris felszínének deaktiválása. Körültekintően frakcionálják a kiindulási polimer összetevőket is, eliminálva ezzel a kisebb molekulatömegű szennyeződések, valamint javítva a felületi borítottságot. A folyamat eredményeképpen az állófázisban kereszt-kötések épülnek ki, továbbá a polimer réteget egy agresszív katalitikus eljárással kötik hozzá a felülethez. Ezek eredményeképp egy szerterágazó, jól kapcsolódó hálózat jön létre. Ez az eljárás kifejezetten tartóssá és ellenállóvá teszi a kolonnákat, melyek ettől fogva rendkívül alacsony vérzéssel fognak bírni az GC-MS mérések során.

## Összefoglalás

Két megoldás is van tehát a kezünkben arra, hogy élesebb csúcsokat és nagyobb érzékenységet érzünk el a gázkromatográfiás analízisünk során. Az egyik az oldószeres fókuszálás, melyet három paraméter tud kedvezően befolyásolni. A termosztát kiindulási hőmérséklete, a kolonna fázisaránya és az oldószer forráspontja. Ezek közül a kezdeti hőmérséklet gondos megválasztásával lehet a legegyszerűbben jótékony változtatásokat eszközölni. A kolonna megfelelő kiválasztása ugyancsak fontos szerepet játszik a nagy érzékenység és alacsony detektálási határ elérésében. Csak kis vérzésű és kiváló deaktiválási eljárásos oszlop biztosíthatja a legpontosabb és legérzékenyebb analízist. A fentieket szem előtt tartva biztosak lehetünk benne, hogy a lehető legjobb eredményt érjük el.

## Referencia

1. Grob, R.L. (1995). *Modern practice of gas chromatography, (3rd edition): Inlet Systems in GC (pp.496)*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
2. McNair, H.M. (1995). *Basic Gas Chromatography: Capillary Inlet Systems (pp.99)*. New York: John Wiley & Sons, Inc.



*mintatartouveg.hu*

AS, HS, EPA, SHELL, PP



[www.mintatartouveg.hu](http://www.mintatartouveg.hu)

- Folyamatos raktárkészlet fenntartás  
- Gyors kiszolgálás (akár 24 órás szállítással)

- Ingyenes termékminta biztosítása  
- Speciális típusok/egyedi igények kiszolgálása



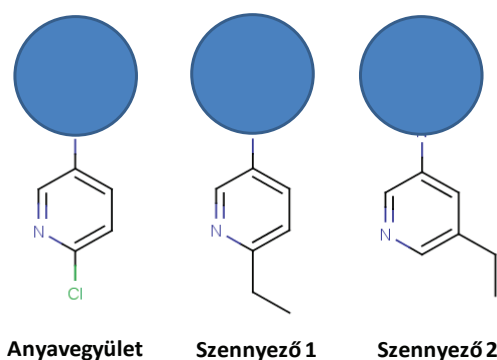
# Pentafluorofenil állófázis szelektivitásának bemutatása egy gyógyszeripari HPLC tisztaságvizsgálati módszerfejlesztés példáján

Könczöl Árpád\*, Meszlényiné Sipos Márta

Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium, 1475 Budapest, Gyömrői út 30-32.

\*Levelező szerző: a.konczol@richter.hu

Az 1. ábrán látható klór-piridil szerkezeti elemet tartalmazó gyógyszerhatóanyag jelölt vegyület rutin LC-MS vizsgálata során nyert ESI+ tömegspektrumban egy, az anyavegyület  $[M+H]^+$  molekulaionjához képest 6 tömegegységgel kisebb, hozzávetőlegesen 35%-os relatív intenzitású, izotópeloszlása alapján klór atomot nem tartalmazó (!) molekulaiont azonosítottunk. Mivel a szintézis útja Grignard-reakción alapult (EtMgBr reagens használata), felmerült, hogy a kérdéses molekulaiont a megfelelő etil-piridil elemet tartalmazó szennyező szolgáltatja.

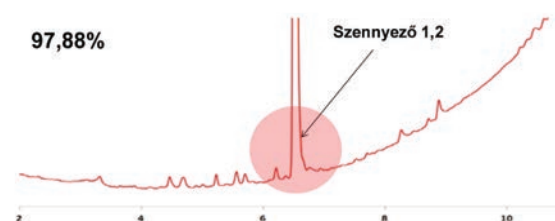


1. ábra Klór-piridil szerkezeti részletet tartalmazó gyógyszerhatóanyag jelölt (M, monoCl) és 2 fő szennyezője (M-6, Cl atomot nem tartalmazó).

Az M-6 molekulatömegű szennyező azonosítása és mennyiségének pontos meghatározása érdekében összesen öt, különböző szelektivitású és hatékonyságú állófázison fejlesztettünk HPLC-DAD alapú tisztaságvizsgálati módszert. Ahogy a 2. ábrán látható, a monolit állófázison koelúciót tapasztaltunk savas illetve semleges pH-n is (piros színnel jelölve), míg az amid (savas pH), a Gemini NX-C18 (lúgos pH) és a Kinetex PFP kolonnákon (savas pH) már sikerült a szennyezők csúcsaira nézve kis felbontást elérnünk (sárga színnel jelölve). A kérdéses szennyezőkre nézve alapvonal elválasztást azonban csak a Kinetex F5 állófázisra fejlesztett módszer szolgáltatott (zöld színnel jelölve). A 248 nm-es hullámhosszon rögzített kromatogramok alapján számolt mennyiségi értékek rámutattak arra is, hogy a két M-6 móltömegű szennyezőt (izomerek) - szemben az MS ionok intenzitásarányával - csak kb. 2,5 % mennyiségben tartalmazza a minta. Megállapítható tehát, hogy kb. egy nagyságrendnyi az anyavegyület és a szennyezők fajlagos ionizációs hatásfoka közötti különbség. Vizsgálatsorozatunk bizonyította, hogy a pentafluorofenil állófázis aromás szubsztituensekkel szemben mutatott szelektivitása magas.

## Kísérletek:

Abszorbancia 248 nm



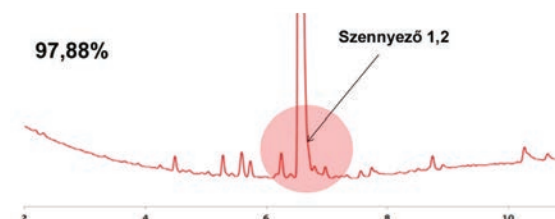
Kolonna: CROMOLITH High Resolution RP-18-e,100x4,6 mm  
Eluens:

A. 0,1 % TFA/víz  
B. 0,1 % TFA/acetonitril

Gradiens:

idő(perc) 0 9,7 12,5  
B% 0 90 90

Áramlási sebesség: 1,7 ml/perc  
Hőmérséklet: 40 °C



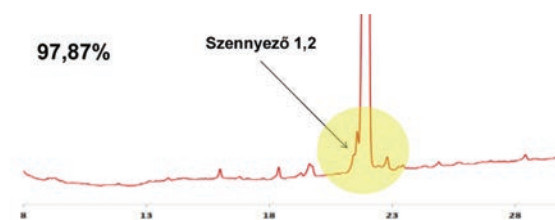
Kolonna: CROMOLITH High Resolution RP-18-e,100x4,6 mm  
Eluens:

A. Víz  
B. Acetonitril

Gradiens:

idő(perc) 0 9,7 12,5  
B% 0 90 90

Áramlási sebesség: 1,7 ml/perc  
Hőmérséklet: 40 °C



Kolonna: Ascentis RP-Amide 5 µm, 150x4,6 mm  
Eluens:

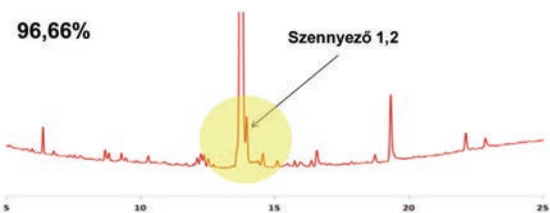
A. 0,1 % TFA/víz  
B. 0,1 % TFA/acetonitril

Gradiens:

idő(perc) 0 35 40  
B% 0 100 100

Áramlási sebesség: 1 ml/perc  
Hőmérséklet: 26 °C





Kolonna: Gemini-NX C18 110A 3u, 100x4,6 mm  
Eluens:

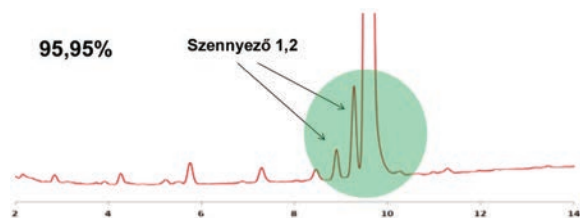
A. 10 mm Ammónium-hidrogénkarbonát  
B. Acetonitril

Gradiens:

idő(perc)	0	24	26
B%	0	100	100

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Hőmérséklet: 40 °C



Kolonna: Kinetex F5 100A 2,6u, 100x3,0 mm

Eluens:

A. 0,1 % TFA/víz

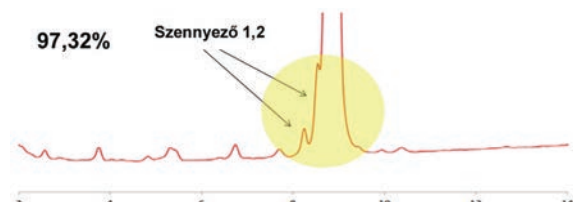
B. 0,1 % TFA/acetonitril

Gradiens:

idő(perc)	0	35	40
B%	30	80	80

Áramlási sebesség: 0,4 ml/perc

Hőmérséklet: 26 °C



Kolonna: Kinetex PFP 100A 2,6u, 100x3,0 mm

Eluens:

A. 0,1 % TFA/víz

B. 0,1 % TFA/acetonitril

Gradiens:

idő(perc)	0	35	40
B%	30	80	80

Áramlási sebesség: 0,4 ml/perc

Hőmérséklet: 26 °C

2. ábra Hat különböző HPLC tisztaságvizsgáló kromatogram és az egyes módszerek leírása.



# Kis belső átmérőjű (0,10mm) GC kolonnák szakszerű alkalmazása

Sky Countryman, GC Product Manager  
Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA

Az első felmerülő kérdésünk az lehet, hogy hogyan tudnánk lecsökkenteni a gázkromatográfiás módszereink analízis idejét. Célunk eléréséhez pedig az egyik lehetséges megoldást a kis átmérőjű kolonnák használata jelentheti. Ez egy izgalmas megoldás, de mindenképp érdemes néhány apró szabályt betartani.

## Injektor

### Áramlás leosztási arány (split ratio), vagy adagolási térfogat:

A 0,10 mm belső átmérőjű kolonnák tömeg- és térfogat terhelhetősége kisebb a hagyományos oszlopokénál. Az előnyük, hogy nagyobb a hatékonyságuk, és ennek következtében keskenyebbek a kromatográfiás csúcsok. A keskenyebb csúcsok magasabbak ugyanolyan térfogatú adagolásnál, ha azonos csúcsmagasságot akarunk, keskenyebb kolonnánál kevesebb térfogatot kell adagolni. Az új követelményekre optimált kromatográfiás készülék megfelelő érzékenységet ad a jól kidolgozott módszerekre.

### Eluens, vagy vivőgáz:

Ha a bemeneti nyomása problémássá válik, feltétlen cseréljük le a vivőgázt hidrogénre, ugyanis az egyéb mozgó fázisokhoz képest a hidrogén azonos áramlási sebességnél kisebb nyomásesést okoz. Kiemelkedő, hogy a hidrogén használatakor az optimális áramlási sebesség felett dolgozva, (lásd van Demter görbe) a többi vivőgázhoz képest kisebb lesz a hatékonyság veszteség. Ezek eredményeképp növelhetjük az áramlási sebességet, csökkentve ezzel az analízisidőt a nélkül, hogy kedvezőtlenül befolyásolnánk magát az elválasztást.

### A kolonna bemeneti nyomása:

Mint említettük, a kolonna bemeneti nyomása akkor kerülhet előtérbe a módszer fejlesztésénél, amikor a rendszerünk áramlás-szabályozott. A módszerfejlesztésnél, a hőmérséklet program kezdetén a kolonna bemeneti nyomás értéke 5 bar (75 psi) körüli. A hőmérséklet növelésekor az áramlási sebesség szabályozó növeli a nyomást, hogy fenntartsa az állandó áramlási sebességet. Ennek oka, hogy a hőmérséklet növelésekor a gáz viszkozitása is nő. Nem ritka, hogy ilyenkor a kolonna bemeneti nyomása meghaladja a 7 bar (100 psi) értéket. Érdemes ilyenkor felvenni a kapcsolatot a készülék gyártójával, hogy ezt a terhelést elbírja-e.

### Adagoló betét (liner):

A szokványos 4 mm átmérőjű betétek helyett ajánlott a 2 mm belső átmérőjű betétek alkalmazása. Ezeknek számos előnye lehet, többek között csökken a betét aktív helyeinek száma, ami minta veszteséget okoz, gyorsabb

lesz a minta átvitele a kolonnára. Van, amit mindenképp figyelembe kell venni az összes elemzéskor, ez az adagoló okozta diszkrimináció. Nevezetesen, hogy a kolonnára jutó minta összetétele eltér a mérőlombikba levőtől.

### Kolonna bekötése:

Sokan szemmérték alapján állítják meg, hogy milyen mélyen nyúljon be a kapilláris kolonna vége az adaglóba, mekkora az anyacsavar feletti rész hossza. Amennyiben 0,1 mm belső átmérőjű kapilláris kolonnával szeretnénk dolgozni, a benyúlási hosszát pontos mérésrel kell megállapítani, a megfelelő benyúlási mélység beállítása drámai hatással lehet a mérési eredményekre. Éppen ezért a rendkívül körültekintő kolonna bekötés javasolt kis átmérőjű kolonna használatánál.

## Kemence

### Hőmérséklet program:

A legtöbb gázkromatográf legfeljebb 35-40 °C/perc fűtési sebességre képes. Ahhoz, hogy a 0,10 mm belső átmérőjű kolonna várt hatékonyságát elérhessük, jóval nagyobb fűtési sebességre van szükség. Ehhez egy kiegészítő fűtőegység beszerzésére lehet szükség, illetve ha új készülék beszerzésén gondolkodik, győződjön meg róla, hogy a készülék képes a gyors felfűtésre.

## Detektor

### Mintavételi sebesség:

A gyors GC élesebb, keskenyebb csúcsokat is jelent, néhányuk mindössze pár másodperc „széles”. Ebben az esetben a detektor gyors mintavételi sebességére van szükség. A lángionizációs detektorok többsége elég gyors ehhez, néhány régebbi típusú tömegspektrométer mintavételi sebessége azonban mindössze 1-4 Hz. Az alábbiakban összegyűjtöttük néhány új detektor típus mintavételi sebességét.

Láng Ionizációs Detektor (FID): ~200Hz  
Elektron Befogósos Detektor (ECD): ~50Hz  
Nitrogén Foszfór Detektor (NPD): ~200Hz  
Tömegspektrométer (MS): 20-100Hz

# Így főztök Ti...

**Imrik Péter**  
**Gen-Lab Kft.**

**Méréseket végezte:**  
**Kaleta Zoltán**  
**Progresszió Mérnöki Iroda Kft.**

## Szabad az út

A jövedéki adóról és a jövedéki termékek forgalmazásának különös szabályairól szóló 2003. évi CXXVII. törvény (továbbiakban: Jöt.) 2010. szeptember 27-i kezdettel lehetővé teszi minden 18. életévét betöltött természetes személy számára, hogy lakóhelyén, vagy gyümölcsöse helyén saját tulajdonú berendezésével pálinkát, azaz párlatot állítson elő saját termelésű vagy akár vásárolt gyümölcsből. A jogszabály azon kívül, hogy megteremtette a lehetőségét a pálinka „otthoni” előállításának, konkrét előírásokat is tartalmaz a tevékenység folytatásával kapcsolatban, melyek betartását a vámhatóság ellenőrzi.

## Néhány fontos fogalom a jogszabályhoz

**Párlat:** a bérfőzés és magánfőzés keretében előállított 2208 20 19, 2208 20 99, 2208 90 33, 2208 90 39, 2208 90 51, 2208 90 71 vámtarifaszám alá tartozó alkoholtermék. **Magánfőzés:** „A párlatnak a magánfőző lakóhelyén vagy gyümölcsöse helyén használható, legfeljebb 100 liter űrtartalmú, párlat-előállítás céljára kialakított desztillálóberendezésen a magánfőző által végzett előállítása évente legfeljebb 50 liter 86 térfogatszázalékos mennyiségig.” **Magánfőző:** „Az a 18. életévét betöltött gyümölcsstermesztő személy, aki saját tulajdonú gyümölcscsel, gyümölcsből származó alapanyaggal és párlat készítésére alkalmas, saját tulajdonú desztillálóberendezéssel rendelkezik.”

Megjegyezendő, hogy a pálinkafőzés folyamatában a lepárlás különböző lépéseiben az erjedés folyamán keletkező ártalmas komponensek (etil-acetát, metil alkohol) eltávolítása szükséges.

A törvény adta lehetőségeket kihasználva a házi/magán főzések alkalmával kíváncsiak voltunk, hogy a megfelelő technológia lépéseket betartva készülnek-e ezek a házi főzetek, vagy inkább a mennyiséget szem előtt tartva a minőség kárára főzzük a pálinkáinkat.

Annak ellenére, hogy a jogszabály előírja a pálinka készítésekor az elkészült termék egészségre ártalmas anyagok vizsgálatát, viszont nem terjed ki a házi főzésben saját magunk (ne legyünk naívak, ...és barátaink) részére főzött pálinkára.

*A következőkben nézzük meg a kisüsti pálinkafőzés folyamatát.*

## A lepárlás folyamata

A lepárlás két alapfolyamatból áll: a cefre (víz+alkohol folyadékelegye) elgőzölögtetése és a gőzök cseppfolyósítása (kondenzáció). Mindezt kétszer kell elvégezni, ugyanis a kisüsti módszer lényege az első főzés során – melynek célja a cefréből (víz+alkohol folyadékelegyből) az illó és nem illó anyagok külön választása – az összes alkohol kinyerése elgőzölögtetéssel, majd a kondenzáció révén az újra cseppfolyósítás. A lepárlást addig kell folytatni, amíg a kifolyó alszesz alkoholtartalma 10-15°. A párlási idő az üstmérettől függően 2-4 óra is lehet. A lejött alszeszt 20 °C-on megfokoljuk, és ha erősebb 25°-nál, akkor 25°-ra hígítjuk. Csak hitelesített mérőeszközt érdemes használni, mely mezőgazdasági szakboltokban, gyógyászati orvosi műszerboltokban szerezhető be.

A finomítás célja az alkoholkoncentráció növelése, a párlatrészek szétválasztása, hogy kívánt zamátú és minőségű pálinkát kapjunk. Mivel az alszesz nem habzik, ezért az üst névleges térfogatának 80-90 %-áig tölthető. A fűtést – mint a cefre főzésénél – intenzíven kezdjük, majd a páracső hűtő felőli melegedésekor visszavesszük és a lehető leghalványabban indítjuk a lepárlást az alkotórészek tökéletes szétválasztása végett. Ezután is „lassú üzemmenettel” folytatjuk a lepárlást. A lepárlás tartama üstmérettől függően 4-6 óra.



## Rézeleje

Ez a párlatrész tartalmazza a legtöbb előpárlati szennyeződést, közte sok rézvegyületet, amiről a nevét is kapta. Gyakran kékeszöld színű, a hűtő belső felületéről leoldott „grünspan” miatt. Nagy szennyezettsége miatt ez semmire se használható, ki kell dobni. Mennyisége az alszesz 0,3-0,5 %-a lehet.

## Előpárlat

A rézeleje után lejövő előpárlat mennyisége az alszesz 0,5-1,5 %-a. Leggyakrabban szűrőszagú, acetalde-



hidet és sóborszeszre emlékeztető etil-acetátot (valamint ecetsavat, kozmaolajat) tartalmaz. A túl sok, illetve túl kevés előpárlat elvétele egyformán hiba!

## Középpárlat (pálinka)

Mihelyt a kellemetlen szag megszűnik, azonnal váltsunk át középpárlatra, mert az előpárlat után kellemes aromájú anyagok párolódnak át. A középpárlatot külön edénybe gyűjtjük. A középpárlat az alszesz 30-35 %-a, szeszfoka 50-60° (borpárlat esetén 65-75°), íze, illata hibátlan.

## Utópárlat

Akkor váltsunk át, amikor megjelenik a jellegzetes főtt, fazék-, üst íz. Az utópárlat savanyú szagú. Az utópárlat az alszesz térfogatának 25 %-a, szeszfoka 15-25°.

Kíváncsiak voltunk, hogy a háztartásokban fellelhető „nagyapa” és „unokatesó” szenzációs kerítészaggatói esetében milyen mennyiségű metanol és etilacetát található, ami jó információként szolgálhat a „mesteremberek” pálinkafőzési szokásáról, illetve, hogy mennyire tartják be a technológiai lépéseket a káros anyagok eltávolításának érdekében vagy esetleg érvényesül a „Öntsed bele aztat is nehogymá' kiöntsed a jó kis szeszt” felfogás. Kollégáinkat és barátainkat megkértük, hogy az otthoni pálinkakészletből hozzanak mintákat, melyeket vizsgáltunk.

## Módszerleírás

[GC-2010]

Oszlop: ZB-WaxPlus 20 mx0,18 mmx0,18 µm

Injektor hőmérséklet :160 °C

Injektálás: folyadék

Injektált térfogat: 0,1 µl

Vivőgáz áramlás: Lineáris

Nyomás: 124,1 kPa

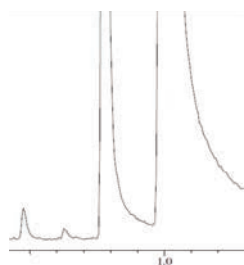
Áramlási sebesség: 93,2 cm/s

Split arány: 50:1

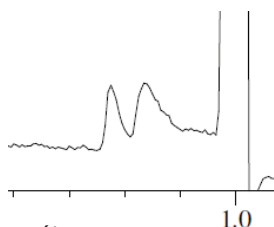
Vivőgáz: Hidrogén

Hőmérsékletprogram:

40 °C 3 percig, majd 25 °C/perccel 180 °C-ig.



1. ábra



2. ábra

Az 1. ábrán a megfelelően leválasztott előpárlat kromatogramjának egy részletén jól látszik az (Rt = 0,774 perc) etilacetát komponens mely szinte összemérhető az etanol tartalommal. A 2. ábrán egy kész pálinka kromatogramja látható.

## 1. táblázat

Minta neve	Etil acetát (mg/ml)	Metil alkohol (mg/ml)
előpárlat	23,405	9,438
alma	0,270	3,972
kajszi	0,292	5,494
meggy	0,469	2,618
szilva	0,488	1,819
vilmoskörte	1,132	4,944
szilva_002	3,896	9,352
ágyaskörte	2,711	5,096
málna	0,043	0,00
datolya	0,133	0,494
ismeretlen_001	0,535	2,379
ismeretlen_002	2,365	3,829
ismeretlen_003	0,00	2,094
ismeretlen_004	0,01	2,104
ismeretlen_005	1,609	3,885
ismeretlen_006	1,648	4,059
ismeretlen_007	0,555	2,139
ismeretlen_008	1,637	3,798
ismeretlen_009	3,733	0,572
ismeretlen_010	0,232	3,025
ismeretlen_011	0,386	1,452
ismeretlen_012	0,82	2,16
ismeretlen_013	0,429	1,722
ismeretlen_014	0,878	1,769

## Eredmények

A kalibrációt és koncentráció meghatározást követően a megvizsgált 23 darabszámú mintában az 1. táblázatban szereplő értékeket kaptuk. A jogszabály a metanol koncentrációra vonatkozó határértéket minden esetben az etanol koncentrációra adja meg. A gyümölcscefréből főzött pálinka megengedett metanoltartalma tisztaszesz-tartalomra számítva kisebb, mint literenként 10 g. Ez 40 fokos pálinkánál literenként 4 g metanolt jelent.

A kapott eredményekből jól látszik, hogy a minták többségénél nem volt a határérték felett a metanol koncentrációja, de sajnos a minták között talákoztunk olyan házi készítésű pálinkával ahol a metanol mennyisége jóval magasabb volt a jogszabályban megengedett értéknél. Jól látszik, hogy ebben az esetben nem tartották be a megfelelő technológiai lépéseket, így az előpárlat nem lett leválasztva vagy nem lett kétszer lefőzve a termék.

Meglepő eredményeket kaptunk két minta esetében ugyanis hiányzott vagy nagyon kis koncentrációban volt jelen a metanol és az etil acetát, gyanúval élve, hogy a két ágyas „pálinka” inkább finomszesz, aroma és víz keverékéből készülhetett.



# Gázkromatográfia - Hogyan csökkenthető a diszkrimináció üvegyapotot tartalmazó betét használatával

**Matthew Trass**  
Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA

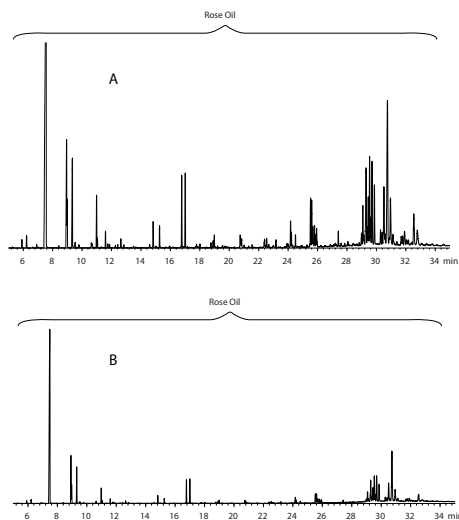
## Bevezetés

A minta összetételének megváltozása, azaz a diszkrimináció – a kapilláris kolonnába jutó és a mérőlombikban lévő minta összetételi változását adja meg - kritikus pont lehet, különösen azoknál a gázkromatográfias elemzéseknél, ahol áramlás leosztásos (split) adagolással dolgozunk. Ez annyit jelent, hogy a kevésbé illékony komponensek kisebb csúcsintenzitást adnak, ahogy a retenciós idők nőnek. Ennek oka lehet a minta összetétele, vagy az adagolási módszer. Összetett, több komponensű minták adagolásakor egy nagy hőmérsékletű adagolóba az egymástól eltérő forráspon-tú komponensek különböző arányban kerülnek gáz-fázisba és a kolonnára. Ez annak köszönhető, hogy a magas forráspon-tú vegyületek lassabban párolognak, így azonos idő alatt kevesebb jut belőlük az oszlopra.

Jelen cikk tárgya a különböző betétek (linerek) használatának hatása az analízisre. Két összehasonlító kísérletben követhetjük nyomon a töltött és a töltetlen betéttel kapott eredményeket.

## Kísérlet

A méréseket Aglinet 6890 kromatográf készüléken, valamint Agilent 5973 MS detektorral végezték el.



1. ábra Rózsaolaj kromatogramja üvegyapotot tartalmazó kúpos betét (A), valamint üvegyapot nélküli betét használata esetén (B). Az üvegyapot használata jelentősen csökkenti a minta jelének torzulását.

## Futási körülmények:

Kolonna: Phenomenex® Zebron™ ZB-XLB  
Méretek: 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm  
Cikkszám: 7HG-G019-11  
Adagolási paraméterek: Split 25:1, 250 °C, 1 µL  
Hőmérséklet program: 50 °C-ról indul 340 °C-ig, 10 °C/perc fűtési sebességgel  
Vivőgáz: Hélium 1,2ml/perc  
Detektor: MSD @ 230 °C, 45-450 amu  
Minta: 1% rózsa olaj etil-acetátban

A két mérés azonos kromatográfias paraméterek beállítása mellett történt, egyedül az alkalmazott betétek voltak eltérőek. Az első mérést egyszerű kúpos, üvegyapot nélküli betéttel (AG0-7516), míg a másikat egy hasonló, de üvegyapotot is tartalmazó betét (AG0-8175) használatával végezték el.

## Eredmények és tárgyalás

Kolonna bemeneti diszkriminációról beszélünk az áramlási leosztásos (split) adagolásnál, ha a minta komponensei nagy molekulatömegű tartományt fognak át, mert a nagy molekulatömegű komponensek elpárolgása lassúbb és kevesebb kerül a gáz fázisba az áramlási leosztású vonalon. Ez annyit jelent, hogy az adagolás teljes időtartama alatt több kerül a szabadba, összevetve az illékonyabb komponensekkel, ezzel összhangban kevesebb kerül belőlük a kolonnára. Ezt a hatást, egyes esetekben a különböző kialakítású betétekkel csökkenteni lehet. Betét (liner) üvegyapot nélkül növeli a diszkriminációt, mert az elpárolgás helyét nem tudjuk kontrollálni (1B. ábra) Folyadékadagolásakor a mintának az a része, ami a betét aljára kerül az szétterül és elpárolog. Ez a nem homogén elpárolgás okozza, hogy a kevésbé illékony komponensekből több kerül a szabadba az áramlás leosztási vonalon (split), növelve a diszkrimináció mértékét.

Abban az esetben, ha a folyadékminta párolgása nem megfelelő, az üvegyapot nélküli betétek a minta komponenseinek diszkriminációját is okozhatják. Az illékony komponensek a fűtött adagolóban már a folyadékfecskeendő tujéből elpárologhatnak, míg a kevésbé illó komponensek az adagolóban a betét (liner) aljára kerülnek és szétterülnek, mielőtt elpárolognának. Így az optimálitól eltérő párolgásnak köszönhetően a minta kevésbé illékony komponenseit elveszíthetjük az áramlás leosztási (split) ágon, megváltoztatva ezzel kolonnára kerülő komponensek koncentrációját, a bemérthez képest,


kromatográfias szóhasználatlaltal diszkrimináció történik. Deaktivált üvegyapotot tartalmazó betét használata esetén (1A. ábra) láthatóan jobb kromatográfias eredményt kapunk. Az üvegyapot mellett, hogy a szilárd szemcsék kolonnára jutását is megakadályozza, egy másik előnyös tulajdonsága is van. Megnöveli azt a felületet, ahol a minta párolgása bekövetkezik, így a kevésbé illékony komponenseknek is nagyobb az esélye a párolgásra, tehát csökkenti a diszkriminációt.

Mindkét, a kísérletnél használt betét kimeneti nyílása kúpos kiképzésű (2. ábra). Az ilyen típusú betét (liner) egyrészt abban segít, hogy a minta a kolonna elejére fókuszálódjon, valamint abban, hogy az adagolóban a betét alsó részével minél kisebb mértékben érintkezzen. Ezáltal nő az alkalmazott (gold seal) tömítés élettartama és csökken a betét hatása a diszkriminációra, illetve csökkenti az üres betét aktivitását. Ugyanakkor a kúpos betét (liner) nem akadályozza meg a betét okozta diszkriminációt, melyet az illékony komponensek gyors párolgása és így az áramlás leosztási (split) ágon való távozása okoz. Ebben mind a csúcsterület, mind a jel-zaj viszony érintett.

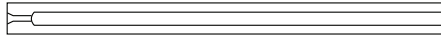
Az 1A. ábra szerint az üvegyapotot tartalmazó betét jobb kromatográfias eredményt ad. Ahogy arra számítani lehetett, a később eluálódó komponensek esetén nagymértékben nőtt a csúcsterület. Ezen kevésbé illékony komponensek esetében a diszkriminációt okozó tényezők hatása is sokkal szembeűnőbb. Az illékony komponensek esetén is tapasztalható némi javulás, bár ennek mértéke nem nagy, ugyanis ezek elpárolgásához az üvegyapot nem járul hozzá számottevő mértékben.

Összességében viszont elmondhatjuk, hogy összetett minták, amelyekben az egyes komponensek forráspontja nagyon eltérő, mérése esetében az üvegyapotot is tartalmazó betétek használata nagymértékben lecsökkenti a diszkriminációt, ezzel növelve a mennyiségi analitika megbízhatóságát, egyben hatékonyságát.

### Single Taper Liner w/Wool

Part No.	Description
AG0-8175	

### Single Taper Liner

Part No.	Description
AG0-7516	

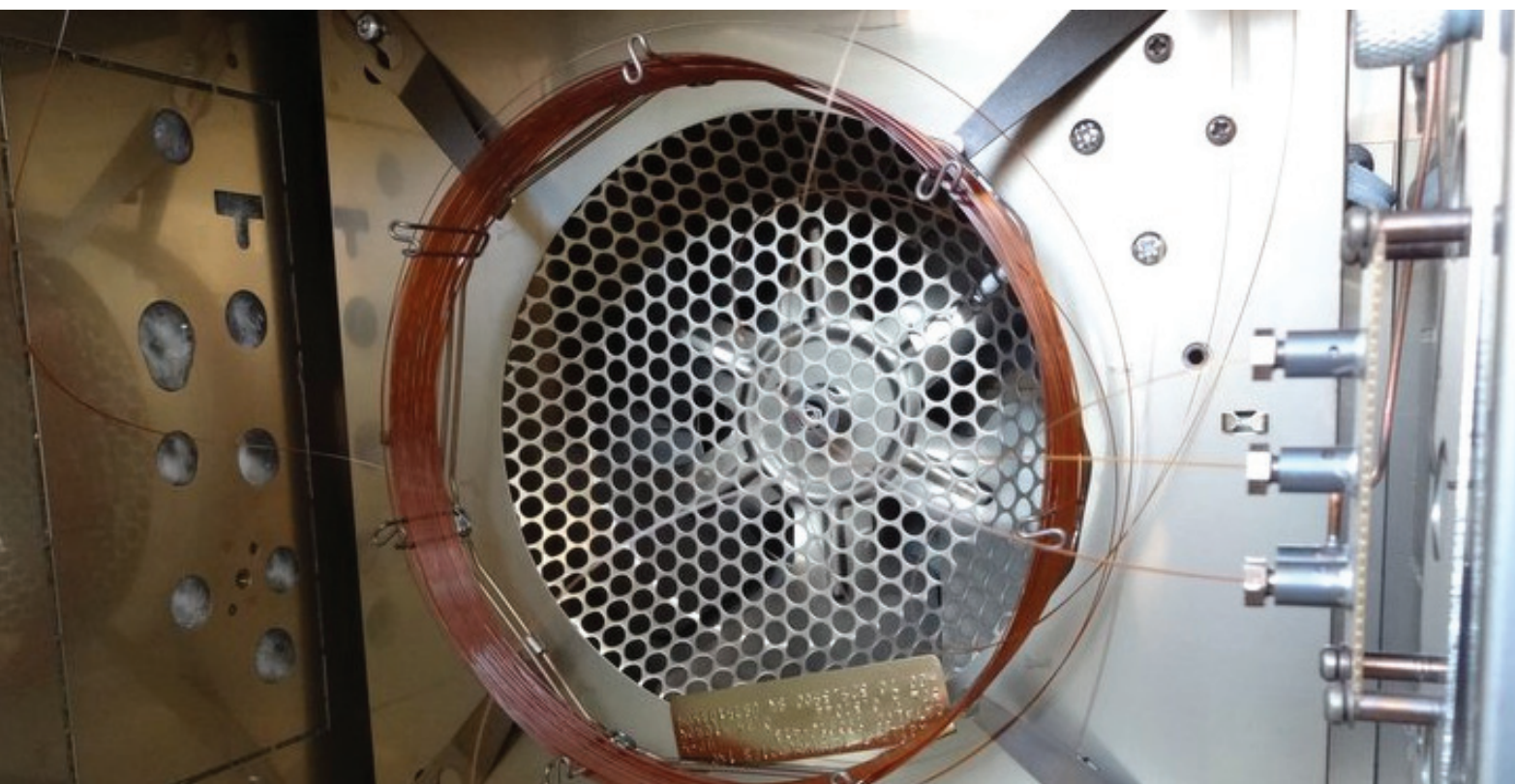
2. ábra: linerek keresztmetszete

## Összefoglalás

Közepesen illékony komponensek mérése esetén, áramlás leosztásos (split) adagolási technikát alkalmazva diszkriminációt tapasztalhatunk. Ahogy láthattuk, az egyszerű kúpos betét alkalmazása helyett üvegyapotot is tartalmazó betéttel használva ez a negatív hatás csökkenthető. Mindemellett az üvegyapot megakadályozza, hogy szilárd szemcsék jussanak a kolonnára, valamint segít abban, hogy a közepesen illó komponensek is már az adagoló elején elpárologjanak. Következésképpen az összetett minták méréséhez mindenképpen ajánlott lehet az ilyen típusú betétek (linerek) használata.

### Technikai Tipp

*Tudta, hogy a legtöbb gázkromatográfias probléma abból adódik, hogy a kolonna installálása nem megfelelően történik? A maximális hatékonyság érdekében használja a Cool-Lock™ Nut eszközt a megfelelő benyúlási mélység beállításához! Ez a szabadalmi oltalom alatt álló termék nemcsak hogy könnyebbé és gyorsabbá teszi a kolonna behelyezését, de használatával elkerülheti az esetleges égési sérüléseket is, mivel a folyamat során nem szükséges hozzáérni a készüléke forró alkatrészeihez.*





DataApex  
**Clarity**<sup>TM</sup>

 **DataApex**  
www.dataapex.com

# CHROMATOGRAPHY SOFTWARE



500+ Controlled instruments

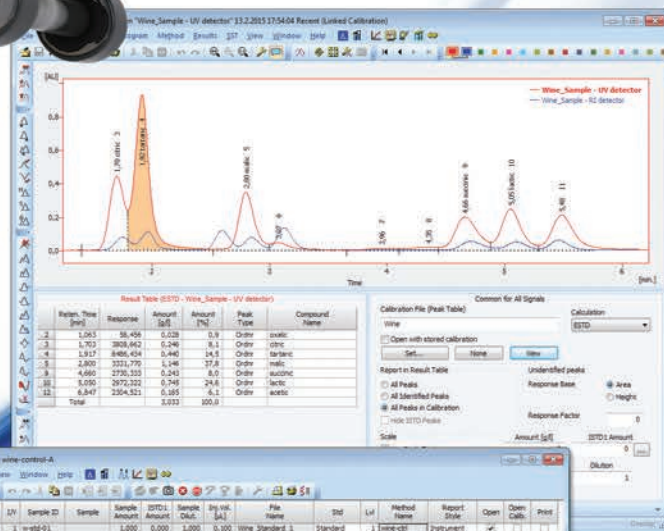
Optional extensions  
(PDA, MS, GPC, GCxGC...)

Free software updates

Clarity2Go – monitoring app for smartphones

**FREE DEMO VERSION**

**EASY**  
**RIDE**



Status	Run	Inj	Inj	Sample ID	Sample	Sample Amount	STD	Sample Amount	Inj Vol	Inj Vol	File Name	STD	Inj	Method Name	Report Date	Open	Chem Calc	Print
1	1	1	1	1-1918-01	1,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_1_1	Standard	1	std-std	Instrument			
2	1	2	1	1-1918-02	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_2_1	Standard	1	std-std	Instrument			
3	1	3	1	1-1918-03	4,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_3_1	Standard	1	std-std	Instrument			
4	1	4	4	1-A-1917	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_4_1	Unknown	std-std	Instrument				
5	1	5	5	1-A-1918	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_5_1	Unknown	std-std	Instrument				
6	1	6	6	1-A-1919	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_6_1	Unknown	std-std	Instrument				
7	1	7	7	1-A-1920	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_7_1	Unknown	std-std	Instrument				
8	1	8	1	1-A-1921	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_8_1	Unknown	std-std	Instrument				
9	1	9	1	1-A-1922	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_9_1	Unknown	std-std	Instrument				
10	1	10	1	1-A-1923	2,000	0,000	1,000	0,100	1,000	0,100	Wine_Sample_10_1	Unknown	std-std	Instrument				

