

KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat



New Luna Omega 1.6 μm UHPLC Columns

**The Final Word in
Fully Porous UHPLC**

explore

LUNA[®]

Ω

phenomenex[®]
...breaking with traditionSM



Tartalomjegyzék

4. A héjszerkezetű (mag-héj) töltetek alkalmazási lehetőségei

4. rész: Fehérjék elválasztása

Fekete Jenő, Kormány Róbert, Bobály Balázs,

Fekete Szabolcs

8. Korszerű méretkizárásos kromatográfia: fehérje aggregátumok elválasztása

Fekete Szabolcs, Fekete Jenő, Guillaume Davy

11. Hogyan krimpeljünk?

A krimpelés dióhéjban

Imrik Péter

16. Nyugtat vagy élénkít?

Teaminták analitikai vizsgálata

Csupor Dezső, Jedlinszki Nikoletta, Boros Klára

18. Komplex minták tisztítása hidrofil módosított Strata-XL polimer alapú szilárd fázisú extrakciós oszlopon: Alternária toxinok meghatározása paradicsom mintákból

Tölgyesi Ádám

22. Reflektorfényben az ügyfélgondozás -

Marketing szemléletű laborpiaci gazdasági háttér áttekintés forgalmazói oldalról

Tolnay Anita

24. Hidrazin tartalom meghatározása allopurinolban

Kormány Róbert, Radócz Orsolya, Fekete Jenő



Gen-Lab NerdBird

Kromatográfiás Fotópályázat

2016

A fotók elkészítésének és beküldésének határideje:

2016. JÚNIUS 31.

A fotózáshoz plüss NerdBird igénylést és a fotókat az info@gen-lab.hu email címre kérjük beküldeni

A pályázathoz maximálisan beküldhető fotók száma: 5db

További részletek

a www.gen-lab.hu/hirek oldalon!



Kromatográfus

III. évfolyam 1. szám

Nyomdai előkészítés:

Mogyorósi Eszter

mogyorosi.eszter@gen-lab.hu

Nyomdai munka:

Real Press Nyomda

Szakmai szerkesztők:

Fekete Jenő

Fekete Szabolcs

Kormány Róbert

Imrik Péter

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

Real Press Nyomda

A héjszerkezetű (mag-héj) töltetek alkalmazási lehetőségei

4. rész: Fehérjék elválasztása

Fekete Jenő¹, Kormány Róbert², Bobály Balázs¹, Fekete Szabolcs³

¹ BME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

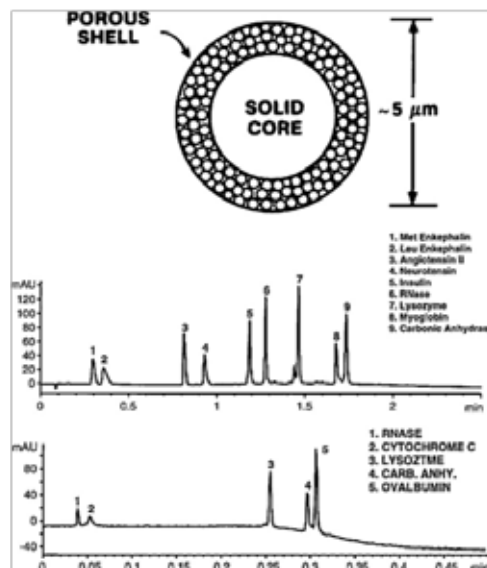
² Egis Gyógyszergyár Zrt., 1106 Budapest, Keresztúri út 30-38.

³ Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Tanszék, 1211 Genève, Boulevard d'Yvoy 20.

Az utóbbi évek legnagyobb sikerét egyértelműen a héjszerkezetű töltetek hozták, néhány év leforgása alatt alkalmazásuk gyakorisága megközelíti a teljesen porózus töltetekét.

A teljesen porózus töltetek alkalmazásának jól ismert korlátja - makromolekulák elválasztása során - az ún. „elválasztási-sebesség és hatékonyság” problémaköre (a szakirodalomban „constraints in separation speed and efficiency” néven ismert). Ez abból adódik, hogy a teljesen porózus szemcsékben a makromolekulák viszonylag sok időt töltenek el a szemcsén belüli porózus térfogatban, hiszen kicsi a diffúziós együtthatójuk. Ezért jelentős zónaszélesedés várható a kis molekulatömegű anyagokéhoz képest a megnövekedett anyagátadási ellenállás miatt. A kinetikai hatékonyság növelésére (csúcshélessedés csökkentésére), javasolta Horváth Csaba a 60-as évek végén a részben porózus töltetek használatát. Először viszonylag nagy szemcseátmérőjű (~ 50 µm) nem porózus magra (üveggyöngy) vitt fel vékony porózus ioncserélő „hátyát” (pellicular particle) és sikeresen alkalmazta nukleotidok, nukleinsavak, majd később peptidek és fehérjék elválasztására [1,2]. Néhány évvel később Jack Kirkland már kisebb (30-40 µm) részlegesen porózus szemcséket alkalmazott gáz és folyadékkromatográfiás elválasztásokra. A pelliculáris (hátyás) elnevezés helyett ő már „kontrollált felületi porozitású” szemcséknek hívta az akkori héjszerkezetű tölteteket [3]. Ezt követően a teljesen porózus töltetek gyorsabban fejlődtek, hamar megjelentek a 10, 5 és 3 µm-es szemcsék és sikeresen alkalmazták azokat folyadékkromatográfián kismolekulatömegűnek tekintett vegyületek elválasztására. A korai hátyás töltetek terhelhetősége messze elmaradt a teljesen porózus töltetekhez képest, ez vetette vissza a népszerűségét. Persze történtek fejlesztések a héjszerkezetű töltetekkel is (pl. Zipax) de az első (nagyobb) áttörés csak 2000-ben következett be, amikor megjelent az első 5 µm-es héjszerkezetű töltet, 0,25 µm-es porózus réteggel. Nagy-pórusú (300 Å), fordított fázisú módosítással optimális volt makromolekulák

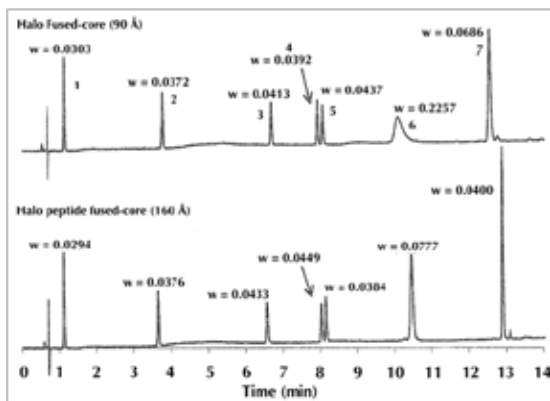
elválasztására. A töltet a Poroshell nevet kapta és megint Jack Kirkland volt az, aki aktívan részt vett a fejlesztésben és rendkívüli hatékonyságú, gyors fehérje elválasztásokat mutatott be [4]. Az 1. ábrán látható a legendás Poroshell töltet sematikus ábrája és két igen látványos elválasztás, amelyek a mai napig is példaértékűek. Különösen lenyűgöző a tojás albumin fehérje (ovalbumin) csúcshélessége és analízis ideje.



1. ábra. A Poroshell töltet sematikus vázlata és alkalmazása peptidek/fehérjék elválasztására [Ref 4]

Néhány évvel később (2007-ben) jelentek meg az első, 3 µm-nél kisebb szemcseátmérőjű héjszerkezetű töltetek, amelyek forradalmasították a kolonna-technológiát. Ezekkel a 2,6, 2,7 µm-es töltetekkel (0,35 és 0,50 µm-es héjvastagsággal) hasonló minőségű elválasztásokat lehetett elérni, mint az akkori legjobb porózus 1,7 – 2,0 µm-es töltetekkel, viszont lényegesen kisebb nyomáson. Így nem feltétlen volt szükség arra, hogy nagy nyomásokon végezzük az elválasztásokat. Az új generációs héjszerkezetű töltetek hatékonysága és kedvező permeabilitása hamar sikert hozott. A töltetek gyorsan elterjedtek és rövid időn belül szinte az összes kolonna gyártó előállt a saját héjszerkezetű töltetével. Meg kell említenünk viszont, hogy ekkor még kizárólag a folyadékkromatográfián kismolekulatömegű anyagok elválasztására alkalmas pórusméretű (90-120 Å) töltetek álltak rendelkezésre. 2010-ben jelent meg az első 160 Å pórusátmérőjű töltet (AMT, Peptide-ES C18), ami már megfelelő volt peptidek és kisebb fehérjék rendkívül hatékony elválasztására [5]. A 2. ábrán a pórusméret hatását szemléltetjük. Egy peptid keverék kromatogramját láthatjuk 90 Å és 160 Å átlagos pórusátmérőjű 2,7 µm-es héjszerkezetű tölteteken mérve. A csúcshélesség értékek változása egyértelműen jelzi a nagy pórusátmérő szerepét.

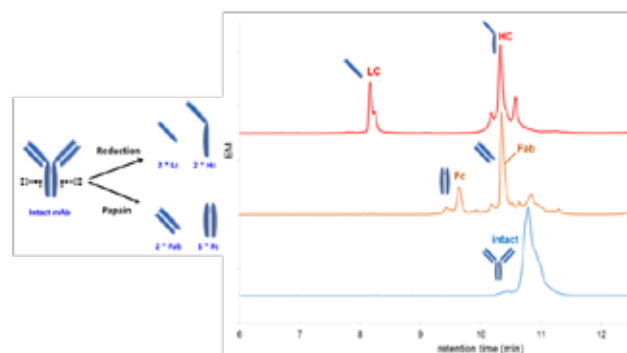
Egy évvel később már meg is jelentek a nagy-pórusú (wide-pore) héjszerkezetű töltetek. Először a Phenomenex Aeris Widepore kolonnák kerültek



2. ábra. Peptid keverék kromatogramja új generációs 90 Å és 160 Å átlagos pórus átmérőjű 2,7 µm-es héjszerkezetű tölteteken (Halo Fused-Core 90 Å és Halo Peptide-ES C18 160 Å kolonnák) [Ref 5]

kereskedelmi forgalomba, majd hamar követte a Halo Protein 400 Å és Sigma-Aldrich BioShell 400 Å töltet, végül az Agilent AdvanceBio RP-mAb [6]. Az új-generációs nagypórusú héjszerkezetű töltetek érdekessége, hogy viszonylag nagy szemcseátmérőjűek - kizárólag 3,4 – 3,6 µm-esek - és igen vékony a porózus réteg vastagsága (0,2 – 0,25 µm). A rétegvastagság csökkentése szükséges volt a nagy fehérjék hatékony elválasztásához. Tehát etekintetben visszakanyarodtunk Horváth Csaba eredeti elképzeléséhez, miszerint nagyméretű fehérjék elválasztására a vékony porózus réteggel bevont tömör magvú (pellikuláris) töltetek előnyösek. Az pedig, hogy miért növelték meg a jól bevált 2,6, 2,7 µm-es töltetek szemcseátmérőjét, nagy valószínűséggel a kolonnán eső nyomással és a nagy fehérjék nyomás- és hő-érzékenységgel magyarázható. Viszonylag szélsőséges fordított fázisú körülményeket kell alkalmaznunk, ha éles, szimmetrikus kromatográfiai csúcsban akarjuk eluálni a nagy fehérjéket. Ionpárképzőt (pl. TFA) és jelentős mennyiségű szerves oldószert (pl. 30-50 % acetonitril) kell adni a mozgófázishoz, továbbá kis pH-n (pl. $1.8 < \text{pH} < 3$, azaz nagy savasság) és nagy hőmérsékleten kell dolgozni (70 – 90 °C). Ezekre mind azért van szükség, hogy gyorsítsuk az anyagátadási folyamatot, csökkentsük a nem kívánatos, erős kölcsönhatásokat. Az erős, ionos kölcsönhatások, mind a fehérjék visszatartását, mind a csúcsszélesedést befolyásolják. Továbbá, bizonyos fehérjék (pl. az IgG antitestek) irreverzibilisen kötődhetnek az állófázis felületéhez. Ahhoz, hogy megfelelő retenciót és visszanyerést biztosítsunk, ezeket az erős kölcsönhatásokat csökkenteni kell. Az erősen savas közegben, nagy hőmérsékleten és nyomáson a fehérje szerkezete (konformációja, töltés-száma, hidrofób felülete, parciális moláris térfogat változása az állófázissal történő kölcsönhatása során) jelentősen eltér a fiziológiai körülmények között felvett szerkezettől. Ezeket a hatásokat behatóan tanulmányozták a szakirodalomban. Jól ismert, hogy a visszatartás nagymértékben függ az alkalmazott nyomástól, illetve a nagy nyomás okozta – oszlopban létrejövő – hőmérséklet gradienstől is [7]. Azért, hogy a nyomás okozta, előre nehezen megadható változásokat a

fehérje szerkezetében - amelyek az elválasztási paramétereket befolyásolják - csökkentsük, viszonylag nagy szemcseátmérőjű tölteteket alkalmazunk. A kolonnán létrejövő nyomásesés ugyanis a szemcseátmérő négyzetével fordított arányban változik. A 3. ábrán példát mutatunk be az új-generációs nagy-pórusú töltetek alkalmazására. Intakt, redukált és papainnal emésztett terápiás IgG1 antitest kromatogramjait láthatjuk. Az elválasztást egy 150 x 2,1 mm-es Phenomenex Aeris Widepore XB-C18 kolonnán végeztük. Jól látható, hogy az intakt (150 kDa) fehérje széles csúccsal eluálódik. A zónaszélesedést, feltehetőleg, nem csak az előzőekben tárgyalt kromatográfiai körülmények okozzák, hanem ehhez járul a minta heterogenitása is (számos természetes variánst tartalmazhat, mint pl. C-terminális lizin variánsok, N-terminális piroglutamin és izo-aszparaginsav variánsok, deamidált és oxidált formák). Tehát az intakt fehérje kromatografálása során, a nagyon hasonló szerkezetű (de nem azonos) komponenseket csak részlegesen választottuk el. Az interferáló, átlapoló kromatográfiai csúcsok ezért okozzák az elvártnál szélesebb zónát. A nem megfelelő elválasztás miatt nem tudunk levonni hasznos információkat, ezért van szükség a fehérje méretének csökkentésére (un. fragmensek vagy domének előállítására). Részleges emésztéssel (papain, pepszin, IdeS...) és a diszulfidhidak redukálásával 25-50 kDa antitest fragmenseket kapunk, amelyek lényegesen „kellemesebbek” kromatográfiai szempontból, mint a teljes 150 kDa nagyságú fehérje. Jobb a visszanyerésük és keskenyebb csúcsban eluálódnak. A papainnal emésztett minta kromatogramjából az is kiderül, hogy mind az ún. Fab (az antitest antigénkötő fragmense) és Fc (az antitest un. kristályosítható fragmense) részek heterogének (variánsokat tartalmaznak). Erre utalnak a két főcsúcs előtt és mögött eluáló kisebb csúcsok. A redukált minta kromatogramja pedig arra enged következtetni, hogy sem az antitest könnyű lánc (LC) sem pedig a nehéz lánc (HC) nem homogének. Tehát ez esetben az antitest heterogenitása nem lokalizálható egy specifikus molekula szakaszhoz, hanem többszörösen heterogén populációról van szó. A variánsok pontos azonosítása tömegspektrometriás detektálást igényel. Ez az ún. részleges emésztés („middle down”, vagy „limited proteolysis”) ma jól bevett gyakorlat az antitest fragmensek vizsgálatára.



3. ábra. Monoklonális antitest (IgG1) fragmensek elválasztása (middle down) korszerű, nagy-pórusú, héjszerkezetű állófázison

A töltet morfológiáján kívül az állófázis kémiai tulajdonságai is befolyásolják a fehérje elválasztások hatékonyságát, elsősorban az eltérő szelektivitásuk miatt. Régebben kizárólag rövid alkil-láncú fázisokat (C3, C4) alkalmaztak fehérjék fordított fázisú vizsgálataihoz. Az akkori technikai lehetőségek mellett nehezebb volt kontrollálni a felületi borítottságot (ligand density, loading) és azt tapasztalták, hogy a fehérjék visszanyerése és csúcsszélesedése is kedvezőbb, ha rövid alkil-láncú állófázison eluáljuk őket. Mára viszont az oszlop-technológia fejlődése révén nagyon jól kontrollált és reprodukálható felületi borítottság állítható elő. A modern héjszerkezetű, nagy-pórusú tölteteket már számos felületi módosítással kínálják a felhasználóknak, mint C3, C4, C8, C18, difenil és fenil-hexil. Kisebb fehérjék esetén valóban jelentős különbség figyelhető meg a szelektivitásban különböző állófázisok alkalmazásakor. Mérési adatokkal támasztották alá, hogy a nagyobb fehérjéknél elsősorban csak az abszolút retencióban van lényeges eltérés, a relatív retenciót kevésbé befolyásolja az állófázis típusa (a felület fizikai-kémiai tulajdonságai) [8].

Beigazolódott Horváth Csaba erre a területre vonatkozó előrejelzése és útmutatása, aminek az eredménye, hogy a mai kromatográfiás gyakorlatban a leggyakrabban alkalmazott töltet típusok a héjszerkezetű állófázisok közül kerülnek ki [9]. Az 1. táblázatban, a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható, nagy-pórusú fordított fázisú héjszerkezetű töltetek jellemzőit foglaltuk össze.

Felhasznált irodalom

[1] Cs. Horváth, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, *Fast liquid chromatography: an investigation of*

operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422–1428.

[2] Cs. Horváth, S.R. Lipsky, *Column design in high pressure liquid chromatography*, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 109–116.

[3] J.J. Kirkland, *Controlled surface porosity supports for high speed gas and liquid chromatography*, *Anal. Chem.* 41 (1969) 218–220.

[4] J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks Jr., G.S. Engel, *Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules*, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 3–13.

[5] S.A. Schuster, B.M. Wagner, B.E. Boyes, J.J. Kirkland, *Wider pore superficially porous particles for peptide separations by HPLC*, *J. Chromatogr. Sci.* 48 (2010) 566–571.

[6] Sz. Fekete, D. Guillarme, M.W. Dong, *Superficially porous particles, perspectives and trends*, *LCGC North-Am* 32 (2014) 2–12.

[7] Sz. Fekete, D. Guillarme, *Estimation of pressure-, temperature- and frictional heating-related effects on proteins' retention under ultra-high-pressure liquid chromatographic conditions*, *J. Chromatogr. A* 1039 (2015) 73–80.

[8] B. Bobály, Z. Márta, J. Fekete, D. Guillarme, Sz. Fekete, *Comparative Study on Selectivity and Kinetic Performance of Recent Reversed Phase Liquid Chromatography Columns in the Separation of Protein Variants*, *Curr. Chrom.* 2 (2015) 136–144.

[9] L. Várady, K. Kalghatgi, Cs. Horváth, *Rapid high performance affinity chromatography on micropellicular sorbents*, *J. Chromatogr.* 458 (1988) 207–215.

1. táblázat. Kereskedelmi forgalomban kapható, makromolekulák (peptidek, fehérjék) elválasztására alkalmazható, nagy-pórusú, héjszerkezetű, fordított fázisú töltetek

Kolonna típus		Felület-módosítás	Szemcseátmérő (porózus réteg vastagsága) [μm]	Alkalmazható maximális hőmérséklet [°C]	Alkalmazható pH tartomány	Nyomástűrés [bar]
Zorbax (Agilent)	Proshell SB 300	C18, C8, C3	5 (0,25)	90	1-8	600
	Proshell 300Extend	C18	5 (0,25)	60	2-11	600
	AdvanceBio RP-mAb	C8, C4, difenil	3,5 (0,25)	90	1-8	600
Aeris (Phenomenex)	Widepore	C18, C8, C4	3,6 (0,2)	90 (C18, C8) 60 (C4)	1,5-9	600
	Peptide	C18	3,6 (0,5) 2,6 (0,35) 1,7 (0,22)	90	1,5-9	600 (2,6-3,6μm) 1000 (1,7μm)
Halo (AMT)	Peptide	C18, CN	2,7 (0,5) 4,6 (0,6)	100	1-9	600
	Protein	C18, C8	3,4 (0,2)	90	1-9	600
Flare (Diamond Analytics)	Widepore	C18	3,6 (0.1)	100	1-13	400

TARTSON LÉPÉST

AZ ÉLELMISZER-BIZTONSÁG

EGYRE SOKASODÓ KIHÍVÁSAIVAL!

**Olvassa rendszeresen
az Élelmiszervizsgálati Közleményeket!**



- Kizárólag tudományos cikkekkel, kétnyelvű formában és megújult külsővel jelentkeznek negyedévente a 60 éves múltú visszatekintő folyóirat
- Előfizetőink a www.eviko.hu oldalról is letölthetik a kéziratokat teljes terjedelmükben

**Csatlakozzon Ön is az olvasótáborunkhoz
amelynek tagjai vizsgáló-laboratóriumok,
élelmiszer-előállítók, forgalmazók, hatósági
szervezetek, kutatóintézetek, egyetemek
munkatársai.**



www.eviko.hu

Korszerű méretkizárásos kromatográfia: fehérje aggregátumok elválasztása

Fekete Szabolcs¹, Fekete Jenő², Guillaume Davy¹

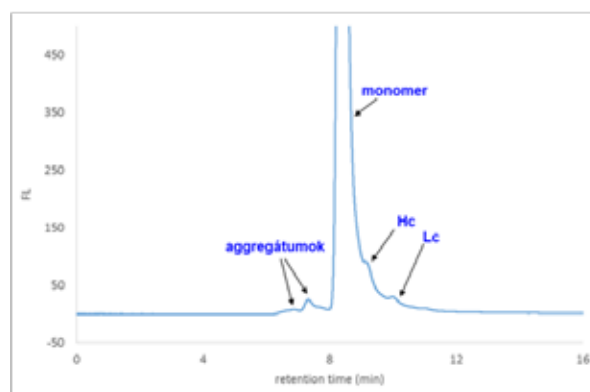
¹ Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Tanszék, 1211 Geneva, Boulevard d'Yvoy 20.

³BME Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

A méretkizárásos kromatográfia (SEC, az angol „size exclusion chromatography” megnevezés alapján) széles körben alkalmazott a terápiás fehérjék aggregátumainak meghatározására. Régebben használták a gélszűrés (gel filtration) elnevezést, amelynél a gravitáció volt a folyadékaamlást biztosító erő. Nagy előnye ennek a kromatográfiás módnak, hogy enyhe körülményeket használ (vizes mozgófázis, környezeti hőmérséklet, viszonylag kis nyomás, fiziológiás körüli mozgófázis pH) ezért a fehérjéket a természetes konformációs szerkezetüket megtartva tudjuk elválasztani. Az utóbbi években - a többi kromatográfiás módhoz hasonlóan - a méretkizárásban is megjelentek a kis szemcse-méretű töltetek és a korábbihoz képest rövidebb és kisebb átmérőjű kolonnák. Ma már a méretkizárásos kromatográfiánál is megkülönböztethetjük a hagyományos (konvencionális, HP-SEC) és az ultranagy-nyomású (UHP-SEC) módokat [1].

Méretkizárásos kromatográfiában, a makromolekulákat az un. hidrodinamikai átmérőjük alapján választjuk el. Az állófázis jól kontrolált pórus-méretű és eloszlású szemcsés töltetből áll, sokszor olyan felületi módosítást alkalmazva, hogy a felülettel lehetőleg ne (vagy csak kis mértékben) alakuljon ki kölcsönhatás. Ez alapvető ahhoz, hogy a makromolekulák elválasztását az oldatban felvett méretük szabja meg. Ha a termodinamika technikus terminusait használjuk, akkor azt mondjuk, hogy az elválasztást az entrópia szabja meg. A folyadékkromatográfiásan kis molekulatömegű anyagok elválasztásánál a visszatartás és az elválasztás alapja a komponensek eltérő kölcsönhatása az állófázissal, ugyanez vonatkozik a biopolimerekre is, ha fordított fázisú, ioncserés vagy hidrofób kölcsönhatású kromatográfiás módszert használunk. A méretkizárásnál nem beszélhetünk erről - az eltérő kölcsönhatásokon alapuló megoszlásról -, hanem inkább szűrésről, ahol a szűrőágy a szemcsés töltetből áll, és a szemcsék eltérő átmérőjű pórusokat tartalmaznak. A gyakorlatban, sajnos az állófázissal való kölcsönhatást nem minden esetben tudjuk kizárni. Felléphet hidrofób, ioncserés, vagy ionkizárásos kölcsönhatás, amelyek befolyásolják a komponensünk elúciós idejét is és a csúcsalakját

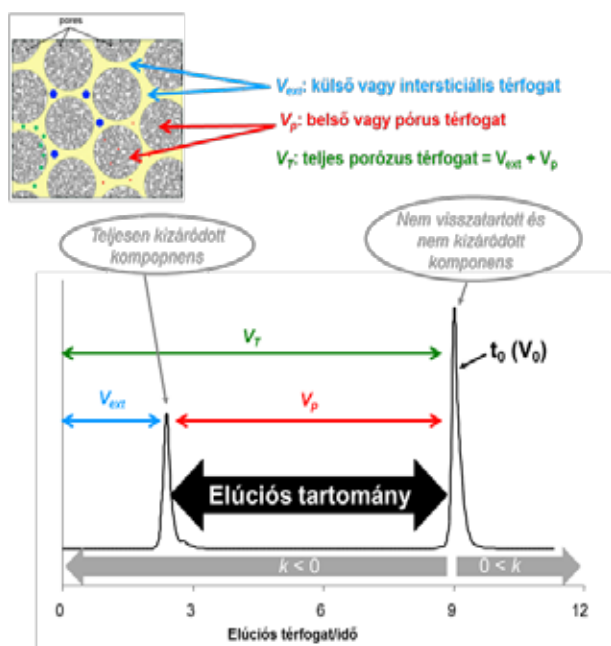
vagy szélességét. A gyakorlati elválasztások során arra törekszünk, hogy ezeket a kölcsönhatásokat csökkentjük (pl. a mozgófázis pH helyes megválasztásával, só vagy kis mennyiségű szerves oldószer hozzáadásával). Ha sikerül ezeket a kölcsönhatásokat kiküszöbölni, akkor a kisebb molekulák több időt fognak eltölteni a pórusokban, míg a nagyobbak kevesebbet, hiszen csak a pórusok egy részébe tudnak bediffundálni, kizáródnak onnan és így gyorsabban haladnak a mozgófázissal. Tehát a nagyobb molekulák hamarabb, a kisebbek később eluálódnak. Az 1. ábrán példát mutatunk be egy terápiás fúziós-fehérje aggregátumainak illetve nehéz- (Hc) és könnyű-lánc (Lc) fragmensének elválasztására. Az elválasztást egy 300 x 4,6 mm-es (3 µm szemcseátmérőjű és 290 Å pórusátmérőjű) kolonnán végeztük.



1. ábra: Terápiás fúziós-fehérje aggregátumainak és fragmensének elválasztása hagyományos 300 x 46 mm kolonnán

A másik lényeges különbség az eltérő kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiás és a méretkizárásos kromatográfia között, hogy az utóbbi módszernél a maximális elúciós térfogat megegyezik a pórustérfogat és a szemcsék közötti térfogat összegével. Ez, az eltérő kölcsönhatáson alapuló kromatográfiás módszereknél megadja a holtterefogatot. Érdemes átgondolni, hogy ebben a kromatográfiás módban a komponenseink elúciós ideje kisebb lesz a hagyományos értelemben vett holtidőnél ($t_e < t_0$). A 2. ábrán szemléltetjük az un. belső-, külső- és teljes pórustérfogat (porozitás) szerepét a méretkizárásos elválasztásra. Teljes kizáródásnál a makromolekula minden pórusból kizáródik és a mozgófázissal együtt a szemcsék közötti térfogatban áramlik. Ez lesz a hasznos elúciós tartomány kezdetét meghatározó elúciós idő vagy térfogat (méretkizárásos kromatográfiában gyakran adjuk meg az elúciót térfogatban). A belső porozitás pedig meghatározza azt a molekulaméretet ami még teljes mértékben bejut a belső pórusokba, ez lesz a hasznos elúciós tartomány végpontja. Tehát a hasznos elúciós tartományt a belső- (pórustérfogat) és külső- (szemcsék közötti térfogat) porozitás viszonya határozza meg. Hasonlóan a visszatartásos (szorptív) kromatográfiás módokhoz, a méretkizárásban is gyakran használják a „retenciós” tényezőt, persze itt mást értünk rajta. Gyakran k^* -gal jelölik és a következő

formában írható fel: $k^* = (V_e - V_{ext}) / V_{ext}$. Könnyen belátható, hogy k^* -nak van egy maximum értéke, $k^*_{max} = V_p / V_{ext}$. Korszerű kolonnákkal ez a maximum érték általában $k^* \sim 2$ adódik. Annak, hogy nem visszatartott komponenseket választunk el, egy másik következménye is van, nevezetesen a kromatográfiás csúcs szélesedése. A csúcsvarianciát meghatározza a visszatartás. Mivel itt a klasszikus visszatartás (k) zéró, ezért rendkívül keskeny csúcsok várhatók amelyeket nagyban befolyásolhat a készülék oszlopon kívüli térfogataiban lejátszódó zónaszélesedés.



2. ábra: Elúciós tartomány értelmezése a méretkizárásos kromatográfiában: külső és belső porozitás szerepe

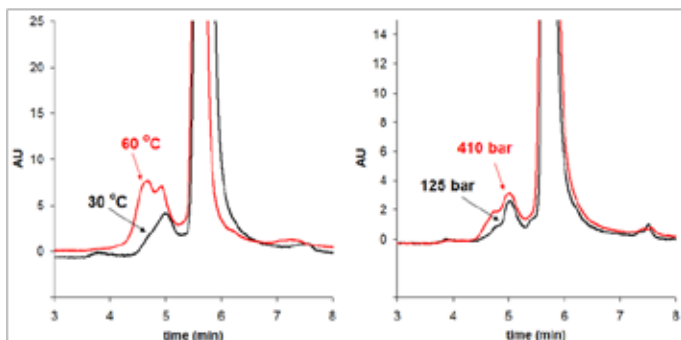
Azt is fontos megemlíteni, hogy a töltet átlagos pórusmérete és pórusméret eloszlása pedig meghatározza azt a molekulaméretet (tömeget), amelyeket megfelelően el lehet választani. Például kisebb fehérjék (15-80 kDa) elválasztására jól beváltak a 150 - 200 Å pórusméretű töltetek, nagyobb antitestek és aggregátumainak (145 - 450 kDa) elválasztására pedig a 250 - 300 Å pórusúak.

A hagyományos SEC elválasztásokat nagy térfogatú kolonnákkal végezzük, melyek leggyakrabban 300 mm hosszúságúak és 6 - 8 mm átmérőjűek. A nagy kolonna-térfogatra a már említett okok miatt van szükség, nevezetesen, hogy megfelelő pórustérfogat álljon rendelkezésre az elválasztáshoz. Ennek megfelelően a hagyományos SEC mérések analízis ideje a 25-50 perces tartományba esik. Az elválasztás gyorsításának legegyszerűbb módja a kolonna méret csökkentése és/vagy a mozgófázis térfogat-áramának növelése. Ezt többször kihasználták már méretkizárásban, elsősorban szintetikus polimerek elválasztásakor [2,3]. Meg kell jegyeznünk, hogy a kolonnahossz csökkentéssel arányosan csökken az elérhető tányérszám is. Ezért viszont egyszerre hatékony és gyors elválasztást nem tudunk végezni - ha csak a kolonna méretét csökkentjük.

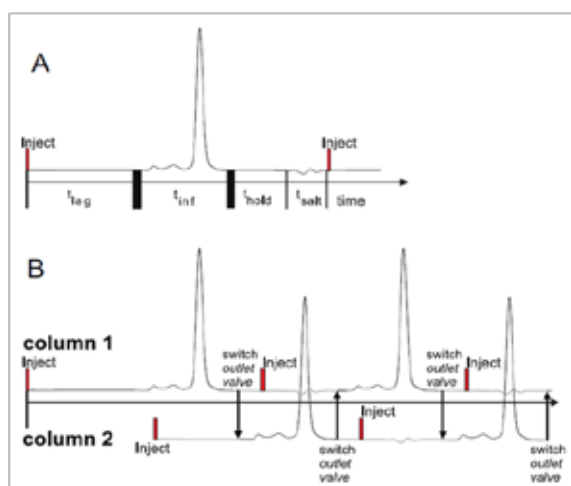
A kinetikai hatékonyság növelésére is szükség van, amit például a hőmérséklet növelésével lehet elérni.

A megnövelt hőmérséklet azért is előnyös a méretkizárásos kromatográfiában, mert a mozgófázis viszkozitása csökken, ennek megfelelően csökken a nyomásesés is, s a térfogatáramlási sebesség növelhető. Park és kollégái mutattak be először 110 °C-os mozgófázissal végzett gyors SEC méréseket [4]. A szemcseméret csökkentése is jó lehetőséget ad arra, hogy egy rövid kolonnával is megfelelő tányérszámot tudjunk elérni. A hagyományos SEC kolonnák szemcsemérete az 5 - 10 µm-es tartományba esik. Néhány évvel ezelőtt méretkizárásban is megjelentek az apró szemcsés töltetek, először 2,5 majd 1,7 µm-es szemcseátmérővel (Waters BEH), nemsokkal később pedig 3 µm-es töltetek követték őket (Phenomenex Yarra). 2016-ban már több gyártó is kereskedelmi forgalomba bocsátotta az UHP-SEC kolonnáit (Agilent AdvanceBio 3 µm, Tosoh UP-SW3000 2 µm és Phenomenex Yarra 1,8 µm). Ezek az UHP-SEC kolonnák a korábbi 300 mm x 6 mm helyett már 150 x 4,6 mm-es dimenzióval kerülnek kereskedelmi forgalomba. Ezekkel a kolonnákkal az analízis idő 5 perc alá is csökkenthető [5,6]. Azt azonban nem szabad elfelejtenünk, hogy kis szemcsés töltetekkel dolgozva, az ár amit fizetnünk kell az mindig a megnövekedett nyomás. Ezekkel az UHP-SEC kolonnákkal gyakran dolgozunk 200 bar felett, de akár 500-600 bar nyomáson is. Sajnos ilyen körülmények között a nyomás- és hőérzékeny fehérjék, a fellépő nyíróerők és súrlódásból eredő hőmérséklet-gradiensek miatt bizony aggregálódhatnak az elválasztás során [5]. Ennek az lesz a következménye, hogy nem a valós - mintában jelenlevő - aggregátum mennyiséget fogjuk mérni, hanem az általunk „mesterségesen” előállítottat. Ez nem minden fehérjére igaz, de bizonyos monoklonális antitest családok hajlamosak nyomás indukált aggregációra. A nagy nyomáson létrejövő fehérje asszociáció és aggregáció jól ismert jelenség [7,8,9]. Tehát UHP-SEC kolonnákkal dolgozva - ha azokat fehérje aggregáció meghatározásra alkalmazzuk - mindig érdemes olyan körülményeket választani, hogy az oszlopon létrejövő nyomás ne legyen túl nagy (pl. $\Delta p < 200$ bar). A 3. ábrán példát mutatunk be monoklonális antitest kolonnán létrejövő hőmérséklet- (A) és nyomás-indukált (B) aggregációjára. Az ábrán a 4-5 perc közötti elúciós tartományban figyelhetjük meg az aggregátumokat. Gyakran fordul elő az is, hogy ha ugyanazt a fehérje mintát megmérjük hagyományos (HP-SEC) és UHP-SEC körülmények között, bizony más-más aggregátum mennyiséget mérünk.

További lehetőség az elválasztás gyorsítására, hogy nem egy, hanem kettő kolonnán dolgozunk amiket párhuzamosan üzemeltetünk. Még jobban járunk, ha a két kolonnán az injektálásokat idejét „összefonjuk” (parallel interlaced SEC), nem várjuk meg amíg a számunkra érdektelen elúciós tartomány (pl. a monomer csúcsot követő tartomány) végig fut, hanem már előtte injektáljuk a következő mintát a másik oszlopra [10]. A 4. ábrán ilyen „párhuzamosan-összefonott” SEC elválasztással kapott kromatogramokat mutatunk be. Ma már az ilyen elválasztás technikai háttere (szelepek, oszlop váltók vezérlése), rutinban is rendelkezésre áll.



3. ábra: Hőmérséklet (A) és nyomás (B) okozta oszlopon létrejövő aggregátumok UHP-SEC elválasztás során



4. ábra: „Párhuzamosan összefon” (parallel interlaced) SEC elválasztással kapott kromatogram

A kis mennyiségben rendelkezésre álló fehérje mintákból történő aggregáció-meghatározás érzékenységének növelésére a kapilláris kolonnák alkalmazása is jó lehetőség. Ekkor az oszlopon kívüli térfogatok szerepe jelentős, nagyban ronthatják az elválasztás hatékonyságát. Feltehetőleg ezért sem terjedt még el a kapilláris SEC kromatográfia. Néhány alkalmazást azonban már közöltek, amelyekből említésre méltó az antitestek fragmenseinek elválasztása amit 300 mm x 300 μ m kolonnán végeztek [11,12].

Végül meg kell említenünk, hogy a gyakorlatban a SEC kolonnák élettartama elmarad a más típusú (pl. RP, IEX, HIC) kolonnák élettartamától. Tovább bonyolítja a dolgot, hogy a SEC kolonnák messze a legdrágábbak az összes más típusú kolonnhoz képest. A kolonnák élettartamát valószínűleg a terápiás fehérje oldatokban lévő segédanyagok (poliszorbátok, sók, PEG) is csökkentik. Érdemes előtét kolonnát alkalmazni és rendszeresen mosni, regenerálni az oszlopot. Az irodalomban számos SEC kolonna tisztítási protokoll áll rendelkezésünkre (pl. 10-20% szerves oldószer adása a mozgófázisba ami segíthet a megkötődött hidrofób komponensek eltávolításában, vagy nátrium-azid hozzáadása ami a bakteriális szennyeződések eltávolítására alkalmas).

Felhasznált irodalom

- [1] Sz. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guilleme, Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 161-173.
- [2] H. Pasch, P. Kilz, Fast liquid chromatography for high-throughput screening of polymers, *Macromol. Rapid Commun.* 24 (2003) 104-108.
- [3] S.T. Popovici, P.J. Schoenmakers, Fast size-exclusion chromatography – theoretical and practical considerations, *J. Chromatogr. A* 1099 (2005) 92-102.
- [4] S. Park, H. Cho, Y. Kim, S. Ahn, T. Chang, Fast size exclusion chromatography at high temperature, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 96-100.
- [5] Sz. Fekete, K. Ganzler, D. Guilleme, Critical evaluation of fast size exclusion chromatographic separations of protein aggregates, applying sub-2 μ m particles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 78-79 (2013) 141-149.
- [6] S. M. Koza, P. Hong, K.J. Fountain, Advantages of ultra performance liquid chromatography using 125 Å pore size, sub-2 μ m particles for the analysis of peptides and small proteins, poster presented at Medimmune 2012, Rockville, MD.
- [7] T.W. Randolph, M. Seefeldt, J.F. Carpenter, High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1595 (2002) 224-234.
- [8] N. Rivalain, J. Roquain, G. Demazeau, Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies, *Biotech. Adv.* 28 (2010) 659-672.
- [9] V.L. Pellerin, C. Balny, High pressure as a tool to study some proteins properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation, *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.* 3 (2002) 209-221.
- [10] D. Farnan, G. Moreno, J. Stults, A. Becker, G. Tremintin, M. van Gils, Interlaced size exclusion liquid chromatography of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8904-8909.
- [11] J.C. Rea, Y. Lou, J. Cuzzi, Y. Hu, I. Jong, Y.J. Wang, D. Farnan, Development of capillary size exclusion chromatography for the analysis of monoclonal antibody fragments extracted from human vitreous humor, *J. Chromatogr. A*, 1270 (2012) 111-117.
- [12] J.C. Rea, G.T. Moreno, L. Vampola, Y. Lou, B. Haan, G. Tremintin, L. Simmons, A. Nava, Y. J. Wang, D. Farnan, Capillary size exclusion chromatography with picogram sensitivity for analysis of monoclonal antibodies purified from harvested cell culture fluid, *J. Chromatogr. A*, 1219 (2012) 140-146.

Hogyan krimpeljünk?

A krimpelés dióhéjban

Imrik Péter

Gen-Lab Kft.

Megfelelően zár-e a Headspace üvegem?

A Headspace (HS) analízisnél különösen fontos a mintánkat tartalmazó üveg lezárásának minősége. A magas nyomás és hőmérséklet alkalmazása reprodukálhatóan jó tömítést igényel. Az újabb és újabb készülékek pedig csak fokozzák az ezen irányú elvárásokat. Magasabb hőmérsékleten a kiváló minőségű anyagokból készült szeptumok használata is kulcsfontosságú feltétele a reprodukálható (pl.: sziloxán), szennyezőktől mentes analízisnek.



1. ábra: Legáltalánosabb kézi négyfogas krimpelő fogó

Hogyan is működik...

A Headspace analízis szigorú elvárásai miatt a csavaros üvegek helyett jobban elterjedt a krimpelős típus, mivel annak használatával az üveg lezárása reprodukálhatóan hajtható végre. A HS mérések mellett fontos kiemelni, hogy gyógyszergyártásban a kész termékek csomagolásának esetében a reprodukálhatóság még lényegesebb, mint az analitikai módszerekénél. Például számos gyártó cég kimondottan a lezárás minőségének ellenőrzésére tervez, gyárt több milliós készülékeket.

Igen drága készülékkel végezhető el a lezárás minőségének az ellenőrzése, ám az analitikai laborokban továbbra is a legelterjedtebb vizsgálat az ún. csavarásos teszt, ami során a vegyész a kupak kézi erejű megcsavarásával ellenőrzi, hogy az elég szorosan zár-e.

Minden krimpelő eszköz, beleértve a nagy sebességű gyógyszergyári lezáró készülékeket, az üveg pereme köré formálja a kupakot. A kupakot egy meghatározott geometriájú fogó segítségével helyezzük az üvegre. Az 1. ábrán négyfogas krimpelő látható nyitott pozíciójában. Megjegyzendő, hogy maga a fogó, vagy gép nem tudja ellenőrizni a megfelelő illeszkedést és egy adott üveg/kupak kombinációra tökéletesen beállított peremező nem biztos, hogy más gyártói kupak esetében (elég itt a szeptum vastagságának vagy netalán anyagának a változtatására gondolni) is megfelelően fogja elvégezni a mintatartóüveg lezárását. A kupak zárásának a minőségét nem csak a krimpelés de a szeptum anyaga (gumi, szilikon), a mintatér felőli rész (PTFE, FEP, Al) anyagminősége és ezek vastagsága, alakja is meghatározza.

A megfelelő krimpelés

A fentiek ismeretében feltehetjük a kérdést, hogy több milliós készülék beszerzése nélkül hogyan bizonyosodhatunk meg a lezárás helyességéről? A szeptum és a kupak lezárás utáni szemrevételezése sok esetben már információval szolgálhat az esetleges nem megfelelő kompresszióra. A helyesen krimpelt kupak oldala egyenesen sima, nagyobb horpadásoktól, gyűrődésektől mentes, amik például gátolhatják az automata mintaadagoló működését. A szeptum kis mértékű megsüllyedése az alumínium kupak összenyomásától alakul ki. A lezárási folyamatot vizsgálva gondolhatnánk, hogy az alumínium kupak széleinek a krimpelés miatti beszűkülése okozhatja a szeptum deformálódását (besüllyedését). Leginkább a PTFE szeptum rész üvegbe történő benyomódása magával húzza a szilikon szeptum felsőrészt -mert az üveg szája szélesebb mint az alumínium kupakon található nyílás-, ide könnyebben be tud türemkedni az alumínium kupakban a krimpelés hatására összehúzott szeptum.

A csavarásos teszt

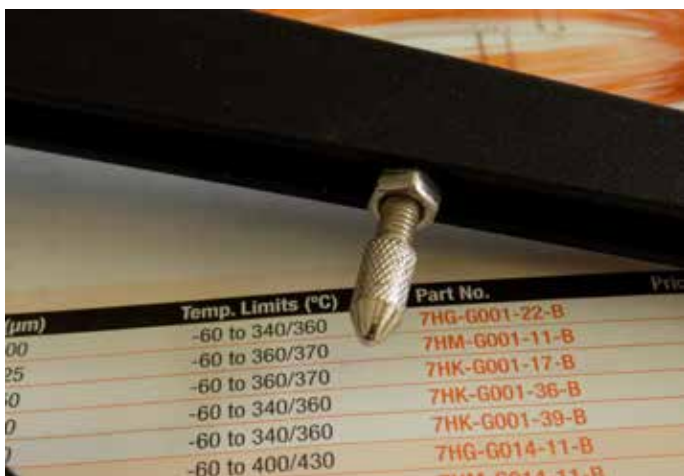
Nézőpont kérdése, melyben most nem kívánunk állást foglalni. Ez a módszer egy kicsit ellentmondásos – erősen függ a (pl.: a nagyon csúszós PTFE) szeptum anyagától és a legideálisabb esetben sima felületű üveg egymással érintkező felületétől. Eltérő lehet az egyes felhasználók kézi ereje is, illetve ne feledjük, hogy ha egyszer már elfordult a kupak, utána sokkal egyszerűbb újra megtekerni az üveg peremén. A fentiek tükrében a csavarásos teszt megfelelő ellenőrzése lehet a krimpelés minőségének de fontos kiemelni, hogy egy elcsavarható kupak még lehet, hogy megfelelően zár és elkövethetjük azt a hibát, hogy emiatt rendszeresen „túlkrimpeljünk” (2. ábra) majd.



2. ábra: "Túlkrimpelt" headspace kupakon jól látszódik a deformálódott peremrész

Hogyan állítsuk be a krimpelő fogót?

Először is amennyire csak lehetséges vegyük figyelembe a variációs lehetőségeket. Az elektromos krimpelőknél a plusz és mínusz gomb segítségével nagyon egyszerű, precíz és jól reprodukálható módon lehetőségünk van az optimális lezárás beállítására. A manuális fogóknál a végső lezáró pozíció beállítása lehetséges általában egy csavar/ütköző beállításával (3. ábra). Fontos, hogy a használatkor össze tudjuk majd csukni annyira a fogót, hogy ezt a pontot el tudjuk érni. Tapasztalataink szerint egy csomag üvegben és kupakban nem valószínű, de még azonos márkán belül több hónap/sarzs távlatában előfordulhatnak eltérések. Ez nem feltétlenül minőségi hiba, bár mindenképpen ügyeljünk arra, hogy úgy állítsuk be a krimpelőt, hogy ezen kis eltérések esetében is jól zárjon. Lehetőség szerint minden új kibontott csomagnál és minden észrevett hiba esetén először próbáljunk meg állítani a fogón és az éles mintáink előtt végezzünk 1-1 próbázást.



3. ábra: Állítható ütközőcsavar a kézi krimpelőfogón

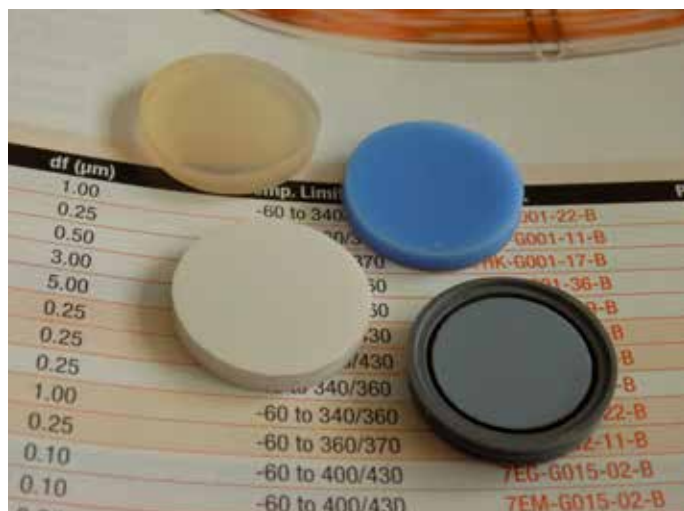
Fontos kiemelni, hogy a fogó beállításánál ne folyamatosan azonos üvegen próbálkozzunk hanem mindig egy új üveg/kupak párost vegyünk elő a dobozból. Azonos üvegen történő több-

szöri próbálkozás fals beállítást eredményezhet. Tény, hogy az elektromos eszközök reprodukálhatóbb végrehajtást biztosítanak. A fogó végső pozícióját sokkal érzékenyebben lehet beállítani a motorikus vezérlő segítségével, ráadásul a jobb elektromos krimpelőknél többféle beállítást rögzíthetünk. A különféle üvegekhez a fogó fejek könnyen cserélhetők és egy állványra szerelve a hatékonyságunk messze jobb lesz mint a kézi lezárófogók esetében.

Különböző szeptumok

Egy komolyabb gyártó termékpalettájában rendre többféle (4. ábra) szeptum típust találhatunk a legáltalánosabban elterjedt Butil(gumi)/PTFE és a szilikon/PTFE szeptumoktól az ún. Pharma fix típusokon keresztül egészen az egyedi megoldásokig, például az Antispin szeptummal szerelt kupakokig. Legtöbb esetben a pénztárcánk szab határt egy adott típus kiválasztásánál mert itt elég jelentős (akár 300HUF/db eltérés az árban) költségbeli különbségek jelentkezhetnek egy-egy adott típus között.

Itt is fontos kiemelnünk, hogy egy jól beállított lezárófogóval szinte minden kupaktípussal megfelelő tömített lezárást tudunk elérni egy hozzá kompatibilis HS üvegen.



4. ábra: Különböző szeptum típusok

Kupak kupak?

Előfordul, hogy a HS üvegek a minta típusától függően költségtakarékosságból többszöri felhasználásra kerülnek. Találkoztunk már olyan esettel is amikor ugyanazon üvegek megfelelő tisztítás után több éve folyamatos használatban voltak. A gyártók, az árfolyamok, a beszerzési lehetőségek akár egy éven belül is sokat változhatnak. Ha a meglévő üvegeinkhez esetleg más beszerzési forrásból származó kupakot rendelünk a legtöbb esetben biztosan kell a fogónk eddigi beállításain változtatnunk, hogy megfelelően tudjuk használni az új kupakokat de sajnos sok esetben az új kupak a krimpelő állítása után sem megfelelően rögzíthető

a mintatartóüvegen. Ennek oka lehet a gyártók közötti méret-, alakbeli szórás ha például csak a különböző üvegperem (DIN sík, HS ferde, SPME) kialakításokat nézzük. (6. ábra)

Sok bosszúságtól kímélhetjük meg magunkat, ha egy mintacsomaggal ellenőrizzük, hogy az új, beszerezni kívánt kupakok kompatibilisek-e a meglévő üvegeinkkel.



5. ábra: Mágnesezhető fémbetéttel szerelt alumínium kupak

Acél és Alumínium mágnesezhető kupakok

A Combi-Pal és más CTC gyártotta mintaadárgolók használata esetén mágneses kupakokat kell, hogy alkalmazzunk a mintáink tárolására. Kétrészes, mágneses tetővel ellátott alumínium és egyrészes acél kupakokat (5. ábra) egyaránt használhatunk. Az acél egyrészes kupakokhoz sokkal kedvezőbb áron juthatunk hozzá de nagy teljesítményű elektromos krimpelőre van szükség, mivel sokkal nagyobb erő kifejtéssel lehet csak lezárni azokat. Kézi erővel túlságosan fárasztó és sérülésveszélyes lenne a művelet még az általánosan használt elemmel/akkumulátorral működő elektromos krimpelőnek sincs elég ereje ezekhez a kupakokhoz, de az elektromos hálózatról működtethető típusok segítségével már jól reprodukálhatóan tudjuk elvégezni a lezárást.



6. ábra: Perem kialakítások: (balról jobbra) HS, DIN, SPME

Örömmel értesítjük, hogy a Magyar Elválasztástudományi Társaság a már hagyományokkal rendelkező hazai konferenciáját, az Elválasztástudományi Vándorgyűlést, 2016. november 9-11. között rendezzi meg Kecskeméten a Four Points by Sheraton Kecskemét Hotel & Konferenciaközpont szállodában. Hagományainknak megfelelően kétféleképpen, változó helyszíneken rendezzük meg a magyar kromatográfusok és elválasztástudománnyal foglalkozó szakemberek egyik legkedveltebb, „vándorló” találkozóját, az **Elválasztástudományi Vándorgyűlést**. A tudományos ismeretek bővítése, az új kutatási eredmények bemutatása és megvitatása mellett nem elhanyagolható szempont a rendezvényeink helyszíneinek kiválasztása sem. A kellemes környezet jótékonyan járul hozzá az elmélyült tudományos munkához, ugyanakkor lehetőséget biztosít a szünetekben, a tudományos program befejezése után a kikapcsolódásra, baráti beszélgetésekre is. 2016-ban ünnepeljük a Magyar Elválasztástudományi Társaság Alapításának **20. évfordulóját**. A jubileumi Elválasztástudományi Vándorgyűlésen visszaemlékszünk Társaságunk húszéves történetének legfontosabb mozzanataira, eseményeire.

Az Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016 az elválasztástudomány valamennyi területét érintő analitikai, preparatív és ipari elválasztási módszerek és eljárások, továbbá a minta-előkészítés és a kapcsolt technikák legújabb hazai eredményeinek bemutatásával kíván foglalkozni. Az előadások, posztterek igen jó lehetőséget biztosítanak a gyógyszer- és vegyipari gyártás, kutatás és minőség-ellenőrzés, a gyógyszerkutatás és fejlesztés különböző területein az analitikai, elválasztástechnikai, bioanalitikai, biokémiai, biotechnológiai és szerkezetkutatási analitikai módszerek, stb. legfontosabb eredményeinek áttekintésére.

Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016 Kecskemét, Four Points by Sheraton Kecskemét Hotel & Konferenciaközpont **2016. november 9-11.**

A Vándorgyűlés honlapja a **www.vandorgyules.mett.hu** címen érhető el, a honlapon valamennyi lényeges információ megtalálható.

Előadások, posztterek elérésére és az on-line regisztrációra is hamarosan megnyílik a lehetőség.

Örömmel tájékoztatjuk a METT tagjait, hogy részükre **10 ezer Ft kedvezményt** biztosítunk a részvételi díjból. Amennyiben kiállítóként vagy szponzorként, támogatóként kíván részt venni az Elválasztástudományi Vándorgyűlésen, figyelmébe ajánljuk a Vándorgyűlés honlapjáról letölthető kiállítói és támogatói ajánlatot.

A Magyar Elválasztástudományi Társaság vezetősége pályázat hirdetett meg tagjai részére az Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016 rendezvényen való ingyenes részvételre (beküldési határidő 2016. szeptember 1.).

A pályázati felhívás a METT és az Elválasztástudományi Vándorgyűlés honlapján is elérhető.

A fiatal kutatók részére meghirdetett „Prizma-díj Nyiredy Szabolcs emlékére” pályázat (beküldési határidő 2016. szeptember 1.) felhívása szintén elérhető a METT és az Elválasztástudományi Vándorgyűlés honlapján. A díj átadására novemberben, a Vándorgyűlésen kerül sor.

Szeretettel várjuk Önöket az Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016 rendezvényen.



Biztonság a Laborban
Prémium minőség
Széles termékpaletta
Megfizethető ár

HAUST FILTER



VISIONEC-LAB LTD.

VisionEC-Lab Kft.

E-mail: info@visionec.hu
Web: www.visionec.hu

Magyarországi forgalmazó:



Gen-Lab Kft.

Email: info@gen-lab.hu
Web: www.gen-lab.hu

VISION SAFETY CAPS

ÚJ STARTER KIT kezdő csomag
MOST KEDVEZTMÉNYES ÁRON

Tegye biztonságossá HPLC készülékeit
már 45 900 Ft-tól!



Cikkszám:

VLS45-4001

GL45 STARTER KIT

**4DB VLC45-2A-SF ELUENS KUPAKOT
TARTALMAZ**

NYUGTAT VAGY ÉLÉNKÍT? TEAMINTÁK ANALITIKAI VIZSGÁLATA

Csupor Dezső, Jedlinszki Nikoletta, Boros Klára

Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerésztudományi Kar,
Farmakognóziai Intézet

Jóllehet a teacserje (*Camellia sinensis* L.) levelének egyre több gyógy- és egészségmegőrzésben betöltött szerepére derül fény, a tea máig elsősorban élvezeti célú italknak számít. A kedvező hosszú távú élettani, farmakológiai hatások a tea polifenoljainak tulajdoníthatók [1], azonban a tea központi idegrendszeri, azonnal tapasztalható hatásai két másik vegyület, a koffein és egy speciális aminosav, a növényvilágban csak sporadikusan előforduló L-teanin jelenlétére vezethetők vissza. Előbbinek központi idegrendszeri izgató hatása az adozinreceptorokon keresztül alakul ki [2], utóbbi ezzel ellentétes hatással rendelkezik. A teanin nyugtató, relaxáló hatásának mechanizmusa nem teljesen ismert, az azonban bizonyított, hogy részben antagonizálja a koffein hatását – ezt állatkísérletek és human vizsgálatok is igazolják. Tiszta teanin alkalmazásával embereken relaxáló hatást lehet elérni, amit EEG-vel is alátámasztottak [3-5].

A szárított tealevél 1-2% teanint és mintegy 2-6% koffeint tartalmaz. Ezek mennyisége, egymáshoz viszonyított arány a feldolgozás módjától erősen függ. Minél kíméletesebb a feldolgozás, annál magasabb a teanin mennyisége, a koffein szintjére viszont kevésbé hat a feldolgozás módja. Szakirodalmi adatok szerint a legkíméletesebben feldolgozott zöld és fehér teában a legmagasabb az aminosav mennyisége, mivel ezeket nem fermentálják, ráadásul a begyűjtés utáni gyors, rövid ideig tartó hőkezeléssel inaktíválják a növényi enzimeket, ezáltal leállítják a teanin lebomlásához (is) vezető post mortem folyamatokat. A legintenzívebb feldolgozáson a pu-erh teák esnek át, amelyeknél a hosszú távú fermentáció és az oxidatív folyamatok nemcsak a polifenol-összetételben okoznak jelentős változást (csökkenést), hanem a teanintartalomban is. Az oolong és fekete teák feldolgozási módja, összetétele valahol e két véglet között található [6]. A helyzet természetesen ennél bonyolultabb, mivel a kiindulási nyersanyag, a friss tealevél összetétele is eltérő lehet.

Bár a koffein és a teanin alapvetően befolyásolja a tea hatását, és különösen a koffein analitikájának kiterjedt irodalma van, szimultán meghatározásukkal csak néhány cikk foglalkozik [7] [8] [9]. Különböző teatípusokkal, viszonylag nagy mintaszámon

végzett elemzést elsőként kutatócsoportunk közölt a szakirodalomban [10].

Eszközök és módszerek

A vizsgálat keretében 34, kereskedelembe kapható teaminta elemzésére került sor. A kivonatokat – a teakészítés módját imitálva – 1 g minta 100 ml 80 °C-os vízzel 3 percen át történő kivonásával (áztatás) nyertük. A kvantifikáláshoz L-teanin és koffein standardok oldatát használtuk.

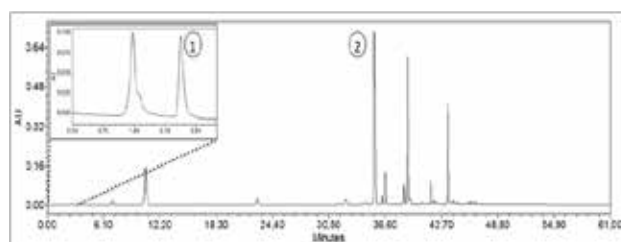
A HPLC vizsgálatot egy Waters HPLC-n (Waters 600, 2998 PDA, Empower Pro) végeztük Kinetex XB-C18 (2,6 µm, 100Å, 100x4,6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) oszlopon, 40 °C-on. Mozgófázisként 0,05% foszforsavat tartalmazó víz (A) és acetonitril (B) gradiensét alkalmaztuk: 0-6 perc 100% A, 0,5 ml/perc; 6-7 perc 100% A, 0,8 ml/perc; 7-25 perc 95% A, 0,8 ml/perc; 25-40 perc 80% A, 0,8 ml/perc; 40-41 perc 100% A, 0,5 ml/perc, majd 9 perc ekvilibrálás. A teanint 210 nm-n, a koffeint 273 nm-n detektáltuk.

Eredmények

Az általunk kidolgozott analitikai módszer a teanin és a koffein szelektív és megbízható analízisét tette lehetővé a növényi kivonat mátrixából (1. ábra). A teanin 2,5, a koffein 35 perces retenciós idővel volt detektálható. A mintákban található mennyiségek méréséhez felvett kalibrációs egyenesek lineárisak voltak, az RS értéke 0,999, illetve 1,000 volt.

Fehér teák esetén a mintákban mért, száraz tealevélre számított teanin/koffein koncentráció 6,26/16,79 mg/g, fekete teáknál 5,13/17,77 mg/g, zöld teáknál 6,56/16,28 mg/g, oolong teáknál 6,09/19,31 mg volt. A pu-erh mintában teanin nem volt kimutatható, koffeintartalma 12,59 mg/g volt. Az egyes teatípusok koffein- és teanintartalmának szórása viszonylag mérsékelt volt (kb. 2-4 mg/g), az oolong kivételével, amelynél a nagy eltéréseket valószínűleg a feldolgozás módszerének eltérései okozhatták.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a közvélekedéssel ellentétben a zöld teák teanintartalma nem kiugróan magas a többi teafajtához viszonyítva. A tea fogyasztás esetén tapasztalt (szubjektív) élénkítő hatás eltérő mértéke adódhat a két anyag arányából, de függhet azok biohasznosulásától is, amelyre jelentős hatással vannak a levélben található polifenolok.



1. ábra Zöldteakivonat kromatogramja a teanin (1) és a koffein (2) csúcsaival

Irodalomjegyzék

- [1.] Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci* 2007;81(7):519–33.
- [2.] Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev [Internet]* [cited 2014 Sep 25];17(2):139–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1356551>
- [3.] Kakuda T, Nozawa A, Unno T, Okamura N, Okai O. Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem [Internet]* 2000 [cited 2014 Oct 30];64(2):287–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737183>
- [4.] KOBAYASHI K, NAGATO Y, AOI N, JUNEJA LR, KIM M, YAMAMOTO T, et al. Effects of L-theanine on the release of α -brain waves in human volunteers [Internet]. *Nippon Nōgei Kagakukai-shi* [cited 2014 Oct 30];72(2):153–7. Available from: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsi dt=2234172>
- [5.] Cooper R, Morre DJ, Morre DM. Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *J Altern Complement Med* 2005;11(3):521–8.

- [6.] Keenan EK, Finnie MDA, Jones PS, Rogers PJ, Priestley CM. How much theanine in a cup of tea? Effects of tea type and method of preparation. *Food Chem* 2011;125(2):588–94.
- [7.] Song R, Kelman D, Johns KL, Wright AD. Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii. *Food Chem* 2012;133(3):707–14.
- [8.] Peng L, Song X, Shi X, Li J, Ye C. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *J Food Compos Anal* 2008;21(7):559–63.
- [9.] Zhu X, Chen B, Ma M, Luo X, Zhang F, Yao S, et al. Simultaneous analysis of theanine, chlorogenic acid, purine alkaloids and catechins in tea samples with the help of multi-dimension information of on-line high performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2004;34(3):695–704.
- [10.] Dezső Csupor, Nikolett Jedlinszki, Klára Boros: Theanine and Caffeine Content of Infusions Prepared from Commercial Tea Samples. Article in *Pharmacognosy Magazine*, January 2016., DOI: 10.4103/0973-1296.176061, University of Szeged, Hungary

Klónozza régi oszlopait!

Robusztusabb oszlopok, kedvezőbb árak!

InertClone™
KromaClone™
HyperClone™
BondClone™
SphereClone™

Az Inertsil™ garantált alternatívája
A Kromasil™ garantált alternatívája
A Hypersil™ garantált alternatívája
A µBondapak™ garantált alternatívája
A Spherisorb™ garantált alternatívája

Kérje tesztoszlopát még ma!

További kérdéseivel forduljon helyi Phenomenex képviselőjéhez:

genlab

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**
...breaking with traditionSM

Komplex minták tisztítása hidrofil módosított Strata-XL polimer alapú szilárd fázisú extrakciós oszlopon: Alternária toxinok meghatározása paradicsom mintákból

Tölgyesi Ádám^{1,2}

¹Jelenleg: European Commission Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements, European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

²Nemzeti Élelmiszer-lánc Biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, Élelmiszer Toxikológiai Nemzeti Referencia Laboratórium, 1095 Budapest, Mester utca 81.
Email: tolgyesi83@gmail.com

Összefoglalás

A jó minta-előkészítés megválasztása épp úgy fontos, mint a megfelelő analitikai készüléké. Az előkészítés szerves részét képezi a minta tisztítása, melyhez gyakran alkalmaznak szilárd fázisú extrakciós módszert. Jelen kéziratban egy hidrofil módosított polimer alapú szilárd fázisú extrakciós oszlop (Strata™-XL) kerül bemutatásra Alternária toxinok meghatározásában paradicsom és paradicsomlé mintákból. A minták metanolos extrakcióját egy származékképzés követi 2,4-dinitrofenilhidrazinnal, ami a célkomponensek közül csak a tenuazonic savval képez származékot. Ugyanakkor adott mátrix vegyületek is reagálnak a származékképzőszerezrel, polaritásuk ezáltal csökken és együtt koncentrálódnak a célvegyületekkel az előkészítés során. Így a származékolt extraktum nagyfokú tisztítása nélkülözhetetlen a műszeres analízist megelőzően. A minta-előkészítést követően az öt toxin meghatározása folyadékkromatográfiás tandem tömegspektrometriás módszerrel történik izotóphígítás nélkül. A célvegyületekkel együtt eluálódó mátrix komponensek jelentős ionhatásokat okoznak az ionforrásban, viszont ezen mátrixhatások jól reprodukálhatóak, így a mátrixból felvett kalibráció megfelelő mennyiségi meghatározást tesz lehetővé. A módszer paradicsom mintákra történő, laboron belüli validálását követően az eljárást nemzetközi körvizsgálatban sikerrel alkalmaztuk természetes szennyezést tartalmazó és adagolt paradicsomlé mintákra. Az eljárás egy Európai Unió szabvány módszer kidolgozásának az alapját képezi.

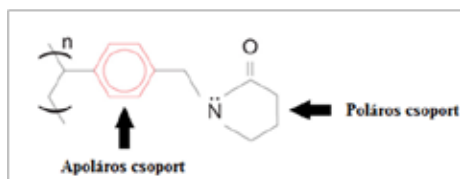
Bevezetés

Az élelmiszer minták célkomponensekre történő vizsgálata a mátrix összetettségénél fogva hatékony minta-előkészítést igényel. Az előkészítés része a

minta extrakciója (szilárd – folyadék vagy folyadék – folyadék) és az extraktum tisztítása (clean-up). A nagyérzékenységű készülékek lehetővé teszik az extraktum tisztítás nélküli analízisét is, ebben az esetben elegendő az extrahált mintát hígítani ("dilute-and-shoot" módszer), esetleg megszűrni. Ilyen meghatározás a folyadékkromatográfiával kapcsolt izotóphígításos tömegspektrometria (LC-ID-MS). Az LC-ID-MS feltétele, hogy álljon rendelkezésre a célkomponens stabil izotópjelzett analógja, ami belső standardként (ISTD) adagolható a mintához. Az ISTD szerepe a tömegspektrometriás (MS) detektálás során, hogy a mérendő komponenst ért ionhatásokat kompenzálja. A célvegyületekkel együtt eluálódó mátrixalkotó komponensek elnyomhatják vagy felerősíthetik a meghatározandó vegyület ionizációját az ionforrásban. Izotóphígítás esetén az ISTD-t befolyásoló mátrixhatás értéke és iránya megegyezik az analátot ért hatásával, így a jelek aránya az ionhatás mértékétől független lesz. Ezen jelzett ISTD-k viszont sokszor nem érhetőek el minden laboratórium számára, mert rendkívül drágák vagy egyszerűen forgalomban nem kaphatóak. Izotóphígítás hiányában a hagyományos minta tisztítási eljárások alkalmazása szükséges lehet még a nagyszelektivitású detektálások során is.

A minták tisztítására leggyakrabban folyadék – folyadék extrakciót (LLE) vagy szilárd fázisú extrakciót (SPE) alkalmaznak. A kettő közül az utóbbi az elterjedtebb. Az SPE a minta-előkészítés során alkalmazott kishatékonyságú folyadékkromatográfiás tisztítás, melynek célja kettős lehet: a minta tisztítása és a mérendő komponensek dúsítása. Az SPE oszlopok töltetei nagy tisztaságú szorbenseket (tölteteket) tartalmaznak, amiket jól reprodukálható módon állítanak elő. Az LC-MS alapú többkomponenses analízisek során elterjedt az olyan kopolimer SPE oszlopok használata, melyek töltetei az apoláros felület mellett poláros részeket

is tartalmaznak. Ezáltal a különböző tulajdonságú vegyületek (savas-bázikus, hidrofil-lipofil) egyidejű visszatartása megoldható egy SPE oszloppal, mérésük modern, gyors polaritás váltást (pár milliszekundum) lehetővé tevő LC-MS/MS rendszerekben könnyen megvalósítható egy injektálással. Ilyen SPE oszlop a Strata™-XL, melynek töltete apoláros divinil-benzol csoportok mellett poláros N-vinilpirolidon csoportokat is tartalmaz (1. ábra). Ezzel javul a polárosabb komponensek kötődése a fordított fázison. A polimer állófázis széles pH tartományban használható (0 – 14) és a veszteségek a töltet vákuummal történő többszöri szárítása esetén is elhanyagolhatóak.

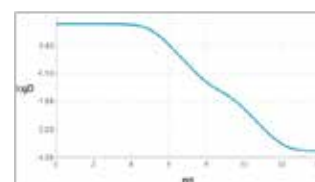
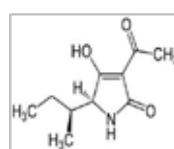


1. ábra: a Strata-XL SPE oszlop töltete

A származékképzés is része lehet a minta-előkészítésnek. Szükségessé válhat a célvegyület származékolása, ha annak érzékenysége natív formában nem elég a kitűzött kimutatási határ (LOD) eléréséhez, vagy ha a molekula egyéb LC-MS jellemzői (visszatartás, csúcsalak, fragmentáció) ezáltal javíthatóak. A származékképzés egy pluszlépés az előkészítésben, amiben a mátrixalkotó komponensek is származékot képezhetnek a származékképző szerrel. Ennek következtében polaritásuk jelentős mértékben csökken és együtt koncentrálnak a célkomponensekkel az SPE során. Ebben az esetben a megfelelő minta tisztítási eljárás megválasztása döntő lehet a műszeres analízis szempontjából, ugyanis a mátrix komponensek minősége/mennyisége és koncentrációja a célvegyületek azonosítását (szelektivitás) és mennyiségi értékelését (pontosság) nagymértékben befolyásolják. Az Alternária mikotoxinok a mezőgazdasági terményeken lévő Alternária gomba fajok, mint például az *A. alternata* másodlagos anyagcsere termékei. Ezen mikotoxin csoportba több mint 70 féle toxin tartozik, de szerkezetileg még csak néhány toxint azonosítottak napjainkig. Ezen toxinokra jelenleg még nincs érvényes Európai Unió (EU) határérték, de az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) már 2011-ben jelezte ennek szükségességét az általuk kiadott hatástanulmányban [1]. A legfontosabb Alternária toxinok, mint altenuene (ALT), alternariol (AOH), alternariol monometiléter (AME), tentoxin (TEN) vagy tenuazonic sav (TEA) mind gyenge savas karakterű vegyület (pK_a : 4.3 – 7.7), kivéve a TEN-t. A TEA a csoport többi tagjához képest kiugróan poláros komponens ($\log P$: 0,92), továbbá kelátképző, ami a kromatográfiás analízist tovább nehezíti (2. ábra). Ezért az irodalomban publikált Alternária LC-MS módszerek szerzői vagy kihagyták a TEA-t a többkomponenses meghatározásokból, vagy csak a TEA meghatározására fókuszáltak 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)

alapú kolonna előtti származékképzést alkalmazva [2]. A származékolás során keletkező TEA-hidrazon LC-MS tulajdonságai mind a visszatartás, mind az érzékenység tekintetében jobbak, mint a TEA natív formában történő meghatározása során tapasztalt jellemzők. Viszont a származékolás az MS detektálás kimutatási határát azáltal növeli, hogy sok mátrix vegyület szintén reagál a származékképzővel és koelúció során mind a mátrixhatás (ionelnyomás) mind a zajszint nő a detektorban.

Jelen kéziratban paradicsom és paradicsomlé minták Alternária toxin tartalmának meghatározására kidolgozott folyadékkromatográfiás tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) módszer kerül bemutatásra. Az eljárásban alkalmazott kolonna előtti származékképzés tovább növeli a minta összetettségét, ezért jól kidolgozott tisztítási eljárás szükséges, hogy a komponensek alacsony szinten történő meghatározását a mátrix minél kisebb mértékben befolyásolja. A közlemény célja, hogy bemutassa egy LC-MS/MS módszeren keresztül, miképp lehet komplex minták hatékony minta-előkészítését kivitelezni hidrofil módosított kopolimer Strata™-XL SPE állófázison.



2. ábra: A tenuazonic sav szerkezete és LogD – pH függvénye.

Az LC-MS/MS módszer

A módszer teljes körű leírását egy tavalyi publikáció tartalmazza [3].

Extrakció és származékképzés

A homogenizált mintát (1,00 g) műanyag 50 mL-es centrifugacsőbe mérjük, 5,0 mL metanolt adunk hozzá és kupakkal lezárjuk a csövet. Pár másodperces vortex keverést követően 40 percig rázatjuk a mintát, majd centrifugáljuk. A felülúszót egy új centrifugacsőbe öntjük és 100 μ L származékképzőszert (0,6% DNPH sósavas oldata) adunk hozzá. Pár másodperces vortex keverést követően 60 percig rázatjuk a mintát, majd stop reagenssel (5% undecanal metanolban) megállítjuk a reakciót. Centrifugálást követően a származékolt extraktumot 50 mM-os vizes ammónium formiát oldattal (pH 3, 0,05% hangyasavval) hígítjuk és SPE oszlopon tisztítjuk.

Szilárd fázisú extrakció

A származékolt és hígított mintát Strata™-XL (200 mg, 6 mL, 100 μ m) SPE oszlopon tisztítjuk. Az oszlop kondicionálását követően a mintát az oszlop-ra öntjük és hagyjuk, hogy nem túl nagy árammal (kb. 1 csepp/másodperc) átfolyjon rajta. Az oszlopot metanol – víz eleggyel (15/85, v/v), majd

n-hexánnal mossuk. A hexános mosásra azért van szükség, hogy a DNPH és a stop reagens reakció termékét, illetve a stop reagens feleslegét lemosuk az oszlopról. Az oszlop vákuummal történő szárítását követően metanollal eluáljuk a toxinokat és szárazra pároljuk az eluátumot. A bepárolt mintát metanolban visszaoldjuk és Phenex™ regenerált cellulóz (RC) alapú fecskendőszűrővel HPLC mintatartó üvegcsékbe szűrjük.

LC-MS/MS analízis

A módszerben szereplő 5 toxin elválasztása héjszerkezetű C-18-as töltetű HPLC kolonnán valósul meg gradiens elúcióval. A vizes mozgó fázis 10 mM ammónium formiát puffer (pH 3, 0,05% hangyasavval), míg a szerves modifikátor 100% metanol. A kolonna hőmérséklet 30 °C, az analízis idő 23 perc és az injektálási térfogat 5 µL. Az elválasztott mikotoxinok detektálása hármaskvadropol rendszerű MS/MS detektorban anyai- és leányion mód-
ban (multiple reaction monitoring, MRM) történik két ionátmenettel komponensenként. Az ionforrás negatív ionizációs módban működő elektrosprré. Stabil izotóp jelzett ISTD hiányában a mennyiségi értékelés mátrixból felvett kalibráción alapul.

Eredmények és tárgyalásuk

Módszerfejlesztés

Az LC-MS módszerek robusztussága vagy laborok közti reprodukálhatósága sokszor alacsonyabb, mint más kromatográfiás meghatározásoké, aminek egyik fő oka lehet az eltérő gyártmányú LC-MS/MS készülékek különböző konstrukciója. Az LC-MS készülékeknél ugyanis a meghatározandó komponensekkel egyidejűleg az ionforrásba jutó mátrixok döntően befolyásolják a módszer pontosságát [4]. Az LC-ID-MS a mátrixhatásokat jól tudja kompenzálni, de az *Alternaria* toxinok esetén az izotóphígítás nem kivitelezhető még minden toxinra, forgalomban még csak a tenuazonic savnak létezik stabil izotópjelzett analógja. Az eltérő készülékek más-más geometriájú/kialakítású ionforrással rendelkeznek, ami következtében a mátrixhatás iránya (elnyomás/erősítés) és mértéke is változik készülékről készülékre.

A jelen kéziratban szereplő *Alternaria* LC-MS/MS módszer három különböző gyártmányú készüléken lett kipróbálva. A módszer laboron belüli validálása paradicsom mintákra Thermo TSQ és MicroMass Ultima PT készülékeken lett végezve. Az abszolút visszanyerések 90% körülinek adódtak az 5 toxin esetén és a módszer precizitása 5,2% – 13,3% között volt. A módszert egy külső laboratóriumban tesztelve AB Sciex 4000-es detektorral a visszanyerések 76% és 98% között voltak, míg a reprodukálhatóság 13% alatt volt [3].

Általánosságban elmondható, hogy a mikotoxinok LC-MS módszerekkel jól mérhetőek, viszont a mátrixhatás nagymértékben befolyásolja a mennyiségi meghatározásukat. Ez igaz az *Alternaria* toxinok esetén is; az abszolút mátrixhatás értéke paradi-

csom mintában -67% és +44% között változott az 5 toxinra. Az abszolút mátrixhatás mellett lényeges a relatív mátrixhatás is, ami az abszolút mátrixhatás reprodukálhatóságát jelenti. Mátrixból felvett kalibrációnál fontos, hogy a mátrixhatás jól reprodukálható legyen, ugyanis ez esetben tudja a kalibráció megfelelően kompenzálni a teszt minta mérésénél adódó mátrixhatást. A relatív mátrixhatás azonos minták (pl.: különböző származású paradicsomok) mátrixhatásának ismételhetőségét jelenti. Ahhoz, hogy a mátrixhatást minimalizáljuk, illetve annak reprodukálhatóságát növeljük (alacsony RSD%) mindenképp olyan minta-előkészítés szükséges, ami garantálja egyrészt a minta tisztítását, másfelől az analátok minimális veszteségét.

Szilárd fázisú extrakció Strata™-XL oszloppal

A Strata™-XL SPE oszlop töltete egy olyan kopolimer, melyben a sztirol-divinil-benzol csoportok között N-vinilpirolidon csoportok vannak. Ezáltal egy olyan jól nedvesíthető töltet jön létre, amely a polárosabb molekulákat az N-vinilpirolidon csoportokon dipol – dipol kölcsönhatás és/vagy hidrogénhid révén adszorbeálja, míg az apoláros vegyületek n-n kötéssel vagy hidrofób kölcsönhatással kötődnek a sztirol-divinil-benzol fázison. Így csökkenthető a mérendő vegyületek vesztesége a tisztítás során, illetve a mátrixalkotók minősége és mennyisége közel azonos lesz mintáról mintára. Ezzel az azonos mintákban levő mátrixhatások reprodukálása nő. A Strata™-XL előnye a töltet 100 µm-es szemcsemérete, ami gyorsabb átfolyást eredményez, míg az analátok visszatartása így is garantált a hidrofíl módosított állófázis következtében. Ráadásul a nagy szemcsemérettel megelőzhető az oszlop töltetének eldugulása.

Előfordulhat, hogy az SPE nagyfokú visszatartása okoz pont problémát, ugyanis minden olyan mátrixot is megköt, ami majd a mátrixhatást növeli. Ilyenkor a kevertmódú SPE oszlopok adhatnak jó megoldást, mint pl.: Strata™-XL-C vagy Strata™-XL-A. Ezek az SPE oszlopok a polimer alapú fordított fázis mellett erős ioncserélő csoportokat is tartalmaznak, így biztosítva adekvát kötőhelyet az ionos molekulának a közeg pH-jától függően. A neutrális vegyületek a kevertmódú SPE fordított fázisú felületén kötődnek a pH-tól függetlenül. A pH változtatásával így egy szelektív extrakció valósítható meg ionos és nem ionos vegyületek elválasztására.

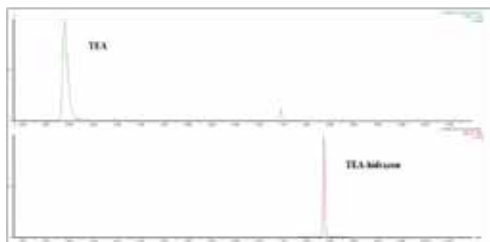
Az *Alternaria* toxinok gyenge savas vegyületek, kivéve a TEN, ezért kevertmódú anioncserélővel (Strata™-XL-A) nem lehet az összes toxint szelektíven elválasztani a semleges/bázikus mátrixoktól. Kevertmódú kationcserélő SPE (Strata™-XL-C) alkalmazásával ugyanakkor savas pH-n az *Alternaria* toxinok a fordított fázison kötődnek, míg a bázikus mátrixok a kationcserélőn koncentrálnak. Ez a szelektív tisztítás viszont *Alternaria* toxinok esetén nem vezet a mátrixhatás csökkenéséhez, ami azt mutatja, hogy nem a bázikus jellegű mátrix komponensek okozzák az *Alternaria* toxinok esetén tapasztalható erős mátrixhatást [3].

A módszer alkalmazása

A módszerek alkalmazhatóságát nem az adagolt minták mérésén alapuló validálás mutatja, hanem a természetes szennyezést tartalmazó minták mérése. Ilyen lehet a referencia- vagy kontrollminták analízise. Adagolt mintáknál ugyanis a mérendő komponensek a minta felületén koncentrálnak, míg például természetes szennyezést tartalmazó anyagoknál és kezelt állatoktól származó mintáknál a maradékanyagok a sejtek közti pórusokban találhatóak. Körvizsgálatok során általában természetes szennyezettséget tartalmazó minták mérése valósul meg. A fent leírt *Alternaria* LC-MS/MS módszert nemzetközi körvizsgálatban alkalmaztuk paradicsomlé mintákra. A körvizsgálatban három természetes szennyezést tartalmazó minta *Alternaria* toxin tartalmát kellett meghatározni. Két mintát még pluszban adagoltak is, hogy mind az 5 *Alternaria* toxin jelen legyen bennük. Összesen 13 érték megadása volt szükséges. A három mintában mért koncentrációk 1,56 és 53,0 µg/kg között változtak a toxinokra. A leírt módszert használva mind a 13 megadott érték az elfogadhatósági tartományon belül volt, a z-értékek -0,1 és 0,8 között adódtak. A körvizsgálat sikeres, ha a z-értékek -2 és 2 között vannak, így a módszer alkalmazása paradicsomlé mintákra sikeresnek értékelhető. Egy mátrix nélküli standard oldat mérése is része volt a körvizsgálatnak. Az oldatra számolt komponensenkénti z-értékek -1,3 és 0,1 között adódtak.

A módszer egyszerűsítésének lehetőségei

A módszer egyik továbbfejlesztése a származékképzés elkerülése lehet. Ehhez a HPLC elválasztást kell optimalizálni úgy, hogy a TEA csúcsának kromatográfiás paraméterei elfogadhatóak legyenek. Savas pH-n a TEA csúcs szimmetriája nem elfogadható és a jel reprodukálhatatlan. A pH növelésével a szimmetria javul, de a mozgófázis lúgosításának határt szab a kolonnák pH stabilitása. Bázikus pH-jú eluenssel a fordított állófázisú kolonna visszatar-tása csökken a TEA ionos és polárosabb szerkezete következtében ($\log D = -1.5$, pH 8.7), ezért magas víztartalmú mozgófázis szükséges a megfelelő retenció biztosításához (3. ábra). Mindezeket figyelembe véve pH 9 közelire (nem meghaladva) kell állítani az eluens pH-ját ahhoz, hogy a TEA csúcs szimmetriafaktora az elhúzódo csúcsalak (tailing) ellenére is elfogadható legyen és a TEA visszatar-tási tényezője 2-nél nagyobb legyen.



3. ábra: A tenuazonic sav multiple reaction monitoring (MRM) ionátmenete paradicsomlé mintában (100 µg/kg) natív formában (TEA) lúgos pH-n és származékolás formában (TEA-hidrazon) savas pH-n.

Poláros komponensek elválasztásánál a teszt minta injektált oldatának oldószererőssége a kezdeti eluens összetétel oldószererősségével megegyező-nek vagy annál gyengébbnek kell lennie. Ez viszont a minta visszaoldásánál okoz annyiban problémát, hogy a minta bepárlását követően a metanolos visszaoldás csak a származékolást tartalmazó eljárásban alkalmazható. Ugyanis csak alacsony (10%) szerves oldószer tartalmú oldatból lehet injektálni, ahhoz hogy a TEA csúcsalakja ne torzuljon. Származékolás nélkül a TEA natív poláros formában kerül elválasztásra, így magas víztartalmú oldószerben kell visszaoldani a mintát, hogy a TEA szimmetriája megfelelő legyen. Gyenge oldószer elegy viszont az apolárosabb toxinokat, mint AOH és AME nem oldja és ez veszteséget jelent az előkészítés során. Az SPE tisztítás után, ezért az eluátum szárazra párlását kerülni kell.

Következtetések

A hidrofíli módosított kopolimer töltetű Strata™-XL SPE oszlop jól alkalmazható *Alternaria* toxinok meghatározásában is. A származékképzés következtében még komplexebbé váló paradicsom és paradicsomlé minták tisztítása egy egyszerű SPE lépéssel kivitelezhető az LC-MS/MS analízist megelőzően. A módszer reprodukálhatósága, három különböző készüléken tesztelve, elfogadható értékeket mutat. A módszer továbbfejlesztése és laborok közti validálása folyamatban van.

Hivatkozások

- [1] European Food Safety Authority (EFSA). 2011. *Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of Alternaria toxins in food and feed*. EFSA J. 9(10):1–97.
- [2] Asam S, Liu Y, Konitzer K, Rychlik M. 2011. *Development of a stable isotope dilution assay for tenuazonic acid*. J Agr Food Chem. 59:2980–2987.
- [3] Tölgyesi Á, Stroka J, Tamosiunas V, Zwickel T. 2015. *Simultaneous analysis of Alternaria toxins and citrinin in tomato: an optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Food Add Contam. 32:1512–1522.
- [4] Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. 2009. *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects*. J Chromatogr B. 877(23): 2198–2207.



Reflektorfényben az ügyfélgondozás

Marketing szemléletű laborpiaci gazdasági háttér áttekintés forgalmazói oldalról

Tolnay Anita

Lab-Ex Kft.

A globalizáció hatásának köszönhetően a nemzetközi laboratóriumi műszerek technológiai fejlődése, korszerűsödése soha nem látott mértékben történő robbanásszerű innovatív változásokon ment keresztül az elmúlt pár évtizedben. Az innovációs technológia magas szintű követelményeinek való megfelelése érdekében a gyártó cégek sok esetben együttműködésre kényszerülnek erőforrásaik hatékony allokálása és eredményesebb kiaknázása céljából. A cégek beruházási döntéseiknél mindinkább a tudás alapú javakat részesítik előnyben.

A kémiai laboratóriumi iparágat - a kutatás-fejlesztés elsődleges fontossága miatt - igen erős és dinamikus technológiai innováció jellemzi, magas fejlettségi szinttel. Az innováció hosszú távú következményei nem mindig láthatóak előre, azonban a technológiai újítások ösztönzőleg hatnak a gazdaság növekedésére és az iparágak által támasztott fejlődés ütemére. Mivel zömmel kutatómunkák tevékenységét szolgálják ki a forgalmazott termékek, környezetükre az igen magas turbulencia, az előre nem látható változások sorozata, és az ezáltal egyre rövidülő termék-életciklus jellemző. A gépek és berendezések egyre rövidebb elavulási ideje, valamint az új kereslet generálása, hatékonyabb és eredményesebb működési megoldásokkal ösztönzi az eszközpark cseréjét, bővítését, melynek sok esetben költségvetési korlátok szabnak határt. Az utóbbi évtizedben a költségvetési intézmények laboratóriumi egyre szűkebb szabadon felhasználható anyagi forrással rendelkeznek, miközben néhány külföldi tulajdonban lévő magánlaboratórium korábban nem tapasztalt mértékű árbevétel növekedést könyvelhet el. Ennek fényében a külföldi laboratóriumi berendezéseket gyártó cégeknek, illetve ezen vállalatok berendezéseit, készülékeit forgalmazó hazai képviselői joggal rendelkező disztribútorainak, célszerű a különböző iparágakban működő laboratóriumi szegmenst jól elkülöníthető célcsoportokra bontani és differenciált marketingstratégiával megcélozni.

Az utóbbi években végbement radikális gazdasági változások, a globalizáció térnyerése, a fejlődő BRIC országok megerősödése, a XX. századot jellemző egypólusú világ felbomlásához, az USA hatalmának meggyengüléséhez vezetett. A nemzet-

közi laboratóriumi piacot a 2000-es évek elejéig az amerikai és európai gyártók kiváló minőségű termékei képviselték. Az ezredfordulót követően a feltörekvő országok (elsősorban Kína, Tajvan, Korea és India) egyre intenzívebb jelenléte figyelhető meg az európai piacon. Laboratóriumi termékeik kitűnő ár-érték arányt képviselnek. Az utóbbi években a nemzetközi szakmai kiállításokon a távolkeleti gyártók száma feltűnően megtöbbszöröződött, egyre nagyobb teret nyerve a piacvezető amerikai és európai gyártókkal szemben, melyek a mai napig magas áron kínálnak hasonló minőségű laborműszereket. Mindinkább az a tendencia figyelhető meg a nemzetközi laborpiacokon, hogy a távolkeleti cégek egyre nagyobb szeletet hasítanak ki a piaci részből. Kína csatlakozása az ezredfordulón a WTO-hoz, illetve a szabadalmi rendszer hiánya, mind elősegítette a fenti trendek kialakulását. Az egyre jobb minőségű és kiváló árkategóriájú kínai termékek európai piaci térhódításával, a hazai forgalmazó cégek eleinte számos nehézséggel néztek szembe a hiányos dokumentációs gyártói háttér, továbbá a minőségbiztosítási szabványoknak való megfelelés terén, mely követelményrendszer napjainkra egyre inkább adaptálódik az európai szabványelőírásokhoz.

Az egyre erősödő laborpiaci verseny kiéleződése - a fejlett és fejlődő országok termékei között - stratégiai gondolkodásmód váltásra kényszerítette a hazai forgalmazókat, mely a felhasználói igényekhez és szükségletekhez idomuló magas szintű kapcsolati marketing erősödésében és kiemelt vevőgondozásban nyilvánul meg. A piaci pozíció megőrzése érdekében a változásokhoz való alkalmazkodás, az ügyfelek szükségletei alapján történő szegmentálás és az ügyfél-elégedettség a cégek tevékenységének mindenkor mozgatórugójává vált. Mindezen megközelítések magukban hordozzák az egyes szervezetek vásárlói magatartásának döntési kritériumait és beszerzési központjának (Buying Center) minél alaposabb ismeretét. A sikeres piaci szegmentálás a makroszegmentáláson (iparági hovatartozás, adott intézményen belüli laboratóriumok száma, mérete, tevékenységének komplexitása, a beszerzés jellege) túl, figyelembe veszi a mikro tényezőket is (úgy mint a Beszerzési Központ összetettségét, struktúráját), valamint a döntéshozó személyek jellemzőit (attitűd, motiváció, szakértelem, szervezetben betöltött pozíció).

A laboratóriumi piac meghatározó forgalmazói a laborműszerek és -eszközök értékesítésén és promotálásán kívül tevékenységi körükbe ágyazottan kiemelt jelentőséget tulajdonítanak az ügyfélkörnek nyújtott, hozzáadott értéként megjelenő szolgáltatásoknak. Mindennapi munkájukban központi szerepet töltenek be a tudományos szakmai tanácsadások, az applikációs konzultációk, a szemináriumok megszervezése, a laboratóriumi műszerek folyamatos karbantartása, a berendezések szakszerű beüzemelése és eseti szervizelése,



továbbá igény szerint az ügyfelek betanítása a készülékek használatára. Céljuk a hosszú távú bizalmi alapokra épülő partnerkapcsolatok kiépítése meglévő és potenciális ügyfelekkel és felhasználóikkal. Ennek érdekében megfelelő szakmai végzettséggel és kiváló értékesítési vénával rendelkező, ún. „keresztfunkcionális” képességekkel bíró értékesítési csapatot ajánlatos felépíteni, mely pozitív hatással van az értéknövelő kapcsolatmenedzsment kiépítésére. Az értékesítés egész folyamata és a lebonyolítást követő vevőgondozás során az ügyfélorientált disztribútorok kiemelt figyelmet fordítanak a vevőérték és -elégedettség növelésére. Ezen folyamathoz tartozik a potenciális ügyfelek első ízben történő megcélzása, a minél pozitívabb imázs kialakítása, a termékportfólió szakértelemmel történő bemutatása, szakszerű árajánlatadás, a szerződésfeltételek kialakítása, valamint a teljesítés lebonyolítása és az ezt követő vevő támogatás és kapcsolattartás. Ezen disztribútorok árajánlataikat testre szabottan, ügyfelek szükségleteit figyelembe véve és igényeik maximális kielégítésére törekedve állítják össze. Az árképzés során a piacvezérelt árképzési módszert követik, melynél a vevő által meghatározott észlelt értéket és a versenytársak

által alkalmazott árakat helyezik a középpontba.

Az ügyfelek és disztribútoraik között létrejövő hosszú távú, bizalmi alapokon nyugvó, kölcsönösen gyümölcsöző kapcsolat kiépítésében hangsúlyos szerepe van a felhasználói igények teljes körű megismerésének, melynek egyik elengedhetetlen feltétele az ügyfelek interaktív együttműködése. Ennek érdekében kérjük Önt, hogy az alábbi kérdőív kitöltésével küldje el nekünk észrevételét, véleményét, hogy Ön mit tart a laboratóriumi eszköz beszerzés legfontosabb kritériumainak. Milyen gyártói, forgalmazói támogatással hozzák meg végső döntéseiket, és melyek az Ön cége számára a kevésbé releváns tényezők.

Az ügyfél-elégedettségi kérdőív elérhető a **www.labex.hu/kerdoiv** oldalon.

Együttműködésüket előre is köszönjük!

labex



Hidrazin tartalom meghatározása allopurinolban

Kormány Róbert¹, Radócz Orsolya², Fekete Jenő³

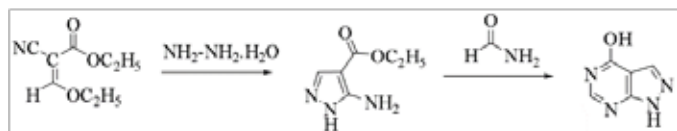
¹ Egis Gyógyszergyár Zrt., 1106, Budapest, Keresztúri út 30-38.

² BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék 1111. Budapest, Budafoki út 8.

³ BME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

1. Bevezetés

Az allopurinol előállítása során felhasznált hidrazin genotoxikus szennyezőnek minősül, ezért a hatóanyag minőségellenőrzési vizsgálatánál kiemelt figyelemmel kell követni a hidrazin tartalmat. Az allopurinol egyik lehetséges előállítását láthatjuk az 1. ábrán.



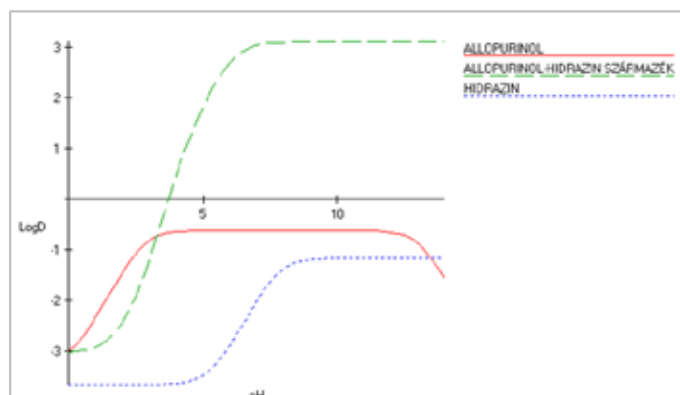
1. ábra: Allopurinol szintézis

Az európai gyógyszerértékelés és felügyelet központja (EMA) és a gyógyszerminőségre vonatkozó irányelvek (ICH) szerint a genotoxikusnak tekinthető szennyezők napi maximálisan szervezetbe vihető mennyisége 12 hónapnál hosszabb távon alkalmazott gyógyszerkészítmény esetén 1,5 µg. Ez az allopurinol esetében maximum 2,5 ppm-et jelent [1].

Szerkezetéből adódóan a hidrazin nem tartalmaz kromofor csoportot, így a folyadékkromatográfiás gyakorlatban használt UV-VIS vagy a nagy érzékenységet biztosító fluoreszcens detektor nem alkalmazható. Szakirodalomban leírnak titrálósos [2], elektrokémiai [3] spektrofotometriás [4-6] hidrazin meghatározási módszereket, de található származékképzéssel összekötött folyadékkromatográfiás meghatározás is biológiai közegből [7].

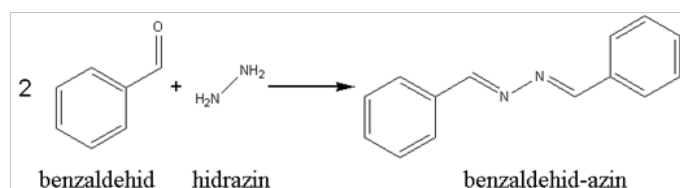
A második bekezdésben leírt, a hatóságok által megengedett koncentráció kis értékű, ennek megfelelően a módszer kimutatási határának, ennek az értéknek ötödének-tizedének kell lenni. A spektrofotometriás és folyadékkromatográfiás szakirodalmat áttekintve ez csak kolonna előtti származékképzéssel lehetséges. Seifart és munkatársai által közölt publikációban kis hidrazin koncentrációkat határoztak meg. Ez a koncentrációszint az előírásoknak megfelel ugyan, de esetünkben a nagy mennyiségű mátrix még egy problémát okoz. Annak ellenére, hogy az allopurinol és a hidrazin szár-

mazék között nagy a polaritás különbség, amelyet a logD különbség jelez (2. ábra), a kis kimutatási határ eléréséhez nagy koncentrációjú mintát kellene adagolni a kromatográfiás kolonnára. Ez tömeg túlterhelést és akár új kölcsönhatási lehetőséget adna, s ezzel a kolonna elválasztóképességét tönkretennénk.



2. ábra: Az allopurinol, a benzaldehid-azin és a hidrazin LogD-pH függvényei

A hidrazin származék képzést, amelyet a hidrazin származékképzésnél meghatároztunk a 3. ábrán adtuk meg.



3. ábra: Származékképzési reakció

Ahhoz, hogy a nagy mennyiségű allopurinolt eltávolítsuk a hidrazin származék (benzaldehyd-azin) mellől, szilárdfázisú extrakciót kellett alkalmaznunk. Cikkünkben leírjuk, a származékképzést a szilárd fázisú extrakciók, és a folyadékkromatográfiás meghatározás körülményeit.

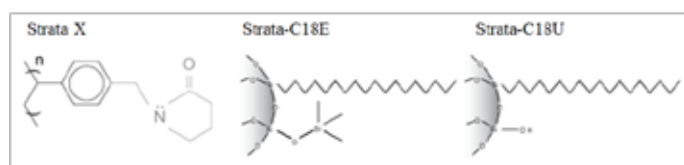
2. Származékképzés

Vizsgálataink első és meghatározó lépése volt a származékképzési reakció kivitelezése. Kiindulási pontnak vettük az allopurinol Európai Gyógyszerkönyvi módszerét [8]. A származékképzési reakció 0,2 M NaOH vízben / MeOH = 1 / 1 (v/v%) elegyben (későbbiekben oldószer) történt. A képződő terméket a 3. ábrán adtuk meg. A keletkező termék apoláris jellege jelentősen nőtt (2. ábra). A reakcióhoz szükséges hidrazin mennyiséget hidrazin-szulfát hozzáadásával biztosítottuk. A származékképző oldatot úgy készítettük el, hogy 1 mL benzaldehidet oldottunk 25 mL oldószerben. Ebből az oldatból 2 mL-t adtunk hozzá 5 mL, 2,5 ppm mennyiségű hidrazint tartalmazó oldathoz. A származékképzési reakció 20 perc alatt végbemegy szobahőmérsékleten. A keletkezett benzaldehid-

azin szerkezetét folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométerrel (LC-MS) igazoltuk.

3. Szilárd fázisú extrakció (SPE)

A szilárd fázisú extrakcióhoz a következő töménységű mintát használtuk. Az oldószer (0,2 M NaOH vízben / MeOH = 1 / 1) 5 mL-ében 50 mg allopurinolt (10 mg/mL) oldottunk. Három típusú SPE töltetet (30 mg/mL) próbáltunk ki: Strata™ X, Strata™ C18-E és Strata™ C18-U. A Strata™ X polimer alapú nagy felületi kapacitású fordított fázisú SPE töltet. A Strata™ C18-E és Strata™ C18-U szilikagél alapú C18-as felületi módosítással rendelkező szintén fordított fázisú SPE töltet. Az a különbség a kettő között, hogy a C18-E nagyobb felületi borítottságú, utószilanizált töltet, míg a C18-U kisebb felületi borítottságú és nem utószilanizált. A Strata SPE töltetek felületi módosításait a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A módszerfejlesztés során használt Strata SPE töltetek felületi módosításai

Mindhárom esetben ugyanazok voltak a mintaelőkészítés lépései [9]:

1. Kondicionálás 1 mL oldószerrel (0,2 M NaOH vízben / MeOH = 1 / 1)
2. 1 mL minta felvitel
3. Mosás 1 mL oldószerrel (0,2 M NaOH vízben / MeOH = 1 / 1)
4. Elúció 1 mL metanollal.

A mintaelőkészítés során egyszerű, fecskendőhöz könnyen csatlakoztató Luer csatlakozós adaptert használtunk a vákuum manifold helyett. Ez a megoldás gyorsabbnak tűnt és el tudtuk kerülni a mintaoldatok egyenetlen lefolyását és így a szilikagél alapú töltetek kiszáradását. A mintaelőkészítési lépések folyadékárama 1-2 csepp/perc volt.

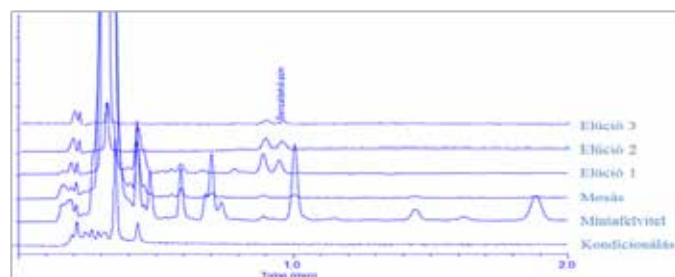
A 5-7. ábrákon lehet látni a különböző SPE tölteteken a mintaelőkészítés lépéseihez tartozó kromatogramokat. A kromatográfiás körülményeket a 4. fejezetben adtuk meg. Az egyes SPE töltetek alkalmazhatóságát külön-külön értékeltük.

1. A Strata™ X töltethez tartozó kromatogramokon (5. ábra) látszik, hogy az SPE első három lépésében 0,95 percnél nincs csúcs, vagyis a mintafelvitel alatt és a mosási fázis során nincs „áttörés”. Ez azt jelenti, hogy a vizsgálandó komponensem a tölteten maradt, de az allopurinol jelentős mennyiségétől meg tudtunk szabadulni. A problémát az elúció jelenti. Látható, hogy a negyedik lépés során 1 mL

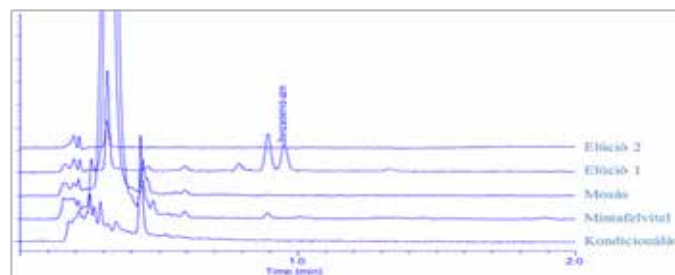
metanol hatására nem eluálódik a benzaldehid-azin teljes mennyisége, további 1 + 1 mL metanol hozzáadása során is megjelenik a kromatogramban a komponens.

2. A Strata™ C18-E és Strata™ C18-U töltetekhez tartozó kromatogramokon (6. és 7. ábrák) szintén látszik, hogy az SPE első három lépésében 0,95 percnél nincs csúcs, vagyis a mintafelvitel alatt és a mosási fázis során itt sincs „áttörés”, de az allopurinol jelentős mennyiségétől itt is meg tudtunk szabadulni. A negyedik lépés során 1 mL metanol hatására a benzaldehid-azin teljes mennyisége eluálódik, további 1 mL metanol hozzáadása során nem jelenik meg a kromatogramban a komponens. Az így kapott csúcs területe megegyezik az SPE nélkül előkészített minta csúcsterületével, a visszanyerés közel 100%.

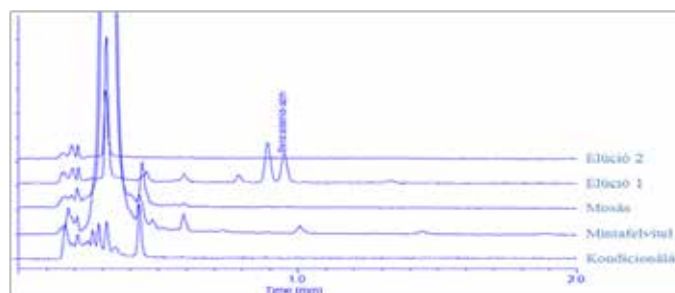
Megállapítottuk, hogy ebben az esetben a Strata™ X töltet nagy visszatartása miatt nem alkalmazható a hatékony mintaelőkészítésre, míg Strata™ C18-E és Strata™ C18-U esetében nem találtunk jelentős különbséget, mindkét töltet jól alkalmazható a hidrazin származék tisztítására, vagyis az allopurinol jelentős mennyiségétől meg tudtunk szabadulni.



5. ábra: Szilárd fázisú extrakció Strata™-X tölteten



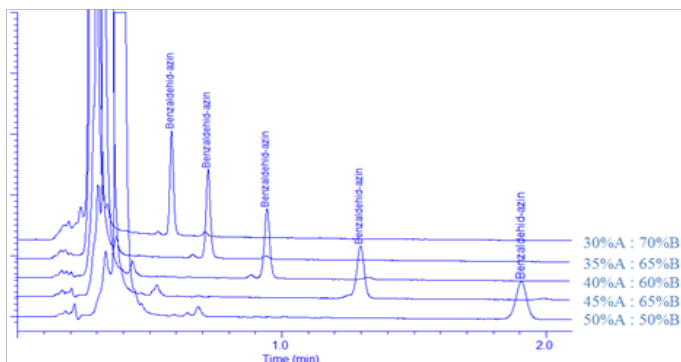
6. ábra: Szilárd fázisú extrakció Strata™ C18-E tölteten



7. ábra: Szilárd fázisú extrakció Strata™ C18-U tölteten

4. Folyadékkromatográfiás körülmények

A hidrazin-származék (benzaldehyd-azin) meghatározására ultra-nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) módszert fejlesztettünk. Az alkalmazott kolonna kis mérete és a nagy kinetikai hatékonysága, gyors és érzékeny módszer alkalmazását tette lehetővé. Külön kiemelnénk a kis szemcseátmérőt és a héjszerű töltet megnövekedett hatékonyságát [10]. A kolonna kiválasztása után (Kinetex C18, 1,7 μ m) a hangsúlyt a mozgófázis összetételének optimalizálására helyeztük. A mozgófázis „A” komponense víz, míg a „B” komponense acetonitril (AcN) volt. A megfelelő mozgófázis összetételt, ahol megvan a megfelelő visszatarthatás, de kellően rövid az elemzés ideje 40%A:60%B eluens aránynál értük el (8. ábra). A benzaldehyd-azin csúcs retenciós ideje (t_R) 0,95 perc. A folyadék-kromatográfiás paramétereket az 1. táblázat tartalmazza.



8. ábra: Különböző mozgófázis összetételhez tartozó kromatogramok.

1. táblázat: Folyadékkromatográfiás paraméterek

Készülék típusa:	Acquity UPLC
Állófázis (kolonna):	50x2,1 mm Kinetex C18, 1,7 μ m
Mozgófázis:	víz / acetonitril = 40 / 60 (v/v%)
Áramlási sebesség	0,5 mL/perc
Kolonnatér hőmérséklet	30 °C
Mintatér hőmérséklet	20 °C
Injektált térfogat	1 μ L
Detektálás	300 nm

Az optimalizált módszerhez tartozó benzaldehyd-azin csúcsot három paraméterrel, az elméleti tányerszámmal (N) a retenciós tényezővel (k) és a szimmetria faktoral (AS) jellemeztük. Az N értéke

~10500, a k = 3,8, az AS pedig ~1,07-nek adódott. Mindhárom paraméter teljesíti az általános kromatográfiás feltételeket, vagyis legyen meg a megfelelő hatékonyság ($N < 5000$) és a visszatarthatás ($1 < k < 10$), illetve legyen értékelhető a csúcsalak ($0,8 < AS < 1,5$).

5. A kidolgozott módszer analitikai teljesítmény jellemzői és értékelésük

Az allopurinol hidrazin tartalom meghatározási módszert (mintaelőkészítés és folyadékkromatográfiás mérés) ICH Q2(R1) irányelvek szerint validáltuk [11].

A módszer specifikus, szelektív és robusztus a külső körülmények kismértékű változására. A folyadékkromatográfiás meghatározás megfelel a rendszeralkalmassági követelményeknek. $N \sim 10500$ ($N < 5000$), $k = 3,8$ ($1 < k < 10$), $AS \sim 1,07$ ($0,8 < AS < 1,5$).

A kimutatási határ (LoD) 0,1 ppm, míg a mennyiségi meghatározás alsó határa (LoQ) 0,3 ppm. A mérés 0,3 ppm – 20 ppm értékek között lineáris ($R^2 = 0,999$).

A rendszer és a módszer megfelelően precíz. Megfeleltünk a torzítatlanság és állékonyság kritériumainak is. A minta oldat 48 órán át stabil a mintatartó hőmérsékletén (20 °C).

Összefoglalásként megállapítottuk, hogy a származékképzéssel egybekötött szilárd fázisú extrakciós módszerrel, s a kidolgozott ultra-nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer kidolgozásával eleget tettünk a gyógyszerkönyvi előírásoknak. A hidrazint származékán keresztül a megadott koncentrációban megbízhatóan tudtuk meghatározni.

Hivatkozások

- [1] ICH Guidance for Industry M7, 2015
- [2] J.S. Budkuley, *Microchimica Acta*, 1992, 108, 103–105.
- [3] K.M. Korfhage, K. Ravichandran, R.P. Baldwin, *Analytical Chemistry*, 1984, 56, 1514–2151.
- [4] A.M. El-Brashy, L.A. El-Hussein, *Analytical Letters*, 1997, 30, 609–622.A.
- [5] A. Afkhami, A.R. Zarei, *Talanta*, 2004, 62, 559–565.
- [6] M. George, K.S. Nagaraja, N. Balasubramanian, *Analytical Letters*, 2007, 40, 2597–2605.
- [7] H.I. Seifart, W.L. Gent, D.P. Parkin, P.P. Jaarsveld, P.R. Dolan, *Journal of Chromatography B*, 1995, 674, 269–275.
- [8] *European Pharmacopeia 8.0, Amlodipine*, 2014, 04/2012:1491, 1547.
- [9] J.R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, John Wiley and Sons Ltd., 2009, 49–84.
- [10] Fekete J., Kormány R., Fekete Sz., *A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai*, Merck Kft., 2014, 47–57.
- [11] ICH Guidance for Industry Q2(R1), 2005

CombiFlash EZ Prep: Hibrid preparatív kromatográf rendszer, mely alkalmas mind FLASH (azaz alacsony nyomástartományban) mind PREPARATÍV HPLC (240 bar) készülékként is üzemelni ugyanazon szoftver segítségével.

COMBI *Flash* EZ PREP

KÉSZÜLÉKEK ÉS KIEGÉSZÍTŐK

Újabb kiegészítőkkel bővült a gyártóként széles körben ismert Teledyne Isco termékpalettája.

Köztudott, hogy a cég által forgalmazott kromatográfias készülékek négy különböző oldószert képesek binárisan kezelni. A berendezésekre jellemző mozgó fázist figyelő rendszerek szintén megtalálhatók a CombiFlash EZ Prep berendezésnél, legyen szó bemenő vagy hulladék oldószerről. Az eluens esetén a rendszer az eljáráshoz szükséges oldószert mennyiségét kiszámolja, továbbá fontos kiemelni, hogy a készülék folyamatosan monitorozza a hulladéktartályban lévő oldószert szintjét, ezáltal meggátolva a tartály túltöltődését.

A legutóbbi fejlesztéseknek köszönhetően immár olyan pumpákkal büszkélkedhetnek a készülékek, melyek a HPLC rendszereknél használatosak. Flash üzemmódban 200 psi (kb. 13,5 bar), míg preparatív módban 3500 psi (241 bar) maximális nyomás előállítására képes a pumparendszer. A fenti nyomásértékeknek köszönhetően 5-200 ml/perc áramlási sebesség mellett akár 250x50 mm-es 5 µm-es preparatív oszlopokat is használhatunk.

A gyártó cég célkitűzése a minőség fenntartása mellett a folyamatos megújulás, korszerűsítés, elősegítve a hatékony laboratóriumi kutatást, munkavégzést.

PeakTrak: Egy készüléken belül, egy szoftverrel valósul meg a flash és a preparatív HPLC rendszer. A szoftver hátterszíne alapján megállapítható, hogy éppen milyen módban történik az elválasztás (zöld a preparatív, a kék szín a flash oldalt jelenti).



CombiFlash EZ Prep készülékekhez elérhető további kiegészítők:

Automata injektorszelep, oszlopváltó szeleprendszer, automata mintaadagoló.



Automata
injektorszelep



Oszlopváltó
szeleprendszer



Automata
mintaadagoló



Kapcsolattartó: Bende Zsolt

Telefon: +36-30/311-8358

E-mail: bende.zsolt@labex.hu

