

2018. november
www.gen-lab.hu

KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat





MINTATARTOUVEG.HU

mintatartouveg.hu

Tartalomjegyzék

4. A mintatartó hatása fehérjék kromatográfiás méréseinek ismételhetségére

Fekete Szabolcs

8. Gázkromatográfiás linerek

Göröcs Noémi

10. pH-kontroll

a folyadékkromatográfiában

I. – alapelvek

Kormány Róbert

16. pH-kontroll

a folyadékkromatográfiában

II. – ammónium-acetát

Kormány Róbert

19. Az SPE módszerfejlesztés alapjai

Szabó Géza

23. Hová tűnt ... ?

Avagy keressük meg az oldószert, amit nem találunk

Szász-Vadász Tas

24. Mennyire biztonságos vizet injektálni egy GC "készülékbe"?

Bálint Balázs

26. A Shimadzu LC- és GC-MS készülékek bemutatása

Kővágó Márton, Juhász Tamás,

Vincze Lajos

Kromatográfus

V. évfolyam 1. szám

Nyomdai előkészítés:

Mogyorósi Eszter

mogyorosi.eszter@gen-lab.hu

Nyomdai munka:

Real Press Nyomda

Szerkesztette:

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

A mintatartó hatása fehérjék kromatográfiás méréseinek ismételhetőségére

Fekete Szabolcs
Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok
Tanszék, 1211 Genève, Rue Michel Servet 1.

Jól ismert, hogy a fehérjék mennyiségi meghatározása kromatográfiás módszerekkel sokkal nagyobb bizonytalansággal terhelt, mint a kismolekulák meghatározása [1-3]. Gyakran előfordul, hogy az egymást követő injektálásokról származó csúcsterületek jelentősen eltérnek. Sok esetben csökkenő, de előfordul, hogy növekvő tendenciát mutat a csúcsterület időbeni változása. Ennek számos oka lehet, a leggyakrabban a következők fordulnak elő:

- A fehérje adszorpciója a HPLC készülék érintkező felületein (pl. injektor, összekötő vezetékek, detektor cella).
- A fehérje megkötődése az oszlopon (az állófázison vagy a bemeneti fritten esetleg az oszlop ház belső falán).
- Injektálási nehézség a fehérje oldatok nagy viszkozitása miatt.
- Talán a leggyakoribb, a mintatartó edény (vial) falán lejátszódó fehérje megkötődés (kitapadás). Néhány szerző a mintásüvegben lejátszódó ülepedést is megemlíti, de véleményünk szerint ez nem jelentős a mindennapi mérések időtartamában.

Ma már gyakran használunk, ún. bio-inert készülékeket, melyek segítségével csökkenthetjük a fehérje kiragadás veszélyét. Ezek a készülékek nem tartalmaznak acél és poliéter-éterketon (PEEK) felületeket a folyadékáram mentén, helyette inkább titán vagy PEEK-sil (olvasztott szilícium-oxid) bevonatú felülettel vannak ellátva [4-6]. Gyakran a „vasmentes” (iron-free), „acélmentes” (steel-free) vagy „fémentes” (metal-free) jelzőkkel illetik a gyártók az ilyen HPLC rendszereket. Fordított fázisú (RP) körülmények között a fehérjék erősen kötődnek a szilika alapú állófázisokhoz, ioncserés és hidrofób kölcsönhatások révén, ami gyakran okoz nem megfelelő minta visszanyerést [7-9]. Megfelelő ionpár képzővel

(TFA), magas mozgófázis hőmérsékletet alkalmazva (80-90°C), a nemkívánatos kötődés jelentősen csökkenthető. Alternatív megoldás lehet, ha 1-3% butanolt adagolunk a mozgófázisba. Jól ismert az alkil-alkoholok maszkírozó hatása [10]. Egy kolonna gyártó cég nemrég titán frittel és titán-borítású házzal ellátott oszlopokat hozott forgalomba, amit elsősorban fehérjék kromatografálására javasolnak.

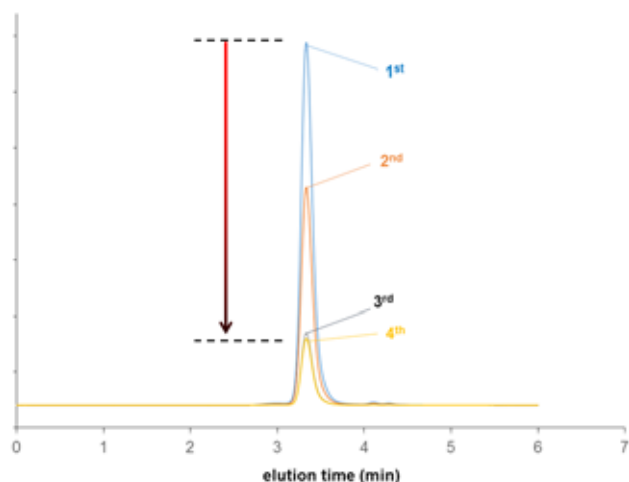
A készülék felületeken és oszlopon lejátszódó adszorpció mellett nagy jelentősége lehet a mintatartó edény falán végbemenő nemkívánatos fehérje megkötődésnek (kitapadás). A fehérjék felületaktív molekulák, gyakran kötődnek a tárolóedények vagy csomagolóanyagok falára [11]. Ez a kitapadás kritikus is lehet a HPLC-s mérés szempontjából, hiszen csökken a fehérje oldatbeli koncentrációja, illetve a falra tapadva nagyobb valószínűséggel aggregálódik, mint a hígabb oldatban (a falon és fal közelében nagyobb a fehérje fajlagos koncentrációja). A falra (pl. mintás üveg belső felülete) kötődött fehérjék konformációja változik az oldatbeli konformációhoz képest. Az edény falára kötődött fehérjét gyakran megkülönböztetik a „lábnyom” (the footprint) elnevezéssel, ami arra utal, hogy ez esetben a fehérje nem a natív konformációban van jelen, hanem ahhoz képest egy síkban jobban kiterjedt, kinyújtott formában. A fehérje lábnyom mérete általában nő az érintkezési idővel. Rövidtávon részlegesen egyensúlyi folyamatról van szó, ami azt jelenti, hogy mechanikai beavatkozással (pl. keverés vagy rázás) a falra kötődött fehérje még eltávolítható és visszaoldódva újra felveszi az eredeti konformációt. Az adszorpció folyamat kinetikája nagyban függ a fehérje koncentrációtól [12-14]. Nagyobb koncentráció mellett a felület hamarabb telítődik fehérjével így kevesebb idő marad a lábnyom kiterjedésére (kevésbé változik a falon kötődött fehérje konformációja). Nyilván az oldat pH-ja, ionerőssége és a fal anyagi minősége is nagyban befolyásolja a fehérje falra kötődését [15].

Egy nemrég megjelent tanulmány részletesen beszámolt a mintatartó falán lejátszódó fehérje kötődésről [16]. Legtöbb esetben kis mennyiségű fehérje minta áll rendelkezésünkre ezért ún. szűkítő betétet (vial insert) szoktunk alkalmazni, aminek segítségével 10-50 µL mintaoldat is jól kezelhető és többször injektálható. Számos különböző anyagú és alakú szűkítő betétből választhatunk. A leggyakrabban felületkezelt üveg vagy műanyag (polipropilén, polimetilpentán) betéttel dolgozunk. A betét alakját tekintve megkülönböztethetünk erősen vagy kevésbé szűkített típusokat. Az erősen szűkített betétek fajlagos felülete (adott oldat térfogattal érintkező felület) jelentősen nagyobb, mint a kevésbé szűkítetté. Az 1. ábrán a leggyakrabban alkalmazott mintatartó alakokat mutatunk be.



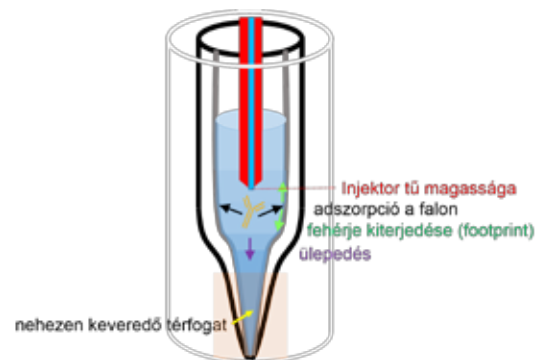
1. ábra: Különböző kiképzésű mintatartó szűkítő betétek.

Nem meglepő, hogy az anyagi minőség mellett a szűkítő alakja is nagyban befolyásolta számos antitest megkötődését. A megkötődést az egymást követő injektálások csúcsterületéből lehet meghatározni. A 2. ábrán erre mutatunk példát: egy IgG fehérje négy egymást követő injektálással kapott méretkizárásos kromatogramját láthatjuk. A méretkizárás a „leginertebb” fehérje kromatográfiás módszer, itt várható a legkevesebb kölcsönhatás az állófázissal. Jól látszik, hogy a második injektálásnál az eredeti csúcsterület 60%-a, majd a harmadik injektálás után már csak a 20%-a mérhető vissza. Érdekes, hogy a negyedik injektálásnál már nem változik a csúcsterület és 2-3 napon keresztül ugyanezt a területet mérhetjük vissza. Ez arra utal, hogy egy gyorsan lejátszódó (kb. 1 óra) folyamatról van szó. Egy alapos kísérletsorozattal azt is sikerült igazolni, hogy egy kétlépéses megkötődési folyamat játszódik le a fehérje és a mintatartó fala között. Az első egy gyors, reverzibilis folyamat, amely során a fehérje a mintatartó falára kötődik, de még nem változik a konformációja. Ha egy pipetta véggel felkavarjuk a mintát a szűkítő betétben, akkor visszamérhetjük az első injektálással kapott (teljes) csúcsterületet, ami arra utal, hogy a falra kötődött fehérjét könnyen visszajuttathatjuk az oldatba. Viszont néhány nap elteltével, ahogy a fehérje molekulák szétterülnek a falon és egyre több kötőhelyet alakítanak ki, már irreverzibilis kötődést figyelhetünk meg. Ezt követően már fizikai beavatkozással (keverés, rázás) nem tudjuk visszamérni az eredeti csúcsterületet.



2. ábra. Egy IgG antitest négy egymást követő injektálásból kapott méretkizárásos kromatogram

A kísérletsorozatból az is kiderült, hogy a legszűkebb betéteknél a legjelentősebb a csúcsterület csökkenése. Ez feltehetően a nagyobb fajlagos felülettel magyarázható, hiszen az ilyen kiképzés esetén lényegesen nagyobb „megköthető” felület jut azonos mennyiségű fehérjére. Ez esetben nagyobb mértékű lesz a csúcsterület csökkenés. A mérések ismételtetésének javítására egy érdekes megoldás lehet, hogy megvárjuk az első, gyors kitapadás idejét (kb. 1 óra) és csak utána injektáljuk a mintákat. Ezzel a módszerrel általában 3-4% alá csökkenthető a legkritikusabb fehérjék egymást követő injektálásából eredő relatív csúcsterület szórása. Az is célra vezethet, ha a mintát minden egyes injektálás előtt megkeverjük. Fontos lehet a mintavételi hely magassága is (injector needle offset), hiszen egy erősen szűkített betét alsó szakaszában lényegesebben nehezebben keveredik a nagy viszkozitású fehérje oldat, mint a felsőbb helyeken, ahol tágabb a betét. A legtöbb HPLC készüléken tetszőlegesen beállíthatjuk a mintavételi hely magasságát (általában a mintatartó aljától számított magasság, ami állítható). A legjobb megoldás nyilván az, hogy inert anyagú, kevésbé szűk mintatartót használunk és lehetőleg ne a mintatartó legaljáról végezzük a mintavételt.



3. ábra. A mintatartó betétben lejátszódható folyamatok sematikus illusztrációja

Végezetül a 3. ábrán foglaltuk össze a szűkített mintatartó betétben előforduló folyamatokat. Mindegyik közül, a fehérjék falra történő kitapadása a legjelentősebb és legtöbbször ez befolyásolja a mérések ismételtetését.



Referenciák

- [1] F.R. Huebner, J.A. Bietz, Quantitation and reproducibility problems in reversed-phase and size-exclusion HPLC analyses of wheat proteins, *Cer. Chem.* 76 (1999) 299-302.
- [2] B.A. Marchylo, J.E. Kruger, The effect of injection volume on the quantitative analysis of wheat storage proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Cer. Chem.* 65 (1988) 192-198.
- [3] J.W. Dolan, Injection loop adsorption, *LC-GC* 14 (1996) 562-566.
- [4] S. Fekete, J.L. Veuthey, D. Guillarme, New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 9-27.
- [5] K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, *J. Chromatogr. A* 1335 (2014) 81-103.
- [6] P.C. Sadek, P.W. Carr, L.D. Bowers, L.C. Haddad, A radiochemical study of irreversible protein loss on high-performance liquid chromatography column frits, *Anal. Biochem.* 144 (1985) 128-131.
- [7] S. Fekete, S. Rudaz, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 3113-3123.
- [8] S. Fekete, A. Beck, E. Wagner, K. Vuignier, D. Guillarme, Adsorption and recovery issues of recombinant monoclonal antibodies in reversed-phase liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 1-8.
- [9] K. Vuignier, S. Fekete, P.A. Carrupt, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of various silica-based monoliths for the analysis of large biomolecules, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2231-2243.
- [10] A. P. Schellinger, D. Stoll, P.W. Carr, High speed gradient elution reversed phase liquid chromatography of bases in buffered eluents Part II. Full equilibrium, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 54-61.
- [11] K. Höger, T. Becherer, W. Qiang, R. Haag, W. Friess, S. Küchler, Polyglycerol coatings of glass vials for protein resistance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 756-764.
- [12] J. Mathes, Protein adsorption to vial surfaces – Quantification, structural and mechanistic studies, PhD thesis, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2010.
- [13] J.M. Kleijn, W. Norde, The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces, *Het. Chem. Rev.* 2 (1995) 157-172.
- [14] M.V.D. Veen, M.C. Stuart, W. Norde, Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, *Coll. Surf. B*, 54 (2007) 136-142.
- [15] J.M. Mathes, W. Friess, Influence of pH and ionic strength on IgG adsorption to vials, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 239-247.
- [16] M. Rodriguez-Aller, A. Cusumano, A. Beck, D. Guillarme, S. Fekete, Importance of vial shape and type on the reproducibility of size exclusion chromatography measurements of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. B* 1032 (2016) 131-138.

TARTSON LÉPÉST

AZ ÉLELMISZER-BIZTONSÁG
EGYRE SOKASODÓ KIHÍVÁSAIVAL!

Rendelje meg, és olvassa rendszeresen
az Élelmiszervizsgálati Közleményeket!



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

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



www.eviko.hu

Gázkromatográfiás linerek

Göröcs Noémi
Egis Gyógyszergyár Zrt.
Hatóanyag analitikai fejlesztési laboratórium

Bevezetés

A mintaadagolás alapvetően meghatározza az elválasztás hatékonyságát, ismételhetőségét és széles tartományban befolyásolhatja a kimutatási határokat is. Ezeknek a paramétereknek az optimalizálásakor elengedhetetlen feladat a megfelelő mérési módszer kiválasztása és a megfelelő „hardver” biztosítása.

A gázkromatográfiás mintaadagolás során a fecskendőből illetve mintaadagoló hurokból kilépő minta az injektorba jut, ahol térben találkozik a kolonna injektor felőli végével. Itt történik a minta tényleges adagolása, kolonnára való juttatása. Összefoglalva ilyen egyszerű az injektor szerepe a gázkromatográfiás mérés során.

A kérdés azonban egy gyakorló analitikus számára sokkal összetettebb. A minta a nagy hőmérsékletű térbe kerülve először az injektor belsejét bélelő liner felületével találkozik. A liner főként egy üvegből készült, kis átmérőjű csövecské. A nagy hőmérséklet a pillanatszerű elpárologtatáshoz szükséges, azonban katalitikus reakciók mehetnek végbe, ha szimplán az injektor fém házát használjuk expanziós térként. Márpedig a komponenseket egymástól elválasztani szeretnénk, nem pedig egymással reagáltatni.

A liner leggyakrabban boroszilikát üvegből készül, mely nagy előnye, hogy viszonylag alacsony hőmérsékleten, szélesebb hőmérséklettartományban is könnyen formázható, egészen bonyolult formájú megoldások is készülhetnek belőle (1. ábra). Hátránya, hogy szemben a kvarcüveggel, fémion szennyezések találhatóak benne, melyek erősíthetik a katalitikus hatást. Utólagos savas kezeléssel ezek az ionok eltávolíthatóak, s a felület tisztán szilanol (Si-OH) csoportokkal lesz borított. Azonban ez a felület ilyen állapotban aktív, adszorpcióra hajlamos, gyengén savas tulajdonságú, s a szintén aktív, ne adj' isten bázikus molekulák elválasztásakor meggyűlhet a bajunk egy ilyen liner használatával.



1. ábra: Cyclo Splitter liner kialakítás.

Emiatt liner választáskor érdemes figyelni a „deactivation”, „inert”, „passivated” stb. szavakra, melyek azt jelzik számunkra, hogy az aktív szilanol felületet valamilyen

úton-módon blokkolták. A dezaktiválás lehet tartós vagy kevésbé tartós, utóbbi esetben bizonyos minták és tisztítási eljárások károsíthatják az inert réteget, azonban házilag újraépíthető. Aktív, bázikus vegyületek mérésekor különösen fontos figyelembe venni az inert réteg anyagi minőségét, érdemes bázikusan dezaktivált liner alkalmazni. Tartós blokkolás érhető el, ha amorf szilíciumot tartalmazó réteget párologtatnak a liner felületére, ez a típus reaktív komponensek mérésekor is sikerrel alkalmazható, valamint az inert felület a nagyon alacsony koncentrációjú vegyületek mérésének az ismételhetőségét is javítja.

A liner használhatjuk gyapottal vagy gyapot nélkül. Általánosságban javasolt a gyapot használata, mely elősegíti a minta kontrollált körülmények közötti elpárologtatását, segít homogenizálni a gózt és javítja az ismételhetőséget. A gyapot a linerhez hasonlóan aktív szilanol csoportokkal borított, azonban jóval nagyobb a fajlagos felülete, s emiatt a minta sokkal nagyobb arányban érintkezik vele, mint a linerrel. Különösen fontos a gyapot inertségét biztosítani, a kereskedelmi forgalomban lévő gyapotok nagy része dezaktivált. Bázikus vegyületek esetén, hasonlóan a linerhez, érdemes bázikusan dezaktivált gyapotot választani.

A linerek típusai

Split linerek

A különböző gázkromatográfiás eszközöket gyártó cégek katalógusaiban megkülönböztetnek split és splitless technikára alkalmas linereket. A linerek geometriája készülfüggő paraméter, azonban általánosságban a split linerek mindkét végén nyitott, 3-4mm belső átmérőjű kialakítással rendelkeznek (2. ábra).



2. ábra: Mindkét végén nyitott, „straight” liner split injektáláshoz.

A split injektálás során a keletkező mintagözök csak bizonyos hányada kerül a kolonnára. A kolonna mintafelvétő kapacitása kicsi, azonban a még elfogadható hibahatárral injektálható mintatér fogat ilyen mértékűre nem csökkenthető. Csak a beállított splitaránynak megfelelő mintahányad kerül a kolonnára, a másik hányad a split ágon távozik a rendszerből (legtöbbször egy szűrőn keresztül a labor levegőjébe). Ennek az útját biztosítja az egyenesen nagy átmérőjű liner kialakítás.

Splitless linerek

Splitless technika esetén általában legalább az egyik végén szűkített liner érdemes alkalmazni (pl. „single gooseneck”, „single taper”) (3. ábra). Splitless üzem-

módban az injektor a minta injektálását követően rögtön leállítja a split ág gázáramát a módszerben beállított ideig, amíg megtörténik a minta kolonnára való jutása. Ha ezt a mutatót mindkét végén nyitott linerrel szeretnénk véghezvinni, előfordulhat, hogy nem kapunk értékelhető jelet, mert hiába zár a split gázáram, a nagy átmérőjű végek nem segítik elő a minta linerben való tartását. Ezek után nyílik a split ág, s a szintén meghatározott splitaránnyal üzemel tovább a készülék. Szükséges a split gázáram elindítása az injektálást követően, mert koszos minták esetén folyamatosan szennyeződik a kolonna és emelkedhet az alapvonal.



3. ábra: Alul szűkített splitless liner.

Mind a split, mind a splitless linerek egy részét megvásárolhatjuk gyapottal már előre megtöltve. Ezeknek a kényelmi funkcióknál kívüli nagy előnyük, hogy a liner és a gyapot inertizálását egyszerre végzik, miután már a helyére került a gyapot. Így minimalizálható az aktív felületek aránya, hiszen házilagos töltésnél a gyömszölés során óhatatlanul töredeznek a gyapotszálak, amelyek friss, kezeletlen felület megjelenését eredményezik.

Egyéb, speciális linertípusok

Magas forráspontú komponensek elemzésekor és/vagy reaktív minták esetén használhatunk mindkét végén szűkített linert (pl. „double gooseneck”) (4. ábra). A kétszeresen szűkített véggel rendelkező liner csökkentheti a visszaáramlás (backflash) jelenségét, mert nem engedi könnyen kilépni a mintagözöket az expanziós térből a gázvezetékekbe, kisebb eséllyel fordul elő keresztaszennyezés a minták között.



4. ábra: Kétszeresen szűkített liner.

Kis átmérőjű linerek

Gáz halmazállapotú minták injektálásakor használatos, nincs szükség a folyadékok adagolásánál látott nagy expanziós térfogatra (5. ábra). A komponensek csúcshéledése jelentősen csökkenthető a fókuszált mintabevitelnek köszönhetően. SPME mintaelőkészítés esetén is alkalmazható, ahol a minta egy adszorpciós szálon helyezkedik el.



5. ábra: Gáz halmazállapotú minta injektálására alkalmas liner.

Ezt a szálat helyezük a nagy hőmérsékletű injektorba, ahol a gáz halmazállapotú minta a szál felületéről deszorpcióval szabadul fel.

A direkt injektálás linerei

A mintát közvetlenül a kolonnára is juttathatjuk, ha direkt injektálásra alkalmas készülékünk és linerünk van. A direkt injektálásra alkalmas liner ismertető jegye az alsó részen lévő, harang alakú kiképzés, melynek a csúcsa egy szűk átmenettel kapcsolódik össze az expanziós térrel (6. ábra).



6. ábra: Direkt injektálásra alkalmas liner.

A splitless technikához hasonló eredményt érhetünk el vele, azonban a mintamátrix mindenestől a kolonnára kerül, ezért meg kell gondolni a technika használatát, mert fokozott figyelmet kíván, hogy megakadályozzuk a kolonna elszennyeződését.

PTV injektor linerek

A programozott fűtésű injektorok az injektálás során alacsony hőmérsékletűek, majd egy hirtelen, nagysebességű felfűtést követően fókuszálva kezd haladni a minta a kolonnán keresztül. Ezek a linerek vékony falúak, hogy a hőt minél gyorsabban át tudja adni a mintának.

Az említett főbb típusú linereken kívül sokféle kialakítással találkozhatunk még a katalógusokban, többek között a bevezetőben már említett cyclo splitter linerrel (1. ábra), amelynek a belsejében a nagy fajlagos felületű kialakítás a gyapotot kívánja helyettesíteni. Koszos minták esetén ritkábban kell tisztítani, mint a gyapotos társait. Aktív komponensek esetén csökkenti az adszorpció lehetőségét a gyapot hiánya miatt.

A linerekben használt gyapot mennyisége és magassága is változhat, mely szintén hatással van az oldószer és vele együtt a vizsgálandó minta elpárologtatására.

Linerek választásakor vegyük figyelembe azok alkalmaságát az adott analitikai feladathoz, de bátran próbáljunk ki más típusú linereket is, és figyeljük meg, hogy hogyan változnak a kromatogramok egy-egy liner cseré hatására.

pH-kontroll a folyadékkromatográfiában

I. – alapelvek

Kormány Róbert
Egis Gyógyszergyár Zrt.

Forrás: Fekete J., Kormány R., Fekete Sz. (Szerk.)
Modern folyadékkromatográfia
KromKorm Kft., 2017 (p. 154-165)

Bevezetés

Ionos és könnyen ionizálható anyagok vizsgálata esetén a számunkra előnytelen erős kölcsönhatások kiküszöbölése végett elengedhetetlen a mozgófázis pH-kontrollja, illetve ezt biztosítandó a mozgófázis pufferelése. A megfelelő pH beállításához ismernünk kell az elválasztandó komponensek pKa értékét, illetve az alkalmazni kívánt puffer pufferkapacitását a pH függvényében. Megfelelő pufferkoncentráció alkalmazásával maszkírozhatjuk az állófázist, így energetikailag homogénebbé válik. Azonban minden esetben figyelembe kell vennünk, hogy minél agresszívebb puffert használunk, minél nagyobb koncentrációban keverjük a mozgófázishoz a puffert, annál rövidebb lesz a kolonnánk élettartama. Ebből a szempontból előnyösebb a szerves pufferek használata, azonban ekkor számolnunk kell a nagyobb UV cut-off értékekkel.

A puffereelt mozgófázisok alkalmazásának egy speciális területe a fordított fázisú ionpár kromatográfia, melyet ionos és könnyen ionizálható anyagok vizsgálata esetén célszerű alkalmazni. Ekkor az ionpárképző só szerepe, hogy az ionos molekulával kapcsolatot teremtve asszociátumot, ionpárt alkosson, melynek így jelentősen megnő a visszatartása a fordított fázisú tölteten. A pH-kontrollnak természetesen itt is fontos szerepe van.

A pufferekkel szemben támasztott általános igények tehát az alábbiak:

- ne okozzon detektálási problémát, alacsony UV cut-off (UV detektálás esetén), illékony puffer (MS, ELSD detektálás esetén)
- adott mérési körülmények között nagy ($pKa \pm 1$) pufferkapacitás (β)
- teljes mértékben szilárdanyag mentesnek kell lennie (szűrés)
- a puffernek a lehető legtisztábbnak kell lennie
- puffer kompatibilitás, ez azt jelenti, hogy nagy szerves oldószerhányadnál ne váljon ki szilárd formában, (figyelni kell, hogy az elemzés során az oldhatósági korlátokon belül kell maradnia a puffer koncentrációjának)

pH-kontroll a fordított fázisú folyadékkromatográfiában

A pH kontroll szükségességének megítélése előtt a szerves vegyületeket kromatográfias szempontból csoportokba kell sorolni. Ennek a csoportosításnak a vezérlő elve, hogy a mozgófázis pH-jának változtatásával megváltozik-e a vegyületek molekuláris formája. Mindazon esetekben, amikor ez bekövetkezik, akkor pH kontroll kell, hogy biztosítani tudjuk a molekuláris formák állandóságát és ezzel összhangban a visszatartást és a zónaszélesedést. Ebben a megközelítésben a mozgófázis oldaláról vizsgáljuk, azokat a követelményeket, amelyekkel az elválasztás fő paramétereit állandó értéken tudjuk tartani.

Az utóbbi évek kutatásai nyilvánvalóvá tették, hogy a szilikagél alapú állófázisoknál a szilanol csoportok molekuláris formáit is állandó értéken kell tartani ahhoz, hogy a visszatartás, a zónaszélesedés és a csúcsszimmetria ne változzon. Lehetséges olyan eset is, hogy a vegyület molekuláris állapota pH független, de a szilikagél alapú állófázis megköveteli a pH kontrollt.

Kromatográfias szempontból a vegyületek tehát négy csoportra oszthatók:

- kromatográfias szempontból semleges vegyületek
- savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
- bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek
- ionos vagy ionizálható vegyületek (ezen csoport molekuláinak elválasztására a fordított fázisú ionpár kromatográfia alkalmazható)

Kromatográfias szempontból semleges vegyületek

E csoportba tartozó vegyületek közös tulajdonsága, hogy pH változás esetén nem változtatják meg molekuláris állapotukat. Mozgófázis oldaláról nézve nem kell pH kontroll.

Az állófázissal való kölcsönhatás szempontjából ezt a csoportot két részre oszthatjuk. Azok a vegyületek, amelyek csak diszperziós kölcsönhatást tudnak kialakítani az állófázissal (alkil csoportokkal) és azokra, amelyek olyan csoportokat is tartalmaznak, amelyek a szilanol csoportokkal kölcsönhatásba lépnek. Az első esetben a fordított fázisú töltet apolaritása a döntő, kromatográfias szakzsargon szerint az állófázis hidrofóbicitása (apoláris felület), a második esetben a szilanol csoportok poláris kölcsönhatásra való hajlama (poláris felület) is meghatározza az elválasztást.

1.a csoportba tartozó vegyületek: Ebbe a csoportba tartoznak mindazon szerves vegyületek, amelyek szénből, hidrogénből és kovalens kötésű halogénből épülnek fel.

A szén halogén kötés minden esetben polarizált, viszont a halogénatom bevitele a molekulába annak lipofil jellegét jelentős mértékben növeli. Kromatográfias szempontból ez az utóbbi hatás érvényesül közvetlenül. A szén-halogén atom polarizációjából eredő töltés eltolódás hatása a fordított fázisú kromatográfias körülmények között elhanyagolható. A végeredmény, hogy a visszatartást, ahogy ennek a résznek a bevezetőjében hangsúlyoztuk, az apoláris felülettel való kölcsönhatás szabja meg. A szerves vegyületek közül ebbe a csoportba tartoznak az aromás és alifás szénhidrogének (folyadékkromatográfias szempontból kiemelték a több gyűrűsek), policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok), halogénezett aromás és alifás szénhidrogének.

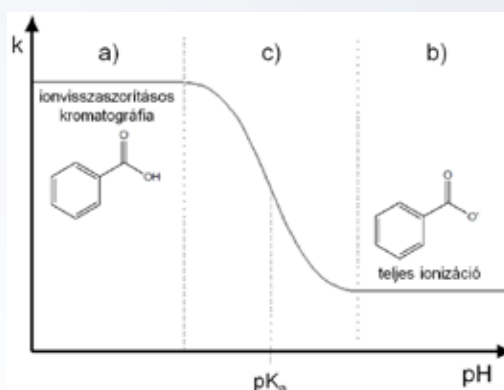
1.b. csoportba tartozó vegyületek: Minden esetben tartalmaznak poláris csoportot vagy csoportokat. Ezek a csoportok vagy H-hidas kötést alakítanak ki az állófázis szilanol csoportjaival, vagy dipól-dipól kölcsönhatásba lépnek azokkal. Ezeket a kölcsönhatásokat együttesen polárisként adjuk meg a folyadékkromatográfias gyakorlatban. Ezek a poláris kölcsönhatások energetikailag nagyobbak, mint a diszperziós vagy London-féle, de a fordított fázisú körülmények között nem szélesítik ki elfogadhatatlanul a kromatográfias csúcsokat vagy teszik aszimmetrikussá azokat. A poláris kölcsönhatást ki tudjuk használni az elválasztás hatékonyságának növelésére. A következő vegyületekre igazak a fenti megállapítások: alkoholok, éterek, észterek, aldehidek, ketonok, nitrilek, nitro-vegyületek, azo-vegyületek. Azonos váz estén a visszatartást a csoportok H-hidas kötésre való hajlandósága szabja meg. Az alkoholok nagyobb erősségűt tudnak kialakítani, mint az oxo-vegyületek és ha ez a kölcsönhatás lesz a domináló a visszatartásnál, akkor retenciójuk is nagyobb lesz.

Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

A savas funkciós csoportot tartalmazó vegyületek a pH-tól függően két molekuláris állapotban lehetnek jelen, s ezeknek a mozgófázisban való oldhatósága eltérő. Ebből következik, hogy ha pH kontroll nélkül próbálnánk mérni, és a körülmények valami miatt megváltoznak, akkor a molekuláris formák aránya is változni fog, ami pedig a visszatartási tényező definíciójának megfelelően ($k = ns/nm$, ahol az ns a mólok száma az állófázison és a nm a mólok száma a mozgófázisban) a retenció megváltozását eredményezi.

A fentiekből egyértelműen kitűnik, hogy a pH kontroll célja biztosítani a mozgófázisban a molekuláris formák arányának állandóságát, illetve, hogy kizárólag az egyik vagy másik forma legyen jelen.

Vizsgáljuk meg a benzooesav viselkedését:



1. ábra: A pH-retenció tényező függvény savas vegyületek esetében. Ionvisszaszorított forma a), teljesen ionizált forma b) és mind két forma jelen van a mozgófázisban c).

Az 1. ábrán három tartományt különböztethetünk meg:

a) A $pH < pK_a + 2$ értéknél savasabb tartományban a vegyület ionvisszaszorított formában van jelen, a kölcsönhatási formák száma kevés és kis erősségű, keskeny a csúcs, nagy a visszatartás, robusztus a módszer (ionvisszaszorításos kromatográfia), ezt a formát a szakirodalom semleges formának is nevezi. Pontosabb, ha a savas csoportot tartalmazó vegyület semleges formájáról beszélünk. Ebben az állapotban a savas csoport csak H-hidas kötést alakít ki a szilanol csoporttal. Ez a kölcsönhatás a fordított fázisú körülmények között gyenge és a továbbiakban kihasználható az elválasztás optimalizálásánál.

b) A $pH > pK_a + 2$ értéknél lúgosabb tartományban a molekula ionos formában van, a kölcsönhatási formák száma kicsi, jó a csúcsalak, kicsi a visszatartás, robusztus a módszer. Kérdés, hogy a $k > 1$ kritérium teljesül-e ebben a tartományban. A szilikagél alapú állófázisoknál a másik korlát a kolonna felső, megengedett pH-ja. A gyakorlatban kevésbé kihasznált tartomány.

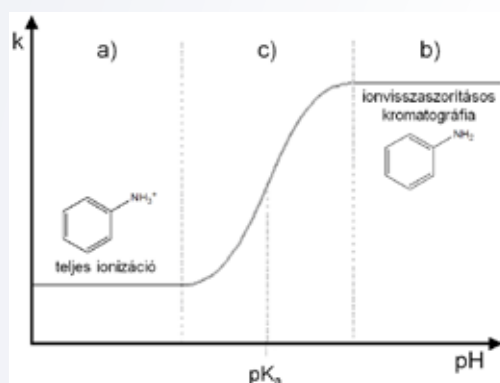
c) A $pH = pK_a + 2$ tartományban a molekula mindkét formája jelen van, a visszatartás (retenció) attól függ, hogy milyen a két forma aránya. Itt több kölcsönhatás típus játszik szerepet az elválasztásban, s mivel ez zónaszélesítő hatású, a csúcs általában széles. Emellett a módszer nem robusztus, hiszen kis pH változás esetén a két molekulaforma arányának megváltozása miatt jelentős retencióváltozás következhet be. Amennyiben szelektivitás a két másik pH tartományban megfelelő, akkor ezt a tartományt nem használjuk.

A megfelelő puffer kiválasztásához a vegyületek pK_a értékét ismerni kell. Ezt vagy a szakirodalomból keressük ki, megmérjük, vagy intelligens programok segítségével a vegyületek szerkezeti képletéből előre jelezzük (prediktáljuk).

Bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek

A bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek, hasonlóan a savas funkciós csoportot tartalmazó molekulákhoz, szintén két molekuláris állapotban lehetnek jelen a pH-tól függően. Az ionos forma itt a protonáltat jelenti, az ion visszaszorított a szabad bázist. A két forma apoláris jellege nagyban eltér, ami az apoláris állófázissal a kölcsönhatást megszabja. Ugyancsak nagyban eltér az oldhatóságuk a mozgófázisban, amely ismételt nagyban meghatározza a visszatartásukat. A fentiekből következően e vegyületek elválasztásánál is szükséges a pH kontroll alkalmazása.

Itt az anilint, mint modellvegyületet felhasználva mutatjuk be a molekuláris formák változását a pH függvényében (2. ábra)



2. ábra: A pH-retenció tényező függvény bázikus vegyületek esetében. Teljesen ionizált forma a), ionvisszaszorított forma b), mind két forma jelen van a mozgófázisban c).

Ebben az esetben is, kromatográfiai szempontból, három pH tartomány különíthető el:

a) A $pH < pK_a + 2$ értéknél savasabb tartományban a molekula ionos formában van jelen, ez jelenti a kevésbé apoláris molekuláris formát, amely a mozgófázisban jól oldódik, ennek megfelelően visszatartása a szabad bázishoz képest kisebb mértékű. A hidofil bázisoknál lehetséges, hogy nem tudjuk teljesíteni a minimális visszatartási feltételt ($k > 1$). A kölcsönhatási lehetőségek száma kicsi, nincs több egyensúly egymás mellett, ezért kis zónaszélesség és szimmetrikus csúcs várható.

b) A $pH > pK_a + 2$ értéknél lúgosabb tartományban ion visszaszorított formában van a molekula. Ez jelenti az apolárisabb molekuláris formát, amely kölcsönhatása az állófázissal nagyobb, mint a protonált formáé. A kölcsönhatási lehetőségek száma kicsi, nincs több egyensúly egymás mellett, ezért kis zónaszélesség és szimmetrikus csúcs várható. A pH növelésnek a kolonnák felső használati pH értéke szab határt. A nagy visszatartás és gyenge kölcsönhatás lehetőséget ad, hogy a szerkezetileg kis mértékben különböző vegyületeket is elválasszuk. Ha a vegyület $pK_a > 7$ bázikus csoportot tartalmaz, akkor pH túró állófázist kell használnunk.

c) A $pH = pK_a + 2$ tartományban a molekula mindkét formája jelen van, több egyensúly lehetséges, ennek megfelelően széles csúcs és egyes esetekben aszimmetria várható. A szilikagél alapú állófázisoknál ebben a pH tartományban a szilanol csoportok egy része is ionizált formában van. A negatív töltésű szilanol anion erős kölcsönhatásba lép a pozitív töltésű, protonált bázikus csoporttal. Az ioncserére alkalmas helyek száma korlátozott, ezért ezeken a helyeken hamar túltelítés következik be, amely eredménye széles aszimmetrikus kromatográfiai csúcs. Ezt a pH tartományt csak a Silica B alapú vagy hibrid, nagy borítottaságú és utószilanizált töltetekkel lehet kihasználni.

A pufferekkel szemben támasztott követelmények

A pufferoldatok pH-ja jól definiált, sav illetve bázis hozzáadásakor kevésbé változik. A pufferoldatok gyenge savból (vagy bázisból) és a gyenge sav (bázis) erős bázissal (savval) alkotott sójából álló rendszerek. Folyadék-kromatográfiai gyakorlatban olyan anyagokat is alkalmazunk, amelyek a fenti definíciónak nem felelnek meg, viszont pH változás tompító hatásúak. Ha pH tompító hatást tesszük meg a puffer definíciójának, akkor ezek az anyagok is a puffer kategóriába kerülnek. A pH változás tompító oldatok egyik fő jellemzője a pufferkapacitás.

A pufferkapacitás (β) a pufferoldatok tompító hatását jellemzi, definíciószerűen valamely egyértékű erős bázisnak vagy erős savnak az a mennyisége [mol], amely 1 liter pufferoldat pH-ját egy-egységgel változtatja meg:

$$\beta_H = 2,3 \cdot \frac{K[H^+]}{(K + [H^+])^2} C \quad (1)$$

ahol β_H a pufferkapacitás, C a puffer koncentrációja és K a sav/konjugált bázis disszociációs állandója.

Mielőtt a pH tompító hatású (pufferek) anyagokkal szemben támasztott általános követelményeket vizsgálnánk, nézzünk meg néhány – a kiválasztásuknál fontos – gyakorlati szempontot.

Először is puffer használata savas vagy bázikus csoportot tartalmazó vegyületeknél szükséges. Az ionos vegyületek bevitele a mozgófázisba az esetek többségében csökkenti az állófázis stabilitását.

Másodszor a puffer kationja is jelentős hatással lehet a kolonna élettartamára. Az, hogy milyen lesz a puffer kation, befolyásolja a kolonna élettartamát. Ez a hatás $pH > 6$ mozgófázisban válik jelentőssé.

Az ionos anyagok növelik az alap szilikagél oldhatóságát. A puffer kation kiválasztásánál tehát azt kell választanunk, amely a legkisebb fázis eróziót okozza. Az ammónium-, a kálium- és a nátrium-ion hatását figyelembe véve elmondható, hogy az ammónium-ion a legagresszívabb a három kation közül. Ez azért említésre méltó, mert az elpárolgztatás utáni fényszóráson alapuló (ELSD) és tömegspektrometriás (MS) detektálásnál illékony puffereket kell alkalmazni, ekkor a puffer-kation gyakran ammónium-ion. A legkisebb mértékű fázis tönkremenelt a nátrium-ion alkalmazásakor kapjuk.

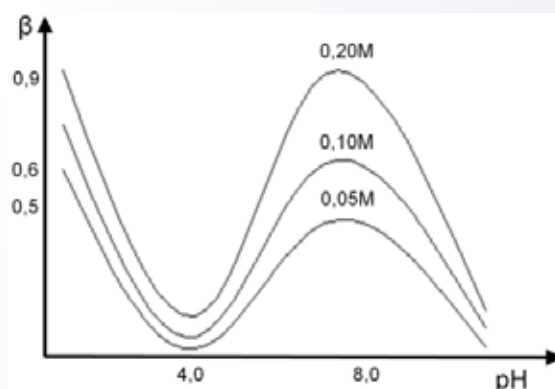
A puffer anionok minősége is jelentősen befolyásolja a kolonna élettartamot. Az alap szilikagél oldódása mindig új szilanol csoportot, illetve szilanol csoportokat jelent a felületen. A puffer anionok közül a pH=6–8 tartományban a sokat használt foszfát csökkenti a legnagyobb mértékben a kolonna élettartamát. A szerves puffer-anionok használata mindig kedvezőbb.

A gyakorló folyadékkromatográfus számára kérdés, hogy milyen puffer koncentrációt használjon. Ha az állófázis oldódását kémiai reakcióként kezeljük, akkor egyértelmű, hogy az oldódást segítő anyag koncentrációjának növelése növeli a folyamat sebességét. Minél nagyobb a puffer koncentráció, annál kisebb a kolonna élettartama, viszont a nagyobb puffer koncentráció nagyobb pufferkapacitást eredményez. Mérlegelni kell, hogy a nagyobb ionkoncentrációnál levő stabilabb rendszert választjuk (pufferkapacitás), vagy a hosszabb kolonna élettartamot. Ezzel elérkeztünk a puffer használat lényeges pontjához. Ahhoz, hogy kis mennyiségű puffert alkalmazhassunk, az az alapfeltétel, hogy az adott pH értéken nagy legyen a tompító oldat pufferkapacitása. Kromatográfiai szempontból nézve, tehát úgy fogalmazhatjuk meg, hogy adott mérési körülmények között legyen olyan a pufferkapacitás, hogy a mozgófázis pH-tól eltérő mintánál ne idézzen elő nagy zónaszélesedést. Ez a puffer $pK_a \pm 1$ -es pH tartományban megfelelő. Az 1. táblázatban néhány gyakrabban alkalmazott folyadékkromatográfiai puffer alkotó pK_a -ja, folyadékkromatográfiai alkalmazható pH-tartománya és UV cut-off értékei láthatók.

1. táblázat: Folyadékkromatográfiában alkalmazható pufferek tulajdonságai.

Puffer	pK_a	pH tartomány	UV cut-off
Trifluoecetav	< 2	< 2,5	210nm (0,1%)
Foszfát (pK_{a1})	2,1	1,1 – 3,1	< 200nm (10mM)
Citrát (pK_{a1})	3,1	2,1 – 4,1	230nm (10mM)
Förmiát	3,8	2,8 – 4,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_{a2})	4,7	3,7 – 5,7	230nm (10mM)
Acetát	4,8	3,8 – 5,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_{a3})	5,4	4,4 – 6,4	230nm (10mM)
Karbonát (pK_{a1})	6,4	5,4 – 7,4	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_{a2})	7,2	6,2 – 8,2	< 200nm (10mM)
Trietanolamin	7,8	6,8 – 8,8	200nm (10mM)
Tris	8,3	7,3 – 9,3	205nm (10mM)
Dietanolamin	8,9	7,9 – 9,9	200nm (10mM)
Ammónia	9,2	8,2 – 10,2	200nm (10mM)
Etanolamin	9,5	8,5 – 10,5	200nm (10mM)
Karbonát (pK_{a2})	10,3	9,3 – 11,3	< 200nm (10mM)
Dietilamin	10,5	9,5 – 11,5	< 200nm (10mM)
Trietilamin	11,0	10,0 – 12,0	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_{a3})	12,3	11,3 – 13,3	< 200nm (10mM)

Példaként nézzük a gyakran alkalmazott foszfát-pufferek pufferkapacitásának változását a pH függvényében (3. ábra). A pH=2 érték körül a $H_3PO_4/H_2PO_4^-$ nek van maximális pufferkapacitása ($pK_a=2,1$), a pH=7-es körül a $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ összetevőjűnek ($pK_a=7,2$). A harmadik kombinációt már nem használjuk, mert kívül esünk a szilikagél felső használati pH értékén. A foszforsavat egyedül is használhatjuk tompító anyagként, mint közepesen erős sav, az alkalmazott 0,1–1 V/V%-os koncentrációban 1–2 közötti pH-t alakíthat ki.



3 ábra: A pufferkapacitás változása a pH-val és a koncentrációval foszfát-puffereknél.

Ahogy a 3. ábrán látható, a pufferkapacitás egy adott pufferrendszer esetén a koncentrációval növekszik. A görbe egy minimum és egy maximum szerint változik, csak adott pH tartományban érhető el elég nagy pufferkapacitás. A pufferkapacitás maximuma $pH=pK_a$

nál van, pl.: foszfát-pufferrel $3 < \text{pH} < 5$ nem előnyös dolgozni. Ha kicsi a pufferkapacitás, akkor nem elég gyors a molekuláris formák között az átalakulás, a mozgófázis nem képes a pH-t pillanatszerűen megváltoztatni, ennek eredménye a széles kromatográfiai zóna, és sok esetben aszimmetrikus kromatográfiai csúcshoz vezet.

A nagynyomású folyadékkromatográfiai rendszer szempontjából alapvető, hogy a puffer ne tartalmazzon kis szemcseátmérőjű szilárd anyagokat. Ezt hívjuk szilárdanyag mentességi követelménynek. A pufferek egyik vagy mindkét komponense szilárd anyag, oldásuk után nagyon kis rész visszamarad, ami vagy eltömi a kis átmérőjű vezetékeket vagy tönkretesz a nagynyomású szivattyú és/vagy az automata mintaadagoló tömítését. Ezt figyelembe véve a puffer tartalmú mozgófázisnak szilárd anyagtól mentesnek kell lennie. Általánosan elmondható, hogy $5\mu\text{m}$ -es és nagyobb szemcsés töltetek esetén elegendő a $0,45\mu\text{m}$ -es pórustátmérőjű szűrő, míg $3\mu\text{m}$ -es és kisebb szemcsés töltetű állófázisok esetén $0,22\mu\text{m}$ -es pórustátmérőjű szűrőt célszerű használni, hogy elkerüljük a frit és kolonna elszennyeződését.

A pufferek még kis mennyiségben sem tartalmazhatnak szennyező komponenseket, ezt nevezzük a puffer tisztasági követelményének. Kromatográfiai minőségű, tiszta puffer nem minden esetben kapható, így mindig az elérhető legtisztább anyagot kell alkalmazni. Nem megfelelően tiszta puffert tartalmazó mozgófázis in-situ módosíthatja az állófázis felületét, illetve gradiens elúciónál szellemcsúcsokat eredményezhet.

A pufferek és tompító anyagok többsége a mozgófázisban ionos formában van. Az ionos anyagok oldhatósága egy víz-szerves oldószer elegyben több nagyságrenddel csökken a vízben mért oldhatósághoz képest. Az előzőekben tárgyaltuk, hogy a pufferes mozgófázisnak szilárdanyag mentesnek kell lenni. Ez azt is jelenti, hogy a mérés során sem képződhet benne szilárd anyag. Ezt a követelményt fejezi ki röviden a puffer kompatibilitás. Ez különösen nagy szerves oldószer tartalom esetén okozhat problémát. Rendkívül fontos, hogy a puffer ne váljon ki, ne kristályosodjon. A pufferek használatakor az oldhatósági koncentrációból kell maradni. Pl. 70–80 V/V% metanol 0,05M foszfát-puffert nem tud oldatban tartani. Ha nagy szerves oldószer tartalommal kell dolgozni, akkor szerves puffer használata a célszerű, mert az oldhatósága legalább egy nagyságrenddel nagyobb.

A 2. és 3. táblázat néhány puffer oldhatóságát szemlélteti víz-szerves oldószer elegyben.

2. táblázat: Kálium-foszfát ($\text{pH}=7,0$) oldhatósága különböző összetételű víz-metanol (MeOH), víz-acetonitril (MeCN) és víz-tetrahidrofuran (THF) oldószer elegyekben.

%B	MeOH	MeCN	THF
50	> 50 mM	> 50 mM	25 mM
60	> 50 mM	45 mM	15 mM
70	35 mM	20 mM	10mM
80	15 mM	5 mM	< 5 mM
90	5 mM	0 mM	0

3. táblázat: Különböző pufferek oldhatósága különböző összetételű víz-acetonitril elegyben (szobahőmérsékleten).

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

A szilárdanyag mentességgel és a puffer kompatibilitással függ össze, hogy a mérés befejezése után az egész rendszert puffermentesíteni kell. Az állás során a puffer komponensek kikristályosodhatnak a mozgófázis elpárolgása közben. A kivált puffer komponensek a nagynyomású szivattyút, a mintaadagolót tönkreteszhetik, a kolonna élettartamát, mint minden ionos vegyület, csökkentik. Első lépésben vízzel, vagy közepes (<50%) szerves oldószer tartalmú mozgófázissal mossuk a rendszert, ezután következhet a 60–80% szerves oldószer tartalmú mozgófázissal mossuk a rendszert, a puffer könnyen kiválhat az egész rendszerben.



Kedves Kollégák!

2019. 04. 01. – 12. között második alkalommal kerül megrendezésre a KromKorm Kft. és a Gen-Lab Kft. kromatográfias tanfolyama (LC/GC tanfolyam), melynek tematikáján az előző tanfolyam tapasztalatait figyelembe véve némileg változtatunk, illetve a felmerülő igényekhez igazodva, kiegészítettünk két tömegspektrometriai nappal, ahol elsősorban a kromatográfiával (GC/MS, LC/MS) kapcsolt technikák kerülnek tárgyalásra.

Ezúttal is gyakorlat orientált elméleti képzést tervezünk, a teljes tanfolyam 45 óra (30 x 90 perc) elméleti képzésből és 10 óra (10 x 60 perc) diszkuszióból áll.

A tanfolyam nem akkreditált, de a részvételről igazolást állítunk ki. Minden résztvevő megkapja az általa hallgatott előadások diasorait nyomtatott formában, továbbá a legalább öt képzési napra regisztrálók kapnak egy példányt a „Fekete J., Kormány R., Fekete Sz.: Modern folyadékkromatográfia” című könyvből.

Mit jelent, hogy

- **gyakorlat orientált:** A tanfolyam anyagát elsősorban gyakorló kromatográfusoknak állítottuk össze, akik napi munkájuk során használják ezt a technikát. Hosszú időt igénylő, konkrét műszeres méréseket nem tervezünk, viszont valódi mérési eredményeken keresztül próbáljuk elmagyarázni a technika rejtelseit. Ezen túlmenően különböző készülék alkatrészek, eltérő típusú kolonnák és a mintaelőkészítési eszközök is bemutatásra kerülnek (működés, előnyök, hátrányok).

- **elméleti képzés:** Azt gondoljuk, amennyiben valaki szeretné szakszerűen alkalmazni a kromatográfias technikákat, annak elengedhetetlen, hogy bizonyos szintű elméleti tudással is rendelkezzen, ezzel elkerülve számos gyakorlati hibát.

- **diszkuszió:** Minden oktatási nap végére, levezetésként tervezünk egy 60 perces kötetlen megbeszélést, ahol a napi témákban felmerülő kérdések, illetve saját gyakorlati problémák megvitatására kerül sor.

Kinek ajánljuk?

A tanfolyamot ajánljuk mindazoknak, akik napi munkájuk során folyadék- vagy gázkromatográfiával foglalkoznak, legyenek kezdő vagy haladó szinten. Az előadások tematikája úgy lett megszerkesztve, hogy a kezdők számára is érthető legyen, de egy nagyobb gyakorlattal rendelkező kromatográfus is találjon benne újdonságot. Emellett ajánljuk azoknak is, akik csak a kromatográfia eredményeit használják munkájuk során (pl. szerves preparatív vegyészek, minőségirányítási szakemberek,...), hogy nagyobb rálátásuk legyen a kapott adatok valódi tartalmának megítélésére.

A részletek megtalálhatók a www.kromkorm.hu weblapon.

A tanfolyamra 2019. 02. 28-ig regisztrálók 10% engedményt kapnak a részvételi díjból!

Megj.: Az LC/GC tanfolyamunk elérhető testre szabott formában is, vagyis a tematikája, óraszámja és helyszíne a megrendelő igényeinek megfelelően alakítható.

A részletek után érdeklődni lehet az info@kromkorm.hu címen.

A TERVEZETT PROGRAM:

Folyadékkromatográfia				
2019. 04. 01. (Hétfő)	04. 02. (Kedd)	04. 03. (Szerda)	04. 04. (Csütörtök)	04. 05. (Péntek)
A folyadékkromatográfia alapjai – I. (alapfogalmak, alapösszefüggések)	Folyadékkromatográfias technikák – I. (NP, RP)	Gyors folyadékkromatográfia (UHPLC, héjszerű töltetek, monolitok)	Módszeroptimalizálás – I. (kísérlettervezés)	Fehérjevizsgálati módszerek – I. (alapok, RP)
A folyadékkromatográfia alapjai – II. (gradiens elúció)	Folyadékkromatográfias technikák – II. (RP, HILIC)	Gyakorlati tippek, trükkök, mintaelőkészítés	Módszeroptimalizálás – II. (optimalizáló szoftverek)	Fehérjevizsgálati módszerek – II. (HIC, HILIC)
A folyadékkromatográfia műszerezettsége	Folyadékkromatográfias technikák – III. (Királis)	Ionkromatográfia (IC)	Módszeroptimalizálás – III. (esettanulmányok)	Fehérjevizsgálati módszerek – III. (IEX, SEC)
Gázkromatográfia			Tömegspektrometria	
04. 08. (Hétfő)	04. 09. (Kedd)	04. 10. (Szerda)	04. 11. (Csütörtök)	04. 12. (Péntek)
A gázkromatográfia alapjai	Gázkromatográfias mozgófázis választás és állófázis típusok	Gyakorlati tippek, trükkök	A tömegspektrometria alapjai	LC/MS – I. (ionizáció, analizátorok)
A gázkromatográfia műszerezettsége – I. (gázrendszerek, mintabevitel)	Gőztéranalízis	Mintaelőkészítés	GC/MS – I. (ionizáció, fragmentáció)	LC/MS – II. (tandem tömegspektrometria, spektrumelemzés)
A gázkromatográfia műszerezettsége – II. (hőmérséklet programozás, detektálási lehetőségek)	Minőségi és mennyiségi elemzés	A gázkromatográfia alkalmazási területei	GC/MS – II. (spektrumelemzés)	LC/MS – III. (proteomika)

pH-kontroll a folyadékkromatográfiá- ban

II. – ammónium-acetát

Kormány Róbert
Egis Gyógyszergyár Zrt.

Bevezetés

A folyadékkromatográfiában (LC) a gyengén savas vagy bázikus (protonfunkciós) csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásakor pH kontrollt kell alkalmazni, hogy a protonfunkciós csoportot tartalmazó vegyületek retenciója állandó legyen, melyhez különböző puffereket állnak rendelkezésre. A puffer minőségének és mennyiségének megválasztása alapvető fontosságú. A kiválasztás szempontjai lehetnek a vizsgálandó minta pKa értéke, víz-szerves oldószerben lévő oldhatóság és a detektálás módja.

Napjaink egyik legfontosabb analitikai mérőrendszere a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS). Míg a folyadékkromatográf a vizsgálandó vegyületeket fizikai kémiai (kromatográfiás) tulajdonságaik alapján, addig a tömegspektrométer a kromatográfól eluálódó komponenseket az ionizációt követően tömeg/töltés (m/z) viszonya alapján választja el. Az LC-MS kapcsolat során folyadékkromatográfól eluálódó komponenseket a kondenzált fázisból gázfázisba (nagyvákuumba, ~10-6 torr) kell juttatni és a vizsgálandó komponensekből töltéssel rendelkező ionokat kell létrehozni, csak ezt követően történhet meg a tömegspektrometriás analízis. Ezt a kettős feladatot a folyadékkromatográfot a tömegspektrométerrel összekötő kapcsolóelem (interface, ionforrás) látja el, ahol első lépésként a mozgófázist atmoszférius körülmények között elpárologtatjuk, majd a vákuumot két lépcsőben csökkentjük. Az LC-MS kapcsolat nagyon fontos kérdése a pufferkompatibilitás, csakis ún. illékony pufferek használhatók kis ionerősséggel (1–10mM), melyek a mozgófázissal együtt elpárolognak.

Ebben a tanulmányban az egyik leggyakrabban használt MS-kompatibilis mozgófázis összetevő, az ammónium-acetát ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NH_4OAc) híg vizes oldatának a folyadékkromatográfia szempontjából fontos tulajdonságai kerülnek bemutatásra.

Az NH_4OAc , mint puffer

A folyadékkromatográfiás szelektivitást jelentősen lehet befolyásolni a pH változtatásával. A protonfunkciós vegyületek retenciója változik annak függvényében, hogy ionizált vagy ionvisszaszorított formában van a molekula. Ionvisszaszorított formában mindig nagyobb retenciót

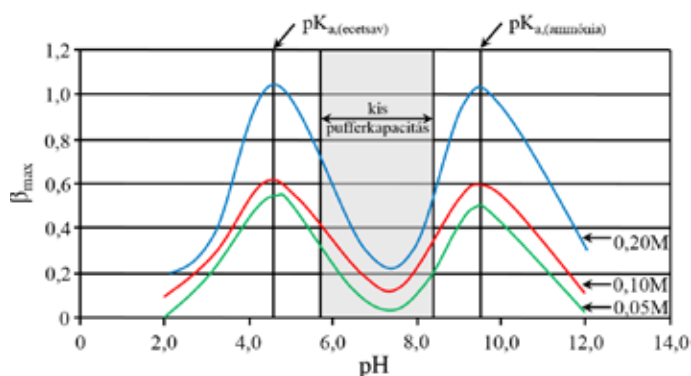
várhatunk. Ez savas csoportot tartalmazó vegyületek esetén $\text{pKa}-2$, bázikus csoportot tartalmazó vegyületek esetén $\text{pKa}+2$. A $\text{pKa}\pm 2$ közötti értéken a mozgófázis pH-nak jelentős, retenciót befolyásoló hatása lesz az elválasztásra. Ez egyrészt előnyt jelenthet a szelektivitás befolyásolása szempontjából. Másrészt hátrány, mert kis pH eltérések jelentős retenciósi időbeli eltéréseket eredményezhetnek, vagyis a folyadékkromatográfiás módszer nem lesz robusztus.

A pufferek folyadékkromatográfiás alkalmazásánál fontos szempont, hogy a legkisebb koncentrációban alkalmazzuk. Ahhoz, hogy ez a feltétel teljesüljön, az kell, hogy a pufferkapacitás az adott pH értéken nagy legyen, ez a puffer $\text{pKa}\pm 1$ -es pH tartományban megfelelő. Az NH_4OAc ugyan nem valódi puffer, hiszen a valódi pufferrendszerek gyenge savnak/bázisnak, és annak erős bázissal/savval alkotott sójának oldata, az NH_4OAc pedig egy gyenge savnak (ecetsav, $\text{pKa}=4,8$) és egy gyenge bázisnak (ammónia, $\text{pKa}=9,2$) a sója, a kromatográfiás szaknyelvben mégis a puffer elnevezés terjedt el az NH_4OAc esetében is.

$$\text{pH}_{\text{NH}_4\text{OAc}} = \frac{1}{2}(\text{pK}_{a,\text{ecetsav}} + \text{pK}_{a,\text{ammónia}}) = \frac{1}{2}(4,8 + 9,2) = 7,0 \quad (1)$$

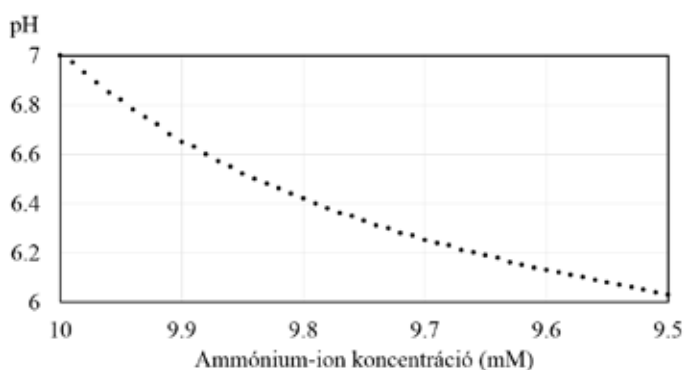
Nagy előnye, hogy olyan folyadékkromatográfiás detektorokkal is kompatibilis, amelyeknél a detektálás előtt a mozgófázist el kell párologtatni (pl. MS, ELSD), hiszen az illékony ecetsavra és ammóniára bomlik, ezen kívül MS-ben az ionforrásban keletkező NH_4^+ segíti a vizsgálandó komponensek ionizációját. UV detektálásnál problémát jelenthet, hogy az acetátnak viszonylag nagy UV-elnyelése van (UV cut-off 210nm, 10mM), mely az alacsony hullámhosszon detektálható komponensek kimutatási határát megnöveli.

Az NH_4OAc -nak két pH tartományban van maximális pufferkapacitása (1. ábra), a savas tartományban az ecetsav és bázikus tartományban az ammónia pKa értékek körül ($4,8\pm 1$ és $9,2\pm 1$). Az 1. ábrán jól látható, hogy $\text{pH}=5,8-8,2$ között kicsi, míg $\text{pH}=7,0$ körül (1), ahol 1:1 arányban van jelen a NH_4^+ és CH_3COO^- , pedig gyakorlatilag nincs is pufferkapacitás.



1. ábra: Az ammónium-acetát-oldat pufferkapacitása.

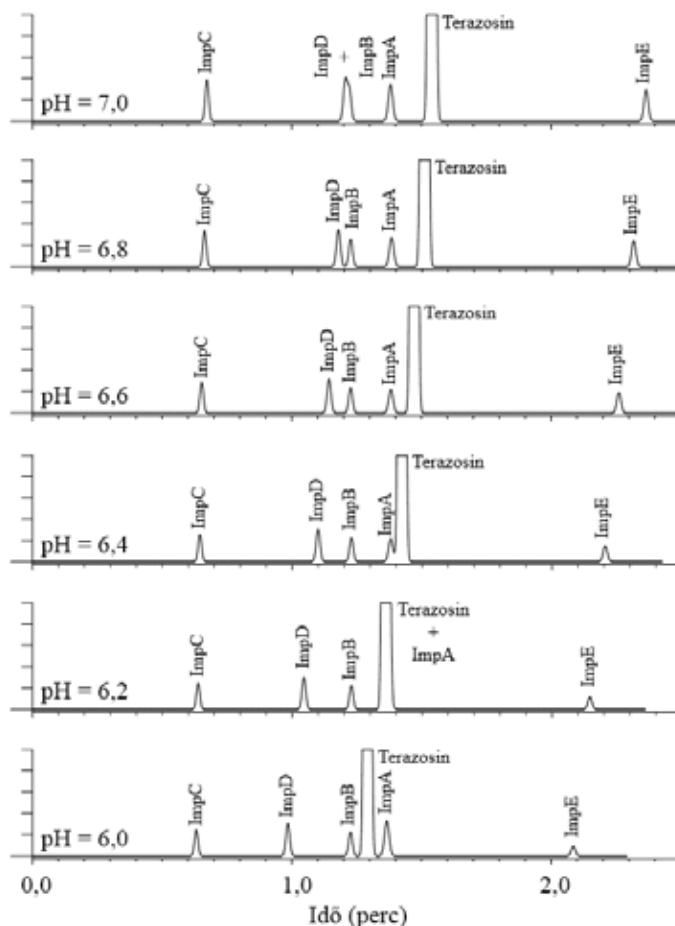
A 2. ábrán jól látható, hogy 10mM-os NH_4OAc -ban néhány százalék NH_4^+ csökkenés jelentős pH változást eredményez.



2. ábra: 10mM ammónium-acetát pH-változása az ammónium-ion koncentráció csökkenése esetén.

Hogyan készítsünk NH_4OAc -puffert?

Legegyszerűbb oldatkészítési eljárás, ha fogjuk a vegyszergyártó cégek által forgalmazott NH_4OAc -ot és bemérjük a kívánt mennyiséget, pl. 10mM-os oldat elkészítéséhez bemérünk 0,77g NH_4OAc -ot és vízzel 1L-re hígítjuk. Ennek az eljárásnak több hátránya van. Az NH_4OAc higroszkópos, vagyis vizet vesz fel a levegőből, ezért minél többször vesszük le a vegyszertároló edény tetejét, annál inkább vizesedik a só (a lezártan edényben tárolt NH_4OAc teljesen el is folyósodik). Ennek az lesz a következménye, hogy egy idő után hiába mérünk be 0,77g anyagot és hígítjuk 1L-re, annak a koncentrációja már nem lesz 10mM. Ennél is nagyobb probléma a stabilitás, vagyis hogy szilárd állapotban is bomlik az anyag. A gyártók sem adják meg pontosan az NH_4OAc -ból készíthető oldat pH-ját, legtöbb esetben egy tartományt (pl.: pH=6,7–7,3) jelölnek meg. Az általunk vizsgált NH_4OAc -okból készített 10mM-os oldatok pH-ja 6,6–6,9 között változott. Mivel pH=6,0–7,0 között kicsi a pufferkapacitás, nagyon nehézkes a pH után állítása is, hiszen könnyen a „még nem jó, még nem jó,... már nem jó” hibájába eshetünk. Pedig fontos, hogy ha a vizsgálni kívánt vegyület tartalmaz valamilyen protonfunkciós csoportot, a pH-t állandó értéken kell tartani. Erre jó példa a 3. ábrán látható gyógyszerhatóanyag (Terazosin) folyadékromatográfiás szennyezésprofil vizsgálata, pH=6,0–7,0 közötti pufferek alkalmazásával. Ebben a tartományban több komponens retencióját befolyásolja a pH, aminek hatására koelúció és retenciócseré is bekövetkezik.



3. ábra: Terazosin szennyezésprofil vizsgálata pH=6,0–7,0 közötti tartományban.

Állófázis: 50 x 2,1 mm – 1,6 μm C18, mozgófázis: puffer – acetonitril, gradiens: 15% acetonitril + 45% acetonitril / 3 perc.

Nem mehetünk el szó nélkül az NH_4OAc sóban lehetséges oldhatatlan szilárd részecskék problémája mellett sem. Az emberi szemnek tisztának tűnő mozgófázis még tartalmazhat olyan méretű részecskéket, melyek a mérés során problémát okozhatnak, pl. kitapadnak az oszlop fritten (4. ábra). Ez megnövekedett rendszeryomáshoz, romló (esetleg behasadó) csúcsalakhoz és az állófázis tönkremeneteléhez vezet, ezért a szilárd sóból készített puffereket minden esetben szűrni kell. Általánosan elmondható, hogy 5 μm -es és nagyobb szemcsés töltetek esetén elegendő a 0,45 μm -es pórustátmérőjű szűrő, míg 3 μm -es és kisebb szemcsés töltetű állófázisok esetén 0,22 μm -es pórustátmérőjű szűrőt célszerű használni, hogy elkerüljük a frit és kolonna elszennyeződését.



4. ábra: Oszlop bemeneti fritt mikroszkópos felvétele, nem szűrt NH_4OAc -puffer használata után (700x-os nagyítás).

Másik lehetőség az NH₄OAc-puffer elkészítésére (ecetsav pKa közeli pH-n), ha készítünk megfelelő koncentrációjú (1–10mM) ecetsav oldatot és azt ammónium-hidroxiddal a megfelelő pH-ra titráljuk, persze ebben az esetben gyakorlati szempontból az ecetsav, pKa±1 tartomány, vagyis pH=3,8–5,8 jöhet szóba. Mint ahogy korábban említve volt, az e fölötti pH-k beállítása nagyon nehézkes és ott a pufferkapacitás is nagyon kicsi. (Az ammónia pKa±1 tartományra nem terjedt ki a vizsgálat.)

Az ammónium-acetát oldhatósága

Az ammónium acetát nagyon jól oldódik vízben (~1,4kg/l), de metanolban is készíthetünk belőle, akár 1M-os oldatot is. Tiszta acetonitrilben viszont nem oldódik, minimális vizet kell tartalmaznia, hogy fel tudjunk benne oldani megfelelő mennyiségű NH₄OAc-ot. Ez a HILIC technika miatt lehet fontos kérdés, hiszen ott magas acetonitril mennyiség (akár 97%) szükséges a „gyenge” eluens készítéséhez. Az 1. táblázat tartalmazza az ammónium-acetát oldat koncentrációkat pH=5,0 és pH=7,0 értéknél, melyeket még sókiválás nélkül el lehet készíteni (szobahőmérsékleten). A táblázatban lévő értékekből látható, hogy pH=5,0-nél valamennyivel nagyobb pufferkoncentráció érhető el ugyanolyan

oldószer összetételénél, mint pH=7,0 esetében, de még a 7-es pH-jú ammónium-acetát is sokkal jobban oldódik acetonitril-víz elegyekben, mint a szerves pufferek. Például pH=7,0-es kálium-foszfát esetén 80% acetonitril tartalomnál csak 5mM-os oldatot készíthetünk, 90%-os acetonitril-víz elegyben pedig már gyakorlatilag oldhatatlan.

1. táblázat: Az NH₄OAc oldhatósága különböző összetételű víz-acetonitril (MeCN) elegyekben.

MeCN (V/V%)	NH ₄ OAc (mM) pH = 5,0	NH ₄ OAc (mM) pH = 7,0
70%	>50	>50
80%	>50	45
90%	25	20
95%	15	10
97%	10	5

Használt HPLC készülék eladó

EXFORMMA EX 1 600 típusú HPLC készülék

Az lenti táblázatban láthatja a fontosabb adatait, az alábbi elérhetőségen keresheti Nagy Gábort a további információkért.



A HPLC rendszer egység részei:

400bar-os analitikai izokratikus pumpa 0,001-10ml áramlási sebesség tartománnyal	EX1600HP
Automata mintaadagoló 96 férőhellyel, 96-os plate használatával	Arcus 2000
UV-Vis detektor 180-900nm hullámhossz tartományban (8ul-es átfolyócellával)	EX1600UV
Oldószer tároló tálca	EX1600TRII
Kolonnatermosztát	EX1600COII
EX1600 kiértékelő és vezérlő szoftver	

A készülék megtekinthető, kipróbálható és igény szerint egyszerűen/kedvező áron bővíthető gradiens rendszerré.

Kitűnő megkímélt állapot, kihasználatlanság miatt eladó.

Elérhetőség:

Nagy Gábor

laborvezető
Analkrom Kft.

Tel./fax: 06 1 280 4782
Cím: 1194 Budapest, Zombor u. 57.
E-mail: analkrom@pannongsm.hu
Mobil: 06 20 9382 052

Az SPE módszerfejlesztés alapjai

fordította: Szabó Géza
Gen-Lab Kft.

Forrás: Phenomenex Ltd., General Methods and User Guide

A különböző környezeti és élelmiszeripari minták szilárd fázisú extrakciós előkészítésének kialakításában érdemes figyelembe venni néhány fontos dolgot. Az egyik legnagyobb probléma az lehet, hogy hogyan szabaduljunk meg a minta mátrixtól, amely komoly gondokat okozhat a későbbi kromatográfiás méréseknél, úgymint MS detektálás esetében az alacsony kimutatási határ, máshol a zavaró komponensek eltávolítása miatt lehet ez egy fontos lépés.

Minta előkészítési javaslatok az egyes mátrixok esetében:

Minta mátrix	
Víz (természetes vizek, szennyvíz, stb.)	pH beállítás és szűrés
Szilárd, üledékes	Homogenizálás mintától függően szerves vagy vizes oldószerben, ezután ülepités, dekantálás és felülúszó szűrése, végül Soxhlet extrakció.
Kenőcsök, krémek	Olajos bázisúak: Oldás apoláros szerves (hexán) oldószerben és extrahálás poláros SPE oszlopon Vizes bázisúak: Oldás vízben vagy vízzel elegyedő szerves oldószerben (metanol) és extrahálás apoláros SPE oszlopon.
Gyümölcsök, zöldek és gyógynövények	Homogenizálás mintától függően szerves vagy vizes oldószerben (hexán -> poláros mechanizmus; vizes oldószer -> apoláros mechanizmus, illetve metanol/acetonnitril bármely esetben), szűrés, majd megfelelő SPE oszlop alkalmazása.

Biológiai minták (folyadék)	
Vizelet, vér, szérum, plazma stb.	Minta hígítása 1:2 arányban megfelelő pufferrel, fehérjék kicsapása (ZnSO ₄ vagy ACN), glükuronidek hidrolizálása, fehérjekötések felbon-tása (enzimatisus, sav-bázis reakció, ultrahangos eljárás)

Biológiai minták (szilárd)	
Szerves szövet, ürülék stb.	Homogenizálás mintától függően szerves vagy vizes oldószerben, ezután ülepités, dekantálás és felülúszó szűrése. Mátrix-szilárd fázisú diszperziós (MSPD) extrakció alkalmazása.

A szilárd fázisú extrakciós módszerek kivitelezése általában 12-24 férőhelyes vákuumkád, ritkábban automatizált készüléken folyik, azonban a módszerfejlesztést lehetséges ezen berendezések nélkül is lefolytatni. Egy fecskendő és egy speciális feltét segítségével egyszerűen elvégezhetőek a próbamérések.

Módszerfejlesztéséhez kérje feltétünket és SPE oszlop mintacsomagjainkat!

A különböző típusú töltetek esetében ajánlott elúciós térfogatok az alábbi táblázatban találhatóak:

Szilika bázisú töltetek tömege	Praktikus minimum mosási és elúciós térfogatok	Ajánlott mosási és elúciós térfogatok	Polimer alapú töltet mennyisége	Praktikus minimum mosási és elúciós térfogatok	Ajánlott mosási és elúciós térfogatok
10 mg	60 µl	120 µl	10 mg	100 µl	200 µl
---	---	---	30 mg	300 µl	600 µl
50 mg	300 µl	600 µl	---	---	---
---	---	---	60 mg	600 µl	1.2 ml
100 mg	600 µl	1.2 ml	100 mg	1 ml	2 ml
150 mg	900 µl	1.8 ml	150 mg	1.5 ml	3 ml
200 mg	1.2 ml	2.4 ml	200 mg	2 ml	4 ml
500 mg	3 ml	6 ml	500 mg	5 ml	10 ml
1 g	6 ml	12 ml	1 g	10 ml	20 ml
2 g	12 ml	24 ml	---	---	---
5 g	30 ml	60 ml	---	---	---
10 g	60 ml	120 ml	---	---	---

* A polimer alapú tölteteknek magasabb a fajlagos felülete, ezért tömegre vonatkoztatva kicsivel több oldószert igényelnek. Az elúciós térfogatok az elválasztandó vegyületek természetétől is függenek. Az adatok csupán iránymutatók, további módszerfejlesztést igényelhetnek.

A különböző minta mátrixok esetében eltérő töltetmennyiségek is javasoltak. A szilika alapú SPE állófázisoknál az alábbi tömegek javasoltak.

Minta mátrix	Töltet tömege
Vér, szérum, plazma	50 mg töltet / 250 µl minta
Vizelet	50 mg töltet / 250 µl minta
Szűrt szövet homogenátum	100 mg töltet / 100 mg minta
Környezeti minták	Töltet tömege
Ivóvíz (Makroszemcséktől mentes)	500 mg - 100 ml / 500 ml minta
Víz (Makroszemcsét tartalmazó): folyóvíz, szennyvíz stb.	1 g - 100 ml / 500 ml minta
Talajminta	1 g - 100 g szilárd extraktum

Az SPE oszlopok kiválasztásánál érdemes figyelembe venni, hogy a szilika alapú töltetek esetében a kapacitás 1 tömeg%-ra tehető, míg a polimer alapú töltetek esetében ugyanez az érték már 5-10% körüli, így kevesebb töltet is elegendő. Emellett az utóbbi típusok pH=1-14-ig használhatók.

Minta mátrix	Töltet tömege	Strata-X, X-C, X-CW, X-A, X-AW	Strata-XL, XL-C, XL-CW, XL-A, XL-AW
Vér, szérum, plazma	30 mg	250 µl	125 µl
Vizelet	30 mg	1 ml	500 µl
Szűrt szövet homogenátum	60 mg	100 mg	50 mg
Környezeti minták	Töltet tömege	Strata-X, X-C, X-CW, X-A, X-AW	Strata-XL, XL-C, XL-CW, XL-A, XL-AW
Ivóvíz (szűrt)	200 mg	100 - 400 ml	50 - 200 ml
Víz (természetes víz, szennyvíz stb.)	500 mg	100 - 400 ml	50 - 200 ml
Talajminta	500 mg	100 g	50 g

A különböző SPE állófázisok esetében használatos legalapvetőbb módszerek:

Strata® -X-C / Strata-XL-C

Erős kationcserélő és fordított fázis

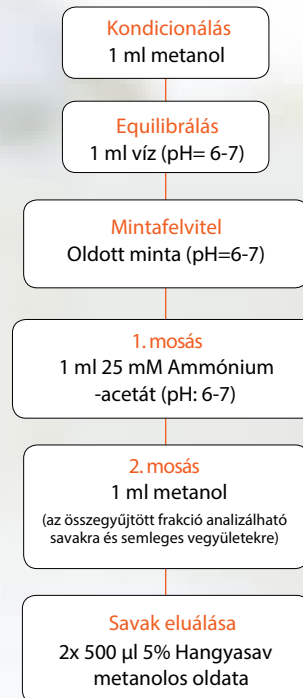
$pK_a \leq 10.5$ bázisokhoz



Strata-X-A / Strata-XL-A

Erős anioncserélő és fordított fázis

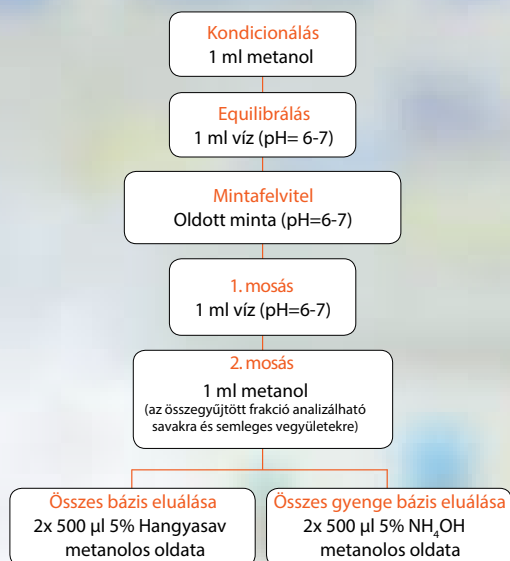
$pK_a > 2$ savakhoz



Strata-X-CW / Strata-XL-CW

Gyenge kationcserélő és fordított fázis

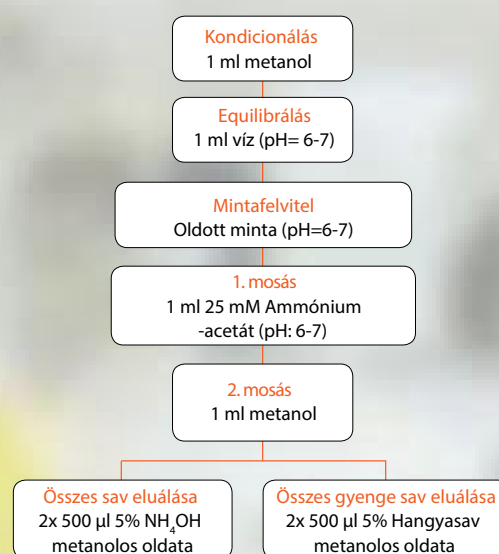
$pK_a > 8$ bázisokhoz



Strata-X-AW / Strata-XL-AW

Gyenge anioncserélő és fordított állófázis

$pK_a \leq 5$ savakhoz



Strata-X / Strata-XL Fordított fázis



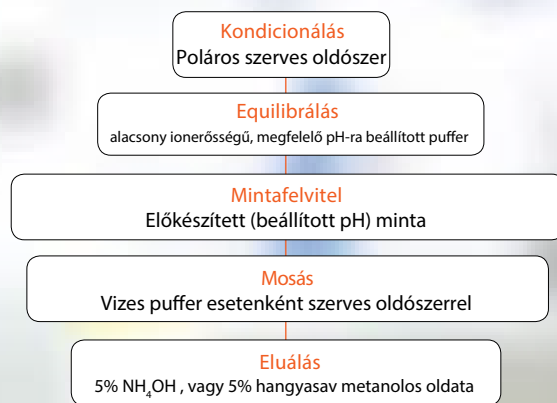
semleges vegyületekhez



Strata SCX, WCX, SAX, NH₂ (WAX) Ioncserélő fázis



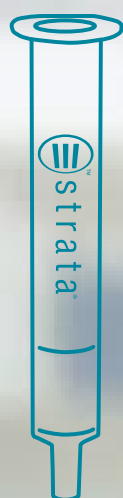
töltött, vagy ionizált vegyületekhez



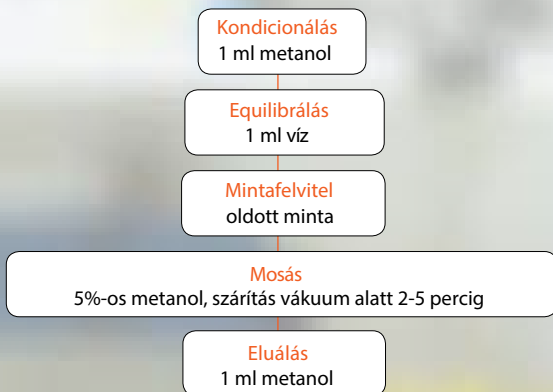
Javasolt elúciós oldószer

A minta teljes ionizáltságának eléréséhez a pH-t 2-vel a mérendő vegyület pKa értéke alá, vagy felé kell beállítani. Megfelelő pH-val az állófázis vagy a vegyület semlegesíthető.

Strata[®] C18, C8, Phenyl, CN, SDB-L Fordított fázis



hidrofób vegyületekhez



Javasolt elúciós oldószer

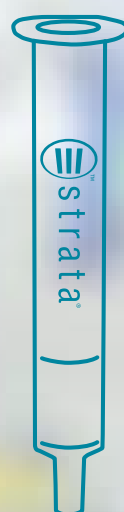
- THF
- Aceton
- Etil-acetát
- Acetonitril
- IPA
- Metanol

Polaritás

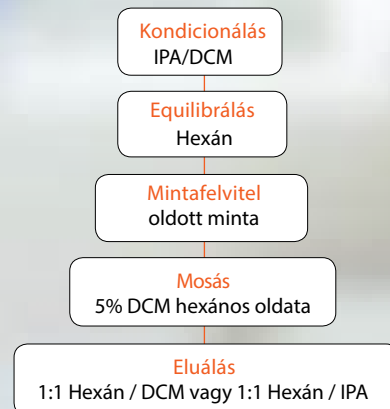
növekvő polaritás

Poláros

Strata Silica, Florisil, NH₂, CN Normál fázis



poláros visszatartáshoz



Javasolt elúciós oldószer

- Hexán
- Metilén-klorid
- THF
- Aceton
- Acetonitril
- IPA

Polaritás

legapolárosabb

növekvő polaritás

poláros

További információ a MKE Csongrád
Megyei Csoportjának honlapján található:
www.mke-szeged.hu



A Magyar Kémikusok
Egyesülete Csongrád
Megyei Csoportja és az MTA
Szegei Akadémiai Bizottság
Kémiai Szakbizottsága
tisztelttel meghívja Önt
és munkatársait az



50.

**Kromatográfias
Továbbképző
Tanfolyamra**

2019. január 28-30.

Szeged

MTA SzAB Székház

Hová tűnt ... ?

Avagy keressük meg az oldószert, amit nem találunk

Szász-Vadász Tas
Gen-Lab Kft.

Egy érdekes beszélgetésben volt részem a minap, egy hulladékkezelő cég munkatársával, mi szerint az év közben kiadott és visszaérkezett oldószer mennyiségek között tonnában mérhető a különbség. A számok mögé gondolva sok okot felsorakoztathatunk, ebben a rövid írásban egy olyan tényezőre világítok rá, amit a kromatográfias gyakorlatban tapasztalhatunk ezzel kapcsolatban. Vajon belegondoltunk-e abba, hogy a készülékeink eluens üvegeiből, illetve a hulladék oldószer gyűjtő edényeinkből mennyi oldószer párologhat el a mindennapos munka során?

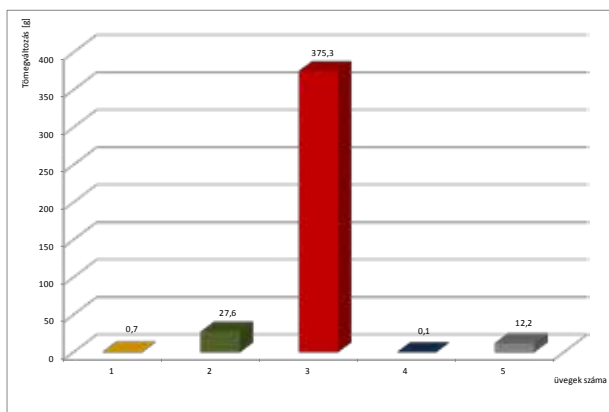
Az alábbi kísérleteket végeztük el annak tisztázására, hogy mekkora lehet az az oldószermennyiség, mely naponta elpárolog a készülékek edényeiből, ezzel is a környezetünket terhelve.

I. kísérlet

Metanolt töltöttünk 5db 1l-es laboratóriumi üvegbe, melyeket különböző módon zártunk le, és tettük elszívófülkébe, szobahőmérsékleten.

- üveg1 – visszacsapó szeleppel szerelt biztonsági kupak az üvegen, a kapilláris bevezető furata vak dugóval zárt
- üveg2 – 3db 3,2mm átmérőjű furat a kupak tetején
- üveg3 – kupak nélkül, nyitott tetővel
- üveg4 – az üveghez szállított kupakkal zártuk az üveget
- üveg5 – alumínium fóliával takart szájnylás

A feltöltött üvegek tömegét megmértük a kísérlet elején, majd 10 nap elteltével. A kapott eredményeket, tehát a különböző üvegekből elpárolgott oldószermennyiségeket a 1. ábrán mutatom be. Láthatjuk, hogy a zártnak tekinthető rendszerekből viszonylag kevés oldószer hiányzik, míg a nyitott üvegből jelentős az oldószerteljesítés. A kísérletből jól látszik, hogy minél jobban csökkentjük az edény szájnylását, annál kisebb lesz az elpárolgott oldószerteljesítés.



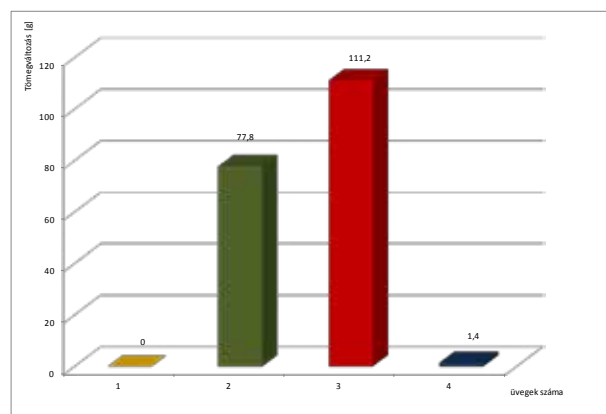
1. ábra: I. kísérlet során, 10 nap alatt elpárolgott oldószerteljesítés a különböző módon zárt üvegekből

II. kísérlet

Acetonitrilt töltöttünk 4db 1l-es laboratóriumi üvegbe, melyek tetejét az alábbi módokon zártuk.

- üveg1 – Waste biztonsági kupakkal zártuk az üveg tetejét, a kapilláris bevezető furata vak dugóval zárt
- üveg2 – 2db 8mm átmérőjű furat az üveghez szállított kupakon
- üveg3 – kupak nélkül, nyitott tetővel
- üveg4 – az üveghez szállított kupakkal zártuk az üveget

Mind a 4 kísérleti üveg tömegét megmértük a bemérések után, majd 53 nap elteltével. Az üvegeket szobahőmérsékleten tartottuk és nem alkalmaztunk elszívást, levegőcserét a kísérlet alatt. A kapott tömegváltozásokat a 2. ábrán mutatom be.



2. ábra: II. kísérlet során, 53 nap alatt elpárolgott oldószerteljesítés a különböző módon zárt üvegekből

A kísérleti eredményekből jól látszik, hogy a nyitott üvegeken keresztül a kísérlet időtartama alatt akár 100g oldószerteljesítés is elpárolgott, míg a zárt üvegekből nincs, vagy elhanyagolható az oldószerteljesítés. Érdekeséggé válhat, hogy a biztonsági kupakkal zárt edény tömege ugyan nem változott, de a szorbens tömege 2,2g-al nőtt, tehát megállapítható, hogy annak ellenére, hogy nincs a kipufogón átmenő térfogatáram, a szorbens a párolgott oldószert megköti. A gyári kupakkal lezárt edényből történt oldószerteljesítés, ez arra vezethető vissza, hogy a kupakhoz használt tömítés nem biztosítja az edényzet teljesen zárt állapotát.

Mindkét kísérlet során a nyitott edényből jelentős mennyiségű oldószerteljesítés párologott el, mert ehhez az üveg szájnylása viszonylag nagy felületet biztosít. Ha azt a tényezőt is számításba vesszük, hogy a gyógyszeripari analitikai laborokban naponta többszöri légcseré történik, így ez a nyitott edényzetekből tovább gyorsítja az oldószerteljesítést. A méréseinkhez használt eluensek nagy része, illetve a hulladék oldószerteljesítés tartalmá szerves oldószerteljesítés, mindez a károsanyag párologás forrása lehet. Egy nagyobb analitikai labor esetén, ahol több tíz készülék is található, az elpárolgott oldószerteljesítés éves szinten elérheti a száz kilógrammos nagyságrendet is. Amellett, hogy ez az érték viszonylag magas a környezetterhelés és egészségügyi kockázatok szempontjából, gazdasági megfontolások alapján sem elhanyagolható.

Mennyire biztonságos vizet injektálni egy GC "készülékbe"?

fordította: Bálint Balázs
Gen-Lab Kft.

Forrás: Phenomenex Ltd., *Is Water Safe To Inject In Gas Chromatography?* Írta: Badaoui Omais

Rengeteg kérdést vet fel gázkromatográfiát használók körében a víz injektálásának lehetősége. Más felhasználókkal konzultálva, vagy az internetes portálokat böngészve négy alapvető kérdésbe futhatunk bele:

1. Oldja-e a víz a gázkromatográfiás állófázist?
2. Hozzátapad-e a víz a GC oszlophoz?
3. Kompatibilis-e a vizes minta az inlettal?
4. Mennyire nedvesíthetőek a GC fázisok vízzel?

Elveszett a pletykák tengerében? Szeretné tudni az igazságot? Csak folytassa az olvasást.

1. Oldja-e a víz a gázkromatográfiás állófázist?

Igen is, meg nem is. Manapság, a kapilláris oszlopok állófázisainak többségére lehet vizet injektálni, mivel azok megerősített, térhálósított módon vannak a szilikáshoz kötve. A Zebron® poli(dimetil-sziloxán) (PDMS) és polietilén-glikol (PEG) állófázisok mindegyike térhálósított.

Az ESC (Engineered Self Crosslinkage) technikának köszönhetően a lenti McReynolds skálán felsorolt állófázisok egyike sem hajlamos oldódásra, szemben a régebbi típusú állófázisokkal, melyek nem voltak fizikailag az oszlophoz kötve, mint a töltetes kolonna és korai kapilláris kolonnák.

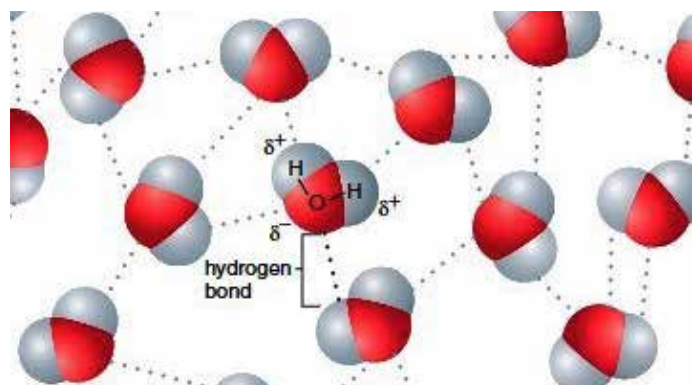
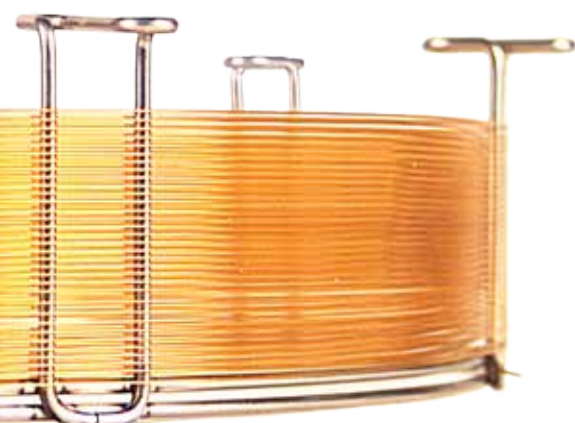
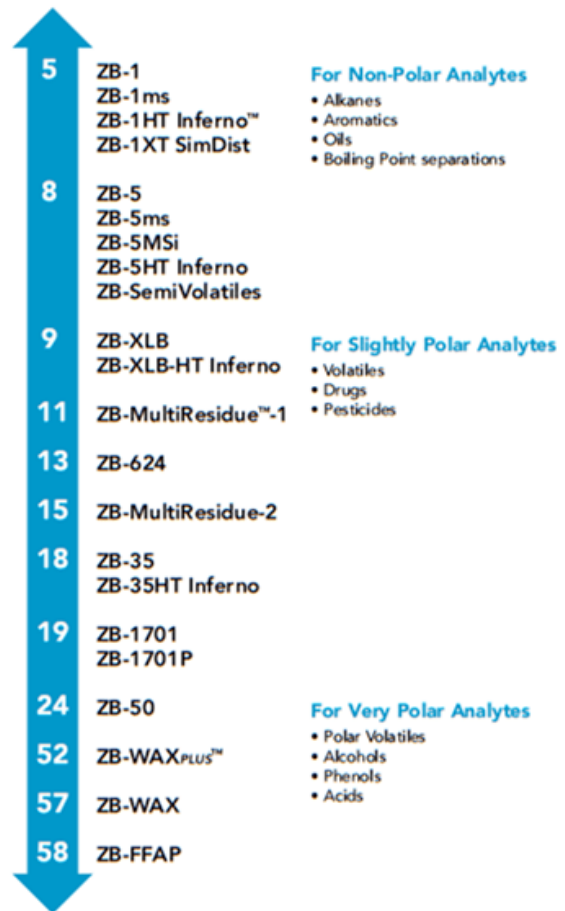
2. Vajon hozzátapad-e a víz a GC kolonnához?

Menjünk vissza az alapokhoz.

Ha a kemence hőmérséklete elég magas ($>120^{\circ}\text{C}$), a víz könnyedén eluálódik a kolonnáról. Ez igaz a fenti McReynolds skálán felsorolt kapilláris kolonnákra, kivéve a ZB-WAX kolonnát.

A WAX kolonna állófázisa polietilén-glikol, mely erős hidrogén hidas kölcsönhatásba lép a vízzel. Számos injektálás során a víz adszorbeálódik, ráépül a fázisra, mely folyamat végül a kolonna szelektivitásának megváltozásához vezet. Ráadásul, ha a térhálósítás nem tökéletes, a víz sorozatos injektálásának hatására az állófázis lemosódhat. Ebből adódóan a retenciók idői elcsúsznak és a módszer nem lesz reprodukálható.

Selected Zebron Polarities



Ha mégis a PEG fázis lenne megfelelő szelektivitású, a ZB-WAXPlus a megoldás vizes minták esetén. Ez a fázis hasonló szelektivitású, mint a ZB-WAX azonban kitűnő stabilitást mutat vizes mintákkal szemben. Többszöri, vagy rutinszerű vízinjektálás sem változtatja meg a fázis hatékonyságát vagy polaritását. Ez a megoldás megfelelő vízdoldható minták, mint például az alkoholtartalmú italok vagy a glikolok esetén.

3. Kompatibilis-e a vizes minta az injektorokkal?

Habár a vízminták kompatibilisek a GC injektorokkal, különleges óvintézkedéseket kell tenni a víz halmazállapot változásakor fellépő rendkívül nagy térfogatváltozás miatt.

Míg 1 µl diklórmétán mindössze 361 µl térfogatra tárgul a 200°C-os inletben 10psi fejnnyomás mellett, addig ugyanezen térfogatú víz 1279 µl gőztérfogatot produkál.

A linereknek korlátozott térfogata miatt nem hagyhatjuk figyelmen kívül ezt a rendkívül nagy térfogatváltozást. Ha ez a térfogatváltozás nagyobb, mint a liner térfogata, a keletkező gőzök vissza tudnak áramlani a fűtéssel nem rendelkező vivőgáz áram vezetékébe és a későbbi mérésekben keresztzennyezést okozhatnak. Éppen ezért vizes minták esetén kis injektálási térfogatok alkalmazása szükséges.

Egy standard 78,5 mm hosszú és 4 mm belső átmérőjű Z-liner térfogata 493 µl, amely térfogat messze elmarad a fent említett 1 µl vízből keletkező vízgőz térfogatától.

4. Mennyire nedvesíthetőek a GC fázisok vízzel?

A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható WCOT állófázissal szemben a víz nagyon magas felületi energiával rendelkezik. Következésképpen, a víz nagyon rosszul nedvesíti az állófázisokat. A gyártók a használt deaktivációs eljárással az állófázisok felületi energiáját csökkentik, ebből következően a nedvesíthetőség valójában növelhető is lenne, de ezzel feláldoznánk az inertséget és ez aktív anyagok esetén igen széles csúcsokat eredményezne. (Grob et. Al, J. Chrom. A; 473, 381-390 – 1989).

A mítosz, mely a víz és a GC inkompatibilitásáról szól, történelmi eredetű és még abból az időből ered, mikor az állófázisok nem voltak kémiaiilag kötve a hordozóhoz. A Phenomenex csak kémiaiilag kötött állófázissal rendelkező kolonnákat gyárt, így mindegyik vízzel kompatibilis. Az egyetlen kivétel a ZB-WAX, melynek reprodukálhatósága vizes minták injektálása után jelentősen romlik. Vizes minták esetén válasszuk inkább a ZB-WAXPlus kolonnát.

A vizes minták injektálásánál felmerült problémák többségét a halmazállapot változás során fellépő térfogatváltozás okozza, mely a fent említett visszaáramlás okozója. Az injektált térfogat és az injektor hőmérsékletének csökkentése segíthet ezen probléma megelőzésében.

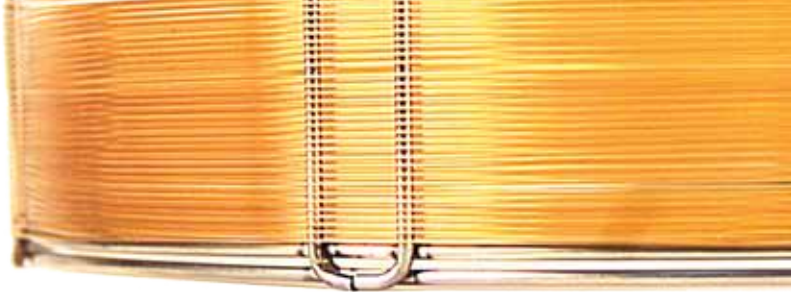
Ha bármilyen kérdése lenne, keresse a Phenomenex szakértőit a Live Chaten:

www.phenomenex.com/chat



A Shimadzu LC- és GC-MS készülékek bemutatása

Kővágó Márton, Juhász Tamás, Vincze Lajos,
Simkon Kft., 1163, Budapest, Színjátzó utca 30.



A Shimadzu LC-MS készülékek fejlesztése során számos szabadalom született, amelyek segítségével a gyors és pontos LC-MS(MS) mérések könnyen megvalósíthatóvá váltak.

A Shimadzu LCMS-2020 készüléke (1. ábra) abban az esetben kitűnő választás, ha a mérési feladat során elegendő egy egyszeres kvadrupól. Ezzel a készülékkel rutin mérési feladatokat könnyen és gyorsan tudunk elvégezni, kevés karbantartást igényel, és robusztus működéssel számolhatunk.

A hármass kvadrupól készülékek közül a csúcs kategóriát az LCMS-8060 készülék képviseli (2. ábra), amely érzékenységben és gyorsaságban a tömegspektrométerek között kiemelkedően teljesít. Az LCMS-8050 és LCMS-8045 a csúcs készülék mellett a belépő, illetve a közepes szintű készülékeket képviselik, amelyek esetében lehetőség van upgrade-re. Tehát, ha a mérési feladataink során egyre nagyobb igényeknek kell megfelelnünk, lehetőségünk van a kisebb tudású készülékünket magasabb szintűre átépíttetni, ezáltal nem veszítjük el a készülékbe fektetett pénzünket.

A Shimadzu LCMS-9030 Q-TOF készülék (3. ábra) a család legfrissebb tagja, a nagy felbontást igénylő feladatokhoz szükséges, pontos tömeg meghatározására, minőségi, valamint mennyiségi mérésekre is alkalmas.

A Shimadzu alábbi LC-MS szabadalmi lehetőségei teszik a készülékek mindennapos kiemelkedő működését:

HESI, melegített elektro-szpré kapilláris, amely lehetővé teszi a magas hőmérsékletre melegíthető ion blokkal és a szintén melegíthető desolvation line-al (DL) az LC-MS-ről érkező nagy mennyiségű folyadékáram hatékony elpárologtatását.

DUIS ionizáció, amely lehetővé teszi a szimultán ESI és APCI ionizációt, egyszerre van jelen a rendszerben a feszültség alatti elektro-szpré kapilláris és a korona tű, így a molekulának több lehetősége van ionizálódni, mint egy szimpla ionforrás esetén (4. ábra).

UF-QArray™ ionfókuszáló alagút optimált geometria tervezésének köszönhetően és a kialakult ideális elektromágneses tér hatására az ionok trajektóriáját (mozgásuk útját) térben és időben megfelelően fókuszálja, így biztosítja a töltéssel rendelkező részecskék nagy arányú

bejutását az analizátorba. Ezzel egy időben a töltéssel nem rendelkező részecskéket a kialakult erőviszonyok eltávozásra kényszerítik, így a jel/zaj arány, vagyis az érzékenység növekszik.

UF-Lens™ multipólusú RF ionlagút segítségével még tovább történik az ionok fókuszálása, így az első kvadrupólba még kisebb térbeli eloszlással lépnek be az ionok.

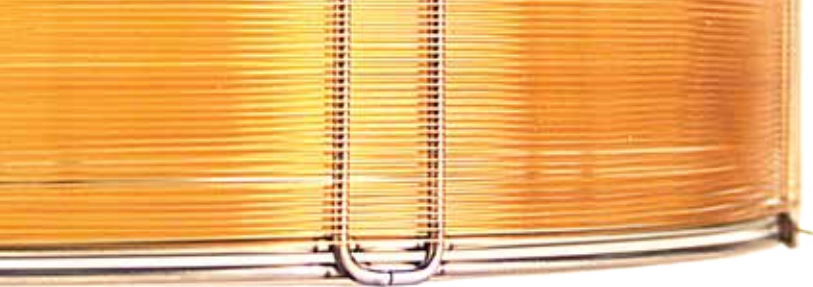
UF-Sweeper™ III ütközési cella a beépített pseudo kvadrupól ionlagút segítségével a fragmens ionok második kvadrupól felé történő gyors továbbítását biztosítja, növelve ezzel az érzékenységet és jelentősen csökkentve az egymás után következő események (event-ek) közötti áthordást, még egészen kis dwell és pause idő esetén is.

A gyors elektronika az egész rendszerre jellemző, a polaritás váltás 5 ms, a szkennelési sebesség akár 30.000 Da/s is lehet, így a gyors ciklusidővel sokkal több anyag detektálása válik lehetővé, mint lassabb készülékekkel. A készülékek egyszerű üzemeltetését biztosítják a rendelkezésre álló módszer adatbázisok, amelyek kulcsra kész LC-MS módszereket tartalmaznak. A felhasználónak csak ki kell választania, hogy melyik anyagokat szeretné mérni, majd a szoftver létrehozza a méréshez szükséges method file-t, amelyet a készülékre letöltve már el is kezdhető maga a mérés. A következő területeken érhető el módszer adatbázisok, amelyek összesen közel 3000 vegyületet tartalmaznak: törvényszéki orvostan, mikotoxinok, antibiotikumok, állatgyógyszerek, peszticidek, vízanalítika.

GC-MS készülékek

A Shimadzu GC-MS rendszerek portfóliója jelenleg egy egyszeres kvadrupólt és két tandem tömegspektrométert foglal magába. A készülékek jelenleg két különböző típusú gázkromatográfval is elérhetőek, a jól ismert GC-2010 Plus és az új GC-2030 műszerrel is. A GC-2030 készülékkel működő rendszerek NX jelzést kaptak a típusok megnevezése mellé.

Az általános analitikai feladatok ellátására előnyös választás lehet a GCMS-QP2020 NX (5. ábra). A robusztus



ionforrás és az egyszeres kvadrupól párosítása a rutin feladatok elvégzésére tökéletesen alkalmas. A GCMS-TQ8040 NX tandem tömegspektrométer a Shimadzu GCMS kutató készülékeinek belépő szintjét képezi. Ebben a kategóriában a csúcskészülék a GCMS-TQ8050 (6. ábra). Ideális választás lehet nyomanalitikai feladatok és szerkezetkutató vizsgálatok esetében.

A Shimadzu GC-MS rendszerek kiemelkedő teljesítményéhez hozzájárulnak a speciális technikai megoldások. A következőkben ezek közül kerül néhány bemutatásra. Ion források tekintetében az LC-MS rendszerekhez hasonlóan itt is több opció áll rendelkezésre. Az elektron ütközéses ionforrás (EI) az alap felszereltség része, hiszen a kvantitatív módszerek túlnyomó többségét ezzel végzik. A legtöbb GC-MS könyvtár is az EI ionizációs technikával készül, így az azonosításban és szerkezetkutatásban is nagy szerepe van. A kutató munkában azonban gyakran a molekulaion megléte a fontos, így lágyabb ionizációs technikák is előtérbe kerülhetnek.

A Shimadzu GC-MS készülékeiben jelenleg három különböző ionforrás is használható. Az EI, CI (kémiai ionizációs ionforrás) és a Smart EI/CI ionforrás. A források sematikus rajzát az 7. ábra szemlélteti. A kombinált Smart EI/CI ionforrással az EI és a CI technika egyaránt megvalósítható anélkül, hogy a készüléket ki kellene kapcsolni, és a dedikált forrásokat át kellene szerelni.

A GC-MS kvadrupól analízátorok gyors 20.000 u/sec pásztázási sebességre is képesek. Erre a teljesítményre a Shimadzu által kifejlesztett ASSPMT (Advanced Scanning Speed Protocol) technológia ad lehetőséget. A készülék így a gyors pásztázás mellett sem veszít az érzékenységéből. Ezt egy plusz gyorsító feszültség alkalmazásával éri el a készülék. A nagyobb tömegű lassabb fragmentumok így a nagy pásztázási sebesség mellett is időben be tudnak érni a detektorba. Az érzékenység stabilitását demonstrálja a 8. ábra. UF-Sweeper™ technika a GC-MS készülékben is felhasználásra került, így a 800 MRM/sec átmenet szám is biztosított. A tandem GC-MS készülékek esetében a zaj csökkentésében az Off-Axis kialakítás is szerepet játszik. Ennek a kialakításnak a lényege, hogy a két kvadrupól analízátor egymással egy enyhe szöveget zár be, így a detektor konverziós dinódájába nem csapódhat be véletlenszerűen nagy sebességű semleges molekula.

A detektor előtt közvetlenül egy zajsűrés történik. Az erre kifejlesztett Overdrive Lens technológia egy fókuszálás, amely során a nagy sebességű elektronokat és a véletlenszerű kismolekulákat szűri ki a rendszer (9. és 10. ábra).

A készülékek hatékony felhasználását a különböző spektrumkönyvtárak és módszercsomagok is segítik. A könyvtárak közül a NIST, Wiley is hozzáférhető, de speciális peszticid, illatanyag és aroma spektrumgyűjtemény is elérhető. A módszercsomagok optimalizált mérőmódszert és az analitok azonosítását segítő spektrumokat is tartalmaznak. Ilyen módszercsomagok készültek törvényszéki orvostan, peszticid és metabolomika témakörben.

A készülékek



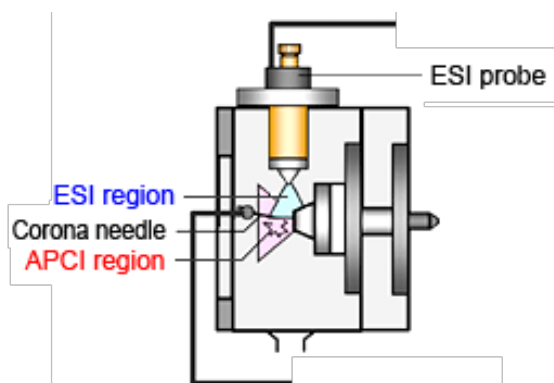
1. ábra LCMS-2020 egyszeres kvadrupól készülék



2. ábra LCMS-8060 háromszoros kvadrupól készülék



3. ábra LCMS-9030 Q-TOF készülék



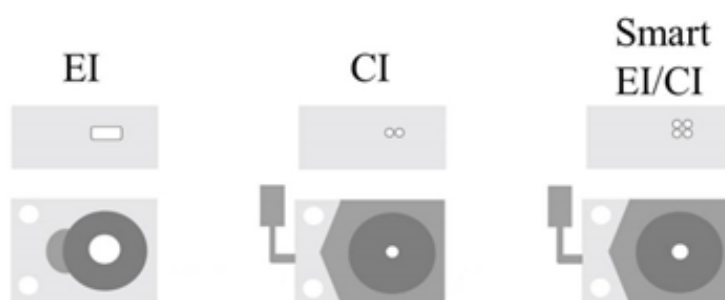
4. ábra DUIS ionizáció



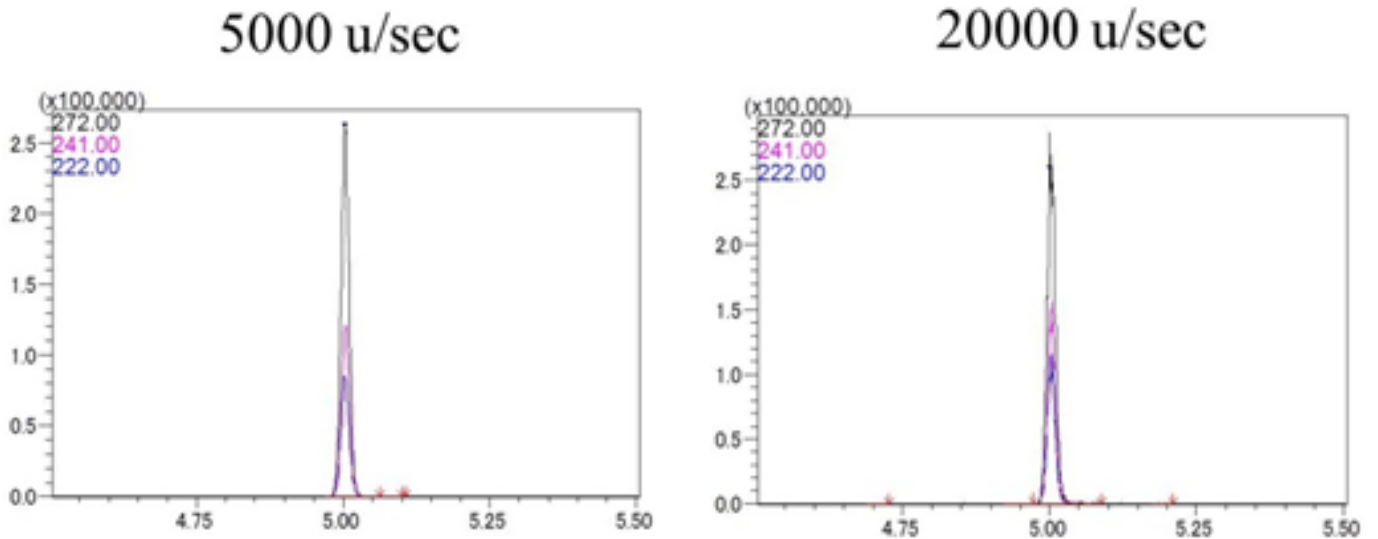
5. ábra GCMS-QP2020 NX széria az új GC-2030 gázkromatográfjal



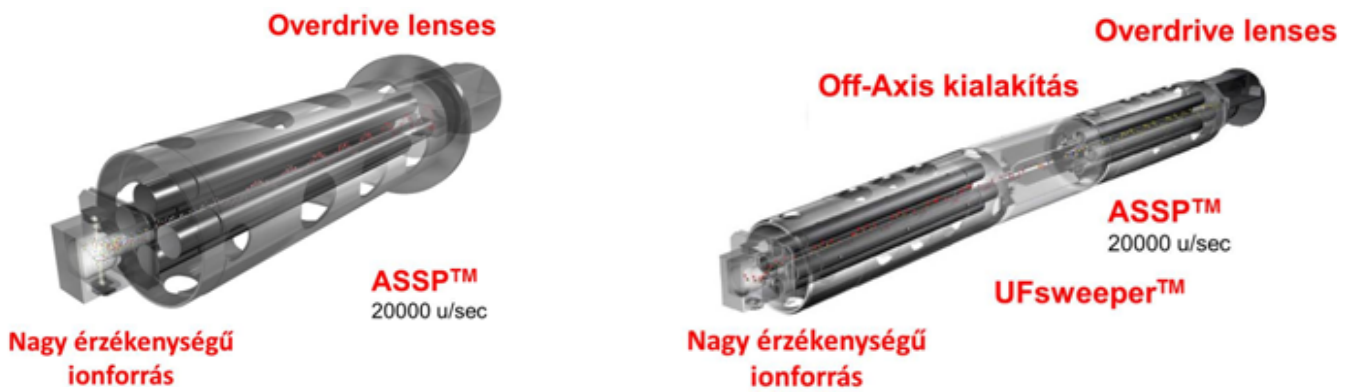
6. ábra GCMS-TQ8050 NX és a multifunkciós AOC-6000 mintaadagoló



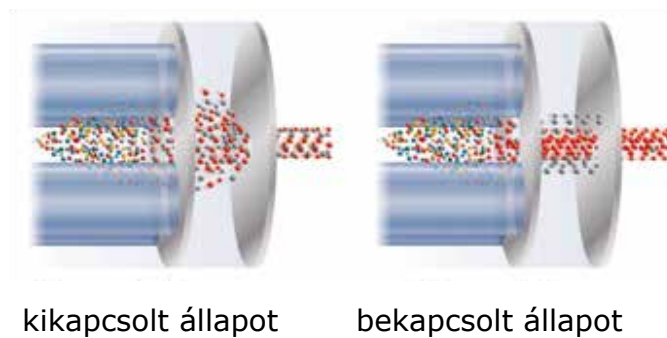
7. ábra Shimadzu GCMS Ionforrások



8. ábra 1 ppb OFN (oktafluoronaftalin) mérése 5000 és 20000 u/sec pásztázási sebesség mellett



9. ábra Shimadzu egyszeres és tandem GC-MS készülékek felépítése

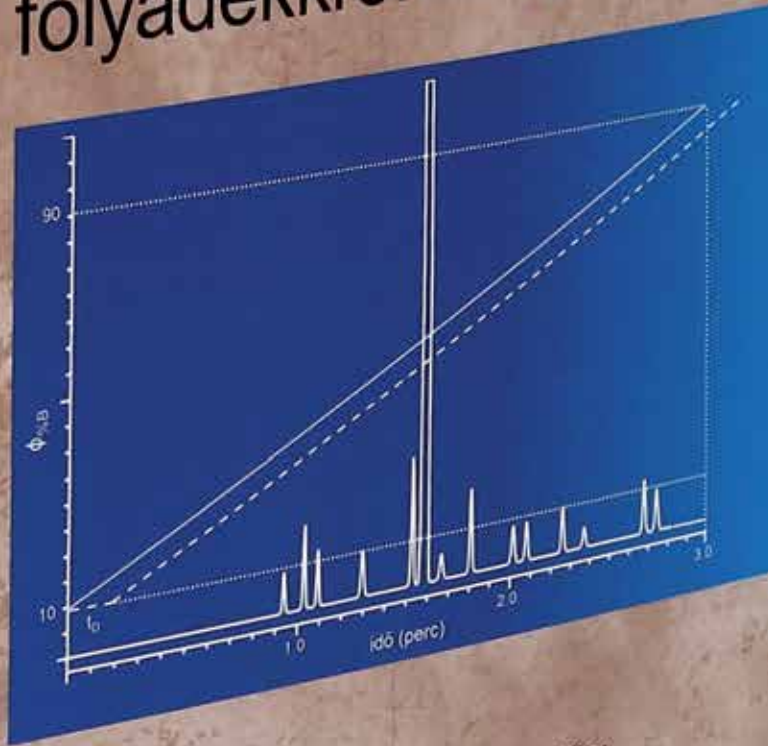


10. ábra Overdrive Lens sematikus működési ábrája

Fekete J.
Kormány R.
Fekete Sz.

Modern folyadékkromatográfia

Modern folyadékkromatográfia



Szerkesztette:
Prof. Fekete Jenő
Dr. Kormány Róbert
Dr. Fekete Szabolcs

Lektorálta:
Dr. Bobály Balázs



www.kromkorm.hu

