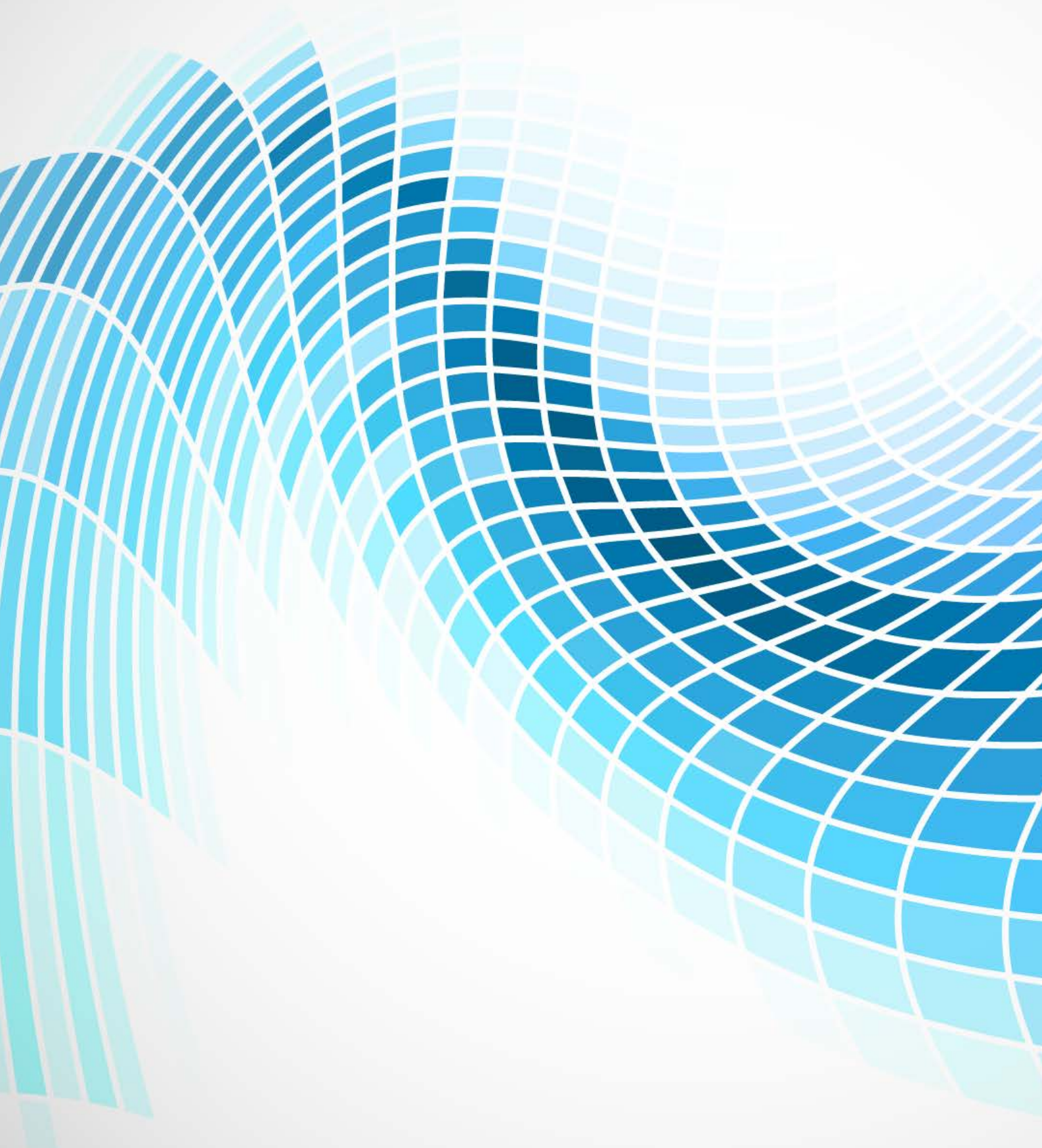


# KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat







## Rugalmas

Szinte minden méretű oszlop tárolására alkalmas (300mm x 10mm). Az insertek egyedi tervezésének köszönhetően az összes gyártó oszlopainak tárolására alkalmas. Még egyedi dimenziók esetén is.

## Elérhető 2 formátumban és 14 méretben

A3 és A4 formátumban is elérhető. Egyszerűen tárolhat akár 240 oszlopot!

## Egymásra helyezhető

Egymásra rögzíthető készlet, növelhető tárolókapacitás.

## Tartós

Szilárd acél szerkezet tartós festéssel.

# ezCOL

*store your columns much easier....*

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

## Tartalomjegyzék

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

1. rész: Elérhető hatékonyság:

Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs

**9.** Egyszerű megoldások a gázkromatográfiás kolonnák élettartamának növelése érdekében:

Sky Countryman

**11.** A mintaelőkészítés szerepe az LC-MS/MS módszerű szermaradék vizsgálatok során:

Tölgyesi Ádám

**13.** Oszlop élettartam növelése peptid és fehérje tisztításnál, agresszív mosási technika alkalmazva pH tűrő Gemini oszlopon:

Marc Jacob, J.T. Presley III, Carl Sanchez, Ismail Rustamov és mtsi.

**15.** Alkalmazások: UHPLC kolonnák védelme, vagyis hogyan őrizzük meg az ilyen típusú kolonnák hatékonyságát és növeljük élettartamát:

J.T. Presley III, Tom Cleveland, Jeff Layne

**16.** Gyógyszermolekulák tisztítása és visszanyerése plazmából Strata-X szilárd-fázisú extrakcióval és hagyományos folyadék-folyadék extrakcióval:

Deborah Jarrett

**18.** pH-stabil PolymerX™ oszlop alkalmazása bázikus gyógyszervegyületek lipofilításának kromatográfiás előrejelzésére:

Könczöl Árpád, Balogh György Tibor

**21.** Gasztrosarok:

Dan Leopard áfonyás csokoládés puszedlije, 5 saláta öntet recept. Új saláta dressing ötletek a Food Network Magazine-tól

## Előszó

Kedves Olvasó!

Engedje meg, hogy figyelmébe ajánljam a *Kromatográfus* kísérleti és egyben első számát.

A jövőben szeretnénk, ha ez a folyóirat egy, az analitikai szakmához kapcsolódó és kimondottan kromatográfiával foglalkozó kiadvánnyá nőhetné ki magát.

Ehhez természetesen elengedhetetlen az Önök szakmai segítsége minél több és minél színvonalasabb szakmai anyagok publikálása. Folyamatos építő jellegű kritikára is feltétlenül számítunk, hogy az Önök igényének leginkább megfelelő szakmai lapot hozhassunk létre.

Kiadványunk hasábjain szeretnénk a szakma minél szélesebb területéről újdonságokat, megoldásokat megjelentetni és lehetőséget adni Önöknek, hogy szakmai tapasztalatukat megosszák egymással.

Mi is csak az első bizonytalan lépéseket tettük meg ezért amennyiben bármilyen ötlete lenne, hogy miként tehetnénk jobbá, színvonalasabbá kiadványunkat kérjük ossza meg velünk.

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

## Kromatográfus

I. évfolyam 1. szám

Nyomdai előkészítés:  
Mogyorósi Eszter

Nyomdai munka:  
Tónus Nyomda

Lektorálta:  
Kormány Róbert  
Fekete Jenő

Kiadja:  
Gen-Lab Kft.

A szerkesztőség elérhetőségei:

Cím: H-1119 Budapest Hadak útja 41.  
Tel.: (36-1) 206-2455  
Fax: (36-1) 206-2451  
Email: info@gen-lab.hu  
Web: www.gen-lab.hu  
Telefon:  
+36-1-206-2455  
Fax:  
+36-1-206-2451



Olvassa Ön is környezetvédelmi magazinunkat online tartalommal kimondottan a környezetvédelmi mérésekhez

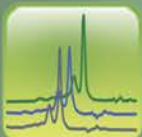


## Környezetvédelmi honlap

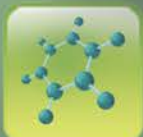
### Hasznos webes alkalmazások



Technikai  
füzetek



Alkalmazások



Alkalmazás kereső

### Iratkozzon fel a környezetvédelmi magazin hírlevelére



### Böngésszen a legújabb technológiák között



Zebron ZB-Semivolatile  
GC kolonnák



StrataPAH SPE csövek – és még sok  
minden más!



Gen-Lab Általános Laboratórium  
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



Még több tartalom a  
[www.phenomenex.com/EdgeTools](http://www.phenomenex.com/EdgeTools) címen



# A héjszerkezetű (mag-héj) töltetek alkalmazási lehetőségei

## 1. rész: Elérhető hatékonyság

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

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

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

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

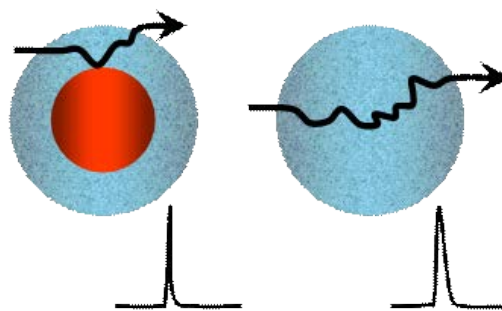
### Bevezetés

Az utóbbi évek legnagyobb sikerét - a folyadékkromatográfiai állófázisokat tekintve - egyértelműen a héjszerkezetű töltetek hozták. A használati gyakoriságuk vetekszik a teljesen porózus 2 µm alatti töltetekével, sőt egyes becslések szerint már többet használnak a gyors folyadékkromatográfiai gyakorlatban. Ahhoz, hogy megértsük, miért beszélünk a felületi porozitású (superficially porous stationary phase, core-shell vagy fused-core) töltetek reneszánszáról, vissza kell pillantanunk a folyadékkromatográfia történelmében. A töltet újbóli bevezetését ugyanaz a szakember végezte el, aki Horváth Csabával már 45 évvel ezelőtt „kitalálta”. Kirkland és Horváth akkor pellikuláris névvel illette azokat. Az újkori bevezetés két eltérő gyártási technológia eredménye, amely két névhez kapcsolódik. 2007 Halo, és 2009 Kinetex adták a varázsszavakat, jobban mondva a termékek neveit. Mára szinte nincs olyan kolonna gyártó cég, akinek ne lenne ilyen töltete. Mi a továbbiakban héjszerkezetű töltetnek nevezzük az ilyen morfológiájú állófázisokat. Közleményünkben összefoglaljuk azokat a kromatográfiai indokokat, amelyek ezt a robbanásszerű elterjedést magyarázzák.

A kromatográfiai elválasztást több paraméter együttesen szabja meg. Az elválasztás alapegységéből következik, hogy a visszatartás (retenció), a szelektivitás (relatív retenció) és a kinetikai hatékonyság (zónadiszperzió) befolyásolja az elválasztás hatékonyságát. Az ultra- nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiában (UHPLC) a kinetikai hatékonyság növelése a fő cél. Ez többféle módon is megvalósítható. A hőmérséklet növelésével nő a diffúziós állandó és csökkennek a kölcsönhatások erősségei s ezek szűkebb kromatográfiai csúcsokat eredményeznek. A szemcseátmérő csökkentése, hasonlóan a hőmérséklet növeléséhez, a kinetikai hatékonyság növekedését eredményezi. Végül, de nem utolsó sorban az ún. szemcsén belüli diffúziós úthosszat is csökkenthetjük, s ez is megnövekedett elválasztási hatékonyságot eredményez. A héjszerkezetű töltetek tartalmazzak egy nem porózus inert magot és egy ezt körülvevő aktív porózus réteget, amelyben az elválasztás végbe megy. Ezzel a töltetszerkezettel a szemcsén belüli stagnáló mozgófázisban a diffúziós úthosszat csökkentjük, ez a zóna-szélesedés csökkenését eredményezi (elsősorban a kis diffúziós állandójú makromolekuláknál). Ennél a hatáznál sokkal jelentősebb, hogy a héjszerkezetű állófázisokkal töltött kolonnáknál, a töltetanyag szabályosabb elrendeződés. Ezzel az örvénydiszperzió okozta csúcscsúszélesedés is csökken. A hosszirányú diffúzió okozta zónadiszperzió is kedvezőbben alakul, de ennek elsősorban kis térfogatáramnál van jelentősége. A kis molekulatömegű anyagoknál elsősorban a kedvezőbb örvénydiszperzió és hosszirányú diffúzió eredményezi a nagy kinetikai hatékonyságot, míg a folyadékkromatográfiai nagy molekulatömegű anyagoknál pedig a szemcsén belüli rövid diffúziós úthosszából eredő gyorsabb anyagátadás jelenti a fő előnyt.

Az 1. ábra a héjszerkezetű és teljesen porózus töltetek

diffúziós úthosszbeli különbségét szemlélteti. A héjszerkezetű töltetknél a diffúziós úthossz arányos az aktív réteg vastagságával, míg a teljesen porózus töltetnél a szemcseátmérővel. Feltételezve, hogy mindkét töltet 2,6 µm szemcseátmérőjű, s héjszerkezetű töltetnél az aktív réteg vastagsága 0,35 µm, akkor a diffúziós úthossz a héjszerkezetű töltetnél 0,35 µm-rel lesz arányos.



1.ábra: A héjszerkezetű (bal) és a teljesen porózus (jobb) töltetek sematikus ábrája, amelyekkel a diffúziós úthosszbeli különbséget szemléltetjük.

Az új generációs héjszerkezetű töltetek kis szemcseméretéből (tipikusan 1,3 – 2,7 µm között) adódik az előnyös örvénydiszperziós tulajdonság, a vékony porózus réteg következtében pedig gyorsabb részecskén belüli anyagátadás és kedvezőbb hosszirányú diffúzió várható, s az előzőekben megadottak miatt (homogénebb töltetanyag) tovább csökken az örvénydiszperziós tag is. A folyadékkromatográfiai gyakorlatban alapvető, hogy az eltérő morfológiájú kolonnáknál ne kelljen eltérő mozgófázis összetételt alkalmazni. Ezzel eljutottunk a módszer átvitel problémájához.

Kérdés, hogy a teljesen porózus kolonnára kidolgozott folyadék-kromatográfiai módszert változtatás nélkül átvihetjük-e héjszerkezetűre.

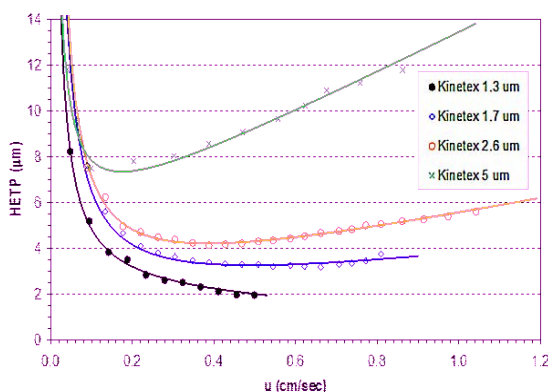
Ebből a szempontból két fontos paramétert kell megvizsgálnunk. Az egyik a visszatartás, a másik a kolonna tömeg és térfogati terhelhetősége. Ezeket a tényezőket azonos geometriai méretű kolonnáknál és azonos szemcseátmérőnél vizsgáljuk. Az előnyök mellett, látszólag hátrányos tulajdonság lehet, hogy a vékony aktív porózus réteg miatt az azonos méretű teljesen porózus töltethez képest kisebb a terhelhetőségük és a visszatartás is várhatóan kisebb (a kolonnában lévő összes aktív porózus térfogat arányának megfelelően). Ez a terhelhetőségi különbség az analitikai folyadék-kromatográfiai gyakorlatban elhanyagolható. Az aktív, héj vagy kéreg réteg az azonos szemcseátmérőjű porózus réteghez képest általában 60-70% körül mozog.

A hatékonysági összehasonlításokból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a 3 µm alatti héjszerkezetű töltetek hatékonysága hasonló, mint a 2 µm alatti teljesen porózus tölteteké.

Ezért az UHPLC gyakorlatban sokszor külön említjük a 3 µm alatti héjszerkezetű, és 2 µm alatti teljesen porózus tölteteket. A kinetikai hatékonyság további növekedését eredményezte a 2 µm alatti héjszerű töltetek bevezetése.

A 2 µm alatti szemcseméretű héjszerkezetű töltetekkel eddig nem tapasztalt kinetikai hatékonyságot érhetünk el.

A 2. ábrán az 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es Kinetex töltetekkel mért  $H-u$  görbéket mutatjuk be. Figyelemreméltó, hogy az 1,3 µm-es töltettel  $H_{min} \sim 2$  µm érhető el. Ez megfelel 20000 – 25000 elméleti tányérszámnak egy 5 cm-es kolonnán. Az eddig publikált adatok szerint a 2 µm alatti teljesen porózus töltetekkel ennek a hatékonyságnak körülbelül felét mérték ( $H_{min} \sim 3,5 - 4,5$  µm), így egy 1,7 µm-es teljesen porózus töltetű 5 cm-es kolonnával a tipikusan elérhető elméleti tányérszám 10000 – 12000.



2. ábra: 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es Kinetex töltetekkel mért  $H-u$  görbék (butilparabén testvegyület, acetonitril-víz mozgófázis, 30 °C, injektált térfogat: 0,1 µL).

Azonos típusú (morfológiájú) töltetnél érdemes összevetni a szemcseátmérő hatását is az elválasztás hatékonyságára az elválasztási ellenállás függvényében. Az elválasztási ellenállás magában foglalja, hogy adott viszkozitású mozgó fázisnál mekkora nyomásesés kell, hogy a kívánt hatékonyságot elérjük. Ezt sem a van Deemter, sem a Knox összefüggés nem tartalmazza. A hatékonyság elválasztási ellenállást együttesen a kinetikus elmélet tartalmazza. A következőkben erre kívánunk rávilágítani.

A folyadékkromatográfia elméletéből és gyakorlatából egyaránt következik, hogy szemcsés töltetknél a hatékonyság (kinetikai) a szemcseátmérőtől függ. A megnövekedett kinetikai hatékonyság lehetővé teszi a kisméretű kolonnák használatát.

Tehát rövid, 3-5 cm hosszúságú kolonnákkal pl.  $N = 10000 - 20000$  tányérszámot el lehet érni akár 0,5 – 1 perc alatt is. Az ár, amit ezért fizetünk a nagy nyomásesés. A kis szemcseátmérőjű állófázissal töltött kolonnák permeabilitása kicsi, ezért nem tudunk hosszú kolonnát alkalmazni, hiszen a készülék vagy a töltet nyomásállósága határt szab a kolonna hossz növelésének, ami szintén határt szab az elérhető maximális elméleti tányérszámnak (pl.  $N = 100000$  nem is érhető el egy kis permeabilitású töltettel). A nagyobb szemcseátmérőjű töltetek permeabilitása viszont lényegesen nagyobb, tehát nagy kolonna hossz is alkalmazható (pl. kolonnák sorba kötésével).

Ez használható ki a héjszerkezetű töltetknél, mert nagyobb szemcseátmérő alkalmazásával is ugyanazt a kinetikai hatékonyságot érjük el, mint a kis permeabilitású, teljesen porózus töltetekkel. Ha a kinetikus elmélet alkalmazásával összehasonlítjuk az 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es héjszerkezetű tölteteket,

akkor a következőkre jutunk. Az 1,3 µm-es töltet adja a leggyorsabb elválasztást, ha a mérés tányérszám igénye  $N < \sim 20000$ . Viszont 20000 és 60000 tányérszám között már az 1,7 µm-es szemcse biztosítja a legrövidebb analízisidőt. Ha nagyobb tányérszámokra van szükség, akkor a 2,6 µm-es töltet kell választani, ha az elválasztás érdekében extrém tányérszámokra van igény ( $N > 170000$ ), akkor pedig az 5 µm-es töltet kell használni. Az előzőekben leírtakból következik, hogy az elválasztás kinetikai hatékonyság szükségletéből kell kiindulnunk a kolonna kiválasztásánál, ha a kolonnák szelektivitása azonos.

### Mindig az analitikai cél az elsődleges.

Ez alatt az értendő, hogy a vegyületek szerkezete között milyen különbségek vannak. Ha szerkezetileg nagyon hasonlóak, akkor a kis szemcseátmérőjű, ha nagyok, akkor a nagyobb átmérőjű, gyorsabb elválasztást tesz lehetővé. Ezzel arra kívántuk a figyelmet felhívni, hogy „csak” úgy általánosságban nem adhatjuk meg a héjszerű töltetek szemcseátmérőjét, s a hozzá tartozó kolonna méreteket (kolonna hossz és átmérő).

Az UHPLC elterjedése előtérbe helyezi a készülék zónaszélesítő hatását. Zónaszélesedést a kolonna és az alkalmazott készülék együttesen okozzák. A készülék (hardver) megítélésénél a kolonna elméletileg elérhető kinetikai hatékonyságából kell kiindulnunk.

Elvárás a készülékkel szemben, hogy minél kevésbé csökkentse a kolonna hatékonyságát. Ezt az ún. oszlopon kívüli, a folyadékkromatográfias készülék szempontjából elengedhetetlen térfogatok csökkentésével tehetjük meg, és az adatgyűjtés sebessége okozta zónaszélesítő hatást is minimalizálni kell. Az oszlopon kívüli káros – hatékonyság rontó – hatások annál jelentősebbek, minél kisebb a kolonna térfogat (rövid kolonna, kis belső átmérő) és minél hatékonyabb a kolonna.

A kromatogramon mért zónaszélesedés (variancia) tehát a kolonnán fellépő és azon kívüli hatásokból tevődik össze:

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

ahol a  $\sigma_{col}^2$  és a  $\sigma_{ec}^2$  jelentik a kolonnán létrejövő és a kolonnán kívüli zónaszélesedést. Az adagolóban és az összekötő vezetékben azért van zónaszélesedés, mert az áramlás lamináris és a sebességi profil parabolikus, továbbá az egyes rétegek közötti keveredés elhanyagolható. Így a molekulák, melyek a cső falához közelebb vannak, lényegesen kisebb sebességgel haladnak, mint a középső rétegben lévők. Ez az áramlási csúcsdiszperzió jelensége. A detektorban ehhez járul még az áramlási sebesség (irányának és sokszor a geometriájának) változása is, és ha az elektronika lassú, akkor ún. alul mintavételezett (torzított) jelet kaphatunk. Az oszlopon kívüli csúcsdiszperzió függ még a térfogatáramtól, a minta diffúziós tulajdonságaitól, a mozgófázis viszkozitásától, hőmérséklettől és az injektált minta mennyiségétől.

Megállapodás szerint az oszlopon kívüli zónaszélesedés összege nem lehet nagyobb, mint a kolonnán mért csúcsszélesedés tizede.

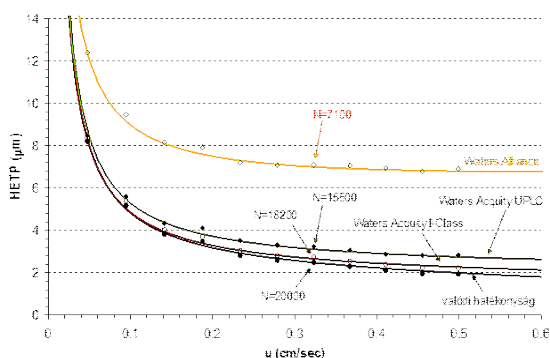
$$\sigma_{ec}^2 \leq 0,1 \cdot \sigma_{col}^2$$

A csúcshéyesedést (varianciát) térfogat-négyzet vagy idő-négyzet dimenziókkal tudjuk kifejezni. Az oszlopon létrejövő csúsvarianciát a következő általános összefüggéssel írhatjuk le:

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

ahol  $V_r$  a retenció térfogat,  $N_{col}$  az elméleti tányérszám,  $V_0$  az oszlop holtterfogatja és  $k$  a visszatartási tényező. Tehát minél kisebb a kolonna térfogata és a komponens visszatartása, illetve minél hatékonyabb a kolonna, annál kisebb az eluálódó csúcs varianciája (szélesedése).

Az alábbi példában  $H-u$  görbékkel szemléltetjük a készülék hatékonyság-rontó tulajdonságát. Butilparabén tesztvegyületet acetonitril-víz mozgó fázissal eluáltunk egy 1,3  $\mu\text{m}$ -es Kinetex (50 x 2,1 mm) kolonnáról. Azonos mérési körülményeket alkalmazva felvettük a  $H-u$  görbét egy Waters Acquity I-Class, egy régebbi Waters Acquity UPLC és egy konvencionális Waters Alliance HPLC készüléken, továbbá megadtuk a kolonna valódi (elméleti) hatékonyságát. A kapott  $H-u$  görbéket a 3. ábra mutatja be.



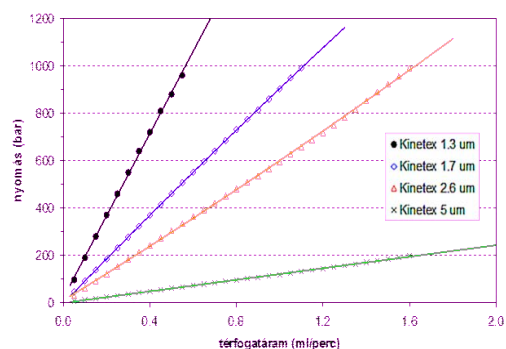
3. ábra: Látszólagos hatékonyság: 50 x 2,1 mm-es, 1,3  $\mu\text{m}$ -es Kinetex töltetekkel mért  $H-u$  görbék (Waters Acquity I-Class, Waters Acquity UPLC és Waters Alliance HPLC rendszeren).

A példában a Waters Acquity I-Class készülék rendelkezik a legkisebb oszlopon kívüli térfogattal (átlagos varianciája  $\sim 2 \mu\text{l}^2$ ). Ennek megfelelően ezzel a készülékkel mértük a legkisebb  $H$  értékeket (kissé elmaradva az elméletileg várható, valódi hatékonyságtól). Az első generációs Waters UPLC készülék oszlopon kívüli térfogata és csúcs-varianciája valamivel nagyobb, tipikusan  $\sim 6-8 \mu\text{l}^2$ . Ezzel a készülékkel dolgozva már lényegesen romlik a kolonna „látszólagos” hatékonysága. És ha egy ilyen hatékony, kisméretű kolonnát egy konvencionális HPLC készülékkel akarunk használni, akkor sajnos a kolonna lehetőségeit egyáltalán nem tudjuk kihasználni.

A hatékonyság nagy részét elveszítjük a készülék oszlopon kívüli térfogatában végbemenő csúcsdiszperzió miatt. A 3. ábrán feltüntettük a 0,3 cm/s lineáris sebességhez tartozó „látszólagos” tányérszámokat is. Az adott körülmények között a Waters I-Class készüléken  $N = 18200$  tányérszámot mértünk, a régebbi UPLC készüléken már csak  $N = 15500$ -at, és a konvencionális Alliance készüléken csupán  $N = 7100$  tányérszámot tudtunk elérni. A példa jól szemlélteti, hogy ilyen hatékonyságú kolonnák sajnos nem használhatók hagyományos HPLC készülékekben. Nyomásesés oldaláról nézve, az Acquity UPLC I-Class esetében adott mozgófázis sebességhez mindig nagyobb

rendszer-nyomás járul mint a régebbi UPLC vagy konvencionális HPLC készülékek esetén. A különbséget elsősorban az összekötő vezetékek átmérője közötti eltérés okozza. A mi esetünkben a rendszer-nyomás kétszer nagyobb volt az I-Class készüléken a régi UPLC rendszerhez képest.

A kolonna működtetési nyomást tekintve az 1,3  $\mu\text{m}$ -es töltet esetében a maximálisan alkalmazható áramlási sebesség kb. 0,5 - 0,7 ml/perc értékre korlátozódik (mozgófázis viszkozitástól függően). Ilyen sebesség mellett már 1000 bar nyomás körül dolgozunk (4. ábra). Az 1,7  $\mu\text{m}$ -es és a 2,6  $\mu\text{m}$ -es töltetek esetén az 1,0 - 1,2 ml/perc-es áramlási sebesség is kényelmesen alkalmazható. Az 5  $\mu\text{m}$ -es töltettel meg 2 - 3 ml/perc térfogatáram mellett sem érjük el az oszlop mechanikai stabilitásának határát.



4. ábra: Nyomásesés az 50 x 2,1 mm-es, 1,3, 1,7, 2,6 és 5  $\mu\text{m}$ -es Kinetex töltetekben.

A kapott eredményekből egyértelműen látszik, hogy a jobb hatékonyság elérése érdekében a kisebb rendszertérfogattal rendelkező készüléket célszerű választani az 50 x 2,1 mm dimenziójú állófázisokhoz. Az 1,3  $\mu\text{m}$ -es töltet biztosítja a legnagyobb hatékonyságot, de az alkalmazott nyomás körülbelül kétszer akkora, mint az 1,7  $\mu\text{m}$ -es töltet esetében. A 2,6  $\mu\text{m}$ -es töltet jó kompromisszumnak tűnik a hatékonyságot és permeabilitást is figyelembe véve. Az 5  $\mu\text{m}$ -es Kinetex kolonnák pedig a konvencionális HPLC-s mérésekhez lehetnek hasznosak, igen jó hatékonyságú elválasztások valósíthatók meg velük. Lényegesen jobb tányérszámot produkálnak mint az 5  $\mu\text{m}$ -es teljesen porózus töltetek.

Visszatérve az elválasztás hatékonyságának növelésére, az egyik utat a héjszerkezetű töltetek alkalmazása jelenti. A kolonnaméret megválasztását az analitikai feladat szabja meg. A gyors folyadékromatográfiás módszerek, melyek nagy hatékonyságot kívánnak, megszabják az alkalmazható készüléket. A nagy hatékonyságú kolonna ezekben az esetekben szükséges, de a feladat megoldásához nem elégséges eszköz. Nagy hatékonyságú kolonna csak kis zónadiszperziójú készülékekben működik az elvárt hatékonysággal. Jelenleg a kolonnafejlesztés (hatékonyság tekintetében) előbbre jár, mint a készülék fejlesztés. Az elválasztást végző analitikusnak minden esetben a kolonnát vagy kolonnák választását a rendelkezésre álló készülékhez kell igazítani.



# Egyszerű megoldások a gázkromatográfiás kolonnák élettartamának növelése érdekében

Sky Countryman,  
Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA  
Fordította: Szabó Géza

## Bevezetés

A gázkromatográfiás kolonnák rövid élettartamáért elsősorban a mintákban előforduló nem illékony, vagy maró hatású szennyezők a felelősek, melyek károsíthatják a kapilláris oszlopok első 10-15 cm-es szakaszát. A sérült rész levágásával általában visszaállítható a kolonna teljesítménye, de ez nem jelenthet hosszú távú megoldást a problémára, mivel egy idő után annyira lecsökken a hatékonyság, hogy többé már nem lesz alkalmas az adott analitikai feladat megoldására. A hatékonyság megtartása érdekében számos egyszerű megoldás van az analitikus kezében, ezek közül mutatunk be néhányat a következőkben.

Az egyik lehetőség a kolonna élettartam növelésére az ún. liner, avagy betét megfelelő alkalmazása, amely egy szükséges eleme a gázkromatográfiás adagolóknak, tulajdonképpen a gázkromatográfiás rendszer első védelmi vonalát képezi. A optimális típus kiválasztásával jelentősen csökkenthető az oszlopra jutó szennyezők mennyisége. A betét -a gyors automata mintaadagolóknál- üveg, vagy kvarcgyapotot tartalmaz, ami megköti a nagy molekulatömegű, vagy nem illékony anyagokat, megakadályozva ezzel, hogy azok a kolonna elejére kerüljenek.

| GC Model No.  | Dimensions (ID x L x OD) (mm) | Material* (deactivated) | Quartz Wool (Y / N) | Mfr. No.        | Part No. | Unit  |
|---|-------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|----------|-------|
| <b>Split/Splitless</b>                              |                               |                         |                     |                 |          |       |
| 5880/5890/6890                                      | 4 x 78.5 x 6.3                | B (y)                   | Y                   | 092002          | AGO-7515 | 5/pk  |
|   |                               |                         |                     | 092219          | AGO-7582 | 25/pk |
| <b>Split/Splitless, Recessed Gooseneck Liner</b>    |                               |                         |                     |                 |          |       |
| 5880/5890/6890                                      | 4 x 78.5 x 6.3                | B (y)                   | Y                   | 5181-3316       | AGO-4661 | 5/pk  |
|   |                               |                         |                     |                 | AGO-4662 | 25/pk |
| <b>Cup Splitter/Split Liner</b>                     |                               |                         |                     |                 |          |       |
| 5880/5890/6890                                      | 4 x 78.5 x 6.3                | B (n)                   | N                   | HP 18740-80190; | AGO-4647 | 5/pk  |
|   |                               |                         |                     | 5183-4699       | AGO-4648 | 25/pk |
| <b>Cup Splitter/Split Liner</b>                     |                               |                         |                     |                 |          |       |
| Autosystem  | 3.5 x 100 x 5                 | B (n)                   | N                   | 0330-5181       | AGO-4663 | 5/pk  |
| <b>Split/Splitless Single Taper/Gooseneck Liner</b> |                               |                         |                     |                 |          |       |
| 5880/5890/6890                                      | 4 x 78.5 x 6.3                | B (y)                   | Y                   | 5062-3587;      | AGO-4657 | 5/pk  |
|   |                               |                         |                     | 5183-4693;      | AGO-4658 | 25/pk |
|   |                               |                         |                     | 5183-4694       |          |       |

\* B = Borosilicate; Deactivated = Yes (y) or No (n)

1. táblázat: A Phenomenex által forgalmazott különféle liner típusok.

**Vigyázat:** Az üvegyapot deaktiválása után is maradnak nem reagált szilanol csoportok, melyek erős hidrogénhidat tudnak kialakítani a vegyületeinkkel. Az üvegyapot tömörségének minden csere után azonosnak kell lenni, ez házi töltéssel nehezen érhető el, rendkívül nagy gyakorlatot igényel.

## Előtét oszlopok

A Z-Guard egy 5 vagy 10 méter hosszúságú deaktivált előtét oszlop, melyet egyszerűen egy csatlakozó segítségével kapcsolhatunk az analitikai oszlophoz (1. ábra).

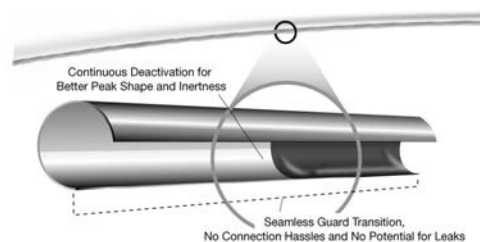
Az előtét kolonna csapdaként viselkedik az olyan nem illékony komponensek számára, melyek károsíthatják az analitikai oszlopot. Használatával, a kapott kromatogramon semmilyen jelentős időbeli vagy hatékonyságbeli változást nem tapasztalhatunk, mert az előtét oszlop nem tartalmazza az analitikai oszlop állófázisát. Mivel az előtét oszlop szilanol csoport aktivitás forrása lehet, minden egyes Z-Guard oszlopot egy alapos minőség ellenőrzésnek vetnek alá, hogy megbizonyosodjanak annak teljes deaktiváltságáról.



1. ábra: A Z-Guard előtét oszlop és csatlakoztatása az analitikai kolonnához

## Guardian™ Integrált előtétoszlopok

A Guardian™ kolonnák egy előre beépített 5 vagy 10 méteres védőoszlopot is magukban foglalnak (2. ábra). A hagyományos előtét oszlopokkal szemben ezekben nincs mechanikai csatlakozás az analitikai és az előtét oszlop között. A Guardian™ kolonnák szintén egy speciális deaktiválási és ellenőrzési folyamaton esnek át annak érdekében, hogy a legjobb hatékonyságot érjék el a savak, bázisok és egyéb érzékeny anyagok esetében is. További előnyük, hogy a Guardian™ kolonnák használatával a hagyományos előtét oszlopok csatlakoztatásának módjából adódó esetleges szivárgások is elkerülhetők.



2. ábra: A Guardian™ integrált rendszer.

## A kolonna kifűtése

A gázkromatográfiás kolonnákra került szennyeződések eltávolításának legegyszerűbben elvégezhető módszere a mérést követő, magas hőmérsékletre történő rövid felfűtés. Ez az eljárás segít megszabadulni a magas forrásponttal rendelkező komponensektől. Amennyiben ez a folyamat jelentősen megnövelné az elemzési időt, érdemes minden 10 injektálás után lefuttatni egy erre a célra kidolgozott programot.

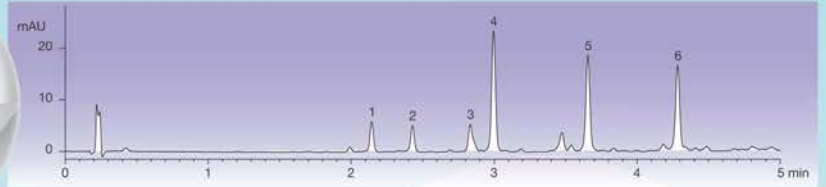
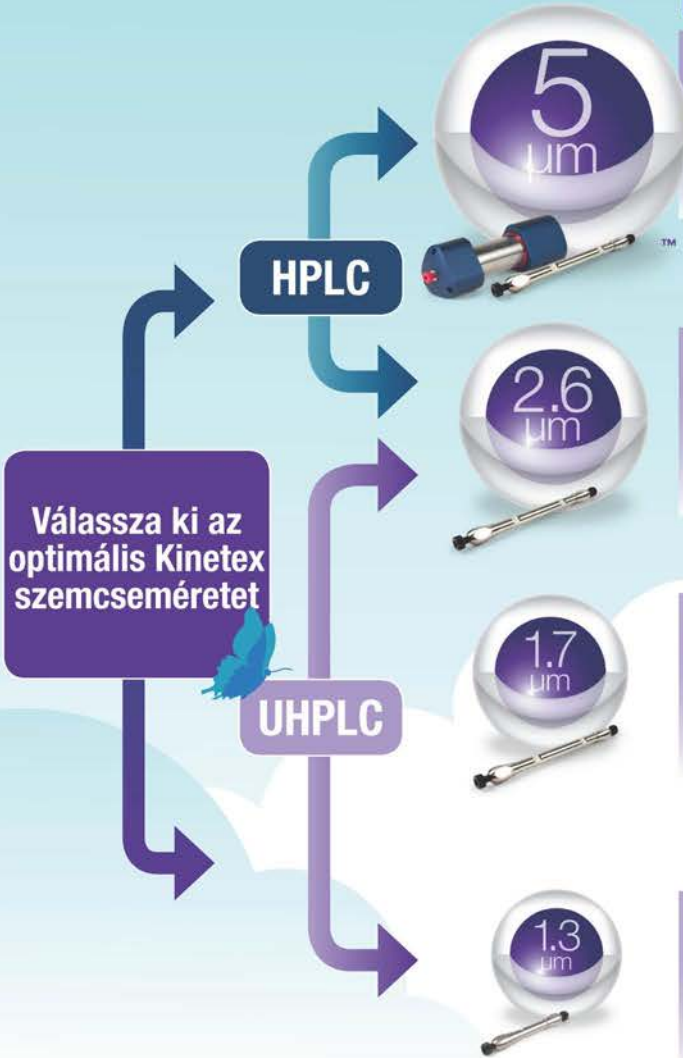
Az új módszerek fejlesztésénél érdemes fontolóra venni egy magasabb termikus stabilitással rendelkező oszlop használatát is, mert magasabb hőmérséklet alkalmazásával még több szennyező eltávolítható, ezzel javítva a felfűtési tisztítás hatékonyságát. Például a Zebron ZB-5 30m x 0,25mm x 0,25µm kolonna felső hőmérsékleti határa 370°C, mely 20°C-kal magasabb, mint az azonos dimenzióval rendelkező ZB-5ms kolonnáknál.

Növényvédőszer maradék vizsgálata során elterjedten alkalmaznak Zebron ZB-1701 (14% cianopropil-fenil, 86% polidimetil-sziloxán) típusú oszlopot, melynek felső hőmérsékleti határa csupán 300°C. Egyes esetekben ugyanaz a módszer egy alternatív kolonnán is lefuttatható, így erre a célra jobb választás lehet a Zebron ZB-35 (35% fenil, 65% polidimetil-sziloxán) kolonna, melynek felső hőmérsékleti határa 360°C.

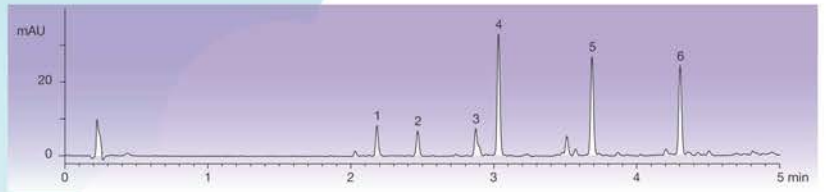


# Egyszerűsítse UHPLC/HPLC módszereit a Kinetex Core-Shell Technológiával

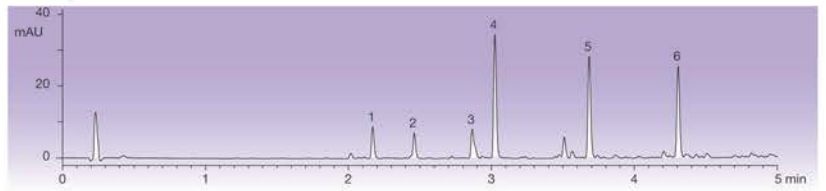
Négy szemcseméret, amely teljes átjárhatóságot biztosít HPLC ↔ UHPLC módszerek között



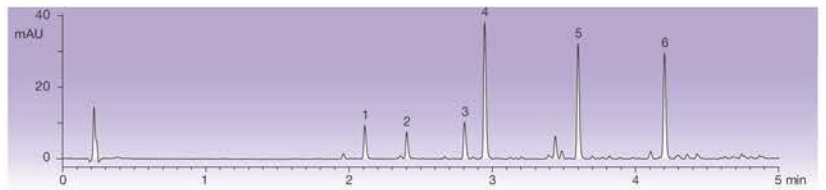
**Kinetex 5 µm:** 3um vagy nagyobb hatékonyság 5 um nyomáson HPLC és PREP LC módszerekhez



**Kinetex 2.6 µm:** sub-2 um-es teljesítmény érhető el HPLC és UHPLC rendszereken is



20%-kal nagyobb hatékonyság a teljesen porózus 1.7 um-os oszlopokhoz képest



**Kinetex 1.3 µm:** Hihetetlen UHPLC hatékonyság és teljesítmény

\*Gingerols analyzed on 50 x 2.1 mm columns

Válasszon a 6 állófázis közül!



**NEW**

**Biphenyl**

Szelektivitás,  
amellyel egy C18-as  
nem rendelkezik

# A mintaelőkészítés szerepe az LC-MS/MS módszerű szermaradék vizsgálatok során

Tölgyesi Ádám, PhD

## Bevezetés

Az élelmiszervizsgálatok egyik nagy területe az állatgyógyászati szerek (főként antibiotikumok) maradékainak (reziduumok) meghatározása a különböző állati eredetű, emberi fogyasztásra szánt termékekben. A vizsgálatok típusai a legegyszerűbb szűrőmódszerektől (screening) egészen a legpontosabb megerősítő (konfirmációs) módszerekig terjed. Screening eljárásnak tekinthetőek többek közt a mikrobiológiai csészés próbák és az immunanalitikai meghatározások (pl.: ELISA). A 4 csészés próba során 1 cm él hosszúságú kocka alakú nyers mintát kell a különböző táptalajt és baktériumtörzset tartalmazó csészékre tenni. Az ELISA módszerekben is viszonylag egyszerű előkészítés szükséges. Elég egy hígítás vagy egy egyszerű szilárd-folyadék extrakció és ezt követő inkubálás. Ezen módszerek az antibiotikumokra rendszerint meghatározott maximális maradékanyag tolerancia határérték (maximum residue limit, MRL) körüli koncentrációkat tudják kimutatni, ami egy screening meghatározás szemszögéből elfogadható. Végző minőségi és mennyiségi eredményt viszont nem szolgáltatnak, ugyanis szelektivitásuk nem mindig megfelelő olyan komplex minták elemzése során, mint az élelmiszer vizsgálatokhoz kapcsolódó mátrixok (pl.: szövetek, tej, tojás, és állati fluidumok). Szűrőmódszerekhez sorolható a vékonyréteg-kromatográfia (VRK) is, ami ugyan már igényel többlépcsős minta-előkészítést és szelektíven kimutathatóak a célkomponensek, mégis a VRK szemikvantitatív jellegéből adódóan denzitóméter nélkül végző mennyiségi meghatározásra nem szolgál. A konfirmációs mérések döntően nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiai (HPLC) meghatározások.

Engedélyezett szerek vizsgálata során az UV vagy fluoreszcens detektálással párosított HPLC vizsgálatok elfogadhatóak, viszont tiltott komponensek mérése során már csak a kapcsolt technikájú folyadékkromatográfiai analízisek jöhetnek szóba. A mai modern élelmiszervizsgálatok folyadékkromatográfiai – tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) meghatározásokkal érik el a reziduumok ultranyomnyi kimutatását akár a legösszetettebb mátrixokban is. Az MS/MS detektort anyaiion – leányion (multiple reaction monitoring, MRM) módban alkalmazva az analitikus ionátmenetei biztosítják a mérés nagyfokú szelektivitását.

Ugyanakkor a célkomponensekkel azonos retencióban eluálódó mátrixok az ionforrásban döntően befolyásolják a mérendő komponensek ionizációs hatásfokát (mátrixhatás). A leggyakoribb esetben a mátrix elnyomja a vizsgálandó vegyület anyaiionjának ionizációját (ion suppression) bizonyos százalékban, de tej minták mérésénél tapasztalunk már ionerősítést is (ion enhancement). Nem csak az ionforrásban, hanem az ütközési cellában is tapasztalható mátrixhatás. Ilyenkor nem az anyaiion, hanem a belőle keletkezett leányionok intenzitása változik meg a mátrix nélküli standard oldatban mért intenzitáshoz képest, ami az ionarányok eltolódásához vezethet.

Az MS/MS mérésekben az azonosítás az ionarányok meglétére alapul. Az ionhatások kompenzálására általános eljárás az izotópjelzett belső standardok (internal standard, ISTD) alkalmazása, viszont nem minden komponens esetén érhetőek el izotópjelölt standardok, illetve esetenként rendkívül drágák.

A mennyiségi meghatározás pontosságát és a kimutatási határt (limit of detection, LOD) a mátrix döntően befolyásolja, így a mintaelőkészítés szerepe az LC-MS/MS mérések során a mintában jelenlevő mátrix koncentrációjának csökkentése és ezáltal a mátrixhatások redukálása. Az MS/MS detektálás szelektivitását kihasználva gyakori, hogy az LC-MS/MS módszerben egy szilárd-folyadék extrakciót (solid-liquid extraction, SLE) követően már injektálják is a mintát a készülékbe. Ez az eljárás a HPLC kolonna túltelítéséhez valamint az ionforrás rövid időn belüli elkoszolódásához vezethet, és persze a nagy mennyiségű mátrix miatt a meghatározás pontossága, illetve precizitása csökken. Mindenképp szükséges a SLE után valamilyen tisztító lépés alkalmazása. Leggyakoribb a szilárd-fázisú extrakció (solid-phase extraction, SPE), de használnak folyadék-folyadék extrakciót is (liquid-liquid extraction, LLE), előfordul a két említett lépés egymás utáni alkalmazása a kellően tiszta minta elérése céljából. Ezen cikk keretében olyan különböző *Phenomenex Strata* SPE tisztításokat szeretnénk bemutatni, melyek lehetővé tették a szermaradékok hatékony LC-MS/MS módszerű kimutatását állati eredetű élelmiszermintákból és állati fluidumokból.

A készülékhez optimált SPE tisztítások lehetővé tették az adagolt minták (spike), illetve a kezelt állatoktól levett minták (incurred) pontos analízisét mind a validálások alatt, mind nemzetközi körvizsgálatokban és referencia anyagok elemzése során.

## Szulfonamidok meghatározása mézből Strata-XL SPE tisztítással és LC-MS/MS analízissel

A Strata-XL SPE oszlop a szerkezetét tekintve egy különleges kopolimer, mely sztiroldivinilbenzol és N-vinilpirrolidon monomer csoportok polimerizációjával készül. Ez a fordított fázisú (reversed-phase, RP) töltet mind apoláris és poláris felületet tartalmaz, miáltal széles polaritás tartományban képes adszorbeálni a vegyületeket. A szulfonamidok bázikus vegyületek (pKa 5-7), így a meghatározás során mindenképp pH kontroltnak kell alkalmazni. A kísérletek tapasztalatai alapján elmondható, hogy a legjobb eredmények savas körülmények között érhetőek el Strata-XL oszloppal. 5%-os (v/v) vizes ecetsav oldatban (pH 2) oldva és hidrolizálva a mézet a minta SPE tisztítása savas oldószerek alkalmazásával valósítható meg a legjobban. Az így kialakított tisztítás lehetővé teszi a minta nagymértékű dúsítását a szilárd fázisú extrakcióval, ami után µg/kg szint alatt lehet a szermaradékokat kimutatni kezelt állatoktól származó méz mintákból.

## A linkomicin meghatározása állati eredetű élelmiszerekből Strata-XL-C SPE tisztítással és LC-MS/MS analízissel

A Strata-XL-C SPE oszlop töltete benzolszulfonsav csoportokat tartalmaz felületén, így mind RP fázist, mind erős kationcserélő részt tartalmaz. Úgynevezett kevert módú kationcserélő SPE oszlop. A linkomicin szerkezetét tekintve közepesen erős bázikus vegyület (pKa 7,95), ebből adódóan savas körülmények között protonált állapotban jól kötődik a kationcserélő csoportokon ionos kölcsönhatás révén. Ennek ellenére az irodalomban található módszerekben RP töltetű SPE oszlopokkal oldják meg a minták tisztítását. Ebben az esetben a savas és neutrális karakterisztikájú mátrixot alkotó komponensek együtt koncentrálódhatnak az SPE oszlopon és eluálódhatnak az oszlopról a linkomicinnel.



A linkomicin poláris vegyület, így az oszlop mosására alkalmazott oldószer RP töltet esetén nem tartalmazhat szerves komponenszt, ugyanis az elindítaná a linkomicin elúcióját. Így nagyfokú tisztítást RP fázissal nem lehet megvalósítani. 4,7-es savas pH-n a linkomicin a Strata-XL-C oszlop kationcserélő csoportjain kötődik, míg a savas és neutrális vegyületek az SPE kolonna RP felületen. Az oszlop lehetővé teszi a 100% szerves oldószerrel történő mosást, mivel az ionos kölcsönhatás által szorbeált linkomicin csak bázikus körülmények mellett eluálódik az állófázisról. Így a savas és neutrális komponensek egy mosási lépéssel eltávolíthatók az oszlopról. A nagyfokú tisztítást követően µg/kg-os szint alatt lehet a linkomicint kimutatni mézből, izomból, tejből és tojásból.

#### **Kortikoszteroidok meghatározása szarvasmarha szövetekből Strata-XL-C SPE tisztítással és LC-MS/MS analízissel**

A kortikoszteroidok közepesen poláris (LogP 1,4-2,3) és neutrális vegyületek, RP felületen jól kötődnek. A gyakorlatban sokszor viszont nem elég az, hogy az SPE oszlopnak jó visszatartása legyen, hanem valamiképp szelektívnek is kell lennie (lásd linkomicin). A mátrixalkotók gyakran ionos vegyületek, melyek a meghatározandó neutrális célkomponensek mellől kevert módú SPE oszloppal pH kontrol mellett könnyen eltávolíthatók a mintákból. Savas pH-n a bázikus mátrix vegyületek a Strata-XL-C oszlop kationcserélő részén koncentrálnak, míg a neutrális kortikoszteroidok a fordított fázisú felületen. Savas eluálással a szteroidok egy lépéssel elválaszthatók a bázikus vegyületektől, így azok már nem befolyásolják az analízist. Hangsúlyozni kell, hogy mindkét pH beállítás (savas, bázikus) kipróbálása szükséges a módszerfejlesztés alatt. Ennek megfelelően Strata-XL-A kevert módú anioncserélő SPE oszlopon lúgos pH-n is elvégeztük a kísérleteket. Hasonló elgondolás alapján ezzel az eljárással a savas mátrixot alkotó komponensek távolíthatók el a mintákból egy lépéssel. Az eredmények azt mutatják, hogy izom mintánál a Strata-XL-C eredményez minimális mátrixhatást, addig vese minták esetén a Strata-XL-A. Máj mátrix esetén nem volt különbség a két eljárás között az ionhatások tekintetében. A módszer pontosságát tanúsított referencia anyag (certified reference material, CRM) vizsgálatával igazoltuk.

#### **Nitroimidazolok meghatározása komplex mintákból Strata-SDB SPE tisztítással és LC-MS/MS analízissel**

A nitroimidazolok gyenge bázikus vegyületek (pKa 2-3) enyhén savas, vagy afeletti pH-n jól kötődnek RP felületen. A Strata-SDB SPE oszlop RP töltete egy hagyományos pH tűrő polimer alapú sztiroidivinilbenzol fázis. Az SPE kolonna visszatartása és szelektivitása nitroimidazolokra 7-es pH a legjobb. Hat különböző mintából (plazma, izom, tej, tojás, méz és takarmány) sikerült ugyanazzal az SPE eljárással meghatározni öt nitroimidazol származékot. A kimutatási határ az összes komponens esetén µg/kg-os szint alatt van. A módszert nemzetközi körvizsgálatban és CRM minta elemzése során is sikerrel alkalmaztuk.

#### **T-2 és HT-2 mikotoxiok meghatározása gabonából Strata-XL SPE tisztítással és LC-MS/MS analízissel**

A T-2 és HT-2 mikotoxinok meghatározása gabonából a figyelem középpontjában van, mivel az Európai Unió (EU) hamarosan határértéket fog megállapítani ezen két toxinra. Közepesen poláris vegyületek révén a Strata-XL oszlopon jól kötődnek. Az SPE kolonnára közvetlenül felvitt gabona extraktumot metanol-víz eleggyel (40/60, v/v) veszteség nélkül moshatjuk T-2 és HT-2-re nézve, míg jelentős mennyiségben csökken a mátrix koncentrációja a mosás által. A legjobb visszanyerés 100%-os metanolos elúcióval nyerhető ki. A módszert nemzetközi körvizsgálatban sikerrel alkalmaztuk.

#### **Összefoglalás**

Az LC-MS/MS mérések mintaelőkészítései gondos optimalizálást igényelnek, melyek alapja a meghatározandó komponensek karakterisztikája (savas, neutrális, vagy bázikus). Az előkészítés kidolgozása során viszont fontos több lehetőséget is kipróbálni a legjobb eredmények elérése céljából. Jó példa erre a szulfonamidok, linkomicin és nitroimidazolok meghatározásai. Mindhárom vegyületcsoport bázikus komponenseket tartalmaz, mégis csak a linkomicin esetén adódott a kationcserélő SPE oszlop a legjobbnak. Manapság sokféle LC-MS/MS készülék érhető el, melyek érzékenysége változó. A különbség főként az ionforrásokban rejlik. A különböző technikai megoldások az ionforrások kialakításánál befolyásolhatják a készülék érzékenységét a standard oldatra és a mátrixokra egyaránt, így sokszor nehéz egy másik készülékre optimált mintaelőkészítést adaptálni. A legjobb megoldást mindig a saját készülékhez optimált előkészítések adhatják.



# Oszlop élettartam növelése peptid és fehérje tisztításnál, agresszív mosási technikát alkalmazva pH tűrő Gemini oszlopon

Marc Jacob, J.T. Presley III, Carl Sanchez, Ismail Rustamov és mtsi.,  
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA  
Fordította: Héja Kornélia

## Bevezetés

A Gemini folyadékkromatográfiás töltetek széles pH tartományban (pH 1-12) történő elválasztásokra fejlesztették ki.

A cikkben bemutatásra kerül, hogy a magas pH stabilitású Gemini termékcsaládnál alkalmazható lúgos mosás, ezzel növelhető a kolonna élettartama (1 M NaOH/alkohol=1/1 (V/V), mert a kolonna használat után tisztítható.

A szennyezett kolonna felület rontja az elválasztás hatékonyságát valamint nyomásnövekedést okoz. Az agresszív lúgos oszlop regenerálás a peptid és fehérjék vizsgálatánál fontos, hogy eltávolíthassuk a felhalmozódott szennyeződések az oszlop felületéről. Az Axia Gemini preparatív oszlopok hosszabb élettartamot és nagyobb teljesítményt nyújtanak a peptid és fehérjék preparatív tisztításánál.

A preparatív folyadékkromatográfiában az oszlop tölteteket és az előre töltött preparatív oszlopok tölteteit is ki kell cserélni, amennyiben a hagyományos mosási eljárás nem javít az oszlop teljesítményén és nem csökkenti a nagy nyomást. A kicsapódott fehérje, az erősen visszatartott komponens és a töltet nagy mértékű porlódása okozhatják ezeket a problémákat. A fordított fázisú szilika alapú szorbensek korlátozzák a mosási körülményeket ecetsavra, metanolra és alacsony koncentrációjú NaOH-ra.

A polimer alapú töltetek képesek ellenállni a nagyobb koncentrációjú NaOH-nak, de nem biztosítanak megfelelő hatékonyságot és szelektivitást, hogy azok versenyképesek legyenek a szilika alapú töltetekkel. Az újabb, hibrid technológiával előállított töltetek, mint a Gemini (C18, NX C18 és C6-Phenyl), nagyobb hatékonyságot és szelektivitást biztosítanak, mint a polimer alapú töltetek és sokkal nagyobb a pH stabilitásuk, mint a teljesen szilika alapú tölteteknek. A Gemini oszlopoknál alkalmazható a korábban említett agresszív mosási technika is az oszlopok tisztítására (pH: 1 M NaOH/alkohol=1/1 (V/V)).

A Gemini TWIN Technológiánál az egységes szilika réteg egy összetett részecskét alkot. Mióta bevezették ezt a típusú gyártási rendszert, a szemcsék megtartják mechanikai stabilitásukat, merevségüket, így nagyobb hatékonyság és jobb felbontás érhető el, a polimer réteg pedig megvédi a szemcséket a kémiai behatásoktól. Tehát a Gemini oszlopoknál lehet használni erősebb, hatékonyabb mosási folyamatokat, anélkül, hogy az oszlop töltete megsérülne. Természetesen, vannak olyan fehérjék, peptidok, amelyek aggregálódhatnak és a standard mosási körülményekkel nem lehet regenerálni az oszlopot. A fehérjék közül, pl: az inzulin, amelyet rekombináns technikával állítanak elő, rosszul oldódó anyagokat tartalmaz, ezért kell folyamatosan mosni az oszlopot, ezzel visszaállítva az oszlop teljesítményét. A peptidok/fehérjék kémiai szintézissel előállított fehérjék/peptidok diszulfid hidakat tartalmaznak. A polimerizáció során szennyeződések keletkeznek. Az elválasztási folyamatnál ezek a szennyeződések aggregálódhatnak, így eltömíthetik a kolonna inlet fritjét.

Az egyik leggyakrabban használt oszlop regenerálási technika az erős lúgos mosás.

Ezt a technikát lehet alkalmazni a nagy kémiai stabilitású Gemini oszlopoknál is, amellyel növelhető a kolonnák élettartama.

## Anyagok és módszerek

Minden vegyszer és fehérje a Sigma-Aldrichtól (St.Louis, MO, USA), az oldószerek az EMD-től (San Diego, CA, USA), a Gemini C18 250\*4,6 mm, 10 um oszlop a Phenomenextől származnak. (Torrance, CA, USA). A C8 250\*4,6 mm, 10 um oszlopot egy versenytárs gyártja.

Az analízisek és a tisztítási folyamatok az Agilent által gyártott (Santa Clara, CA, USA) Agilent 1100 HPLC készüléken történnek, amelyhez tartozik egy kvaterner nagynyomású szivattyú (pumpa), gázmentesítő, UV detektor és automata mintaadagoló. A kolonnateszteknél naftalint használtunk (1. ábra), az áramlási sebesség 1 ml/perc, az oszlop hőmérséklete környezeti (tehát nem volt termosztálva), az UV detektálás 254 nm-en történt. Az eluens 20 mM-os ecetsav/alkohol=1/1 (V/V). Az agresszív mosási folyamatoknál 3,3 kolonna térfogat 1 M NaOH/alkohol=1/1 (V/V)-t használtunk, ugyanazzal az áramlási sebességgel, hőmérséklettel. A mosás után a kolonnán található lúgos eluent semlegesítettük 4 oszlop térfogatnyi 20 mM-os ecetsav/alkohol=1/1 (V/V) elegyével. A fehérje tisztításhoz (2. ábra) a fehérje oldat koncentrációját 10 mg/ml-re állítottuk be, az injektált térfogat 5 ml, az áramlási sebesség 1 ml/perc, az oszlop hőmérséklete környezeti (tehát nem volt termosztálva), az UV detektálás 260 nm-en történt.

15-25 % alkohol/vizes gradienst használtunk, 25 percen keresztül.

Három preparatív fehérje tisztítás után regeneráltuk és semlegesítettük az oszlopot (1. ábra kísérleteinél).

## Eredmények

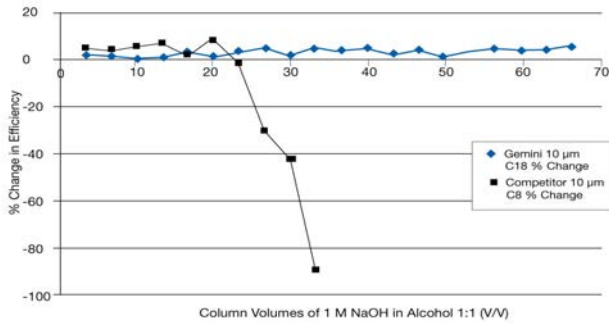
A következő kísérletek a Gemini töltetek alkalmazhatóságát mutatják be.





Az első kísérletben az oszlop hatékonyság változását teszteltük (tesztvegyület naftalin, UV detektálás hullámhossza 254 nm), többször megismételt tömény NaOH-os mosás után. A Gemini C18 oszlop mellett egy másik gyártó fordított fázisú szilika alapú oszlopa lett használva. A kapott eredmények az 1. ábrán láthatóak.

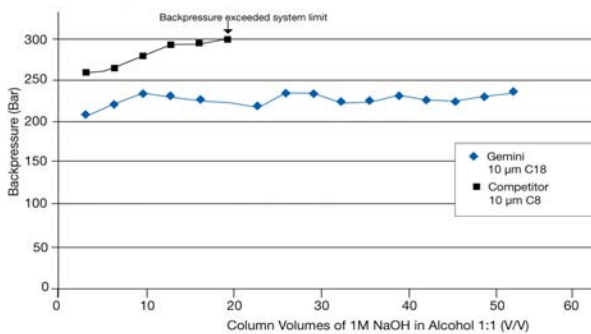
Az agresszív mosási folyamatot követően a Gemini C18 oszlop hatékonysága közel 70 kolonna térfogat agresszív mosó eluens után is megmaradt. A hagyományos fordított fázisú szilika alapú töltet esetén 25 kolonna térfogat agresszív mosó eluens hatására jelentősen kezdett csökkenni a kolonna hatékonysága a töltetben keletkező irreverzibilis károsodások miatt.



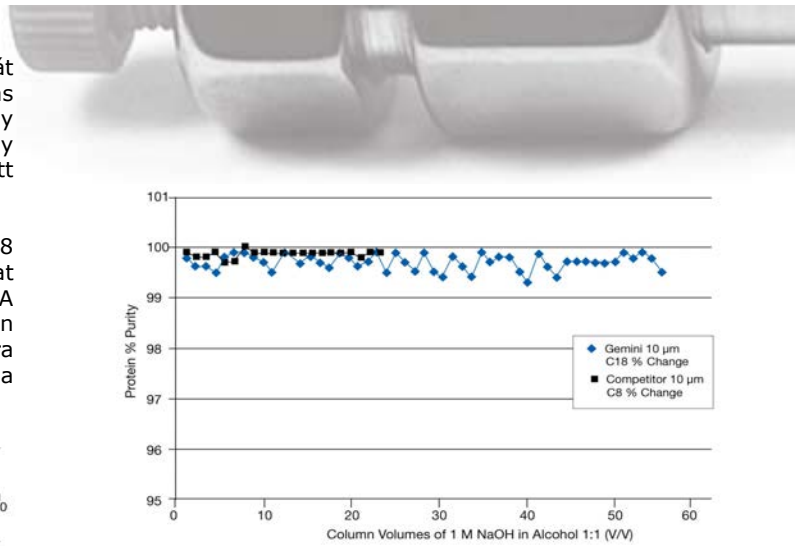
1. ábra: Az oszlop hatékonyság változása a tömény lúgos mosás hatására Gemini C18 és fordított fázisú szilika alapú töltet esetén.

A második kísérletben a Gemini C18 oszlop kémiai stabilitása kerül bemutatásra kis méretű (10000Da) fehérjék tisztítása (injektált mennyiség 5 mL, 10mg/mL) során. A kolonna 3,3 oszlop térfogatnyi NaOH-os eleggyel mosva három preparatív tisztítás után. A 2. ábra bemutatja, hogy a Gemini C18-on kétszer több tisztítási lépés és kétszer több mosási folyamat szükséges, mint egy tipikus szilika alapú állófázison. A szilika alapú oszlopokon a tisztítást abba kell hagyni, mivel a mosási lépéseknél megnő a nyomás az oszlopon.

A magas pH-jú lúgos mosás tönkreteszi a állófázist, így kezd csökkenni a kolonna élettartama, illetve növekedni az oszlopon kialakuló nyomás.



2. ábra: Fehérje ismétlődő tisztítása és mosása Gemini C18 és tipikus szilika állófázisú oszlopon

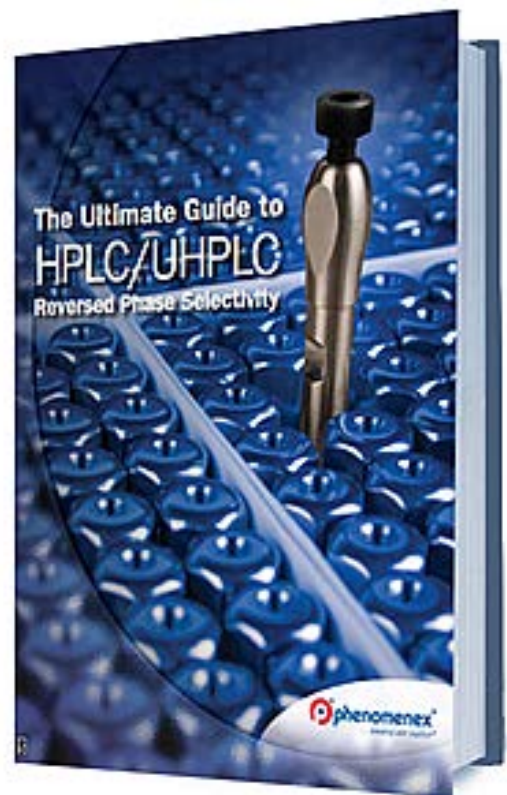


3. ábra: Bemutatja a két oszlopon kialakuló nyomást, az agresszív mosások hatására.

### Konklúzió

Ebben az alkalmazásban bemutatjuk, hogy a Gemini oszlopok szorbense kompatibilis az agresszív lúgos mosásokkal. A Gemini termékcsalád kiváló kémiai stabilitása által növelhető az oszlopon a tisztítási folyamatok száma, anélkül, hogy ki kellene cserélni az oszlopot.

Az Axia preparatív Gemini oszlopok hosszabb élettartamot és nagyobb teljesítményt mutattak a fehérjék és peptidok preparatív tisztításánál.



# UHPLC kolonnák védelme, vagyis hogyan őrizzük meg az ilyen típusú kolonnák hatékonyságát és növeljük élettartamát

J.T. Presley III, Tom Cleveland, Jeff Layne,  
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA  
Fordította: Szász Vadász Tas

## Bevezetés

Az UHPLC kolonnák használatával jelentősen javul a kromatográfiás elválasztások hatékonysága, ugyanakkor egyedi kihívásokat is támaszt elének. Az UHPLC rendszerek optimalizáltak a jobb hatékonyság elérése érdekében. A legnagyobb gond a kolonna védelme a mikroszennyezőktől.

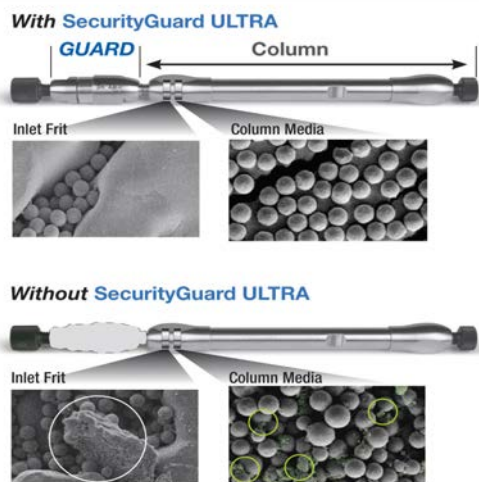
Egy ultra-nagy hatékonyságú védő kolonna rendszer arra hivatott, hogy az UHPLC 2 µm alatti és a héjszerkezetű (core-shell) kolonnák élettartamát meghosszabbítsa (ezzel pénzt és időt is tudunk spórolni), illetve a készülék karbantartási költségei is csökkenthetőek.

## Eredmények és értékelés

Köztudott, hogy a UHPLC rendszerek és kolonnák nagyobb odafigyelést igényelnek, a hagyományos HPLC-hez képest, annak érdekében, hogy a maximális hatékonyságot el tudjuk érni. Optimalizált rendszereken dolgozunk, az UHPLC teljesítmény megőrzése érdekében elengedhetetlen a kromatográfiás tisztaság és a kolonnák védelme. Védő kolonna használata nélkül csökkenhet a kolonnák teljesítménye, élettartama és megnövekedhet a készülékek karbantartási igénye és költsége.

Az UHPLC kolonnák, különösen a 2 µm alatti szemcseméretűek hamarabb eltömődhetnek, mint a hagyományos 3 µm, vagy 5 µm szemcseméretű HPLC oszlopok. Ez nem csak abból adódik, hogy a szemcsék közötti tér jóval kisebb, de a kolonnát lezáró szűrők (fritt-ek) porozitása is kisebb, mint a hagyományos töltetekenél. Tehát az eluensben, vagy a mintában levő bármilyen szemcseátmérőjű szilárd szennyező, fel nem oldódott kristály, vagy a készülékből esetlegesen leváló szilárd részecskék irreverzibilisen eltömíthetik a kolonnát.

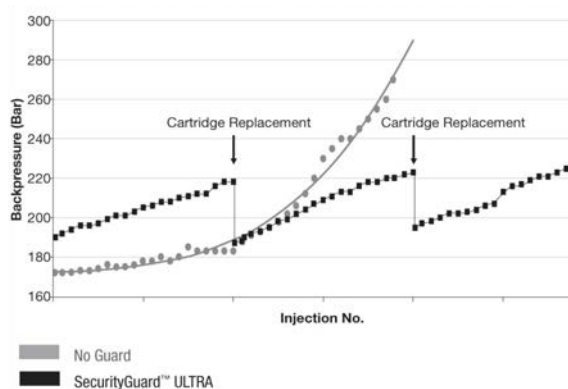
Egy egyszerű módja az UHPLC hatékonyság megőrzésének, illetve a kolonna védelmének (akár 2 µm szemcseátmérő alatti teljesen porózus, akár héjszerű töltetű oszlop esetén) a SecurityGuard™ ULTRA védő kolonna rendszer használata. (1. ábra)



1. ábra. Elektronmikroszkópos felvétel a kolonna frittről és töltetről védő kolonna használatával és nélküle.

Egy kolonna élettartam tesztet végeztünk, biológiai mintát injektáltunk egy kéregszerkezetes (Kinetex 2,6 µm C18 50 × 4,6 mm Phenomenex, Inc. Torrance CA, USA) oszlopra (2. ábra). Védő kolonna nélkül az oszlopon egy állandó, exponenciális nyomásemelkedés lép fel (szürkével jelölt pontok). Ez a nyomásnövekedés végül ahhoz vezet, hogy a kromatográfiás hatékonyság romlik, csúcscsúszás és sőt, akár csúcskettőződés léphet fel.

A SecurityGuard™ ULTRA védő kolonna rendszer használatával jelenősen növelhető a kolonna élettartama. Ahogy az ábrán a fekete pontokkal jelzett görbén is látszik, ebben az esetben is tapasztalhatunk nyomásnövekedést, de ez a csupán védő kolonnán lép fel. A védő oszlop cseréjével a kolonnán közel a kiindulási nyomásesés jelentkezik.



2. ábra. Nyomásesés a kolonnán az injektálások számának függvényében. A szürke pontok jelölik a védő kolonna nélküli kísérleteket, míg a fekete pontok jelölik a SecurityGuard™ ULTRA védő kolonna használatát.





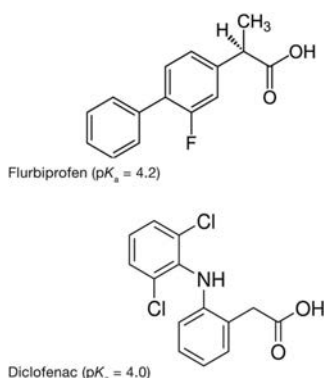
# Gyógyszermolekulák tisztítása és visszanyerése plazmából Strata-X szilárdfázisú extrakcióval és hagyományos folyadék-folyadék extrakcióval

Deborah Jarrett,  
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA  
Fordította: Szabó Krisztina

## Bevezetés

A szilárdfázisú extrakció [SPE] napjainkban a legelterjedtebb tisztítási technika a kromatográfiai minta-előkészítés során. Bár régóta használják ezt a technikát, az új funkciócsoportokra vonatkozó egyre nagyobb specifikusság lehetővé teszi az analitikusok számára a minták visszanyerésének és reprodukálhatóságának növelését.

A diclofenac (1. ábra) egy gyengén savas ( $pK_a=4.0$ ), nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő gyógyszer (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID), amelyet pl. műtét utáni fájdalomcsillapításra használnak felnőttek és gyermek pácienseknél. A diclofenac, mint fájdalomcsillapító úgy fejt ki a hatását, hogy a ciklooxygenáz (COX) útvonalon gátolja a prosztaglandinok szintézisét. Úgy is NSAID-ként működik, hogy a lipoxigenáz útvonalat gátolja azáltal, hogy csökkenti a proinflammatorikus hormonok képződését. A diclofenac mennyiségi meghatározása biológiai mintákból, mint pl. plazmából nagy jelentőséggel bír. Ez a cikk két széles körben alkalmazott módszert tár fel a diclofenac plazmából történő izolációjára, a szilárdfázisú extrakciót (SPE) és a folyadék-folyadék extrakciót (LLE) kontrollként vizes mátrixot alkalmazva.



1. ábra A flurbiprofen és a diclofenac szerkezete és  $pK_a$  értékei.

## Anyagok és módszerek

A plazma előkezelése mindkét extrakciós technika esetében azonos. A plazma gézlapon történő átszűrése után 5% metanolban feloldott diclofenacból 500 $\mu$ L-t adtunk 500 $\mu$ L plazmához, majd ehhez 600 $\mu$ L 1M-os foszforsavat mértünk.

## Szilárdfázisú extrakció

Az előkészített plazma minták további tisztítása és töményítése SPE alkalmazásával történt.

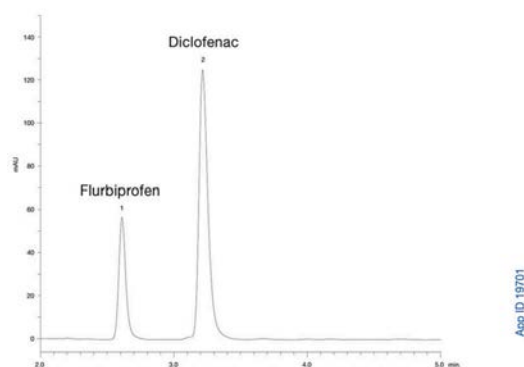
Ekvibrálás: 2mL víz  
Mintafelvitel: 1,6mL előkészített plazma  
Mosás: 1mL 5%-os metanol  
Szárítás: 1perc (254Hgmm nyomáson)  
Elúció: 1mL metanol  
Bepárlás: 53°C-os nitrogén áramban 20 percig  
Oldás: 0,5mL eluensben

## Folyadék-folyadék extrakció

Az előkészítés után az oldathoz 5mL hexán/IPA=95/5 v/v elegyet adtunk. 1 perces összerázás és 10 perc centrifugálás (2000rpm) után a felső, szerves fázisból 4mL oldatot bepároltunk 53°C-os nitrogénáramban 20 percig.

## LC/UV

A diclofenac és IS (flurbiprofen) kromatogramja plazma mátrixból történő SPE extrakció után.



2. ábra: 50 $\mu$ g/mL koncentrációjú diclofenac spike-olt plazma minta és az extrakció után hozzáadott 160 $\mu$ g/mL koncentrációjú flurbiprofen (IS) kromatogramja.

Oszlop: 75x4,6mm Kinetex C18 2,6 $\mu$ m (00C-4462-E0)  
Eluens: foszforsavas víz (pH=3,3)/metanol=63/37 v/v  
Elemzési idő: 5perc  
Hőmérséklet: 30°C  
Detektálás: 254nm  
Minta: flurbiprofen (IS) és diclofenac

## Eredmények és értékelés

Hagyományosan a folyadék-folyadék extrakció volt az elterjedt tisztítási módszer gyógyszeripari minták esetén. Bár sok évtizede alkalmazzák ezt a technikát, még mindig találkozhatunk hiányosságokkal. Az összehasonlító mérés elvégzése során kiderült, hogy a szilárdfázisú extrakció sok előnyt mutatott fel ezzel a hagyományos módszerrel szemben, mint pl. a visszanyerés, idő, oldószer megtakarítás, illetve a sokkal reprodukálhatóbb eredmények.

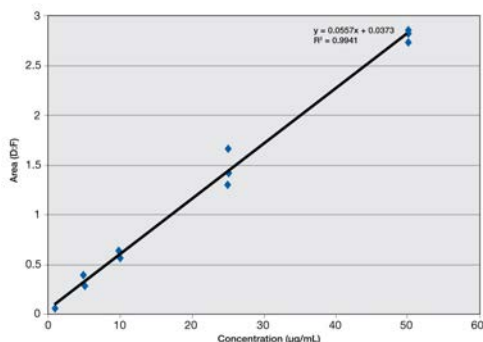
Diclofenac-kal spike-olt plazma mintákat alkalmaztunk az SPE (polimer alapú szorbent, Strata-X-et alkalmazva) és az LLE extrakciós hatékonyságának összehasonlítására. Az eredmények szerint a szilárdfázisú extrakció során a Strata-X szorbensen a teljes visszanyerés a 15 $\mu$ g/ml koncentrációjú diclofenac esetén plazma mátrixban közel 86% volt az LLE során mért 46%-kal szemben. (1. táblázat) Ez azt jelenti, hogy LLE alkalmazása esetén a visszanyerés megközelítőleg a fele az SPE-hez képest. Ez az eljárás az LLE esetén egy extrakciós lépést tartalmazott, szemben a többszöri hexán-IPA eleggyel való extrakcióval, amellyel meg lehetne növelni a hatékonyságot, viszont az jóval nagyobb oldószerfelhasználással járna együtt.

Ezzel nemcsak az extrakcióra fordított idő növekedne meg, hanem a nagyobb mennyiségű oldószer elpárologtatása is több időt venne igénybe.

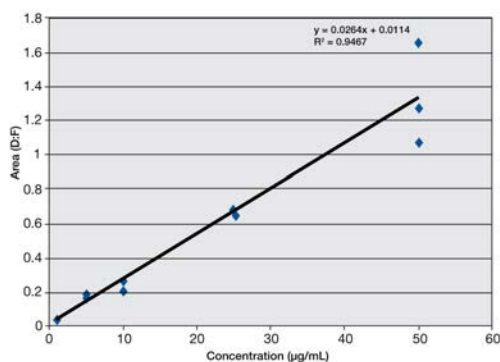
1. táblázat Teljes visszanyerés (%) diclofenac esetén

|     | spike-olt koncentráció | diclofenac   | RSD középérték % |
|-----|------------------------|--------------|------------------|
| SPE | 15ug/ml                | 86%<br>(n=4) | 10               |
| LLE | 15ug/ml                | 46%<br>(n=4) | 35               |

Azon felül, hogy az SPE sokkal nagyobb visszanyerési százalékot eredményez, további előnye még, hogy a Strata-X szorbens jóval kisebb eltérést mutat a mintaelőkészítő oszlopok között: 10%-os RSD középérték szemben az LLE során mért több mint 3-szoros, azaz 35%-os értékkel. (2. és 3. ábra). Az RSD középértékeket tekintve SPE és LLE esetén az SPE sokkal pontosabb és reprodukálhatóbb módszer gyógyszeripari vegyületek extrakciójára, mint a folyadék-folyadék extrakció.



2. ábra: RSD középértékek.



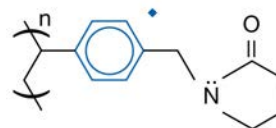
3. ábra: RSD középértékek

## Összegzés

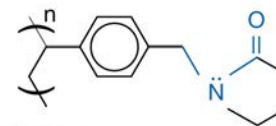
A Strata-X szorbens a pirrolidon ligand által nyújtott kölcsönhatási mechanizmusoknak köszönhetően a semleges vegyületek mellett bázikus és savas csoportot tartalmazó poláris vegyületeknél jó visszatartást biztosít még magas szerves oldószer tartalmú mosó elegyek esetén is. A pirrolidon ligand gyűrűje lehetővé teszi aromás vegyületek esetén a pi-pi kölcsönhatást, továbbá savas és bázikus vegyületek képesek kötődni a szekunder amin nitrogénjéhez valamint a karbonil csoport szénjéhez.

## Binding Properties of Strata-X

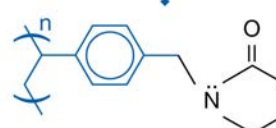
### Pi-Pi Bonding



### Hydrogen Bonding, Dipole-Dipole Interactions



### Hydrophobic Interactions



• Analyte-sorbent interaction site highlighted in blue.

4. ábra: SPE funkciós csoport kölcsönhatásai.

Ezzel szemben a folyadék-folyadék extrakció két nem elegendő oldószert használ, amelyek a szóban forgó analittal való kölcsönhatásért versenyeznek. Bár a folyadék-folyadék extrakció a legtöbbször választott extrakciós technika, az SPE számos előnyt mutatott fel az LLE-vel szemben a diclofenac extrakciója során a Strata-X szorbens funkciós csoportjainak köszönhetően. Összegzésként az adatok azt mutatják, hogy a diclofenac esetén az SPE sokkal jobb visszanyerést ad az LLE-hez képest, kevésbé időigényes, kisebb az oldószer-felhasználása, mint a hagyományos folyadék-folyadék extrakciós módszereké, valamint sokkal reprodukálhatóbb eljárás. Ezek alapján kimondhatjuk, hogy a gyógyszeripari termékek extrakciós módszere egyértelműen az SPE.





# pH-stabil PolymerX™ oszlop alkalmazása bázikus gyógyszervegyületek lipofilitásának kromatográfiás előrejelzésére

Könczöl Árpád\*, Balogh György Tibor

Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium, 1103 Budapest, Gyömrői út 30-32.

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

## Bevezetés

A gyógyszerhatóanyagok lipofilitása alapvetően meghatározza mind a farmakokinetikai, mind a farmakodinámiai sajátosságait, így a paraméter ismerete már a gyógyszerkutatás korai fázisában kulcsfontosságú [1]. A lipofilitás szám-szerű jellemzésére elsősorban az adott vegyület n-oktanol/víz rendszerben mért megoszlási hányadosának logaritmusát ( $\log P$ ) szokás használni. A  $\log P$  érték meghatározása történhet direkt módon „klasszikus” rázótolcséres módszerrel vagy potenciometriás titrálással, illetve indirekt úton például kromatográfiás technika segítségével [2]. A fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) megközelítés kis mintaigényű, gyors és széles  $\log P$  tartományban (-1 – 6) használható. Ebben az esetben az adott vegyület  $\log P$  értékének közelítése a poláros mozgófázis és az apoláros állófázis közti megoszlást jellemző retenció tényező ( $\log k$ ) segítségével, jellemzően egy lineáris összefüggés alapján ( $\log P = a \cdot \log k + b$ ) történik [3]. Erősen bázikus vegyületek valódi megoszlási hányadosának kromatográfiás méréséhez elengedhetetlen, hogy az adott vegyület neutrális (nem ionizált) molekuláris formában eluálódjon. Ehhez „extrém” magas pH értékű (pH>10) eluens alkalmazása szükséges, amelyet azonban a legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható szilika alapú állófázis nem tolerál. E problémákra például a polimer alapú, így széles pH tartományban stabil (pH=0-14), továbbá a C18-cal módosított szilika alapú álló-fázisokhoz hasonló szelektivitást biztosító állófázisok használata jelenthet megoldást.

Jelen feljegyzés a PolymerX™ RP-1 elnevezésű [4], polisztirol-divinilbenzol (PSDVB) állófázis bázikus gyógyszer-vegyületek  $\log P$  értékének előrejelzésére történő alkalmazhatóságát mutatja be.

## Anyagok és módszer

A tesztelt gyógyszervegyületek oldásához használt dimetil-szulfoxid (DMSO) és az eluensekben használt HPLC-tisztaságú metanol a Sigma-Aldrich Kft-től került beszerzésre, míg az ioncserélt vizet egy Millipore Milli-Q® víztisztító berendezésből nyertük. A vizsgált 33 db gyógyszervegyület (1. táblázat) szintén a Sigma-Aldrich Kft-től származott. Azonosságukat és tisztaságukat analitikai bizonylatokkal igazolta a forgalmazó.

A kromatográfiás mérések egy Agilent 1200 RR-HPLC készüléken történtek (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A retenció időket egy PolymerX 3u RP-1 100Å, 50 x 4,0 mm (00B-4338-DO, Phenomenex, Torrance, CA, USA) analitikai kolonnán határoztuk meg, amelyet egységesen 40 °C hőmérsékleten és 1,0 ml/perc térfogatáram mellett használtunk. 0,1% trifluor-ecetsavval savanyított ioncserélt víz (pH=2,0), illetve lúgos eluensként 20 mM ammónium-acetát (pH=10,5) oldat szerepelt „A” eluensként, míg „B” eluensként HPLC-tisztaságú metanolt alkalmaztunk.

A lineáris gradiens elúció programja: 0-5,3 perc 5-100% B; 5,3-8,5 perc 100% B; 8,51 perc 5% B; majd 3 perc ekvibrációs idő.

A gyógyszervegyületeket egységesen 1 mM koncentrációjú DMSO oldatokban vizsgáltuk.

A kromatogramokat 220, 254, 280 és 320 nm hullámhosszokon DAD detektorral rögzítettük és a MassHunter® szoftverrel értékeltük. Az alkalmazott injektálási térfogat egységesen 1 µl volt.

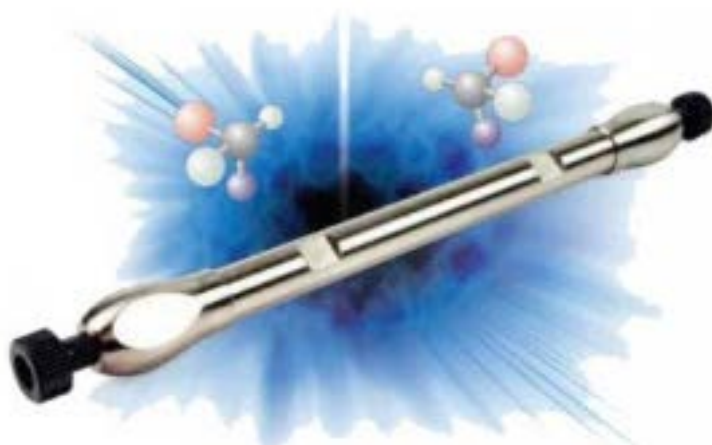
A 0% szerves eluens tartalomra extrapolált retenció tényező ( $\log k_0$ ) értékek számolása a Snyder és Dolan féle összefüggéssel történt [5]:

$$\log k_0 = (t_{R,g} - \frac{t_0}{b} \log(2,3b) - t_0 - t_D) \cdot \frac{b}{t_0}$$

ahol  $t_{R,g}$  az adott vegyület gradiens módban mért retenció ideje (perc),  $t_0$  a kolonna holt ideje ( $t_0 = t_{DMSO} = 0,32$  perc),  $t_D$  a gradiens késleltetési ideje (0,98 perc), és  $b$  a gradiens lépcső paramétere (0,3):

$$b = \frac{V_m \cdot \Delta\phi \cdot S}{t_G \cdot F}$$

ahol  $V_m$  a kolonna holt térfogata (kb. 0,4 ml),  $\Delta\phi$  a szerves eluens térfogatarányának változása a gradiens program alatt (0,95);  $S$  az adott vegyületre jellemző állandó (közelítőleg 4,2 kis molekulákra),  $t_G$  gradiens ideje (5,3 perc), és  $F$  a térfogatáram (1,0 ml/perc).



## Eredmények

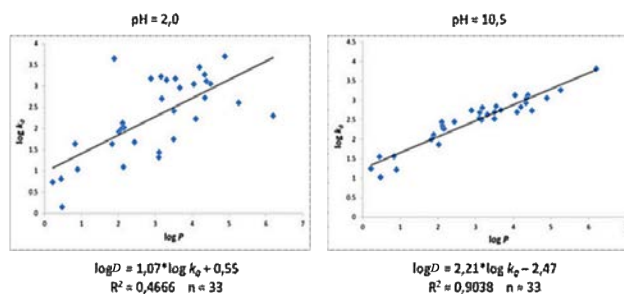
A vizsgált 33 db gyógyszervegyületre kapott  $\log P$  –  $\log k_0$  összefüggéseket az 1. ábra és az I. táblázat tartalmazza.

I. táblázat A vizsgált gyógyszervegyületek,  $\log P$  értékük és mért kromatográfias retenció tényezőik.

| Ssz. | Név           | $\log P$ * | $\log k_0$ |           |
|------|---------------|------------|------------|-----------|
|      |               |            | pH = 2,0   | pH = 10,5 |
| 1    | Acebutolol    | 2.02       | 1.92       | 1.86      |
| 2    | Asztemizol    | 4.35       | 2.72       | 3.05      |
| 3    | Atenolol      | 0.22       | 0.73       | 1.24      |
| 4    | Benzokain     | 1.89       | 3.64       | 2.11      |
| 5    | Bromokriptin  | 4.20       | 3.44       | 2.82      |
| 6    | Cimetidin     | 0.48       | 0.15       | 1.02      |
| 7    | Difenhidramin | 3.18       | 2.70       | 2.81      |
| 8    | Diltiazem     | 2.89       | 3.17       | 2.74      |
| 9    | Fenazopiridin | 3.31       | 3.14       | 2.64      |
| 10   | Fluoxetin     | 4.50       | 3.05       | 2.73      |
| 11   | Haloperidol   | 3.67       | 2.95       | 2.74      |
| 12   | Hidroxizin    | 3.55       | 3.17       | 2.84      |
| 13   | Imipramin     | 4.39       | 3.11       | 3.13      |
| 14   | Ketokonazol   | 4.34       | 3.26       | 2.93      |
| 15   | Kinin         | 3.50       | 1.74       | 2.53      |
| 16   | Klaritromicin | 3.16       | 3.22       | 2.50      |
| 17   | Klorokin      | 3.11       | 1.43       | 2.68      |
| 18   | Klozapin      | 4.10       | 2.22       | 2.69      |
| 19   | Lidokain      | 2.44       | 1.67       | 2.45      |
| 20   | Mikonazol     | 4.89       | 3.70       | 3.06      |
| 21   | Moxonidin     | 0.90       | 1.03       | 1.22      |
| 22   | Olanzapin     | 3.10       | 1.32       | 2.53      |
| 23   | Pindolol      | 1.83       | 1.64       | 1.99      |
| 24   | Prazosin      | 2.16       | 2.01       | 2.26      |
| 25   | Prokain       | 2.14       | 1.09       | 2.27      |
| 26   | Prometazin    | 4.05       | 3.04       | 3.13      |
| 27   | Ranitidin     | 0.45       | 0.81       | 1.54      |
| 28   | Rivasztigmin  | 2.10       | 2.00       | 2.44      |
| 29   | Tamoxifén     | 5.26       | 2.61       | 3.26      |
| 30   | Terbinafin    | 6.20       | 2.30       | 3.81      |
| 31   | Tetrakain     | 3.51       | 2.41       | 2.69      |
| 32   | Timolol       | 2.12       | 2.13       | 2.35      |
| 33   | Trimethoprim  | 0.83       | 1.64       | 1.56      |

\*: rázótölcséres és/vagy potenciometriás titrálásból származó értékek, jellemzően [6] forrásból.

A tesztvegyületek sav-bázis sajátosságait figyelembe véve, az előzetes várakozásoknak megfelelően az erősen lúgos eluent alkalmazó kromatográfias rendszerben szignifikánsan jobb korrelációt kaptunk a lipofilitás és a kromatográfias visszatartás között. Megállapítható, hogy a lúgos eluent alkalmazó rendszerben nyert kalibrációs egyenlet adekvát módon képes előre jelezni bázikus gyógyszervegyületek lipofilitását.



1. ábra Összefüggés a vizsgált bázikus gyógyszervegyületek lipofilitása ( $\log P$ ) és HPLC-vel meghatározott retenció tényezője között savas, illetve lúgos kémhatású eluens alkalmazása mellett. Megjegyzés: a numerikus értékeket az 1. táblázat tartalmazza.

Ezen felül a kapott eredmények indirekt módon megerősítették a polisztirol-divinilbenzol állófázis C18-as állófázishoz viszonyított szelektivitásának analógiáját. Ki kell továbbá hangsúlyozni, hogy közel 300 injektálás után is 5%-nál kisebbnek adódott a vizsgált oszlopon mért retenció idők reprodukálhatóságának relatív szóródása, így valóban pH-stabil, robusztus állófázisként értékelhető a PSDVB. Meg kell azonban jegyezni, hogy alacsony csúskapacitása és kis mechanikai ellenálló képessége (170 bar maximális nyomásesés) miatt csak kis kromatográfias hatékonyság és közepes áteresztőképesség érhető el a tesztelt kolonnán.

## Irodalom

- [1] Testa, B., Van de Waterbeemb, H., Folkers, G., Guy, R. (eds.) Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001.
- [2] Takácsné Novák, K., Völgyi, G.: A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban. Magy. Kém. F. 111, 169–176 (2005).
- [3] Gocan, S., Cimpan, G., Comer, J., 2006. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. In: Grushka, E., Grinberg, N. (eds.) Advances in Chromatography. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 79–176.
- [4] Phenomenex Product Guide 13/14, p. 239.
- [5] Snyder, L.R., Dolan, J.W.: Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. J. Chromatogr. A 721, 3–14 (1996).
- [6] Avdeef, A. 2012. Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.



## Gasztrosarok

### Áfonyás csokis puszedlik:

**Tartson egy keveset otthon a hűtőben vagy a fagyaszóban ebből a finom sütimasszából**



Fotó: Colin Campbell, a Guardian-tól

Egy rejtett adag, sütésre kész étel a hűtőben vagy fagyaszóban bármilyen eseményhez jól jön decemberben. Mindig van valaki, aki váratlanul beállít, így kell valami, amivel percek alatt elkészülhetünk. Ilyenkor nagyon tudunk örülni egy tál házi készítésű süti alapján. Egy hétig is eláll, fagyaszva akár néhány hónapig is, és egy pillanat alatt lehet formázni, kinyújtani és kisütni. Tartsunk egy keveset ebből az ízletes áfonyás, csoki darabokkal megszórt zabsüteményből a hűtőben, és még hidegen is puha és omlós marad, hiszen tartalmaz egy kis olajat. Elkészítés: körülbelül 25 perc.

**50g vaj**  
**175g kristálycukor**  
**1 teáskanál vanília kivonat**  
**1 közepes tojás**  
**100ml napraforgómag olaj**  
**150g sima liszt**  
**1 teáskanál sütőpor**  
**100g zabpehely**  
**100g étcsokoládé**  
**170g csomag szárított áfonya**  
**porcukor**

Verjük fel finoman a vaját, cukrot, vaníliát és tojást, majd öntsük hozzá az olajat, lisztet, sütőport és a zabpehelyt.

Keverjük össze a csokoládét és az áfonyát, majd hűtsük vagy fagyasszuk le a masszát, amíg kicsit megszilárdul. Béleljük ki a tepsit sütőpapírral, gyúrjunk diónyi méretű golyókat a masszából, és tegyük a tepsibe sütésre. Teaszűrő vagy szita segítségével szórjuk meg jól mindegyik süti tetejét porcukorral (elég ha csak tálaláskor tesszük rá).

Melegítsük a sütőt 170°C-ra (150°C légkeverésben) 3-as gázfokozaton, és süssük 14 percig, amíg térfogata megnő és aranybarna nem lesz a széle.

Hagyjuk kihűlni a tepsiben néhány percig, majd egy spatulával óvatosan emeljük át egy tányérra, hogy lehűljön és megszilárduljon.

## 5 saláta öntet recept

### Új saláta dressing ötletek a Food Network Magazine-tól



**1. Mangó-Lime öntet:** Pürésítsünk 1 felszeletelt, meghámozott mangót, a rostjait és levét 1 lime-nak, tegyük egy teáskanál bármilyen dijoni mustárt, cukrot és sót egy turmixba. Fokozatosan mixeljünk ¼ csésze balzsamecettel és ½ csésze növényi olajjal.

**2. Bazsalikomos-diós:** Turmixoljunk össze ¾ csésze olívaolajat, 3 kanál bármilyen pörkölt diót, citromlevet, 1 csésze friss bazsalikomot, 1 fokhagyma gerezdet és 1 teáskanálnyi sót.

**3. Szarvasgombás:** Verjük fel 1 kanál bármilyen dijoni mustárt és pezsgőecetet, 1 apróra vágott mogoróhagymát, ½ teáskanál sót, és borsot ízlés szerint. Fokozatosan keverjük ¼ csésze szarvasgomba olajban és ¼ csésze olívaolajban

**4. Krémes-kéksajtos:** Keverjük össze ¼ csésze bármilyen író (tejes vaj) és tejfölt, ½ csésze összemorzolt kéksajtot, ½ citrom levét, sót, és csípős szósz ízlés szerint.

**5. Ezersziget:** Keverjük össze ½ csésze majonézt, ¼ csésze édes chili szósz, 2 kanálnyi édes-savanyú szósz és szeletelt barackot, 1 szeletelt főtt tojást és egy ½ citrom levét.



