

# KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat



# VISION SAFETY CAPS

Prémium minőség

Széles termékpaletta

Megfizethető ár

GYÁRTÓ: VISIONEC-LAB KFT.

KIZÁRÓLAGOS MAGYARORSZÁGI  
FORGALMAZÓ: GEN-LAB KFT.



MAGYAR TERMÉK



# Tartalomjegyzék

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

3. rész: UHPLC/HPLC módszertranszfer.

*Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs*

**8.** A lángionizációs detektor (FID) és használatakor tapasztalt hibák felismerése és javítása.

*Kory Kelly*

fordította: *Szabó Géza*

**10.** A Shimadzu bemutatja az új LCMS-8060 készüléket.

*Simkon Kft.*

**12.** Puffer választás szempontjai a hidrofili kölcsönhatási kromatográfiában.

Puffer kation és anion kiválasztás hatása az elválasztásra.

*A. Carl Sanchez, Monika M. Kansal*

fordította: *Héja Kornélia*

kiegészítette: *Fekete Jenő*

**18.** Akirális állófázisok összehasonlítása SFC körülmények között.

*Philip J. Koerner, Nick Mitchell, Sky Countryman*

fordította: *Szász Vadász Tas*

**20.** Az immobilizált és fizikailag kötött poliszacharid alapú királis HPLC oszlopok összehasonlítása általános oldószer összetételek mellett.

*Zdravko Milanov, Liming Peng, Jeff Layne,*

*Marc Jacob*

fordította: *Imrik Péter*

**25.** Megnövekedett visszanyerés poláris savas anyagok esetén polimer alapú erős anioncserés SPE-n gyenge anioncserés szorbenshez képest.

*Erica Pike, Shahana Huq*

fordította: *Szabó Krisztina*

**27.** Mennyi? Harminc... ja nem, negyven. 40 éves a nagyhatékonyságú ionkromatográfia.

*Horváth Krisztián, Hajós Péter*

## Kromatográfus

II. évfolyam 2. szám

Nyomdai előkészítés:

Mogyorósi Eszter

[mogyorosi.eszter@gen-lab.hu](mailto:mogyorosi.eszter@gen-lab.hu)

Nyomdai munka:

Real Press Nyomda

Szakmai szerkesztők:

Fekete Jenő

Fekete Szabolcs

Kormány Róbert

Imrik Péter

Kiadja:

Gen-Lab Kft.

ISSN 2415-9042

A szerkesztőség elérhetőségei:

Cím: H-1119 Budapest,

Hadak útja 41.

Tel.: (36-1) 206-2455

Fax: (36-1) 206-2451

Email: [info@gen-lab.hu](mailto:info@gen-lab.hu)

Web: [www.gen-lab.hu](http://www.gen-lab.hu)

**Real Press Nyomda**

# A héjszerkezetű (mag-héj) töltetek alkalmazási lehetőségei

## 3. rész: UHPLC/HPLC módszertranszfer

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.

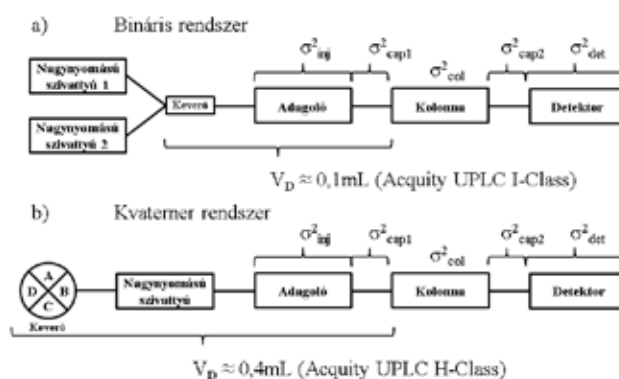
<sup>3</sup> Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok  
Tanszék, 1211 Geneva, Boulevard d'Yvoy 20.

Manapság a legtöbb folyadékkromatográfias elválasztást gradienselúciós módban végzik. Gradiens elválasztásoknál döntő jelentősége lehet a készülék gradiens késési térfogatának (dwell volume,  $V_D$ ). Ez a térfogat a pumpa térfogatokból, keverőből, mintaadagoló hurokból (sample loop) és az oszlop elejéhez vezető összekötő kapillárisból tevődik össze, és azt a „plusz időt” adja a rendszerhez, amíg a beállított mozgófázis összetétel a kolonna elején megjelenik. Ez a gradiens késési térfogat nagyban függ az alkalmazott nagynyomású szivattyú rendszertől. Technikailag két eltérő elven működő gradiens megoldás létezik, attól függően, hogy a mozgófázisokat kis nyomáson, vagy nagy nyomáson keverjük össze (kisnyomású és nagynyomású gradiens). A négy folyadék összekeverését lehetővé tevő kvaterner rendszer a kisnyomású kategóriába tartozik (pl. Alliance e2695 HPLC), egyetlen aktív szállító szivattyú fejjel és szelepvezérléssel oldják meg a mozgófázis összetételének változtatását (1/b) ábra).

Az ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (UHPLC) általában nagy nyomású gradiens rendszereket használnak, ekkor ahány összetevőből áll a mozgófázis, annyi nagynyomású szivattyú kell (1/a) ábra). A készülék árának csökkentése miatt az esetek többségében két összetevőből áll a mozgófázis, ezért ezt bináris rendszernek is nevezik (pl. Acquity UPLC I-Class). Természetesen UHPLC technikánál is lehet kisnyomású gradiens rendszert használni (pl. Acquity UPLC H-Class). Ezt azért kell kiemelni, mert a késleltetési térfogatot elviekben megszabja, hogy melyik rendszerrel dolgozunk. A nagynyomású gradiens rendszerrel a nagynyomású szivattyú nem tartozik bele a késleltetési térfogatba, a kisnyomásúnál igen.

Az 1. ábrán jól látható, hogy a keverő térfogata és az előbb említett tény miatt a kis nyomású gradiensnél a késleltetési térfogat nagyobb. Amíg a keverőből elér a megváltoztatott összetételű mozgófázis a kolonna elejére, addig izokratikus szakasza van a gradiens elúciónak. Egyértelmű, hogy a retenciós időt és sok esetben a

szelektivitást is befolyásolja a késleltetési térfogat ( $V_D$ ), vagy a térfogatáramlási sebesség ismeretében kiszámítható késleltetési idő. Továbbiakban az 1. ábrához kapcsolódóan számszerűleg adunk meg adatokat a retenció változására egy kisnyomású gradiens késést (1/b) ábra), összevetve a nagynyomásúval (1/a) ábra).



1. ábra: A bináris a) és kvaterner b) folyadékkromatográfias rendszerek és a rendszerekhez tartozó térfogatok értelmezése

Ultra-nagynyomású folyadékkromatográfias (UHPLC) mérések során gyakran 0,5mL/perc térfogatáramlási sebességgel dolgozunk (pl. 2,1mm átmérőjű kolonnán). Ekkor, ha a készülékünk gradiens késési térfogata  $V_D = 0,1\text{mL}$  (1/a) ábra), akkor 0,2 percet fog „késni” a gradiens program, ha  $V_D = 0,4\text{mL}$  akkor már 0,8 perc késéssel kell számolnunk. A két készüléken mért komponensek retenciós ideje között tehát átlagosan 0,6 perc különbség várható. A kevésbé visszatartott komponensek esetén különösen kritikus lehet a gradiens késés változása. Sokszor a szelektivitás és felbontás is változhat, ami annak is köszönhető, hogy az elválasztás a gradiens program késése miatt (a nagyobb gradiens késésű rendszeren), mindig egy „szükségyszerű” izokratikus szakasszal indul. A kis gradiens késleltetésű készülékeknél egy kezdeti izokratikus szakasz beiktatásával növelhetjük a „látszólagos” gradiens késést. A nagyobb gradiens késleltetésű rendszerek esetén pedig a gradiens programot nem az elejétől, hanem a késésnek megfelelő időhöz tartozó kiindulási mozgófázis összetételétől kell indítani, ha azt akarjuk, hogy hasonlítson a kromatogram a kisebb késleltetésű rendszeren mért kromatogramhoz. Ezt viszont a mérések visszavezethetősége miatt a gyakorlatban nem tehetjük meg, ez megmarad, mint elméleti lehetőség.

*„Kromatográfias módszerek átadásakor sokszor okozhat gondot a különböző rendszerek és kolonnák közötti módszertranszfernek nevezett módszeradaptálás.”*

Gyakori probléma, hogy régebbi, meglévő konvencionális nagynyomású folyadékkromatográfias (HPLC) módszereket viszünk át, transzferálunk (továbbiakban a módszerátvitelt, a szaknyelvben elterjedt módszertranszferálásnak nevezzük) UHPLC módszerré vagy éppen az ellenkezője, hogy az UHPLC módszereket kell hagyományos oszlopra/készülékre átdolgozni, mert az átvevő laboratóriumban csak az áll a rendelkezésre. Kiemeljük, hogy egy módszertranszferálás csak akkor lesz sikeres, ha a kolonnák (állófázisok) felületi fizikai-kémiai tulajdonságai megegyeznek. Ennek taglalása meghaladja a cikk kereteit. Az ismertetett szabályok a készülékek



és a kolonnák paraméteri különbségéből eredő eltéréseket veszi figyelembe. Ez külön elnevezést kap, amelyet úgy hívunk, hogy geometriai módszertranszfer. Módszertranszferálásnál az ún. geometriai transzfer szabályok mellett a gradiens idő és oszlop holt idő arányát ( $t_G/t_0$ ) is állandó értéken kell tartani. Az új gradiensidő átvitelére az egyik oszlopról a másikra, jó közelítést ad az [1] összefüggés, amennyiben változik a térfogatáramlási sebesség, az oszlophossz, és a szemcseátmérő.

$$t_{G2} = t_{G1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \cdot \left( \frac{d_{p2}}{d_{p1}} \right)^2 \quad [1]$$

ahol  $t_{G1}$  és  $t_{G2}$  a gradiens ideje,  $F_1$  és  $F_2$  a térfogat-áramlási sebessége,  $L_1$  és  $L_2$  a kolonna hossza,  $d_{p1}$  és  $d_{p2}$  az átlagos szemcseátmérő. Az indexben jelölt 1 és 2 pedig a két eltérő kromatográfias rendszert jelöli.

Az eltérő méretű kolonnák esetén a mintaadagolási térfogatot is változtatni kell, hogy elkerüljük a térfogati túlterhelést. A maximálisan a kolonnára adagolható térfogatok szoros összefüggésben vannak a kolonna méretével, és az elérhető kinetikai hatékonysággal, amit az állófázis szemcseátmérője szab meg. A két hatás figyelembe vételével belátható, hogy sokkal kisebb térfogatokat adagolhatunk egy 50 x 2,1mm-es kolonnára, mint egy 50 x 4,6mm-esre. Az injektálási térfogatot a oszloptérfogatok arányának megfelelően kell változtatnunk:

$$V_2 = V_1 \cdot \frac{d_2^2 \cdot L_2}{d_1^2 \cdot L_1} \quad [2]$$

ahol  $V_1$  és  $V_2$  az injektált minta mennyisége,  $d_1$  és  $d_2$  a kolonnák átmérője.

Amennyiben a folyadékkromatográfias módszerünket valamilyen modellező szoftver segítségével (pl. DryLab 3D) fejlesztettük (Kromatográfus, 2015 június, 9-12), lehetőségünk van az ún. „szimulált módszertranszferre”. Ez arra ad lehetőséget, hogy - a szoftver segítségével - a geometriai és injektálási szabályok mellett ([1] és [2] egyenletek) a készülékek késleltetési térfogatát ( $V_0$ ) is figyelembe vegyük.

*A következőkben a helyes folyadékkromatográfias módszertranszferre mutatunk be példát.*

A szimulált módszertranszferhez három eltérő típusú készüléket (Acquity UPLC I-Class, Acquity UPLC H-Class és Alliance 2965 HPLC) és három különböző méretű (50 x 2,1mm 1,7 $\mu$ m, 100 x 3mm 2,6 $\mu$ m és 150 x 4,6mm, 5 $\mu$ m), de azonos töltetű (Kinetex C18) állófázist alkalmaztunk. A készülékek jellemző paramétereit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Kiindulási módszernek az Aquity UPLC I-Class / 50 x 2,1mm Kinetex C18, 1,7 $\mu$ m rendszert választottuk.

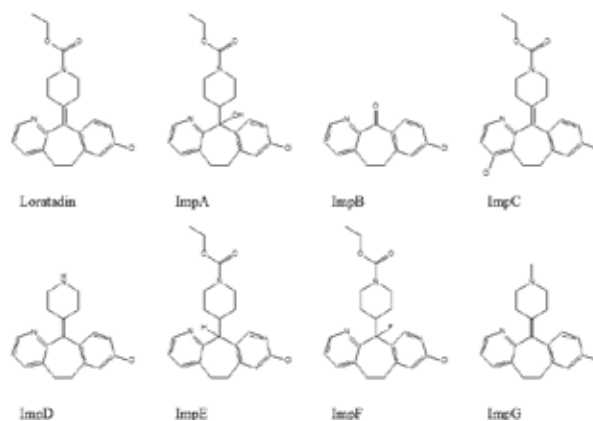
1. táblázat: Folyadékkromatográfias rendszerek és azok kolonnán kívüli térfogatai

Rendszer	Kolonnán kívüli térfogat ( $\mu$ L)	Késleltetési térfogat (mL)
Acquity UPLC I-Class	8	0,1
Acquity UPLC H-Class	12	0,4
Alliance 2965 HPLC	30	1,0

Kromatográfias körülmények:

Állandó paraméterek:

- Mozgófázis „A”: 30mM Na-foszfát puffer, pH= 3,0
- Mozgófázis „B”: acetonitril
- Gradiens összetétel: 10%B—90%B
- Hőmérséklet: 40°C
- Detektálás hullámhossza: 220nm
- Modellvegyületek: Loratadin és Ph. Eur. szennyezői (2. ábra)



2. ábra: A Loratadin és Ph. Eur. szennyezői

Változók:

Rendszer 1 (kiindulási paraméterek):

- Készülék: Acquity UPLC I-Class
- Állófázis: 50 x 2,1mm Kinetex C18, 1,7 $\mu$ m
- Gradiens idő ( $t_G$ ): 5 perc, áramlási sebesség: 0,5mL/perc
- Az adagolt minta mennyisége: 1 $\mu$ L

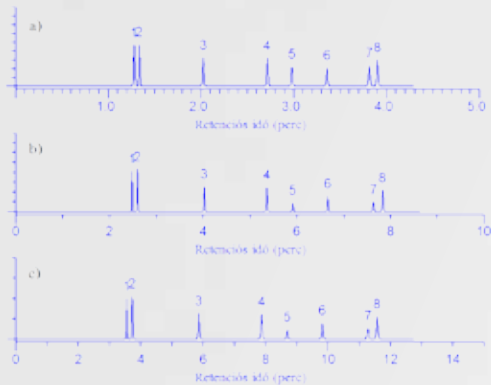
Rendszer 2:

- Készülék: Acquity UPLC H-Class
- Állófázis: 100 x 3mm Kinetex C18, 2,6 $\mu$ m
- Gradiens idő ( $t_G$ ): 10 perc, áramlási sebesség: 1,0mL/perc
- Az adagolt minta mennyisége: 4 $\mu$ L

Rendszer 3:

- Készülék: Alliance 2965 HPLC
- Állófázis: 150 x 4,6mm Kinetex C18, 5 $\mu$ m
- Gradiens idő ( $t_G$ ): 15 perc, áramlási sebesség: 2,4mL/perc
- Az adagolt minta mennyisége: 15 $\mu$ L

A 3. ábrán szimulált, normalizált kromatogramokat mutatunk be. A retencióidő tengely úgy lett eltolva, hogy egy szinten legyen az 5, 10 és 15 perces elemzési idő. Az így eltoltskálán látszik, hogy eltérő kromatográfias rendszereken is viszonylag egyszerűen megoldható a módszertranszfer, közel ugyanolyan szelektivitással.



3. ábra: A szimulált módszertranszfer kromatogramjai: a) Készülék: Acquity UPLC I-Class / Állófázis: 50 x 2,1mm Kinetex C18, 1,7 $\mu$ m, b) Készülék: Acquity UPLC H-Class / Állófázis: 100 x 3mm Kinetex C18, 2,6 $\mu$ m, c) Készülék: Alliance 2965 HPLC / Állófázis: 150 x 4,6mm Kinetex C18, 5 $\mu$ m, Retenciók sorrend: ImpD, ImpG, ImpB, Loratadin, ImpE, ImpF, ImpA, ImpC

Első körben tehát mindenképp hasznos lehet modellezni a módszertranszfer, hogy lássuk mennyire tartható az elválasztás minősége a különböző kromatográfiai rendszerek között. Természetesen ez csak az első lépés, mindig meg kell győződnünk a valóságban is a transzferált elválasztás jószágáról. Az egyszerű geometriai transzfer szabállyal és a gradiens térfogat késés figyelembevételével még nem vettünk figyelembe minden paramétert, ami befolyásolhatja az elválasztást. Ezek közül az egyik legfontosabb a nyomás hatása lehet, hiszen UHPLC körülmények között általában lényegesen nagyobb nyomáson dolgozunk, mint a konvencionális HPLC körülmények között. A nyomás pedig befolyásolja a retenciót, a mozgófázis viszkozitását és fajlagos térfogatát is. Ehhez adódhatnak még a nagy nyomás és lineáris sebesség mellett fellépő sűrűségi hő-effektusok amelyek szintén jelentősen befolyásolhatják a visszatartást. Ez utóbbi nagyban függ a készüléktől (oszlop termosztát típusától).



A Magyar Kémikusok Egyesülete Csongrád Megyei Csoportja  
és az MTA Szegedi Akadémiai Bizottság Kémiai Szakbizottsága

**2016. január 25-27.**

között Szegeden, a MTA SzAB Székházában (Szeged, Somogyi u. 7.) renndezi

### **XLVII. Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyamát.**

Az utóbbi évek tanfolyamain rendszeresen kiemelt téma volt a folyadékromatográfia-tömegspektrometria kapcsolt technika. Így lesz ez most is, mert a korszerű analitikai laboratóriumokban ma már nélkülözhetelen ez a módszer. Előadások hangzanak el a konvergens kromatográfiáról, a kromatográfia, a kapilláris elektroforézis és a tömegspektrometria új fejlesztéseiről, biológiai minták és élelmiszerek analízisének, hatósági laboratóriumok legújabb módszereiről. A tanfolyam előadói ez alkalommal is a hazai elválasztástudomány szaktekintélyei és fiatal kollégák, valamint kromatográfiás berendezéseket, tömegspektrométereket forgalmazó cégek képviselői lesznek.

A teljesség igénye nélkül az elmúlt években a következő kollégáktól hallottunk nagyszerű előadásokat: *Antal Eszter, Bobály Balázs, Drahos László, Fekete Jenő, Felinger Attila, Gali Attila, Harangi János, Herpai Zoltán, Horváth Krisztián, Huszár Pál, Ilisz István, Imre Béla, Imrik Péter, Józsa Tibor, Juhász Tamás, Kilár Ferenc, Kirchkeszner Csaba, Klebovich Imre, Kóréh Orsolya, Kormány Róbert, Mayer Mátyás, Márk László, Monostori Péter, Móricz Ágnes, Osztheimer Éva, Péter Mária, Szabó Pál, Szekeres András, Szemán Judit, Szigeti Tamás, Tábi Tamás, Tímár Zoltán, Varga Tibor, Veress Tibor, Vékey Károly.*

A korábbi évekhez hasonlóan a tanfolyamhoz kromatográfiás cégek legújabb termékeiket bemutató kiállítás csatlakozik. Hagyományos, vacsorával egybekötött baráti találkozónkat Szeged egyik patinás éttermébe szervezzük.

A MKE Csongrád Megyei Csoportja nevében ezúton tisztelettel meghívjuk tanfolyamunkra és kérjük, hogy kollégáit is tájékoztassa rendezvényünkről. Jelentkezés az MKE Csongrád Megyei Csoportjának honlapján ([www.mke-szeged.hu](http://www.mke-szeged.hu)) lehetséges.

Jelentkezési határidő: **2016. január 22.**

**A tanfolyam részvételi díja 18000 Ft + ÁFA, PhD hallgatóknak: 11500 Ft + ÁFA.**

A részvételi díj befizetését a Magyar Kémikusok Egyesülete Csongrád Megyei Csoportja Szeged, **K&H Bank Rt. 1020020128610045-00000000** sz. egy számlára „**MKE Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyam**” megjelöléssel kérjük. További információkat a MKE Csongrád Megyei Csoportjának honlapján találnak, ill. Bartók Tibortól (tel: 62-546-503, e-mail: [tibor.bartok@fumizol.hu](mailto:tibor.bartok@fumizol.hu)) és Janáky Tamástól (tel: 62-545-137, e-mail: [janaky.tamas@med.u-szeged.hu](mailto:janaky.tamas@med.u-szeged.hu)) kaphatnak az érdeklődők.

*Bartók Tibor, Janáky Tamás, Péter Antal*  
vezetőségi tagok

*Hannus István*  
elnök



# A lángionizációs detektor (FID) és használatakor tapasztalt hibák felismerése és javítása

Kory Kelly  
Phenomenex Inc.

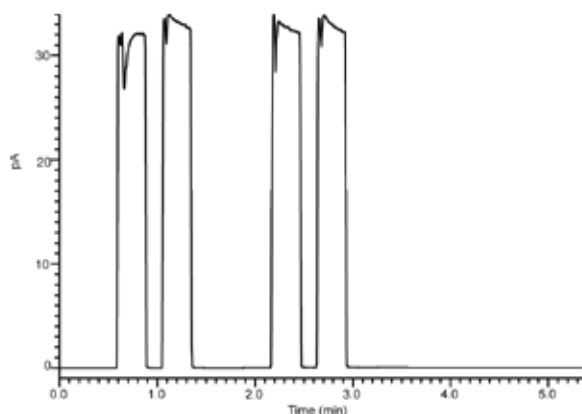
fordította: Szabó Géza

## Bevezetés

*„A Phenomenex technikai csoportjának feladata, hogy segítse munkájukban a gyakorló kromatográfusokat. Ez a technikai segítség nem csak a kolonna használatakor tapasztalt problémák elhárítására vonatkozik, hanem kiterjed a kromatográfias rendszer alkalmazásakor tapasztalt rendellenességekre is.”*

Napjainkban egyre többen teszik fel a kérdést, hogy nem működik a FID detektor (nincs láng), vagy a másik gyakran elhangzó kérdés, hogy mi az oka, hogy kialszik. Meg kell mondanunk, hogy megértjük a kémikusokat, akik használják ezt a technikát, mert mi is gyakran találkoztunk már ezzel a jelenséggel. A ma forgalmazott készülékek elektronikus nyomáscsabályzóval (EPC) ellátottak, melynek egyik fontos funkciója, hogy a FID bármilyen hibáit azonnal jelzi.

## A lángionizációs detektor (FID) és a működésekor tapasztalt problémák

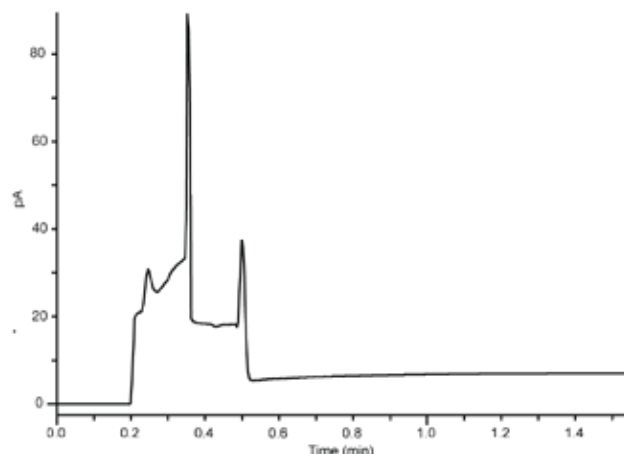


1. ábra: Sikertelen begyújtáskor tapasztalható csúcsok

Az EPC kromatográfias készülékeknél a FID begyújtása automatikusan történik, ha a mért áramerősség egy előre megadott határérték alá csökken, ez tipikusan 2-3pA. Amennyiben az áramerősség, vagy a mért feszültség (mV, jel) szélsőséges értékek között változik - amelyet a gáztömörség megváltozása, például a tömítés megszűnése okozhat, vagy egyéb a FID működését befolyásoló paraméterek változása eredményez (hidrogén vagy levegő áramlási sebességének megváltozása) - a készülék automatikusan leáll és figyelmeztető jelzést ad (1. ábra).

## Hibakeresés:

A hibaelhárítás egyszerűsítése érdekében először is tegyük fel a kérdést, hogy működött-e a FID (égett-e a láng) és csak aztán aludt-e ki? Minden egyes alkalommal, amikor a rendszer begyújtja a lángot, egy jellegzetes hangot hallunk. Amikor a láng begyullad, az alapvonalon egy nagy, szikraszerű jelet látunk (100pA felett), ami időben egybeesik magával a hanggal (2. ábra). Ha a FID be sem gyulladt, annak egészen más okai lehetnek.



2. ábra: Sikeres begyújtáskor tapasztalható csúcsok

## Ha a láng a FID-ben meg sem gyullad:

*A következőkben néhány hibát és annak elhárítását adjuk meg:*

1. A FID fúvókája el van tömődve, így a gáz nem tud azon kiáramlani. Kiváltó ok: kolonna degradációs termékek, vagy egyéb szilárd részecskék kerülnek bele, mely túl sok használat után következhet be. Megoldás: távolítsuk el a fúvókát és tisztítsuk meg. Kezdjük egy fecskendő tisztító dróttal (vagy hasonló eszközzel), amelyet a tetején dugunk be. A tömítőgyűrűről (ferrul) származó grafitot ultrahangos mosás használatával is eltávolíthatjuk szén-diszulfid alkalmazásával.
2. A következő lehetséges ok a begyújtáshoz használt fűtőszál meghibásodása. Kiváltó ok lehet, hogy a fűtőszál sérült, vagy nem érintkezik megfelelően. A láng begyújtáskor narancsszínű izzást kell, hogy lássunk, amennyiben ezt nem észleljük, nagy valószínűséggel ez lehet a probléma. Erről a következőképp győződhetünk meg. A lángot kézzel is (manuálisan) begyújthatjuk. Ha begyújtás után ég és égve is marad, akkor az izzító szálát ki kell cserélni vagy újra kell csatlakoztatni.

Problémát jelenthet ha az égést tápláló gázokat felcseréljük. Saját tapasztalatunkon keresztül adunk meg erre példát: hidrogén vivógázzal, héliumra váltottunk és az átváltásnál nem megfelelően jártunk el. A hélium elárasztotta az égést tápláló hidrogén vezetékét, tehát a begyújtás sikertelen volt. Tanácsunk, hogy begyújtás előtt a hidrogén gáz vonalát át kell áramoltatni hidrogénnel. Amennyiben gázpalackokat használunk, előfordulhat, hogy azokat felcseréljük. Tanácsoljuk tehát, hogy FID begyújtása előtt győződjünk meg, hogy mind a gázok minősége, mind a nyomásuk megfelelő-e.



## Ha a FID láng ég, majd váratlanul elalszik:

A gyakorló kromatográfusoknak szembe kell nézni azzal a problémával is, hogy adott kísérleti körülmények között jól működő FID detektor más beállításnál kialszik. Most néhány gyakorlatban tapasztalt okra hívjuk fel a figyelmet. Például, ha az áramlási sebesség túl nagy, akkor az a lángot elfújhatja. Ez akkor fordulhat elő, amikor kis belső átmérőjű oszlopról (0,18, 0,25mm) nagyobbra (0,53mm) váltunk anélkül, hogy módosítanánk a szoftver beállításain. Megoldás lehet, hogy a 'total flow' lehetőséget használjuk, ami korrigálja, a 0,53mm-es kolonna miatt megnövelt vivőgáz áramlási sebességet.

A FID megbízható működéséhez szükséges egy minimális hőmérséklet, ha ezt nem éri el, akkor a láng kialszik. Kiváltó ok, a nem megfelelő hőmérséklet beállítás. A megoldás: hogy a detektor hőmérsékletét egy bizonyos érték felett kell tartanunk. Amennyiben ez a határon, vagy az alatt van, a készülék nem tudja fenntartani a lángot.

## Ha a FID néha ég, máskor viszont nem:

A kolonna bekötése a detektorba alapvetően meghatározza annak működését. A benyúlási mélység nem csak a jel nagyságát szabja meg, hanem kihat a FID megbízható működésére is. Az eltérő benyúlási mélységet több tényező szabja meg. Az egyik a kezelő hibája, a másik, hogy a detektor csatlakozója feszül és benyomja a kolonna végét a fűvókába. Ekkor a segédgáz (make-up) áramot a kolonna blokkolja és a FID nem megfelelően működik. A láng nem a megszokott módon ég, sőt még a kisebb huzat is eloltja azt. Külön figyelmet kell fordítani a FID gázok térfogat áramlási sebességére. Szükséges esetben lehet, hogy azoknak az áramlási sebessége nem megfelelő vagy egyáltalán nem is áramolnak. Lehetséges, hogy a gáztűzők eltömődtek vagy nem gáztömörek a vezetékek. A detektor korrekt működéséhez szükséges egy minimális nyomás, ha ez nincs meg, akkor a készülék pár másodpercig próbálja beállítani azt, majd figyelmeztető jelzést küld és leáll. Kiváltó ok lehet, hogy egy esetleges szivárgás csökkentheti a gáznyomást. Bizonyosodjunk meg arról, hogy a gázutánpótlás legalább 40psi nyomás alatt van.

Ez vonatkozik a hidrogénre, és a segédgázra ('make-up'), gázokra is. A levegő magasabb nyomásértékeket igényel. Ebben az esetben a láng meggyullad, de a fenntartáshoz a rendszernek nincs elegendő utánpótlása, így az kialszik. Ellenőrizzük a nyomásértékeket a rendszer bemeneti részén a gyújtáskor, majd az aktuális áramlási értékeket.

## Ha a detektorjel a beállított küszöbérték (cut-off) alatt van:

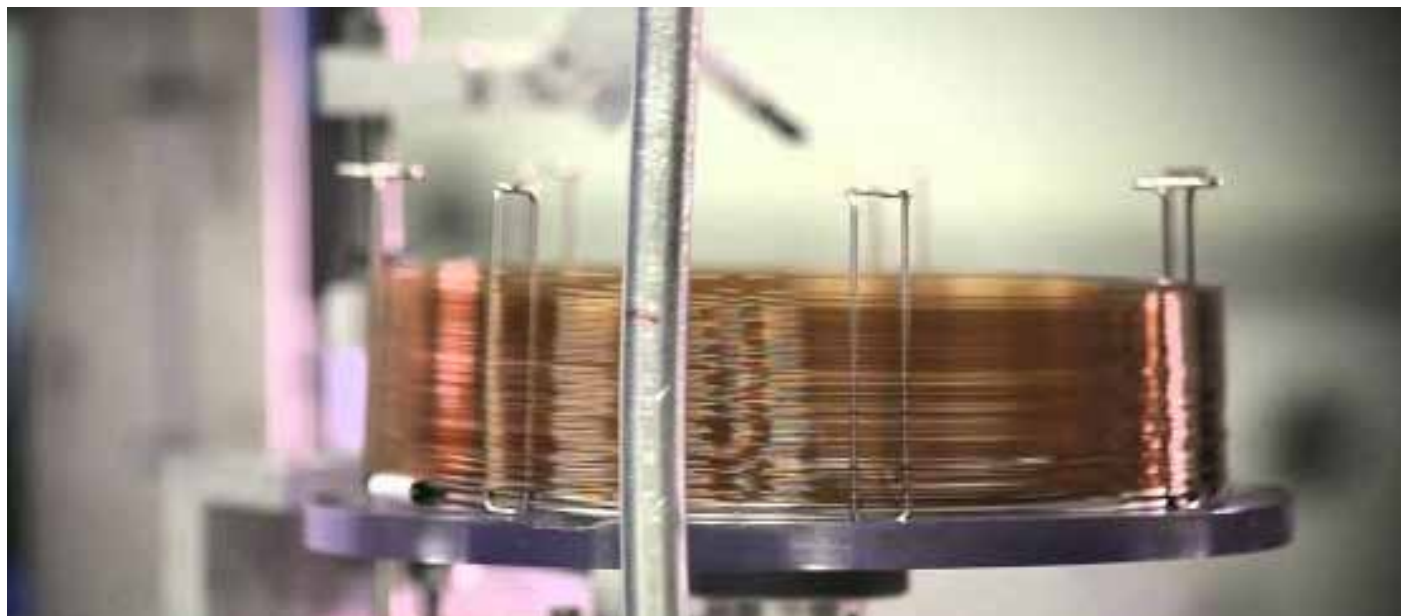
Ez általában akkor fordul elő, amikor a küszöbérték előzőleg magasra lett beállítva. Ha a detektor nemrég volt tisztítva, vagy kifűtve, a háttér alacsonyabb értéket vehet fel. Megoldás, hogy állítsuk nulla értékre a küszöbérték. Ezt követően beállíthatjuk úgy, ahogy az alapvonal csökken.

## Ha a FID jel nagymértékben csökken a szennyeződése miatt:

Kiváltó oka lehet, a kolonnavérzés, amikor is a szilán alapú állófáziskról szilícium-dioxid rakódik a gyújtó elektródra. Megoldás az alapos detektortisztítás, amely után az érzékenység nő. A másik ok ismét visszavezethető a nem jól beállított gázáramlási sebességekre. Kiváltó oka lehet, hogy a beállítások megváltoztak, amikor új módszert töltöttünk be. A megoldás az, hogy a hidrogén áramlási sebességét az optimális 35mL/perc-re állítjuk be, amelyhez 350mL/perc-es levegő és 35mL/perc-es segédgáz (make-up gáz) áramlási sebességet választunk. Egyes készülékeknél ez eltérő amellet, hogy a hidrogén-levegő arány egy a tízhez. A pontos értékeket keresse meg a használati útmutatóban. A legtöbb esetben a láng egy ideig ég, majd elalszik.

## Nagy gázzivárgás a detektorban:

Ennek oka a helytelenül behelyezett kolonna. Ha kolonna és a tömítést rögzítő anyacsavar a tömítővel (ferrul) nem ad egy hatásos gáztömörséget, akkor az égéshez szükséges gázok itt kifújnak, s nem jutnak a detektorba, hogy az égést táplálják. Ilyenkor ellenőrizni kell a gáztömörséget, és az összes csatlakozót meghúzni. A gáztömörség ellenőrzéséhez ne használjunk szappanos vizet, hanem megfelelő gázdetektort.



# A Shimadzu bemutatja az új LCMS-8060 készüléket

Simkon Kft.



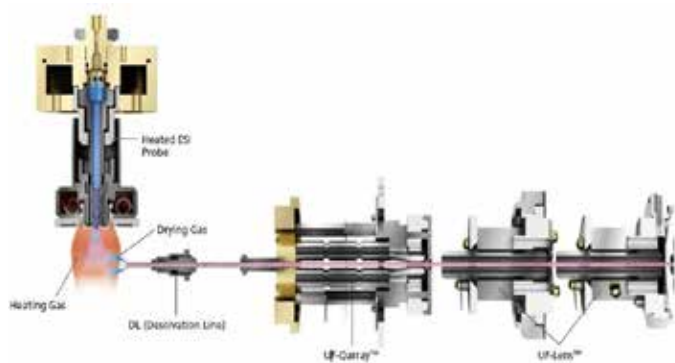
Ez mindent megváltoztat:



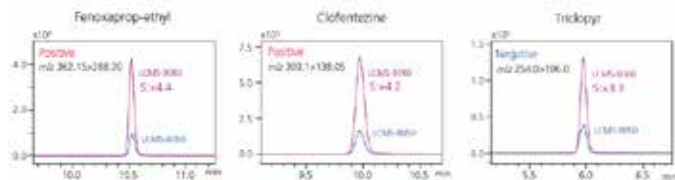
„Az LCMS-8060 készülék a tömegspektrometria új úttörő innovációja, ami az LC-MS/MS adatminőséget, érzékenységet és sebességet új megvilágításba helyezi.”



Az UF-Qarray ionlencsék újradefiniálásával az LCMS-8060 készülékkel a mennyiségi méréshatárok jelentősen csökkennek és ez új lehetőségeket jelent a kutatóknak. Az UF-Qarray ionlencsék úttörő technológiájával az analitikai jel nő, a zaj pedig csökken a korábbi modellekhez képest.



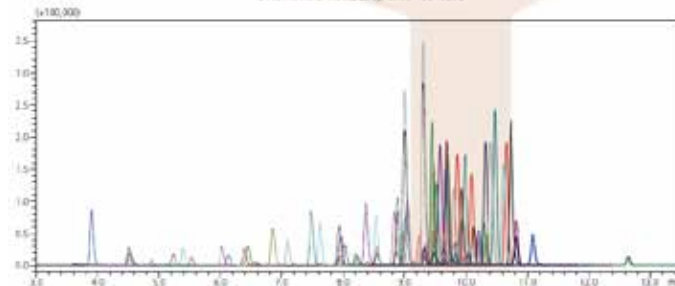
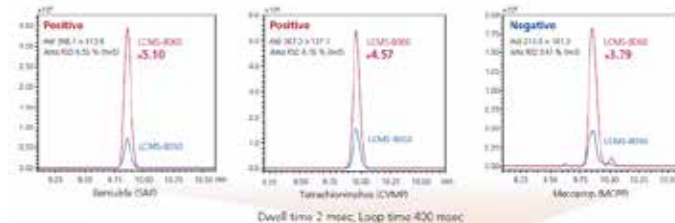
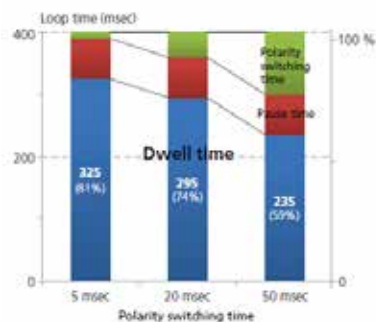
1. ábra: Az LCMS-8060 ionforrás és lencserendszer felépítése



2. ábra: MRM kromatogramok: 100pg/mL tiszta sztenderd



Annak érdekében, hogy a kiváló LC hatékonyság nagy sebességű MS/MS detektálással párosuljon, a Shimadzu volt ez első tömegspektrométer gyártó, aki 15,000Da/sec pásztázási sebességet és 15msec polaritás-váltási időt tudott kínálni. Az LCMS-8060 készülékben a pásztázási sebesség 30,000Da/sec-ra emelkedett, a polaritás-váltás ideje pedig 5msec-ra csökkent.



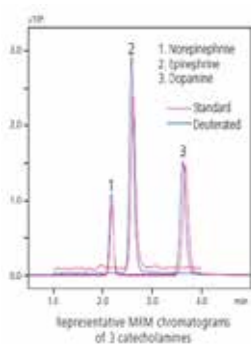
3. ábra: 105 peszticid MRM kromatogramja (300pg/mL), 5msec polaritás váltási idő. A kiemelt időablakban 65 komponenst detektálunk 400msec ciklusidővel



A készülék számos célra, komplex problémák megoldására tökéletesen alkalmas. Az alábbiakban néhány felhasználási területet mutatunk be.

## Intakt katekolaminok (CAs) emberi plazmából történő nagy érzékenységű mennyiségi mérése

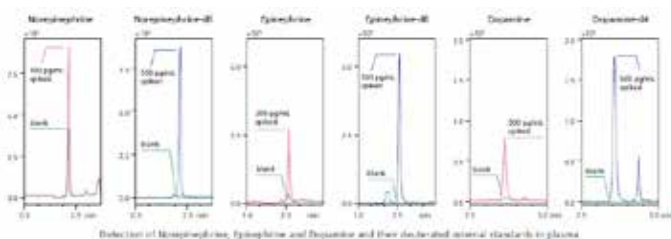
A klinikai kutatásokban a plazma katekolaminokat és azok O-metilált metabolitjait betegségek biomarkereiként szokták mérni. Olyan betegségekre lehet következtetni belőlük, mint a magas vérnyomás, pheochromocytoma vagy neuroblastoma. A katekolaminok alacsony fiziológiás szintje, a fizikokémiai tulajdonságaik és lehetséges interferenciák miatt mérésük nagy érzékenységet és specifikusságot követel meg. SPE-LC/MS/MS módszert fejlesztettünk az LCMS-8060 készüléken katekolaminok ultranagy érzékenységű, mátrix interferencia nélküli mérésére. A mérési ciklusidő a kolonna ekvilibrálásával együtt 12 perc, ami nagy mintakapacitást jelent.



Quantitative range of neat and matrix-matched calibration curves

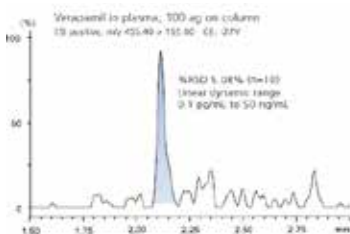
Compound name	Neat standard curve		Matrix-matched	
	Range (ppm)	Linearity (R <sup>2</sup> )	Range (ppm)	Linearity (R <sup>2</sup> )
Norepinephrine (DL 1 > 113.1)	2.5 - 2000	0.9999	2.5 - 2000	0.9997
Epinephrine-DL (DL 1 > 112.1)	10 - 2000	0.9999	10 - 2000	0.9994
Dopamine-DL (DL 1 > 95.1)	5 - 2000	0.9999	10 - 2000	0.9995

4. ábra: Három katekolamin mennyiségi mérése: kromatogram és kalibrációs tartományok



5. ábra: Célvegyületek és deuterált belső sztenderdjeik vérmintában

## Verapamil nagy érzékenységű mérése plazma mintából



Precision and accuracy of verapamil			
Actual Conc. (ng/ml)	Calculated Conc. (ng/ml)	Area (SD) (% area)	Accuracy (R <sup>2</sup> )
0.0001	0.000150	2.07	100.2
0.0005	0.000525	6.75	101.2
0.001	0.000975	3.38	98.2
0.005	0.00491	2.04	98.9
0.01	0.00969	2.04	97.0
0.05	0.0513	2.14	102.6
0.1	0.0990	1.18	99.8
0.5	0.512	0.22	102.4
1	1.01	0.26	101.9
5	5.08	0.45	101.6
50	50.0	0.80	100.0
100	99.8	0.77	99.8

6. ábra: Verapamil mérése vérmintából (100ag oszlopon); jobbra: precizitás és pontosság a kalibrációs tartományon

## Nagy érzékenységű és sebességű törvényszéki mérések

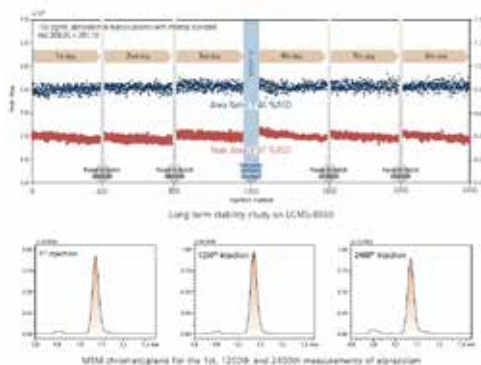
Információ gazdag MS/MS spektrumot MRM átmenetek alapján is fel lehet venni. Az LCMS-8060 készülék gyorsan képes váltani teljes pásztázás és MRM módok között a Synchronized Survey Scan (SSS) funkcióval. Ezzel termékion spektrumot vesz fel az MRM átme-

net kvázi molekula ionjából, ha az MRM átmenet egy előre beállított küszöb értéket meghalad. 1000 eseményt (Event) lehet beírni egy ilyen SSS módszerbe.

Type	Event#	+/-	Compound Name m/z	Time (1.059 min - 6.590 min)
MRM	11	+	Flunitrazepam 314.05>268.15	-----
- Product Ion Scan	12	+	> 20.00: 324.00	-----
MRM	13	+	Nimetazepam 296.05>250.20	-----
- Product Ion Scan	14	+	> 20.00: 306.00	-----
MRM	15	+	Estazolam 295.05>267.15, 29	-----
- Product Ion Scan	16	+	> 20.00: 305.00	-----
MRM	17	+	Triazolam 343.05>308.20, 34	-----
- Product Ion Scan	18	+	> 20.00: 351.00	-----
MRM	19	+	Alprazolam 309.10>281.10, 3	-----
- Product Ion Scan	20	+	> 20.00: 319.00	-----

7. ábra: MRM mód és termékion pásztázás (PIS) kombinálása egy SSS módszerben

## Robusztusság



8. ábra: Napon belüli és napok közötti robusztusság. A szürke sáv jelzi a készülék leállítását

## Könnyű felhasználói karbantartás



9. ábra: A Desolvation Line (DL) cseréje a vákuum megbontása nélkül

## LC/MS/MS módszercsomagok és MS/MS könyvtára

- Növényvédő szerek
- Állatgyógyszerek
- Vízminőség vizsgálat
- Kábítószeres
- Gyors toxikológiai módszercsomag
- Elsődleges metabolitok
- Lipid mediátorok
- Sejttenyészet profil
- Metabolomikai enzimek élesztőben (MRM könyvtár)



# Puffer választás szempontjai a hidrofil kölcsönhatási kromatográfiában

## Puffer kation és anion kiválasztás hatása az elválasztásra

A. Carl Sanchez, Monika M. Kansal  
Phenomenex Inc.

fordította: Héja Kornélia  
kiegészítette: Fekete Jenő

### 1. Bevezetés

Folyadékkromatográfiában, ahol a mozgófázis egyik összetevője víz és az elválasztandó vegyületek ionizálható (disszociálható) csoportot tartalmaznak, a mozgófázis savassága (pH) alapvetően befolyásolja az elválasztást. A HILIC elválasztásoknál az egyik legfontosabb feladat a mozgófázis puffer pH értékének ellenőrzése és megfelelő kiválasztása. Ez azonban csak egyik paramétere a puffernek, amely hatással van az elválasztásra. A pufferek, mint sók befolyásolják a mozgófázis ionerősségét, amely szintén hatással van a kromatográfiás paraméterekre, de ezen kívül figyelembe kell vennünk, hogy a pufferben lévő ionoknak jelentős hatása van a retencióra és a szelektivitásra.

A HILIC elválasztással használt nagy szerves oldószer tartalom befolyásolja a puffer komponens (gyenge sav vagy bázis) és az analizált komponens pKa értékét is. A pKa érték változása a vízben mérhető képest megváltoztatja a hidrogén-ion aktivitását, ezzel a mozgófázis pH értékét. Ez a változás maga után vonja a vizsgált molekulák ionizációjának megváltozását is. Megváltozik a molekuláris formák aránya. Mind a hidrogén-ion aktivitás (pH), mind a molekuláris formák arányának változása hatással van a visszatartásra és a kromatográfiás rendszer szelektivitására.

*„A HILIC elválasztások kulcsfontosságú része a megfelelő puffer megválasztása, amely a módszer robusztusságát (visszatartás állandóságát) biztosítja.”*

Ebben a cikkben a különböző kationok és anionok HILIC elválasztásokra gyakorolt hatását mutatjuk be, hangyasavval és hangyasav nélkül, különböző puffereket alkalmazva. Végezetül ajánlást teszünk a megfelelő puffer kiválasztására és megadjuk az anionok és kationok elválasztásra gyakorolt hatását.

### 2. Kísérleti célok és feltételek

A HILIC módszernél alapvető a nagy szerves oldószer tartalmú mozgófázisok használata. A fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RPLC) gyakorlatból jól ismert, hogy a mozgófázis szerves oldószer tartalma nagyban megváltoztatja annak dielektromos állandóját. Ezért bemutatjuk, hogy acetonitril-víz oldószernél ez milyen hatással van a szerves oldószer önprotonálódására,

azaz a pKa értékre, amely a pH skálát és a mozgófázisban a hidrogén-ion aktivitást megszabja. (1. táblázat)

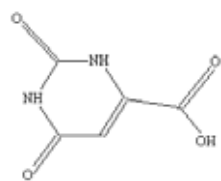
1. táblázat: RPLC-nál használatos vegyület besorolás

% MeCN (v/v)	$\epsilon_{\text{MeCN}}$	$\rho$ (kg dm <sup>-3</sup> )	$\log \epsilon \rho^2$	$\epsilon$	$\Delta$	$\alpha, \beta$	$\delta \approx -\log \left( \frac{\epsilon}{\epsilon_0} \right)$	pKa
0	0.000	0.999	-0.001	78.6	0.528	1.52	0.09	14.00
10	0.040	0.983	-0.007	73.2	0.566	1.55	-0.01	14.24
20	0.079	0.968	-0.014	70.1	0.604	1.59	-0.02	14.47
30	0.120	0.950	-0.022	68.4	0.655	1.63	-0.06	14.74
40	0.165	0.931	-0.031	67.8	0.712	1.68	-0.13	15.08
50	0.260	0.908	-0.042	68.6	0.791	1.74	-0.26	15.48
60	0.339	0.883	-0.053	54.7	0.877	1.80	-0.44	15.90
70	0.440	0.859	-0.066	50.4	0.992	1.87	-	16.42
80	0.578	0.829	-0.081	45.5	1.156	1.97	-	17.14
90	0.755	0.802	-0.096	40.4	1.378	2.09	-	17.33
100	1.000	0.782	-0.107	35.1	1.707	2.24	-	34.40

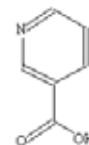
Ebben a közegben először is más értelmet nyer a vizes közegre definiált pH, amely a hidrogén-ion aktivitást jellemzi, megváltozik a gyenge savak és bázisok disszociációja. Figyelembe kell venni, hogy a szerves anionok és kationok solvatációja is nagyban eltérő lesz a vízben jól tanulmányozottól és megismerttől. Azt is figyelembe kell venni, hogy a megváltozott solvatációs viszonyok miatt, egy kisózási hatás is érvényesülhet, amely az állófázis felületén megnöveli az anionos anyagok koncentrációját. Ez annál is valószínűbb, mert az állófázis felületén egy vízben gazdag réteg található.

#### A HILIC poláris anyagok elválasztási módszere:

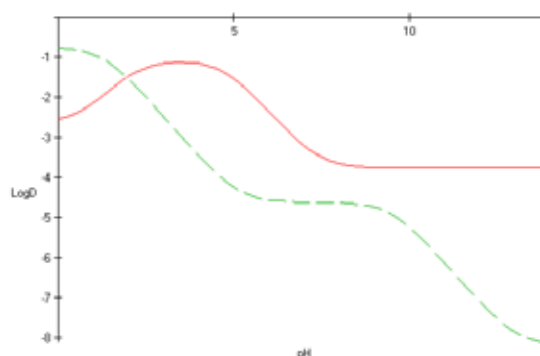
Ezek a vegyületek elsődlegesen savas vagy bázisos csoportot tartalmaznak. Az RPLC-nál használatos vegyület besorolás alapján, a savas csoportot tartalmazók kromatográfiásan a 2. osztályba tartoznak, ezeket az 1. táblázatban adtuk meg.



orotsav, pKa=1,27

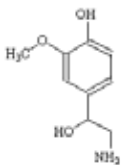


nikotinsav, pKa=4,74

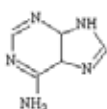


1. ábra: Nikotinsav és orotsav megoszlása n-oktanol-vízben a pH függvényében.

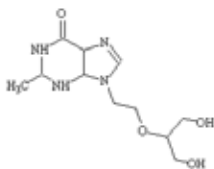
A logD-pH görbéből látható (1. ábra), hogy a vegyületek vízoldhatósága nagy. Minden pH értéken teljesül, hogy  $\log D < -0,5$ , ezzel teljesül az a feltétel, hogy a visszatartásuk a kétszeres holtidőnél nagyobb ( $k > 1$ ). A vegyületek másik nagy csoportját a bázisos csoportot tartalmazó vegyületek adták, ezek kromatográfiásan a 3. osztályba soroltak.



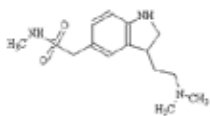
normetanefrin (4) pKa=9,63



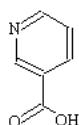
adenin (2) pKa=9,41



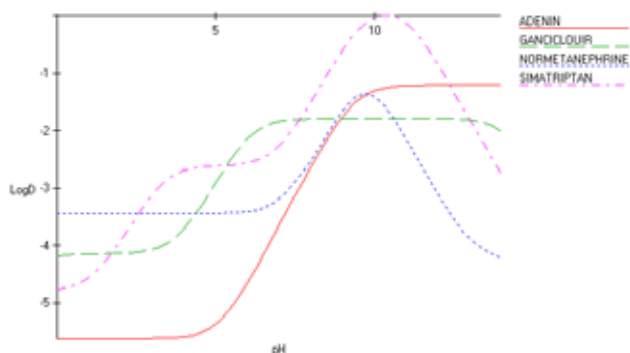
ganciclovir (5) pKa=6,12



simatriptan (1) pKa=11,03

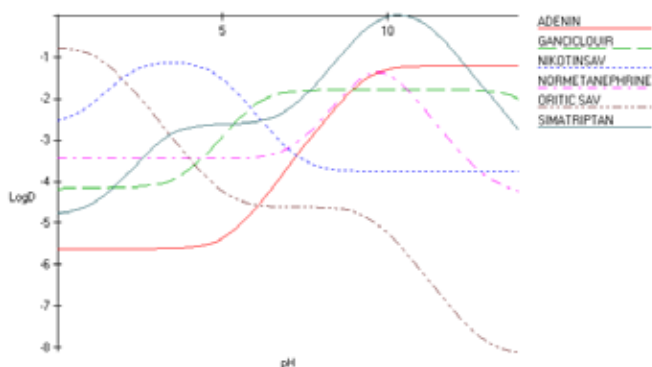


nikotinsav (3) savas pKa=2,2, bázisos=4,74



2. ábra: A bázisos csoportot tartalmazó vegyületek megoszlása n-oktanol-vízben a pH függvényében.

A bázisos csoportot tartalmazó vegyületeknél is teljesül, hogy savas közegben a  $\log D < -0,5$ , ezzel teljesül az a feltétel, hogy a visszatartásuk a kétszeres holtidőnél nagyobb ( $k > 1$ ) (2. ábra). Ha a savas és bázisos csoportot tartalmazó vegyületek egy mintában fordulnak elő akkor az n-oktanol-víz közti megoszlás bonyolultabb képet mutat. Ezt a 3. ábrán mutatjuk be.



3. ábra: A bázisos és savas csoportot tartalmazó vegyületek megoszlása n-oktanol-vízben a pH függvényében.

A vizet tartalmazó rendszereknél a  $\log D$  és a  $\log k$  között összefüggés van, mert az n-oktanol-víz megoszlás rokon a HILIC-nél feltételezett vízréteg és a kevésbé poláris mozgófázis között, amelyet módosít az állófázis-komponens közvetlen kölcsönhatása. A bemutatott adatok vízre vonatkoznak. A HILIC elválasztási módszernél ezt módosítja a nagy szerves oldószer tartalom, amely a bevezetőben leírtak szerint befolyásolja a mozgófázisban a hidrogén-ion aktivitást (pH) és az ionhatást. Tanulmányunkban ezt vesszük górcső alá és vetjük össze a vizes rendszerre előre jelzett adatokkal.

Tanulmányunkban a következő kísérleti paramétereket vizsgáltuk:

- kation hatás, kationok: hidrogén-, lítium-, nátrium-, kálium-, és ammónium-ion
- anion hatás, anionok: formiát-, perklorát-, klorid-, tiocianát-ion hatását a visszatartásra és szelektivitásra. A mozgófázis hidrogén-ion aktivitását (pH) 0,1% (0,25mmol/l), vagy 10mmol/l töménységű perklorátsavval.

Mozgó fázis: 90/10% ACN/puffer, a mérések izokratikus módban történtek.

A hangyasavat tartalmazó mozgófázisoknál összevetettük az eredményeket:

- Csak hangyasavat tartalmazott a mozgófázis
- A hangyasavhoz különböző sókat tettünk

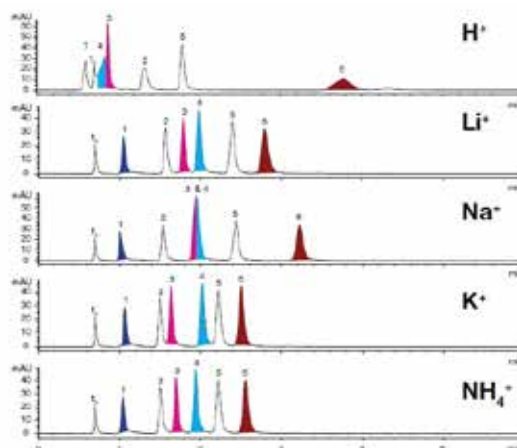
A méréseknél alkalmazott oszlopok a következők voltak:

Luna HILIC 3 $\mu$ m, 100x2mm  
Luna Silica(2) 3 $\mu$ m, 100x2mm

### 3. Kísérleti eredmények és értékelésük

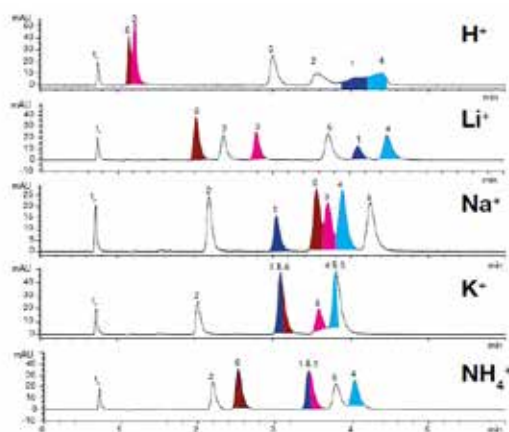
#### 3.1. Kation hatás vizsgálata a HILIC-ban

A 4. ábrán a Luna HILIC 3 $\mu$ m kapott eredményeket mutatjuk be. Az első kromatogramon a 0,1% hangyasavas mozgófázissal kapott elválasztás látható. A további kromatogramokon hangyasav sóival készült elválasztásoknál kapottakat láthatjuk, koncentrációjuk 10mmol/l volt.



4. ábra: Luna HILIC kolonna, 0,1% hangyasavas mozgófázissal és hangyasav sóival készült elválasztások, koncentrációjuk 10mmol/l

Ugyanilyen körülmények között az 5. ábrán a Luna Silica(2) kolonnán kapott elválasztásokat mutatjuk be.



5. ábra: Luna Silica(2) kolonna, 0,1% hangyasavas mozgófázissal és hangyasav sóival készült elválasztások, koncentrációjuk 10mmol/l.

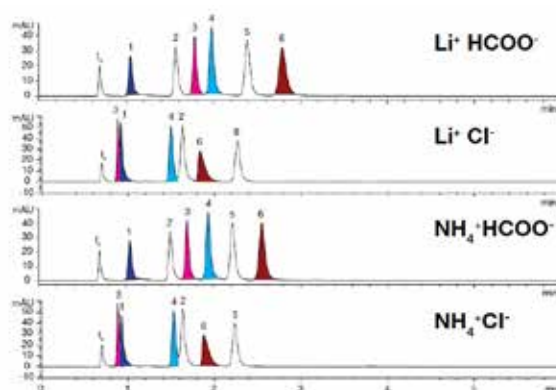
A két kolonnán kapott eredmények összevetése elsőként és nyomatékosan rámutat, hogy a HILIC elválasztásoknál is, ahogy a RPLC-nál, az állófázis kiválasztása alapvető. A Luna HILIC kolonna egy olyan állófázis, ahol a szilikagél felületén polimerizált diol található. A polimer réteg árnyékolja a szilikagél felületén található szilanol csoportokat. Az alkoholos hidroxil csoportok (diol csoportok) kölcsönhatása a kationokkal kismértékű, s nincs közöttük jelentős különbség. A Luna Silica(2) egy szilikagél kolonna, amelynek a felületén szilanol csoportok találhatóak, melyek a vizes rétegben ionizálódnak. A kationok ioncserés kölcsönhatást alakítanak ki az ionizált szilanolcsoportokkal. Az első következtetés, amely mindkét kolonnánál érvényesült, hogy hangyasav használata nem ad megfelelő elválasztást vagy kinetikai hatékonyságot. Az ionos formában lévő különböző formiát sók mind az elválasztást, mind a kinetikai hatékonyságot növelik. A második általános következtetés, hogy a különböző kationok használatakor a szelektivitás változik, de eltérő módon a Luna HILIC és Luna Silica(2) állófázison. Emlékeztetül, a Luna HILIC felülete ioncserés hatás szempontjából inertnek tekinthető, kivéve a diol-polimer nem borított felületet. Itt a kationok hatása kismértékű, hatásukat elsődlegesen a mozgófázisban fejtik ki. A retencióssorrendet tekintve, itt felhasználhatjuk a logD-pH diagramot (3. ábra). Feltételezve, hogy a legpolárisabb molekuláris formában lévő komponens eluálódik utolsónak, ez esetünkben az orotsav (vegyület sorszáma: 6), majd ganciclovir (5), normetafrin (4), nikotinsav (3), adenin (2) és végezetül a sumatriptan (1). Ha logD-pH diagramon megnézzük, hogy ez a retencióssorrend, milyen pH-nál várható, akkor ez a 6-8 pH tartományba esik. Ez mutatja, hogy a retenció változást a vízhez képest megváltozott hidrogén-ion aktivitás okozza, amelyet az 1. táblázatban megadott dielektromos állandó megváltozásával hozhatunk összefüggésbe. Ehhez járul az egyes kationok eltérő kiszóó hatása. A kettő eredménye a kapott kromatográfiás szelektivitás. Ez bizonyos mértékig egyezik a  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+}$  klasszikus Hofmeister sorozattal. A logD-pH diagramon látható, hogy kismér-

tékű csúszás a pH-ban már retencióváltást eredményez. A vizsgált vegyületeknél legkisebb kiszóó hatást mutató ammónium és a legnagyobb mutató lítium-ionnál kaptuk a legjobb elválasztást. Az ammónium-ionnál kapott jó elválasztás azért fontos, mert az ammónium-sók kompatibilisek a tömegspektrométer detektorral.

A Luna Silica(2) kolonnánál egyértelmű, hogy a szilikagél felületén az ionizált szilanolcsoportok jelentős szerepet játszanak a visszatartásban és a szelektivitásban. A Luna Silica(2) egy nagy tisztaságú szilikagél (Silica B), amelynél a szilanolok vízben mért pKa érték 7. A szilikagélek (Silica B) vizsgálatakor kimutatták, hogy előfordulnak nagyobb savasságúak is, melyek pKa értéke 3 körüli. A szilikagél felületén a HILIC módszernél határfelületi vízréteg található, így azok pKa értéke nem változik. Ennek következtében azok ionizálódnak és kation-cserélőként viselkednek. Ez magyarázza, hogy a kationok hatása sokkal nagyobb a Luna HILIC-hez képest. Ismét kiemelendő a lítium- és az ammónium-ion hatása. Az ammónium-formiát alkalmazásakor további optimalás szükséges az elválasztás hatékonyságának növelésére, ha tömegspektrométert használunk detektorként.

### 3.2. Anionok és kationok együttes hatása a HILIC-ben

A kationok vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy az ammónium-ion (ammónium-formiát) használható a folyadékkromatográf-tömegspektrométer csatolt módszernél. UV-detektálásnál a lítium-ion tartalmú (lítium-formiát) mozgófázisok is jó elválasztást adnak. Elsőnek a sóhatás ellenőrzését végeztük el, ekkor a mozgófázishoz, amely 90/10% acetonitril/víz+0,1% hangyasavat tartalmazott, 10mmol/l sót adtunk. A kapott kromatogramokat a 6. ábrán adtuk meg.

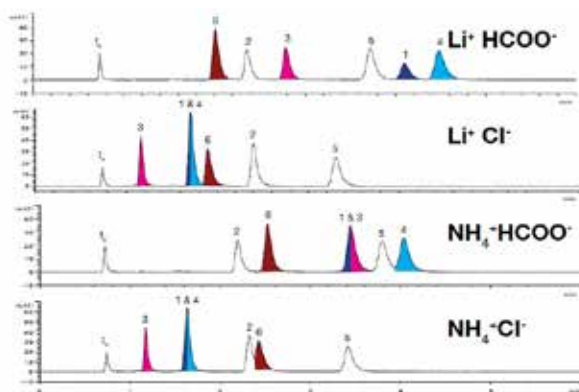


6. ábra: Luna HILIC kolonnán a szerves és szervetlen sók hatása a retencióra és a visszatartásra.

A szervetlen sók hozzáadása a mozgófázishoz jelentősen megváltoztatta a retencióssorrendet és a szelektivitást, az elválasztás csökkent. A lítium-formiát és az ammónium-formiát hozzáadása az alap mozgófázishoz puffert hozott létre, megfelelő pufferkapacitással. A retencióssorrend a Luna HILIC oszlopon megfelelt a logD-pH diagramból előre jelzetel. Ismét kiemelni a hangyasav/ammónium-formiát puffert, amelyet LC-MS módszernél is használhatunk.



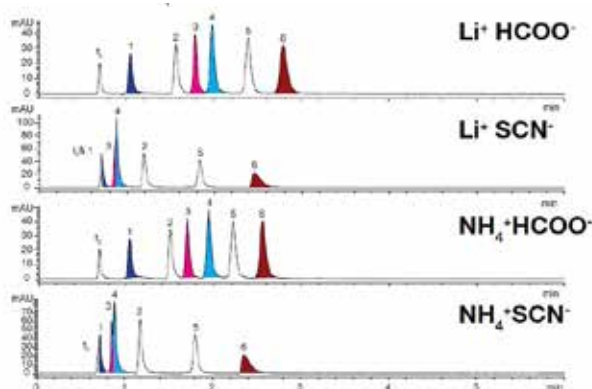
A Luna Silica(2) kolonnánál ugyanolyan kísérleti körülmények között kapott kromatogramokat a 7. ábrán adtuk meg.



7. ábra: Luna Silica(2) kolonnán a szerves és szervetlen sók hatása a retencióra és a visszatartásra.

A 3.1. fejezetben kiemeltük, hogy ha szilikagél használunk állófázisnak, akkor az állófázis kationcserélő jellege alapvetően befolyásolja a retenció sorrendet, a visszatartást és a szelektivitást. A szervetlen só hozzáadásával az ellenion koncentrációjának növelésével csökken a visszatartás és a retenció sorrend is. A formiát sóknál a kevésbé kaotróp kation - ez a lítium-ion -, más retenciót és szelektivitást adott, mint az ammónium-ion. A szilikagél állófázisoknál a szerves só kationja az elválasztásra jellemző összes paramétert nagyban befolyásolja. Az ammónium-formiáttal és a lítium-formiáttal kapott kromatogramokat összevetve eltérő szelektivitást kapunk a Luna Silica(2) és a Luna HILIC kolonnán, ez ismét aláhúzza az állófázis elsődleges szerepét, egyben rámutat az állófázis választás elsődlegességére. Sajnálatos, hogy ezeket a hatásokat nem tudjuk előre megadni.

Az anionok közül a tiocianát-anion kiszóó hatása a legnagyobb, ahogy ez a Hofmaister sorból kiderül  $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > HCOO^- > Cl^- > ClO_4^- > SCN^-$ . Ennek hatását külön vizsgáltuk, ismételten 10mmol/l koncentrációban az alap mozgófázishoz adva és a lítium-formiát és ammónium-formiát adalékkal kapott elválasztással összevetve. Az eredményeket a 8. ábrán adtuk meg.

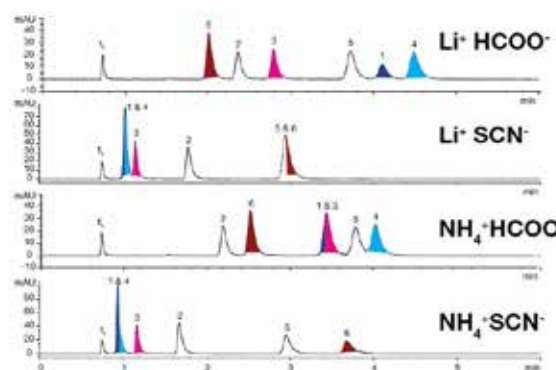


8. ábra: Luna HILIC kolonnán a tiocianát-anion (SCN<sup>-</sup>) hatása a retencióra és a visszatartásra

A tiocianát-anion elvileg a legjobb ionpárképző a vizsgált szervetlen anionok közül. Ha a nagy szerves oldó-

szertartalmú mozgófázisnál ez az ionpár képződés lejátszódna, akkor retenció csökkenést kellene kapnunk a bázikus csoportot tartalmazó vegyületekre. A 2. vegyület bázikus csoportot tartalmaz (adenin, pKa=9,63), retenciója jelentősen eltér a lítium-formiát tartalmúétól, növekedett, csökkenés helyett. A 4. vegyület is bázikus csoportot tartalmaz (normetanefrin, pKa=9,63), retenciója viszont csökkent. Ebből következik, hogy a szerves ionpárképző hatása a vizsgált vegyületekre nem bizonyítható egyértelműen, hasonlóan a kis molekulatömegű anyagokra, de ki sem zárható teljes mértékben.

A Luna Silica(2) kolonnával is elvégeztük a tiocianát-anion hatásának vizsgálatát. Itt az előzőekben taglalt ioncserés hatás miatt összetettebbek az elválasztást megszabó folyamatok. A lítium-formiáttal és az ammónium-formiáttal való összevetést a 9. ábrán mutatjuk be.



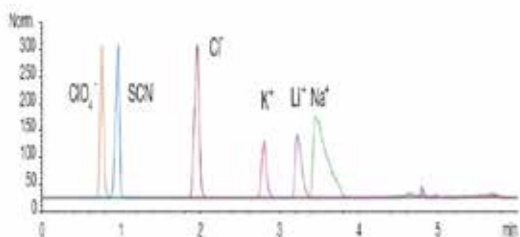
9. ábra: Luna Silica(2) kolonnán a tiocianát-anion (SCN<sup>-</sup>) hatása a retencióra és a visszatartásra

Kiemelendő az ammónium-tiocianáttal kapott eredmény, ahol az ammónium-formiáthoz képest jelentősen megváltozott a szelektivitás. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a tiocianát-aniont lehet szelektivitás növelésére használni egyes vegyületek elválasztásánál. A Luna HILIC és a Luna Silica(2) kolonna összevetésénél ismét megállapítottuk, hogy a szilikagél alapú HILIC oszlopon nagyobb visszatartásokat és más szelektivitást kaptunk. A Luna HILIC kolonnánál, ahol az állófázis kölcsönhatása jelentősen kisebb a Luna Silica(2)-nél, egyértelmű, hogy a határfelületi vizes fázisban az anionok kiszóó hatása érvényesül. A legnagyobb mértékben visszatartott komponens a savas jellegű orotsav. A Luna Silica(2) kolonnánál, az ammónium-acetátot kivéve, az alifás primer amino-csoportot tartalmazó vegyület visszatartása a legnagyobb. Ennek a részlegesen ionizált vegyületnek lesz a legerősebb ioncserés kölcsönhatása az ionizált szilanolcsoportokkal (állófázis hatás).

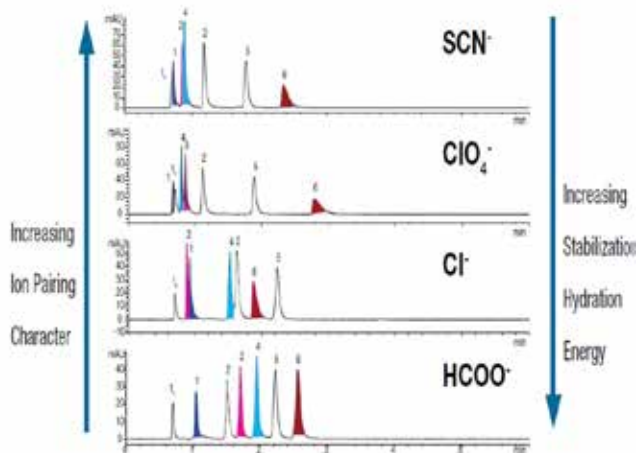
### 3.3. Anion-hatás vizsgálata hangyasavas mozgófázisban

A mozgófázishoz különböző anionokat adva vizsgáltuk a tesztvegyületek visszatartására és a kromatográfiai rendszerre gyakorolt hatását. Az anionok hozzáadása 10mmol/l ammónium-só formájában történt. Ahhoz, hogy az anion-hatást megértsük, ismernünk kell az állófázisban a koncentrációjukat. Ezt közvetlenül nem

lehet mérni, viszont arányos lesz az adott állófázison mért retenciójukkal. A nagyobb retenciójú anion felületi koncentrációja nagyobb és jobban érvényesül, hogy a vegyületeket kisózza a mozgófázis felé, ami eredménye a retenció csökkenése. A különböző anionok retencióját mutatjuk be a 10. és 12. ábrán. Az anionok kölcsönhatása a szilikagél alapú állófázissal elhanyagolható, ezért a határfelületi víz rétegbe oldódnak be. Az egyes anionok retenció sorrendje mindkét állófázison a következő: perklorát-, tiocianát- és klorid-ion. Mind a Luna HILIC, mind a Luna Silica(2) kolonnán az orotsav (6) retenció idejét a klorid-ion csökkenti a legnagyobb mértékben.



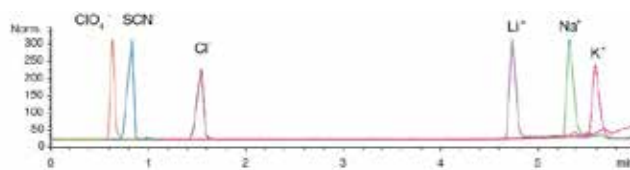
10. ábra: Anionok és kationok visszatartása, 0,1% ammónium-formiát, 90/10% acetonitril elegyben, pH=3,2. Kolonna: Luna HILIC



11. ábra: A 0,1% hangyasavas mozgófázishoz adott 10mmol/l ammónium-sók hatása az elválasztásra. Kolonna: Luna HILIC

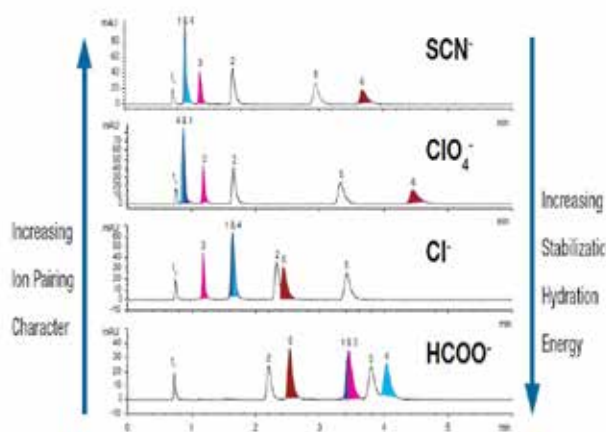
Összefoglalóan az anionhatást értelmezzük a Luna HILIC kolonnánál (11. ábra). Az eddigiekből kiderült, hogy a Luna HILIC kolonnánál a felületi vízrétegbe beoldódó anionok kisózó hatása szabja meg elsődlegesen a komponensek visszatartását. A klorid-ion kisózó hatása a legnagyobb, itt kaptuk a legkisebb visszatartásokat, majd következik a perklorát-anion, ahol a visszatartások már nagyobbak. A tiocianát-anion kisózó hatása a legkisebb, ez viszont kevésbé érvényesül a visszatartásban, azonban a legnagyobb retenciójú komponens savas jellegű, ez a kisózó hatásra utal. A tiocianát-anion visszatartása a Luna HILIC kolonnán nagyobb, mint a perklorát-anioné, ezért feldúsulása a határrétegi vízrétegben nagyobb, ezzel kisózó hatása is. Ez a magyarázata annak, hogy a gyengébb

kisózó hatású anionnak miért nagyobb a retenció csökkentő hatása. Ugyanez vonatkozik a formiát-anionra is.



12. ábra Anionok és kationok visszatartása, 0,1% ammónium-formiát, 90/10% acetonitril elegyben, pH=3,2. Kolonna: Luna Silica(2)

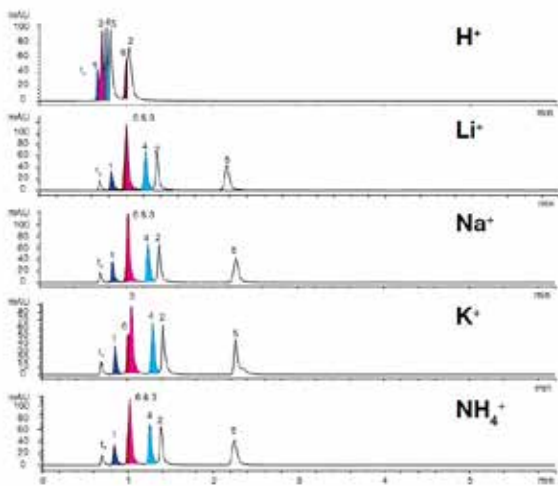
Az anionok visszatartása a szilikagélen kisebb, ez mutatja, hogy a szilanolcsoportok egy része a vizsgált körülmények között ionos formában van. A 13. ábrán adtuk meg az egyes anionok hatását a vizsgált vegyületek visszatartására. A kisózó hatás az erősen savas karakterű orotsavnál (pKa=1,27) a legnagyobb, mert a vizsgált pH=3,2 savasságú közegben gyakorlatilag teljes mértékben ionizált formában van. A perklorát- és a tiocianát-anionok hatása ugyanaz, amit leírtunk a Luna HILIC kolonnánál.



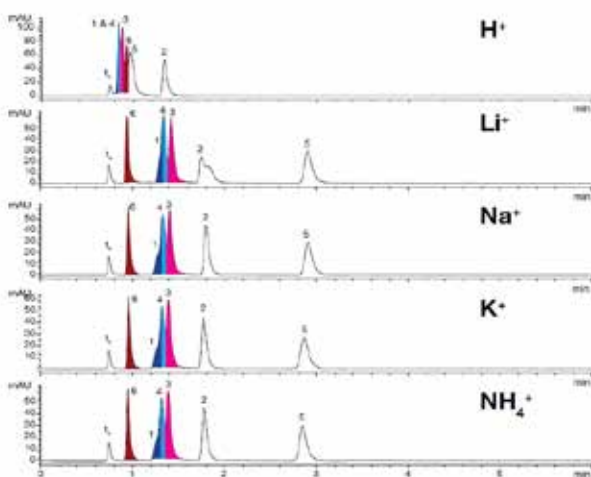
13. ábra: A 0,1% hangyasavas mozgófázishoz adott 10mmol/l ammónium-sók hatása az elválasztásra. Kolonna: Luna Silica(2)

### 3.4. Kationok hatása a HILIC elválasztásokban

A kationok hatását a HILIC elválasztásban izokratikus módban, 90/10% acetonitril/víz mozgófázissal vizsgáltuk, ami 0,1% perklorosavat tartalmazott. A vizsgált kationokat (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 10mmol/l koncentrációban adtuk az alap mozgófázishoz. A kapott elválasztásokat a 14. és 15. ábrákon adtuk meg. A perklorosav a határfelületi fázisban 1 és 2 körüli savasságú (pH) közeget alakít ki, mindkét állófázis határfelületi vízrétegében. Ez a bázisos csoportokat protonálja a savas csoportot tartalmazó orotsav disszociációját részben visszaszorítja. A szilanol csoportok ionizációját gyakorlatilag visszaszorítja. A kapott, közel azonos retenciók az anion sóhatásnak tudhatóak be, ezt bizonyítják a közel azonos visszatartások is. Összevetve az anion és kation hatást az anion hatás kifejezettebb és az anionok minőségétől függ.



14. ábra: A 0,1%-os perklórsavas, 90/10 acetonitril/víz mozgófázishoz adott fém-kloridok hatása a vizsgált vegyületek elválasztására, Luna HILIC kolonnán.



15. ábra: A 0,1%-os perklórsavas, 90/10 acetonitril/víz mozgófázishoz adott fém-kloridok hatása a vizsgált vegyületek elválasztására, Luna Silica(2) kolonnán.

#### 4. Összefoglaló értékelés

Vizsgálatainkban savas és bázisos csoportokat tartalmazó proton funkcióú vegyületek elválasztását vizsgáltuk, két eltérő tulajdonságú poláris kolonnán. Az egyik egy polimerrel borított szilikagél (Luna HILIC), amely felületén diol csoportok adták a kölcsönhatási helyeket.

A másik egy szilikagél (Luna Silica(2)), melynek felületén az erős kölcsönhatásra alkalmas szilanol csoportok találhatóak, amelyek a vizsgált körülmények között részben ionizált formában voltak. Az eltérő anionok és kationok alkalmazásakor fel kívántuk deríteni azok hatását az elválasztásra.

A legfontosabb következtetések a két állófázison kapott eredmények összehasonlítása alapján:

1. Az állófázis minősége, annak kölcsönhatása a vizsgált komponensekkel alapvetően meghatározza azok visszatartását.
2. Ez okozza azt, hogy a komponensek határfelületi vírrétegbe való beoldódása, amelyet a logD-pH függvénnyel jellemzünk, nem tükrözi vissza a retenciós sorrendet.
3. A határfelületen az adszorbeált réteg pH-ja, amelynek döntő összetevője víz, nem ismert. Ezzel az ionizációja (disszociációja) sem előre jelezhető. A retenciós sorrend és a logD-pH diagram alapján valószínűsíthető, hogy a vízhez képest pH eltérés van.
4. A visszatartást, szelektivitást és a csúcsszélesedést az ionos komponensek jelentősen befolyásolják. A gyenge sav, mint a hangyasav, vagy nem megfelelő szelektivitást, vagy nem elfogadható csúcsalakot eredményez.
5. A hangyasav sói jelentősen megváltoztatják az elválasztásra jellemző adatokat. A különböző sók közül, tapasztalataink szerint, az ammónium-sók adják a legjobb elválasztást. Ez az eredményünk azért is fontos, mert az ammónium vegyületek, és pufferek használhatók a folyadékkromatográf-tömegspektrométer kapcsolt technikában.
6. Az anionoknál a visszatartás befolyásolásánál kisítő hatás érvényesül. A klorid-ion adta a legkisebb visszatartásokat, mert legnagyobb a feldúsulása a határfelületi vírrétegben és legnagyobb a kisítő hatása.
7. Az állófázis hatását bizonyítja, hogy a kationok hatása a szilikagél (Luna Silica(2)) kolonnára nagyobb, mint a Luna HILIC kolonnánál. Ez visszavezethető arra, hogy a kationok és a vizsgált vegyületek versengenek az állófázis felületén lévő ioncserélő helyekért (ionizált szilanolcsoportok).
8. A szervesen ionpároképzők visszatartásra gyakorolt hatását csak közvetve lehetett bizonyítani, azok kisítő hatása valószínűbb.
9. A kation- és anion-hatás együtt határozzák meg az elválasztást.
10. Az előzőekből következik, hogy a pH-án kívül a puffer kémiai összetétele is nagyban befolyásolja a retenciót és a szelektivitást. A puffer komponensek gondos kiválasztásával az elválasztás nagyban befolyásolható.



# Akirális állófázisok összehasonlítása SFC körülmények között

Philip J. Koerner, Nick Mitchell, Sky Countryman  
Phenomenex Inc.

fordította: Szász Vadász Tas

A szuperkritikus folyadékkromatográfia (SFC) egyre nagyobb elismerésnek örvend a gyógyszeriparban, különösen új molekulák kutatásában, klinikai készítmények elválasztásában, tisztításában. Mostanáig ezt a technikát kis molekulák királis preparatív elválasztására találták leghasznosabbnak, annak ellenére, hogy az SFC nagy lehetőséget biztosít a megfelelő akirális kolonna kiválasztásához, módszerfejlesztéshez.

## Bevezetés

Az egyik legnagyobb kihívás a gyógyszeriparban a reakció elegyek analízise és tisztítása. Különösen igaz ez könyvtárszintézisek, illetve potenciális új gyógyszerhatóanyagok vizsgálata esetén. Napjaink összetett szintézisútjainak eredményeként sok komponensből álló elegyeket kapunk, melyek széles polaritás tartományt ölelnek át. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) hagyományosan a megfelelő analitikai módszer a hasonló elegyek vizsgálatára. Az SFC technológia egy jó alternatíva, kiegészítő technológia lehet a HPLC elválasztás mellett, számos előnyös tulajdonságának köszönhetően. Ezek többek között jobb felbontás, gyorsabb analízisidő, hatékonyabb mintakezelés. Az SFC mindemellett un. „zöld” technológia, ugyanis kevesebb az oldószer felhasználás. Az SFC technikában használt szén-dioxid (CO<sub>2</sub>) a kritikus állapota közelében van (13,1°C, >73,8bar) szerves módosító (pl. metanol) mellett. Ez a relatív kevésbé poláros mozgófázis használható normál és fordított fázisú elválasztásokhoz, mindemellett a szuperkritikus CO<sub>2</sub> alacsony viszkozitásának és magas diffuzivitásának köszönhetően jóval gyorsabb elválasztást érhetünk el. A gyógyszeriparban az SFC technológia elsősorban a királis elválasztások kapcsán vált népszerűvé. Ezen technika kedvező tulajdonságainak köszönhetően, mint alacsony viszkozitás, magas diffuzivitás, a HPLC-ben alkalmazható királis kolonnák átalakítás nélkül használhatóak.

Manapság a különböző klinikai és analitikai laboratóriumok másodlagos figyelmet szentelnek az SFC technikának, ha akirális elválasztásról van szó. A kromatográfusok számára a legfontosabb feladat egy olyan általánosan használható kolonna kiválasztása az SFC technológiához, mint a fordított fázisú HPLC technika C18 fázisa. Jelen írásunkban azt szeretnénk bemutatni, hogy az akirális elválasztásokra is igen széles körben használható az SFC technológia. A módszerfejlesztés velejárója, ahogy a királis fejlesztések esetén is, a körülmények közötti kolonna választás, mely a megfelelő kromatográfias

elválasztást nyújtja az adott feladatra. Különösen fontos ez, ha a célvegyületünket preparatív kromatográfias eljárásban szeretnénk kinyerni. A megfelelő kolonna választás eredményezi a kromatográfus számára a jó kromatográfias elválasztást és szelektivitást, mellyel a célkomponens elkülöníthető a minta további összetevőitől. Fontos, hogy ezen fő komponens jól elkülönülten, korán eluálódik, így is növelhető a kromatográfias hatékonyság.

## Kísérleti körülmények

Készülék: Thar SFC Investigator (Thar Instruments, Pittsburgh, PA, USA), Gilson UV/VIS-151 változtatható hullámhosszú detektor (Gilson, Middleton, WI, USA), SuperChrom v2.6 kiértékelő szoftver (Thar Instruments)  
Mozgófázis: nagy tisztaságú ipari CO<sub>2</sub> (99,995% tisztaság, Air Liquide, Houston TX, USA), HPLC tisztaságú metanol (Honeywell Burdick and Jackson, Muskegon, Michigan, USA). A különböző akirális kolonnák gyártója a Phenomenex (Torrance, CA, USA)

Kolonnák:

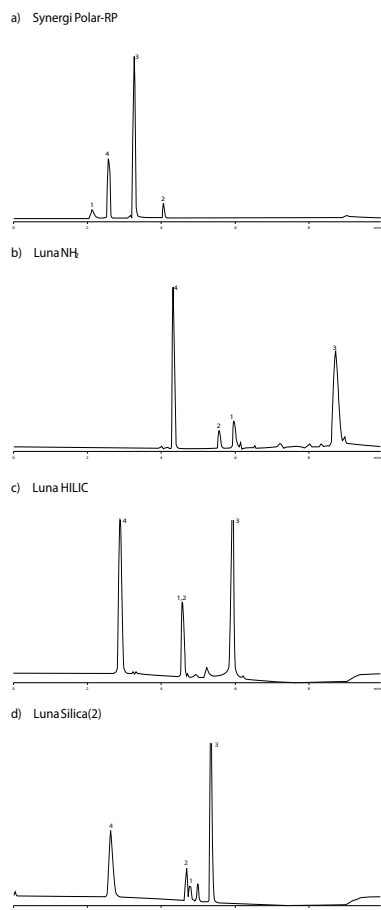
Luna® 5µm NH<sub>2</sub>  
Luna® 5µm Silica(2)  
Synergi™ 4µm Polar-RP®  
Luna® 5µm HILIC

Az összes kolonnán az alábbi körülményeket alkalmaztuk:

Dimenzió: 250 x 4,6mm  
Mozgófázis: A: Metanol  
B: Carbon Széndioxid (CO<sub>2</sub>)  
Gradiens: A/B (5:95) - (50:50) 5,5 perc alatt, majd 2 perc izokratikus  
Áramlási sebesség: 3,0ml/perc  
Hőmérséklet: 40°C  
Nyomás: 200 bar (~2900psi)  
Detektálás: UV @ 254nm  
Injektált térfogat: 1µL  
Két különböző mintaelegyet injektáltunk a fent említett körülmények között, mind a négy kolonnára.  
Tesztelegy 1: 1. Uracil, 2. Hydrocortisone, 3. Sulfanilamide, 4. Ethyl-2-methyl-3-indoleacetate  
Tesztelegy 2: 1. Benzoic Acid, 2. Caffeine, 3. Acetaminophen

## Eredmények

Thar SFC Investigator rendszert használtunk különböző Phenomenex állófázisokkal, két különböző mintakeverékre. Az eredmények azt mutatják (1. és 2. ábra), hogy ugyan az SFC állófázis azonos, a különböző kolonnák eltérő szelektivitásúak, így a kapott kromatográfias eredmény is más. Mind a négy kolonnára injektáltuk a két mintaelegyet. A választott négy kolonna teljesen eltérő mechanizmus szerint működne: fordított fázisú Synergi Polar-RP, normál fázisú Luna Silica(2) és Luna NH<sub>2</sub>, illetve HILIC módban a Luna HILIC. Természetesen SFC módban is tapasztalható a különböző kolonnákon a retenciók idői változása, valamint az elúciós sorrend felcserélődése. Így a szelektivitás különbségeket tudjuk kihasználni, és kiválasztani a megfelelő kolonnát a kromatográfias feladat megoldásához.

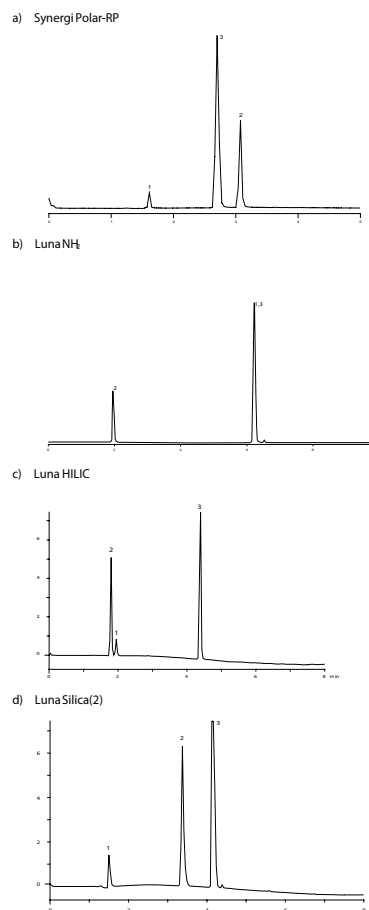


1. ábra: Tesztelegy (Uracil<sub>(1)</sub>, Hydrocortisone<sub>(2)</sub>, Sulfanilamide<sub>(3)</sub>, Ethyl-2-methyl-3-indoleacetate<sub>(4)</sub>) Synergi Polar-RP<sup>®</sup> (a), Luna<sup>®</sup> NH<sub>2</sub> (b), Luna<sup>®</sup> HILIC (c), és Luna<sup>®</sup> Silica(2) (d) kolonnákon.

Az analitikusok számára a különböző kolonnákon tapasztalható szelektivitásbeli különbségek adnak lehetőséget arra, hogy megfelelően hatékony kromatográfiai módszert fejlesszenek. Ez nagyon fontos továbbá, hogy az ismeretlen mintaelegy összetételét jobban megismerjék.

### Következtetések

A fenti példákön bemutatott módszerekben láthatóak a különböző szelektivitásból adódó különbségek, melyek az SFC technológiában is jelentkeznek.



2. ábra: Tesztelegy 2 (Benzoic acid<sub>(1)</sub>, Caffeine<sub>(2)</sub> és Acetaminophen<sub>(3)</sub>) Synergi Polar-RP<sup>®</sup> (a), Luna<sup>®</sup> NH<sub>2</sub> (b), Luna<sup>®</sup> HILIC (c) és Luna<sup>®</sup> Silica(2) (d) kolonnákon.

Az SFC technológia továbbá a méretnövelhetőségnek, a kevés szerves oldószer felhasználásnak és egyedi szelektitásnak köszönhetően a preparatív kromatográfiában is tekintélyes szerepet tölthet be. A Phenomenex kolonnák, ahogy ezt a mostani példa is mutatja, széles szelektivitási spektrumot fednek le, másrészt a robusztusságnak és reprodukálhatóságnak köszönhetően az SFC technológiában is remekül használhatóak. Elmondható tehát, hogy a klinikai és gyógyszeriparban már jól ismert és használt fázisok SFC technikában is remekül megállják a helyüket, és ez egy kiegészítő technika lehet a fejlesztő analitikusok kezében.

**A GYÓGYSZERKUTATÁS MŰSZERES MÓDSZEREI**

SZERKESZTŐ: SCHÁR PÁL

MKE MAGYAR KÉMIKUSOK EGYESÜLETE

A Magyar Kémikusok Egyesülete gondozásában megjelent „A gyógyszerkutatás műszeres módszerei” című szakkönyv.

Szerkesztette: Sohár Pál

ISBN 978-963-9970-61-8

**Fejezetek:**

1. Folyadékkromatográfia
2. Termikus analízis
3. Páztató tüszondás módszerek
4. Tömegspektrometria
5. Egykristály-röntgenátfraction
6. Atómszopciós spektrometria
7. Ultraibolya-látható (UV-VIS) spektroszkópia
8. Rezgési spektroszkópia
9. Közei infravörös (NIR) spektroszkópia
10. NMR-spektroszkópia

A könyv megrendelhető a Magyar Kémikusok Egyesülete titkárságán.  
Email: mail@mke.org.hu

# Az immobilizált és fizikailag kötött poliszacharid alapú királis HPLC oszlopok összehasonlítása általános oldószer összetételek mellett

Zdravko Milanov, Liming Peng, Jeff Layne,  
Marc Jacob  
Phenomenex Inc.

fordította: Imrik Péter

Két eltérő királis állófázist (Lux® Cellulose-1 és CHIRALPAK® IB) hasonlítottunk össze melyek azonos királis szelektorral, cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) rendelkeznek. A legfőbb különbség a két állófázis között, hogy míg az egyik a hordozó szilikagél bevonásával, addig a másik állófázis egy ún. immobilizált állófázis, ahol a poliszacharid szelektor kovalens kötással van rögzítve a szilikagélhez. Ez a kovalens kötés lehetővé teszi, hogy sokkal szélesebb körben alkalmazhatunk olyan oldószereket (pl. THF, DMF, acetone, EtOAc, DKM), ami a fizikailag kötött állófázisok esetében nem megengedett. Ebben a cikkben megvizsgáljuk, hogy az immobilizált állófázisokhoz használható oldószerek milyen előnyökkel járhatnak egyáltalán.

## Bevezetés

*„A módosított poliszacharid alapú állófázisok a legszélesebb körben használt CSP-k (Chiral Stationary Phase), az általuk kínált széles királis szelektivitás és a magas terhelhetőségük miatt.”*

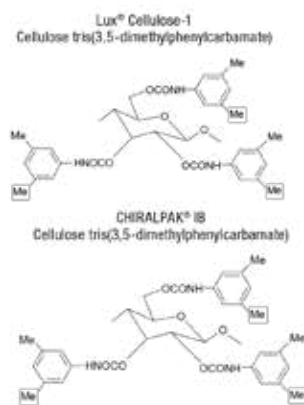
A legtöbb poliszacharid állófázis esetében normál fázisú körülmények mellett végezzük az elválasztásokat, mert tapasztalatok alapján ezen körülmények kedveznek leginkább a királis elválasztásoknál fellépő kölcsönhatásoknak.

A poliszacharid alapú királis állófázisok túlnyomó része fizikailag kötött, mely nem kapcsolódik kémiai (pl.: kovalens kötés) a hordozó szilikáéhoz. A közelmúltban az immobilizált poliszacharid CSP-k, ahol a királis szelektor kovalens kötéssel keresztül kapcsolódik a hordozóhoz, széles körben elérhetővé váltak. Ezen állófázisok lehetővé teszik agresszívabb oldószerek használatát, mint például a klórozott szénhidrogének, melyeket nem használhattunk a hagyományos poliszacharid alapú királis állófázisok esetében.

Több esetben találunk utalásokat, hogy a szélesebb oldószer kompatibilitás növelheti az adott állófázissal elválasztható királis vegyületek számát és ez szélesebb szelektivitási spektrumot jelenthet. Sajnos kevés össze-

hasonlítás áll rendelkezésre, hogy ezt az állítást igazoljuk. Ebben a cikkben szeretnénk erre a felvetésre több elválasztáson keresztül választ találni. A két összehasonlított királis állófázis azonos királis szelektorral - cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) - rendelkezett, amint az 1. ábrán is láthatjuk.

Ezek az állófázisok történő módszerfejlesztéseknél a normál fázisú körülmények a legáltalánosabbak, melyek kiemelten kedveznek a királis elválasztások esetén fellépő kölcsönhatásoknak. A királis elválasztásoknál (poliszacharid állófázis) hexán és valamilyen alkohol keveréke mondható a legelterjedtebbnek. Előzőleg már több alkalmazás segítségével megvizsgáltuk, hogy eltérő szelektivitásokat tapasztalhatunk izopropil-alkohol és etanol használata mellett. Klórtartalmú oldószerek és etil-acetát szintén használható, mint módosító és befolyásolhatja a szelektivitást, de mint ismeretes ezek az oldószerek nem használhatók a hagyományos, fizikailag kötött állófázisok esetében. Tanulmányunkban a fenti oldószereket csak az immobilizált állófázisok esetében használtuk.



1. ábra: Használt állófázisok funkciócsoportjainak felépítése

## Anyagok és módszerek

Minden analízist Agilent 1100-as HPLC készüléken (Agilent Technologies, Pali Alto, CA, USA) végeztünk (automata mintaadagolóval és kvaterner pumpával szerelve) és UV detektálást használtunk. A felhasznált HPLC oszlopok: Lux® Cellulose-1 (fizikailag módosított) és CHIRALPAK®-IB (immobilizált) 5µm-es szemcsemérettel töltve. A méréseket 1ml/perc áramlási sebesség mellett szobahőmérsékleten végeztük. A felhasznált eluenseket az 1. számú táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Ebben a tanulmányban használt mozgófázisok

### Mozgófázis

<b>Coated Phase Lux® Cellulose-1</b>	80:20:0.1 Hex:IPA:DEA; and 85:15:0.1 Hex:EtOH:DEA
<b>Immobilized Phase CHIRALPAK® IB</b>	80:20:0.1 Hex:IPA:DEA; 85:15:0.1 Hex:EtOH:DEA; 65:35:0.1 Hex:EtOAc:Ethanolamine; and 65:35:0.1 Hex:CHCl <sub>3</sub> :Ethanolamine

DEA = dietil-amin; IPA = izopropil alkohol; CHCl<sub>3</sub> = Kloroform; Hex = Hexán; EtOH = Etanol; EtOAc = etilacetát



## Eredmények és Következtetések

A hagyományos és immobilizált állófázisok közötti szelektivitásbeli különbségeket 51, a gyógyszeripar számára érdekes vegyületen, különféle oldószer összetételek mellett vizsgáltuk. Az első mérési sorozatnál módosítóként izopropanolt (IPA) használtunk DEA-val. A vizsgált 51 vegyület közül 22 esetben megfelelő elválasztást kaptunk 80:20:0,1 arányú hexán:IPA:DEA mozgófázis használatával. A fenti körülmények között kapott eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

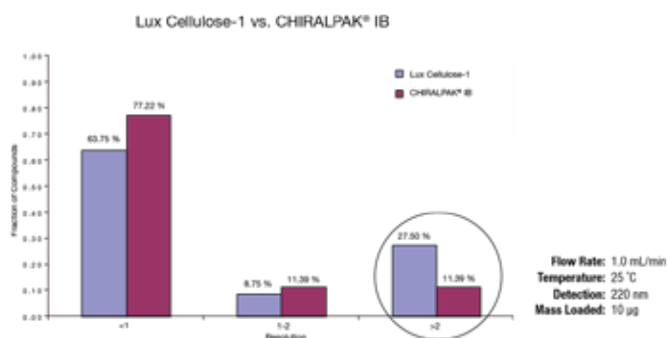
2. táblázat: 22 vegyület elválasztásának összehasonlítása azonos körülmények között, két típusú királis állófázis használatánál

Compounds	Lux® Cellulose-1	CHIRALPAK® IB	Compounds	Lux Cellulose-1	CHIRALPAK® IB
Tetrahydrozoline	✓	x	Toliprolol	✓	✓
Metoprolol	✓	x	Bisoprolol	✓	Partial
Tetramisole	✓	x	Sulfonazole	x	Partial
Halofantrine	✓	✓	Orphenadrine	✓	✓
Bopindolol	✓	Partial	Mianserin	✓	x
Bupranolol	✓	Partial	1,1-Dihydroxy-6,6-Dimethylbiphenyl	✓	✓
Carazolol	Partial	x	Methoxy-p-tolyl sulfoxide	✓	x
Metomidate	✓	x	Prilocaine	✓	Partial
Mephesisin	✓	x	Nifedipine	x	✓
Oxazepam	✓	✓	Bupivacaine	✓	x
Oxprenolol	x	✓	Disopyramide	Partial	x

	Lux Cellulose-1	CHIRALPAK® IB
✓ Baseline Resolution $R_s > 1.5$	17	7
x Partial Resolution $0.8 < R_s < 1.5$	2	5
No resolution $R_s < 0.8$	3	10

A sikeresen elválasztott vegyületek százalékos megoszlásából jól láthatjuk, hogy a hagyományos állófázison megközelítőleg kétszer annyi sikeres elválasztást értünk el hexán/izopropanol használatával. (2. ábra)



2. ábra: Eredményesen ( $R_s > 2$ ) elválasztott vegyületek százalékos megoszlása IPA módosító esetén

Ugyanazon 51 vegyület vizsgálata más oldószer összetétel mellett, etanol szerves oldószer és DEA módosító használatával. A vizsgált 51 vegyület közül 28 esetén megfelelő szelektivitást tapasztaltunk. Az eluens összetétele ebben az esetben 85:15:0,1 arányú hexán:etanol:DEA volt. A 3. táblázatban összefoglaltuk az eredményeket.

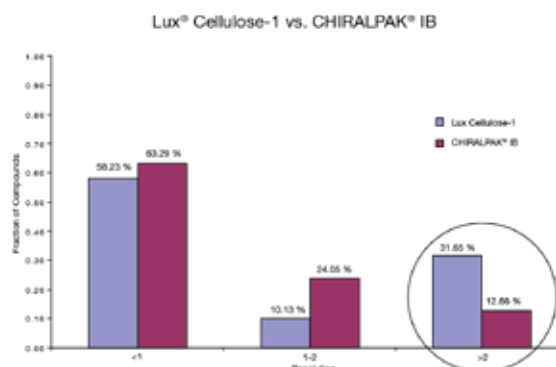
3. táblázat: 28 vegyület elválasztásának összehasonlítása azonos körülmények között, két típusú királis állófázis használatánál

Compounds	Lux® Cellulose-1	CHIRALPAK® IB	Compounds	Lux Cellulose-1	CHIRALPAK® IB
DL-E-Hydroxyphenethylamine	x	Partial	Carazolol	✓	Partial
Miconazole	✓	Partial	Toliprolol	✓	✓
Tetrahydrozoline	✓	x	Bisoprolol	✓	Partial
Metoprolol	x	✓	Sulfonazole	✓	✓
Acetobutol	Partial	x	Orphenadrine	✓	Partial
Tetramisole	✓	✓	Mianserin	✓	Partial
Halofantrine	✓	✓	1,1-Dihydroxy-6,6-Dimethylbiphenyl	Partial	✓
Bopindolol	✓	✓	Methoxy-p-tolyl sulfoxide	✓	x
Bupranolol	✓	x	5-Methyl-5-phenyl-hydantoin	Partial	x
Metomidate	✓	Partial	Nifedipine	x	✓
Mephesisin	✓	Partial	Bupivacaine	Partial	x
Oxazepam	✓	✓	Disopyramide	✓	✓
Oxprenolol	✓	✓	Indapamide	x	✓
Prilocaine	Partial	Partial	Bencoflumethazide	x	✓

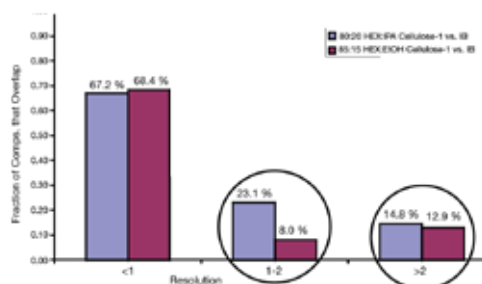
	Lux Cellulose-1	CHIRALPAK® IB
✓ Baseline Resolution $R_s > 1.5$	18	13
x Partial Resolution $0.8 < R_s < 1.5$	5	9
No resolution $R_s < 0.8$	5	6

A sikeresen elválasztott vegyületek százalékos megoszlásából jól látszik hogy a hagyományos állófázison megközelítőleg kétszer annyi sikeres elválasztást értünk el hexán/etanol használatával. (3. ábra)



3. ábra: Eredményesen ( $R_s > 2$ ) elválasztott vegyületek százalékos megoszlása etanol módosító esetén

Érdekes, hogy bár mindkét oszlop az esetünkben azonos királis szelektorral rendelkezett - cellulose tris(3,5-dimethylphenyl)carbamate -, kevés átfedés volt azon vegyületek között amelyek megfelelő elválasztást mutattak, mind az immobilizált és a fizikailag kötött állófázisokon, amint azt a 4. számú ábrán láthatjuk. A vizsgált vegyületek kevesebb, mint 25%-nál kaptunk megfelelő elválasztást mindkét oszlopon a leírt elválasztási körülmények között.



4. ábra: Azon vizsgált vegyületek %-os megoszlása melyek esetén mindkét fázison azonos elválasztást tapasztaltunk

A következő példákon keresztül láthatjuk, hogy milyen hatással lehet az eluens oldószer összetétele a királis elválasztásokra mind hagyományos, mind immobilizált állófázisok esetén. A kapott eredményeken (5. ábra, cikk végén) jól látható, hogy sok esetben a fizikailag módosított állófázisokon jobb elválasztást érhetünk el annak ellenére, hogy azonos királis szelektorral rendelkeznek a felhasznált oszlopok.

Mint az előzőekben is kiemeltük, az immobilizált királis állófázisokat (CSP) az oldószeres szélesebb palettájával használhatjuk. Az úgynevezett „sztenderd” oldószeres, mint az acetonitril, alkoholok és alifás szénhidrogének mellett a fizikailag kötött állófázisok számára tiltott „nem sztenderd” oldószeresekkel is, mint az etil-acetát, tetrahydrofuran, klórozott szénhidrogének és a metil-tercbutil-éter. Ugyanakkor ha megvizsgáljuk ezen oldószeres hatásait az elválasztásokra, a 6-8. ábrán található három vegyület „sztenderd” és „nem sztenderd” oldószeresekkel történő elválasztásakor kapott kromatogramokon jól látható, hogy kloroform és etilacetát módosító használata nem kedvezett a kapott eredményeknek.

#### 4. Táblázat

Compounds	80:20:0.1 Hex:IPA:DEA	85:15:0.1 Hex:EtOH:DEA	65:35:0.1 Hex:EtOAc:Ethanolamine	65:35:0.1 Hex:CHCl <sub>3</sub> :Ethanolamine
1,1-Dihydroxy-6,6-Dimethylbiphenyl	✓	✓	x	Partial
Bisoprolol	Partial	Partial	✓	✓
Bopindolol	Partial	✓	x	✓
Bupranolol	Partial	x	x	✓
Diopyramide	x	x	✓	x
Mefenazin	Partial	Partial	✓	x
Methoxy-p-tolyl sulfoxide	x	x	Partial	x
Metomidate	x	Partial	✓	Partial
Metoprolol	x	✓	✓	x
Misoxon	x	Partial	Partial	Partial
Miconazole	x	Partial	Partial	x
Diphenadrine	✓	Partial	✓	✓
Doprenolol	✓	✓	✓	✓
Prilocaine	Partial	Partial	✓	✓
Sulfonazole	✓	✓	✓	✓
Tetranisole	Partial	✓	Partial	x
Taliprolol	✓	✓	✓	x
Zopiclone	x	x	✓	✓

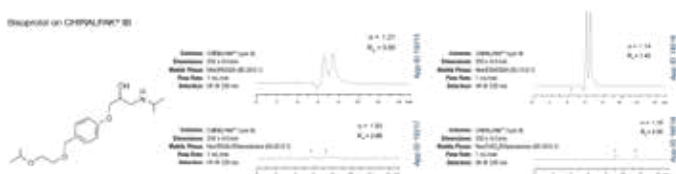
✓ Baseline resolution: $R_s > 1.5$
x No resolution $R_s < 0.8$
Partial resolution $0.8 < R_s < 1.5$

#### Következtetések

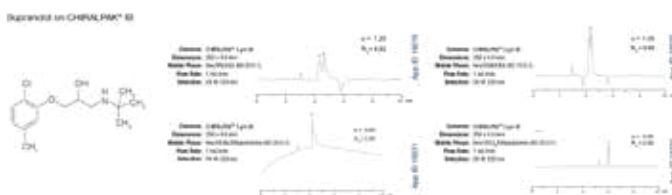
Ebben a cikkünkben összehasonlítottunk egy azonos királis szelektorral rendelkező immobilizált és hagyományos királis állófázist, általános normál fázisú oldószer összetételek mellett, 51 különféle vegyület elválasztására. Hagományos oldószer összetétel (hexán/IPA/DEA) használata mellett a fizikailag kötött állófázison 17 királis vegyületet sikeresen választottunk el míg az immobilizált állófázison csak 7 vegyület esetén kaptunk megfelelő felbontást. Másik oldószer összetétel használatával (hexán/etanol/DEA) 18 vegyületnél míg az immobilizált állófázison mindössze 13 esetben kaptunk alapvonalai vagy jobb elválasztást.

Láthatjuk, hogy a hagyományos, fizikailag kötött állófázison a két általános oldószer összetétel mellett a vegyületek 45%-ra kielégítő ( $R_s > 2$ ) eredményeket kaptunk míg az immobilizált állófázis esetén négy különféle oldószer összetétel mellett is csak a vegyületek 37%-nál tapasztaltunk kielégítő felbontást.

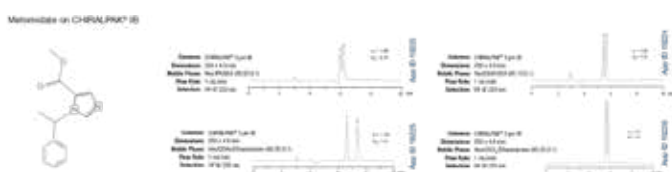
Összegezve a kapott eredményekből jól látszik, hogy általános normál fázisú körülmények mellett a hagyományos, fizikailag kötött királis állófázisok jobb enantioszelektivitással rendelkeznek a vegyületek elválasztásának százalékos sikeraránya szemszögéből, mint az immobilizált állófázisok.



6. ábra: Bisoprolol elválasztása CHIRALPAK® IB-n



7. ábra: Bupranolol elválasztása CHIRALPAK® IB-n



8. ábra: Metomidate elválasztása CHIRALPAK® IB-n

A különféle normál fázisú oldószer rendszerben vizsgált 51 egyedi vegyületből mindössze 18 esetében (4. táblázat) értünk el elfogadható felbontást immobilizált állófázis használatával. A lehetőség a nem sztenderd oldószeres használatára egyértelműen nem jelentett semmi előnyt.





5. ábra: A szerves módosító hatása a királis elválasztásokra





# Affordable Chiral Columns, Brilliant Separation Power

- Guaranteed alternatives to CHIRALCEL<sup>®</sup> and CHIRALPAK<sup>®</sup> columns



NEW

Amylose-O-CONH

Lux Amylose-1  
Guaranteed Alternative to  
CHIRALPAK<sup>®</sup> AD<sup>®</sup> Columns



# Megnövekedett visszanyerés poláris savas anyagok esetén polimer alapú erős anioncserés SPE-n gyenge anioncserés szorbenshez képest

Erica Pike and Shahana Huq  
Phenomenex Inc.

fordította: Szabó Krisztina

A gyenge savak eltávolítása komplex mátrixokból gyakran nehéz feladat a gyenge SPE szorbens – analit kölcsönhatás miatt, mely alacsony visszanyerést eredményez. Ezen írásunk egy polimer alapú erős anioncserés szorbent mutat be, amellyel látványosan javul a gyenge savak eltávolításának eredményessége a gyenge anioncserés szorbensekhez képest.

## Bevezetés

A gyengén savas vegyületek, mint pl. a karboxil csoportot tartalmazók vizsgálata, sokszor kihívás, mivel csak korlátozott számban áll rendelkezésünkre olyan SPE szorbens, ami alkalmas lenne ezekre a feladatokra. Gyakran alkalmaznak hagyományos szilikagél alapú erős anioncserés szorbenseket, bár ezek pH tartománya csak 1-8-ig terjed, ami korlátozza a használható pH-t. A másik népszerű módszer a gyenge savaktól való megszabadulásra a polimer alapú gyenge anioncserés szorbensek használata. Ezzel már széles pH tartományban dolgozhatunk (pH 1-14), de az analit-szorbens kölcsönhatás nem olyan erős, mint az erős anioncserés esetén, és ez határt szab a mintatisztításnál használt mosófolyadék a szerves oldószer tartalmának. Ez befolyásolja, mind a minta tisztaságát, mind a visszanyerés határfokát. Ennek a tanulmánynak a célja, hogy módszert adjon meg egy feladat megoldásán keresztül egy polimer alapú erős anioncserélő alkalmazására, kihasználva nagy pH tartománybeli alkalmazhatóságát, amely nagy visszanyerést eredményez, anélkül, hogy a szilikagél alapú ioncserélők korlátozott pH tartományába ütköznénk.

## Kísérleti körülmények

500µl humán plazmát, amelyhez a hemolízis megakadályozására Na<sub>2</sub>EDTA-t adtunk, szpájkoltunk indol-3-karbonsavval (pKa~4), amely koncentrációja a mintában 5µg/ml volt. A szpájkolt mintát 1:1 arányban hígítottuk 500µl vízzel majd savasítottuk 2%-os foszforsavas oldattal. A felhígított plazma mintákat ezután két különböző 30mg/3ml-es SPE csövön extraháltuk: egy polimer alapú gyenge anioncserés, és egy polimer alapú erős anioncserés szorbensen (Strata-X-A, Phenomenex, Torrance, CA, USA). A két SPE szorbens értékelése az 1. táblázatban leírt módszer alapján történt. Az extra-

háló módszerek mindkét szorbens optimális működéséhez lettek kiválasztva. Mivel a Strata-X-A kvaterneramin ligandumot tartalmaz, el kellett végezni egy savas elúciót a mérendő anyag semlegesítése végett, hogy távozni tudjon az SPE szorbensről. A gyenge anioncserés szorbensen egy gyengébb diamin ligandum található, és emiatt lúgos elúcióra volt szükség a semlegesítéshez. A semlegesítéskor savas anyagok eluálódtak, amelyeket addig az SPE oszlop visszatartott. Ezután az extrahált mintát LC/UV-val vizsgáltuk visszanyerés és tisztaság szempontjából.

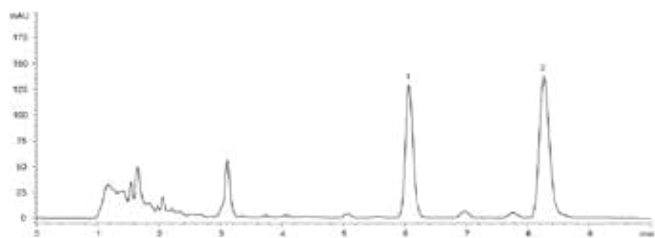
1. táblázat: Strata-X-A polimer alapú erős anioncserélő SPE és Polimer alapú gyenge anion cserésszorbens

Strata-X-A polimer alapú erős anioncserélő SPE szorbens (30mg/ml, kat.szám:8B-S123-TB3)	Polimer alapú gyenge anion cserés szorbens (30mg/ml)
1: kondicionálás - 1ml metanol - 1ml víz	1: kondicionálás - 1ml metanol - 1ml víz
2. Mintafelvétel - 500µl humán plazma (Na <sub>2</sub> EDTA) indol-3-karbonsavval szpájkolva, amely koncentrációja a mintában 5µg/ml,volt, hígítva 500µl vízzel 1:1 arányban majd savasítotva 2%-os foszforsavas oldattal	2. Mintafelvétel - 500µl humán plazma (Na <sub>2</sub> EDTA) indol-3-karbonsavval szpájkolva, amely koncentrációja a mintában 5µg/ml,volt, hígítva 500µl vízzel 1:1 arányban majd savasítotva 2%-os foszforsavas oldattal
3. minta tisztítása - 1ml 50mM Na-acetát, pH=7,0 - 1ml metanol	3. minta tisztítása - 1ml 50mM Na-acetát, pH=7,0 - 1ml metanol
4. szárítás - 2 percig szárítás, vákuum alatt 254Hgmm nyomáson	4. szárítás - 2 percig szárítás, vákuum alatt 254Hgmm nyomáson
5. elúció - 2x500µl 5%-os hangyasavval metanolban - 45°C-on párologtatás száradásig	5. elúció - 2x500µl 5%-os ammónium-hidroxiddal metanolban - 45°C-on párologtatás száradásig
6. visszaállítás 500µl kezdeti eluenssel 50µg/ml szalicilsavval szpájkolva	6. visszaállítás 500µl kezdeti eluenssel 50µg/ml szalicilsavval szpájkolva

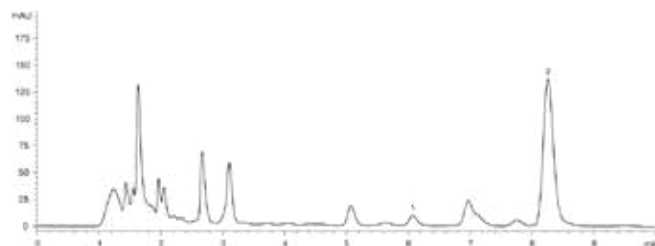
## Eredmények és következtetések

Az LC/UV elemzésből világosan látszik, hogy az erős anioncserés polimer szorbenssel végzett módszer magasabb visszanyerést és tisztább extraktumot eredményezett, mint a gyenge anioncserés polimerrel végzett (1. és 2. ábra). Nagy valószínűséggel ez a Strata-X-A erős

anioncserélő szorbensen lévő dimetil-butil kvaterner aminnak tulajdonítható. Ez a ligandum képes volt erősen megkötni az indol-3-karbonsavat, és ez lehetővé tette a 100%-os szerves oldószer használatát a mintatisztításnál. Így további mátrix zavaró komponensek eltávolítása vált lehetségessé, miközben a gyenge anioncserés szorbensen ugyanez a szerves mosás mintaveszteséget okozott.



1. ábra: Strata-X-A-n extrahált szpájkolt minták LC/UV mérése

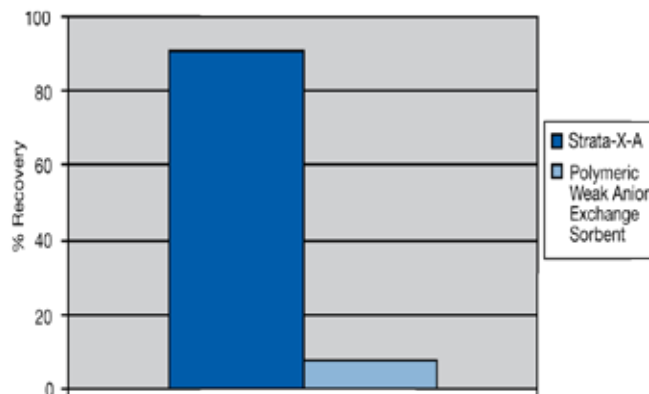


2. ábra: Polimeralapú gyenge anioncserés szorbensen extrahált szpájkolt minták LC/UV mérése

Körülmények mindkét oszlopon:

Oszlop: Gemini® 5µm C18  
 Dimenzió: 150 x 4.6mm  
 Katalógusszám: 00F-4435-E0  
 Mozgófázis: 20mm Kálium-dihidrogénfoszfát, pH 2,5 / Acetonitril (75:25)  
 Áramlási sebesség: 1,0mL/perc  
 Hőmérséklet: Szobahőmérséklet  
 Detektálás: UV @ 220nm  
 Minta: 1. indol-3-karbonsav, 2. szalicilsav (IS)

Azt is megállapítottuk, hogy a Strata-X-A-n extrahált gyenge savak nagy retenciója reprodukálhatóbb eredményt mutatott 3,1%-os CV értékkel, mint a gyenge anioncserés szorbens 24,5%-os CV értékkel (3. és 4. ábra).



3. ábra: Az indol-3-karbonsav visszanyerése (%)

	Spiked Concentration (µg/mL)	Strata-X-A		Polymeric Weak Anion Exchange Sorbent	
		% Recovery	% CV	% Recovery	% CV
(1) Indole-3-Carboxylic Acid	5.0	91 %	3.1	8.0 %	24.5
(2) Salicylic Acid	50	(IS)		(IS)	

4. ábra: Az indol-3-karbonsav visszanyerése és CV értékei (%)

### Értékelés

Gyenge savak (főként, amelyek karbonsavat tartalmaznak) komplex mátrixokból történő extrakciója esetén fontos, hogy olyan SPE szorbentet válasszunk, amely erős analit-szorbens kölcsönhatást tesz lehetővé, mint pl. a Strata-X-A, hogy minél nagyobb visszanyerést, minél tisztább frakciót, és minél reprodukálhatóbb eredményt tudjunk elérni.





# Mennyi? Harminc... ja nem, negyven. 40 éves a nagyhatékony- ságú ionkromatográfia

Horváth Krisztián, Hajós Péter  
Analitikai Kémia Intézeti Tanszék,  
Pannon Egyetem

## Bevezetés

Vizes oldatok ionos összetételének ismeretére a kémia szinte minden területén igény van, a szerves és szervetlen kémiában, a komplex kémiában, a biokémiában, a gyógyszerkémiában, a környezeti kémiában, a klinikai és a nukleáris kémiában egyaránt. Ionos komponensek szelektív meghatározása vizes oldatokban klasszikus analitikai probléma, melynek megoldására sokféle módszer jöhet szóba.

*„A kation analízis területén gyors, érzékeny és versenyképes módszerek állnak rendelkezésre (atomabszorpciós-, atomemissziós-, indukált csatolású plazma spektrometria, polarográfia stb.), anionok szelektív meghatározására azonban kevés megfelelő, nagy érzékenységű módszer létezik. Ezek között kiemelkedik az idén negyvenéves nagyhatékonyságú ionkromatográfia.”*

## Ionkromatográfia

Ionkromatográfia alatt nem egy konkrét kromatográfias technikát értünk, hanem több, egymástól teljesen eltérő retenciós mechanizmusú módszert. Az ionkromatográfia magába foglalja az összes kisméretű, vízzoldható, ionos vagy ionizálható komponens analízisére szolgáló folyadékkromatográfias módszert [1]. Tehát az ionkromatográfiát a többi kromatográfias technikától nem a retenciós mechanizmus, hanem az elválasztott mintakomponensek minősége különbözteti meg.

## Ionkromatográfiával az alábbi komponensek határozhatók meg:

- szervetlen anionok: halogenidok ( $F^-$ ,  $Cl^-$  stb.), oxoanionok ( $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $BrO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ , ... stb.),
- szerves anionok: kis molekulatömeg (vízzoldható) mono-, di- és trikarbonsavak (formiát, acetát, oxalát, fumarát, citrát, EDTA stb.), szulfonsavak, beleértve az ionos detergenset is,
- szervetlen kationok: alkáli- és alkáliföldfémek ( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  stb.),
- szerves kationok: kis molekulatömegű (vízzoldható) aminok (metil-, etil-, propilamin, poliaminok stb.),
- ionos organo-metallo komplexek (fém-kelátok, tributil-ón stb.),
- aminosavak (glicin, alanin stb.) és
- szénhidrátok (glükóz, fruktóz, szacharóz stb.).

Biológiai makromolekulák (peptidek, fehérjék) ioncserés elválasztását nem soroljuk az ionkromatográfia területéhez.

## Ionkromatográfia típusai

- ioncsere-kromatográfia (HPIC): az elválasztás mechanizmusát a mozgófázis és az állófázison kötött ioncserélő csoportok közti ioncsere folyamatok szabályozzák. Az ioncsere az egyik legrégebben bemutatott és legelterjedtebben alkalmazott elválasztási mechanizmus az ionkromatográfián belül. Az ioncsere-kromatográfia egyaránt használható szerves és szervetlen anionok és kationok elválasztására is.
- ionkizárásos-kromatográfia (HPICE): az elválasztás mechanizmusát az adszorpció, a Donnan- ill. a sztérikus kizárás folyamatai szabályozzák. Gyenge szervetlen és szerves savak elválasztására és meghatározására szolgál, de megfelelő detektálási rendszerrel kombinálva a technika aminosavak, aldehidek és alkoholok elválasztására is alkalmas.
- ionpár-kromatográfia (MPIC): felületaktív anionok és kationok ill. átmenetifém-komplexek elválasztására alkalmas technika. A mozgófázis ún. ionpárképzőt tartalmaz, mely az elválasztandó ionokkal ionpárt képez. Az állófázis leggyakrabban C8/18 funkcionális szilikagél.
- alternatív módszerek: alternatív módszerek közé szokás sorolni a kationok és anionok elválasztására egyaránt használható kelát-ionkromatográfiát, micellakizárásos-kromatográfiát, valamint a hidrofil interakciós kromatográfiát is.

## A görögöktől a Manhattan projekten át 2015-ig: rövid történeti áttekintés [2]

Minden jelentős tudományág története így kezdődik: „Már az ókori görögök is...”. Ókori feljegyzések említést tesznek a tengervíz ioncserés sótalánításáról. Arisztotelész *Problematica*-jában bemutatja, hogy homok szűrőket használtak a sós tengervíz tisztítására. Sir Francis Bacon a *Sylva Sylvarum: A Naturall Historie in Ten Centuries c.* könyvében írja le azt a módszert, mellyel a *Berberia* partjainál élők a friss vizet nyerték: lyukat ástak a homokba, úgy, hogy a tengervíz közvetlenül ne folyjon bele. A lyuk dagálykor, megtelt tiszta vízzel. Egy évszázaddal később Dr. Stephen Hales tesz említést egy módszerről, melynek során a tengervíz kőkádakon szűrtek át. Az első pint tiszta, sómentes víz volt, de a későbbiek már ugyanolyan sósak voltak, mint a tengervíz.

Habár az ioncsere gyakorlati alkalmazása évszázadokkal a kromatográfia születése előtt fel lett jegyezve, a jelenséget senki nem értette. Arisztotelész például úgy gondolta, hogy a sós víz nehezebb a sótlan víznél, mely könnyebben, gyorsabban mozog. Még Berzelius, aki az ionok és ionos komponensek elméletét kimunkálta, sem ismerte fel a mechanizmus mögött az ioncsere jelenségét. Az ioncsere folyamatok felismerése két agrokémikus, H.S Thompson és J. Thomas Way nevéhez fűződik [3, 4]. Habár munkájuk követőkre talált néhány talajkémikus és geokémikus személyében, egészen a huszadik századig az ioncsere széleskörű gyakorlati alkalmazása nem terjedt el. Tswett munkájával egy időben, Gans természetes és szintetikus alumínium szilikátokat használt ipari vizek lágyítására [5].

Az ioncsere első analitikai alkalmazására 1917-ben Folin és Bell által került sor [6]. Szintetikus zeolitot használtak ammónium vizeletből való kivonására. Az ioncsere első oszlop kromatográfiás alkalmazására 1923-ban került sor Whitehorn által aminok biológiai mintákból való elválasztására [7]. Az első anion analízisre 1927-ben került sor, mikor Bahrtd szulfátot határozott meg természetes vizekben [8].

Az ioncserés technikák forradalmi változásokon mentek keresztül a '30-as években Adams és Holmes megfigyelésének köszönhetően, miszerint az összetört hanglemezek ioncserés tulajdonságokat mutatnak. Ez a felfedezés vezetett el az első szerves ioncserélő szintéziséig fenol és formaldehid kondenzációs reakciójával [9]. Sok akadémiai és ipari vegyész felismerte ezeknek a gyantáknak a sokoldalúságát, ami az ioncserés alkalmazások széleskörű fejlődéséhez vezetett. A szintetikus ioncserélők legjelentősebb felhasználására a Manhattan projekt keretében került sor. 1942–43-ban Boyd és munkatársai az ioncsere alkalmazhatóságát mutatták be nyommenyiségű hasadvány termékek megkötésére [10]. Ez vezetett az egyes lantanidák ioncserés elválasztásának fejlődéséhez. A természetben nem található prométium felfedezése is az ioncserének volt köszönhető. A világháború után a terület fejlődése jelentősen felgyorsult, a közlemények száma az ötvenes években évenként nagyjából ezerrel nőtt.

Míg az ioncsere fejlődése az analitikai kémiában robbanásszerű volt, addig az elválasztások sebessége és hatékonysága korlátozott maradt. Mindezt jól tükrözi Fritz és Pietrzyk 1961-es munkája, melynek során  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionok klorokomplexeit több mint kilenc óra alatt sikerült elválasztani anioncserélőn [11]. A módszer csúskapacitása 10-nél kevesebb volt.

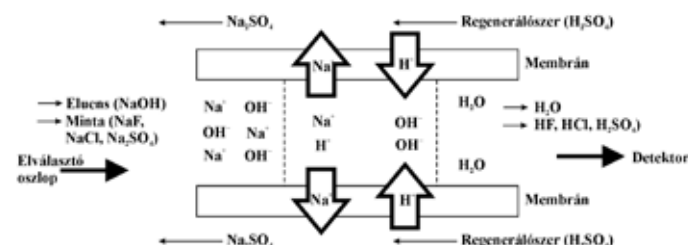
1974-re a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásában meglehetősen nagy potenciállal rejtett. Megjelentek az ún. pelliculáris ioncserés állófázisok, amelyek polisztirol-divinilbenzol felületi szulfonálásának ill. aminálásának szintézisével jöttek létre. Ennek köszönhetően UV tartományban elnyelő ionok meghatározására számos nagyhatékonyságú ioncserés elválasztást dolgoztak ki. Köszönhetően azonban az UV aktív ionok kis számának ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ), az ioncserés HPLC technikák elterjedését az univerzálisan alkalmazható detektor hiánya hátráltatta.

Az áttörésre idén 40 éve, 1975-ben került sor H. Small munkássága [12] révén. A szuppresszált vezetőképességi eljárás kidolgozásával és az ún. latex-szerkezetű ioncserélők kifejlesztésével mind a detektálás érzékenysége, mind az elválasztások hatékonysága lehetővé tette anionok és kationok analitikai meghatározását mg/l koncentráció tartományban. A kereskedelmi forgalomban szintén ebben az évben megjelenő első ionkromatográfiás készülékek mindenki számára elérhető rutin műveletté tette mindezt. A technika kidolgozóit számos díjjal jutalmazták. A kereskedelmi készülékek bemutatásával egyidejűleg a hazai alap kutatások is elindultak ezen a szakterületen a Veszprémi Vegyipari Egyetem (jelenleg Pannon Egyetem) Analitikai Kémia Tanszékén [13,

14], ahol ma is intenzív kutatások zajlanak a módszer alapjainak és alkalmazásainak vizsgálatában. Az elmúlt évtizedek során az ionkromatográfia fejlődése töretlennek bizonyult. Mind az oszloptechnológia, mind a készülék részegységek jelentős változáson estek át. 2015-ben a legmodernebb ionkromatográfiás rendszerek kapilláris oszlopokat tartalmaznak (0,4mm belső átmérő), a mozgófázist és a szupresszor regeneráló oldatot nagy tisztaságú vízből, elektrokémiai úton állítják elő. Működtetésükhöz évente mindössze 2–5l vízre van szükség. Érzékeny detektálásuknak köszönhetően kevesebb mint 100fg-os kimutatási határral rendelkeznek.

## Szuppresszált vezetőképességi detektálás

Egy ionkromatográfiás rendszer alapvetően ugyanazokat a főbb részegységeket tartalmazza, mint egy hagyományos folyadékkromatográfiás rendszer. Alapvető különbség – az elválasztás mechanizmusán túl – a detektálás módjában található. Az ionkromatográfiában főként szuppresszált vezetőképességi detektálás használatos. A szupresszor feladata, hogy az ionok elúciójához használt elektrolit (NaOH, metánszulfonsav) vezetőképességét kémiai csökkentsze, és egyúttal a mintaionokét növelje. A modern szupresszorokban egy ioncserélő membrán található. Kationkromatográfia esetén anion-, anionkromatográfia esetén kationcserélő membrán. Előbbi esetben a mozgófázis anionjait hidroxidionokra, utóbbi esetben a mozgófázis kationjait protonokra cseréljük vizet állítva így elő a mozgófázisból.



1. ábra: Kémiai regenerálású szupresszor működési elve

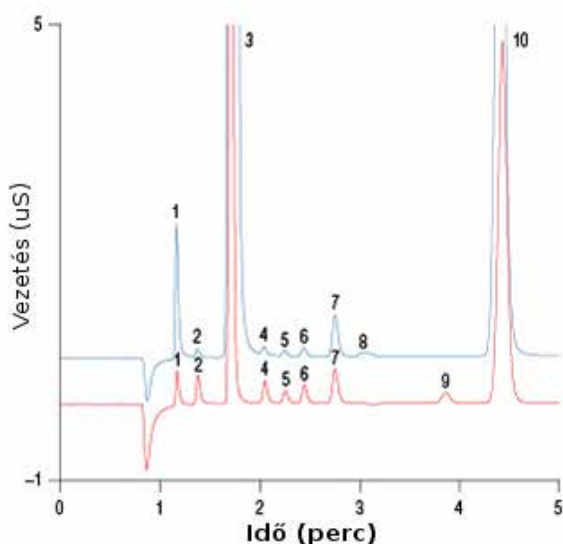
Az ioncserélő membrán regenerálása folyamatos üzemmódban az elektrokémia lehetőségén túl anionkromatográfiában kénsavval, kationkromatográfiában tetrametil-ammonium-hidroxiddal történik, ami biztosítja a reakcióhoz szükséges protonokat, ill. hidroxidionokat. A szuppresszált vezetőképességi detektálás mellett elterjedten alkalmazzák még az elektrokémiai és UV-s detektálást is.

## Ionkromatográfia alkalmazási területei

### Környezetanalitika

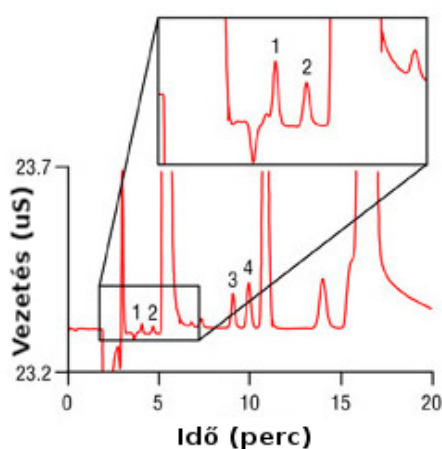
Az ionkromatográfiás elválasztási módszereket széles körben alkalmazzák különböző környezeti minták elemzése során. Az ionkromatográfia egyaránt alkalmazható ivóvizek és szennyvizek összetételének meghatározására, talajok, iszapok, csurgalékok, szilárd hulladékok analitikai vizsgálatára is. A technikának elsősorban anionok meghatározásában van kiemelt jelentősége.

Az ivóvízminősítés területén az ionkromatográfia igen elterjedt, ugyanis lehetőséget nyújt az ivóvízben található szervesetlen ionok többségének nagy hatékonyságú elválasztására (2. ábra). Ennek köszönhetően több szabványos mérési módszer is rendelkezésre áll a vízminősítés területén. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala - EPA - által alkalmazott US-EPA Method 300 jelzésű szabványsorozat is meglehetősen sok ionkromatográfias módszert ajánl anionok meghatározására.



2. ábra: Ivóvíz minta (felső) és standard oldat (alsó) ionkromatográfias analízise. Oszlop: Dionex AS22, eluens: 5,9 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , 1. fluorid, 2. formiát, 3. klorid, 4. nitrit, 5. klorát, 6. bromid, 7. nitrát, 8. karbonát, 9. foszfát, 10. szulfát

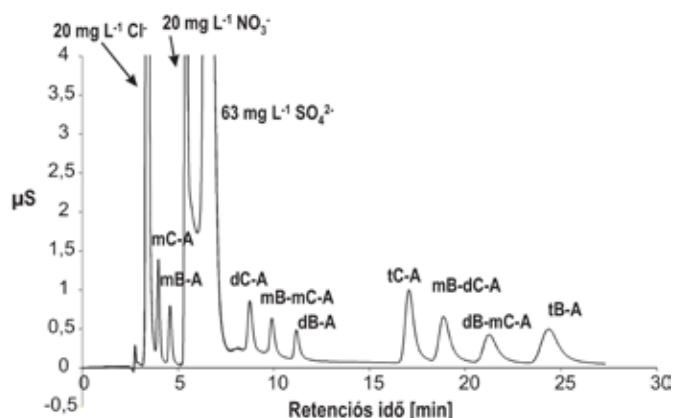
A víztisztítás során alkalmazott fertőtlenítés anionos melléktermékeinek kimutatására is előnyösen alkalmazható az ionkromatográfia. Ilyen vegyületek például a bromát, klorit és a klorát (3. ábra). A bromát az ózonos fertőtlenítés során képződik a nyersvíz természetes bromidtartalmából, míg a klorit és klorát a klór-dioxidos fertőtlenítés mellékterméke. Ezek az ionok igen súlyos egészségügyi kockázatot hordoznak már néhány  $\mu\text{g}/\text{l}$  koncentrációnál is.



3. ábra: Bromátion meghatározása ivóvízben. Oszlop: Dionex AS9-HC, eluens: 9mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1. klorit, 2. bromát, 3. bromid, 4. klorát

A klórral való fertőtlenítés során a vízben lévő szerves anyagokból halogénezett szerves szennyezők keletkez-

hetnek, melyek közül legnagyobb mennyiségben a halogénezett ecetsavak találhatóak meg az ivóvizekben. Attól függően, hogy a nyersvíz milyen mennyiségben tartalmaz bromidot, klórozott- ill. brómozott-klórozott ecetsavak különböző variációi keletkezhetnek. Ezek a vegyületek erősen toxikus hatásúak, feltételezhetően rákkeltők is, bár ez utóbbi hatás egyelőre még nem bizonyított. Ivóvízben, köszönhetően meglehetősen alacsony pKa értéküknek, disszociált formában, azaz anionokként vannak jelen. Ionkromatográfias meghatározásuk nehézségét elsősorban az okozza, hogy a különböző mértékben halogénezett ecetsavak nagyon eltérő módon kötődnek az állófázis-hoz, így analízisük főként kapacitás gradiens technika (4. ábra) ill. induktív csatolású plazma tömegspektrometria detektálás alkalmazásával oldható meg.



4. ábra: Halogénezett ecetsav származékok és szervesetlen anionok elválasztása makrociklikus anioncserélőn

Hatékony ionkromatográfias módszerek állnak rendelkezésre cianid, króm(III), króm(VI), alkáli és alkáliföldfém ionok kimutatására is. Különösen előnyös a módszer ammónium- és egyéb kationok kimutatására aminok jelenlétében, mivel ezek a vegyületek zavarják a hagyományos kolorimetriás ammónia meghatározást.

Az ionkromatográfia területén napjainkban került előtérbe az igen toxikus perklorát felszíni és felszín alatti vizekből történő meghatározása. A perklorát ion a szilárd rakéta hajtóanyagok kulcsösszetevője, ezért elsősorban olyan területeken szennyezheti a felszíni és talajvizeket, ahol ilyen anyagokat, lőszeret, tűzijátékokat gyártanak, tesztelnek.

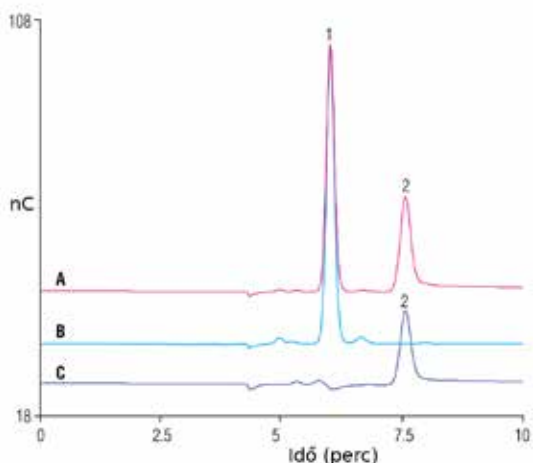
A felszíni vizek fémvegyületeinek meghatározásában is egyre nagyobb teret hódít az ionkromatográfia. Nagy előnye, hogy mérhetővé teszi a különböző oxidációs állapotok - pl. a Fe(II) és Fe(III) - mennyiségét, a stabil fémkomplexeket - fém-cianidok -, vagy mind a szerves, mind a szervesetlen arzén vegyületeket. Így lehetővé válik a fémvegyületek sorának, transzportjának, toxicitásának előrejelzése.

### Gyógyszeripari alkalmazások

Habár az ionkromatográfia jelentősége nem vetezhető a fordított fázisú technikáéval, számos hatóanyag, szennyező és formázó vegyület analízisében használatos. Aminoglikozidok (5. ábra), cefepime, betanekol és karbakol hatóanyagok ioncserés elválaszt-



tása szuppresszált vezetőképességi vagy elektrokémiai detektálás alkalmazásával megfelelő hatékonyságot és érzékenységet biztosít ezen komponensek és bomlástermékek analíziséhez. Kisméretű szerves savak analízisére (pl. TFA peptidok elegyekben) is elterjedt módszer.



5. ábra: Kanamycin (1) és amikacin (2) analízise. Oszlop: Dionex CarboPac MA1, eluens: 115mM NaOH, pulzáló amperometriás detektálás

### Élelmiszeripar

Köszönhetően annak, hogy kisméretű szerves savak és bázisok első számú analitikai technikája az ionkromatográfia, a technikát széles körben alkalmazzák az élelmiszeriparban is ezen komponensek kimutatására. Szénhidrátok elválasztása erősen lúgos közegben, elektrokémiai detektálás alkalmazásával is megvalósítható.

### Félvezetőipar

A félvezetőipar hatékony működéséhez nélkülözhetetlen a felhasznált eszközök, anyagok megfelelő mértékű tisztítása. Ennek mértéke anionokra vonatkozóan kizárólag ionkromatográfias módszerek alkalmazásával oldható meg. A félvezetőipar jelenleg az ionkromatográfias hatékonyság növelés és detektálás fejlesztés legnagyobb hajtóereje.

### Quo vadis IC? A görögöktől a Manhattan projekten át a Marsig

Az elmúlt negyven év során az ionkromatográfia minden szempontból érett technikává vált. Az ionkromatográfias módszerek robusztusak, megbízhatóak. A kétezres évek elején az ionkromatográfias társadalom még önálló konferenciákat rendezett, magas részvételi számmal. Az első évtized végére azonban a pezsgő élet némileg lecsendesedett. A jelentős analitikai kihívások megoldásra kerültek, új problémák nem merültek fel. Újabb lökést az ionkromatográfia fejlődésének egy jelenleg futó NASA projekt adhat, melynek célja ionkromatográf eljuttatása a Marsra [15].

### Referencia

- [1] P.R. Haddad, P.E. Jackson, *Ion Chromatography: Principle and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- [2] C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 711.
- [3] H.S. Thompson, *J. R. Agric. Soc. Engl.* 11, (1850) 68.
- [4] J.T. Way, *J. R. Agric. Soc. Engl.* 11 (1850) 313.
- [5] R. Kunin, *Ion Exchange Resins*, Wiley, New York, 1958.
- [6] O. Folin, R. Bell, *J. Biol. Chem.* 29 (1917) 329.
- [7] J. Whitehorn, *J. Biol. Chem.* 56 (1923) 751.
- [8] A. Bahrtdt, *Z. Anal. Chem.* 70 (1927) 109.
- [9] B.A. Adams, E. L. Holmes, *J. Soc. Chem. Ind. Lond.* 54 (1935) 1.
- [10] G.E. Boyd, J. Schubert, A.W. Adamson, *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 2818.
- [11] J.S. Fritz, D.J. Pietrzyk, *Talanta* 8 (1961) 143.
- [12] H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1801.
- [13] Hajós, P., Inczédy J., *J. Chromatography* 1980, 201, 193
- [14] Hajós, P., Inczédy J.; *Ion Exchange Techn. Ellis Horwood Ltd., Chichester*, 1984, 450.
- [15] C.P. Shelor, P.K. Dasgupta, A. Aubrey, A.F. Davila, M.C. Lee, C.P. McKay, Y. Liu, A.C. Noell, *Astrobiology* 14 (2014) 577.



# EQUIPMENT FOR ANALYTICAL, PREPARATIVE AND FLASH LIQUID CHROMATOGRAPHY

## PREPARATIVE SYSTEMS



- Box with gradient valve or container for solvent bottles

- Preparative pump with flow-rate up to 50, 100 or 300 ml/min

- Flash 14 DAD detector in versions up to 400, 600 and 840 nm

Check out  
wide range  
of detectors  
and cells!



