

Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs

A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai Gyors folyadékkromatográfia

2014



© Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs

Lektorok: Ritz Ferenc és Bobály Balázs

ISBN 978 963 08 9407 4

Felelős kiadó: Merck Kft.
Felelős vezető: Dr. Meisel Tibor
Terjedelem: 22,75 ív (A4)

Fekete Jenő¹, Kormány Róbert², Fekete Szabolcs³

A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai
Gyors folyadékkromatográfia

2014

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

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

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

Kedves kromatográfus Kollégák!

Nagy örömmel nyújtjuk át Önöknek legújabb kromatográfias kiadványunkat, mely a 2008-ban és 2009-ben megjelent könyvek folytatásaként a sorozat harmadik tagja.

A gyors folyadékkromatográfia az elválasztástechnika egyik leggyorsabban fejlődő ága, ezért indokolt az Önök részéről megnyilvánuló felfokozott érdeklődés a téma iránt. Jelen kötet a gyors folyadékkromatográfia trendjeit, fejlesztéseit tárgyalja a már megszokott tudományos igényességgel.

Köszönettel tartozunk a szerzőknek a téma alapos, gyakorlati példákkal is alátámasztott feldolgozásáért.

Biztosak vagyunk benne, hogy mind a folyadékkromatográfiával ismerkedők, mind pedig a gyakorlott kollégák számára egyaránt hasznos ismereteket nyújt a kiadvány és jelentősen hozzájárul tudásuk bővítéséhez, munkájuk sikeréhez.

Üdvözlettel,

Wachter György

Gabriellának

Bevezetés	6
1. Alapösszefüggések a gyors folyadékkromatográfiában	8
2. Korlátok a gyors folyadékkromatográfiás módszereknél	17
2.1. Oszlopon kívüli zónaszélesítő hatás	17
2.2. Gradiens késési térfogat	22
2.3. Mintaadagolás.....	26
2.4. Készülék jellemzők gyors és hagyományos kromatográfiához.....	28
3. Gyors elválasztások, fejlesztések a kolonnatechnológiában.....	30
3.1. Az oszlopon létrejövő zónaszélesedés	30
3.2. Teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű töltetek.....	38
3.3. Héjszerkezetű (mag-héj) töltetek.....	46
3.4. Monolit kolonnák.....	56
3.5. Nagyhőmérsékletű elválasztások.....	69
4. Kinetikus görbék módszerének alapjai.....	74
4.1. Eltérő morfológiájú töltetek összehasonlítása	75
4.2. Szemcseméret és a nyomás hatása azonos morfológiájú töltetekenél.....	82
4.3. A kinetikus görbék transzformációja	86
5. Fejlesztések a szuperkritikus és szubkritikus fluid kromatográfiában	89
6. A pH mérés és hatása a folyadékkromatográfiás elválasztásra.....	95
6.1. A pH definíciója, elsődleges és másodlagos pufferek	95
6.2. A pH mérés lehetőségei és gyakorlata a folyadékkromatográfiában.....	97
6.3. A pK_a értékek a mozgófázisban és alkalmazásuk a folyadékkromatográfiás gyakorlatban.....	101
6.4. A pH és pK_a érték változás savas pufferek alkalmazásakor savas csoportot tartalmazó vegyületek meghatározásakor	105
6.5. A pH és pK_a érték változás bázikus pufferek alkalmazásakor, savas csoportot tartalmazó vegyületek meghatározásához.....	113
6.6. Pufferválasztás bázikus csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásához.....	114
6.7. Bázikus csoportot tartalmazó szerves vegyületek elválasztása savas pufferek alkalmazásával.....	117
6.8. A pK_a értékeinek változása a hőmérséklettel	122
7. Számítógépes szimulációval támogatott módszerfejlesztés (Quality by Design)	124
7.1. LogD meghatározása	125
7.2. DryLab szoftver	128
7.2.1. t_G -T-pH modell	130
7.2.3. t_G -T- t_C modell	137
7.3. Módszerfejlesztés első és második generációs szilika monoliton	140
Mellékletek	145

Bevezetés

A folyadékkromatográfia hosszú ideig csipkerózsika álmát aludta. A 1970-es évek elejére kialakult a műszerezettség. Ez visszatükrözte az arra az időre elért eredményeket a kolonnatechnológia területén. Már megjelentek az 5 μm szemcseátmérőjű töltetek, a szabálytalan alakú szilikagél helyét fokozatosan átvették a szabályos, gömbszimmetrikus töltetek. Uralkodóvá váltak a 15 és 25 cm hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű kolonnák. A folyadékkromatográfia műszerezettségét is ezekhez igazították. Ennek megfelelően az adagolási térfogat 10-100 μl közé esett, az UV, UV-VIS detektorok cellatérfogata 10 μl , az összekötő vezetékek belső átmérője 0,25 mm volt. Az így kialakított készülék teljes mértékben megfelelt a követelményeknek. Hosszú ideig csak a számítógépes vezérlés és adatgyűjtés jelentette a fejlesztést. Ez a rendszer lett a gyógyszeripar fő analitikai módszere. A kolonna töltetek viszont, amelyek döntő többségét a szilikagél alapúak jelentették, a nagy fémion tartalmuk, nagy szilanolcsoport aktivitás és a kis borítottságuk miatt számos feladat megoldásánál nehezen reprodukálhatóvá tették a módszereket. Sokszor sarszról sarszra változtak a kolonnák felületi fizikai-kémiai tulajdonságai és ez visszaköszönt az elválasztásban. Ekkor a fő feladat a kolonnatechnológia fejlesztése volt.

Kisebb fémion tartalmú, kisebb szilanolcsoport aktivitású, jól borított állófázisok és sarszról sarszra való azonosság jelentették a fő célokat. A 90-es évek végére, a 2000-es évek elejére a kolonnatechnológia területén sikerült ezeket elérni, sőt megjelentek az 5 μm alatti szemcseátmérőjű töltetek; először a 3 μm -esek, majd napjainkra a 2 μm -esek és az alatti szemcseátmérőjűek is. A kis csúcshatár, amelyet a kis szemcseátmérőjű töltetekkel lehet elérni, jelentősen megnövelte a technika hatékonyságát. Értve ezalatt, hogy kis szerkezeti különbségű anyagokat lehetett rövid idő alatt elválasztani, egységnyi idő alatt viszonylag nagyszámú mintát lehetett elemezni, megnőtt a kolonna csúcsfelbontó kapacitása, stb. Ennél a technikánál a nyomás felső határa 400 bar. Ma, amikor HPLC-ről beszélünk, akkor ezzel a műszerezettséggel működő folyadékkromatográfias rendszert értjük alatta. Ezt a műszerezettséget alkalmazva, az elemzési idő 5-60 perc között változott, az elválasztásokban tapasztalt csúcshatárak viszonylag nagyok voltak. Adva voltak a fő célok, amelyeket szem előtt tartva megindulhattak az új fejlesztések. Megjelent az igény a gyorsabb kromatográfias módszerek alkalmazására, ahol a zónaszélesedés kisebb. A megoldásra több út kínálkozott, az egyik; csökkenteni a kolonna- és szemcseméretet, a másik; növelni a hőmérsékletet, a harmadik; új, nagyobb permeabilitású kolonnát készíteni, majd időrendben végül újra megjelentek a héjszerkezetű töltetek. A nagy permeabilitású kolonnák egyik válfaja a monolit. Ez az „egy darabból álló” megoldás valóban forradalmasította az elválasztástechnikát a 2000-es évek elején azzal, hogy bizonyos szabályokat és kolonna méreteket betartva, a most már hagyományosnak mondott HPLC

készülékben is használható. A 2 μm szemcseátmérőjű kolonnák, és a nagy hőmérséklet alkalmazása viszont megköveteli, hogy új készüléket használjunk.

A könyv tárgyalja a gyors folyadékkromatográfiával kapcsolatos elméleti megközelítéseket, és annak következményeit a műszerezettségre. Mivel az esetek többségében protonfunkciós vegyületek elválasztását kell megoldani a gyakorlatban, a folyadékkromatográfia különböző ágaival, többek között a pH problémájával is behatóan foglalkozik. Továbbá ízelítőt adunk a számítógépes szimulációval támogatott módszerfejlesztésről és robusztusságvizsgálatról.

1. Alapösszefüggések a gyors folyadékkromatográfiában

A gyors folyadékkromatográfiás módszereknél a következő problémákkal állunk szemben: vajon a kisméretű kolonnák terhelhetősége megengedi-e az eddig hagyományosnak tekintett nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás rendszerek alkalmazását (HPLC). Értve ezalatt, hogy az adagolt minta mennyisége és térfogata ugyanolyan határok között változhat-e, mint a hagyományos HPLC-nél, a megszokott műszer-konfiguráció alkalmas-e, hogy mindazokat az előnyöket kihasználjuk, amelyeket ezek a kis térfogatú kolonnák nyújtanak? Először is nézzük meg, hogy milyen előnyöket adnak ezek a kis szemcseátmérőjű és kis térfogatú kolonnák. A szakirodalom elsődlegesen a kis szemcseátmérőt hangsúlyozza, holott a kis térfogat szorosan összefügg a gyorsasággal és a zóna maximumban mért koncentrációval is. A kisebb holtterefogat kisebb komponenshígulást jelent, amelynek eredménye a kimutatási határ csökkenése, vagy másképpen, az érzékenység növekedése. A gyorsaság megítéléséhez a következő alapösszefüggésből kell kiindulnunk:

$$t_r = t_0(1 + k) \quad (1)$$

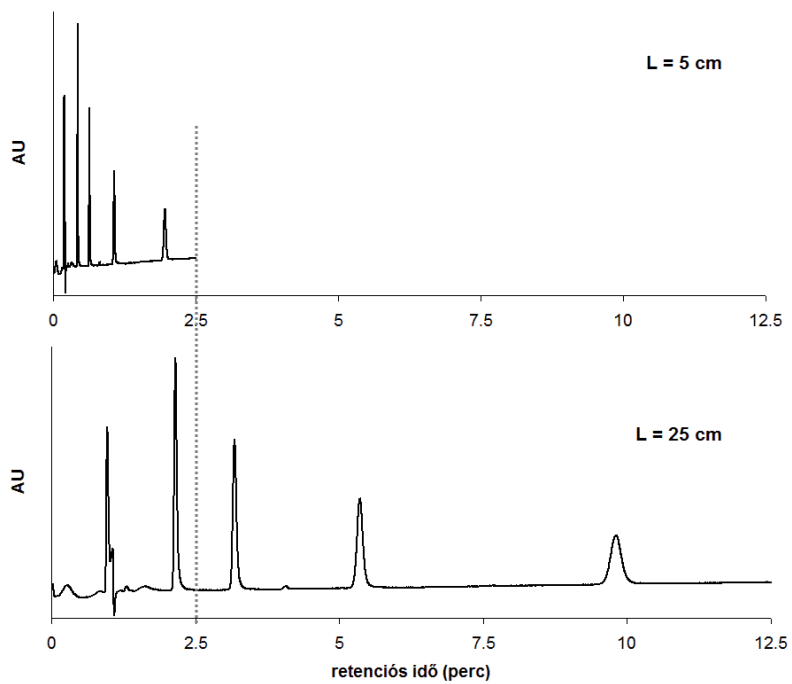
A kifejezésben a t_r a bruttó retenciós időt jelenti, a t_0 a holtidő vagy hold-up idő, a k a visszatartási tényező, vagy retenciós faktor.

$$t_0 = \frac{L}{u} \quad (2)$$

ahol az L a kolonnahossz és az u a lineáris áramlási sebesség. Az (1)-et a (2)-behelyettesítve kapjuk:

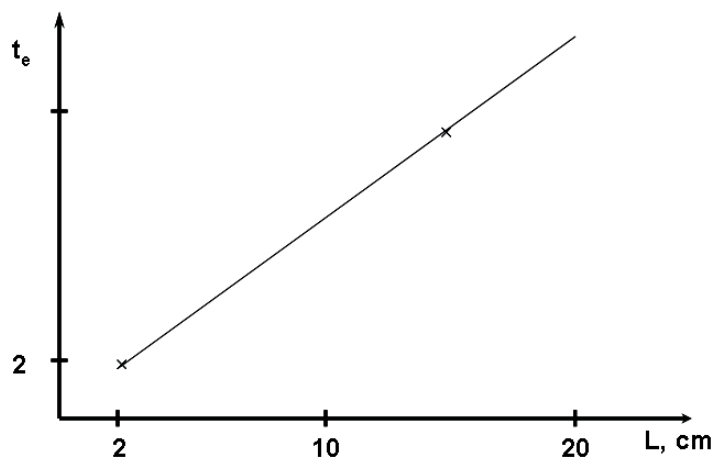
$$t_r = \frac{L}{u}(1 + k) \quad (3)$$

Az összefüggésből egyértelműen kiderül, hogy az elemzési idő csökkentésének két útja van: vagy a kolonnahossz nagymértékű csökkentése, vagy a lineáris áramlási sebesség növelése. A k érték csökkentése nem lehetséges, mert akkor az interferencia veszély - azaz, hogy két kromatográfiás csúcs együtt eluálódjon - jelentősen nő. A hagyományos kolonnahosszak 10 - 25 cm között változnak. Ezeket a kolonnákat a hagyományos HPLC készülékekben a megengedett kolonnán kívüli zónaszélesedéssel használhatjuk. Amennyiben a kolonnahosszakat 2 - 5 cm-re csökkentjük, akkor kb. ötödére csökken az elemzési idő. Ábrával szemléltetve ezt, vegyünk egy 25 cm-es és egy 5 cm-es kolonnát (1. ábra):



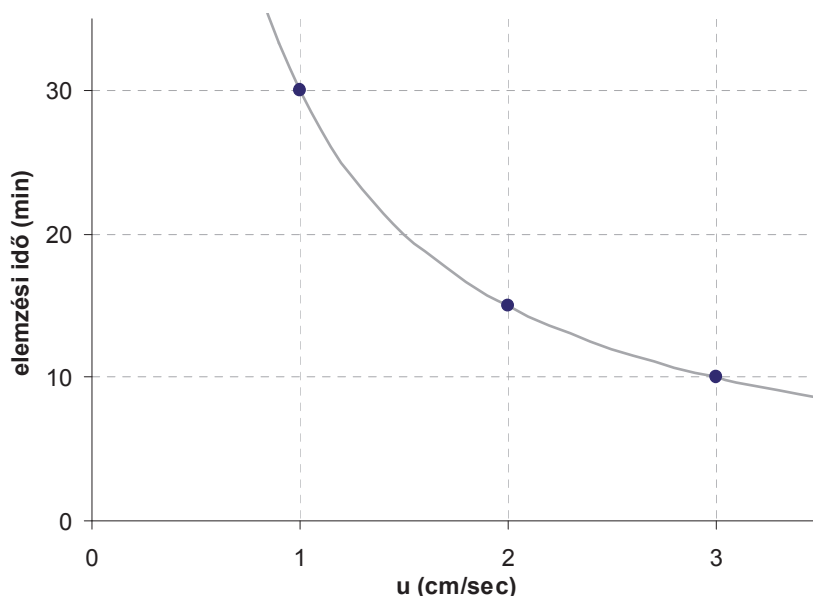
1. ábra: Az elemzési idő csökkenése a kolonnhossz csökkentésével.

Az elemzési idő és a kolonnhossz között lineáris összefüggés van (2. ábra):



2. ábra: Az elemzési idő és a kolonnhossz közötti összefüggés.

A lineáris áramlási sebesség növelése fordított arányban áll az elemzési idővel. A kétszeresére növelt lineáris áramlási sebesség felére csökkenti az elemzési időt (3. ábra).



3. ábra: A lineáris áramlási sebesség és az elemzési idő kapcsolata.

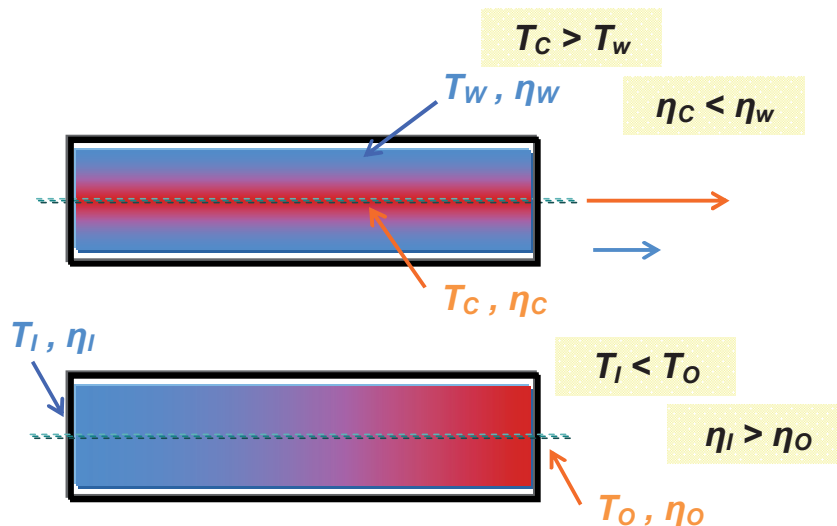
Folyadékromatográfiás körülmények között, ahol a lineáris áramlási sebességek kicsik, az áramlás lamináris jellegű. Ekkor a nyomásesést a kolonnán a Darcy törvény a következő formában írja le.

$$\Delta p = \frac{\Phi \eta L u}{d_p^2} \quad (4)$$

ahol Φ a kolonna áramlási ellenállása, η a mozgófázis viszkozitása, d_p a töltet szemcseátmérője. A különböző cégek által forgalmazott azonos átlagos szemcseátmérőjű kolonnákon a nyomásesés eltérő lehet. Ennek két oka lehetséges, vagy a szemcseátmérő eloszlás szélesebb a nagyobb nyomásesésű kolonnán, és az átlag átmérőnél kisebb szemcseátmérőjű szemcsékből több van, vagy a töltés során a szemcsék sérülnek, és a kis szemcseátmérőjű törmelék elzárja az áramlási csatornákat. Itt kiegészítjük azzal, hogy különbséget kell tenni a hagyományos HPLC-re tervezett töltetek és a nagy nyomásra tervezett töltetek között. A töltési nyomásnak, ugyanis nagyobbak kell lennie, mint a használatkor mért, vagy esetünkben a megengedett legnagyobb nyomásnak. A hagyományos HPLC készülékeknél ez a felső nyomás 400 bar, az ultra-nagynyomású készülékeknél (UHPLC) ez ma 1200 - 1400 bar. Önmagában véve a 10 nm pórusátmérőjű szilikagélek többsége bírja a 400 bar-nál nagyobb nyomásokat is. Ez igaz a vastagfalú, kis porozitásúakra, de a nem teljesen szabályos alakú, vagy az előállításnál képződött kisebb

mechanikai stabilitású töltet porlódása a töltés során nagyobb valószínűséggel bekövetkezik. A szilikagél szemcsék sérülésekor keletkező kis átmérőjű részecskék szűkítik a szemcsék közötti áramlási csatornákat, ez okozza Φ értékében a nagy eltérést. A hagyományos HPLC-re tervezett töltetnél a kolonna töltési nyomása kisebb, mint 1000 bar. Így lehetséges, hogy a gyártók a 2 μm szemcseátmérőjű tölteteket ajánlják a hagyományos készülékekhez gyors kromatográfiai módszerek alkalmazására. Ennek azonban vannak feltételei. Nyomásesés oldalról az, hogy a mozgófázisnak kis viszkozitásúnak kell lennie. Ezért kerülnek előtérbe az acetonitril tartalmú mozgófázisok, szemben a metanol tartalmúakéval. Gradienselúció alkalmazásakor nagy víz tartalmú oldószerből indulva a metanol tartalom függvényében maximumos görbével írható le a viszkozitás változása, és ezzel a nyomásesés a kolonnán. 50 tf. % víz-metanol elegynél már 1,5-ször nagyobb, mint a kiindulási mozgófázisnál. Acetonitril-víz elegynél a hatás sokkal kisebb, szobahőmérsékleten a maximális viszkozitás alig haladja meg az 1 cP-t. Így a nyomásesés még a legkedvezőtlenebb körülmények között is, kb. 50 %-kal kisebb, mint a metanol-víz elegynél.

Gyors folyadékkromatográfiában az elválasztás hatékonyságát két hatás külön-külön vagy együttesen is leronthatja. Az első hatás abból ered, hogy a nagy nyomással bevitt energia hővé alakul, amely eredményeképpen hossz és keresztirányú hőmérséklet-gradiens alakul ki a kolonnán. A 4. ábra sematikusán mutatja a hossz- és keresztirányú hőprofilokat. A keresztirányú hő gradiens elsősorban hatékonyság romlást, míg a hosszirányú gradiens retencióváltozást eredményez. Keresztirányú hő gradiens során a kolonna fal közelében alacsonyabb a hőmérséklet (T_w) mint az oszlop középvonalában (T_c). A középvonal menti magasabb hőmérséklet következménye még a gyorsabb molekuláris diffúzió, a kisebb mozgófázis viszkozitás (η_c) és a megoszlási hányadosok különbsége a középvonal és a fal között. Ezek együttes hatásaként a mérendő komponensek a középvonal mentén gyorsabban haladnak, mint a fal közelében. Az áramlási profil torzul, amelynek következtében széles kromatográfiai csúcsalakokat kapunk.

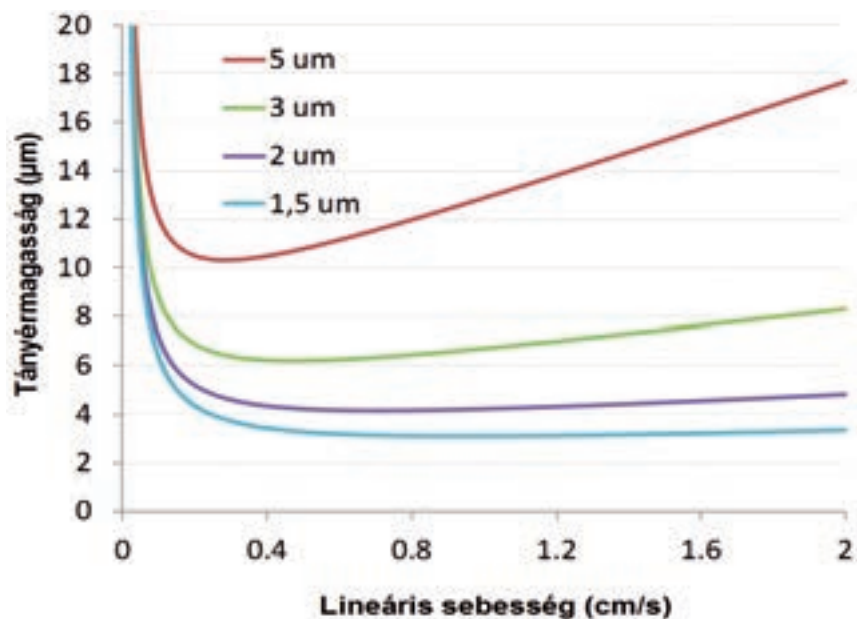


4. ábra: Az oszlopban létrejövő hossz- és keresztirányú hőgradiensek.

A hosszirányú hő gradiensek következtében pedig az oszlop végénél mindig magasabb lesz a hőmérséklet (T_o) mint a bemenetnél (T_i). Ez azt eredményezi, hogy általában az oszlop hossza mentén egyre gyorsabban haladnak a komponensek mivel egyre magasabb hőmérsékletű mozgófázisba érkeznek. Minél nagyobb a hosszirányú hő gradiens, annál jelentősebb lesz a retenció csökkenés.

A hőátadás a környezetnek a kolonna átmérőtől függ, minél kisebb a kolonnaátmérő, annál nagyobb az egységnyi kolonnatérfogatra jutó hőátadó felület. Ebből következik, hogy ekkor inkább a 2 mm vagy akörüli belső átmérőjű, vagy az alatti kolonnák alkalmazása teszi lehetővé, hogy ne alakuljanak ki olyan hőmérséklet különbségek, amelyek jelentős csúcsszélesedést vagy retencióváltozást okoznak. A belső átmérő csökkentésével viszont jelentős mértékű retenció térfogat csökkenés következik be. Ekkor előtérbe kerülnek a kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások, és az abból eredő készülék problémák. Ezekkel a későbbiekben foglalkozunk.

A második hatás abból ered, hogy a megnövelt lineáris áramlási sebességnél az anyagátadási ellenállásból és örvénydiffúzióból eredő tagok jelentősen növelik a kromatográfiás csúcsszélesedést. A van Deemter sebességi elmélet értelmében minél kisebb a szemcseátmérő, annál kisebb a póruson belüli diffúzió és örvénydiffúzió zónaszélesítő hatása. A szemcseátmérő hatását a tányérmagasságra – a lineáris áramlási sebesség függvényében – az 5. ábrán mutatjuk be.



5. ábra: Az elméleti tányérmagasság változása a lineáris áramlási sebességek függvényében, különböző szemcseátmérőjű tölteteknél.

A kromatográfiás felbontás alapösszefüggése a van Deemter sebességi elmélet alapján:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1} \quad (5)$$

ahol N az elméleti tányérszám, az α a relatív retenció vagy szelektivitás, k a visszatartási tényező.

$$N = \frac{L}{H} \quad (6)$$

A kromatográfiás felbontás egyenletébe (5) behelyettesítve kapjuk, hogy két kolonnán mért felbontások aránya a kolonnák H értékeinek a négyzetgyökével arányosak. Feltételezve, hogy a szelektivitás és a visszatartás független a nyomástól (ez nem minden esetben tehető meg) – és logaritmizálva az összefüggést – kapjuk a következő szemléletes egyenletet.

$$\log \Delta R_s = 1/2 \log \Delta H \quad (7)$$

A gyors folyadékkromatográfiás módszereknél a ΔH -t minimalizálni kell. Ezt a szemcseátmérő csökkentése teszi lehetővé. A tányéregyenletek (modellek) értelmében az anyagátadási ellenállás állófázis járuléka (C_a) a szemcseátmérő négyzetével arányos.

Horváth Csaba a következő összefüggést adta meg e tag H járulékára ($H_{C,\dot{a}}$):

$$H_{C,\dot{a}} = \frac{\Theta(k'+k + k'k)^2 d_p^2 v_e}{30D_M k'(1+k')^2(1+k)^2} \quad (8)$$

ahol Θ egy korrekciós tényező, D_M a mozgófázisban mért diffúziós állandó, k' a szemcsék közötti visszatartási tényező, v_e a redukált áramlási sebesség. A k' a k -tól abban különbözik, hogy számításakor csak a valóban a szemcsék között áramló mozgófázist vesszük figyelembe, és nem tartalmazza a pórusokban stagnálót (lásd a 3.1. fejezetben). Az összefüggés értelmében a H és a szemcseátmérő között négyzetes összefüggés van. Ismételten, ha minden körülmény azonos, akkor, ha azzal a közelítéssel élünk, hogy a kifejezésben szereplő tagok kevésbé függenek a nyomástól, a következő összefüggést kapjuk:

$$\frac{R_{S2}}{R_{S1}} = \frac{d_{p1}}{d_{p2}} \quad (9)$$

Ismételten hangsúlyozzuk, hogy a kifejezések csak közelítőleg igazak, mert nagy nyomáson a folyadékok kompresszibilitását nem hagyhatjuk figyelmen kívül. Első körben mégis azt mondhatjuk, hogy a szemcseátmérő csökkentésével fordított arányban nő az elválasztás. A Darcy törvény értelmében viszont a kolonna áramlási ellenállása a szemcseátmérő négyzetével nő, ami ismét felveti a hő gradiensek okozta zónaszélesedést. Mindezeket egybevetve megállapítható, hogy gyors kromatográfiát szemcsés töltetknél kis szemcseátmérővel lehet megvalósítani. Megoldás szempontjából több alternatíva van; egyik lehetséges megoldás, hogy a (3) összefüggés értelmében a kolonnahosszat csökkentjük és ekkor a hagyományosnak mondott HPLC (400 bar) is alkalmazható, vagy a nyomást növeljük meg ahhoz, hogy a lineáris áramlási sebességet ne kelljen csökkenteni. Az első esetben jó kompromisszumnak tűnik, ha a szemcseátmérőt 3 μm körül tartjuk, a második esetben alkalmazhatjuk az ún. szub-2 μm (2 μm alatti) szemcseátmérőjű tölteteket is.

Nézzük meg, hogy a hagyományos HPLC-nél alkalmazott gyors kolonnánál milyen korlátok vannak elméleti oldalról. A nyomásesés itt egy korlátozó tényező, ezért a kolonnahosszt kis értéken kell tartani, ami általában 5 cm. A van Deemter elmélet értelmében a H_{\min} értéke 2 d_p körüli egy jól töltött oszlopban és kromatográfiásan semleges vegyületet használva tesztanyagként. Ekkor 5 cm-en az elérhető maximális elméleti tányérszám 8300. Figyelembe véve, hogy a gyakorlati feladatok megoldásánál a különböző másodlagos kölcsönhatások és oldószerhatás valamint egyéb mátrixhatások miatt a fenti érték fele vagy harmada érhető csak el, ezért 2000–4000 elméleti tányérszámot kell az elválasztásnál figyelembe vennünk. Ez annyit jelent, hogy a vegyületek szerkezetében nagy különbségnek kell lennie, hogy a korlátozott elméleti tányérszám miatt teljesíteni tudjuk az

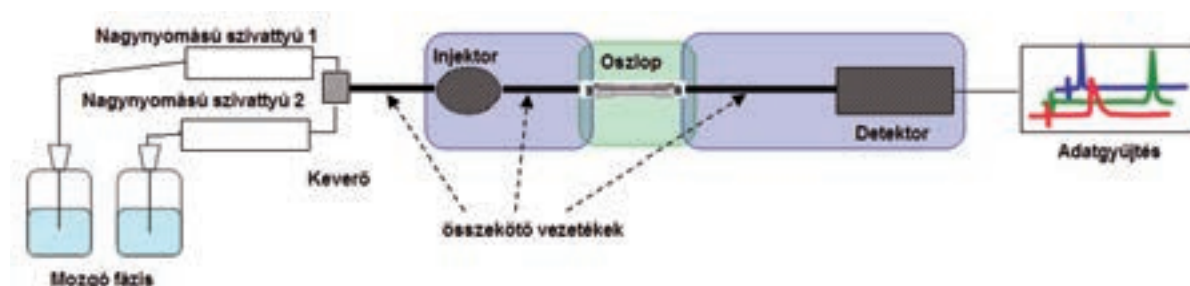
alapon történő elválasztást ($R_s > 1,5$). A szelektivitás értékét, mind az állófázis típusának, mind a mozgófázis összetételének kiválasztásával maximálni kell. Erre vezethető vissza az a szakirodalomban megfogalmazott tétel, hogy gyors folyadékkromatográfiás kolonnákat akkor használunk, ha a megkívánt elméleti tányérszám kis értékű. A másik, amely ezeket a kolonnákat jellemzi, hogy a kolonnaátmérőt a hagyományosan alkalmazott értéken tartják. Ennek oka, hogy a kolonnában megfelelő tömegű állófázisnak kell lenni, hogy az elválasztáshoz szükséges visszatartás meglegyen, és a kolonna mind térfogatilag, mind tömegre terhelhető legyen; ezzel a kérdéssel is később foglalkozunk. A nagyobb kolonnaátmérő itt megengedhető, mert a nyomásesés 400 bar alatt van és a hőgradiens kisebb mértékű.

Ajánlott és felhasznált irodalom az 1. fejezethez:

- (1) Dr. Fekete Jenő: A folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata, Edison House Kft., Dabas, 2007.
- (2) Quanyun Alan Xu ed., Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications (2013) John Wiley & Sons
- (3) Davy Guillarme, Jean-Luc Veuthey ed., UHPLC in Life Sciences (2012) Royal Society of Chemistry
- (4) Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography (2010) John Wiley & Sons

2. Korlátok a gyors folyadékkromatográfiás módszereknél

A készülékekkel szemben három fő elvárásunk lehet, a működtetési nyomás-tartomány, az oszlopon kívüli térfogatok okozta zónaszélesedés és a gradienskésés. Az első elvárás egyértelmű, minél nagyobb nyomáson tudunk dolgozni egy készülékkel annál több lehetőségünk van az elválasztás gyorsítására és a felbontás javítására. A második elvárás kicsit összetettebb, kompromisszumokból tevődik össze. A folyadékkromatográfiás rendszerben az áramlás jellege lamináris. Ebből következik, hogy az oszlopon kívül folyamatosan történik zónaszélesedés. Ezt nevezik kolonnán kívüli, térfogati zónaszélesítő hatásnak. Ez az injektált térfogattól, az adagoló-, a kolonna-, valamint a kolonnát és a detektort összekötő vezetékben történő zónaszélesedésből tevődik össze, ehhez járul még UV-detektornál a cellatérfogat hatása. Van még egy idő jellegű (térfogattól független) hatás, melyet a detektor elektronikája okoz, (időálló, mintázási sebesség). A 6. ábra sematikus mutatja, milyen hatásokból áll össze a látszólagos zónaszélesedés egy folyadékkromatográfiás rendszerben.



6. ábra: Folyadékkromatográfiás rendszer sematikus vázlata.

2.1. Oszlopon kívüli zónaszélesítő hatás

A következőkben az oszlopon kívüli térfogatok jelentőségét tárgyaljuk. A látszólagos hatékonyság (mért tényérszámok vagy felbontási érték) függ az alkalmazott készüléktől. Természetesen a mérce mindig az, hogy a kolonna mire volna képes, ha egy olyan készülékben használnánk, ami nem járul hozzá a zónaszélesedéshez. Ehhez viszonyítjuk, hogy mit kapunk a kromatogramon. Következésképp egy gyors elválasztás hatékonysága tehát nemcsak a kolonnán múlik, hanem a készüléken is. Elvárás a készülékkel szemben, hogy minél kevésbé csökkentse a kolonna hatékonyságát. Ezt az ún. oszlopon kívüli, az elválasztás szemponjából aktív térfogatok csökkentésével tehetjük meg. Az oszlopon kívüli káros – hatékonyság rontó – hatások annál jelentősebbek, minél kisebb a kolonna méret (kis

belső átmérő, kis hossz) és minél hatékonyabb a kolonna. Ezért a kromatogramon mért zónaszélesedés (variancia) tehát a kolonnán fellépő és azon kívüli hatásokból tevődik össze:

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{ec}}^2 + \sigma_{\text{col}}^2 \quad (10)$$

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

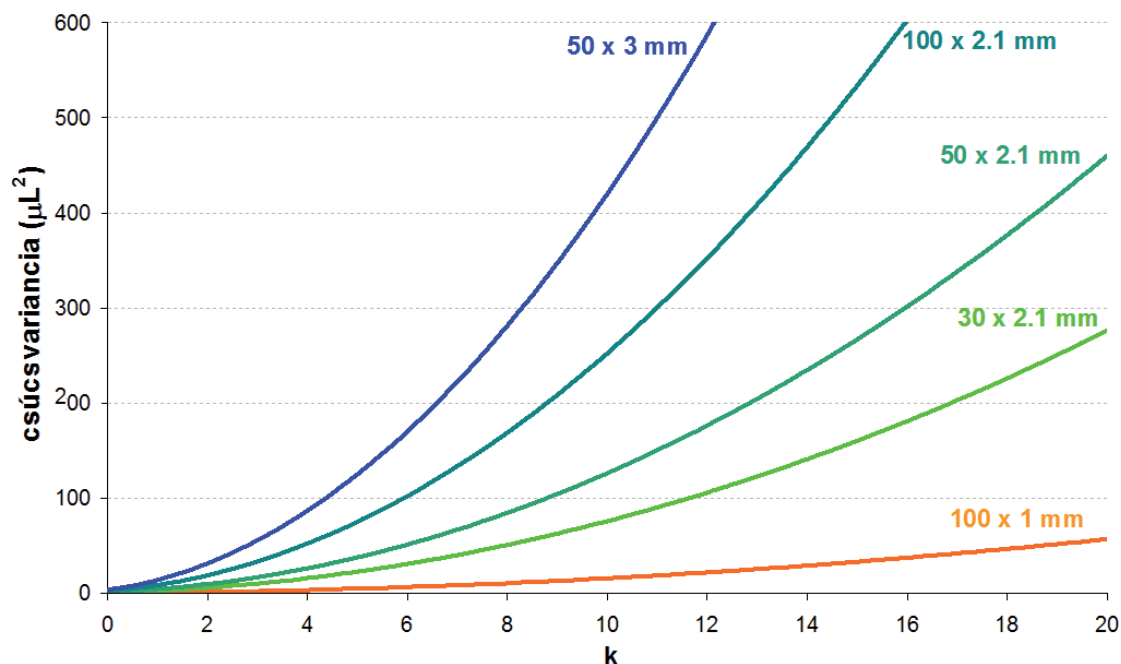
Megállapodás szerint az oszlopon kívüli zónaszélesedés összege nem lehet nagyobb, mint a kolonnán mért csúcscsészesedés tizede.

$$\sigma_{\text{ec}}^2 \leq 0,1 \cdot \sigma_{\text{col}}^2 \quad (11)$$

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

$$\sigma_{\text{col}}^2 = \frac{V_r^2}{N_{\text{col}}} = \frac{V_0^2}{N_{\text{col}}} (1+k)^2 \quad (12)$$

ahol V_r a retenciós térfogat, N_{col} az elméleti tányérszám és V_0 az oszlop holtterfogata. Tehát minél kisebb a kolonna térfogata és a komponens visszatartása, illetve minél hatékonyabb a kolonna, annál kisebb az eluálódó csúcs varianciája. A 7. ábrán, 2 μm -nél kisebb szemcsékkel töltött, kis térfogatú kolonnák csúcsvarianciáját szemléltetjük a visszatartási tényező függvényében.



7. ábra: Oszlopon létrejövő csúcsvariancia (2 μm-nél kisebb tölteten) a retenciós tényező függvényében.

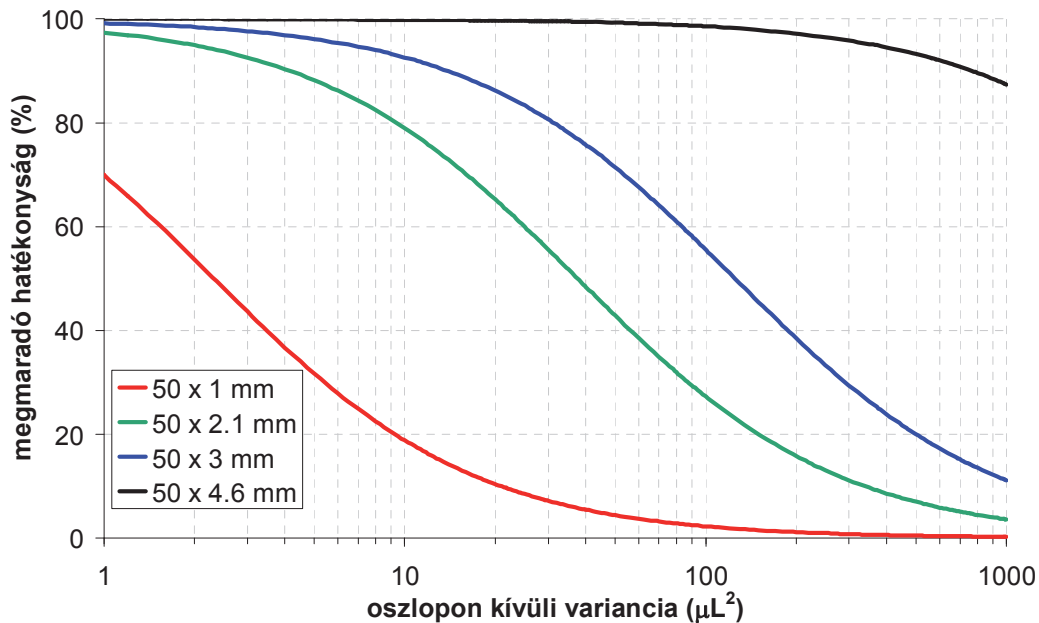
Tehát minél kisebb a kolonna térfogat és minél jobb a kolonna hatékonysága, úgy válik egyre kritikusabbá az oszlopon kívüli csúcsszélesítő hatás. Bevezethetjük a látszólagos tányérszám (N_{app}) fogalmát, ami felírható a kolonna által teljesített tányérszám (N_{col}) és az oszlopon létrejövő, illetve azon kívüli varianciák viszonyával:

$$N_{app} = N_{col} \frac{1}{1 + \frac{\sigma_{ec}^2}{\sigma_{col}^2 + \sigma_{ec}^2}} \quad (13)$$

Az ún. megmaradó kolonna hatékonyság (E_r) egyszerűen felírható a következő módon:

$$E_r = 100 \cdot \frac{\sigma_{col}^2}{\sigma_{col}^2 + \sigma_{ec}^2} \approx \frac{V_0}{V_{ec}} \quad (14)$$

A következő példában különböző átmérőjű (4,6, 3, 2,1 és 1 mm) 5 cm-es kolonnák (1,7 μm szemcseátmérő) megmaradó hatékonyságát mutatjuk be az oszlopon kívüli variancia függvényében ($k=5$ visszatartást feltételezve).

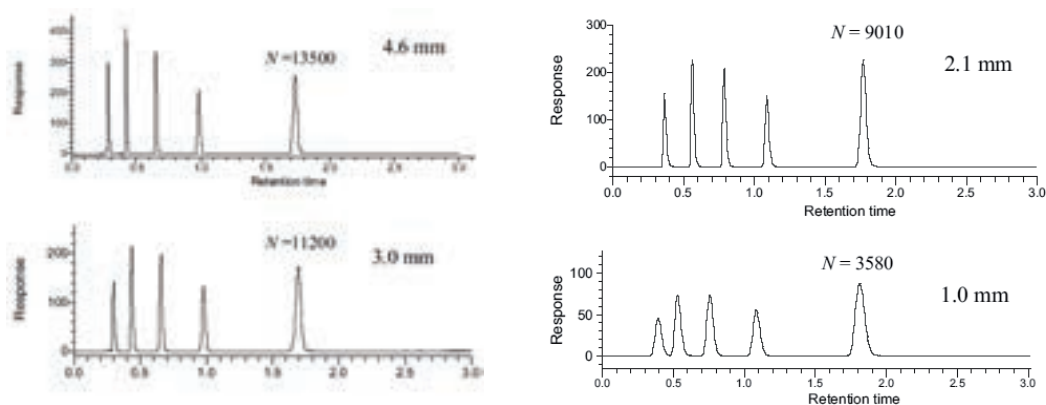


8. ábra: Megmaradó hatékonyság az oszlopon kívüli variancia függvényében 50 x 4,6, 50 x 3, 50 x 2,1 és 50 x 1 mm kolonna dimenziókra (1,7 μm szemcseátmérő).

A 8. ábrán jól látszik, hogy a 4,6 mm átmérőjű kolonnákat használhatjuk bármilyen készülékben anélkül, hogy a látszólagos hatékonyság csökkenne. Hagyományos HPLC készülékek oszlopon kívüli csúcsvarianciája általában $\sigma_{ec}^2 = 40 - 200 \mu\text{L}^2$ közé esik, míg az UHPLC készülékek általában $\sigma_{ec}^2 = 4 - 9 \mu\text{L}^2$ -el járulnak hozzá a kromatográfiai csúcsszélesedéséhez. Azok a készülékek, amelyeket a gyártók mind a hagyományos HPLC-s, mind pedig az UHPLC-s elválasztásokhoz javasolnak (ún. hibrid készülékek) általában $\sigma_{ec}^2 = 10 - 40 \mu\text{L}^2$ -tel járulnak hozzá a csúcsszélesedéséhez. A 2011-ben megjelent legújabb fejlesztésű UHPLC készülék (Acquity UPLC I-Class) oszlopon kívüli varianciája, a mérés körülményeitől függően $\sigma_{ec}^2 = 0,5 - 4 \mu\text{L}^2$ közé esik. Tehát a legkorszerűbb UHPLC készülékeket alkalmazva is jelentős hatékonyságvesztés következhet be elsősorban 1 mm és 2,1 mm átmérőjű kolonnák esetén, így nem tudjuk kihasználni a jelenlegi kolonnatechnológia valódi lehetőségeit. Jó kompromisszumnak tűnik a 3 mm-es átmérőjű kolonnák használata, ekkor az analízisidő rovására tudjuk csak a hatékonyságot fokozni.

Nemrég Wu és Bradley mutatta be az 1,8 μm-es szemcsékkel töltött 5 cm hosszú kolonnák látszólagos hatékonyság romlását. Tanulmányukban 1, 2,1, 3, és 4,6 mm átmérőjű kolonnákat működtettek egy Waters Acquity UPLC készüléken. A készülék oszlopon kívüli térfogatát 11,4 μL-nek mérték. A 9. ábra mutatja a mért tényérszámokat a különböző átmérőjű kolonnák esetén. A kolonnán kívül zónaszélesedés miatt drasztikus hatékonyság csökkenést figyeltek meg a 2,1 és 1 mm átmérőjű kolonnáknál. Természetesen ilyenkor felvetődik a kérdés, hogy az eltérő belső átmérőjű kolonnákat azonos hatékonysággal tudják-e megtölteni? Egy bizonyos, a 4,6 mm-es kolonnánál mért kinetikai hatékonyság, elméleti

tányérszám több mint 1/3-ra csökkent. Meg kell jegyeznünk, hogy a nagy nyomáson végzett elválasztásoknál a kis belső átmérő használata szükséges. Ekkor ugyanis az egységnyi térfogatra nagyobb kolonnafelület jut, és a nyomásesés indukálta hő könnyebben elvezetődik. Ez az oka, hogy az UHPLC technikában 2,1 mm-es kolonnákat használjuk a leggyakrabban.



9.ábra: Látszólagos hatékonyságcsökkenés a kolonna átmérő csökkentésével (5 cm-es kolonnák, 1,8 μm szemcseátmérő, UPLC készülék).

A „standard” konfigurációjú készülékek okozta zónaszélesedés csökkenthető, ha csökkentjük az összekötő vezetékek átmérőjét és hosszát, illetve ha a beépített „standard” detektor cellát ún. mikro vagy szemi-mikro cellára cseréljük. Egy Acquity UPLC rendszer oszlopon kívüli varianciája 2 - 4 μL^2 -re csökkenthető (eredetileg 5 - 8 μL^2), ha az összekötő 0,127 mm átmérőjű vezetékeket 0,0635 mm átmérőjűre cseréljük. Guiochon és mtsai. bemutatták, hogy egy konvencionális Agilent 1100-as készülék varianciája akár 5 - 10 μL^2 -re csökkenthető (eredetileg 80 - 100 μL^2), ha az eredeti konfigurációban alkalmazott összekötő vezetékeket, injektor tű-talp (needle seat) kapillárist és detektor cella térfogatát optimalizáljuk. Omamogho és mtsai. egy Agilent 1200 rendszer variációját csökkentették sikeresen 3 - 4 μL^2 -re úgy, hogy a 0,17 mm átmérőjű összekötő vezetékeket 0,11 mm-re cserélték, illetve az eredetileg 6 μL -es detektor cella helyett 1,7 μL -es cellát alkalmaztak.

További lehetőség lehet az oszlop hatékonyságának minél jobb kihasználására, ha optimalizáljuk az injektálás módját. A nemrég bevezetett ún. „hatékonyság optimalizáló injektálási szekvencia” (POISe), akár 10 – 20 %-ban növelheti a látszólagos hatékonyságot kis visszatartású komponensekre ($k < 3$). Ezzel a technikával az injektor rendszer hatékonyság rontó hatása küszöbölhető ki úgy, hogy meghatározott mennyiségű gyenge oldószert injektálunk a mintával együtt.

Összességében megállapíthatjuk, hogy jelenleg a kolonnatechnológia előre futott a készülékfejlesztések mellett, és elsősorban új, még kisebb oszlopon kívüli térfogatokkal rendelkező készülékek fejlesztése a cél annak érdekében, hogy a meglévő kolonnákat a 10%-os hatékonyságvesztés alatt tudjuk használni.

2.2. Gradiens késési térfogat

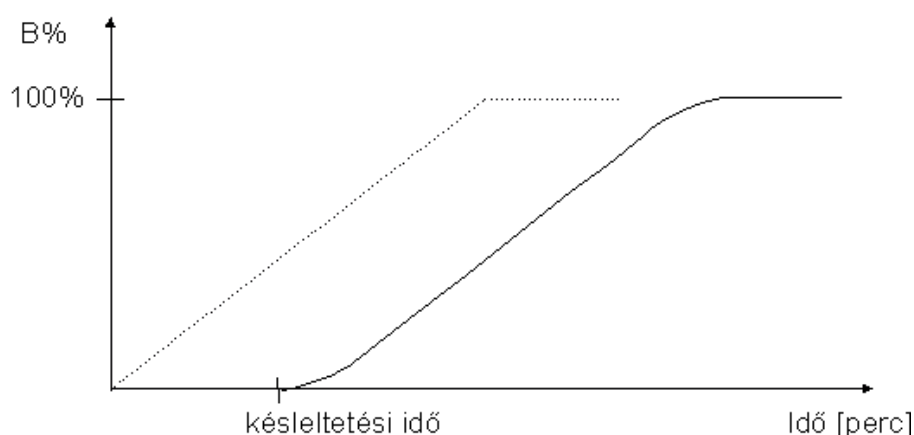
Egy másik kérdéskör, ami szorosan kapcsolódik a készülék térfogathoz, az ún. gradiens késési vagy gradiens késleltetési idő/térfogat.

Napjainkban a legtöbb folyadékkromatográfiás elválasztást (mind ipari, mind akadémiai laboratóriumokban) gradiens elúciós módban végzik. A mozgófázisban az erősebb „B” oldószer (acetonitril vagy metanol) koncentrációját növeljük az idő függvényében, ezáltal csökken a nagyobb megoszlási hányadossal rendelkező komponensek retenciója.

Gradiens elválasztásoknál döntő jelentősége lehet a készülék gradiens-késési térfogatának (dwell volume, V_d). Ennek megítélésakor különbséget kell tennünk a kis és nagy nyomású gradiens készülékek között. A megfelelő áramlási stabilitás biztosítására, általában nagy nyomású gradiens rendszert alkalmazunk. Ennek lényege, hogy az erősebb és gyengébb oldószert (mozgófázis összetevőket) a nagy nyomású szivattyú után, az adagoló előtt keverjük össze. Ahány oldószert keverünk össze, annyi szállítófej kell. Ekkor a késleltetési térfogat a keverőből, mintaadagoló hurokból (sample loop) és az oszlop elejéhez vezető összekötő kapillárisból tevődik össze. A készüléknek ez a térfogata azt a „plusz időt” adja a rendszerhez, amíg a nagy nyomású szivattyún beállított mozgófázis összetétel a kolonna elején megjelenik. A kis nyomású gradiens készülékeknél a mozgófázis összekeverése a nagy nyomású szivattyú előtt történik. Ebben az esetben a nagy nyomású szivattyú térfogata is beleszámít a késleltetési térfogatba. Ez a gradiens késési térfogat igen különböző lehet, attól függően, hogy ún. kis nyomású- vagy nagy nyomású keverőrendszerrel dolgozik a készülékünk. Konvencionális HPLC készülékeknél általában 0,5 és 2 mL között változik a gradiens-késési térfogat (V_d) a nagy nyomású keverő rendszerek esetén, illetve $V_d = 1 - 5$ mL a kis nyomásúakra. A korszerű UHPLC készülékek tipikusan 0,08 – 0,5 mL gradiens késési térfogattal rendelkeznek. Készülékünk gradiens késési térfogatát ismerni kell, elsősorban módszerek átvételekor és átadásakor (transzfer) lehet nagy jelentősége.

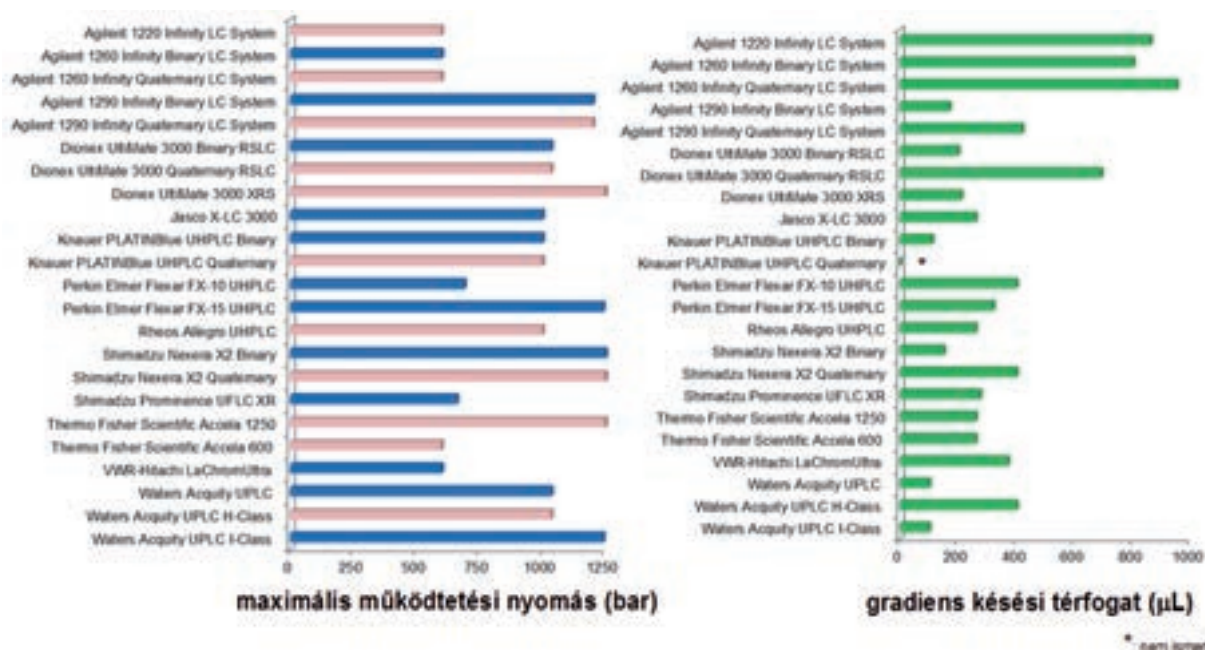
A gradiens késési térfogat egyszerűen meghatározható, több módszer is elterjedten alkalmazott. Mindegyik azon alapszik, hogy az egyik mozgófázis nem UV aktív (pl. víz), a másik mozgófázisba pedig valamilyen kromofor komponenst keverünk kis mennyiségben (pl. acetone). Az oszlopot eltávolítjuk, és egyszerűen csak összekötjük a kolonnába és kolonnából vezető csöveket. Beállítunk egy gradiens programot és a mért UV jelet összehasonlítjuk a beállított gradiens programmal. A kromofort tartalmazó „B” eluens jele nyilván késik a beállított programhoz képest. Ezt az időbeli késést mérjük, majd az alkalmazott térfogatáram ismeretében könnyen számolható a késési térfogat. Újabban szoktak egy ismert térfogatú kapillárist is hozzáadni a rendszerhez, ami megfelelő ellenállást (nyomást) biztosít a rendszernek és ezzel jobban hasonlít valós elválasztásokra, mintha csak összekötnénk a

kolonnába be és kolonnából kimenő összekötő vezetékeket. A 10. ábrán egy HPLC rendszer gradiens késését mutatjuk be.



10. ábra: A gradiens késés ábrázolása. Az Y tengelyen az erősebb „B” oldószer mennyisége az „A”oldószerhez viszonyítva.

A 11. ábra a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható UHPLC készülékek maximális működtetési nyomását és gradiens késleltetési térfogatát mutatja be.



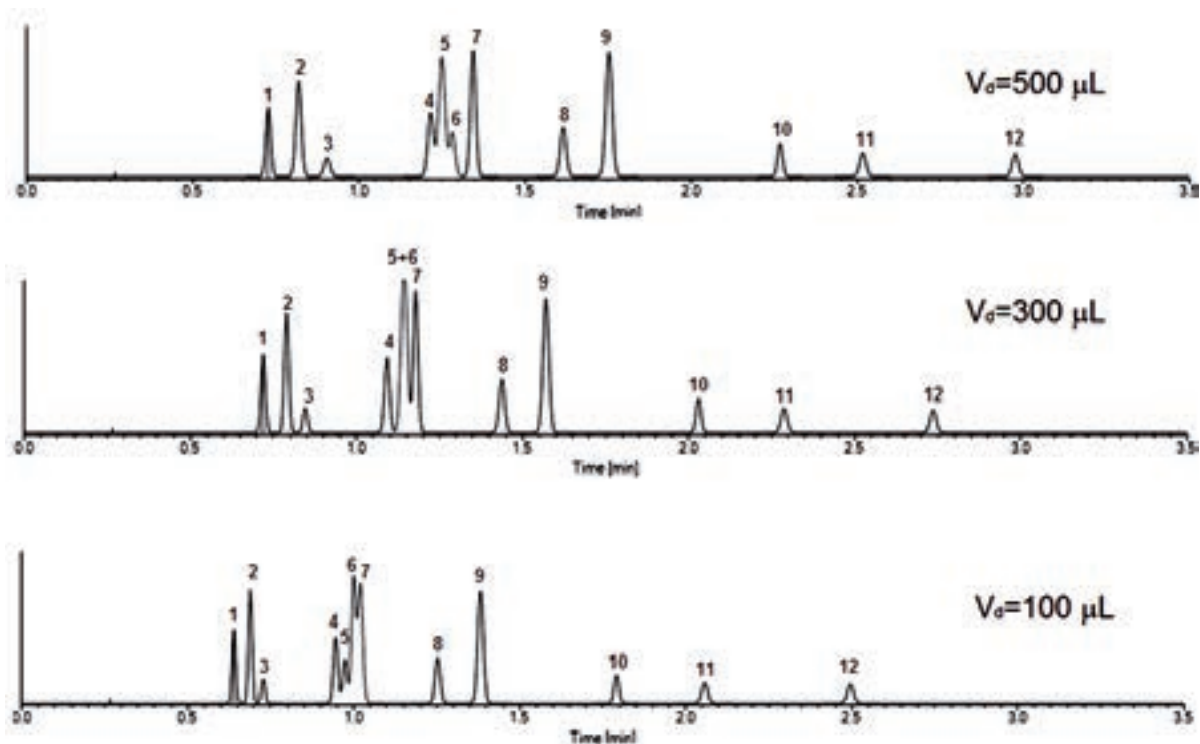
11.ábra: Kereskedelmi forgalomban kapható UHPLC készülékek maximális működtetési nyomása és gradiens késleltetési térfogata.

A 11. ábrán jól látszik, hogy a jelenlegi készülékek gradiens késleltetése nagyon eltérő. Ez elsősorban módszerek átadásakor okozhat gondot. A késleltetési idő/térfogat arányosan eltolja retenciós időket, mert a kolonna elejét ennyivel később éri el a beállított mozgófázis.

Ez a térfogat értelemszerűen nem okoz zónaszélesedést, de az elválasztásnál alapvető, hogy az elemzés leállítása előtt a kívánt erősségű oldószert elérjük. Az elemzési időt tehát ezzel az idővel meg kell hosszabbítani. Gyakori a gyógyszeranalitikában, hogy régebbi, meglevő konvencionális HPLC módszereket transzferálunk UHPLC módszerré vagy éppen az ellenkezője, hogy az UHPLC módszereket kell hagyományos oszlopra/készülékre átdolgozni, mert az átvevő laboratóriumban csak az áll rendelkezésre. Vegyünk egy egyszerű példát, UHPLC-ben tipikusan 0,5 mL/perc térfogatárammal dolgozunk. Ekkor, ha a készülékünk gradiens késési térfogata 0,5 mL, akkor éppen 1 percet „késik” a gradiens program. Viszont ha $V_d = 0,1$ mL akkor csak 0,2 perc késésünk lesz. A két készüléken mért komponensek retenciós ideje között tehát 0,8 perc különbség várható. A kevésbé visszatartott komponensek esetén különösen kritikus lehet a gradiens késés változása. Sokszor a felbontás és néha még a szelektivitás is változhat. 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. Módszertranszferálásnál pedig a szokásos ún. „geometriai transzfer szabályok” mellett a gradiens késési idő és oszlop holt idő arányát (t_d/t_0) kell állandó értéken tartani.

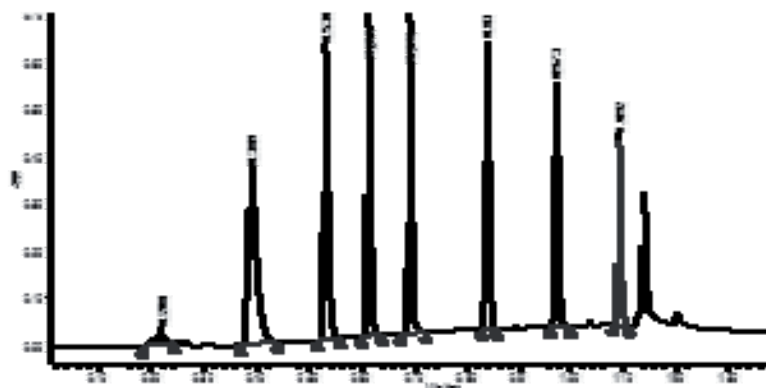
Nyilván a gradiens késést érdemes csökkenteni amennyire csak lehet, de a végtelen csökkentésnek határt szab az a tény, hogy ha nem áll rendelkezésre a mozgófázisok keveredéséhez megfelelő térfogat/idő akkor a nem tökéletes keveredés miatt a módszer reprodukálhatósága nem lesz megfelelő. Ez nagy térfogatáramoknál különösen kritikus lehet, pulzálás is felléphet.

A 12. ábrán szemléltetjük a gradiens késési térfogat hatását. A példában 500, 300 és 100 μ L-es gradiens késéssel rendelkező készülékeken mért kromatogramokat mutatjuk be. Látható, hogy a kevésbé visszatartott komponensek esetén (1 - 7) a csúcsfelbontás nagyban függ a készülék késési térfogatától.



12. ábra: Készülék gradiens-késési térfogatának hatása gyors kromatográfiás elválasztásokra. Mérési körülmények: oszlop: Halo C18, 100 × 2,1 mm, 2,7 µm, mozgófázis: víz-acetonitril gradiens (15-90 % / 4 perc), térfogatáram: 0,8 mL/perc, komponensek: 1, ftálsav; 2, vanília sav; 3, izo vanília sav; 4, antranil sav; 5, vanillin; 6 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehid; 7, ferul sav; 8, orto-vanillin; 9, benzooesav; 10, trans-2,4-dimetoxifahéjsav; 11, metilbenzoát; 12, etilbenzoát.

Az ultragyors gradienseknek, tehát a késleltetési idő határt szab. Az első komponens visszatartásának nagyobbak kell lennie, mint a holtidő kétszerese ($k > 1$), ehhez járul hozzá a késleltetési idő. Ha ez a feltétel nem teljesül, akkor két hatás is feléphet a gyors kromatográfiás elválasztásoknál alkalmazott kisméretű kolonnáknál. Az egyik, hogy nem érvényesül a kolonna elején a gradiens elúció zónafókuszáló hatása, a másik, hogy az első komponens retenciója mérésről mérésre változhat. Ezt mutatjuk be 13. ábrán.



13. ábra: A kis retenciójú komponensnél a gradiens elúció jellemző zónaszűkítő hatása nem érvényesül.

A gyors gradiens elúciónál is felmerül az a kérdés, amely a hagyományos rendszereknél is, vajon a két gradiens mérés között teljes egyensúlynak kell lennie, vagy elegendő minden esetben ugyanabból a helyzetből indítani a méréseket? A gradiens elúciós folyamatot a következő szakaszokra bonthatjuk. Az első szakasz a mérési ciklus indítása előtti szakasz. Ekkor a két fázis között az egyensúly valószínűleg beáll. A második szakaszon növeljük a mozgófázis elúciós erősségét, a harmadik szakaszon visszaállunk az eredeti összetételre, míg a negyedik szakasz az újabb ciklus előtti várakozó szakasz. Az első ciklust a nulladik mérésnek kell megadni, mert ekkor kell ellenőrizni a mozgófázis tisztaságát. A negyedik, várakozó szakasznak legalább akkorának kell lennie, amekkora a késletetési idő. A kolonna elején akkor és csak akkor van az „A” oldószer, ha a nyomás az emelkedés után állandó értékű lesz. Ez az alapja a gradiens mérés ismételtetésének. További kérdés, hogy ezen a szakaszon egyensúly legyen a két fázis között vagy elegendő a továbbiakban minden esetben azonos állapotból indulnunk. Ha a negyedik szakasz hossza állandó, akkor a gradiens ismételtető. Kézi adagolással ez a feltétel nem teljesíthető, így ezen a szakaszon biztosítani kell az egyensúly beállítását. Automata mintaadagoló alkalmazásakor a feltétel teljesíthető, ezért elméletileg nem kell a viszonylag hosszú egyensúlyi idő beállítását megvárunk. Amennyiben a mérést megszakítjuk, akkor a következő mérésort újból a mozgófázis tisztaságának ellenőrzésével kell kezdenünk. A gradiens mérés elemzési idejét tehát a késletetési idő jelentősen befolyásolja. Az elemzési idő növekedése a térfogat-áramlási sebesség függvénye. Ezt viszont a kolonna hossza és a szemcseátmérő (permeabilitás) szabja meg. A készülékek 400 és 1200 - 1400 bar-os felső nyomáshatára a következő korlátozó tényező. 400 bar felső nyomáshatámál 10 cm hosszú kolonnát alkalmazva 0,1 - 0,2 mL/perc, 1400 bar-nál 0,4 - 0,5 mL lesz a gyakorlatban kihasználható térfogat-áramlási sebesség. Ekkor az elemzési idő tipikusan 1 - 2 vagy 0,2 - 0,4 perccel lesz hosszabb.

2.3. Mintaadagolás

Az eddigiek alapján egyértelműen megállapítható, hogy a 2 µm alatti kis belső átmérőjű és rövid kolonnákhoz a hagyományos HPLC rendszer nem vagy csak jelentős hatékonyság veszteséggel alkalmazható. A 3 és 5 µm-es töltetű rövid kolonnák alkalmazása a hagyományos HPLC rendszerekben bizonyos kompromisszumokkal, és szabályok betartásával jár együtt. A továbbiakban ezt részletezzük.

Első szabály a mintaadagolással kapcsolatos. Hagyományos kolonnáknál általánosan az adagolásnál használt oldószer összetételnek meg kell egyeznie vagy gyengébbnek kell lennie a mozgófázis erősségénél, azzal a megszorítással, hogy a molekuláris formának azonosnak kell lennie a mintában és a mozgófázisban. Ekkor 5 - 20 µl adagolása nem okoz

térfogati túlterhelést. A 3 és 5 μm szemcseátmérőjű töltetknél, amelyek kis hosszúságúak, de 4 mm körüli átmérőjűek, 5 μl jelenti az adagolás felső határát, vagy a minta oldószerének gyengébbnek kell lennie a mozgófázis eluenserősségénél és a molekuláris formának azonosnak kell lennie a mintában és a mozgófázisban. A másik megközelítés, hogy az adagolás olyan, hogy a kolonna elején csúcskompresszió történik. Folyadékkromatográfiás gyakorlatban ez annyit jelent, hogy akkor is gradienselúciót alkalmazunk, mikor nem lép fel az általános elúciós probléma. Azaz a meghatározandó vegyületek szerkezete nem tér el jelentősen és az elválasztás megoldható lenne izokratikus körülmények között. Az adagolási zóna szűkítésének ennél a módjánál azok az alapjelenségek játszódnak le, mint amelyek a gradienselúciónál, ha az jól tervezett. A kiindulási mozgófázis összetételének olyan gyengének kell lennie, hogy a mintában a leggyengébben visszatartott komponensre is teljesülnie kell a $k > 10$ feltételnek.

A visszatartási tényezőt felírhatjuk a következő módon:

$$k = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{n_s V_s}{n_m V_m} \quad (15)$$

ahol V_s és a V_m az álló és a mozgófázis térfogata, K a megoszlási hányados, n_s és n_m az álló- és a mozgófázisban mért mólok száma.

Ha $k > 10$ akkor a komponensek döntő részben az állófázisban tartózkodnak (legalább 11-szer több időt töltenek az állófázisban, mint a mozgófázisban). Az összes komponens vándorlási sebessége lecsökken, azaz a mintaadagolás során a kolonna eleje koncentrálna azokat. A vándorlási sebesség csökkenését jól mutatja a következő egyenlet:

$$u_x = \frac{u}{(1+k)} \quad (16)$$

ahol az u_x a komponensvándorlási sebessége, u a mozgófázis lineáris sebessége.

Problémát okozhat az oldhatóság, ha a minta komponenseinek nagyon eltérő az apolaritása vagy polaritása. Ekkor a jobban visszatartott komponensek a gyenge eluenserősségű mozgófázisban kevésbé oldódnak. Azt azonban figyelembe kell venni, hogy a közel egyforma tulajdonságú vegyületeknél gradiens elúcióval a szelektivitás csökken, ezért a vegyületek tulajdonságaiban nagyobb különbségnek kell lenni. Fordított fázisú folyadékkromatográfia nyelvére lefordítva a vegyületek oktanol/víz megoszlási hányadosában (**LogP**) az általános esetre megadott 0,1-nél nagyobbak kell lenni a különbségnek.

2.4. Készülék jellemzők gyors és hagyományos kromatográfiához

Ahhoz, hogy egyértelműbb legyen az eligazodás a konvencionális HPLC és UHPLC között, az 1. táblázatban megadjuk az egyes módszereknél alkalmazott készülék-jellemző adatokat, illetve a tipikusan alkalmazott oszlop dimenziókat. Megjegyezzük, hogy néhány készülégyártó cég javasol olyan konfigurációkat is amelyeket UHPLC és HPLC mérésekre egyaránt alkalmasnak tart. Ezeket az irodalom „hibrid” készülékként nevezi. Ezek jellemzői valahol a két készülék típus között helyezkednek el, ezért csak korlátozott mértékben alkalmasak az egyik, illetve másik módban történő mérésekre.

A fentiek egyértelműen jelzik, hogy az eltérő kategóriákba tartozó folyadékkromatográfiás módszerek eltérő műszerezettséget követelnek meg. Az átjárás az egyes módszerek között korlátozott. A sokszor csak méretnövelésként számon tartott módszer csak akkor alkalmazható, ha a kolonnán kívüli zónaszélesedés, a kolonnán létrejövő 10 %-a alatt tartható.

1. táblázat: Az UHPLC és HPLC rendszerek/mérések főbb jellemző adatai.

	UHPLC	HPLC
Nyomás teljesítmény (bar)	1000 - 1400	400
Kolonna töltet átmérő (µm)	1 - 3	3 - 10
Kolonna hossz (cm)	3 - 10	10 - 25
Kolonna belső átmérő (mm)	1 - 3	3 - 8
Alkalmazott térfogatáram tartomány (mL/perc)	0,02 - 2	0,1 - 10
Injektált térfogat (µL)	0,1 - 5	5 - 200
UV-VIS detektor cella térfogat (µL)	0,5 - 2	5 - 10
Detektor mintavételi frekvencia (Hz)	20 - 100	5 - 20
Gradiens késési térfogat (mL)	0,1 - 0,7	0,5 - 3
Oszlopon kívüli variancia (µL ²)	1 - 25	40 - 200

Ajánlott és felhasznált irodalom a 2. fejezethez:

- (1) S. Fekete, J. Fekete, The impact of extra-column band broadening on the chromatographic efficiency of 5 cm long narrow-bore very efficient columns, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5286–5291.
- (2) N. Wu, A.C. Bradley, Effect of column dimension on observed column efficiency in very high pressure liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1261 (2012) 113-120.
- (3) F. Gritti, G. Guiochon, Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3000–3012.
- (4) S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87 (2014) 105-119.

3. Gyors elválasztások, fejlesztések a kolonnatechnológiában

3.1. Az oszlopon létrejövő zónaszélesedés

Elsők között Halász és mtsai. mutatták meg, hogy elméletileg az elválasztás annál gyorsabb lehet, minél kisebb a töltet szemcseátmérője. Arra is felhívták a figyelmet, hogy az elválasztás várható idejének a készülékek maximális működtetési nyomása szab határt. A szemcseátmérő és kolonna dimenziók csökkentése folyamatos fejlesztési irány maradt a folyadékromatográfiában. A következő fejezetekben röviden összefoglaljuk a jelenlegi fejlesztések lehetőségeit, határait és gyakorlati példákon keresztül bemutatjuk a lehetséges alkalmazásokat.

Van Deemter és kollégái 1956-ban mutatták meg, hogy az elméleti tányérmagasság (**H** vagy sokszor hívják **HETP**-nek) a lineáris sebesség (**u**) függvényében egy minimumos görbével írható le. Az általuk bevezetett függvény általános alakja a következő volt:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (17)$$

ahol **A** az örvénydiffúzióra, **B** a hosszirányú diffúzióra és **C** az anyagátadási ellenállásra jellemző együtthatók. Ezt az alapegyenletet azóta sokan továbbfejlesztették (Giddings, Knox, Golay, Hubert, Horváth, Myabe, Guiochon...), különösen az **A** és **C** tag fizikai értelmezése az, amelyben az egyes megközelítések eltérnek.

A kromatográfiás ún. tányérelmélet alapján az elméleti tányérmagasság az a kolonna-szakasz, ahol a mozgó- és állófázis között az egyensúlyi koncentráció kialakul.

Definícószerűen:

$$N = \frac{L}{H} \quad (18)$$

ahol **L** a kolonna hossza.

A redukált dimenziómentes paraméterek bevezetésével különböző szemcseátmérőjű töltetek hatékonysága (minősége) hasonlítható össze, ezért gyakorlati szempontból előnyösebb a redukált tányérmagasság (**h**) és redukált lineáris sebesség (**v**) használata. A redukált tányérmagasság és sebesség a következő képpen írható fel:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (19)$$

$$v = \frac{ud_p}{D_M} \quad (20)$$

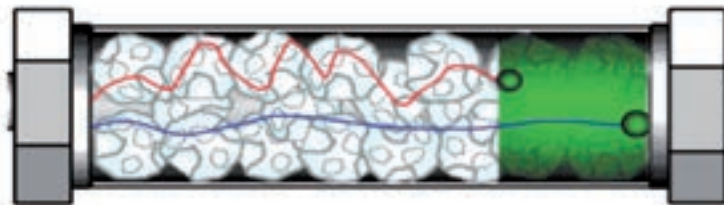
Mivel az egyes csúcsszélesítő hatások egymástól függetlenek és a kromatográfiás csúcsokat normális eloszlással közelítjük, akkor az eredő redukált tényérmagasság általánosan a következő tagokból tevődik össze:

$$h = h_A + h_B + h_{C,\dot{a}} + h_{C,m} + h_{h\ddot{o}} \quad (21)$$

ahol h_A az örvénydiffúzióra, h_B a hosszirányú diffúzióra, $h_{C,\dot{a}}$ az anyagátadási ellenállás állófázis járulékára, $h_{C,m}$ az anyagátadási ellenállás mozgófázis járulékára és $h_{h\ddot{o}}$ pedig a hőgradiensekre vonatkozó tényérmagasság járulékok.

Örvénydiffúziós tag (h_A)

Az eltérő áramlási csatornák következtében jelentkező kromatográfiás csúcsszélesítő hatás. Elsősorban a kolonna töltés minőségétől (rendezettségétől), szemcseátmérőtől, a komponens diffúziós állandójától és a mozgófázis sebességétől függ. Az örvénydiffúzió hatását sokan modellezték (Giddings, Knox, Horváth, Tallarek, Gritti és Guiochon, Desmet), jelenleg is vita tárgya. A 14. ábra sematikus mutatja az örvénydiffúzió jelenségét.



14. ábra: Az örvénydiffúzió sematikus bemutatása.

Attól függően, hogy az elválasztandó komponensek milyen utat járnak be a kolonna hossza mentén, különböző időben érnek a kolonna végéhez, hiszen eltérő úthosszakat tesznek meg. A szemcseméret csökkentésével csökken a „zegzugosság” is, aminek következtében az örvénydiffúzió zónaszélesítő hatása kisebb lesz. Giddings ún. kapcsolási elmélete szerint ez a jelenség több részből áll össze, nevezetesen 1) az áramlási csatornán keresztüli, 2) a rövidtávú csatornák közötti, 3) a hosszú távú csatornák közötti és 4) az egész kolonnán keresztüli áramlási heterogenitásokból. Általánosan a következő egyenlettel írható le:

$$h_A = \sum_{i=1}^{i=4} \frac{1}{\frac{1}{2\lambda_i} + \frac{1}{\omega_i \nu}} \cong 2 \sum_{i=1}^{i=4} \lambda_i \quad (22)$$

ahol λ_i állandók, ω_i a mozgófázis különböző csatornákban létrejövő sebesség különbségeire jellemző értékek, és ν a négy különböző örvénydiffúziós hozzájárulást jelenti.

Megjegyezzük, hogy a különböző járulékok függnek a szemcseátmértől és a töltet rendezettségétől. Egyes szerzők szerint a szemcseméret eloszlás is hatással van az örvénydiffúzióra, ami elsőre logikusnak tűnik, de nem bizonyított. Sokszor ezt a tagot „töltési tagnak” is szokták nevezni, mivel a kolonna töltésének minőségétől függ. A következő egyszerűsített összefüggést is gyakran szokták megadni az örvénydiffúzióra, ami jól kifejezi a szemcseméret függést:

$$h_A = 2\lambda d_p \quad (23)$$

Egy heterogén töltet nagyban lerontja a kolonna hatékonyságát. Gritti és Guiochon újabb eredményei szerint, a modern oszlopokon a nagyobb áramlási sebesség tartományokban az örvénydiffúzió a fő zónaszélesítő hatás. Korábban a régebbi oszlopokon (nagyobb szemcseátmérők) a szemcséken keresztüli anyagátadási-ellenállást tartották a fő zónaszélesítő folyamatnak. Összegezve tehát, annál kedvezőbben alakul az örvénydiffúzió, minél kisebb a szemcseméret (vagy monolit oszlopoknál az ún. domain mérete és átfolyó pórus mérete), illetve minél rendezettebb, homogénebb a töltet. Nagyban függ még a kolonna átmérő és a szemcseméret arányától, illetve az a jelenség is ismert, hogy a töltetsűrűség a kolonna középvonalától a falig oszcillikusan változik. Ez különösen fontos kapilláris kolonnáknál. Megjegyezzük végül, hogy a klasszikus van Deemter egyenletben az örvénydiffúzió az áramlási sebességtől független, de valójában nagyban függ a lineáris sebességtől. Gyakran a lineáris sebesség 1/3-ik hatványával írják le (pl. Knox vagy Giddings egyenlet).

Hosszirányú diffúziós tag (h_B)

A kolonnára adagolt zóna hosszirányban az idő előrehaladtával diffúziós úton szélesedik (a koncentráció különbségek miatt). A diffúzió okozta zónaszélesedés elsődlegesen a mozgófázisban történik, de nem elhanyagolható az állófázisban sem. Elsősorban a mozgófázis sebességétől, a komponens mozgó- és az állófázisban mért diffúziós állandójától, a komponens obstrukciós (ütközési) tulajdonságaitól és visszatartásától függ. Minél nagyobb a komponens visszatartása, annál több idő áll rendelkezésre a hosszirányú diffúzió okozta zónaszélesítő hatásra. Általánosan a következő egyenlettel írható le:

$$h_B = \frac{2 \left[\frac{D_{eff}}{D_{mol}} \right]}{\nu} \cdot (1 + k) \quad (23)$$

ahol D_{eff} az ún. effektív diffúziós állandó és D_{mol} a molekuláris diffúziós állandó. Fontos kiemelni, hogy a hosszirányú-diffúzió zónaszélesítő hatása a lineáris sebesség reciprokával arányos. Ezért nagyobb (az optimum térfogatáram feletti) lineáris sebességi tartományokban a hatása nem jelentős. Továbbá az Einstein féle diffúziós egyenlet szerint a diffúziós állandók a hőmérséklettől függenek. Tehát a hosszirányú diffúzió hatása magas hőmérsékleten dolgozva egyre jelentősebb lesz. Ezt úgy lehet kompenzálni, hogy a hőmérséklet emelésével párhuzamosan növeljük a térfogatáramot is. Az effektív diffúziós állandó elsősorban az állófázis szerkezetétől (morfológiájától) függ, tehát a hosszirányú diffúzió nyilván másképp alakul egy teljesen porózus, héjszerkezetű vagy monolit fázison.

A 15. ábra egyszerűsítve mutatja, hogyan szélesedik az injektált zóna egy csőben, amelyben folyadékot áramoltatunk.



15. ábra: Hosszirányú diffúzió sematikus bemutatása
A késsel jelölt részek mutatják a zóna időbeni szélesedését.

Anyagátadási ellenállás tagok ($h_{c,\dot{a}}$ és $h_{c,m}$)

A mozgó- és állófázis között a kvázi egyensúly beállása nem pillanatszerű. Minden olyan hatás, amely növeli a kvázi egyensúly beállítás idejét, kiszélesíti a kromatográfiai csúcsot. Ezeket a hatásokat a 16. ábra szemlélteti. A következő hatásokkal számolhatunk:

- külső anyagátadási gátlás a szemcsék felületén,
- axiális diszperzió a mozgófázis áramában,
- pórusbeli diffúzió a szemcsékben,
- adszorpció – deszorpció az állófázis felületén.

Az anyagátadási ellenállás a mozgófázis sebességétől, a komponens mozgó- és az állófázisban mért diffúziós állandójától, a visszatartásától és a szemcseátmérőtől (állófázis morfológiájától) függ.

A $h_{c,\dot{a}}$ és $h_{c,m}$ tagok leírására számos matematikai model található az irodalomban, ezeket itt nem részletezzük. Általánosan használt és elfogadott formák a következők:

$$h_{c,\dot{a}} = \frac{1}{3} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{v}{Sh_p \gamma_p} \quad (24)$$

$$h_{c,m} = \frac{1}{3} \frac{k'^2}{(1+k')^2} \frac{v}{Sh_m} \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \quad (25)$$

ahol Sh a Sherwood szám, γ_p az effektív és molekuláris diffúziós állandók hányadosa, ε a külső porozitás és k' az ún. zóna retenciós faktor. k' a következőképpen írható fel:

$$k' = (1+k) \frac{\varepsilon_T}{\varepsilon} - 1 \quad (26)$$

ahol ε_T az állófázis teljes porozitása.



16. ábra: Az anyagátadási folyamatok sematikus vázlatja.

Számos szerző (pl. Horváth, Neue) szerint az anyagátadási ellenállás a töltet szemcseméretének négyzetével arányos (lásd 8. egyenlet).

Ha szemléltetni akarjuk a szemcseátmérő és diffúziós tulajdonságok hatását az elválasztás hatékonyságára, akkor Neue szerint a következő egyszerűsített formát írhatjuk fel:

$$H = A \cdot d_p + \frac{B \cdot D_M}{u} + C \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M} \quad (27)$$

Hangsúlyozzuk, hogy a (27) egyenlet sok elhanyagolást tartalmaz (pl. a diffúziós állandó nem azonos a szemcsék közötti folyadék fázisban és a szemcsén belüli stagnáló folyadékban, vagy az örvénydiffúzió a valóságban nem független a lineáris sebességtől, illetve az egyenlet nem különbözteti meg az anyagátadás álló- illetve mozgófázis járulékát), de első közelítésben jól szemlélteti, hogy az anyagátadási tag a szemcseátmérő négyzetétől függ. Az egyenletből egyértelműen következik, hogy a szemcseátmérő csökkentése jelentős tányérmagasság csökkenést (tányérszám növekedést) eredményez. Másik következmény, hogy az egyenlet által leírt görbe minimum helye a nagyobb lineáris sebességi tartományba tolódik, ha a szemcseátmérőt csökkentjük. A függvény optimum (minimum) helye ott van, ahol a $dH/du = 0$ teljesül. Ekkor az optimális lineáris sebesség (u_{opt}) a következők szerint írható le:

$$u_{opt} = \frac{\sqrt{D_M}}{d_p} \sqrt{\frac{B}{C}} \sim \frac{1}{d_p} \quad (28)$$

Tehát a lineáris sebesség optimuma fordítottan arányos a szemcseátmérővel. A (28)-as egyenletet a (27)-be helyettesítve megkapjuk a tányérmagasság elérhető minimum értékét (H_{min}):

$$H_{min} = d_p (A + 2\sqrt{CB}) \sim d_p \quad (29)$$

Azaz az elérhető legkisebb tányérmagasság (legnagyobb tányérszám) egyenesen arányos a töltet szemcseátmérőjével. Láthatjuk, hogy a szemcseátmérő csökkentés előnyös az elválasztás gyorsítása és a kinetikai hatékonyság fokozása szempontjából is.

Hőhatások okozta zónaszélesítő tag ($h_{h\ddot{o}}$)

Ahogy korábban már említettük, a kolonnában fellépő keresztirányú hő-gradienseknek jelentős zónaszélesítő hatása lehet, főleg ha nagy nyomáson dolgozunk. Keresztirányú hő-gradiens során a kolonna fal közelében alacsonyabb a hőmérséklet, mint az oszlop középvonalában. A középvonal menti magasabb hőmérséklet következménye még a gyorsabb molekuláris diffúzió, a kisebb mozgófázis viszkozitás és a megoszlási hányadosok különbsége a középvonal és a fal között. Ezek együttes hatásaként a mérendő komponensek a középvonal mentén gyorsabban haladnak, mint a fal közelében. Az áramlási profil torzul, amelynek következtében széles kromatográfiás csúcsokat kaphatunk.

Gritti és Guiochon szerint a következő összefüggés adható meg a súrlódási hő zónaszélesítő járulékára:

$$h_{h\ddot{o}} = \frac{1}{\frac{1}{2\lambda_{h\ddot{o}}} + \frac{1}{2\omega_{h\ddot{o}}V}} \quad (30)$$

ahol $\lambda_{h\ddot{o}}$ a súrlódási hőhöz kapcsolódó örvénydiffúziós tényező és $\omega_{h\ddot{o}}$ a súrlódási hő Aris diffúzióhoz tartozó komponense. Egyes tanulmányok szerint 1000 bar nyomáson dolgozva 5-10 % hatékonyság csökkenés várható 100 bar nyomáshoz képest, amit elsősorban a súrlódási hőeffektusoknak tulajdonítanak. Elsősorban kis átmérőjű kolonnák (2,1 vagy 1 mm) alkalmazásával csökkenthetjük a súrlódási hőeffektusokat, hiszen ekkor a hőleadás kedvezőbb alakul.

Ajánlott és felhasznált irodalom a 3.1. fejezethez:

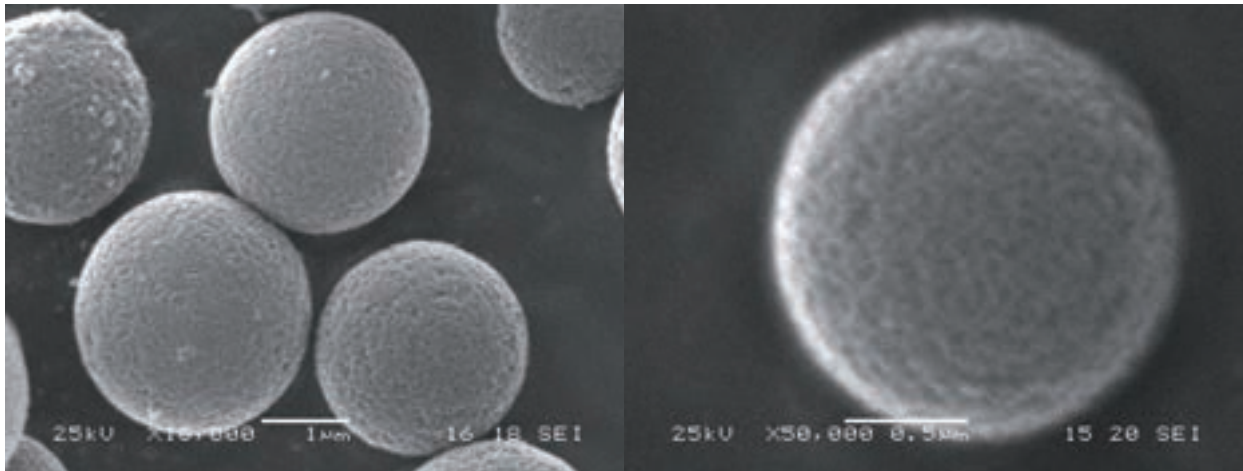
- (1) J.C. Giddings, Dynamics of chromatography: Principles and theory (Chromatographic Science Series) (Pt. 1), 1965. M. Dekker Inc. New York
- (2) U.D. Neue, HPLC columns, theory, technology, and practice, 1997. Wiley-VCH Inc. New York
- (3) J.H. Knox, H.P. Scott, B and C terms in the Van Deemter equation for liquid chromatography, Journal of Chromatography A 282 (1983) 297-313.
- (4) F. Gritti, G. Guiochon, A protocol for the measurement of all the parameters of the mass transfer kinetics in columns used in liquid chromatography, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 5137–5151.
- (5) G. Desmet, A finite parallel zone model to interpret and extend Giddings' coupling theory for the eddy-dispersion in porous chromatographic media, Journal of Chromatography A 1314 (2013) 124–137.

3.2. Teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű töltetek

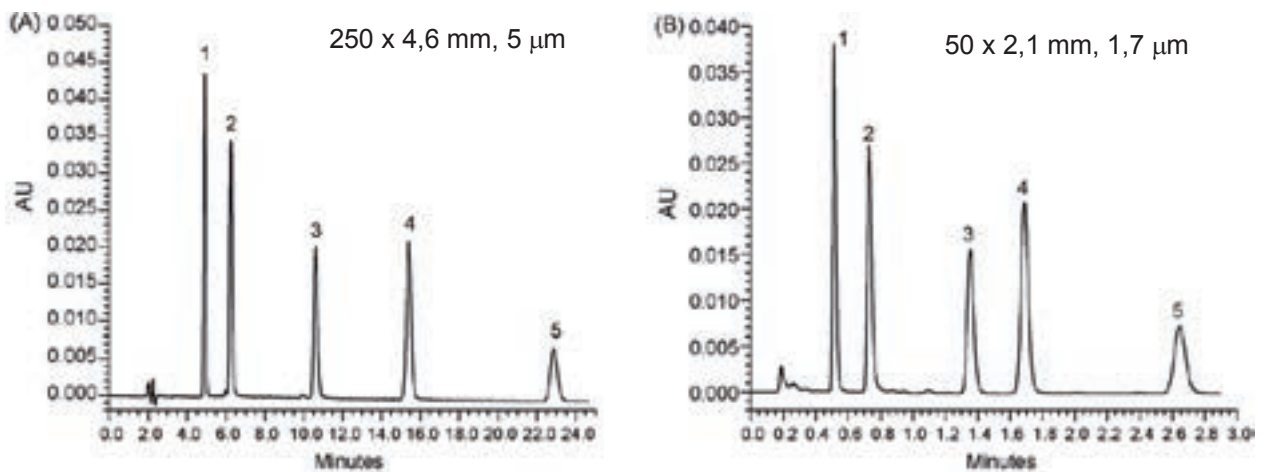
Ahogy az előző fejezetben említettük, belátható hogy az elérhető legkisebb tányérmagasság (legnagyobb tányérszám) egyenesen arányos a töltet szemcseátmérőjével. A szemcseátmérő csökkentése előnyös az elválasztás gyorsítása és a kinetikai hatékonyság fokozása szempontjából is. Azt is láttuk, hogy a szemcseátmérő csökkentésével négyzetesen nő az oszlopon létrejövő nyomásesés. Ma szinte már minden készülégyártó forgalmaz UHPLC készüléket, amelyek 1000 - 1400 bar tartományig is képesek a mozgófázist szállítani.

Egybevetve az eddigieket megállapítható, hogy gyors folyadékkromatográfiát teljesen porózus töltetekkel, kis szemcseátmérővel és kis kolonnatérfogattal lehet megvalósítani. 2004 mérföldkő volt a folyadékkromatográfia történetében. Ekkor a Waters cég kibocsátotta az első 1000 bar-ig (15 000 psi) működő – és kis kolonnán kívüli térfogatú – gyors folyadékkromatográfias rendszerét. Ezt UPLC-nek nevezte el, amely az ultra performance liquid chromatograph betűszava. Ezzel egyidőben 1,7 µm átlagos szemcseátmérőjű szerves és sziloxánból (bridge ethylene hybrid, BEH) készült teljesen porózus állófázissal töltött kolonnákat is forgalomba bocsátottak. A szemcse teljesen gömbszimmetrikus, a felületén nincsenek kiugrások vagy mélyedések. Ez több szempontból is fontos, egyrészt a mechanikai stabilitás miatt, másrészt a szemcsét körülvevő álló folyadékfilm okozta zónaszélesedés kisebb. A töltet szemcseátmérő eloszlása is szűkebb a hagyományos HPLC-s töltetekhez képest. A 17. ábrán az 1,7 µm-es BEH töltet elektronmikroszkópos felvételét mutatjuk be. A szakirodalomban jelenleg is vita van a szemcseátmérő eloszlás szerepéről, elsősorban a kinetikai hatékonyságra gyakorolt hatásáról (örvénydiffúzió, töltet sűrűség, töltési tulajdonságok), műveleti szempontból előnyös a kis szemcseátmérő eloszlás. Wang és mtsai az elsők között mutatták be, hogy a hagyományos HPLC-s módszerek (25 cm-es, 5 µm-es kolonna, 400 bar nyomás) analízis ideje akár a hetedére is csökkenthető 5 cm-es 1,7 µm-es BEH kolonnát és 900-1000 bar nyomást alkalmazva. A 18. ábrán egy hagyományos módszer gyors módszerre történő sikeres transzferálásának eredményét láthatjuk.

A Waters BEH 1,7 µm-es töltet sikere után hamarosan más gyártók is forgalomba hoztak 2 µm-es vagy az alatti tölteteket. Először az Agilent Zorbax RHD 1,8 µm-es, a Thermo Hypersil Gold 1,9 µm-es majd a Grace Vision HT 1,5 µm-es töltetei jelentek meg. Mára már minden kolonnagyártó cég ajánlja a saját teljesen porózus UHPLC-s töltetét. A 2. táblázat a 2013-ig kereskedelmi forgalomban megjelent 2 µm és az alatti tölteteket foglalja össze.



17. ábra: 1,7 μm-es teljesen porózus Acquity BEH töltet elektronmikroszkópos felvételei.



18. ábra: Izokratikus hagyományos HPLC elválasztás UHPLC-s felgyorsítása gyógyszerhatóanyagok elválasztására.

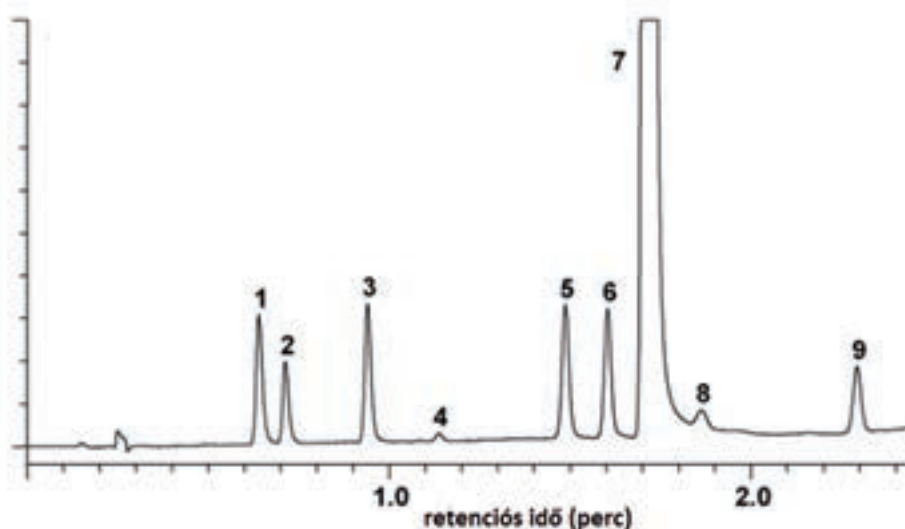
A 2 μm alatti töltetek abszolút értékben jó tányérmagasságokat (H_{\min}) valósítanak meg, de a redukált tányérmagasság minimuma ezeknél a töltetekkel elmarad a 3 - 5 μm-es töltetekhez képest. A redukált tányérmagasság egy dimenziómentes mérőszám, amivel a különböző szemcseméretű kolonnák hatékonyságát vethetjük össze függetlenül a szemcsemérettől (lásd a 3.1. fejezetben). Az elmélet szerint egy jól töltött, teljesen porózus töltetű kolonnának $h_{\min} = 2 - 2,5$ közötti redukált tányérmagasság minimumot kellene adnia. Sok esetben a szemcseátmérő és a redukált tányérmagasság között fordított arány figyelhető meg. Ez azt jelenti, hogy a 2 μm alatti töltetek hatékonysága a gyakorlatban elmarad az elméletileg elvárhatótól ($h_{\min} \sim 3$). Ennek több oka lehet, a már említett hő effektusok, a kolonna töltési problémák, illetve a káros oszlopon kívüli térfogatok is nagyban leronthatják a kolonnák hatékonyságát.

2. táblázat: Kereskedelmi forgalomban megjelent (2014-ig)
2 µm-es és az alatti teljesen porózus töltetek.

gyártó	kolonna/termék neve	névleges szemcseátmérő (µm)
Alltech (Grace Davison)	VisionHT	1,5
Shant Laboratories	Pathfinder	1,5
Waters	Cortecs, Acquity-BEH, -CSH, -HSS	1,6, 1,7, 1,8
Fortis Technologies	Fortis 1.7	1,7
Orochem Technologies	Gazelle	1,7
Phenomenex	Luna, Kinetex, Aeris	2,0, 1,7, 1,3
Sepax	GP-8 and GP-18	1,7
Thermo	Synchronis, Hypersil Gold	1,7, 1,9
Agilent Technologies	Zorbax Rapid Resolution HT/HD	1,8
Bischoff	ProntoPEARL TPP Ace-EPS	1,8
ES Industries	Epic Sub-2	1,8
Knauer	BlueOrchid	1,8
Macherey-Nagel	Nucleodur	1,8
MicroSolv Technology	Cogent Diamond & Silica-C	1,8
Micro-Tech Scientific	Microsil	1,8
Perkin Elmer	BrownLee	1,9
Restek	Pinnacle DB/ Ultra II	1,9
Sigma-Aldrich	Titan	1,9
YMC	Triart, Ultra-HT	1,9, 2,0
Varian	Pursuit UPS	1,9
Agela Technologies	Rapid aSB	2,0
Hitachi	LaChromUltra	2,0
Imakt	Presto	2,0
Shiseido	Capcell Pack	2,0
Tosoh Haas	TSKgel SuperODS	2,0
Zirchrom	Zirchrom	2,0

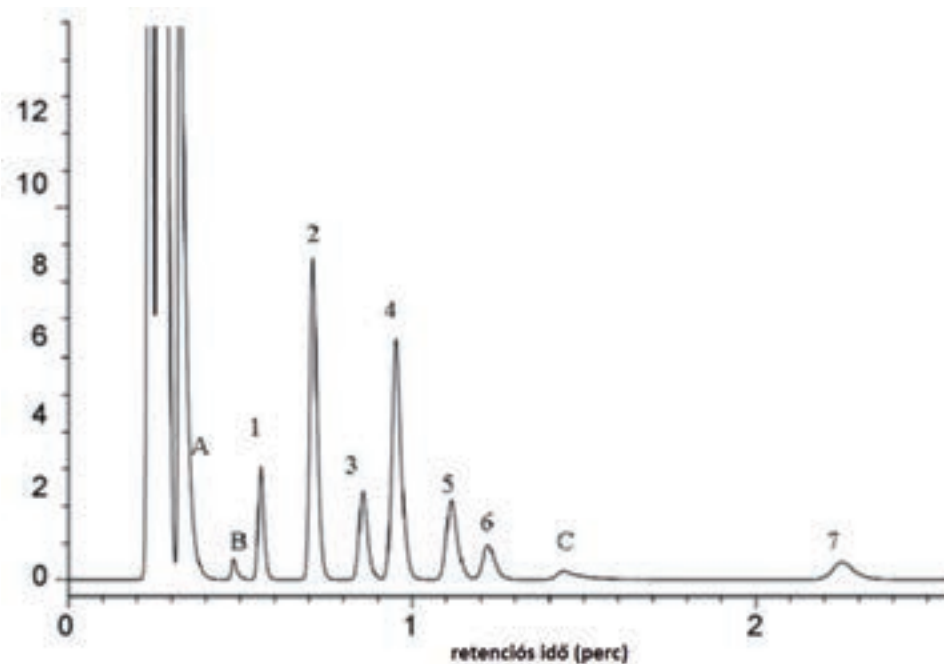
Az alábbiakban néhány korszerű gyógyszer analitikai példát mutatunk be a teljesen porózus 2 µm alatti töltetek alkalmazására.

Etinil-ösztadiol tartalmú készítmény tisztaságvizsgálati módszerben 8 szennyezőt/bomlásterméket választottak el egymástól és a hatóanyagtól mindössze 2,5 perc alatt. A tanulmányban 1,9 µm-es C18-as szemcsékkel töltött 50 x 2,1 mm-es kolonnát és egyszerű acetonitril-víz lineáris gradienst alkalmaztak (19. ábra). A módszer érdekessége, hogy hasonló feladatra 30-60 perces konvencionális HPLC-s elválasztások találhatók az irodalomban (150 x 4,6 és 250 x 4,6 mm-es kolonnákon).



19. ábra: Etinilösztadiol tartalmú készítmény bomlásvizsgálata. Kolonna: Restek Pinnacle C18 1,9 µm (50 mm × 2,1 mm), mozgófázis: „A”: acetonitril–víz 5–95 V/V%, „B”: acetonitril, gradiens program: (35–70% B, 2.3 perc alatt), térfogatáram: 0.5 mL/perc (p = 299 bar), oszlop hőmérséklet: 50 °C, injektálási térfogat: 1 µL, detektálás: 220 nm. Komponensek: (1 - 6 és 8) bomlástermékek, (7) etinilösztadiol és (9) ismeretlen szennyező.

Második példánkban készülék tisztítás-validálására mutatjuk be a 2 µm alatti töltetek előnyét. A bemutatott izokratikus módszer alkalmas egy szteroid gyártósor tisztítási műveletének, illetve a készülékek tisztaságának megítélésére számos gyógyszerkészítmény gyártásakor. A mindössze 3 perces elválasztással hét hormon hatóanyagot lehet pontosan és torzítatlanul meghatározni rendkívül kis koncentrációban (meghatározási határ: 0,05 – 0,3 µg/mL) (20. ábra). A módszer további érdekessége, hogy alkalmazható a készülékekben előforduló összes mintavételi felületre (rozsdamentes acél és PTFE alkatrészek, illetve szilikongumi anyagú tömítések, összekötő elemek).



20. ábra: Szteroid gyártósor szilikon felületéről vett minta kromatogramja. Kolonna: UPLC BEH C18 1,7 μm ($50 \times 2,1 \text{ mm}$), mozgófázis: acetonitril–víz (48:52, v/v), térfogatáram: 0,55 mL/perc, oszlop hőmérséklet: 50 °C, injektált térfogat: 5 μl , detektálás: 210 nm. Komponensek: (1-7) szteroid hatóanyagok, A, B és C csúcsok a mintavételi hely (szilikon) anyagából kioldódó komponensek.

A kis szemcséjű töltetek nem csak gyors elválasztásokra használhatók, hanem ún. nagy felbontású (a szakirodalomban „high resolution”) elválasztások is megvalósíthatók segítségükkel. Nagy felbontású elválasztásokra akkor van szükség, ha a minták igen összetettek, számos komponenst tartalmaznak és mi a lehető legtöbb információt akarjuk kinyerni a kromatogramból. Tipikusan ilyenek a biológiai minták, növényi extraktumok, proteomikai minták vagy például fehérje emésztmények. Egy nagy fehérje vagy fehérje keverék triptikus emésztménye több száz peptidet is tartalmazhat.

A gyakorlatban ezeket a méréseket gradiens módban végezzük, hosszú kolonnákat és kis áramlási sebességet alkalmazva. A gradiens elúcióra azért van szükség, mert sokféle különböző szerkezetű vegyületet kell meghatározni, a hosszú kolonnára pedig azért, mert az elérhető tányérszám az oszlop hosszával arányos (lásd az 1. fejezetben). Azaz minél hosszabb a kolonna, annál több komponenst tudunk elválasztani, annál jobb csúcsfelbontás várható. A kis áramlási sebesség pedig abból adódik, hogy a 2 μm -nél kisebb szemcsék áramlási ellenállása igen nagy. Mivel 1000 – 1400 bar jelenleg a felső nyomáshatár ezért egy 30 vagy 60 cm-es kolonnát csak alacsony térfogatáramon tudunk üzemeltetni. A 30, 45 vagy 60 cm-es kolonna hosszakat gyakran alkalmazzák nagy felbontású elválasztásokra. Ezt a kolonna hosszt úgy érhetjük el, hogy pl. egyszerűen sorba kötünk 15 cm-es (2,1 mm átmérőjű) kolonnákat. Figyelnünk kell viszont arra, hogy ne növeljük meg jelentősen az

oszlopon kívüli térfogatokat az által, hogy összekötő vezetékkel alkalmazunk a kolonnák között. Tipikusan 1 µl térfogatú összekötőelemeket használnak erre a célra.

Mivel a nagyfelbontású elválasztásokat gradiens elúciós módban végzik, érdekes röviden áttekinteni a csúcskapacitás fogalmát. A csúcskapacitás annak a mérőszáma, hogy adott idő alatt (pl. a gradiens program ideje) hány darab csúcsot tudunk egymástól elválasztani egy meghatározott csúcshelyzetűvel (általában $R_s = 1$). Számos összefüggés található az irodalomban a csúcshelyzetű (n) leírására, a gyakorlatban általában a gradiens idő (t_G) és a csúcshelyzetű (w) hányadosát vesszük alapul. A következő egyszerű összefüggést használva könnyen meghatározhatjuk az ún. gyakorlati vagy mért csúcshelyzetűt:

$$n = 1 + \frac{t_G}{w} \quad (31)$$

ahol a nevezőben a csúcshelyzetű átlaga szerepel. Természetesen a csúcshelyzetű sok változótól függ. Nagymértékben függ a gradiens időtől, a térfogatáramtól, a gradiens meredekségétől, a mozgófázis hőmérsékletétől és természetesen a kolonna hosszától. A következő összefüggés jól szemlélteti, hogy az elméleti csúcshelyzetű (n_e) a kolonnahossz négyzetgyökével arányos.

$$n_e = 1 + \frac{\sqrt{L}}{4\sqrt{H}} \cdot \frac{1}{b+1} \cdot \ln\left(\frac{b+1}{b} e^{S\Delta\Phi} - \frac{1}{b}\right) \quad (32)$$

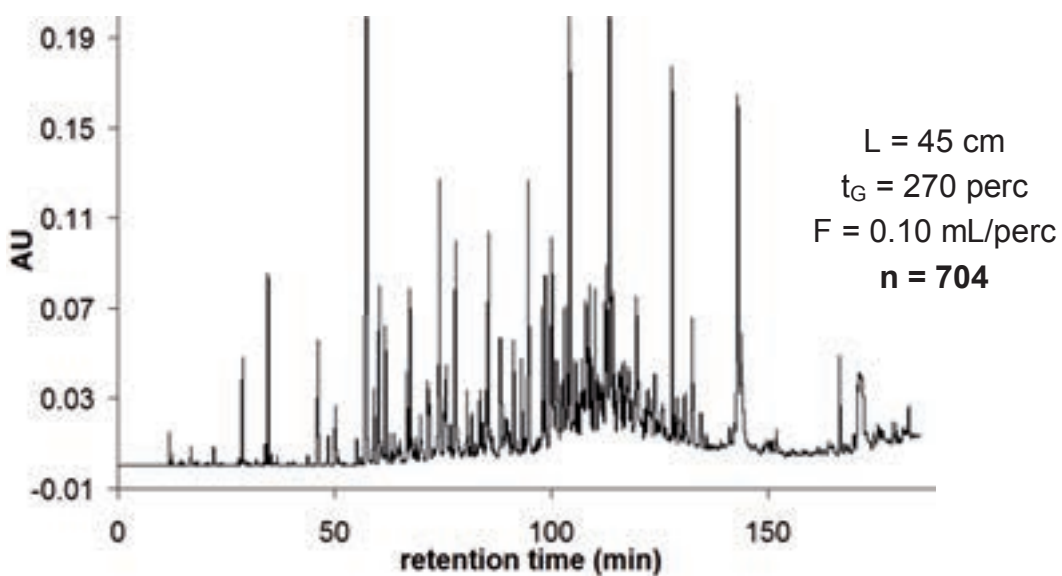
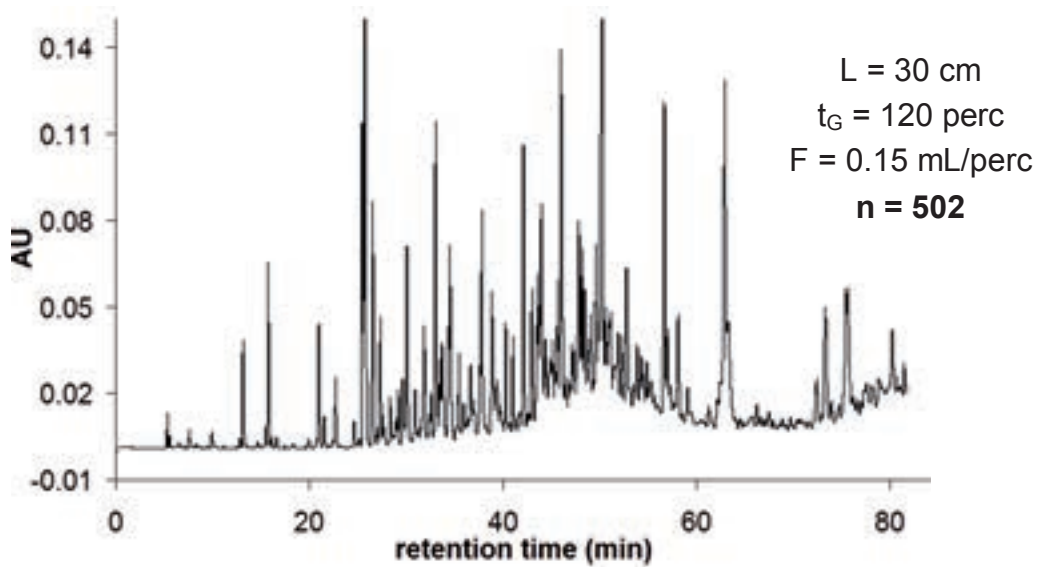
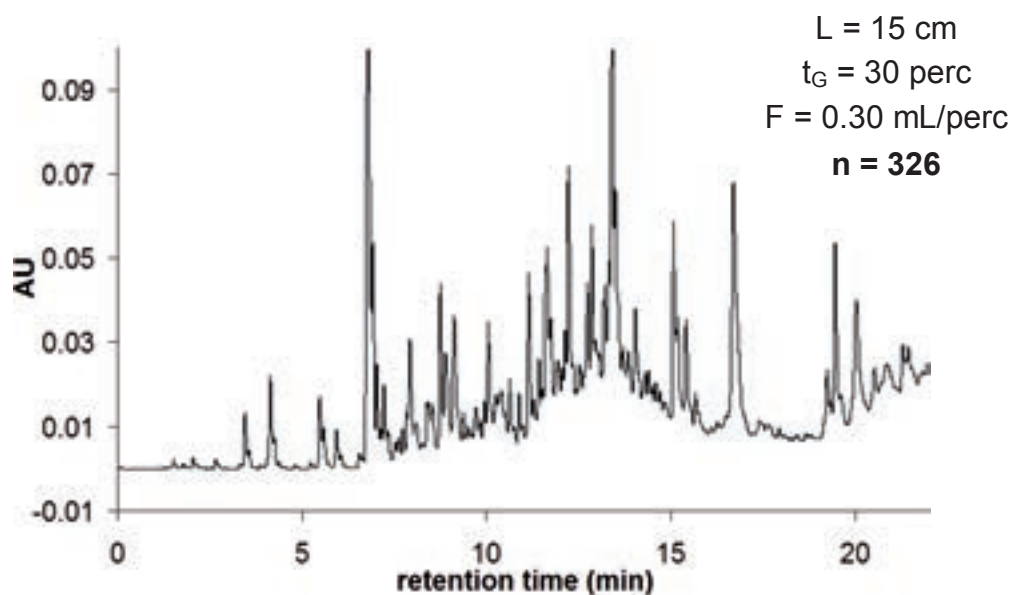
ahol

$$b = \frac{t_0 \Delta\Phi S}{t_G} \quad (33)$$

ahol S a gradiens elúcióra jellemző paraméter (az ún. lineáris oldószer-erősségi egyenlet meredeksége, értéke függ a molekula jellegétől, méretétől és a szerves módosító típusától), $\Delta\Phi$ pedig a gradiens program során a kiindulási és végső mozgófázis összetétel közti változást fejezi ki.

Gyors UHPLC-s elválasztásoknál a tipikusan alkalmazott 5 cm-es kolonnákkal körülbelül $n = 80 - 180$ csúcshelyzetű érhető el (a komponensek jellegétől függően). Ennél nagyobb csúcshelyzetű csak hosszabb kolonnákkal valósítható meg.

A következő példa jól szemlélteti az oszlophossz és a csúcshelyzetű közötti összefüggést (21. ábra). Egy monoklonális antitest tripszines emésztésével kapott peptideket választottunk el 15, 30 és 45 cm-es, 1,7 µm-es teljesen porózus szemcsékkel töltött kolonnákon. Látható, ahogy a csúcshelyzetű $n = 326$ -ról (15 cm) $n = 704$ -re nő (45 cm).



21. ábra: Egy IgG2 típusú monoklonális antitest peptid térképe különböző hosszúságú kolonnákon mérve. Oszlop: Acquity BEH300 C18 150 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m (1, 2 és 3 kolonna sorba kötve).

Ajánlott és felhasznált irodalom a 3.2. fejezethez:

- (1) J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 983-989.
- (2) J.E. MacNair, K.D. Patel, J.W. Jorgenson, Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography: isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0-micron particles, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 700-708.
- (3) N. Wu, J.A. Lippert, M.L. Lee, Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 911 (2001) 1-12.
- (4) Davy Guillarme, Jean-Luc Veuthey ed., *UHPLC in Life Sciences* (2012) Royal Society of Chemistry
- (5) Quanyun Alan Xu ed., *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications* (2013) John Wiley & Sons
- (6) S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles, *Journal of Chromatography A* 1228 (2012) 57-71.
- (7) S. Fekete, M.W. Dong, T. Zang, D. Guillarme, High resolution reversed phase analysis of recombinant monoclonal antibodies by ultra-high pressure liquid chromatography column coupling, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 83 (2013) 273-278.

3.3. Héjszerkezetű (mag-héj) töltetek

Az utóbbi évek legnagyobb sikerét egyértelműen a héjszerkezetű töltetek hozták. Néhány év alatt úgy elterjedtek (vagy még jobban), mint a 2 μm alatti teljesen porózus töltetek. Nézzük át röviden, mi okozza ezen töltetek sikerét.

A zónaszélesedés csökkentésének egyik megoldása lehet, ha az ún. diffúziós úthosszat lerövidítjük. Ez hozta el a héjszerű töltetek jelenlegi reneszánszát. Horváth és Kirkland közel negyvenöt éve bevezette ezeket a tölteteket, amelyeket akkor pellikulárisnak neveztek. Horváthék először a 60-as évek legvégén, 50 μm -es üvegyöngyöt használtak, amelyet 1 μm szerves polimer alapú ioncserélővel vettek körül. Utána Kirkland volt az, aki 30-40 μm átmérőjű töltetet készített 1 μm -es aktív réteggel. Az ilyen típusú tölteteknek az anyagátadási ellenállása kedvezőbb, mint a hasonló méretű teljesen porózus tölteteknek. Ez a töltet azonban nem lett népszerű a folyadékkromatográfias társadalomban, mert a teljesen porózus szilikagél alapú töltetfejlesztés vált döntővé és megjelentek a 10, 5 később a 3 μm szemcseátmérőjű, teljesen porózus töltetek. A kezdeti sikertelenség oka a nagy inaktív mag (az aktív réteghez képest), aminek a következménye a kolonnák kis terhelhetősége és a visszatartás csökkenése volt. 2007-ben újból megjelentek ezek a töltetek (harmadik generáció), amikor a szemcseátmérő már kisebb volt, mint 3 μm . Ez óriási áttörést hozott a gyors folyadékkromatográfiában. Az első 2,7 μm -es héjszerkezetű töltetek Halo és Ascentis Express néven kerültek kereskedelmi forgalomba, s ismét Kirkland volt az, aki bevezette azokat.

Kezdetben az alapkoncepció az volt, hogy makromolekulák (fehérjék, peptidek) elválasztásának hatékonyságát javítsák úgy, hogy a csökkentett diffúziós úthossz következtében felgyorsulnak a szemcsén belüli anyagátadási folyamatok. A makromolekulák ugyanis lassú diffúzióval haladnak a porózus töltetekben, lényegesen „lomhábbak” mint a kismolekulák. Ha a töltet tartalmaz egy nem porózus magot és ezt veszi körül az elválasztásban szerepet játszó aktív porózus réteg, akkor a lassú diffúziót (anyagátadási folyamatot) kompenzálhatjuk. A 22. ábra a héjszerkezetű töltetek sematikus képét mutatja.

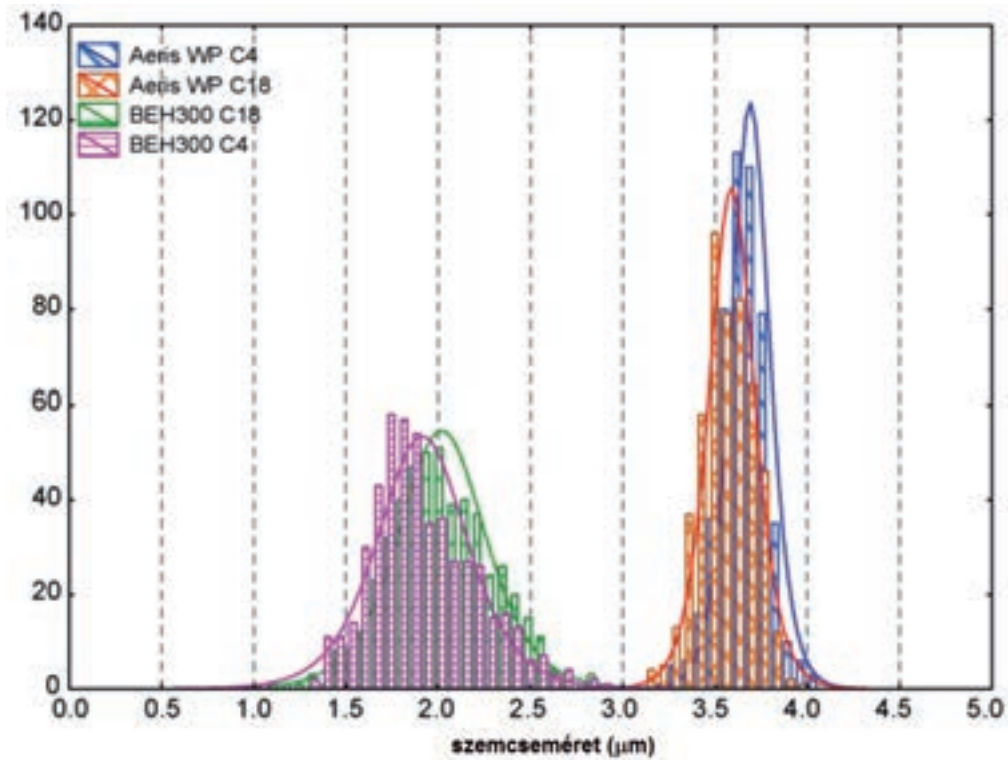


22. ábra: Héjszerkezetű töltetek sematikus képe (balra), illetve elektronmikroszkópos felvétele (jobbra).

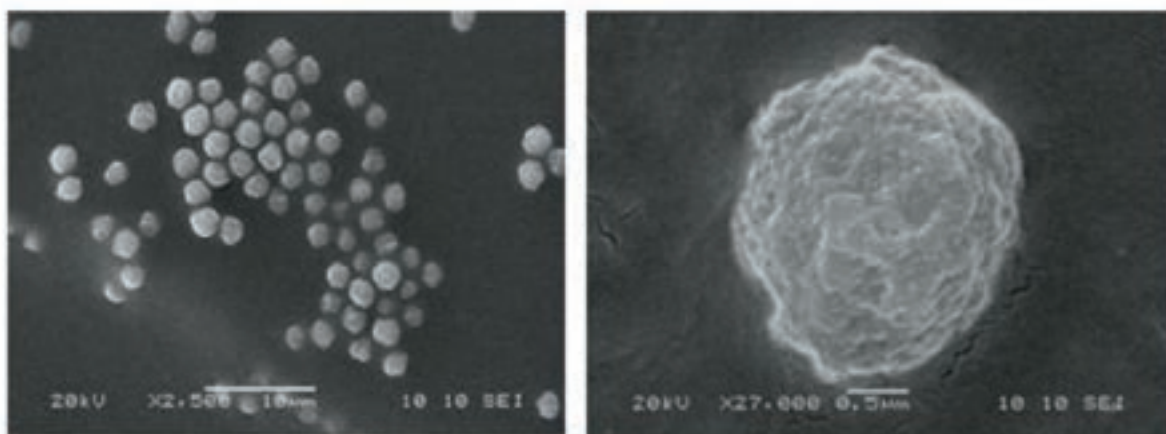
Az újgenerációs héjszerkezetű töltetek kis szemcseméretéből adódik az előnyös örvény- és hosszirányú diffúziós tulajdonság, a vékony porózus réteg következtében pedig gyorsabb részecskén belüli anyagátadás és kedvezőbb hosszirányú diffúzió várható. Kaczmarek és Guiochon levezetései alapján, a részecskén belüli diffúzió a belső mag átmérő és a teljes szemcse átmérő hányadosának (ρ) függvényében írható le. Ahogy ez az arány növekszik ($\rho = 1$ megfelel a nem-porózus töltetnek, míg $\rho = 0$ a teljesen porózusnak), úgy válik egyre gyorsabbá az anyagátadási kinetika az aktív héjban (van Deemter összefüggés **C** tagja, nevezetesen az állófázis járuléka). Ez az előnyös tulajdonság elsősorban a nagy lineáris sebességeknél jelentkezik. Másrészt a hosszirányú diffúzió is csökkennie kell az inert belső mag miatt (van Deemter összefüggés **B** tagja). Ennek elsősorban a kis lineáris sebességi tartományban van jelentősége. Az általános sebességi elméletből az is levezethető, hogy az anyagátadás mozgófázis járuléka közvetve is függ a héjvastagságtól (mert a visszatartás csökken a rétegvastagság csökkentésével). Az elméleti levezetések szerint körülbelül 2,3-szor, illetve 1,7-szer gyorsabb részecskén belüli anyagátadás várható a kereskedelmi forgalomban kapható 2,6 és 2,7 μm -es héjszerkezetű töltetekkel (Kinetex és Halo/Ascentis Express/Poroshell-120, $\rho = 0,73$ és $\rho = 0,63$), mint az azonos méretű teljesen porózus töltetekkel.

Teljesen porózus töltetekkel, egy jól töltött kolonna esetén a legkisebb elérhető redukált tányérmagasság $h_{\text{min}} = 2,0$, míg a jelenlegi héjszerkezetű töltetekkel $h_{\text{min}} = 1,2 - 1,5$ körüli redukált tányérmagasság minimum várható és érhető el. Meg kell jegyeznünk, hogy az irodalomban található rendkívül jó hatékonysági adatok kromatográfiásan kis molekulákra nem magyarázhatóak a jelenlegi elméletekkel. Kromatográfiásan kis molekulatömegű anyagokon azokat értjük, melyek egy 10 nm-es pórusátmérőjű töltet pórusaiban gátlás nélkül diffundálhatnak. Ezek molekulatömege 1000 - 2000 Da-nál kisebb. Több szerző is lényegesen kedvezőbb örvénydiffúziós tulajdonságot figyelt meg a héjszerkezetű töltetekre, mint a teljesen porózusokra. Elvileg a szemcse szerkezetének nincs hatása az örvénydiffúzióra, ebben az esetben is máshol kell keresnünk a magyarázatot. Egyik magyarázat, hogy a héjszerkezetű töltetek kis szemcseméret eloszlással rendelkeznek, s ezért javul a kinetikai hatékonyságuk. A 23. ábrán 1,7 μm -es teljesen porózus és 3,6 μm -es héjszerkezetű töltetek szemcseméret eloszlásait láthatjuk. A másik kísérletileg bizonyított tény, hogy viszonylag egyenetlen, göbös felületük miatt a töltésnél homogénebb töltetágy jön létre. Ezt a viszonylag göbös szemcsefelületet (ami általában jellemzi a héjszerkezetű tölteteket) a 24. ábrán láthatjuk. Ezek a göbös szemcsék jobban „egymásba kapaszkodnak” és töltés során kisebb valószínűséggel csúsznak szét egymáson. Még egy előnyös tulajdonságuk a teljesen porózus töltetekhez képest, hogy a tömör magnak sokkal kedvezőbbek a hőátadási tulajdonságai, mint a porózus töltetnek. Ezért a súrlódási hőeffektusok (mind a hossz-, mind a sugár irányúak) kevésbé jelentősek héjszerkezetű töltet

esetén, mint a porózus tölteteknél, és nagy lineáris sebességen tudunk dolgozni anélkül, hogy a fellépő sűrűdési hő miatt drasztikusan csökkenne a kolonna hatékonysága vagy a komponens retenciója. Jelenleg a héjszerkezetű töltetek reneszánszukat élik, remek hatékonyságot produkálnak mind folyadékkromatográfiásan kis és nagy molekulatömegű anyagok elválasztásakor.

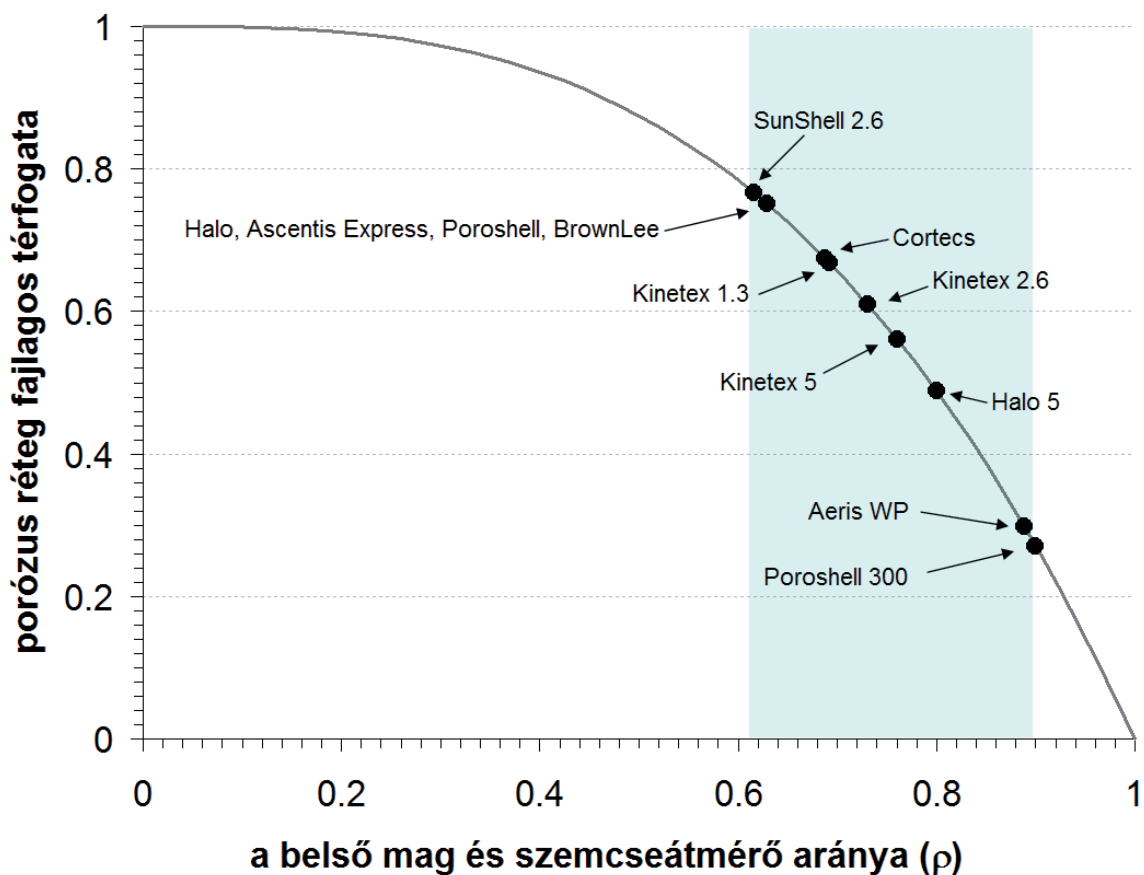


23. ábra: Héjszerkezetű (Aeris WP C4 és C18) és teljesen porózus (BEH300 C4 és C18) töltetek szemcseméret eloszlása.



24. ábra: Halo 2,7 µm-es héjszerkezetű töltet elektronmikroszkópos felvétele.

Az eddig tárgyalt előnyök mellett néhány hátrányos tulajdonságot is meg kell említeni. A vékony aktív porózus réteg miatt könnyen belátható, hogy azonos méretű teljesen porózus töltetkez képest kisebb a terhelhetőségük és a visszatartás is csökken a kolonnában lévő összes felület arányában. A héjszerű töltetek aktív porózus része ~25 - 40%-al kisebb, mint a hasonló méretű teljesen porózus tölteteké. Kísérleti adatok alapján az a megállapítás született, hogy az új generációs héjszerkezetű töltetknél a terhelhetőség közel esik a 2 μm -nél kisebb teljesen porózus töltetekéhez. Az is bebizonyosodott, hogy a visszatartás csökkenése a jelenlegi $\rho = 0,6 - 0,8$ szemcseszerkezet esetén még nem kritikus. Elsősorban $\rho > 0,8$ szemcseszerkezet esetén (pl. Aeris WP töltet) várható jelentős visszatartás csökkenés. A 25. ábrán a porózus réteg fajlagos térfogatát mutatjuk a szemcseszerkezet (ρ) függvényében.

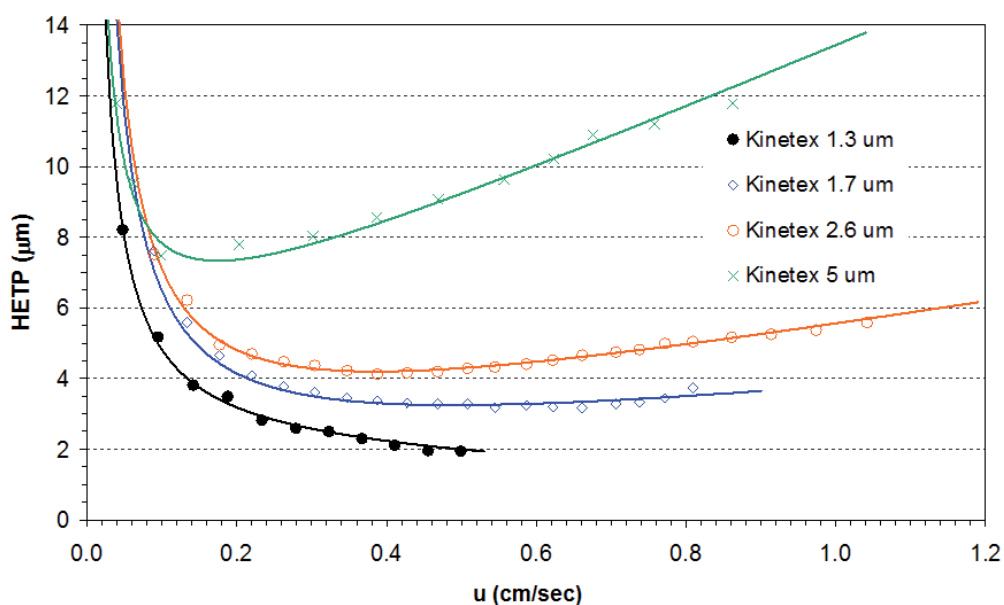


25. ábra: A héjszerkezetű töltetek porózus rétegének fajlagos térfogata.

Napjainkra szinte minden töltet-gyártó forgalmaz újgenerációs héjszerkezetű állófázisokat. Először a 2 - 3 μm szemcseátmérő közötti töltetek jelentek meg, amelyeknél a héj vastagsága 0,35 - 0,50 μm között volt (Halo, Ascentis Express, Poroshell, Kinetex). Érdekes, hogy ezen töltetek átlagos pórus átmérője 90 - 100 Å közötti volt, holott a héjszerkezetű töltetek az elmélet szerint makromolekulákra teljesítenek jobban. Mára már

megjelentek a 160, 200, 300 és 400 Å körüli héjszerkezetű állófázisok is (Halo Peptide ES, Aeris WP...), amelyek jó hatékonysággal alkalmazhatók fehérje elválasztásokra.

A 3. táblázatban a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható új generációs héjszerkezetű tölteteket foglaltuk össze. A 2 µm alatti szemcseméretű héjszerű tölteteken eddig nem tapasztalt kinetikai hatékonyságot érhetünk el, míg a 3 - 5 µm szemcseátmérőt a hagyományos, teljesen porózus HPLC-s töltetek helyettesítésére javasolják a gyártók. A 26. ábrán az 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es héjszerkezetű (Kinetex) töltetekkel mért **H-u** görbéket mutatjuk be. Figyelemreméltó, hogy az 1,3 µm-es töltettel $H_{\min} \sim 2 \mu\text{m}$ érhető el. Ez megfelel 20000 – 25000 elméleti tányérszámnak egy 5 cm-es kolonnán. A legjobb 2 µm alatti teljesen porózus töltetekkel ennek a hatékonyságnak körülbelül csak a fele érhető el ($H_{\min} \sim 3,5 - 4,5 \mu\text{m}$). Egy 1,7 µm-es teljesen porózus töltetű 5 cm-es kolonnával tipikusan 10000 – 12000 elméleti tányérszám érhető el.



26. ábra: 1,3, 1,7, 2,6 és 5 µm-es héjszerkezetű töltetekkel mért H-u görbék (butilparabén tesztvegyület, acetonitril-víz mozgófázis 30 °C, 0,1 µL térfogatú injektálás).

3.táblázat: Kereskedelmi forgalomban megjelent (2014-ig) újgenerációs héjszerkezetű töltetek

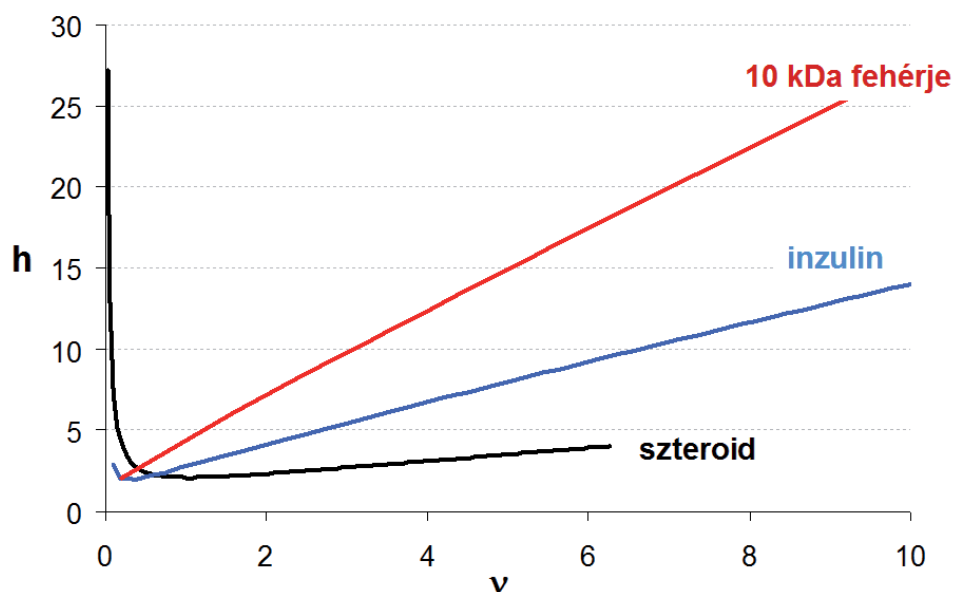
Gyártó	Termék neve	szemcseméret (μm)	rétegvastagság (μm)	ρ	állófázisok
Advanced Chromatography Technologies	ACE UltraCore	2,5	0,45	0,64	C18, phenylhexyl
		5,0	0,70	0,72	
Agilent	Poroshell 300	5,0	0,25	0,90	SB-C18, SB-C8, SB-C3, Extend
		2,7	0,50	0,63	SB-AQ, SB-C18, EC-C18, EC-C8, phenylhexyl, EC-CN, Bonus-RP, Peptide-mapping, HILIC
Advanced Materials Technology	Halo	2,7	0,50	0,63	C18, C8, phenylhexyl, Amide, PFP, CN, HILIC, Penta-HILIC
		4,7	0,60	0,74	
		2,7	0,50	0,63	
		3,4	0,20	0,88	
Diamond Analytics	Flare Diamond Coreshell	3,6	n.a.	n.a.	C18, C18-WAX, HILIC
		2,6	0,40	0,69	C18, diphenyl, PFP, HILIC
Knauer	Blueshell	2,6	0,50	0,62	C18, C18A, PFP, phenylhexyl, HILIC
		2,7	0,50	0,63	
Macherey-Nagel	Nucleoshell	5,0	0,60	0,76	C18, phenylhexyl, PFP, HILIC
		2,6	0,50	0,62	
Perkin Elmer	Brownlee SPP Peptide-ES	2,7	0,50	0,63	C18, C8, phenylhexyl, RP-amide, PFP, ES-CN, HILIC
		5,0	0,60	0,76	
Phenomenex	Kinetex	5,0	0,60	0,76	C18, C8, phenylhexyl, PFP, HILIC
		2,6	0,35	0,73	
		1,7	0,23	0,73	
		1,3	0,20	0,69	
Aeris Peptide	Aeris Peptide	3,6	0,50	0,72	C18
		1,7	0,23	0,73	
Aeris Widepore	Aeris Widepore	3,6	0,20	0,89	C18, C8, C4

3. táblázat: Kereskedelmi forgalomban megjelent (2014-ig) újgenerációs héjszerkezetű töltetek (folytatás)

Gyártó	Termék neve	szemcseméret (μm)	rétegvastagság (μm)	ρ	állófázisok
Restek	Raptor	2,7	0,50	0,63	Biphenyl
	Ascentis Express	2,7	0,50	0,63	C18, C8, phenylhexyl, Amide, F5, CN, HILIC, OH5
	Ascentis Express 5 μm	4,7	0,60	0,74	
	Ascentis Express Peptide160 A	2,7	0,50	0,63	C18, CN
Sunniest	BIOshell 400 A	3,4	0,20	0,88	C4
	SunShell	2,6 4,6	0,50 0,60	0,62 0,74	C18, C8, PFP
Thermo Scientific	Accucore XL	4,0	0,50	0,75	C30, C18, C8, C4, phenylhexyl, PFP, HILIC, RP-MS, aQ, Amide-HILIC
	Accucore	2,6	0,50	0,62	
Waters	Cortecs	1,6	0,25	0,70	C18, C18+, HILIC
YMC	Meteoritic Core	2,7	0,50	0,63	C18, C18 Bio, C8

Kismolekulás elválasztásoknál az 1,3 μm -es töltet még „túl hatékony” is lehet. Ezalatt azt értjük, hogy a jelenlegi készülékteljesítmények mellett (nyomásteljesítmény) nem mindig tudunk olyan mozgófázis sebességgel dolgozni, hogy elérjük a **H-u** görbe optimumát. Az 1,3 μm -es töltetnek rendkívül kicsi a permeabilitása ($K_v = 1,7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2$). Ez azt jelenti hogy 40% acetonitril tartalmú mozgófázissal egy 50 x 2,1 mm-es kolonnán már 0,7 mL/perc térfogatáramnál elérjük az 1000 - 1200 bar maximális nyomásteljesítményt. Tehát újból arra a következtetésre juthatunk, hogy a jelenlegi oszlopok hatékonysága túlhaladta a készülékek „tudását”. A már részletesen tárgyalt oszlopon kívüli térfogatok mellett a másik probléma, hogy egyértelműen magasabb nyomásra volna szükség, hogy a kolonnák lehetőségeit kihasználjuk. Modell számítások alapján legalább 2000 bar nyomás kellene ahhoz, hogy az 1,3 μm -es töltet lehetőségeit kiaknázzuk.

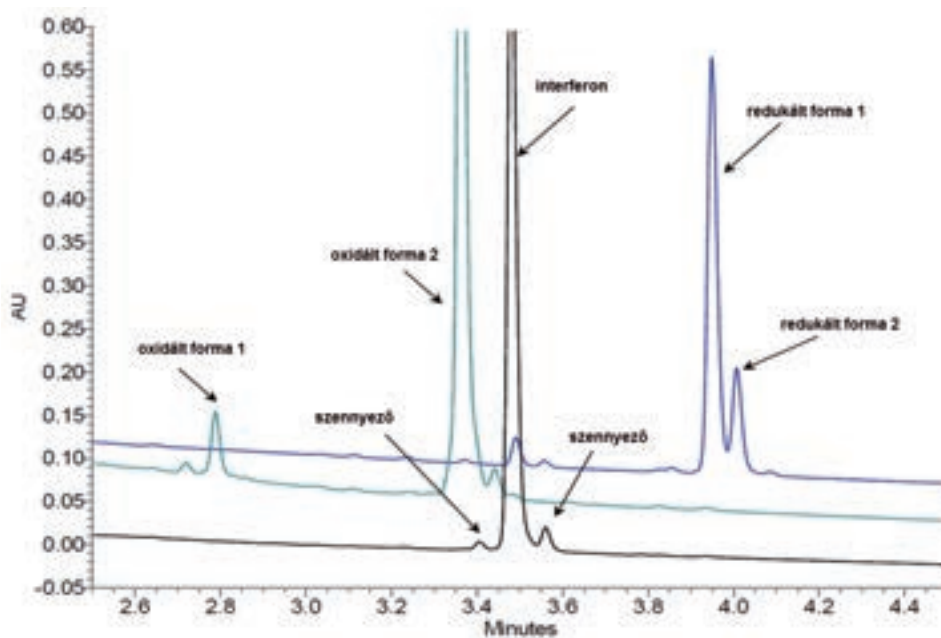
Más a helyzet, ha nagymolekulák elválasztását tervezzük. A peptidek és fehérjék lényegesen „lomhábbak”, mint a kismolekulák. Esetükben a hosszirányú diffúzió hatása elhanyagolható és elsősorban a szemcsén belüli anyagátadás lesz az, ami meghatározza a zónaszélesedést (**C** tag a van Deemter egyenletben). A 27. ábrán a redukált tányérmagasság alakulását mutatjuk be a redukált sebesség függvényében egy szteroidra, inzulinra és egy 10 kDa tömegű fehérjére. Ebből következik, hogy fehérjék elválasztására a kis szemcsén belüli diffúziós úthosszakkal rendelkező héjszerkezetű szemcsék hatékony elválasztásokat tesznek lehetővé.



27. ábra: A redukált tányérmagasság függése a redukált lineáris sebességtől különböző móltömegű komponensekre (szteroid /300 g/mol/, inzulin /5,7 kDa/ és egy 10 kDa tömegű fehérje).

Az újgenerációs héjszerkezetű töltetek nagy sikerét bizonyítja, hogy a megjelenésük óta eltelt 6 - 7 év alatt rengeteg alkalmazást dolgoztak ki ezekre a kolonnákra. Néhány példát mi is bemutatunk.

Fehérjék elválasztására tervezték az Aeris névre keresztelt nagy pórusú 3,6 μm -es töltetet. Csak a 2011-es év végén került kereskedelmi forgalomba, de mára el is terjedt a fehérjeanalitikai laboratóriumokban. A 28. ábrán egy 19 kDa tömegű terápiás fehérje (interferon-alfa-2a) tisztaságvizsgálatára mutatunk be egy példát. A példában egy 150 x 2,1 mm-es Aeris C18 kolonnát alkalmaztunk. Fehérjék fordított fázisú elválasztásánál általában magas hőmérsékleten ($T \geq 60\text{ }^\circ\text{C}$) dolgozunk, ezzel gyorsítva a diffúziós folyamatokat. Egy gyors (5 perces) gradienst alkalmazva, megfelelő elválasztással mérhetők a fehérje oxidált és redukált bomlástermékei. A csúcsalak és csúcsszélesség is figyelemreméltó.



28. ábra: Interferon alfa-2a oxidált és redukált bomlástermékeinek gyors és hatékony elválasztása nagypórusú, héjszerkezetű töltetes kolonnán.

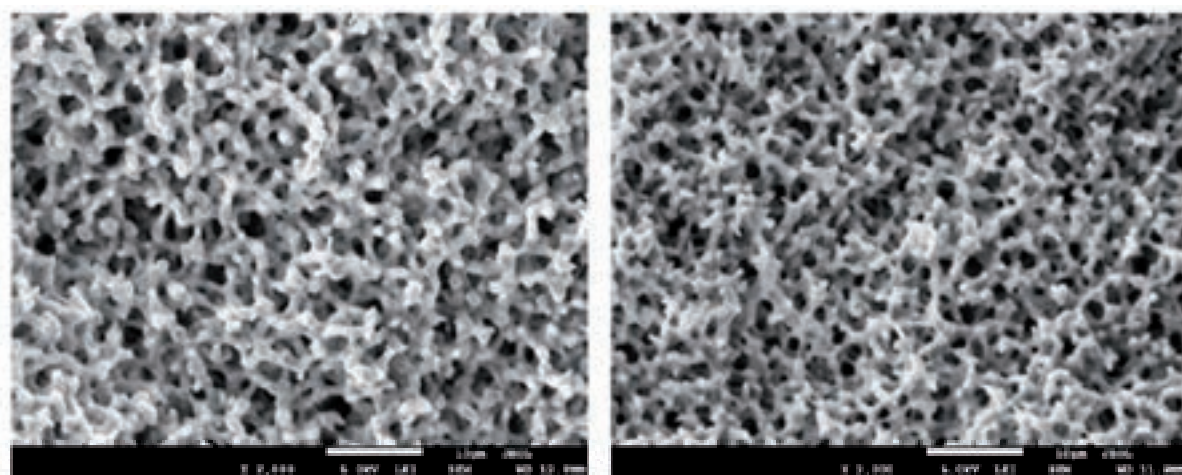
Ajánlott és felhasznált irodalom a 3.3. fejezethez:

- (1) G. Guiochon, F. Gritti, Shell particles: Trials, tribulations and triumphs, Journal of Chromatography A 1218 (2011) 1915-1938.
- (2) A. Felinger, Diffusion time in core-shell packing materials, Journal of Chromatography A 1218 (2011) 1939-1941.
- (3) S.A. Schuster, B.M. Wagner, B.E. Boyes, J.J. Kirkland, Optimized superficially porous particles for protein separations, Journal of Chromatography A 1315 (2013) 118-126.
- (4) Davy Guillarme, Jean-Luc Veuthey ed., UHPLC in Life Sciences (2012) Royal Society of Chemistry
- (5) S. Fekete, D. Guillarme, Kinetic evaluation of new generation of column packed with 1.3 μm core-shell particles, Journal of Chromatography A 1308 (2013) 104-113.

3.4. Monolit kolonnák

A monolit szó eredeti jelentése nagy kő. Kromatográfiás szempontból ez annyit jelent, hogy egyetlen polimer alkotja a töltetet, amelyben kétfajta pórus található (szilikagél alapú monolitok esetén). A nagyobbik pórus átmérője 1 - 3 μm , ezt nevezzük átfolyó pórusnak, míg a szilárd polimerben található a mezopórusok, amelyek a komponensek megkötődését biztosítják. A kereskedelmi forgalomban mind szerves polimer, mind szilikagél alapú monolit kolonnák kaphatók. Először a szilikagél alapú monolitok tulajdonságait foglaljuk össze.

Úttörő munkát végzett ezen a területen Hjertén, Svec, Horváth, Tanaka és az általuk kialakított műhelyek és azok munkatársai. Kereskedelmi forgalomban a Merck és a Phenomenex cég által forgalmazott termékek vannak kereskedelmi forgalomban (Chromolith, illetve Onyx). Az utóbbi a Merck szabadalma alapján gyártja a kolonnát. Az első generációs szilikagél alapú monolit 2000-ben került kereskedelmi forgalomba. 2011-ben jelent meg a továbbfejlesztett változat, ami a második generációs monolit nevet kapta. A töltetek elektronmikroszkópos felvételét a 29. ábrán mutatjuk be.



29.ábra: Első (balra) és második generációs (jobbra), szilikagél alapú monolitok elektronmikroszkópos felvételei.

A 29. ábrán a világos részek adják a szilikagél alapvázat (skeleton), míg a sötét részek a nagy átmérőjű pórusokat (átfolyó pórusok). A szerkezet olyan szivacshoz hasonlít, ahol a pórusok nyitottak és egymással összeköttetésben vannak. A mozgófázis áramlása ezekben a μm -es nagyságrendű pórusokban történik. Ahogy a 29. ábrán is jól látható, a pórusok átmérője közel állandó. Ebből következik, hogy áramlási ellenállás oldaláról nézve nincs szűk keresztmetszet, amelyet a szemcsés töltetknél a legkisebb átmérőjű csatorna ad meg. Töltetes kolonnáknál az áramlási csatornák átmérőjét a szemcseátmérőből lehet becsülni. Szabályos alakú, gömbszimmetrikus töltetknél ez általában a szemcseátmérő 1/3 része. Tehát egy 3 μm -es töltetnél ez 1 μm -nek felel meg. Ez csak akkor igaz, ha a töltés során a

részecskék nem sérülnek és a szemcseátmérő eloszlás szűk és az átlagos szemcseátmérőnél sokkal kisebb szemcséket töltés előtt eltávolították. A mozgófázis áramlása ezekben az egymással összeköttetésben lévő pórusokban történik, míg a visszatartást a vázban lévő mezopórusok adják meg. Az áramlást lehetővé tevő pórusok átmérője 1 - 3 μm , a visszatartást eredményező mezopórusok átlagos átmérője 10 - 20 nm, a kereskedelmi forgalomban lévő első generáció monolit 13 nm volt. Ennek a töltetnek a fajlagos felülete nagyobb, mint 100 m^2/g , ami megfelel a szemcsés töltetknél mért értékeknek. Az ábrából az is látható, hogy a pórustérfogat (sötétebb rész) aránya nagy a váz (világosabb rész) arányához képest (kis fázisarány). A monolit kolonna porozitása, összevetve a szemcsés töltetű kolonnákkal, sokkal nagyobb. Ez megszabja a kolonna áramlási ellenállását (permeabilitását), és ebből következik, hogy ugyanolyan térfogat-áramlási sebességhez sokkal kisebb nyomásesés tartozik. Ez igaz mind a szilikagél alapú, mind a szerves polimer alapú monolitokra. Az első monolitok 10 cm hosszúak voltak, nagy áramlási sebesség mellett használták azokat az elemzési idő csökkentése érdekében. Ezek nem feleltek meg a folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) csatolt technikának. Ez vezetett el az ultragyors monolit kialakításához. Először a kolonna hosszát csökkentették 5 majd 2,5 cm-re, majd a kolonna belső átmérőjét 4,6 mm-ről 3, majd 2 mm-re. Az 5 cm hosszú 2 mm átmérőjű monolit kolonna (Chromolith FastGradient) jól alkalmazható LC-MS módszerekhez, illetve UHPLC készülékekben használva gyors és hatékony elválasztások megvalósítására.

Az egybefüggő, és közel azonos átmérőjű pórusok a kolonna permeabilitását nagyban növelik. Elméletileg visszajutunk a klasszikus Kármán-Kozeny összefüggéshez. A folyadékkromatográfias gyakorlatban használt gyakori formája:

$$K_v = \frac{\varepsilon^3}{180(1-\varepsilon)^2} d_p^2 \quad (34)$$

ahol a K_v jelenti a kolonna permeabilitását, d_p a szemcsés töltetű kolonnánál a szemcseátmérőt, mint karakterisztikus paramétert (domain size), mely monolit kolonnánál az áramlást biztosító pórusok átmérőjének és a szilárd fázis vastagságának az összege. A kolonna porozitását a hagyományos módon tudjuk értékelni, nevezetesen a kolonnán belül található üres térfogat és a kolonna ösztérfogatának hányadosaként. A permeabilitás és a kolonnán létrejövő nyomásesés között a következő összefüggés teremt függvény kapcsolatot:

$$K_v = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta p} \quad (35)$$

Átrendezve az egyenletet Δp -re a következő összefüggést kapjuk:

$$\Delta p = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{K_v} \quad (36)$$

Tehát a kolonna áramlási ellenállása (permeabilitása) közvetlenül megszabja a kolonnán a nyomásesést. Ez viszont a kolonna porozitásával függ össze. Szilikagél alapú monolit kolonnáknál a teljes porozitás $\epsilon_T \sim 81\%$. Szemcsés kolonnáknál, amelyeket a hagyományos HPLC és UHPLC technikánál használunk ez az érték 50 - 70 % ugyan, de az áramlási csatormákat adó szemcsék közötti porozitás kisebb, mint 40 %, ehhez járul a nem egyenletes csatorna-átmérő, aminek következtében a K_v értéke tovább csökken. Bevezethetjük a ϕ paramétert, amely az áramlási ellenállással arányos tényező:

$$\phi = \frac{d_p^2}{K_v} = \frac{d_{dom}^2}{K_v} \quad (37)$$

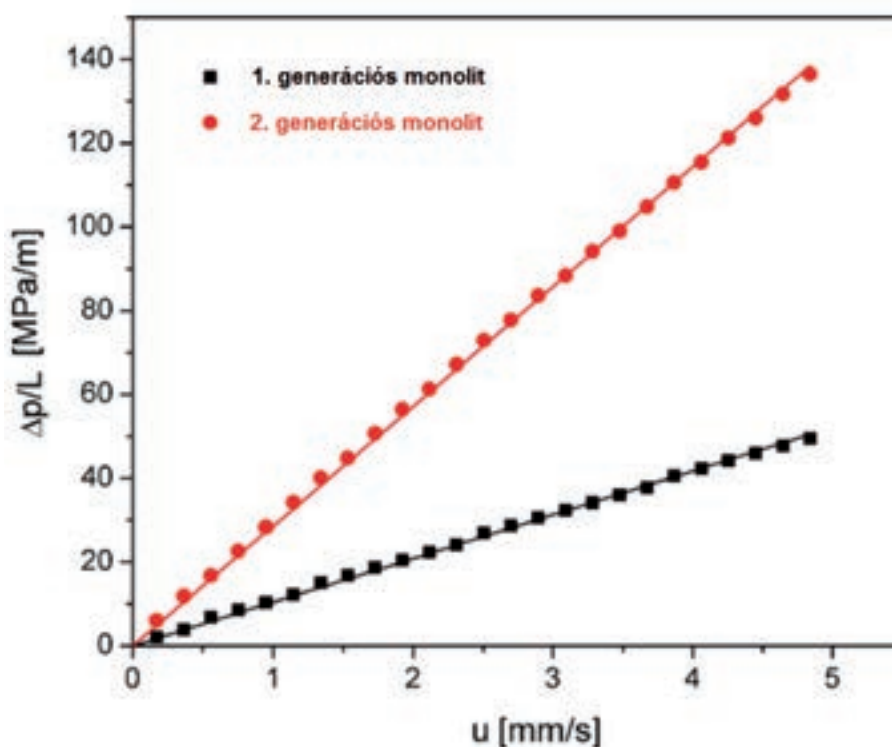
Az összefüggés egyértelmű függvénykapcsolatot ad a karakterisztikus méret (szemcseméret vagy domain méret $/d_{dom}/$) és az áramlási ellenállás, valamint a karakterisztikus méret és a ϕ között. A monolit kolonnáknál, ahol az átfolyó pórus és a váz átmérő viszonya közel állandó, a ϕ értéke is állandó, összevetve egy $5 \mu\text{m}$ átlagos szemcseátmérőjű kolonnával, közel egy nagyságrenddel kisebb. Az áramlási ellenállás tehát kevésbé szab határt az elemzések gyorsításának. Ha figyelembe vesszük a kolonna által elért tányérszámot, a retenciós időt és a létrejövő nyomásesést (azaz a permeabilitást), akkor a kolonna abszolút teljesítménye az elválasztási ellenállással (E) definiálható. Ez a dimenziómentes mérőszám kifejezi, hogy egy adott hatékonyság milyen „áron” (nyomáson) érhető el:

$$E = \frac{t_0 \Delta p}{N^2 \eta (1+k)} \quad (38)$$

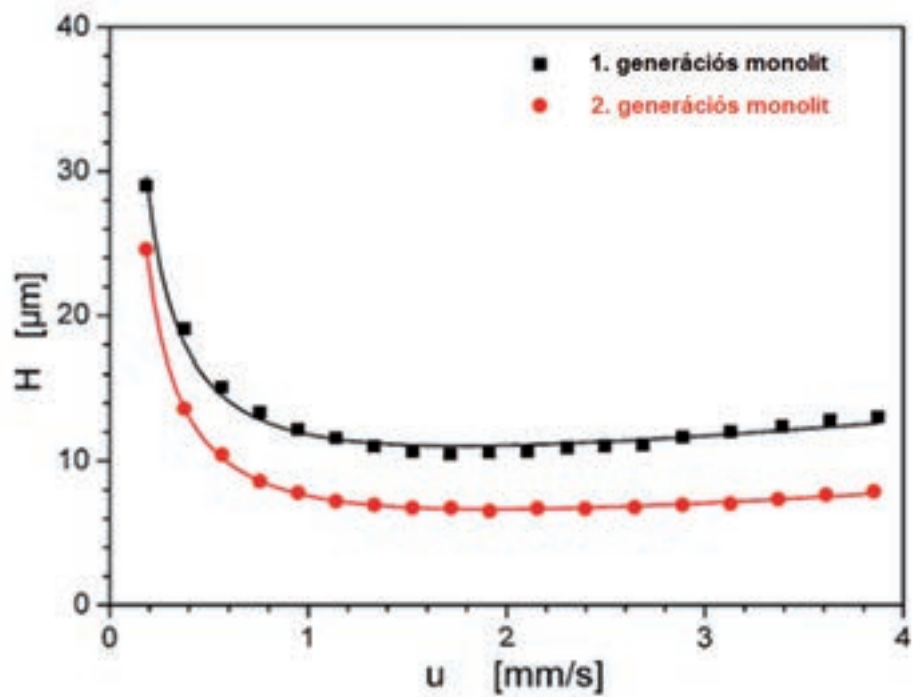
Ha a ma használt monolit kolonnát $5 \mu\text{m}$ szemcseátmérőjű kolonna kinetikai hatékonyságával vetjük össze, akkor a két rendszer csak a nyomásesésben különbözik és így az elválasztási ellenállás tizede a monolit kolonnák alkalmazásakor. A monolit kolonnák elméletileg nagy lehetőséget adnak a gyors elválasztásokra, az elválasztási ellenállásuk igen kedvező, sok esetben jobb, mint a szemcsés tölteteké. Gyakorlatban azonban technikai problémák okozzák, hogy az elméletinél kisebb hatékonyságot lehet velük elérni. Ezt a nemrég megjelent második generációs monolit töltetek részben kiküszöbölik, ahol az átfolyó pórusok egyenletességének növelésével nagyobb kinetikai hatékonyságot tudtak elérni. A

második generációs monolit porozitása azonos az első generációséval, viszont az átfolyó pórusok és a falvastagság valamivel kisebbek, mint az elődjénél voltak. Ennek következménye természetesen az áramlási ellenállás növekedése. Azonos dimenziójú második generációs kolonnán – azonos térfogat áram mellett – kb. két és félszer nagyobb nyomás esik, mint egy első generációs monoliton. A 30. ábrán a két oszlopon létrejövő nyomásesést mutatjuk be a lineáris sebesség függvényében, míg a 31. ábrán a két oszloppal elérhető tányérmagasságokat hasonlítjuk össze. A szilikagél alapú monolit kolonnákat rúd formában állítják elő (32. ábra) és műanyag házban kerülnek forgalomba (poliéter-éter-keton, PEEK), ez behatárolja az alkalmazható felső nyomást, ami ~200 bar.

Amennyiben a monolit kolonnán a nyomásesést 200 bar-ra korlátozzuk, még így is képesek lehetünk 6-9 mL/perc térfogatárammal dolgozni ezeken a kolonnákon (a mozgófázis összetételétől, viszkozitásától függően). A térfogatáramlási sebesség jelentős növelésével az elemzési idő nagymértékben csökkenthető.



30. ábra: Nyomásesés összehasonlítása első és második generációs szilika monolitok között
Oszlopdimenzió: 100 x 4,6 mm, mozgófázis: acetonitril-víz 40/60 v/v.



31. ábra: H - u görbék összehasonlítása első és második generációs szilika monolitok között
 Oszlopdimenzió: $100 \times 4,6$ mm, mozgófázis: acetonitril-víz 40/60 v/v, teszt komponens: butilbenzén.



32. ábra: Szilikagél monolit rudak és a PEEK házak.

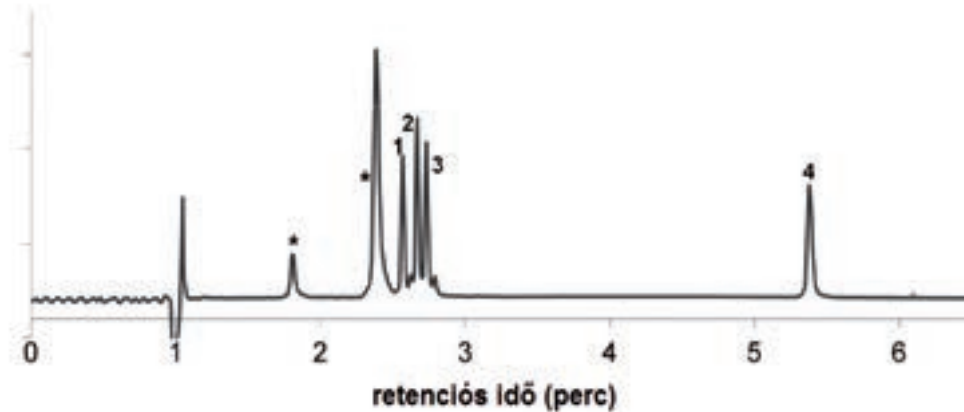
Meg kell említenünk a szerves polimer alapú (polimetakrilát, poliakrilamid, polisztirol-divinilbenzol) monolitokat is, amelyeket elsősorban makromolekulák (fehérjék, peptidek, oligonukleotidok) elválasztására alkalmaznak sikeresen. Elsősorban jó pH- és hőstabilitásuk, valamint a szilanol csoportok hiányából eredő – káros másodlagos kölcsönhatások, ioncserés hajlam hiánya miatti – kedvező tulajdonságaik miatt terjedtek el a fehérje analitikában. Kereskedelmi forgalomban a Thermo Scientific cég ProSwift név alatt megjelent kolonnái (RP-1S, RP-2H, RP-3U és RP-10R) kaphatók. Nagy előnyük, hogy a fehérjék kevésbé adszorbeálódnak a szerves polimer alapú állófázisokon, azaz jobb visszanyeréssel dolgozhatunk ezeken a kolonnákon, mint a szilikagél alapú állófázisokon. Hátrányuk viszont, hogy a mezopórusos szerkezet hiánya miatt, a felbontó erejük és terhelhetőségük lényegesen kisebb, mint a szilikagél alapú monolitoknak. A 4. táblázatban a kereskedelmi forgalomban kapható monolit kolonnákat foglaltuk össze.

4. táblázat: Kereskedelmi forgalomban megjelent monolit kolonnák.

gyártó	kolonna/termék neve	átfolyópórus (μm)	mezopórus (nm)	állófázisok
Merck	Chromolith (1. generáció)	1,9	12-13	RP-18, RP-8
	Chromolith (2. generáció)	1,2	14-15	Si, CN, NH ₂ , Diol
Phenomenex	Onyx	1,9	12	C8, C18
Thermo Scientific	Proswift RP-1S	1,0	-	
	Proswift RP-2H	2,2	-	fenil
	Proswift RP-3U	5,1	-	
	Proswift RP-10R	nem ismert	-	

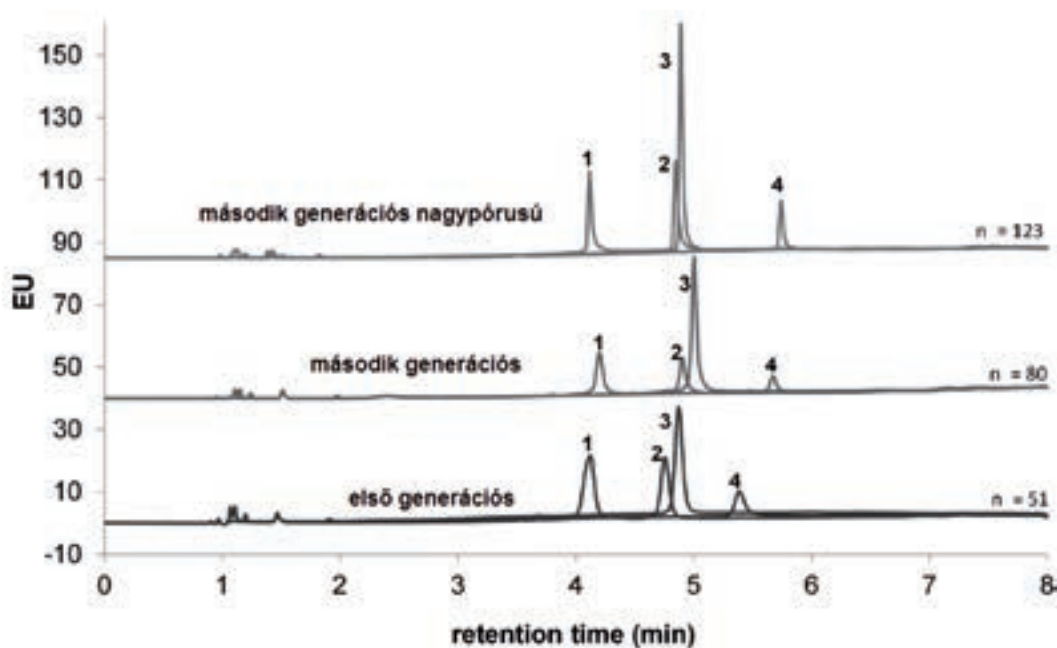
A fehérjeanalitikában elvileg nagy áttörést jelenthetnének a nagy pórusú szilikagél alapú monolitok (pl. 20 - 30 nm-es pórusok). Kísérleti fázisban már léteznek 26 nm-es mezopórusokkal rendelkező második generációs szilika monolitok, és valóban jól teljesítenek peptid és fehérje elválasztásokban. Egy nemrég megjelent tanulmány számos fehérje elválasztási példával igazolta a nagypórusú szilika monolitok létjogosultságát.

Jelenleg a szilikagél alapú monolitok nem terjedtek el, a kismolekulás gyógyszeranalitikában a teljesen porózus és héjszerkezetű töltetek uralkodnak. Fehérjeanalitikában a fordított fázisú elválasztásokra viszont gyakran alkalmaznak szerves polimer alapú monolitokat. A 33. ábra négy különböző inzulin és két konzerválószer készítmény gyors elválasztását mutatjuk be nagy pórusú, második generációs szilikagél alapú monoliton.



33. ábra: Inzulinok (1-4) és konzerváló- segédanyagok (*) gyors elválasztása, második generációs nagy pórusú szilikagél alapú monoliton (kísérleti minta, jelenleg nem kapható kereskedelmi forgalomban). Kolonna: 100 x 4,6 mm, mozgófázis "A" 0,1% trifluoecetsav vízben, mozgófázis "B" 0,1% trifluoecetsav acetonitrilben. Gradiens program: 25-60% "B" 6 perc alatt. Térfogat áram: 1,5 mL/perc; kolonna hőmérséklet: 45 °C; injektált térfogat: 5 µL, detektálás: UV 210 nm.

A 34. ábra pedig az első-, második- és második generációs nagypórusú szilika monolitok hatékonyságát veti össze 19 kDa fehérje és bomlástermékeinek elválasztására. Az ábrákon feltüntetett csúcskapacitások (n) egyértelműen növekedő tendenciát mutatnak a monolit kolonna generáció fejlődésével. A méréseket azonos mérési körülmények mellett és azonos oszlopdimenzióval végezték.



34. ábra: 19 kDa tömegű fehérje és bomlástermékeinek gyors elválasztása, első-, második- és második generációs nagypórusú szilikagél alapú monoliton (kísérleti minta, jelenleg nem kapható kereskedelmi forgalomban). Kolonna: 100 x 4,6 mm, 7 perces gradiens program 1,5 mL/perc áramlási sebesség mellett; kolonna hőmérséklet: 45 °C; injektált térfogat: 3 µL.

A folyadékromatográfias rendszerek majd mindegyike lehetővé teszi, hogy mérés során a térfogatáramlási sebességet időben változtassuk. A megnövelt térfogatáramlási sebességgel arányosan csökken az elemzési idő. A szemcsés töltetknél ritkán alkalmazzuk a térfogatáramlási sebesség időbeli változtatását két okból is, egyrészt a nyomásesés az adott kolonnán az áramlási sebességgel arányosan nő, másrészt a kinetikai hatékonyság az anyag átadási ellenállás miatt csökken (**H** nő). A kis szemcseátmérőjű töltetknél az áramlási sebesség az elméleti tányérmagasság csak kis mértékben nő, az elválasztás hatékonyságára gyakorolt hatása még kisebb. A nyomásesés még kis hosszúságú kolonnák esetén sem teszi lehetővé nagyobb térfogatáramlási sebesség alkalmazását. Monolit kolonnák használatakor egyrészt az áramlási ellenállás közel egy nagyságrenddel kisebb, másrészt a **H** értéke csak kis mértékben függ attól. Ezzel lehetővé válik az elemzési idő csökkentése az elválasztás hatékonyságának csökkenése nélkül.

Az általánosított karakterisztikus paraméter monolit kolonnáknál a már említett „domain size” (d_d). A d_d és az elméleti tányérszám közötti összefüggés alapján megállapítható, hogy a nagy lineáris sebesség értékeknél a **H** érték veszteség kismértékű (lásd 31. ábra). Ez annyit jelent, hogy a térfogatáramlási sebességet növelhetjük jelentős elválasztási veszteség nélkül. A csúcsfelbontás csökkenése ugyanis **H** négyzetgyökének reciprokától függ (lásd 1. fejezetben):

$$R_s \sim \frac{1}{\sqrt{H}} \quad (39)$$

Monolit kolonnákra gyakran szokták felírni a következő tényéregyenletet:

$$H = \frac{1}{\frac{1}{C_0 d_d} + \left(\frac{1}{(C_m d_d^2 u) / D_M} \right)} + \frac{C_d D_M}{u} + \frac{C_{sm} d_d^2 u}{D_M} \quad (40)$$

A fenti összefüggést szemcsés töltetű kolonnákra dolgozták ki, ahol a C_0 , C_m , C_{sm} és a C_d a mozgófázis okozta anyagátadási ellenállást jellemzik. Amennyiben a szemcseátmérőt a karakterisztikus (domain size) paraméterrel helyettesítjük, akkor az első generációs monolit viselkedését (amennyiben csak az elméleti tányérmagasságot vesszük figyelembe), a kinetikai hatékonyság oldaláról nézve úgy értelmezhetjük, mintha a kolonna egy 3 - 4 μm -es szemcsés töltettel lenne töltve. A második generációs szilika monolit pedig egy 2,5 - 3 μm -es szemcsés töltetű kolonnához hasonló tányérszámokat produkál.

Monolitokra jellemző, hogy a megnövelt térfogat áramlási sebesség (elméletileg a lineáris áramlási sebesség), csak kismértékű elválasztás csökkenést ad (ha a 3 – 4 μm -es szemcsés

töltetekhez hasonlítjuk). A kinetikai hatékonyság oldaláról nézve ezt több publikáció is alátámasztotta.

A monolit morfológiája – csakúgy, mint a töltetes kolonnánál – megszabja a kromatográfiás hatékonyságot és a kolonnán létrejövő nyomásesést. Első lépés az átfolyó pórusok átmérőjének meghatározása és a szilikagél váz átmérőjének meghatározása. Az első paraméter megszabja a kolonna hidrodinamikai paramétereit (áramlási ellenállását), a második az anyagátadási ellenállást. A két jellemző paraméter mérését pásztázó (scanning) elektron mikroszkópiával (SEM) végzik el a szárítási lépés után. Ahogy a szemcsés töltetű kolonnánál fontos a szemcseátmérő-eloszlás, a monolitoknál az átfolyó pórusok egyenletessége. Ezt a monolit rúd hosszirányú metszetének vizsgálatával tudják ellenőrizni. Hidrodinamikai szempontból az azonos falvastagságú monolitoknál a nagyobb átmérőjű az előnyösebb.

Az átfolyó pórusok átmérőjét 1 - 8 μm között lehet változtatni az ismert előállítási módszerekkel. Az összefüggés értelmében a 8 μm -es töltetnél hatvannégyszer kisebb az áramlási ellenállás. Ez működési paraméter szempontjából annyit jelent, hogy 64-szer gyorsabb elválasztást tudunk elérni. A mai körülmények között ez jelenti az ún. „high through put” technikát. Az áramlás a csatornában lamináris, ekkor viszont a nagyobb átfolyó pórus átmérő a megnövekedett diffúziós úthossz miatt nagyobb elméleti tényérmagasságot jelent. Ebből az következne, hogy a nagyobb kinetikai hatékonyság elérésére tehát a kisebb átfolyó pórusátmérőjű monolit kolonnák a megfelelőek. Az áramlási rendellenességek a kis átmérőjű csatornában nagyok. Desmet és munkatársai elméletben bizonyították, hogy a nagyobb porozitású monolitoknál kisebb a zónaszélesedés. A kinetikai hatékonyságot a szilikagél váz nagysága is megszabja. Az általánosan alkalmazott monolit kolonnánál a vázban található pórusok a mezopórus tartományba esnek (10 - 15 nm). Ebben a pórusátmérő tartományban a folyadék stagnál a pórusokban csakúgy, mint a szemcsés tölteteknél. A komponensek diffúzióval jutnak be és ki a mozgófázisba. A kinetikai hatékonyság ismételten diffúzió kontrollált. A hatékonyságot az szabja meg, hogy milyen hosszú a diffúziós úthossz és milyen mértékben gátolt a diffúzió a pórusokban, továbbá a pórusok geometriája. A diffúziós úthosszt a falvastagság szabja meg, minél kisebb a szilárd váz vastagsága, annál kevesebb a deszorpciós lépés időigénye. A hatékony elválasztáshoz tehát kis falvastagságú és nagy átfolyó pórusátmérőjű monolit kolonnák a megfelelőek. Irodalmi adatok alapján, ha a karakterisztikus méret 5,8 μm , akkor 15 μm körüli elméleti tényérmagasság várható, ha a karakterisztikus méret 2,9 μm akkor az elméleti tényérmagasság várhatóan 5 μm .

A jelenlegi kolonna technológia mellett azt a becslést adhatjuk, hogy az első esetben egy 7,5 μm -es, míg a második esetben egy 2,5 μm -es szemcsés töltetű kolonnával válthatnánk ki a monolit kolonnát, ha csak a hatékonyságot nézzük.

Amennyiben a szilikagél vázban a pórusok átmérője olyan nagy, hogy a folyadék áramolni tud ott is, akkor a diffúziós hatások csökkennek, a konvekció jelentősen lecsökkenti az anyagátadási ellenállást, és a monolitok hatékonysága jelentősen nő. Előzetes kísérleti eredmények alapján ez 140 nm-nél nagyobb pórusúaknál lehetséges.

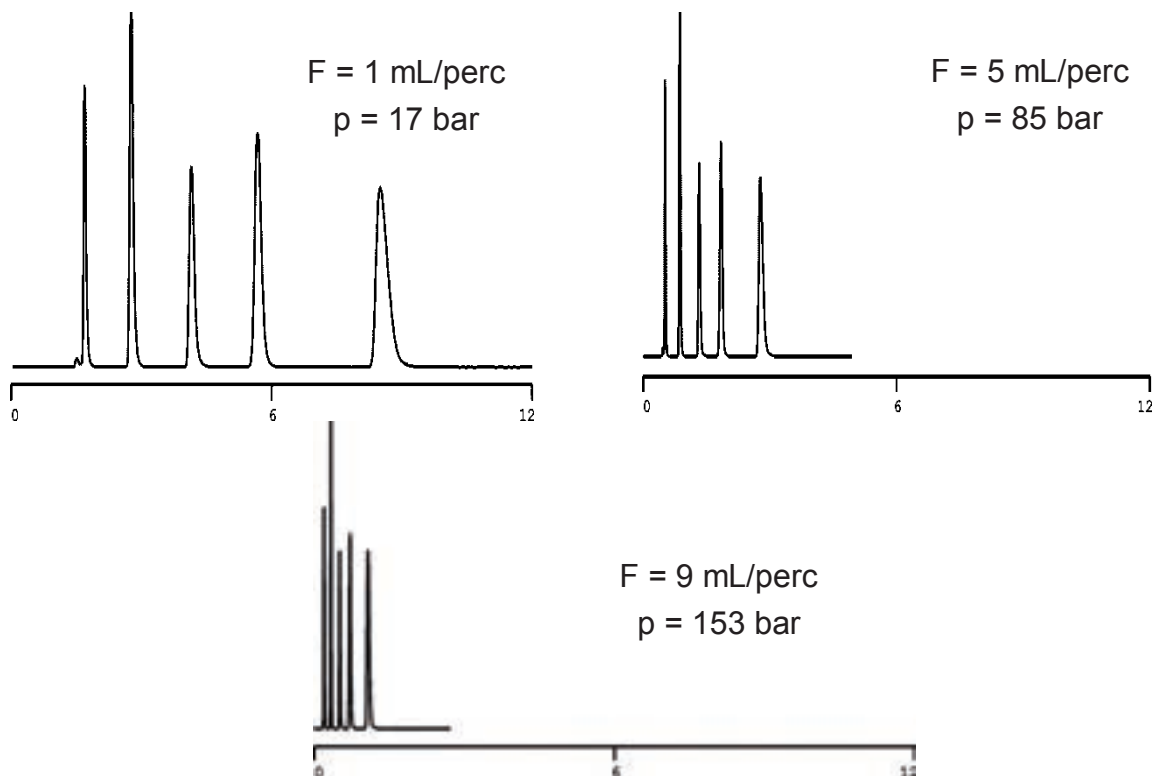
A második összehasonlítási alap a pórus gátolt diffúzió nagysága. Ez viszont közvetlen kapcsolatban van a pórusok geometriájával. A hatás különösen a kémiaileg módosított töltetknél válik érzékelhetővé. Ehhez kapcsolódnak a fajlagos felület megadásával és mérésével kapcsolatos problémák és a fajlagos pórustérfogat kérdése. A folyadékkromatográfiás kolonnákat előállítók a töltet specifikációjánál megadják ugyan a fajlagos felületet, de ez az alapfázisra (szilikagélre) vonatkozik, nem a módosítottra. A mérést a fizikai-kémiai gyakorlatban jól ismert BET mérési és számítási mód alapján végzik.

Elsőnek nézzük a pórus geometriát. A hagyományos folyadékkromatográfiás tölteteknek, amelyeket kis molekulatömegű anyagok elválasztására használunk, a pórusátmérője 20 nm alatt van. A pórusok a nem porózus szilikagél részecskékből jöttek létre úgy, hogy azok egymással kapcsolódtak, az így kialakult szerkezetet globuláris szerkezetnek nevezzük. A pórusok alakja nem szabályos, vannak benne kis görbületű részek és tintásüveg alakú (zárt) pórusok is keletkeznek. Kinetikai hatékonyság szempontjából a hengerszerű, átmenő pórusok a kedvezők. Az 1 - 2 μm falvastagságú szilikagél monolit kolonnánál az átmenő pórusok valószínűsége nagyobb, kisebb a valószínűsége a tintásüveg alakú pórusoknak. Tehát az alap szilikagél (módosítás előtti) pórusszerkezete kinetikai hatékonyság szempontjából jobb. Meg kell jegyezni, hogy a nagy pórusátmérőjű töltetknél más a helyzet, mert hidrotermikus kezelés hatására a pórusszerkezet átalakul, és a globuláris szerkezet eltűnik, helyette a pórusalakok hengerszimmetrikusak lesznek. Módosításnál, a kapcsolódó részekenél a nagy térigényű módosítószer nem férnek hozzá a szilanol csoportokhoz. Mivel a monolit kolonnák pórusszerkezete jobb, ezért a felületi módosítás elméletileg nagyobb, és energetikailag homogén felületet eredményez.

A visszatartás oldaláról nézve a fajlagos felület növekedésével ez az érték is nő. Az előzőekben jeleztük, hogy a gyártók a fajlagos felületet az alap szilikagélre adják meg, melyet BET módszerrel határoznak meg. Biztos, hogy módosítás után kisebb lesz a töltet fajlagos felülete, mint a módosítás előtt. A mérésnek több elvi problémája van, az első, hogy a nitrogén kis molekula, így messze túlbecsüli a folyadékkromatográfiás elválasztásnál tapasztalt hasznos felületet. Ezt egyesek úgy veszik figyelembe, hogy a nitrogén helyszükségletét megnövelik. Mérések alapján még ez is nagyon messze esik a folyadékkromatográfiásan realizálhatótól. Ez az érték oktadecil csoporttal módosított szilikagélnél 2 - 3 nm-re van a felülettől, amely a nitrogénnel végzett mérési eredményekből számolható. Az eddigi tapasztalataink azt mutatják, hogy monolit kolonnánál az egységnyi felületre jutó retenció nagyobb, mint az azonos fajlagos felületű szemcsés töltetnél

tapasztalattal, így közvetett bizonyíték van arra, hogy a globuláris szerkezet adta kedvezőtlen pórus szerkezet kisebb mértékű.

A továbbiakban példát mutatunk be egy elválasztás gyorsítására. A 35. ábrán β -blokkolók elválasztását szemléltetjük 1, 5, illetve 9 mL/perc térfogatáram mellett.



35. ábra: Chromolith™ Performance RP-18e kolonna (100 x 4,6 mm), elválasztott anyagok: β -blokkolók, térfogatáramlási sebesség: 1, 5 illetve 9 mL/perc, nyomásesés a kolonnán: 17, 85, illetve 153 bar. Az X tengelyen az időt adjuk meg.

Az ábrán látható, hogy még 9 mL/perc térfogatáramlási sebességnél is csak 153 bar a nyomásesés, viszont az elemzési idő 10 percről 1,5 perc alá csökkent. A hagyományos folyadékkromatográfiai készülékekkel általában 10 mL/perc a legnagyobb térfogatáramlási sebesség. Tehát lehetőségünk van, hogy a térfogatáramlási sebességet növeljük. Az utolsó ábrán látható kromatogramnál az elemzési idő 1 perc körüli. Nézzük meg, hogy ez milyen hatással van az elválasztásra. Az elválasztás hatékonysága 9 mL/perc térfogat áramlási sebességnél: a kromatográfiai csúcsok közti elválasztás csak kis mértékben csökkent, a kromatográfiai rendszer minta átbocsátó kapacitása viszont jelentősen nőtt.

A bemutatott monolit kolonna alkalmazásának előnye (azon túl, hogy a hagyományos HPLC rendszeren alkalmazható) az is, hogy sem térfogati, sem tömeg túlterhelés nincs az eddig alkalmazott kolonnákhoz képest. Gyakorlati oldalról nézve ez annyit jelent, hogy a megszokott 10 - 20 μ l minta mennyiség adagolható a kinetikai hatékonyság csökkenése nélkül.

A gyorsaság nemcsak az analitikai elválasztásoknál fontos, hanem a félpreparatív és preparatív elválasztásoknál is. Ahhoz, hogy a monolit kolonnák terhelhetőségét növeljék a gyártott kolonnák átmérőjét meg kellett növelni. A rúd (töltet) átmérőjének növelésekor az egyenletes monolit kialakítás nehezebb feladat. A félpreparatív monolit jellemzői gyakorlatilag megegyeznek az analitikai monolitével, a preparatívnál az átfolyó pórusok átmérője 3 μm , az analitikainál ez az érték 2 μm . A méretnövelés törvényeit kihasználva gyors preparatív elválasztások valósíthatók meg ezzel a megoldással. A 10 mm-es kolonna alkalmazásával a kolonna terhelhetősége $(10/4,6)^2$ szerint megnő. A kis nyomásesés miatt az elválasztás sebessége megnövelhető. Az analitikai folyadékromatográfiában alkalmazott 10 mL/min térfogatáramlási sebesség gátat jelent ennek, tehát a monolit kolonnák félpreparatív alkalmazásához nagyobb szállító teljesítményű nagynyomású szivattyú kell. Ennél a technikánál az a cél, hogy az ismeretlen szerkezetű anyagból, amely lehet szennyező vagy bomlástermék, például a gyógyszer alapanyagoknál, vagy toxikus anyagok esetén környezetvédelmi mintában, annyit nyerjünk kevés számú adagolásból, amely a szerkezetvizsgálati és/vagy toxikológiai vizsgálatokra elegendő.

Összegezve az előzőekben leírtakat a szilikagél alapú monolit kolonnák alkalmazása a gyakorlati problémák megoldásában a következő előnyökkel jár:

- a hagyományos HPLC-ben (4,6 mm-es kolonnával) általánosan alkalmazott 1-2 mL/min térfogatáramlási sebességek helyett akár 6 - 9 mL/perc térfogatárammal is dolgozhatunk
- a hagyományos (400 bar felső nyomás) készülékeknél alkalmazható
- a kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások nem minden esetben kívánnak meg új készülék konstrukciót (nem annyira jó a kinetikai hatékonyságuk)
- elméletileg ez adja a legkisebb elválasztási ellenállást, ami főleg a nagyfelbontású elválasztásokban jelent előnyt (sok kolonnát lehet sorba kapcsolni)
- amennyiben a retenciók idők között nagy a különbség, az elemzési időt csökkenteni lehet a térfogatáramlási sebesség programozásával

Hátrányai közül a ma kapható kolonnák alapján az mondható el, hogy a kolonna felületi kémiája korlátozott. Ez annyit jelent, hogy elsődlegesen az oktadecil és oktil módosítású fázisok kaphatók, de újonnan megjelentek a normál fázisú és HILIC elválasztásokra is alkalmas állófázisok (4. táblázat). Meg kell jegyezni, hogy a mai technológiai fejlődés mellett ez csak időlegesnek tekinthető. Várhatóan a jövőben mindazok a kémiai ismert és elterjedt töltetek megjelennek, amelyek már ismertek a szemcsés töltetekenél.

A szilikagél alapú monolitok gyártástechnológiáját az I. Mellékletben részleteztük. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható Chromolith kolonnák jellemzőit a II. – IV. Mellékletben foglaltuk össze. További alkalmazási példákat mutatunk be a V. – XVIII. Mellékletekben.

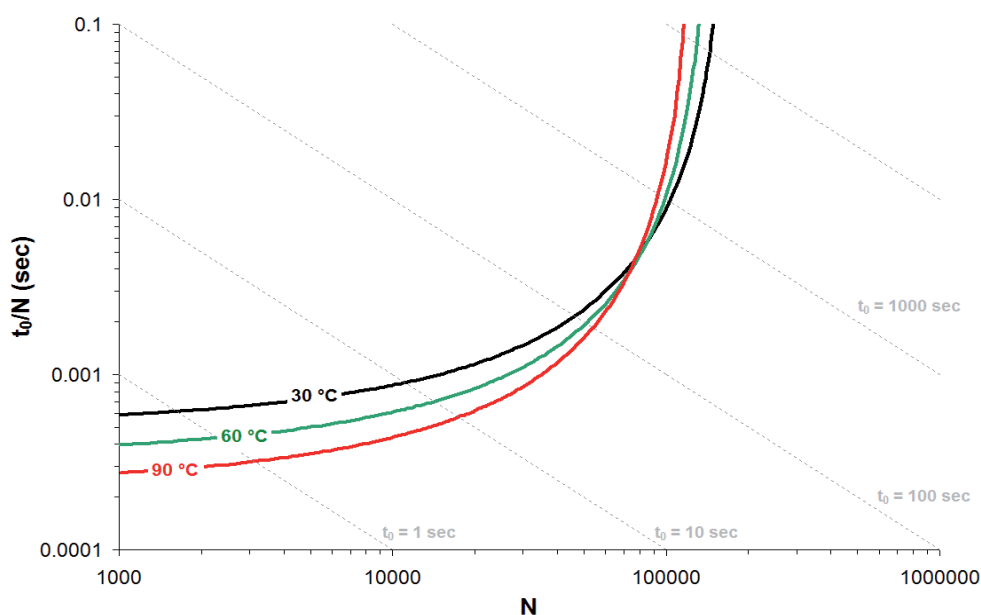
Ajánlott és felhasznált irodalom a 3.4. fejezethez:

- (1) G. Guiochon, Monolithic column in high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1168 (2007) 101-168.
- (2) Dr. Fekete Jenő, *A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai*, Merck Kft, Budapest, 2008.
- (3) K. Hormann, T. Müllner, S. Bruns, A. Höltzel, U. Tallarek, Morphology and separation efficiency of a new generation of analytical silica monoliths, *Journal of Chromatography A* 1222 (2012) 46-58.
- (4) K. Vuignier, S. Fekete, P.A. Carrupt, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of various silica-based monoliths for the analysis of large biomolecules, *Journal of separation sciences*, 36 (2013) 2231–2243.
- (5) D. Cabooter, K. Broeckhoven, R. Sterken, A. Vanmessen, I. Vandendael, K. Nakanishi, S. Deridder, Gert Desmet, Detailed characterization of the kinetic performance of first and second generation silica monolithic columns for reversed-phase chromatography separations, *Journal of Chromatography A* 1325 (2014) 72-82.
- (6) K.K. Unger, N. Tanaka, E. Machtejevas, *Monolithic Silicas in Separation Science: Concepts, Syntheses, Characterization, Modeling and Applications*, 2011. Wiley-VCH Inc. New York

3.5 Nagyhőmérsékletű elválasztások

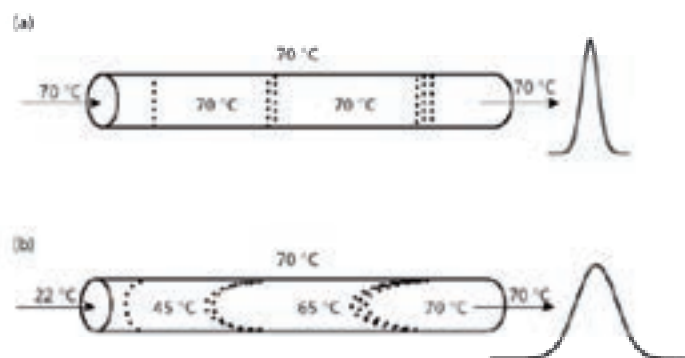
A folyadékkromatográfiai elválasztások sebessége gyorsítható a mozgófázis hőmérsékletének emelésével is. A hőmérséklet emelésével ugyanis csökken a mozgófázis viszkozitása és gyorsul az anyagátadás (nő a diffúziós állandó). A **H-u** görbék optimuma a nagyobb lineáris sebességek irányába tolódik el és felszálló águk (**C** tagra jellemző tartomány) meredeksége csökken. Ez könnyen belátható a 28. egyenletből, hiszen a lineáris sebesség optimuma a diffúziós állandó négyzetgyökével arányos. A csökkent viszkozitás miatt a nyomásesés is kisebb lesz, tehát a lineáris sebességet tudjuk fokozni anélkül, hogy nagy nyomás teljesítményre volna szükség. Elméletileg tehát nagyon ígéretes a mozgófázis hőmérsékletének emelése. Természetesen a hőmérséklet előnyös hatását már nagyon korán felismerték és 1969-ben a technikát HTLC-nek (High Temperature Liquid Chromatography) nevezték el. Antia és Horváth különösen nagy előnyöket tapasztalt makromolekulák elválasztásakor. Később, 1995-ben Chen és Horváth fehérjéket választott el 120 °C-os mozgófázis hőmérsékletet alkalmazva, az elválasztás mindössze 10 másodperces volt! Akkoriban ez megdöbbentette a kromatográfiai világot, senki nem gondolta, hogy fehérjéket lehet ilyen magas hőmérsékleten vizsgálni. Azóta viszont a 70 - 90 °C-os mozgófázis hőmérséklet teljesen rutinszerű lett a fehérjék fordított fázisú elválasztásaiban. Makromolekulák anyagátadási tulajdonságai nagymértékben javíthatók a diffúziós tulajdonságok fokozásával. A molekulák diffúziós állandóját pedig elsősorban a hőmérséklet szabja meg.

Az ún. kinetikus görbék módszerével (lásd 4. fejezet) is egyszerűen lehet szemléltetni a hőmérséklet elválasztási időre gyakorolt hatását. Ekkor még figyelembe kell vennünk a viszkozitás csökkenését is. A 36. ábra egy 1,7 µm-es töltettel 30, 60 és 90 °C-on várható időegységre eső tányérszám (t_0/N) értékeit mutatja be. Egyértelműen látható a várható analízis idő csökkenése (kisebb t_0/N értékek) a kisebb tányérszám tartományokban. Például ha $N = 6000$, akkor, ha 30 °C-ról 90 °C-ra emeljük a hőmérsékletet, elvileg kb. felére csökkenthető az elemzési idő (ez persze nagyban függ az alkalmazott mozgófázistól, illetve attól, hogy viszkozitása hogyan változik a hőmérséklettel, és hogy a komponensek retenció tulajdonságai hogyan függenek a hőmérséklettől).



36. ábra: A mozgófázis hőmérsékletének hatása az időegység alatt elérhető tányérszámra (1,7 μm -es tölteten).

A HTLC-s módszerek egyik kritikus eleme a mozgófázis megfelelő előmelegítése (pre-heating). Ennek már 60 °C felett is döntő jelentősége lehet. Nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában a csúcsalak nagymértékben függ az előfűtött mozgófázis tömegétől (pre-heater térfogattól), az adagolt térfogattól és a mintaoldat oldószerétől. Azok a készülékek, amelyek csak az oszlopteret fűtik (lehet statikus vagy dinamikus fűtés pl. levegőkevertetéssel), általában nem használhatóak 60 °C feletti elválasztásokhoz. A 37. ábrán szemléltetjük a mozgófázis előfűtés szerepét. A kolonna után viszont a mozgófázis lehűtésére van szükség, hogy a káros detektorzajokat csökkentsük. A detektor cella termosztálása nélkülözhetetlen, illetve megfelelő hosszúságú összekötő vezetékre van szükség a kolonna kimenete és detektor cella között, hogy a lehűlés megtörténhessen. Ez természetesen növeli a kolonnán kívüli térfogatokat.



37. ábra: Csúcsszélesedés a nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában mozgófázis előfűtést alkalmazva (a), illetve csak a kolonna teret fűtve (b).

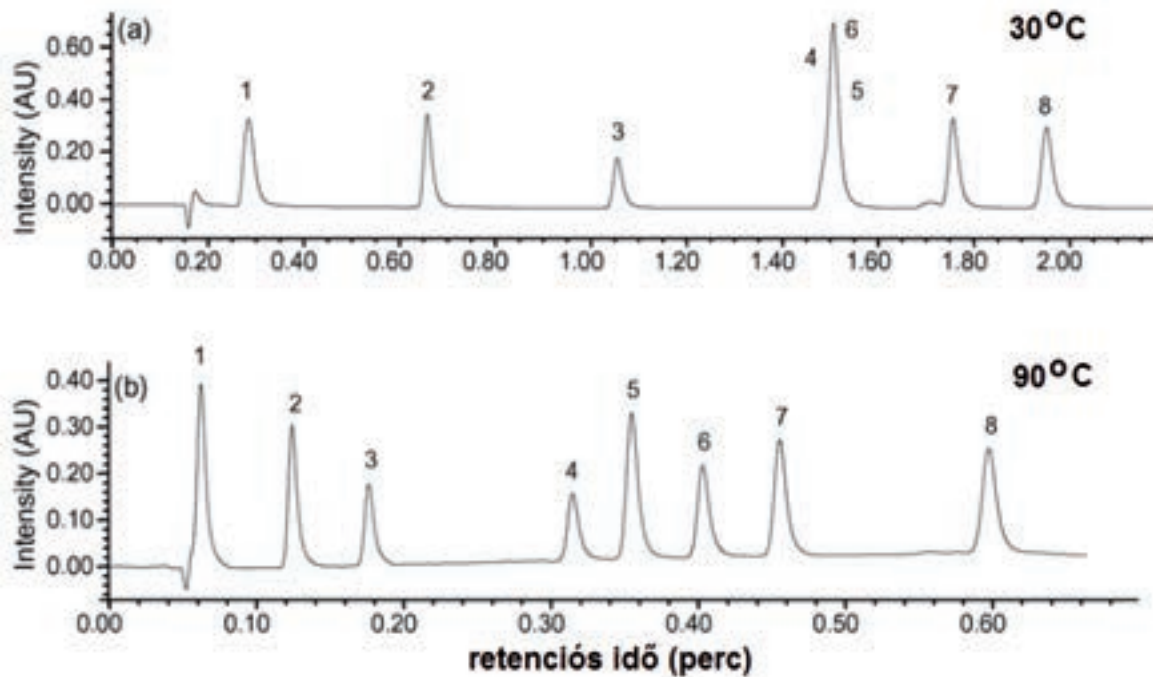
A nagyhőmérsékletű elválasztások nem nagyon terjedtek el a gyakorlatban, persze van néhány speciális terület, ahol jól alkalmazhatók. Ennek két fő oka van, kevés hőstabil állófázis kapható kereskedelmi forgalomban, illetve a nem hő-stabil komponensek lehetséges kolonnán létrejövő termikus bomlása. Állófázis oldalról elsősorban a cirkónium-oxid alapú töltetek ugyan ígéretesek, de a retenciós tulajdonságok lényegesen eltérnek a szilikagél alapú töltetekhez képest, ezért a gyógyszeripar még „nem fogadta el” ezt a típusú állófázist. Néhány szerves polimer és grafit alapú állófázis is igen jó hőstabilitási tulajdonságokat mutat, akár 150 - 200 °C-ig is alkalmazhatóak.

Jelenleg a hőmérséklet adta lehetőségeket elsősorban az elválasztás szelektivitásának módosítására/hangolására használjuk, nem pedig a módszerek gyorsítására. Ebből a célból a mozgófázis hőmérsékletét általában 30 - 60 °C között szoktuk változtatni. A komponens visszatartása a hőmérséklettel a következő általános összefüggéssel írható le (van't Hoff egyenlet):

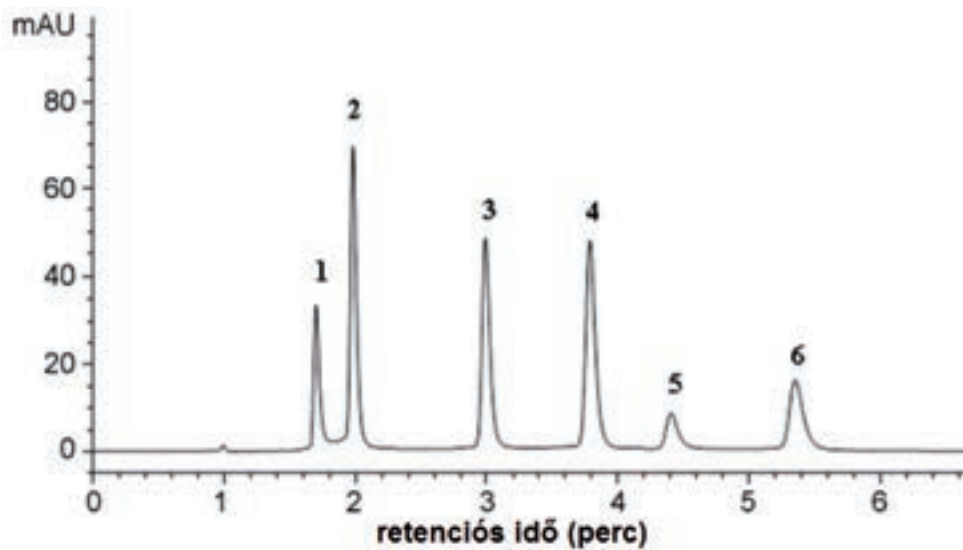
$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (41)$$

ahol ΔH a standard entalpiaváltozás, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, ΔS a standard entrópia változás, β pedig a fázisarány. A hőmérséklet emelésével a visszatartás általában csökken. Ha konformációs változás következik be a hőmérséklet-változtatással – főleg peptidek vagy fehérjék vizsgálatakor – akkor bizonyos esetekben a visszatartás növekedhet, ahogy emeljük a mozgófázis hőmérsékletét (pl. inzulin).

A 60 - 90 °C-on végzett elválasztásoknak nagy jelentősége lehet az UHPLC és HTLC technikák kombinálásakor. A kis szemcsés töltetek alkalmazása megemelt hőmérsékleten nagyon ígéretes lehet, hiszen a viszkozitást csökkentjük, azaz nagyobb térfogatárammal is tudunk dolgozni. Szerencsés esetben a szelektivitás is kedvezően alakulhat a magasabb hőmérsékleten, ekkor jelentősen csökkenthetjük az elválasztás idejét. Erre mutat egy példát a 38. ábra. Egy másik gyógyszeranalitikai példa pedig levonorgesztrell szennyezők elválasztását mutatja be 150 °C-on (39. ábra). A szerzők cirkónium-dioxid alapú állófázist és metanol-víz mozgófázist alkalmaztak. Izokratikus módban 6 komponenst választottak el 6 percen belül.



38. ábra: Kismolekulás gyógyszerhatóanyagok elválasztása 1,7 μm -es tölteten 30, illetve 90 °C-on. Kolonna: Acquity BEH C18 (30 x 2,1 mm), mozgófázis: acetonitril – víz (0,1 % hangyasav) gradiens elúció, komponensek: (1) paracetamol, (2) phenazone, (3) phenobarbital, (4) methylphenobarbital, (5) propyphenazone, (6) nitrazepam, (7) flunitrazepam, (8) diazepam.



39. ábra: Levonorgesztrell szennyezőinek elválasztása nagy hőmérsékleten ($T = 150\text{ °C}$), cirkónium-oxid alapú állófázison, metanol-víz mozgófázist alkalmazva.

Ajánlott és felhasznált irodalom a 3.5. fejezethez:

- (1) T. Teutenberg, High-temperature liquid chromatography, A user's guide for method development, (2010) Royal Society of Chemistry
- (2) F.D. Antia, Cs. Horváth, High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for the rapid separation of large molecules, Journal of Chromatography A 435 (1988) 1-15.
- (3) D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Heinisch, M.P. Barrioulet, J.L. Rocca, S. Rudaz, J.L. Veuthey, High throughput liquid chromatography with sub-2 μm particles at high pressure and high temperature, Journal of Chromatography A 1167 (2007) 76-84.
- (4) R. Berta, M. Babják, M. Gazdag, A study of some practical aspects of high temperature liquid chromatography in pharmaceutical applications, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 54 (2011) 458-462.

4. Kinetikus görbék módszerének alapjai

A gyakorlatban általában arra vagyunk kíváncsiak, hogy melyik kolonna adja a leggyorsabb vagy a legnagyobb hatékonyságú elválasztást. Eddig szó esett a van Deemter típusú (**H-u**) görbékről, amelyek megmutatják, hogy adott kolonnával milyen elméleti tényérmagasság érhető el egy adott lineáris sebesség (vagy mozgófázis térfogatáram) tartományban. Ezekkel a görbékkel összehasonlíthatjuk a különböző kolonnákat aszerint, hogy melyik kolonna ad jobb tényérszámot egy adott lineáris sebességnél. Viszont ezek a **H-u** görbék nem adnak tájékoztatást arról, hogy egy adott elválasztás mennyi időt igényel, illetve hogy mi is az a maximális tényérszám vagy leggyorsabb elválasztás, ami megvalósítható az adott kolonnával. A 3.4 fejezetben részletezett elválasztási ellenállás ugyan már egy átfogóbb képet ad a kolonnák hatékonyságáról és permeabilitásáról, de még mindig nem elegendő ahhoz, hogy meghatározzuk az adott kolonnával maximálisan elérhető tényérszámot. Hogy ilyen következtetéseket vonjunk le, figyelembe kell vennünk a kolonnák mechanikai stabilitását is (nyomásállóságát) és a készülékünk maximális működtetési nyomását. Másik nehézség a **H-u** görbékkel a különböző morfológiájú töltetek összehasonlítása, hiszen a karakterisztikus tulajdonságok eltérőek egy monolitnál, egy teljesen porózus vagy egy héjszerkezetű szemcsés töltetnél.

A kinetikus görbék módszerével – a kísérletileg felvett **H-u** adatokat felhasználva – egyszerűen elvégezhetjük az analízis idő és tényérszám „extrapolálását” egy adott (pl. maximális) nyomásértékre. Így megtudhatjuk, hogy mi a maximálisan elérhető tényérszám adott analízis időn belül, illetve hogy mi a legrövidebb idő egy adott tényérszám megvalósítására. Ehhez először kísérletileg meg kell határoznunk a kolonna permeabilitását (lásd 35. egyenlet).

Ezután, – a mozgófázis viszkozitásának ismeretében – egy adott nyomásesésre (Δp_{\max}) egyszerűen kiszámolhatjuk t_0 (holtidő), illetve N (tényérszám) extrapolált értékét az alábbi összefüggéseket alkalmazva:

$$t_0 = \frac{\Delta p_{\max}}{\eta} \left(\frac{K_v}{u_2} \right) \quad (42)$$

$$N = \frac{\Delta p_{\max}}{\eta} \left(\frac{K_v}{uH} \right) \quad (43)$$

Ahhoz, hogy a kolonnák permeabilitását nagyságrendileg érzékelnünk tudjuk, számszerűleg megadunk néhány adatot a monolit és a szemcsés töltetű kolonnákra (5. táblázat).

5. táblázat: Néhány gyakori, modern kolonna permeabilitása és morfológiai jellemzői.

Gyártó/kolonna	szemcse- vagy átfolyópórus méret (μm)	morfológia	permeabilitás (cm^2)	mechanikai stabilitás (bar)
Merck Chromolith 1. generációs	1,9	monolit	$7,4 \times 10^{-10}$	200
Merck Chromolith 2. generációs	1,2	monolit	$2,7 \times 10^{-10}$	200
Phenomenex Kinetex	5	$\rho = 0,76$	$2,5 \times 10^{-10}$	600
Phenomenex Kinetex	2,6	$\rho = 0,73$	$5,5 \times 10^{-11}$	600
Phenomenex Kinetex	1,7	$\rho = 0,73$	$3,1 \times 10^{-11}$	1000
Phenomenex Kinetex	1,3	$\rho = 0,69$	$1,7 \times 10^{-11}$	1000
Waters Cortecs	1,6	$\rho = 0,70$	$3,5 \times 10^{-11}$	1200
Waters Acquity BEH	1,7	porózus	$3,6 \times 10^{-11}$	1000

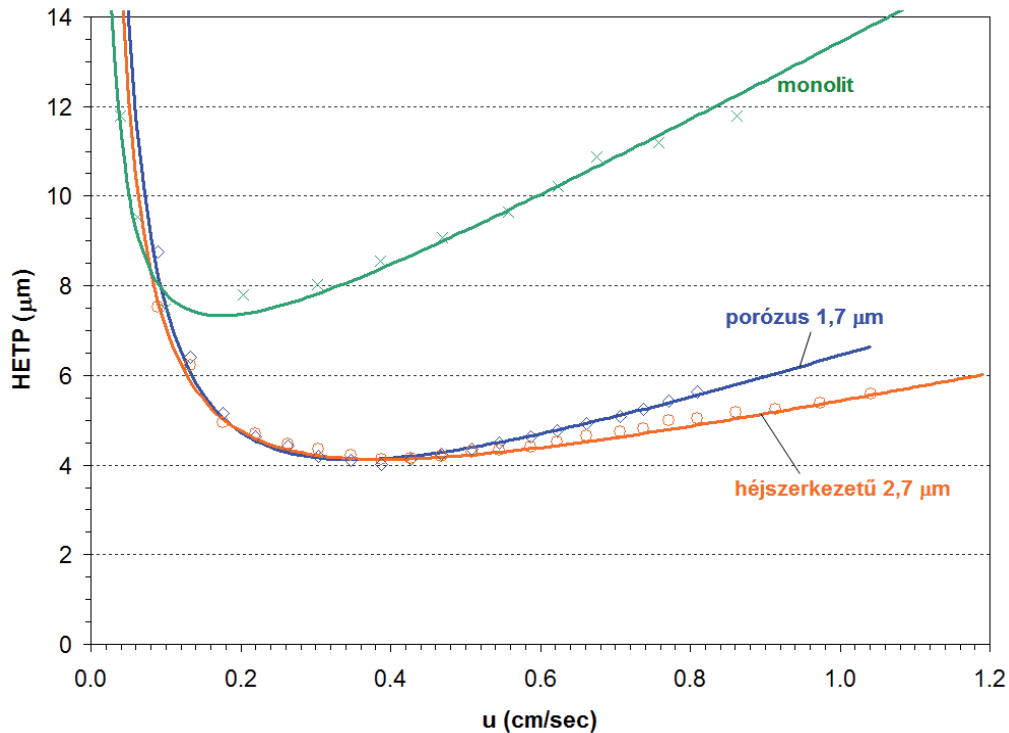
A kapott adatokat többféle képpen is ábrázolhatjuk. Leggyakrabban a t_0 , t_0/N vagy t_0/N^2 értékeket szoktuk megjeleníteni a tányérszám függvényében. Mindhárom érték arányos az analízis idővel. Továbbá az adott tányérszámhoz tartozó kolonna hossz is meghatározható, hiszen kísérletileg megmértük a H értékeket és kiszámoltuk a maximális nyomáshoz tartozó tányérszámot. A kettő szorzata megadja azt a kolonnahosszt, amivel az adott tányérszám elérhető:

$$L = \frac{\Delta p_{\max} K_V}{\eta u} \quad (44)$$

4.1. Eltérő morfológiájú töltetek összehasonlítása

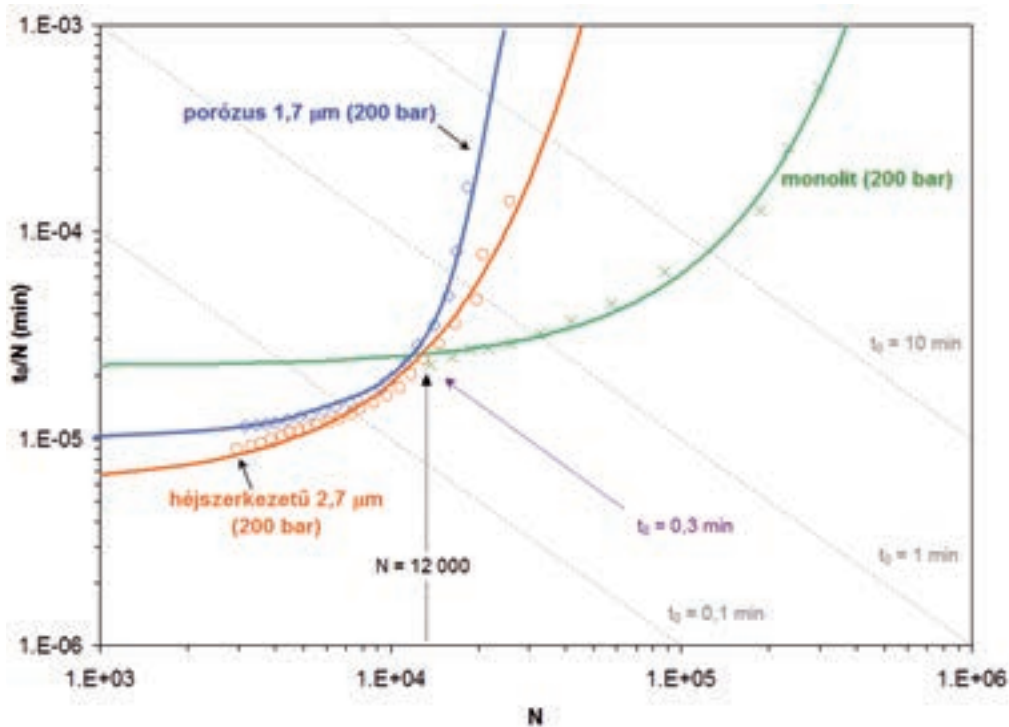
A kinetikus görbék módszerének egyik leggyakoribb alkalmazási területe a különböző típusú (morfológiájú) töltetek lehetőségeinek összehasonlítása. Példa kedvéért hasonlítsunk össze egy második generációs monolit, egy 1,7 μm -es teljesen porózus töltet és egy 2,7 μm -es héjszerkezetű töltet kinetikai hatékonyságát butilparabén tesztvegyület alkalmazásával. Acetonitril-víz 60/40 v/v eleggyel eluálva 30 °C-os mozgófázis hőmérsékletet alkalmazva a butilparabén mindhárom kolonnáról (C18 fázisok) $k = 6 - 8$ visszatartással eluálódik. Ez a k érték megfelel a kolonna hatékonyságok összehasonlítására, mert ilyen k -nál a csúcsvariancia már elég nagy és a készülék zónaszélesítő hatása már elhanyagolható lesz (de természetesen korrigálhatunk is a készülék varianciára). Először fel kell vennünk a H - u

görbékét. Ez annyit jelent, hogy különböző térfogatáramok mellett megmérjük a tányérszámot. A kolonnahosszakat ismerve ezután átszámoljuk **H** értékre a tányérszámokat. Először érdemes a **H-u** görbékét szemügyre venni (40. ábra).



40. ábra: Butilparabén tesztvegyülettel mért **H-u** görbék monolit, teljesen porózus és héjszerkezetű töltettel.

A 40. ábrán bemutatott **H-u** görbe annyit árul el, hogy a monolit kolonna adja a legkisebb tányérszámokat (legnagyobb HETP érték) és a héjszerkezetű 2,7 μm-es, valamint a teljesen porózus 1,7 μm-es töltetekkel körülbelül azonos maximális tányérszám (**H_{min}**) érhető el. Viszont nem tudunk meg semmit az elválasztások időigényéről. Hogy erről is információt nyerjünk, a (42) és (43) egyenlet alapján a **H-u** görbe pontjait transzformálni kell egy adott nyomáshoz tartozó **t₀** és **N** értékre. Ehhez először szükségünk lesz a mozgófázis viszkozitására. Ezt irodalomban közölt táblázatokból vehetjük, illetve számos empirikus összefüggést is találhatunk az irodalomban. Akár kísérletileg is meghatározhatjuk például a Hagen-Poiseuille összefüggés alapján. Megjegyezzük, hogy a viszkozitás nagyban függ az alkalmazott hőmérséklettől és valamennyire a nyomástól is. A példánkban irodalmi adatok alapján vegyünk $\eta = 0.73$ cP-t. A következő kérdés, hogy az adatok transzformációjakor milyen értéken rögzítsük a nyomást? Először nézzük meg, hogy mi történik $\Delta p_{\max} = 200$ bar nyomáson, hiszen ez a monolit kolonna alkalmazható maximális működtetési nyomása. A (42) és (43) egyenletek szerint számolva majd ábrázolva a **t₀/N** hányadost az **N** függvényében a következő görbékét kapjuk (41. ábra).



41. ábra: $t_0/N - N$ típusú kinetikus görbék, $\eta = 0.73 \text{ cP}$, $\Delta p_{max} = 200 \text{ bar}$.

A 41. ábra arról tanúskodik, hogy annak ellenére, hogy a monolit kolonna viszonylag kis tányérszámokat produkál, mégis a leggyorsabb elválasztást adja, ha $N > 12\,000$ elméleti tányérra van szükségünk. (A rutin gyakorlatban legtöbbször $N = 5000 - 40\,000$ tányérszámok között dolgozunk, a kinetikus görbéken ez az N tartomány a legfontosabb a gyakorlati elválasztások szempontjából.) A t_0/N érték arányos az analízis idővel ($t_r = t_0(k+1)$), minél alacsonyabban fut a görbe, annál gyorsabb az elválasztás. Az ábrán az $N > 12\,000$ tartományban ez a görbe fut a legalacsonyabban. Továbbá az is látszik, hogyha $12\,000$ -nél kisebb tányérszám is elegendő az adott elválasztáshoz, akkor azt leggyorsabban a héjszerkezetű töltettel tudjuk elérni (ebben a tartományban ez a görbe fut alul). A kis permeabilitású $1,7 \mu\text{m}$ -es teljesen porózus töltet nem a legjobb választás, mert 200 bar maximálisan megengedett nyomáson nem tudjuk kihasználni a lehetőségeit. A kis permeabilitású és nagy hatékonyságú töltetek elsősorban nagy nyomás alkalmazása mellett hasznosak.

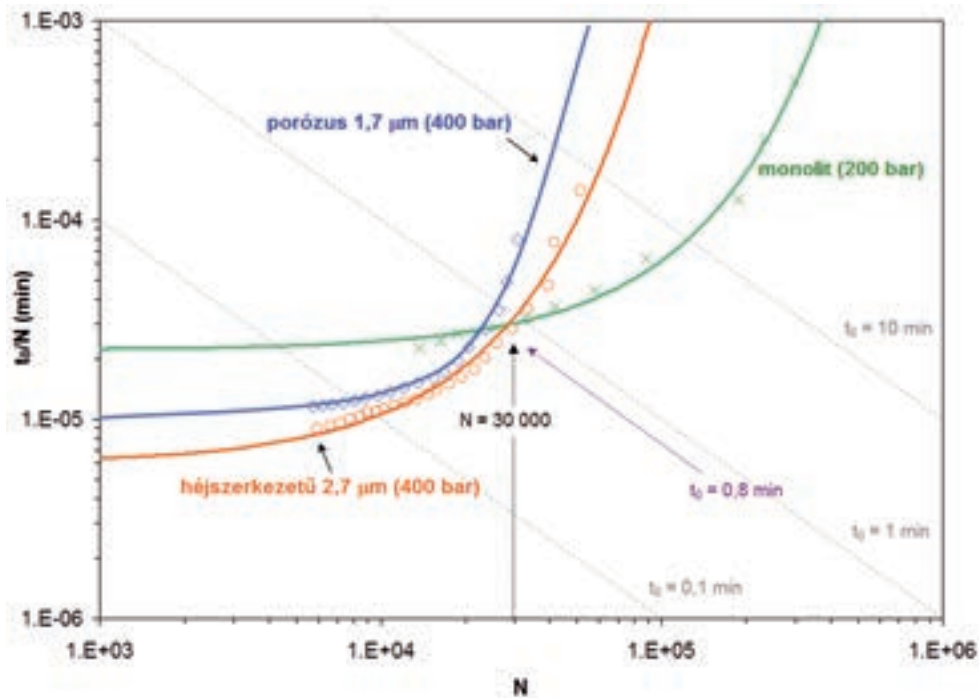
Arra is van mód, hogy megjelenítsük az ábrán az adott tányérszám eléréséhez szükséges holtidőt (t_0). A tipikusan jelölt értékek általában a $t_0 = 0,1, 1$ és 10 perc (ezek a rutin gyakorlatban előforduló jellemző holtidők). Ha ábrázoljuk az adott N értékhez tartozó t_0/N hányadosokat, akkor a kolonnához tartozó görbék és az adott t_0 egyenesek metszéspontja jelzi a kolonnával elérhető tányérszámhoz tartozó holtidőt. A 41. ábrán láthatjuk, hogy az $N = 12\,000$ tányérszámhoz $t_0 = 0,3$ perc tartozik. Ez azt jelenti, hogy egy $k = 10$ visszatartással eluálódó komponens esetén a retenciós idő (analízis időigénye) $t_r = 3,3$

perc mind a monolit, mind a héjszerkezetű tölteten. Míg a kis permeabilitású 1,7 µm-es tölteten, ehhez a tányérszámhoz körülbelül $t_0 = 0,4$ perc azaz $t_r = 4,4$ perc ($k = 10$) tartozik.

Fontos megjegyezni, hogy a görbe pontjai más-más kolonnahosszaknak felelnek meg, mivel a görbe az adott nyomáshoz tartozó ún. kinetikai határt ábrázolja. Ez annyit jelent, hogy az eredetileg különböző mozgófázis sebességekkel felvett N értékeket egy adott maximális nyomásra extrapolálunk. Tehát ha például egy 5 cm-es (2,1 mm átmérőjű) 1,7 µm-es töltetű kolonnát 0,1 mL/perc térfogatárammal működtetve az adott körülmények között $p = 65$ bar nyomás esett, akkor $p = 200$ bar nyomásra extrapolálva egy 15,4 cm-es kolonnát tudnánk üzemeltetni az adott 0,1 mL/perc térfogatárammal. Viszont ezen a 200 bar-on, ha 0,5 mL/perc térfogatárammal akarunk dolgozni, akkor csak egy 3,1 cm hosszú kolonna alkalmazására van lehetőségünk. Ezen a rövid kolonnán nyilván nem tudunk nagy tányérszámokat elérni. Tehát a kinetikus görbék elsősorban elméleti jelentőségűek (a gyakorlatban nem tudunk alkalmazni 3,1 vagy 15,4 cm hosszúságú kolonnákat), de nagyon jó támpontot adnak ahhoz, hogy adott tányérszám és rendelkezésre álló nyomás tartományban melyik kolonnát érdemes használni, hogy az analízis idő a lehető legrövidebb legyen.

Nézzük meg, mi történik, ha az említett oszlopokat egy konvencionális HPLC készülékben akarjuk üzemeltetni a lehető legnagyobb nyomáson (400 bar). A monolit kolonna görbéje nem fog változni, hiszen a PEEK ház miatt nem tudunk 200 bar-nál nagyobb nyomáson dolgozni. Viszont a szemcsés tölteteket minden további nélkül használhatjuk 400 bar nyomáson. Ekkor a kinetikus görbék a következő módon alakulnak (42. ábra).

Azt láthatjuk, hogy a szemcsés töltetű kolonnákhoz tartozó görbék a jobb irányba tolódtak és a görbék metszéspontjai változtak. Logikus módon a nagyobb maximális nyomáson a héjszerkezetű töltet és monolit kolonna görbéjének metszéspontja a nagyobb tányérszámok irányába tolódott. A monolit kolonna most már „csak” az $N > 30\,000$ tartományban adja a leggyorsabb elválasztást. A gyakorlati szempontból igen fontos $N = 5000 - 30\,000$ tartományban a 2,7 µm-es héjszerkezetű töltettel lehet a leggyorsabb elválasztásokat végezni. Ez abból fakad, hogy az új generációs héjszerkezetű 2,5 – 2,7 µm-es töltetekkel elérhető H értékek nagyon hasonlóak az 1,7 - 1,9 µm-es teljesen porózus töltetekkel elérhető értékekhez, viszont a 2,5 – 2,7 µm-es töltetek permeabilitása kb. kétszer nagyobb. Példánkban 400 bar nyomáson dolgozva a 2,7 µm-es töltettel az $N = 30\,000$ tányérszámhoz $t_0 = 0,8$ perc tartozik, ami megfelel egy 8,8 perces elválasztásnak ($k = 10$). Továbbá kb. 1 perces elválasztással is már $N \sim 10\,000$ elérhető! Azaz hagyományos HPLC készülékeken ezekkel a 2,5 – 2,7 µm-es héjszerkezetű töltetekkel tudjuk jelenleg a leggyorsabb elválasztásokat megvalósítani.

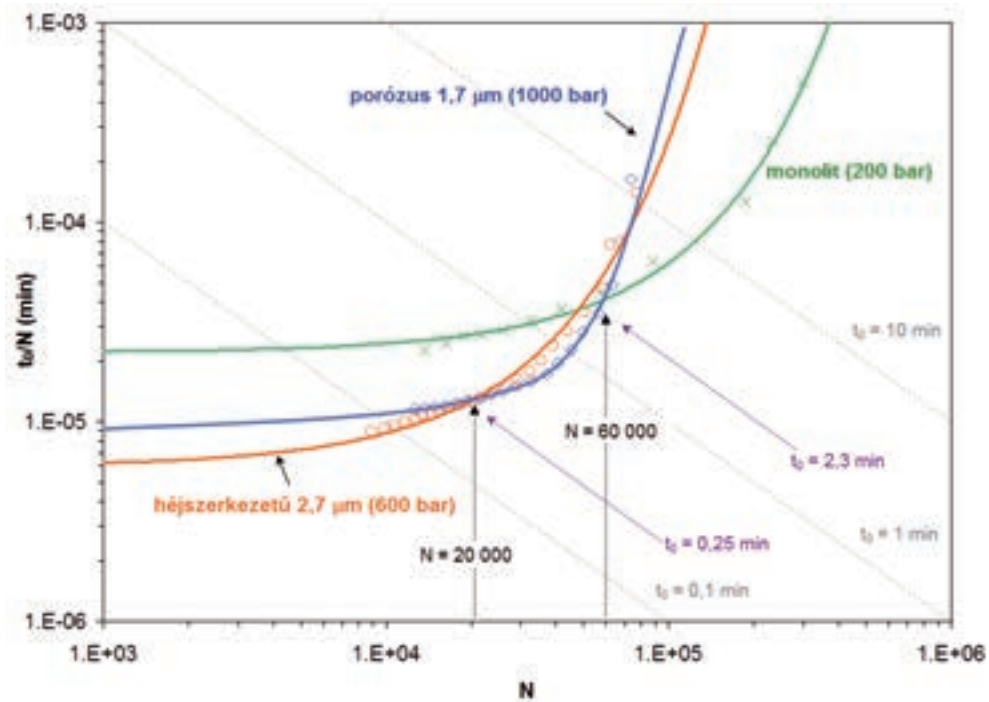


42. ábra: $t_0/N - N$ típusú kinetikus görbék, $\eta = 0.73$ cP, $\Delta p_{max} = 400$ bar /HPLC körülmények/ (monolit kolonnánál csak 200 bar).

Végül nézzük meg, mi történik UHPLC-s körülmények között, azaz ha $\Delta p_{max} = 1000$ bar. A monolit kolonnát egy UHPLC készüléken is csak legfeljebb 200 bar nyomáson használhatjuk. A legtöbb 2,5 – 2,7 μm -es szemcseméret tartományba eső héjszerkezetű töltet nyomásállóságát $\Delta p_{max} = 600$ bar-nak adják meg a gyártók. Tehát tételezzük fel, hogy 600 bar nyomáson üzemeltetjük a héjszerkezetű töltetet. A 2 μm -nél kisebb, teljesen porózus tölteteket viszont alkalmazhatjuk 1000 bar nyomáson is. Ekkor a kinetikus görbéink a következő módon változnak (43. ábra).

A 43. ábrán már egyértelműen megjelenik a teljesen porózus 1,7 μm -es töltet előnye. Ilyen nagy nyomáson dolgozva ez a kolonna adja a leggyorsabb elválasztást az $N = 20\,000 - 60\,000$ tartományban. Például, 17 cm-es kolonnahosszal 37 000 tányérszám érhető el $t_0 = 0,6$ perc mellett. Viszont a kis tányérszámok tartományában továbbra is a héjszerkezetű töltet adja a leggyorsabb elválasztásokat. Tehát gyors elválasztásokra továbbra is ezek a legelőnyösebb kolonnák. Amennyiben viszont nagyfelbontású elválasztásokat akarunk végezni, akkor a monolit kolonnákat célszerű alkalmazni. $N > 60\,000$ esetén – nagy permeabilitásának köszönhetően – ez a legjobb választás. A 43. ábra jól példázza, hogy nem létezik „legjobb” vagy „tökéletes” kolonna, hiszen mindegyik töltet típusnak megvan a maga alkalmazási területe, ahol a legjobban teljesít. A kolonnát mindig a feladatnak megfelelően kell választanunk. Az viszont általánosságban elmondható, hogy a kis permeabilitású és nagy kinetikai hatékonyságú töltetek a gyors elválasztásokra alkalmasak,

szemben a kisebb hatékonyságú, de nagy permeabilitású töltetekkel, amik viszont nagy tányérszám igényű elválasztásokra alkalmazhatók.



43. ábra: $t_0/N - N$ típusú kinetikus görbék, $\eta = 0.73 \text{ cP}$, $\Delta p_{max} = 1000 \text{ bar}$ /UHPLC körülmények/ (monolit kolonnánál 200 bar, héjszerkezetűnél 600 bar, $1,7 \mu\text{m}$ -es töltetre 1000 bar).

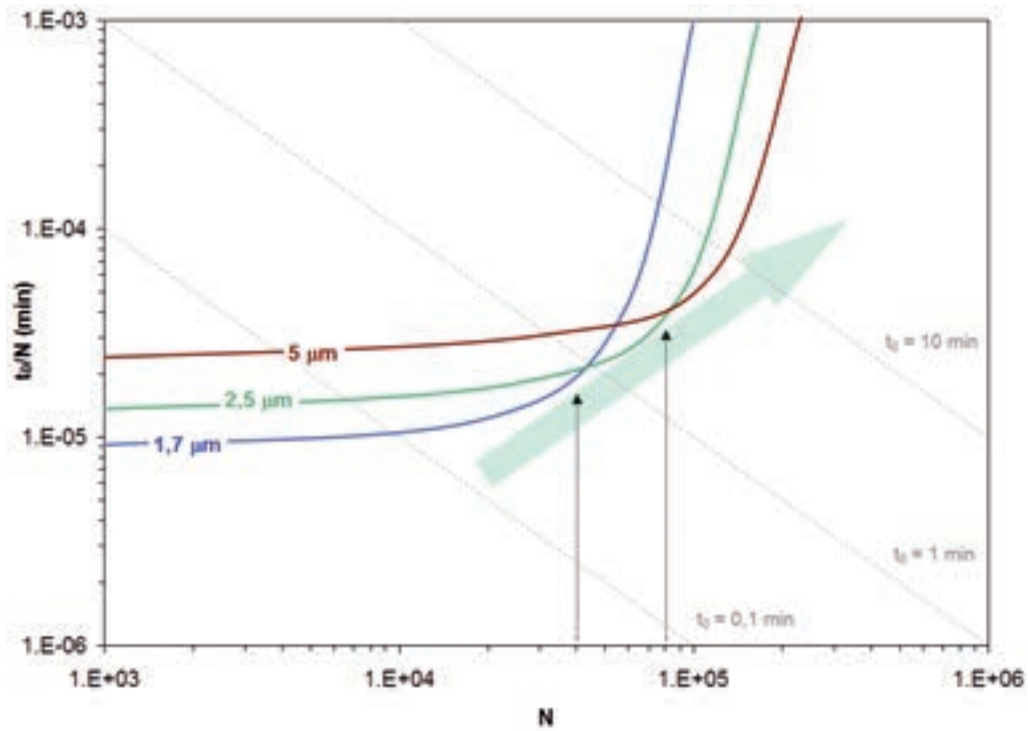
Ajánlott és felhasznált irodalom a 4.1. fejezethez:

- (1) J.C. Giddings, Comparison of Theoretical Limit of Separating Speed in Gas and Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry* 37 (1965) 60-63.
- (2) J.H. Knox, M. Saleem, Kinetic conditions for optimum speed and resolution in column chromatography, *Journal of Chromatographic Science* 7 (1969) 614-622.
- (3) H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *Journal of Chromatography A* 778 (1997) 3-21.
- (4) G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, Geometry-independent Plate Height Representation Methods for the Direct Comparison of the Kinetic Performance of LC Supports with a Different Size or Morphology, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4058-4070.

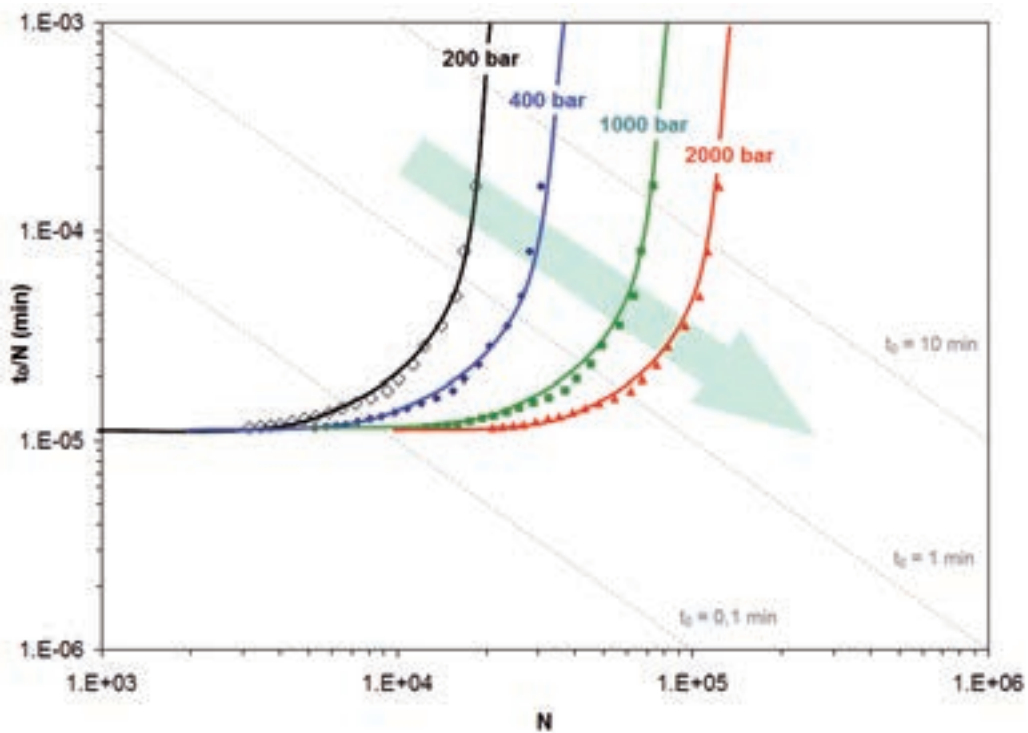
4.2. Szemcseméret és a nyomás hatása azonos morfológiájú töltetknél

Azonos típusú (morfológiájú) töltetnél érdemes összevetni a szemcseátmérő hatását is. Elméletileg és gyakorlatilag is az következik, hogy a kisebb szemcsék a gyors elválasztásokra előnyösebbek, míg a nagyobb szemcseátmérő (vagy nagyobb permeabilitású monolit kolonna) főleg a nagy felbontású elválasztásokra nézve kedvezőbb. Tehát rövid kolonnákkal pl. $N = 10\ 000 - 20\ 000$ tányérszámot el lehet érni 0,5 - 1 perc alatt is (pl. 3 vagy 5 cm-es kolonnával), de mivel egy kis szemcsékkel töltött kolonnának a permeabilitása kicsi, ezért nem tudunk hosszú kolonnát alkalmazni, hiszen a készülék vagy a töltet nyomásállósága határt szab a kolonna hossz növelésének. Ezért igazán nagy felbontás (pl. $N = 100\ 000$) nem is érhető el egy kis permeabilitású töltettel. A nagyobb szemcseátmérőjű töltetek permeabilitása viszont lényegesen nagyobb, tehát nagy kolonna hossz is alkalmazható. Mivel a tányérszám arányos a kolonna hosszal, ezért valóban nagy kinetikai hatékonyság érhető el, de hosszú kolonnákat (vagy sorba kötött kolonnákat) alkalmazva, nyilván az elválasztás időigénye is meg fog nőni. A következő példában 1,7, 2,5 és 5 μm -es tölteteket hasonlítunk össze a kinetikus görbék módszerével. A 44. ábráról leolvasható, hogy az 1,7 μm -es töltet adja a leggyorsabb elválasztást, ha a mérés tányérszám igénye $N < 40\ 000$. Viszont a 40 000 és 80 000 tányérszám között már a 2,5 μm -es szemcse biztosítja a leggyorsabb elválasztás lehetőségét. Ha nagyobb tányérszámokra van szükség, akkor az 5 μm -es töltet a legjobb választás. A példából ismét jól látszik, hogy az elválasztás céljának megfelelően kell kolonnát választanunk. Nem mondhatjuk ki, hogy melyik kolonna vagy melyik szemcseméret a legjobb.

Az is következik az eddigiek alapján, hogy adott töltet típust alkalmazva, annál nagyobb tányérszámokat tudunk elérni, minél nagyobb a rendelkezésünkre álló nyomás. Ezt két dolog szabja meg, vagy a kolonnánk mechanikai stabilitása, vagy a készülékünk felső nyomásteljesítménye. Ma a legtöbb UHPLC-s kolonna 1000 – 1200 bar nyomásig használható. A kereskedelmi forgalomban kapható készülékek nyomásteljesítménye pedig már 1200 – 1400 bar-nál jár. Megjegyezzük, hogy kísérleti fázisban ennél már lényegesen nagyobb nyomástartományokban is dolgoztak (~7000 - 8000 bar). Az eddiekből az is belátható, hogy minél nagyobb nyomáson dolgozunk, annál rövidebb idő alatt érhető el azonos tányérszám. A jelenséget a 45. ábrán mutatjuk be.



44.ábra: Összehasonlító kinetikus görbék azonos szerkezetű, különböző szemcseátmérőjű töltetekre (1,5, 2,5 és 5 μm-es porózus töltetek, hipotetikus nyomás: $\Delta p_{max} = 1000$ bar /UHPLC körülmények/).



45.ábra: Összehasonlító kinetikus görbék azonos szerkezetű 1,7 μm-es szemcseátmérőjű porózus töltetekre, eltérő működtetési nyomásokon.

A 44. ábra alapján azt mondhatjuk, hogy a szemcseméret növelése a kinetikus görbéken úgy jelenik meg, mint egy jobb-felső irányba történő függvénytranszformáció. Tehát a szemcseméret növelésével adott nyomás mellett egyre nagyobb tányérszámok érhetőek el, de természetesen ez együtt jár az analízis idő növekedésével. Ugyanakkor a kis szemcseméretű kolonnák pedig gyors elválasztásokra alkalmasak. Adott nyomás mellett – a kisebb tányérszámok tartományában, ami az X tengely baloldali tartományának felel meg – kisebb t_0 tartozik a kis szemcséjű töltethez, mint a nagyobb szemcseméretűhöz.

Az egyre nagyobb nyomáson történő elválasztások pedig úgy jelennek meg a $t_0/N-N$ típusú függvényeken, mintha a görbék jobb irányba „kinyílnának” (45. ábra). Ez jelzi a nagyobb nyomáshoz tartozó lehetőségeket. Nagyobb nyomás mellett egyre nagyobb tányérszámok érhetőek el és egyre rövidebb analízis idő mellett tudunk dolgozni.

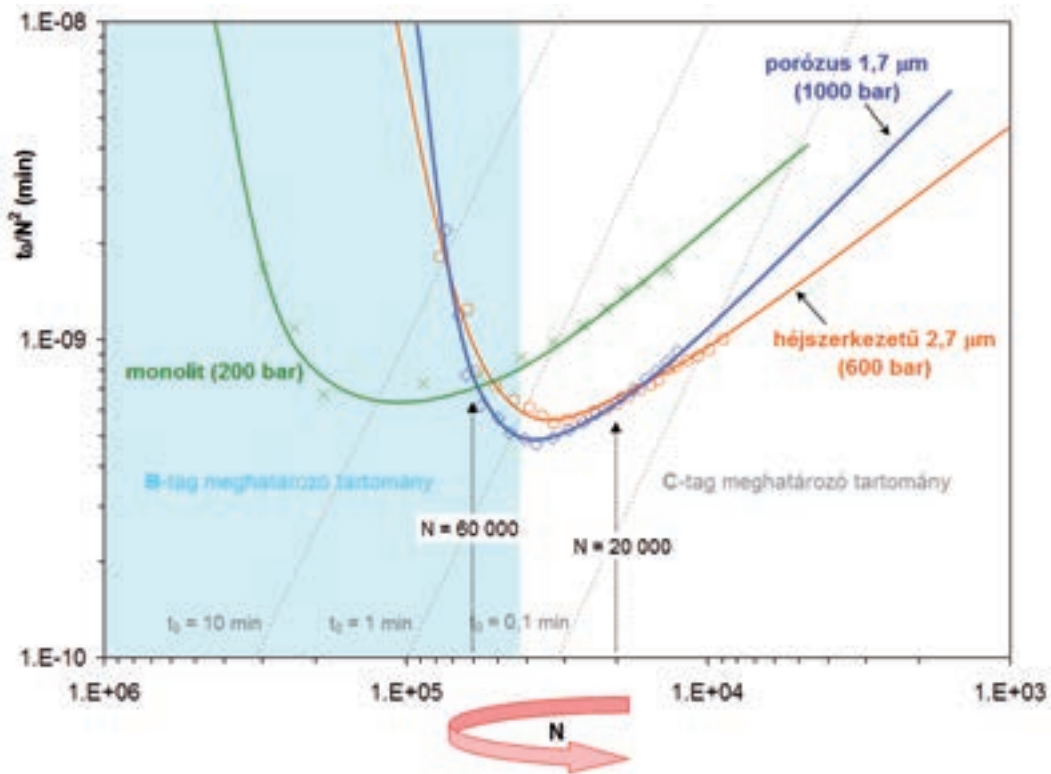
Ajánlott és felhasznált irodalom a 4.2. fejezethez:

- (1) J.H. Knox, M. Saleem, Kinetic conditions for optimum speed and resolution in column chromatography, *Journal of Chromatographic Science* 7 (1969) 614-622.
- (2) H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *Journal of Chromatography A* 778 (1997) 3-21.

4.3. A kinetikus görbék transzformációja

Minden tudományágban, köztük az alkalmazottakban is kialakultak bizonyos formalizmusok és a hozzátartozó vizuális képi megjelenítés. Kromatográfiában ilyen az általánosan ismert van Deemter, Knox vagy Golay egyenletek, illetve azok képi megjelenítése a **H-u** vagy **h-v** görbék alapján. Akkor, amikor a kolonnák megítélése történik, minden folyadékkromatográfiával vagy általánosabban elválasztástechnikával foglalkozó szakemberben az a minimummal jellemzett görbe él, amely jellemző a fenti összefüggésekkel írható le. Az adott kolonnával elérhető kinetikai teljesítményt, ehhez a minimumhoz tartozó adatpárral szokás jellemezni (H_{min} , u_{opt}). Ebben a megközelítésben, ahogy már többször hangsúlyoztuk, nincs benne a teljesítmény eléréséhez szükséges nyomásesés (elválasztási ellenállás), valamint csak morfológiailag azonos kategóriába tartozó töltetek vehetők össze. A kinetikus elmélettel eddig bemutatott görbék alakja viszont eltér a klasszikus van Deemternél megismertektől. Ahhoz, hogy vizuálisan összeegyeztethető legyen a két megközelítés, de a kinetikus elmélet adta többletinformációt ne veszítsük el az ábrázolásnál, további két transzformációt kell végrehajtani. Az egyik az Y tengelyen a t_0/N^2 -t érték megadása a szokásos t_0/N vagy t_0 érték helyett. Ekkor a van Deemter típusú görbéhez hasonlóan minimumos görbét kapunk. Viszont a hosszirányú diffúzióra jellemző része (**B**-tag meghatározó tartomány) és az anyagátadási ellenállásra jellemző tartomány (**C**-tag meghatározó tartomány) a görbe ellentétes oldalán jelentkeznek. Ahhoz, hogy formailag a két eltérő megközelítés azonos jelleget adjon a második lépés, hogy az X tengelyen a számegeyenest megfordítjuk. Azaz balról jobbra csökkennek az értékek ezen a tengelyen. Így formailag már teljes az összhang a van Deemter féle reprezentációval. A minimumtól balra a zónaszélesedést a hosszirányú diffúzió szabja meg, a minimumtól jobbra pedig az anyagátadási ellenállás.

A 46. ábrán bemutatjuk a 4.1. fejezetben tárgyalt kinetikus görbék transzformációját. Ez az ábrázolás ugyanazt az információt adja, mint a korábban tárgyalt t_0/N típusú kinetikus görbe, de formailag megegyezik a szokásos **H-u** görbékkel.



46. ábra: Kinetikus görbék transzformációja, hogy jellege megegyezzen a van Deemter reprezentációval. Az X tengelyen az N , míg az Y tengelyen a t_0/N^2 szerepel továbbá az X tengelyen felcserélt a számegegyenes iránya.

A (38) összefüggésben is szerepel a t_0/N^2 , amelyet az elválasztás ellenállásának nevezhetjük, azaz milyen ráfordítás kell egy adott elválasztás eléréséhez. Akkor célszerű ez az ábrázolás, ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy milyen könnyen valósítható meg egy adott kolonnával egy-egy elválasztás. Sok esetben a t_0/N^2 hányadost csak egyszerűen **E**-vel jelölik.

Ez a fajta ábrázolás még világosabbá teszi, hogy bonyolult elválasztásoknál a nagy permeabilitású monolit, míg a gyors elválasztásoknál a kis szemcseátmérőjű kolonnák alkalmazása az előnyösebb. A kinetikus görbéknél az E_{\min} és N_{opt} mindig együtt kell megadni, mert ez megmutatja, hogy milyen elméleti tényérszámnál milyen kolonna alkalmazása a legmegfelelőbb.

Ajánlott és felhasznált irodalom a 4.3. fejezethez:

- (1) G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, Geometry-independent Plate Height Representation Methods for the Direct Comparison of the Kinetic Performance of LC Supports with a Different Size or Morphology, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4058-4070.

5. Fejlesztések a szuperkritikus és szubkritikus fluid kromatográfiában

A következőkben röviden bemutatjuk a szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) történetét és jelenlegi lehetőségeit. Azért tartjuk fontosnak, mert mára már ezen a területen is megjelentek a 2 μm -nél kisebb porózus töltetek, illetve az újgenerációs, héjszerkezetű állófázisok. Az utóbbi években a készülékfejlesztés terén is sok újdonság született. A modern SFC nagyon ígéretesnek tűnik és a gyógyszeripar is kezd megbarátkozni a technika lehetőségeivel.

A szuperkritikus fluid kromatográfia olyan kromatográfias elválasztási módszer, melyben a mozgófázis szuperkritikus vagy szubkritikus állapotú fluidum. Az oszlopban található állófázis vagy kisméretű, szilárd szemcsékből áll, mint a folyadékkromatográfiában is használt szilikagél, porózus grafit és kémiaiilag módosított állófázisok, vagy kapilláris oszlopok esetében lehet térhálós folyadékfilm, mely egyenletes filmbevonatot képez az oszlop falán.

Ez a kromatográfias mód már több mint 50 éve ismert. Klesper nevéhez kötik, aki már 1962-ben beszámolt a technika lehetőségeiről. Az SFC-ben még akkor – mivel kapilláris kolonnákkal dolgoztak – sok technikai nehézség lépett fel, s a készülékek technikailag nem voltak megfelelőek, a mérések nem voltak reprodukálhatók. Egészen 2008-ig, amikor az acetonitril válság idején mind az ipari, mind az akadémiai szakemberek újra gondolták az SFC lehetőségeit. Szuperkritikus vagy közel szuperkritikus állapotban bizonyos anyagok sűrűsége és oldószer erőssége hasonló a folyadékkromatográfias mozgófázisokéhoz, míg viszkozitása és diffúziós tulajdonságai pedig a gázok és a folyadékok között van. Ebből következően az anyagátadás gyorsabb, mint a folyadékkromatográfiában, de lassabb a gázkromatográfiában mérténél. A szuperkritikus fluidumok kisebb viszkozitása miatt a nyomásesés is kisebb, mint a folyadékkromatográfiában. A szuperkritikus fluidokban a komponensek diffúziós állandói nagyobbak, mint folyadékokban, az anyagátadási ellenállás kisebb nagy lineáris sebességeken is. Ez az oka, hogy hatékony elválasztásokat lehet elvégezni, növelve a mozgófázis lineáris sebességét. Így ma már ezt a módszert is a gyors folyadékkromatográfias módszerek közé sorolhatjuk.

Novotny és Lee munkáinak köszönhetően először a kapilláris-SFC-t vezették be a gyakorlati életbe (c-SFC). A c-SFC-ben a szén-dioxid mellett szénhidrogéneket, dinitrogén-oxidot és ammóniát alkalmaztak mozgófázisként, és a gázkromatográfia egyfajta kiterjesztésének tekintették. Biztonsági és technikai okokból azonban hamarosan a széndioxid (szuperkritikus pontja: 31 °C, 74 bar) vette át a mozgófázisok között a vezető szerepet. A szuperkritikus széndioxid mozgófázist sikeresen alkalmazták hőlabilis komponensek elválasztására. Ebben az időben gázkromatográfokat üzemeltettek

szuperkritikus mozgófázissal, leggyakrabban lángionizációs detektorokat alkalmaztak. Az első SFC készülék 1983-ban került piacra a Hewlett Packard jóvoltából. Ez a készülék már lehetővé tette a töltetes kolonnák (p-SFC) alkalmazását, sőt először nyílt lehetőség arra, hogy a szuperkritikus mozgófázist egyéb oldószerekkel (pl. metanol) keverjék. A p-SFC számos előnyt mutatott (több lehetőség a szelektivitásban, gyors analízis idő, lehetőség poláris komponensek elválasztására), mégis egy évtizedbe telt, mire elfogadott kromatográfiai technikává érett. A 90-es évekre a kapilláris SFC kezdett visszaszorulni technikai problémák és kis alkalmazási területe miatt. A tiszta szén-dioxid mivel apoláris, csak apoláris komponenseket old, így alkalmazási területe csak a nem-poláris komponensek és a petrokémiai alkotók elválasztására korlátozódott. Ezzel szemben a p-SFC alkalmazási lehetőségei viszont kiterjedtek. Berger szerint, – aki a modern SFC egyik úttörője – a kétkomponensű mozgófázisok alkalmazásával (széndioxid és egy szerves modifikátor) az SFC alkalmazási lehetőségei és az elválasztások kinetikai hatékonysága valahová a gáz- és folyadékkromatográfia közé esik. Elsősorban metanolt, etanolt és izopropanolt használtak szerves modifikátorokként. Ezek a poláris oldószerek jelentősen növelték a vegyületek oldhatóságát, és egyúttal a megfűző mozgófázis erősséget is be lehet állítani segítségükkel. Kis mennyiségű poláris modifikátor hozzáadásával, a szuperkritikus fluid még megtartja kis viszkozitását, így gyors marad a diffúzió, amely eredményeként az anyagátadás sebessége nő.

Jelenleg az SFC legfőbb előnyei a következőkben foglalható össze:

- a mozgófázis viszkozitása kisebb, mint a folyadékoké, ebből következően gyorsabb a molekuláris diffúzió, keskenyebbek a kromatográfiai csúcsok
- a kis viszkozitás megengedi a nagy áramlási sebességek használatát a kinetikai hatékonyság csökkenése nélkül
- kritikus elválasztások is megvalósíthatók a kolonnák sorba kapcsolásával

A gyakorlatban általában 2 - 25 % szerves modifikátort adunk a mozgófázishoz, tehát a szerves oldószer felhasználás kicsi. Ezért sokszor ún. „zöld” vagy környezetbarát elválasztási technikának is szokták nevezni az SFC-t. Ennek különösen a félpreparatív és a preparatív elválasztásokkor van jelentősége. A gyógyszeriparban gyakori, hogy preparatív elválasztásokra alkalmazzák az SFC-t.

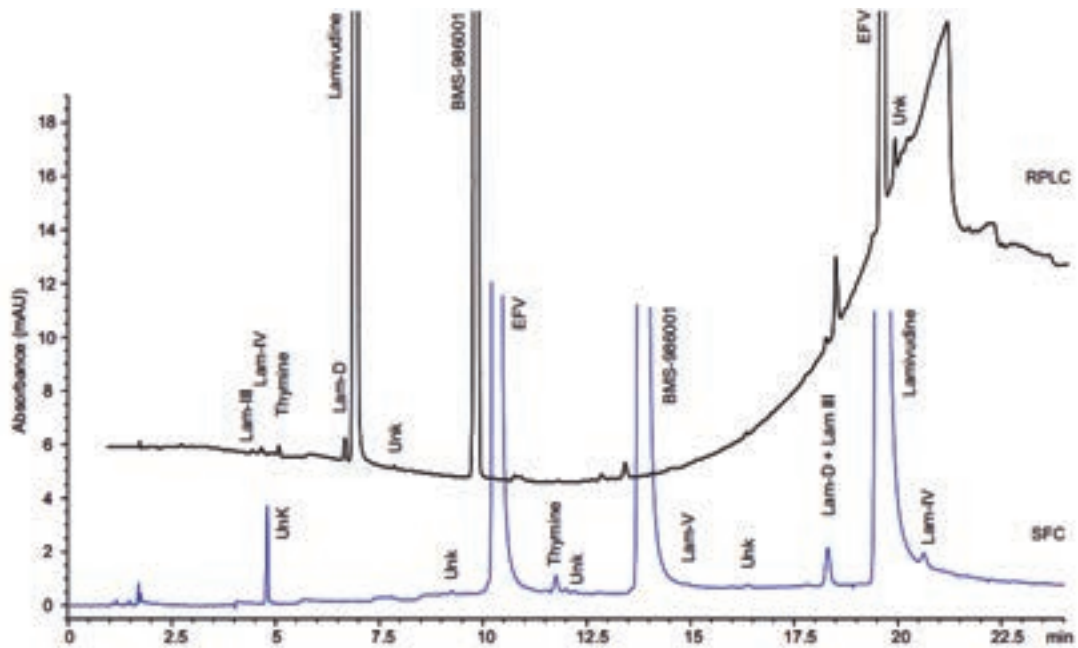
A másik gyakran emlegetett előnyös tulajdonság, hogy a fordított fázisú kromatográfiához képest (ami a leggyakoribb gyógyszeranalitikai elválasztási mód) ún. ortogonális vagy alternatív szelektivitást biztosít az SFC. A széndioxid apoláris mozgófázis, az SFC-ben alkalmazott állófázisok pedig polárisak, tehát a szelektivitás a normál fázisú kromatográfiához hasonló. Jól alkalmazható királis elválasztásokra is, a legtöbb enantiomer

elválasztás megoldható poláris poliszacharid típusú állófázisokon szuperkritikus körülmények között.

Jelenleg a modern SFC alkalmazási területe rendkívül nagy. Olyan poláris komponensek is mérhetők SFC-vel, amelyeket fordított fázisú kromatográfiás körülmények között nem tudunk mérni, mert nincs megfelelő visszatartásuk. SFC-ben a szelektivitás és a visszatartás elsősorban az állófázissal változtatható, de mindkét kromatográfiás paramétert a poláris modifikátor minősége és koncentrációja nagyban befolyásolja. A leggyakrabban alkalmazott poláris állófázisok a szilika-, diol-, ciano- és 2-etilpiridin típusúak, ezeket főleg poláris vagy könnyen ionizálható komponensek elválasztására használhatjuk.

Jelenleg az SFC fejlesztési irányai azonosak a fordított fázisú kromatográfiával; megjelentek a 2 µm alatti porózus töltetek, a kis átmérőjű, rövid kolonnák és a kis oszlopon kívüli diszperzióval rendelkező, újgenerációs készülékek. A 2 µm alatti töltetekkel hasonló kinetikai hatékonyság érhető el, mint a fordított fázisú UHPLC-ben, ez vezetett az új nomenklátúra megszületéséhez, nevezetesen az UHPSFC-hez (ultra nagyhatékonyságú szuperkritikus fluid kromatográfia). Nemrégiben héjszerkezetű töltetek alkalmazásáról is beszámoltak, körülbelül 50%-os kinetikai hatékonyság növelés érhető el a 3 µm-es teljesen porózus töltetekhez képest (hasonlóan, mint fordított fázisú kromatográfiában). Jelenleg két gyártó forgalmaz UHPSFC készüléket, nevezetesen a Waters UPC²-t és az Agilent Aurora rendszereket. Előbbi 414 bar-os, utóbbi 600 bar-os maximális nyomásteljesítménnyel. Ezen rendszerek oszloponkívüli varianciája $\sigma_{ec}^2 = 80 - 100 \mu\text{L}^2$ közé esik, ami a korábbi rendszerekhez képest óriási előrelépést jelent. A teljes oszlopon kívüli térfogat pedig 55 – 60 µL. Ilyen készülék teljesítményjellemzők mellett jelenleg a 100 x 3 mm kolonnadimenzió az optimális. Sajnos a 2,1 mm átmérőjű kolonnák még mindig csak igen nagy hatékonyság veszteség mellett használhatók.

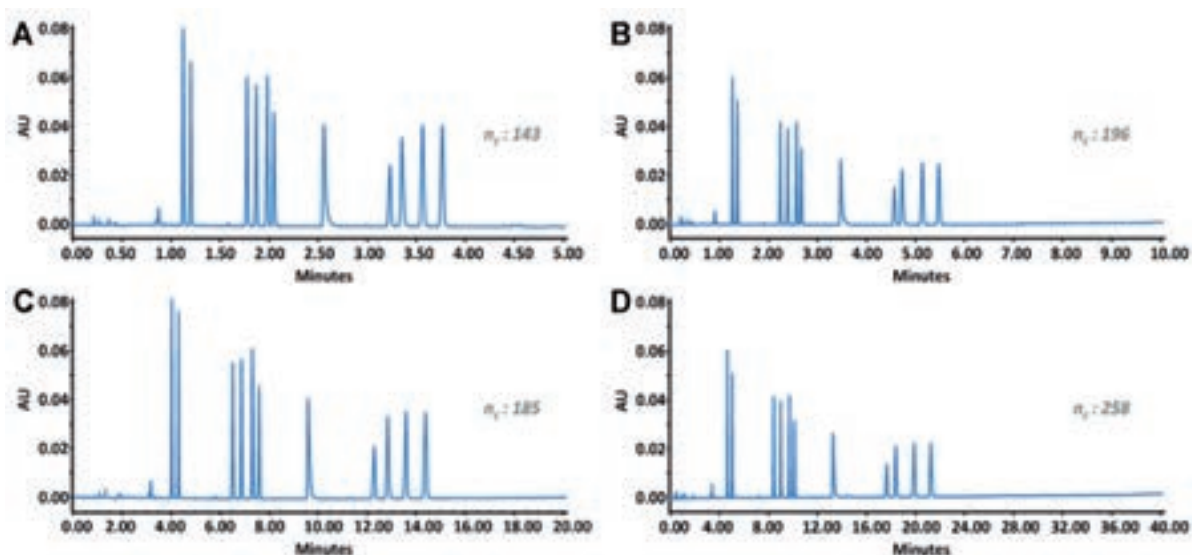
A modern SFC, UHPSFC sokszínűségének köszönhetően — a korábban említett preparatív és királis elválasztások mellett — egyre jobban kezd elterjedni a gyógyszeripari kutató és minőségellenőrző laboratóriumokban. Alexander és mtsai. fordított fázisú folyadékkromatográfiás és ortogonális szelektivitást biztosító SFC módszert mutattak be antiretrovirális hatóanyagokat tartalmazó (lamivudin, efavirenz és fesztinavír) kombinált gyógyszerkészítmény minősítésére. A módszert be is vezették a gyógyszeripari minőségellenőrző laboratóriumban. A 47. ábrán a kétféle elválasztást mutatjuk be.



47.ábra: Antiretrovirális hatóanyagokat tartalmazó kombinált gyógyszerkészítmény bomlásvizsgálata fordított fázisú kromatográfiával (RP-LC, felül) és szuperkritikus fluid kromatográfiás módszerrel (SFC, alul).

Taylor és mtsai. peptideket választottak el SFC körülmények között. A terner mozgófázis (széndioxid-metanol-víz) vizes részébe ionpároképző adalékot (trifluoecetsav, ammónium acetát) adtak. Perrenoud gyógyszerhatóanyagok elválasztására dolgozott ki UHPSFC módszereket és részletesen tanulmányozta a kinetikai hatékonyság fokozásának lehetőségeit. Kolonnák sorba kapcsolásával és a gradiens körülmények megfelelő módosításával igen nagy csúskapacitásokat értek el viszonylag rövid analízis idő mellett (48. ábra).

A szuperkritikus fluid kromatográfia – elsősorban az UHPSFC – egyre jobban kezd elterjedni, és úgy tűnik, a gyógyszeripar is kezdi elfogadni a technikában rejlő lehetőségeket. A fordított fázisú folyadékkromatográfia ígéretes kiegészítő módszere lehet a közeljövőben.



48. ábra: Benzodiazepinek UHPSFC-s elválasztása. Elúciós sorrend: prazepam, flunitrazepam, klorazepate, dezmetilflunitrazepam, nitrazepam, klonazepam, midazolam, brotizolam, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam és triazolam). Kolonna: Acquity UPC2 BEH 100 mm x 3 mm, 1,7 μ m, mozgófázis hőmérséklet: 40 °C, hátsó nyomás: 150 bar, gradiens elúció: 2–17% MeOH, térfogatáram: 2,5 mL/perc, gradiens idő: 5 perc, (A) és 10 perc (B). Két oszlop sorba kötésével (20 cm oszlop), térfogatáram: 1,25 mL/min, gradiens idő: 20 perc (C) és 40 perc (D).

Ajánlott és felhasznált irodalom az 5. fejezethez:

- (1) M. Novotny, S.R. Springston, P.A. Peaden, J.C. Fjeldsted, M.L. Lee, Capillar supercritical fluid chromatography, *Analytical Chemistry* 53 (1981) 407A-14A.
- (2) E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner, High-pressure gas chromatography above critical temperatures *Journal of Organic Chemistry* 27 (1962) 700-701.
- (3) S.R. Springston, M. Novotny, Kinetic optimization of capillary supercritical fluid chromatography using carbon dioxide as a mobile phase, *Chromatographia* 14 (1981) 679-84.
- (4) T.A. Berger, Characterization of a 2.6 μm Kinetex porous shell hydrophilic interaction liquid chromatography column in supercritical fluid chromatography with a comparison to 3 μm totally porous silica, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 4559-4568.
- (5) A.J. Alexander, L. Zhang, T.F. Hooker, F.P. Tomasella, Comparison of supercritical fluid chromatography and reverse phase liquid chromatography for the impurity profiling of the antiretroviral drugs lamivudine/BMS-986001/efavirenz in a combination tablet, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78 (2013) 243-251.
- (6) A. Grand-Guillaume Perrenoud, M. Goel, C. Hamman, J.L. Veuthey, D. Guillarme, S. Fekete, Maximizing kinetic performance in supercritical fluid chromatography using state-of-the-art instruments, *Journal of Chromatography A* 1314 (2013) 288-297.
- (7) A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds, *Journal of Chromatography A* 1266 (2012) 158-167.

6. A pH mérés és hatása a folyadékkromatográfias elválasztásra

6.1. A pH definíciója, elsődleges és másodlagos pufferek

A folyadékkromatográfiában a gyengén savas vagy bázikus csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásakor a pH helyes megválasztásának alapvető szerepe van. Kérdés, hogy ezzel a látszólag egyszerűnek tűnő művelettel hogyan birkózunk meg a folyadékkromatográfias gyakorlatban. A probléma a pH értelmezésénél kezdődik vizes közegben, majd folytatódik, amikor áttérünk víz-szerves oldószer elegybe.

A pH eredeti definícióját 1906-ban Sørensen adta meg a mai nomenklatura nyelvén a következő összefüggéssel:

$$pH = -\lg \frac{C_H}{C^0} \quad (45)$$

ahol a C_H a hidrogénion koncentrációja mol/dm³ koncentrációban, a C^0 jelentette a standard állapotot, amely számszerűen megegyezett 1 mol/dm³-rel. Az, hogy a pH mértékegység nélküli szám legyen, így volt elérhető. Későbbiekben az vált elfogadottá, hogy a pH-t a hidrogénion relatív aktivitásával jobban lehet jellemezni vizes oldatokban.

$$pH = -\lg a_H = -\lg \frac{m_H \gamma_H}{m^0} \quad (46)$$

ahol az a_H molalitás alapon megadott relatív hidrogén aktivitás, γ_H a moláris aktivitási koefficiens, m^0 standard molalitás.

A pH eredeti célja az volt, hogy a hidrogén-ion aktivitást mérje vizes oldatban, a definíció szerinti mérést azonban termodinamikailag érvényes módon nem lehet kivitelezni. Így a pH nem más, mint egy megállapodáson alapuló definíció, amelyet, ha pontosan ugyanolyan módon végzünk el, akkor az adatok összehasonlíthatók lesznek. A gyakorlati méréseknél a pH munkadefinícióját alkalmazzuk. Ennek során kiválasztunk olyan anyagokat, amelynek meghatározott összetételéhez adott hőmérsékleten pH értékeket rendelünk. Ezekkel meghatározzuk az elektromotoros erőt 1, 2, vagy 5 különböző értékre, olyan galvánecellákkal, amelyeknél a határfelületen nem lép fel külön potenciál, majd megmérjük a mintában az elektródpotenciált, és a Nerst-törvény érvényességét feltételezve számoljuk a pH értéket (47).

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln a_H \approx E_0 + \frac{0,059}{z} \lg c_H \quad (47)$$

ahol **E** az elektródpotenciál, **E₀** a standard elektródpotenciál, **R** az egyetemes gázállandó, **T** a hőmérséklet és **z** az oxidált és redukált forma oxidációs állapotának különbsége (esetünkben **z** = 1).

Az elsődleges standardokat, az azokhoz rendelt adatokat (melyeket abszolút pH mérésel állapítottak meg), valamint a pH mérésnél alkalmazott elsődleges és másodlagos referencia anyagokat a XIX. – XXI. Mellékletben adtuk meg. A másodlagos standardokat olyan elektrokémia cellával mérték, ahol a folyadék határfelületen fellépő potenciál elhanyagolható. A gyakorlatban üvegelektrodot használunk a mérésre, ahol ez a feltételezés már nem tehető meg. A folyadékkromatográfias gyakorlatban viszont, különböző okokból, amelyeknek egy részét a továbbiakban tárgyaljuk, a 0,05 - 0,1 pH egység megfelelő és tolerált. Az üvegelektroddal történő mérés kielégíti a követelményeket. Tehát adott elsődleges vagy másodlagos puffer oldatban kalibráljuk az üvegelektrodot, és a következő összefüggés adja a pH értéket.

$$pH = \frac{pH(S) + [E(S) - E(X)]}{59} \quad (48)$$

ahol **pH(S)** a kalibráló puffer pH-ja, **E(S)** az ebben mért elektród potenciál mV-ban, **E(X)** a mintában mért elektród potenciál 25 °C-on.

Az elméleti háttér és a mérések részletezése nélkül az IUPAC (International Union of Pure and applied Chemistry) „Measurement of pH. Definition, standards, and procedures” szerint a kalibrációnál a következő bizonytalanságok lépnek fel a kalibráló oldatok számától függően:

- Kettőnél több pontos kalibrációnál (5 pont): 0,01-0,03
- Két pontos kalibrációnál (a mérendő a kettő közé esik): 0,02-0,03
- Egy pontos kalibrációnál ($\Delta pH=3$, 59 mV/pH): 0,3

A fenti mérési bizonytalanságokat összevetjük a folyadékkromatográfia megkövetelte pontossággal, akkor a kétpontos kalibráció elegendő, ha a beállítandó puffer pH-ja a kettő közé esik. Fordított fázisú folyadékkromatográfiában, a szilikagél alapú töltetknél a pH-t behatárolja az állófázis. A hagyományos fordított fázisú töltetknél ez a tartomány 2 - 8 pH közé esik. A kalibrációnál tehát, ha egyet-egyét az elsődleges vagy a másodlagos referencia anyagokból választunk a kis (2) és a nagy (8 - 9) pH-ra javasoltak közül, és ezekre kalibrálunk, akkor a folyadékkromatográfia megkövetelte pontosságnak eleget teszünk.

6.2. A pH mérés lehetőségei és gyakorlata a folyadékkromatográfiában

A pufferek pH-ját viszonyítva az elsődleges és/vagy másodlagos pufferekhez, egyértelműen és reprodukálhatóan lehet mérni. Kérdéses viszont, hogy mit értünk a mozgófázis pH-ján és hogyan mérjük azt. Három lehetőség kínálkozik a mozgófázis pH-jának beállítására:

- Mérjük a puffer pH-t és ehhez adjuk a szerves oldószert.
- Kalibráljuk az üvegelektrodát az elsődleges és/vagy másodlagos pufferekre, és utána a kész mozgófázisban mérjük a pH-t.
- A kalibrációnál az elsődleges és/vagy másodlagos puffereket a mozgófázisba mérjük be, és a mérést is a mozgófázisban végezzük el.

Az első esetben a pH alsó és felső indexében is „w” kell, hogy szerepeljen, a második esetben, az alsó indexben „w”, a felsőben „s”, a harmadik esetben mind az alsó, mind a felső indexben „s”-nek kell szerepelni. A három mérési módszer három eltérő eredményt (számot) ad. Kérdés, hogy milyen szempontból lehet érdekes a „valódi” hidrogén-ion aktivitás. Az első lényeges kérdés, hogy a gyártó cégek által megadott pH tartomány a fordított fázisú töltetekre milyen módon mért értékre értendő. A másik lényeges kérdés kapcsolódik a proton funkciók vegyületek elválasztásához (a savas vagy bázikus csoportot tartalmazókra). Az ilyen típusú elválasztásoknál a pH alapvető paraméter, mert a vegyületek pK_a értékéhez képest kell beállítani.

Ahhoz, hogy a hidrogénion aktivitás hatását megértsük, vissza kell mennünk az ionaktivitás általános elméletéhez, nevezetesen a Debey-Hückel közelítéshez és a Bates-Guggenheim konvencióhoz. Az előbbi a termodinamikailag nem mérhető egyedi hidrogénion aktivitás becslését teszi lehetővé, az utóbbi ezt kiterjeszti más oldószerekre is.

A Debey-Hückel összefüggés:

$$\log \gamma_H = -\frac{AI^{1/2}}{1 + a_0BI^{1/2}} \quad (49)$$

ahol γ_H az egyedi hidrogén-ion aktivitás, I az ionerősség, A és B konstansok, amelyek az oldószertől és a hőmérséklettől függenek, és a_0 a szolvatált ionméret.

Az eredeti Bates-Guggenheim konvenció szerint az oldószer víz és a standard állapotot is erre vonatkoztatjuk, úgyhogy a hidrogén-ion koncentrációt végtelen kicsinek vesszük, akkor az a_0^*B értéke 1,5. Ha a fenti adatokat átvisszük más oldószerekre is, akkor az előbbi megközelítés szerint az alábbi összefüggést kapjuk:

$${}^s a_0^s B = 1,5 \left[{}^w \varepsilon^s \rho / ({}^s \varepsilon^w \rho) \right]^{1/2} \quad (50)$$

ahol a felső index **s** az adott oldószert, míg **w** a vizet jelenti, ε az adott oldószer és víz permittivitását, ρ pedig a sűrűséget.

Amennyiben a pH-t értelmezni akarjuk a fordított fázisú mozgófázisoknál, akkor a standard állapot nem lehet más, mint az adott oldószer, és ebben a hidrogén-ion koncentrációt végtelen kicsinek vesszük. Ez egy újabb hidrogén-ion skálát jelent. A vízre vonatkozó pH skálát szokás „*abszolút*” pH skálának nevezni.

A két pH skála megkülönböztetésére az IUPAC (Robinson és Stoke alapján) a következő megközelítést javasolja, amennyiben a pH-t az abszolút értékhez akarjuk hasonlítani, vagy kifejezni vele, akkor a pH alsó indexében „w” szerepel, és a felső indexben „s”. Ha az adott közeg (oldószer) a viszonyítási alap, akkor az alsó és a felső indexben is „s” szerepel:

$${}^s_w pH = {}^s_s pH - \log \left({}^s_w \gamma_H^0 \right) \quad (51)$$

amennyiben a vízre definiáljuk a standard állapotot, akkor a két skála megegyezik.

Ezeket a megfontolásokat kell alkalmaznunk az összes sav-bázis egyensúlyra is, ahol a pH-nak szerepe van. Ennek megfelelően a savi disszociációs állandó negatív logaritmusára is (pK_a):

$${}^s_w pK_a = {}^s_s pK_a - \log \left({}^s_w \gamma_H^0 \right) \quad (52)$$

Ebben az összefüggésben a hidrogén-ion standard állapota, a víz és koncentrációja, illetve az aktivitási koefficiens értéke tart az egyhez, ha végtelen híg oldatban van, de az egyensúlyban résztvevő egyéb ionok vagy molekuláknál a viszonyítási alap az adott mozgófázis.

A XXII. – XXIV. Mellékletben, a folyadékkromatográfiában leggyakrabban alkalmazott oldószerekre adunk meg adatokat, amelyek segítségével a különböző skálával definiált pH-k átszámolhatók. A táblázatban megadott pK_{ap} megegyezik az előbbi összefüggésben megadott, és az „*abszolút*” pH skálára visszavezetett értékkel. Itt jegyezzük meg, hogy pH^* vagy pK_a^* az adott mozgófázisra vonatkozó („s” alul és felül) jelölése volt régen.

Az előzőekben látható, hogy a gyakorlatban miért lehet eltérően megadni és mérni a mozgófázis pH-ját, amely értékek a közegtől függően más és más hidrogén-ion aktivitást

jelentenek. Itt ismét vissza kell kanyarodnunk a pH munka-definíciójához, hogy egyértelműen értelmezni tudjuk a hidrogén-ion aktivitást a mozgófázisban. Továbbiakban kérdés, hogy a standard állapotot mire vonatkoztatjuk. Amennyiben indexek nélkül használjuk a kifejezést, akkor mindig a víz jelenti az oldószert. Folyadékkromatográfiás gyakorlatban, ahol az esetek döntő többségében vízzel elegyedő oldószereket használunk, meg kell adnunk a vonatkoztatási (standard) állapotot. A mozgófázisra vonatkoztatva ez a következőt jelenti:

$${}^s_pH_x = {}^s_pH_s - ({}^sE_x - {}^sE_s) / g \quad (53)$$

ahol s_pH_x jelenti a mozgófázisra vonatkoztatott pH értéket, s_pH_s jelenti az ugyanolyan oldószeregyben mért referencia pH értéket, mint a mozgófázis, sE_x jelenti az ismeretlen oldatban mért elektromotoros erőt, míg az sE_s jelenti a referencia oldatban mért elektromotoros erőt, a g (ha mV-ban adjuk meg az elektromotoros erőt), akkor 59 mV (Nersti viselkedés), másképpen a kalibrációs egyenes iránytangense. Ennél a kifejezésnél a határfelületen fellépő potenciáltól eltekintünk.

Ez egyben annyit is jelent, hogyha nem állnak rendelkezésünkre összefüggések a mozgófázis összetételének függvényében a pH változásról, akkor minden egyes összetételnél kalibrálnunk kell!

Néhány oldószeregyre, bizonyos összetételig ezek az adatok rendelkezésre állnak. Így például víz-acetonitril elegyre 75 tf.%-ig és víz-tertrahidrofurán 72 tf.%-ig. A mérési adatokra görbét illesztettek és ez alapján adták meg az adatokat (XXV. – XXVI. Melléklet). A táblázatokban mért adatokat később felhasználjuk a különböző pH skálák összehasonlításánál.

A következő lehetőség a pH mérésére a vizes közegben kalibráció és a mozgófázisban a mérés:

$${}^s_pH_x = {}^w_pH_s - ({}^sE_x - {}^wE_s) / g \quad (54)$$

Ennél a módszernél csak a vizes puffer oldatra kell kalibrálni. Tehát az előző módszerhez képest egyszerűbb a kivitelezése.

A két eltérő módon mért pH érték egymásba átszámolható a következő összefüggések segítségével:

$$\delta = \bar{E}_j - \log\left(\frac{{}^S\gamma_H^0}{{}^W\gamma_H^0}\right) = {}^S\text{pH} - {}^S\text{pH} \quad (55)$$

$$\bar{E}_j = ({}^S E_{jX} - {}^W E_{jS}) / g \quad (56)$$

ahol E_j a határfelületi potenciál, amely a referencia oldat és a mozgófázis között fellép. Ennek értéke egy jól tervezett kombinált üvegelektrodánál 0,01 pH nagyságrendbe esik. A gyakorlati számításoknál csak azzal a hatással kell számolnunk, amely akkor lép fel, ha a hidrogén-iont a vizes közegből átvisszük a nem vizes közegbe.

$$\delta = -\log\left(\frac{{}^S\gamma_H^0}{{}^W\gamma_H^0}\right) \quad (57)$$

Ezeket az adatokat víz-metanol elegyre a teljes koncentráció tartományban ismerjük valamint részben a víz-acetonitril elegyre (lásd XXII. – XXIII. Mellékletben).

A két módon mért pH ugyanarra az oldószerre vonatkozik, csak a standard állapotban különböznek, amelyre az aktivitási koefficiens egységnyinek tekintjük. Metanolra vonatkozó adatokból látható, hogy jelentős eltérés csak a nagy szerves oldószer tartalomnál van. Acetonitrilre az adatok csak 60%-ig vannak és itt az eltérés -0,44.

Folyadékkromatográfiás gyakorlatban elterjedt, hogy csak a puffer pH-ját mérjük. Ez gyakorlatilag a ${}^W\text{pH}$, ennek átszámolása az előző két pH-ra nehézségekbe ütközik. Amíg a ${}^S\text{pH}$ és a ${}^S\text{pH}$ értékek különbségét csak az oldószerek közötti önprotonálódási tényezőkből különbség adja, addig csak a puffer pH-n alapuló mozgófázis megadásánál már a vizsgált vegyület is közbejárt. Más oldalról nézve viszont a folyadékkromatográfiában arra kell választ adni, hogy a $\text{pK}_a \pm 0,5$ egységnél ne legyen nagyobb a különbség a mért és a valódi pH érték között. Ennek oka, hogy ebben a tartományban nagy a pH változás okozta szelektivitásváltozás, és a kromatográfiás gyakorlatban soha nem az abszolút értékek játszzák a főszerepet az elválasztásban, hanem a retenciók egymáshoz való viszonya. Amennyiben a teljesen ionvisszaszorított vagy ionizált értéket akarjuk elérni, akkor is, ha vízben mért értékekhez képest a határt $\text{pK}_a \pm 2$ -ben adjuk meg, akkor sem okoz 0,5 pK_a egység elcsúszás az ionizáció mértékében nagymértékű változást. A XXII. – XXIV. Mellékletben az ${}^S\text{pH}$ -ra adtak meg empirikus összefüggést az acetonitril, metanol és tetrahidrofurán koncentrációjának függvényében. A kiindulási alap, a szervesoldószermentes puffer volt. Az adatok alapján megállapítható, hogyha $\pm 0,50$ pH egység kritériumot alkalmazunk, akkor a pufferre vonatkozó pH érték alkalmazható a mozgófázisra anélkül, hogy a szelektivitás (relatív retenció) jelentősen változna. Mivel a protolitikus folyamatokra a

vizes és nem vizes közegben ugyanazok az elméleti megfontolások igazak, mint amit bemutattunk a pH-ra, az előzőekben előadottak érvényesek a pK_a -ra is. A továbbiakban ezt nézzük át részletesebben. A 6. táblázatban néhány vegyület vizes közegben mért pK_a értékét mutatjuk meg.

6. táblázat: Néhány vegyület pK_a értéke vizes környezetben.

Puffer	pK_a	pH tartomány	UV cut-off
Trifluoecetsav	< 2	< 2,5	210nm (0,1%)
Foszfát (pK_1)	2,1	1,1 – 3,1	< 200nm (10mM)
Citrát (pK_1)	3,1	2,1 – 4,1	230nm (10mM)
Formiát	3,8	2,8 – 4,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_2)	4,7	3,7 – 5,7	230nm (10mM)
Acetát	4,8	3,8 – 5,8	210nm (10mM)
Citrát (pK_3)	5,4	4,4 – 6,4	230nm (10mM)
Karbonát (pK_1)	6,4	5,4 – 7,4	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_2)	7,2	6,2 – 8,2	< 200nm (10mM)
Trietanolamin	7,8	6,8 – 8,8	200nm (10mM)
Tris	8,3	7,3 – 8,3	205nm (10mM)
Dietanolamin	8,9	7,9 – 9,9	200nm (10mM)
Ammónia	9,2	8,2 – 10,2	200nm (10mM)
Etanolamin	9,5	8,5 – 10,5	200nm (10mM)
Karbonát (pK_2)	10,3	9,3 – 11,3	< 200nm (10mM)
Dietilamin	10,5	9,5 – 11,5	< 200nm (10mM)
Trietilamin	11,0	10,0 – 12,0	< 200nm (10mM)
Foszfát (pK_3)	12,3	11,3 – 13,3	< 200nm (10mM)

6.3. A pK_a értékek a mozgófázisban és alkalmazásuk a folyadékkromatográfias gyakorlatban

Savas vagy bázikus csoportot tartalmazó vegyületeknél elérkeztünk az egyik központi kérdéshez, milyen pH értéken dolgozzunk, vagy meddig növelhetjük a pH értéket ahhoz, hogy a szabad bázist kapjuk meg, vagy a savas csoportot tartalmazó vegyületeknél meddig csökkenthetjük a pH-t anélkül, hogy a kolonnát tönkretennénk. Az előző pontok kimondatlanul is arról szóltak, hogy a pH, mint fogalom egy műveleti paraméter, amely mérésének megvannak az egyértelmű szabályai. A protonálódást, a deprotonálódást, és a kolonna tönkremenetelt viszont az oldatok hidrogén-ion aktivitása szabja meg. Megállapítást nyert, hogyha csak a puffer pH-ját mérjük, akkor a nem vizes oldatban a hidrogén-ion

aktivitás nem adható meg. Így a vizes pufferoldatokra megadott kolonna stabilitás értéke nem számolható ki csak a puffer pH ismeretében. A mozgófázisban mért, de vízre kalibrált pH mérésnél már a hidrogén-ion aktivitások a megadottak alapján számolhatók, amennyiben az elektródoknál a hátárfelületi potenciál elhanyagolható. A XXII. – XXIV. Mellékletben két oszlop is erre a célra szolgál, az egyikben a víz-szerves oldószer pK_a értéke található, míg a másikban a δ érték, mely a szerves oldószerben mért és a szerves oldószert, mind standard állapotot használó és a valódi hidrogénion aktivitást megközelítő **pH** számítható.

Nézzünk erre egy példát: 25 °C-on a víz önprotonálódási állandójának negatív logaritmus 14, azaz a pH skálát 0 és 14 között értelmezzük. Metanolnál ez az érték 16,77, a pH skála ennek megfelelően 0 és 16,77 között értelmezendő. Acetonitril-víz esetén a pK_a érték 34,40, tetrahydrofuran-vízénél 34,70 értékig terjed. A táblázatokból kiolvasható másik jellegzetesség, hogy ezek a pK_a értékek, különösen a nagy szerves oldószer tartalomnál változnak meg jelentősen. Sajnálatos módon adatok az irodalomban még nem jelentek meg, hogy a vízre megadott 1-8 pH közötti stabilitás hogyan vihető át a szerves oldószer tartalmú mozgófázisban mért pH stabilitásra. Spekulatív módon azonban következtethetünk ezekre az adatokra. Például 70 tf.% acetonitril-víz elegynél a pH skála kitolódása 3,14, így a fordított fázisú töltet felső pH (s^S pH) határa 11 körül van. Ismételten fel kell hívni a figyelmet, hogy ez nem az alkalmazott puffer pH-ja! Mindezekből látszik, hogy a viszonylag egyszerű pH megadási és mérési módszer (puffer pH-ja, vagy másképpen vízben mért és víz, mint standard állapot, melyben a hidrogén-ion aktivitási koefficiens 14, ha végtelen híg az oldat) adja a használható kolonna pH tartományáról a legkevesebb információt. Gyakorlati szempontból is elérkeztünk egy lényeges dologhoz, hogyan lehetséges puffer oldatokat készítenünk, hogy azok reprodukálhatóak legyenek. Ez a kérdés ismételten visszavezethető arra, hogy az oldatban mért hidrogén-ion aktivitás még vizes oldatban sem törvényszerűen egyezik meg a mért pH értékkel, továbbá az ion koncentráció is befolyásolja. Következmény, hogy az eltérően készített és a pH mérő által azonos értéket adó oldatok hidrogén-ion aktivitása eltérő, és a módszer reprodukálásánál eltérő eredményt kapunk. Ezek után nézzük meg, hogy hányféleképpen készíthetjük el a puffert.

1. módszer: Az ajánlott módszer, hogy az elsődleges és/vagy másodlagos pufferekből tömeg szerint összemérjük az oldatokat, és a nemzetközileg elfogadott értéket használjuk. Ez egyértelmű, mindenhol reprodukálható. Amennyiben táblázatban az adott összetételt és a hozzá tartozó pH értéket nem találjuk meg, akkor a tiszta komponensekből törzsoldatot készítenünk, ezek pH-ja adott és a megadott arányokban összemérjük, és mérjük a pH értéket. A tömegmérés az egyik legpontosabb analitikai mérésünk. A 7. táblázatban 0,1 M-os pufferek készítésére adunk javaslatot.

7. táblázat: 0,1M-os pufferek készítése.

pH	A-oldat (mL)	B-oldat (mL)	pH	C-oldat (mL)	D-oldat (mL)	pH	B-oldat (mL)	E-oldat (mL)
2,0	565	435	3,6	926	74	5,6	948	52
2,2	455	545	3,8	880	120	5,8	920	80
2,4	345	655	4,0	820	180	6,0	877	123
2,6	250	750	4,2	736	264	6,2	815	185
2,8	175	825	4,4	610	390	6,4	735	265
3,0	110	890	4,6	510	490	6,6	685	315
3,2	55	945	4,8	400	600	6,8	510	490
			5,0	296	704	7,0	390	610
			5,2	210	790	7,2	280	720
			5,4	176	824	7,4	190	810
			5,6	96	904	7,6	130	870
						7,8	85	915
						8,0	53	947

A-oldat: 0,1M foszforav

B-oldat: 0,1M nátrium-dihidrogén-foszfát

C-oldat: 0,1M ecetsav

D-oldat: 0,1M nátrium-acetát

E-oldat: 0,1M dinátrium-hidrogén-foszfát

2. módszer: Az analitikai-kémiai számításoknál megismert közelítő képlet alapján számítást végzünk:

$$pH = pK_a + \log \frac{C_{s\acute{o}}}{C_{sav}} \quad (58)$$

A képlet alapján kiszámoljuk, hogy 0,01 mol/dm³ savhoz mennyi bázist kell adni, hogy 4-es legyen a pH értéke. Készítsünk ecetsav-nátrium-acetát puffert (**pK_a**=4,76). Bemérünk 0,01 mol ecetsavat egy 1000 ml-es normállombikba, majd a számítás alapján hozzáadunk 0,015 mol nátrium-hidroxidot és jelre töltjük a lombikot. A pH csak körülbelül lesz 4-es értékű, mert a bázisnál nem vettük figyelembe az aktivitásfüggést (lásd Debye-Hückel elmélet vagy Bates-Guenheim közelítés). A hidrogén-ion aktivitás függ a disszociációs állandótól, az egyéb ionoktól, a mozgó fázisban mért valódi hidrogénion aktivitástól és az önprotonálódási állandótól. Hogy a bázikus karakterű anyagoknál ez milyen mértékű, irodalomból vett példával illusztráljuk:

Legyen az oldatunk $0,01 \text{ mol/dm}^3$ NaOH, ekkor az aktivitása, $a_s = C_{\gamma_H}$, ez $0,01 \cdot 0,9 = 0,009$. Az $a_h = K_v/a_s = 1,11 \cdot (-14)$, a vízre vonatkoztatott pH érték 11,95. Itt az eltérés a kromatográfiás viselkedésben csak kismértékű. 50 tf.%-os acetonitril-víz elegyben γ_H értéke 0,856, így az a_s értéke 0,00856, a mozgófázis pK_a értéke $10(-15,48)$ és az oldószerre vonatkoztatott pH = 13,41.

Ez ismét rámutat arra, hogy a hidrogén-ion aktivitás pH értelmezésénél is problémák vannak, így a puffer elkészítés módja eltérő aktivitást, pH-t jelent, amely a retenciót nagyban befolyásolja. A pH számításához és puffer-oldatok készítéséhez segítséget nyújthatnak számítógépes szoftverek is, mint pl. a BufferMaker program. A XXVIII. – XXX. Mellékletekben a leggyakrabban alkalmazott pufferek elkészítéséhez találunk számított összetételeket.

3. módszer: Bemérjük az ecetsavat és NaOH-dal 4-es pH értékig titráljuk. Ismétetlen a hidrogén-ion aktivitás meghatározatlansága okoz bizonytalanságot a retenció reprodukálásában.

4. módszer: A fenti műveletet a mozgófázisban hajtjuk végre. A mozgófázishoz hozzámérjük az ecetsavat, és NaOH oldattal titrálva állítjuk be a pH értéket. Ekkor a vízre vonatkoztatott értékhez képest megkapjuk a vízre kalibrált, de a mozgó fázisban mért pH értéket, amely eltér a vízre vonatkoztatottól és a szerves oldószerre vonatkoztatottól is.

A puffer készítésénél, tehát az első módszer ajánlott. Módszer átvételénél mindig ellenőrizni kell, hogy hogyan készítették a puffert és mit értettek mozgófázis pH alatt.

Ahogy az előzőkben a pH mérésénél és értelmezésénél tárgyaltuk, ha a vizes közegben elkészített puffert a szerves oldószer tartalmú mozgófázisba tesszük, megváltozik a hidrogén-ion aktivitása, mert megváltoznak a disszociációs viszonyok. Természetesen ez igaz a savas vagy bázikus csoportokat tartalmazó vegyületekre is. Más lesz a disszociációs állandójuk vízben, és más lesz a mozgófázisban. Mivel a savas és/vagy bázikus csoportokat tartalmazó vegyületeknél az optimalizálás sarkalatos pontja a mozgófázisban mért pK_a érték, és ehhez viszonyított hidrogén-ion aktivitás, továbbiakban ezeket a hatásokat vesszük figyelembe és nézzük, hogy milyen megközelítéseket használhatunk majd.

A pK_a érték ismerete alapvető a folyadékkromatográfiás elválasztás tervezésénél. A gyakorlati adatok alapján az mondható el, hogy a változás vegyületről vegyületre változik. Néhány általános trend azonban megadható. Ezek közül kettő emelendő ki. Az egyik, hogy a savas csoportot tartalmazó vegyületeknél a fordított fázisú körülmények között a pK_a értéke növekszik. Ez annyit jelent, hogy a vízben mért értékekhez képest az ionizált forma aránya

megváltozik, mert a pH skála megváltozott. A növekvő szerves oldószer koncentrációval megváltoznak a szolvatációs viszonyok.

6.4. A pH és pK_a érték változás savas pufferek alkalmazásakor savas csoportot tartalmazó vegyületek meghatározásakor

Elméleti alapon már tárgyaltuk a savas és bázikus csoportot tartalmazó vegyületek visszatartásának változását a pH-val, amelyet a hidrogén-ion aktivitásával vettük egyenértékűnek, most részletesen tárgyaljuk, hogy a gyakorlatban milyen közelítéseket alkalmazhatunk.

A pufferek alkalmazásánál alapvető szempont, hogy a legkisebb koncentrációban alkalmazzuk. (A XXVII. Melléklet néhány puffer oldhatóságát szemlélteti víz-szerves oldószer elegyben). Ahhoz, hogy ez a feltétel teljesüljön, az kell, hogy a pufferkapacitás az adott pH értéken nagy legyen. Jól ismert, hogy a pufferkapacitás a puffer $pK_a \pm 1$ -es pH tartományban megfelelő. Amennyiben a szerves oldószer hatására a pK_a érték kikerül ebből a tartományból, akkor a várt hatás, azaz a pufferkapacitás akár egy nagyságrenddel is kisebb lehet, amelynek az a következménye, hogy az eltérő pH-jú mintánál a komponensek molekuláris formáit nem képes a mozgófázis megszabta arányra a kolonna elején gyorsan átállítani, és ez csúcshévesedést vagy csúcs megosztást eredményez (splitting). Nézzük meg először is, hogy milyen irányban változik meg a savas pufferek pK_a értéke. Savas pufferek alatt azokat értjük, amelyeket egy gyenge sav és annak erős bázisból előállított sójából készítünk. Ebbe a csoportba tartoznak a foszfát, az ecetsav/nátrium-acetát, citromsav/nátrium-citrát pufferek, hogy a legtöbbet alkalmazottakból néhányat említsünk.

A pK_a érték változása a puffer savas jellegének megváltozásával függ össze. A savas jelleg növekedése vagy csökkenése viszont azzal függ össze, hogy a közeg – esetünkben az alkalmazott mozgófázis – milyen mértékben képes szolvatálni (hidratálni) a hidrogén-iont. Az oldószereknek ez a képessége nagyban összefügg a dielektromos állandójukkal. A víz, amely ebben az esetben a viszonyító oldószer nagy dielektromos állandójú ($\epsilon \geq 80$, szobahőmérsékleten), ha ehhez szerves oldószert adunk, akkor az oldószerelegy dielektromos állandója csökken. Ebből következően a szolvatáló képessége is csökken, amely a savi erősség csökkenését eredményezi. Anélkül, hogy az összetett elméleti levezetésbe belemennénk, az Izmailov által levezetett összefüggést adjuk meg, az előzőekben bemutatott pK_a változás (shift) alátámasztására:

$${}^S pK_a = {}^{vac} pK_{HA} - {}^{vac} pK_{HS^+} - \frac{e^2(z-1)}{2,303r({}^S \epsilon)kT} - \frac{\sum_S G_{SOLV}^0}{2,303RT} \quad (59)$$

ahol a mozgófázisban mért pK_a értéket az oldószer dielektromos állandójával (ϵ) és a solvatációs energiával (G_{SOLV}) hozza összefüggésbe. Viszonyító alap a vákuum, ahol nincsenek specifikus solvatációs hatások, e az elektron töltését, z a töltésszámot, T a hőmérsékletet, k a Boltzmann állandót, r az ionok átlagos átmérőjét adja meg.

Az összefüggésből egyértelmű, hogy a solvatációs energia csökkenésével a vákuumban mért aciditás csökkenése kisebb mértékű, így egy relatív skálán mérve ez pK_a növekedést ad. Az ion visszaszorított savaknál $z = 0$ és ezért a dielektromos állandót tartalmazó tag is pozitív lesz, ami egyértelműen növeli a pK_a értéket.

Bázisos puffereknél a konjugált sav töltése 1, így az elektrosztatikus tag nem változtatja meg a pK_a értéket, csak a solvatációs tag, ahogy már az előzőekben hangsúlyoztuk, hogy a fordított fázisú folyadékkromatográfiában alkalmazott oldószerek az ionos formában lévő anyagokat kevésbé solvatálják, mint a víz, így ez a tag a bázikus pufferekre a pK_a értékben csökkenést eredményez. Bázikus pufferekről akkor beszélünk, ha tompító oldat egyik komponense gyenge bázis, és/vagy gyenge bázisnak erős savval képzett sója.

Felhasználva az előző összefüggést és megnézzük a pK_a változást savas pufferekre, akkor a következő összefüggést kapjuk:

$${}^S pK_{HA} - {}^W pK_{HA} = \frac{vac}{vac} pK_{H_3O^+} - \frac{vac}{vac} pK_{HS^+} - \frac{e^2(z-1)}{2,303rkT} \left(\frac{1}{{}^S \epsilon} - \frac{1}{{}^W \epsilon} \right) - \frac{(\sum_S G_{SOLV}^0 - \sum_W G_{SOLV}^0)}{2,303RT} \quad (60)$$

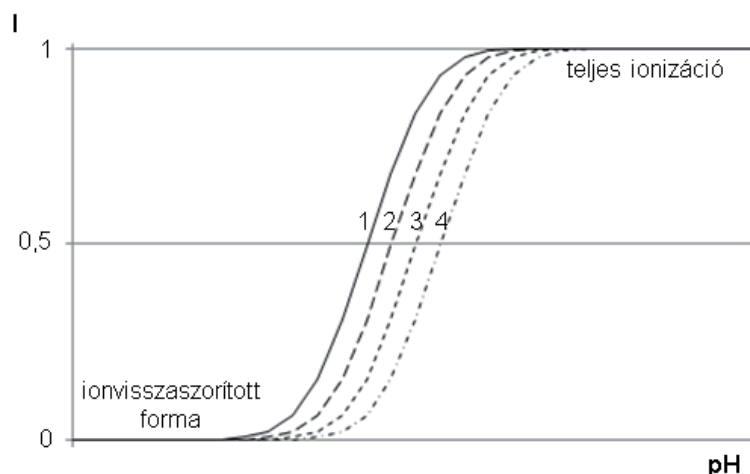
Feltételezve, hogy a vízben és a mozgófázisban a solvatációs energiák csak kevésbé térnek el, akkor a változást elsődlegesen a közeg dielektromos állandójának változására vezethetjük vissza. A XXII. – XXIV. Mellékletben ezeket a dielektromos állandókat megadtuk. Acetonitril-víz elegynél a változás először kisebb mértékű, majd a változás nagysága valamelyest nő. Folyadékkromatográfiás gyakorlatban, ahol a pufferekkel egy adott tartományban kell dolgoznunk ($pK_a \pm 1$), a pK_a változást savas puffereknél lineáris összefüggés alkalmazásával közelíthetjük:

$${}^S pK_{HA} = a {}^W pK_{HA} + b_S \quad (61)$$

Az összefüggést az előzővel összevetve a tengelymetszet értékét (b), az első három tagja, míg a meredekségét az eltérő solvatációs hatások szabják meg. Minél kisebb a mozgófázis solvatációs hatása a vízhez képest, annál nagyobb a meredekség.

A savas pufferek oldaláról nézve egyértelmű pH eltolódást kapunk, mégpedig a nagyobb értékek felé. Minél nagyobb a szerves oldószer tartalma a mozgófázisnál, annál nagyobb ez a sáveltolódás. A vizsgálandó szerves oldószer oldaláról is meg kell határoznunk ezt az eltolódást. A szerves vegyületekre is a vizes közegre ismertek (mértek vagy intelligens programmal előre jeleztek). A fenti gondolatmenet a folyadékkromatográfiásan mért savas

csoporthoz tartozó vegyületekre is pontról-pontra alkalmazható. Az eltolódás mértéke itt is lineárisan közelíthető. Amennyiben az adott pH értéken a puffer töltésszáma megegyezik a vizsgált molekuláéval, akkor az egyenes tengelymetszete azonos lesz, az eltérés az egyenes iránytangensében várható, attól függően, hogy a pufferhez képest mennyivel változik meg a szerves vegyület szolvatációja. A változás iránya mind a pufferre, mind a szerves vegyületre ugyanolyan irányú. Kérdés, hogy vajon a vegyület pK_a értéke egy egységnél nagyobb értékkel változott-e meg a pufferhez képest. Gyakorlati folyadékromatográfiás szempontból a következő közelítést tehetjük: Ha szerves vegyületet, az elválasztás stratégiájának megfelelően ion visszaszorított formában akarjuk meghatározni, akkor az általános szabálynak megfelelően $pH \leq pK_a \pm 2$. Figyelembe véve, hogy a szerves vegyület pK_a változása, az esetek döntő többségében nagyobb, mint a pufferé, így vízre mért vagy előre jelzett (prediktált) adatok megfelelőek, hiszen a pH-k azon a szakaszon vagyunk, ahol a változás elhanyagolható, ezt a 49. ábrán mutatjuk be.

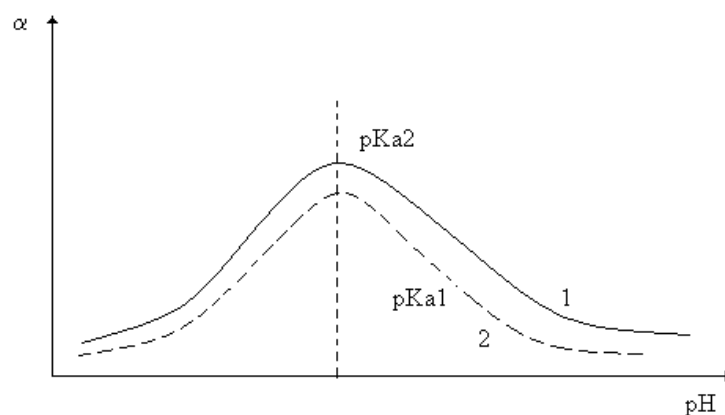


49. ábra: Savas csoportot tartalmazó vegyületek elválasztása savas pufferrel. A vizes közegre mért pK_a értéket lehet alkalmazni az elválasztásnál a pH kiválasztására.

Alapszabály, tehát hogyha lehetséges, akkor a savas csoportot tartalmazó vegyületeknél savas puffereket alkalmazzunk, mert ekkor az elválasztás tervezésénél a vízben mért vagy előre jelzett pK_a értékek használhatók.

Amennyiben a szelektivitás növelése érdekében a savas csoportot tartalmazó vegyület pK_a értéke körül kell dolgoznunk, akkor már az előbbieken leírtak csak részben alkalmazhatók. 30-40 tf.% szerves oldószer tartalomig a puffer $pK_a \pm 1$ tartományából valószínűleg nem csúszunk ki. Ez ugyan pufferkapacitás oldalról nézve megfelelő, de lehetséges, hogy nem vagyunk abban a pH tartományban, ahol a legnagyobb a szelektivitás. Ezért a tervezésnél a nagyobbik pK_a -t kell figyelembe venni és az indulásnál ezt a pH-t alkalmazni. Annak eldöntésére, hogy megfelelő pH-t alkalmazunk-e, a második lépésben növeljük meg a pH-t 0,5 értékkel, és nézzük meg a szelektivitást. Ha csökken, akkor a vízre

mért pK_a adatok megfelelőek, ha nő, akkor ezt az új pH-t kell alkalmaznunk. A változásokat az 50. ábrán is megadjuk.



50. ábra: pH tartomány kiválasztás a 30-40% szerves oldószer tartalmú mozgófázisig.

40-70 tf.% acetonitril tartományban a vízben mért pK_a -hoz képest egy egységgel növelni kell a pH-t a kisebb pK_a -jú komponenshez képest. Majd az ellenőrzés során készíteni kell egy puffert, amelynek a pH-ja 0,5 egységgel kisebb és egyet, amelynek a pH-ja 0,5 egységgel nagyobb az első méréshez képest.

A legnagyobb pH változás a 80-100 tf.% acetonitril tartalmú mozgófázisoknál következik be. Ez a változás igaz mind a savas pufferre, mind a vizsgált vegyületekre. Ebben az esetben is kihasználva a lineáris függését a pH-nak, ekkor 80-90 tf.% acetonitril tartalomig, a vízben megadott pK_a értékeket 1,5 egységgel növeljük, és ennek megfelelően a savas puffer pH értékét is, majd a mérés után az előzőekben megadottak szerint először 0,5 egységgel csökkentjük, majd 0,5 egységgel növeljük a mozgófázis pH értékét. 90 tf.% felett az első lépésben 2 egységgel növeljük a mozgófázis pH értékét, azután a $\pm 0,5$ egységes változtatásokat végezzük el.

A savas csoportokat tartalmazó vegyületeknél a teljesen ionizált formában a mérést ritkán végezzük. Ennek egyik oka, hogy a vegyületek visszatartása túl kicsi, vagy pedig a teljesen ionizált formát csak a fordított fázisú töltet felső pH határán túl érjük el. Ha a vegyületek stabilitása miatt kénytelenek vagyunk nagy pH értékeknél dolgozni, akkor a pH növelésére gyakorlatilag ugyanazok a szabályok vonatkoznak, mint amelyeket a pK_a érték körül leírtunk. Ezeket a következőkben foglaljuk össze:

0-40 tf.% acetonitril-víz pH = $pK_a + 2$, ellenőrzés $\pm 0,5$ pH

40-70 tf.% acetonitril-víz pH = $pK_a + 2,5$, ellenőrzés $\pm 0,5$ pH

70-90 tf.% acetonitril-víz pH = $pK_a + 3,0$, ellenőrzés $\pm 0,5$ pH

90-100 tf.% acetonitril-víz pH = $pK_a + 3,0$, ellenőrzés $\pm 0,5$ pH

A fentiekben leírtak akkor és csak akkor igazak, ha savas jellegű puffereket alkalmazunk, mert ekkor a pK_a értéke a pufferek és a vizsgálandó vegyületeknek azonos irányban változik. Mindkét esetben nő, és ezáltal bizonyos mértékű kompenzáció történik.

A fordított fázisú folyadékkromatográfiában a másik, sokat alkalmazott oldószer elegy a víz-metanol. A továbbiakban ebben a mozgófázisban vizsgáljuk a savas pufferek hatását a savas csoportot tartalmazó vegyületek elválasztására. Metanol-vízben mutatunk be néhány szemléletes példát a 8. táblázatban vízben mért puffer és a szerves közeg pH-ja közötti különbségre .

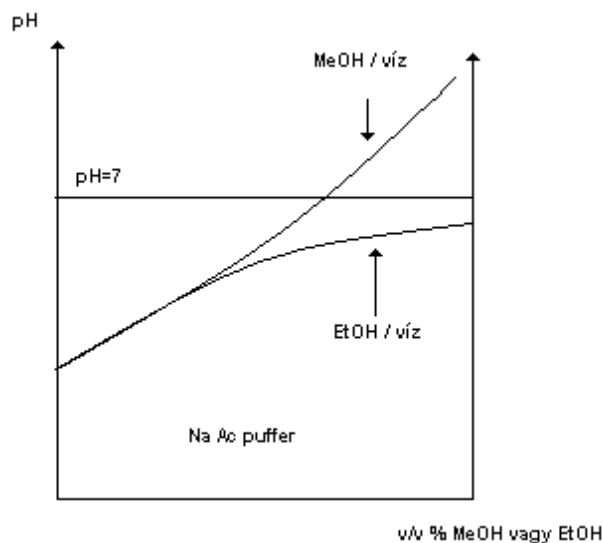
8. táblázat: *Eltérés a $pH_{(S)}$ és a $pH^*_{(S)}$ között*

Metanol m/m%	Oxalát alapú pufferek	Szukcinát
0	2,15	4,12
vizes oldatban		
10	2,19	4,30
20	2,25	4,48
50	2,47	5,07
80	3,13	6,01
90	3,73	6,73
100	5,79	8,75

T = 25°C

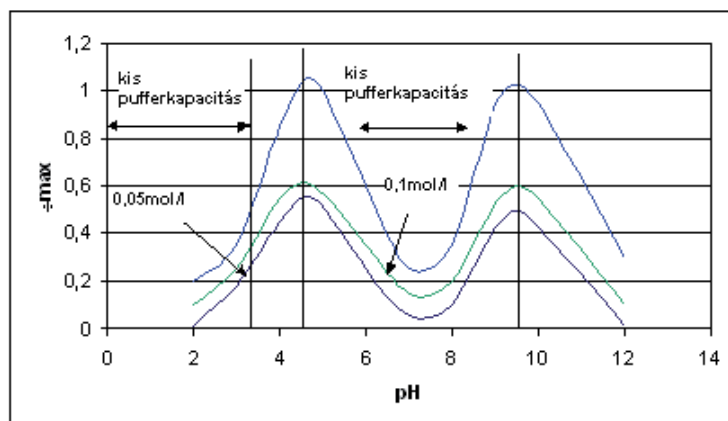
A táblázat adataiból jól látható, hogy a vízre vonatkoztatott puffer pH és a mozgófázisban mért érték között kb. 80 tf. % fölött változik meg a mért érték úgy, hogy a $pK_a \pm 1$ puffer tartományból kikerülünk.

Nátrium-acetát puffernél ez a változás az elméleti levezetésekben megadott lineáris változást követi (51. ábra).



51. ábra: A vízre megadott puffer pH és a mozgófázis pH-ja közti különbség nátrium-acetát puffer alkalmazásakor.

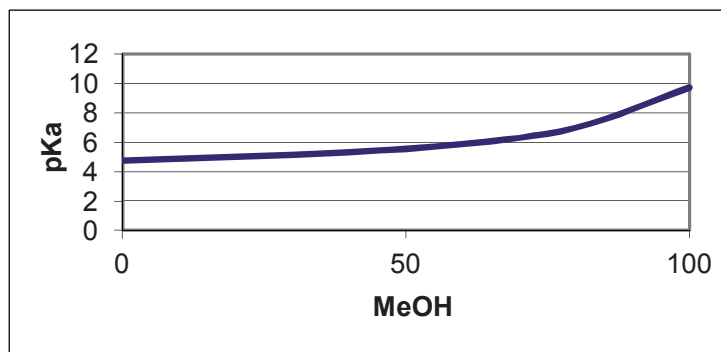
Ahhoz, hogy az előzőekben sokszor hangsúlyozott puffer $pK_a \pm 1$ szabályt megértsük, bemutatjuk az ammónium-acetát pufferkapacitásának pH függését (52. ábra).



52. ábra: A pufferkapacitás pH és koncentrációfüggése ammónium-acetát puffer alkalmazásakor.

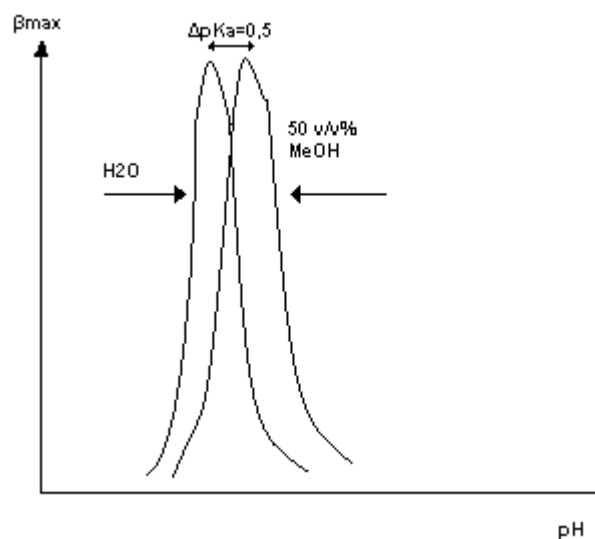
A bemutatott puffernek két pH tartományban van maximális pufferkapacitása, a savas tartományban az ecetsav és az ammónia pK_a értékek körüli ($4,8 \pm 1$ és $9,2 \pm 1$, lásd 6. táblázat) tartományban. Ezek az értékek vízben igazak.

A 51. ábrán megadottaknak megfelelően ezek az értékek lineárisan változnak a metanol koncentrációjának függvényében. Amennyiben a csúszás egységnyi, akkor még a pufferkapacitás kisebb lesz, de az elválasztás hatékonysága nem romlik. Ha ebből a tartományból kikerülünk, akkor már csúcsszimmetria romlás lehet az eredmény. Mivel a savas komponensek pK_a értéke is hasonlóan növekszik, így a ± 1 tartományt csak a nagy metanol tartalmú mozgófázisoknál lépjük túl. A változást az 53. ábrával szemléltetjük.



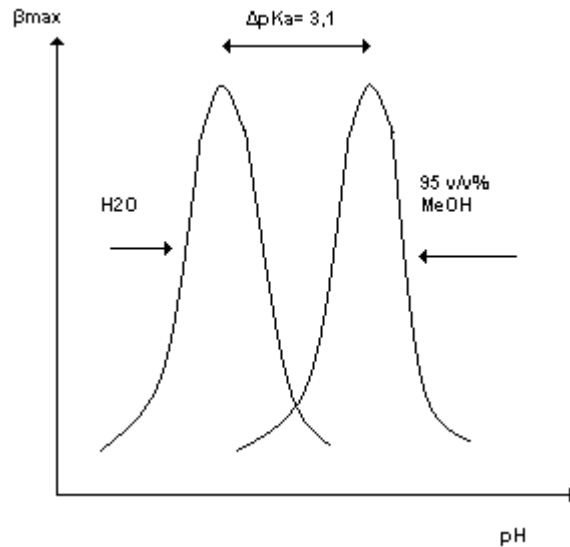
53. ábra: Az ammónium-acetát pK_a értékének változása a mozgófázis metanol tartalmának függvényében.

Az 54. ábrán a pufferkapacitás változását adtuk meg, amennyiben a mozgófázis metanol tartalma 50 tf.%. A pK_a értékben a változás csak 0,5 egységnyi, ha hozzávesszük, hogy a vizsgált savas csoportot tartalmazó vegyület pK_a értéke is azonos irányban tolódik el, akkor ± 1 szabály alapján a vízben mért pK_a adatokat használhatjuk és a maximális pufferkapacitás csak kis mértékben csökken.



54. ábra: A pufferkapacitás változása a mozgófázis metanol tartalmának függvényében. 50 tf% metanol koncentrációig a vízben mért pK_a értékeket használhatjuk az elválasztás tervezésekor.

Ahogy közeledünk a metanol felé ez a pK_a eltolódás egyre nagyobb lesz, azaz a pufferkapacitásban jelentős eltolódások várhatók. A szerves oldószerben a kis ionok (ammónium-, acetát-ionok) solvatációja csökken, míg a szerves anyagoké, esetünkben az ion visszaszorított savé és a disszociált savé viszont növekszik. Az ammónium-acetátra vonatkozóan ezt az alábbiakban adjuk meg (55. ábra).



55. ábra: Az ammónium-acetát pK_a értékének változása a metanolban a vízhez viszonyítva.

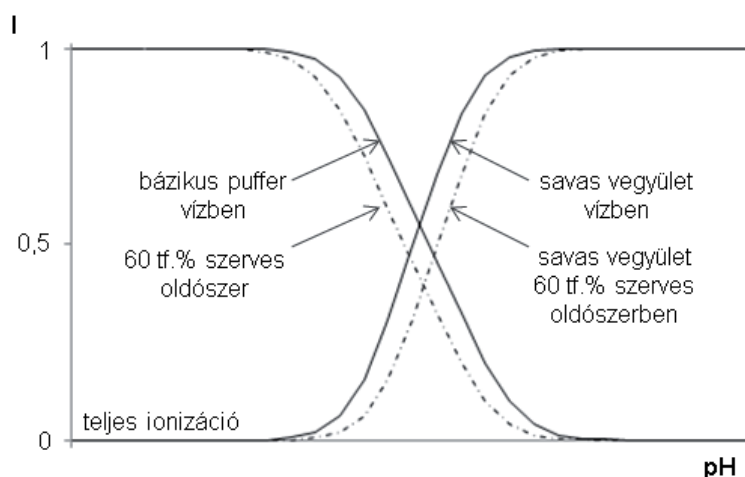
Az ábrából jól látható, hogy a változás mértéke már olyan nagy, hogy sok esetben nem férünk be a savas csoportot tartalmazó vegyület pK_a értékének eltolódásával korrigált ± 1 -es tartományba. A vízben mért pK_a értéket 1 - 2 egységgel korrigálni kell.

A harmadik oldószeranyag, amelyet még alkalmazunk, a tetrahydrofuran-víz elegy. Amennyiben a XXII. – XXIV. Mellékletben található adatokat összevetjük, akkor az acetonitril-víz elegyhez képest azonos összetételnél a dielektromos állandó jelentősen eltér, a mozgófázisokra megadott önprotonálódási adatok viszont közel esnek. A kisméretű szerves ionok solvatációja a mozgófázis dielektromos állandójával hozható összefüggésbe, a nagyméretű vizsgált ioné viszont a dielektromos állandón kívül az oldószer apoláris jellegétől is függ. A tetrahydrofuran-víz elegyben tehát a pK_a értékek eltolódása (savas jellegű puffer, mérendő vegyület) jelentősebb, mint az acetonitril-víz elegyben. Az irodalomban is kevés adat található, gyakorlati szempontból a jelentősége is kisebb, mert tetrahydrofuran-víz elegyet ritkábban alkalmazunk. A szelektivitás növelésére metanol-víz-tetrahydrofuran vagy acetonitril-víz-tetrahydrofuran elegyet használhatunk. Ezekben a terner elegyekben a tetrahydrofuran koncentrációja általában nem haladja meg 40 tf. %-ot, így a puffer pK_a értékére gyakorolt hatása kisebb. A ± 1 pH szabály alkalmazását az acetonitril-víz elegynél megadottak szerint végezhetjük el.

6.5. A pH és pK_a érték változás bázikus pufferek alkalmazásakor, savas csoportot tartalmazó vegyületek meghatározásához

A bázikus pufferek valamely gyenge bázist, és annak erős savval képzett sóját tartalmazza. Például klasszikus pufferek tekinthető az ammónium-hidroxid-ammónium-klorid, vagy az aminok és foszforsav alkotta pufferek, a tris, piperazin-piperazin fosztát. Ezeknél a puffereknél a pK_a értéket a konjugált sav (protonált) bázis disszociációja szabja meg. A pK_a érték változásának irányát és nagyságát a közeg azon sajátossága is megszabja, hogy a hidrogén-iont milyen mértékben tudja szolvatolni (hidratálni). Metanol-víz, acetonitril-víz, tetrahidrofurán-víz, vagy ezek terner elegyeiben a bázikus pufferek pK_a értékei csökkennek. Az előző fejezetben megadottak szerint a savas csoportot tartalmazó vegyület pK_a értékei viszont a szerves oldószer tartalommal nőnek.

A bázikus puffer pufferkapacitása a kisebb pH értékek felé, míg a vizsgált vegyületek ionizációja a nagyobb pH értékek felé tolódik el. Ezt a helyzetet illusztráljuk az 56. ábrán.



56. ábra: A bázikus puffer és a vizsgált vegyület pK_a értékének változása a mozgófázis szerves oldószer tartalmának változásával.

Ha a savas csoportot tartalmazó vegyületek elválasztási stratégiáját végigvesszük, akkor az ion visszaszorított formában történő elválasztás adja a legjobb lehetőséget.

Az amin típusú pufferek pK_a értéke 5 körül van. Szerves oldószer hozzáadásával ez az érték a kisebb pH-k felé tolódik el. A savas csoportot tartalmazó vegyületeké viszont a nagyobb pH értékek felé, ahogy ez az ábrából is látható. Az eredmény, hogyha a vízre megadott pK_a alapján adjuk meg az ion visszaszorításhoz szükséges pH-t, akkor ez bázikus puffer esetén biztosított. A savas csoportot tartalmazó vegyület elválasztása bázikus pufferrel, amennyiben a bázikus rész szerves molekulát takar, akkor az ionpár képződés

miatt az elválasztás összetett lesz, amelynek eredménye, hogy kismértékű **pH** változtatás nemcsak a savas csoportot tartalmazó vegyület **pK_a** értékét, hanem a bázisos puffer ionos formában lévő mennyiségét is csökkenti, amelynek következtében a szelektivitás túl sok paramétertől függ egyszerre, és nehezen tartható kézben. Ez az oka, hogy az ion visszaszorítás kivételével a bázikus puffereket csak ritkán alkalmazzuk savas csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásánál

6.6. Pufferválasztás bázikus csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásához

A bázikus puffereknél láttuk, hogy a **pK_a** érték a szerves oldószer tartalom növelésével általában a kisebb pH-k felé tolódik el. Az eltolódás iránya a bázikus csoportot tartalmazó vegyületekre is igaz. Amennyiben a szerves puffer és a bázikus csoportot tartalmazó vegyület **pK_a** értéke közel esik, akkor az eltolódások között kisebb a különbség.

Ismételten hangsúlyozzuk, hogy folyadékkromatográfiában, amikor a pH beállítással változtatjuk a szelektivitást, a szabadsági fokunk az a pufferkapacitásból következően ± 1 pH egység. Ehhez kell igazítanunk, hogy a bázikus csoportot tartalmazó vegyületnél az elválasztáshoz szükséges molekuláris forma meglegyen. Amennyiben a két feltételt össze tudjuk igazítani, akkor az, hogy milyen a pontos hidrogén-ion aktivitás az oldatban, nem elsődleges szempont. Fontosabb, ahogy ezt a puffer készítésnél leírtuk, hogy reprodukálhatóan elvégezhető legyen.

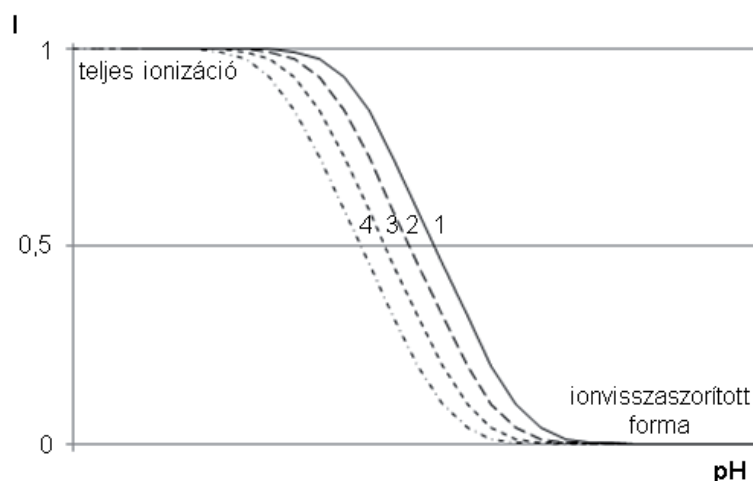
Ha a bázikus csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásakor bázikus puffert használunk, akkor az általános stratégiánk a mozgófázis pH-t tekintve a következők lehetnek. Ebben az esetben is az első kérdés, lehetséges-e ion visszaszorított formában az elválasztás. Itt jegyezzük meg, hogy az irodalom ezt a molekuláris formát a bázis semleges formájának nevezi, és ugyanezt alkalmazza a savakra is, ha ion visszaszorított formában van, ekkor ez a sav semleges formája.

Az ion visszaszorított formában történő elválasztás alapfeltétele, hogy a semleges formák között megfelelő **LogP** (apolaritás) különbség legyen. Ha ez megvan, akkor a pH-nak olyan értékűnek kell lenni, hogy a semleges formák gyakorlatilag állandóak legyenek. Ezt pH oldaláról nézve úgy tudjuk megadni, hogy a közegben mért valódi pH érték legyen 2 egységgel nagyobb, mint a bázikus csoport adott közegben mért **pK_a** értéke. Továbbá a puffer koncentrációjának minimumra csökkentése végett a pufferkapacitás legyen nagy (**pK_a** ± 1). Természetesen az állófázis felső pH határát az adott közegben nem haladhatjuk meg. A hagyományos fordított fázisú töltetekenél 8 - 9-es érték, míg a pH-t jól tűrő állófázisoknál 10 - 12.

Ez az érték egy bázisnál, amelynek a **pK_a** értéke vízben 6, 8-as pH-t jelent. Ez igaz akkor, ha csak puffert használunk az elválasztásnál. A **LogP** ≥ 1 értékű bázisoknál már több mint

10 % szerves oldószert kell alkalmaznunk. Ebben az esetben már mind a puffer, mind a bázikus csoportot tartalmazó vegyület pK_a értéke csökkenni fog. Fontos, hogy a változás azonos irányú! A változás mértékében van ugyan különbség, de biztosan benne maradunk a ± 1 pH egységben. Ez fontos, hogy a nagy pufferkapacitás megmaradjon.

A vizes oldatban mért pK_a érték, amely alapján a puffer pH-t választottuk megfelelő támpont. Az elmozdulást bemutatjuk ábrán is (57. ábra).



57. ábra: A bázikus csoportot tartalmazó vegyületek és a puffer pK_a értékének változása a szerves oldószer hozzáadására.

A bázikus csoportot tartalmazó vegyület pK_a értékének savas irányban való eltolódása nem változtatja meg a molekuláris formát, ezzel a visszatartás is állandó lesz. A kompenzációs hatás miatt 50 tf.% víz-szerves oldószer tartalomig a vízben mért pK_a értékek, mind bázikus csoportot tartalmazó vegyületekre, mind ennek alapján kiválasztásra kerülő puffereknél alkalmazhatók. 50 tf.% feletti szerves oldószer tartalomnál korrekciókat kell figyelembe venni. Általában ez a korrekció 90 tf.% szerves oldószerig nem haladja meg a 0,5 pH egységet. Ez annyit jelent, hogy maradván az előbbi példánál, a vízre mért pK_a értéket 2,5 egységgel növeljük meg. Ez az érték már a gyártók által a fordított fázisú töltet felső pH értéke fölött lehet, de ne feledjük, hogy a megadott érték vizes közegre vonatkozik. A szerves oldószer valódi pH értéke és az ezzel korrigált érték 1 - 2 pH egységgel is nagyobb lehet a specifikálnál.

A fordított fázisú kromatográfia gyakorlatában a 70-80 tf.% feletti szerves oldószer tartalomnál szerves anyagokból összeállított tompító oldatokat nem használunk, mert oldhatóságuk nagymértékben csökken, amely só kiválást okoz. A kritikus szerves oldószer tartományban tehát szerves anyagokból összeállított puffert kell használnunk. Ekkor viszont a szerves oldószer okozta pK_a csúszás a szerves pufferre és a bázikus csoportot tartalmazó vegyületekre nem tér el nagyon. Sok esetben elégséges a vizes közegre mért $pK_a \pm 2$ érték

a pH beállítására. A gyakorlatban az ellenőrző mérésnél változtassuk meg a pH-t 0,5 egységgel, és ha a visszatartások változatlanok, akkor az ion visszaszorított elválasztást valósítottuk meg. Állófázis oldaláról nézve egy Silica B (nagy tisztaságú) és jól borított és utószilanizált töltetet kell alkalmazni. Az állófázis megkötése még kritikusabb, ha a bázikus csoport pK_a -ja körüli pH értéknél végezzük az elválasztást.

Ekkor a bázikus csoportok közel fele ionizált a másik fele ion visszaszorított formában van. Az előzőekben csak a mozgófázis oldaláról tárgyaltuk a bázisos csoportokat tartalmazó vegyületek elválasztását. Ezt a hatást az állófázis minősége nagyban befolyásolhatja. Nincs tökéletesen borított fordított fázisú töltet, ezért a sztérikus okok miatt nem reagált, és a bázikus vegyület által hozzáférhető szilanol csoportok egy része ionos formában van, a másik része ion visszaszorított, azaz savas formában. A vegyület bázikus csoportja és a savas szilanol csoport olyan erős sav-bázis kölcsönhatást alakíthat ki, amely csúcs aszimmetriához vezet. Ehhez járul az erős ionos (ioncserés) kölcsönhatás, amely a protonált bázikus csoport és az anionos formában lévő szilanol között fellép. Véggövetkeztetés, hogy bázikus csoportot tartalmazó vegyületeknél csak kis szilanol aktivitású (Silica B) és jól borított fordított fázisú tölteteket szabad alkalmaznunk. Ekkor az állófázis nem képes specifikus kölcsönhatásokat kialakítani a bázikus vegyületekkel, nem lesznek nagyon eltérő erősségű kölcsönhatások, így a szelektivitást elsődlegesen az állófázis szabja meg.

Ha szelektivitási okok miatt a bázikus csoportot tartalmazó vegyületek pK_a értékei körül kell a pH-t beállítani, akkor vesszük a nagyobb pK_a értékű bázist és ennek megfelelően állítjuk be a pH-t. Általában ehhez használhatjuk a vízben mért vagy az előrejelzett pK_a értékeket. Ellenőrzésképpen a nagyobb pK_a értékhez képest 0,5 egységgel csökkentjük a pK_a értéket, és nézzük meg a szelektivitás változását. Azt fogadjuk el a további mérésekhez, amelyik esetben jobb az elválasztás. 50-80 tf.% között a nagyobbik pK_a értékhez képest 0,5 pH egységgel csökkentjük a pH-t, majd 1 egységgel csökkentve ismét végezzük el a mérést. Azt fogadjuk el a további mérésekhez, amelyik esetben jobb az elválasztás. Az egy egységgel történő pH csökkentés után is még megfelelő marad a pufferkapacitás. 80 tf.% felett a csökkentést 1,5 pH egységgel kezdjük, majd az ellenőrzést 2 pH egység csökkentésével végezzük el.

A bázisos csoportot tartalmazó szerves vegyületek elválasztásának harmadik lehetősége, ha protonált formában történik az elválasztás. Ennek nagy előnye, hogy ekkor a szilanol csoportok döntő többsége ion visszaszorított formában van, és csak gyenge kölcsönhatást tud kialakítani a protonált aminnal. Hátránya viszont a nagyságrendekkel csökkent visszatartás, amely ekkor az elválasztást is befolyásolja. Ekkor alapfeltétel, hogy a mozgófázisban mért pH érték a bázikus csoport pK_a értékénél kettővel kisebb legyen.

Ismételten a mozgófázis szerves oldószer tartalmának hatását kell figyelembe venni a pK_a értékre. 50 tf.%-ig ez a hatás a bázikus puffer és a bázikus csoportot tartalmazó szerves

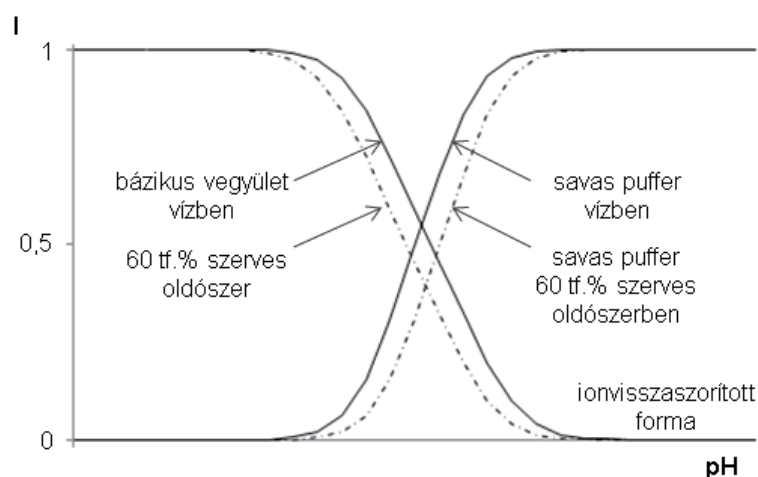
vegyület pK_a értékének azonos irányban történő változása miatt kismértékű. Ezért, ha elsőnek a kisebb pK_a értékű bázikus csoportot tartalmazó vegyület pK_a értékéhez (pK_a-2) állítsuk be a pH-t, az akkor jó indulási alap. Ellenőrzésképpen, a következő mérésnél ismét ehhez képest 0,5 egységgel csökkentjük a pH-t és a két mérést vessük össze majd a jobb elválasztást adó pH-án végezzük a további méréseket.

50-80 tf.% közötti szerves oldószer tartalmú mozgófázisoknál a kezdő pH érték a kisebbik pK_a értékű bázikus csoportot kell figyelembe venni, és ehhez képest kell a pH értéket 0,5 egységgel csökkenteni, majd ellenőrzésképpen újabb 0,5-es csökkentés következik. 80-100 tf.% közötti szerves oldószer tartalomnál a kisebbik pK_a értékű bázikus csoporthoz képest állítsuk be a pH-t. A beállított pH legyen pK_a-3 és az ellenőrzést 0,5 pH egységnél nagyobb és kisebb értéknél is állítsuk be és végezzük el a mérést. A három mérés közül a legjobbat adót válasszuk a további mérésekhez.

Általános szabály, hogy a vízre kimért és/vagy előre jelzett pK_a értékeket használhatjuk a bázikus csoportot tartalmazó vegyületek elválasztására, ha pH beállítására bázikus puffereket használunk.

6.7. Bázikus csoportot tartalmazó szerves vegyületek elválasztása savas pufferek alkalmazásával

A savas pufferek pK_a értéke a szerves oldószer tartalommal növekszik, míg a bázikus csoportot tartalmazó szerves vegyületeké csökken. A hatást az 58. ábrán mutatjuk be.



58. ábra: A savas pufferek pK_a értéke a szerves oldószer tartalommal növekszik, míg a bázikus csoportot tartalmazó szerves vegyületeké csökken. A szaggatott vonallal jelölt görbék a vízre megadott ionizációs viszonyokat tartalmazzák, a folytonos a szerves vegyületek hozzáadása után kialakultakat. A jobb oldalon a savas puffer változása, míg a jobb oldalon a bázisos vegyületé látható.

Az ábrán jól látható, hogy a savas pufferek pK_a értéke a szerves oldószer tartalommal növekszik, míg a bázikus csoportot tartalmazó szerves vegyületeké csökken. A végeredmény a pK_a ablak növekedése. Ez hatással lesz az elválasztási stratégia kidolgozására. Ismét végig megyünk a lehetséges elválasztási stratégiákon és empirikus közelítéssel a lehető legkevesebb számú lépéssel próbáljuk a pH beállítást megoldani.

Mindeddig is az első lehetőség, amit meg kell vizsgálnunk az, hogy ion visszaszorított formában (szabad bázis) lehetséges-e az elválasztás. Ennek két alapfeltétele van. Egyrészt az állófázis felső használati pH értékének nagyobbnak kell lennie, mint az ion visszaszorításhoz szükséges pH érték, másrészt a mozgófázisban mért pH értéknek a legnagyobb pK_a értékű bázisnál 2 egységgel nagyobbnak kell lennie. Az állófázis kritérium sok esetben csak pH tűrő fordított fázisú töltetekkel érhető el, ha legerősebb bázis pK_a értéke meghaladja a 7-et. Legyen a legerősebb bázisos csoport pK_a értéke 7, ekkor a mozgófázisban mért pH értéknek 9-nek kell lennie ahhoz, hogy az összes bázis ion-visszaszorított formában legyen. Ismételtelen nem tudunk másból kiindulni, mint a vízben mért pK_a értékekből. Vonatkozik ez a savas pufferekre és a bázikus csoportot tartalmazó szerves vegyületekre is. A 0,01 mol/kg dinátrium-tetraborát eleget tesz ennek a feltételnek. Ekkor a vízben mért pH nagyobb, mint 9. Kérdés, hogy ion visszaszorított formában hogyan változik meg a pK_a értéke, és ezzel összefüggésben a pH, ahol még a pufferkapacitás megfelelő ($pK_a \pm 1$). Az ion-visszaszorított formában lévő komponenseknél a LogP értékből az elválasztásnál alkalmazott szerves oldószer mennyisége becsülhető. Az elválasztás első lépésénél is meg kell nézni, hogy a LogP különbségek elegendők-e a sikeres elválasztáshoz. Általában, ha a két kritikus vegyület (kromatográfiás szakzsargonban: kritikus pár) közötti LogP különbség nagyobb, mint 0,1 akkor van esély a bázikus vegyületek semleges formájában (ion visszaszorított formában) az elválasztásra. Általános szabályként fogadjuk el, hogy kromatográfiásan semleges vegyületeknél, (ez lehet a bázikus csoportot tartalmazó vegyület semleges formája), a legnagyobb LogP -jű anyagra, ahhoz, hogy az 1 és 10 visszatartási tényező között eluálódjon, akkor a mozgófázis összetételére alkalmazhatjuk, hogy a szerves oldószer tartalom = $10 \times \text{LogP} + 10$ szabályt. Tehát egy 4-es LogP -jű anyagra 50 térfogat rész szerves oldószer tartalmat kell alkalmazni, ekkor a savas puffer pK_a értéke 0,5 - 1,0 egységgel növekedik, a bázikus vegyületek pK_a értéke hasonló mértékben csökken. A pK_a ablak és szükségszerűen a pH ablak növekszik. Az ion visszaszorítás oldaláról nézve ez kedvező, kérdéses viszont, hogy a pufferkapacitás megfelelő lesz-e. Amennyiben a kritikus pár kisebbik kisebbik pK -jú csoportjához választjuk a savas puffer pK_a és ezzel a pH értékét, akkor még a megnövekedett pK_a ablak mellett is elegendő lesz a pufferkapacitás.

Ha a LogP értéke 5 és 7 közé esik, akkor a mozgófázis szerves oldószer tartalmának 60 és 80 tf.% között kell lennie. Ez a nagy szerves oldószer tartalom a pH ablakot megnöveli. A vízre megadott értékeket, ha savas puffereket alkalmazunk, korrigálnunk kell, mert különben

a pufferkapacitás jelentősen lecsökken, amely torzult csúcsalakot eredményez. Amennyiben a legnagyobb pK -jú bázikus csoport pK_a értékéhez most egy olyan puffert választunk, amely pH értéke 8, akkor a pK_a értékekben bekövetkezett változások miatt nem csökken le a megengedett érték alá a puffer kapacitás. Amennyiben a csúcsszimmetriák megfelelőek, akkor valószínűleg a pufferkapacitás megfelelő. Ezt ellenőrizhetjük úgy, hogy olyan puffert választunk, amelynek a vízre vonatkoztatott értéke 0,5 egységgel kisebb illetve nagyobb. Amennyiben a visszatartások és az elválasztás változatlan, akkor az eredeti feltételezésünk igaz volt.

Ha a **LogP** értéke 7-nél nagyobb, akkor 80-100 tf.% szerves oldószer tartalmú mozgófázist kell alkalmazni. Ekkor a pK_a ablak tovább nő és az alkalmazott savas puffer kiválasztásánál ezt figyelembe kell venni. Első mérést itt is a legnagyobb pK -jú bázikus csoportnál egy egységgel nagyobb pH értéknél kezdjük, és ehhez válasszuk ki a megfelelő puffert. Majd 1,0 és 1,5 egységgel csökkentjük a savas puffer pH értékét, és végezzük el a méréseket. A három mérés közül, ahol a legkisebb zónaszélesedést, a legjobb csúcsszimmetriát és a legjobb elválasztást kaptuk, azzal a pufferrel folytatjuk a módszer kidolgozását.

A pH tartomány kihasználása az elválasztás hatékonyságának növelésére a legjobb helyzetet azzal teremti, ha a savas puffer pH-ja a kritikus bázis pár valamelyikének pK_a közelébe esik. Itt ismét a vizes közegben megadott pK_a értékekre és savas puffer pH értékekre kell támaszkodnunk, annak ismeretében, hogy a mozgófázisban a pK_a (vegyület)-pH (savas puffer) ablak a szerves oldószer tartalommal nő. A nagy víztartalmú mozgófázisoknál, ha a szerves oldószer tartalom kisebb, mint 30 tf%, akkor a vízre megadott értékek csúszása még kis értékű. Ha a kisebb pK_a -jú bázikus csoportra választjuk ki a puffer pH értékét, akkor a csúszás értéke olyan mértékű lehet, hogy benn maradunk a szelektivitás megkívánta pH tartományban. Mivel ez a csúszás bázikus vegyületről-vegyületre változik, az ellenőrző lépést el kell végezni. Ez abból áll, hogy a puffer pH-ját 0,5 egységgel csökkentjük és a mérést ismét elvégezzük. A két mérés közül a jobbkial folytatjuk az optimalizálást.

30-60 tf.% közötti tartományban a kezdő lépésnél a savas puffer pH értékét úgy választjuk meg, hogy a kritikus pár kisebb pK_a értékénél 0,5-el kisebb legyen. Majd ellenőrzésként kétszer 0,5-el csökkentjük. A három mérés közül a legjobbal folytatjuk a méréseket.

60-90 tf.% szerves oldószer tartalomnál a pK_a ablak tovább nyílik, a bázikus csoportot tartalmazó vegyületek pK_a értéke további csökkenést mutat, a savas puffer pK_a értéke tovább nő. Mindkettő értéke az anyagi minőség függvénye. A legjobb közelítés, amelyet ebben a szerves oldószer tartományban tehetünk a következő. A savas puffer pH értékét a kritikus pár kisebb pK_a értékű komponenséhez viszonyítva egy egységgel csökkentjük. Majd ellenőrző lépésként további egy egységgel csökkentjük a pH értéket. Amennyiben a

kromatográfiai csúcsok szimmetrikusak, és az elválasztás a minimális értékek fölött van akkor a pH érték korrekt. Ha nem akkor 0,5 pH egységgel csökkentjük majd növeljük a pH értéket és fokozatos közelítéssel határozzuk meg a megfelelőt.

90-100 tf.% szerves oldószer tartományban hasonló stratégiát kell követnünk, mint a 60-90 tf.% ban. A fokozatos iterációs lépések alapján tudjuk a savas puffer pH-t megadni.

Összefoglalásként annyi mondható el, ha bázikus csoportot tartalmazó vegyületeket akarunk azok pK_a értéke körül elválasztani, akkor a pK_a ablak nyílása miatt több lépésre van szükségünk a sava puffer pH-nak megadására.

A bázikus vegyületek elválasztásának következő lehetősége, hogy azok protonált formájában történjen. Ekkor a mozgófázis pH-nak az adott összetételű mozgófázisban mért legnagyobb pK_a értékű bázishoz viszonyítva 2 egységgel kevesebbnek kell lenni.

Ismételten visszaérteztünk ahhoz a ponthoz, hogy a bázikus csoportot tartalmazó vegyületek pK_a értékei általában vizes közegben ismertek. A további megfontolásokat is ebből a szempontból kell elvégezni. Ismerve azt a tényt, hogy a savas pufferek pK_a értékei ellentétesen mozognak a bázikus csoportot tartalmazó vegyületek pK_a értékeivel.

Az elválasztások ebben az esetben olyan pH értékeken történnek, ahol a nem reagált, de a vizsgált vegyület számára hozzáférhető szilanolok ionizációja visszaszorított. A bázisos csoportok ebben a pH tartományban protonált formában vannak. A kölcsönhatás a két molekuláris forma között kismértékű. Az anyagátmenet a két fázis között gyors, ennek eredménye a nagy kinetikai hatékonyság. A gyenge kölcsönhatás kis visszatartást eredményez. Kérdéses, hogy a minimális visszatartást elérjük-e. Amennyiben a kis szerves oldószer tartalmú mozgófázissal ez elérhető, akkor a vízben meghatározott pK_a értékeket a következőképp használhatjuk fel az optimalizálásra.

0-50 tf.% közötti szerves oldószertartalomnál közvetlenül használhatjuk a vízre mért bázikus pK_a adatokat, mert mind a bázikus csoportok, mind a savas puffer pK_a értéke csak kis mértékben változik meg. Ekkor $pH < pK_a - 2$ értékre állítjuk be a mozgófázis savasságát. Ellenőrzésképp ezt a pH-t még 0,5-del csökkentjük, és a két mérés alapján döntünk, hogy tovább csökkentjük-e 0,5 értékkel a pH-t.

60-100 tf.%-os szerves oldószer tartományban a $pH < pK_a - 3$ savasságú oldattal kezdjük mérést, majd a fordított fázisú töltet által megengedett pH határra csökkentjük azt. Általában ebben a tartományban kevés alkalommal dolgozunk, mert a hidrofób aminok oldhatósága a savas pH-án három-négy nagyságrenddel csökken, és a jól borított és/vagy utószilanizált tölteten kismértékű lesz a visszatartása. Az esetek egy nagy részében ezért 50 tf.% alatti szerves oldószer tartalom kell.

Mindenképpen kiemelendő, hogyha savas puffereket alkalmazunk bázisos csoportot tartalmazó szerves vegyületek elválasztására, akkor a vízre magadott adatokat (pK_a)

nehezebben használhatjuk, mert a savas puffer pK_a értéke és bázisos csoport pK_a értéke ellenkező irányban mozdul el a szerves oldószer hatására. Több kísérletből lehetséges a megfelelő pH kiválasztása.

A pH alapvető paraméter az ionpár-kromatográfiánál is. A savakat teljesen ionizált formába, a bázisokat teljesen protonált formába kell hozni. A probléma megoldása analóg az eddigiekben leírtakkal. Azzal kiegészítve, hogy az adott szerves oldószer tartalom mellett a savakra $pK_a + 2$, a bázisokra a $pK_a - 2$ feltételt biztosítani kell. A pK_a értékek az adott közegben értendők. Amennyiben csak vízre vonatkozó adatokat ismerjük, akkor a 6.3.-6.5. fejezetekben megfelelően kell eljárni.

6.8. A pK_a értékeinek változása a hőmérséklettel

A gyors folyadékkromatográfiai elválasztások egyik lehetséges változata az, hogy nagy hőmérsékletet alkalmazunk. A hőmérséklet növelésével viszont az oldószerek ön-protonálódási állandója nő, ezzel a pH tartomány szűkül. Ugyancsak megváltoznak a gyenge savak és bázisok disszociációs állandói, amely a megfelelő pH és puffer kiválasztást befolyásolja. A hőmérséklet hatásának tárgyalását az alkalmazott készülékektől függően két részre kell bontanunk. A hagyományos HPLC készülékekre, amelyeknél nincs fojtószelep a kolonna után, és azokra, amelyek ezekkel rendelkeznek. Az első esetben az intenzív buborékképződés elkerülése végett az alacsonyabb forrpontú komponens forrpontja alatt 20 °C-kal kell dolgoznunk. A másik esetben jóval 100 °C felett is dolgozhatunk. 60 °C-ig bármely állófázist alkalmazhatjuk, tudomásul véve, hogy a szilikagél alapúak élettartama a hőmérséklet emelésével jelentősen csökken.

A hagyományos folyadékkromatográfiánál a savas és a bázikus pufferek pK_a értéke is csak kis mértékben csökken. Ez csak kismértékű pH eltolódást eredményez. Kevés adat áll rendelkezésre az elválasztandó vegyületekre, de a fentiek alapján feltételezhető, hogy azoknál sem nagymértékű a változás. Mindenesetre a pufferkapacitás, amely a $pK_a \pm 1$ körüli pH-n a legnagyobb, megmarad, s ugyancsak az általános szabályok az ion elnyomásra és ion visszaszorításra megfelelő biztonságot adnak a tervezésre.

100 °C felett a disszociációs viszonyok jelentősen változnak. Például, 200 °C-on a víz dielektromos állandója 3, szobahőmérsékleten 80. Erről a területről, a pK_a értékek megváltozásáról, az ezzel kapcsolatos optimalizációs stratégiákról csak elvétve található adat. Gyakorlati példákat már lehet találni az irodalomban, a probléma az, hogy a hagyományosan előállított fordított fázisú töltetek stabilitása 100 °C felett kicsi, ezért vagy különleges módosítást kell alkalmazni, vagy cirkónium-dioxid alapú vagy szerves polimert kell használni. A HPLC-s gyakorlatban eltérő koncentrációjú puffereket alkalmazunk. Kérdés, hogy ezeknek milyen a hatása a vegyületek pK_a értékeire. Erre ad felvilágosítást a Davies összefüggés:

$$\Delta pK_a = \frac{0,512(2n-1)\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,1(2n-1) \quad (62)$$

ahol I az ionerősség és $n = 0; 1; 2$ (HPLC gyakorlatban $n \approx 1$)

Ajánlott és felhasznált irodalom a 6. fejezethez:

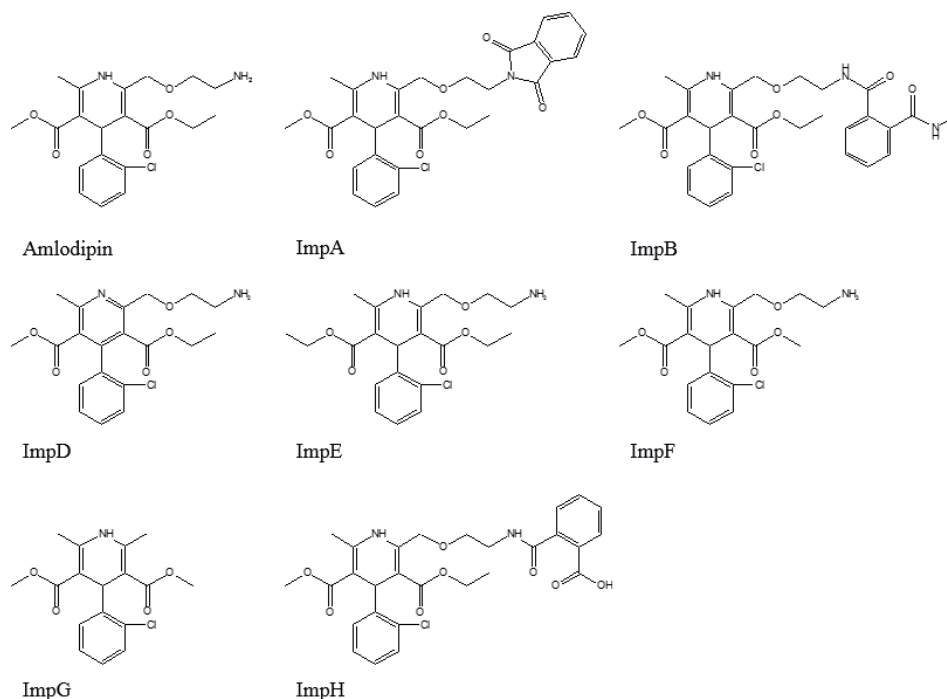
- (1) E. Bosch, S. Espinosa, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography: III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile–water mobile phases, *Journal of Chromatography A*, 824 (1998) 137-146.
- (2) X. Subirats, E. Bosch, M. Roses, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography: XV. Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the acetonitrile fraction of the mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 1059 (2004) 33-42.
- (3) X. Subirats, E. Bosch, M. Roses, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVII Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the methanol fraction of the mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 1138 (2007) 203–215.
- (4) X. Subirats, E. Bosch, M. Roses, Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XVIII: pH variation in mobile phases containing formic acid, piperazine, tris, boric acid or carbonate as buffering systems and acetonitrile as organic modifier, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2491-2498.
- (5) L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons, 1997. New York
- (6) D.V. McCalley, Influence of organic solvent modifier and solvent strength on peak shape of some basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column, *Journal of Chromatography A*, 708 (1995) 185-194.
- (7) K. Valkó, L.R. Snyder, J.L. Glajch, Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 501-520.

7. Számítógépes szimulációval támogatott módszerfejlesztés (Quality by Design)

Az International Conference on Harmonization (ICH) Q8(R2) és Q11 irányelvei a gyógyszer hatóanyagok és készítmények fejlesztési irányait egyértelműen megfogalmazzák. Ez azt jelenti, hogy a gyártásnál és a folyamatok ellenőrzésénél minden olyan paramétert, amely az eredményeket befolyásolja, a tudományos ismeretek alapján előre kell jelezni. Ezt a megközelítést nevezik Quality by Design (QbD) elvnek. Ez vonatkozik a gyártást ellenőrző analitikai eljárásokra, így a legtöbbet alkalmazott hagyományos nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és a modernebb ultra-nagy nyomású/hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) módszerekre is.

A folyadékkromatográfiás gyakorlatban ez azt jelenti, hogy olyan vizsgálati módszert kell fejleszteni, amely a készülék típusától függetlenül bárhol és bármikor reprodukálható eredményt ad ugyanarra az analitikai feladatra. A kifejlesztett és optimalizált analitikai módszert csak abban az esetben lehet felhasználni nyersanyagok, intermedierek, hatóanyagok vagy készítmények kvantitatív minősítésére, ha a módszer alkalmazhatósága előzetesen bizonyításra került. A módszerek alkalmazhatóságának bizonyítását validálásnak hívják. A validálás irányelveit az ICH Q2(R1) guideline foglalja össze.

A folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés egy lehetséges módját mutatjuk be ebben a fejezetben. Modellvegyületekként az amlodipint és az Európai Gyógyszerkönyvben (Ph.Eur.) előforduló szennyezőit használjuk (59. ábra).



59. ábra: Az amlodipin és a Ph.Eur.-ban leírt szennyezőinek szerkezete.

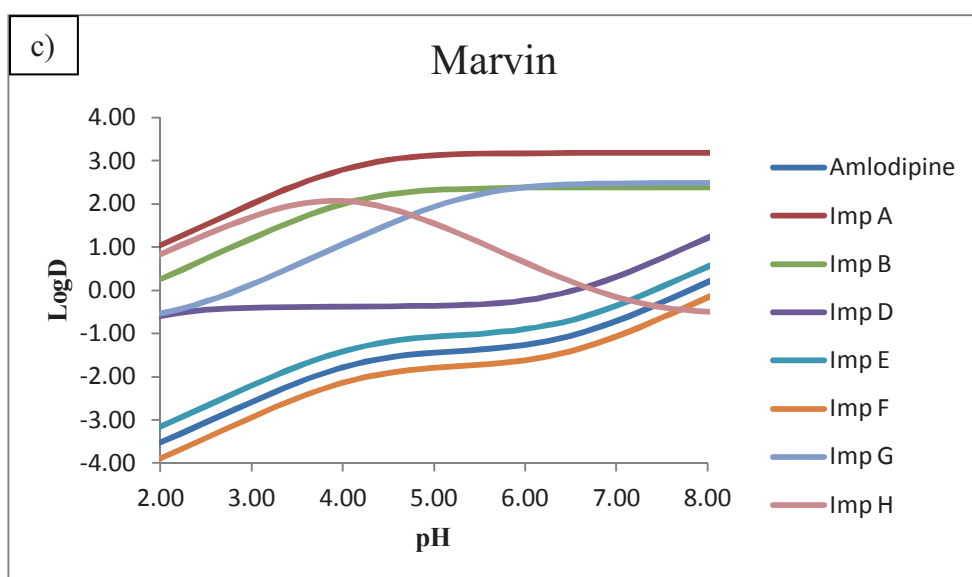
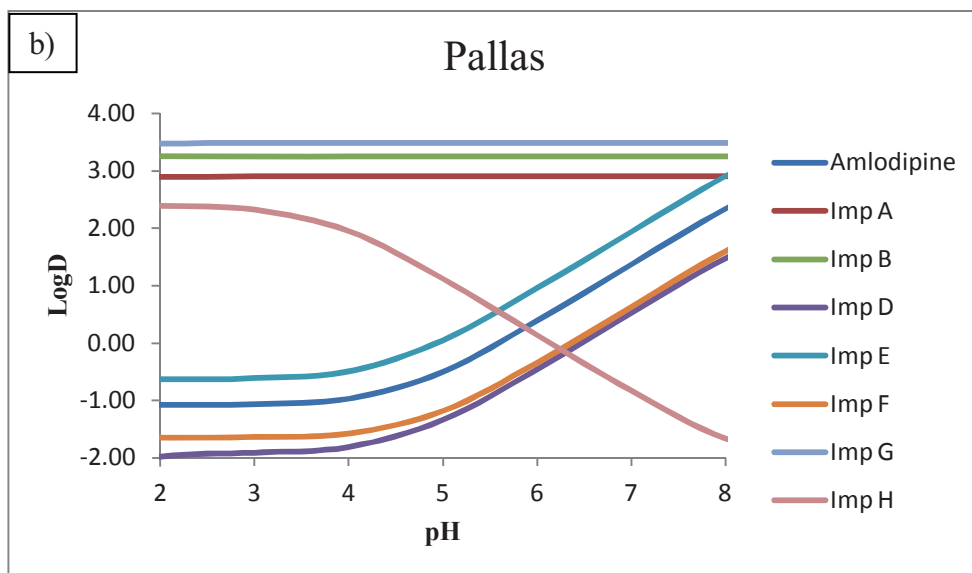
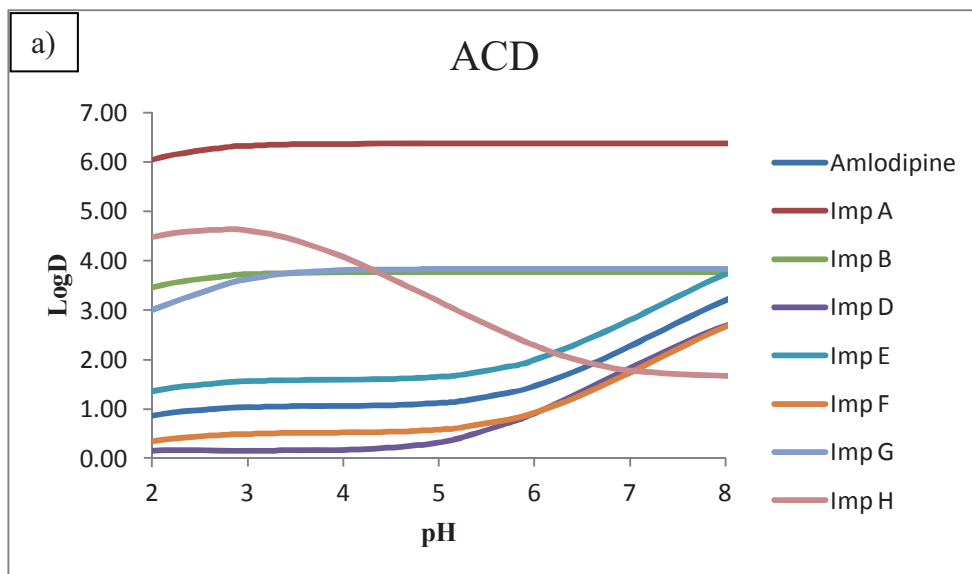
7.1. LogD meghatározása

Egy folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés megkezdésekor az elválasztandó vegyületek három fő anyagi állandóját célszerű meghatározni, ezek a pK_a , LogP és LogD .

A vizsgálandó komponensek ionizációja befolyásolja a retenciót, a detektálási limiteket, a csúcshélesedést, a szelektivitást és a módszer robusztusságát, következésképpen az oldatban jelenlévő komponensek pK_a értékeinek ismerete fontos a módszerfejlesztési kísérletek tervezésében és kivitelezésében. A LogP érték az ion visszaszorított formában lévő vegyület megoszlását fejezi ki az n-oktanol/víz fázisok között. Ez az érték arról ad felvilágosítást, hogy az elválasztandó vegyületek hidrofil vagy hidrofób tulajdonságúak-e. Mivel folyadékkromatográfiás körülmények között a komponensek nem csak ionvisszaszorított állapotukban fordulnak elő, ezért módszerfejlesztéskor nagy segítséget nyújt a LogD értékek ismerete, mely megadja a vegyületek ionos és nem ionos formájának megoszlását n-oktanol/víz fázisok között a pH függvényében. A LogD -pH függvény alapján lehet a mozgófázisként használt puffer pH-ját optimalizálni. Ezt a megoszlási hányadost úgy értelmezhetjük a RPLC-ben, hogy az állófázis (C8, C18, fenil, ...) felel meg az oktanolnak a poláros mozgófázis pedig a víznek. Azt azonban szem előtt kell tartani, hogy ez a modell nem veszi figyelembe azokat a kölcsönhatásokat, amelyek kialakulhatnak a vizsgálandó anyagok és az álló fázis között, de ad egy „segéd mankót” a vizsgálati módszer, illetve a megfelelő álló és mozgó fázis kiválasztáshoz. A $\text{LogD} > 0$ érték azt jelenti, hogy az adott komponens nagyobb mennyiségben van jelen apolárosabb közegben, tehát várhatunk megfelelő visszatartást fordított fázisú körülmények között. A LogD -pH adatokat vagy az irodalomból kereshetjük ki vagy számítógépes programok segítségével jósolhatjuk.

Az 59. ábrán látható szerkezetekből látszik, hogy az amlodipin, ImpD, ImpE és ImpF bázikus karakterű, mert tartalmaz szabad amino-csoportot. Az ImpH savas karakterű, mert karboxil csoportot tartalmaz. Az ImpA, ImpB és ImpG kromatográfiásan semlegesnek tekinthető.

A 60. ábrán három (ACD, Pallas és Marvin) szoftverrel számolt LogD -pH függvényt látunk, ugyanazokra a vegyületekre. A jobb áttekinthetőség kedvéért csak a folyadékkromatográfiában leggyakrabban használt pH tartományban (2 – 8) vizsgáljuk a függvényeket.



60. ábra: Az amlodipin és Ph.Eur. szennyezőinek LogD-pH függvénye
a) ACD, b) Pallas, c) Marvin szoftverekkel meghatározva.

A három függvény **LogD** értékei 6 - 7 nagyságrendet ölelnek át, de az értékek jelentősen különböznek egymástól, néhol még a sorrend is felcserélődik. A bázikus csoportot tartalmazó komponensek (amlodipin, ImpD, ImpE és ImpF) retenciója nő, míg a savas csoportot tartalmazó komponens (ImpH) retenciója csökken a pH emelésével. Két pH értéknél (pH = 3 és pH = 6) vizsgálva a függvényt nézzük meg a „jósolt” **LogD** sorrendeket:

ACD (pH=3): ImpD-ImpF-Amlodipin-ImpE-ImpG-ImpB-ImpH-ImpA

ACD (pH=6): ImpD és ImpF-Amlodipin-ImpE-ImpH-ImpB-ImpG-ImpA

Pallas (pH=3): ImpD-ImpF-Amlodipin-ImpE-ImpH-ImpA-ImpB-ImpG

Pallas (pH=6): ImpD-ImpF-ImpH-Amlodipin-ImpE-ImpA-ImpB-ImpG

Marvin (pH=3): ImpF-Amlodipin-ImpE-ImpD-ImpG-ImpB-ImpH-ImpA

Marvin (pH=6): ImpF-Amlodipin-ImpE-ImpD-ImpH-ImpG és ImpB-ImpA

7.2. DryLab szoftver

1986-ban Lloyd Snyder, John Dolan és Molnár Imre által DryLab név alatt elindított kromatográfiás modellezés, amely kezdetben a retenciós idők (t_r), a visszatartási tényező (k) és a kritikus felbontás ($R_{s,crit}$) egy dimenziós számításából indult, közben kromatogramokat vizualizálva, negyed századdal később eljutott a három mért és nyolc számított dimenzióig. A szakirodalom ezt a három-dimenziós modellt „Cube”-nak vagyis *kockának* nevezi. A szoftver a Horváth Csaba és Molnár Imre által kidolgozott szolvofób elméleten alapszik, mely a víz fontos, retenciót szabályozó szerepét magyarázza fordított fázisú körülmények között.

A DryLab egy lehetséges megoldás a Quality by Design folyadékkromatográfiás alkalmazására. Megemlítjük, hogy más kromatográfiás modellező szoftverek is rendelkezésre állnak. Valós méréseken alapuló modellezést tesz még lehetővé az Osiris szoftvercsomag vagy az ACD Lab LC simulator-a. A szoftverek másik nagy csoportja pedig a molekulaszervezet alapján végez predikciókat pl. Chromsword vagy ACD. Érdekes megközelítés a szelektivitás és felbontás optimalizálása az állófázis oldaláról, erre ad lehetőséget a POPLC szoftvercsomag.

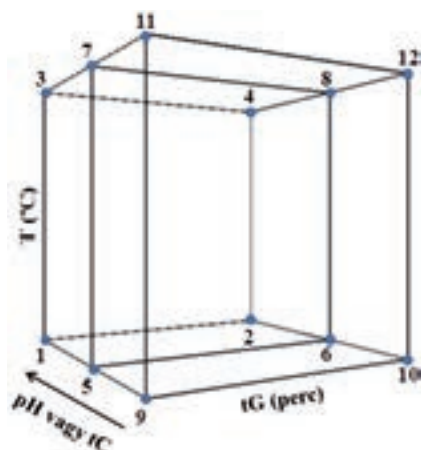
Egy *kocka* elkészítéséhez mindössze 12 alpmérésre van szükségünk. Ezzel egyszerre tudjuk kontrollálni a legfontosabb kromatográfiás paramétereket, mint a gradiens időt (t_G) – illetve meredekséget, a hőmérsékletet (T) és a pH-t vagy a terner eluens összetételét (t_c).

A *kocka* felépítését a 61. ábrán láthatjuk. Ez a kísérlettervezés első szakasza, amit a szakirodalom “Design of Experiment”-nek (*DoE*) nevez. A korábban említett 12 mérés kromatogramjait átvisszük egy elektronikus exportáló file típusba, az ún. AIA-formátumba (AnalYTICAL Instrument Association, *.cdf). Ezt követi a megfelelő kromatográfiás csúcsok egymáshoz való illesztése (Peak Tracking), amit legkönnyebben a csúcsterületek alapján tudunk megtenni.

A 61. ábrán lévő körök a *kocka* sarkain ill. élein jelzik a mérési pontokat. Az 1, 5, 9, 3, 7 és 11 pontok tartoznak a rövid-, míg a 2, 6, 10, 4, 8 és 12 pontok a hosszú gradiens időhöz (t_G -hez). Az 1, 5, 9, 2, 6 és 10 pontok tartoznak az alacsony, míg a 3, 7, 11, 4, 8 és 12 pontok a magas hőmérséklethez (T).

A három különböző pH-jú vagy terner összetételű (t_c) mozgófázishoz három különböző, ún. t_G - T -sík tartozik. Az azonos pH-hoz/ t_c -hez tartozó t_G - T -síkok a következők: (1, 2, 3 és 4); (5, 6, 7 és 8); a (9, 10, 11 és 12).

A szoftver a 3 mért t_G - T -sík mellé kiszámít további 97-et, ami által a *kocka* teljessé válik. A modellben minden pont reprezentál egy kromatogramot, dimenzióként ~100 pont képzelhető el, ami azt jelenti, hogy a háromdimenziós modellből 12 kísérlet alapján ~10⁶ szimulált kromatogram nyerhető.



61. ábra: A kocka modelljének felépítése, ahol az egyes pontok az alapkromatogramokat szimbolizálják. Miután minden egyes kromatogram különböző komponens retenciót mutat, ahol a kromatográfiás szelektivitás különböző, így a kockával a szelektivitás/felbontás változásokat kitűnően lehet tanulmányozni.

A gyakorlatban úgy határozzuk meg a mérési paramétereket, hogy a legkevésbé visszatartott komponens retenciós ideje (t_r) a holt idő (t_0) legalább kétszerese legyen, vagyis teljesüljön a $k > 1$ feltétel. További feltétel még, hogy az összes komponens eluálódjon t_G -n belül mind a 12 kísérletben. Ezeket a feltételeket úgy tudjuk meghatározni, hogy kiválasztjuk az alacsonyabb hőmérsékletet és itt végzünk néhány kísérletet.

Amennyiben harmadik dimenzióként a pH-t választottuk, célszerű az alacsonyabb és magasabb pH-n is elvégezni ugyanazokat a kísérleteket, mert a komponensek ionizáltsági viszonyai nagymértékben befolyásolják a retenciót. Előfordulhat, hogy egy bázikus csoportot tartalmazó molekula magasabb pH-n még teljesíti a $k > 1$ feltételt, de a pH csökkentésével megnövekszik az ionizáltsági foka és csökken a retenciója, vagyis már nem teljesíti a $k > 1$ feltételt. Ugyanez mondható el savas csoportot tartalmazó molekula esetén, csak itt meg kell fordítani a gondolatot. Vagyis a pH növelésével növekszik az ionizáltsági fok és csökken a retenció. Ugyanezeket a szabályokat alkalmazzuk az utolsóként eluálódó komponensekre is. Vagyis úgy válasszuk meg a pH-t és a gradiens összetételét, hogy az összes komponens eluálódjon. Ha kiválasztottuk a kiindulási pontot (61. ábrán az 1-es pont), akkor néhány egyszerű szabály betartásával könnyen meghatározhatjuk a többi kísérleti pontot is. Az első szabály: a hosszabb t_G háromszorosa legyen a rövidebb t_G -nek, második szabály: a két hőmérséklet (T_1 és T_2) között ne legyen 30°C -nál nagyobb különbség, harmadik szabály: $\Delta\text{pH} \leq 0,6$ legyen.

Hasonlóan kell eljárunk, ha harmadik dimenzióként terner összetételt (t_c) választjuk. Itt az előkísérletek során a pH helyett a szerves módosítóra kell helyoznünk a hangsúlyt. A $k > 1$ feltétel teljesülését AcN-t tartalmazó rendszerben végezni, mivel az AcN erősebb eluens, mint a MeOH, vagyis a komponensek korábban eluálódnak. Ugyanezen ok miatt a gradiens idejét és meredekségét MeOH-t tartalmazó rendszerben kell meghatározni.

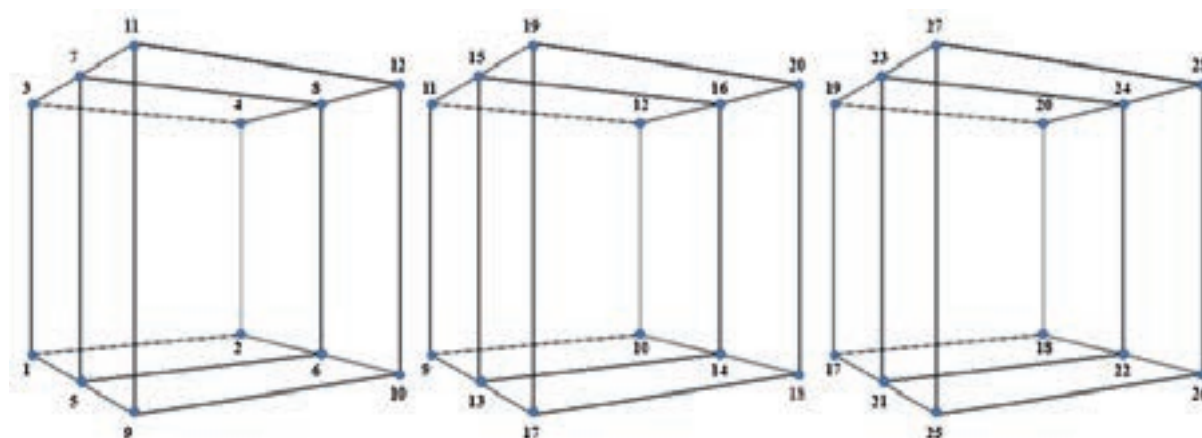
7.2.1. t_G -T-pH modell

A t_G -T-pH elnevezés arra utal, amikor a gradiens idő (t_G), a hőmérséklet (T) és a pH együttes optimalizálása történik.

A t_G ill. a szerves módosító (%B) hatása a fordított fázisú folyadékkromatográfiában igen jelentős. A víz eluensben lévő mennyiségének van a legnagyobb befolyása a szelektivitásra, ill. az egyes anyagok retenciójára.

Amennyiben a vizsgálandó vegyületek valamelyike rendelkezik protonfunkciós csoporttal (savas vagy bázikus karakterrel), akkor a mozgófázis pH-ját állandó értéken kell tartani, hogy a molekuláris formák egyensúlya és ezáltal a retenció idő ne változzon. Ezt a pH állandóságot tudjuk biztosítani megfelelő puffer oldatok alkalmazásával. A szelektivitás változtatása szempontjából viszont jól tudjuk használni ezt a paramétert, hiszen, ha a protonfunkciós csoporttal rendelkező vizsgálandó anyag $pK_a \pm 2$ értéke körül állítjuk be a pH-t, akkor a retenció pH-függő lesz, ezáltal a felbontás (R_s) szabályozható és a pH-által pontosan beállítható lesz. Továbbá minél nagyobb arányban van jelen az ion-visszaszorított (ill. semleges) forma, annál nagyobb retenciót várhatunk.

Célszerű a fejlesztést alacsony pH-n kezdeni, mert ott az állófázison lévő szabad szilanol csoportok ionvisszaszorított állapotban vannak, így elkerülhetjük a nem kívánt ionos kölcsönhatást az állófázis és a bázikus tulajdonságú vizsgálandó anyag között. Ez a hatás a rövid szén-láncú, illetve kevésbé borított fázisokon lehet jelentős. Ahhoz, hogy szemléltessük a pH hatását az elválasztásra kiválasztottunk egy $\Delta pH = 3,6$ tartományt. Ezt a tartományt három egymáshoz kapcsolódó kockával tudjuk modellezni (62. ábra). A 9. táblázatban a modell kiindulási paramétereit (DoE) szerepelnek.

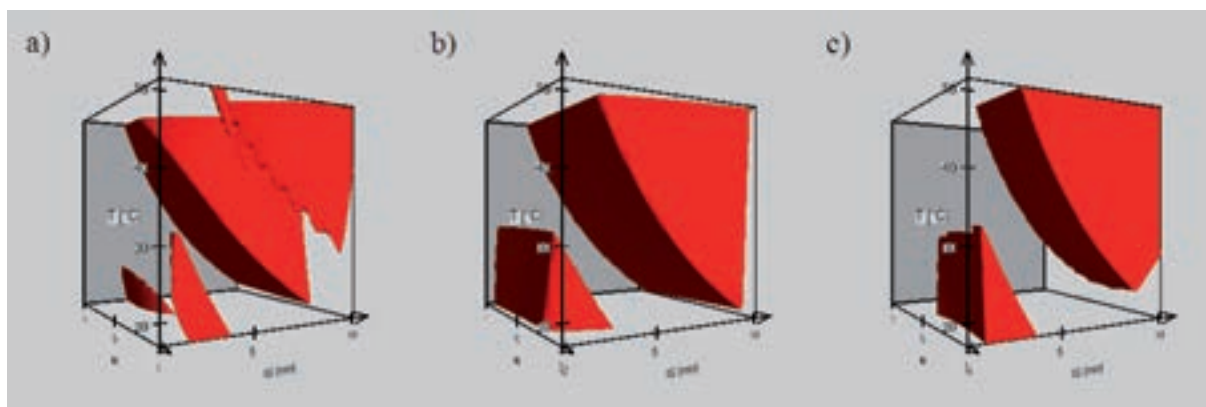


62. ábra: A három egymáshoz kapcsolódó kocka modelljének felépítése, ahol az egyes pontok az alapkromatogramokat szimbolizálják (9. táblázat). A kockák között átfedések vannak, hiszen négy pont, ami az egyik modellnél magasabb pH-nak számít (9, 10, 11, 12, és 17, 18, 19, 20), az következő modell alacsonyabb pH-ja.

9. táblázat: DryLab kiindulási mérési paraméterek t_G -T-pH kockához. készülék: Acquity UPLC, oszlop: 50 x 2,1mm BEH C18 1,7 μ m, áramlás: 0,7mL/perc, „A” eluens 10mM citrát-puffer, „B” eluens acetonitril.

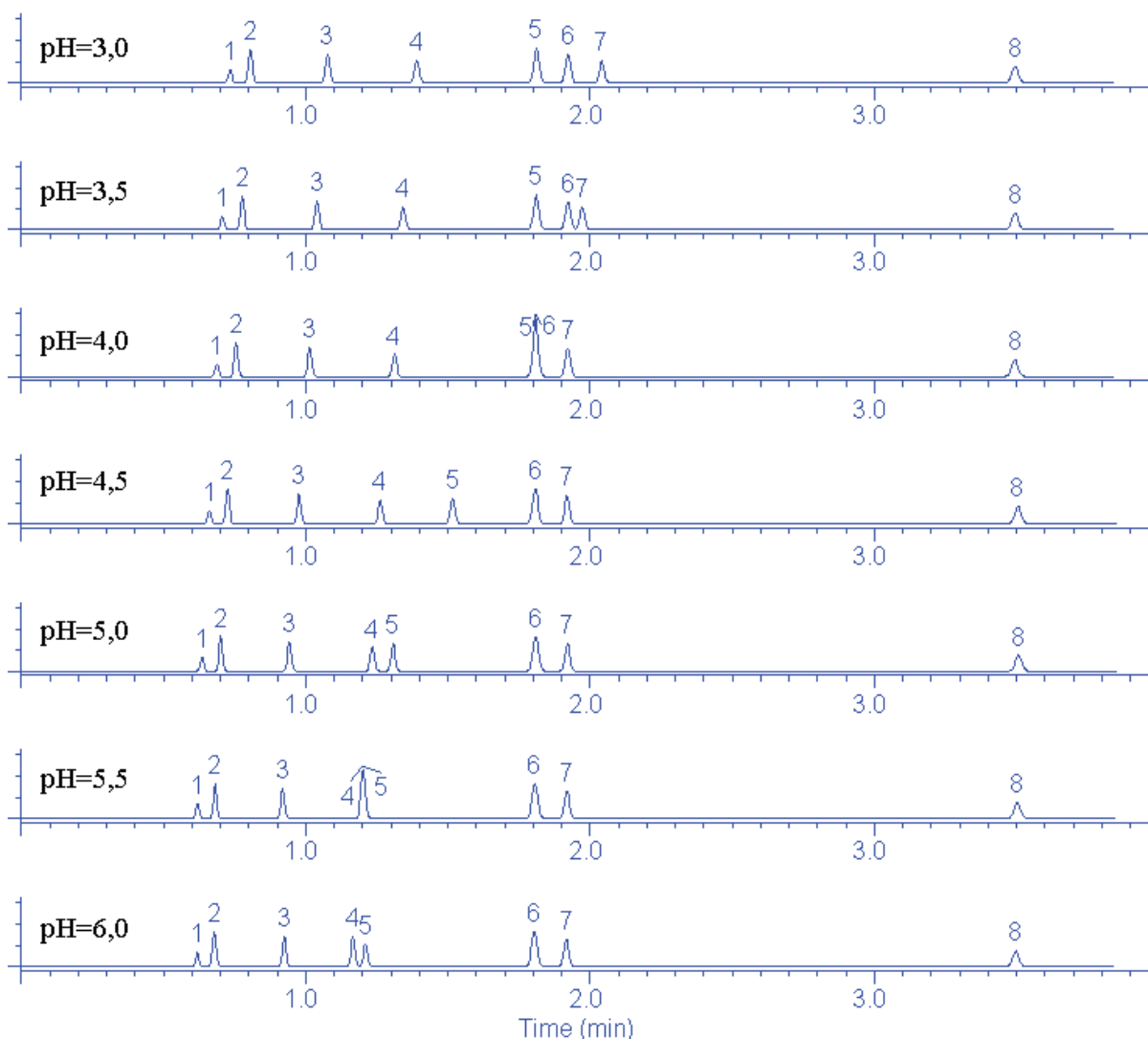
Mérési pont	t_G (perc) 30%B→90%B	T (°C)	pH	Mérési pont	t_G (perc) 30%B→90%B	T (°C)	pH
1	2,0	20	2,8	15	2,0	50	4,6
2	6,0	20	2,8	16	6,0	50	4,6
3	2,0	50	2,8	17	2,0	20	5,2
4	6,0	50	2,8	18	6,0	20	5,2
5	2,0	20	3,4	19	2,0	50	5,2
6	6,0	20	3,4	20	6,0	50	5,2
7	2,0	50	3,4	21	2,0	20	5,8
8	6,0	50	3,4	22	6,0	20	5,8
9	2,0	20	4,0	23	2,0	50	5,8
10	6,0	20	4,0	24	6,0	50	5,8
11	2,0	50	4,0	25	2,0	20	6,4
12	6,0	50	4,0	26	6,0	20	6,4
13	2,0	20	4,6	27	2,0	50	6,4
14	6,0	20	4,6	28	6,0	50	6,4

A 63. ábrán a három DryLab modell látható (a: pH = 2,8→4,0, b: pH = 4,0→5,2 c: pH = 5,2→6,4). A jobb áttekinthetőség kedvéért, csak a piros részeket hagytuk meg, amely csak azt a tartományt jelöli, ahol a felbontás (R_s) értéke nagyobb, mint 1,5 az összes komponensre nézve (Design Space).



63. ábra: Design Space a DryLab kockákban.

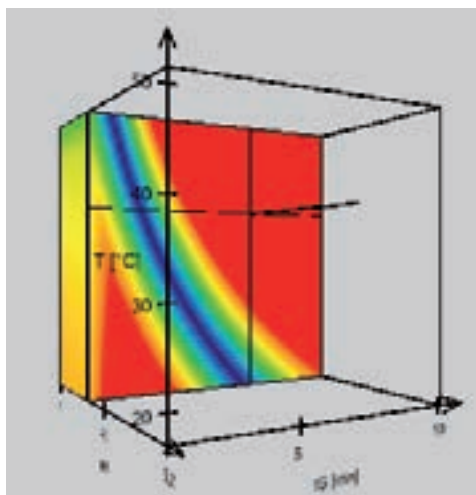
A 64. ábrán hét különböző t_G - T -síkhhoz tartozó ponton ($t_G = 7$ perc, $T = 40^\circ\text{C}$) vizsgáljuk a pH hatását az elválasztásra, 0,5 pH egységenként vizsgáljuk meg a kromatogramokat. A pH = 3,0 értéknél a retenciós sorrend a következő: ImpD-ImpF-Amlodipin-ImpE-ImpG-ImpB-ImpH-ImpA. Ez megegyezik az előző fejezetben leírt ACD szoftver által kalkulált hidrofóbicitási sorrenddel. A pH = 3,5 értéknél ugyanazt a sorrendet kapjuk, mint pH = 3,0-nál, viszont az ImpH komponens retenciója csökken (savas komponens, $pK_a \approx 4,2$, így a pH emelésével nő az ionizáltsági fok, ezáltal csökken a retenció). Az első négy bázikus karakterű komponens (ImpD, ImpF, Amlodipin és ImpE) retenciója is kismértékben csökken, ami jól példázza, hogy az elválasztási mechanizmus összetett folyamat, hiszen az itt említett komponensek teljesen ionizált formában vannak az összes pH-n ($pK_a \approx 10,7$), így nem kellene, hogy változzon a retenció. Ez a kismértékű retenció csökkenés végig (pH = 6,0) megfigyelhető. Ez a jelenség az állófázis, a mozgófázis és a vizsgált komponensek együttes kölcsönhatásának az eredménye. Az 5-ös (pH = 4,5-től 6-os) ImpG, a 6-os (pH = 4,5-től 7-es) ImpB és a 8-as ImpA retenciója a teljes pH tartományban állandó maradt. A következőkben az ImpH komponens retenció változását követjük figyelemmel. pH = 4,0-nél megelőzi az ImpB-t és együtt eluálódik az ImpG-vel. pH = 4,5-nél megelőzi az ImpG-t is és tovább csökken a retenciója egészen pH = 5,5-ig, ahol együtt eluálódik az ImpE-vel. pH = 5,5-nél megáll a retenció csökkenése, majd a korábban említett bázikus komponensek kis retenció csökkenése miatt az ImpE komponens „visszaelőzi”. A **LogD**-pH modellek közül itt is az ACD adta a legpontosabb jóslást. Abban viszont mindhárom szoftver téved, hogy az első négy (ImpD, ImpF, Amlodipin és ImpE) komponens hidrofóbicitás (apolaritás) növekedését jósolja a pH hatására, a gyakorlat ennek éppen ellenkezőjét mutatja. Mivel rengeteg eltérő jellegű állófázis és több mozgófázis additív áll a kromatográfusok rendelkezésére, ez a jelenség különböző rendszerekben más és más lehet.



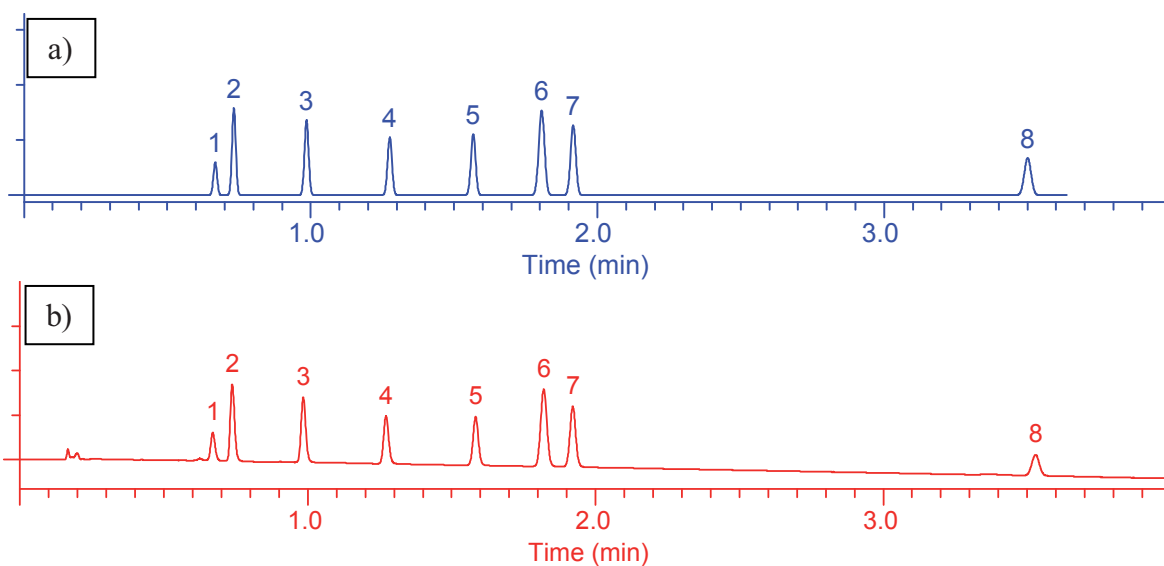
64. ábra: A pH hatása az elválasztásra.

Ahhoz, hogy meggyőződjünk a DryLab modell hatékonyságáról, kijelölünk egy mérési pontot az 5/b. kockában (65. ábra). Ez a pont a $t_G = 7$ perc, $T = 40^\circ\text{C}$ és $\text{pH} = 4,4$. Igaz, a kiindulási kísérleteknél 2 és 6 perces t_G -vel végeztük, de a 8 - 10 perce extrapolált retenciós értékek megbízhatósága is még nagyon jó. A 7 perces gradiens idő megfelel 8,57 %B/perc gradiens meredekségnek. A kromatogramokon (66. ábra) látszik, hogy az elemzéshez szükséges idő 4 perc. Ez azt jelenti, hogy nem kell megvárunk a 7 perces elemzési időt 90 %B-ig, elég, ha elindulunk 30 %B-ről és hozzáadjuk a 4 perc \times 8,57%B/perc \approx 34,3%B eluensösszetételt.

Összefoglalva, a mérési ponthoz tartozó értékek: $t_G = 4$ perc (30%B \rightarrow 64,3%B), $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,4$. A 66. ábrán látható a) számolt és b) mért kromatogramok nagy egyezést mutatnak egymással, a csúcsok retenciós ideje közötti eltérés kevesebb, mint 2 másodperc.



65. ábra: A t_G - T - pH -modell a kiválasztott munkapontnál. A piros rész jelzi azt a tartományt (Design Space), ahol a felbontás értéke nagyobb, mint 1,5 ($R_{s,crit} > 1,5$), a kék rész mentén a csúcsok koelúciója ($R_s=0$) történik. A kocka térfogata $\sim 10^6$ pontból épül fel, amikor is minden pont egy-egy kromatogramot reprezentál. A kiválasztott munkapont koordinátái: $t_G = 7$ perc, $T = 40^\circ\text{C}$, $pH = 4,4$.



66. ábra: A DryLab szoftverrel számolt a) és mért b) kromatogramok. A retenciós sorrend: 1: ImpD, 2: ImpF, 3: Amlodipin, 4: ImpE, 5: ImpH, 6: ImpG, 7: ImpB, ImpA

7.2.2. Szimulált robusztusság vizsgálat

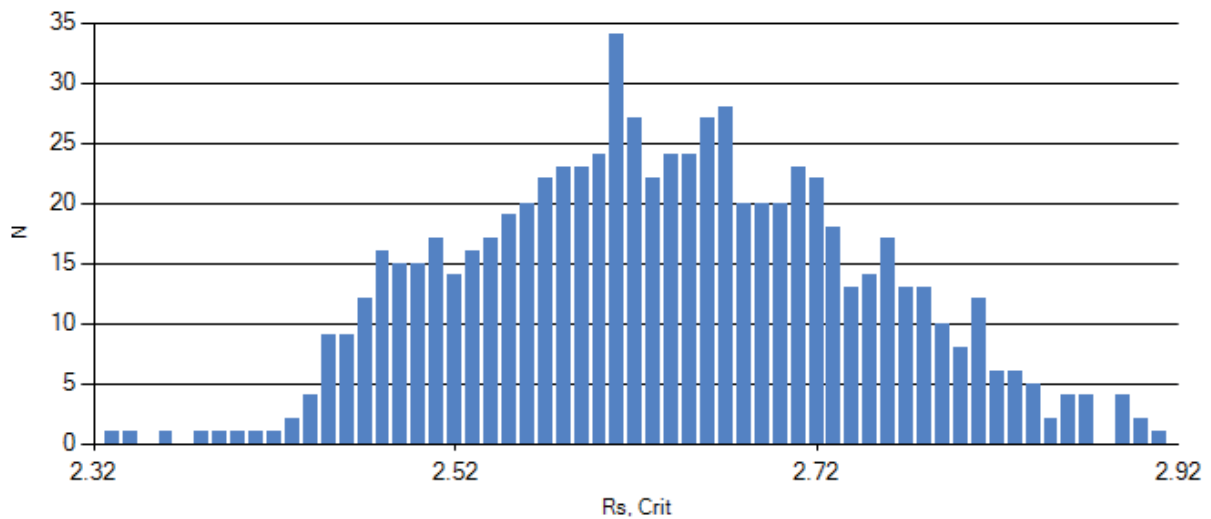
A módszerfejlesztés korai szakaszában érdemes meggyőződni arról, hogy a fejlesztett módszer mennyire érzékeny a kromatográfiás körülmények változására, vagyis mennyire robusztus.

A DryLab szoftver legújabb verziója (DryLab4) lehetővé teszi egy tervezett módszer robusztusság vizsgálatát, ahol a gradiens elúcióban leggyakrabban alkalmazott körülmények hatásait tudjuk modellezni. Ezek lehetnek a t_G , **T**, **pH** vagy t_c , térfogat áramlási sebesség, induló és végső eluens összetétel. A szimulált robusztus vizsgálatot a 65. ábrán látható *kockán* mutatjuk be. A fejlesztett módszer robusztusság vizsgálatának elvégzéséhez be kell állítanunk az elválasztást befolyásoló paraméterek tolerancia szintjét, vagyis hogy mennyi eltérést engedünk meg az eredeti módszerhez képest (10. táblázat).

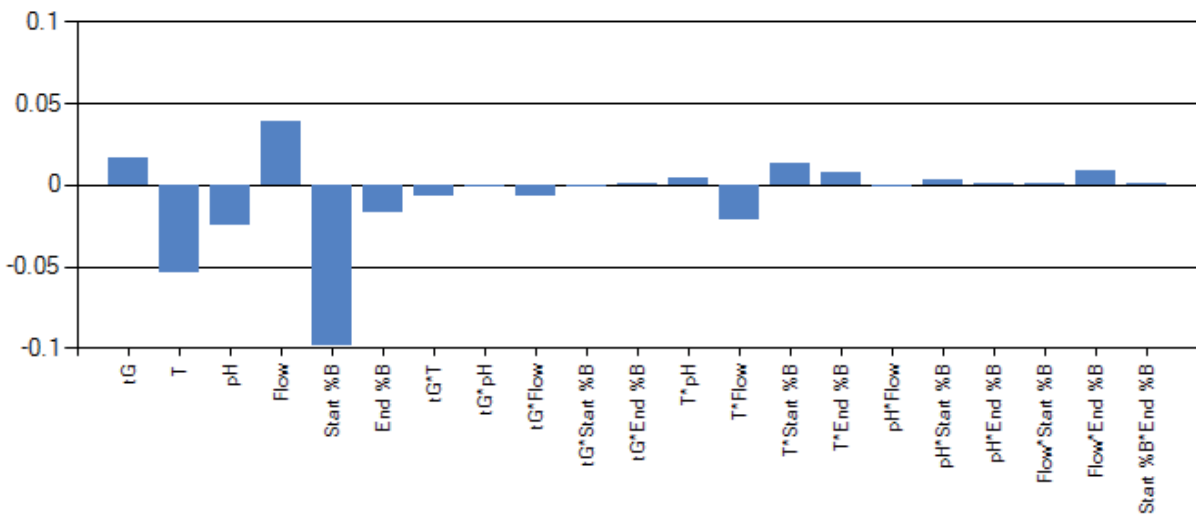
10. táblázat: Kromatográfiás paraméterek és megengedett eltérés értékeik.

Paraméterek	Értékek	± Eltérés
t_G (perc)	7,0	± 0,1
T (°C)	40	± 2
pH	4,4	± 0,2
FlowRate (mL/perc)	0,70	± 0,05
Start %B	30	± 1
End %B	90	± 1

A DryLab szoftver robusztusság vizsgáló modulja a 6 mérési paramétert három szinten vizsgálja (-1, 0, +1) és kombinálja azokat, vagyis $3^6 = 729$ teljes faktoros terv szimulációját végzi el. A 67. ábrán láthatjuk az összes (729) $R_{s,crit}$ érték eloszlását és az ábráról leolvasható, hogy minden kísérlet teljesíti a korábban megfogalmazott $R_{s,crit} > 1,5$ feltételt. A 68. ábra ad felvilágosítást arról, hogy melyik paraméter vagy paraméter kombináció (faktorok kölcsönhatása) van legnagyobb hatással a felbontásra. Ebben az esetben a kiindulási mozgófázis összetétel a legfőbb befolyásoló tényező, ezt követi a hőmérséklet és az áramlás, a kombinált hatásoknak elenyésző szerepük van az elválasztásra.



67. ábra: A 729 mérés $R_{s,crit}$ eloszlása, egy négyzet (■) jelképez egy mérési paraméterhez tartozó $R_{s,crit}$ értéket. $R_{s,crit,min} = 2,33$, $R_{s,crit,max} = 2,91$.



68. ábra: A kromatográfiai paraméterek hatása a felbontásra.

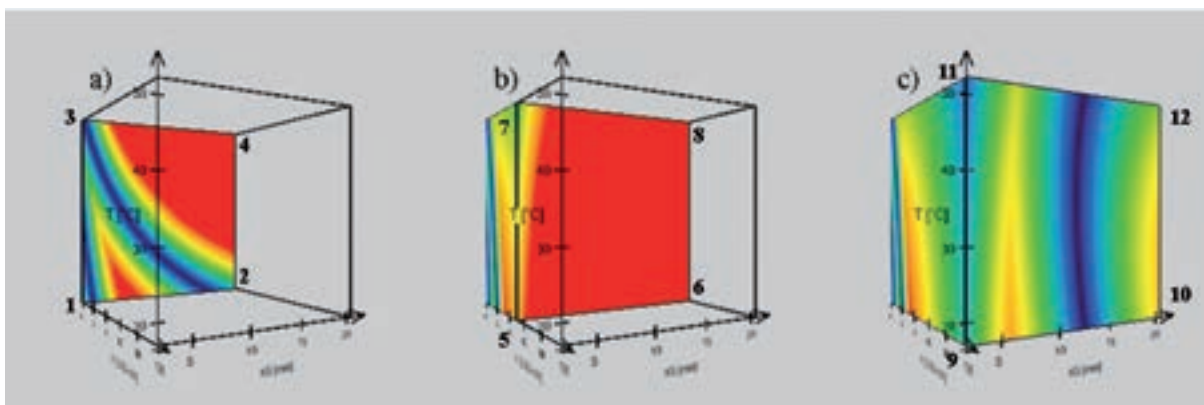
7.2.3. t_G - T - t_C modell

Sok esetben a szelektivitást a szerves módosítók változtatásával vagy keverésével jól lehet hangolni. A termer mozgófázis összetétel gyakran eltérő szelektivitást ad mintha külön-külön alkalmaznánk a módosítókat. Tipikus termer mozgófázisok a víz-acetonitril-metanol keverékek, de sok esetben segíthet kis mennyiségű tetrahidrofurán vagy izopropanol hozzáadása is. Az első DryLab modell *kocka* is termer mozgófázis összetétel optimalizálására született meg ahol a t_G és a T -tengelyek mellett egy harmadik, ún. termer koncentrációs tengelyt (t_C) vezetettek be, amely a szerves eluens variálta amennyiben AcN és MeOH között keverékeket mért, ill. ábrázolt. Ez azt jelenti, hogy a puffer pH-ja („A” eluens) állandó marad, ugyanakkor a szerves rész („B” eluens) összetételét pedig változtatjuk.

A mérések kivitelezésénél célszerű úgy eljárni, hogy az első t_G - T -síkhöz (69.a ábra) tartozó méréseknél AcN-t, a második t_G - T -síkhöz (69.b ábra) tartozó méréseknél AcN:MeOH 1:1 arányú elegyét, a harmadik t_G - T -síkhöz (69.c ábra) tartozó méréseknél pedig MeOH-t választunk szerves módosító oldószernek. A mérések kiinduló paramétereit a 11. táblázat tartalmazza.

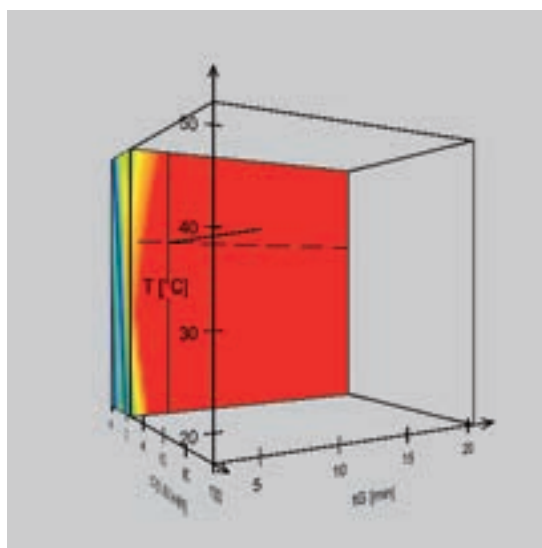
11. táblázat: DryLab kiindulási mérési paraméterek t_G - T - t_C kockához. készülék: Acquity UPLC, oszlop: 50 x 2,1mm BEH C18 1,7 μ m, áramlás: 0,5mL/perc, „A” eluens pH = 2,0.

Mérési pont	t_G (perc) 30%B→90%B	T (°C)	t_C
1	4,0	20	AcN
2	12,0	20	AcN
3	4,0	50	AcN
4	12,0	50	AcN
5	4,0	20	AcN/MeOH
6	12,0	20	AcN/MeOH
7	4,0	50	AcN/MeOH
8	12,0	50	AcN/MeOH
9	4,0	20	MeOH
10	12,0	20	MeOH
11	4,0	50	MeOH
12	12,0	50	MeOH

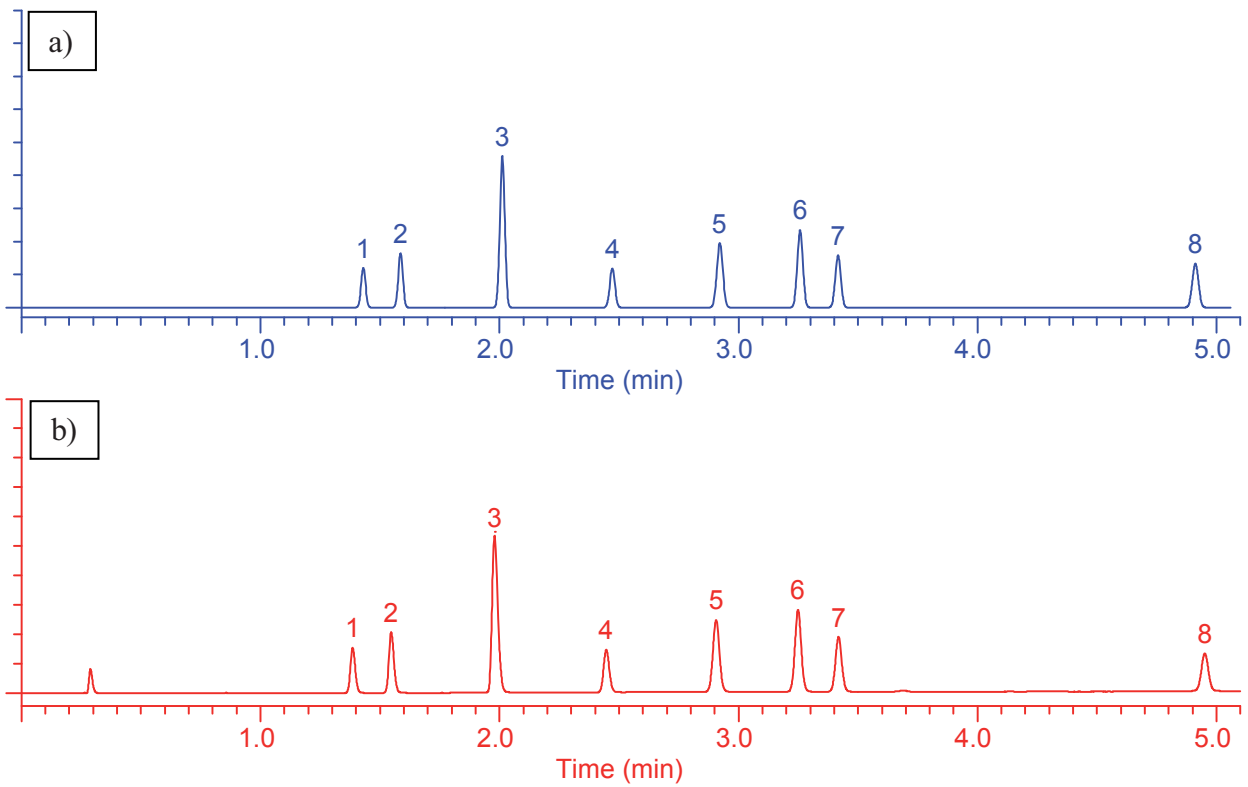


69. ábra: A t_G - T - t_C modell felépítése. A piros részek (Design Space) jelölik azokat a helyeket, ahol az $R_{s,crit} > 1,5$ feltétel teljesül. A kék szín jelzi, amikor két kromatográfias csúcs együtt eluálódik.

A 69. ábrán látható, hogy terner összetétel alkalmazása előnyös lehet az elválasztás szempontjából (nagyobb a Design Space). A t_G - T -pH modellhez hasonlóan itt is kiválasztunk egy mérési pontot, hogy meggyőződjünk a DryLab modell hatékonyságáról. Ez a pont a $t_G = 5$ perc, $T = 40^\circ\text{C}$, $t_C = \text{AcN/MeOH} = 75/25$ v/v (70. ábra). A 71. ábrán látható a számolt és mért kromatogram, itt is nagy egyezést mutatnak egymással.



70. ábra: A t_G - T - t_C -modell a kiválasztott munkapontnál. A piros rész jelzi azt a tartományt (Design Space), ahol a felbontás értéke nagyobb, mint 1,5 ($R_{s,crit} > 1,5$), a kék rész mentén a csúcsok koelúciója ($R_s = 0$) történik. A kocka térfogata $\sim 10^6$ pontból épül fel, amikor is minden pont egy-egy kromatogramot reprezentál. A kiválasztott munkapont koordinátái: $t_G = 5$ perc, $T = 40^\circ\text{C}$, $t_C = \text{AcN/MeOH} = 75/25$ v/v.



71. ábra: A DryLab szoftverrel szimulált a) és mért b) kromatogramok.
 A retencióssorrend: 1: ImpD, 2: ImpF, 3: Amlodipin, 4: ImpE, 5: ImpH, 6: ImpG, 7: ImpB, ImpA

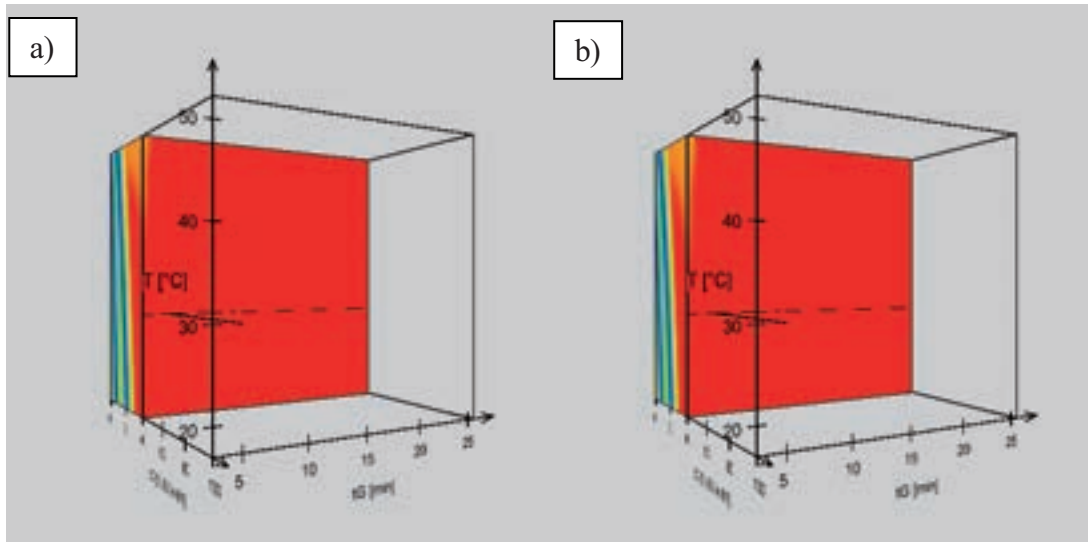
7.3. Módszerfejlesztés első és második generációs szilika monoliton

A fordított fázisú DryLab modellek alkalmazhatóak bármilyen morfológiájú állófázisra (porózus szemcsés, héjszerkezetű, monolit, nem porózus). Az állófázis morfológiája/szerkezete nem befolyásolja a fizikai-kémiai kölcsönhatások minőségét (termodinamika) ezért a szolvofób és lineáris oldószer erősségi modellek ugyanúgy működnek bármilyen RP állófázison. A különbség a kinetikai hatékonyságban és permeabilitásban lehet. A következőben monolit kolonnára mutatunk be módszerfejlesztési példát. A kiindulási mérési paramétereket a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat DryLab kiindulási mérési paraméterek t_G - T - t_C kockához. készülék: Alliance 2695e HPLC, oszlop: 100 x 4,6 mm Chromolith RP-C18e, áramlás: 3,0mL/perc, „A” eluens pH = 2,0.

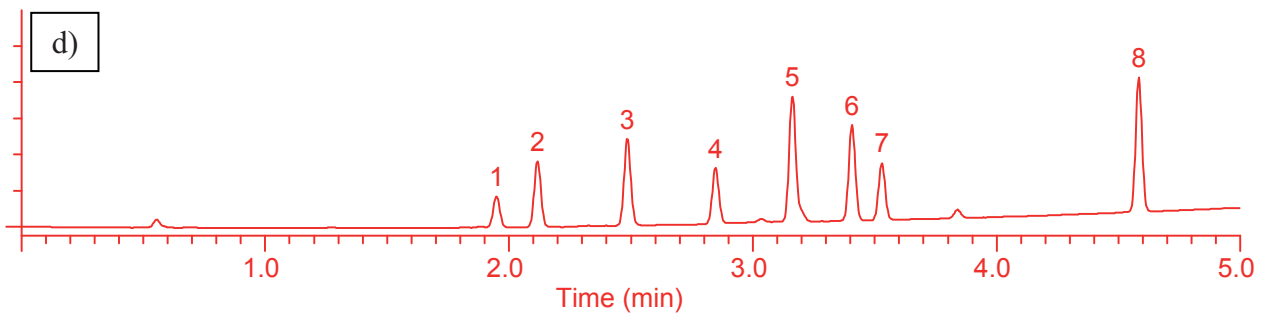
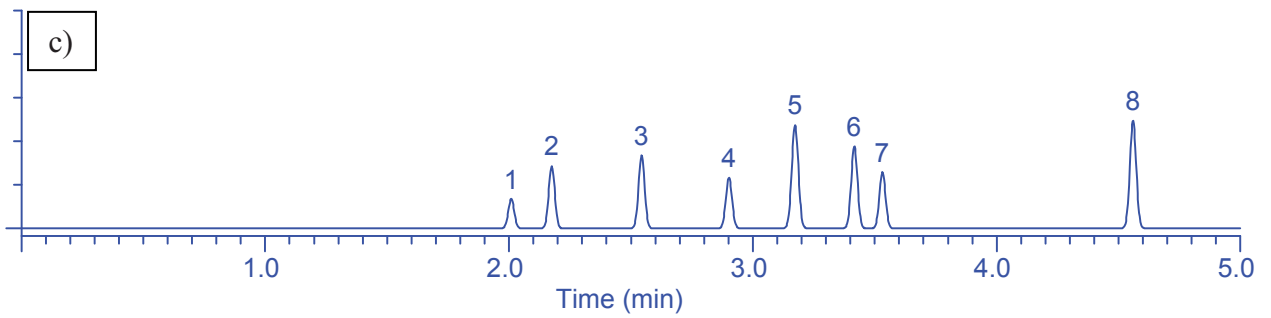
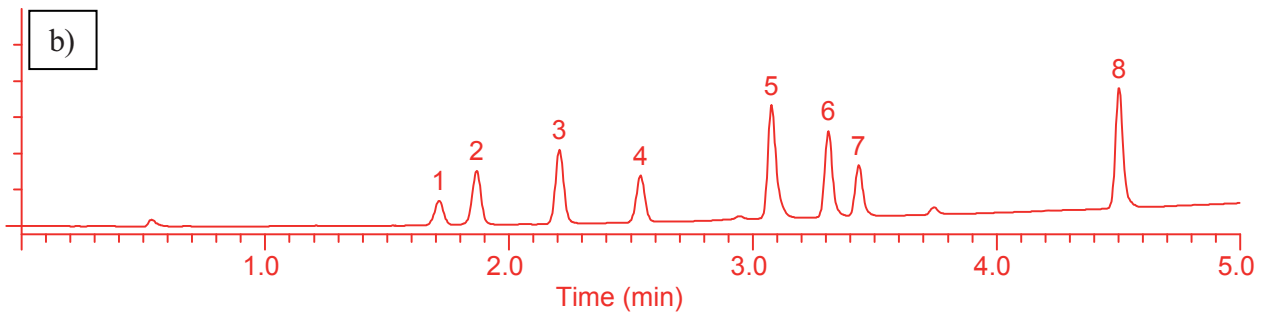
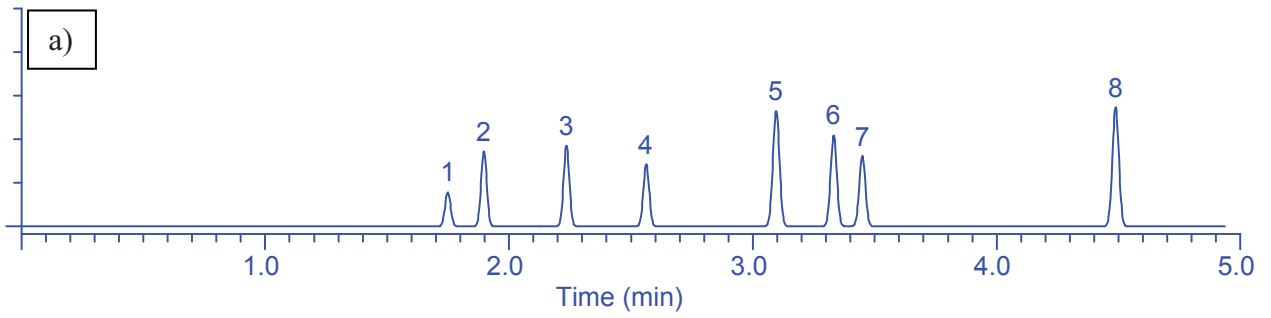
Mérési pont	t_G (perc) 30%B→90%B	T (°C)	t_C
1	5,0	20	AcN
2	15,0	20	AcN
3	5,0	50	AcN
4	15,0	50	AcN
5	5,0	20	AcN/MeOH
6	15,0	20	AcN/MeOH
7	5,0	50	AcN/MeOH
8	15,0	50	AcN/MeOH
9	5,0	20	MeOH
10	15,0	20	MeOH
11	5,0	50	MeOH
12	15,0	50	MeOH

A 72. ábrán láthatjuk, hogy az első és második generációs monolit oszlop esetén is gyakorlatilag azonos kockát kapunk (hasonló a szelektivitás). A 73. ábrán látjuk, hogy a szimulált és mért kromatogramok megegyeznek egymással, tehát itt is jól működik a modell. Azt már korábban megállapítottuk, hogy a második generációs monolit jóval hatékonyabb, mint az első generációs. A példában használt komponensek retencióját tekintve megállapítható, hogy a második generációs monolit esetében valamelyest nagyobb retenciókat mértünk, ami a porozitás beli különbségekkel magyarázható. Az állófázis kémiaja azonos ezért a szelektitásnak elvileg egyeznie kell csak kis retenciók idő csúszással kell számolnunk.



73. ábra: A t_G - T - t_C -modell a kiválasztott munkapontnál a) I. generációs és b) II. generációs monolit kolonna esetében.

A kiválasztott munkapont koordinátái: $t_G = 5$ perc, $T = 30^\circ\text{C}$, $t_C = \text{AcN/MeOH} = 60/40$ v/v.



74. ábra: a) szimulált kromatogram első generációs monolit oszlopon, b) mért kromatogram első generációs monolit oszlopon, c) szimulált kromatogram második generációs monolit oszlopon, d) mért kromatogram második generációs monolit oszlopon.

A retencióssorrend: 1: ImpD, 2: ImpF, 3: Amlodipin, 4: ImpE, 5: ImpG, 6: ImpB, 7: ImpH, ImpA

Ajánlott és felhasznált irodalom a 7. fejezethez:

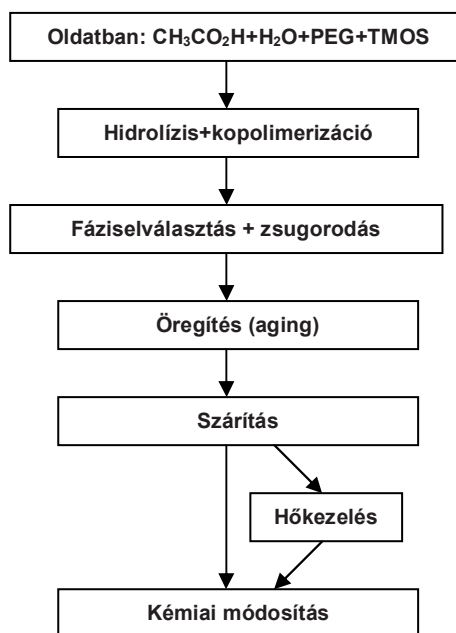
- (1) L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development : I. Isocratic elution, *Journal of Chromatography A*, 485 (1989) 65-89.
- (2) J.W. Dolan, D.C. Lommen, L.R. Snyder, Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development : II. Gradient elution, *Journal of Chromatography A*, 485 (1989) 91-112.
- (3) I. Molnár, Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software, *Journal of Chromatography A* 965 (2002) 175–194.
- (4) R. Kormány, I. Molnár, H.J. Rieger, Exploring better column selectivity choices in ultra-high performance liquid chromatography using Quality by Design principles, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80 (2013) 79–88.
- (5) R. Kormány, J. Fekete, D. Guillarme, S. Fekete, Reliability of simulated robustness testing in fast liquid chromatography, using state-of-the-art column technology, instrumentation and modelling software, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89 (2014) 67–75.
- (6) S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, D. Guillarme, Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: Toward a generic method development approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70 (2012) 158–168

Mellékletek

I. Melléklet

Szilikagél alapú monolitok gyártástechnológiája

Ahhoz, hogy megértsük, hogyan lehetséges a jelenlegitől eltérő porozitású monolitokat készíteni, nézzük meg a jelenleg alkalmazott gyártástechnológiát:



Monolit kolonnák előállítása

A monolit előállítása a szemcsés töltetekhez hasonló szol-gél folyamat eredménye. Kiindulásként különböző viszkozitású és reakcióképességű szilánokat használnak. A különböző viszkozitás eltérő polimerizáltságú szilánokat jelent. Kémiaailag ezek a szilánok lehetnek tetraetoxiszilánok (TEOS), tetrametoxiszilánok (TMOS), metiltrimetoxiszilánok (MTMS), etoxitrimetoxiszilánok (ETMS), 2-cianoetilszilánok (CEOS), 3-aminopropiltriethoxiszilán (APTHS) és digliceril szilán (DGS). Ezekhez a szilánokhoz az esetek többségében polietilén-glikolt adnak, ezt az egyéb polimerizációs reakciónál porogénnek nevezik. A kondenzációs reakció beindítása sav hozzáadásával történik, a víz hatására hidrolízis majd ezt a polimerizáció követi. A növekvő molekulatömeggel a keletkező gél kiválik az oldatból és két fázis alakul ki: a porogén (additív) és a szilikaváz. A fázis szétválást az additív koncentrációja nagymértékben befolyásolja, ezzel mind az átfolyó pórusok átmérőjét, mind a karakterisztikus méretet (domain size) is megváltoztatja. Ennek a magyarázata, hogy a keletkező gél kiválási sebessége kisebb, mint a fázis szétválásé, így a szilárd rész több lesz, ennek következtében az átfolyó pórusok átmérője csökken.

I. Melléklet (folytatás)

A keletkező hidrogél nem stabil, ezért a következő lépésben (öregítés, aging) a háromdimenziós szerkezet alakul. Ennek az utókezelésnek (aging) a körülményei már nagyban befolyásolják a mezopórusok nagyságát. Ammónium-hidroxid hozzáadásával akár 400 nm pórusátmérő is elérhető, s ezzel a kolonával nagy molekulatömegű biopolimerek vizsgálhatók. A hőkezelés (szárítás, kalcinálás) adja meg a végső mezopórusosságot. A szilárd formát egy megfelelő méretű és hőtűrő csőben nyerik el. A kémiai módosítást vagy ekkor, vagy a végső házban ún. in situ módosítással végzik el. Az irodalmi adatok szerint ezt a módosítást oktadecil-metil-N,N-dimetilamino-szilánnal végzik el.

A kiindulási körülmények megválasztása, milyen kiindulási szilánt használnak, az utókezelésnél használt bázis minősége és mennyisége, a hőkezelési hőmérséklet mind-mind befolyásolják a monolit porozitását és a karakterisztikus méretet. Ezt mutatjuk be a következő táblázatban.

Az ecetsav katalizálta szöll-gél eljárással gyártott monolit kolonnák struktúrájának változatai a különböző szintézis paraméterek függvényében. Azok a paraméterek, amelyeket a hivatkozásokban variálnak, dőlt betűtípussal jelölve.

Szintézis változók			Késztermék struktúra paraméterei				
Szilánok	Adalékok	Öregítő reagens	Váz méret, μm	Átfolyó pórus mérete, μm	Mezopórus mérete, nm	Karakterisztikus paraméter, μm	Átfolyó pórus/szilikaváz aránya
TMOS	<i>PEG</i>	<i>NH₄OH</i>	<i>1,1 - 2,4</i>	<i>1,3 - 3,5</i>	<i>13,0 - 25,0</i>	<i>2,3 - 5,9</i>	<i>1,3 - 1,4</i>
TMOS	PEG	NH ₄ OH	1,0	1,7	14,0 vagy 25,0	2,7	1,7
<i>TMOS</i>	<i>PEG</i>	<i>NH₄OH</i>	<i>1,0 - 2,3</i>	<i>1,3 - 3,4</i>	<i>5,0 - 25,0</i>	<i>2,3 - 5,7</i>	<i>1,0 - 1,7</i>
TMOS	PEG	NH ₄ OH	2,2	8,0	14,0	10,2	3,6
TMOS	<i>PEG</i>	NH ₄ OH	<i>1,0 - 2,3</i>	<i>1,2 - 3,5</i>	Na ^{aj}	<i>2,2 - 5,8</i>	<i>1,2 - 1,5</i>
<i>TMOS vagy TMOS+MTMS</i>	<i>PEG</i>	<i>Urea</i>	<i>1,0 - 2,0</i>	<i>2,0 - 8,0</i>	NA	<i>3,0 - 10,0</i>	<i>1,33 - 4,0</i>
<i>TMOS</i>	<i>PEG és CTAB</i>	<i>NH₄OH</i>	<i>1,0 - 2,0</i>	<i>1,2 - 3,5</i>	<i>10,0 - 15,0</i>	<i>2,2 - 5,5</i>	<i>1,2 - 1,75</i>
TMOS	PEG	Urea	NA	- 1,0	8,0 - 413,0	NA	NA

a) Nem hozzáférhető

A monolit előállítás kritikus lépése az oldószer eltávolítása a pórusokból. Ha az oldószert túl gyorsan távolítják el a pórusokból, akkor a fellépő feszültség meghaladja a szilikagél-váz mechanikai stabilitását, és ott a váz összeroppan. A keletkező finom szemcsék eltömik a nagyátmérőjű pórusokat, amely jelentős nyomásnövekedést okoz. Ennek elkerülésére különböző oldószereket, szuperkritikus állapotot vagy ionos-folyadékokat alkalmaznak.

II. Melléklet

Szilikagél alapú monolit kolonnatípusok

Kereskedelmi forgalomban kapható Chromolith® kolonnák jellemzői

név	oszlop dimenzió (mm)	pórusméret (Å)	átfolyó pórus (µm)	állófázis
Kapilláris kolonnák				
CapRod	150 x 0,05	130	2	RP-18
	150 x 0,1	130	2	RP-18
	150 x 0,2	130	2	RP-18
	300 x 0,1	130	2	RP-18
	50 x 0,01	130	2	RP-18
	50 x 0,02	130	2	RP-18
CapRod HighResolution	150 x 0,1	150	1	RP-18
	150 x 0,2	150	1	RP-18
	150 x 0,1	130	2	RP-8
	50 x 0,1	130	2	RP-8
Analitikai kolonnák				
FastGradient	50 x 2	130	1,5	RP-18
	50 x 3	130	2	RP-18
Flash	25 x 2	130	1,5	RP-18
	25 x 3	130	2	RP-18
	25 x 4,6	130	2	RP-18, RP-8, CN, Diol, NH ₂
HighResolution	25 x 4,6	150	1,15	RP-18
	50 x 4,6	150	1,15	RP-18
	100 x 4,6	150	1,15	RP-18
Performance	100 x 2	130	1,5	RP-18
	100 x 3	130	2	RP-18
	100 x 4,6	130	2	RP-18, RP-8, CN, Diol, NH ₂ , Si
SpeedRod	50 x 4,6	130	2	RP-18, RP-8, CN, Diol, NH ₂
Preparatív kolonnák				
Prep	100 x 25	120	3	RP-18, Si
SemiPrep	100 x 10	130	2	RP-18, Si

III. Melléklet

Chromolith® védőkolonnák (Cartridges) és védőkolonna kit (Cartridge Kit)

A monolit kolonna átfolyó pórusait a mozgófázis és a minta szilárd szennyeződései is eltömhetik, továbbá elsődleges biológiai minták elemzésénél az irreverzibilisen adszorbeálódó komponensek a felületét átalakíthatják. Ennek elkerülésére védő vagy előtét kolonna alkalmazása ajánlatos. A védőkolonna ugyanaz a C-18 módosított állófázis, amelyet az analitikai kolonnában alkalmaznak. A védőkolonnát tartalmazó ház (cartridge) közvetlenül csatlakoztatható az analitikai kolonnához, ahogy azt az ábra mutatja. Két eltérő méretben készül 5 és 10 mm hosszúságban. Az 5 mm-est a 25 és 50 mm-es kolonnáknál, a 10 mm-est 100 mm-es kolonnánál ajánlatos használni. Az előtét (védő) kolonna csatlakoztatása egyszerű az analitikai kolonnához.



Előtét kolonnák és csatlakoztatásuk az analitikai kolonnához

IV. Melléklet

Chromolith® kolonnák sorba kötése

A kolonnák sorba kötése egyszerűen megoldható. A csatlakoztató elem kis átmérője nem növeli meg a holtterefogatot mivel a mozgófázist közvetlenül a monolitra vezeti. A szemcsés töltetekkel ellentétben, ahol szűrő szélesíti a kromatográfiás csúcsokat, ez a hatás ebben az esetben elhanyagolható. A csatlakoztató elemet és a két sorba kötött kolonnát az ábrán mutatjuk be.

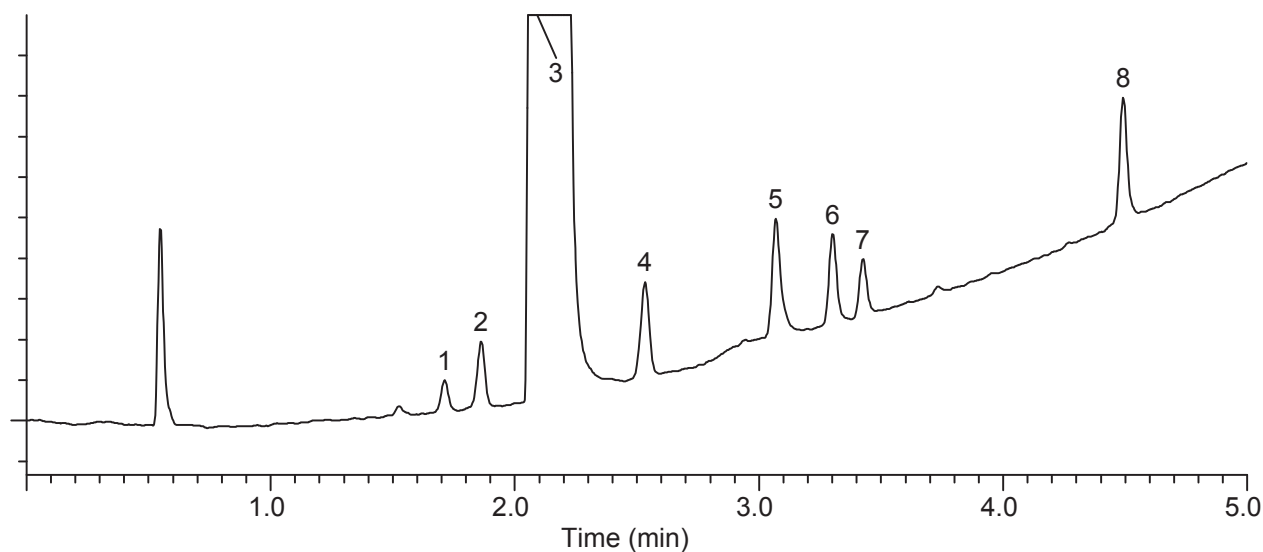


Monolit kolonnák sorba kötése

V. Melléklet

Amlodipin és Ph.Eur. szennyezőinek elválasztása első generációs Chromolith® kolonnán

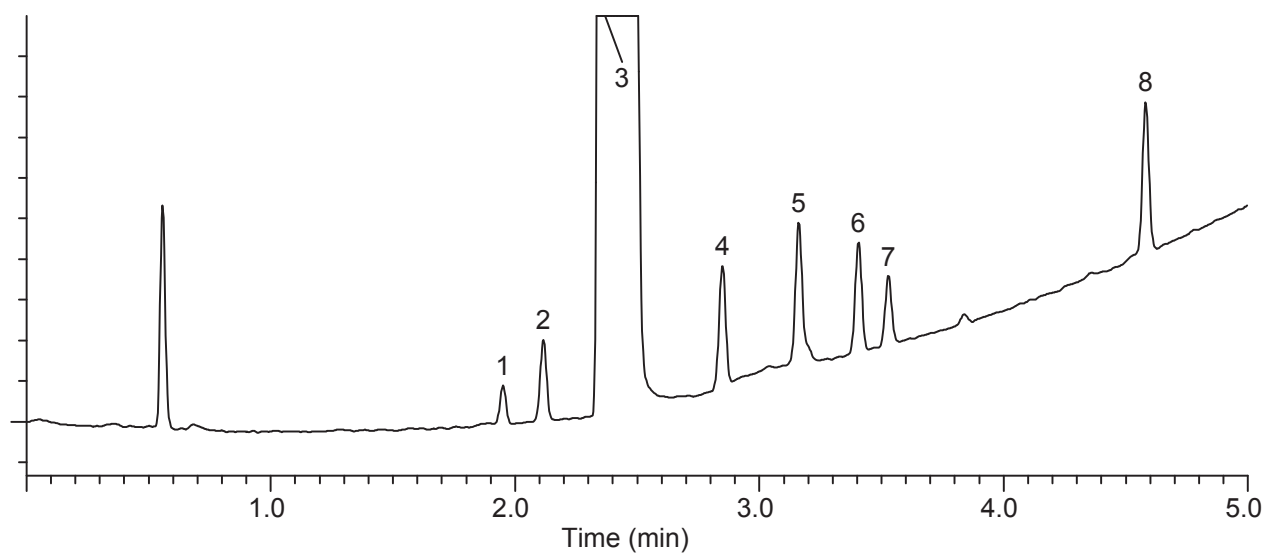
Kolonna	Chromolith® Performance RP-18 endcapped, 100x4,6mm
Mozgófázis	A: 30 mM foszfát puffer, pH=2,0 B: acetonitril / metanol = 60 / 40 (v/v)
Gradiens	t (perc) %A %B 0 70 30 5 10 90
Térfogatáramlási sebesség	3,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	237 nm
Hőmérséklet	30°C
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. Ph.Eur. ImpD 2. Ph.Eur. ImpF 3. amlodipin 4. Ph.Eur. ImpE 5. Ph.Eur. ImpG 6. Ph.Eur. ImpB 7. Ph.Eur. ImpH 8. Ph.Eur. ImpA



VI. Melléklet

Amlodipin és Ph.Eur. szennyezőinek elválasztása második generációs Chromolith® kolonnán

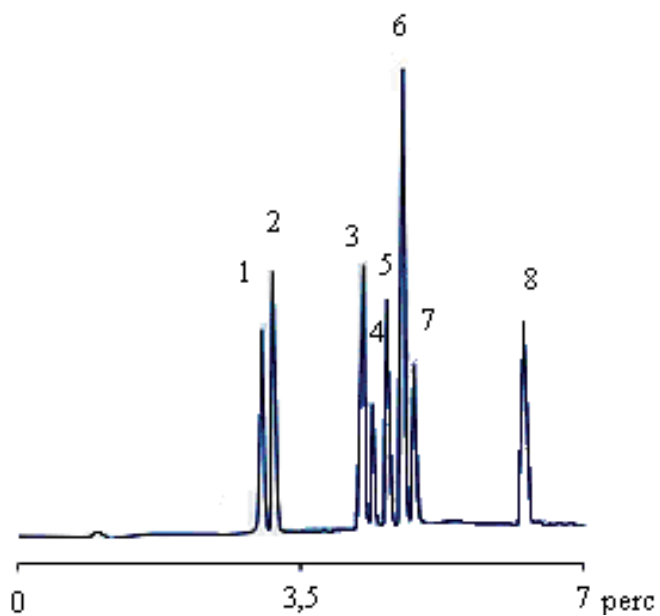
Kolonna	Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped, 100x4,6mm
Mozgófázis	A: 30 mM foszfát puffer, pH=2,0 B: acetonitril / metanol = 60 / 40 (v/v)
Gradiens	t (perc) %A %B 0 70 30 5 10 90
Térfogatáramlási sebesség	3,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	237 nm
Hőmérséklet	30°C
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. Ph.Eur. ImpD 2. Ph.Eur. ImpF 3. amlodipin 4. Ph.Eur. ImpE 5. Ph.Eur. ImpG 6. Ph.Eur. ImpB 7. Ph.Eur. ImpH 8. Ph.Eur. ImpA



VII. Melléklet

Szteroidok elválasztása Chromolith® Performance RP-18 endcapped kolonnán (sorba kötve)

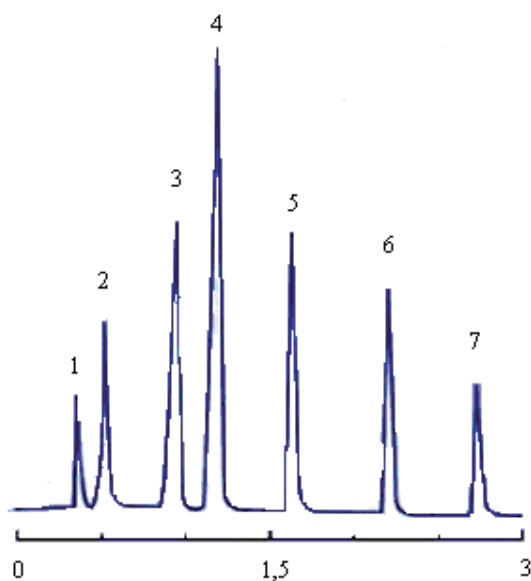
Kolonna	2 db Chromolith® Performance RP-18 endcapped
Mozgófázis	A: víz B: acetonitril
Gradiens	t (perc) %A %B 0 80 20 7 10 90
Térfogatáramlási sebesség	3,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	220 nm
Hőmérséklet	szobahőmérséklet
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. predisolon 3. estradiol 4. tesztoszteron 5. kortikoszteron 6. esztron 7. progeszteron



VIII. Melléklet

Savas csoportot tartalmazó vegyületek elválasztásánál alkalmazott kromatográfiai paraméterek Chromolith® Performance RP-18 endcapped kolonnán

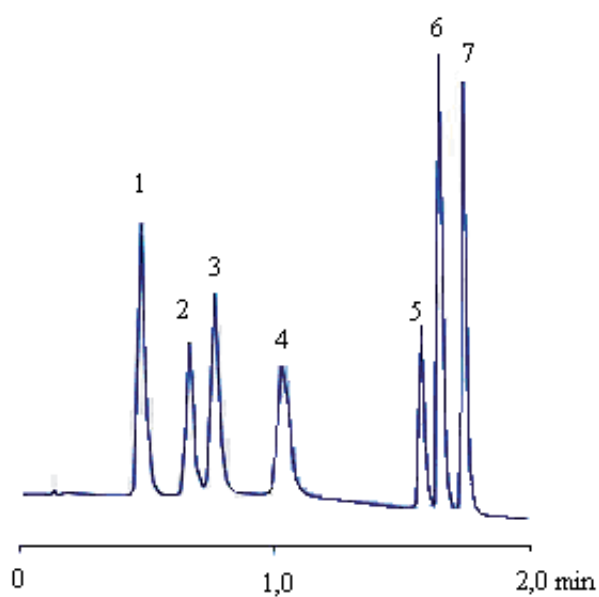
Kolonna	Chromolith® Performance RP-18 endcapped, 100x4,6mm
Mozgófázis	A: 20 mM foszfát puffer, pH=4,5 B: acetonitril
Gradiens	t (perc) %A %B 0 80 20 3 40 60
Térfogatáramlási sebesség	4,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	230 nm
Hőmérséklet	22°C
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. aszkorbinsav 2. 4-hidroxi-benzoészav 3. benzoészav 4. szorbinsav 5. metil-4-hidroxi-benzoát 6. etil-4- hidroxi-benzoát 7. propil-4- hidroxi-benzoát



IX. Melléklet

Szulfonamidok elválasztása Chromolith® SpeedROD RP-18 endcapped kolonnán

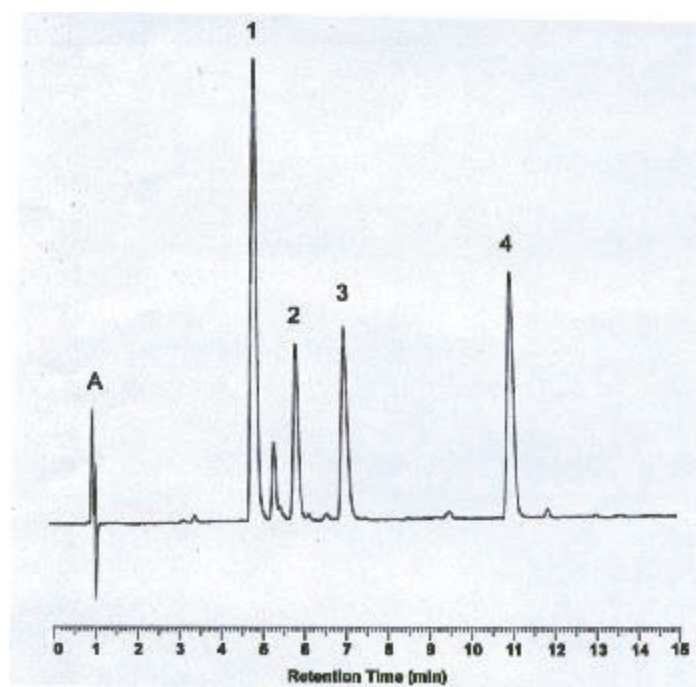
Kolonna	Chromolith® SpeedROD RP-18 endcapped, 50x4,6mm
Mozgófázis	A: 0,1% TFA vízben B: acetonitril
Gradiens	t (perc) %A %B 0,0 5 95 0,4 5 95 1,2 30 70 2,2 30 70
Térfogatáramlási sebesség	6,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	270 nm
Hőmérséklet	szobahőmérséklet
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. szulfadiazin 2. szulfatiazol 3. szulfamerazin 4. szulfadimidin 5. szolfaoxazol



X. Melléklet

Peptidek elválasztása Chromolith® Performance RP-18 endcapped kolonnán

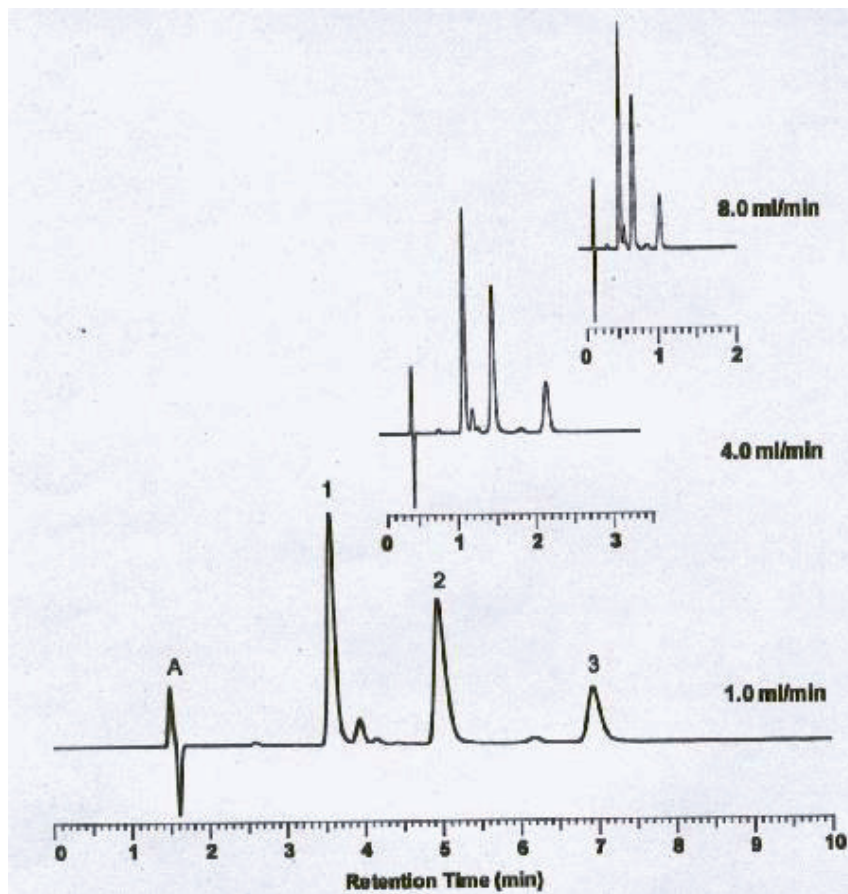
Kolonna	Chromolith® Performance RP-18 endcapped 100x4,6mm
Mozgófázis	A: 0,1% TFA vízben B: acetonitril
Gradiens	t (perc) %A %B 0 95 5 7 80 20
Térfogatáramlási sebesség	1,5 mL/perc
Detektálási hullámhossz	215 nm
Hőmérséklet	szobahőmérséklet
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	A. tiourea 1. AAAY (Ala-Ala-Ala-Tyr) 2. LAP (Leu-Ala-Pro) 3. GGF (Gly-Gly-Phe) 4. LFY (Leu-Phe-Tyr)



XI. Melléklet

Peptidek elválasztásának gyorsítása Chromolith® Performance RP-18 endcapped kolonnán

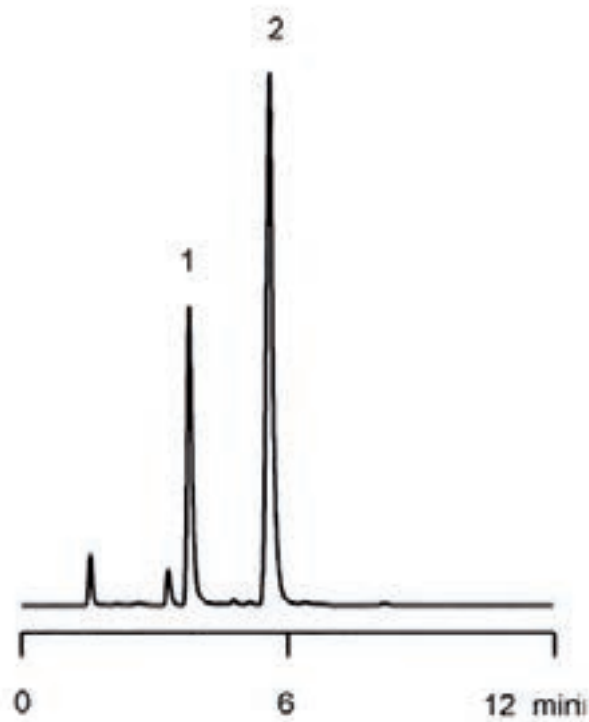
Kolonna	Chromolith® Performance RP-18 endcapped 100x4,6mm
Mozgófázis	víz / acetonitril / THF = 8 / 92 / 0,1 (v/v)
Térfogatáramlási sebesség	1,0 / 4,0 / 8,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	215 nm
Hőmérséklet	32°C
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	A. tiourea 1. AAAY (Ala-Ala-Ala-Tyr) 2. LAP (Leu-Ala-Pro) 3. GGF (Gly-Gly-Phe)



XII. Melléklet

Purpurin és quinizarin elválasztása Chromolith® Performance RP-8 endcapped kolonnán

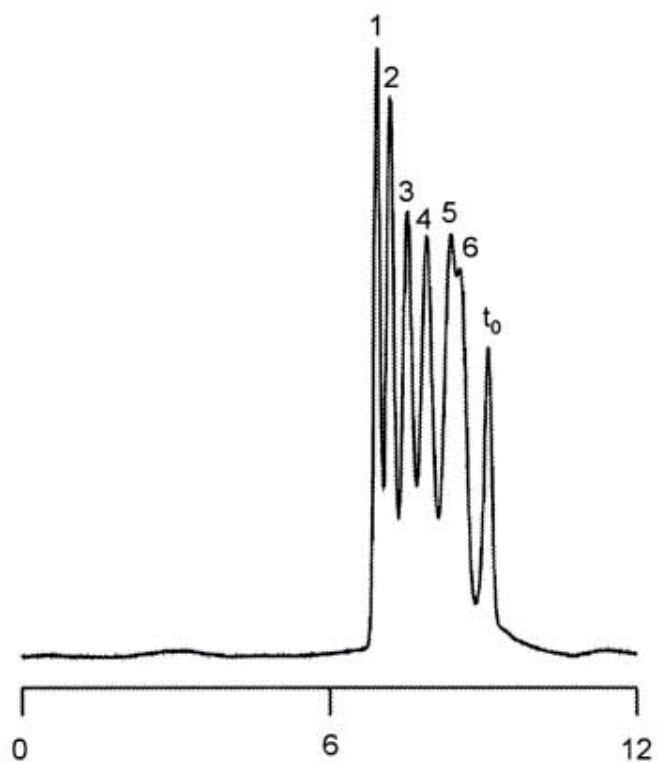
Kolonna	Chromolith® Performance RP-8 endcapped, 100x4,6mm
Mozgófázis	20 mM foszfát puffer, pH=2,0 / metanol = 30 / 70 / (v/v)
Térfogatáramlási sebesség	1,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	254 nm
Hőmérséklet	szobahőmérséklet
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. purpurin 2. quinizarin



XIII. Melléklet

Polisztirolok elválasztása Chromolith® Performance Si 30 cm-es kolonnán (sorba kötve)

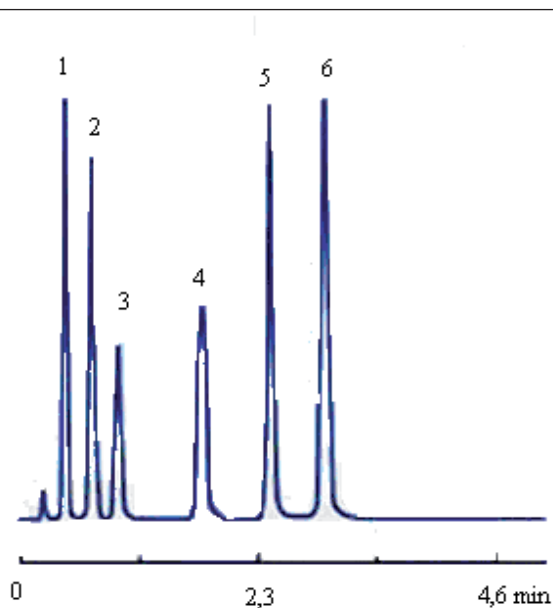
Kolonna	3db Chromolith® Performance Si, 100x4,6mm
Mozgófázis	tetrahidrofurán
Térfogatáramlási sebesség	0,5 mL/perc
Detektálási hullámhossz	254 nm
Hőmérséklet	40°C
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. polisztirén 39000 2. polisztirol 20650 3. polisztirol 10850 4. polisztirol 5460 5. polisztirol 2100 6. polisztirol 1050



XIV. Melléklet

Chromolith® SpeedROD RP-18 endcapped kolonnával történő elválasztás paraméterei

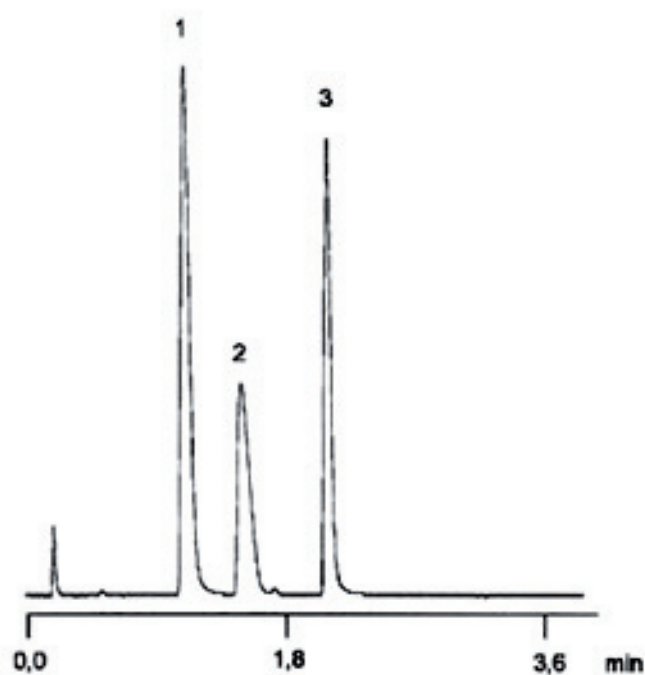
Kolonna	Chromolith® SpeedROD RP-18 endcapped, 50x4,6mm
Mozgófázis	A: 10 mM foszfát puffer, pH=5,0 B: acetonitril
Gradiens	t (perc) %A %B 0,0 3 97 2,5 3 97 2,6 8 92 5,0 8 92
Térfogatáramlási sebesség	4,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	227 nm
Hőmérséklet	szobahőmérséklet
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. aceszulfám-K 2. szacharin 3. benzoesav 4. szorbin sav 5. koffein 6. aszpartám



XV. Melléklet

Ionos vegyületek (kationaktív) elválasztása Chromolith® SpeedROD RP-18 endcapped kolonnán

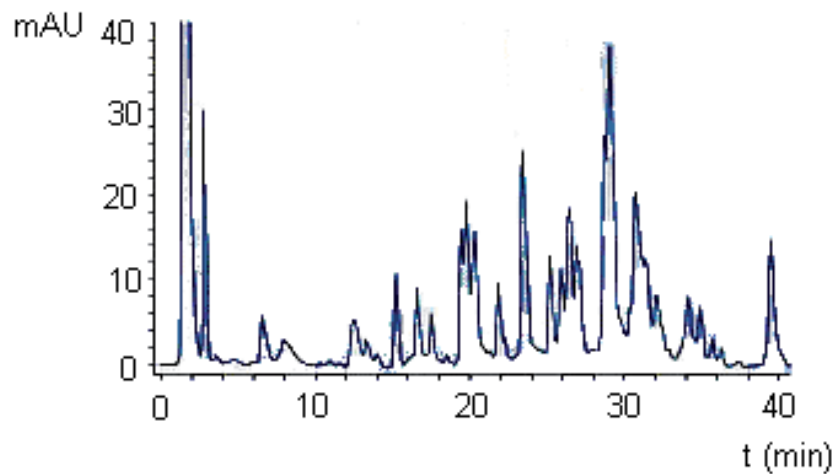
Kolonna	Chromolith® SpeedROD RP-18 endcapped, 50x4,6mm
Mozgófázis	A: 0,1% TFA vízben B: metanol
Gradiens	t (perc) %A %B 0,0 60 40 2,5 0 100
Térfogatáramlási sebesség	4,0 mL/perc
Detektálási hullámhossz	254 nm
Hőmérséklet	szobahőmérséklet
Adagolt térfogat	10 µl
Komponensek	1. N-dodecylpiridinium klorid 2. hiamin 3. N-cetilpiridinium klorid



XVI. Melléklet

Immunglobulinok elválasztása kapilláris kolonnán Chromolith® CapRod RP-18 endcapped kolonnán

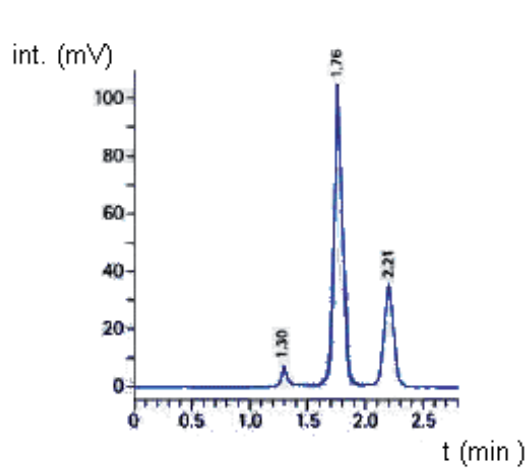
Kolonna	Chromolith® CapROD RP-18 endcapped, 150x0,1mm
Mozgófázis	A: víz / acetonitril / hangyasav = 98 / 2 / 0,1 (v/v) B: víz / acetonitril / hangyasav = 20 / 80 / 0,08 (v/v)
Gradiens	t (perc) %A %B 0,0 98 2 2,5 60 40
Térfogatáramlási sebesség	3,0 µL/perc
Komponensek	immunoglobulinok



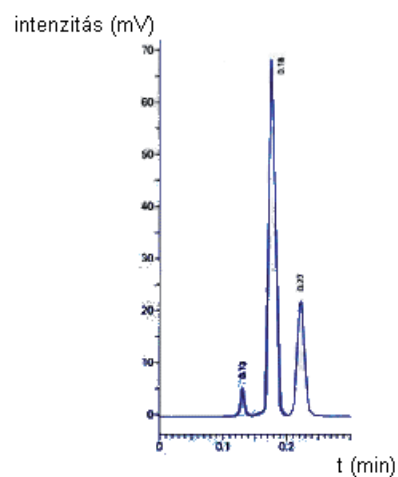
XVII. Melléklet

Preparatív elválasztása Chromolith® prep kolonnán

Kolonna	Chromolith® prep 100x25mm
Mozgófázis	n-heptán / dioxán = 80 / 20 (v/v)
Térfogatáramlási sebesség	40 / 390 mL/perc
Komponensek	1. toluol 2. dimetil-ftalát 3. dibutil-ftalát



áramlás: 40mL/perc

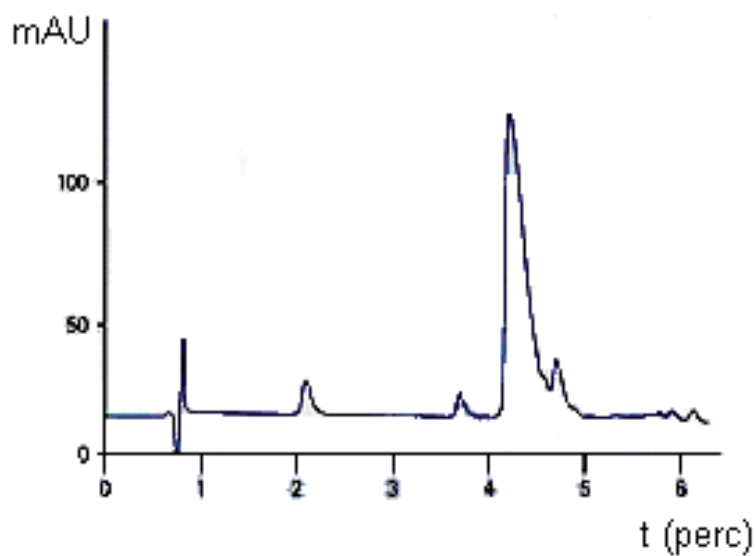


áramlás: 390mL/perc

XVIII. Melléklet

Nyers extraktumból történő kis mennyiségű komponens kinyerése Chromolith® prep RP-18 endcapped kolonnán

Kolonna	Chromolith® prep RP-18 endcapped, 100x4,6mm
Mozgófázis	A: 0,1% hangyasav vízben B: acetonitril
Gradiens	t (perc) %A %B 0,0 90 10 10,0 70 30
Térfogatáramlási sebesség	60 mL/perc
Detektálási hullámhossz	254 nm
Adagolt térfogat	5 mL
Minta	23 mg hirudin (nyers extraktból szűrve)



XIX. Melléklet
Néhány elsődleges és másodlagos puffer tulajdonsága

Só vagy szilárd anyag	Molekuláris formula	Molalitás / mol kg ⁻¹	Moláris tömeg / g mol ⁻¹	Sűrűség / g dm ⁻³	Koncentráció 20°C-on / mol dm ⁻³	Tömeg / g 1 dm ³ elkészítéséhez	Hígítás érték ΔpH _{1/2}	Puffer érték (β) / mol OH ⁻ dm ⁻³	pH hőmérséklet koeficiens/ K ⁻¹
Kálium tetraoxalát dihidrát	KH ₃ C ₄ O ₈ ·2H ₂ O	0,1	254,191	1,0091	0,09875	25,101			
Kálium tetraoxalát dihidrát	KH ₃ C ₄ O ₈ ·2H ₂ O	0,05	254,191	1,0032	0,04965	12,620	0,186	0,070	0,001
Kálium hidrogén tartarát (telített 25°C-on)	KHC ₄ H ₄ O ₆	0,0341	188,18	1,0036	0,034	6,4	0,049	0,027	-0,0014
Kálium dihidrogén citrát	KH ₂ C ₆ H ₅ O ₇	0,05	230,22	1,0029	0,04958	11,41	0,024	0,034	-0,022
Kálium hidrogén ftalát	KHC ₈ H ₄ O ₄	0,05	204,44	1,0017	0,04958	10,12	0,052	0,016	0,00012
Dinátrium hidrogén	Na ₂ HPO ₄	0,025	141,958	1,0038	0,02492	3,5379	0,080	0,029	-0,0028
Kálium dihidrogén ortofoszfát	KH ₂ PO ₄	0,025	136,085			3,3912			
Dinátrium hidrogén	Na ₂ HPO ₄	0,03043	141,959	1,0020	0,08665	4,302	0,07	0,016	-0,0028
Kálium dihidrogén ortofoszfát	KH ₂ PO ₄	0,00869	136,085		0,03032	1,179			
Dinátrium tetraborát dekahidrát	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,05	381,367	1,0075	0,04985	19,012			
Dinátrium tetraborát dekahidrát	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,01	381,367	1,0001	0,00998	3,806	0,01	0,020	-0,0082
Nátrium hidrogén karbonát	NaHCO ₃	0,025	84,01	1,0013	0,02492	2,092	0,079	0,029	-0,0096
Nátrium karbonát	Na ₂ CO ₃	0,025	105,99			2,640			
Kalcium hidroxid (telített 25°C-on)	Ca(OH) ₂	0,0203	74,09	0,9991	0,02025	1,5	-0,28	0,09	-0,033

XX. Melléklet
A pH méréseknél alkalmazott elsődleges referencia anyagok

Elsődleges standardok	Hőmérséklet / °C										
	0	5	10	15	20	25	30	35	37	40	50
Telített kálium hidrogén tartarát (25°C-on)						3,557	3,552	3,549	3,548	3,547	3,549
0,05 mol kg ⁻¹ kálium dihidrogén citrát	3,863	3,840	3,820	3,802	3,788	3,776	3,766	3,759	3,756	3,754	3,749
0,05 mol kg ⁻¹ kálium hidrogén ftalát	4,000	3,998	3,997	3,998	4,000	4,005	4,011	4,018	4,022	4,027	4,050
0,025 mol kg ⁻¹ dinátrium hidrogén foszfát + 0,025 mol kg ⁻¹ kálium dihidrogén foszfát	6,984	6,951	6,923	6,900	6,881	6,865	6,853	6,844	6,841	6,838	6,833
0,03043 mol kg ⁻¹ dinátrium hidrogén foszfát + 0,008695 mol kg ⁻¹ kálium dihidrogén foszfát	7,534	7,500	7,472	7,448	7,429	7,413	7,400	7,389	7,386	7,380	7,367
0,01 mol kg ⁻¹ dinátrium tetraborát	9,464	9,395	9,332	9,276	9,225	9,180	9,139	9,102	9,088	9,068	9,011
0,025 mol kg ⁻¹ nátrium hidrogén karbonát + 0,025 mol kg ⁻¹ nátrium karbonát	10,317	10,245	10,179	10,118	10,062	10,012	9,966	9,926	9,910	9,889	9,828

XXI. Melléklet
A pH méréseknel alkalmazott másodlagos referencia anyagok

Másodlagos standardok	Hőmérséklet / °C									
	0	5	10	15	20	25	30	37	40	50
0,05 mol kg ⁻¹ kálium tetraoxalát ^a	1,67	1,67	1,67	1,67	1,68	1,68	1,68	1,69	1,69	1,71
0,05 mol kg ⁻¹ nátrium hidrogén diglikolát ^b	3,47	3,47	3,47	3,48	3,48	3,49	3,50	3,52	3,53	3,56
0,1 mol kg ⁻¹ ecetsav + 0,1 mol kg ⁻¹ nátrium acetát	4,68	4,67	4,67	4,66	4,66	4,65	4,65	4,66	4,66	4,68
0,1 mol kg ⁻¹ ecetsav + 0,1 mol kg ⁻¹ nátrium acetát	4,74	4,73	4,73	4,72	4,72	4,72	4,72	4,73	4,73	4,75
0,02 mol kg ⁻¹ piperazin foszfát ^c	6,58	6,51	6,45	6,39	6,34	6,29	6,24	6,16	6,14	6,06
0,05 mol kg ⁻¹ tris hidroklorid + 0,01667 mol kg ⁻¹ tris ^c	8,47	8,30	8,14	7,99	7,84	7,70	7,56	7,38	7,31	7,07
0,05 mol kg ⁻¹ dinátrium tetraborát	9,51	9,43	9,36	9,30	9,25	9,19	9,15	9,09	9,07	9,01
Telfített (25 °C-on) kálium hidroxid	13,42	13,21	13,00	12,81	12,63	12,45	12,29	12,07	11,98	11,71

^akálium trihidrogén dioxalát (KH₃C₄O₈)

^bnátrium hidrogén 2,2'-oxidiacetát

^c2-amino-2-(hidroximetil)-1,3 propándiol vagy tris(hidroximetil)aminometán

XXII. Melléklet
Metanol-víz elegy hidrogén-ion aktivitását befolyásoló paraméterek

% MeOH (v/v)	x_{MeOH}	ρ (kg dm ⁻³)	$\log p/\rho^0$	A	a_{OH}	$\delta \approx -\log(\frac{a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}^+}^0})$	pK _{sp}
0	0,000	0,995	-0,002	0,53	1,50	0,00	14,00
10	0,047	0,983	-0,008	0,56	1,53	0,01	14,08
20	0,100	0,969	-0,014	0,59	1,57	0,03	14,08
30	0,160	0,955	-0,020	0,64	1,61	0,05	14,07
40	0,229	0,939	-0,027	0,70	1,66	0,09	14,09
50	0,308	0,921	-0,036	0,77	1,72	0,13	14,14
60	0,400	0,901	-0,045	0,87	1,79	0,18	14,23
70	0,509	0,878	-0,057	1,01	1,88	0,18	14,39
80	0,640	0,852	-0,070	1,20	1,99	0,05	14,63
90	0,800	0,822	-0,085	1,48	2,13	-0,34	15,04
100	1,000	0,787	-0,104	1,87	2,31	-2,00	16,77

XXIII. Melléklet
Acetonitril-víz elegy hidrogén-ion aktivitását befolyásoló paraméterek

% MeCN (v/v)	x_{MeCN}	ρ (kg dm ⁻³)	$\log \rho/\rho^0$	ϵ	A	a_{H}	$\delta \approx -\log(\frac{\epsilon}{\mu^0} \gamma_{\text{H}}^0)$	$\sum pK_{\text{ap}}$
0	0,000	0,995	-0,001	76,6	0,528	1,52	0,00	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	0,130	0,950	-0,022	66,4	0,655	1,63	-0,06	14,74
40	0,186	0,931	-0,031	62,8	0,712	1,68	-0,13	15,08
50	0,260	0,908	-0,042	58,6	0,791	1,74	-0,26	15,48
60	0,339	0,885	-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	-	17,13
100	1,000	0,782	-0,107	35,1	1,707	2,24	-	34,40

XXIV. Melléklet
Tetrahidrofurán-víz elegy hidrogén-ion aktivitását befolyásoló paraméterek

% THF (v/v)	x_{THF}	ρ (kg dm ⁻³)	$\log \rho/\rho^0$	ϵ	A	a_{oB}	$S_{\text{pK}_{\text{ap}}}$
0	0,000	0,991	-0,004	78,5	0,51	1,50	14,00
10	0,024	0,993	-0,003	72,4	0,58	1,56	14,12
20	0,053	0,989	-0,005	65,9	0,66	1,64	14,31
30	0,087	0,983	-0,007	58,6	0,79	1,74	14,52
40	0,129	0,974	-0,011	50,5	0,99	1,87	14,79
50	0,182	0,964	-0,016	42,3	1,29	2,04	15,13
60	0,250	0,950	-0,022	34,2	1,77	2,27	15,56
70	0,342	0,937	-0,028	26,4	2,61	2,59	16,14
80	0,471	0,921	-0,036	19,4	4,14	3,01	-
90	0,667	0,903	-0,045	13,2	7,41	3,66	-
100	1,000	0,882	-0,055	7,4	17,64	4,89	34,7

XXV. Melléklet
pH és referencia pufferek kapcsolata maximálisan 70m/m% acetonitril tartalmú acetonitril-víz keverékekkel vizsgálva ($\phi=0,75$)

Puffer	Kapcsolat	R
Telített kálium hidrogén tartarát (25 °C)	$pH = 3,546 + 2,49 \times 10^{-2}\phi - 2,60 \times 10^{-4}\phi^2 + 4,01 \times 10^{-6}\phi^3$	0,999
0,05 mol kg ⁻¹ kálium dihidrogén citrát	$pH = 3,775 + 1,74 \times 10^{-2}\phi - 2,72 \times 10^{-7}\phi^2 + 1,15 \times 10^{-6}\phi^3$	0,999
0,05 mol kg ⁻¹ kálium hidrogén ftalát	$pH = 3,998 + 2,75 \times 10^{-2}\phi - 5,02 \times 10^{-5}\phi^2 + 1,38 \times 10^{-6}\phi^3$	0,999
0,1 mol l ⁻¹ ecetsav + 0,1 mol l ⁻¹ nátrium acetát	$pH = 4,643 + 1,88 \times 10^{-2}\phi + 1,26 \times 10^{-4}\phi^2 - 7,23 \times 10^{-7}\phi^3$	0,999
0,025 mol kg ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ + 0,025 mol kg ⁻¹ KH ₂ PO ₄	$pH = 6,885 + 3,16 \times 10^{-2}\phi - 5,84 \times 10^{-4}\phi^2 + 6,55 \times 10^{-6}\phi^3$	0,995
0,003043 mol kg ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ + 0,008695 mol kg ⁻¹ KH ₂ PO ₄	$pH = 7,417 + 2,23 \times 10^{-2}\phi - 8,29 \times 10^{-5}\phi^2 + 1,23 \times 10^{-6}\phi^3$	0,999
0,01 mol kg ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	$pH = 9,178 + 3,35 \times 10^{-2}\phi - 1,51 \times 10^{-5}\phi^2 + 2,59 \times 10^{-7}\phi^3$	0,999
0,025 mol kg ⁻¹ NaHCO ₃ + 0,025 mol kg ⁻¹ Na ₂ CO ₃	$pH = 10,014 + 0,145\phi - 4,43 \times 10^{-3}\phi^2 + 4,44 \times 10^{-5}\phi^3$	0,999

XXVI. Melléklet
pH és referencia pufferek kapcsolata maximálisan 70m/m% tetrahidrofurán tartalmú tetrahidrofurán-víz keverékekkel vizsgálva ($\phi=0,72$)

Puffer	Kapcsolat	R
Telített kálium hidrogén tartarát (25 °C)	$pH = 3,575 + 9,99 \times 10^{-3}\phi + 2,12 \times 10^{-4}\phi^2$	0,999
0,05 mol kg ⁻¹ kálium dihidrogén citrát	$pH = 3,772 + 1,26 \times 10^{-2}\phi + 1,09 \times 10^{-4}\phi^2$	0,999
0,05 mol kg ⁻¹ kálium hidrogén ftalát	$pH = 3,983 + 2,83 \times 10^{-2}\phi + 1,55 \times 10^{-5}\phi^2$	0,999
0,1 mol l ⁻¹ ecetsav + 0,1 mol l ⁻¹ nátrium acetát	$pH = 4,655 + 1,18 \times 10^{-2}\phi + 2,10 \times 10^{-4}\phi^2$	0,998
0,025 mol kg ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ + 0,025 mol kg ⁻¹ KH ₂ PO ₄	$pH = 6,858 + 1,70 \times 10^{-2}\phi - 8,15 \times 10^{-5}\phi^2$	0,995
0,003043 mol kg ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ + 0,008695 mol kg ⁻¹ KH ₂ PO ₄	$pH = 7,412 + 1,19 \times 10^{-2}\phi + 2,29 \times 10^{-5}\phi^2$	0,999
0,01 mol kg ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	$pH = 9,188 + 2,46 \times 10^{-2}\phi + 8,76 \times 10^{-5}\phi^2$	0,999
0,025 mol kg ⁻¹ NaHCO ₃ + 0,025 mol kg ⁻¹ Na ₂ CO ₃	$pH = 9,982 + 6,77 \times 10^{-2}\phi - 5,47 \times 10^{-4}\phi^2$	0,990

XXVII. Melléklet

Pufferek oldhatósága víz-szerves oldószer elegyekben

Kálium-foszfát (pH=7,0) oldhatósága különböző összetételű víz-szerves oldószer elegyekben (szobahőmérsékleten)¹

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

Különböző pufferek oldhatósága különböző összetételű víz-acetonitril elegyben (szobahőmérsékleten)¹

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

¹ J. Dolan, *A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection*

XXVIII. Melléklet

30mM-os foszfát-puffer készítése (BufferMaker programmal számított)

pH	A-oldat (mL)	B-oldat (mL)	pH	B-oldat (mL)	C-oldat (mL)	pH	B-oldat (mL)	C-oldat (mL)
2,0	932	68	6,0	900	100	7,3	272	728
2,1	797	203	6,1	877	123	7,4	227	773
2,2	667	323	6,2	848	152	7,5	188	812
2,3	571	429	6,3	814	186	7,6	154	846
2,4	479	521	6,4	774	226	7,7	126	874
2,5	398	602	6,5	728	272	7,8	102	898
2,6	329	671	6,6	677	323	7,9	82	918
2,7	270	730	6,7	621	379	8,0	66	934
2,8	220	780	6,8	560	440	8,1	53	947
2,9	179	821	6,9	449	501	8,2	42	956
3,0	145	855	7,0	438	562			
3,1	117	883	7,1	378	622			
3,2	94	906	7,2	323	677			

A-oldat: 30mM foszforsav

B-oldat: 30mM nátrium-dihidrogén-foszfát

C-oldat: 30mM dinátrium-hidrogén-foszfát

XXIX. Melléklet

10mM-os pufferek készítése pH=7 alatt (BufferMaker programmal számított)

pH	A-oldat (mL)	B-oldat (mL)	pH	C-oldat (mL)	D-oldat (mL)
3,0	948	52	4,0	856	144
3,1	893	107	4,1	820	180
3,2	837	163	4,2	780	220
3,3	780	220	4,3	735	265
3,4	720	280	4,4	685	315
3,5	658	342	4,5	631	369
3,6	594	406	4,6	574	426
3,7	530	470	4,7	515	485
3,8	467	533	4,8	456	544
3,9	407	593	4,9	398	602
4,0	350	650	5,0	344	656
4,1	297	703	5,1	293	707
4,2	250	750	5,2	247	753
4,3	208	792	5,3	206	794
4,4	172	828	5,4	171	829
4,5	141	859	5,5	140	860
4,6	115	885	5,6	115	885
4,7	94	906	5,7	93	907
4,8	76	924	5,8	75	925
4,9	61	939	5,9	61	939
5,0	49	951	6,0	49	951

A-oldat: 10mM hangysav

B-oldat: 10mM nátrium-formiát

C-oldat: 10mM ecetsav

D-oldat: 10mM nátrium-acetát

XXX. Melléklet

10mM-os pufferek készítése pH=7 fölött (BufferMaker programmal számított)

pH	A-oldat (mL)	B-oldat (mL)	pH	C-oldat (mL)	D-oldat (mL)
7,0	135	865	8,5	83	917
7,1	165	835	8,6	102	898
7,2	199	801	8,7	125	875
7,3	239	761	8,8	153	847
7,4	284	716	8,9	186	814
7,5	334	666	9,0	224	776
7,6	388	612	9,1	267	733
7,7	444	556	9,2	315	685
7,8	503	497	9,3	368	632
7,9	561	439	9,4	424	576
8,0	618	382	9,5	483	517
8,1	672	328	9,6	542	458
8,2	722	278	9,7	601	399
8,3	767	233	9,8	658	342
8,4	806	194	9,9	711	289
8,5	840	160	10,0	760	240
8,6	869	131	10,1	804	196
8,7	894	106	10,2	844	156
8,8	914	86	10,3	879	121
8,9	931	69	10,4	911	89
9,0	945	55	10,5	939	61

A-oldat: 10mM trietanolamin

B-oldat: 10mM trietanolamin·HCl

C-oldat: 10mM etanolamin

D-oldat: 10mM etanolamin·HCl

Hitachi ChromasterUltra RS UHPLC rendszerek





www.merckmillipore.hu

Felelős kiadó:

Merck Kft.

1117 Budapest, Október huszonharmadika utca 6-10.

Tel.: (06-1) 463-8100

Fax: (06-1) 463-8101

Honlap: www.merckmillipore.hu

E-mail: kemia@merck.hu