Boros Borbála

NAGYSEBESSÉGŰ HPLC ELVÁLASZTÁSOK KIDOLGOZÁSA BIOAKTÍV VEGYÜLETEK MEGHATÁROZÁSÁRA

Ph.D. DOLGOZAT

Készült:
Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Karának
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében

Doktori Iskola Vezető: Dr. Barthó Lóránd egyetemi tanár
Programvezető: Dr. Deli József egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Ohmacht Róbert egyetemi tanár

Pécs, 2007.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 3

2. KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK 5

3. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK 7

3.1 A kromatográfia történelmi fejlődése 7

3.2 Kromatográfiás állófázisok 9

3.3 Az alkalmazott kromatográfiás állófázis ismertetése 10

3.4 Az alkalmazott elválasztás technika rövid ismertetése 13

3.5 Nyomás hatása a retencióra 14

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 15

4.1 Az alkalmazott állófázis stabilitás vizsgálata 15

4.2 Nyomás-retenció összefüggés vizsgálata 18

4.3 Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfiás elválasztása 39

4.3.1 Vitaminok HPLC analízise 39

4.3.2 Vízoldékony vitaminok HPLC analízise 40

4.3.3 Zsíroldékony vitaminok HPLC analízise 47

4.3.4 d,l-Norgesztrel elválasztása és kimutatási határának vizsgálata 52

4.3.5 Analgetikumok HPLC analízise 56

4.3.6 Természetes aminosavak elválasztása és kimutatási határának vizsgálata 59

4.3.7 Alkaloidok elválasztása és kimutatási határának vizsgálata 66

4.3.8 Ópium alkaloidok elválasztása és kimutatási határának vizsgálata 72

5. ÖSSZEFOGLALÁS 78

6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK 80

7. ELŐADÁS ÉS POSZTER JEGYZÉK 81

8. IRODALOM 85

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) egyike a legfontosabb műszeres analitikai módszereknek. Ez a megállapítás egyáltalán nem meglepő, ha figyelembe vesszük a módszer elvében és alkalmazásában rejlő, szinte korlátlan lehetőségeket, és azt az információ mennyiséget, amit a mérések során nyerni tudunk. A korszerű analitikai módszerekkel szemben felmerülő legfontosabb elvárásoknak: elemzés gyorsasága és érzékenysége, messzemenően megfelel.

A legtöbb műszeres analitikai technika, így a HPLC is, először a kutató és fejlesztő laboratóriumok vizsgáló eljárásaként terjedt el. Növekedésének töretlen trendje annak köszönhető, hogy az utóbbi időben az élettudományok területén, és a rutin vizsgálatoknál előtérbe került a gyors és érzékeny kromatográfiás eljárások alkalmazása, és a módszert az ipar is gyorsan elfogadta és bevezette. A gyógyszeripar területén egyre növekedett és jelenleg is nő a HPLC módszerek szerepe a nyersanyagok, az intermedierek, a reakcióelegyek, a gyógyszeralapanyagok és a kiszerelt gyógyszerkészítmények vizsgálatában és minősítésében.
A széles körű elterjedést jelentősen segítették a különböző kormányzati szervek (FDA, OGYI) és a nemzetközi szervezetek (WHO, FOA) előírásai és ajánlásai is.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia napjainkra igen magas technikai színvonalat ért el, és megállapítható, hogy szinte minden új analitikai feladat megoldása egyben bizonyos fokú kromatográfiás kutatással is együtt jár, nincs általánosan alkalmazható vizsgálati séma, vagy eljárás, amely valamennyi felmerült analitikai probléma megoldására megfelel.

A kromatográfiás berendezések fejlesztésével párhuzamosan, az állófázisok (a speciális töltetek) és oszlopok továbbfejlesztésére egyaránt szükség volt.
Az állófázis a kromatográfiás elválasztások „lelke", ezért a leggyorsabb fejlődés ma is a töltetfejlesztés területén tapasztalható.

A bioaktív vegyületek korszerű -néhány perces és érzékeny- elválasztásának kidolgozásánál nagy gondot kell fordítani a megfelelő kromatográfiás töltet kiválasztására. A folyadékkromatográfiás elválasztásokhoz egyre gyakrabban alkalmazzák a 3 μm-nél kisebb szemcseátmérőjű, *nemporózus, monodiszperz,* fordított fázisú tölteteket. Ezen töltetek

alkalmazása eleinte biopolimerek gyors analízisénél terjedt el, majd később a kis molekulatömegű szerves vegyületek elválasztásában is szerepet kaptak.

2. KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki, hogy nagysebességű HPLC vizsgálati módszereket fejlesztek ki bioaktív kis és nagy móltömegű vegyületek elválasztására *nemporózus, monodiszperz,* fordított fázisú tölteteket alkalmazásával.

A kromatográfiás analízisekhez olyan vegyületcsoportok választására törekedtem, melyek az élettudományokban, az orvosbiológiai kutatásokban, valamint a klinikai vizsgálatoknál nagy jelentőséggel bírnak. A kiválasztott mintavegyületek nem csak a gyakorlat szempontjából fontosak, hanem figyelemmel voltam arra is, hogy eltérő elválasztási problémát jelentő vegyületcsoportokkal (erősen poláris, gyengén poláris, savas, bázikus vegyületek) igazoljam a *nemporózus, monodiszperz,* fordított fázisú töltetek újszerű tulajdonságait.

1. A kromatográfiás elválasztási módszerek kidolgozása előtt vizsgálni kívántam a töltet kémiai stabilitását. Fontos szempontnak tartottam, hogy olyan állófázist használjak a HPLC elválasztásokhoz, amely hosszú időn keresztül biztosítja a reprodukálható vizsgálati eredményeket.

2. Vizsgálni kívántam a *nemporózus* töltetek esetén jellemző nagy nyomásesések mellett a retenció esetleges változását a nyomás függvényében.

3. A vitaminok (víz- és zsíroldékony vitaminok), az analgetikumok és az aminosav származékok HPLC elválasztása gyakran fontos analitikai feladat. Ezekre az elválasztásokra azonban a hosszú analízisidő jellemző.
   A *nemporózus, monodiszperz,* fordított fázisú töltet alkalmazásával igen rövid analízisidő elérésére törekedtem.

4. Gyógyszer analitikai szempontból nagyon lényeges az optikai izomerek HPLC elválasztásának megvalósítása, mivel élettani hatással rendszerint csak az egyik enantiomer rendelkezik. Ezért szerettem volna elválasztási módszert kidolgozni optikai izomerek szupergyors elválasztására *nemporózus* töltetek alkalmazásával.

5. Az analgetikumok és az aminosav származékok HPLC elválasztása gyakori és fontos feladat. A *nemporózus, monodiszperz*, fordított fázisú töltet alkalmazásával igen rövid analízisidő elérésére törekedtem.

6. Az alkaloidok elválasztása fordított fázisú kromatográfiás rendszerben kritikus analitikai feladat a vegyületek erősen bázikus jellege miatt.
   Napjainkban fontos HPLC elválasztási feladat az ópium alkaloidok különböző mátrixból történő analízise, ahol a fő ópium alkaloidok meghatározását meg lehet valósítani nyers ópiumból és mákgubó extraktumból.
   Olyan kromatográfiás elválasztás megvalósítására törekedtem, ahol a fő alkaloidok mellett a kísérő (minor) alkaloidok is meghatározhatók. Ez a minta származási helyének megállapítása érdekében lehet jelentős.

3. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

3.1 A kromatográfia történelmi fejlődése [1]

A kromatográfiát kémiai elemzés céljára alkalmazható módszerré *Michael Szemjonovics Cvet (1872-1919)* orosz botanikus tette, aki *1903-ban* a növényi színanyagok tanulmányozására fejlesztette ki az oszlopkromatográfiás eljárást. Megalkotta az első oszlopkromatográfiás rendszert. Egy üveg oszlopban állófázisként szilárd adszorbenst, mozgófázisként folyadékot használt az analíziseihez. Kísérletei során több mint 100 adszorbensen kipróbálásával petróleumos klorofill extraktumot választott el.
Először *Cvet* publikált a kromatográfiás elválasztás lehetőségéről.

„... a porokon keresztül való szűréskor megfigyelhető adszorpciós jelenség különösen érdekes. A cső alsó végén lejövő folyadék először színtelen, azután sárga, míg az oszlop tetején zöld gyűrű képződik... "

(Cvet,1903)

Napjainkban az általa alkalmazott adszorbensek közül több már jelentőségét vesztette, de a lejegyzett listában megtalálhatók a ma is használatos anyagok közül, a timföld, faszén, kalcium-karbonát, magnézium-oxid és cukor.
1906-ban Michael Cvett először használta a 'chromatography' elnevezést, amely a görög *khroma, -atos* szín és *graphos* írás szavakból ered.
1913-ban az amerikai L.S.Palmer közleményében növényi pigmentek és tejtermékek oszlopkromatográfiás eredményeiről számolt be.
1930-ban Edgar Lederer tanulmányozta Cvett és Palmer munkásságát és a már jól ismert oszlopkromatográfiát használta kísérleteihez, melyben a tojássárgája pigmentjeit vizsgálta. Az elválasztási módszer kiválasztásakor fontos szerepet játszott, hogy a módszert viszonylag gyorsnak találta és feltételezte, hogy ezáltal elkerülhető a karotinoid molekulák degradációja.
1938-ban ismertették először a sík (planar) kromatográfiás elválasztást. Egy üveglapon szétterített poron végezték az analíziseket. Ettől az időponttól számítható a vékonyréteg kromatográfia megjelenése.

1941-ben Martin és Synge számos fejlesztés végzett a modern kromatográfia területén. Aminosavakat választottak szét, vízzel nedvesített és indikátorral kezelt szilicium-dioxid állófázison.

1943-ban Martin és mások elválasztásaikhoz cellulózt használtak állófázisként. Ekkor vette kezdetét a papírkromatográfia alkalmazása.

1952-ben Martin és Synge Nobel-díjat kapott az első kromatográfiás elméletért, amelyben az elválasztás alapjait írták le.

1952-ig Martin és James kísérletezett a gáz-folyadékkromatográfiával, ahol illékony komponensek analizálásához használt gázhalmazállapotú mozgó fázist és egy nem illékony folyadékkal bevont szilárd hordozót állófázisnak.

1956-ban Stahl nevéhez fűződik a vékonyréteg (TLC) kromatográfia széleskörű bevezetése.

1960-as évek közepétől elterjed a gázkromatográfiás (GC) elválasztási módszerek alkalmazása a gyógyszeripari és a mezőgazdasági analitikai vizsgálatokban.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) „gyermekkora" az *1960-70-es évek közé* tehető [1, 2], ugyanis szükséges volt egy olyan kromatográfiás elválasztási technika kifejlesztése, amellyel lehetőség nyílt a nem illékony komponensek elválasztására és pontos mennyiségi analizálására. A HPLC technika a megjelenésétől napjainkig nagyon gyors fejlődésen ment keresztül.

3.2 Kromatográfiás állófázisok

Az 1970-es évek közepétől a nagyhatékonyságú kromatográfia fejlődésével (HPLC) az állófázisok is nagy fejlődésen mentek keresztül. A folyadékkromatográfiában alkalmazható állófázisoknak nagyon sokféle és néha egymásnak ellentmondó követelménynek kell megfelelnie. Elsődleges követelmény a nyomásállandóság. A szilikagél alapú töltetek alkalmazása széles körben elterjedt, mivel a töltetszemcsék mechanikusan stabilak, jól viselik az oszlopon előforduló 50-60 MPa nyomásesést.
A kromatográfiás elválasztás a töltet felületén és pórusaiban történik, az elválasztandó komponensek eltérő szorpciós viselkedésének következtében. A folyadékkromatográfiás tölteteket a felületi struktúrájuk szerint lehetnek *porózus*ak, illetve *nemporózus*ak.

A *porózus töltetek* (pl.: a legelterjedtebben alkalmazott a szilikagél alapú töltetek) nagy fajlagos felületű (kb.10-500 m^2/g) és pórustérfogatú anyagok. Az analitikai kromatográfiás célra használt szilikagélek szemcsemérete általában 3-10 μm tartományban van, de alkalmaznak kis szemcseméretű (1,5-2 μm), különösen szűk szitafrakciójú tölteteket is. Félpreparatív, illetve preparatív kromatográfiás elválasztásokhoz a 10 μm feletti átlagos szemcseméretű töltetek a megfelelőek.
A *nemporózus töltetek* 3 μm-nél kisebb szemcseméretű *monodiszperz* rendszerek. Leggyakrabban az 1,5 μm szemcseátmérőjű tölteteket alkalmazzák az analitikai kromatográfiás elválasztásokhoz. A töltet fajlagos felülete – tekintve, hogy pórusok nincsenek – megegyezik a geometriai felülettel (kb. 2 m^2/g). A *nemporózus* adszorbensekkel töltött oszlopok terhelhetősége általában alacsony, az oszlopok nyomásesése nagy, de az ilyen oszlopokon végezhető gyors elválasztások, a kitűnő visszanyerés e tölteteket olyan új feladatok megoldására teszik alkalmassá, melyek porózus tölteteken, nehézkesen, sokkal lassabban és kisebb érzékenységgel végezhetők el.

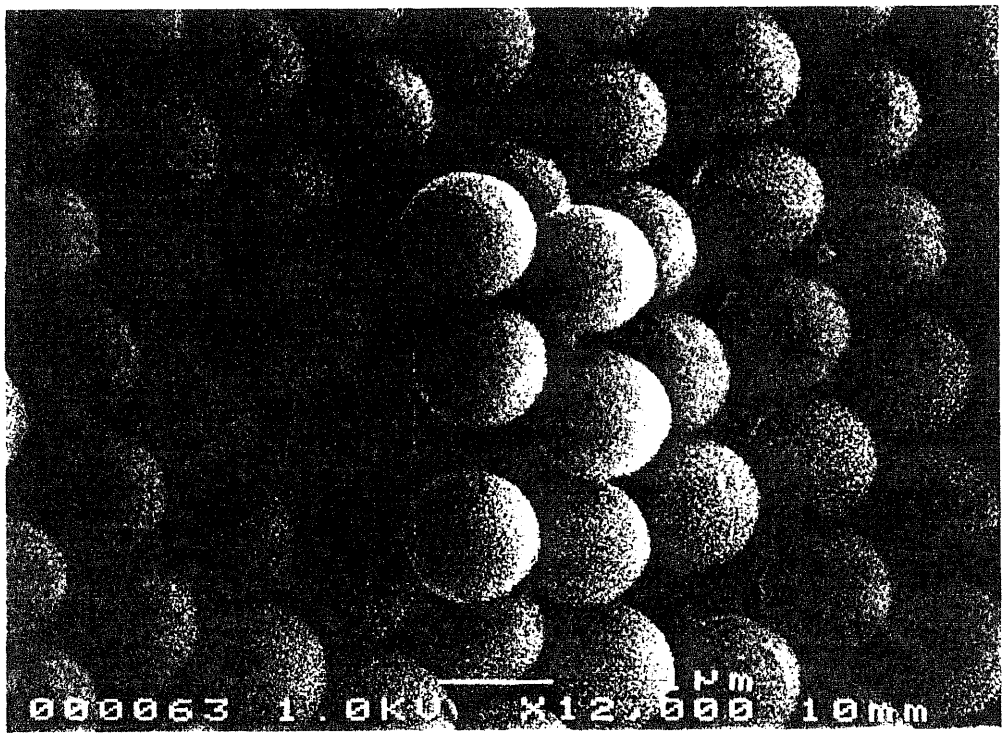
A kromatográfiás elválasztási módszerek kidolgozása során szem előtt tartottuk a különböző felhasználási területek igényeit, ahol a rövid analízis idejű és nagy érzékenységű elválasztások előnyös módon alkalmazhatók. Napjainkban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában a rövid analízisidő megvalósítását leginkább a *nemporózus fordított fázisú* (reversed-phase, RP) töltetek használatával lehet elérni.

3.3 Az alkalmazott kromatográfiás állófázis ismertetése

Felmérések szerint [3] az összes HPLC elválasztás 60%-át fordított fázisú tölteteken végzik. A fordított fázisú folyadékkromatográfiás töltetek körében továbbra is a szilikagél alapú állófázisok (felületén alkil-csoportokkal módosított szilikagél) a leginkább elterjedtek (75%). A hidrofobizált szilikagél állófázison végzett fordított fázisú folyadékkromatográfia népszerűségét több tényezőnek köszönheti. Ilyen a részecskék mechanikai szilárdsága, fizikai tulajdonságának viszonylagos állandósága, illetve az elérhető nagyobb hatásosság más fordított fázisú töltettípusokhoz képest [4, 5].
Az élettudományok szempontjából fontos molekulák túlnyomó többsége apoláris vagy gyengén poláris molekularészeket is tartalmaz, ennél fogva fordított fázisú állófázisok alkalmazásával sikeres elválasztások érhetők el.

A biokromatográfia területén egyre nagyobb tért hódít a 3 μm-nél kisebb szemcseátmérőjű, *nemporózus, monodiszperz* fordított fázisú töltetek alkalmazása.
A legfontosabb alkalmazási területe a biopolimerek gyors analízise [6-10], mivel ezeknek a vegyületeknek a folyadékkromatográfiás elválasztása porózus állófázisok használatával sokszor nehezen valósítható meg a nagy retenciók és a részleges visszanyerhetőség miatt. Napjainkban, a kis molekulatömegű (M<500) szerves vegyületek analízisének körében is elterjedt a *nemporózus* töltetek alkalmazása [11-21].

Ezen megfontolások figyelembe vételével a kismolekulájú bioaktív molekulák folyadékkromatográfiás elválasztásaihoz KOVASIL-C_{14} ill. KOVASIL-C_{18} típusú (Chemie Uetikon, Uetikon, Svájc) oszlopot választottunk. Az oszlop 33 mm hosszú és 4,6 mm belső átmérőjű. Az oszlopban nagy tisztaságú, szilikagél alapú, *nemporózus, monodiszperz*, 1,5 μm szemcseátmérőjű apoláris töltet van.
A szilikagél felületéhez kémiai kötésekkel C_{14}, C_{18} lánchosszúságú hidrofób alifás szénhidrogén csoportok kapcsolódnak.
A töltet monodiszperzitását, a gyártó által készített elektronmikroszkópos felvétel szemlélteti (1. ábra).



1. ábra: KOVASIL töltet elektronmikroszkópos felvétele

Nemporózus, monodiszperz, 1,5 μm szemcseátmérőjű töltet <u>előnyei</u>:

1.) A gyors anyagátadás a kis szemcseméretnek és a pórusmentes felületnek köszönhető. (A kis átmérőjű szemcséknek és a pórusmentes felületnek köszönhetően a mozgófázisban javul az anyagátadás, mivel a szemcsék közötti csatornák kicsik, ezért a minta molekuláinak rövidebb utat kell megtenniük a két egymást követő kromatográfiás kölcsönhatás között). A nagy sűrűségű, monomer C_{14} borítás (4,0 μmol/m^2) [22] pedig a gyors állófázisbeli anyagátadást biztosítja. Ezáltal rövid analízisidejű gyors kromatográfiás elválasztási módszereket lehet kidolgozni, ezen töltetek alkalmazásával.

2.) Azonos körülmények között a monodiszperz szemcsék alkalmazása azért előnyösebb, mint a szabálytalan alakúaké és/vagy nem monodiszperz szemcseméret eloszlásúaké, mert belőlük homogén töltetágyat lehet előállítani. (Egy inhomogén töltetágyban az áramlási sebesség minden pontban más és más, következésképpen nagyobb a sávszélesedés mértéke a homogénhez képest).

3.) Magas elméleti tányérszám (N) jellemző az oszlopra.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{t_B}\right)^2 \text{, ahol}$$

N: elméleti tányérszám

t_R: a minta retenciós ideje

t_B: a sávszélesedés mértéke (az alapvonalon mérve).

A folyadékkromatográfiás elválasztások során törekszünk nagy tányérszámok elérésére. Minél kisebb a töltet szemcsemérete, minél kevésbé viszkózus az eluens, minél jobb az anyagátadás annál nagyobb elméleti tányérszám (N) érhető el.

4.) A töltet mechanikai és kémiai stabilitása kiváló (lásd. 15. oldal).

5.) A rövid analízisidőnek köszönhetően alacsony az oldószer felhasználás.

Nemporózus, monodiszperz, 1,5 μm szemcseátmérőjű töltet hátrányai:

1.) Kicsi a töltet fajlagos felülete, ami viszonylag kis számú kromatográfiás kölcsönhatást, következésképpen rövid retenciókat eredményez.

2.) A kis szemcseméretből adódóan magas az oszlopon a nyomásesés. (Az elválasztásokhoz ezért olyan eluenseket célszerű alkalmazni, melyek viszkozitása kicsi. Ezért többnyire az acetonitril-víz rendszerek használatosak, a metanol-víz eluensek viszont nagy viszkozitásuk miatt kevéssé alkalmazhatók [23].)

3.) Gradiens elúciót kell alkalmaznunk az alacsony terhelhetőség részbeni ellensúlyozására.

3.4 Az alkalmazott elválasztás technika rövid ismertetése

A bioaktív molekulák rövid, néhány perces analízisét gradiens elúciós technika alkalmazásával értük el. A gradiens elúciós eljárással a retenciós idő csökkentését, az eluálódó csúcsok elválasztásának minőségét, és a csúcsszélesedés mértékét tudtuk befolyásolni.

A gradiens elúciós technikát előnyben részesítettük a *nemporózus* oszlopoknál, ahol az oszlopban a mozgófázis térfogata csak kb. 0,2 ml, így az oszlopon kívüli sávszélesedés jelentős lehet, de tapasztalatunk szerint e kellemetlen kolonnán kívüli hatás (pl.: a holtterek hatása) gradiens elúciót alkalmazva mérsékelhető.

Az oszlopon kívüli sávszélesedés a folyadékkromatográfiás berendezés különféle alkatrészeiben (injektor, detektorcella, csővezetékek, stb.) bekövetkező sávszélesedésből adódik. Tapasztalatunk szerint az injektor és a detektorcella jelentős befolyásoló tényező. Az általunk alkalmazott Rheodyne 8125-ös injektor lényegesen jobban harmonizál a KOVASIL oszlopokkal - szimmetrikusabb csúcsokat ad -, mint a korábbi 7125-ös típus. Meglepő módon a Gynkotek cég detektorcellája (14 μl) optimális felépítésűnek tűnik. Munkacsoportunk más gyártók sokkal kisebb térfogatú detektorcelláit (9 μl, 2 μl) is kipróbálta, de az alkalmazott körülmények között jelentős minőségjavulást nem tapasztaltunk. Kisebb jelentőségűek az összekötő kapillárisok. Tapasztalatunk szerint a 0,18 mm belső átmérőjű kapilláris a hatékonyságot nem befolyásolja, feltéve, hogy az összekötő pontok jól illeszkednek.

A gradiens elúció alkalmazása megoldást jelent az általános elúciós probléma kezelésére is [24]. Ezt főként olyan vegyületek analízisénél okoz gondot, amelynél egy izokratikus elválasztás során a komponensek kapacitási tényezője (k) tág határok között mozog és az egyes értékek között nagy, vagy minimális a különbség. Az ilyen probléma megoldására alkalmas a gradiens elúció, amikor az elválasztás közben változtatjuk az eluens összetételét. Ennek hatására a kapacitási tényező a kívánt módon változtatható.

3.5 Nyomás hatása a retencióra

Az utóbbi évtizedben többen tanulmányozták a HPLC rendszer fizikai-kémiai paramétereinek változását a nyomás változásának hatására.

A nyomás befolyásolja a mozgófázis sűrűségét és viszkozitását, az analizálandó molekulák molekulatérfogatát, valamint az eluens komponensei között létrejövő kölcsönhatásokat.

Kísérletek sorozata bizonyítja, hogy a nyomás lényegesen kihat a retencióra mind fordított fázisú kromatográfiás, mind királis elválasztásoknál [25-30].

Megfigyelték, hogy a nyomás 0,1-50 MPa tartományban történő növelése a retenció lineáris növekedését eredményezi [31, 32]. Hasonló összefüggés található néhány korábbi közleményben [33-37]. A nyomásnak szerepe van az oszlopban kialakuló szorpciós egyensúlyok megvalósulásában is [38-41]. Ezen a területen *Martire* [42] és *Guiochon* [37] alapvető elméleti munkát végzett. Kromatográfiás elválasztás során nem elhanyagolható mennyiség a mozgófázis áramlásából eredő súrlódási hő [47-50], amivel számolnunk kell. A súrlódási hő szintén hatással van az elválasztandó anyagok retenciójára.

Chen és munkatársai tanulmányozta a lisosim fehérje és a poli-L-fenil-alanin homológ sorának retenciós viselkedését a nyomás függvényében fordított fázisú kromatográfiás módszerrel oktadecil (C_{18}) állófázis alkalmazásával [51]. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az oldott fehérje parciális moláris térfogata kb. 100 ml/mol-lal csökken, amikor az állófázison adszorbeál. A poli-L-fenil-alanin homológok esetében a parciális moláris térfogat csökkenése kisebb mértékű volt.

Szabelkski és munkatársai négy különböző inzulin adszorpciós egyensúlyának nyomás és hőmérséklet függését vizsgálták. Arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző retenciós paraméterek változását a nyomás okozta, amikor az oldott anyag adszorbeált a C_8-csoporttal borított állófázison, és ekkor az oldott anyag parciális moláris térfogata kb. 102 ml/mol-lal változott [52].

A *nemporózus* állófázisok alkalmazása a HPLC elválasztások különböző területein [6, 10, 12, 14, 43, 44], egyben a magas nyomáson történő elválasztást is jelenti. Ezeknél az elválasztási rendszereknél tehát szintén fontos szerepet kell tulajdonítani a nyomás-retenció összefüggésnek.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Az alkalmazott állófázis stabilitás vizsgálata

Az állófázis stabilitása a folyadékkromatográfia szempontjából alapvető jelentőségű. Szilikagél alapú tölteteknél megkülönböztetünk mechanikus és kémiai stabilitást.

A mechanikus stabilitás a *nemporózus* tölteteknél kiváló, tekintettel a *monodiszperz* részecskékre. A töltet szemcsék az oszlopban a legszorosabb illeszkedés szerint helyezkednek el. Több éves rendszeres használat után sem fordult elő, hogy a töltetágy akár a legkisebb mértékig is „megroggyant" volna, vagy a csúcsalakok torzulást szenvedtek volna.

A kémiai stabilitás alatt a töltet viselkedését értjük erősen savas (pH<2) és bázikus (pH>8) kémhatású eluensek használata esetén.
A töltetek kémiai stabilitását savas és bázikus körülmények között is megvizsgáltuk.

Savas stabilitás vizsgálatnál a tölteten pH=1,9 eluenst áramoltattunk keresztül úgy, hogy a kolonnát 80 °C-ra termosztáltuk. Az alacsony pH-nál az állófázis stabilitás csökkenése elsősorban a Si-C kötések bomlásának tudható be [24].

Bázikus stabilitás vizsgálatnál a pH=8,5-ös kémhatású eluenst áramoltattunk az oszlopon, melyet szintén 80 °C-on termosztáltunk. Abban az esetben, ha a szilikagél felülete nem tökéletes borítottságú, akkor a pH>8,5 kémhatású eluens a töltet rendkívül gyors hidrolízisét eredményezheti [24]. Így ezzel a kísérlettel közvetve a szilikagél borítottságát is ellenőriztük.

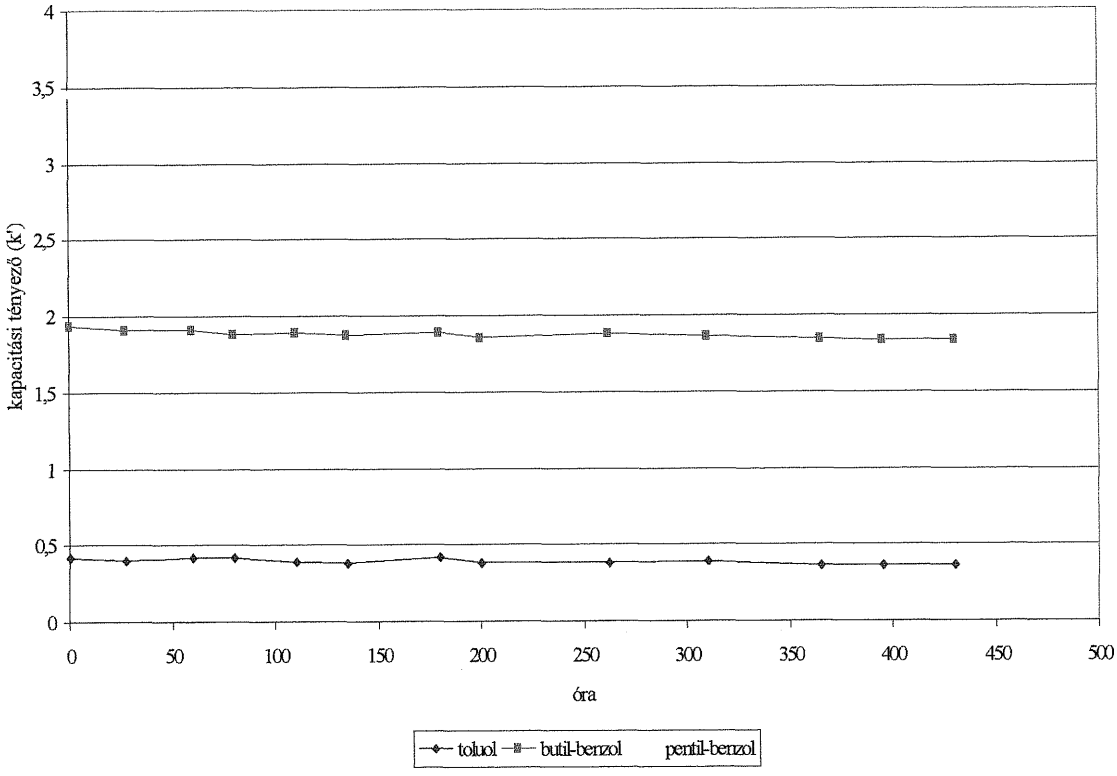
A magas hőmérsékleten történő termosztálással a töltet igénybevételét kívántuk fokozni. Időközönként a kolonnát egy izokratikus elválasztással teszteltük. A teszt analízisekhez azokat a tesztanyagokat választottuk, melyekkel a gyártó cég a kész kolonnáit teszteli.

Ellenőrző elválasztás:
Minta: toluol:butil-benzol:pentil-benzol = 1:1:1 arányú elegye
Eluens: 50 % acetonitril (CH_3CN) + 50 % bideszt.víz (H_2O)

Savas stabilitás vizsgálat (pH=1,9):

Eluens: 50 % acetonitril (CH_3CN) + 50 % bidesztvíz (H_2O) + 0,12 % trifluor-ecetsav (TFA)

Savas stabilitás vizsgálatnál a kísérletet 430 óra folyamatos eluens áramlás után abbahagytuk (2. ábra). Ez idő alatt 39 liter, azaz 200000 kolonna térfogat eluenst szivattyúztunk át, a töltet stabil maradt, a retenciók nem változtak. (Vizsgáltuk az oszlopon tapasztalható nyomásesést is, ez sem változott a savas stabilitás vizsgálat során, azaz megegyezett a kiindulási értékkel.)

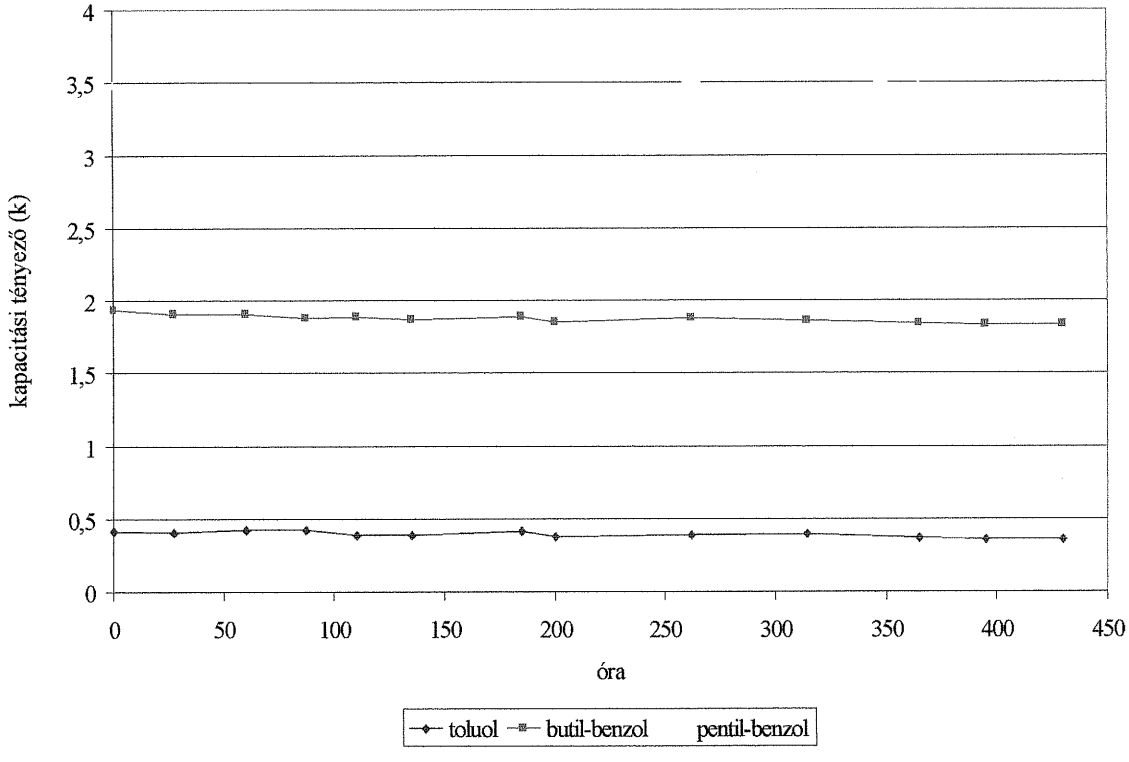


2. ábra: KOVASIL-C_{14} oszlop stabilitás vizsgálata (pH=1,9)

Bázikus stabilitás vizsgálat (pH=8,5):

Eluens: 50 % 0,2 mol/l-es koncentrációjú trisz(hidroximetil)-aminometán (trisz-puffer) oldat + 50 % acetonitril (CH_3CN) = 1:1 arányú elegye

A lúgos stabilitás vizsgálatot 440 órás folyamatos eluens áramlás után fejeztük be. Ennél a kísérletnél 40 liter, azaz 205000 kolonna térfogatnyi eluenst áramoltattunk át az oszlopon. A 3. ábra mutatja, hogy a töltet ilyen vizsgálati körülmények mellett is stabil maradt.



3. ábra: KOVASIL-C_{14} oszlop stabilitás vizsgálata (pH=8,5)

4.2 Nyomás-retenció összefüggés vizsgálata

Kísérleti rész

Munkánk során kétféle kísérleti elrendezésben tanulmányoztuk a nyomás szerepét a retenció változására:

1.) **Első esetben a nyomás növelését az áramlási sebesség növelésével értük el. (Ez valósul meg a legtöbb gyakorlati munka során is.)**

2.) **A második esetben az áramlási sebességet a rendszerben állandó értéken tartottuk, míg a rendszer kimenőpontján egy szelep segítségével változtattuk a nyomást oszlopon.**

A méréseket elvégeztük 25°C-on és 60°C-on is. Az oszlopot, valamint az injektor és az oszlop közötti „bemenő" kapillárist kb. 20 cm hosszban vízköpennyel termosztáltuk. Ezt az elrendezést azért választottuk, hogy ne csak az oszlop, hanem a belépő folyadék hőmérséklete is bizonyosan a beállított (25°C és 60°C) hőmérsékletű legyen, azaz, ha valamilyen hőmérséklet-változás fellép az oszlopban, az csak az oszlopban végbemenő folyamatok következménye legyen. Természetesen a mért retenciók és a retenció változások is számszerűen eltértek a két hőmérsékleten, de az összefüggések jellege, „trendje" azonos volt. Mértük az oszlop végpontján az eluens hőmérsékletét, amely az áramlási sebesség növelésével emelkedett. A retenciókat az oszlopban uralkodó átlagos nyomás függvényében ábrázoltuk, feltételezve, hogy a nyomásesés az oszlopban egyenletes:

$$P_{átlag} = (P_{be} + P_{ki})/2$$

A jelenség tanulmányozását két teszt elegy elválasztásával végeztük:

1.) Aromás szénhidrogének (toluol, etil-benzol, butil-benzol, pentil-benzol) elválasztása.
Eluens: acetonitril : bideszt.víz = 4 : 6

2.) Poláris, savas és bázisos minták (fenol, acetofenon, N,N-dimetil-anilin, benzofenon) elválasztása.

Eluens: acetonitril : bideszt.víz = 13 : 87

A tesztelegyeink sokban hasonlítanak a fordított fázisú folyadékkromatográfiában kiterjedten alkalmazott ún. Engelhardt-tesztre, melyet porózus töltetek minősítésére dolgoztak ki [44-46]. A *nemporózus* állófázisokon a retenciók alacsonyabbak, ezért némileg eltértünk az eredeti (Engelhardt féle) előirattól. Külön végeztük a poláris és nem poláris mintaanyagok elválasztását.

Vegyszerek: tiokarbamid, toluol, etil-benzol, butil-benzol, pentil-benzol, fenol, acetofenon, N,N-dimetil-anilin, benzofenon, Fluka gyártmányú volt (Buchs, Svájc). A HPLC minőségű acetonitrilt a Scharlau Lab. Chemicals szállította (Barcelona, Spanyolország). A vizet kétszeres desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

Kromatográfiás rendszer: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy P 580 NDG precíziós pumpából, 170S diódasoros detektorból, és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt. A detektorban egy UZ-GT-MIC nagynyomású kapilláris átfolyó detektor cellát (140 nL) csatlakoztattunk. A minta bevitelt egy 8125 Rheodyne (Cotati CA, USA) injektor segítségével végeztük, melyhez egy 20 μL-es loop tartozott. A kromatográfiás elemzéseket KOVASIL-C_{14}, állófázison végeztük.

A kolonna állandó hőmérsékletét vízköpeny biztosította, melynek hőmérsékletét HAAKE F3 cirkulációs termosztáttal (Berlin, NSZK) szabályoztuk. A vízköpeny az oszlopon kívül az injektor-kolonna összekötő kapilláris kb. 20 cm-ét is temperálta.

Eredmények

1.) A nyomásemelés hatása a retencióra eluens áramlás változtatásával

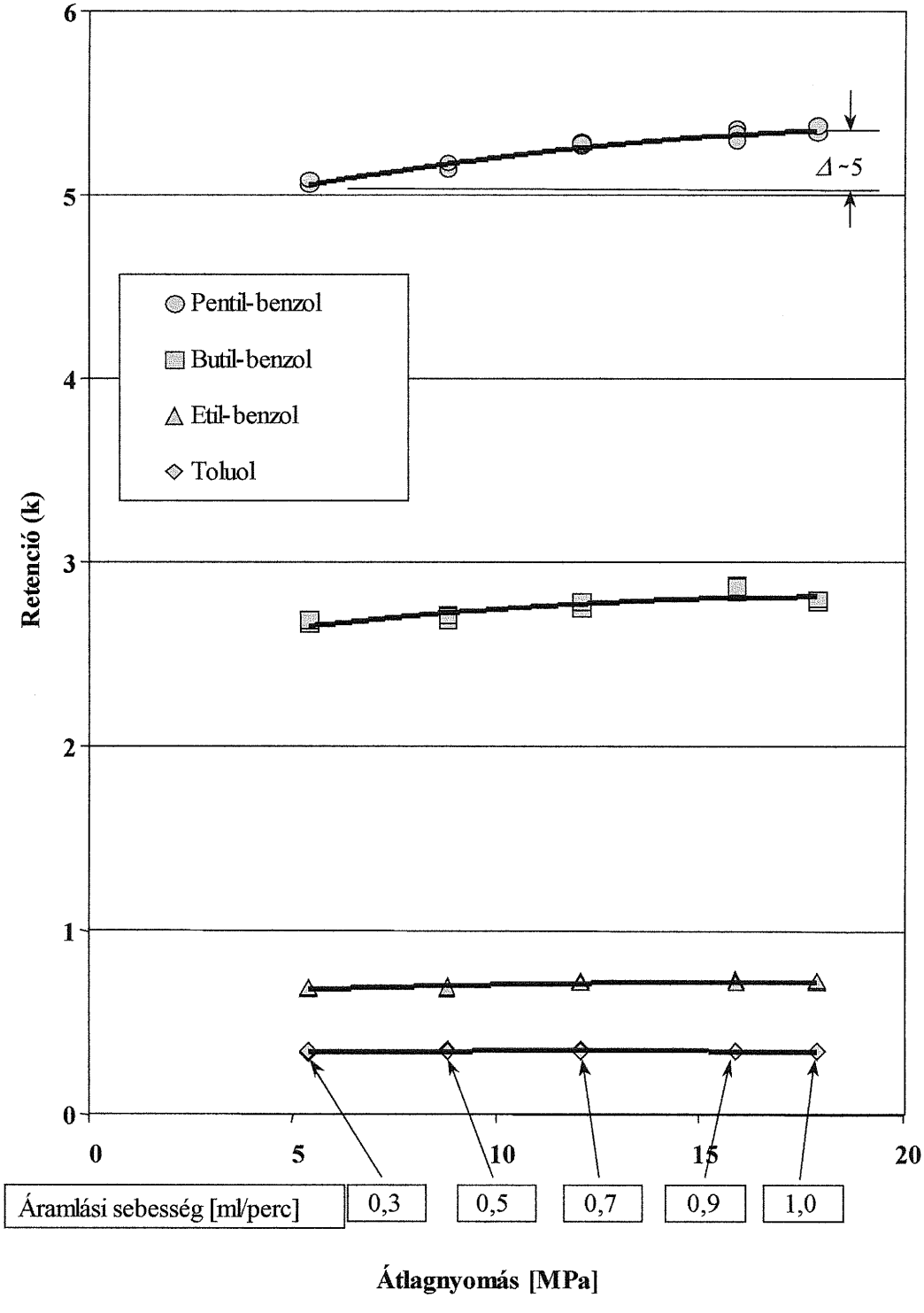
Az első mérési sorozatban a nyomást az áramlási sebesség emelésével növeltük. Ebben az esetben az oszlop kimenőpontján a nyomás megegyezik a légköri nyomással, az oszlopban uralkodó átlagnyomás a belépő nyomás fele:

$$P_{ki} = P_{környezet} \cong 0$$

$$P_{átlag} = P_{be}/2$$

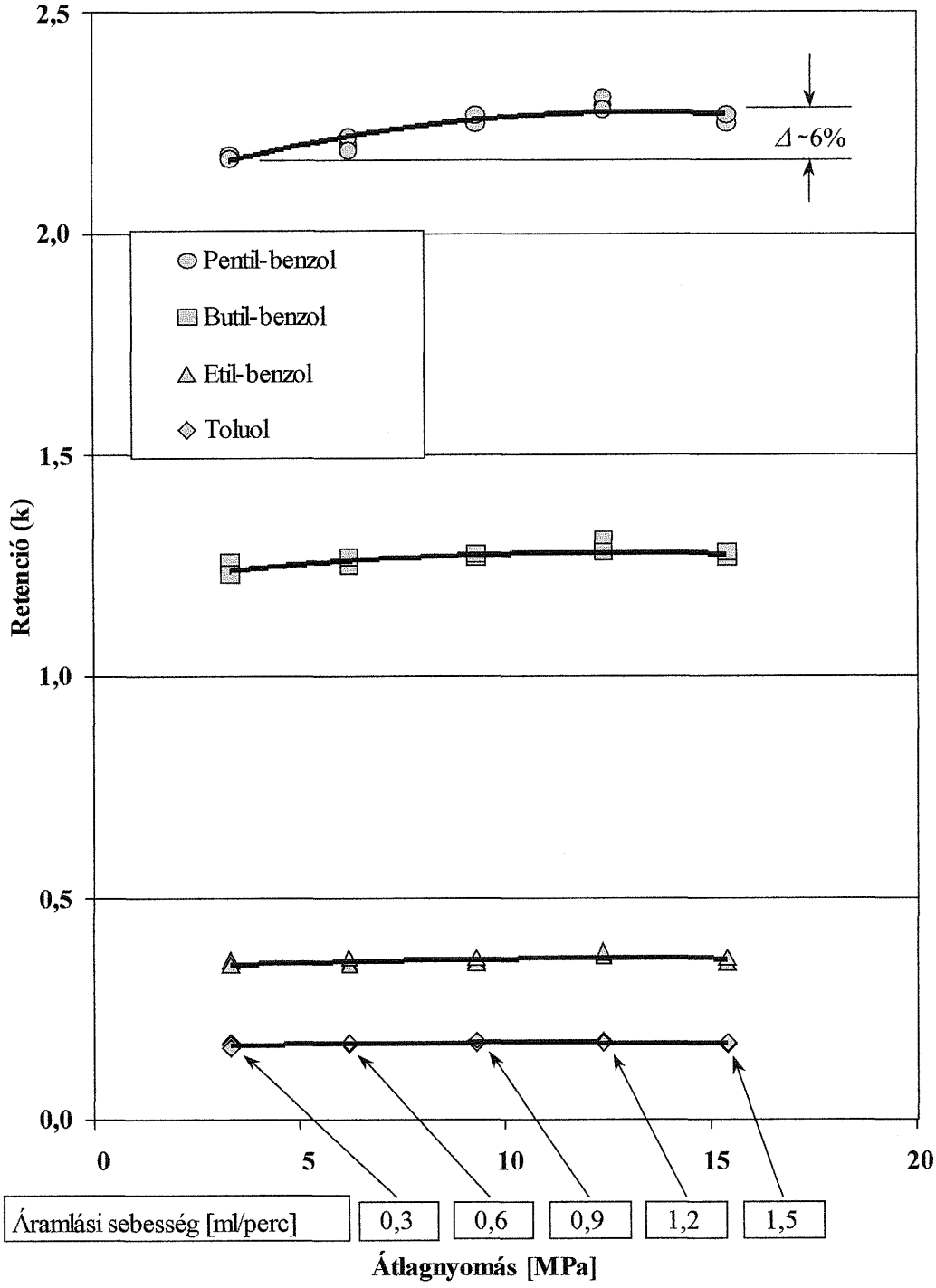
A nyomás emelkedésével járó retenció (k) változás a 4., 5., 6. és a 7. ábrán látható. A változás kismértékű (2-5 %) és összetett. A nyomás emelése eleinte a retenció növekedését, majd egy idő után csökkenését eredményezte. Ezt a jelenséget azzal lehet magyarázni, hogy az áramlási sebesség növekedése egyre több súrlódási hőt eredményez, amit el kell vezetni a rendszerből. Erre azonban még a gondos termosztálás esetén sincs teljesen mód, a 8. és 9. ábrán látható, hogy az oszlopban áramló folyadék melegszik. Az általunk alkalmazott oszlop és eluensek esetében a jól termosztált kolonnában (vízköpenyes termosztálás), 1 ml/perc áramlási sebességnél az oszlop kilépő pontján a hőmérséklet kb. másfél fokkal magasabb a nyugalomban lévő folyadékhoz képest. Nem termosztált oszlop esetében a hőmérséklet emelkedése elérheti a három fokot is. A nagyobb víztartalmú eluensben a hőmérséklet emelkedés mértéke alacsonyabb, mint acetonitrilben gazdagabb eluensben, tekintve a víz nagyobb fajhőjét és jobb hővezető képességét.

Megvizsgáltuk a mintavegyületek retenció változását nem termosztált kolonnában is, szobahőmérsékleten (7. ábra). A retenció enyhe csökkenését (≅2 %) tapasztaltuk amely megerősíti, hogy a retenció csökkenése az oszlop melegedésének a következménye; minél erősebb a melegedés, annál inkább csökken a retenció. Ez az effektus a gyakorlatban elfedi a retenció-nyomásemelkedés összefüggés retenciónövelő hatását.



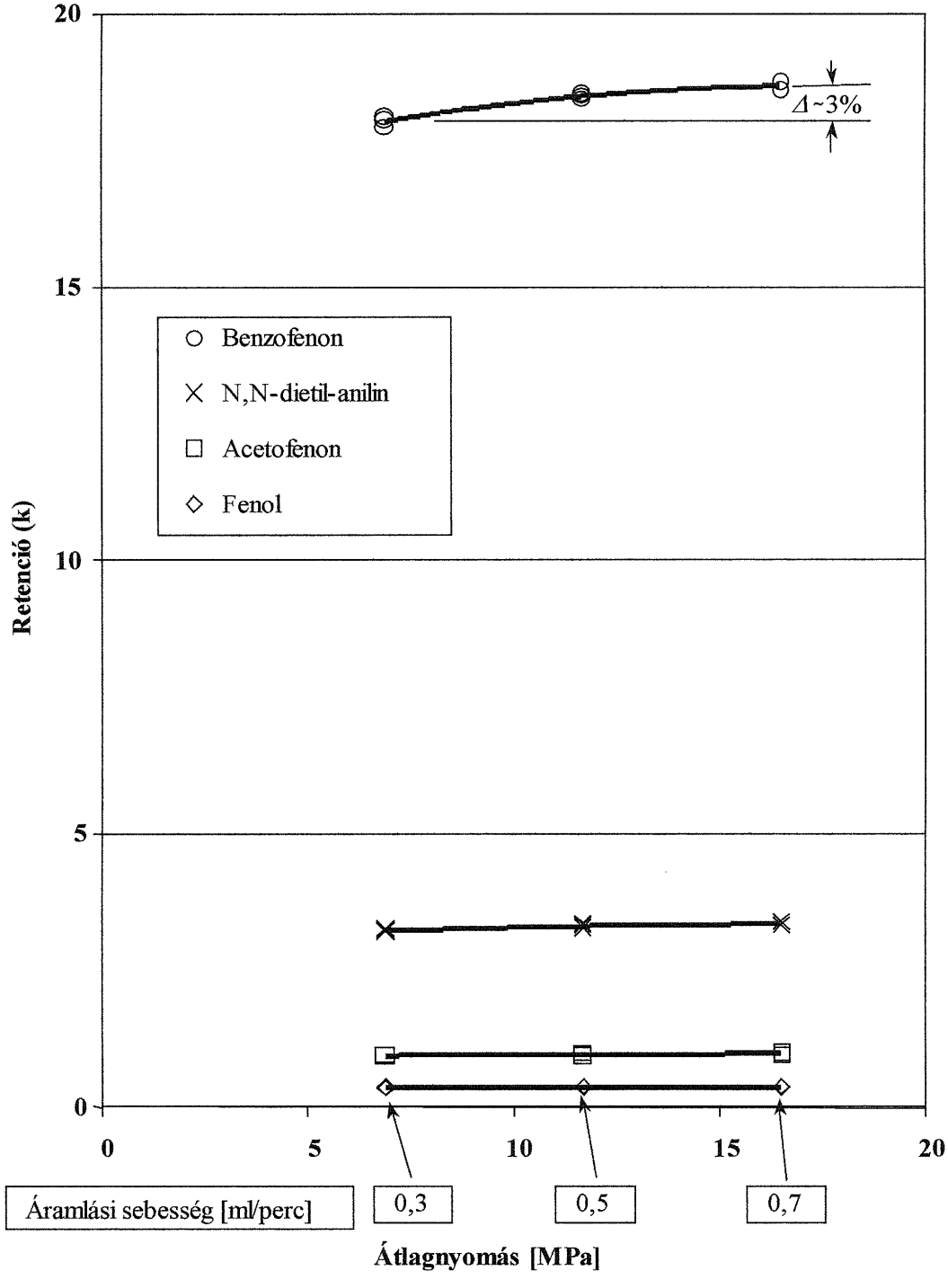
4. ábra: Alkil-benzol vegyületek retenciója 25°C-on

(nyomás változtatása áramlási sebesség változtatással)



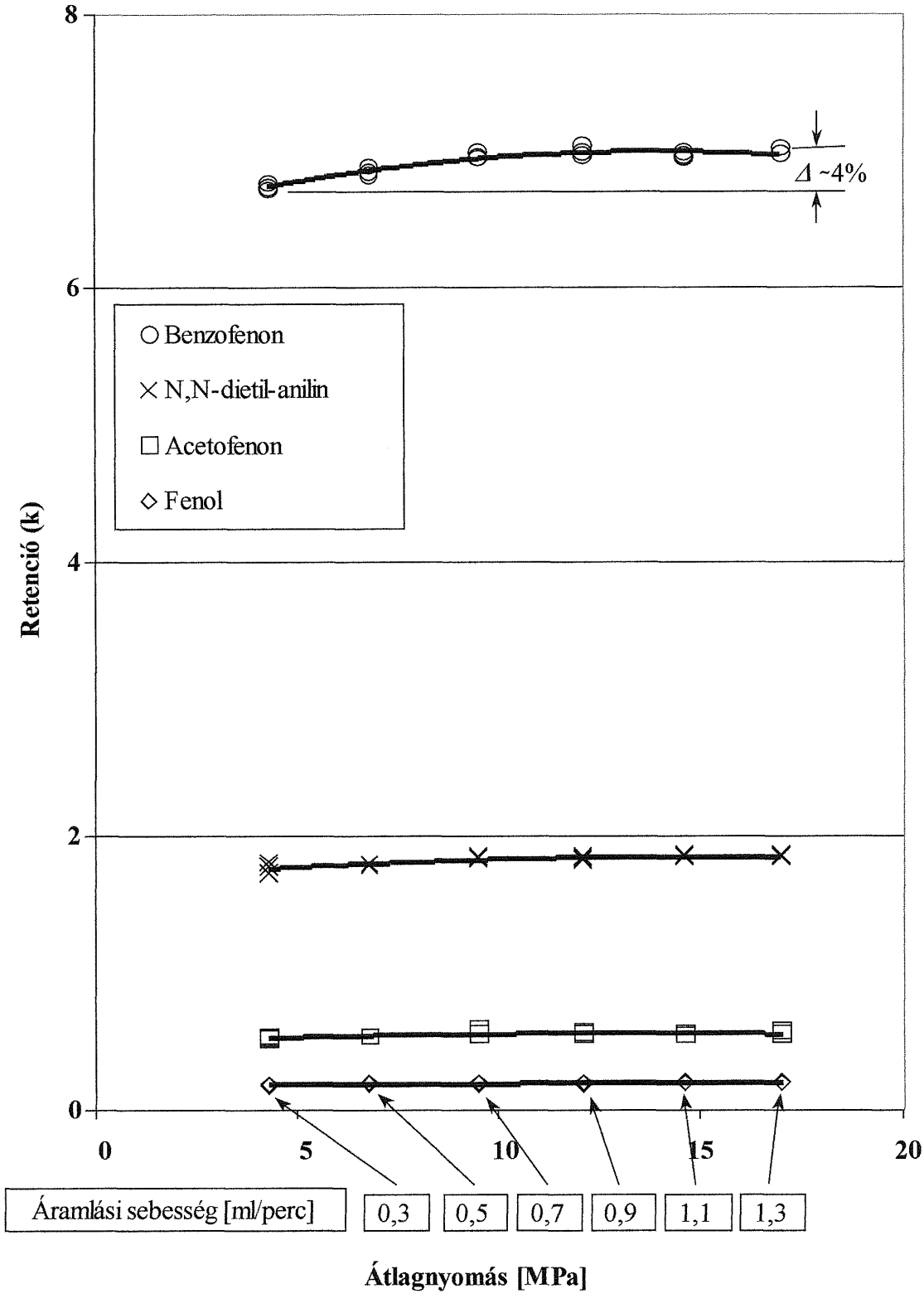
5. ábra: Alkil-benzol vegyületek retenciója 60°C-on

(nyomás változtatása áramlási sebesség változtatással)



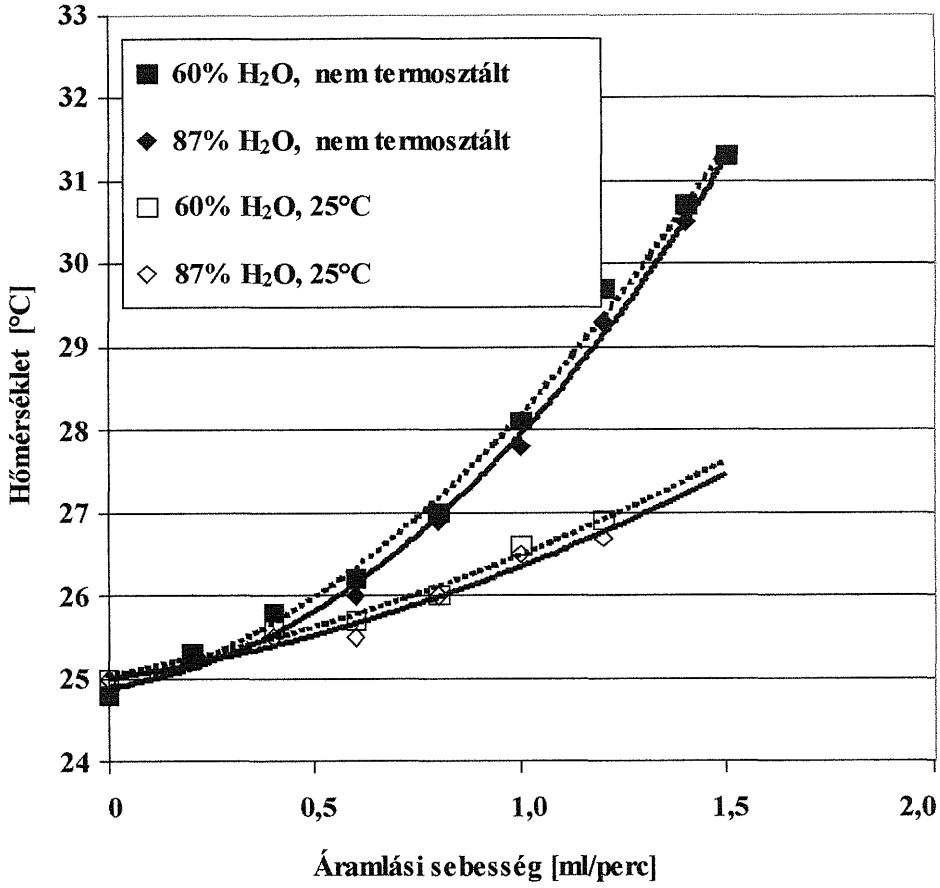
6. ábra: Poláris vegyületek retenciója 25°C-on

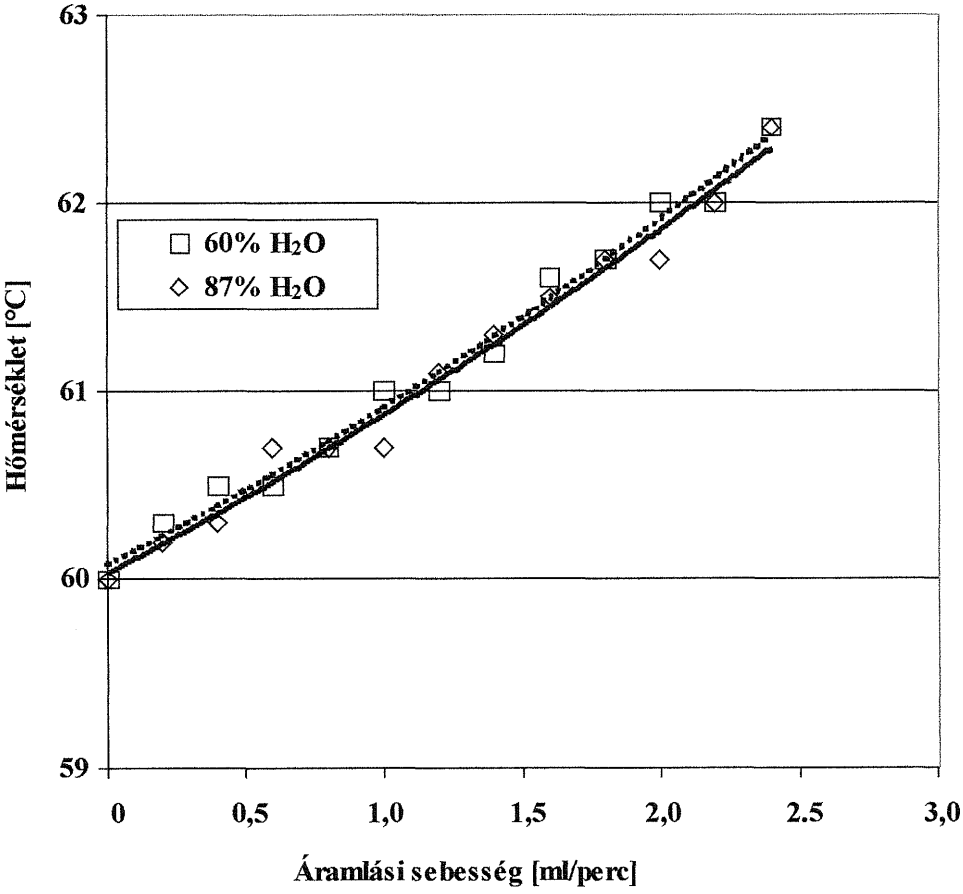
(nyomás változtatása áramlási sebesség változtatással)



7. ábra: Poláris vegyületek retenciója 60°C-on

(nyomás változtatása áramlási sebesség változtatással)





8-9. ábra: Áramlási sebesség és hőmérséklet összefüggése 25 és 60°C-on

2/a.) A nyomásemelés hatása a retencióra fojtószelep alkalmazásával

A nyomás emelkedésével járó retenció (k) változása az 10., 11., 12. és 13. ábrán látható.

A fojtószelep alkalmazásával úgy tudtuk a rendszerben a nyomást emelni, hogy az áramlási sebességet nem kellett változtatni, így a súrlódási hő (és ezzel a kolonna hőmérséklete) sem változott a kísérletek folyamán.

Abban az esetben, amikor a nyomást a rendszerben a kolonna kilépő pontján elhelyezett szeleppel szabályoztuk, a nyomás a kilépőponton gyakorlatilag megegyezett a fojtószelepen eső nyomással (ezt ellennyomásnak neveztük el):

$$P_{ki} = P_{ellennyomás} + P_{környezet} \approx P_{ellennyomás}$$

Az oszlopban uralkodó átlagnyomás pedig:

$$P_{átlag} = (P_{be} + P_{ellennyomás}) / 2$$

A gyakorlatban a nyomás megállapítása a következőképpen történt: 0,3 ml/perc áramlási sebességnél mértük a nyomást fojtószelep nélkül (P_{fn}). Ezután a szelep fokozatos zárásával emeltük a nyomást a rendszerben, miközben az áramlási sebesség természetesen továbbra is 0,3 ml/perc maradt. A mérhető nyomásesés összeadódik a kolonna ellenállásából adódó nyomásesésből (P_{fn}) és a fojtószeleppel kiváltott nyomásesésből ($P_{ellennyomás}$).
A fojtószelepen aktuálisan eső nyomást következő képlettel számoltuk:

$$P_{ellennyomás} = P_{be} - P_{fn}$$

azaz,

$$P_{átlag} = (P_{be} + (P_{be} - P_{fn})) / 2 = P_{be} - (P_{fn} / 2)$$

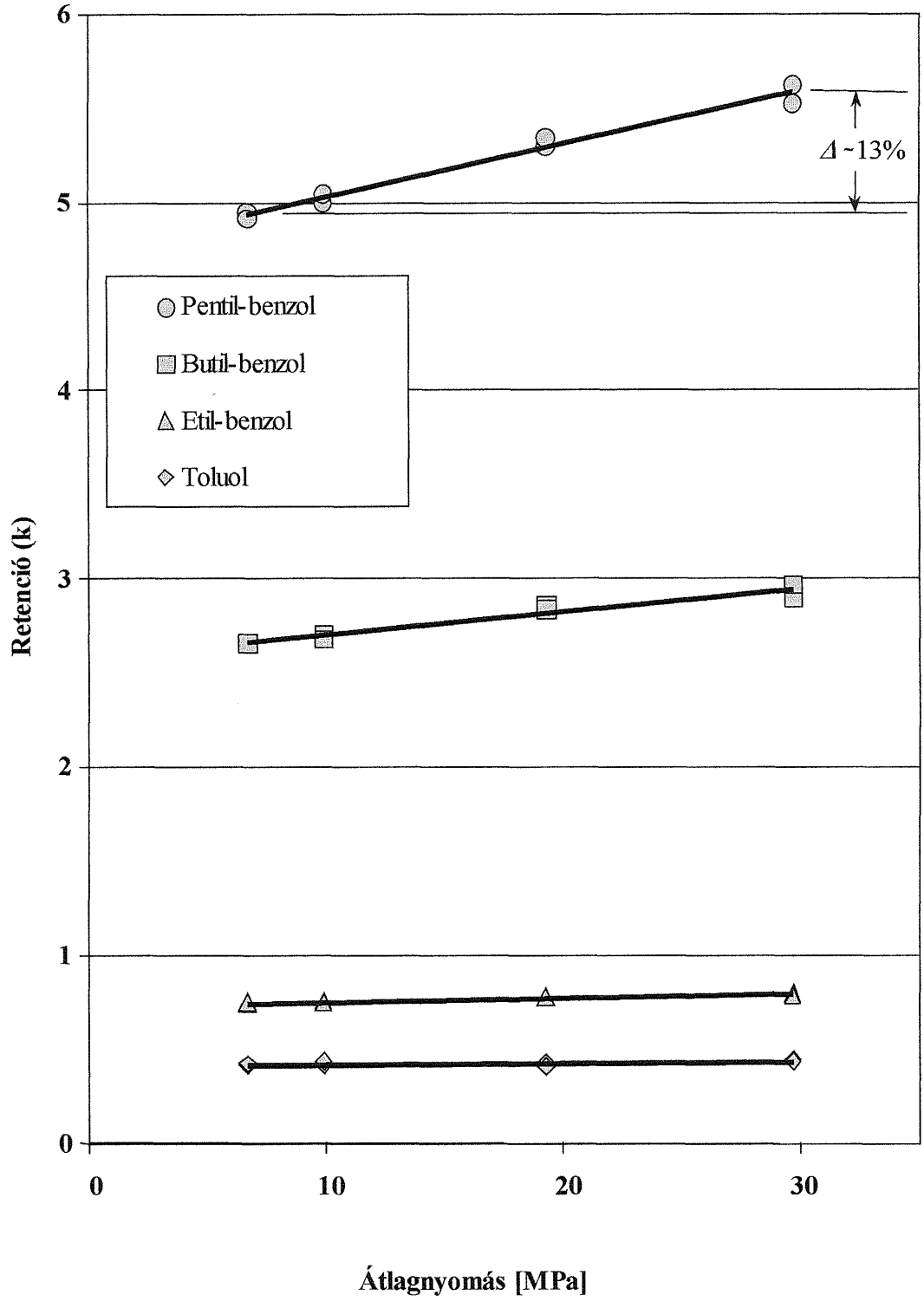
ahol a P_{be} a rendszer bemenő nyomása (oszlop + fojtószelep).

A mérésekhez ugyanazokat a mintákat és eluenseket alkalmaztuk, mint az előző kísérlet sorozatban.

Valamennyi mintaanyagunk esetében a nyomásesés-retenció összefüggés lineáris, emelkedő 25 °C-on és 60 °C-on is. Az általunk vizsgált nyomástartományban (5-30 MPa tartományban) a retenció (k) emelkedése 5-16% között van a mintaanyagok retenciójától és a hőmérséklettől függően.

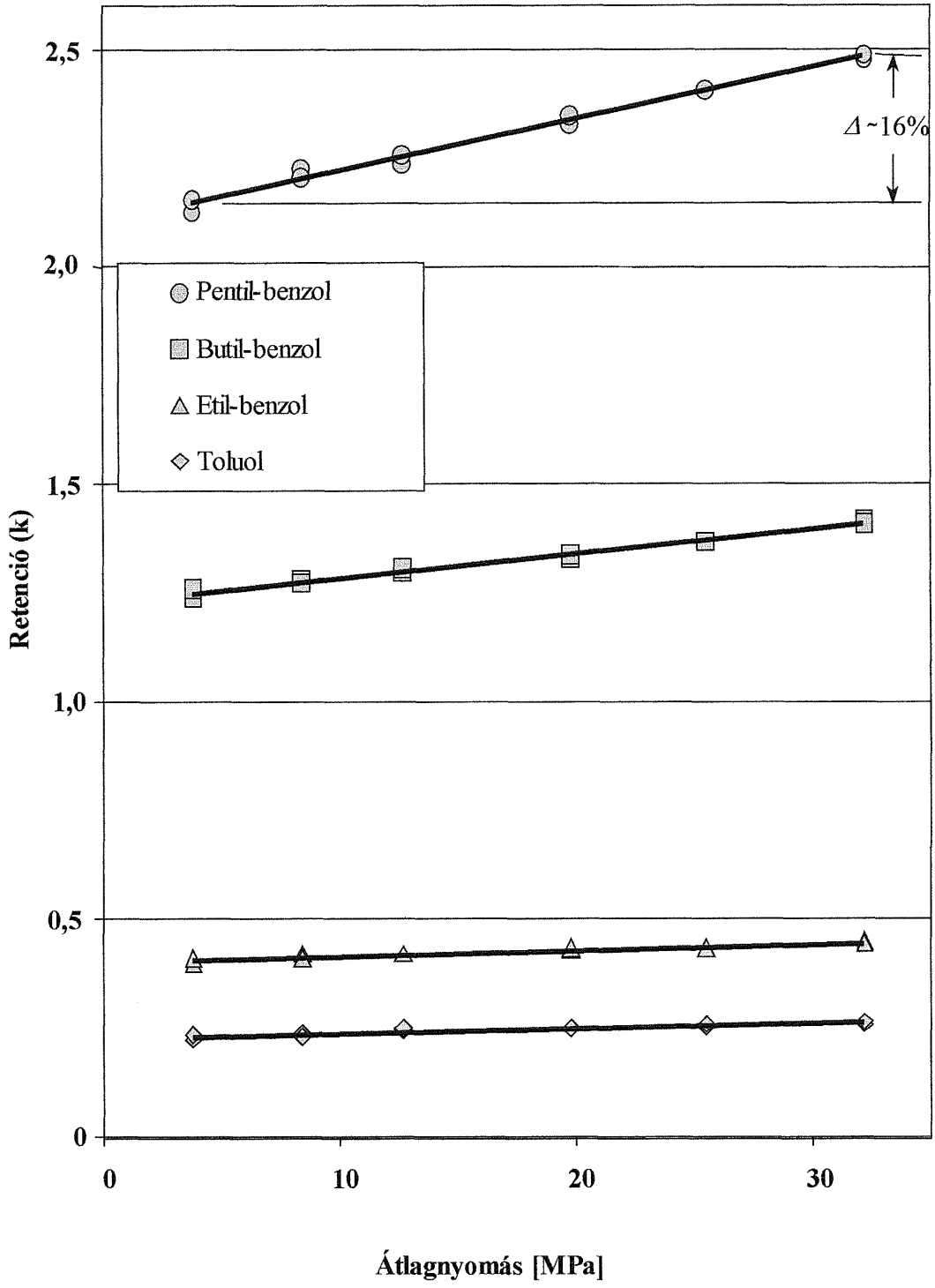
Eredményeink jó összhangban vannak az irodalomban kapilláris oszlopokon kapott eredményekkel. (A kapilláris oszlopokon akkor is lineáris nyomás-retenció összefüggést tapasztaltak, ha nyomást az áramlási sebesség emelésével fokozták. Ennek oka azzal magyarázható, hogy a néhány száz mikron átmérőjű oszlopok jól termosztálhatók, a súrlódási hő könnyen elvezethető.)

Eredményeink rámutattak arra, hogy rutin kromatográfiás körülmények között, a leggyakrabban alkalmazott 4,6 mm átmérőjű oszlopokban, szilikagél alapú töltetek esetében egy mintaanyag retenciója az alapvető hidrofób és szilanofil kölcsönhatáson kívül, jelentősen függ az oszlopban uralkodó nyomástól, a keletkező súrlódási hőtől és annak elvezetési lehetőségétől.



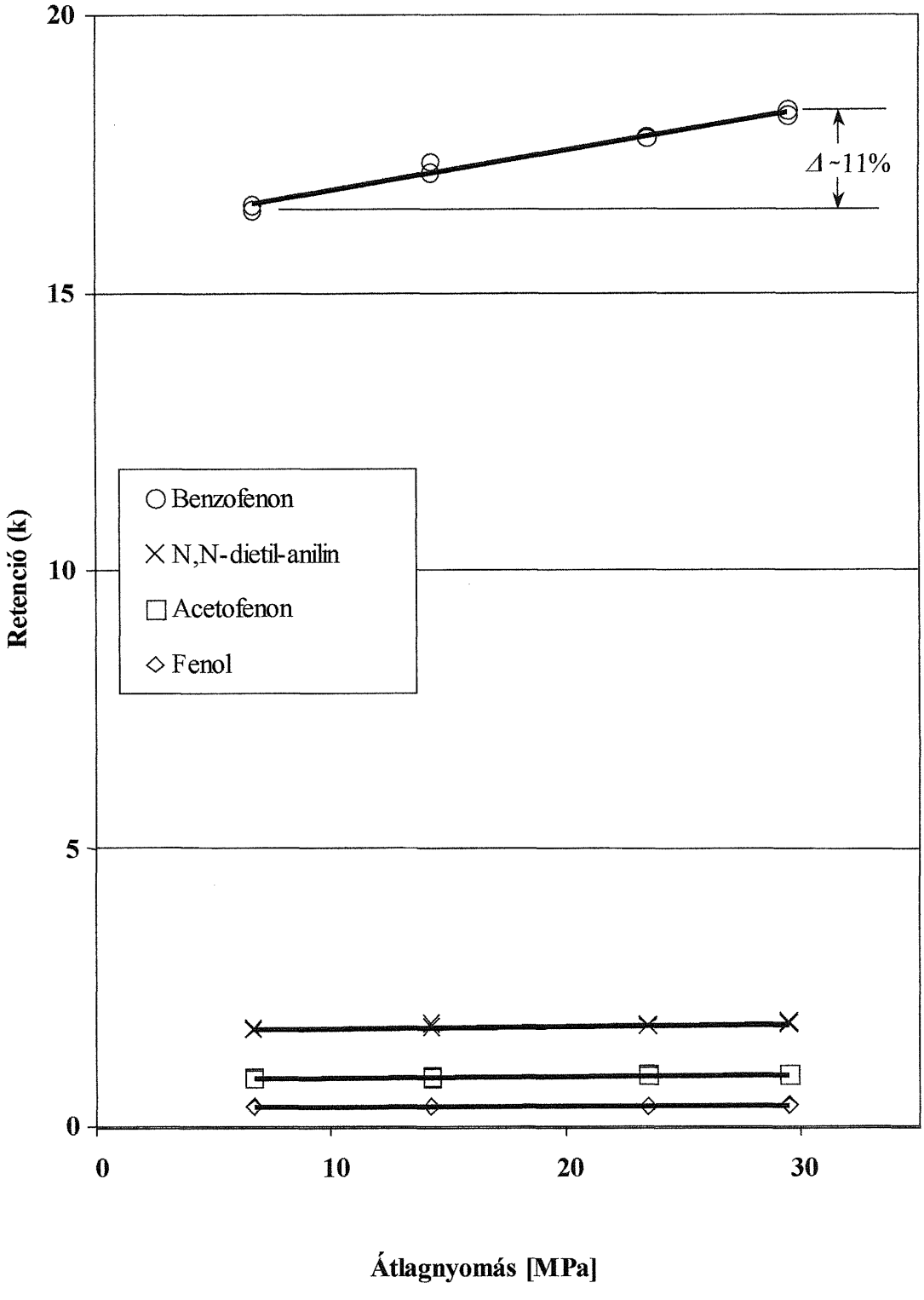
10. ábra: Alkil-benzolok retenciója 25 °C-on

(nyomás változtatása fojtószelep alkalmazásával)



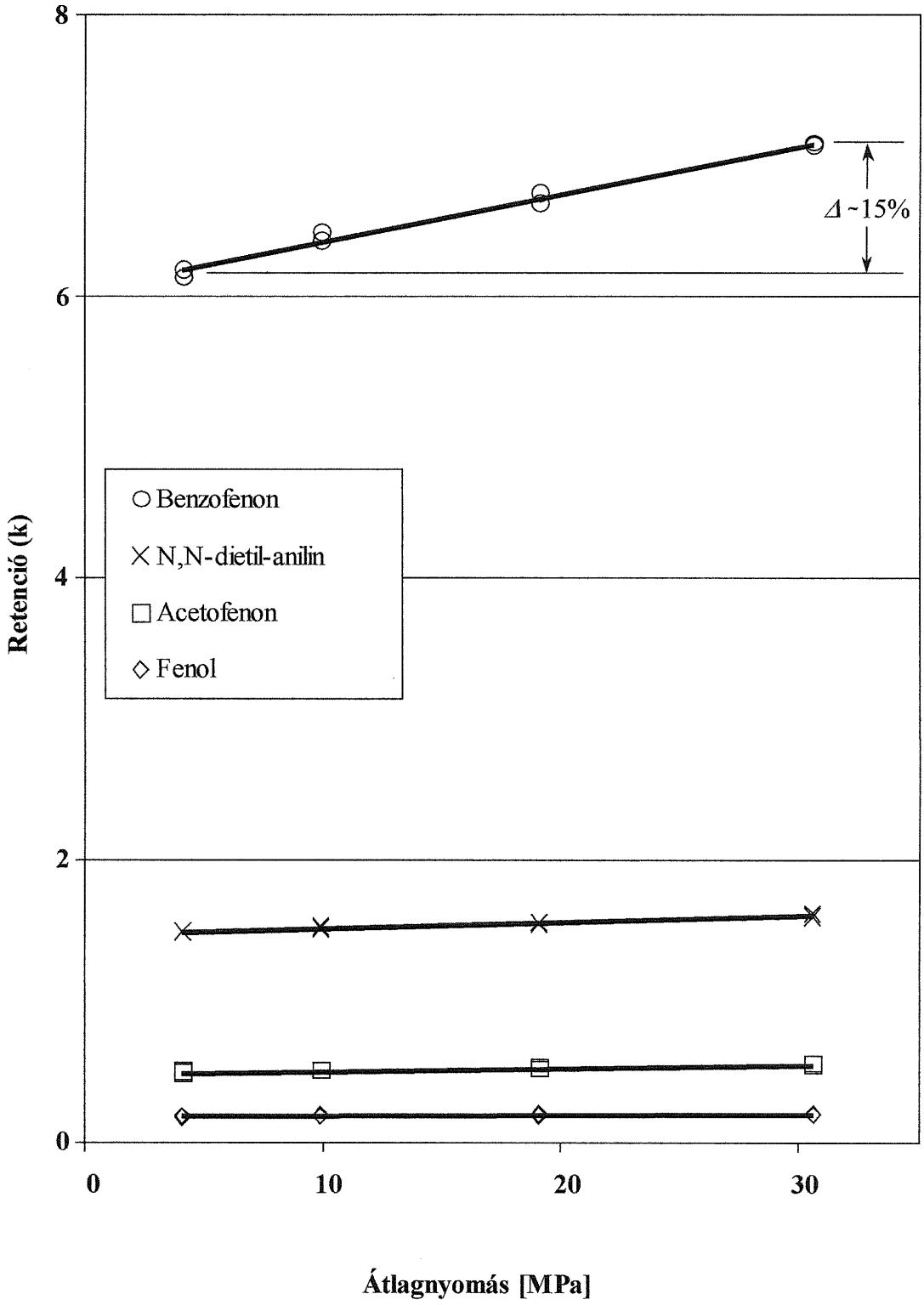
11. ábra: Alkil-benzolok retenciója 60 °C-on

(nyomás változtatása fojtószelep alkalmazásával)



12. ábra: Poláris vegyületek retenciója 25 °C-on

(nyomás változtatása fojtószelep alkalmazásával)



13. ábra: Poláris vegyületek retenciója 60 °C-on

(nyomás változtatása fojtószelep alkalmazásával)

2/b.) A nyomás hatása a mintavegyületek móltérfogatára

Elméleti összefüggés

A kromatográfiás retenciós paraméterek és a termodinamikai alapmennyiségek között az alábbi összefüggés írható le:

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln \phi k = \Delta H - T\Delta S = \Delta E + p\Delta V_m - T\Delta S$$

ahol ΔG, ΔH, ΔE és ΔS a rendszer Gibbs-féle szabad energia, entalpia, belső energia és entrópia változása, R az egyetemes gázállandó, T a hőmérséklet, K az adszorpciós egyensúlyi állandó, ϕ a fázisarány, k a retenció, p a nyomás és ΔV_m az oldott anyag parciális moláris térfogata közötti különbség az állófázison adszorbeált és nem adszorbeált (mozgó fázisban lévő) állapotban.

A fenti egyenlet átalakítása után a következő összefüggéshez juthatunk:

$$\ln k = -\frac{\Delta E}{RT} - p\frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi$$

Állandó hőmérsékleten és állandó fázisaránynál az ln k nyomás szerinti első derivált értéke:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial p} = -\frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{1}{\phi}\frac{\partial \phi}{\partial p}$$

A móltérfogat változás kifejezhető és lineáris regresszióval meghatározható:

$$\Delta V_m = -RT\frac{\partial \ln k}{\partial p}$$

Irodalmi adatok alapján [37] feltételezzük, hogy a parciális moláris térfogat lineárisan változik egy homológ soron belül. Két egymást követő homológ retenciójára felírható a következő összefüggés:

$$\alpha_{n+1,n} = \frac{k_{n+1}}{k_n}$$

Ennek figyelembevételével a móltérfogat változáshoz egy darab CH_2 csoport hozzájárulása:

$$\Delta V_{CH_2} = -RT \frac{\partial \ln \alpha_{n+1,n}}{\partial p}$$

Megfelelő pontosságú eredmények elérése érdekében a 2/a (lásd 26. oldal) kísérletet megismételtük 0,15 ml/perc áramlási sebességnél 25 °C, 45 °C és 65 °C hőmérsékleten. Így 2 és 40 MPa nyomás határ között tudtunk méréseket végezni.

Más tanulmányokhoz hasonlóan észleltük, hogy a retenció nő az átlagos nyomás növekedése során. A minták retencióját az 1. táblázatban foglaltuk össze.
Az aromás szénhidrogének és a legtöbb poláris minta retenciója (k) átlagosan 10-25 %-kal emelkedett, (tekintett nélkül az oszlop hőmérsékletére). Kivétel az N,N-dimetil-anilin, melynek retenciója 25 °C-on 11 %-ot, míg 45 °C-on már csak 4 %-ot emelkedett és 65 °C-on pedig gyakorlatilag nem változott.

A retenció kis változása azzal magyarázható, hogy a tanulmányozott mintamolekulák kicsik voltak, ezért az adszorpciónál a parciális moláris térfogatváltozás sokkal kisebb, mint a nagyobb molekulák esetében. Lineáris regresszióval (Levenberg-Marquardt-féle módszer) határoztuk meg valamennyi mintavegyület móltérfogat változását (ΔV_m). A móltérfogat –5 és –15 ml/mol között változott. A számolt paraméterek relatív standard deviációjának (RSD%) értékei szokásos illeszkedésű görbét adott. A számolt adatok értékeit a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Aromás szénhidrogének és poláris vegyületek retenciója különböző átlagnyomáson és hőmérsékleten

t=25°C								
	***p* (MPa)**	**2,7**	**6,7**	**13,6**	**20,0**	**29,6**	**39,1**	
Toluol		0,47	0,47	0,48	0,48	0,49	0,52	
Etil-benzol		0,78	0,81	0,82	0,83	0,87	0,88	
Butil-benzol		2,67	2,73	2,81	2,86	3,00	3,11	
Pentil-benzol		4,85	4,98	5,14	5,37	5,55	5,85	
t=45°C								
	***p* (MPa)**	**2,0**	**7,6**	**13,3**	**18,8**	**30,2**	**45,0**	
Toluol		0,36	0,38	0,38	0,38	0,39	0,40	
Etil-benzol		0,61	0,62	0,64	0,64	0,65	0,69	
Butil-benzol		1,89	1,96	2,00	2,03	2,16	2,20	
Pentil-benzol		3,38	3,47	3,54	3,64	3,84	4,12	
t=65°C								
	***p* (MPa)**	**1,4**	**7,2**	**11,7**	**18,7**	**26,6**	**33,7**	**39,1**	**44,4**
Etil-benzol		0,42	0,43	0,44	0,44	0,44	0,47	0,48	0,48
Butil-benzol		1,22	1,27	1,31	1,33	1,37	1,38	1,42	1,44
Pentil-benzol		2,09	2,15	2,21	2,26	2,37	2,44	2,59	2,60
t=25°C								
	***p* (MPa)**	**2,6**	**8,1**	**14,9**	**23,3**	**31,0**	**40,0**	
Fenol		0,32	0,34	0,35	0,36	0,36	0,38	
Acetofenon		0,86	0,92	1,07	0,98	0,98	0,99	
N,N-dimetil-anilin		3,04	3,06	3,19	3,30	3,31	3,38	
Benzofenon		16,70	17,20	17,45	18,07	18,51	19,31	
t=45°C								
	***p* (MPa)**	**2,1**	**8,6**	**16,9**	**24,9**	**34,1**	**39,5**	
Fenol		0,24	0,25	0,25	0,26	0,26	0,28	
Acetofenon		0,69	0,70	0,73	0,73	0,76	0,78	
N,N-dimetil-anilin		3,06	3,06	3,10	3,14	3,18	3,19	
Benzofenon		10,12	10,42	10,74	11,09	11,50	11,82	
t=65°C								
	***p* (MPa)**	**1,6**	**7,8**	**13,9**	**19,5**	**24,4**	**34,2**	**43,1**
Fenol		0,14	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,17
Acetofenon		0,48	0,48	0,49	0,50	0,50	0,53	0,56
N,N-dimetil-anilin		2,59	2,62	2,61	2,62	2,64	2,62	2,67
Benzofenon		5,65	5,85	5,94	6,05	6,19	6,50	6,70

2. táblázat: Vizsgálati eredményekből számolt adatok

	25 °C		45 °C		65 °C	
	$-\Delta V_m$ (ml/mol)	RSD (%)	$-\Delta V_m$ (ml/mol)	RSD (%)	$-\Delta V_m$ (ml/mol)	RSD (%)
Toluol	6,31	19,00	5,35	22,2	–	–
Etil-benzol	7,87	11,70	6,98	11,70	8,83	13,00
Butil-benzol	10,20	3,14	9,46	11,20	9,93	8,08
Pentil-benzol	12,50	4,00	12,20	1,67	14,70	4,90
Fenol	9,77	15,90	8,84	21,40	9,62	31,80
Acetofenon	6,87	79,90	8,35	9,84	10,50	12,70
N,N-dimetil-anilin	7,44	13,10	3,30	11,60	1,54	29,20
Benzofenon	9,22	4,40	10,70	2,74	11,50	3,74

Az 14. és 15. ábrákon a pentil-benzol és benzofenon nyomás-ln k összefüggését ábrázoltuk. A többi mintavegyület esetében hasonló összefüggést tapasztaltunk. A különböző hőmérsékleten mért összefüggések közel párhuzamos egyeneseket adnak, mutatva, hogy a móltérfogat változása a nyomás hatására mindhárom hőmérsékleten közel azonos. A relatív retenciónak a nyomásemelkedés hatására bekövetkező változásából (RT $\ln\alpha_{n+1,n}$ - P) következtetni tudunk egy $-CH_2-$ csoportnak a móltérfogat csökkenéséhez való hozzájárulására (lásd 16. ábra), ez az érték jó közelítéssel ΔV_{CH2} = 2,3 ml/mol (RSD =28 %). Az érték jól közelít *Guiochon és Sepaniak* [37] által számolt és *McGuffin és Evans* kísérleti eredményeivel [36] alátámasztott – 2,5 ml/mol értékhez.

A következő egyenletből látható, hogy a nyomás számos termodinamikai paramétertől függ:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{R}\frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln\phi$$

A 17. ábra 2 MPa és 40 MPa nyomás tartományban mutatja a pentil-benzol és benzofenon ln k-1/T megszerkesztett görbéjét. Az egyenes metszetéből, meredekségéből, valamint a felhasznált ϕ = 0,44 fázisarány értékéből tudtuk meghatározni a pentil-benzol különböző termodinamikai paramétereit 2 MPa nyomásnál: ΔH = - 17,7 kJ/mol, ΔS = - 52,6 J/(K×mol), valamint

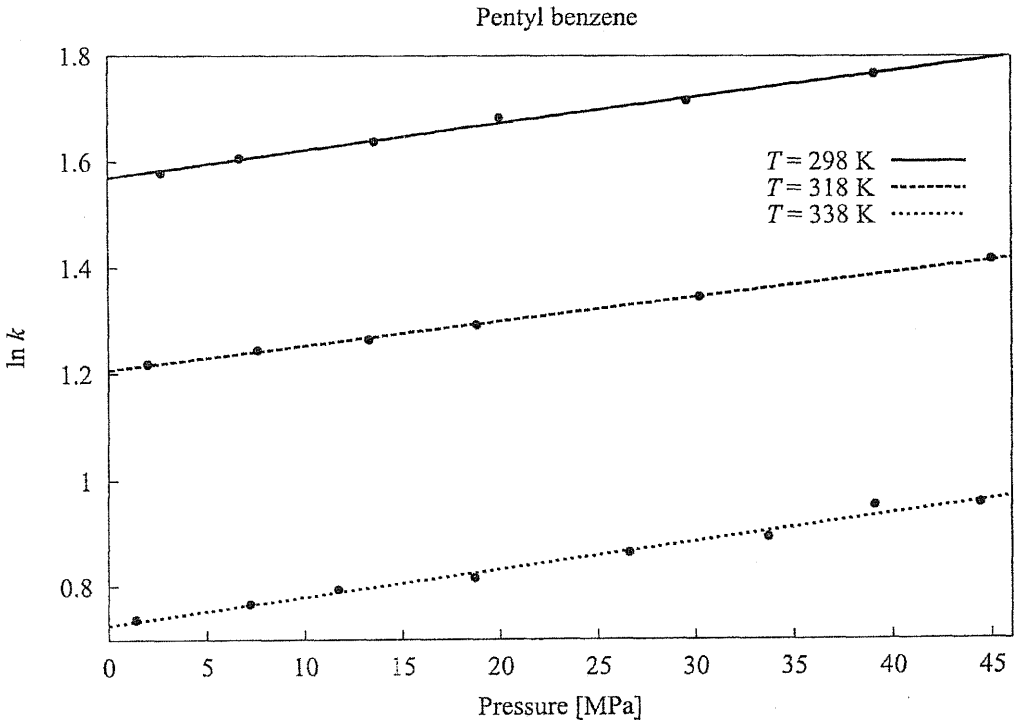
40 MPa nyomás értéknél: ΔH = - 17,4 kJ/mol, ΔS = - 50,6 J/(K×mol).

A benzofenon hasonlóan meghatározott értékei 2 MPa nyomásnál: $\Delta H = -22{,}6$ J/(K×mol), $\Delta S = -59{,}1$ J/(K×mol), valamint

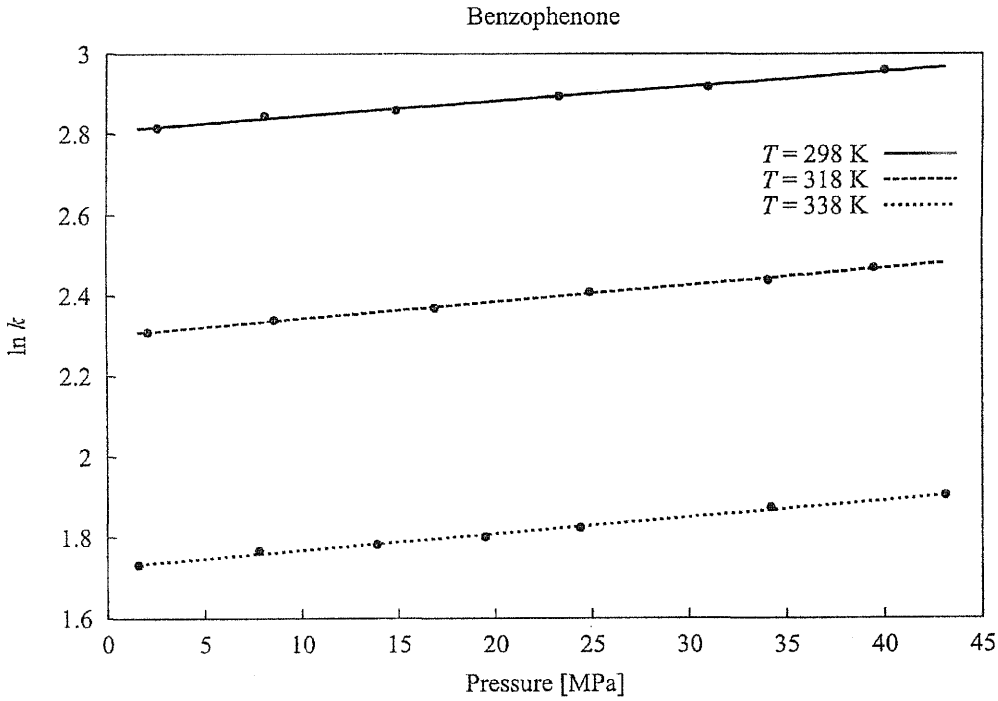
40 MPa nyomáson: $\Delta H = -22{,}3$ J/(K×mol), $\Delta S = -57{,}0$ J/(K×mol),

2 MPa-tól 40 MPa-ig terjedő nyomásváltozásnál mindkét komponens entalpia változásának különbsége $\Delta(\Delta H) = 0{,}3$ kJ/mol. A parciális moláris térfogatváltozást ($p = 38\times10^6$ N/m^2, $\Delta V_m = 10^{-5}$ m^3/mol véve alapul a kalkulált érték: $p\Delta V_m \cong 0{,}4$ kJ/mol.

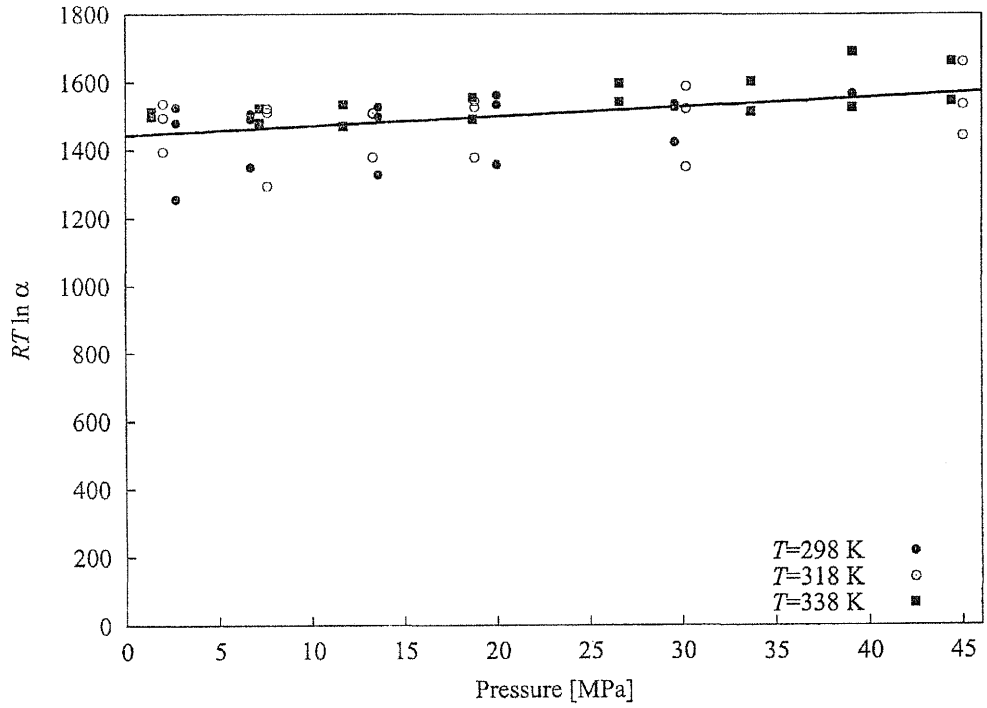
Megállapíthatjuk, hogy az entalpiaváltozás különbségét leginkább az oldott molekula adszorpciója során bekövetkező térfogatának változása okozza.



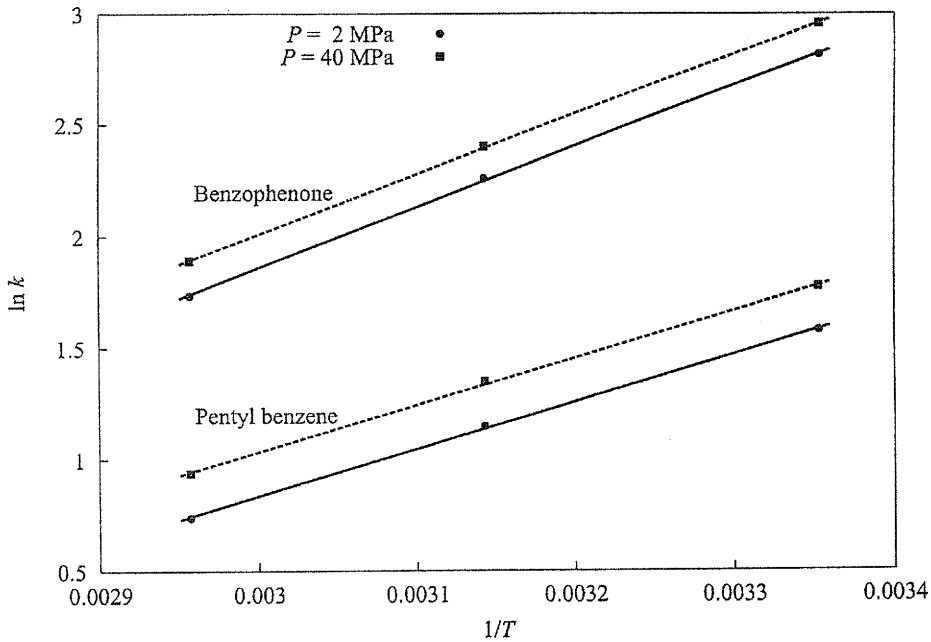
14. ábra: Pentil-benzol nyomás-ln k összefüggése



15. ábra: Benzofenon nyomás-ln k összefüggése



16. ábra: Relatív retenció-nyomás összefüggése



17. ábra: Pentil-benzol és benzofenon ln k-1/T összefüggése

4.3 Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfiás elválasztása

4.3.1 Vitaminok HPLC analízise

A helyes táplálkozás és az egészség elválaszthatatlanok egymástól. A gondosan megtervezett étrend, amely tartalmazza a szervezet számára nélkülözhetetlen vitaminokat, nagyban hozzájárul az egészség megőrzéséhez és biztosítja a jó közérzetet.

A vitaminok mindazokban a komplex kémiai folyamatokban részt vesznek, amelyek folytonosan újra és újra lejátszódnak a szervezetben. Nemcsak a jó közérzet kialakításában játszanak fontos szerepet, hanem egyesek elengedhetetlenek a test megfelelő működéséhez, az aktív és lendületes életvitelhez. Napjainkra már jól ismert tény, hogy néhány gyakori betegség (vascularis megbetegedések, diabetes, magas vérnyomás, elhízás, stb.) egymással szoros kapcsolatban vannak. Ezek kialakulásában és a betegségek továbbfejlődésében nagy jelentősége van a szervezetben előforduló antioxidáns hatású, gyökfogó (scavanger) típusú vegyületek mennyiségének. Ide tartoznak a karotinoidok, az A-vitamin (Retinol), az E-vitamin (Tokoferol) és a C-vitamin (Aszkorbinsav) is.

Ezért a vitaminok meghatározása nemcsak az élettudományok területén, hanem a mindennapi gyakorlat (gyógyászat, ipar, stb.) számára is fontos feladat.

A víz- és zsíroldékony vitaminok elemzésére a folyadékkromatográfia az egyik legelterjedtebb eljárás. Szérumból, különböző élelmiszerekből, vitaminkészítményekből egyaránt végeznek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vitamin meghatározást. A terület rendkívül kiterjedt irodalommal rendelkezik, ezért csak néhány közleményére szeretnék utalni: vízoldékony vitaminok elválasztására [53-56], zsíroldékony vitaminok elválasztására [57, 58].

4.3.2 Vízoldékony vitaminok HPLC analízise

A vízoldékony vitaminok közül a B_1-, B_2-, B_3-, B_4-, B_6-, és C-vitamin (18. ábra) gyors folyadékkromatográfiás elemzését végeztük el. Az 19. ábrán az 1,1 percen belüli analízis látható.

A vegyületeket ionpár-kromatográfia alkalmazásával választottuk el. A heptán-szulfonsav ionpárképzőt az eluensbe adagoltuk megfelelő arányban, amit előzetes vizsgálattal állapítottunk meg (vizsgáltuk az elválasztás szelektivitását az ionpárképző koncentrációjának függvényében).
Az analízist megnehezítette, hogy az elválasztás során egyidejűleg jelen voltak savas és bázikus tulajdonsággal rendelkező vegyületek. Ezért az eluensrendszer kiválasztásánál kettős optimalizálást végeztünk. A szokásos víz-acetonitril gradiens biztosította a gyors kromatográfiás elválasztást, ugyanakkor az elválasztás során a közeg kémhatását is változtattuk. Az elválasztás kezdetekor a mozgófázis gyengén savas volt (az „A" eluensbe jégecetet adagoltunk), majd az elválasztás végén az eluens kémhatása már gyengén bázikusra változott (a „B" eluenshez trietil-amint adagoltunk).
Az elválasztás szobahőmérséleten 1,1 perc alatt elvégezhető.

Ionpár-kromatográfia [102]:

A disszociációra hajlamos funkciós csoportot tartalmazó vegyületet HPLC elválasztásának egyik lehetséges módja az ioncserés kromatográfia és az ionvisszaszorítás elvén működő módszerek mellett az ionpár-kromatográfia. Alkalmas párképző reagens használatával semleges ionpárt képezünk, amivel a komponens polaritását tudjuk csökkenteni.
Az ionpárképzés analitikai alkalmazásának elméleti összefüggésének alapjai *Schill* nevéhez fűződik [59].
Az ionos vegyületek retencióváltozása elsősorban a mintaion és az adszorbens felületén adszorbeálódott párképző reagens közötti elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások eredménye. A párképzővel ellentétes töltésű ionok esetében ez azt jelenti, hogy a minta ion a reagenssel az állófázisban képez ionpárt és a kialakult ionpár hidrofób kölcsönhatással kötődik az apoláris állófázishoz. A retenciós maximum annak az eredménye, hogy az állófázis felülete telítődik a párképző reagenssel és egyre kevesebb hely marad a kialakult ionpár hidrofób kölcsönhatására a felületen. Egy bizonyos koncentráció felett már lehetőség van arra

is, hogy az eluensben a reagens „micellákat" képezzen, amely megnöveli a mintaion oldékonyságát a mozgófázisban, ami a retenció csökkenését eredményezheti [60]. A párképző reagenssel azonos töltésű ionos vegyületek retenció csökkenése ugyancsak elektrosztatikus kölcsönhatásra (taszító hatásra) vezethető vissza, a párképző felületi koncentrációjának növelésével nő a felületi töltéssűrűség, csökken a mintakomponens lehetséges adszorpciója az apoláris felületen.

Fordított fázisú ionpár-kromatográfiás elválasztást befolyásoló tényezők [102]:

1.) A párképző reagensek két fő típusba sorolhatók:
   a.) Anionos típusú párképző reagensek, amelyek a szerves bázisok kationjával képeznek ionpárt.
   b.) Kationos típusú párképző reagensek, amelyek a szerves savak anionjával képesek ionpárt képezni.

2.) A párképző reagensek koncentrációja: általánosságban elmondható, hogy ha növeljük a párképző reagens koncentrációját, ez növeli a vele ellentétes töltésű komponens retencióját. Az ionpárképző reagens koncentrációja a retenciót nem monoton növeli, hanem maximum görbén megy át, azaz egy adott reagens koncentráció felett a retenció csökken.

   A párképző reagens jelenléte a töltéssel nem rendelkező molekulák retencióját kismértékben, míg a vele azonos töltésű molekulák retencióját nagymértékben csökkenti.

3.) Az állófázis típusa és szénlánchosszúsága: mivel ionpárképzéssel a komponensek polaritása csökken, ezért célszerű apoláris állófázist választani a folyadékkromatográfiás elválasztáshoz.

4.) Eluens pH értékének hatása: az ionpár-kromatográfiás elválasztások során is nagyon fontos, hogy a mintakomponensek ionizált formában legyenek.

   A vegyületek pK-értékei segítséget adhatnak a kísérletek megtervezéséhez, de mindig figyelembe kell tartanunk, hogy az eluens szerves oldószert is tartalmaz és az oldat pH-ja, valamint a vegyületek pK-értéke nagymértékben függ a szerves oldószer típusától és koncentrációjától.

5.) Az eluensben alkalmazott szerves oldószer típusának és koncentrációjának a hatása: azonos koncentrációban alkalmazva a szerves oldószereket erősségük

mértékének megfelelően csökkentik az ionpár retencióját, mivel növekedik az ionpár oldékonysága a mozgófázisban.

Az oldószerek eltérő szelektivitása jelentős mértékben befolyásolhatja az elválasztás szelektivitását.

A szerves oldószer koncentrációjának a növelése mindig retenció csökkenést eredményez.

Az ionpár-kromatográfia esetében a szilanofil kölcsönhatás jelentősége jóval kisebb, mivel a maradék szilanol csoportokat az ionpárképző reagens molekula leárnyékolja.

6.) Ionerősség hatása: az állandó pH biztosítása miatt mindig használunk puffereket az eluensben. A puffer koncentráció befolyásolja a párképzést és a komponensek ionizáltsági állapotát. Az ionerősség hatásának vizsgálatánál figyelembe kell venni, hogy az ionpárképző reagens koncentrációjának a növelése egyúttal növeli az ionerősséget, mivel az ionpárképzés során nagyon jól disszociáló sókat alkalmazunk párképző reagensként.

7.) Hőmérséklet hatása: annak ellenére, hogy az oszlop hőmérséklete számos ionpár-képzést befolyásoló paraméterre hat, általában figyelmen kívül hagyjuk az elválasztásaink során. Az egyik oka az, hogy általában a hőmérséklet emelése a retenciót csökkenti, viszont az ionpár-kromatográfia esetében figyelembe kell venni, hogy kémiai reakció játszódik le, amely a Le-Chatelier-Braun elv értelmében okozhatja a kémiai egyensúly felső nyíl irányában való eltolódást, azaz a retenció növekedését. Nehéz azonban előre megjósolni, hogy a hőmérséklet okozta együttes hatások eredménye a retenció csökkenése, állandó értéken maradása, vagy növekedése.

Kromatográfiás analízis:

Vegyszerek:

A vízoldékony vitaminok gyógyszerkönyvi minőségűek voltak.

Az 1-heptán-szulfonsav Na-sója, a jégecet valamint a trietil-amin (TEA) Fluka és Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt. A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) cég szállította.

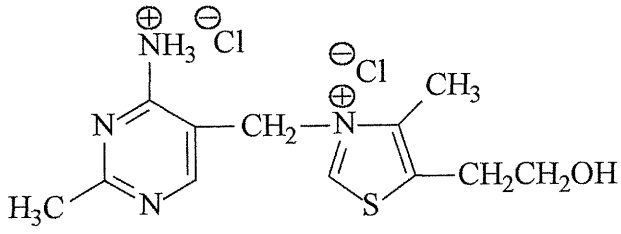
A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

Mintakoncentrációk: c≅1,0 mg/ml

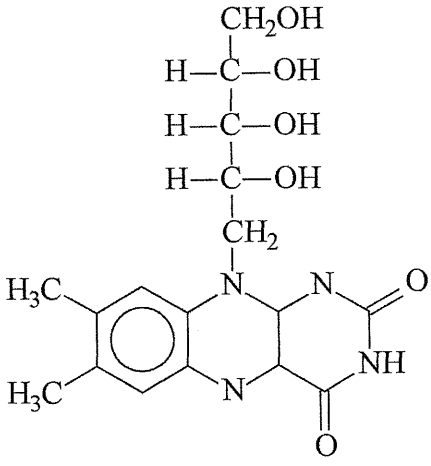
A kromatográfiás elválasztásokhoz tiszta szubsztanciákból készítettünk mintaoldatokat.

Injektált mintamennyiségek: 1,0 μl

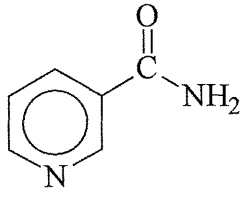
Műszerek: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt.



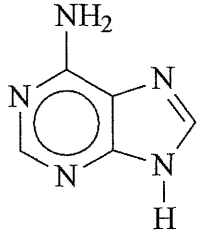
B_1-vitamin (Tiamin)



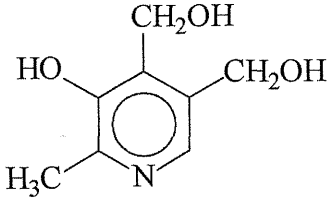
B_2-vitamin (Riboflavin)



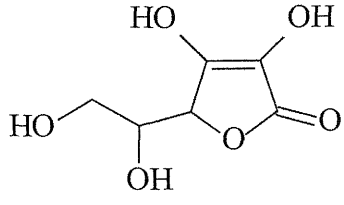
B_3-vitamin (Niacinamid)



B_4-vitamin (Adenin)

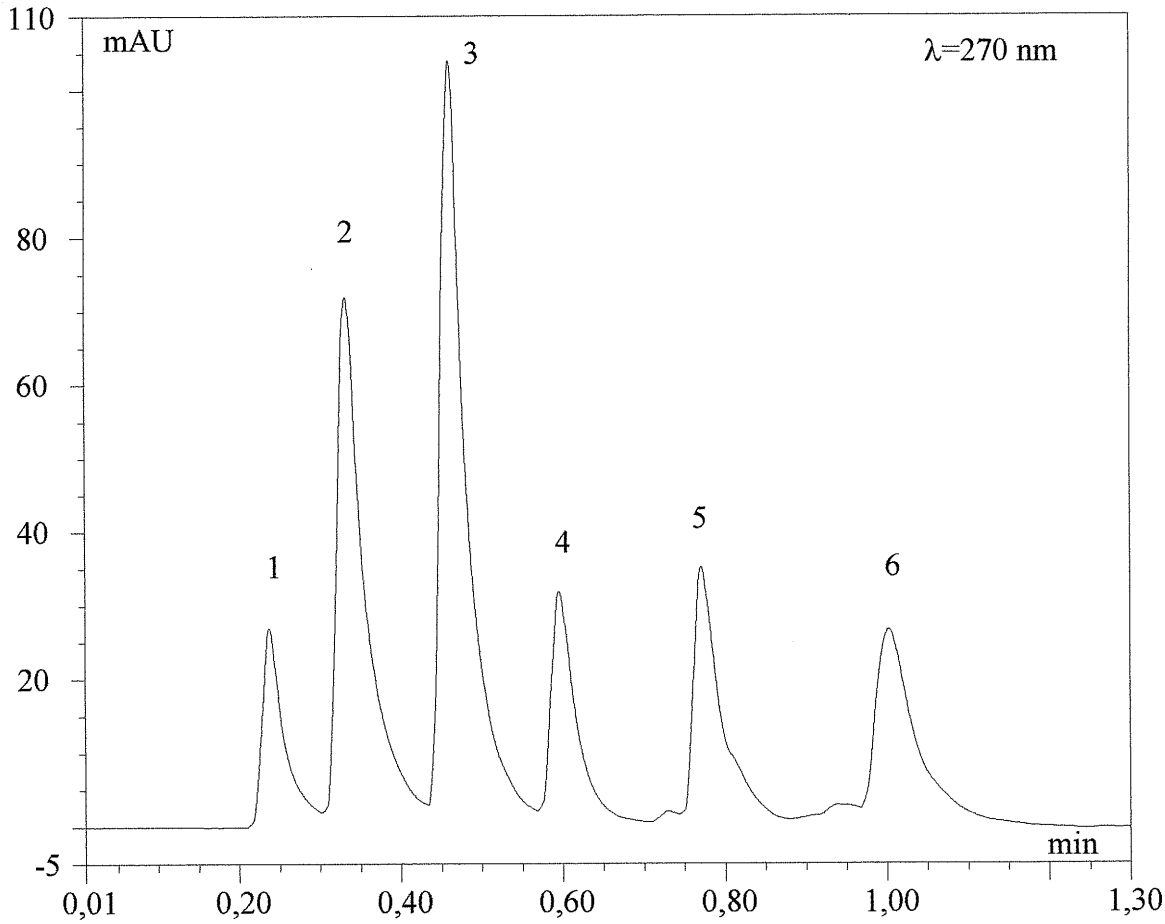


B_6-vitamin (Piridoxin)



C-vitamin (Aszkorbinsav)

18. ábra: Elválasztott vízoldékony vitaminok szerkezeti képlete



19. ábra: Vízoldékony vitaminok elválasztása

1.	C-vitamin (Aszkorbinsav)	4.	B_6-vitamin (Piridoxin)
2.	B_3-vitamin (Niacinamid)	5.	B_2-vitamin (Riboflavin)
3.	B_4-vitamin (Adenin)	6.	B_1-vitamin (Tiamin)

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 100% 2,70 mmol/l-es 1-heptán-szulfonsav nátrium sójának oldata + 0,5% jégecet

B: 100% CH_3CN + 0,3% trietil-amin

Gradiens: 0% B-ről 100% B-re 1,50 perc alatt

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 270 nm

Vízoldékony vitaminok kimutatási határának vizsgálata:

Egyes minták kimutatási határaként a gyakorlatban többféle értéket szoktak elfogadni. Kimutatási határ alatt legtöbbször ahhoz a csúcsmagassághoz tartozó anyagmennyiséget értik, mely csúcsmagasság az alapvonal zajszintjének a kétszerese. Ritkábban a háromszoros jel/zaj viszonyhoz tartozó anyagmennyiséget adják meg, viszont az így kapott mennyiség az, amely a gyakorlat szempontjából releváns, mennyiségi kiértékelésre még alkalmas. A kimutatási értékek megadásánál az utóbbit, tehát a kevésbé „optimista", azaz magasabb értéket adtuk meg.

Vizsgálataink során hangsúlyozottan rutin szempontokat tartottunk szem előtt. Ezért a mért kimutatási határokat tartalmazó 3. táblázat második oszlopában azon a hullámhosszon mért kimutatási határértékeket tüntettük fel, ahol valamennyi komponens kielégítő érzékenységgel meghatározható. (Egyszerű, nem programozható detektorral végzett analízis esete.) A következő oszlop a maximális fényelnyelés hullámhosszát, az utolsó oszlop pedig az ott mért kimutatási határértékeket tartalmazza.

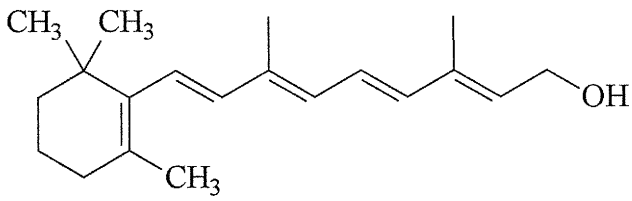
3. táblázat: Vízoldékony vitaminok kimutatási határa

	Detektálás (λ=270 nm)	Abszorpció maximum (nm)	Detektálás max.abszorpciónál
C-vitamin	1,4 picomol	248	900,0 femtomol
B_3-vitamin	1,0 picomol	262	670,0 femtomol
B_4-vitamin	160,0 femtomol	260	110,0 femtomol
B_6-vitamin	35,0 picomol	292	23,0 picomol
B_2-vitamin	160,0 femtomol	267	130,0 femtomol
B_1-vitamin	33,0 picomol	263	30,0 picomol

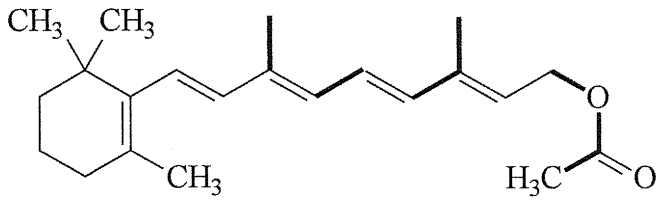
A kimutatási határ jelentős mértékben függ a kromatográfiás körülményektől, mint például a berendezés minőségétől és/vagy gradiens meredekségétől. 270 nm hullámhosszon valamennyi mintavegyület kielégítő UV abszorpciót mutat, a kimutatási határok a legtöbb esetben már femtomol (10^{-15} mol) tartományba esnek. Optimális hullámhosszon az érzékenység még tovább növelhető.

4.3.3 Zsíroldékony vitaminok HPLC analízise

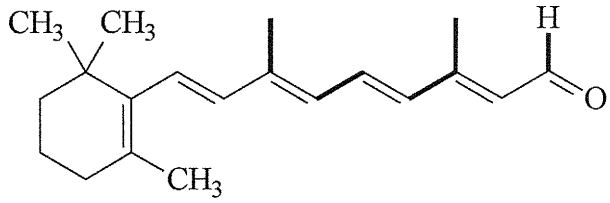
Az A-vitaminnak és származékainak (A-vitamin sav, A-vitamin aldehid, A-vitamin acetát és A-vitamin palmität), a D_3-vitaminnak, az E-vitaminnak és az E-vitamin acetátjának az emberi szervezet megfelelő működésében fontos szerepük van, valamint számos betegség kialakulását akadályozzák meg.



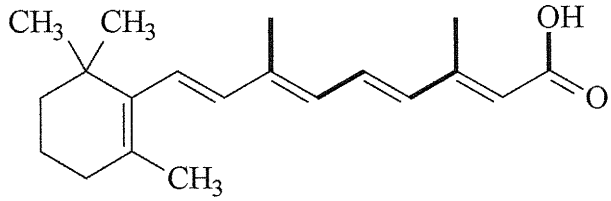
A-vitamin (Retinol)



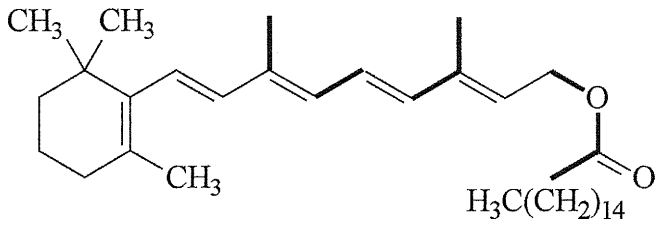
A-vitamin acetát (Retinol-acetát)



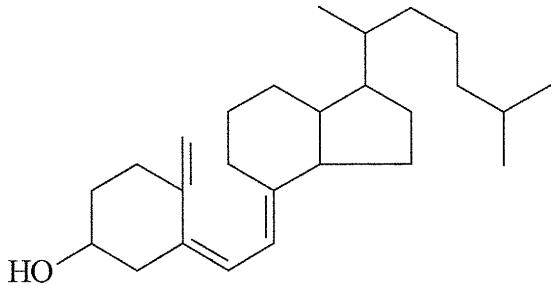
A-vitamin aldehid (Retinal)



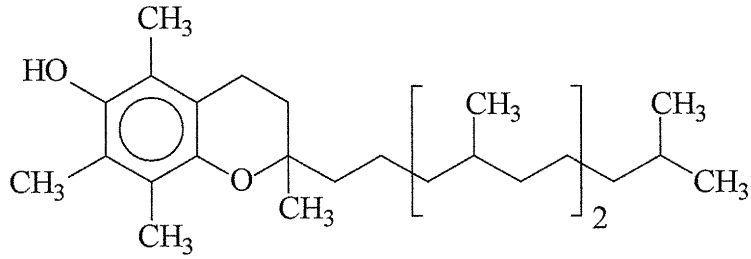
A-vitamin sav (Retinol sav)



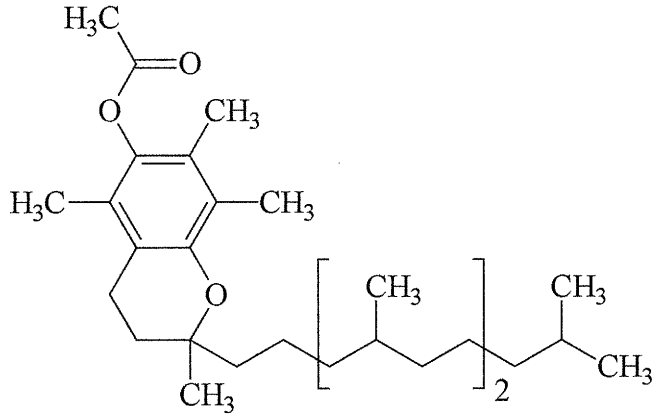
A-vitamin palmität (Retinol-palmität)



D_3-vitamin (Kolekalciferol)



E-vitamin (Tokoferol)



E-vitamin acetát (Tokoferol-acetát)

20. ábra: Zsíroldékony vitaminok szerkezeti képlete

Tapasztalataink alapján a zsíroldékony vitaminok ill. származékaik (20. ábra) elválasztásához (21. ábra) az egyszerű víz-acetonitril gradiensek alkalmazhatók. Ebben az esetben azonban az A-vitamin sav nem retardálódik, a fronttal eluálódik. Ezért, ha a minta (például metabolitként) A-vitamin savat is tartalmaz, célszerű az „A" eluenshez kevés ammónium-acetátot adagolni. A zsíroldékony vitaminok erősen hő és fényérzékenyek. Ezért a minták és a standardok tárolásánál különös gonddal kell eljárni. Hosszabb tárolásuk során a mintákat inertgáz atmoszférában, mélyhűtve lehet csak eltartani.

Kromatográfiás analízis:

Vegyszerek:

A zsíroldékony vitaminok, az ammónium-acetát Fluka és Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt.

A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) cég szállította.

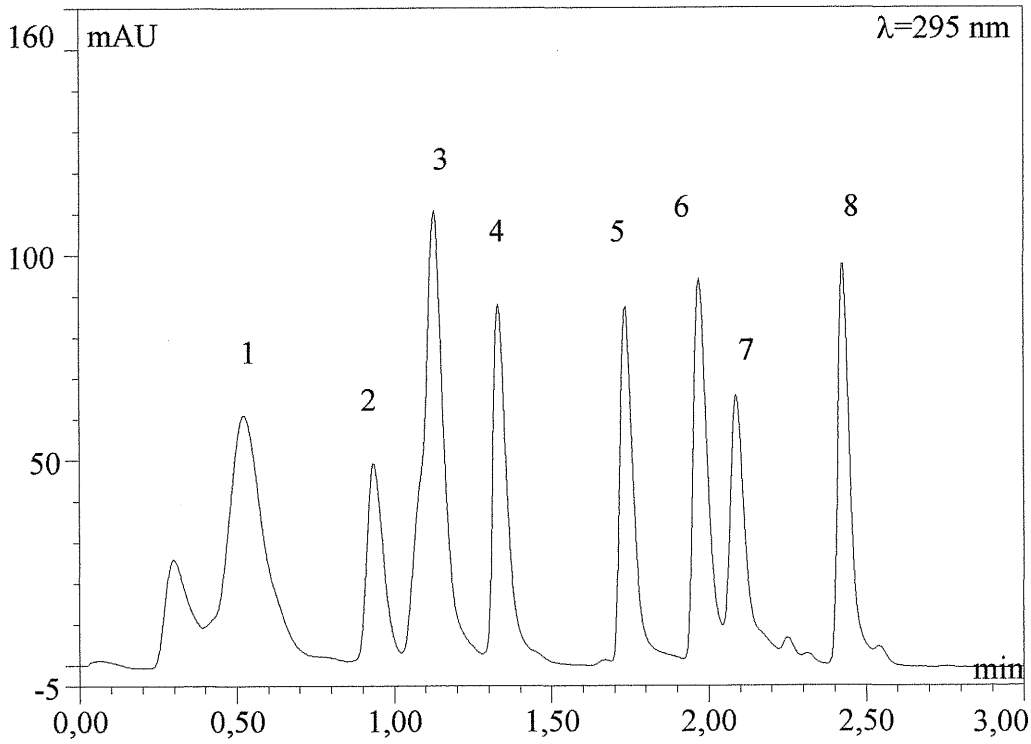
A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

Mintakoncentrációk: $c \cong 1{,}0$ mg/ml

A kromatográfiás elválasztásokhoz tiszta szubsztanciákból készítettünk mintaoldatokat.

Injektált mintamennyiségek: 1,0 μl

Műszerek: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt.



21. ábra: Zsíroldékony vitaminok elválasztása

1.	A-vitamin sav (Retinol sav)	4.	A-vitamin acetát (Retinol-acetát)
2.	A-vitamin (Retinol)	5.	D3-vitamin (Kolekalciferol)
3.	A-vitamin aldehid (Retinal)	6.	E-vitamin (Tokoferol)
7.	E-vitamin acetát (Tokoferol-acetát)	8.	A-vitamin palmitát (Retinol-palmitát)

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 20% CH_3CN + 80 % 0,05 mol/l-es ammónium-acetát oldat

B: 100% CH_3CN

Gradiens: több lépcsős gradiens

Áramlási sebesség: 1,0 ml/perc

Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 295 nm

Zsíroldékony vitaminok kimutatási határának vizsgálata:

A 4. táblázat a zsíroldékony vitaminok mért kimutatási határértékeit tartalmazza.

Az A- és E-vitaminok UV spektruma jelentősen eltér, abszorpciós maximumuk távol esik egymástól. 295 nm-en azonban mindegyik vegyületnek van abszorpciója ezen a hullámhosszon történő detektálással kielégítő érzékenység érhető el. Az abszorpciós maximumon történő méréssel az érzékenység jelentősen fokozható. Nagyon jelentős az effektus pl.: az A-vitamin acetát esetében, ahol a mérési hullámhossz 10 nm-es változtatása ötszörös érzékenység növekedést jelentett.

4. táblázat: Zsíroldékony vitaminok kimutatási határa

	Detektálás (λ=295 nm)	Abszorpció maximum (nm)	Detektálás max.abszorpciónál
A-vitamin sav	220,0 *femtomol*	351	60,0 *femtomol*
A-vitamin	80,0 *femtomol*	325	40,0 *femtomol*
A-vitamin aldehid	1,0 picomol	386	250,0 *femtomol*
A-vitamin acetát	60,0 *femtomol*	325	30,0 *femtomol*
D_3-vitamin	180,0 *femtomol*	267	40,0 *femtomol*
E-vitamin	2,0 picomol	295	2,0 picomol
E-vitamin acetát	1,1 picomol	285	190,0 *femtomol*
A-vitamin palmität	10,0 *femtomol*	327	5,0 *femtomol*

4.3.4 d,l-Norgesztrel elválasztása és kimutatási határának vizsgálata

A királis Norgesztrel racém elegyének folyadékkromatográfiás elválasztásánál figyelembe kellett venni a királis molekulák enantiomerjeire elfogadott axiómát; amely kimondja, hogy királis molekula enantiomerjei csak királis molekulával szemben mutatnak eltérő viselkedést. Ebből a megállapításból következik például az is, hogy enantiomereket csak királis „segédanyag" segítségével lehet elválasztani. (A Norgesztrel az anticoncipiens tabletták egyik gyakori komponense.)

A folyadékkromatográfiában az optikai aktivitással rendelkező izomerek elválasztásának egyik gyakran alkalmazott módszere a ciklodextrinnel képzett zárványvegyületeik analízise [65-67]. A ciklodextrinek (α, β, γ) és származékaik nagy választékban hozzáférhetők a kereskedelemben [68]. Az eluensben oldott ciklodextrin az elválasztandó anyaggal „zárvány komplexet" képez. Az elválasztandó minta optikai izomerjei különböző módon helyezkednek el a ciklodextrin molekulában, aminek következtében a két enantiomer kromatográfiás viselkedése megváltozik. A ciklodextrin zárványkomplex-képzés kromatográfiás elválasztás céljára két módon alkalmazható. Az egyik, amikor az elválasztást kémiailag kötött ciklodextrin oszlopon végzik [69]. A legtöbb esetben β-ciklodextrint és származékait kötik a szilikagél vagy egyéb hordozó felületére. A zárványkomplex-képzés másik módja, amikor a ciklodextrint az eluensbe adagolják és így a zárványkomplex a mozgófázisban keletkezik. A két elválasztási módszert élesen el kell választani egymástól, bár mindkettő a zárványkomplex kialakulásán alapul, de egészen más kromatográfiás hatást fejt ki.

Zárványkomplex képzésen alapuló kromatográfiás elválasztási módszerek [103]:

Az elválasztási módszer alapja, hogy az elválasztandó vegyületek a toroidális szerkezetű gyűrűs molekulák belső üregébe jutva a belső felülettel kölcsönhatásba lépnek „bezáródnak". Ezzel a komponensek oldékonysági tulajdonságai jelentősen megváltoznak, és a változás nagysága a kölcsönhatás erősségének a függvénye.

A zárványkomplex képzés kromatográfiás alkalmazásának két módja van, a komplexképző molekula jellegétől függően:

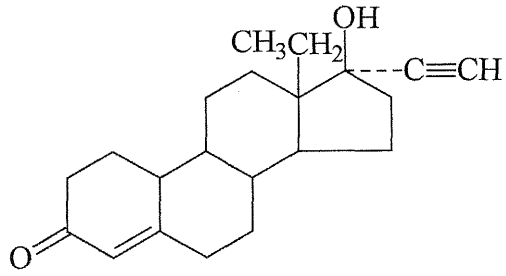
1.) Komplexképzéshez korona-étereket használnak fel, ebben az esetben a reagens külső felülete apoláris, míg a belső üreg poláris. Ez a komplexképzés a molekulát apolárisabbá teszi, mivel poláris részük reagál a belső felülettel.
A koronaéter formában történő kromatográfiás elválasztást japán kutatók alkalmazták először [61-64].

2.) Komplexképzéshez ciklodextrint használnak, amelynek a belső felülete apoláris, a külső poláris, így a molekulák polaritása megnő, mivel a molekulák hidrofób részükkel kapcsolódnak az üreg belsőfelületéhez.

Amennyiben ciklodextrin állófázison dolgozunk, a reagáló komponensek retenciója a kölcsönhatás következtében nő, és ez a retenció növekedés a polaritásukkal arányos lesz, tehát az apolárisabb komponens retenciója jobban nő, mint a polárisabbé.
Amennyiben a reagenst a mozgófázisba tesszük, a reagáló komponensek polárisabbá válnak, tehát a retenciójuk csökken és a csökkenés mértéke a hidrofób kölcsönhatás erősségének a függvénye. Ez azt jelenti, minél apolárisabb a molekula, annál erősebb komplexet képez, így annál polárisabbá válik. A fordított fázisú elválasztás szelektivitása ezért a ciklodextrin koncentráció függvénye, annak változtatásával az elúciós sorrend esetleg megfordítható.
A komplexképzési reakció sebessége kicsi, ezért a kémiailag kötött ciklodextrin oszlopokon az elválasztás hatékonysága, a kedvezőtlen csúcsalak miatt sokszor nem megfelelő. Mozgófázisban elhelyezett komplexképző esetében a reagens nagy feleslegben adható, ami kedvező a hatékonyság szempontjából és az elválasztás körülményei sokkal szabadabban változtathatók, növelve ezzel is a szelektivitási lehetőségeket. Az eljárás másik előnye, hogy „szokásos" fordított fázisú oszloppal elvégezhető a kromatográfiás elválasztás.

A *d,l*-Norgesztrel (22. ábra) analíziséhez a zárványképző reagenst a γ-ciklodextrint az eluensben oldottuk fel. A γ-ciklodextrin koncentrációját a módszeroptimálási kísérletek segítségével határoztuk meg. A 23. ábrán az optimális elválasztás látható.

A *d,l*-Norgesztrel kimutatási határa az általunk választott kromatográfiás elválasztási rendszerben 8 pikomol, melyet szobahőmérsékleten és maximális fényelnyelésnél (λ=266 nm) mértünk.



22. ábra: *d,l*-Norgesztrel szerkezeti képlete

Kromatográfiás analízis:

Vegyszerek:

A *d,l*-Norgesztrel gyógyszerkönyvi minőségű volt. A γ-ciklodextrint a budapesti Cyclolab-tól vásároltuk. A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) cég szállította. A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

Mintakoncentrációk:

c≅1,0 mg/ml

A kromatográfiás elválasztásokhoz tiszta szubsztanciából készítettünk mintaoldatokat.

Injektált mintamennyiségek: 0,5 μl

Műszerek: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt.

Kromatográfiás analízis:

Vegyszerek:

Az analgetikumok gyógyszerkönyvi minőségűek voltak.

Az 1-oktán-szulfonsav Na-sója, a foszforsav Fluka és Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt.

A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) cég szállította.

A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

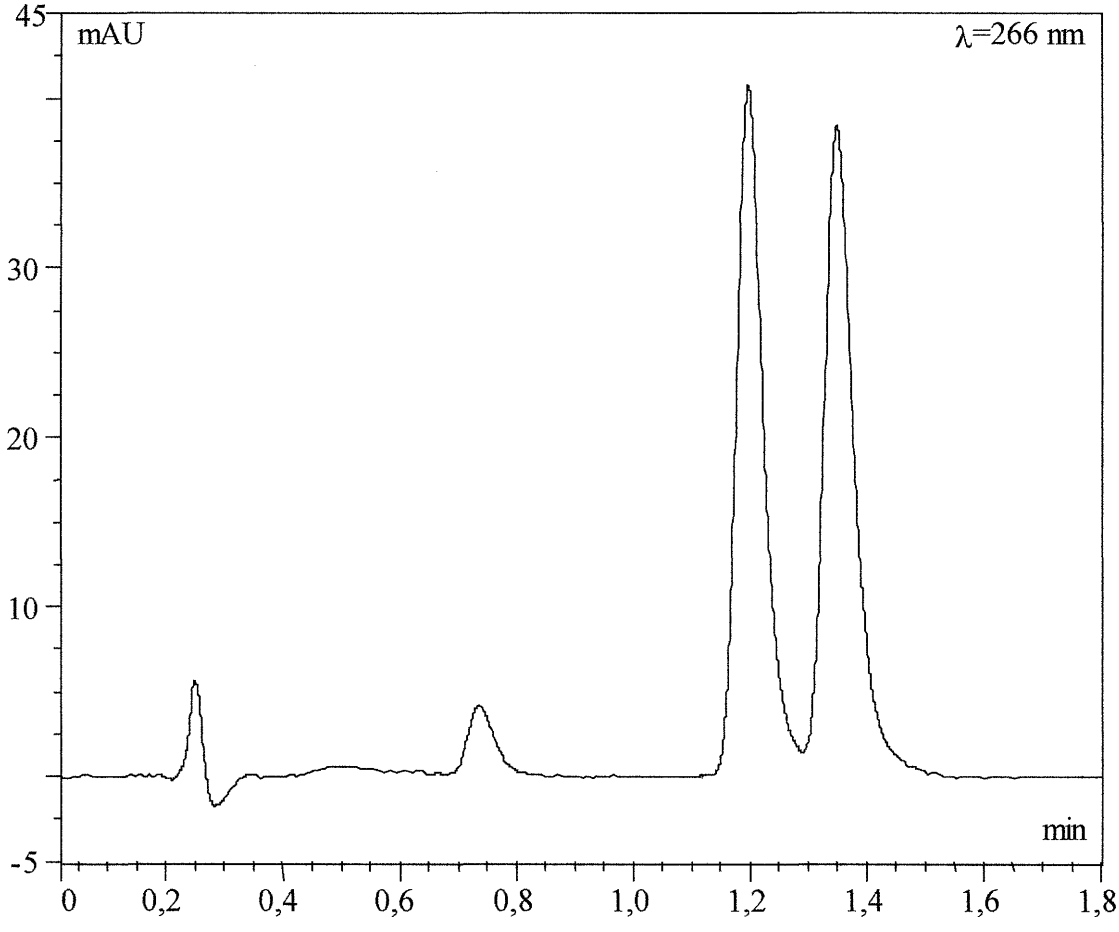
Mintakoncentrációk:

$c \cong 1{,}0$ mg/ml

A kromatográfiás elválasztásokhoz tiszta szubsztanciákból készítettünk mintaoldatokat.

Injektált mintamennyiségek: 0,5 μl

Műszerek: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt.



23. ábra: *d,l*-Norgesztrel elválasztása

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 100% 1,00 mmol/l-es γ-ciklodextrin oldat

B: 50% 1,00 mmol/l-es γ-ciklodextrin oldat + 50% CH_3CN

Gradiens: 32% B-ről 42% B-re 5,00 perc alatt

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

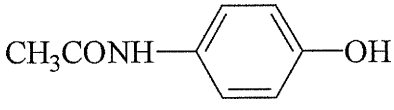
Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 266 nm

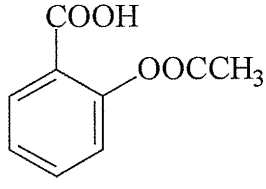
4.3.5 Analgetikumok HPLC analízise

A 24. ábrán bemutatott analgetikumból álló mintaelegyre kidolgozott elválasztási módszerünk (25. ábra) kitűnik rövid analízisidejével.

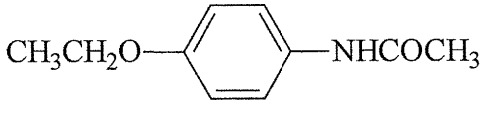
Hasonló elválasztásokkal számos irodalom foglalkozik [70-76]. Az analízis körülmények az analizálandó minták különbözősége folytán erősen eltérnek, az analízis időigénye 5-15 perc az elválasztandó komponensek számától függően.



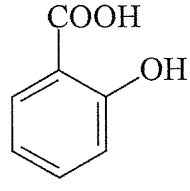
Acetamonifen



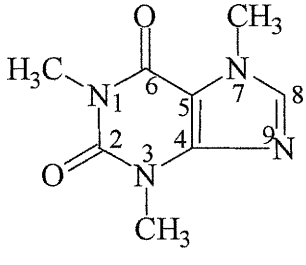
Aszpirin



Fenacetin

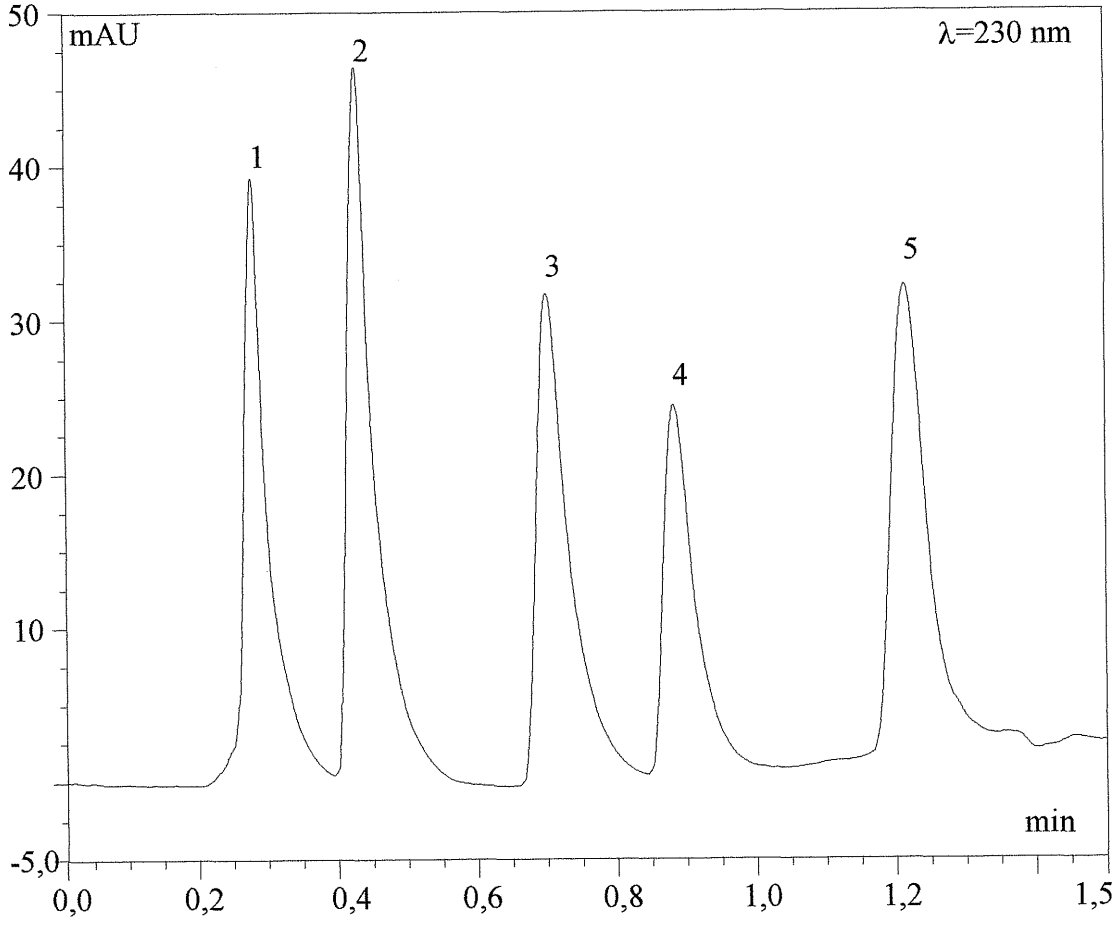


Szalicilsav



Koffein

24. ábra: Elválasztott analgetikumok szerkezeti képlete



25. ábra: Analgetikumok elválasztása

1. Acetaminofen
2. Koffein
3. Szalicilsav
4. Aszpirin
5. Fenacetin

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 99% 4,00 mmol/l-es 1-oktán-szulfonsav nátrium sójának oldata (pH=2,5; foszforsavval beállítva) + 1% CH_3CN

B: 94% 4,00 mmol/l-es 1-oktán-szulfonsav nátrium sójának oldata (pH=2,5; foszforsavval beállítva) + 6% CH_3CN

Gradiens: 35% B-ről 100% B-re 1,50 perc alatt

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 230 nm

4.3.6 Természetes aminosavak elválasztása és kimutatási határának vizsgálata

A táplálékkal felvett fehérjék az emésztés folyamatában résztvevő fehérjebontó enzimek hatására aminosavakká bomlanak le. Az aminosavak elsősorban a szervezet saját fehérjeállományának felépítésére szolgálnak, de részt vesznek a szervezet számára ugyancsak fontos egyéb anyagok (nukleinsavak, vérfestékek, egyes hormonok) szintézisében is. Ezen kívül a szervezetben lejátszódó anyagcsere folyamatok útján szénhidrátok és zsírok, ill. ezek egyes komponensei is képződhetnek aminosavakból.

A szervezet anyagcsere-folyamataiban azonban nem keletkezik a fehérjéket felépítő valamennyi aminosavnak megfelelő oxosav, ezért egyes aminosavak megszerzése szempontjából a szervezet kizárólag a táplálékkal felvett fehérjére van utalva. Az ilyen aminosavakat, melyeket a szervezet más anyagokból (pl.: szénhidrátból) nem tud szintetizálni, és éppen ezért a táplálékkal való felvételükre a szervezet normális funkciójának betöltéséhez feltétlenül szükség van, esszenciális aminosavaknak nevezzük (leucin, izoleucin, lizin, metionin, fenilalanin, reonin, triptofán és a valin). Néhányat az emberi szervezet képes ugyan előállítani (arginin, hisztidin), de a szintézis sebessége kicsi, így mennyiségük nem elégséges, főként a fejlődésben levő szervezet számára. A nélkülözhetetlen aminosavak jellege és száma fajonként, sőt az életkor szerint is változhat.

Az aminosavak nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztása során elsődleges célként az esszenciális aminosavak analízisét tűztük ki.

Meghatározásuk klasszikus módszere a *Moor és Stein* által bevezetett ioncserés aminosav elválasztás.

A HPLC elterjedésével jelentősen teret nyertek azok az eljárások, melyek viszonylag apoláris aminosav-származékok fordított fázisú kromatográfiás rendszereken történő elválasztásán alapulnak [77-84]. Bár az aminosavak fenil-tiohidantoin származékaik nem túl stabilak, mégis, jó detektálhatóságuk miatt előnyösen alkalmazhatók folyadékkromatográfiás meghatározásra UV detektálás mellett.

Míg a „klasszikus" aminosav-analizátorral (ioncserés módszerrel) a mérés időszükséglete az oszlop regenerálásával együtt 1 óra alá nem csökkenthető, addig az aminosav fenil-tiohidantoin (PTH)- származékainak fordított fázisú analízise az általunk kidolgozott módszerrel 7 perc körüli időráfordítással elvégezhető. A mérés során nagy gondot kellett fordítani az oszlop regenerálására, tekintettel arra, hogy nagyon érzékeny molekulák elválasztásáról volt szó. A *nemporózus, monodiszperz* töltetnek és a rövid oszlopnak

köszönhetően gyorsan visszaállt a kolonna egyensúlya, az elválasztás kezdeti eluens összetételére. Egy elemzés teljes időszükséglete kb. 10 perc.

Munkánk a PTH-aminosavak igen gyors analízisének kidolgozására és az azt befolyásoló tényezők vizsgálatára, valamint az elválasztás optimalizálására irányult. Az elválasztás szelektivitását a mozgófázis pH-ja és ionerőssége, az eluens minőségének és összetételének változása befolyásolja.

PTH-aminosavak elválasztására két eljárást próbáltunk ki. Egyik módszernél a pH=3,8-5,7 puffer tartalmú eluenst, míg a másiknál erősen savas (pH=2,0 körül) eluenst alkalmaztunk az elválasztásokhoz.

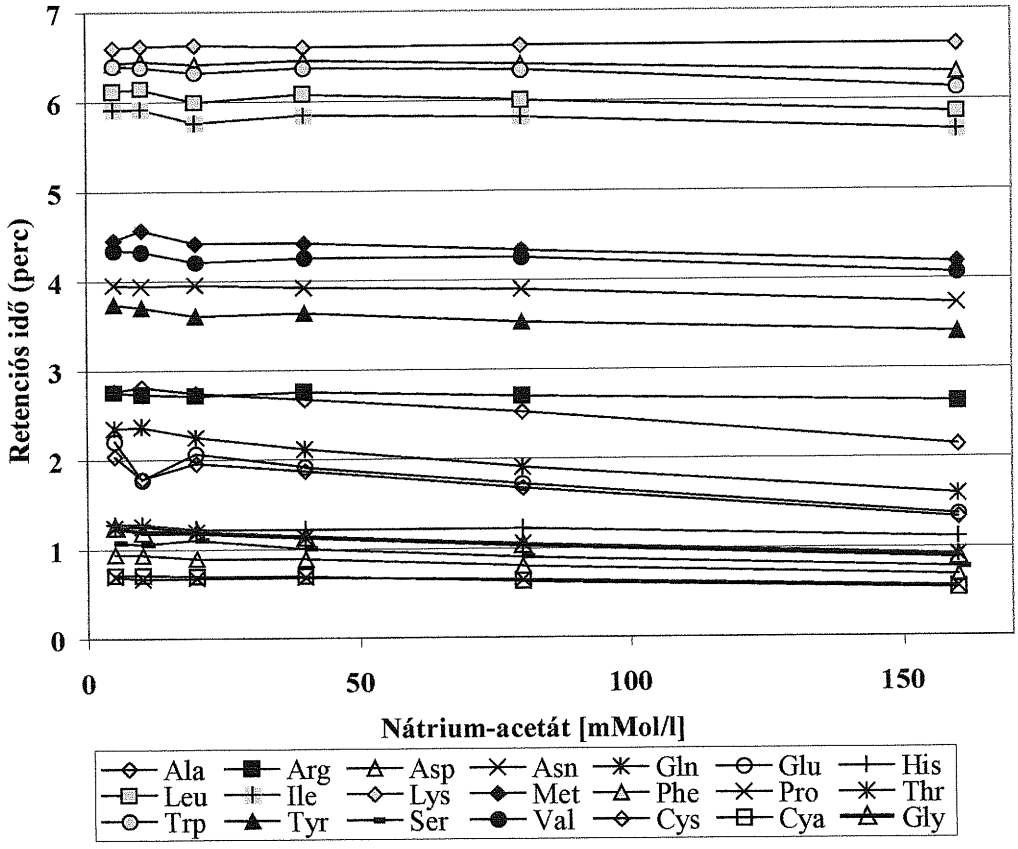
A semlegeshez közeli kémhatású közeg előnye, hogy ebben az oldott PTH-aminosavak stabilitása megfelelő. Vizsgáltuk az aminosavak retenciós idejének változását a pH (26. ábra) ill. a pufferkoncentráció (27. ábra) függvényében. A vizsgált kémhatás tartományban (pH=3,8-5,7) néhány aminosav kivételével (aszparaginsav, ciszteinsav, treonin, glicin, cisztein, és glutaminsav) a retenciók változása mérsékelt, de tekintve a sokkomponensű elegyre a legjobb szelektivitást a pH=4,5-4,9 tartományban kaptuk.

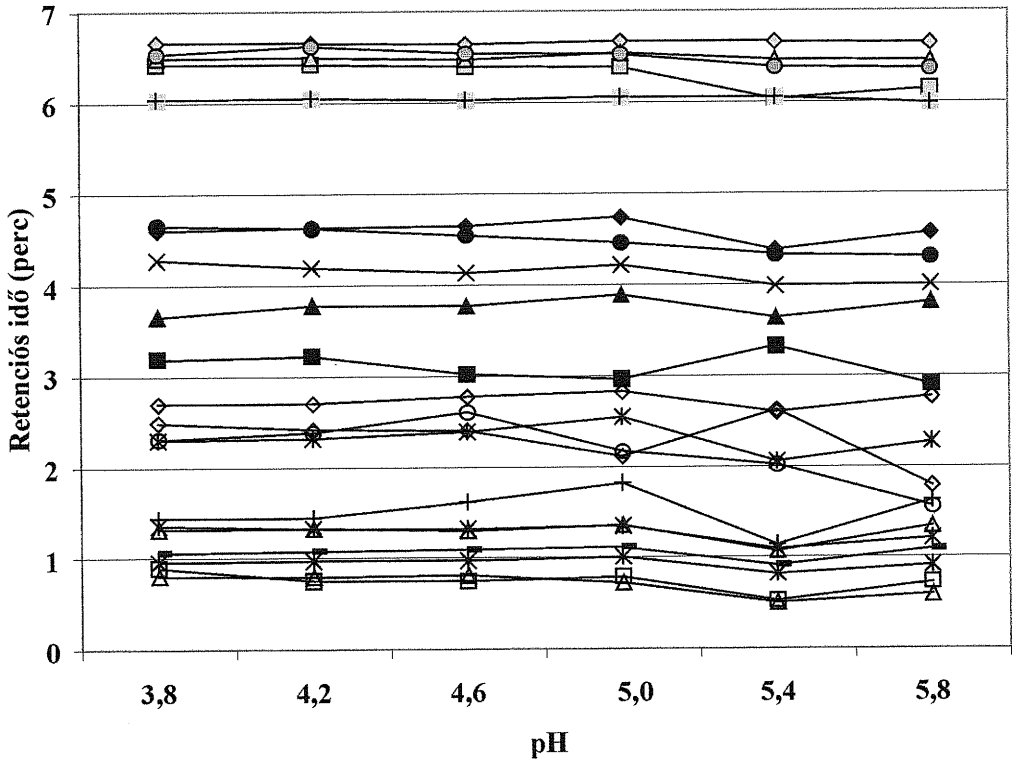
Az alkalmazott berendezéssel és állófázissal megvalósítható optimális elválasztást pH=4,8 értékű és 10,5 mmol/l koncentrációjú eluenssel tudtuk elérni (28. ábra).

Az analízis körülmények széles határok közötti változtatásával sem sikerült valamennyi aminosavat egy lépésben elválasztani. A 21 aminosavból álló keverékben vannak párok, melyek átfedő csúcsokat adtak (aszparaginsav-ciszteinsav, treonin-glicin, cisztein-glutaminsav).

Erősen savas közegben, trifluor-ecetsav tartalmú eluens alkalmazásával az érzékenység növelhető, a csúcsalakok kedvezőbbek (keskenyebb csúcsok) lettek, azonban az elválasztás még így sem volt megfelelő.

A legjobb felbontást, hepta-fluoro-vajsav (HFBA) ionpárképző segítségével lehetett elérni (29. ábra). A hepta-fluoro-vajsav jelentősen növeli a minták hidrofób tulajdonságát és ezen keresztül a retenciót. Így egy pár (glicin-treonin) kivételével valamennyi aminosavra teljes elválasztást tudtunk megvalósítani. A legjobb elválasztásokat akkor értük el, amikor az oldószererősségen kívül a hepta-fluoro-vajsav koncetrációja is folyamatosan emeltük az eluensben az analízis során. (A „B" eluensbe lényegesen több hepta-fluoro-vajsavat adagoltunk, mint az „A" eluensbe.) Ezen körülmények között vizsgáltuk a PTH-aminosavak kimutatási határát (5. táblázat) is.





26-27. ábra: Retenciós idő változása a puffer koncentráció és pH függvényében

Kromatográfiás analízis:

Vegyszerek:

A PTH-aminosavak, Na-acetát, a trifluor-ecetsav (TFA), a heptafluoro-vajsav (HFBA) valamint az ecetsav Fluka és Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt.

A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) cég szállította.

A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

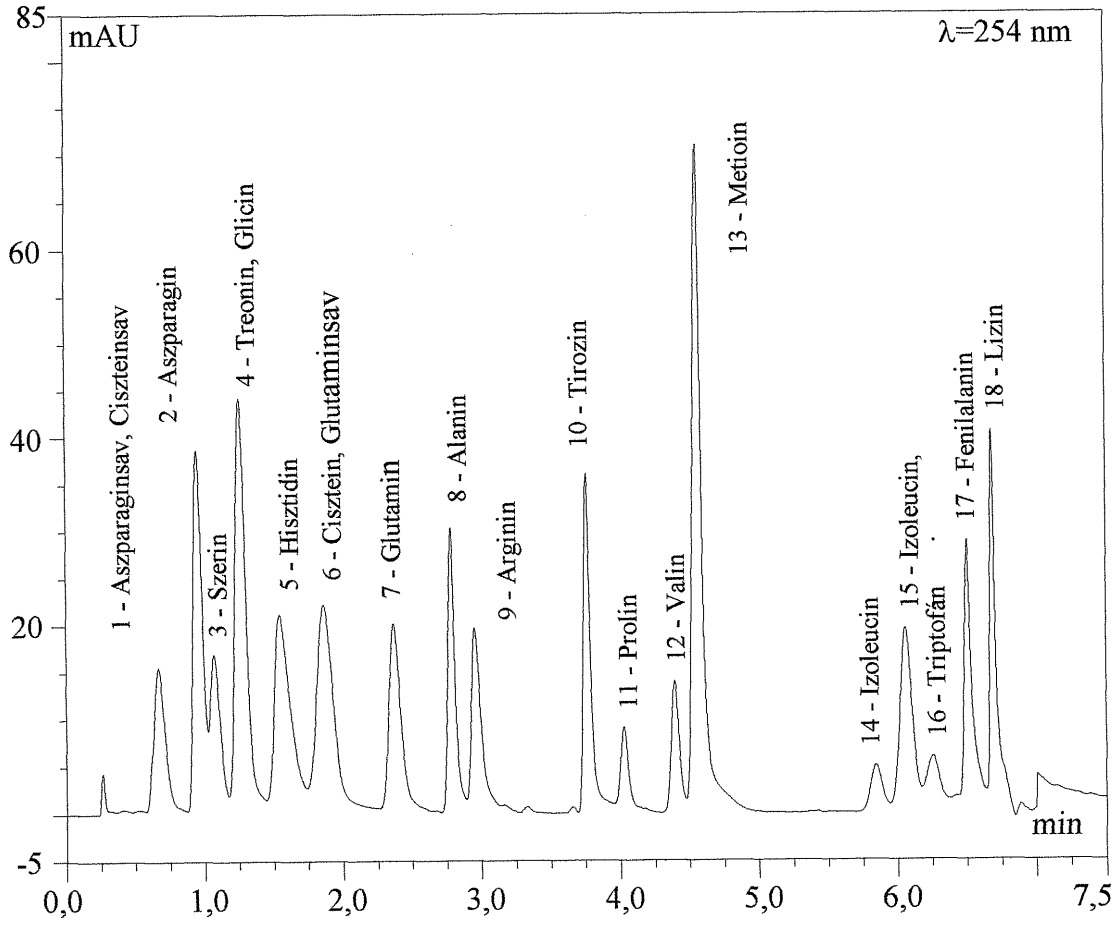
Mintakoncentrációk:

c≅1,0 mg/ml

A kromatográfiás elválasztásokhoz tiszta szubsztanciákból készítettünk mintaoldatokat.

Injektált mintamennyiségek: 0,5 μl

Műszerek: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt.



28. ábra: PTH-aminosavak elválasztása puffer tartalmú eluensben (pH=4,8)

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 100% 10,5 mmol/l-es nátrium-acetát oldat (pH=4,8; ecetsavval beállítva)

B: 100% CH_3CN

Gradiens: 0% B-n 2,00 percig

0% B-ről 10% B-re 0,01 perc alatt

10% B-ről 15% B-re 4,49 perc alatt

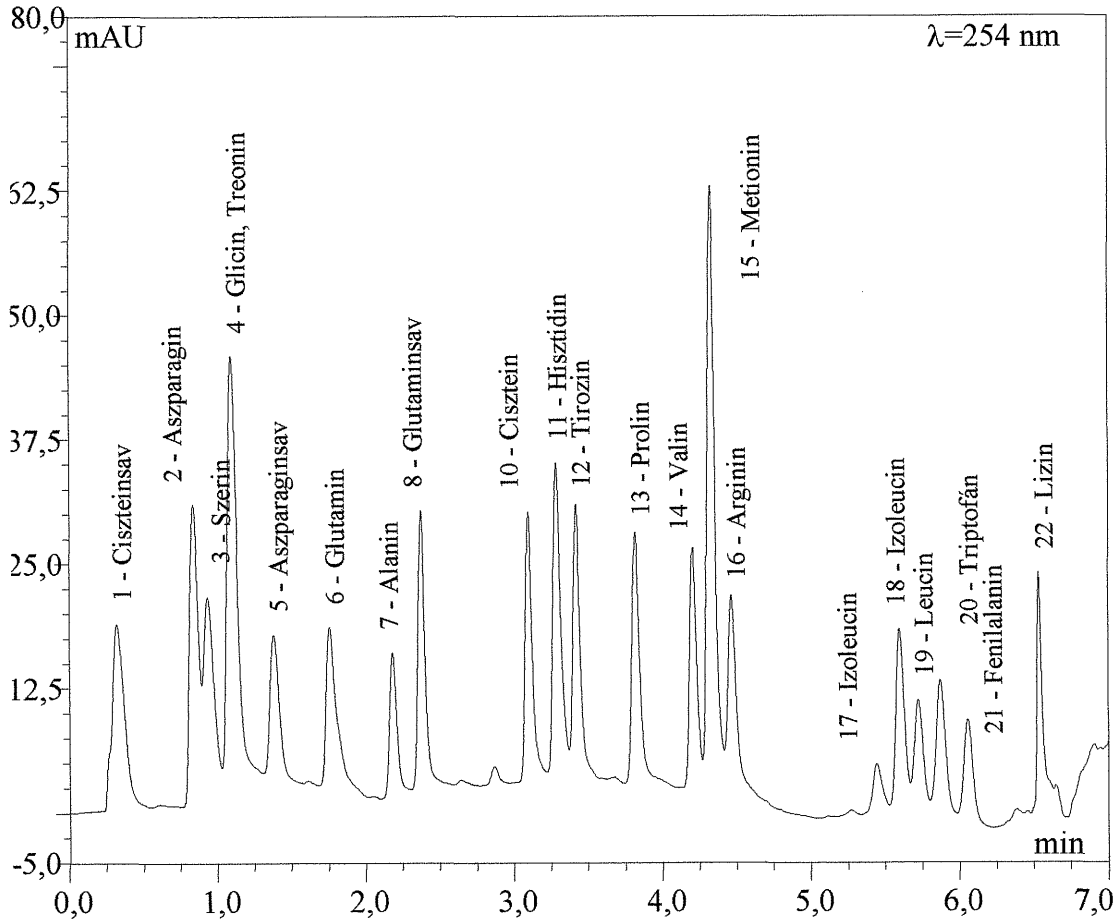
15% B-ről 100% B-re 0,10 perc alatt

100% B-n 2,00 percig

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 254 nm



29. ábra: PTH-aminosavak elválasztása hepta-fluoro-vajsavas közegben (pH≅2)

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 100% H_2O + 0,1% HFBA

B:10% H_2O + 90% CH_3CN + 0,8% HFBA

Gradiens: 0% B-ről 12% B-re 3,55 perc alatt

12% B-ről 20% B-re 3,00 perc alatt

20% B-ről 100% B-re 0,01 perc alatt

100% B-n 2,00 percig

Áramlási sebesség: 1,0 ml/perc

Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 254 nm

5. táblázat: PTH aminosavak kimutatási határa

Aminosav	Kimutatási határ [pmol]	Aminosav	Kimutatási határ [pmol]
PTH-L-alanin	0,110	PTH-L-leucin	0,110
PTH-L-arginin	0,100	PTH-(ε-PTC)-L-lizin	0,120
PTH-L-aszparagin	0,130	PTH-L-metionin	0,110
PTH-L-aszparaginsav	0,090	PTH-L-fenilalanin	0,120
PTH-L-karboximetil-L-cisztein	0,150	PTH-L-prolin	0,110
PTH-L-ciszteinsav	0,100	PTH-L-szerin	0,130
PTH-L-glutamin	0,140	PTH-L-treonin	0,110
PTH-L-glutaminsav	0,140	PTH-L-Triptopfán	0,080
PTH-L-glicin	0,150	PTH-L-tirozin	0,080
PTH-L-hisztidin	0,090	PTH-L-valin	0,170
PTH-L-izoleucin	0,120		

4.3.7 Alkaloidok elválasztása és kimutatási határának vizsgálata

Az alkaloidok elsősorban növényekben előforduló, bázisos természetes anyagok, amelyek molekulájában egy vagy több, többnyire heterociklusba beépült N-atomot tartalmaznak és gyakran élettani hatásuk van. A közös természetes eredeten kívül nem adható meg semmiféle általános jellemző az alkaloidokra.

A szakirodalomban talált definíciók közül a legjobb megfogalmazást talán *Mothes* javasolta *1950-ben* ezekre a vegyületekre:

„Az alkaloidok bázisos növényi anyagok, túlnyomórészt heterociklusba beépült amin-nitrogénnel, amelynek erős, többnyire nagyon specifikus hatása van az idegrendszer különböző területeire."

Ismeretesek olyan alkaloidok is, amelyekben a N-atom nem heterociklusban szerepel. Ilyen például: az efedrin, hordenin vagy a meszkalin.
Minthogy az alkaloidok többnyire idegmérgek, ezért az állatok szervezetében nagyobb mennyiségben nem képződhetnek. Azonban ismert néhány állati eredetű alkaloid is, mint például a szalamandraméreg, varangyméreg, adrenalin és hisztamin.
Az alkaloidok túlnyomó többsége a növényvilágból származik, ahol feltehetően a fehérje anyagcsere úgymond „hulladéktermékeként" főleg a perifériális növényrészekben: a gyökérzetben, levelekben, kéregben, vagy a termésben, sokkal ritkábban a fás részekben rakódnak le. A növényekben ritkábban fordulnak elő szabad bázis alakjában, hanem oxál-, ecet-, tej-, vagy citromsavval képeznek semleges vízoldható sókat.
Néhány magasabb rendű növénycsalád mint például a boglárkafélék, a mákfélék és csucsorfélék sok alkaloidot tartalmaznak, ezzel szemben a fészkesviráguak és az alacsonyabb rendű növények, mint például a páfrányfélék, mohafélék és moszatfélék többnyire mentesek az alkaloidoktól.
Általában egy-egy növényfaj nem csak egyetlen alkaloidot tartalmaz, hanem egymással közeli rokon alkaloidok keverékét, ezért a kinyerést követő elválasztásukra fokozott gondot kell fordítani.

Az alkaloidok bázikus tulajdonságuk miatt gyakran az állófázis el nem reagált ún. maradék szilanol csoportjai erősen kötik (kemiszorbeálják) a bázikus mintákat és ez elnyúló (tailinges) csúcsok kialakulásához vezet, főleg a nagyobb retenciójú komponensek esetében. Ezért például a mák alkaloidok vizsgálatánál gyakran csak 4, sőt egyes esetekben csak 2 fő alkaloid mérésével kénytelenek megelégedni (brucin a meghatározásoknál szokásos belső standard) [85-87]. KOVASIL-C_{14} állófázisunkra két különböző hőmérsékletre dolgoztam ki optimális elválasztást (31-32. ábra).

Szobahőmérsékleten a 7 komponensű tesztelegy (a 30. ábrán a vegyületek szerkezeti képlete látható) elválasztásához kb. 1,3 perc szükséges.

Az 50 °C-on végzett analízis jelentős analízis idő csökkenést eredményezett, az elválasztás 0,9 perc alatt elvégezhető és az elválasztás érzékenysége is lényegesen javult.

Kromatográfiás analízis:

Vegyszerek:

Az alkaloidok és a trifluor-ecetsav (TFA) Fluka és Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt.

A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) cég szállította.

A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

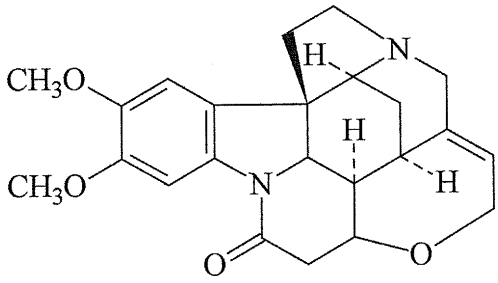
Mintakoncentrációk:

$c \cong 1{,}0$ mg/ml

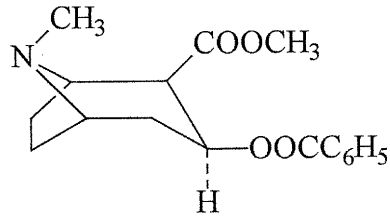
A kromatográfiás elválasztásokhoz tiszta szubsztanciákból készítettünk mintaoldatokat.

Injektált mintamennyiségek: 0,5-1,5 μl

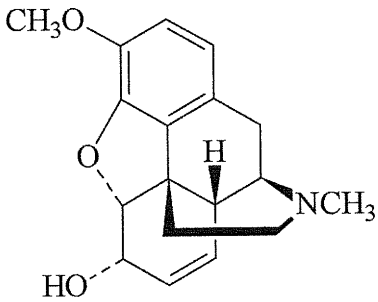
Műszerek: A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt. A kolonna állandó hőmérsékletét egy vízköpeny biztosította, melynek hőmérsékletét Grant W6 cirkulációs termosztáttal (Grant Instruments, Cambridge, Anglia) szabályoztuk. A vízköpeny az oszlopon kívül az injektor-kolonna összekötő kapilláris kb. 20 cm-ét is temperálta.



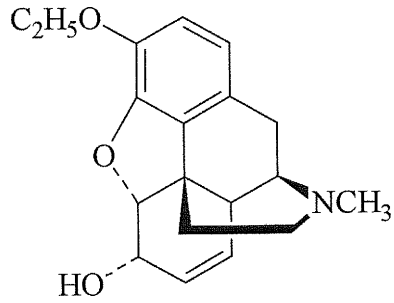
Brucin



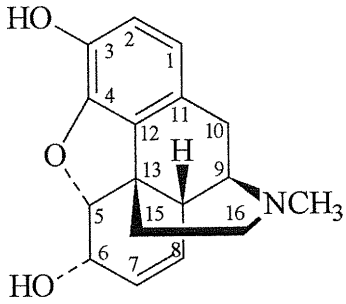
Kokain



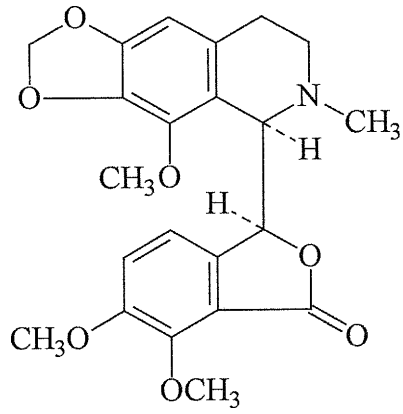
Kodein



Etil-morfin

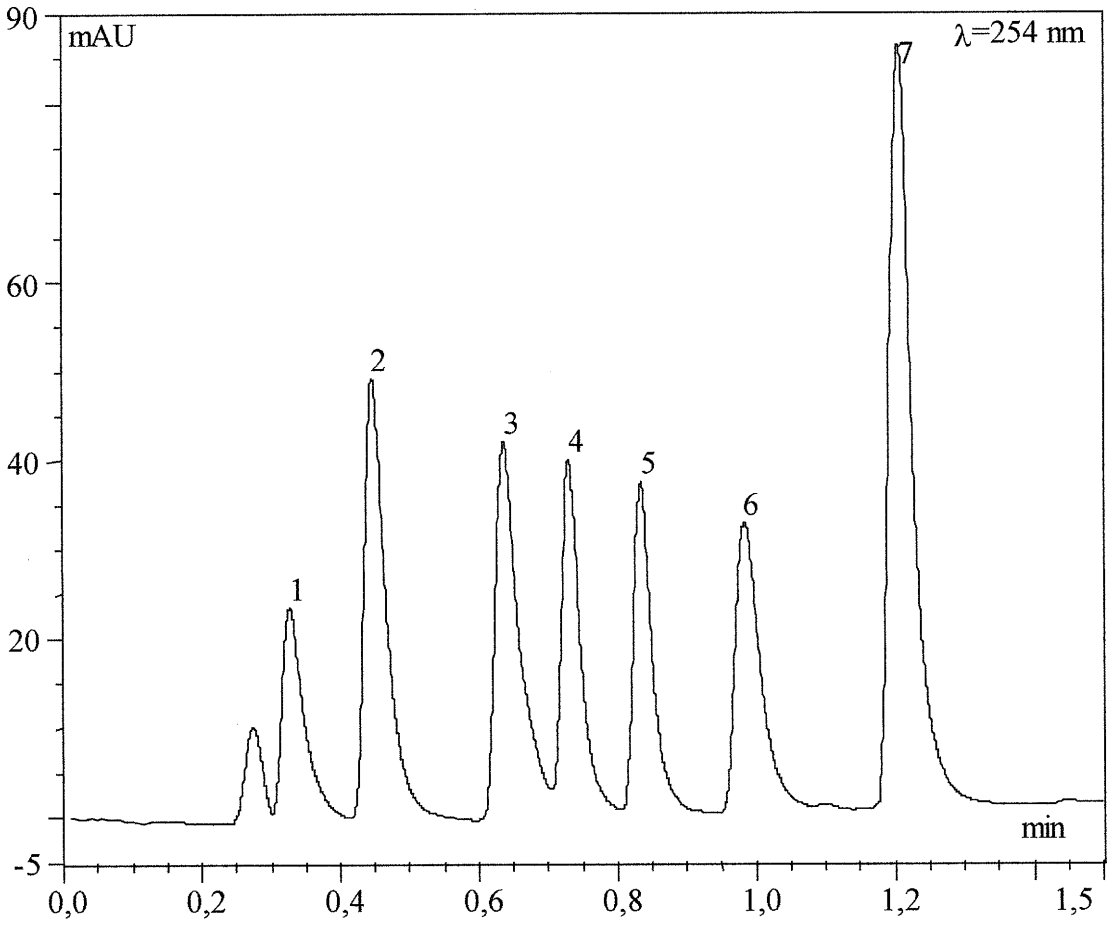


Morfin



Narkotin

30. ábra: Elválasztott alkaloidok szerkezeti képlete



31. ábra: Alkaloid standardok elválasztása szobahőmérsékleten

1.	Morfin	5.	α-metil-morfin
2.	Kodein	6.	Kokain
3.	Etil-morfin	7.	Narkotin
4.	(Brucin)		

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 100% H_2O + 0,15% TFA

B: 30% CH_3CN + 70% H_2O + 0,15% TFA

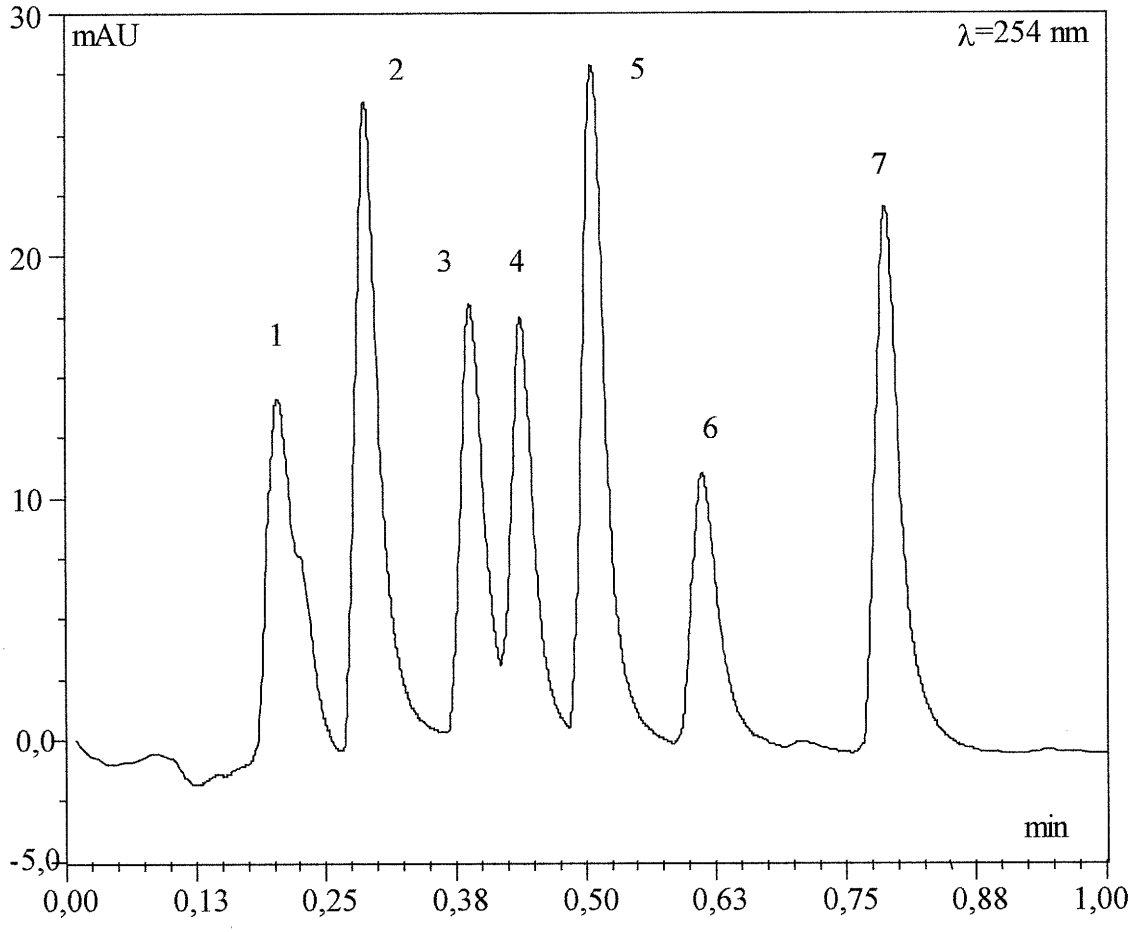
Gradiens: 13% B-ről 23% B-re 0,20 perc alatt

23% B-ről 100% B-re 2,00 perc alatt

Áramlási sebesség: 1,0 ml/perc

Analízis hőmérséklet: szobahőmérséklet

Detektálás: 254 nm



32. ábra: Alkaloid standardok elválasztása 50 °C-on

1. Morfin
2. Kodein
3. Etil-morfin
4. (Brucin)
5. α-metil-morfin
6. Kokain
7. Narkotin

Analízis körülmények:

Oszlop: KOVASIL-C_{14}

Eluens: A: 100% H_2O + 0,15% TFA

B: 30% CH_3CN + 70% H_2O + 0,15% TFA

Gradiens: 5% B-ről 100% B-re 2,05 perc alatt

Áramlási sebesség: 1,4 ml/perc

Analízis hőmérséklet: 50 °C

Detektálás: 254 nm

Alkaloidok kimutatási határának vizsgálata:

Az egyes komponensekre jellemző kimutatási határokat (6. táblázat) mind a két hőmérsékleten elvégeztük. Az alkaloidok magas extinciós koefficiense miatt kedvező kimutatási határok elérésére számítottunk. A vizsgált hét alkaloid kimutatási határa a *femtomol* (10^{-15} mol) tartományba esett.

A kapott eredmények tanulmányozása során arra a következtetésre jutottunk, hogy magasabb analízis hőmérsékleten nőtt az elválasztási rendszer érzékenysége és lényegesen javultak a kimutatási határértékek is. Több esetben az érzékenység közel ötszörös növekedését kaptunk. Ez a rövidebb retenciós idővel magyarázható, ugyanakkor az analízis hőmérséklet emelésével a csúcs szimmetria javulását is tapasztaltuk. Megfigyelhető volt, hogy a detektor zajszintje a kolonnatér hőmérséklet emelésével csökken (kb. 50 %-ban).

6. táblázat: Alkaloidok kimutatási határának vizsgálata

Alkaloid	Analízis hőmérséklet	
	25 °C	50 °C
Morfin	45,3 femtomol	5,3 femtomol
Kodein	9,3 femtomol	0,7 femtomol
Etil-morfin	18,7 femtomol	4,3 femtomol
Brucin	7,0 femtomol	0,4 femtomol
α-metil-morfin	20,3 femtomol	4,0 femtomol
Kokain	9,3 femtomol	0,9 femtomol
Narkotin	7,0 femtomol	0,6 femtomol

4.3.8 Ópium alkaloidok elválasztása és kimutatási határának vizsgálata

Ópium alkaloidok elválasztását és mennyiségi meghatározását legeredményesebben fordított fázisú (RP) és nagyérzékenységű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel végzik, porózus állófázis alkalmazása mellett [87-100]. A nyers ópium és a „mák szalma" kromatográfiás analízise során a kísérő anyagok interferálhatnak a meghatározni kívánt ópium alkaloiddal [91, 94, 101] és ezért legalább két fő alkaloid meghatározása bizonytalan [90, 93]. A későn eluálódó komponensek csúcsalakja széles [91, 92, 93], és ezek a problémák együttesen kihatnak az alkaloidok pontos meghatározására. Ezért gyakran a mák alkaloidok folyadékkromatográfiás vizsgálatánál csak négy, sőt egyes esetekben csak két fő alkaloid mérésével kénytelenek megelégedni [85-87].

A mákgubó extraktumok mennyiségi és minőségi meghatározása során kapott eredményekből következtetni lehet a növény eredetére, ill. a termesztési helyére.

A fő ópium alkaloidok (morfin, kodein, tebain, papaverin, és noszkapin) elválasztására egy új fordított fázisú HPLC módszert fejlesztettünk ki, *nemporózus, monodiszperz* állófázis alkalmazásával. A mennyiségi meghatározáshoz belső standardként brucint (internal standard) alkalmaztunk. A gradiens elúciós technika alkalmazásával a növényi extraktum analízisét 1,5 perc alatt tudtuk elvégezni.

Kísérleti rész

Vegyszerek: morfin, kodein, papaverin hidroklorid,brucin és az Extrelut® szilárd fázisú minta előkészítő oszlop Merck (Darmstadt, NSZK), a narkotin és a thebain Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt. A különböző helyről származó ópium mintákat az UNDCP (United Nations Drug-Control Program, Bécs) bocsátotta számunkra. A többi általános nagytisztaságú és jó minőségű vegyszert, kereskedelmi forgalomból szereztük be a kísérletekhez.

Standard oldatok készítése:

Metanolos, különböző anyagmennyiségeket tartalmazó törzsoldatokat készítettünk:

Ópium alkaloid	Törzsoldat koncentráció [mg/ml]
Morfin	5,0
Narkotin	5,0
Kodein	1,0
Thebain	1,0
Papaverin	1,0
Brucin	1,0

Minta előkészítés: A nyers ópium mintához hozzáadtuk a brucin törzsoldatot és ezután kétszer 2,5 v/v %-os ecetsav oldattal extraháltuk. Az extrakció után pH=9,0-ra állítottuk be az extraktum kémhatását, majd az így kapott mintaoldatot egy szilárd fázisú minta előkészítésnek vetettük alá az Extrelut® minta előkészítő oszlop alkalmazásával. A minta előkészítő oszlopra felvitt alkaloidokat 60 ml diklórmetán:izopropanol=9:1 eleggyel eluáltuk az oszlopról, majd szárazra pároltuk rotadeszt alkalmazásával.

Az így kapott extraktumot 15 ml acetonitril:víz:HFBA = 60:40:0,8 elegyben oldottuk, majd felhígítottuk 30 ml-re 0,1 % vizes HFBA oldattal. A mintaoldatot 0,45 μm-es Millipore szűrőn leszűrtük és a kész oldatból 3 μl-t injektáltunk.

Analízis körülmények:

Készülék: Perkin-Elmer HPLC 200

Detektor: Perkin-Elmer LC-235 diódasoros

Szoftver: Turbochrom

Oszlop: Kovasil MS-C18, 33×4,6 mm, d_p=1,5 μm, (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Svájc)

Eluens: A: 100 % H_2O + 0,1 % HFBA

B: B: 60% CH_3CN + 40% H_2O + 0,8% HFBA

Áramlási sebesség: 1,0 ml/perc

Analízis hőmérséklet: 50 °C

Detektálás: 255 nm

Gradiens profil:

Idő (perc)	B%
0	15
0,3	29
1,9	38
2,4	38
2,6	100
3,4	100
3,6	15
7,0	15

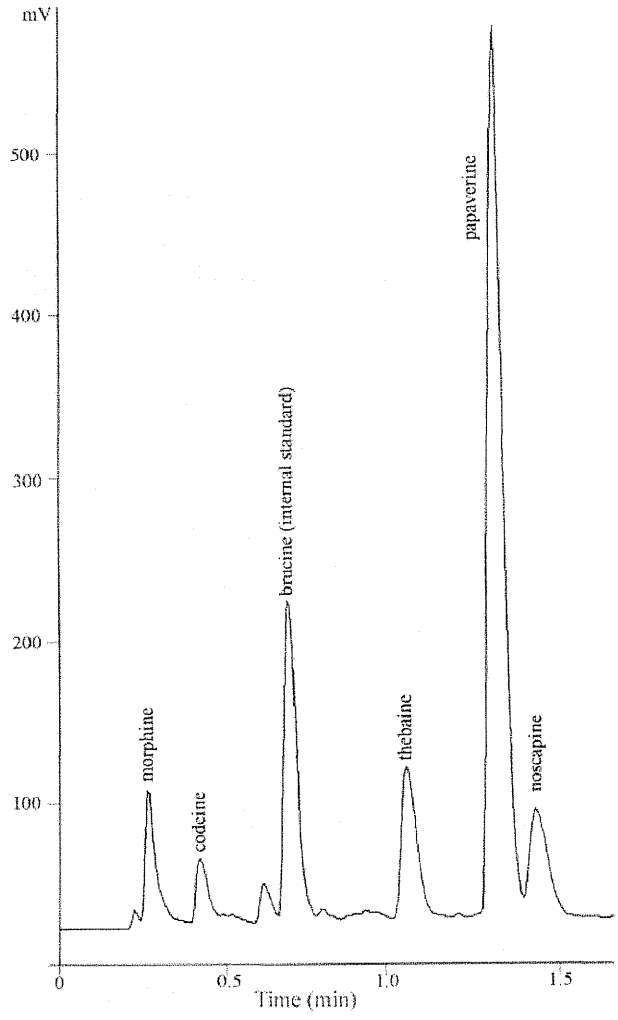
Eredmények:

Az öt fő ópium alkaloidot (morfin, codein, thebain, papaverin és narkotin) tartalmazó mákgubóból kapott extraktum fordított fázisú (RP), *nemporózus*, *monodiszperz* állófázison történő HPLC elválasztását a 33. ábra mutatja be. Ezzel a vizsgálati módszerrel 1,5 percre tudtuk az ópium alkaloidok analízisidejét csökkenteni úgy, hogy az elválasztást 50 °C-on végeztük és ionpár képzőnek a hepta-fluoro-vajsavat (HFBA) használtuk. Így valamennyi ópium alkaloidra jó elválasztást kaptunk. A hepta-fluoro-vajsav jelentősen megváltoztatta a minták hidrofób tulajdonságát, aminek következménye a komponensek retenció növekedése lett. Az optimális elválasztást és a megfelelő csúcsszimmetriát akkor kaptuk, amikor az oldószererősségen kívül a hepta-fluoro-vajsav mennyiségét is fokozatosan növeltük a gradiens során. Az eredményeket a 7-9. táblázatokban foglaltuk össze.

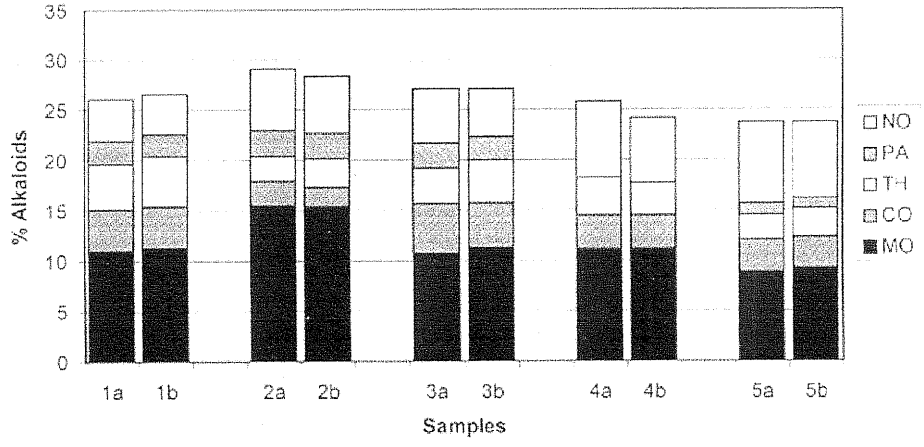
Kimértük a vizsgált alkaloidok kimutatási határát, melyet a 10. táblázat tartalmaz.

Az alkaloidok mennyiségi meghatározásánál az öt fő ópium alkaloidra kalibráltunk. A mért koncentráció tartományban a koncentráció és a csúcs alatti térfogat közötti korrelációs koefficiens jobb volt, mint 0,9988.

Az 33. ábrán összehasonlításként a *nemporózus* és a *porózus* állófázison végzett kromatográfiás vizsgálati eredmények láthatók. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét rendszerben hasonló az elválasztás, de a *nemporózus* rendszerben lényegesen gyorsabban, és nagyságrendekkel érzékenyebben lehet a meghatározásokat végezni.



33. ábra: Ópium alkaloidok HPLC elválasztása



34. ábra: *Nemporózus* és a *porózus* állófázison végzett kromatográfiás vizsgálati eredmények összehasonlítása

(a) *porozus töltet* (b) *nemporózus töltet*
MO=Morfin; CO=Kodein; TH=Thebain; PA=Papaverin; NO=Narkotin

7. táblázat: Alkaloidok lineáris tartományának vizsgálata

Alkaloid	Lineáris tartomány [mg/ml]	Korrelációs koefficiens	Meredekség	Metszet
Morfin	0,09-0,75	0,9988	0,132	0,0006
Kodein	0,03-0,28	0,9997	0,196	0,0000
Thebain	0,02-0,21	0,9999	0,479	0,0032
Papaverin	0,01-0,20	0,9995	5,775	0,0055
Narkotin	0,11-0,34	0,9996	0,354	0,0094

Mindegyik alkaloid esetében 6 pontból vettük fel a kalibrációs egyenest.
X= alkaloid anyagmennyisége [mg]
Y= belső standard anyagmennyisége [mg]×alkaloid csúcsterület/ belső standard csúcsterület

8. táblázat: Alkaloidok mennyiségi meghatározása

Alkaloid	Mennyiség [%] 1. mintában	RSD%	Mennyiség [%] 2. mintában	RSD%
Morfin	11,30±0,25	2,25	15,41±0,06	0,39
Kodein	4,07±0,10	2,56	1,89±0,05	2,44
Thebain	5,02±0,06	1,16	2,87±0,03	0,97
Papaverin	2,17±0,04	1,86	2,52±0,05	2,00
Narkotin	3,98±0,04	0,95	5,61±0,09	1,56

Az adatokat 5 meghatározás átlagértékéből számoltuk.

9. táblázat: HPLC módszer pontosságvizsgálata

Alkaloid	Retenciós idő [perc]	RSD%
Morfin	0,302±0,010	3,31
Kodein	0,429±0,015	3,50
Brucin	0,660±0,027	4,09
Thebain	1,039±0,030	2,89
Papaverin	1,300±0,036	2,77
Narkotin	1,430±0,041	2,87

Az adatokat egy héten keresztül gyűjtött, 12 meghatározás átlagértékéből számoltuk.

10. táblázat: Alkaloidok kimutatási határának vizsgálata

Alkaloid	Kimutatási határ	Kimutatási határ [ng]
Morfin	4,40 picomol	1,26
Kodein	5,70 picomol	1,71
Thebain	1,05 picomol	0,33
Papaverin	35,9 femtomol	0,012
Narkotin	1,75 picomol	0,72

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során *nemporózus*, *monodiszperz* szilikagél alapú hidrofób állófázis alkalmazhatóságát vizsgáltam bioaktív vegyületek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztásához. Bár ezeket az állófázisokat biopolimerek elválasztására fejlesztették ki, kidolgozott analízisek bizonyítják, hogy sikeresen alkalmazhatók kis móltömegű (M<500) vegyületek gyors elválasztására is. Analíziseinkhez olyan vegyületcsoportokat választottam, melyek az élettudományokban, az orvosbiológiai kutatásokban, a klinikai vizsgálatoknál nagy jelentőséggel bírnak.

1.) Folyadékkromatográfiás elválasztásokhoz a svájci Chemie Uetikon AG. KOVASIL-C14 és KOVASIL-C18 oszlopait használtuk. Az oszloptöltet egy nagytisztaságú (nehézfémmentes), *nemporózus*, *monodiszperz*, 1,5 μm szemcseátmérőjű szilikagél. A töltetszemcsék felületéhez C_{14} valamint C_{18} lánchosszúságú, alifás szénhidrogén csoport van kémiai kötéssel kapcsolva. Az így előállított hidrofób ún. fordított fázisú töltet egy 33 mm×4,6 oszlopba töltve került felhasználásra.
Vizsgáltam a töltet kémiai stabilitását. A kapott eredmények azt igazolták, hogy a kolonna kémiai stabilitása kiváló, ami egyben a hosszú élettartamot is valószínűsíti.

2.) A folyadékkromatográfiás módszerek fejlődése, a retenciók mérésének növekvő reprodukálhatósága irányította a figyelmet a folyadékkromatográfiában a nyomás és a retenció közötti összefüggésre.
A nyomás és retenció közötti összefüggés vizsgálata során mérésekkel bizonyítottuk az összefüggés általános érvényességét. Elsőként mutattuk be, hogy a szokásos kromatográfiás mérési körülmények között ezt a jelentős retenciónövelő effektust az áramló eluens súrlódásának hatására melegedő eluens retenció csökkentő hatása elnyomja. Egyszerű és egyértelmű összefüggést találtunk a retencióváltozás és az adszorbeált / nem adszorbeált molekulák móltérfogatának változása között.

3.) A bioaktív molekulákra kifejlesztett gyors kromatográfiás elválasztásokhoz a modell elegyek tiszta szubsztanciákból készültek. A különböző mátrixokból (pl.: növényi, biológiai) készült extraktumok HPLC analízise a kidolgozott módszerek

körülményeinek módosítását teheti szükségessé (pl. a tiszta szubsztanciák kromatográfiás csúcsaival együtt retardáló komponensek zavaró hatása miatt).

Folyadékkromatográfiás elválasztásaink során az alábbi vegyületcsoportok analízisére dolgoztunk ki új, szupergyors elválasztási eljárást:

- Vízoldékony vitaminok
- Zsíroldékony vitaminok
- Királis vegyületek
- Analgetikumok
- Természetes aminosavak
- Alkaloidok

A kiválasztott mintavegyületek nem csak a gyakorlat szempontjából fontosak. Kiválasztásuknál az is szerepet játszott, hogy kromatográfiás szempontból is sokféle eltérő elválasztási problémát jelentő vegyületcsoportokkal igazoltuk a *nemporózus*, *monodiszperz* töltetek előnyös tulajdonságait. A kiválasztott vegyületek között vannak erősen poláris, gyengén poláris, savas és bázikus kémhatású vegyületek.

Az elválasztások időszükséglete általában 1-3 perc. A 21 komponensű aminosav elválasztás 7 perc alatt elvégezhető. Az elválasztások gyorsasága a kromatográfiás rutin szempontjából önmagában is előnyös, de más kedvező hatásokkal is jár, mint például az alacsony vegyszerfogyasztás.

A rövid analízisidő ugyanis egyúttal kis térfogatú kromatográfiás csúcsokat is jelent. A minták szételegyedése a szokásos porózus fázisokon végzett elválasztásokhoz képest csekély. Így az elválasztott vegyületek többségére a kimutatási határ a *femtomol* tartományba esett.

Jelentősek az ópium alkaloidok elválasztásában elért eredményeink, ahol mind az elválasztás sebessége, mind az érzékenysége lényegesen meghaladja az eddig elért eredményeket.

6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1.) *Ohmacht R., BOROS B., Kiss I., Jelinek L.:*Quick and Sensitive HPLC Separations on Non-porous RP Phases
Chromatographia (1999), 50, 75

2.) *Ohmacht R., BOROS B., Kovács K.:* High speed, high sensitivity separation of bioactive compounds by HPLC on non-porous phases
Magy. Kém. F. (1999), 11.sz. 465

3.) *Ohmacht R., BOROS B.:* Effect of pressure on Solute Capacity Factor in HPLC Using a Non-Porous Stationary Phase
Chromatographia (2000), 51, S-205

4.) *BOROS B., Kovács K., Ohmacht R.:* Fast Separation of Amino Acid Phenylthiohydantoin Derivatives HPLC on Non-porous Stationary Phases
Chromatographia (2000), 51, S-202

5.) *Krenn, L., BOROS, B., Ohmacht, R., Jelinek, L.:* HPLC-Separation of Opium Alkaloids on Porous and Non-Porous Stationary Phases
Chromatographia (2000), 51, S-175

6.) *Felinger A., BOROS B., Ohmacht R.,:* Effect of pressure on Solute Capacity Factor in HPLC Using a Non-Porous Stationary Phase II.
Chromatographia (2002), 56, S-61

7. ELŐADÁS ÉS POSZTER JEGYZÉK

Előadás jegyzék:

1. Előadás helye: XX. Kémiai Előadói Napok, Szeged
   Előadás időpontja: 1997. október 15.
   Előadás címe: Szupergyors biokromatográfiás elválasztások
   Szerzők: Boros Borbála, Ohmacht Róbert

2. Előadás helye: MKE Analitikai szakosztályának Szervesanalitikai Szakcsoportjának előadói ülése, Budapest
   Előadás időpontja: 1997. november 11.
   Előadás címe: Bioaktív molekulák gyors folyadékkomatográfiás (HPLC) elválasztása
   Szerzők: Boros Borbála, Ohmacht Róbert

3. Előadás helye: Balaton Symposium '97, Siófok
   Előadás időpontja: 1997. szeptember 04.
   Előadás címe: Nonporous Silica Based Reversed Phase HPLC Packings. An Uiversal easy to use Alternative to Porous Adsorbents?
   Szerzők: Ohmacht Róbert, Boros Borbála, Kiss Ibolya, Jelinek László
   Book of Abstracts: L-24 (48.oldal)

4. Előadás helye: Dél-Dunántúli Analitikai Nap, Kaposvár
   Előadás időpontja: 1998. június 19.
   Előadás címe: Nemporózus állófázisok a folyadékkromatográfiában
   Szerzők: Boros Borbála, Ohmacht Róbert

5. Előadás helye: Elválasztásitudományi Vándorgyűlés '98, Lillafüred
Előadás időpontja: 1998. október 01.
Előadás címe: Nyomásváltozás hatására bekövetkező retencióváltozás a folyadékkromatográfiában
Szerzők: Ohmacht Róbert, Boros Borbála

6. Előadás helye: XI. Roman National Congress of Pharmacy Iasi,
Előadás időpontja: 1998. október 8-10.
Előadás címe: Non Porous Silica Based Reversed Phase Packings. Effective Easy to Use Alternatives to Porous Packings
Szerzők: Ohmacht, R., Boros, B., Kiss, I., Jelinek, L
Book of Abstracts P. 379

7. Előadás helye: Elválasztásitudományi Ankét '99
Előadás időpontja: 1999. május 05.
Előadás címe: Nem porózus, fordított fázisú töltetek alkalmazása alkaloidok gyors folyadékkromatográfiás elválasztására
Szerzők: Boros Borbála, Liselotte Krenn, Ohmacht Róbert,

8. Előadás helye: HPLC'99 Granada (Spain)
Előadás időpontja: 1999. május 30 – június 4
Előadás címe: Effect of Pressure on Solute Capacity Factor in Liquid Chromatography
Szerzők: Ohmacht, R., Boros, B., Jelinek, L.:
Book of Abstracts, Vol.II. PB10/26

9. Előadás helye: Balaton Symposium '99, Siófok,
Előadás időpontja: 1999. szeptember 1-3.
Előadás címe: Pressure Retention Relationship in Liquid Chromatography
Szerzők: Ohmacht, R., Boros, B., Jelinek, L.:
Book of Abstracts: L-14

10. Előadás helye: Balaton Symposium '99, Siófok,

Előadás időpontja: 1999. szeptember 1-3

Előadás címe: HPLC-Separation of Opium Alkaloids on Porous and Non Porous Stationary Phases

Szerzők: Krenn, L., Boros, B., OHMACHT, R.:

Book of Abstracts: L-28

Poszter jegyzék:

1. Poszter megjelenésének helye: 4th Symposium on Instrumental Analysis, Graz

Poszter megjelenésének időpontja: 1997. május 20-23.

Poszter címe: Separation of Drug Substances on Nonporous RP-HPLC columns

Szerzők: Boros Borbála, Ohmacht Róbert

Symposium Abstracts: P36

2. Poszter megjelenésének helye: Balaton Symposium '97, Siófok

Poszter megjelenésének időpontja: 1997. szeptember 03-05

Poszter címe: Fast Separation of Drug Substances on Nonporous RP-HPLC columns

Szerzők: Ohmacht Róbert, Boros Borbála, Kovács Krisztina

Book of Abstracts: P-47 (125.oldal)

3. Poszter megjelenésének helye: IV. Pharmanalysis Europe Conference, London

Poszter megjelenésének időpontja: 1997.október 27-28

Poszter címe: Nonporous Silica Based Reversed Phase HPLC Packings. An Universal easy to use Alternative to Porous Adsorbents?

Szerzők: Ohmacht Róbert, Boros Borbála, Kiss Ibolya, Jelinek László

Conference Proceedings: 15. részben

4. Poszter megjelenésének helye: Elválasztástudományi Vándorgyűlés '98, Lillafüred

Poszter megjelenésének időpontja: 1998.09.30.-10.02.

Poszter címe: Esszenciális aminosavak gyors folyadékkromatográfiás elválasztása

Szerzők: Boros Borbála, Ohmacht Róbert, Kovács Krisztina

5. Poszter megjelenésének helye: Balaton Symposium '99, Siófok,

Poszter megjelenésének időpontja: 1999. szeptember 1-3.

Poszter címe: Effect of Pressure on Solute Retention

Szerzők: Boros, B., Ohmacht, R., Jelinek, L.

Book of Abstracts: P-07

6. Poszter megjelenésének helye: Balaton Symposium '99, Siófok,

Poszter megjelenésének időpontja: 1999. szeptember 1-3.

Poszter címe: Quick Separation of PTH-Amino Acids

Szerzők: Boros, B., Kovács, K., Ohmacht, R., :

Book of Abstracts: P-112

8. IRODALOM

[1] *W.J.Lough and I.W.Wainer*, High Performance Liquid Chromatography,

[2] *Snyder-Krirkland*, Bevezetés az intenzív folyadékkromatográfiába, 19.o.

[3] *R.E.Majors*, Supplement to LC-GC Int. **11**, 7 (1998)

[4] *D.J.Anderson*, Anal. Chem.: **67**, 475R (1995)

[5] *B.L.Karger*, J. Chem. Education, **74,** 45 (1997)

[6] *K.K.Unger, G.Jilge, J.N.Kinkel, M.T.W.Hearn*, J. Chromatogr., **61**, 359 (1986)

[7] *K.Kalghatgi, Cs.Horváth*, J. Chromatogr., **335**, 398 (1987)

[8] *K.Kalghatgi, Cs.Horváth*, J. Chromatogr., **343**, 443 (1988)

[9] *K.Kalghatgi, Cs.Horváth*, in Methods in Protein Sequence Analysis, Springer, p.248 (1989)

[10] *R. Ohmacht, I. Kiss*, Chromatographia, **42**, 595 (1996)

[11] Kovasil Data Sheets 1995-1997

[12] Micra Scientific, Technical Bulletin 1997

[13] *J.E.MacNair, K.C.Lewis, J.W.Jorgenson*, Anal. Chem. **69**, 983 (1997)

[14] *D.Chollet, E.Castella, P.Combe, V.Arnera*, J. Chromatogr., **237**, 683, (1996)

[15] *H.Chen, Cs.Horváth*, Anal. Methods. Instrum., **1**, 213 (1993)

[16] *H.Chen, Cs.Horváth*, J. Chromatogr., **3**, 715, (1995)

[17] *E.Kovats, L.Jelinek, R.Ohmacht*, EP 693314A1 (1996.01.12.)

[18] *R.M.Seifar, W.Th.Kok, J.C.Kraak, H.Poppe*, Chromatographia, **46**, 131 (1997)

[19] *H.Itoh, T.Kinoshita, N.Nimura*, J. Liq. Chromatogr. **16**, 809 (1993)

[20] *W-C.Lee, C-Y.Chuang*, J. Chromatogr., **31**, 721, (1996)

[21] *H.Moriyama, M.Anegayama, Y.Kato*, J. Chromatogr., **81**, 729, (1996)

[22] Uetikon Data Scheet 1995

[23] *Cs.Horváth, W.Melander*, J. Chromatogr. Science **15**, 393, (1977)

[24] R.K.Iler: The Chemistry of Silica, 42.o.

[25] *R. Ohmacht, B. Boros*: Chomatographia 51 S-205 (2000)

[26] *V. L. McGuffin, S-H. Chen,* Anal. Chem. **69**, 930 (1997)

[27] *J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson,* Anal. Chem. **69**, 983 (1997)

[28] *M. C. Ringo, C. E. Evans,* Anal. Chem. **69**, 4964 (1997)

[29] *M. C. Ringo, C. E. Evans,* J. Phys. Chem. **101**, 5525 (1997)

[30] *M. C. Ringo, C. E. Evans,* Anal. Chem. **70**, 315 A (1998)

[31] *J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson,* Anal. Chem. **71**, 700 (1999)

[32] *K. Lan, J. W. Jorgenson,* Anal. Chem. **70**, 2773 (1998)

[33] *G. Prukop, L. B. Rogers,* Separation Sci. Technol. **13**, 59 (1978)

[34] *E. Katz, K. Kogan, R. P. W. Scott,* J. Chromatogr. **260**, 277 (1983)

[35] *N. Tanaka, T. Yosimura, M. Araki,* J. Chromatogr. **406**, 247 (1987)

[36] *V. L. McGuffin, C. E. Evans,* J. Microcolumn Sep. **3**, 513 (1991)

[37] *G. Guiochon, M. J. Sepaniak,* J. Chromatogr. **606**, 248 (1992)

[38] *D. Berek, T. Macko,* J. Liq. Chrom. **21**, 2265 (1998)

[39] *D. Berek, T. Macko,* Pure & Appl. Chem. **61**, 2041 (1989)

[40] *M. Chalányová, T. Macko, J. Kandrač, D. Berek,* Chromatographia **18**, 668 (1984)

[41] *D. Berek, M. Chalányová, T. Macko,* J. Chromatogr. **286**, 185 (1984)

[42] *D. E. Martire, R. E. Boehm,* J. Phys. Chem. **91**, 2433 (1987)

[43] Kovasil Data Folder 1998

[44] *R. Ohmacht, B. Boros*, Chromatographia **50**, 75 (1999)

[45] *H. Engelhardt, M. Jungheim,* Chromatographia **29**, 59 (1990)

[46] *H. Engelhardt, H. Löw, W. Götzinger,* J. Chromatogr. **544**, 371 (1991)

[47] *H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert,* LC. GC Int. **10**, 803 (1997)

[48] *R. Endele, I. Halász, K. Unger,* J. Chromatogr. **99**, 377 (1974)

[49] *I. Halász, R. Endele, J. Asshauer,* J. Chromatogr. **112**, 37 (1975)

[50] *M. Martin, C. Eon, G. Guiochon,* J. Chromatogr. **110**, 213 (1975)

[51] *C. Shu-Hui, H. Chun-Tzan, H. Kai-Yun, C. Jei-Ming*: J. Chromatogr. A **891**, 207 (2000)

[52] *P. Szabelski, A. Cavazzini, K. Kaczmarski, X. Liu, J. van Horn, G. Guiochon*: J. Chromatogr. A, **41**, 950, (2002)

[53] *M.Kimura, K.Kanehira, K.Yokoi*: J. Chromatogr., **1-2**, 722, (1996)

[54] *M.Careri, R.Cilloni, MT Lugari, P Manini*: Analitical Communications **5**, 33, (1996)

[55] M.J.Delnozal, J.Bernal, P.Marinero: J. Liq. Chromatogr., **7**, 19, (1996)

[56] *S.Albalahurtado, M.T.Vecianangues, M.Izquierdopulido, A.Marinefont*: J. Chromatogr., **1-2**, 778, (1997)

[57] *S.A.Klyuev*, J. Anal. Chem., **9**, 51, (1996)

[58] *M.M.D.Zamarreno, A.S.Perez, M.S.Rodriguez, M.C.G.Perez, J.H.Mendez*, Talanta , **9**, 43, (1996)

[59] *Schill, G.:* „Ion exchange and solvent Extraction" **Vol.6**. (Ed: Marinsky, J.A., Marcus, Y.),Marcel Dekker, New York (1974)

[60] *Armstrong, D.W., Nome,F.*: Anal. Chem **53**, 1662 (1981)

[61] *Nakagawa,T., Mizunuma,H., Shibukawa, A., Uno,T.*: J. Chromatogr. **211**, 1 (1981)

[62] *Nakagawa,T., Shibukawa, A., Uno,T.*: J. Chromatogr. **254**, 27 (1983), 239,695 (1982)

[63] *Nakagawa,T., Shibukawa, A., Murata, H.*: J. Chromatogr. **280**, 31 (1983)

[64] *Nakagawa,T., Murata, H., Shibukawa, A., Murakami, K., Tanaka, H.*, J. Chromatogr. **43**, 330, (1985)

[65] *J.Szemán, K.Ganzler, A.Salgó, J.Szietli*, J. Chromatogr., **423**, 728 (1996)

[66] *I.Ciucanu*: J. Chromatogr., **195**, 727 (1996)

[67] C.Fischer, A.Modler, C.Moinet, J.C.Fiaud, J. Chromatogr., **433**, 728 (1996)

[68] Cyclolab kat., Products and Prices of cyclodextrin Derivatives for Capillar Elektrophoresis

[69] *Magyar Gyógyszerészeti Társaság*: A gyógyszerészeti tudomány aktuális kérdései 96-104.o

[70] *A.M.Dipietra, R.Gatti, V.Andrisano, V.Cavrini*, J. Chromatogr., **1-2**, 729, (1996)

[71] *G.P.Mcmahon, M.T. Kelly*, Analitical Chem., **2**, 70, (1998)

[72] *D.Prochazkova, P.Drasar, J.Vacha*, Chemicke Listy, **5**, 91, (1997)

[73] *A.Kunkel, S.Gunter, H.Watzig*, J. Chromatogr., **1**, 768, (1997)

[74] *Z.Bouhsain, S.Garrigues, M.Delaguardia, Fresenius J.* , Anal. Chem., **7**, 357, (1997)

[75] Micra Scientific, Inc.,6

[76] Phenomenex 1998/99, 352

[77] *B.Blomback, M. Blomback, P.Edman, B.Hessel*, Biochim. Biophys.Acta, **371**, 115 (1966)

[78] *M.Hanui, C.Acklin, W.C.Kenney, M.F.Rohde*, Int. J. Peptide Protein Res. **43**, 81, (1994)

[79] *P.Edman, E.Begg*, Europen J. Biochem. **1**, 80 (1967)

[80] *P.Edman*, Acta Chem. Scandinavica **4**, 277 (1950)

[81] *P.Edman*, Acta Chem. Scandinavica **10**, 761 (1956)

[82] *F.Lottspeich*, J. Chromatogr., **321**, 326 (1985)

[83] *Y.Kurosu, K.Murayama, N.Shindo, Y.Shisa, N.Ishioka*, J. Chromatogr., **279**, 752 (1996)

[84] *R.L.Heinrikson, S.C.Meredith*, Anal. Biochem., **65,**136 (1984)

[85] *S.O.Beer, J.Chorthhout, A.J.Vlietink*, Pharmeuropa **3**, 274 (1991)

[86] *P.Gomez-Serranillos, E.Carretero, A.Villar*, Fitoterapia **66** 156 (1995)

[87] *L.Krem, S.Glantschnig, U.Sorgner,*: Chomatographia 47 21 (1998)

[88] *R.Verpoorte, A.Baerheim Svendsen,*: Chromatography of Alkaloids,Journal of Chromatography Library Series, Vol. 23B, Elsevier, Amsterdam,1984, p.297.

[89] *L.W.Doner, A.Hsu,*: J.Chromatogr. **253**, 120 (1982)

[90] *B.C.Pettitt, C.E. Damon*: J.Chromatogr. **242**, 189 (1982)

[91] *V.K.Srivastava, M.L.Maheshwari,*: J.Assoc.Off.Anal.Chem. **68**, 801 (1985)

[92] *M. Dogan, A. Gevenkiris, O. Tarhan,*: Fitoterapia **57,** 257 (1986)

[93] *S.H.Hansen,*: Int.J.Phar. **32**, 7 (1986)

[94] *N.R.Ayyangar, S.R.Bhide,*: J.Chromatogr. **366**, 435 (1986)

[95] *N.R.Ayyangar, S.R.Bhide,*: J.Chromatogr. **436**, 455 (1988)

[96] *J.O.DeBeer, J.Corthout, A.J. Vlietinck,*: Pharmeuropa **3**, 274 (1991)

[97] *K.Yoshimatsu, K.Shimomura,*: Plant Cell Rep. **11**, 132 (1992)

[98] *M.M.Kraml, F.DiCosmo,*: Phytochem.Anal. **4**, 103 (1993)

[99] *P.Gomez-Serranillos, E.Carretero, A.Villar,*: Phytochem.Anal. **5**, 15 (1994)

[100] *P.Gomez-Serranillos, E.Carretero, A.Villar,*: Fitoterapia **66**, 156 (1995)

[101] *Y.Nobuhara, S.Hirano, K.Namba, M.Hashimoto,* J.Chromatogr.,**190**, 251 (1980)

[102] *Nikolics Károly, Burger Kálmán:*
A gyógyszerészeti tudomány aktuális kérdései 1 (65-78.o.)

[103] *Nikolics Károly, Burger Kálmán:*
A gyógyszerészeti tudomány aktuális kérdései 1 (96-104.o.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom édesanyámnak a bíztatásért, a sok-sok türelemért, amit tanulmányaim során kaptam Tőle.

Hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek *Dr. Ohmacht Róbert* egyetemi tanárnak, aki elindította analitikai pályafutásomat a HPLC rejtelmeinek bevezetésével. Köszönettel tartozom a sokévi közös munka lehetőségéért, mind a kutatás és mind az oktatás területén.

Hálás köszönettel tartozom *Dr. Tóth Gyula* professzor úrnak, akihez bármikor fordulhattam jó tanácsért és önzetlen segítségért.

Köszönöm *Dr. Deli József* egyetemi tanárnak az oktatásban való közös munkát és a dolgozat befejezésében nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok a svájci *Cmemie Uetikon* cégnek, hogy a kromatográfiás vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen KOVASIL-C_{14}, KOVASIL-C_{18} kolonnákat rendelkezésemre bocsátotta.

Köszönöm *Dr. Kováts Ervin* professzor úrnak és *Dr. Jelinek László* úrnak a sok közös munka lehetőségét és barátságukat.

Köszönöm *Dr. Kele Mariannának* és *Kiss Ibolyának* a kromatográfiás pályafutásom elején nyújtott sok segítséget.

Köszönöm *Molnár Erzsébet* energiát és időt emésztő, sokszor önfeláldozó segítségét a laboratóriumi munkákban és a HPLC mérésekben.

Köszönöm volt munkatársaimnak a Tőlük kapott segítséget.

Hálás köszönettel tartozom Pallos József Péternek a Pannonpharma Kft. ügyvezető igazgatójának, valamint Káldor Mártonnak a Simkon Kft. tulajdonosának, akik lehetőséget adtak tanulmányaim és dolgozatom befejezéséhez.

Quick and Sensitive HPLC Separations on Non-Porous Reversed-Phase Packings

R. Ohmacht[1]* / B. Boros[1] / I. Kiss[2] / L. Jelinek[3]

[1]Institute of Medical Chemistry, University Medical School, 7601 Pecs, Hungary
[2]Department of Analytical Chemistry, J. Pannonius University, 7624 Pecs, Hungary
[3]Chemie Uetikon AG, 8707 Uetikon, Switzerland

Key Words

Column liquid chromatography
Non-porous, reversed-phase packing
Very fast separation
Bioactive compounds

Summary

The aim of this work was to evaluate reversed-phase chemically bonded non-porous (micropellicular) d_p = 1.5 μm stationary phases. On these modern phases the time for analysis of complex mixtures of solutes – whether monomeric or polymeric (e. g. drugs, vitamins, peptides, or proteins) – is very short compared with that on porous phases. Different surface chemistries were elaborated for the separation of different types of sample. For the separation of small molecules a long-chain (C_{14}) hydrocarbon-coated phase seems to be optimum; a short chain (C_6) hydrocarbon bonded to the surface of the silica seems better for the separation of polymers.

The efficiency, the low analysis times, and sensitivities were demonstrated by the separation of different proteins, peptides, drugs, alkaloids, and mixtures of water- and fat-soluble vitamins.

Introduction

Non-porous reversed-phase sorbents (< 3 μm) were first introduced in the mid eighties by Unger [1], initially for biopolymer separation. Nowadays 1.5 μm silica-based reversed-phase non-porous packings are extensively employed in different fields of HPLC, with special emphasis on the separation of monomeric and polymeric bioactive compounds [2–13]. The main advantage of these non-porous packings is the potential increase in column efficiency (because of reduced resistance to mass transfer), which enables the use of high flow rates, resulting in low analysis times and highly sensitive separations. Resistance to mass transfer limits chromatographic performance especially in the separation of biopolymers [7]. In contrast, the column backpressure can be substantial with non-porous small particles, especially at high mobile phase flow rates, and so elevated temperatures are used to reduce mobile phase viscosity. In this work we have shown that short separation times and detection limits in the *femtomole* range can be achieved under routine conditions by use of commercial HPLC equipment in gradient-elution mode. (The detection limit was defined as the amount of sample giving a peak height three times higher than the noise level.) It must be emphasized that detection limits given in this work are approximate only. Detection limits are highly affected by the conditions of the equipment used (injector, connecting capillaries, column design, detector, and detector cell), the mobile phase quality, gradient profile etc. We believe that our experimental conditions are of good average quality therefore the detection limits published in this paper can be easily reached or even exceeded.

Experimental

Water-soluble vitamins were of Pharm. Hung. VII quality; other samples were purchased from Fluka, Sigma, or Aldrich (Buchs, Switzerland). γ-Cyclodextrin was obtained from Cyclolab (Budapest, Hungary) and 1-heptanesulfonic acid sodium salt, ammonium acetate, trifluoroacetic acid (TFA) and triethylamine were from Fluka. HPLC-grade acetonitrile was from Scharlau (Barcelona, Spain). Water was distilled twice in glass. Approximately 1 mg sample was dissolved in 1 mL solvent (different water–acetonitrile mixtures depending on the solubility). In general 0.5–2 μL samples were injected.

Compounds were separated with a Gynkotek HPLC system comprising a 480TG biocompatible precision pump (equipped with a low-pressure gradient mixer), or a high-pressure gradient system comprising 480/300 pumps, an 170S UV detector, and a Chromeleon chromatography data system. Samples were injected by

0009-5893/99/07 75-07 $ 03.00/0 © 1999 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

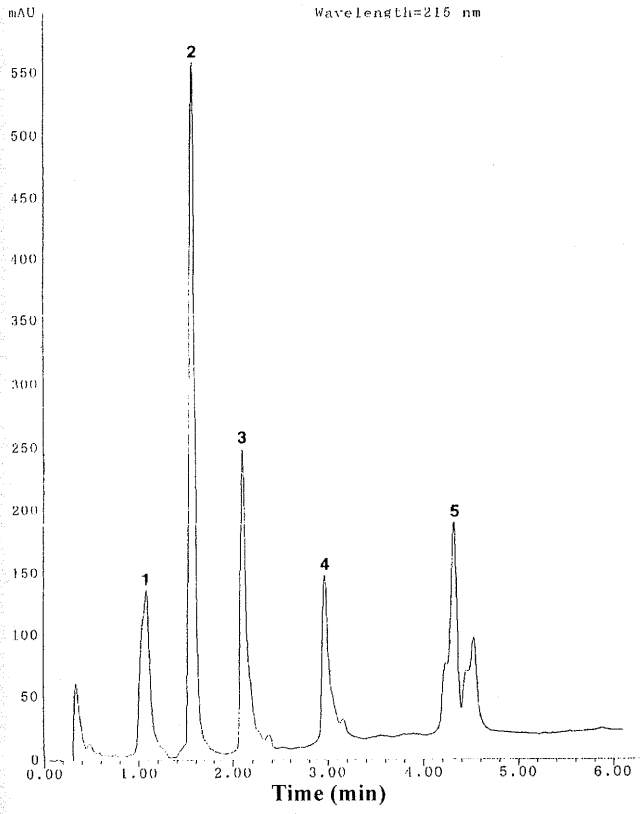


Figure 1
Separation of a protein mixture: 1, ribonuclease A; 2, insulin (human); 3, cytochrome c (horse); 4, β-lactoglobulin. Column, 33 m × 4.6 mm Kovasil-H; mobile phase A, 20:80 acetonitrile–water + 0.05 % TFA; mobile phase B, 90:10 acetonitrile–water + 0.05 % TFA; linear gradient from 6 % B to 42 % B in 6 min; flow rate 1.0 cm^3 min^{-1}; pressure 24 Mpa (at start); temperature 25 °C; detection 215 nm.

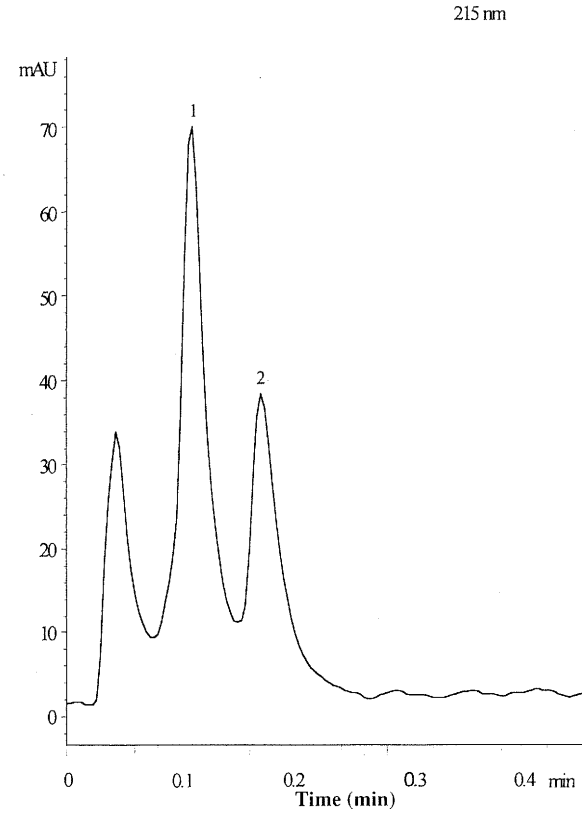


Figure 2
Separation of β-lactoglobulin B (1) and β-lactoglobulin A (2). Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-H; mobile phase A, 10:90 acetonitrile–water + 0.12 % TFA; mobile phase B, 90:10 acetonitrile-water + 0.12 % TFA; linear gradient from 34 % B to 35 %B in 0.8 min; flow rate 3.6 cm^3 min^{-1}; pressure 32 Mpa (at start); temperature 95 °C; detection 215 nm.

means of a Rheodyne (Cotati CA, USA) 8125 sample-injection valve fitted with a 20-μL sample loop. Separations were performed on a 33 mm × 4.6 mm i. d. Kovasil-H or Kovasil-C14 reversed-phase column (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland). Constant column temperature was ensured by use of a water jacket, which covered the column and ca 20 cm of the inlet capillary tubing. The temperature was set by means of a Grant W6 circulating water bath (Grant Instruments, Cambridge, UK).

Results and Discussion

The advantages of micropellicular packings for the separation of biopolymers have been extensively discussed in the literature, and exhaustive summaries can be found elsewhere [7, 13]. Kovasil-H is based on a high-purity non-porous, monodisperse silica bead (d_p = 1.5 μm) chemically bonded with a short, branched-chain (sterically hindered) alkylsilane (C_6 = dimethylbutyl). A detailed description of Kovasil phases (binding chemistries, characterization) is also available elsewhere [2, 8]. This phase was developed for biopolymer separation. A standard mixture of proteins is separated with an acetonitrile-water gradient containing trifluoroacetic acid (TFA) and the recovery of the proteins is calculated according to methods reported in the literature [14, 15]. Recovery is almost complete for every protein (Figure 1, Table I).

Table I. Recovery of proteins.

Compound	Recovery (%)
Ribonuclease A	105
Insulin (human)	96
Cytochrome (horse)	100
β-Lactoglobulin	104

This could explain the long lifetime of the non-porous columns in protein separation (no protein precipitation on the surface of the particles). The column which we used for this experiment has been in use for different protein separations for more than a year. To demonstrate column stability, we separated β-lactoglobulin B and A on this long-lived column. The demanding separation was achieved within just 12 s at 95 °C (Figure 2).

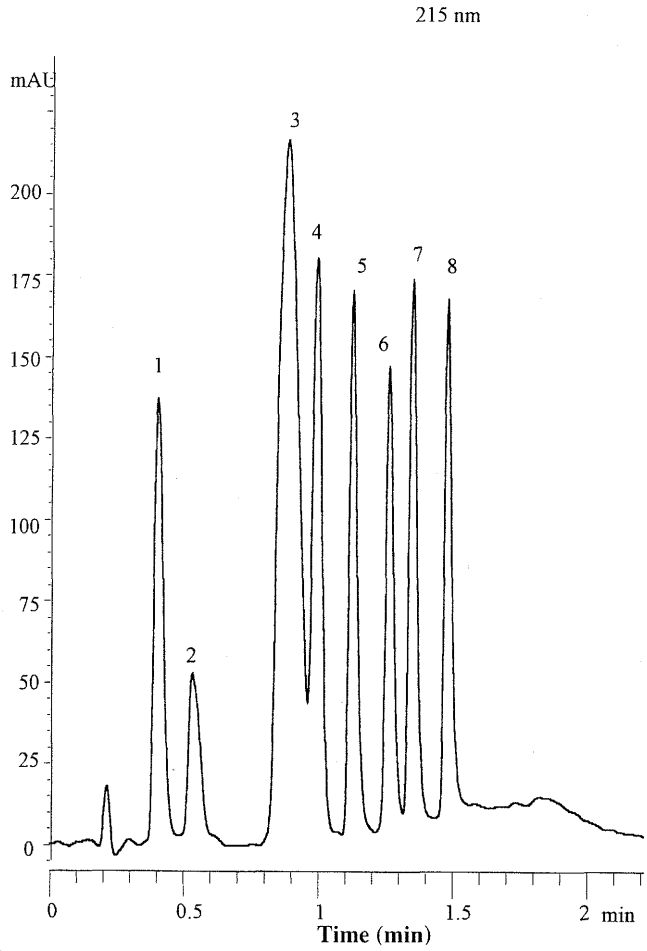


Figure 3

Separation of bioactive peptides: 1, methionine enkephalin; 2, [Arg^8]-vasopressin; 3, leucine enkephalin; 4, oxytocin; 5, angiotensin II; 6, angiotensin I; 7, somatostatin; 8, insulin (bovine). Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-H; mobile phase A, 2:98 acetonitrile-water + 0.1 % TFA; mobile phase B, 90:10 acetonitrile-water + 0.1 % TFA; multilinear gradient from 12 % B to 40 % B in 2.0 min; flow rate 1.4 cm^3 min^{-1}; pressure 36 Mpa (at start); temperature 25 °C; detection 215 nm.

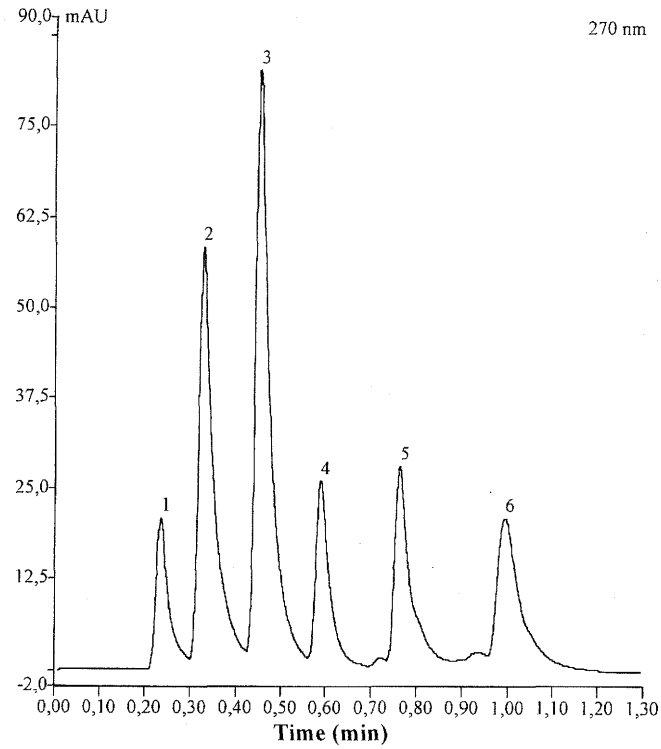


Figure 4

Separation of water-soluble vitamins: 1, ascorbic acid (vitamin C); 2, niacinamide (vitamin B_3); 3, adenine (vitamin B_4); 4, pyridoxine (vitamin B_6); 5, riboflavin (vitamin B_2); 6, thiamine (vitamin B_1). Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-C14; mobile phase A, 2.7 mmol 1-heptanesulfonic acid sodium salt in water + 0.5 % glacial acetic acid; mobile phase B, acetonitrile + 0.3 % triethylamine; linear gradient from 0 % B to 100 % B in 1.5 min; flow rate 1.2 cm^3 min^{-1}; pressure 33 Mpa (at start); temperature 25 °C; detection 270 nm.

Table II. Detection limits for peptides.

Compound	Detection limit	
	(pmol)	(ng)
Meth-enkephalin	0.09	0.052
[Arg8]-vasopressin	0.06	0.069
Leu-enkephalin	0.12	0.065
Oxytocin	1.9	1.914
Angiotensin II.	0.09	0.014
Angiotensin I.	0.05	0.060
Insulin (bovine)	0.02	0.115

Peptides have acceptable UV absorption at wavelengths below 220 nm. We chose 215 nm for detection. At this wavelength absorption is reasonably strong and the background noise is negligible. A mixture of bioactive peptides was separated and the detection limit estimated (Figure 3, Table II). Detection limits lie mainly in the 20–100 femtomole range. The relatively low sensitivity for oxytocin can be explained by its insufficient separation from Leu-enkephalin.

Although micropellicular columns were originally intended for the separation of biopolymers, fast and sensitive separations of solutes with low molecular mass (< 500) can be performed successfully on non-porous columns. Kovasil-C14 was chosen for these separations. According to the manufacturer [2] on Kovasil-C14 packing, which has a C_{14} coating, retention is ca 20 % greater than on Kovasil-H. On this low-surface-area packing material (ca 2 m^2 g^{-1}) retention is usually low and the column is best suited for the separation of mod-

Table III. Detection limits for water-soluble vitamins.

Compound	Detection limit at 270 nm		Absorption maximum	Detection absorption at maximum limit	
	(pmol)	(ng)	(nm)	(pmol)	(ng)
Ascorbic acid (Vitamin C)	1.40	0.250	248	0.900	0.158
Niacinamide (Vitamin B_3)	1.00	0.120	262	0.670	0.082
Adenine (Vitamin B_4)	0.160	0.022	260	0.110	0.002
Pyridoxine (Vitamin B_6)	7.00	1.180	292	4.60	0.780
Riboflavin (Vitamin B_2)	0.160	0.060	267	0.130	0.049
Thiamine (Vitamin B_1)	6.60	2.000	263	6.00	1.810

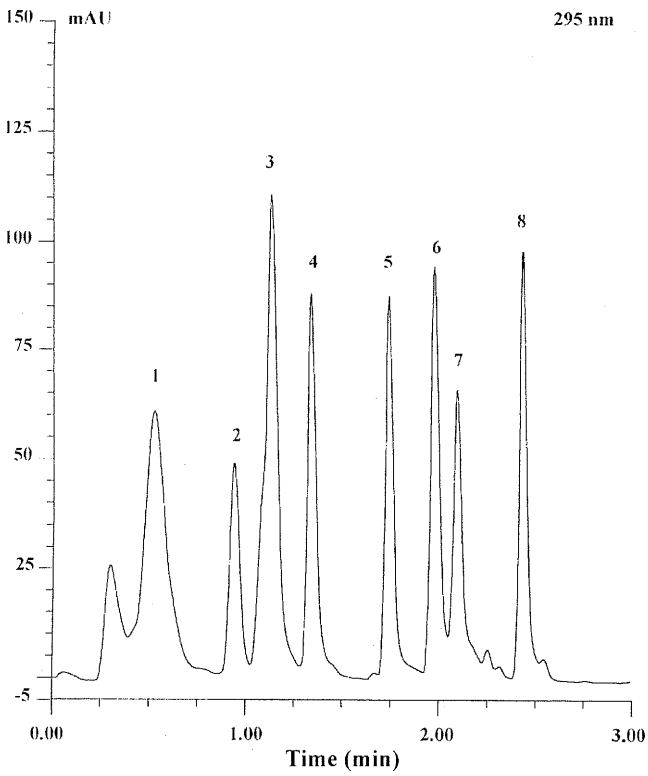


Figure 5

Separation of fat-soluble vitamins: 1, retinoic acid; 2, retinol (vitamin A); 3, retinal; 4, retinol acetate; 5, cholecalciferol (vitamin D_3); 6, tocopherol (vitamin E); 7, tocopherol acetate; 8, retinol palmitate. Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-C14; mobile phase A, 20:80 acetonitrile–0.05 M CH_3COONH_4; mobile phase B, 100 % acetonitrile; multilinear gradient from 10 % B to 100 % B in 2.0 min; flow rate 1.0 cm^3 min^{-1}; pressure 28 Mpa (at start); temperature 25 °C; detection 295 nm.

estly polar or apolar compounds. Polar compounds can often be analysed as ion-pairs.

An example of a quick ion-pair separation is the analysis of water-soluble vitamins (Figure 4). The separation of water-soluble vitamins is difficult because acidic *and* basic compounds must be separated in one run. A gradient system was chosen such that not only did the eluent power increase during the separation, but the mobile phase which was slightly acidic at the beginning, also became slightly basic during the run. The separation required 1.1 min at room temperature. The sensitivity of the separation depends very much on the UV absorption of the analytes. The 270 nm detection wavelength chosen is an acceptable compromise for this separation. In Table III the detection limits are summarized at 270 nm and at the absorption maximum for each compound. When detection is performed for every compound at optimum wavelength (e. g. using diode-array detection), detection limits are in the femtomole range. When our results are compared with recent literature data [16–18] the analyses are 10–100 times faster and the detection limits more than ten times better. The peak height was linearly dependent on the amount of sample from the detection limit to ca 10 nanomol, an amount at the approximate upper limit of the measurement range of the detector (2000 mAU). (Because of the low solubility of riboflavin the largest amount of this substance injected was only 0.2 nanomol).

Laboratories world-wide are involved in the separation of fat-soluble vitamins [19–21]. These compounds and their oxidation products can be separated with an acetonitrile–ammonium acetate gradient (Figure 5). (If the retinoic acid is omitted, water can be used instead of ammonium acetate solution.) The detection limits measured at 295 nm and at the absorption maxima are presented in Table IV. The analysis time is one tenth of that measured on porous stationary phases (or even less). Detection limits were 5–100 times lower with the new method.

The separation of some alkaloids was performed both at 25 °C and at 50 °C (Figures 6 and 7). These rather basic compounds can be successfully separated by use of an acidic mobile phase additive [22]. In this work 0.1 % trifluoroacetic acid was chosen as mobile phase modifier. The pH of the mobile phase under these conditions is ca 1.9. The low pH does not affect the stability of our phases, which is very high in trifluoroacetic acid-containing mobile phases [8]. The sensitivity of the separation depends very much on the analysis temperature. If separations are performed at 50 °C rather than 25 °C, not only is the separation time reduced from 1.3 to 0.85 min, but the sensitivity also increases – ca fivefold. The analysis time was approximately one tenth to one twentieth

Table IV. Detection limits for fat-soluble vitamins.

Compound	Detection limit at 295 nm		Absorption maximum	Detection absorption at maximum limit	
	(pmol)	(ng)	(nm)	(pmol)	(ng)
Retinoic acid	0.220	0.066	337	0.062	0.019
Retinol (Vitamin A)	0.080	0.023	325	0.042	0.012
Retinal	1.00	0.280	383	0.250	0.071
Retinol acetate	0.060	0.020	325	0.031	0.010
Cholecalciferol (Vitamin D_3)	0.180	0.069	267	0.040	0.015
Tocopherol (Vitamin E)	2.00	0.860	295	2.00	0.862
Tocopherol acetate	1.10	0.520	285	0.190	0.090
Retinol palmitate	0.010	0.005	327	0.005	0.003

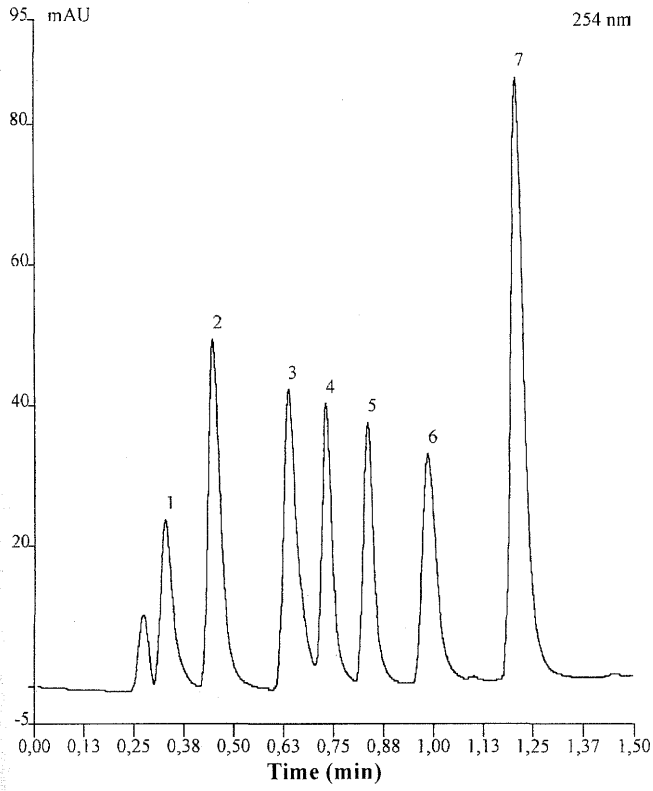


Figure 6
Separation of alkaloids at 25 °C: 1, morphine; 2, codeine; 3, ethylmorphine; 4, brucine; 5, α-methylmorphine; 6, cocaine; 7, narcotine. Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-C14; mobile phase A, water + 0.15 % TFA; mobile phase B, 30:70 acetonitrile-water + 0.15 % TFA; gradient from 13 % B to 23 % B in 0.2 min, then from 23 % B to 100 % B in 2.0 min; flow rate 1.0 cm^3 min^{-1}; pressure 30 Mpa (at start); temperature 25 °C; detection 254 nm.

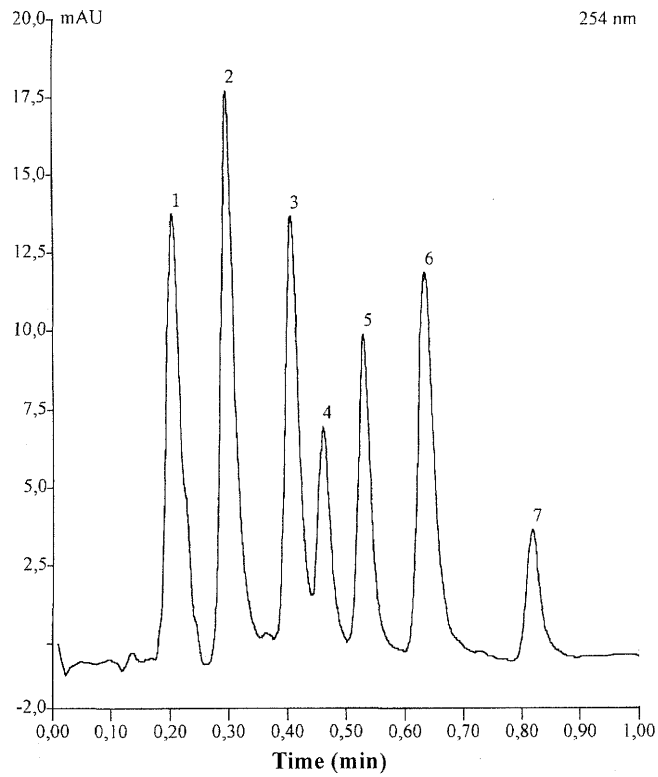


Figure 7
Separation of alkaloids at 50 °C: 1, morphine; 2, codeine; 3, ethylmorphine; 4, brucine; 5, α-methylmorphine; 6, cocaine; 7, narcotine. Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-C14; mobile phase A, water + 0.15 % TFA; mobile phase B, 30:70 acetonitrile-water + 0.15 % TFA; linear gradient from 5 % B to 100 % B in 2.05 min; flow rate 1.4 cm^3 min^{-1}; pressure 28 Mpa (at start); temperature 50 °C; detection 254 nm.

that recently published in the literature [22]. The detection limit at 50 °C for narcotine, codeine, cocaine, and brucine is ca 1 femtomol (Table V). The increase of sensitivity at 50 °C can be explained by the lower retention of the samples and the remarkable reduction in baseline noise compared with that measured at ambient temperature. At higher temperatures the noise level increased again, and so detection was most sensitive at ca 50 °C.

The calibration plots (peak height measurement) for the alkaloids are found to be linear from the detection limit to the picomol level, three orders of magnitude or more.

For the separation of optical isomers cyclodextrins are frequently used as mobile-phase additives [16, 23, 24]. We separated D,L-norgestrel (a common anticoncipient drug) by using γ-cyclodextrin as mobile-phase modifier (Figure 8). The detection limit for each enantiomer was

Table V. Detection limits for selected alkaloids.

Compound	Ambient temperature		50 °C	
	(pmol)	(ng)	(pmol)	(ng)
Morphine	0.050	0.013	0.005	0.0015
Codeine	0.009	0.003	0.0007	0.0003
Ethylmorphine	0.019	0.006	0.004	0.001
Brucine	0.007	0.003	0.0004	0.0002
α-Methylmorphine	0.020	0.006	0.004	0.001
Cocaine	0.009	0.003	0.0009	0.0003
Narcotine	0.007	0.003	0.0006	0.0002

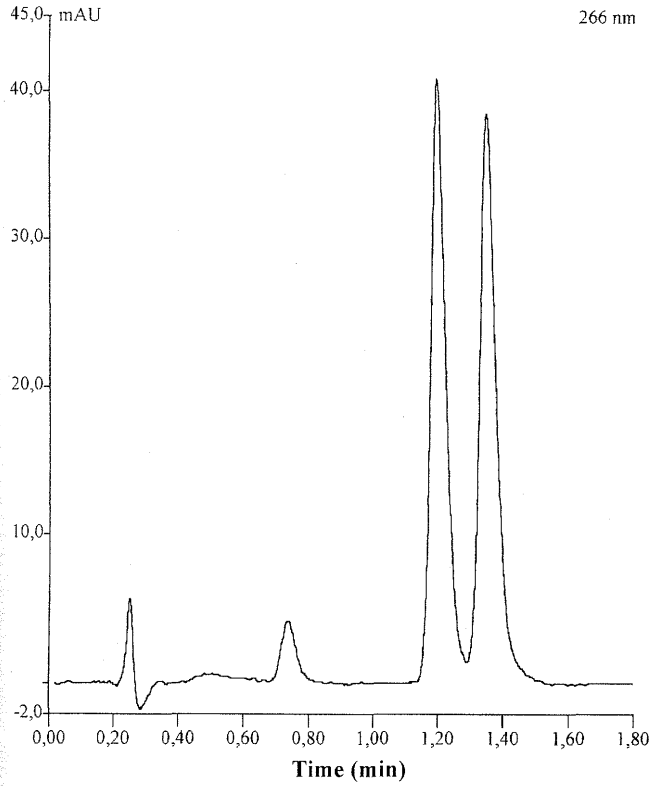


Figure 8
Separation of D,D-norgestrel. Column, 33 mm × 4.6 mm Kovasil-C14; mobile phase A, 1 mmol dm^{-3} γ-cyclodextrin in water; mobile phase B, 1 mmol dm^{-3} γ-cyclodextrin in 50:50 acetonitrile-water; linear gradient from 32 % B to 42 % B in 5 min; flow rate 1.2 cm^3 min^{-1}; pressure 32 Mpa (at start); temperature 25 °C; detection 266 nm.

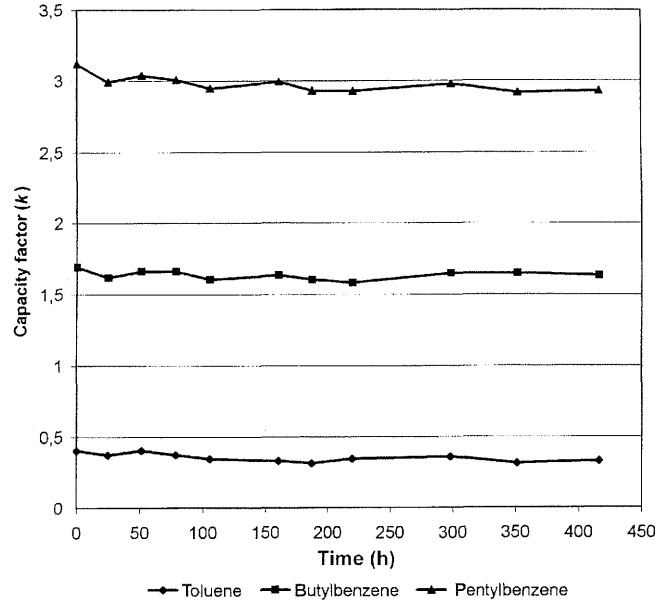


Figure 9
Results from stability testing of Kovasil-H at pH = 8.5.

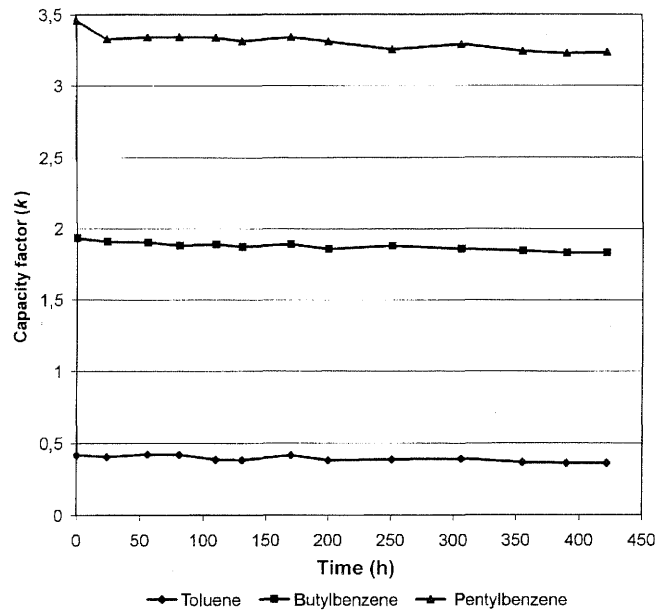


Figure 10
Results from stability testing of Kovasil-C14 at pH = 8.5

found to be 8 pmol. The relatively low sensitivity can be explained by the low light absorbance of the cyclodextrin complexes.

The hydrolytic stability of a stationary phase is essential for long-term reproducible analyses. Tests on the hydrolytic stability of Kovasil materials when used with acidic mobile phases have been published elsewhere [8]. In this work a similar test was performed under basic conditions. A column was treated with 1:1 acetonitrile–tris buffer mobile phase at pH 8.5 and 80 °C. The column performance was checked periodically for the separation of toluene, butylbenzene, and pentylbenzene. After ca 420 h practically no loss in the quality was observed. In this time 39 L mobile phase was pumped through the column, equivalent to 210 000 column volumes (Figures 9 and 10).

Conclusion

Non-porous (micropellicular) reversed-phase packings can be successfully exploited in HPLC not only for the

analysis of biopolymers (the traditional field of use of non-porous adsorbents), but also for the separation of common organic substances with molecular masses between 100 and 500. Use of commercial (unmodified) HPLC equipment (pumps, injectors, UV detectors) and gradient elution resulted in femtomol sensitivity. Despite the low surface area, relatively high (picomole) loadability (tested only for water-soluble vitamins and alkaloids) can be achieved.

Acknowledgement

This research was supported by the Hungarian National Research Fund (OTKA) Grant No. T 023101 which is gratefully acknowledged.

References

[1] *K. K. Unger, G. Gilge, J. N. Kinkel, M. T. W. Hearn,* J. Chromatogr. **359,** 61 (1986).
[2] Kovasil Data Folder, Chemie Uetikon AG 1998.
[3] Micra Scientific, Technical Bulletin 1997.
[4] *J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson,* Anal. Chem. **69,** 983 (1997).
[5] *D. Chollet, E. Castella, P. Combe, V. Arnera,* J. Chromatogr. **683,** 237 (1996).
[6] *H. Chen, C. Horvath,* Anal. Methods Instrum. **1,** 213 (1993).
[7] *H. Chen, C. Horvath,* J. Chromatogr. **705,** 3 (1995).
[8] *E. Kováts, L. Jelinek R. Ohmacht,* EP 693314 A1 96.01.12.
[9] *R. Ohmacht, I. Kiss,* Chromatographia **42,** 595 (1996).
[10] *R. M. Seifar, W. Th. Kok, J. C. Kraak, H. Poppe,* Chromatographia, **46,** 131 (1997).
[11] *H. Itoh, T. Kinoshita, N. Nimura,* J. Liq. Chromatogr. **16,** 809 (1993).
[12] *W.-C. Lee, C.-Y. Chuang,* J. Chromatogr. **721,** 31 (1996).
[13] *K. Štulik, V. Pacáková, J. Suchánková, H. Claessens,* Anal. Chim. Acta **352,** 1 (1997).
[14] *H. Moriyama, M. Anegayama, Y. Kato,* J. Chromatogr. **729,** 81 (1996).
[15] *Y. Kato, S. Nakatani, T. Kitamura, Y. Yamasaki, T. Hashimoto,* J. Chromatogr. **502,** 416 (1990).
[16] *K. Kimura, K. Kanehira, K. Yokoi,* J. Chromatogr. **722,** 295 (1996).
[17] *S. Albalá-Hurtado, M. T. Veciana-Nogués, M. Izquiedro-Pulido, A. Mariné-Font,* J. Chromatogr. **778,** 247 (1997).
[18] *C. Nsengiyuma, J.2O. De Beer, W. Van de Wauw, A. J. Vlietinck, F. Parnemtier,* Chromatographia **44,** 634 (1997).
[19] *S. Albalá-Hurtado, S. Novella-Rodríguez, M. T. Veciana- Nogués, A. Mariné-Font,* J. Chromatogr. **778,** 243 (1997).
[20] *J. Brown Thomas, M. C. Kline, S. B. Schiller, P. M. Ellerbe, L. T. Sniegoski, D. L. Duewer, K. E. Sharpless,* J. Anal. Chem **356,** 1 (1996).
[21] *R. Andreoli, M. Careri, P. Manini, G. Mori, M. Musci,* Chromatographia **44,** 605 (1997).
[22] *L. Krenn, S. Glantschnig, U. Sorgner,* Chromatographia **47,** 21 (1998).
[23] *J. Szemán, K. Ganzler, A. Salgó, J. Szeitli,* J. Chromatogr. **728,** 423 (1996).
[24] *I. Ciucanu,* J. Chromatogr. **727** (1996) 195.

Received: Nov 9, 1998
Revised manuscript received: Jan 25, 1999
Accepted: Feb 12, 1999

Bioaktív vegyületek gyors és nagyérzékenységű folyadékkromatográfiás elválasztása nemporózus állófázison

OHMACHT Róbert, BOROS Borbála, KOVÁCS Krisztina
POTE Orvosi Kémiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12.

KISS Ibolya
JPTE Analitikai és Szerkezeti Kémiai Tanszék, 7624 Pécs, Ifjúság útja 6.

A folyadékkromatográfiában mind gyakrabban alkalmazzák a 3μm-nél kisebb szemcseátmérőjű, nemporózus, monodiszperz, fordított fázisú tölteteket. Előbb biopolimerek gyors elválasztására [1-8, 16], majd a kis molekulatömegű szerves vegyületek analízisére is elterjedt a nemporózus töltetek használata [8-17]. A különböző típusú vegyületek elválasztásához különbözőképpen borított állófázisokat javasolnak. A kis molekulatömegű (M<500) anyagok elválasztására a hosszú (C_{14}, C_{18}), míg a biopolimerek analízisére a rövid (C_6) láncú, alifás szénhidrogéncsoportokkal borított szilikagéltöltet tűnik optimálisnak [7,8].

A nyolcvanas évek közepén Unger [1] javasolta a kis szemcseméretű (d_p<3μm) nemporózus, fordított fázisú tölteteket, elsősorban biopolimerek elválasztására. A kis szemcseméretű, nemporózus töltetek fő előnye a kis anyagátadási ellenállás miatt elérhető rövid elemzési idő és a nagy érzékenység [4]. A kis szemcseméretből adódóan az oszlopon – különösen nagyobb áramlási sebességeknél – a nyomásesés magas, ezért többnyire a kisebb viszkozitású acetonitril-víz eluensek előnyösebbek, a metanol-víz eluensrendszereket ritkábban alkalmazzák. Az analízis hőmérsékletének emelésével (ami viszkozitáscsökkenést eredményez), nagyobb áramlási sebességen még érzékenyebb elválasztások valósíthatók meg. A töltetek kémiai stabilitása mind savas, mind lúgos körülmények között igen jó. Munkánkban bemutatjuk e töltetek alkalmazhatóságát fehérjék, peptidek, alkaloidok, víz- és zsíroldékony vitaminok és aminosavak gyors és nagyérzékenységű elemzésére. Az elválasztások kimutatási határa sok esetben a *femtomol* tartományba esik. (Kimutatási határként azt a mintamennyiséget fogadtuk el, mely a háromszoros jel/zaj viszonynak felel meg.) Természetesen a mért kimutatási határértékek csak tájékoztató jellegűek, hiszen jelentősen függnek az alkalmazott berendezésektől (injektor, detektorcella stb.) is. Az alkalmazott folyadékkromatográf jó átlagos minőségű, így az általunk mért értékek elérhetők, vagy túlszárnyalhatók más berendezésekkel is. Tapasztalatunk szerint a mérhető legnagyobb anyagmennyiség esetenként nem az oszlop terhelhetőségétől függ, hanem az alkalmazott UV detektor felső méréshatárától. Az igen kis csúcstérfogatok miatt az anyag koncentrációja a detektorban nagy, ezért a detektor optikai túlterhelése esetenként hamarább következik be, mint az oszlop túlterhelése.

Kísérleti rész

A vízoldékony vitaminok és az analgetikumok gyógyszerkönyvi minőségűek voltak, a zsíroldékony vitaminok, az alkaloidok, a PTH-aminosavak, az 1-heptán-szulfonsav Na-sója, az 1-oktán-szulfonsav Na-sója, az ammónium-acetát, a trifluor-ecetsav (TFA), heptafluor-vajsav (HFBA) valamint a trietil-amin Fluka és Sigma gyártmányú volt. A HPLC minőségű acetonitrilt a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyol) cég szállította. A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő.

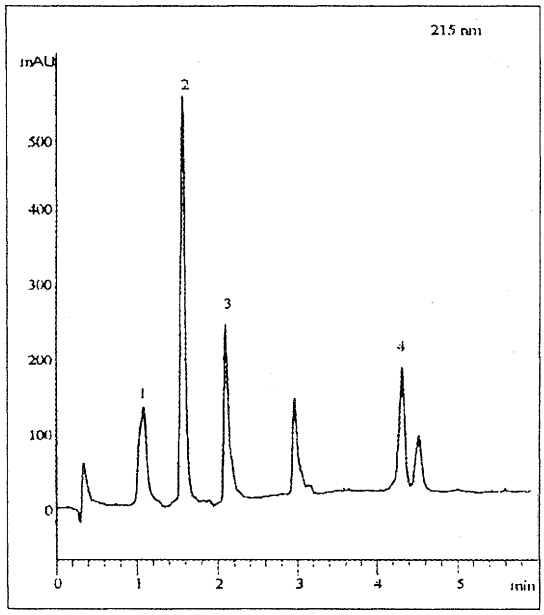
Az minták koncentrációja kb. 1 mg/ml volt. (A mintákat különböző arányú acetonitril/víz elegyben oldottuk, oldhatóságuktól függően). Általában 0,5-2,0 μl közötti mintamennyiséget injektáltunk.

A kromatográfiás elválasztásokat Gynkotek (Germering, NSZK) készülékkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA), 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfiás szabályozó és kiértékelő szoftverből állt. A kolonna állandó hőmérsékletét egy vízköpeny biztosította, melynek hőmérsékletét Grant W6 cirkulációs termosztáttal (Grant

Instruments, Cambridge, Anglia) szabályoztuk. A vízköpeny az oszlopon kívül az injektor-kolonna összekötő kapilláris kb. 20 cm-ét is temperálta. Folyadékkromatográfiás elválasztásainkat 33×4,6 mm-es KOVASIL-H és KOVASIL-C14 fordított fázisú oszlopon (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Svájc) végeztük.

Eredmények

A polipeptidek elválasztását KOVASIL-H állófázison végeztük, mely egy nagy tisztaságú, szilikagél alapú, nemporózus, monodiszperz, (d_p=1,5μm) apoláris töltet. Az apoláris borítás rövid, elágazó szénláncú alkilcsoportokat (dimetil-butil- csoportokat) tartalmaz. Ez az „ernyőszerűen" árnyékolt borítás a töltet stabilitásához nagy mértékben hozzájárul [7]. Az állófázist biopolimerek elválasztására fejlesztették ki. A pórusmentes állófázisok egyik előnye a fehérjék jó visszanyerhetősége (recovery). Ellenőrzését egy standard fehérjekeverék elválasztásával az

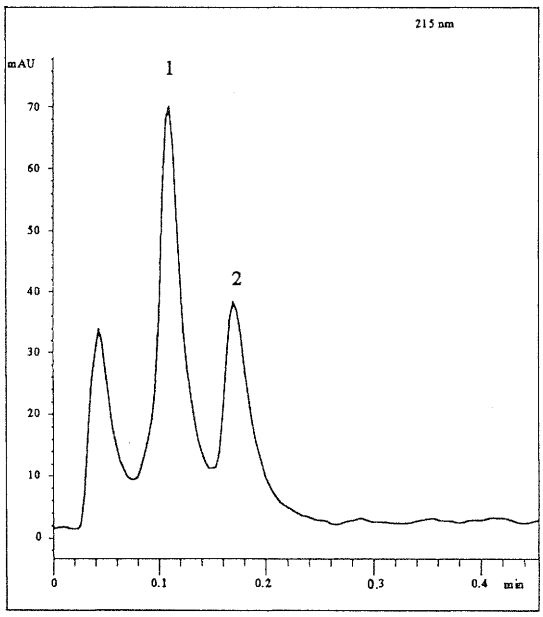


1.ábra:
Fehérjekeverék elválasztása

1. Ribonukleáz A, 2. Inzulin (humán), 3. Citokróm c (ló) 4. β-laktoglobulin
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-H
Gradiens elúció: 6% B → 42% B 6 perc
A: acetonitril/víz = 20/80 + 0,05% TFA
B: acetonitril/víz = 90/10 + 0,05% TFA
Áramlási sebesség: 1,0 $cm^3 \times min^{-1}$; Nyomás: 24 Mpa (indulásnál); Hőmérséklet: 25°C; Detektálás: 215 nm

1. táblázat Fehérjék visszanyerése

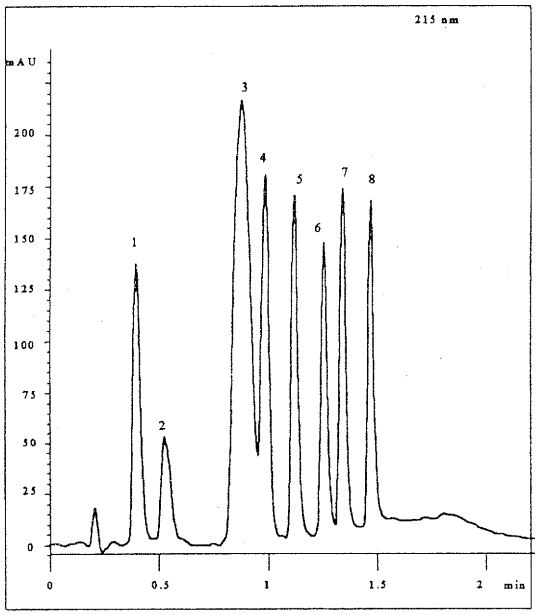
	Visszanyerés [%]
Ribonukleáz A	105
Inzulin (humán)	96
Citokróm (ló)	100
β-Laktoglobulin	104



2.ábra:
β-laktoglobulin B és A elválasztása

1. β-laktoglobulin B, 2. β-laktoglobulin A
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-H
Gradiens elúció: 34% B → 35% B 0,8 perc
A: acetonitril/víz = 10/90 + 0,12 TFA
B: acetonitril/víz = 90/10 + 0,12% TFA
Áramlási sebesség: 3,6 $cm^3 \times min^{-1}$; Nyomás: 32 Mpa (indulásnál); Hőmérséklet: 95°C; Detektálás: 215 nm

irodalomban [18,19] leírtak szerint végeztük (1. ábra, 1. táblázat). A gyakorlatilag teljes visszanyerés részben magyarázza az elválasztáshoz használt állófázis hosszú „élettartamát" is (nem kötődik a felülethez irreverzibilisen minta). Egy több mint másfél éve használatban lévő oszlopon β-laktoglobulin B és A elválasztását végeztük. A kritikus elválasztáshoz 12 másodperc volt szükséges 95°C hőmérsékleten (2. ábra). Egy bioaktív peptidekből összeállított tesztelegy elválasztását is kidolgoztuk elsősorban kimutatási határok vizsgálata céljából (3. ábra, 2. táblázat). A kimutatási határok jórészt a 20-100 femtomol tartományba esnek. (A detektálását 215 nm-en



3.ábra:
Bioaktív peptidek elválasztása

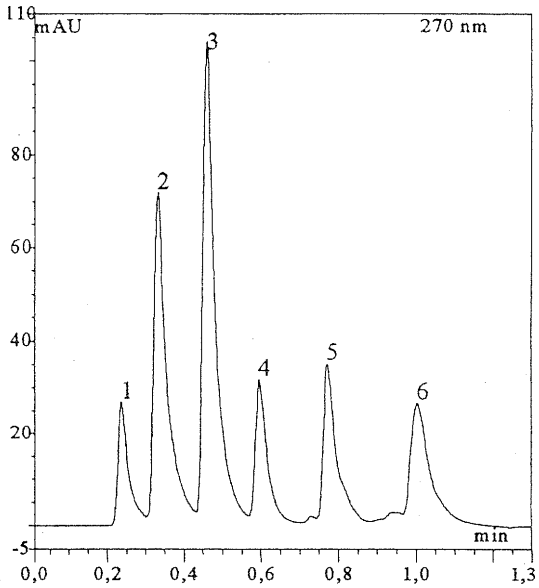
1. Metioin-enkefalin, 2. [Arg^8]-vazopresszin, 3 Leucin-enkefalin, 4. Oxitocin, 5. Angiotenzin II, 6. Angiotenzin I, 7. Szomatosztatin, 8. Inzulin (szarvasmarha)
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-H
Gradiens: lépcsős 12% B → 40% B 2,0 perc
A: acetonitril/víz = 2/98 + 0,10% TFA
B: acetonitril/víz = 90/10 + 0,10% TFA
Áramlási sebesség: 1,4 cm^3×min^{-1}; Nyomás: 36 Mpa (indulásnál); Hőmérséklet: 25°C; Detektálás: 215 nm

2. táblázat Peptidek kimutatási határa

	Kimutatási határ	
	[pmol]	[ng]
Metionin-enkefalin	0,09	0,052
[Arg^8]-vazopresszin	0,06	0,069
Leucin-enkefalin	0,12	0,065
Oxitocin	1,90	1,914
Angiotenzin II.	0,09	0,014
Angiotenzin I.	0,05	0,060
Inzulin (szarvasmarha)	0,02	0,115

végeztük, mert e hullámhossznál már viszonylag nagy a peptidek abszorpciója míg a háttérzaj még nem jelentős.) Az oxitocin viszonylagos kis érzékenységét a Leu-enkefalintól való nem teljes elválása magyarázza.

Kis molekulatömegű (M<500) vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztására a KOVASIL-C14 oszlopokat alkalmaztuk. A KOVASIL-C14 abban különbözik a KOVASL-H fázistól, hogy a szilikagél felületéhez C_{14}

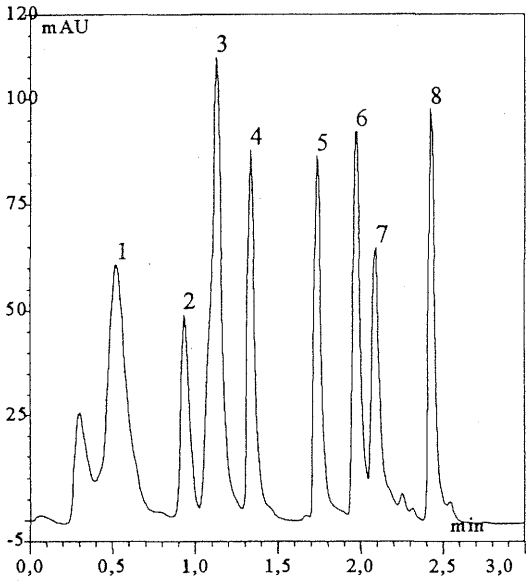


4.ábra
Vízoldékony vitaminok elválasztása

1. C-vitamin, 2. B_3-vitamin, 3. B_4-vitamin, 4. B_6-vitamin, 5. B_2-vitamin, 6. B_1-vitamin
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-C14
Gradiens: 0% B → 100% B 1,5 perc
A: 2,7 mmol×dm^{-3} Na-heptán-szulfonát + 0,5% jégecet
B: acetonitril + 0,3% trietil-amin
Áramlási sebesség: 1,2 cm^3×min^{-1}; Nyomás: 33 Mpa (indulásnál); Hőmérséklet: 25°C; Detektálás: 270 nm

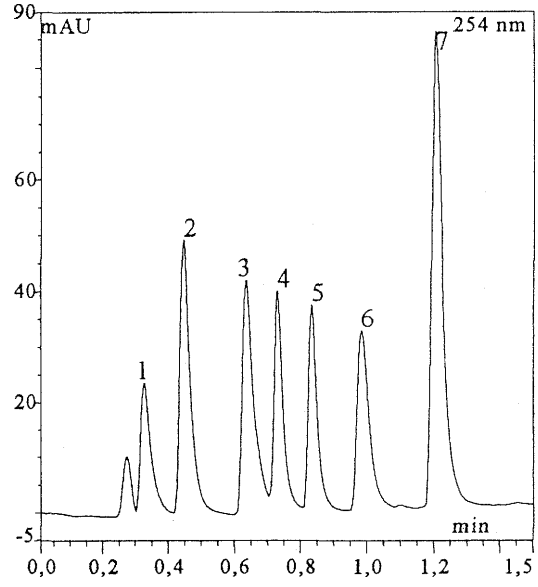
lánchosszúságú alifás szénhidrogéncsoportokat kötöttek. A retenciók kb. 20%-kal nagyobbak a KOVASIL-H oszlopon mért retenciókhoz képest [8]. A töltet főként kevésbé poláris vegyületek elválasztására alkalmas. Poláris mintákat gyakran ionpárok formájában lehet jól elválasztani.

A vízoldékony vitaminok közül a B_1, B_2, B_3, B_4, B_6 és C vitamin elemzését a 4. ábrán mutatjuk be. A szobahőmérsékleten végzett, 1,1 percen belüli elválasztást ionpár-kromatográfiával valósítottuk meg. Nehézséget jelentett, hogy az elválasztás során egyidejűleg jelen voltak savas és bázikus tulajdonsággal rendelkező vegyületek. Ezért a megfelelő eluensrendszer kiválasztásához kettős optimálásra volt szükség. Az oldószererősség változtatása mellett az eluens kémhatását is változtattuk az analízis során. Az elválasztás kezdetén a mozgófázis gyengén savas (az „A" eluens jégecetet tartalmaz), a végén az eluens kémhatása már gyengén bázikus (a „B" eluens trietil-amint tartalmaz). A vízoldékony vitaminok kimutatási határait mutatja 3. Táblázat. A második és harmadik oszlop azon a hullámhosszon mért kimutatási határértékeket tartalmazza, ahol valamennyi komponens kielégítő érzékenységgel



5.ábra:
Zsíroldékony vitaminok elválasztása

1. A-vitamin-sav, 2. A-vitamin, 3. Retinal, 4. Retinol-acetát, 5. D_3-vitamin, 6. E-vitamin, 7. Tokoferol-acetát, 8. Retinol-palmitát
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-C14
Gradiens: lépcsős 10% B → 100% B 2 perc
A: acetonitril/ 0,05M ammónium-acetát = 20/80
B: 100% acetonitril
Áramlási sebesség: 1,0 $cm^3 \times min^{-1}$; Nyomás: 28 Mpa (indulásnál); Hőmérséklet: 25°C; Detektálás: 295 nm



6.ábra:
Alkaloidok elválasztása 25°C-on

1. Morfin, 2. Kodein, 3. Etil-morfin, 4. Brucin, 5. α-Metil-morfin, 6. Kokain, 7. Narkotin,
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-C14
Gradiens: 13% B → 23% B 0,2 perc
23% B → 100 % B 2,0 perc
A: víz + 0,15% TFA
B: acetonitril/víz = 30/70 + 0,15% TFA
Áramlási sebesség: 1,0 $cm^3 \times min^{-1}$; Nyomás: 30 Mpa (indulásnál); Hőmérséklet: 25°C; Detektálás: 254 nm

mérhető. A negyedik oszlopban a komponensek abszorpciós maximumának hullámhosszát, míg az utolsó oszlopokban az ott mért kimutatási határértékeket tüntettük fel, melyek jórészt a femtomol nagyságrendbe estek. Úgy találtuk, hogy a mintamennyiség / csúcsmagasság alapján mért linearitás a detektálási határtól kb.10 nanomolig terjed. (A riboflavinból - kis old-hatósága miatt - a legnagyobb injektálható mennyi-ség csak 0,2 nanomol volt.)

A zsíroldékony vitaminok folyadékkromatográfiás analízise (porózus tölteteken is) gyakori elválasztási feladat pl. [11, 20-22]. Tapasztalatunk szerint, ha az A-vitamin és származékai folyadékkromatográfiás analíziséhez víz-acetonitril gradienst választunk, akkor az A-vitamin-sav nem retardálódik, hanem a fronttal eluálódik. Ezt elkerülendő célszerű az „A" eluensbe kevés ammónium-acetátot adagolni. A 295 nm hullámhosszon mindegyik vegyület kielégítő érzékenységgel detektálható, azonban az abszorpciós maximumon történő méréssel a módszer érzékenysége tovább fokozható (4. táblázat).

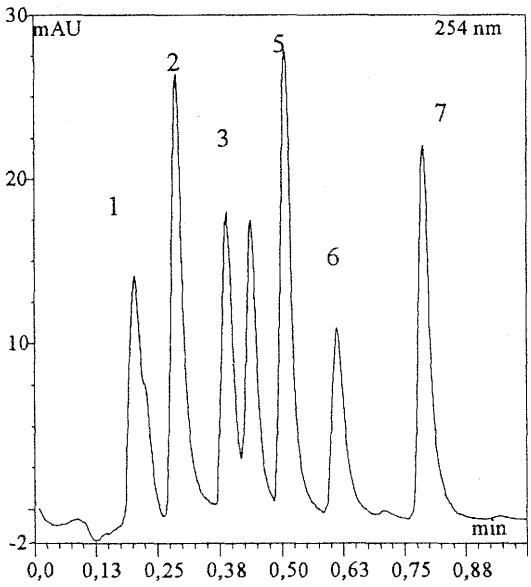
Az alkaloidok elválasztása bázikus jellegük miatt nem könnyű feladat fordított fázisú, szilikagél alapú rendszerekben. Sikeres elválasztásuk érdekében gyakran savas eluenseket alkalmaznak [23]. Két különböző hőmérsékleten (25°C-on és 50°C-on) optimalizáltuk az elválasztást (6. és 7. ábra). Az eluensbe 0,1% trifluor-ecetsavat adagoltunk, mely a pH-t kb. 1,9-re állította be. Az trifluor-ecetsav az állófázis stabilitását károsan nem befolyásolta [8]. Az analízishőmérséklet változtatása jelentősen befolyásolja az elválasztás érzékenységet és sebességét. A szobahőmérsékleten végzett elválasztáshoz 1,3 perc volt szükséges, míg 50°C-on az analízisidő 0,85 percre csökkent. Eljárásunk a porózus tölteteken végzett

3. táblázat Vízoldékony vitaminok kimutatási határa

	Kimutatási határ 270 nm-nél		Abszorpciós maximum (nm)	Kimutatási határ max. absz.-nál	
	[pmol]	[ng]		[pmol]	[ng]
Aszkorbinsav (C-vitamin)	1,40	0,250	248	0,90	0,158
Niacinamid (B_3-vitamin)	1,00	0,120	262	0,67	0,082
Adenin (B_4-vitamin)	0,16	0,022	260	0,11	0,002
Piridoxin (B_6-vitamin)	7,00	1,180	292	4,60	0,780
Riboflavin (B_2-vitamin)	0,16	0,060	267	0,13	0,049
Tiamin (B_1-vitamin)	6,60	2,000	263	6,00	1,810

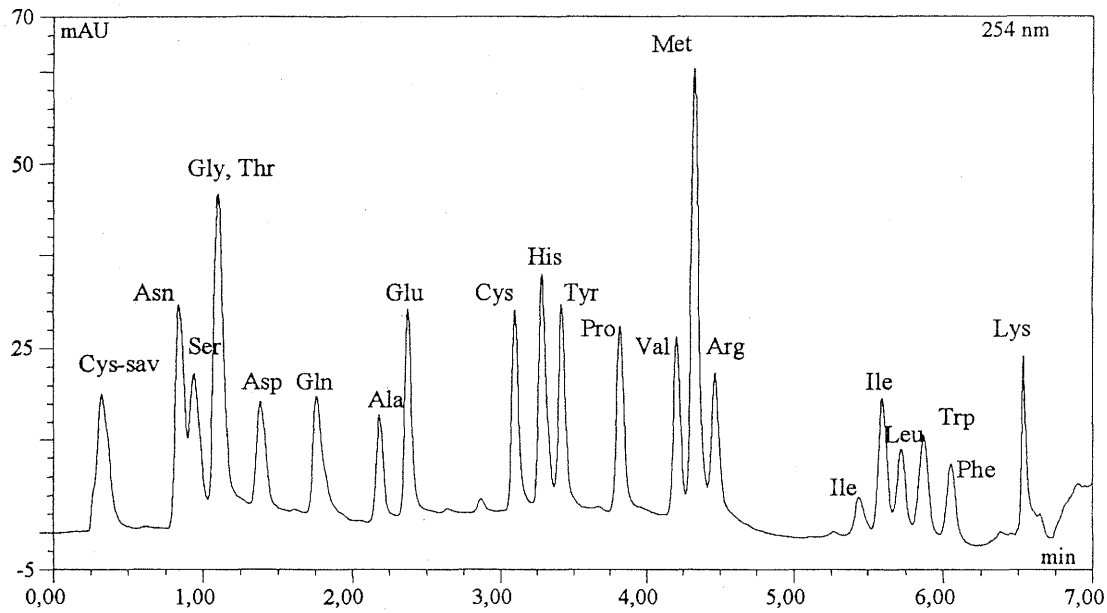
4. táblázat Zsíroldékony vitaminok kimutatási határa

	Kimutatási határ 295 nm-nél		Abszorpciós maximum (nm)	Kimutatási határ max. absz.-nál	
	[pmol]	[ng]		[pmol]	[ng]
A-vitamin-sav	0,22	0,066	337	0,062	0,019
Retinol (A-vitamin)	0,08	0,023	325	0,042	0,012
Retinal	1,00	0,280	383	0,250	0,071
Retinol-acetát	0,06	0,020	325	0,031	0,010
Kolekalciferol (D_3-vitamin)	0,18	0,069	267	0,040	0,015
Tokoferol (E-vitamin)	2,00	0,860	295	2,00	0,860
Tokoferol-acetát	1,10	0,520	285	0,190	0,090
Retinol-palmität	0,01	0,005	327	0,005	0,003



7. ábra
Alkaloidok elválasztása 50°C-on

1. Morfin, 2. Kodein, 3. Etil-morfin, 4. Brucin, 5. α-Metil-morfin, 6. Kokain, 7. Narkotin
Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-C14
Gradiens: 5% B → 100% B 2,05 perc
A: víz + 0,15% TFA
B: acetonitril/víz = 30/70 + 0,15% TFA
Áramlási sebesség: 1,0 $cm^3 \times min^{-1}$
Nyomás: 28 Mpa (indulásnál)
Hőmérséklet: 50°C
Detektálás: 254 nm



8. ábra
PTH aminosavak elválasztása

Oszlop: 33×4,6 mm Kovasil-C14
Gradiens: 0% B → 12% B 3,55 perc
12% B → 20% B 3,00 perc
20% B → 100% B 0,01 perc
100% B 2,0 percig
A: víz + 0,1% HFBA
B: acetonitril/víz = 90/10 + 0,8% HFBA
Áramlási sebesség: 1,0 $cm^3 \times min^{-1}$
Nyomás: 32 Mpa (indulásnál)
Hőmérséklet: 25°C;
Detektálás: 254 nm

elválasztásokhoz képest 10-20 szoros időmegtakarítást jelentett [23]. Feltűnő, hogy a magasabb hőmérsékleten végzett elválasztások közel egy nagyságrenddel érzékenyebbek (5. táblázat). Ezt a rövidebb analízisidőn kívül a csúcsok szimmetriájának javulása és a detektor zajszintjének csökkenése magyarázza.

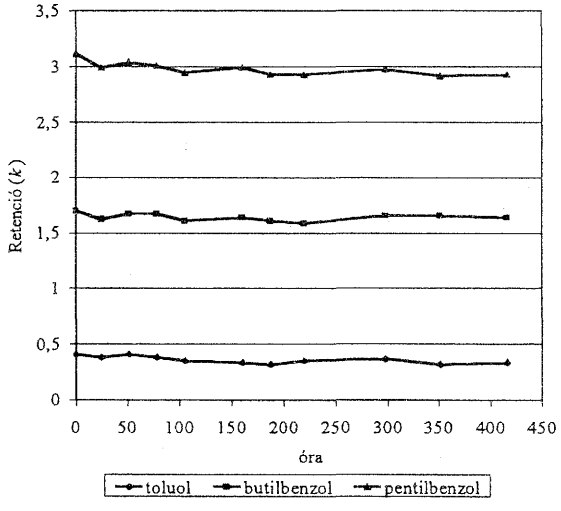
5. táblázat Alkaloidok kimutatási határa

	25°C-on		50°C-on	
	[pmol]	[ng]	[pmol]	[ng]
Morfin	0,050	0,013	0,0050	0,0015
Kodein	0,009	0,003	0,0007	0,0003
Etil-morfin	0,019	0,006	0,0040	0,0010
Brucin	0,007	0,003	0,0004	0,0002
Metil-morfin	0,020	0,006	0,0040	0,0010
Kokain	0,009	0,003	0,0009	0,0003
Narkotin	0,007	0,003	0,0006	0,0002

Az intenzív folyadékkromatográfia alkalmas módszer aminosav-származékok elválasztására [24-29]. KOVASIL-C14 állófázison a fiziológiásan legfontosabb 21 aminosav feniltiohidantoin-származékának (PTH-aminosav) analízisét végeztük el. Az általunk kidolgozott módszerrel 7 perc körüli időráfordítással megvalósítható az elválasztás. Az elválasztást heptafluor-vajsav (HFBA) ionpárképző segítségével végeztük (8. ábra), ami jelentősen növelte a minták hidrofób tulajdonságát, az elválasztás hatékonyságát. Egy komponens pár - a glicin és treonin - kivételével a többi aminosav jól elválasztható. A PTH-aminosavak kimutatási határa 80-170 femtomol között van.

Vizsgáltuk az alkalmazott szilikagél alapú töltetek kémiai stabilitását. A Kovasil-töltetek savas eluensben végzett stabilitásvizsgálata az

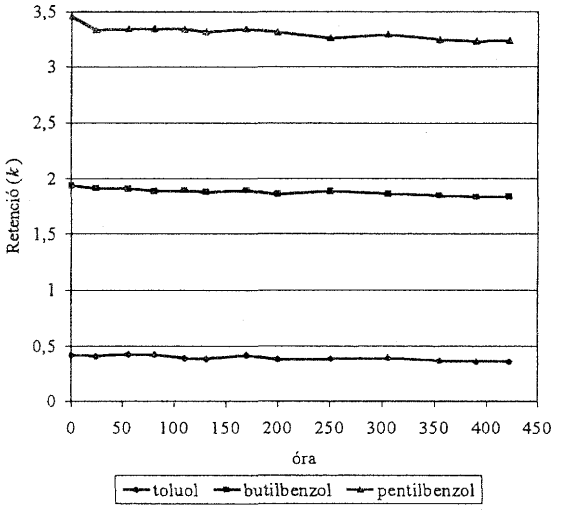
irodalomban megtalálható [8]. A jelen munkában bázikus eluensben végeztünk stabilitás-vizsgálatokat. A kolonnát 80°C-ra termosztáltuk és folyamatosan áramoltattuk át a 8,5 pH-jú eluenst (acetonitril:0,2M trisz-puffer = 1:1). Időközönként a kolonna stabilitását egy egyszerű izokratikus elválasztással vizsgáltuk. (Az ellenőrzés acetonitril:víz = 1:1 eluensben toluol, butil-benzol, pentil-benzol elválasztásával történt). A „fárasztást" 420 órán át végeztük. Ez alatt az idő alatt 39 liter, azaz 210 000 kolonnatérfogatnyi eluenst nyomtunk át az oszlopon, miközben a töltet stabil maradt (9., 10. ábra).



9.ábra
Kovasil-H oszlop stabilitásteszte pH=8,5-nél
(A stabilitásvizsgálat körülményeit lásd a szövegben.)

Összefoglalás

Munkánk során nemporózus, szilikagél alapú hidrofób állófázisokat alkalmaztunk biopolimerek és kis móltömegű (100-500 dalton) vegyületek gyors elválasztására. A mérésekhez használt minták kiválasztásánál olyan vegyületcsoportokat részesítettük előnyben, amelyek az élettudományokban, az orvos-biológiai kutatásokban és a klinikai analízisekben nagy jelentőséggel bírnak (peptidek, fehérjék, víz- és zsíroldékony vitaminok, alkaloidok, aminosavak). A rövid oszlopokkal (33×4,6 mm), rutin folyadékkromatográfiás berendezéssel, gradiens elúciós technika alkalmazásával, gyors és nagy érzékenységű elválasztásokat értünk el, gyakran femtomol kimutatási határokkal. Bár a töltet



10.ábra
Kovasil-C14 oszlop stabilitás tesztje pH=8,5-nél
(A stabilitásvizsgálat körülményeit lásd a szövegben.)

fajlagos felülete kicsi, az oszlopok jól terhelhetők (csak a vízoldékony vitaminokra és az alkaloidokra vizsgáltuk).

High speed, high sensitivity separation of biactive compounds by HPLC on non-porous stationary phases. *R. Ohmacht, B. Boros, K. Kovács*

In the present work non-porous reversed phase packings were employed for the successful HPLC separation of biopolymers (a traditional field of non-porous adsorbents), and for the separation of low molecular mass substances. These materials are of high importance in the life sciences and/or clinical analysis (peptides, proteins, water- and fat-soluble vitamins, alkaloids, amino acids). Using short columns (33 x 4.6 mm), commercial HPLC equipment (pump, injector, detector) and gradient elution technique, sensitivities in the femtomol range were achieved. Despite the low surface area remarkably high loadabilities - in the picomol range (tested for water soluble vitamins and alkaloids) - were measured.

Köszönetet mondunk az *Országos Tudományos Kutatási Alapnak* (OTKA T 023101) munkánkhoz nyújtott segítségéért, valamint *Jelinek Lászlónak a Chemie Uetikon* cégtől, hogy a vizsgálatokhoz a KOVASIL-H és KOVASIL-C14 oszlopokat rendelkezésünkre bocsátotta.

Irodalom

[1] K.K.Unger, G.Gilge, J.N.Kinkel, M.T.W.Hearn: J.Chromatogr. *359*. 61. 1986.
[2] K. Kalghatgi, Cs. Horváth: J. Chromatogr. *443*. 343. 1988.
[3] K. Kalghatgi, Cs. Horváth: in Modern Methods in Protein Sequence Analysis: Springer, p. 248. 1989.
[4] H.Chen, C.Horvath: J. Chromatogr. *705*. 3. 1995.
[5] R.Ohmacht, I. Kiss: Chromatographia, *42*. 595. 1996.
[6] Ohmacht R., Kiss I.: Magy. Kém. F., *103*. 506. 1997.
[7] E.Kovats, L.Jelinek, R.Ohmacht: EP 693314 A1 96.01.12.
[8] Kovasil Data Folder, Chemie Uetikon AG 1998.
[9] Micra Scientific, Technical Bulletin 1997.
[10] J.E.MacNair, K.C.Lewis, J.W.Jorgenson: Anal. Chem., *69*. 983. 1997.
[11] D.Chollet, E.Castella, P.Combe, V.Arnera: J.Chromatogr. *683*. 237. 1996.
[12] H.Chen, C.Horvath: Anal. Methods. Instrum., *1*. 213. 1993.
[13] R.M.Seifar, W.Th.Kok, J.C.Kraak, H.Poppe: Chromatographia, *46*. 131. 1997.
[14] H.Itoh, T.Kinoshita, N.Nimura: J. Liq. Chromatogr., *16*. 809. 1993.
[15] W-C.Lee, C-Y.Chuang: J. Chromatogr., *721*. 31.1996.
[16] K.Štulik, V.Pacáková, J.Suchánková, H.Claessens: Anal.Chim.Acta, *352*. 1. 1997.
[17] R.Ohmacht, B.Boros, I.Kiss: Chromatographia, *50*. 75. 1999.
[18] H.Moriyama, M.Anegayama, Y.Kato: J. Chromatogr., *729*. 81. 1996.
[19] Y.Kato, S.Nakatani, T.Kitamura, Y.Yamasaki, T.Hashim: J.Chromatogr., *502*. 416. 1990.
[20] S.Albalá-Hurtado, S. Novella-Rodríguez, M.T.Veciana-Nogués, A.Mariné-Font: J.Chromatogr., *778*. 243. 1997.
[21] J. Brown Thomas, M.C.Kline, S.B.Schiller, P.M.Ellerbe, L.T.Sniegoski, D.L.Duewer, K.E.Sharpless: J.Anal.Chem., *356*. 1. 1996.
[22] R.Andreoli, M.Careri, P.Manini, G.Mori, M.Musci: Chromatographia, *44*. 605. 1997.
[23] L.Krenn, S.Glantschnig, U.Sorgner: Chromatographia, *47*. 21. 1998.
[24] B.Blomback, M. Blomback, P.Edman, B.Hessel: Biochim. Biophys.Acta, *115*. 371. 1966.
[25] M.Hanui, C.Acklin, W.C.Kenney, M.F.Rohde: Int. J. Peptide Protein Res., *43* 81. 1994.
[26] F.Lottspeich: J. Chromatogr., *326*. 321. 1985.
[27] Y.Kurosu, K.Murayama, N.Shindo, Y.Shisa, N.Ishioka: J. Chromatogr., *752*. 279. 1996.
[28] R.L.Heinrikson, S.C.Meredith: Anal. Biochem., *136*. 65. 1984.
[29] A.Vasanits, I.Molnár-Perl: J. Chromatogr., *832*. 109. 1999.

Pécs, POTE Orvosi Kémiai Intézet
Érkezett: 1999. VII. 5.
Közlésre elfogadtuk: 1999. X. 15.

Effect of Pressure on Solute Capacity Factor in HPLC Using a Non-Porous Stationary Phase

R. Ohmacht* / B. Boros

Institute of Medical Chemistry, Pécs University, Szigeti út 12, 7624 Pecs, Hungary

Key Words

Column liquid chromatography
Non-porous stationary phases
Solute retention
Pressure influence of capacity factor

Summary

The pressure applied in liquid chromatography (LC) can influence the capacity factor of analytes. Using commercial equipment, column (33 × 4.6 mm) and 1.5 μm non-porous, tetradecyl (C_{14}) coated silica particles, a moderate but significant change in the capacity factor was observed with increasing pressure. Depending on the experimental conditions the relationship was found to be either linear or non-linear. In the latter case the retention increased at first, but later tended to decrease at still higher pressure. The results direct attention to the role of the pressure (and hence of flow rate and heat of friction) in determing capacity factors.

Introduction

The mobile phase in LC is generally considered to be incompressible. In spite of this pressure appears to have a significant effect upon the solute retention. Recently it has been found that pressure has a significant impact on retention in reversed-phase chromatography and in chiral separations [1–5]. Capacity factors increase at elevated pressures. All these studies were on capillary columns. More recently [6, 7] a linear increase of 30–50% in the capacity factor has been observed in reversed-phase LC in the pressure range of 0.1–500 MPa. Some earlier observations concerning this relationship can be found in [8–12]. In most of the cases an increase in retention was found, although Katz [5] reported a small decrease. It was also found that pressure can influence the sorption equilibrium processes in the column [13–16]. Except references [2] and [6], where a non-porous stationary phase was used, all experiments were carried out on porous ones. Martire [17] and Guiochon [12] have carried out fundamental theoretical work in this area. The mobile phase in the chromatographic column creates a not negligible amount of frictional heat [27–29] that also influences the retention of the substances being separated.

Nowadays, 1.5 μm silica-based reversed-phase, non-porous packings are extensively employed in different fields of HPLC [18–23]. Owing to the small particle size, the inlet pressure is usually in the range 15–35 MPa. Therefore it seems important to collect data on retention – pressure relationship. The aim of our work was to check the influence of pressure on solute retention under practical conditions, using commercial (manufacturer packed) columns with non-porous, silica-based, reversed-phase packings.

Experimental

Thiourea, toluene, ethylbenzene, buthylbenzene, pentylbenzene, phenol, acetophenone, N,N-diethylaniline and benzophenone were from Fluka (Buchs, Switzerland), HPLC-grade acetonitrile was from Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spain). Water was bidistilled in glass apparatus. Separations were carried out on a Gynkotek HPLC system comprising a 480 precision pump, a 170S diode array detector and Chromeleon chromatography, data system. A UZ-GT-MIC capillary flow detector cell (140 nL) from LC Packings was used. Samples were injected with an 8125 sample injection valve (Rheodyne, Cotati CA, USA). Separations were carried out on a 33 × 4.6 mm KOVASIL-LC14, reversed-phase column (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland). Constant column temperature was ensured using a water jacket, which enclosed the column and ca. 20 cm of the inlet capillary tubing to ensure proper heat exchange. The temperature was set using a Grant W6 circulating

Presented at Balaton Symposium on High Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 1–3, 1999

0009-5893/00 S-205-06 $ 03.00/0 © 2000 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

water bath (Grant Instruments, Cambridge, UK). The temperature at the column outlet was measured with a micro-thermocouple thermometer assembled in the Institute of Biophysics at our university. The micro-sensor was introduced directly into the column outlet via the PEEK outlet capillary tube.

Two separations were studied: i) Aromatic hydrocarbons (toluene, ethylbenzene, butylbenzene, pentylbenzene) were separated in acetonitrile – water, 40–60 eluent; ii) polar, acidic and basic samples (phenol, acetophenone, N,N-diethylaniline, benzophenone) were separated in acetonitrile – water, 13–87 eluent.

Separations were carried out at different flow rates at 25 °C and 60 °C respectively, in both cases.

The settings for altering the pressure were: i) raising the flow rate (the "common" way); ii) using a back-pressure regulator (constant flow rate at 0.3 mL min^{-1} and an adjustable valve behind the detector cell).

Discussion

The tests used in this work were a modification of the widely accepted "Engelhardt test" (which has been elaborated for porous stationary phases) [24–26]. Modifications due to the different retention behaviour of the non-porous packing were necessary (first, because of the relatively low retention). The non-polar (toluene, ethylbenzene, butylbenzene, pentylbenzene) and polar (phenol, acetophenone, N,N-diethylaniline, benzophenone) test mixtures were analysed separately using acetonitrile-water eluents of different compositions to achieve reasonable retentions. In both cases thiourea was used as an inert solute monitoring the flow-through time. To avoid the masking effect of accessible free silanol groups on the surface of the stationary phase the eluent did not contain any buffer or salt.

Calculation of the Average Pressure in the Column

The pressures indicated in the diagrams are *average values*. It is assumed that the pressure drop can be taken as linear across the length of the column:

$$P_{average} = (P_{inlet} + P_{outlet})/2 \quad (1)$$

In first case – pressure altered by changing the flow rate – where

$$P_{outlet} = P_{atmoshere} \approx 0 \quad (2)$$

$$P_{average} = P_{inlet}/2 \quad (3)$$

In the second experiment – setting constant flow rate using a back-pressure regulator – the pressure drop over the column remains constant during experiments. The overall pressure in the system was only altered by adjusting the valve at the column outlet. In this case the outlet pressure of the column could be calculated as:

$$P_{outlet} = P_{backpressure} + P_{atmosphere} \approx P_{backpressure} \quad (4)$$

and

$$P_{average} = (P_{inlet} + P_{backpressure})/2 \quad (5)$$

(In practice, the pressure drop in the back-pressure regulator in these experiments was calculated as follows: at 0.3 mL min^{-1} flow rate the inlet pressure of the column was determined without a back-pressure regulator (P_{wor}). Then, by adjusting the valve at the column outlet the pressure in the system is increased; the measured pressure is the pressure drop over the column (P_{wor}) plus the pressure drop in the back-pressure regulator ($P_{backpressure}$). The pressure drop in the back-pressure regulator can be calculated as follows:

$$P_{backpressure} = P_{inlet} - P_{wor} \quad (6)$$

According to Equations (5) and (6) the average pressure in the column can be expressed as:

$$P_{average} = (P_{inlet} + (P_{inlet} - P_{wor}))/2 = P_{inlet} - P_{wor}/2 \quad (7)$$

Where

P_{inlet} is inlet pressure in system (column + back-pressure regulator)

P_{wor} = inlet pressure without back-pressure regulator

Capacity factors were calculated by the well-known equation:

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (8)$$

where t_R = solute retention time and t_0 = void time (elution time of thiourea).

Pressure Increase Induced by Raising the Flow Rate

Like the majority of authors quoted, we have found that solute retention increases with increasing pressure (Figures 1–4). However, if the pressure was raised by increasing the flow rate, we did *not* find a linear relationship as they did. Our measurements suggest that the change in capacity factor is complex. In general, retention first increases with pressure but at higher pressures retention begins to decrease with further pressures rise. This finding does not necessarily contradic data in the literature [1–7]. We wish to emphasise that our separations were carried out under routine conditions: higher pressures were achieved using higher flow rates and a 4.6 mm i.d. column was used. We believe that these conditions are common in routine HPLC. Although we have used an effective thermostat to achieve constant temperature, it was not exactly uniform across the column, especially at higher flow rates i.e. at higher pressures. The reason for this is that forcing a liquid through the column at high flow rates, a non-negligible amount of heat must be dissipated. Heat dissipation in the column is moderate owing to the low thermal conductivity of the packing, causing undesirable radial and axial temperature gradients. As a result, inhomogeneity in viscosity, density and flow velocity of the eluent cannot be fully avoided [18–20]. Presumably

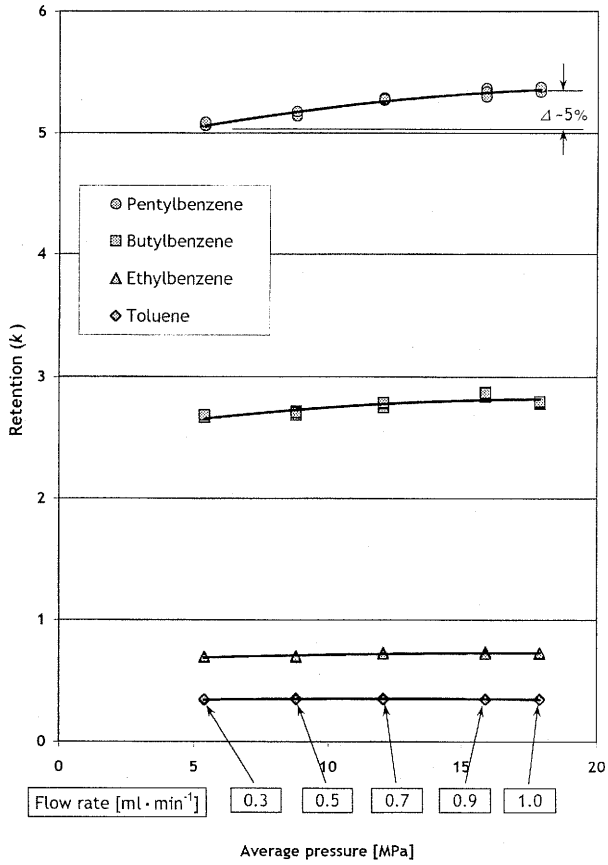


Figure 1
Retention of alkylbenzenes at 25 °C (pressure altered by flow rate)

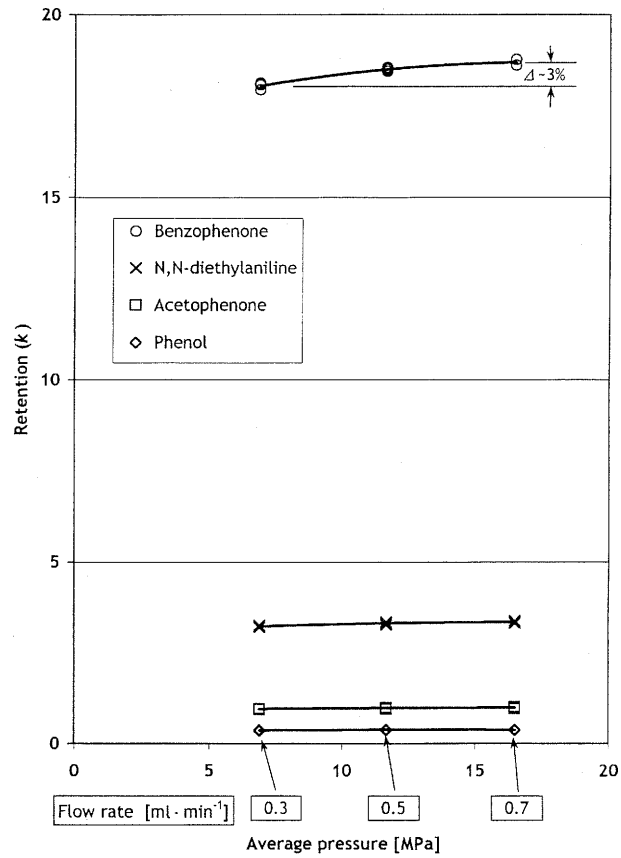


Figure 3
Retention of polar analytes at 25 °C (pressure altered by flow rate)

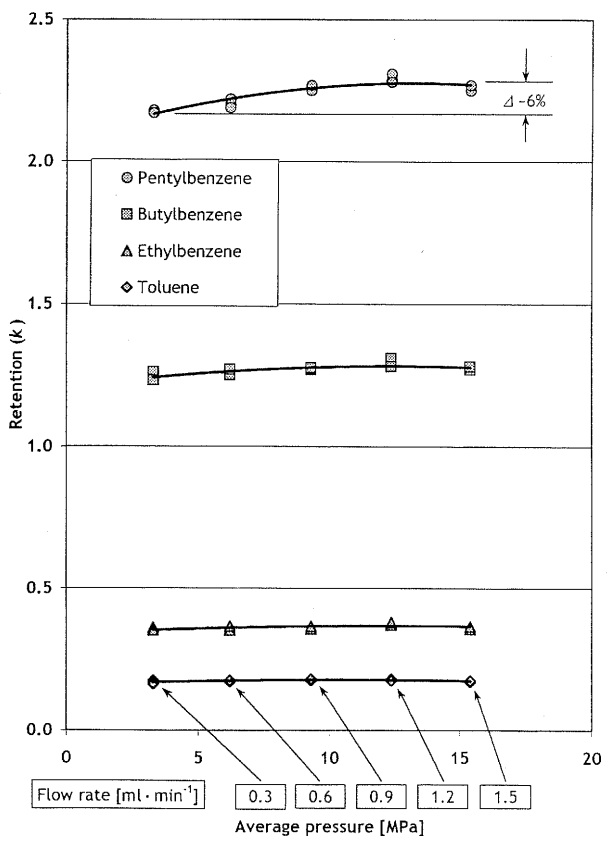


Figure 2
Retention of alkylbenzenes at 60 °C (pressure altered by flow rate)

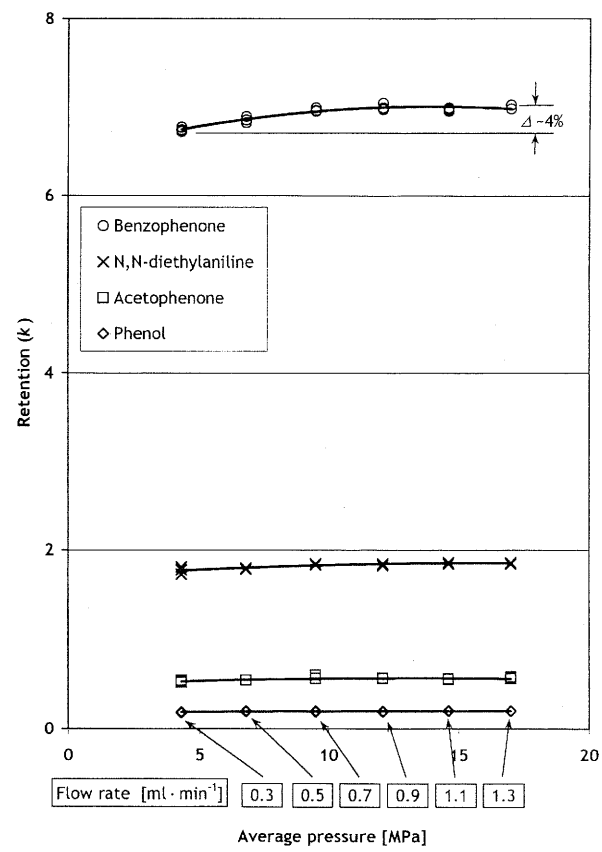


Figure 4
Retention of polar analytes at 60 °C (pressure altered by flow rate)

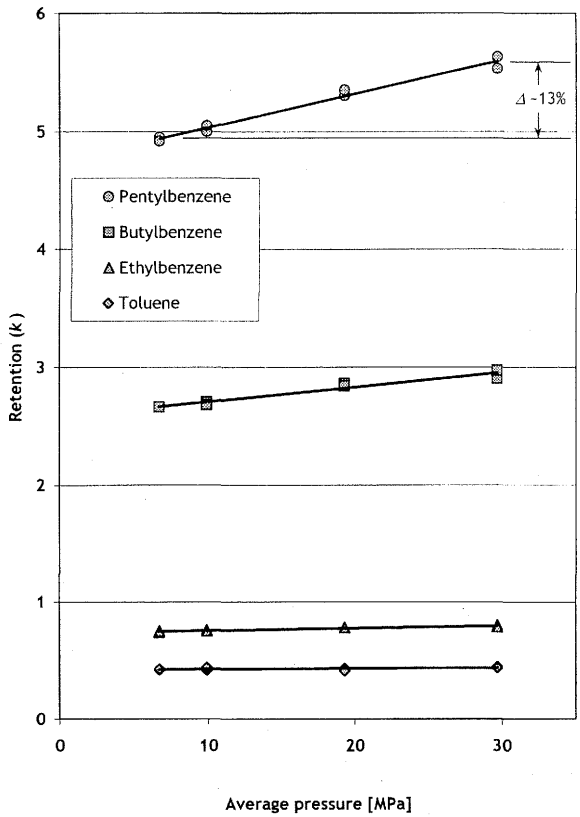


Figure 5
Retention of alkylbenzenes at 25 °C (pressure altered by back-pressure regulator valve)

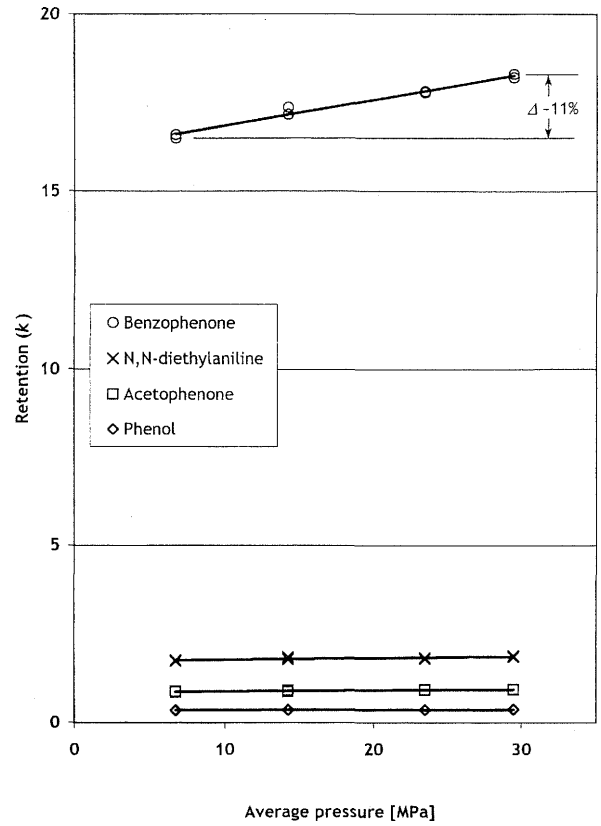


Figure 7
Retention of polar analytes at 25 °C (pressure altered by back-pressure regulator valve)

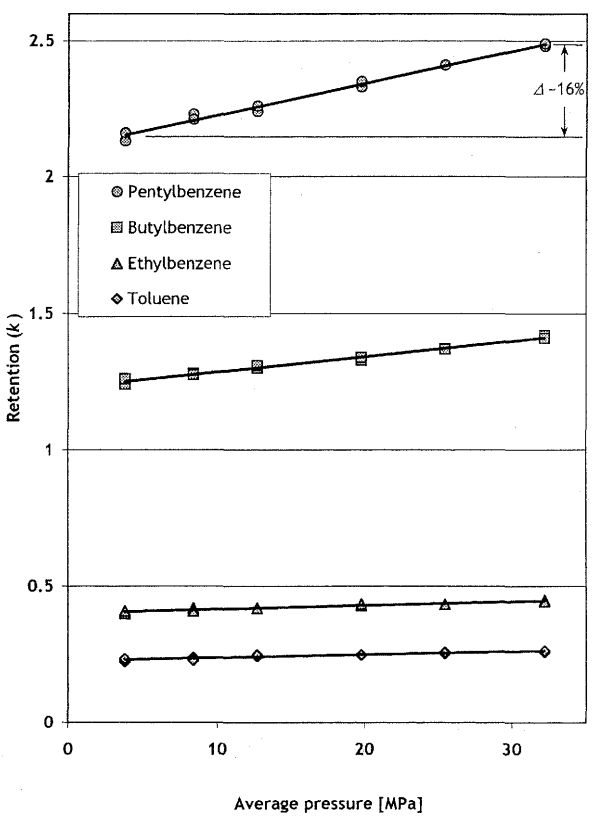


Figure 6
Retention of alkylbenzenes at 60 °C (pressure altered by back-pressure regulator valve)

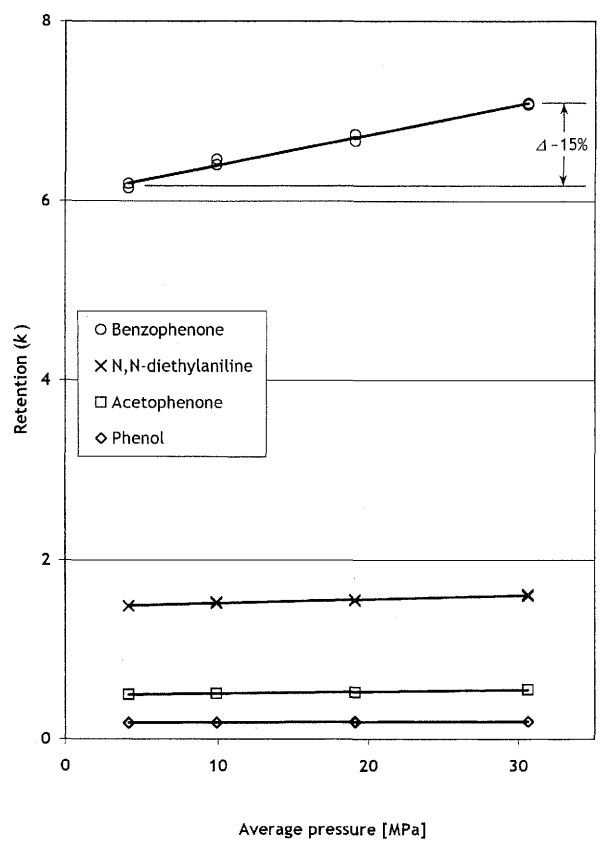


Figure 8
Retention of polar analytes at 60 °C (pressure altered by back-pressure regulator valve)

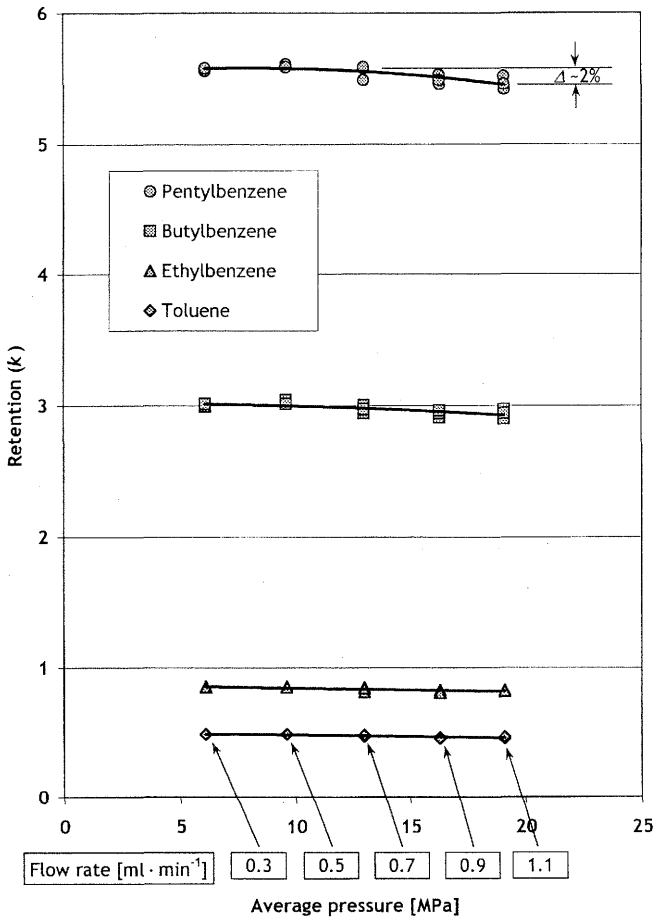


Figure 9
Retention of alkylbenzenes at room temperature without temperature control

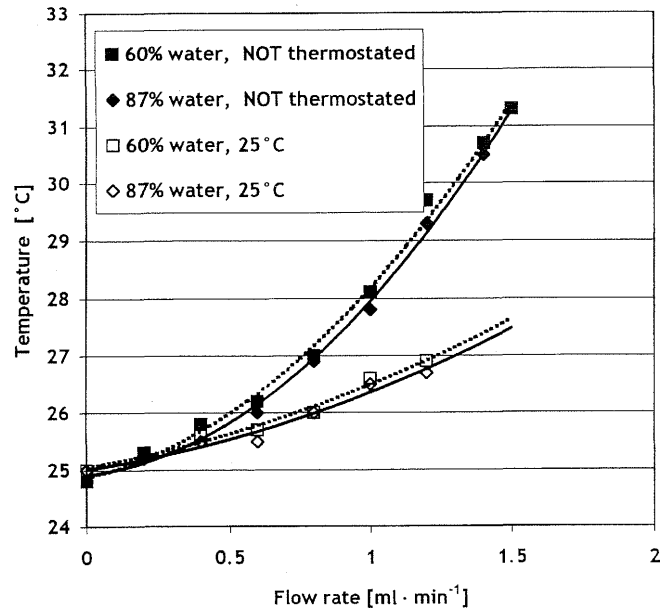


Figure 10
Correlation between flow rate and temperature at 25 °C

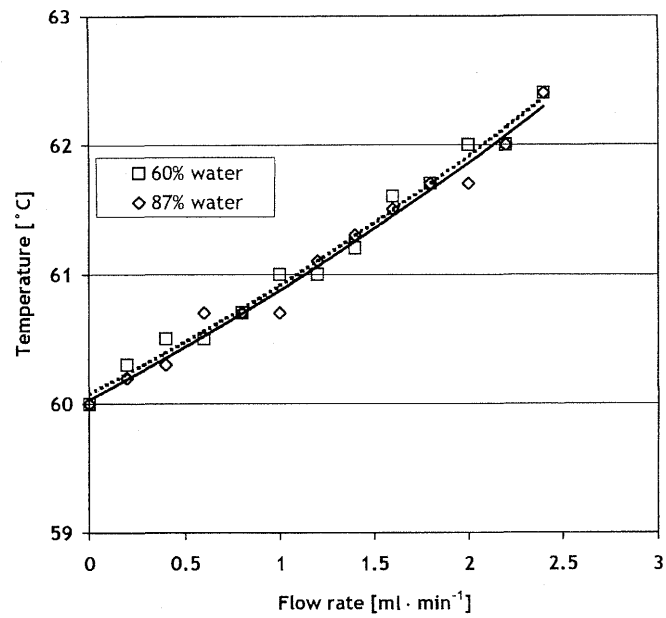


Figure 11
Correlation between flow rate and temperature at 60 °C

the higher temperature in the column caused by friction is responsible for the descending part of the k curve. The trend of the change of k with that of pressure is similar at both 25° and 60° for all samples and lies between 3–6 %. For results of acceptable accuracy, all experiments were carried out three times. The biggest difference in k between parallel measurements was < 2.6 % ($0<k<1$) and <1.5 % ($k>1$).

To obtain more evidence on the role of temperature, one experiment was carried out at room temperature, without thermostating (the temperature in the laboratory was nearly 25 °C). Retentions decreased slightly (Figure 5). To make clear that the column temperature is different from that of the environment, we measured the temperature of the effluent directly at the column outlet (Figures 6, 7). When the column was carefully thermostated, the temperature rose 2–3 °C in the pressure (flow-rate) range of our experiments. Without thermostating, higher temperature changes (6–7 °C) were measured at the column outlet. This explains the difference in behaviour between a column with, and without thermostating.

Raising Pressure by Using Back-pressure Regulator

For a better understanding of the retention-pressure relationship experiments were carried out at constant flow rate but different pressures. In our studies a valve was attached to the column outlet. All experiments were carried out at the same flow rate (0.3 mL min^{-1}). At the start the valve was open (= no extra pressure behind the column). The pressure drop measured under these con-

ditions is the pressure drop across the column. In further experiments the valve was turned off to an increasing degree. The pressure rose in the system *only* because the valve became increasingly closed. These conditions enabled us to follow the pressure-retention relationship, but excluding the disturbing effect of heat of friction mentioned above. In this case the pressure-retention relationship was found to be linear at 25° and also at 60° (Figures 8–11). Over the range of ca. 5–30 MPa the increase in retention varies between 5–16 % depending on retention order and temperature.

Our findings, in accord with values obtained in previous studies on microbore columns shows that the pressure-retention relationship in reversed-phase LC is linear. But the change can only be studied properly if the temperature in the column is constant. This was achieved in our case by altering the pressure using a fine metering valve at the column exit. (In a narrow or microbore column much better heat exchange is assured than in a 4.6 mm diameter column, therefore the pressure retention relationship is always linear.)

Conclusion

Pressure has a significant influence on retention in HPLC. In RP-HPLC, if the pressure rises, retention rises linearly with pressure. This can be studied if the temperature is constant and when only the pressure changes in the system. In the common case where higher pressures will be achieved by raising the flow rate of the eluent, the influence of the higher pressure (increasing retention) and the influence of the higher temperature, caused by the heat of friction (decreasing retention), overlap. The resulting overall influence was not linear, first retention increases, but later it tends to decrease, as the pressure increases further.

Acknowledgement

This research was supported by the Hungarian National Research Fund (OTKA) Grant No. T 023101 and T 032657. Thanks are due to Dr. Laszlo Jelinek (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland) for the generous gift of Kovasil column.

References

[1] *V. L. McGuffin, S-H. Chen*, Anal. Chem. **69**, 930 (1997)
[2] *J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson*, Anal. Chem. **69**, 983 (1997)
[3] *M. C. Ringo, C. E. Evans*, Anal. Chem. **69**, 4964 (1997)
[4] *M. C. Ringo, C. E. Evans*, J. Phys. Chem. **101**, 5525 (1997)
[5] *M. C. Ringo, C. E. Evans*, Anal. Chem. **70**, 315 A (1998)
[6] *J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson*, Anal. Chem. **71**, 700 (1999)
[7] *K. Lan, J. W. Jorgenson*, Anal. Chem. **70**, 2773 (1998)
[8] *G. Prukop, L. B. Rogers*, Separation Sci. Technol. **13**, 59 (1978)
[9] *E. Katz, K. Kogan, R. P. W. Scott*, J. Chromatogr. **260**, 277 (1983)
[10] *N. Tanaka, T. Yosimura, M. Araki*, J. Chromatogr. **406**, 247 (1987)
[11] *V. L. McGuffin, C. E. Evans*, J. Microcolumn Sep. **3**, 513 (1991)
[12] *G. Guiochon, M. J. Sepaniak*, J. Chromatogr. **606**, 248 (1992)
[13] *D. Berek, T. Macko*, J. Liq. Chrom. **21**, 2265 (1998)
[14] *D. Berek, T. Macko*, Pure & Appl. Chem. **61**, 2041 (1989)
[15] *M. Chalányová, T. Macko, J. Kandrac, D. Berek*, Chromatographia **18**, 668 (1984)
[16] *D. Berek, M. Chalányová, T. Macko*, J. Chromatogr. **286**, 185 (1984)
[17] *D. E. Martire, R. E. Boehm*, J.Phys. Chem. **91**, 2433 (1987)
[18] *K. K. Unger, G. Gilge, J. N. Kinkel, M. T. W. Hearn*, J. Chromatogr. **359**, 61 (1986)
[19] Kovasil Data Folder 1998
[20] Micra Scientific, Technical Bulletin 1997
[21] *R. Ohmacht, I. Kiss*, Chromatographia **42**, 595 (1996)
[22] *R. Ohmacht, B. Boros*, Chromatographia **50**, 75 (1999)
[23] *D. Chollet, E. Castella, P. Combe, V. Arnera* J. Chromatogr. **683**, 237 (1996)
[24] *H. Engelhardt, M. Jungheim*, Chromatographia **29**, 59 (1990)
[25] *H. Engelhardt, H. Löw, W. Götzinger*, J. Chromatogr. **544**, 371 (1991)
[26] *H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert*, LC.GC Int. **10**, 803 (1997)
[27] *R. Endele, I. Halász, K. Unger*, J. Chromatogr. **99**, 377 (1974)
[28] *I. Halász, R. Endele, J. Asshauer*, J. Chromatogr. **112**, 37 (1975)
[29] *M. Martin, C. Eon, G. Guiochon*, J. Chromatogr. **110**, 213 (1975)

Received: Sep 1, 1999
Revised manuscript received: Jan 3, 2000
Accepted: Jan 26, 2000

Fast Separation of Amino Acid Phenylthiohydantoin Derivatives by HPLC on a Non-porous Stationary Phase

B. Boros / K. Kovacs / R. Ohmacht*

Institute of Medical Chemistry, University Medical School, 7624 Pecs, Hungary

Key Words

Column liquid chromatography
Non-porous stationary phases
Phenylthiohydantoin (PTH) amino acid separation

Summary

A new method is described for the separation of phenylthiohydantoin (PTH) derivatives of the 20 common amino acids. The analysis requires approximately 7 minutes and good resolution is obtained by RP-HPLC on columns packed with a non-porous stationary phase (Kovasil-C14; 33 x 4.6 mm). Gradient elution was chosen with eluents containing either sodium acetate / acetic acid buffers (moderately acidic conditions) or a heptafluorobutyric acid modifier (strongly acidic eluent). A slightly different elution order of the PTH-amino acids was found in the two systems. Low detection limits (in the femtomol range) were achieved with simple commercial HPLC equipment.

Introduction

The Edman degradation is one of the frequently used methods for determining the primary structure of a protein. In this process, the amino terminal residue of the protein is sequentially removed and converted to its phenylthiohydantoin (PTH) derivative. Following this, PTH derivatives can be separated and identified by RP-HPLC methods. Numerous separations have been published for PTH-amino acid analysis in recent years [1–6]. In most cases gradient elution – using two different buffers as eluent – was applied. (Isocratic systems are simpler, but the lack of satisfactory resolution is a serious drawback of these methods.) In our work, we propose a new RP-HPLC method for the separation of PTH-amino acids. We can separate the common amino acids in the very reasonable analysis time of ca. 7 minutes using a non-porous RP column (Kovasil-C14). In the method proposed, a water-acetonitrile gradient was employed. Buffered eluents (pH 3.8-5.8) and acidic eluents (acidified with heptafluorobutyric acid, pH ca. 2.2) were investigated. Identification was achieved at the femtomol level.

Experimental

PTH amino acid standards, acetic acid, ammonium acetate, trifluoroacetic acid (TFA), heptafluorobutyric acid (HFBA) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). HPLC grade acetonitrile was provided by Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spain). Bidistilled water (distilled in glass in our laboratory) was used. Approx. 0.3 mg PTH-amino acid was dissolved in 1 mL of solvent (different water/acetonitrile mixtures depending on the solubility). In general, 0.2–1 μL of each amino acid was injected. The samples were stored at –20 °C. Even at this temperature the solutes could be stored for a limited period only, in general, for one week.

Separations were carried out on a Gynkotek HPLC system consisting of a 480GT biocompatible precision pump (equipped with a low pressure gradient mixer), a 160S UV detector (at 254 nm) and a Chromeleon chromatography data system (Gynkotek, Germering, Germany). Samples were injected via an 8125 sample injection valve (Rheodyne, Cotati CA, USA) fitted with a 20 μL sample loop. Separations were performed on 33 x 4.6 mm Kovasil-C14 reversed phase column (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland). The column is based on a high-purity non-porous, monodisperse silica bead (d_p=1.5 μm) chemically bonded to a C_{14} alkylsilane. Constant column temperature (25 °C) was ensured by using a water jacket that covered the column and ca. 20 cm of the inlet capillary tubing. The temperature was set using a Grant W6 circulating water bath (Grant Instruments, Cambridge, England).

Presented at the Balaton Symposium on High Peformance Separtion Methods, Siófok, Hungary, September 1–3, 1999

0009-5893/00 S-202-03 $ 03.00/0 © 2000 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

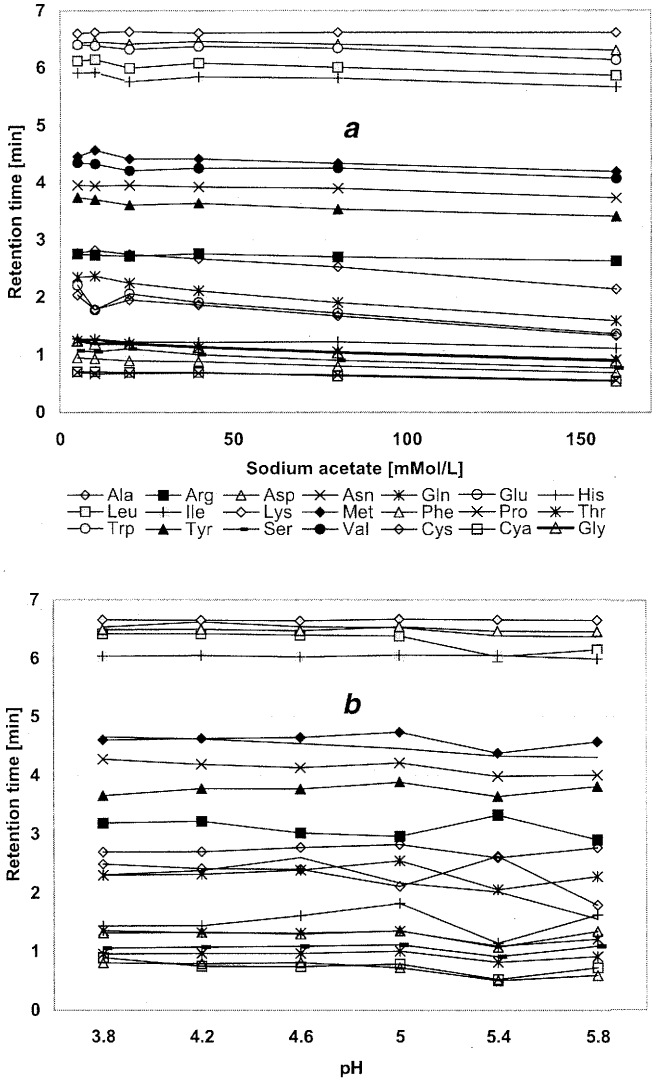


Figure 1

a: Retention time – sodium acetate concentration relationship of the PTH-amino acids in the buffered eluent system (pH=4.8)
b: Retention time – pH relationship of the PTH-amino acids in the buffered eluent system (sodium acetate concentration: 10.5 mMol x L^{-1})

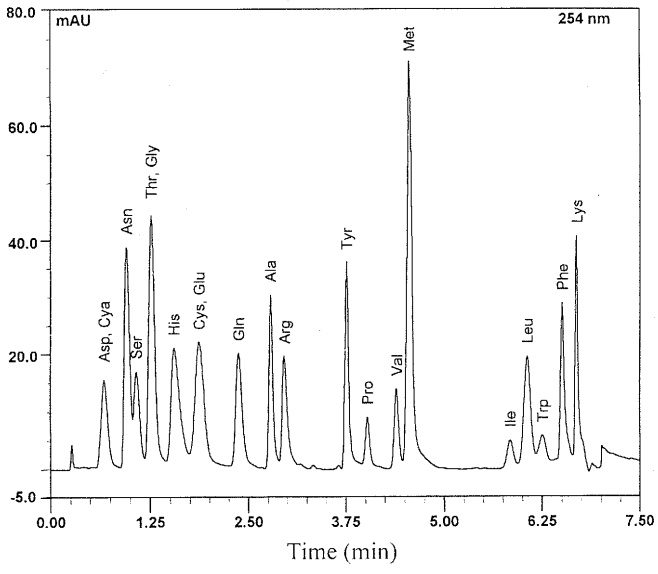


Figure 2

Separation of PTH-amino acids
Column: 33 x 4.6 mm; Kovasil MS-C14
Eluents: A: 10.5 mmol x L^{-1} sodium acetate (with acetic acid to pH 4.8)
B: acetonitrile
Gradient: 0→2.00 min 100 % A; 2.00→2.01 min to 10 % B; 2.01→4.49 min to 15 % B; 4.49→4.59 min to 100 % B; 4.59→7.00 min 100 % B.
Flow rate: 1.2 cm^3 x min^{-1}; Pressure drop: 35 MPa (at start)
Detection: 254 nm
Temperature:25 °C

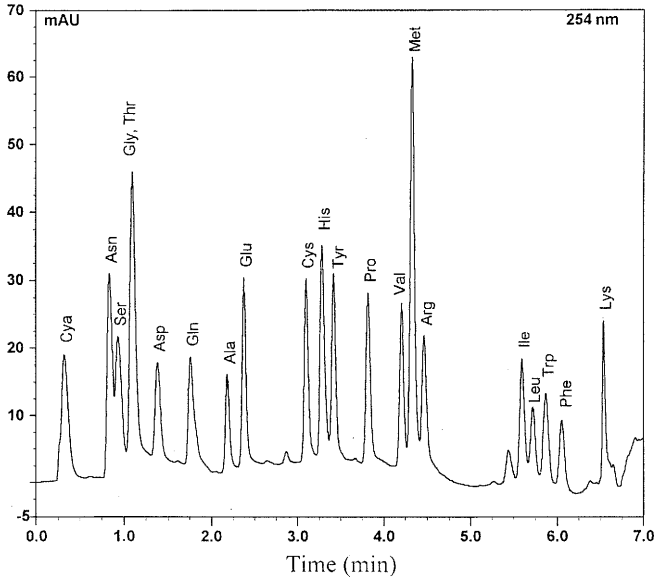


Figure 3

Separation of PTH-amino acids
Column: 33 x 4.6 mm; Kovasil MS-C14
Eluents: A: Water + 0.1 % HFBA
B: 90 % acetonitrile-10 % water + 0.8 % HFBA
Gradient: 0→3.55 min to 12 % B; 3.55→6.55 min to 20 % B; 6.55→6.65 min to 100 % B; 6.65→7.00 min 100 % B.
Flow rate: 1.0 cm^3 x min^{-1}; Pressure drop: 32 MPa (at start)
Detection: 254 nm
Temperature:25 °C

Results

Separations in Buffered Eluents

It seemed reasonable to adapt the widely accepted separation method of an acetonitrile/water gradient in the pH range ~3–7 to our column. The effect of the acidity and the ionic strength of the eluent on the separation was evaluated (Figure 1). In general, only a moderate dependence of the retention was found over the ranges studied. The best compromise consisted of eluents at pH 4.8 with a sodium acetate concentration of 10.5 mMol x L^{-1}. The amino acid derivatives were well separated with the exception of the Asp-Cya, Thr-Gly and Cys-Glu pairs (Figure 2). There is also a slight difference in the retention times of the components of

Table I. Detection limit of PTH amino acids (in HFBA-containing eluent)

PTH-L-alanine (Ala)	110 femtomol
PTH-L-arginine hydrochloride (Arg)	100 femtomol
PTH-L-asparagine (Asn)	130 femtomol
PTH-L-aspartic acid (Asp)	90 femtomol
PTH-S-carboxymethyl-L-cysteine (Cys)	150 femtomol
PTH-L-cysteic acid (Cya)	100 femtomol
PTH-L-glutamine (Gln)	140 femtomol
PTH-L-glutamic acid (Glu)	140 femtomol
PTH-L-glycine (Gly)	150 femtomol
PTH-L-histidine (His)	90 femtomol
PTH-L-isoleucine (Ile)	120 femtomol
PTH-L-leucine (Leu)	110 femtomol
PTH-L-(ε-PTC)-L-lysine (Lys)	120 femtomol
PTH-L-methionine (Met)	110 femtomol
PTH-L-phenylalanine (Phe)	120 femtomol
PTH-L-proline (Pro)	110 femtomol
PTH-L-serine (Ser)	130 femtomol
PTH-L-threonine (Thr)	110 femtomol
PTH-L-tryptophane (Trp)	80 femtomol
PTH-L-tyrozine (Tyr)	80 femtomol
PTH-L-valine (Val)	170 femtomol

these pairs, but it was not sufficient for an adequate separation on our short column.

Separations in Acidic Eluents

Earlier, we had found acidic eluents containing trifluoroacetic acid or heptafluorobutyric acid to be very useful for the separation of small peptides [8,9]. HFBA was chosen as acidifier and ion pairing agent because longer retentions could be achieved with it. (In preliminary experiments, trifluoroacetic and hydrochloric acids were tried as well.) A gradient system was chosen for good separation where not only the elution power increased during the separation but the amount of the acidifier rose during the run as well. (Eluent A contained 0.1 % HFBA, eluent B contained 0.8 % HFBA.) The pH of eluent A was 2.2 but that of eluent B could not be determined exactly because of its high (90 %) acetonitrile content. All PTH-amino acids were well resolved within 7 minutes, only Asp and Cya were coeluted (Figure 3). Compared to the separation carried out in buffered eluent systems, different selectivity and different elution order of the amino acid derivatives were found. No degradation of PTH-amino acids was found during the separation. Low detection limits of the amino acids at the femtomole level were found because of the short analysis time and the low column volume (Table I). The amount (mol) of sample that yields a peak height three times the noise level was taken as the detection limit.

Conclusion

The PTH derivatives of amino acids can be separated and determined within 7 minutes by using non-porous reversed phase columns. Good selectivity and low detection limits can be achieved using heptafluorobutyric acid as acidifier and ion pairing agent.

Acknowledgement

The Hungarian National Research Fund (OTKA) Grant supported this research No. T 023101. Thanks are due to Mr.Lucien L. Charles and Dr. Laszlo Jelinek (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland) for the generous gift of the Kovasil column.

References

[1] *F. Lottspeich,* Z. Physiol. Chem. **361** (1980) 1829
[2] *R. L. Heinrikson, S. C. Meredith,* Anal. Biochem., **136** (1984) 65
[3] *F. Lottspeich,* J. Chromatogr. **326** (1985) 321
[4] *J. L. Meuth, J. L. Fox,* Anal. Biochem., **154** (1986) 478
[5] *D. J. Strydom,* J. Chromatogr. **662** (1994) 227
[6] *Y. Kurosu, K. Murayama, N. Shindo, Y. Shisa, N. Ishioka,* J. Chromatogr. **752**(1996)279
[7] *R. Ohmacht, B. Boros, I. Kiss, L. Jelinek,* Chromatographia **50**, 75 (1999)
[8] *E. Kovats, L. Jelinek, R. Ohmacht* EP 693314 A1 96.01.12.
[9] *R. Ohmacht, I. Kiss,* Chromatographia **42**, 595 (1996)

Received: Sep 1, 1999
Revised manuscript received: Nov 26, 1999
Accepted: Dec 13, 1999

HPLC Separation of Opium Alkaloids on Porous and Non-Porous Stationary Phases

L. Krenn[1]* / B. Boros[2] / R. Ohmacht[2] / L. Jelinek[3]

[1]Institute of Pharmacognosy, University of Vienna, Althanstrasse 14, 1090 Vienna, Austria
[2]Institute of Medical Chemistry, University Medical School of Pecs, Szigeti ut 12, 7624 Pecs, Hungary
[3]Chemie Uetikon AG, 8707 Uetikon, Switzerland

Key Words

Column liquid chromatography
Non-porous stationary phase
Opium alkaloids
Poppy, *Papaver somniferum* L.

Summary

A new reversed-phase (RP) HPLC method has been developed and validated for the separation of the main opium alkaloids morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine on a non-porous (micropellicular) stationary phase. On this phase quantification of the compounds by internal standardization with brucine was achieved extremely rapidly, in ca 1.5 min, only. Thus, the analysis time for the opium alkaloids was approximately one tenth of that on porous stationary phases. Different opium samples were investigated using non-porous and porous packings. The correlation between the results was excellent.

Introduction

The separation and quantification of the main opium alkaloids is most commonly performed by reversed-phase (RP) HPLC on porous stationary phases [1–15]. In methods which enable the precise determination of morphine, codeine, thebaine, papaverine, and noscapine [1, 10] the analysis time is at least 20 min. Recently new 1.5-μm silica-based reversed-phase non-porous packings have been reported not only for the separation of biopolymers [16] but also for bioactive compounds with molecular masses between 100 and 500, including different alkaloids [17]. The main advantage of these micropellicular stationary phases is their high efficiency; this results in very low separation times and highly sensitive separations.

Because of the extremely rapid separation of alkaloids, e.g. morphine, codeine, and noscapine [16], HPLC on such phases seemed a promising way of accelerating the assay of the five main opium alkaloids, and an appropriate method has been developed.

The RP method presented has been used for analysis of the alkaloid content of different opium samples and the results obtained have been compared with those obtained on a porous packing [1].

Experimental

Materials

Morphine, codeine, and papaverine hydrochlorides, brucine, and Extrelut® pre-packed columns were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Noscapine and thebaine were from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Different samples of opium were placed at our disposal by UNDCP (United Nations Drug-Control Program, Vienna). Other common chemicals used were the highest quality available commercially.

Standard Solutions

From methanolic stock solutions of morphine and noscapine (each 5 mg mL^{-1}), codeine, thebaine, and papaverin (each 1 mg mL^{-1}), and brucine (internal standard; 1 mg mL^{-1}) standard solutions were prepared containing different amounts of the five alkaloids.

Sample Preparation

Brucine internal standard solution was added to the gum opium samples and the samples were extracted twice with 2.5 % (*v*/*v*) acetic acid. After adjustment of the pH to 9.0 with conc. ammonia the solution was transferred to an Extrelut® pre-packed clean-up column. The alkaloids were eluted with dichloromethane–*iso*-propanol

Presented at Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 1–3, 1999

0009-5893/00 S-175-04 $ 03.00/0 © 2000 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

Table I. Gradient elution RPHPLC retention of the major opium alkaloids.

Alkaloid	Retention time, t_R (min)
Morphine	0.30
Codeine	0.43
Brucine	0.66
Thebaine	1.04
Papaverine	1.31
Noscapine	1.44
t_0	0.23

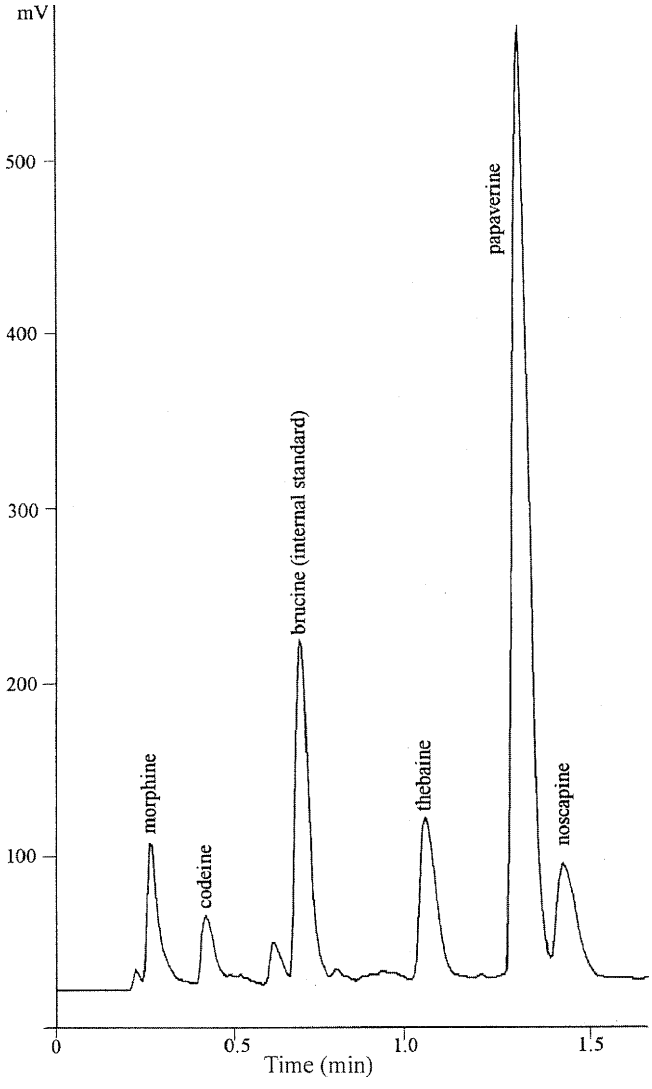


Figure 1
HPLC of gum opium; separation on Kovasil MS-C18 column.

(9:1, 60 mL) and the eluate was evaporated to dryness [1]. The extracts were dissolved in acetonitrile–water (60:40) containing 0.8 % heptafluorobutyric acid (15 mL) and diluted to 30 mL with 0.1 % aqueous heptafluorobutyric acid and 3 μL were injected after filtration through a 0.45-μm Millipore filter.

Instrumentation

Analytical HPLC was performed with a Perkin–Elmer system comprising a series 200 liquid chromatograph, a series 600 Link controller and an LC-235 diode-array detector. Monitoring of the chromatography and data processing were performed by means of Turbochrom software.

Chromatographic Conditions

The analyses on the porous stationary phase were performed as described elsewhere [1]. Separation and quantification on the non-porous stationary phase were performed on a 33 mm × 4.6 mm i.d., 1.5 μm particle size, Kovasil MS-C18 column (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland). Multilinear gradient elution at room temperature was performed with mixtures of 0.1 % aqueous heptafluorobutyric acid (solvent A) and acetonitrile–water (60:40) containing 0.8 % heptafluorobutyric acid (solvent B). The gradient profile was: 0–0.3 min from 15 to 29 % B; 0.3–1.9 min from 29 to 38 % B; 1.9–2.4 min 38 % B. The composition of the mobile phase during purging and regeneration of the column was: 2.4–2.6 min from 38 to 100 % B; 2.6–3.4 min 100 % B; 3.4–3.6 min from 100 to 15 % B; 3.6–7.0 min 15 % B. The flow rate was 1 mL min^{-1}. The alkaloids were detected at 255 nm.

Results and Discussion

The difficult separation of the five main opium alkaloids morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine has recently been improved by application of reversed-phase (RP) HPLC on a base-deactivated porous C_{18} stationary phase [1]. By this method determination of the compounds is achieved in ca 20 min. Because of a report [17] that the assay of three of the above mentioned alkaloids on non-porous packing had been achieved in approximately 1.3 min, we have developed a method for the quantification of five alkaloids with brucine as internal standard.

We achieved excellent separation and resolution of the six compounds in ca 1.5 min (Table I and Figure 1) on a 33 mm × 4.6 mm i.d., 1.5 μm particle size, Kovasil MS-C18 column with multilinear gradient elution; the mobile phase prepared by mixing 0.1 % aqueous heptafluorobutyric acid with 60:40 acetonitrile–water containing 0.8 % heptafluorobutyric acid. Although trifluoroacetic acid was previously used to prepare the mobile phase [1, 17], preliminary tests showed that greater retention of the analytes and better resolution were achieved by use of heptafluorobutyric acid. It should be emphasized that the dead volume of the HPLC system must be determined very precisely and that the time of sample injection must be adapted depending on this dead volume. In the apparatus used the delay volume (the volume from gradient valve to column inlet) was 2.3 mL.

Table II. Detection limits for the major opium alkaloids.

Alkaloid	Detection limit	Detection limit (ng)
Morphine	4.4 picomol	1.26
Codeine	5.7 picomol	1.71
Thebaine	1.05 picomol	0.33
Papaverine	35.9 femtomol	0.012
Noscapine	1.75 picomol	0.72

Table III. Calibration graph data.

Alkaloid	Linear range (mg mL^{-1})	Correlation coefficient	Slope (x, y, see below)	Intercept
Morphine	0.09–0.75	0.9988	0.132	0.0006
Codeine	0.03–0.28	0.9997	0.196	0.0000
Thebaine	0.02–0.21	0.9999	0.479	0.0032
Papaverine	0.01–0.20	0.9995	5.775	0.0055
Noscapine	0.11–0.34	0.9996	0.354	0.0094

Six calibration points were plotted for each alkaloid.
x = amount of alkaloid (mg)
y = [amount of internal standard (mg) × area of alkaloid peak] / area of internal standard peak

Table IV. Reproducibility of the method for the major opium alkaloids.

Alkaloid	Amount (%) in sample 1	Relative standard deviation (%)	Amount (%) in sample 2	Relative standard deviation (%)
Morphine	11.30 ± 0.25	2.25	15.41 ± 0.06	0.39
Codeine	4.07 ± 0.10	2.56	1.89 ± 0.05	2.44
Thebaine	5.02 ± 0.06	1.16	2.87 ± 0.03	0.97
Papaverine	2.17 ± 0.04	1.86	2.52 ± 0.05	2.00
Noscapine	3.98 ± 0.04	0.95	5.61 ± 0.09	1.56

Data are means from five determinations each (± standard deviation).

Table V. Reproducibility of the retention times of the major opium alkaloids.

Alkaloid	Retention time, t_R (min)	Relative standard deviation (%)
Morphine	0.302 ± 0.010	3.31
Codeine	0.429 ± 0.015	3.50
Brucine	0.660 ± 0.027	4.09
Thebaine	1.039 ± 0.030	2.89
Papaverine	1.300 ± 0.036	2.77
Noscapine	1.430 ± 0.041	2.87

Data are means from 12 determinations (± standard deviation) performed during one week.

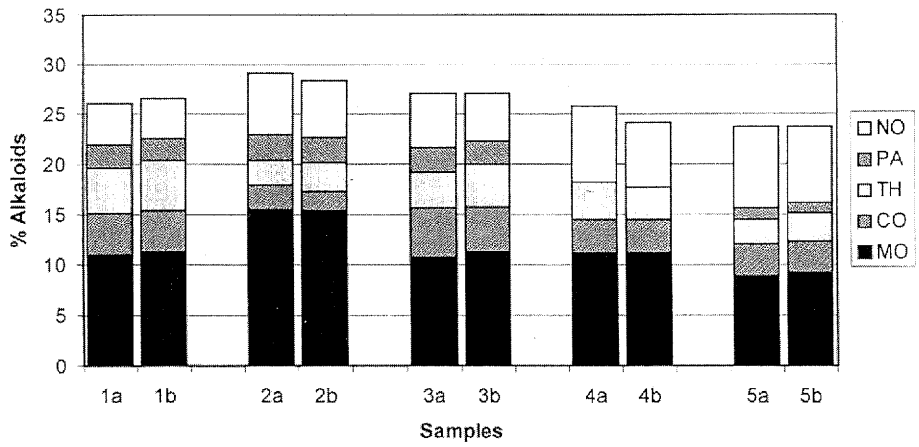


Figure 2
Comparison of the alkaloid content of five different opium samples as determined by HPLC on (**a**) porous and (**b**) non-porous packing. **MO** = morphine; **CO** = codeine; **TH** = thebaine; **PA** = papaverine; **NO** = noscapine

The detection limit of the new method (defined as the amount of analyte giving a peak height three times higher than the noise level) was very low (Table II).

Because of the efficient and validated sample clean-up procedure used [1], interference of accompanying substances with the analytes was not observed.

The system was calibrated for the five major alkaloids of opium. Over the concentration range selected linear relationships were obtained between peak area and concentration; the correlation coefficients were >0.9988 (Table III). The calibration ranges selected adequately covered variations in the amounts of alkaloids in the

samples. The reproducibility of the method was determined by fivefold assay of two different opium samples. The standard deviations (Table IV) proved the accuracy and reproducibility to be excellent. The reproducibility of retention times was also satisfactory (Table V).

The new method was tested on five opium samples and the results were compared with those obtained by RPHPLC on a base-deactivated porous stationary phase [1]. The good correlation between the results obtained from the two methods is shown in Figure 2.

Conclusions

RPHPLC of opium extracts on non-porous 1.5 μm Kovasil MS-C18 enables the assay of morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine in 1.5 min. The HPLC conditions described ensure sufficient resolution, and internal standardization with brucine guarantees precise quantification of the analytes. Statistical analysis of the experimental results proved that the precision and reproducibility of the new method are satisfactory. Analyses of different opium samples using the new non-porous material and the "classical" porous packing showed there was good correlation between the results obtained, and use of the new method reduced the analysis time by a factor of ten. By this method extremely short separation times and low detection limits can be achieved under routine conditions on commercial HPLC equipment.

Acknowledgement

This research was supported by Austrian–Hungarian Foundation grant no. 36öu4 and by Hungarian National Research Fund (OTKA) grant no. T 023101, which are gratefully acknowledged. Lucien L. Charles (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland) is thanked for generously providing the Kovasil columns.

References

[1] *L. Krenn, S. Glantschnig, U. Sorgner*, Chromatographia **47**, 21 (1998).
[2] *R. Verpoorte, A. Baerheim Svendsen*, Chromatography of Alkaloids, Journal of Chromatography Library Series, Vol. 23B, Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 297.
[3] *L. W. Doner, A. Hsu*, J. Chromatogr. **253**, 120 (1982).
[4] *B. C. Pettitt, C. E. Damon*, J. Chromatogr. **242**, 189 (1982).
[5] *V.K. Srivastava, M. L. Maheshwari*, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 801 (1985).
[6] *E. Stahl, H. Jahn*, Pharm. Acta Helv. **60**, 248 (1985).
[7] *M. Dogan, A. Gevenkiris, O. Tarhan*, Fitoterapia **57**, 257 (1986).
[8] *S. H. Hansen*, Int. J. Pharm. **32**, 7 (1986).
[9] *N. R. Ayyangar, S. R. Bhide*, J. Chromatogr. **366**, 435 (1986).
[10] *N. R. Ayyangar, S. R. Bhide*, J. Chromatogr. **436**, 455 (1988).
[11] *J. O. De Beer, J. Corthout, A. J. Vlietinck*, Pharmeuropa **3**, 274 (1991).
[12] *K. Yoshimatsu, K. Shimomura*, Plant Cell Rep. **11**, 132 (1992).
[13] *M. M. Kraml, F. DiCosmo*, Phytochem. Anal. **4**, 103 (1993).
[14] *P. Gómez-Serranillos, E. Carretero, A. Villar*, Phytochem. Anal. **5**, 15 (1994).
[15] *P. Gómez-Serranillos, E. Carretero, A. Villar*, Fitoterapia **66**, 156 (1995).
[16] *R. Ohmacht, I. Kiss*, Chromatographia **42**, 595 (1996).
[17] *R. Ohmacht, B. Boros, I. Kiss, L. Jelinek*, Chromatographia **50**, 75 (1999).

Received: Sep 2, 1999
Revised manuscript received: Nov 9, 1999
Accepted: Dec 7, 1999

Effect of Pressure on Retention Factors in HPLC Using a Non-Porous Stationary Phase

CHROMATOGRAPHIA

2002, 56, Suppl., S-61–S-64

A. Felinger[1] / B. Boros[2] / R. Ohmacht[2]*

[1] Department of Analytical Chemistry, University of Veszprém, 8200 Veszprém, P. O. Box 158, Hungary
[2] Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, 7601 Pécs, P. O. Box 99, Hungary; E-Mail: robert.ohmacht@aok.pte.hu

Key Words

Column liquid chromatography
Non-porous stationary phases
Solute retention
Pressure influence on retention factors

Summary

Pressure and temperature have significant influence on retention in HPLC. This study investigates the effect of pressure and temperature on the retention behavior of aromatic hydrocarbons (toluene, ethyl benzene, butyl benzene, pentyl benzene) and polar, acidic and basic samples (phenol, acetophenone, N,N-dimethyl aniline, benzophenone) on a reversed phase column. The effect has been studied on non-porous, tetradecyl (C_{14}) coated silica particles. We found that the adsorption-induced decrease of the partial molar volume of the solutes investigated was between $\Delta V_m = 5 - 15\ cm^3\ mol^{-1}$. The increment of the decrease of the partial molar volume due to the addition of one CH_2 group, for the homologous series of the aromatic hydrocarbons is approximately $\Delta V_{CH2} = 2.3\ cm^3 mol^{-1}$.

Introduction

The effect of pressure on physico-chemical parameters of HPLC systems below critical conditions has been widely studied in the last decade. Generally pressure influences the density and viscosity of the mobile phase, diffusion rate of the analyte molecules, the temperature of the system and interactions among eluent components. Therefore, the pressure applied in liquid chromatography (HPLC) can significantly influence the retention factor (k) of the analytes.

Recently it has been found that pressure has a significant impact on retention in reversed-phase chromatography and in chiral separations [1–6]. It was observed that if the pressure rises in the range of 0.1–50 MPa then the retention factor rises linearly [7, 8]. A similar relationship has been found in some earlier studies [9–13]. Pressure can influence the sorption equilibrium processes in the column [14–17]. Martire [18] and Guiochon [13] have carried out fundamental theoretical work in this area. The mobile phase in the chromatographic column creates a significant amount of frictional heat [28–30] that also influences the retention of the substances being separated.

Recently Chen at al. have studied the effect of pressure on the retention behavior of the protein lysosyme and that of the homologous series of poly-L-phenylalanine in reversed phase chromatography using an octadecylsilica (C_{18}) stationary phase [31]. The authors concluded that the partial molar volume of the protein solute decreases by approximately 100 cm^3 mol^{-1} when adsorbed onto the stationary phase, whereas a smaller change was observed for the partial molar volumes of the poly-L-phenylalanine homologues.

Szabelski et al. studied the pressure and temperature effects on the adsorption equilibrium of four different insulins. They found that the pressure-induced variation of the retention parameters can be attributed to an approximately 102 cm^3 mol^{-1} change of the partial molar volume when the solute is adsorbed on a C_8 bonded silica stationary phase [32].

Non-porous stationary phases are widely used in different fields of HPLC [19–24]. It seems important to collect data on retention-pressure relationship in these HPLC systems. In our previous paper [1] the effect of pressure on retention was studied using two different experimental settings: i) raising the pressure by raising the flow rate; ii) at constant flow rate, raising the pressure by using a back pressure regulator. It was found that solute retention increases with increasing pressure. If increasing the flow rate raised the pressure, no linear relationship was found; if the pressure was raised at constant flow rate,

Presented at Balaton Symposium '01 on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 2–4, 2001

0009-5893/00/02 S-61-04 $ 03.00/0 © 2002 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

Table I. Retention factors of the aromatic hydrocarbons and polar compounds at different average pressures and temperatures.

t = 25 °C								
p (MPa)	2.7	6.7	13.6	20	29.6	39.1		
Toluene	0.47	0.47	0.48	0.48	0.49	0.52		
Ethyl benzene	0.78	0.81	0.82	0.83	0.87	0.88		
Butyl benzene	2.67	2.73	2.81	2.86	3	3.11		
Pentyl benzene	4.85	4.98	5.14	5.37	5.55	5.85		
t = 45 °C								
p (MPa)	2	7.6	13.3	18.8	30.2	45		
Toluene	0.36	0.38	0.38	0.38	0.39	0.4		
Ethyl benzene	0.61	0.62	0.64	0.64	0.65	0.69		
Butyl benzene	1.89	1.96	2	2.03	2.16	2.2		
Pentyl benzene	3.38	3.47	3.54	3.64	3.84	4.12		
t = 65 °C								
p (MPa)	1.4	7.2	11.7	18.7	26.6	33.7	39.1	44.4
Ethyl benzene	0.42	0.43	0.44	0.44	0.44	0.47	0.48	0.48
Butyl benzene	1.22	1.27	1.31	1.33	1.37	1.38	1.42	1.44
Pentyl benzene	2.09	2.15	2.21	2.26	2.37	2.44	2.59	2.6
t = 25 °C								
p (MPa)	2.6	8.1	14.9	23.3	31	40		
Phenol	0.32	0.34	0.35	0.36	0.36	0.38		
Acetophenone	0.86	0.92	1.07	0.98	0.98	0.99		
N,N-dimethyl-aniline	3.04	3.06	3.19	3.3	3.31	3.38		
Benzophenone	16.7	17.2	17.45	18.07	18.51	19.31		
t = 45 °C								
p (MPa)	2.1	8.6	16.9	24.9	34.1	39.5		
Phenol	0.24	0.25	0.25	0.26	0.26	0.28		
Acetophenone	0.69	0.70	0.73	0.73	0.76	0.78		
N,N-dimethyl-aniline	3.06	3.06	3.10	3.14	3.18	3.19		
Benzophenone	10.12	10.42	10.74	11.09	11.50	11.82		
t = 65 °C								
p (MPa)	1.6	7.8	13.9	19.5	24.4	34.2	43.1	
Phenol	0.14	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.17	
Acetophenone	0.48	0.48	0.49	0.50	0.50	0.53	0.56	
N,N-dimethyl-aniline	2.59	2.62	2.61	2.62	2.64	2.62	2.67	
Benzophenone	5.65	5.85	5.94	6.05	6.19	6.50	6.70	

the retention relationship was found to be linear.

Theory

Classical relationships describe the dependence of the chromatographic retention parameters on the fundamental thermodynamic quantities:

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln \phi k = \Delta H$$

$$-T\Delta S = \Delta E + p\Delta V_m - T\Delta S \qquad (1)$$

where ΔG, ΔH, ΔE, and ΔS are the change of Gibbs free energy, enthalpy, internal energy, and entropy of the system; R is the universal gas constant, T the absolute temperature, K the equilibrium constant for adsorption, ϕ the phase ratio, k the retention factor, p the pressure, and ΔV_m is the difference between the partial molar volume of the solvent when absorbed in the stationary phase and when in the liquid mobile phase.

The above equation can be rewritten as:

$$\ln k = -\frac{\Delta E}{RT} - p\frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi \qquad (2)$$

When temperature is constant, the first derivative of ln k with respect to pressure is:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial p} = -\frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{1}{\phi}\frac{\partial \phi}{\partial p} \qquad (3)$$

Assuming that the volumetric ratio of the stationary and mobile phases is constant regardless of the pressure change, ΔV_m can be determined with a linear regression:

$$\Delta V_m = -RT\frac{\partial \ln k}{\partial p} \qquad (4)$$

We can assume that the partial molar volume increases linearly with increasing carbon number for the members of a homologous series [13]. When the contribution of the functional group to the partial molar volume is V_0 and V_{CH_2} is the unit molar volume increase due to the addition of one CH_2 group, the adsorption-induced change of the partial molar volume is:

$$\Delta V_n = \Delta V_0 + n\Delta V_{CH_2} \qquad (5)$$

The combination of Equations 3 and 5 yields:

$$\frac{\partial \ln k_n}{\partial p} = -\frac{\Delta V_0}{RT} - n\frac{\Delta V_{CH_2}}{RT} + \frac{1}{\phi}\frac{\partial \phi}{\partial p} \qquad (6)$$

For two successive homologues, the separation factor can be written as

$$\alpha_{n+1,n} = \frac{k_{n+1}}{k_n} \qquad (7)$$

On the basis of Equations 6 and 7, we arrive at the following expression [13]:

$$\Delta V_{CH_2} = -RT\frac{\partial \ln \alpha_{n+1,n}}{\partial p} \qquad (8)$$

Experimental

Chemicals

Thiourea, toluene, ethyl benzene, butyl benzene, pentyl benzene, phenol, acetophenone, N,N-dimethylaniline, benzophenone were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), HPLC-grade acetonitrile was purchased from Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spain). Water was bidistilled in house in glass apparatus.

Chromatography

Separations were carried out on a Gynkotek HPLC system consisting of a P 580 NDG precision pump, 170 S diode array detector and Chromeleon chromatography data system. A UZ-GT-MIC high-pressure capillary flow detector cell (140 nL) from LC Packings was used. Samples were injected with an 8125 sample injection valve (Rheodyne, Cotati CA, USA) fitted with a 20 μL sample loop. Separations were carried out on a 33 × 4.6 mm KOVASIL-C14, reversed-phase column (Chemie Uetikon AG, Uetikon, Switzerland). The column is based on a high-purity non-porous, monodisperse silica bead (d_p = 1.5 μm) chemically bonded with a C_{14} alkylsilane. Constant column temperature was achieved using a water jacket, which enclosed the column and ca. 20 cm of the inlet capillary tubing to ensure proper heat exchange. The temperature was set using a HAAKE F3 circulating water bath (Berlin, Germany).

Two kinds of separations were studied: i) Aromatic hydrocarbons (toluene, ethyl benzene, butyl benzene, pentyl benzene) were separated in 40:60 acetonitrile:water; ii) polar, acidic and basic samples (phenol, acetophenone, N,N-dimethyl aniline, benzophenone) were separated in 13:87 acetonitrile:water.

Table II. Adsorption induced change of the partial molar volume of the solutes.

	25 °C		45 °C		65 °C	
	$-\Delta V_m$ (mL · mol^{-1})	RSD (%)	$-\Delta V_m$ (mL · mol^{-1})	RSD (%)	$-\Delta V_m$ (mL · mol^{-1})	RSD (%)
Toluene	6.31	19.0	5.35	22.2	–	–
Ethyl benzene	7.87	11.7	6.98	11.7	8.83	13.0
Butyl benzene	10.2	3.14	9.46	11.2	9.93	8.08
Pentyl benzene	12.5	4.00	12.2	1.67	14.7	4.90
Phenol	9.77	15.9	8.84	21.4	9.62	31.8
Acetophenone	6.87	79.9	8.35	9.84	10.5	12.7
N,N-dimethyl-aniline	7.44	13.1	3.30	11.6	1.54	29.2
Benzophenone	9.22	4.40	10.7	2.74	11.5	3.74

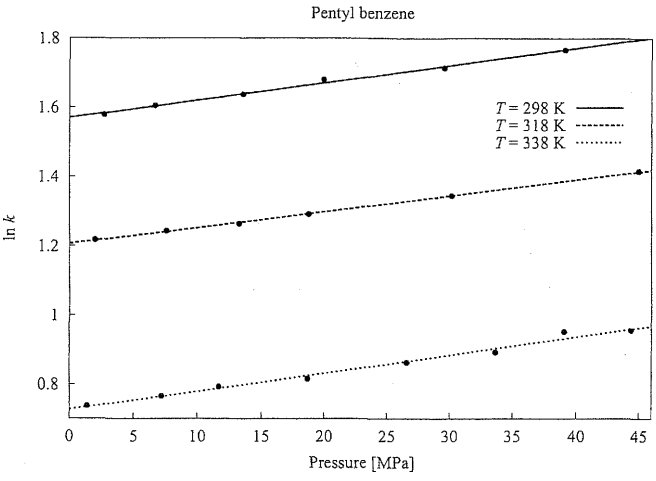


Figure 1. Plot of the logarithm of the retention factor against average pressure for pentyl benzene at three different temperatures.

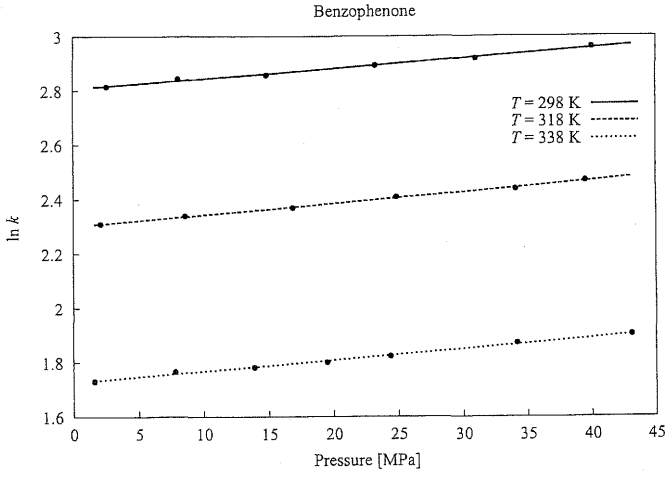


Figure 2. Plot of the logarithm of the retention factor against average pressure for benzophenone at three different temperatures.

The test separation used in this work was a modification of the widely accepted "Engelhardt test" (which was originally developed for porous stationary phases) [24–26].

Separations were carried out at three different temperatures (25 °C, 45 °C and 65 °C) at a constant flow rate of 0.15 cm^3 min^{-1}. To achieve different pressures in the system at constant flow rate, an adjustable back pressure regulator was connected to the outlet of the detector cell.

Results and Discussion

Similarly to other studies, we have observed that retention factors increase when the average pressure is increased. The retention factors of the compounds studied in this work are summarized in Table I. The change of the retention factor is relatively small when the average pressure is increased from 2 to 40 MPa. For the aromatic hydrocarbons and for most of the polar compound generally a 10–25% change of k can be observed regardless of the column temperature. The retention behavior of the N,N-dimethylaniline, however, shows and interesting difference. Whereas at 25 °C its retention factor increases by 11% between the two pressure limits, at 45 °C the difference is only 4% and is marginal (1%) at 65 °C.

The relatively little change of retention factors is due to the fact that the sample molecules studied here are small, therefore the change of the partial molar volume during adsorption is much smaller than in the case of larger molecules.

On the basis of equation 4, we used a linear least squares fitting (Levenberg-Marquardt method) to determine the ΔV_m values for every compound at each temperature. The results of the calculations are reported in Table II. The typical values for the molar volume change range between −5 and −15 cm^3 mol^{-1} for the compounds investigated. The relative standard deviation (RSD) of the numerical parameters, as given by the curve fitting routine, is also reported in Table II. From the numerical data it is obvious that, for the less retained compounds, the relative error of the parameter estimation can be quite large. For more retained sample compounds, when the retention factor is larger than $k \approx 3$, the relative error of ΔV_m drops below 5–10%.

In Figures 1 and 2, ln k is plotted against the average pressure for pentyl benzene and benzophenone, respectively. The straight lines fitted to the experimental data at different temperatures run nearly parallel, indicating that the adsorption-induced change of the partial molar volume of the solutes is very similar at the three temperatures investigated.

The increment of the change of the partial molar volume for the homologous series of the aromatic hydrocarbons can be estimated on the basis of equation 8. From the slope of the plot of $RT \ln \alpha_{n+1,n}$ against pressure (see Figure 3) we determined that $\Delta V_{CH_2} = -2.3$ cm^3 mol^{-1} (RSD = 28%). This value agrees quite well with the −2.5 (±0.8) cm^3 mol^{-1} value calculated by Guiochon and Sepaniak [13] on the basis of the experimental results of McGuffin and Evans [12].

In order to investigate the pressure dependence of some of the thermodynamic parameters, we can express Equation 1 as follows:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{R}\frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi \qquad (9)$$

The plot of ln k against $1/T$ is presented in

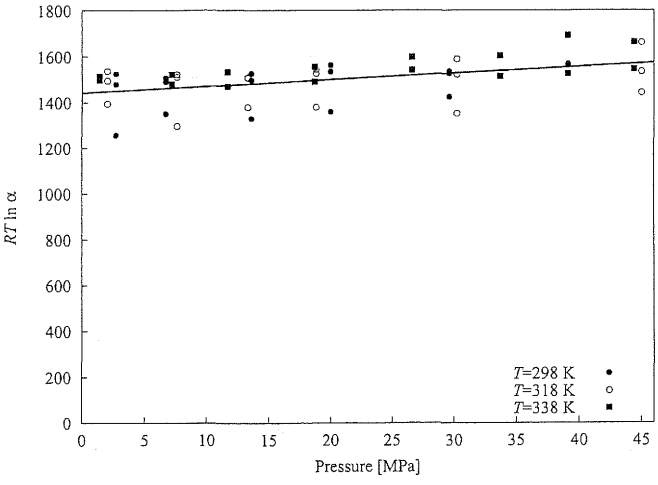


Figure 3. Plot of the logarithm of the separation factor against average pressure.

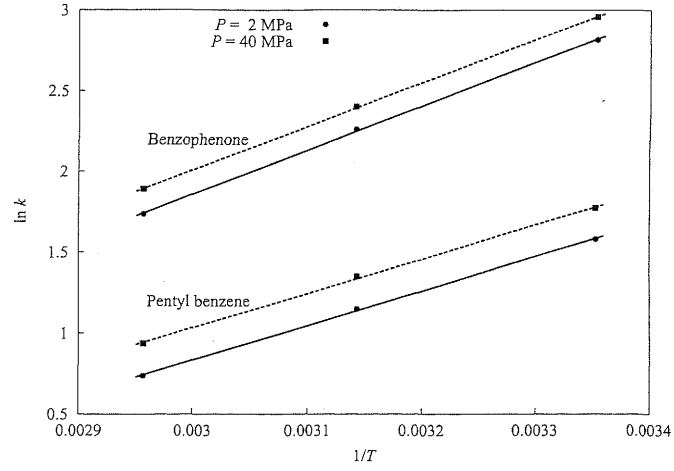


Figure 4. Temperature dependence of the retention factor of pentyl benzene and benzophenone.

Figure 4 for pentyl benzene and benzophenone in the case of 2 and 40 MPa average pressure. From the slope and the intercept of the lines – and utilizing the ϕ = 0.44 value of the phase ratio, – we can determine that for pentyl benzene ΔH = $-17.7\,\mathrm{kJ\,mol^{-1}}$, $\Delta S = -52.6\,\mathrm{J\,K^{-1}\,mol^{-1}}$ at 2 MPa, and $\Delta H = -17.4\,\mathrm{kJ\,mol^{-1}}$, $\Delta S = -50.6\,\mathrm{J\,K^{-1}\,mol^{-1}}$ at 40 MPa. The values for benzophenone are ΔH = $-22.6\,\mathrm{kJ\,mol^{-1}}$, $\Delta S = -59.1\,\mathrm{J\,K^{-1}\,mol^{-1}}$ at 2 MPa, and $\Delta H = -22.3\,\mathrm{kJ\,mol^{-1}}$, $\Delta S = -57.0\,\mathrm{J\,K^{-1}\,mol^{-1}}$ at 40 MPa.

For both compounds the difference of the enthalpy change, $\Delta(\Delta H)$ is 0.3 kJ $\mathrm{mol^{-1}}$ when the pressure changes from 2 to 40 MPa, whereas on the basis of the change of the partial molar volume (p = $38 \times 10^6\,\mathrm{N\,m^{-2}}$, $\Delta V_m = 10^{-5}\,\mathrm{m^3\,mol^{-1}}$) $p\Delta V_m \approx 0.4\,\mathrm{kJ\,mol^{-1}}$ can be calculated. Therefore, we can state that the difference of the enthalpy change is mostly due to the adsorption induced change of the solutes' molar volume.

Conclusions

We have demonstrated experimentally that pressure has an impact on retention in reversed phase liquid chromatography. Our calculations have revealed that the change of retention parameters can be attributed to the fact that the partial molar volume of the solute is smaller when adsorbed in the stationary phase than it is in the liquid mobile phase. The adsorption induced decrease of the partial molar volume of the aromatic hydrocarbons and polar compounds investigated was between $\Delta V_m = 5 - 15\,\mathrm{cm^3\,mol^{-1}}$. The calculations have shown that for the homologous series of the aromatic hydrocarbons, the increment of the decrease of the partial molar volume due to the addition of one CH_2 group, is approximately ΔV_{CH_2} = $2.3\,\mathrm{cm^3\,mol^{-1}}$.

Acknowledgement

This work was supported in part by grant T 034353 and T 032657 from the Hungarian National Science Foundation (OTKA).

References

[1] Ohmacht, R.; Boros, B. *Chomatographia* **2000**, *51*, S-205.
[2] McGuffin, V.L.; Chen, S.-H. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 930.
[3] MacNair, J.E.; Lewis, K.C.; Jorgenson, J.W. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 983.
[4] Ringo, M.C.; Evans, C.E. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4964.
[5] Ringo, M.C.; Evans, C.E. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 5525.
[6] Ringo, M.C.; Evans, C.E. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 315. A
[7] MacNair, J.E.; Patel, K.D.; Jorgenson, J.W. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 700.
[8] Lan, K.; Jorgenson, J.W. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2773.
[9] Prukop, G.; Rogers, L.B. *Separation Sci. Technol.* **1978**, *13*, 59.
[10] Katz, E.; Kogan, K.; Scott, R.P.W. *J. Chromatogr.* **1983**, *260*, 277.
[11] Tanaka, N.; Yosimura, T.; Araki, M. *J. Chromatogr.* **1987**, *406*, 247.
[12] McGuffin, V.L.; Evans, C.E. *J. Microcolumn. Sep.* **1991**, *3*, 513.
[13] Guiochon, G.; Sepaniak, M.J. *J. Chromatogr.* **1992**, *606*, 248.
[14] Berek, D.; Macko, T. *J. Liq. Chrom.* **1998**, *21*, 2265.
[15] Berek, D.; Macko, T. *Pure & Appl. Chem.* **1989**, *61*, 2041.
[16] Chalányová, M.; Macko, T.; Kandrač, J.; Berek, D. *Chromatographia* **1984**, *18*, 668.
[17] Berek, D.; Chalányová, M.; Macko, T. *J. Chromatogr.* **1984**, *286*, 185.
[18] Martire, D.E.; Boehm, R.E. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 2433.
[19] Unger, K.K.; Gilge, G.; Kinkel, J.N.; Hearn, M.T. W. *J. Chromatogr.* **1986**, *359*, 61.
[20] *Kovasil Data Folder* **1998**.
[21] *Micra Scientific, Technical Bulletin* **1997**.
[22] Ohmacht, R.; Kiss, I. *Chromatographia* **1996**, *42*, 595.
[23] Ohmacht, R.; Boros B. *Chromatographia* **1999**, *50*, 75.
[24] Chollet, D.; Castella, E.; Combe, P.; Arnera, V. *J. Chromatogr.* **1996**, *683*, 237.
[25] Engelhardt, H.; Jungheim, M. *Chromatographia* **1990**, *29*, 59.
[26] Engelhardt, H.; Löw, H.; Götzinger, W. *J. Chromatogr.* **1991**, *544*, 371.
[27] Engelhardt, H.; Arangio, M.; Lobert, T. *LC. GC Int.* **1997**, *10*, 803.
[28] Endele, R.; Halász, I.; Unger, K. *J. Chromatogr.* **1974**, *99*, 377.
[29] Halász, I.; Endele, R.; Asshauer, J. *J. Chromatogr.* **1975**, *112*, 37.
[30] Martin, M.; Eon, C.; Guiochon, G. *J. Chromatogr.* **1975**, *110*, 213.
[31] Shu-Hui, C.; Chun-Tzan, H.; Kai-Yun, H.; Jei-Ming C. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *891*, 207.
[32] Szabelski, P.; Cavazzini, A.; Kaczmarski, K.; Liu, X.; van Horn, J.; Guiochon G. *J. Chromatogr.* **2002**, A *950*, 41.

Received: Feb 28, 2002
Revised manuscript received: Apr 5, 2002
Accepted: Apr 15, 2002