

**NAGYSEBESSÉGŰ HPLC ELVÁLASZTÁSOK KIDOLGOZÁSA
BIOAKTÍV VEGYÜLETEK MEGHATÁROZÁSÁRA**

Boros Borbála

Ph.D értekezés tézisei

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2007.

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 kromatográfiai 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 kisserelt 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 kromatográfiai kutatással is együtt jár, nincs általánosan alkalmazható vizsgálati séma, vagy eljárás, amely valamennyi felmerült analitikai probléma megoldására megfelel.

A kromatográfiai berendezések fejlesztésével párhuzamosan, az állófázisok (speciális töltetek) és oszlopok továbbfejlesztésére egyaránt szükség volt.

Az állófázis a kromatográfiai 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 kromatográfiai töltet kiválasztására. A folyadékkromatográfiai elválasztásokhoz egyre gyakrabban alkalmazzák a 3 μm -nél kisebb szemcseátmérőjű, *nemporózus*, *monodiszperz*, fordított fázisú tölteteket. Ezen töltetek alkalmazása eleinte biopolimerek gyors analizésénél terjedt el, majd később a kis molekulatömegű szerves vegyületek elválasztásában is szerepet kaptak.

KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK

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

A kromatográfias analízisekhez olyan vegyületcsoportok választására törekedtem, melyek az élettudományokban, az orvosi biológiai 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 kromatográfias 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 zsírolékony 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.
6. Az alkaloidok elválasztása fordított fázisú kromatográfias 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.

EREDMÉNYEK

Munkám során *nemporózus, monodiszperz* szilikagél alapú hidrofób állófázis alkalmazhatóságát vizsgáltam bioaktív vegyületek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztásához. Bár ezeket az állófázisokat biopolimerek elválasztására fejlesztették ki, a kidolgozott analízisek bizonyítják, hogy sikeresen alkalmazhatók kis móltömegű ($M < 500$) vegyületek gyors elválasztására is. Analíziseimhez 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 használtam. 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 kötással kapcsolva. Az így előállított hidrofób ún. fordított fázisú töltet egy 33 \times 4,6 mm 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 bizonyítottam az összefüggés általános érvényességét. Elsőként mutattam 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 találtam a retencióváltozás és az adszorbeált/nem adszorbeált molekulák móltérfogatának változása között.
- 3.) A bioaktív molekulákra kifejlesztett gyors kromatográfiás elválasztásokhoz a modell elegyek tiszta standard mintákból készültek. A különböző mátrixokból (pl. növényi, biológiai) készült extraktumok HPLC analízise a kidolgozott módszerek körülményeinek módosítását teheti szükségessé (pl. a tiszta szubsztanciák kromatográfiás csúcaival együtt retardáló komponensek zavaró hatása miatt).

Folyadékkromatográfiai analíziseim során az alábbi vegyületcsoportok vizsgálatára dolgoztam ki új, szupergyors elválasztási eljárást:

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

A kiválasztott mintavegyületek nem csak a gyakorlat szempontjából fontosak. Kiválasztásuknál az is szerepet játszott, hogy kromatográfiai szempontból is sokféle eltérő elválasztási problémát jelentő vegyületcsoportokkal igazoljam az általam alkalmazott 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 kromatográfiai rutin szempontjából önmagában is előnyös, de más kedvező hatásokkal is jár, mint például az alacsony vegyszerfogyasztás.

A rövid analízisidő keskeny kromatográfiai csúcsokat eredményezett. A minták szételegyedése a szokásos porózus fázisokon végzett elválasztásokhoz képest csekély. Az elválasztott vegyületek többségére, a kimutatási határ a *femtomol* tartományba esett.

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

EGY KIVÁLASZTOTT KUTATÁSI EREDMÉNY BEMUTATÁSA

Ópium alkaloidok HPLC analízise

Ópium alkaloidok elválasztását és mennyiségi meghatározását legeredményesebben fordított fázisú (RP) és nagyérzékenységű folyadékkromatográfias (HPLC) módszerrel végzik, porózus állófázis alkalmazása mellett. A nyers ópium és a „mák szalma” kromatográfias analízise során a kísérő anyagok interferálhatnak a meghatározni kívánt ópium alkaloiddal és ezért legalább két fő alkaloid meghatározása bizonytalan. A későn eluálódó komponensek csúcsalakja széles, és ezek a problémák együttesen kihatnak az alkaloidok pontos meghatározására. Ezért gyakran a mák alkaloidok folyadékkromatográfias vizsgálatánál csak négy, sőt egyes esetekben csak két fő alkaloid mérésével kénytelenek megelégedni.

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

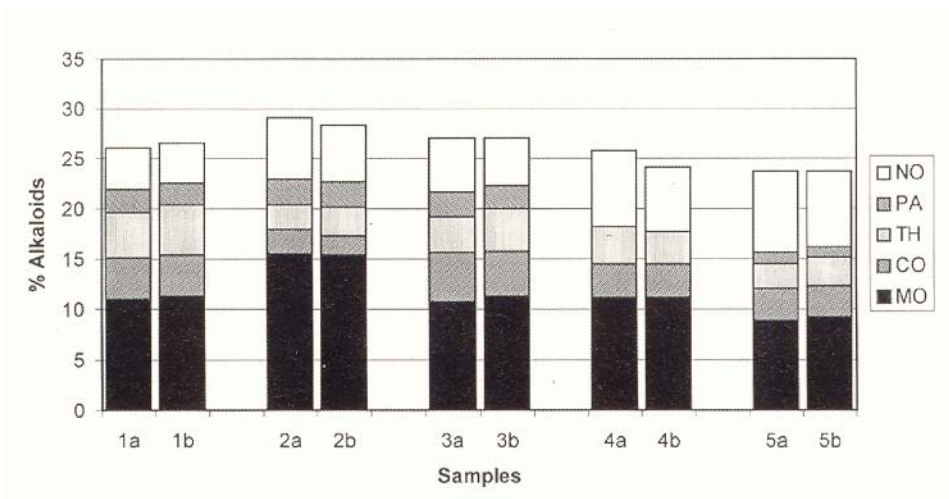
A fő ópium alkaloidok (morfin, kodein, tebain, papaverin, és noszkapin) elválasztására egy új fordított fázisú HPLC módszert fejlesztettem ki, *nemporózus*, *monodiszperz* állófázis alkalmazásával. A mennyiségi meghatározáshoz belső standardként (internal standard) brucint alkalmaztam. A gradiens elúciós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

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 2. ábra mutatja be. Ezzel a vizsgálati módszerrel 1,5 percre tudtam az ópium alkaloidok analízisidejét csökkenteni úgy, hogy az elválasztást 50 °C-on végeztem és ionpár képzőnek a hepta-fluoro-vajsavat (HFBA) használtam. Így valamennyi ópium alkaloidra jó elválasztást kaptam. 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 kaptam, amikor az oldószererősségen kívül a hepta-fluoro-vajsav mennyiségét is fokozatosan növeltem a gradiens során. Kimértem a vizsgált alkaloidok kimutatási határát, melyet a 4. táblázat tartalmaz.

Az alkaloidok mennyiségi meghatározásánál (2. táblázat) az öt fő ópium alkaloidra kalibráltam. A mért koncentráció tartományban a koncentráció és a csúcs alatti terület közötti korrelációs koefficiens jobb volt, mint 0,9988 (1. táblázat).

Az 1. ábrán összehasonlításként a *nemporózus* és a *porózus* állófázison végzett kromatográfias vizsgálati eredmények láthatók.

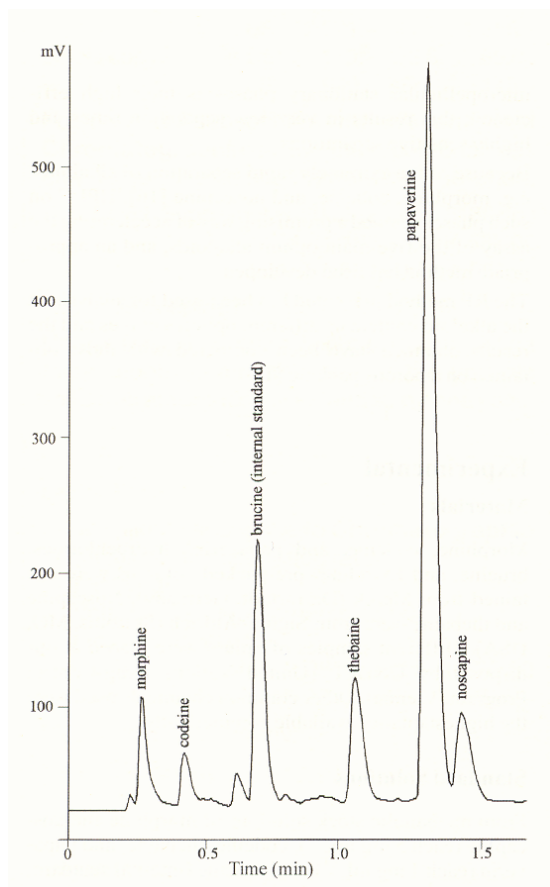
Mindkét rendszerben hasonlóak az elválasztás eredményei (alkaloid %), de a *nemporózus* rendszerben lényegesen gyorsabban, és nagyságrendekkel érzékenyebben lehet a meghatározásokat végezni.



1.ábra: Nemporózus és a porózus állófázison végzett, öt különböző ópium minta kromatográfiai vizsgálati eredményeinek (alkaloid %) összehasonlítása

(a) porózus töltet (b) nemporózus töltet

MO=Morfín; CO=Kodein; TH=Thebain; PA=Papaverin; NO=Narkotin



2. ábra: Ópium alkaloidok HPLC elválasztása KOVASIL-C₁₈ oszlopon

1. táblázat: Alkaloidok lineáris tartományának vizsgálata

Alkaloid	Lineáris tartomány [mg/ml]	Korrelációs koefficiens	Merekség	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 vettem fel a kalibrációs egyenest.

2. 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 számoltam.

3. 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 számoltam.

4. 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

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
Impaktfaktor: 2,079
- 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
Impaktfaktor: 0,262
- 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
Impaktfaktor: 2,079
- 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
Impaktfaktor: 2,079
- 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
Impaktfaktor: 2,079
- 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
Impaktfaktor: 2,079

ELŐADÁS ÉS POSZTER JEGYZÉK

Előadás jegyzék:

1. Előadás helye: XX. Kémiai Előadói Napok, Szeged
Előadás időpontja: 1997. október 15.
Előadás címe: Szupergyors biokromatográfias 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 folyadékkromatográfias (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 Universal 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 Anket '99
Előadás időpontja: 1999. május 05.
Előadás címe: Nem porózus, fordított fázisú töltetek alkalmazása alkaloidok gyors folyadékkromatográfias 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. Pharamanalysis 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: P15
4. Poszter megjelenésének helye: Elvásztástudományi 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
7. Poszter megjelenésének helye: Balaton Symposium '01, Siófok,
Poszter megjelenésének időpontja: 2001. szeptember 2-4.
Poszter címe: Simultaneous Determination of Oxidised and Reduced Glutathione
Szerzők: Boros, B., Ohmacht, R.,
Book of Abstracts: P-92