

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Biopolimerek elválasztása különböző típusú folyadék- kromatográfiás állófázisokon

PhD értekezés

Kiss Ibolya

Témavezető: **Dr. Felsing Attila**
egyetemi tanár

Dr. Ohmacht Róbert
egyetemi tanár



PÉCS, 2010

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2	BEVEZETÉS	7
3	TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK.....	8
3.1	A kromatográfia története	8
3.2	Kromatográfias állófázisok	10
3.2.1	Szilikagél adszorbensek	10
3.2.2	Szilikagél alapú állófázisok	12
3.2.2.1	Fordított fázisú (RP) töltetek	13
	Porózus töltetek.....	14
	Porózus héjú töltetek	15
	Nemporózus töltetek.....	15
3.2.3	Szervetlen, nem szilikagél alapú állófázisok	16
3.2.4	Szerves polimer alapú állófázisok	17
3.3	Az anyagátadás kinetikájának vizsgálata.....	17
3.3.1	Az anyagátadás elmélete.....	18
3.3.1.1	Általános sebességi modell.....	19
3.3.1.2	A van Deemter-egyenlet.....	23
3.3.1.3	Momentum analízis	24
3.3.1.4	Sztochasztikus modell.....	25
4	KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK	27
5	KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK.....	29
5.1	Az alkalmazott, vizsgált kromatográfias állófázisok	29
5.2	Kromatográfias rendszerek.....	33
5.3	Felhasznált vegyszerek	34
5.4	Mérési körülmények	35

6	MÉRÉSEK ÉS EREDMÉNYEK.....	37
6.1	Kovasil állófázisok stabilitásvizsgálata.....	37
6.1.1	Savas stabilitásvizsgálat.....	38
6.1.2	Bázikus stabilitásvizsgálat.....	39
6.2	Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfiás elválasztása ...	39
6.2.1	Vitaminok HPLC analízise.....	40
6.2.1.1	Vízoldékony vitaminok elválasztása	40
	Kimutatási határ vizsgálata.....	43
6.2.1.2	Zsírolékony vitaminok.....	44
	Kimutatási határ vizsgálata.....	47
	Az A-vitamin és A-vitamin aldehid, valamint az E-vitamin és E- vitamin acetát kimutatása egymás mellett	48
6.2.2	Peptidek és fehérjék elválasztása	50
6.2.2.1	A tripszin és kimotripszin tisztaságának ellenőrzése	51
6.2.2.2	A fehérjék enzimatis bontása.....	54
	Szérumalbumin	54
	Humán és szarvasmarha inzulin.....	57
	Humán és szarvasmarha citokróm-c	59
6.2.2.3	Bioaktív peptidek elválasztása és kimutatási határának vizsgálata.....	61
6.2.2.4	Standard protein keverék elválasztása, a visszanyerés vizsgálata	63
6.2.2.5	β -laktoglobulin B és β -laktoglobulin A elválasztása	64
6.3	Az anyagátadási együtthatók meghatározása	66
6.3.1	Térkitöltési tényező meghatározása.....	66
6.3.2	Az anyagátadási együtthatók meghatározása.....	68
	Az általános sebességi modell alkalmazása.....	73
	A van Deemter-egyenlet alkalmazása	76
	Momentum analízis alkalmazása	79
	Sztocasztikus modell.....	83
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	85
8	MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK.....	87
9	IRODALOMJEGYZÉK	92
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	99

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α_1	nulladrendű Bessel-függvény első gyöke
δ_d	második centrális momentum szemcsén belüli diffúzió együtthatója
δ_f	második centrális momentum folyadék-szemcse anyagátadási együtthatója
δ_L	második centrális momentum axiális diszperziójának együtthatója
Γ_e	külső térkitöltési tényező
Γ_p	belső térkitöltési tényező
Γ_t	teljes térkitöltési tényező
η	mozgófázis viszkozitása
θ	oszloptöltet tortuozitás faktora
μ_1	kromatográfias csúcs első abszolút momentuma
μ_2'	kromatográfias csúcs második centrális momentuma
$(\mu_2')_{inj}$	injektálás hozzájárulása a második centrális momentumhoz
$(\mu_2')_{sys}$	készülék oszlopon kívüli holtterefogatának hozzájárulása a második centrális momentumhoz
μ_m	mozgófázis hatása a csúcsszélesedésre
μ_s	állófázis hatása a csúcsszélesedésre
μ_{sys}	rendszer oszlopon kívüli térfogatának hatása a csúcsszélesedésre
ρ_p	szemcse sűrűsége
ρ_s	mozgófázis sűrűsége a pórusokban
σ^2	kromatográfias csúcs varianciája
σ_1^2	csúcs szélességet jellemző, hossz alapján számolt variancia
T_m	részecske várható tartózkodási ideje a mozgófázisban két megkötődés között
T_s	részecske várható tartózkodási ideje az állófázison egy megkötődés során
φ	fázisarány
A	oszlop keresztmetszet
BET	Brunauer-Emett-Teller módszer
BSA	szarvasmarha szérumalbumin
CH ₃ CN	acetonitril
CH ₃ OH	metanol

d	oszlop átmérő
d_p	átlagos szemcseátmérő
D_L	axiális diszperziós együttható
D_m	minta molekuláris diffúziós együtthatója a tömbfázisban
D_p	pórusbeli diffúziós együttható
$D_{p,m}$	pórus diffúziós együtthatója
D_s	felület diffúziós együtthatója
DSC	differenciális pásztázó kalorimetria
ΔE	rendszer belsőenergia változása
EMG	exponenciálisan módosított Gauss-függvény
ΔG	rendszer Gibbs-féle szabadentalpia változása
GC	gázkromatográfia
GE	Gunn-egyenlet
GR	általános sebességi modell (General Rate model)
ΔH	rendszer entalpia változása
H	tányérmagasság
H_{ext}	szemcse felületén kialakuló anyagátadási gátlás
H_L	axiális diszperzió hozzájárulása tányérmagassághoz
H_{MA} és H_0	Suzuki által bevezetett $H/2u_n$ mennyiségek
H_p	szemcse pórusaiban lejátszódó diffúziós gátlás
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
HSA	humán szérumalbumin
k'	retenciós tényező
k_a, k_d	adszorpció – deszorpció sebességi állandó
k_{ext}	külső anyagátadási együttható
K	adszorpció egyensúlyi állandó
L	oszlop hossza
M	molekulatömeg
MA	momentum analízis
n	adszorpció lépések várható értéke
p	nyomás
PGC	porózus, grafitizált szén
PS-DVB	poli(sztírol-divinil-benzol)
r_p	átlagos szemcsesugár
R	egyetemes gázállandó
Re	Reynolds-szám

RP-HPLC	fordított fázisú kromatográfia (Reversed Phase HPLC)
ΔS	rendszer entrópia változása
Sc	Schmidt-szám
SEC	méretkizárásos kromatográfia (Size Exclusion Chromatography)
t_R	korrigált retenciós idő
t_0	oszlop holtideje
T	oszlop abszolút hőmérséklete
TE	tányérmagasság egyenlet
TEA	triethyl-amin
TFA	trifluor-ecetsav
THF	tetrahidrofurán
TLC	vékonyréteg-kromatográfia (Thin Layer Chromatography)
TLCK	1-klór-3-tozilamido-7-amino-L-2-heptanon
TPCK	L-tozilamid-2-fenietil-klómetilketon
u_n	szabad keresztmetszeti térfogatra vonatkoztatott lineáris sebesség
UHPLC	ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Ultra Performance Liquid Chromatography)
ΔV_m	álló- és mozgófázisbeli parciális moláris térfogatok különbsége
V_0	töltet szemcsék közötti térfogata
V_G	oszlop teljes, geometriai térfogata
V_M	oszlop holttérfogata
V_p	töltet pórustérfogata

2 BEVEZETÉS

A múlt század második felében az elválasztástechnikai módszerek jelentős része ugrásszerű fejlődésen ment keresztül, melynek során egyaránt javult az elválasztások sebessége, hatékonysága, megbízhatósága és felbontása.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) napjainkra az egyik legjelentősebb műszeres analitikai módszerré vált. Bonyolult feladat a folyadékfázisú analitikai elválasztások tervezése, mivel egyszerre több tényezőt is figyelembe kell venni, ilyen pl. a mozgófázis, az állófázis és a mintakomponensek kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonsága, valamint a detektálhatóság paraméterei. A módszer elvében és alkalmazásában számos lehetőség rejlik, a mérések során sok információ nyerhető. A módszer, az elemzés gyorsaságát és érzékenységét tekintve a korszerű analitikai módszerekkel szembeni elvárásoknak kiválóan megfelel.

A fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC) retenciós mechanizmusának magyarázatára számos elmélet született. A hidrofób kölcsönhatások elmélete, a megoszlási elmélet, valamint az adszorpciós elmélet a legfontosabbak. Az RP-HPLC retenciós mechanizmusa jelenleg is a folyadékkromatográfia fontos kutatási területe.

A műszeres analitikai technikák, módszerek többsége, mint vizsgáló módszer, eljárás terjedt el a kutató és fejlesztő laboratóriumokban. Így volt ez a kromatográfias eljárásokkal is. A HPLC kiemelt fontossággal bír a vízanalitika, a bioanalitika, a gyógyszergyártás, és a környezetvédelem területén.

Jelenleg valószínűleg több elválasztást végeznek HPLC módszerekkel, mint az összes többi elválasztáson alapuló módszerrel együttvéve. A módszer népszerűségének oka, hogy könnyen kivitelezhető és széleskörűen alkalmazható mind a kisméretű molekulák, mind pedig a biopolimerek elválasztására.

A kromatográfias berendezések fejlődése szükségessé tette az állófázisok (a speciális töltetek) és oszlopok fejlesztését, kidolgozását. Igény van az újabb és újabb, a korábbi-tól eltérő tulajdonságú állófázisok alkalmazására, így a töltetfejlesztés területén ma is folyamatos fejlődés tapasztalható, hiszen az állófázis a kromatográfias elválasztások „lelke”. Napjainkban a kutatók, és a gyártók is arra törekednek, hogy minél jobban megértsék a retenciót és a szelektivitást meghatározó folyamatokat. Különösen fontos e folyamatok molekuláris szinten történő értelmezése, összefüggése az állófázisok fizikai-kémiai tulajdonságaival.

3 TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

3.1 A kromatográfia története [1-3]

Mihail Szemjonovics Cvet (1872-1919) orosz botanikus nevéhez fűződik a kémiai elemzés céljára alkalmazható módszer, a kromatográfia bevezetése. 1903-ban a növényi színyanyagok tanulmányozására kifejlesztette az oszlopkromatográfias eljárást, megalkotta az első oszlopkromatográfias rendszert.

Elsőként publikált a kromatográfias elválasztások lehetőségéről [4]. A '*kromatográfia*' elnevezést, mely a görög χρώμα: chroma, szín és a γραφειν: "grafein" írni szavakból ered Cvet használta először az elválasztási módszer elnevezésére 1906-ban.

A növényi pigmentek és tejtermékek oszlopkromatográfias elválasztásáról az amerikai L.S. Palmer számolt be közleményében 1913-ban.

1930-ban Cvet és Palmer munkásságát tanulmányozva Edgar Lederer oszlopkromatográfias kísérleteket végzett, ahol a tojássárgája pigmentjeit vizsgálta. Az elválasztási módszer kiválasztásánál figyelembe vette, hogy a módszer meglehetősen gyors, így feltételezte, hogy elkerülhető a karotinoid molekulák degradációja.

1937-ben az Erzsébet Egyetemen (akkori Pécsi Tudományegyetem) Zechmeister László és Cholnoky László a karotinoidok vizsgálatával, azok kromatográfias elválasztásával foglalkozott. Megjelentették az első kromatográfias könyvet: „Die chromatographische Adsorptionsmethode” címmel [5].

A vékonyréteg kromatográfia, ahol üveglapra felvitt adszorbens rétegen végezték az elemzéseket Oroszországból származik [6]. Kezdetben kötőanyagként Kirchner és munkatársai [7] keményítőt használtak, majd Stahl [8] kalcium-szulfátot alkalmazott. Stahl nevéhez fűződik a vékonyréteg kromatográfia (TLC) bevezetése (1956) és széles körben való elterjedése [9].

Martin és Synge kutatásai, fejlesztései a kromatográfia területén jelentősek, pl. 1941-ben vízzel nedvesített és indikátorral kezelt szilícium-dioxid állófázison aminosavakat választottak el.

1943-ban Martin és munkatársai állófázisként cellulózt használtak elválasztásaikhoz; ami a papírkromatográfia kialakulásához vezetett.

1952-ig Martin és James a gáz-folyadékkromatográfiaival kísérleteztek. Illékony komponensek elemzéséhez gázhalmazállapotú mozgófázist, állófázisként pedig egy nem illékony folyadékkal bevont szilárd hordozót alkalmaztak.

A gázkromatográfias (GC) elválasztási módszerek mezőgazdasági és gyógyszeripari alkalmazása az 1960-as évek közepétől terjedt el.

Olyan kromatográfias elválasztási technika kifejlesztése vált szükségessé, amellyel megvalósítható a nem illékony komponensek elválasztása és pontos mennyiségi meghatározása.

1964-65-ben az első ilyen készüléket Horváth Csaba építette meg a Yale Egyetemen. A módszert nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiának (High Performance Liquid Chromatography) nevezte el [10,11]. A kutatások arra irányultak, hogy a folyadékkromatográfias elválasztások sebessége nőjön, és a hatékonysága javuljon. A módszer kidolgozása során tömör üveg szemcsékre porózus sztiroldivinil-benzol réteget készített, és ezzel az ún. pellikuláris töltettel végezte első kísérleteit [3].

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) „gyermekkora” az 1960-70-es évekre tehető [2,4]. Az első kereskedelmi HPLC készülékek a '60-as évek végén kerültek forgalomba. A kezdeti HPLC-elválasztások folyadék-folyadék megoszláson [12] vagy adszorpción alapultak [13], és szabálytalan alakú, 50-300 μm szemcseméretű ipari szorbenseket (szilikagél, alumínium-oxid, aktív szén) alkalmaztak.

Az 1970-es években megoldották a kis szemcseméretű (10-15 μm) szorbensek előállítását és hatékony oszlopok töltését. A kémiaiilag kötött állófázisok kifejlesztése a folyadék-folyadék megoszlásos kromatográfia sok problémáját megoldotta. A hidrofób csoportokkal borított, ún. fordított fázisú töltetek széles körben kerültek alkalmazásra, megnövelve az elválasztható komponensek körét, lehetővé tették a gradiens elúció alkalmazását [14,15].

A kromatográfias elméletek az 1940-es évek második felében gyors fejlődésen mentek keresztül. A tényérelméleteket [16,17], valamint azok matematikai leírására szolgáló parciális differenciálegyenletek megoldását [18,19] párhuzamosan dolgozták ki.

A lineáris kromatográfia területén a megoldást Lapidus és Amundson [18], valamint van Deemter és munkatársai [19] munkája hozta meg. A nemlineáris kromatográfias elméletek fejlődését a matematikai elméletek lassú fejlődése gátolta. A megfelelő matematikai megoldások csak az 1950-es években jelentek meg, alkalmazásuk a kromatográfia területén még későbbre tehető.

Martin és Synge 1952-ben a megoszlásos kromatográfia kifejlesztéséért Nobel-díjat kapott. Leírták az elválasztás alapjait, az első kromatográfias elméletet [16], miszerint a kromatográfias állófázis elméleti tényérokra osztható fel, ahol az álló- és mozgófázisban lévő anyagok egyensúlyi megoszlása valósul meg (kromatográfia tényérelmélete). Giddings és Eyring 1955-ben megalkotta a kromatográfia sztochasztikus modelljét, ami – molekuláris szinten vizsgálva az elválasztást – leírja a molekulák véletlenszerű ván-

dorlását az állófázisban. A kromatogram a molekulák állófázisban töltött idejének valószínűségi sűrűségfüggvénye [20].

1956-ban van Deemter megalkotta a kromatográfia kinetikus elméletét [19], mely szerint az elválasztás során az állófázison lejátszódó termodinamikai és kinetikai folyamatok határozzák meg a tányérmagasságot és a sávszélesedés mértékét.

Az általános sebességi modell megoldását Kučera [21] Laplace-tartományban levezette, és kiszámította a kromatográfias csúcs momentumait.

3.2 Kromatográfias állófázisok

Az 1970-es évek közepétől a HPLC fejlődésével az állófázisok is jelentős fejlődésen mentek keresztül [22]. Az alkalmazható adszorbenseknek, folyadékkromatográfias tölteteknek, állófázisoknak nagyon sokféle, és néha egymásnak ellentmondó követelményeknek kell megfelelni. A kromatográfias elválasztás a töltet felületén, és pórusaiban történik, az elválasztandó komponensek eltérő szorpciós viselkedésének megfelelően. A töltetek a felületi struktúrájuk szerint lehetnek *porózusak*, illetve *nemporózusak*.

A szilikagél alapú töltetek [23,24] alkalmazása széles körben elterjedt, ugyanis a töltet-szemcsék mechanikai stabilitása jó és az oszlopon előforduló 50-100 MPa nyomásesést is jól viselik.

Végeztek vizsgálatokat más, szervetlen alapú állófázisok (alumínium-oxid, titán-dioxid, cirkónium-dioxid) alkalmazására is [25-29], mivel e vegyületek pH stabilitása sokkal jobb, mint a szilikagélé. Azonban a megfelelő pórusstruktúrát eddig még nem érték el, és belőlük a kémiailag kötött töltetek is csak bonyolult módon készíthetők.

A szervetlen (csaknem kizárólag szilikagél) alapú állófázisok mellett a szerves polimer (főleg a sztírol-divinil-benzol) alapú állófázisok [30,31] is elterjedtek. Előnyük a nagy pH stabilitás (pH=0–14), valamint az, hogy felületi tulajdonságaik kémiai reakciókkal könnyen változtathatók, viszont az előállítás módjától függően gyakran gyengébb nyomásállóság és – összehasonlítva a szilikagél alapú töltetekkel – kisebb hatékonyság jellemzi őket.

3.2.1 Szilikagél adszorbensek

A porózus szilikagéleket kromatográfias szempontból jellemezhetjük geometriai sajátosságaik, pórusszerkezetük és a belőlük tölthető oszlopok hatékonysága szerint.

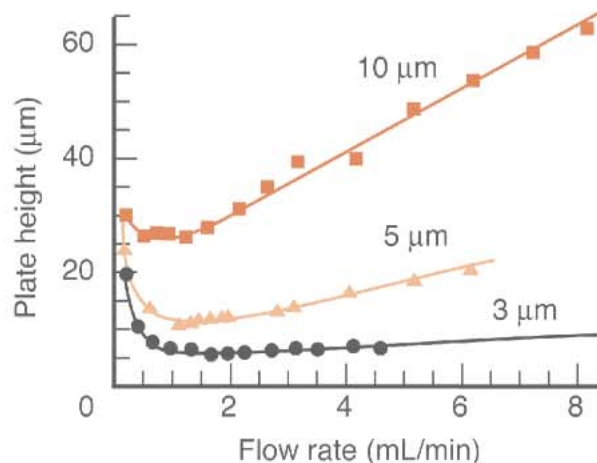
A folyadékkromatográfias gyakorlatban használt porózus szilikagélek átlagos pórusmérete 3-100 nm, pórustérfogata 0,2-2 cm³/g, fajlagos felülete pedig 10-500 m²/g között

van. A kromatográfias töltetek fajlagos felületeként általában a nitrogén vagy argon adszorpcióval a Brunauer-Emett-Teller (BET) módszerrel megadott felületet értjük [32]. A fajlagos felületet azonban kromatográfias úton a töltetek átlagos pórusméretének és pórustérfogatának ismeretében is meghatározhatjuk, az eljárás ismert molekulaméretű minták kizárásos kromatográfias körülmények közt mért áttörési idejének meghatározásán alapul [33].

A szilikagél legnagyobb előnye a mechanikai stabilitás, a nagy nyomásállóság. A nyomásesés miatt fontos a szűk szemcseméret-eloszlás, a hatékonyság miatt pedig a minél alacsonyabb átlagos szemcseméret.

Alakjuk alapján megkülönböztetünk tört (irreguláris) – ma már kevésbé használt, „olcsón” előállítható – és gömb alakú (szférikus) szilikagéleket. Míg az előbbiek nagyipari eljárással, addig az utóbbiak gyakran kifejezetten a kromatográfia igényei szerint – viszonylag kis tételben – készülnek [34,35].

Szemcseátmérőjük szerint az analitikai HPLC céljaira korábban a 10 μm , majd 1980 – 2000 között a 3–5 μm [36], jelenleg a 3 μm ill. annál kisebb átlagos szemcseméretű szilikagéleket alkalmazzák rutinszerűen. A szemcseátmérő jelentősen befolyásolja a töltet hatékonyságát. Kisebb átmérőjű töltetből nemcsak hogy kisebb elméleti tányérmagasságú oszlopok tölthetők (nagyobb hatékonyság - „keskenyebb csúcs”), hanem az áramlási sebességgel a tányérmagasság növekedése, a hatékonyság romlása (a van Deemter egyenlet „C” együtthatója) is alacsonyabb (1. ábra).



1. ábra. A szemcseméret hatása a tányérmagasságra [37]

3.2.2 Szilikagél alapú állófázisok

A folyadékkromatográfiában tehát a leggyakrabban alkalmazott állófázisok szilikagél alapúak.

A szilikagél olyan tulajdonságokkal rendelkezik, melyek a kromatográfiás elválasztásoknál előnyösek [38]. Ilyen például a pórusszerkezetnek köszönhető nagy fajlagos felület, amely lehetővé teszi a szorpciós kölcsönhatásokat. Kémiai tulajdonságaiból adódóan kromatográfiás tulajdonságai megváltoztathatók, módosíthatók, kémiailag stabilis ($\text{pH} \approx 1 - 8$).

A gömb alakú porózus szilikagél többféle módon előállítható [39], így különböző kémiai viselkedésű, fajlagos felületű, tisztaságú és pórusméret eloszlású szilikagélhez jutunk. Az előállítás módjától függően a módosítatlan szilikagélek eltérő kémia tulajdonsága a kromatográfiás viselkedésben is megmutatkozik [40-43].

Az elválasztás során a retenciós mechanizmust a módosítatlan szilikagél esetén a felületen található szilanolcsoportok, valamint a fémion szennyezés, a kémiailag módosított szilikagél (fordított fázisú töltet) esetén pedig a borítottság, a fajlagos felület és a porozitás befolyásolja nagymértékben [44,45].

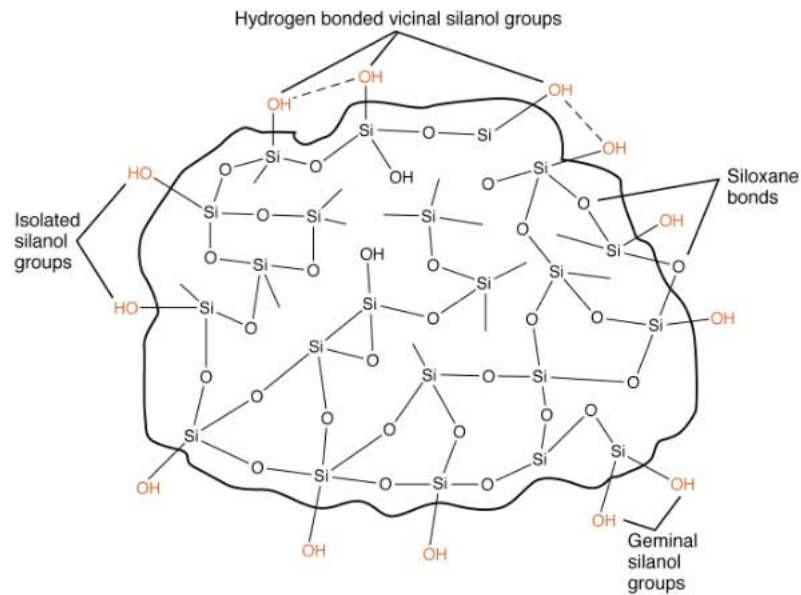
A szilikagél felületén szilanolcsoportok (-Si-OH) találhatóak, mellettük kis mennyiségben sziloxáncsoportok (-Si-O-Si-) is előfordulnak.

Megkülönböztetünk szabad (izolált)-, vicinális helyzetű és geminális helyzetű szilanolcsoportokat (2. ábra).

- Szabad szilanolcsoportokról akkor beszélünk, ha a szilanolcsoportok között nincs hidrogénkötés, ilyenkor két, szomszédos helyzetű szilanolcsoport között általában egy sziloxáncsoport található.
- Geminális helyzetű az a szilanolcsoport, ahol egy szilíciumatomhoz két hidroxilcsoport tartozik.
- Vicinális helyzetű szilanolcsoportok esetében két szomszédos szilanolcsoport között hidrogénkötés alakulhat ki.

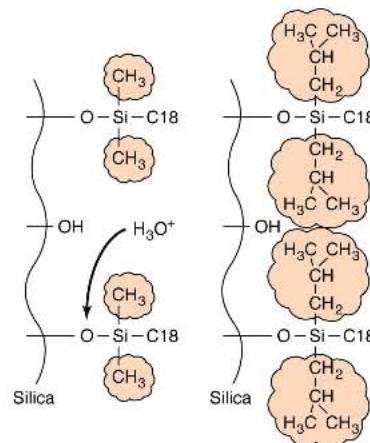
A szakirodalomban eltérő vélemények találhatóak a különböző szilanolcsoportok reakcióképességét [43,47-52] illetően. Számos szerző a szabad szilanolcsoportokat [53-55] tekinti a leginkább reakcióképesnek, a vicinális és geminális helyzetű szilanolcsoportoknak pedig az adszorpciós mechanizmusban tulajdonítanak fontos szerepet. Snyder és Ward [52] szerint a vicinális helyzetű csoportok reaktívabbak, mint a szabad (izolált) szilanolcsoportok, azonban vannak olyan közlemények is – főként

Si^{29} NMR mérések alapján – melyek a geminális helyzetű szilanolcsoportokat tartják a legreaktívabbnak [49,56-58].



2. ábra. A szilikagél felületén található szilanolcsoportok [46]

A kémiailag kötött fázisú töltetek készítésekor a szilanizálószer és a szilikagél, mint hordozó között kovalens szililéter kötések alakulnak ki (3. ábra), a kötődési pontok a felületi szilanolcsoportok.



3. ábra. Kémiailag kötött állófázis [59]

3.2.2.1 Fordított fázisú (RP) töltetek

A fordított fázisú folyadékkromatográfias elválasztásoknál a mozgófázis polárisabb az állófázisnál. A legtöbb analitikai elválasztást fordított fázisú tölteteken végzik. Gyakran alkalmaznak a C_{18} (oktadecil), vagy C_6 (3,3-dimetil-butil) láncokkal borított tölteteket, de

más lánchosszúságú alkilcsoportokkal (C₁-C₃₀) borított szilikagélekkel is eredményesen végeznek speciális elválasztásokat.

Az 1960-as évek közepétől alkalmaznak a szilikagél felületéhez kovalensen kötött szénhidrogénláncokat tartalmazó tölteteket. Az így előállított tölteteket először gázkromatográfiás adszorbensként használták. Steward és Perry [60] javaslata alapján alkalmazzák az oktadecil-klórszilánokkal hidrofóbbá tett szilikagéleket, mint folyadékkromatográfiás állófázisokat.

A legszélesebb körben elterjedt fordított fázisú állófázisok a szilanolcsoportok és szerves szilíciumvegyületek reakciójából kialakuló sziloxánok ($\equiv\text{Si-O-Si-R}_3$). Az szerves szilíciumvegyületek többféle funkciós csoportot is tartalmazhatnak, mint pl. kloro-, alkoxi-, alkil-amino-csoportokat [61]. Az állófázisok egy része monofunkcionális szerves szilíciumvegyületek felhasználásával készül. Di- és trifunkcionális szerves szilíciumvegyületekkel való reakció enyhén polimerizált fázist eredményez, ami egyaránt stabil alacsony és magas pH-n, azonban ilyen borítással nehéz egyenletes felület kialakítani. A hosszú láncú alkilcsoportokkal tökéletesen borítani, azaz az összes felületi szilanolcsoportot elreagáltatni, azok helyigénye („szterikus okok”) miatt nem lehet. Ezért az ilyen tölteteket célszerű egy következő reakcióban kis helyigényű szilánnal (metil-, etil-, izopropil-, tercier-butil-szilil csoportokkal) ismét reagáltatni, utánszilanzálni („endcapping”) [62]. Így az első lépésben el nem reagált szilanolcsoportok száma jelentős mértékben csökken. A töltetek borítottságát legegyszerűbben a töltet százalékos széntartalmával ellenőrizhetjük, a széntartalom utánszilanzálással emelkedik. Az ilyen állófázis előállításának reprodukálhatósága nagyon jó. Ezek a töltetek nagyon hatékonyak a kedvező kinetika miatt, beleértve a vékony monomer állófázisban zajló gyors diffúziót is.

A hosszú alkil-láncú (C₁₈ vagy hosszabb) kötött állófázisok (hidrofóbbok) igen nagy víz-tartalmú (> 90%) mozgófázissal nem használhatók, mivel a vizes közegben az apoláris láncok összeroskadnak. Az állófázis összeesésére következtethetünk, ha csökken az oszlop hatékonysága, változik a retenció és a csúcsok alakja aszimmetrikussá válik.

Horváth [63,64], Halász [65], Kirkland [66] és Majors [67] munkásságának köszönhető, hogy a hidrofóbbá tett szilikagél napjainkra a folyadékkromatográfiában az egyik leggyakrabban használt állófázissá vált.

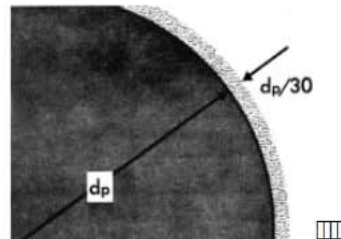
Porózus töltetek

A *porózus töltetek* [39] a legelterjedtebben alkalmazott a szilikagél alapú töltetek. Nagy fajlagos felületű (kb.10-500 m²/g) és pórustérfogatú anyagok. Az analitikai kromatográfiás célra használt szilikagél szemcsemérete általában 3-5 µm tartományban van, de alkalmaznak kis szemcseméretű (1,5-2 µm), különösen szűk szemcseméret-eloszlású

tölteteket is. Félpreparatív, illetve preparatív kromatográfias elválasztásokhoz a 10 μm feletti átlagos szemcseméretű töltetek a megfelelőek.

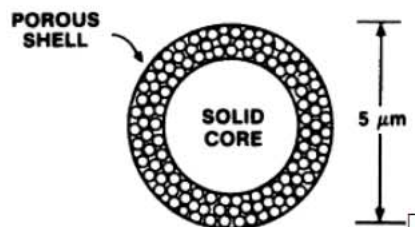
Porózus héjú töltetek

Az 1960-as évek végén Horváth [11,68], valamint Huber [69] készítette és alkalmazta a pellikuláris töltetet (50 μm szemcseátmérőjű sztírol-divinil-benzollal bevont, fedett üvegyöngy). A porózus réteg vastagsága általában a gyöngy átmérőjének 1/30-ad része volt.



4. ábra. Pellikuláris töltet [70]
[1 μm vastagságú porózus szilícium-dioxiddal (100 Å) bevont üvegyöngy]

A Kirkland által előállított felületen porózus 30-40 μm szemcseátmérőjű részecskék (4. ábra) – összehasonlítva az elválasztások során használt porózus töltetekkel – gyorsabb elválasztásokat eredményeztek [71-75]. A későbbiekben a mag átmérője csökkent, ezzel együtt az azt körülvevő porózus réteg vastagsága is változott [76] (5. ábra).



5. ábra. Porózus felületű részecske sematikus rajza [70]

Napjainkban különböző átmérőjű, ún. „tömörmagvú”, azaz porózus héjú részecskéket alkalmazunk [77,78]. Pl. a 2,7 μm átmérőjű részecskék 1,7 μm átmérőjű nem porózus magból és 0,5 μm vastagságú porózus héjből állnak. HPLC elválasztásoknál széles körben alkalmaznak ilyen tölteteket, mivel gyors és hatékony elválasztást eredményeznek (köszönhetően pl. a rövidebb diffúziós úthossznak) [79-81].

Nemporózus töltetek

A nemporózus töltetek 3 μm -nél kisebb szemcseméretű monodiszperz rendszerek. Leggyakrabban az 1,5 μm szemcseátmérőjű tölteteket alkalmazzák az analitikai kro-

matográfiás elválasztásokhoz. A töltet fajlagos felülete – tekintve, hogy nincs pórus – megegyezik a geometriai felülettel (kb. $2 \text{ m}^2/\text{g}$). A *nemporózus* adszorbensekkel töltött oszlopok terhelhetősége általában alacsony, az oszlopok nyomásesése magas, azonban az ilyen oszlopokon végezhető gyors elválasztások, a kitűnő visszanyerés ezeket a tölteteket olyan új feladatok megoldására teszik alkalmassá, melyek porózus tölteteken, nehézkesen, sokkal lassabban és kisebb érzékenységgel végezhetők el. Először a biopolimerek gyors elválasztásában [82-90] majd a kis molekulatömegű szerves vegyületek analízisében is elterjedt a nemporózus töltetek alkalmazása [90-96]. Különböző típusú vegyületek elválasztásához különböző borítású állófázisokat javasolnak. A kis molekulatömegű ($M < 500 \text{ Da}$) anyagok elválasztására a hosszú (C_{14} , C_{18}), míg a biopolimerek analízisére a rövid (C_6) láncú, alifás szénhidrogén csoportokkal borított szilikagél töltet tűnik optimálisnak [88,90].

3.2.3 Szervetlen, nem szilikagél alapú állófázisok

Cirkónium-oxid alapú töltetek

A cirkónium-oxidból készült kovalensen kötött töltetek nem stabilisak. Rendszerint a felületre szerves fázist – polibutadiént vagy polisztirolt – polimerizálnak. Az így kapott töltetek hasonló szelektivitásúak, mint az alkiláncokkal borított szilikagélek [97,98]. Alacsony és magas pH-jú ($1 \leq \text{pH} \leq 13$) mozgófázissal, és igen magas hőmérsékleten ($\leq 160^\circ\text{C}$) is használhatók [26]. Ezzel szemben a szilikagél alapú állófázisok termikus stabilitása korlátozott. A Carr és munkatársai [99-104] által bevezetett cirkónium-oxid alapú fázisok magas hőmérsékleten is jó stabilitással és elhanyagolható vízdoldhatósággal rendelkeznek.

Alumínium-oxid és titán-oxid alapú töltetek

Az alumínium-oxid alapú töltetek alkalmazásáról az 1980-as évek jelentek meg közlemények [105,106]. A kovalensen kötött fázisok instabilak. Fordított fázisú töltetként a felületen polimerizált tölteteket alkalmazzák, ezek tulajdonságaikban a cirkónium-oxidhoz hasonlítanak, pH stabilitásuk jobb, mint a szilikagéle és magas hőmérsékleten használhatók. Jelenleg az alumínium-oxid alapú tölteteket HPLC elválasztásokhoz nem, azonban mintaelőkészítéshez alkalmazzák.

A titán-oxid alapú állófázisokat normál fázisú elválasztásoknál alkalmazzák [107,108].

Szén alapú töltetek

A szilikagél alapú töltetek hátrányait kiküszöbölendő kutatásokat folytattak új adszorbensekkel. Az adszorbensként már jól ismert szén azonban mechanikailag nem volt megfelelő. Knox és Gilbert által kidolgozott eljárással a szén szerkezete teljesen átrendezhető, a szilikagélhez hasonló tulajdonságú, erősen porózus szén állítható elő. Ez az ún. porózus, grafitizált szén (PGC), ami teljesen porózus, gömb alakú részecskékből hexagonális elrendezésű szénatomok sík lemezeiből áll [109-112].

Összehasonlítva más töltetekkel jelentősen eltér a töltet visszatartása és szelektivitása [113]. Felülete sztereo-szelektív, így izomerek elválasztására alkalmas [114,115].

A PGC mind fordított, mind pedig normál fázisú elválasztáshoz egyaránt alkalmazható ($1 \leq \text{pH} \leq 14$ tartományban, $T \leq 200^\circ\text{C}$). A részecskék nagy szilárdságának köszönhetően nyomástűrő képessége jó.

3.2.4 Szerves polimer alapú állófázisok

A szerves, azaz polimer fázis a magas hőmérsékletű folyadékkromatográfia állófázisainak egyik típusa. Kereskedelmi forgalomban elérhetők, elsősorban a porózus polimer részecskéket – pl. a keresztkötött polisztirolt – alkalmazzák [116,117]. A porózus, keresztkötött polisztirol legfőbb előnye nagy pH stabilitása ($0 \leq \text{pH} \leq 14$). Előállítható különböző pórusmérettel, így kis és nagy molekulák elválasztására egyaránt alkalmas.

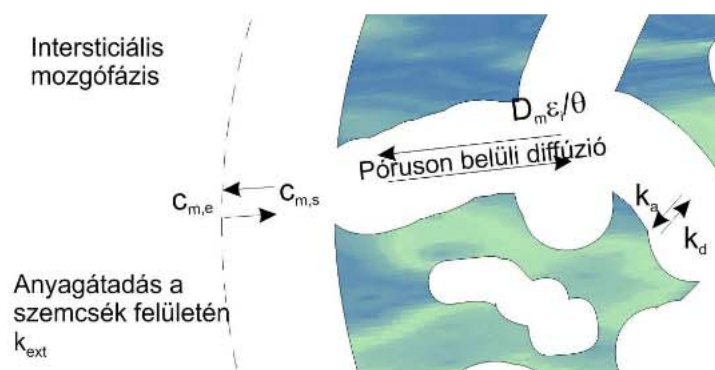
A poli(sztirol-divinil-benzol) (PS-DVB) alapú fázisok megfelelően használhatók neutrális, savas és bázikus körülmények között [99]. Azonban a polimer alapú fázisok minden előnyük ellenére sem rendelkeznek a szilikagél alapú fázisok valamennyi pozitív tulajdonságával [118],[119].

3.3 Az anyagátadás kinetikájának vizsgálata

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias oszloptöltetek szemcséi között lejátszódó anyagátadás kinetikájának pontos és részletes leírásával magyarázhatók a kromatográfias folyamatok.

Az anyagátadási gátlás lehetséges forrásai a porózus szemcséjű kromatográfias állófázisban:

- axiális diszperzió a mozgófázis áramában,
- külső anyagátadási gátlás (k_{ext}) a szemcsék felületén,
- pórusbeli diffúzió (D_p) a szemcsékben,
- adszorpció – deszorpció (k_a, k_d).



6. ábra. Az anyagátadás folyamata

k_a , k_d az adszorpció és a deszorpció sebességi állandója, k_{ext} a szemcsék felületén kialakuló külső anyagátadási gátlás, D_m a minta molekuláris diffúziós együtthatója a tömbfázisban, θ tortuozitási faktor, ε_i belső térkitöltési tényező [2]

Az esetek többségében az adszorpció–deszorpció sebességének hatása a teljes anyagátadásra elhanyagolható, ugyanis ezek a folyamatok gyorsak [120,121]. Az anyagátadás tanulmányozásához a töltetszemcsék pórusbeli diffúziója és a töltet felületén lejátszódó diffúzió ismerete elengedhetetlen. A kromatográfiás csúcsok alakját jelentősen befolyásolják az említett folyamatok. A csúcsok alakját leíró momentumokból kiindulva a különféle anyagátadási gátlások számszerű értéke meghatározható, kiszámítható.

3.3.1 Az anyagátadás elmélete

A kromatográfiában anyagátadásnak tekintjük a molekulák mozgó- és az állófázison keresztüli mozgását. Az anyagátadási folyamatot meghatározó hatások közül a diffúzió viszonylag kis sebességű folyamat, különösen folyadék fázisban, így a molekulák áthaladása mindkét fázison jelentős mértékű sávszélesedést idéz elő.

A csúcsszélesedés mértékét mennyiségileg az elméleti tányérmagasság egyenlet a csúcs szélesedésének (σ^2) és az oszlop hosszának (L) hányadosával írja le

$$H = \frac{\sigma_l^2}{L} \quad (1)$$

ahol σ_l^2 a csúcs szélességet jellemző, hossz alapján számolt variancia.

Az oszlop hatékonysága a csúcsok momentumai, vagy a mintamolekulák retenciós idejének eloszlása alapján is megadható. A momentumok a csúcs integrálásából számolhatók.

$$H = L \frac{\mu_2'}{\mu_1^2} \quad (2)$$

ahol L az oszlop hossza, μ_1 a csúcs első abszolút momentuma és μ_2' a második centrális momentuma.

Számos tényérmagasság egyenletet ismerünk – a van Deemter-egyenlet, Huber-egyenlet, Giddings-egyenlet, Horváth-egyenlet, Knox-egyenlet [122-128] –, melyek a kromatográfiás csúcsok szélesedését az axiális diszperzióval és a mozgó- illetve az állófázisban kialakuló anyagátadási gátlással írják le.

A van Deemter-egyenlet mérési adatokból származtatható általánosan használt összefüggés, ami szintén figyelembe vesz a csúcsok kiszélesedésében szerepet játszó számos tényezőt. Az előbbi makroszkopikus megközelítésű modellek alapján a fizikai-kémiai paraméterek meghatározásához matematikai megoldások szükségesek. Ezzel ellentétben, molekuláris szinten vizsgálva a kromatográfiás folyamatot a fordított fázisú folyadékkromatográfia anyagátadási együtthatóit egyszerű sztochasztikus modellel is leírhatjuk.

3.3.1.1 Általános sebességi modell

Az anyagátadási együtthatók meghatározására a kromatográfia általános sebességi modellje a legáltalánosabb, legösszetettebb kinetikai modell [21]. Figyelembe veszi az axiális diszperziót és az anyagátadási gátlásnak mind a négy lehetséges forrását feltételezve, hogy a mozgófázis áthalad az állófázis szemcséi közötti téren, a mintamolekulák a mozgófázis áramából diffúzióval a szemcsék pórusaiba jutnak, ahol a folyadék fázis mozdulatlan. A mintamolekulák mozgásának leírásához két anyagmérleg-egyenlet szükséges. Ez a modell külön írja le az állófázis szemcsék közötti mozgófázisban és a szemcsék pórusaiban lejátszódó folyamatokat.

Az általános sebességi modell meglehetősen összetett. Időtartományban a parciális differenciálegyenletek megoldása lehetetlen, Laplace-tartományban azonban levezethető [21], és kifejezhetők a momentumok. A momentumok analitikai kifejezésekké alakíthatók, melyeket az általános sebességi modell felírásakor gyakran használunk [129]. A kromatográfiás csúcs első abszolút momentuma (μ_1)

$$\mu_1 = \frac{\int C(t)tdt}{\int C(t)dt} = \frac{L}{u_h}(1+Fa) = \frac{L}{u_h}(1+k_1) \quad (3)$$

$$a = \varepsilon_p + K(1 - \varepsilon_p) \quad (4)$$

$$k_1 = Fa \quad (5)$$

$$F = \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \quad (6)$$

ahol $C(t)$ a kromatográfias sáv profilja, L az oszlop hossza, u_h a mozgófázis sebessége a szemcsék között, ε_e külső térkitöltési tényező, ε_p belső térkitöltési tényező, K az adszorpciós egyensúlyi állandó.

Az oszlop holtideje megegyezik egy retenció nélküli komponens első momentumával:

$$t_0 = \frac{L}{u_h} \left(1 + \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \varepsilon_p \right) \quad (7)$$

A második centrális momentum:

$$\mu'_2 = \frac{\int C(t)(t - \mu_1)^2 dt}{\int C(t)dt} = \frac{2L}{u_h} \left[\frac{D_L}{u_h^2} (1 + k_1)^2 + Fa^2 \left(\frac{r_p}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} \right) \right] \quad (8)$$

ahol D_L az axiális diszperziós együttható, k_{ext} a külső (szemcse felületi) anyagátadási együttható, D_p a pórusbeli diffúziós együttható és r_p az átlagos szemcsesugár.

Az általános sebességi modellből meghatározott momentumok alapján részletes tányérmagasság egyenletet írhatunk fel:

$$H = L \frac{\mu'_2}{\mu_1^2} = \frac{2D_L}{u_h} + \frac{2u_h}{F} \left| \frac{k_1}{k_1 + 1} \right|^2 \left| \frac{r_p}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} \right| \quad (9)$$

H értéke a következő tagokból tevődik össze:

$$H = H_L + H_{ext} + H_p \quad (10)$$

ahol H_L az axiális diszperzió hozzájárulását

$$H_L = \frac{2D_L}{u_h} \quad (11)$$

H_{ext} a szemcse felületén kialakuló anyagátadási

$$H_{ext} = \frac{2u_h}{F} \left| \frac{k_1}{1+k_1} \right|^2 \frac{r_p}{3k_{ext}} \quad (12)$$

H_p pedig a szemcse pórusaiban lejátszódó diffúziós gátlást fejezi ki

$$H_p = \frac{2u_h}{F} \left| \frac{k_1}{1+k_1} \right|^2 \frac{r_p^2}{15D_p} \quad (13)$$

Axiális diszperzió

Az általános sebességi modell felírásához szükséges az axiális diszperziós együttható (D_L) ismerete, amely a különböző empirikus vagy félempirikus egyenletek alapján becsülhető meg.

Az általunk is alkalmazott Gunn-korreláció az axiális diszperzió meghatározásának egyik lehetséges módja [130]

$$D_L = d_p u_h \left[A + B + \frac{\varepsilon_e}{\theta Re Sc} \right], \quad (14)$$

ahol θ az oszloptöltet tortuozitás faktora ($\theta = 1,4$), d_p az átlagos szemcseátmérő, Re a Reynolds-szám és Sc a Schmidt-szám.

Tapasztalati összefüggések alapján [131]:

$$Re = \frac{\rho_s u_h d_p}{\eta} \quad (15)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho_s D_m} \quad (16)$$

ahol ρ_s a mozgófázis sűrűsége a pórusokban és η a mozgófázis dinamikai viszkozitása; D_m a minta molekuláris diffúziós együtthatója a tömbfázisban.

Az A és a B tag a következőképpen adható meg:

$$A = \frac{Re Sc}{4\alpha_1^2 (1 - \varepsilon_e)} (1 - p)^2 \quad (17)$$

$$B = \frac{(Re Sc)^2}{16\alpha_1^4 (1 - \varepsilon_e)^2} p(1 - p)^3 \exp \left[\frac{-4\alpha_1^2 (1 - \varepsilon_e)}{p(1 - p) Re Sc} \right] - 1 \quad (18)$$

ahol α_1 a nulladrendű Bessel-függvény első gyöke ($\alpha_1=2,405$), és $p = 0,17 + 0,33 \exp(-24 / \text{Re})$.

A Gunn-korrelációt – Giddings egyenlethez [132] hasonlóan – a következőképpen írhatjuk fel:

$$\frac{2D_L}{u_h d_p} = \frac{2\gamma}{\nu} + \frac{2\lambda \cdot \frac{\omega\nu}{F}}{2\lambda + \frac{\omega\nu}{F}} \quad (19)$$

ahol $\gamma = 0,714$, $\lambda = 2,586$, $\square = 0,0712$, $\nu = u_h d_p / D_m$ a redukált sebesség, és F fázisarány.

Molekuláris diffúzió

A mintamolekulák mozgófázisbeli molekuláris diffúziós együtthatója (D_m) szükséges a Schmidt-szám megadásához. Kétkomponensű folyadékelegyekben az együttható becslésére számos tapasztalati összefüggést írtak le, melyet Li és Carr foglalt össze [133].

Nagy molekulákra az összefüggést Young és munkatársai dolgozták ki [134]:

$$D_m = 8,31 \cdot 10^{-8} \frac{T}{\eta M^{1/3}} \quad (20)$$

ahol D_m molekuláris diffúziós együttható (cm²/s), η a mozgófázis dinamikai viszkozitása (cP), M moláris tömeg (g), és T az oszlop abszolút hőmérséklete (K).

Külső anyagátadási együttható

Számos összefüggés alkalmazható a paraméter becslésére, közülük többet Miyabe és munkatársai [135] vizsgáltak és kísérleti adatokkal összevetettek, az irodalomban leírtakkal jó egyezést kaptak.

A külső anyagátadási együttható (k_{ext}) a Wilson-Geankoplis tapasztalati egyenlettel [136] a többi anyagátadási együtthatótól függetlenül meghatározható.

Az összefüggés $0,0015 < \text{Re} < 55$ Reynolds-számú rendszerekre érvényes

$$Sh = (1,09 / \varepsilon_e) Sc^{1/3} Re^{1/3} \quad (21)$$

A Wilson-Geankoplis-egyenlettel megadható a Sherwood-szám (Sh), ami függvénye a külső anyagátadási együtthatónak:

$$Sh = k_{ext} d_p / D_m \quad (22)$$

Így k_{ext} a következőképp fejezhető ki:

$$k_{ext} = \frac{1.09}{\varepsilon_e} u_h^{1/3} \left| \frac{D_m}{d_p} \right|^{2/3} \quad (23)$$

3.3.1.2 A van Deemter-egyenlet

A kromatográfia modelljei szerint a sávszélesedésért felelős jelenségek három tényezőtől adódnak össze.

Van Deemter és munkatársai szerint négy sávszélesedési tényező okozza a kromatográfias csúcsok kiszélesedését:

- || az örvénydiffúzió;¹
- || az axiális (hosszirányú) diffúzió;
- || az anyagátadási gátlás a mozgófázisban,
- || és az anyagátadási gátlás az állófázisban.

A van Deemter-egyenlet általánosan használt empirikus összefüggés a tényérmagasság leírására

$$H = A + \frac{B}{u_h} + Cu_h \quad (24)$$

Az A tag az örvénydiffúziót, a B/u_h tag a szemcsék közötti axiális diffúziót, a Cu_h tag a külső anyagátadási gátlást (k_{ext}), a szemcsék pórusaiban zajló diffúziót (D_p) és az állófázis felszínén lejátszódó adszorpciót–deszorpciót foglalja magába.

A van Deemter-egyenlet alapján történő anyagátadási együtthatók meghatározásakor a kromatográfias folyamatokban szereplő fizikai-kémiai jelenségekről a B/u_h és a Cu_h tagból nyerhető információ.

A (9) egyenlet a következő formában írható fel:

$$H = \frac{B}{u_h} + Cu_h \quad (25)$$

ahol a B és a C együttható a következőt jelenti:

¹ Örvénydiffúzió: az oszlopban a töltésszemcsék között áramló mozgófázis visszakeveredése, ami a mintakomponensek haladását késlelteti.

$$B = 2D_L, \quad (26)$$

$$C = \frac{2}{F} \frac{k_1}{k_1 + 1} \frac{r_p^2}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} \quad (27)$$

Az axiális diszperzió a molekuláris diffúzió és az örvénydiffúzió összegeként értelmezhető [122]:

$$D_L = \nu D_m + \lambda d_p u_h \quad (28)$$

3.3.1.3 Momentum analízis

Anyagátadási együtthatókat több makroszkopikus nézőpontú tanulmányban a kromatográfiás sávok retenciósideje és szélessége alapján határoztak meg [137-139]. A kromatográfiás folyamatokban az első momentum (μ_1) és az adszorpciós egyensúlyi állandó között a kapcsolat lineáris. A szemcsék pórusaiban végbemenő diffúzió pedig a második centrális momentummal (μ_2') jellemezhető, ami tartalmazza az oszlopon kívüli hatásokat is.

A momentumok Suzuki szerint a következőképpen adhatók meg [140]:

$$\mu_1 = \frac{L}{u_h} \delta_0 \quad (29)$$

$$\mu_2' = \frac{2L}{u_h} (\delta_L + \delta_f + \delta_d) + (\mu_2')_{inj} + (\mu_2')_{sys} \quad (30)$$

$$\delta_L = \frac{\varepsilon_e D_L \delta_0^2}{u_h^2} \quad (31)$$

$$\delta_0 = \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e)(\varepsilon_p + \rho_p K) \quad (32)$$

$$\delta_f = (1 - \varepsilon_e)(R_p / 3k_{ext})(\varepsilon_p + \rho_p K)^2 \quad (33)$$

$$\delta_d = (1 - \varepsilon_e)(R_p^2 / 15D_p)(\varepsilon_p + \rho_p K)^2 \quad (34)$$

ahol $(\mu_2')_{inj}$ és $(\mu_2')_{sys}$ kifejezi az injektálás és a készülék oszlopon kívüli holtterfogatának hozzájárulását a második centrális momentumhoz. δ_L , δ_f és δ_d a második centrális

momentum axiális diszperziójának, a folyadék-szemcse anyagátadási gátlás és a szemcsén belüli diffúzió együtthatói és ρ_p a szemcse sűrűsége.

Suzuki bevezette H_{MA} és H_0 mennyiségeket [140]:

$$H_{MA} = \frac{\mu'_2}{\mu_1^2} \frac{L}{2u_h} = \frac{H}{2u_h} = \frac{D_L}{u_h^2} + H_0 \quad (35)$$

$$H_0 = \frac{\delta_f + \delta_d}{\delta_0^2} = \frac{1}{F} \frac{k_1}{k_1 + 1} \frac{r_p^2}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} R \quad (36)$$

Ezek a paraméterek nem az általánosan használt HETP értékek, hanem $HETP/2u_h$ értékek, idő mértékegységük van. A (35) egyenlet alapján látható, hogy a H_{MA} az axiális diszperzió miatt függ a mozgófázis sebességétől; lineáris összefüggést kapunk, ha H_{MA} -t $1/u_h^2$ függvényében ábrázoljuk, ahol a tengelymetszet H_0 és az egyenes meredeksége az axiális diszperziós együttható (D_L).

3.3.1.4 Sztochasztikus modell

A kromatográfia sztochasztikus elmélete egy molekuláris szintű modell, amely a kromatográfias csúcs kialakulását a részecskék oszlop mentén történő véletlenszerű vándorlásával írja le, kombinálva azt az ugyancsak véletlenszerűen fellépő adszorpció – deszorpció folyamatokkal [141].

A kromatográfia sztochasztikus modelljét Giddings és Eyring alkotta meg 1955-ben [20], majd Giddings fejlesztette tovább [124]. A modell elhanyagolja az oszlopban lezajló diszperziót, csak a lassú anyagátadást vagy az adszorpció–deszorpció kinetikáját veszi figyelembe. Ebből kiindulva könnyen kialakítható egy kinetikai modell, ami fizikai-kémiai folyamatokkal írja le a kromatográfias folyamatokat.

A sztochasztikus elmélet a kromatográfias folyamatot Poisson-folyamatként szemléli. Amikor egy részecske az elúció során adszorbeálódik, megőrzi oszlopon belüli helyzetét egészen addig, míg el nem hagyja az állófázist. Deszorpció után folytatja útját a mozgófázissal, amíg ismét meg nem kötődik az állófázison. A részecske tartózkodási ideje az állófázison és a mozgófázisban véletlenszerű, exponenciális eloszlású értékek, melyeknek várhatóértéke τ_s és τ_m . Ezek az időállandók közvetlenül függenek az adszorpció (k_a) és a deszorpció (k_d) kinetikájától:

$$\tau_m = \frac{1}{k_a} \qquad \tau_s = \frac{1}{k_d} \qquad (37)-(38)$$

A k_a a molekula időegység alatt az állófázis felületén bekövetkező adszorpciójának valószínűségét fejezi ki. A k_d hasonló sebességi állandó, mely elsőrendű deszorpciót ír le.

A véletlenszerű hatások következtében ugyanabban az időpillanatban az oszlopba belépő, két teljesen azonos kémiai tulajdonságú részecske hamarosan eltérő helyen található. Mivel mindegyik molekula t_M időt tölt a mozgófázisban, az adszorpció lépések átlagos száma:

$$n = \frac{t_M}{\tau_m} \qquad (39)$$

A korigált retenciós idő az, amit a molekulák az állófázishoz kötötten töltenek:

$$t'_R = n \tau_s \qquad (40)$$

Az elúciós profil, azaz a kromatográfiás csúcs alakját leíró görbe, az egyes részecskék retenciós időinek valószínűségi sűrűségfüggvénye.

A kromatográfiás csúcs varianciája:

$$\sigma_s^2 = 2n \tau_s^2 \qquad (41)$$

4 KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűzzük ki különböző típusú (*porózus*, *porózus héjú* és *nemporózus* fordított fázisú) töltetek összehasonlítását, mind a bioaktív kis és nagy molekulatömegű vegyületek nagysebességű HPLC elválasztását, mind az anyagátadási gátlás együtthatóit figyelembe véve.

Méréseinknél a kromatográfias analízisekhez olyan vegyületeket, vegyületcsoportokat választottunk, melyek az élettudományok területén jelentőséggel bírnak. A mintavegyületek eltérő elválasztási problémát jelentő tulajdonsággal (erősen poláris, gyengén poláris, savas, bázikus vegyületek) rendelkeznek, így lehetőségünk van igazolni a *porózus héjú* és a *nemporózus*, fordított fázisú töltetek sokrétű alkalmazhatóságát, és bemutatni azok tulajdonságait.

Kutatási céljaink a következőképpen foglalhatók össze:

- || Vizsgálni kívánjuk a Kovasil töltet(ek) kémiai stabilitását – a kromatográfias elválasztási módszerek kidolgozása előtt – erősen savas és erősen bázikus kémhatású eluensek tartós használata mellett.
- || A biopolimerek (fehérje keverékek, peptidelegyek) HPLC elválasztása gyakran igen fontos analitikai feladat. Porózus töltetek alkalmazásával ezekre az elválasztásokra azonban a hosszú analízisidő a jellemző.
Méréseink célja a biopolimerek elválasztása során a rövid analízisidő elérése nemporózus fordított fázisú tölteten.
- || Vizsgálatainkkal bizonyítani kívánjuk, hogy a nemporózus fordított fázisú töltet a biopolimerek elválasztása mellett kitűnően használható a kis molekulatömegű ($M \sim 100\text{-}500$ Da) bioaktív vegyületek (pl. víz- és zsírolékony vitaminok) gyors, nagyérzékenységű elválasztására is.
- || A méréseinkhez alkalmazandó állófázisok porózus és a porózus héjú töltetek. Az irodalomból a porózus állófázisok térkitöltési tényezői ismertek, azonban a pontos számítások elvégzéséhez szükséges a térkitöltési tényezők meghatározása. Erre a célra inverz méretkizárásos kromatográfiát alkalmazunk.

- || Célunk továbbá az anyagátadási együtthatók meghatározása a különböző töltetek (*SunFire C₁₈* és *Halo C₁₈*) esetében.

Az anyagátadási együtthatókat a következő módszerek szerint kívánjuk meghatározni:

1. az általános sebességi modell alapján;
2. a van Deemter-egyenlet alapján;
3. momentum analízissel;
4. valamint a kromatográfia sztochasztikus modellje alapján.

5 KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

5.1 Az alkalmazott, vizsgált kromatográfiás állófázisok

Felmérések szerint az összes HPLC elválasztások több, mint 80%-át fordított fázisú tölteteken végzik [142]. A fordított fázisú folyadékkromatográfiás töltetek körében továbbra is szilikagél alapú állófázisok (felületükön alkil-csoportokkal) 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 határosság más fordított fázisú töltettípusokhoz képest [22].

Az élettudományok szempontjából fontos molekulák többsége apoláris vagy gyengén poláris molekularészeket is tartalmaz, így fordított fázisú állófázisok alkalmazásával sikeres elválasztások érhetők el.

Nemporózus töltet

Kovasil-C14 ill. Kovasil-MS-H oszlopok jellemzése

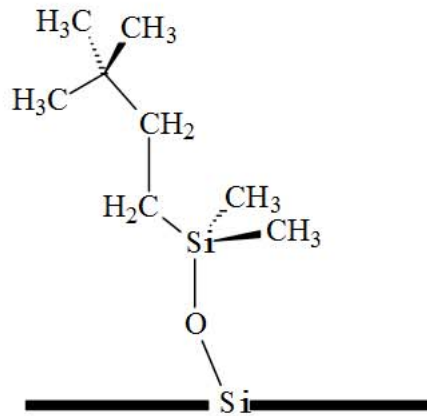
A szilikagél fizikai tulajdonsága a gyártó által szolgáltatott adatok szerint:

Pórus szerkezet	BET módszer szerint, N ₂ adszorpcióval
Felület	2,2 m ² /g;

Töltet kémiai tulajdonsága

Átlagos borítottság (MS-H)	3,9 μmol/m ² ;
Átlagos borítottság (C ₁₄)	4,0 μmol/m ² ;

A Kovasil-MS-H („H” = hard) töltetnél a láncvégen az elágazó láncú (3,3-dimetil-butil) szénhidrogén borítás nagyon tömör, elmozdulásra nem képes, jól záró bevonatot képez a szilikagél felületén. Ez az „ernyőszerűen” árnyékoló borítás (7. ábra) a töltet stabilitásához nagymértékben hozzájárul; a szénláncok mozgása akadályozott, pl. a fehérjeláncok sem tudják megközelíteni a szilikagél felületét, illetve az eluens kisméretű ionjai sem képesek a töltet felületén a Si – C kötéseket hidrolizálni.

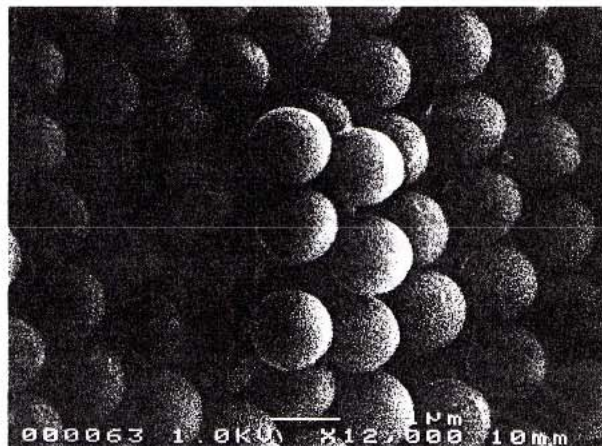


7. ábra. (3,3-dimetil-butil)dimetil-szilil-csoportokkal borított szilikagél felülete [143]

Az általunk használt Kovasil-MS-H ill. Kovasil-C₁₄ típusú 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 [90]. A szilikagél felületéhez kémiai kötésekkel C₆, ill. C₁₄ lánchosszúságú hidrofób alifás szénhidrogén csoportok kapcsolódnak.

A C₁₄ és C₁₈ fázisok között a fő különbség termikus viselkedésükben van. A C₁₈ fázisok differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) vizsgálatok során endoterm változást mutatnak 25°C környékén, ami a kvázikristályos C₁₈ réteg „olvadását” jelenti. A hasonló C₁₄ töltetek átalakulási hőmérséklete 0°C körül van, így szobahőmérsékleten, ahol a legtöbb elválasztást végzik, a töltet jól definiált állapotban van.

A töltet monodiszperzítését, a gyártó által készített elektronmikroszkópos felvétel is mutatja (8. ábra).



8. ábra. Kovasil töltet elektronmikroszkópos felvétele [90]

A Kovasil MS-H töltet előnyei

- || A pórusmentes felületnek és a kis szemcseméretnek köszönhetően gyors az anyagátadás. A szemcsék közötti térben a csatornák kicsik, így a mintamolekulák a két egymást követő kromatográfiás kölcsönhatás között rövidebb utat tesznek meg. Így rövid analízisidejű, gyors kromatográfiás elválasztási módszerek dolgozhatók ki. A gyors állófázisbeli anyagátadást a nagy sűrűségű, monomer C₆ és C₁₄ borítás (3,9 μmol/m² ill. 4,0 μmol/m²) biztosítja [90].
- || A monodiszperz szemcsékből homogén töltetágy állítható elő. Alkalmazásuk azonos körülmények között tehát előnyösebb, mint a szabálytalan alakúaké vagy nem monodiszperz szemcseméret eloszlásúaké.
- || A folyadékkromatográfiás elválasztások során törekszünk nagy tányérszámok elérésére. Minél kisebb a töltet szemcsemérete, minél alacsonyabb az eluens viszkozitása, minél jobb az anyagátadás, annál nagyobb elméleti tányérszám érhető el.
- || A töltet széles hőmérséklet-tartományban használható (méréseinket 25-95°C tartományban végeztük). A hőstabilitás – összehasonlítva más, a HPLC elválasztásoknál használt szilikagél alapú fázisokkal – kiváló, ezt stabilitásvizsgálataink is bizonyítják, ahol a kolonnát 80°C-on folyamatosan, közel 450 órán át használtuk anélkül, hogy a töltet stabilitása, vagy a retenciók változtak volna.
- || A töltet mechanikai és kémiai stabilitása kiváló (11-12. ábra).
- || Az oldószer felhasználás a rövid analízisidő következtében alacsony.

A töltet hátrányai

- || A töltet fajlagos felülete kicsi, ez viszonylag kisszámú kromatográfiás kölcsönhatást, azaz rövid retenciókat eredményez.
- || Az állófázis terhelhetősége alacsony.
- || Az oszlopon a nyomásesés a kis szemcseméretből adódóan magas. Az elválasztásokhoz alacsony viszkozitású eluenseket célszerű alkalmazni. Többnyire az acetonitril-víz rendszerek használatosak [64].

Porózus töltet

SunFire C₁₈, Waters, (100 mm × 3.0 mm, d_p = 3,5 μm),

A szilikagél fizikai tulajdonsága a gyártó által szolgáltatott adatok szerint:

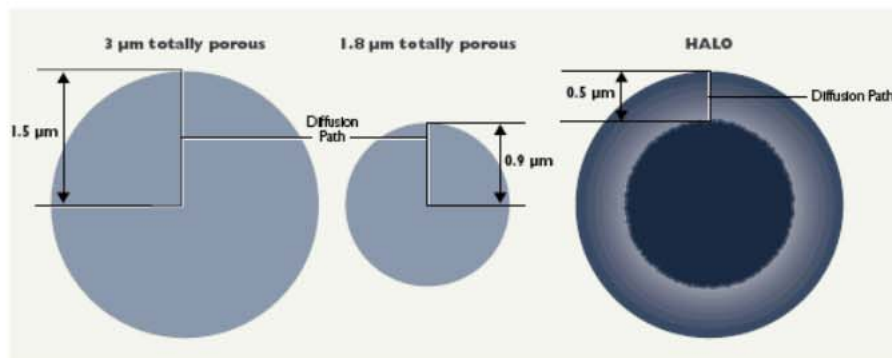
Részecskeméret-eloszlás:	1,28 (Coulter elv alapján) a 90%/10% tartományban
Pórus szerkezet	BET módszer szerint, N ₂ adszorpcióval
Pórustérfogat	0,86 cm ³ /g
Átlagos pórusátmérő	94 Å
Felület	318 m ² /g
Fém szennyezés	ICP-vel meghatározva
Na, Al	< 1ppm
Fe	3 ppm
Töltet kémiai tulajdonsága	
Kötött fázis	C ₁₈ lánc
Utánszilanizált	
Összes széntartalom	15,0%
Átlagos borítottság	3,55 μmol/m ²

Porózus héjú töltet

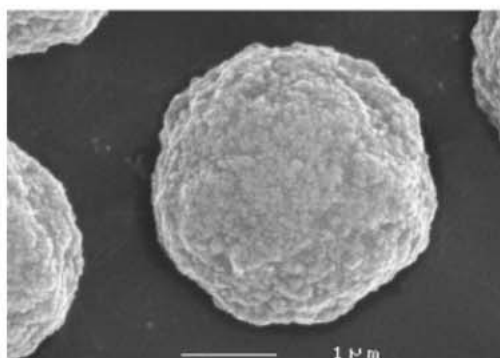
Halo C₁₈ oszlop, Advanced Materials Technology, Wilmington, DE; 100mm×4,6mm, d_p = 2,7 μm; 1,7 μm átmérőjű tömör mag 0,5 μm vastag porózus héjjal borítva

A szilikagél fizikai tulajdonsága

Minősége	nagytisztaságú, B-típusú szilikagél
Pórus szerkezet	BET módszer szerint, N ₂ adszorpcióval
Átlagos pórusméret	90 Å
Felület	150 m ² /g
Töltet kémiai tulajdonsága	
Monomer kötött fázis	C ₁₈ lánc
Utánszilanizált	
Átlagos borítottság	3,5 μmol/m ²
pH tartomány	2 – 9
Töltet fizikai tulajdonsága	
Max. nyomás	9.000 psi, 600 bar
Hőmérséklet	60°C alatt



9. ábra. A porózus héjú töltet sematikus rajza
(internetes forrás: <http://www.mac-mod.com/pb/halo-pb.html> 2010. május)



10. ábra. A porózus héjú töltet elektronmikroszkópos felvétele [144]

5.2 Kromatográfias rendszerek

A Kovalil töltetek stabilitásvizsgálatához alkalmazott rendszer

Az elválasztásokat Gynkotec (Germering, Németország) készülékekkel végeztük, ami egy P580 NDG precíziós pumpából, 170S diódasoros detektorból, és Chromeleon kromatográfias szabályozó és kiértékelő szoftverből állt. A detektorban egy UZ-GT-MIC nagynyomású kapilláris átfolyó detektor cellát (140 nl) alkalmaztunk. A minta bevitelt 8125 Rheodyne (Cotati CA, USA) injektor segítségével végeztük. A kromatográfias elemzéseket Kovalil (Chemie Uetikon, Uetikon, Svájc) állófázisokon végeztük.

A kolonna állandó hőmérsékletét vízköpeny biztosította, melynek hőmérsékletét F3 típusú (Haake, Karlsruhe, Németország) cirkulációs termosztáttal szabályoztuk. A vízköpeny az oszlopon kívül az injektort a kolonnával összekötő kapilláris kb. 20 cm-ét is temperálta.

Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfias elválasztásánál alkalmazott rendszer

A kromatográfias elválasztásokat Gynkotec (Germering, Németország) készülékekkel végeztük, mely egy 480GT terner gradiens szivattyúból, 8125 Rheodyne injektorból (Cotati CA, USA) 170S diódasoros detektorból és Chromeleon kromatográfias szabályozó és kiértékelő szoftverből áll. A hőmérséklet Grant W6 (Grant Instruments, Cambridge, Anglia) cirkulációs termosztáttal állítottuk be.

A mérések során alkalmazott Rheodyne 8125-ös injektor lényegesen hatékonyabb a Kovasil oszlopokkal - szimmetrikusabb csúcsokat ad -, mint a korábbi 7125-ös típus. Meglepő módon a Gynkotec cég detektorcellája (14 µl) optimális felépítésűnek tűnt. Munkacsoportunk más gyártók kisebb térfogatú detektorcelláit (9 µl, 2 µl) is kipróbálta, az alkalmazott körülmények között jelentős minőségjavulást nem tapasztaltunk.

Az anyagátadási együtthatók meghatározásához alkalmazott rendszer

A méréseket egy Agilent 1100 folyadékkromatográfival végeztem. A készülék egy bináris pumpa rendszerből, automata mintaadagolóból, oszlop termosztátból és diódasoros UV-detektorból épül fel.

5.3 Felhasznált vegyszerek

A stabilitásvizsgálathoz felhasznált vegyszerek

A toluol, n-butil-benzol, n-pentil-benzol, trisz-(hidroximetil)-aminometán, trifluor-ecetsav (TFA) szállítója a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) volt. Oldószerként, eluensként HPLC minőségű acetonitrilt (CH₃CN) és bidesztillált ioncserélt vizet használtam, Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország).

Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfias elválasztásánál felhasznált vegyszerek

A vízoldékony vitaminok gyógyszerkönyvi minőségűek voltak. Az 1-heptán-szulfonsav Na-sója, a jégecet valamint a trietil-amin (TEA) Fluka (Buchs, Svájc) és Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) gyártmányú volt.

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

A humán (HSA) és szarvasmarha (BSA) szérumalbumin, a humán és szarvasmarha inzulin, a humán és szarvasmarha citokrom-c, a tripszin, a TPCK-kezelt tripszin, a

TLCK-kezelt kimotripszin Sigma (St. Louis, USA), a trifluor-ecetsav (TFA) Fluka (Buchs, Svájc), a $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a. Merck (Darmstadt, Németország) gyártmányú volt. A HPLC minőségű acetonitrilt (CH_3CN) a Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyol) cég szállította. A vizet többszörös desztillálással laboratóriumunkban állítottuk elő. A felhasznált egyéb vegyszerek mindegyike analitikai tisztaságú volt.

Az anyagátadási együtthatók meghatározásához felhasznált vegyszerek

A mérésekhez felhasznált vegyszerek: tiokarbamid, humán inzulin ($M=5,5$ kDa), tetrahydrofuran (THF), trifluor-ecetsav (TFA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), az acetonitril (CH_3CN), metanol (CH_3OH) és bidesztillált ioncserélt víz Scharlau Lab. Chemicals (Barcelona, Spanyolország) gyártmányú volt.

A különböző molekulatömegű polisztirol standardokat Varian (Varian, Inc. USA) gyártotta, ($M_1=580$, $M_2=1.480$, $M_3=3.070$, $M_4=3.950$, $M_5=5.120$, $M_6=6.930$, $M_7=10.100$, $M_8=31.420$, $M_9=70.950$, $M_{10}=170.800$, $M_{11}=578.500$, $M_{12}=1.233.000$, $M_{13}=3.250.000$).

5.4 Mérési körülmények

A stabilitásvizsgálathoz alkalmazott mérési körülmények

Az ellenőrző, izokratikus elválasztásnál az eluens 50% acetonitrilt (CH_3CN) és 50% bidesztillált vizet (H_2O) tartalmazott. $0,9 \text{ cm}^3/\text{perc}$ áramlási sebesség mellett toluol, n-butil-benzol és n-pentil-benzol 1:1:1 arányú elegyét injektáltuk.

Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfiás elválasztásánál alkalmazott mérési körülmények

Az általunk vizsgálni kívánt bioaktív vegyületek eltérő elválasztási problémát jelentő tulajdonsággal (erősen poláris, gyengén poláris, savas, bázikus vegyületek) rendelkeznek. Mivel a bioaktív vegyületek tulajdonságai eltérőek, így ennek megfelelően minden egyes vegyületcsoport elválasztására módszert dolgoztuk ki, és optimalizáltuk az elválasztást. A mérési körülményeit adott elválasztások mellett tüntettem fel.

A térkitöltési tényezők meghatározásánál alkalmazott mérési körülmények

A porózus töltet esetén $1 \text{ cm}^3/\text{perc}$, a porózushéjú töltet esetén pedig $0,5 \text{ cm}^3/\text{perc}$ áramlási sebességű 100% tetrahydrofuran (THF) használtam eluensként.

A minta $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$ koncentrációjú, különböző molekulatömegű standard polisztirol oldat volt, amelyből $1 \mu\text{l}$ -t injektáltam. A méréseket 20°C végeztem, 254 nm -en detektáltam.

A tiokarbamid megkötődése elhanyagolható a C₁₈-as állófázison, így az oszlopok holt-térfogatának a meghatározása a tiokarbamid csúcsok retenciós adatai alapján történt (1 µl, c = 1,6 · 10⁻³ mg/cm³ tiokarbamid oldatot injektáltam). A rendszer oszlopon kívüli térfogatát – az injektortól az oszlop elejéig és az oszlop végétől a detektorablakig – úgy határoztam meg, hogy a kromatográfias oszlop helyett egy nulla térfogatú szűk ítot kötöttem a rendszerbe.

Az anyagátadási együtthatók meghatározásánál alkalmazott mérési körülmények

Különböző áramlási sebességen, 0,02–1,4 cm³/perc tartományban (p_r ≈ 5–325 bar) 20°C-on végeztem a méréseket.

Az eluens 79% vizet, 21% acetonitrilt (CH₃CN) és 0,1% trifluor-ecetsavat (TFA) tartalmazott. A minta humán inzulin (c = 0,1 mg/cm³) volt, 1 µl-t injektáltam mérésenként. A detektálás 205 nm-es hullámhosszon történt.

6 MÉRÉSEK ÉS EREDMÉNYEK

6.1 Kovasil állófázisok stabilitásvizsgálata

A folyadékkromatográfiában az állófázissal szemben alapvető követelmény, hogy a mechanikai, kémiai (pH), hő, bakteriális és egyéb hatásokkal szemben ellenálló, stabil legyen.

A szilícium-dioxid magas mechanikai szilárdságú, az oszlopban a töltetszemcsék, a monodiszperz részecskéknek a szoros illeszkedés szerint helyezkednek el, ennek köszönhetően a nemporózus töltetek *mechanikai stabilitása* kiváló. Rendszeres, több éves használat után sem fordult elő, hogy a töltetágy „megroppant”, illetve hogy a csúcsalakok torzulást mutattak volna.

Számos szerző a töltet *kémiai stabilitása* alatt az adott töltet savas és lúgos eluenssel való huzamos használatát érti, vizsgálva a retenció változást [24,145,146]. Mások a felületmódosított töltetek esetében a felvitt csoportok kötéseinek kémiai stabilitását értik, azaz adott igénybevétel követően a felületi borítottság változását vizsgálják [47].

Munkánkban vizsgáljuk a töltet viselkedését erősen savas (pH < 2) és bázikus (pH > 8) kémhatású eluensek használata esetén, ez adott eluensterhelés mellett a tesztvegyületek retenció idejének állandóságát, változatlanságát jelenti.

A töltetek kémiai stabilitását savas és bázikus körülmények között is megvizsgáltuk.

Savas stabilitásvizsgálathoz a tölteten pH = 1,9 kémhatású eluentszámot áramoltattunk keresztül, a kolonnát 80°C-on termosztáltuk. Alacsony pH-nál az állófázis stabilitásának csökkenését elsősorban a Si-C kötések bomlása okozza [47].

Bázikus stabilitásvizsgálathoz a pH = 8,5 kémhatású eluentszámot áramoltattunk át az oszlopon, melyet szintén 80°C-on termosztáltunk. Abban az esetben, ha a szilikagél felülete nem tökéletesen borított a pH > 8,5 kémhatású eluens a töltet rendkívül gyors hidrolízisét eredményezheti [47]. Így ezzel a kísérlettel közvetve a szilikagél borítottságát is ellenőriztük.

A magas, 80°C hőmérsékleten történő termosztálással a töltet igénybevételét kívántuk fokozni. A kolonnát naponta egy izokratikus elválasztással teszteltük azokat a tesztanyagokat használtuk, melyekkel a gyártó cég a kész kolonnáit teszteli.

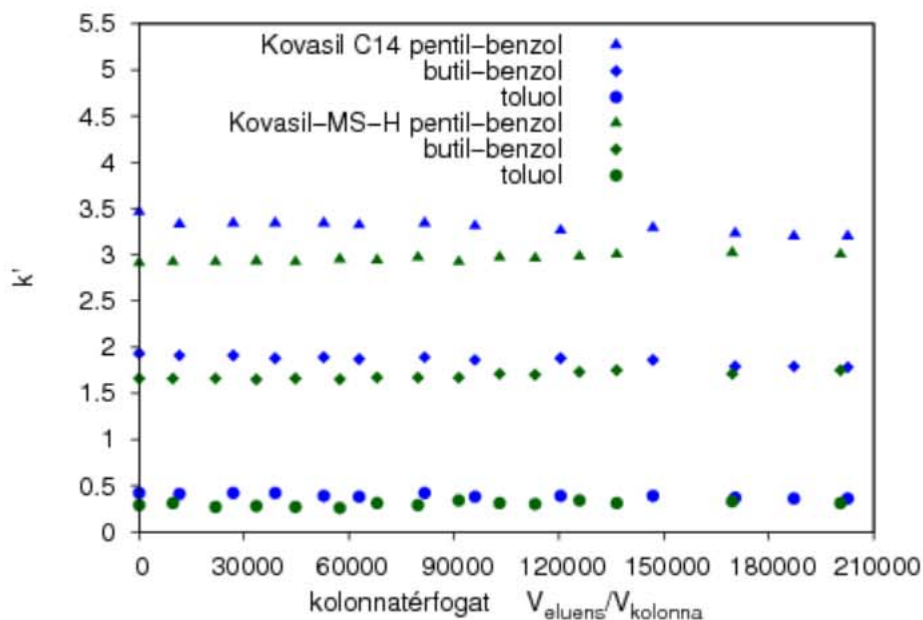
A mérés kezdetén az alábbi tányérszámokat mértük: toluol 4.000, n-butil-benzol 6.000 és n-pentil-benzol 8.000. A retencióval növekvő tányérszámok a kolonnán kívüli hatásokra (holtterekre) vezethetők vissza. Számolással és kísérletileg is igazoltuk, hogy az oszlopon belül az eluens mennyiség kb. $0,2 \text{ cm}^3$. Izokratikus elválasztás esetén a nemporózus oszlopokon végzett elválasztások erősen „holtér érzékenyek”.

6.1.1 Savas stabilitásvizsgálat

A savas stabilitásvizsgálatnál eluensként 50% acetonitrilt (CH_3CN), 50% bidesztyillált vizet (H_2O) és 0,12% trifluor-ecetsavat (TFA) tartalmazó oldatot ($\text{pH} = 1,9$) használtunk, a kísérletet 430 óra folyamatos eluens átáramoltatás után hagytuk abba.

Ez idő alatt a kolonnán 39 liter, azaz 200.000 kolonna térfogatnyi eluentszivattyúztunk át, a töltet stabil maradt, a retenció tényezők nem változtak.

Mérési eredményeinket 11. ábrán foglaltam össze, a kolonnán átáramoltatott eluens mennyiség/kolonna térfogat függvényében ábrázoltam a teszt komponensek retenció tényezőjét.

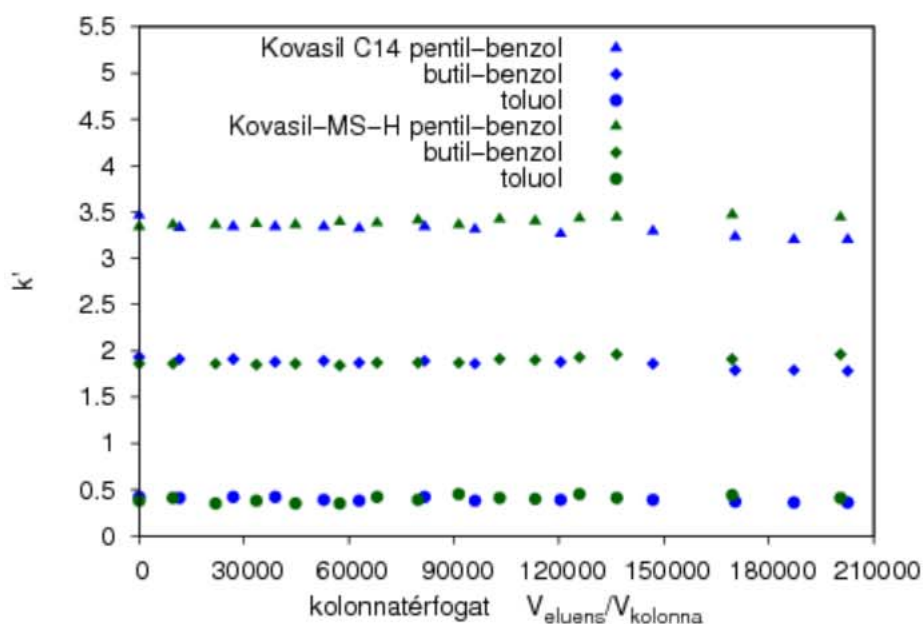


11. ábra. Kovasil-MS-H és Kovasil-C₁₄ oszlop stabilitásvizsgálata ($\text{pH} = 1,9$)

6.1.2 Bázikus stabilitásvizsgálat

A bázikus stabilitásvizsgálatnál eluensként 0,2 mol/dm³ koncentrációjú trisz-(hidroximetil)-aminometán (trisz-puffer) oldat és acetonitril (CH₃CN) 1:1 arányú elegyét használtuk (pH = 8,5).

A stabilitásvizsgálatot 440 órás folyamatos eluens átáramoltatás után fejeztük be. Ennél a kísérletnél 40 liter, azaz 205.000 kolonna térfogatnyi eluents áramoltattunk át az oszlopon. A 12. ábra mutatja, hogy a töltet ilyen vizsgálati körülmények között is stabil maradt.



12. ábra. Kovasil-MS-H és Kovasil-C₁₄ oszlop stabilitásvizsgálata (pH = 8,5)

Vizsgáltuk az oszlopokon tapasztalható nyomásesést is, ami szintén nem változott a stabilitásvizsgálatok során, azaz jó egyezést mutatott a kiindulási értékkel.

6.2 Bioaktív molekulák szupergyors folyadékkromatográfiai elválasztása

A biokromatográfia területén jelentőséggel bír a 3 µm-nél kisebb szemcseátmérőjű, nemporózus, monodiszperz fordított fázisú töltetek alkalmazása.

A biopolimerek folyadékkromatográfiai elválasztása a nagy retenciók és a részleges visszanyerhetőség miatt sokszor nehezen valósítható meg porózus állófázisok használatával. Unger a '80-as évek közepén javasolta a nemporózus töltetek alkalmazását,

elsősorban biopolimerek [82-84,86,147] elválasztására. A kis molekulatömegű ($M < 500$ Da) szerves vegyületek analízisének körében is elterjedt a nemporózus töltetek alkalmazása [90,92-94]. Biopolimerek elválasztására a Kovasil-MS-H, a kisebb molekulatömegű vegyületek elválasztására a C_{14} , illetve a C_{18} bevonatú fázisok alkalmasabbak [85,88,95,96,148-151].

Gradiens elúciós technika alkalmazásával valósítottuk meg a bioaktív molekulák rövid, néhány perces analízisét. Gradiens elúciót alkalmazva befolyásolni tudtuk a retenciós idő változását, az eluálódó csúcsok elválasztásának hatékonyságát, és a csúcsszélesedés mértékét. A nemporózus oszlopoknál, ahol az oszlopban a mozgófázis térfogata csak kb. $0,2 \text{ cm}^3$ az oszlopon kívüli sávzsélesedés jelentős lehet, azonban tapasztalatunk szerint a kellemetlen, kolonna előtti csúcsszélesítő hatások (pl. a holtterek hatása) gradiens elúciót alkalmazva mérsékelhetők.

Az oszlopon kívüli sávzsélesedés a folyadékkromatográfias berendezés egységeiben, különféle alkatrészeiben (injektor, detektorcella, kapillárisok stb.) bekövetkező sávzsélesedésből adódik. Tapasztalatunk szerint jelentős befolyásoló tényező az injektor és a detektorcella.

6.2.1 Vitaminok HPLC analízise

A víz- és zsíroldékony vitaminok elemzésére az egyik legelterjedtebben alkalmazott eljárás a folyadékkromatográfia. A különböző élelmiszerekből, vitaminkészítményekből, szérumból egyaránt végeznek HPLC-vel vitamin meghatározást [152].

A vitaminokkal, azok kimutatásával foglalkozó irodalom igen kiterjedt. Nagyszámú közleményt találunk mind a vízoldékony vitaminok [153-156], mind pedig a zsíroldékony vitaminok elválasztása vonatkozóan [157-159].

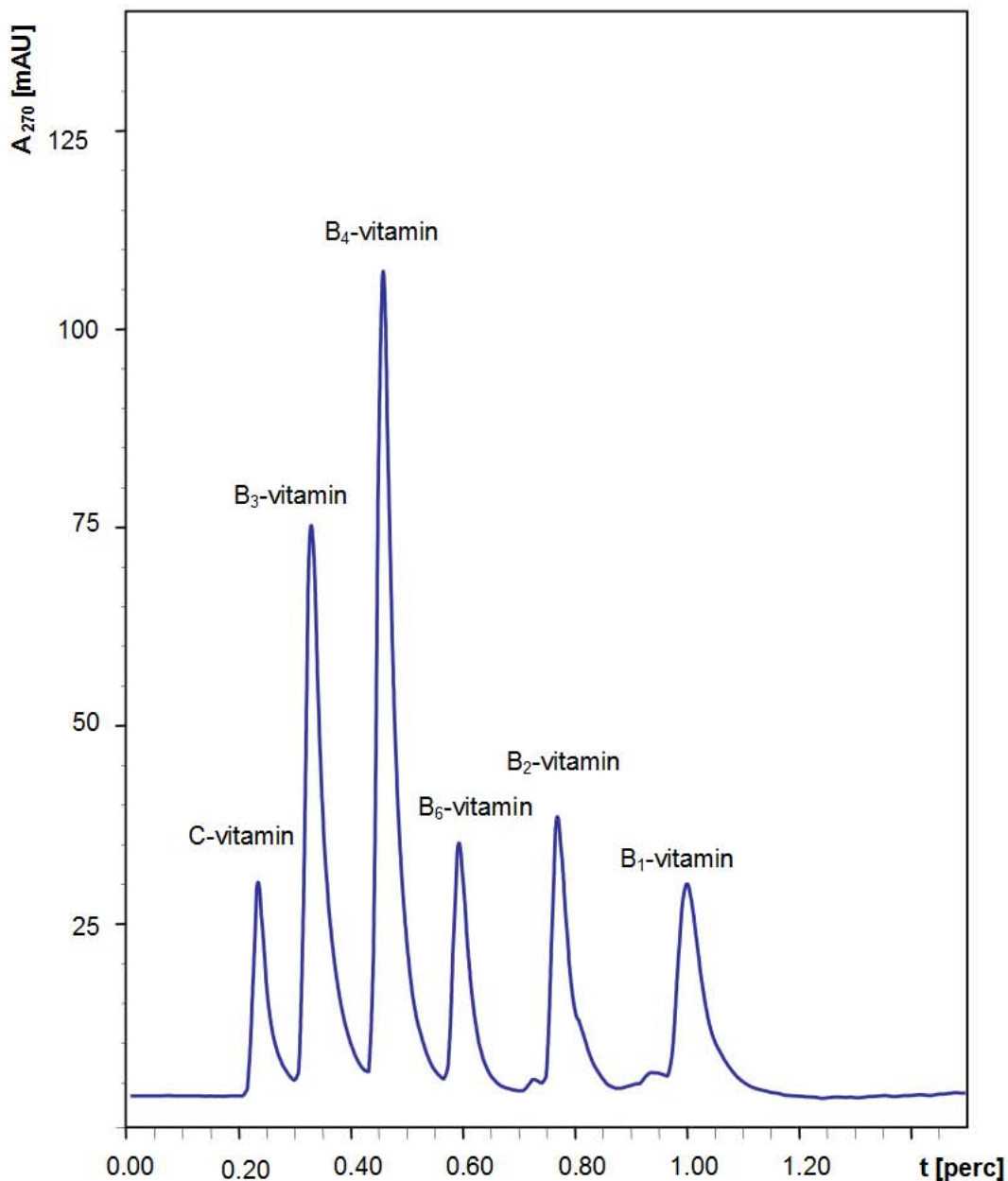
6.2.1.1 Vízoldékony vitaminok elválasztása

Kis molekulatömegű ($M < 500$ Da) vegyületek folyadékkromatográfias elválasztására a Kovasil- C_{14} oszlopokat alkalmaztuk. A retenciók kb. 20%-kal nagyobbak a Kovasil-MS-H oszlopon mért retenciókhoz képest [90]. A töltet főként kevésbé poláris vegyületek elválasztására alkalmas. Poláris mintákat gyakran ionpárok formájában lehet jól elválasztani.

Az ioncserés kromatográfia és az ion-visszaszorítás elvén működő módszerek mellett a disszociációra hajlamos funkciós csoportot tartalmazó vegyületek HPLC elválasztá-

sának egyik lehetséges módja az ionpár-kromatográfia. A mintakomponens polaritása csökken, ha a megfelelő ionpárképző reagens segítségével semleges ionpárt képzünk [160,161]. Az ionos vegyületek retenciójának mértéke a mintaion és az adszorbens felületén adszorbeálódott párképző reagens közötti elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások eredménye. A párképzővel ellentétes töltésű ionok esetében a mintaion a reagenssel a mozgófázisban képez ionpárt és a kialakult ionpár hidrofób kölcsönhatással kötődik az apoláris állófázishoz. Ha az állófázis felülete telítődik a párképző reagenssel és egyre kevesebb hely marad a kialakult ionpár hidrofób kölcsönhatására a felületen, az eluensben a reagens - adott párképző reagens koncentráció felett - „micellákat” képez, ami megnöveli a mintaion oldékonyságát a mozgófázisban, és retenció csökkenést okoz [162]. A párképző reagenssel azonos töltésű ionos vegyületek retenció csökkenése ugyancsak az elektrosztatikus kölcsönhatásra (taszító hatásra) vezethető vissza, a párképző felületi koncentrációjának növelésével nő a felületi töltéssűrűség, és csökken a mintakomponens lehetséges adszorpciója az apoláris felületen.

Elvégeztük vízdékony vitaminok közül a B₁-, B₂-, B₃-, B₄-, B₆-, és C-vitamin (14. ábra) gyors folyadékkromatográfiás elválasztását (13. ábra). Ionpár-kromatográfiát alkalmaztunk, az eluensbe ionpárképzőt, heptán-szulfonsavat adagoltuk (ezt megelőzően vizsgáltuk az ionpárképző koncentrációjának függvényében az elválasztás szelektivitását). Az elválasztás során egyidejűleg jelen voltak savas és bázikus tulajdonsággal rendelkező vegyületek is, ami az elemzést megnehezítette. Kettős optimalizálást alkalmaztunk az eluensrendszer kiválasztásánál, az oldószererősség változtatása mellett az eluens kémhatását is változtattuk. A szokásos víz-acetonitril mellett az „A” eluens jégacetet is tartalmazott, a „B” eluensben trietil-amin volt. Az elválasztás kezdetén a mozgófázis gyengén savas volt, majd elválasztás végére gyengén bázikussá vált. Hat vitamin alapvonal-elválasztását szobahőmérsékleten kevesebb, mint 1,2 perc alatt valósítottuk meg (13. ábra).



13. ábra. Vízoldékony vitaminok elválasztása

Mérési körülmények:

Állófázis

Kovasil-C₁₄

Mozgófázis

A: 100% 2,70 mmol/dm³ 1-heptán-szulfonsav nátrium sójának oldata + 0,5% jégecet

B: 100% CH₃CN + 0,3% trietil-amin

Gradiens

lineáris (0% B-ről 100% B-re 1,50 perc alatt)

Áramlási sebesség

1,2 cm³/perc

Hőmérséklet

szobahőmérséklet

Detektálás

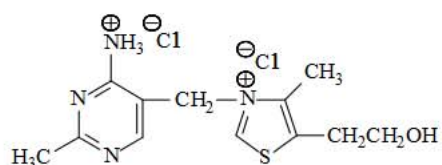
270 nm

Nyomás (indulásnál)

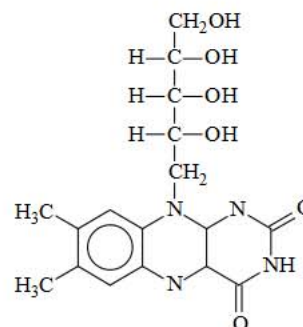
33 MPa

Injektált minta

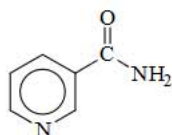
1,0 µl, c ≈ 1,0 mg/cm³



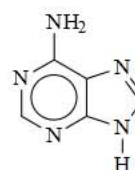
B₁-vitamin (Tiamin)



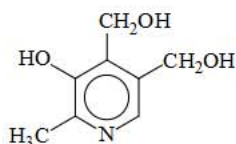
B₂-vitamin (Riboflavin)



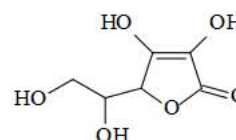
B₃-vitamin (Niacinamid)



B₄-vitamin (Adenin)



B₆-vitamin (Piridoxin)



C-vitamin (Aszkorbinsav)

14. ábra. Elválasztott vízoldékony vitaminok szerkezeti képlete

Kimutatási határ vizsgálata

Kimutatási határként gyakran a csúcsmagasság és az alapvonal zajsztintjéhez, a háromszoros jel/zaj viszonyhoz tartozó anyagmennyiséget adják meg, az így kapott mennyiség az, ami a gyakorlat szempontjából releváns.

Vizsgálataink során hangsúlyozottan rutin szempontokat tartottunk szem előtt, a méréseket egyszerű, nem programozható detektorral végeztük. A vitaminok retenciós sorrendjének megfelelően a mért kimutatási határokat tartalmazó 1. táblázat második oszlopában azon a hullámhosszon mért kimutatási határt tüntettünk fel, ahol valamennyi komponensnek van mérhető fényelnyelése. A következő oszlop a vizsgált vegyületek

abszorpciós maximumának hullámhosszát, az utolsó oszlop pedig az ott mért kimutatási határt tartalmazza.

1. Táblázat: Vízoldékony vitaminok kimutatási határa

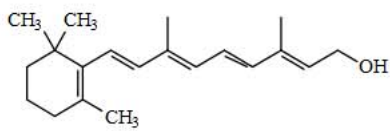
	Detektálás ($\lambda=270$ nm)		Abszorpció maximum (nm)	Detektálás max. abszorpciónál	
	[ng]	[pmol]		[ng]	[pmol]
C-vitamin	0,250	1,40	248	0,158	0,90
B ₃ -vitamin	0,120	1,00	262	0,082	0,67
B ₄ -vitamin	0,022	0,16	260	0,002	0,11
B ₆ -vitamin	1,180	7,00	292	0,780	4,60
B ₂ -vitamin	0,060	0,16	267	0,049	0,13
B ₁ -vitamin	2,000	6,60	263	1,810	6,00

A kimutatási határ a kromatográfiai körülményektől jelentős mértékben függ, befolyásolhatja a berendezés minősége vagy a gradiens meredeksége, azaz a csúcsok szélessége. 270 nm hullámhosszon valamennyi mintavegyület mutat UV abszorpciót, a kimutatási határok a legtöbb esetben 10^{-12} mol (pikomol) tartományba esnek. Optimális hullámhosszon a meghatározható anyag mennyisége kisebb, a kimutatási határ javul. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy a lineáris tartomány (mintamennyiség – csúcsmagasság) a detektálási határtól kb. 10^{-8} molig (10 nanomol) terjed. (A riboflavinból – alacsony oldhatósága miatt – a legnagyobb injektálható mennyiség csak 0,2 nanomol volt.)

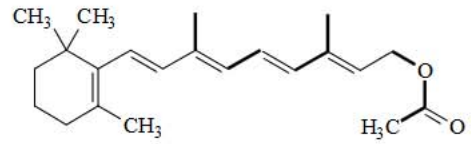
6.2.1.2 Zsíroidékony vitaminok

A zsíroidékony vitaminok (A-vitamin és származékai, a D₃-vitamin, az E-vitamin származékai) az emberi szervezet megfelelő működésében fontos szerepet játszanak, és számos betegség kialakulását megakadályozhatják.

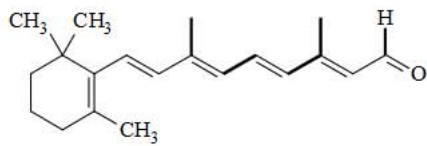
Folyadékromatográfiai analízisük (porózus tölteteken is) gyakori elválasztási feladat [94,156,163-165]. A zsíroidékony vitaminok retenciója kis polaritásuk miatt a fordított fázisú tölteteken magas, a kis fajlagos felületű nemporózus tölteten, rövid oszlopon az analízis idő rövid.



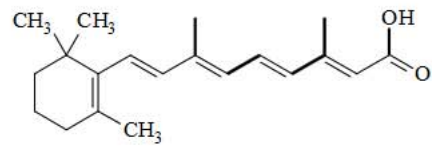
A-vitamin (Retinol)



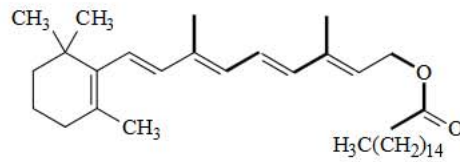
A-vitamin acetát (Retinol-acetát)



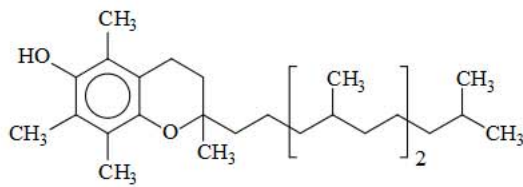
A-vitamin aldehyd (Retinal)



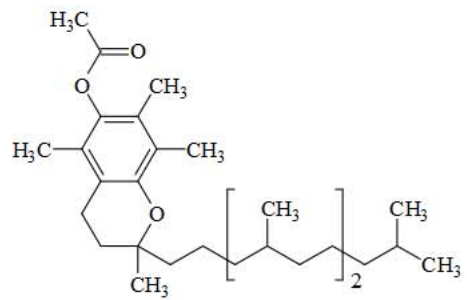
A-vitamin sav (Retinol sav)



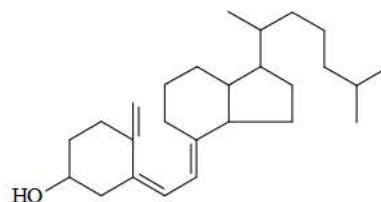
A-vitamin palmitát (Retinol-palmitát)



E-vitamin (Tokoferol)

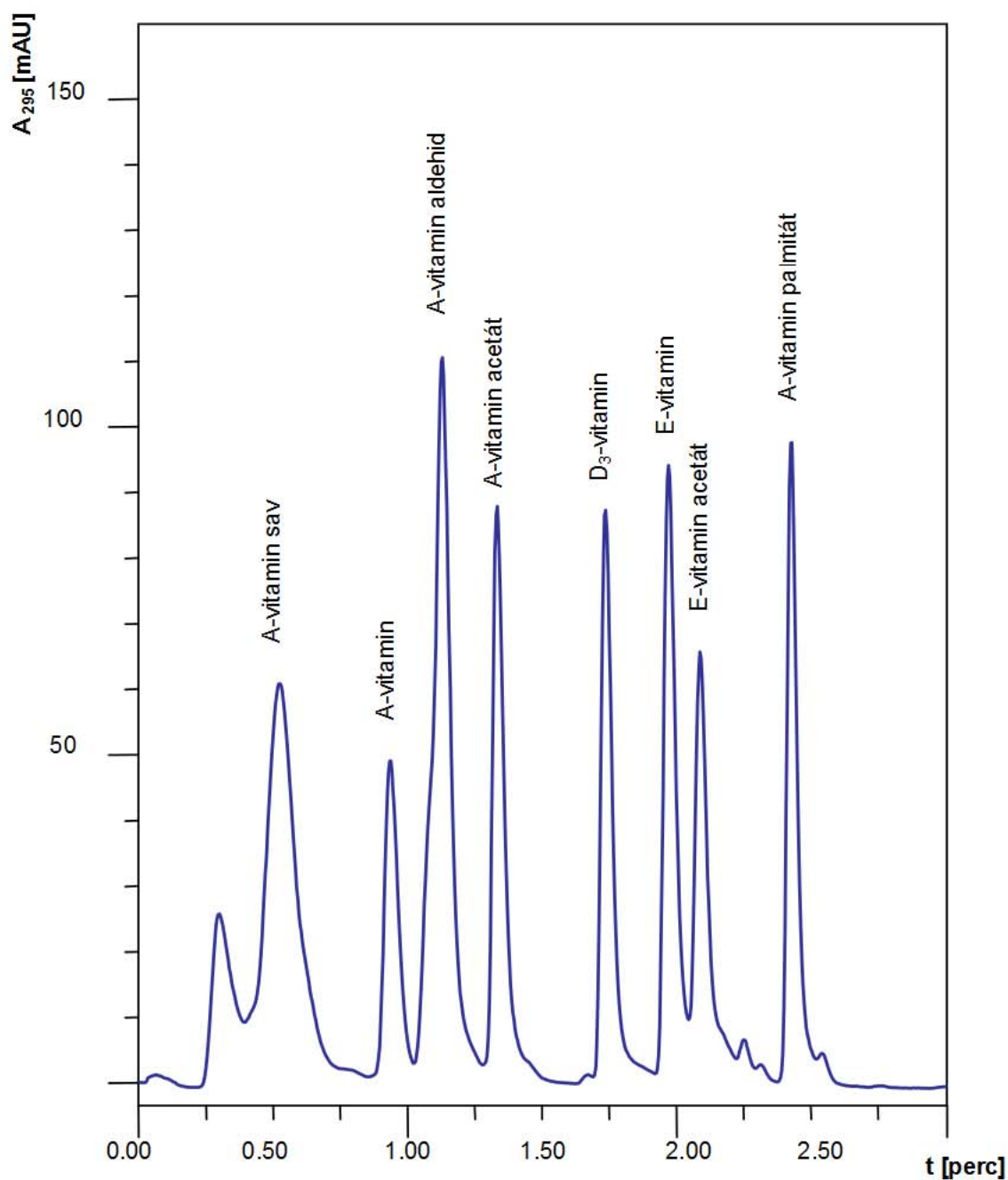


E-vitamin acetát (Tokoferol-acetát)



D₃-vitamin (Kolekalciferol)

15. ábra. Zsírdékony vitaminok szerkezeti képlete



16. ábra: Zsírolékony vitaminok elválasztása

Mérési körülmények:

Állófázis

Kovasil-C₁₄

Mozgófázis

A: 20% CH₃CN + 80% 0,05 mol/dm³ ammónium-acetát oldat

B: 100% CH₃CN

Gradiens

több lépcsős gradiens

Áramlási sebesség

1,0 cm³/perc

Hőmérséklet

szobahőmérséklet

Detektálás

295 nm

Nyomás (indulásnál)

28 MPa

Injektált minta

1,0 µl, c ≈ 1,0 mg/cm³

A zsírodékony vitaminok, ill. származékaik (15. ábra) elválasztásához (16. ábra) irodalmi adatok, és tapasztalataink alapján is gradiens elúciót alkalmazva az víz–acetonitril elegyek jól alkalmazhatók. A nemporózus töltet, rövid oszlop használata esetében célszerű az „A” eluenshez ammónium-acetátot adagolni az A-vitamin sav polaritásának megnövelésére, egyébként az A-vitamin savnak nincs retenciója.

A zsírodékony vitaminok erősen hő- és fényérzékenyek. Ezért a minták és a standardok tárolása külön gondosságot igényel, hosszabb tárolás során a mintákat inert gáz atmoszférában, mélyhűtve kell tárolni.

Kimutatási határ vizsgálata

A 2. táblázat tartalmazza a zsírodékony vitaminok általunk mért kimutatási határát a vitaminok retenciós idejének sorrendjében.

Az A- és E-vitaminok UV spektruma nagymértékben eltér, abszorpciós maximumuk egymástól távol esik, a 295 nm hullámhosszon azonban mindegyik vegyületnek van fényelnyelése. Az abszorpciós maximumon történő méréssel a kimutatható anyag mennyisége csökken, a kimutatási határ csökken. Nagyon jelentős az effektus pl. az E-vitamin acetát esetében, ahol a mérési hullámhossz 10 nm-es változtatásával a mérhető mennyiség több, mint az ötödrészére csökkent [156,163,164].

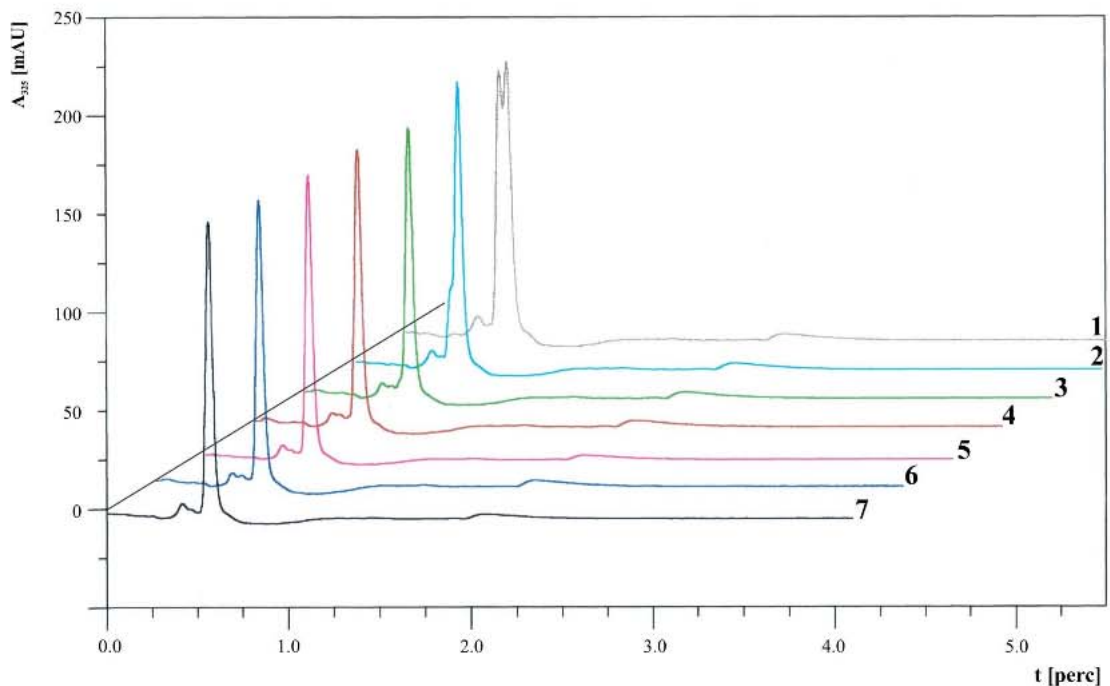
2. Táblázat. Zsírodékony vitaminok kimutatási határa

	Detektálás ($\lambda=295$ nm)		Abszorpció maximum (nm)	Detektálás max. abszorpciónál	
	[ng]	[pmol]		[ng]	[pmol]
A-vitamin sav	0,066	0,220	351	0,019	0,062
A-vitamin	0,023	0,080	325	0,012	0,042
A-vitamin aldehid	0,280	1,000	386	0,071	0,250
A-vitamin acetát	0,020	0,060	325	0,010	0,031
D ₃ -vitamin	0,069	0,180	267	0,015	0,040
E-vitamin	0,860	2,000	295	0,862	2,000
E-vitamin acetát	0,520	1,100	285	0,090	0,190
A-vitamin palmitát	0,005	0,010	327	0,003	0,005

Az A-vitamin és A-vitamin aldehyd, valamint az E-vitamin és E-vitamin acetát kimutatása egymás mellett

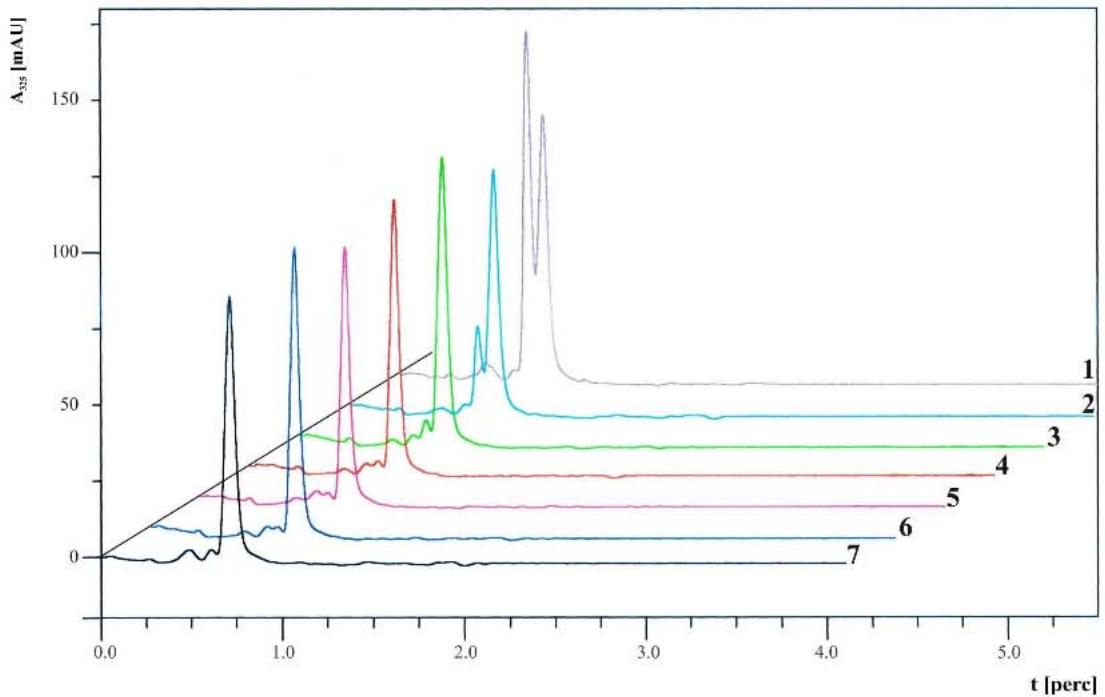
Kidolgoztunk a vitaminok gyors, nagyérzékenységű meghatározására nemporózus állófázisok alkalmazásával egy olyan módszert, amellyel vizsgáltuk a kimutatási határok változását abban az esetben, amikor nagy mennyiségű főkomponens mellett a vizsgált vitamin igen kis mennyiségben, mintegy szennyezőként volt jelen (17.–18. ábra).

Nyomszennyezők kimutatása különösen akkor nehéz feladat, ha azok a főkomponensektől nem tökéletesen válnak el. Ezért a kísérleti körülmények változtatásával az elválasztásokat úgy állítottuk be, hogy két-két komponens csak részlegesen váljon el egymástól (azonos mintakonzentráció esetén a 17.a ábrán $R = 0,8$, a 17.b ábrán $R = 1,0$, a 17.c ábrán $R = 1,2$ és a 18. ábrán $R = 1,0$).

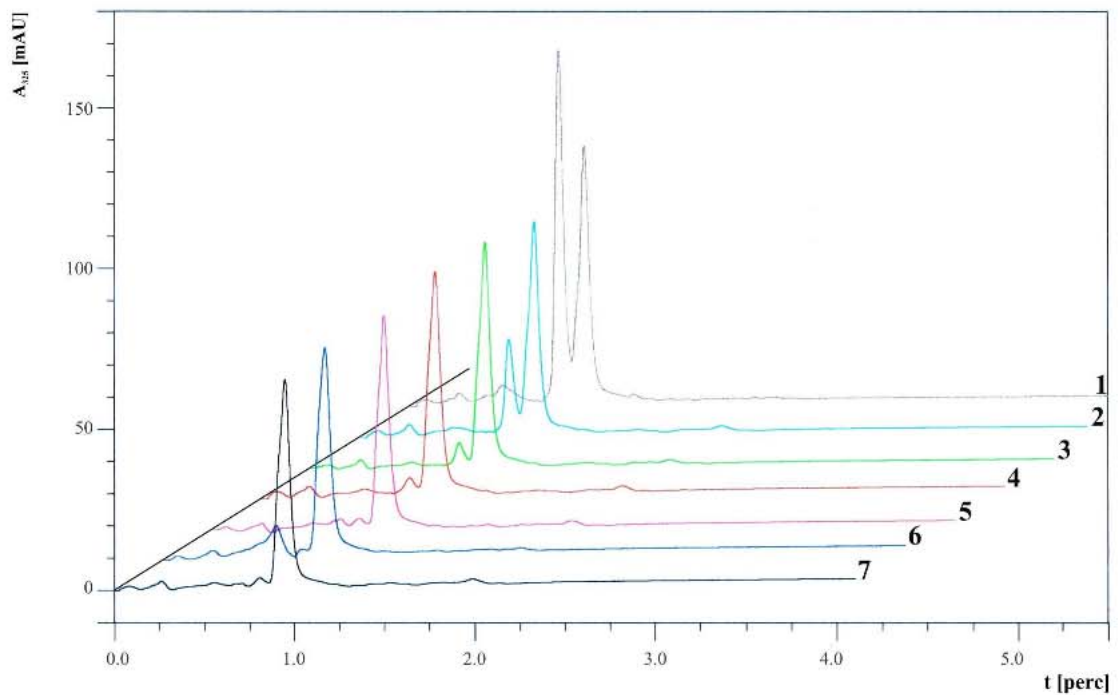


17.a ábra. A-vitamin (Retinol) és A-vitamin aldehyd (Retinal) elválasztása, $R = 0,8$

A zsírolékony vitaminok elválasztásánál ismertetett körülmények között végeztem a méréseket, mindkét esetben többlépcsős gradienst alkalmaztam. A detektálási hullámhossz az A-vitamin és A-vitamin aldehyd elválasztása esetében az A-vitamin abszorpciós maximuma, $\lambda = 325$ nm, az E-vitamin és E-vitamin acetát elválasztásánál pedig az E-vitamin abszorpciós maximuma, $\lambda = 288$ nm volt.



17.b ábra. A-vitamin (Retinol) és A-vitamin aldehyd (Retinal) elválasztása, $R = 1,0$



17.c ábra. A-vitamin (Retinol) és A-vitamin aldehyd (Retinal) elválasztása, $R = 1,2$

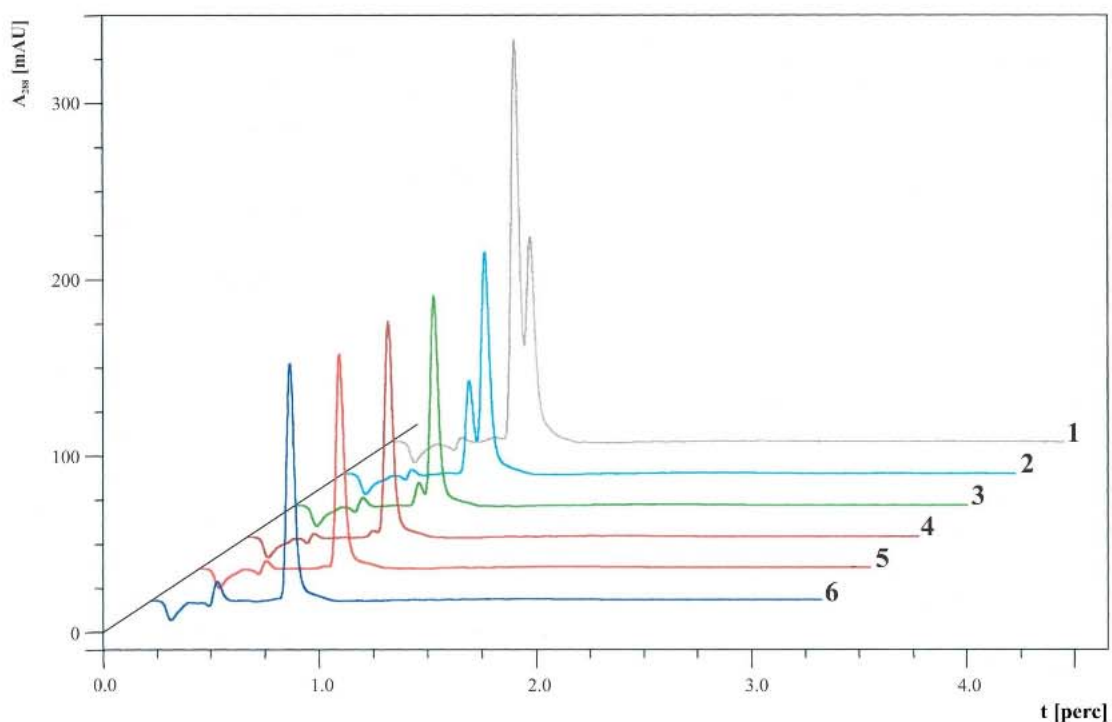
A-vitamin (Retinol) : A-vitamin aldehyd (Retinal)

1 = $10^{-7}g : 10^{-7}g$	2 = $10^{-7}g : 2 \cdot 10^{-8}g$	3 = $10^{-7}g : 4 \cdot 10^{-8}g$
4 = $10^{-7}g : 8 \cdot 10^{-10}g$	5 = $10^{-7}g : 1,6 \cdot 10^{-10}g$	6 = $10^{-7}g : 3,2 \cdot 10^{-11}g$
	7 = $10^{-7}g : 6,4 \cdot 10^{-12}g$	

Méréseink alapján megállapítottuk, hogy $R = 1,0$ -nél a főkomponens mellett még 0,1% szennyezés biztonsággal meghatározható.

Sikerült igen gyors elválasztásokat végezni: az analízisidő az alkalmazott gradiens programtól és a hőmérséklettől függően általában 1-2 perc között változott. Vizsgálatainkhoz – hangsúlyozottan – rutin kromatográfiás berendezéseket (szivattyú, injektor, UV detektor) alkalmaztunk. Ennek ellenére, ilyen körülmények között a kimutatási határ a legtöbb vitaminra a *pikomol* tartományba esett.

A mintamennyiség–csúcsmagasság alapján mért linearitás 4-5 nagyságrend. Megállapítottuk, hogy az egyszerűen elérhető alacsony kimutatási határ a módszert méréseink szerint alkalmassá teszi nyomszennyezők vizsgálatára is.



18. ábra. E-vitamin és E-vitamin acetát elválasztása, $R=1.0$

E-vitamin (Tokoferol):E-vitamin acetát (Tokoferol-acetát)		
1 = $10^{-7}g : 10^{-7}g$	2 = $10^{-7}g : 2 \cdot 10^{-8}g$	3 = $10^{-7}g : 4 \cdot 10^{-9}g$
4 = $10^{-7}g : 8 \cdot 10^{-10}g$	5 = $10^{-7}g : 1,6 \cdot 10^{-10}g$	6 = $10^{-7}g : 3,2 \cdot 10^{-11}g$

6.2.2 Peptidek és fehérjék elválasztása

Fehérjék vizsgálatára elterjedt módszer a kémiai vagy biokémiai lebontásukkal keletkező kisebb molekulaméretű peptidek kromatográfiás meghatározása [166,167]. Az ún. „peptid mapping” eljárást kiterjedten alkalmazzák a biopolimerek kutatásában és a minőségellenőrzésben is [168]. Az eljárás során a fehérjét (gyakran enzimatikusan) bontják, és a kapott peptideket kromatográfiásan választják el. Leggyakrabban 10-25 cm

hosszúságú oszlopokat alkalmaznak, melyeket porózus (10-30 nm pórusátmérőjű), fordított fázisú töltetekből készítettek [169-174].

A biopolimerek analízisében egy új, gyors elválasztási lehetőség került az utóbbi években az elválasztástechnikai fejlesztések előterébe: az elválasztások nemporózus tölteteken. Két töltettípus is elterjedőben van: a szilikagél alapú és a polisztirol alapú töltet. Az előbbiek elsősorban peptidok és proteinek [82-84,86,147], utóbbiak pedig főként nukleinsavak és oligonukleotidok elválasztására terjedtek el [175,176].

Komplex peptidegyegek analízisére a nemporózus töltetek elsősorban a rövid analízisidőnek köszönhetően különösen jól alkalmazhatók. A rövid analízisidő természetesen kis csúcstérfogatot és ezzel együtt megnövekedett érzékenységet is jelent.

Peptidek, fehérjék HPLC-elválasztását leggyakrabban apoláris (fordított fázisú) tölteteken végzik víztartalmú mozgófázisokkal, ahol a mozgófázis denaturáló, ionpároképző reagenst is tartalmaz. Legelterjedtebb a trifluor-ecetsav (TFA) használata, mivel alkalmazásával igen jó elválasztások érhetők el, UV abszorpciója alacsony és megnöveli a nagy molekulatömegű, apoláris polipeptidek oldhatóságát. Alkalmazásának hátránya, hogy megtámadhatja a szilikagél felületét, leginkább abban az esetben, ha az nem tökéletesen nehézfémmentes.

Az eluens szerves komponense legtöbbször acetonitril. Általános a gradiens elúció alkalmazása az éles csúcsok és az optimális szelektivitás elérése érdekében.

A fehérjék elválasztásához optimálisan használható rendszerrel szembeni követelmények:

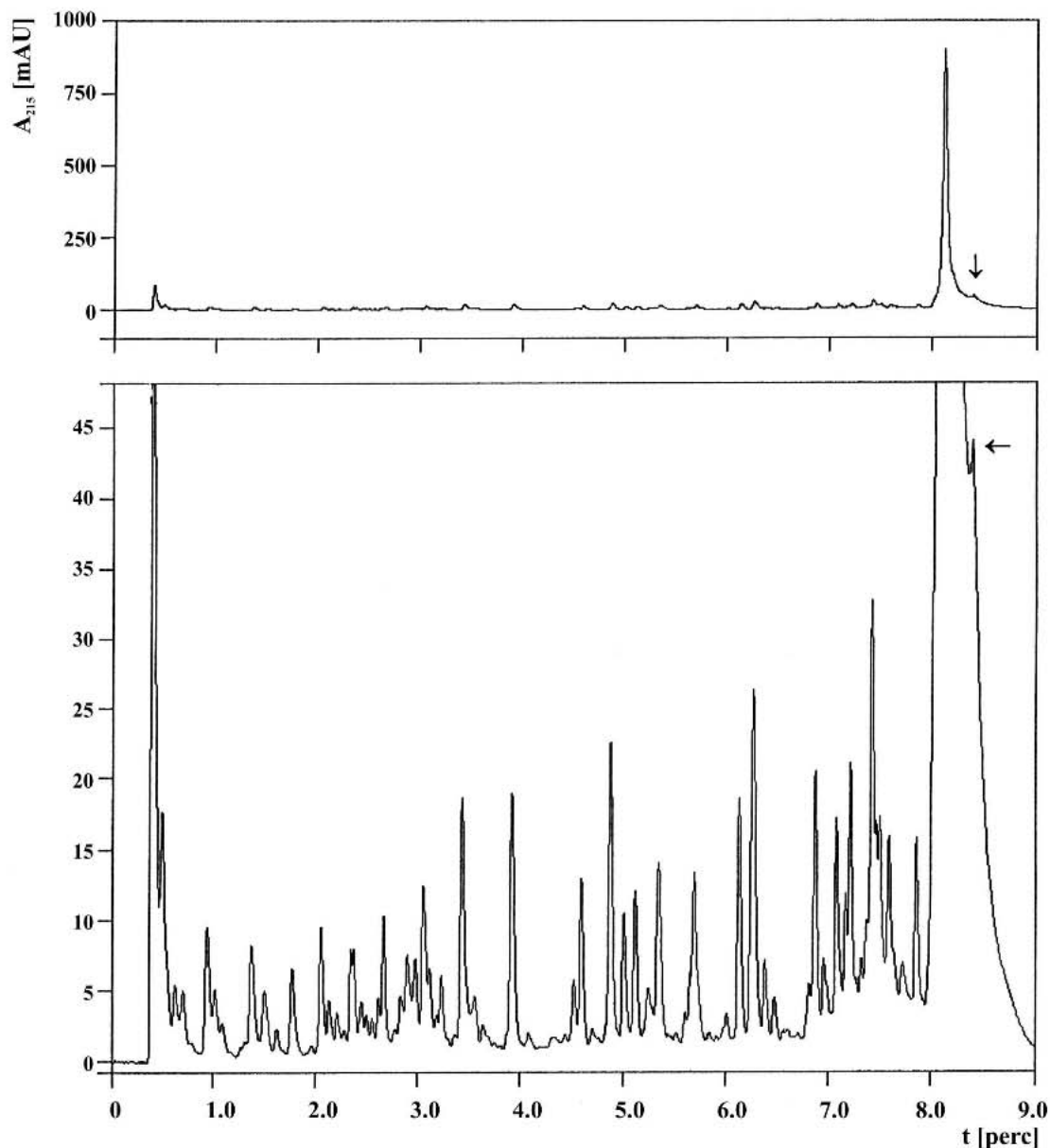
- Az állófázis felületének tökéletesen borítottak kell lennie, mert a szabad szilanolcsoportok a peptidláncok irreverzibilis adszorpcióját okozzák.
- A töltet pórusainak igen nagyoknak kell lenni, hiszen a fehérjék nagymolekulák és be kell férniük a pórusokba, de még jobb, ha a töltet egyáltalán nem tartalmaz pórusokat, azaz pórusmentes.
- Gradiens elúciós technikát alkalmazva a fehérjéket egymás után mintegy leoldják az oszlopról, tehát az oszlop lehetőleg legyen rövid, hogy a fehérjék ismételtelen ne keveredhessenek.

6.2.2.1 A tripszin és kimotripszin tisztaságának ellenőrzése

Az enzimátikus módszereket gyakran alkalmazzák a fehérjék bontására. Leggyakrabban bontó enzimeként a tripszint, ritkábban a kimotripszint használják [177,178].

Mindkét enzim, az előállításuk módjából következően kismértékben egymással is szennyezve van. Ezért a gyártók az enzimpreparátumokat olyan előkezelésnek vetik

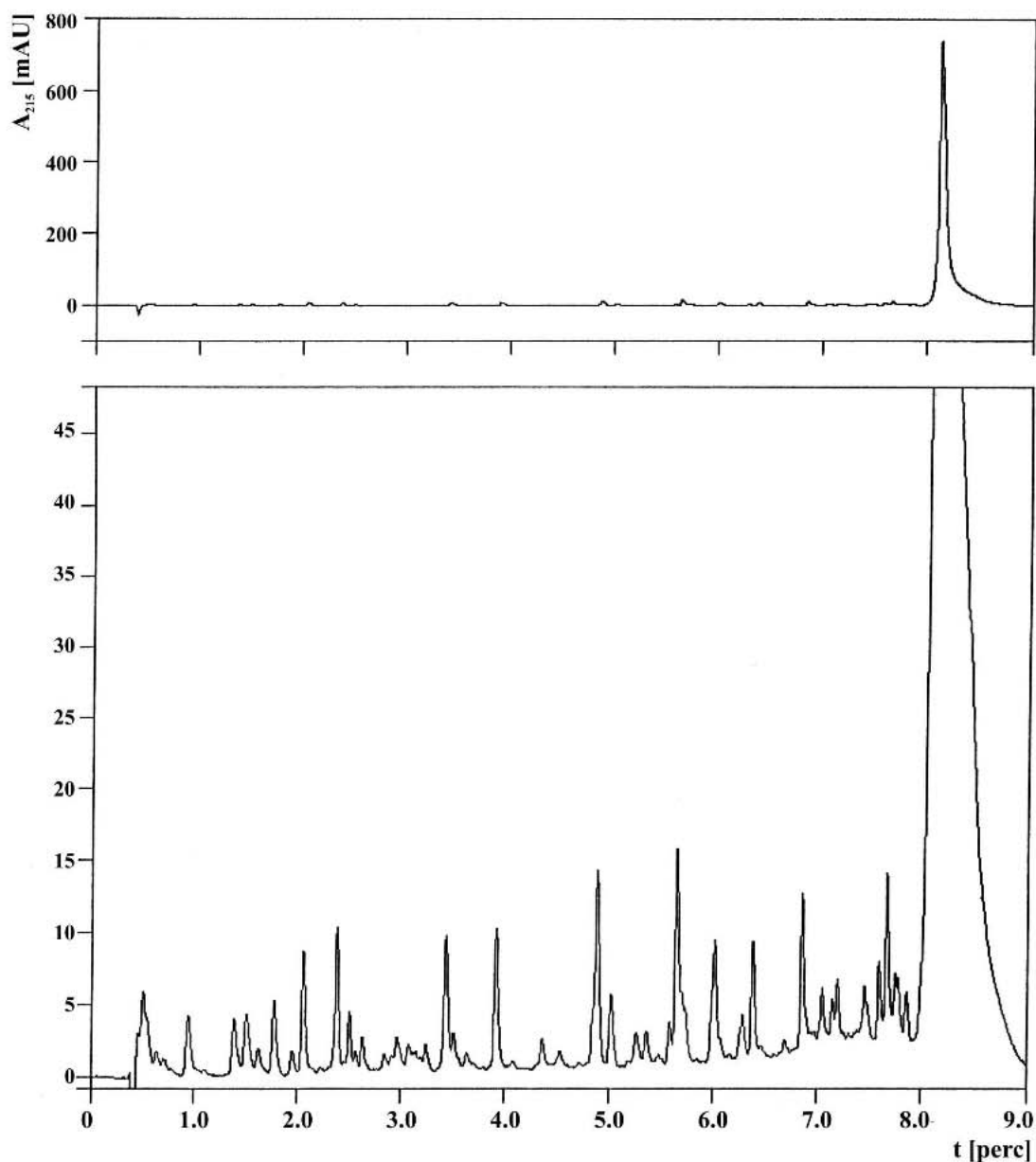
alá, mely a nem kívánt enzimaktivitást csökkenti. A tripszint leghatásosabban L-tozilamid-2-fenietil-klórmetilketonnal (TPCK), a kimotripszint 1-klór-3-tozilamido-7-amino-L-2-heptanonnal (TLCK) kezelik.



19. ábra. Tripszin kromatogramja
(→ a kimotripszin csúcsot jelzi)

Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasi-MS-H (33x4,6 mm) 2 oszlop sorba kötve
Mozgófázis	A: H ₂ O-ban 0,1% TFA B: CH ₃ CN:H ₂ O = 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (7,7 perc alatt B 0% - 100% változik)
Áramlási sebesség	1,2 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Detektálás	215 nm
Injektált minta	10 µl, (c~ 1 mg/cm ³)



20. ábra. TPCK-kezelt tripszin kromatogramja

Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasil-MS-H (33x4,6 mm) 2 oszlop sorba kötve
Mozgófázis	A: H ₂ O-ban 0,1% TFA B: CH ₃ CN:H ₂ O = 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (7,7 perc alatt B 0% - 100% változik)
Áramlási sebesség	1,2 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Detektálás	215 nm
Injektált minta	10 µl, (c~ 1 mg/cm ³)

A nemporózus töltetet tartalmazó rövid oszlopok különösen alkalmasak szennyeződésvizsgálatra, mert nemcsak az analízisidő rövid, hanem a zajszint is alacsonyabb, mint a szokásos (10-15 cm) hosszúságú oszlopokkal végzett méréseknél.

Méréseink során két 33 mm hosszú oszlopot kötöttünk sorba, ezzel az elválasztás hatékonyságát kívántuk megnövelni, valamint az elválasztáshoz szükséges időt pedig csökkenteni, ami egyben kevesebb eluens felhasználását is jelenti.

A méréseinkhez használt tripszin és kimotripszin tisztaságát ellenőriztük. A nem tisztított enzimek jelentős mértékben egymással szennyezve voltak és nem elhanyagolható mértékben tartalmaztak bomlástermékeket is (19. ábra). A kromatogramokat a jobb áttekinthetőség érdekében kinagyítva is bemutatom.

Megállapítottuk, hogy a TPCK-kezelt tripszin sem szennyezőket (20. ábra), sem kimotripszint nem tartalmazott, bomlástermékeket is csak kisebb mennyiségben mérünk

A TLCK-kezelt kimotripszin kromatogramján tripszin csúcs gyakorlatilag szintén nem volt látható.

6.2.2.2 *A fehérjék enzimatis bontása*

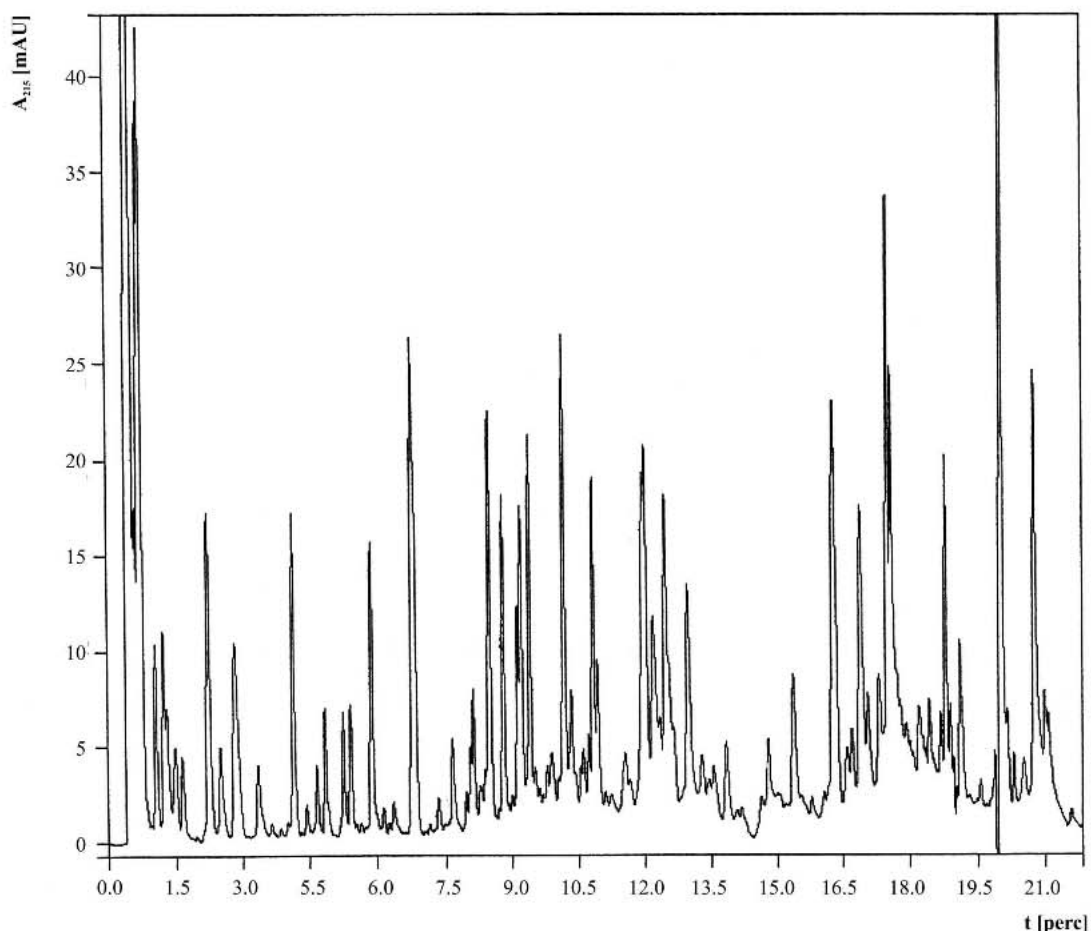
A fehérjék enzimatis bontásához a kimotripszin-mentes tripszint, illetve a tripszin-mentes kimotripszint használtuk. A két enzim más-más aminosavaknál bontja a fehérjéket [84]. A tripszin például a fehérjék arginin és lizin aminosavainak C-terminálisánál bont. A bontás után kapott, meglehetősen nagyszámú és viszonylag kisméretű – általában 7-12 aminosavból álló – peptidek kromatogramja az adott fehérjére jellemző „ujjlenyomat” (fingerprint) kromatogram [177].

A fehérjeoldatot (2 mg/cm³ frissen készített vizes oldat) 37°C-on inkubáltuk TPCK-kezelt tripszinnel, vagy TLCK-kezelt kimotripszinnel (1 mg/cm³ frissen készített vizes oldat). 1000 µl 0,05 M Trisz-pufferhez (pH = 8,5) 125 µl fehérjeoldatot és 5 µl tripszin-, vagy kimotripszin-oldatot adtunk. Az elegyet 6 órán keresztül inkubáltuk, majd a reakciót 500 µl 10%-os TFA hozzáadásával állítottuk le.

Szérumalbumin

A humán szérumalbumin (HSA) bontásából származó peptidek kromatogramjához hasonlóan bonyolult a szarvasmarha szérumalbumin (BSA) bontásából származó peptidek kromatogramja (21.-22. ábra), bár a két fehérje bomlása jelentősen eltér. A BSA tripszines bontása során pl. 79 peptid képződik [179]. Gyakran a fehérjéket redukálják, kémiai úton kisebb részekre bontják, hogy az enzimatis bontás után kapott kromatogram ne legyen túl bonyolult.

Vizsgálatainkhoz a fehérjéket előkezelés nélkül alkalmaztuk. Mivel munkánk során egy új elválasztási módszer kidolgozása volt a cél, és nem a közvetlen biokémiai felhasználás, így a kromatogramok egyszerűsítésére nem törekedtünk.

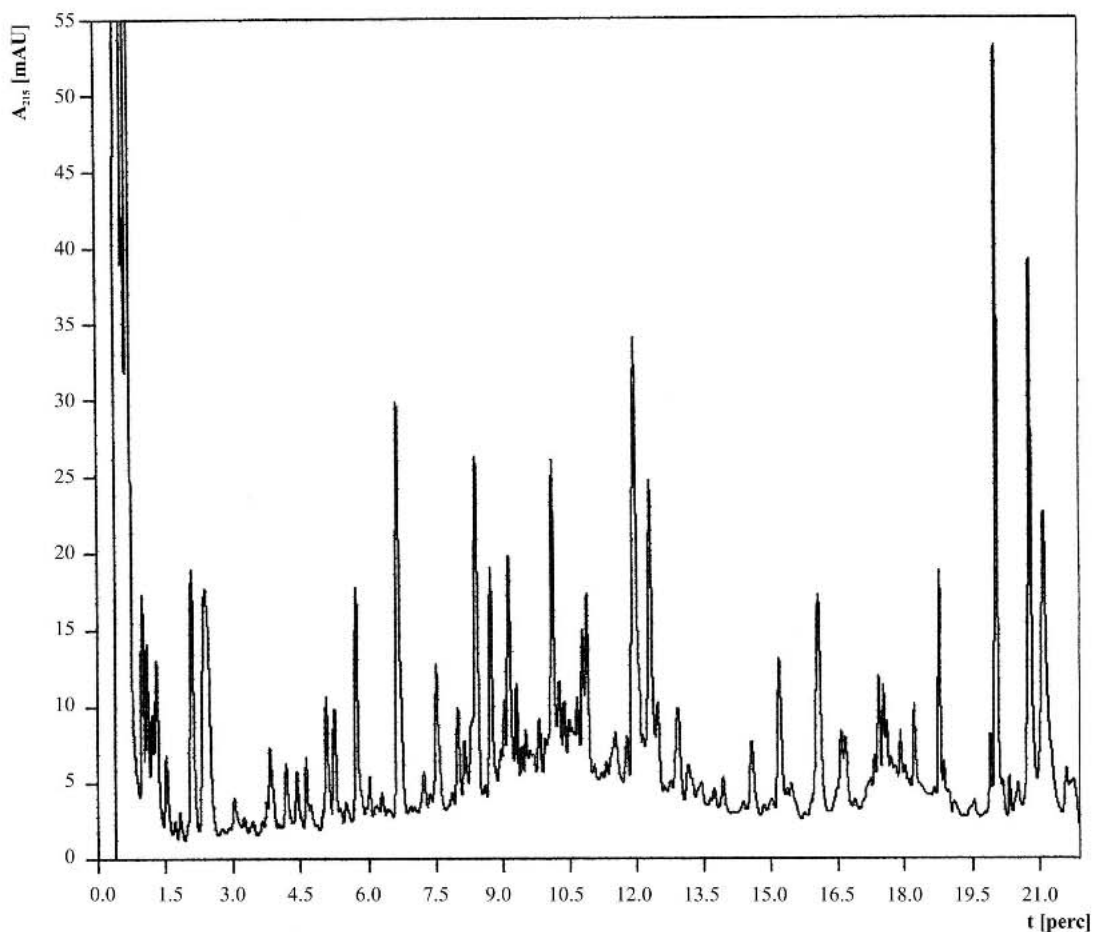


21. ábra. BSA tripszines bontásából származó peptidek kromatogramja

Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasil-MS-H (33x4,6 mm) 2 oszlop sorba kötve
Mozgófázis	A: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 0,5:99,5 arányú elegye B: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (20 perc alatt B 0% - 53% változik)
Áramlási sebesség	1,2 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Nyomás (indulásnál)	24 MPa
Detektálás	215 nm
Injektált minta	10 µl, (c~ 1mg/cm ³)

Elvégeztük humán szérumalbumin (HSA) és a szarvasmarha szérumalbumin (BSA) elemzését magas hőmérsékleten (70°C) mégpedig két Kovasil-MS-H oszlop sorba kapcsolásával. Ezzel az elválasztás hatékonyságát jelentősen megnöveltük. Az elválasztáshoz szükséges időt pedig, ami kevesebb, mint 22 perc volt – irodalmi adatokkal összehasonlítva – jelentősen csökkentettük [179].



22. ábra. Humán szérumalbumin (HSA) emésztmény peptidjeinek elválasztása

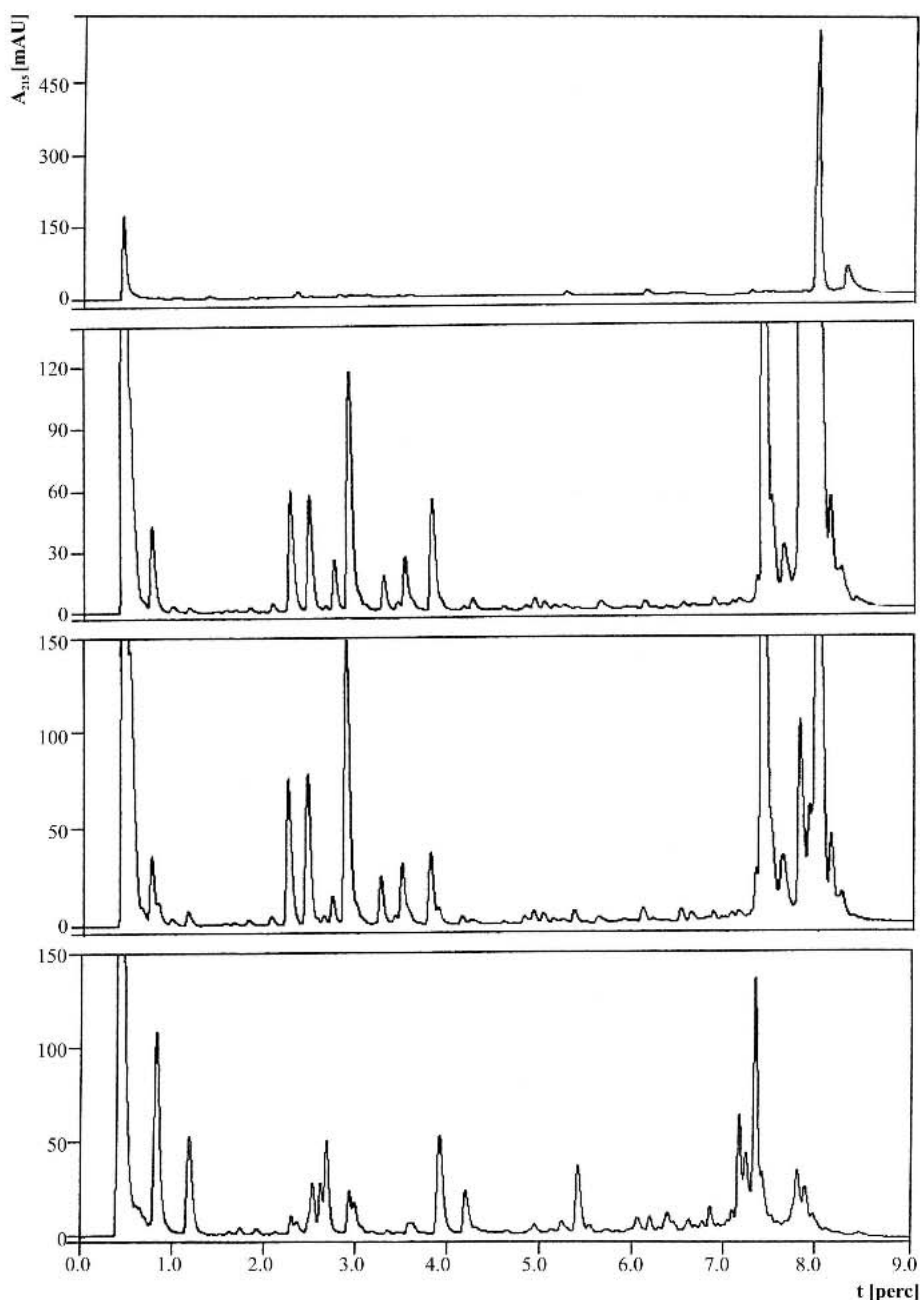
Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasil-MS-H (33x4,6 mm) 2 oszlop sorba kötve
Mozgófázis	A: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 0,5:99,5 arányú elegye B: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (20 perc alatt B 0% - 53% változik)
Áramlási sebesség	1,2 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Nyomás (indulásnál)	24 MPa
Detektálás	215 nm
Injektált minta	10 µl, (c~ 1mg/cm ³)

A nemporózus töltetek alkalmazása több szempontból előnyös:

- || Pórusok hiányában a polipeptidok gyakori, irreverzibilis kötődése az állófázis-hoz elhanyagolható [180].
- || Az alkalmazott rövid oszlopok (33-66 mm) gyors analíziseket és a kis csúcstér-fogatok miatt nagy érzékenységet eredményeznek.
- || A biopolimerek jellegzetes deszorpciós tulajdonságai miatt az alkalmazott rövid oszlopokon a szelektivitás nagy.

Humán és szarvasmarha inzulin



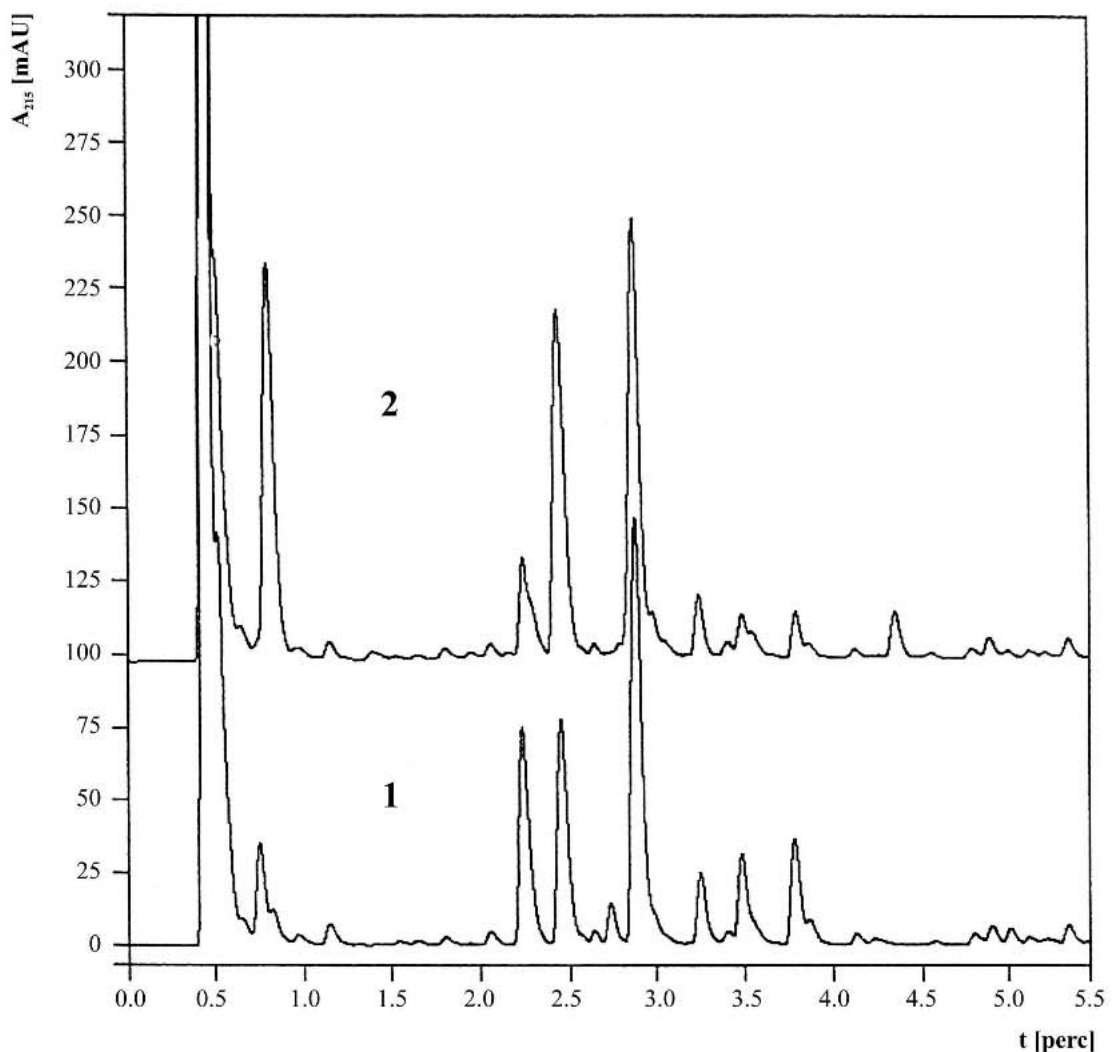
23. ábra. Humán inzulin tripszinnel történő – 0, 3, 6, 9 óra inkubálást követő – bontása után kapott kromatogramok

Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasil-MS-H (33x4,6 mm) 2 oszlop sorba kötve
Mozgófázis	A: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 0,5:99,5 arányú elegye B: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (7,7 perc alatt B 0% - 100% változik)
Áramlási sebesség	1,2 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Nyomás (indulásnál)	24 MPa
Detektálás	215 nm
Injektált minta	10 µl, (c~ 1mg/cm ³)

Humán inzulint bontottuk tripszinnel. Az emésztést megelőzően elvégzett elválasztás során kapott kromatogramon külön-külön látható az inzulin ($t_R = 0,52$ perc) és a tripszin ($t_R = 8,15$ perc) csúcs. Az emésztést követően, a 3 órás inkubálás után a kromatogramon már megjelennek az inzulin bontása során keletkező peptidek, ennek megfelelően a tripszin csúcs alakja megváltozik. (23. ábra).

Elemztük a humán és szarvasmarha-inzulin tripszines bontásával nyert hidrolizátumot is (24. ábra). A kétféle inzulinmolekula láncában csupán csak egy aminosavban van eltérés. A rövid, 5,5 perces kromatogramon a keletkező peptidek eltérő, jellegzetes „ujjlenyomatot” szolgáltatnak.



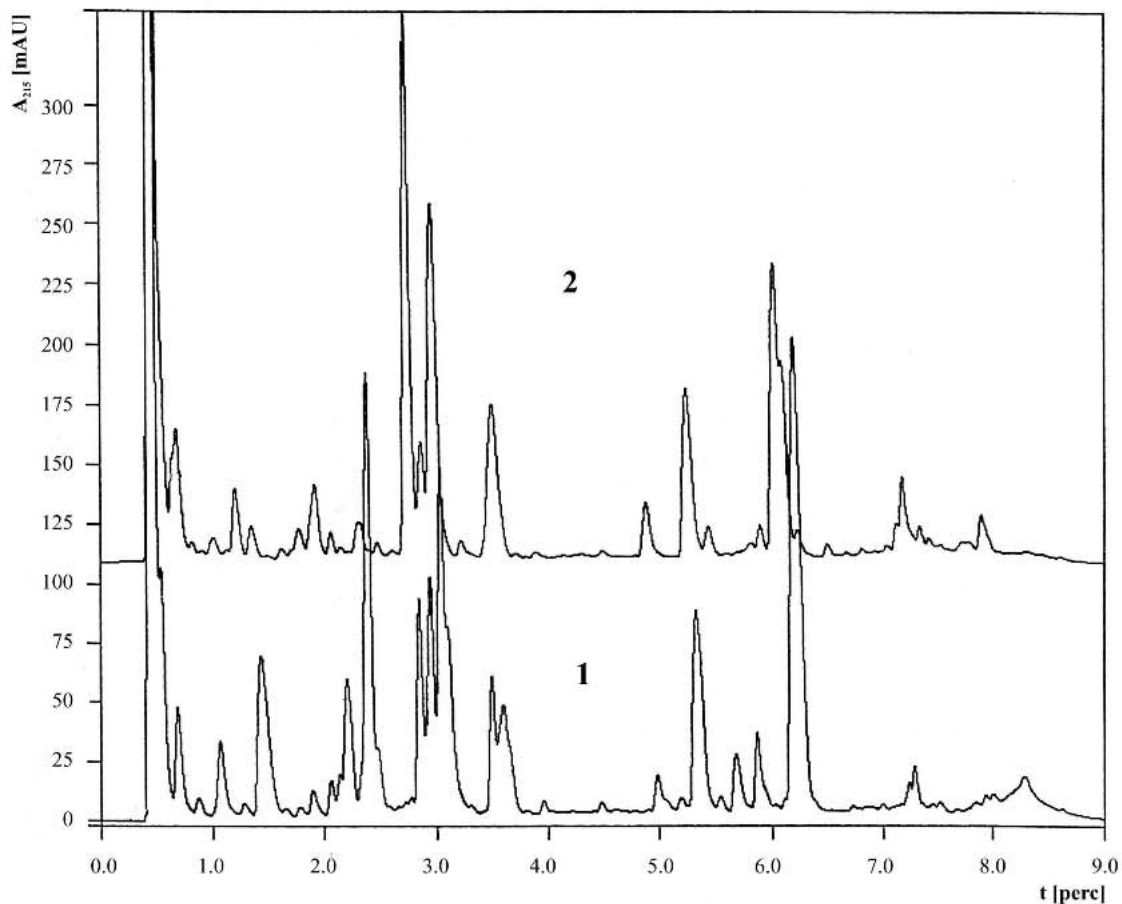
24. ábra. Humán és szarvasmarha-inzulin tripszines bontásának összehasonlítása

1: Humán inzulin, 2: Szarvasmarha inzulin

(A mérési körülményeket az 57. oldaldalon a 23. ábrához tartozóan ismertettem.)

Humán és szarvasmarha citokróm-c

Elvégeztük a humán citokróm-c bontását tripszines és kimotripszines kezeléssel is. A tripszin és a kimotripszin alkalmazása eltérő peptidképződéshez vezetett (25. ábra).



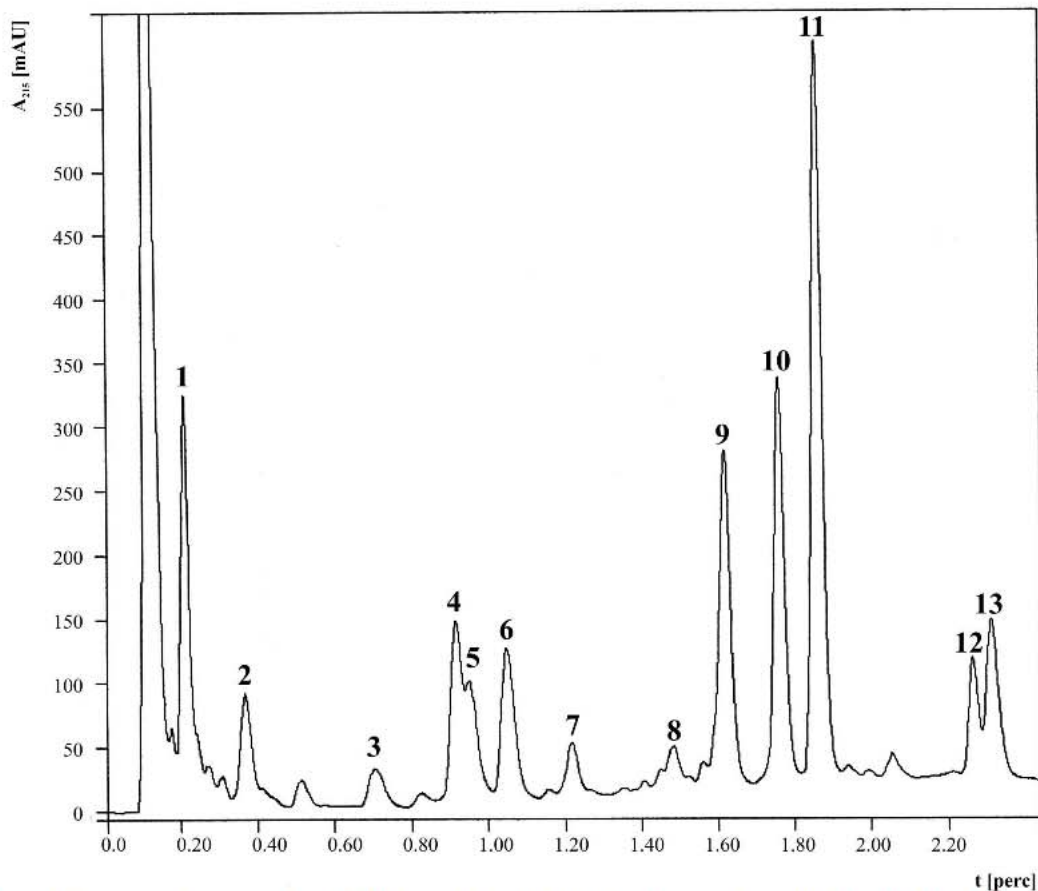
25. ábra. Humán citokróm-c tripszines(1) és kimotripszines(2) bontása során kapott peptidek elválasztása

Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasil-MS-H (33x4,6 mm) 2 oszlop sorba kötve
Mozgófázis	A: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 0,5:99,5 arányú elegye B: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (7,7 perc alatt B 0% - 100% változik)
Áramlási sebesség	1,2 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Nyomás (indulásnál)	24 MPa
Detektálás	215 nm
Injektált minta	10 µl, (c~ 1mg/cm ³)

A rövid, 9 perces, nagy felbontású kromatogramon a tripszines és a kimotripszines bontása eredményeként jól megfigyelhető néhány eltérő peptid jelenléte, eltérő retenció idővel jelennek meg kromatográfias csúcsok.

A kis molekulatömegű szarvasmarha citokróm-c ($M \sim 13.000$ Da) a tripszines kezelés során 13 jól meghatározott polipeptidre bomlik. A bomlást már több szerző is részletesen leírta [169,181].



26. ábra. Szarvasmarha citokróm-c bontásából származó peptidok elválasztása

- | | | |
|------------|--------------------|------------------------|
| 1. GDVEK | 5. KTGQAPGFSYTDANK | 10. EDLIAYLK |
| 2. YIPGTK | 6. TGGAPGFSYTDANK | 11. CAQCHTVEK |
| 3. KYIPGTK | 7. EDLIAY | 12. GITWGEETLMEYLENPKK |
| 4. IFYQK | 8. MIFAGIK | 13. GITWGEETLMEYLENPK |
| | 9. TGNLHGLFGR | |

Mérési körülmények:

Állófázis	Kovasi-MS-H
Mozgófázis	A: 0,2 M NaClO ₄ oldatban 0,1% TFA B: CH ₃ CN : 0,2 M NaClO ₄ oldat 70:30 elegyében 0,1% TFA
Gradiens	több lépcsős gradiens (3,3 perc alatt B 6% - 35% változik)
Áramlási sebesség	2,4 cm ³ /perc
Hőmérséklet	70 °C
Detektálás	215 nm
Nyomás (indulásnál)	35 MPa
Injektált minta	10 µl

Többlépcsős gradiens alkalmazásával – tekintve a viszonylag kisszámú bomlásterméket – egy igen gyors módszert dolgoztunk ki az elválasztásra és a mennyiségi meghatározásra (26. ábra). Az általunk kidolgozott módszerrel az elválasztás időszükséglete

– 3 perc alá csökkentettük – egytizede az irodalomban közétett elválasztások időszükségletének, emellett az elválasztás hatékonysága sem romlott, inkább javult [169,181].

6.2.2.3 Bioaktív peptidek elválasztása és kimutatási határának vizsgálata

Egy bioaktív peptidekből összeállított tesztelegy elválasztását is kidolgoztuk elsősorban kimutatási határok vizsgálata céljából (27. ábra, 3. táblázat).

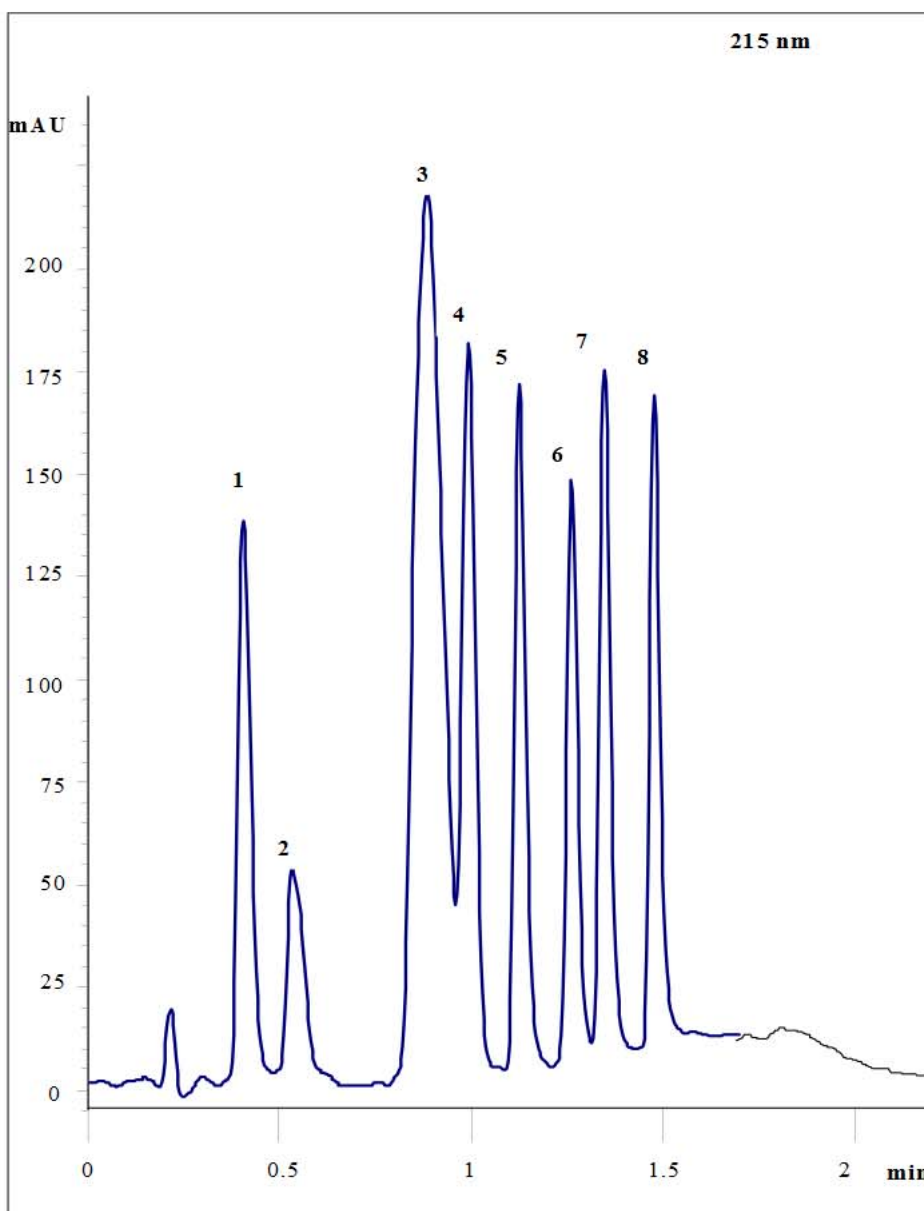
A kimutatási határ vizsgálatát egy 7 komponensű peptideleggyel végeztük el.

A kimutatási határ jellemzésére a jel-zaj viszony szolgál, a zaj háromszorosát tekintetük a legkisebb értékelhető jelnek, ez alapján határoztuk meg a kimutatható mennyiséget.

A kimutatási határok jórészt a 0,020 - 0,120 pikomol tartományba estek. (A detektálását 215 nm-en végeztük, ezen a hullámhosszon már viszonylag magas a peptidek fényabszorpciója, de a háttérzaj még nem jelentős). Az oxitocin viszonylag magas kimutatási határát a Leu-enkefalinól való nem teljes elválasztása magyarázhatja.

3. Táblázat: Peptidek kimutatási határa

Komponensek	Kimutatási határ	
	[ng]	[pmol]
Metionin enkefalin	0,052	0,090
[Arg ⁸]-vazopresszin	0,069	0,060
Leucin enkefalin	0,065	0,120
Oxitocin	1,914	1,900
Angiotenzin II.	0,014	0,090
Angiotenzin I.	0,060	0,050
Inzulin (szarvasmarha)	0,115	0,020



27. ábra: Bioaktív peptidok elválasztása

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| 1. Metioin enkefalin, | 5. Angiotenzin II, |
| 2. [Arg8]-vazopresszin, | 6. Angiotenzin I, |
| 3. Leucin enkefalin, | 7. Szomatosztatin, |
| 4. Oxitocin, | 8. Inzulin (szarvasmarha) |

Mérési körülmények:

Állófázis

Mozgófázis

Gradiens

Áramlási sebesség

Hőmérséklet

Nyomás (indulásnál)

Detektálás

Injektált minta

Kovasi-MS-H

A: CH₃CN:H₂O = 2:98 + 0,10% TFA

B: CH₃CN:H₂O = 90:10 + 0,10% TFA

több lépcsős gradiens (2,0 perc alatt B 12% - 40% változik)

1,4 cm³/perc

25 °C

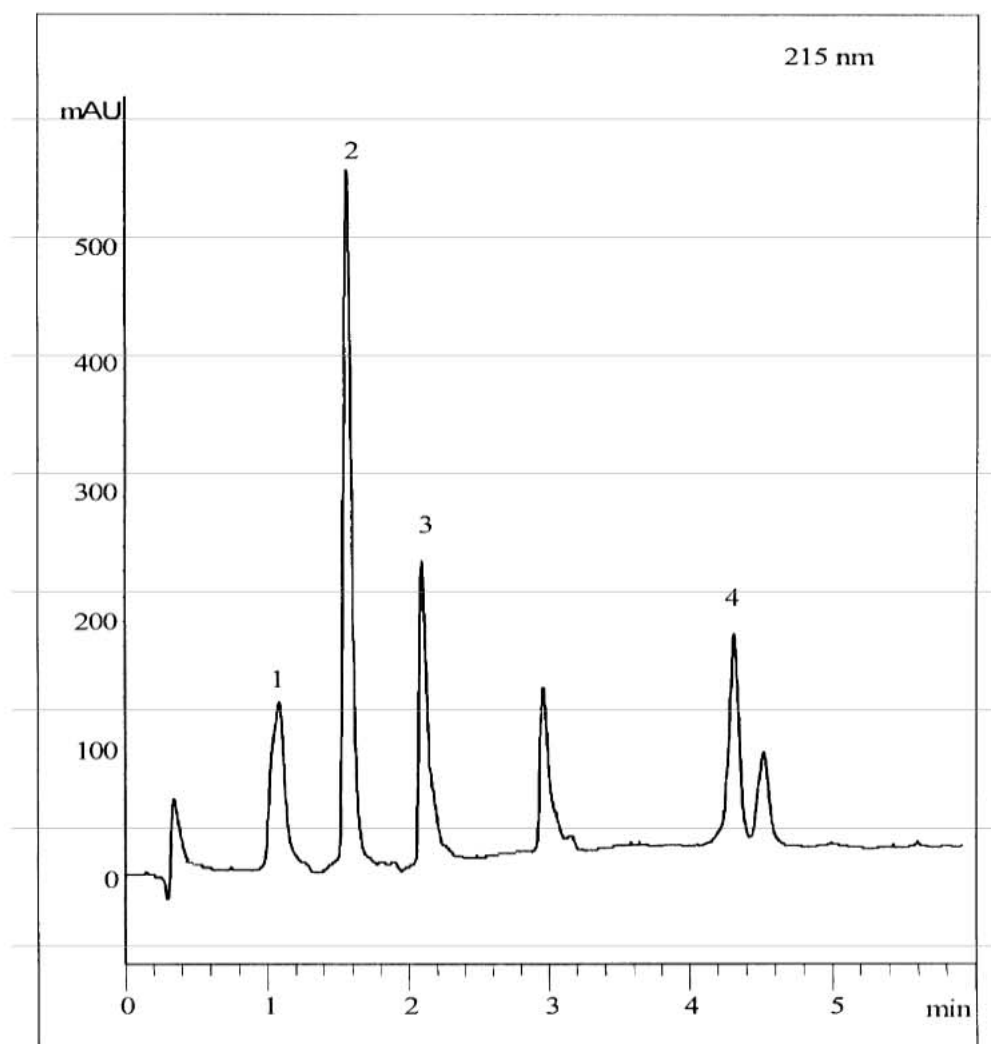
36 MPa

215 nm

10 µl

6.2.2.4 Standard protein keverék elválasztása, a visszanyerés vizsgálata

A pórusmentes állófázisok alkalmazásának egyik előnye a proteinek jó visszanyerhetősége („recovery”) [182-184]. Így a kimutatási határ meghatározása mellett érdekesnek bizonyult a visszanyerés vizsgálata is. Ez természetesen nagy biopolimer molekulák esetében érdekes, melyek hajlamosak – elsősorban porózus tölteteken – az irreverzibilis adszorpcióra.



28. ábra. Proteinek elválasztása

1. Ribonukleáz A 2. Inzulin (human) 3. Citokróm c (ló) 4. β-laktoglobulin

Mérési körülmények:

Állófázis

Mozgófázis

Gradiens

Áramlási sebesség

Hőmérséklet

Detektálás

Nyomás (indulásnál)

Injektált minta

Kovasil-MS-H

A: CH₃CN:H₂O = 20:80 + 0,05% TFA

B: CH₃CN:H₂O = 90:10 + 0,05% TFA

lineáris gradiens (6,0 perc alatt B 6% - 42% változik)

1,0 cm³/perc

25 °C

215 nm

24 MPa

1,0 µl (c = 0,25 mg/cm³)

A visszanyerés ellenőrzését egy standard protein keverék elválasztásával az irodalomban [185,186] leírtak szerint végeztük (28. ábra, 4. táblázat).

Az oszlopra 2 - 4 - 8 μl 250 ng/ μl koncentrációjú fehérje oldatokat injektáltunk. Az elemzés után kapott csúcsterületek arányosak a visszanyert anyagmennyiséggel, koncentrációval. A kalibrálást adott fehérjékből készült hígítási sorozat fotometriás meghatározásával végeztük el. A gyakorlatilag teljes visszanyerés részben magyarázza az elválasztáshoz használt állófázis hosszú „élettartamát” is (nem kötődik a felülethez irreverzibilisen minta). Ezzel a töltettel több, mint 100 elválasztást végeztünk.

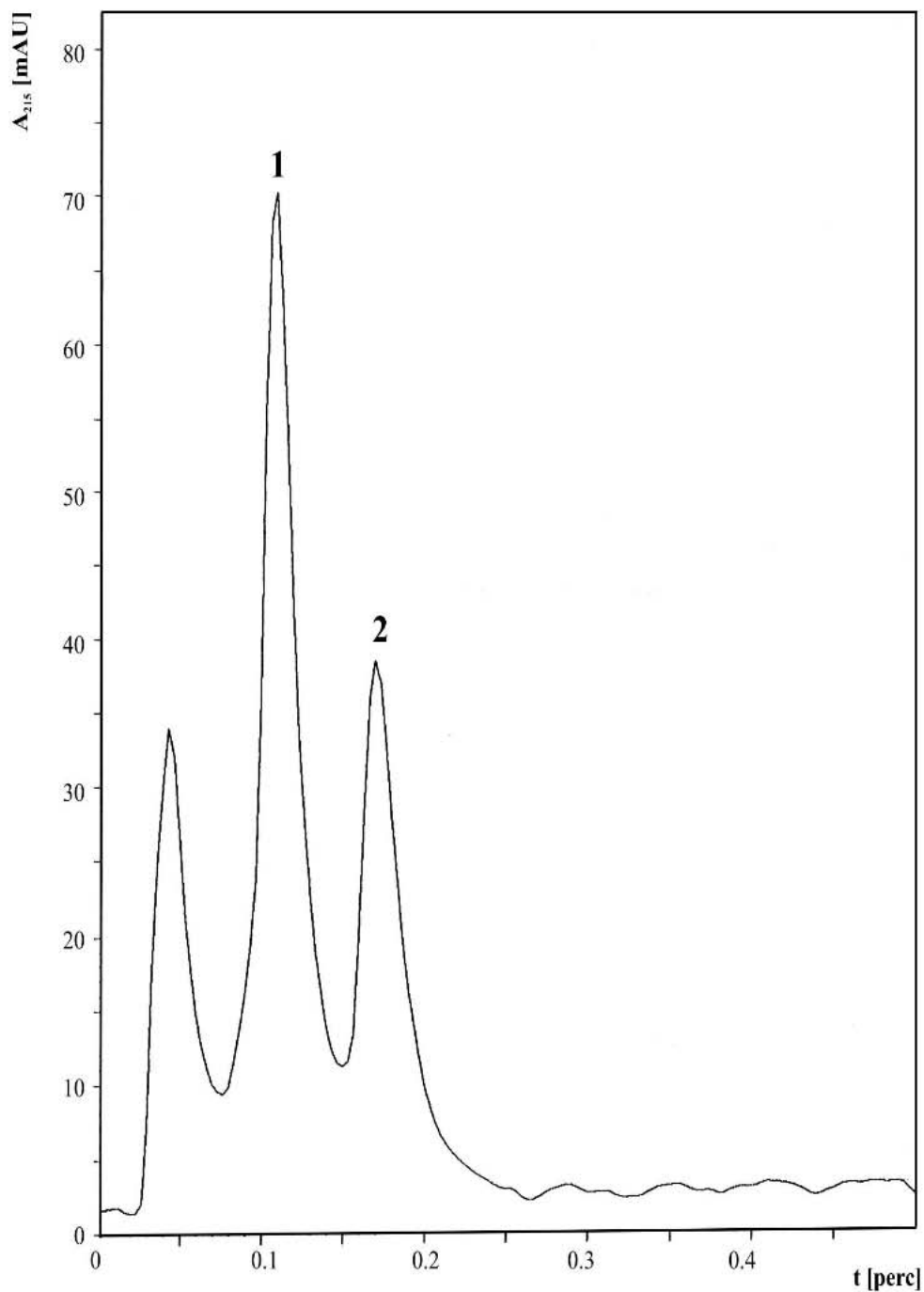
4. Táblázat: Proteinek visszanyerése

Komponensek	Visszanyerés [%]
Ribonukleáz A	105
Inzulin (humán)	96
Citokró-m-c (ló)	100
β -laktoglobulin	104

6.2.2.5 β -laktoglobulin B és β -laktoglobulin A elválasztása

A β -laktoglobulin (M ~ 18.000 Da) 162 aminosavból áll, két genetikai változatát ismerjük β -laktoglobulin A és β -laktoglobulin B. A két fehérje közötti különbség a 64. és a 48. pozícióban lévő aminosavakban van, az A változatban Asp és Val, a B változatban Gly és Ala [187,188]. A β -laktoglobulin pl. a tehéntej az egyik fő tejsavó fehérje alkotórésze, allergén anyag, szerepe még tisztázatlan. Ennek következtében meghatározása, ill. β -laktoglobulin A és β -laktoglobulin B elválasztása fontos analitikai feladat is egyben. A nagyméretű molekulák elválasztását a szokásos, 6-10 nm pórusméretű tölteteken nem sikerült megoldani, a nagyobb, 25-30 nm pórusméretű porózus tölteteken annak ellenére, hogy sikerült elkerülni egyes mintamolekulák méret szerinti kizáródását, a gyors elválasztásokat megnehezítette, szinte lehetetlenné tette a mintamolekulák részleges, irreverzibilis adszorpciója a töltet felületén [189,190].

Magas hőmérsékleten és rövid analízisidő alatt bomlástermék nem képződik, az elválasztás gyorsan elvégezhető. Az eluens alacsonyabb viszkozitása miatt magasabb áramlási sebességgel dolgozhatunk, mint szobahőmérsékleten.



29. ábra. β -laktoglobulin B (1) és A (2) elválasztása

Mérési körülmények:

Állófázis
Mozgófázis

Kovasi-MS-H

A: CH₃CN:H₂O = 10:90 + 0,12% TFA

B: CH₃CN:H₂O = 90:10 + 0,12% TFA

lineáris gradiens (6,0 perc alatt B 6% - 42% változik)

Gradiens

Áramlási sebesség

3,6 cm³/perc

Hőmérséklet

95°C

Nyomás (indulásnál)

36 MPa

Detektálás

215 nm

Injektált minta

10 μ l

Egy, több mint másfél éve használatban lévő oszlopon végeztük el a β -laktoglobulin A és β -laktoglobulin B elválasztását. Az alkalmazott kromatográfias rendszer holtterefogatát kiküszöbölendő a gradiens programot az injektálás előtt (negatív idővel) indítottuk. A kritikus elválasztáshoz 95°C hőmérsékleten 12 másodpercre volt szükség. Összehasonlítva irodalmi adatokkal [187-190] megállapítottuk, hogy az általunk kidolgozott módszerrel a nemporózus tölteten hatékony elválasztást valósítottunk meg (29. ábra).

6.3 Az anyagátadási együtthatók meghatározása

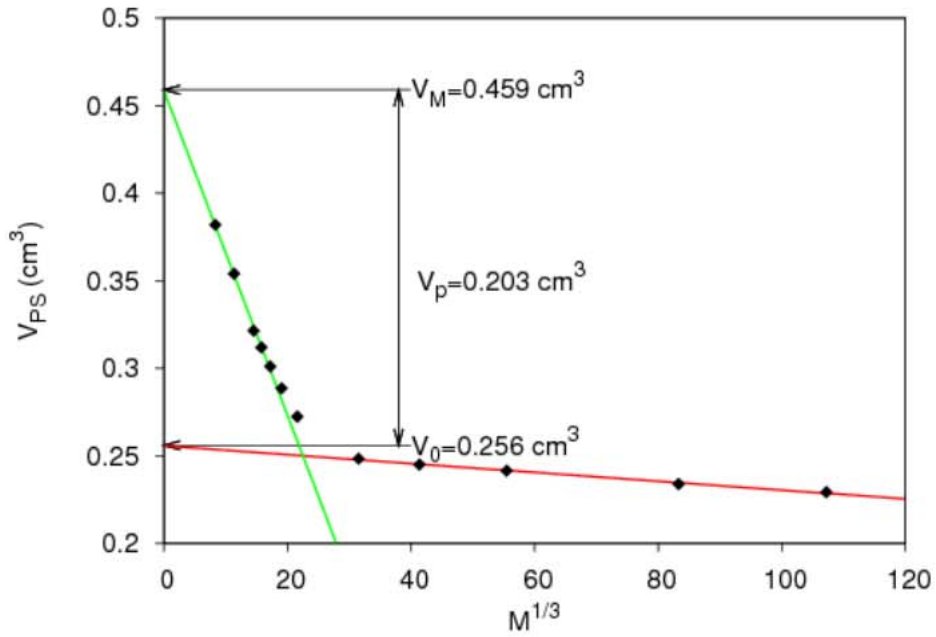
6.3.1 Térkitöltési tényező meghatározása

A méretkizárásos kromatográfia (SEC) az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a polimer vegyületek méreteloszlásának meghatározására. Az ilyen jellegű mérések során kialakuló sávszélesedés okait már a '80-as évek elején is vizsgálták [33,191]. Ismert, hogy a fordított fázisú kromatográfiában a csúcsok alakját négy független anyagátadási jelenség együttesen befolyásolja. A méretkizárásos kromatográfia során a mintamolekulák nem adszorbeálódnak az állófázison, így a sávszélesedés a mozgófázis áramában fellépő axiális diszperzió (D_L); a szemcsék felületén kialakuló külső anyagátadási gátlás (k_{ext}) és a szemcsékben kialakuló pórusbeli diffúzió (D_p) ismeretében leírható.

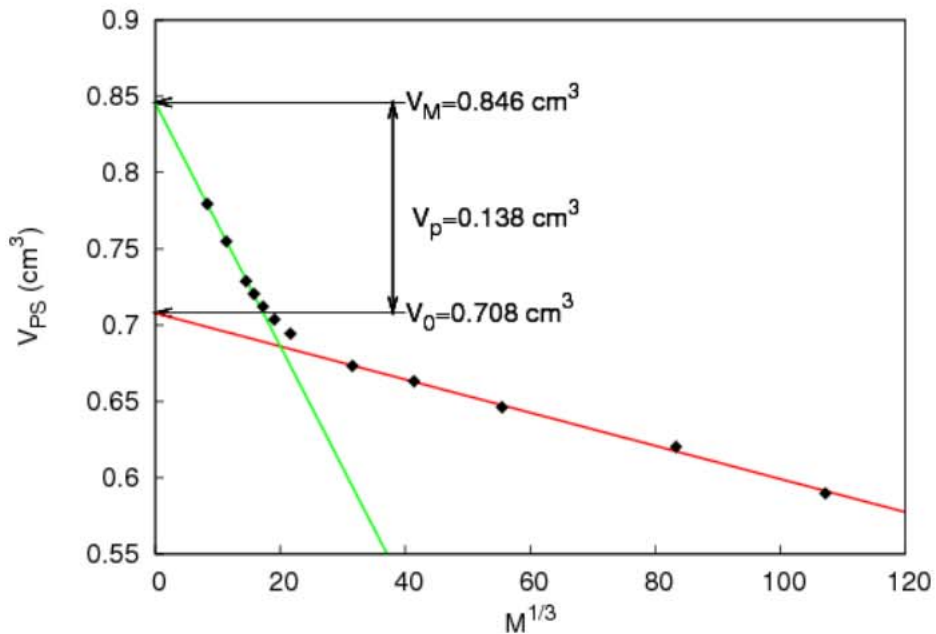
A méretkizárásos kromatográfia fordított, inverz módját az állófázisok geometriai paramétereinek meghatározására alkalmazzák [33,34,191-193]. Jól definiált méreteloszlású standard polimerek injektálása esetén a molekulatömeg függvényében változó asszimetriájú csúcsokat kapunk, amit a pórusokból való kizáródás eredményez.

A teljesen porózus és a porózus héjú állófázisok térkitöltési tényezőinek meghatározására inverz méretkizárásos kromatográfia módszerét alkalmaztam. A retenció a mintakomponensek relatív méretének függvénye.

A méréshez felhasznált polisztirolok retenciós térfogatát molekulatömegük köbgyökének függvényében ábrázoltam a 30.-31. ábrán.



30. ábra. A polisztirolok retenciós térfogata molekulatömegük köbgyökének függvényében a porózus állófázison (SunFire C₁₈ oszlopon)



31. ábra. A polisztirolok retenciós térfogata molekulatömegük köbgyökének függvényében a porózus állófázison (Halo C₁₈ oszlopon)

Az állófázis pórusaiba bejutó polimerek egy egyenesen helyezkednek el (zöld színű vonal), ill. egy másik egyenessel (piros színű vonal) jellemezhetők a pórusokból kizáródó polimerek. Az egyenesek metszéspontja által meghatározható az állófázis pórusaiba bejutó polimerek maximális mérete. A kizáródó polimerekre illesztett egyenes a térfogat tengelyen az állófázis szemcsék közötti térfogatát (V_0) határozza meg. Egy

oszlop holtterfogata (V_M) az oszlop teljes, geometriai terfogatának (V_G) az a része, melyet a mozgófázis tölt ki. A porustér fogatot (V_p) a holtterfogat és a szemcsék közötti terfogat különbségeként adjuk meg.

A teljes térkitöltési tényezőt (ε_t) és a külső térkitöltési tényezőt (ε_e) a következőképpen határoztam meg:

$$\varepsilon_t = \frac{V_M}{V_G} \quad (42)$$

$$\varepsilon_e = \frac{V_0}{V_G} \quad (43)$$

A szemcséken belüli, belső térkitöltési tényező (ε_p) az előzőek ismeretében megadható

$$\varepsilon_p = \frac{\varepsilon_t - \varepsilon_e}{1 - \varepsilon_e} \quad (44)$$

összefüggéssel.

A kapott eredményeket az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. Táblázat. A porózus és a porózus héjú állófázis geometriai paramétereinek összehasonlítása

	d (cm)	L (cm)	A (cm ²)	V_G (cm ³)	V_0 (cm ³)	V_M (cm ³)	\square_t	\square_e	\square_p
SunFire	0,30	10	0,0706	0,706	0,256	0,459	0,634	0,362	0,426
Halo	0,46	10	0,1661	1,661	0,708	0,846	0,509	0,426	0,145

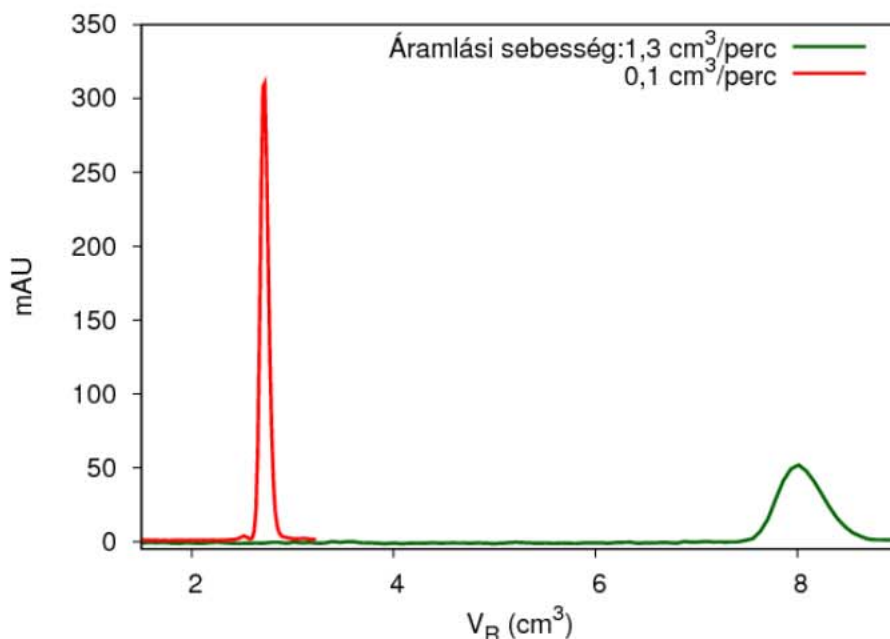
d az oszlop átmérője, L az oszlop hossza, A az oszlop keresztmetszete, V_G az oszlop teljes terfogata, V_0 a töltet szemcsék közötti terfogata, V_M az oszlop holtterfogata, \square_t a teljes térkitöltési tényező, \square_e a külső térkitöltési tényező, \square_p a belső térkitöltési tényező

A térkitöltési tényezőket összehasonlítva megállapítható, hogy a porózus állófázis teljes porozitása, teljes térkitöltési tényezője nagyobb. A belső térkitöltési tényezők esetében ez a különbség jelentősebb, ami a porózus héjú állófázis esetében a porózus héj vastagságából adódhat. A nem porózus mag miatt a diffúziós utak hossza lecsökken, ami gyorsabb anyagátadást eredményez, mint ami a porózus állófázison tapasztalható.

6.3.2 Az anyagátadási együtthatók meghatározása

A 5.4 Mérési körülmények pontban leírt feltételek mellett elvégeztem a méréseket, mindkét töltet vizsgálatánál ugyanúgy jártam el.

A 32. ábra mutatja a humán inzulin injektálása során nyert kromatogramokat porózus héjú (Halo C₁₈) tölteten. A kromatogramon a detektorjelet a retenciós térfogat függvényében ábrázoltam. A mozgófázis áramlási sebessége 0,1 cm³/perc és 1,3 cm³/perc volt.



32. ábra. Human inzulin csúcsok Halo C₁₈ állófázison

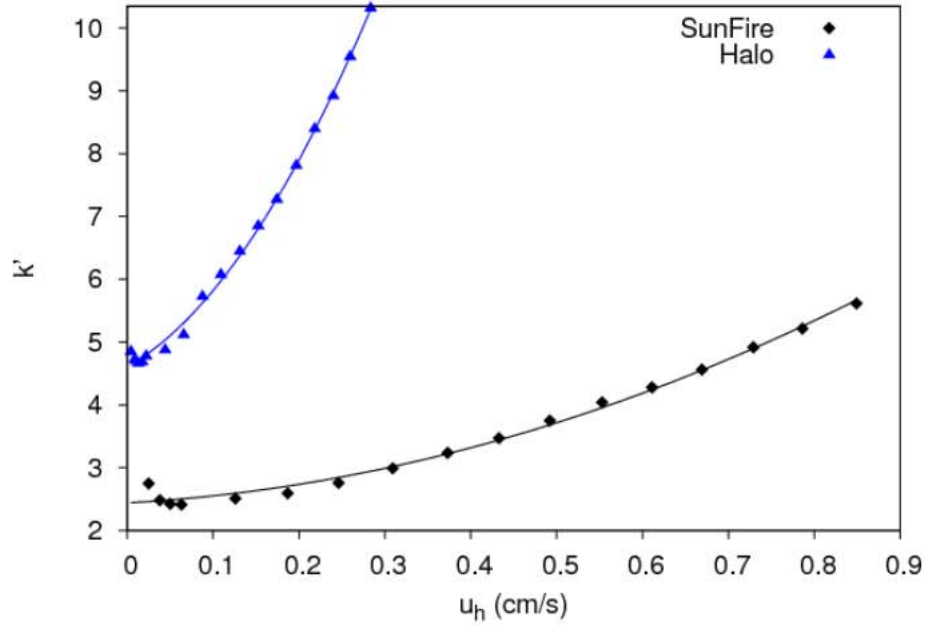
Az áramlási sebesség növelésével a csúcshélesedés szignifikáns, a retenciós tényező nő az áramlási sebesség, ill. a nyomás függvényében (33.–34. ábra).

Alacsony áramlási sebességnél az inzulin nem eluálódik lassabban, mint magasabb áramlási sebességnél, azonban retenciós térfogatát a mozgófázis áramlási sebessége erősen befolyásolja.

Porózus héjú állófázison 0,02 cm³/perc áramlási sebesség mellett az inzulin retenciós tényezője $k' = 4,85$ (33. ábra), a magasabb, 1,3 cm³/perc áramlási sebesség mellett pedig $k' = 10,31$.

A retenciós tényezőt a szabad keresztmetszeti térfogatra vonatkoztatott lineáris sebesség (u_h)– a későbbiekben (33.- 38. ábra) röviden mozgófázis sebesség – függvényében ábrázoltam.

A kis molekulák esetében nem jellemző, a fehérjék és más nagy molekulák esetében viszont megfigyelték, hogy a nyomás/áramlási sebesség erősen befolyásolja a retenciót [194-198]. A retenciós térfogatbeli különbséget az emelkedő áramlási sebesség mellett a fokozódó nyomásváltozás okozza.



33. ábra. A retenció tényező változása a mozgófázis sebességének függvényében

Az általam mért adatok az irodalomban leírtakkal jó egyezést mutatnak [194,195]. A 34. ábra is ezt mutatja; az inzulin retenció tényezője mindkét oszlop esetében az oszlopon uralkodó átlagnyomással együtt növekszik.

A retenció paraméterek és a termodinamikai mennyiségek közti összefüggés a következőképpen írható le:

$$\Delta G = -RT \ln k = -RT \ln \phi k = \Delta H - T \Delta S = \Delta E + p \Delta V_m - T \Delta S \quad (45)$$

ahol ΔG , ΔH , ΔE , és ΔS a rendszer szabadentalpia, entalpia, belsőenergia és entrópia változása; R az egyetemes gázállandó, T abszolút hőmérséklet, K adszorpciós állandó, ϕ fázisarány, k retenció tényező, p a nyomás, és ΔV_m az álló- és mozgófázisbeli parciális moláris térfogatok különbsége.

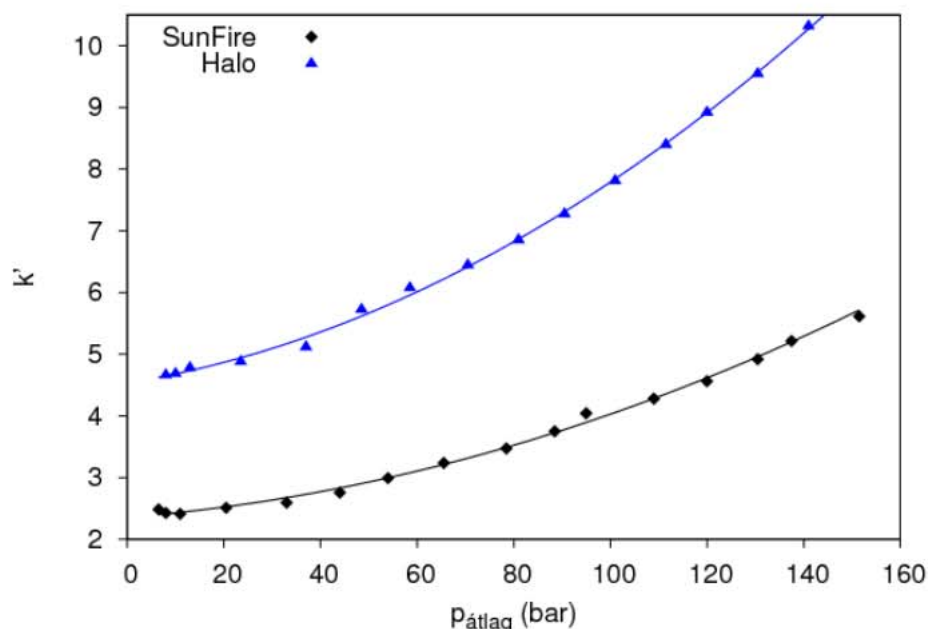
A (45) egyenletből

$$\ln k = -\frac{\Delta E}{RT} - p \frac{\Delta V_m}{RT} + \frac{\Delta S}{R} - \ln \phi \quad (46)$$

$\ln k$ nyomás szerinti első deriváltja állandó hőmérsékleten, ha az álló- és a mozgófázisbeli térfogatváltozás – a nyomásváltozástól függetlenül – állandó marad:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial p} = -\frac{\Delta V_m}{RT} \quad (47)$$

Az UHPLC elválasztás során jelentős a nyomásváltozás, itt az oszlopra a belépő nyomás eléri az 1000 bar-t. A poláris és ionizált komponensek belépve a hidrofób állófázisba elveszítik hidrátrétegüket, ennek következtében a parciális moláris térfogatok változása jelentős [175].



34. ábra. A retenció tényező változása az átlagnyomás függvényében

A hidrofób felületen lejátszódó adszorpció során a fehérjék moláris térfogat csökkenése még jelentősebb. (Pl. az inzulinmolekula adszorpciója megváltoztatja a molekula szerkezetét.) A fehérjemolekulák konformáció változása az adszorpció során (α -hélix \rightarrow β -lemez szerkezetű polipeptid láncokat tartalmazó szálakká, fibrillumokká alakul át [199]) egy olyan jól ismert jelenség, ami a hidrofób mag kialakulásához vezet [173,174].

Az inzulin retenció paramétereinek erőteljes változása az áramlási sebességgel, tehát azzal magyarázható, hogy az inzulin parciális moláris térfogata kisebb az állófázison adszorbeálódva, mint mikor a mozgófázisban oldva van. Ezért az inzulin adszorpciója magasabb nyomásokon jelentősebb, mint alacsonyabb nyomásoknál.

A kromatográfias csúcsok momentumainak meghatározása

A kromatográfias csúcsalakok meghatározására a leggyakrabban használt aszimmetrikus modellt [141], az exponenciálisan módosított Gauss-függvényt (EMG) – egy csökkenő exponenciális és egy Gauss-görbe konvolúciója – illeszttem a kromatográfias csúcsok adatsorára. A függvény nemcsak nagy pontossággal illeszthető a csúcsokra (kivételet képez néhány kis retenció idejű, nagy aszimmetriájú csúcs), hanem könnyen

belátható fizikai tartalommal is bír. A Gauss-görbét olyan hatások okozzák, mint pl. áramlás az oszlopban és az összekötő kapillárisokban. Az első rendű késleltető hatások pedig, mint pl. az injektor holttereiben vagy a detektorban történő keveredés exponenciális függvényekkel írhatók le.

Az EMG függvény a következőképpen írható fel:

$$f(t) = \frac{A}{2\tau_s} \exp\left\{\left|\frac{\sigma^2}{2\tau^2} - \frac{t-t_R}{\tau}\right|\right\} \left|1 - \operatorname{erf}\left|\frac{\sigma}{\sqrt{2}\tau} - \frac{t-t_R}{\sqrt{2}\sigma}\right|\right| \quad (48)$$

ahol A a csúcs alatti terület, t_R a csúcs retenciós ideje, σ a csúcs szélessége, τ az exponenciális tag időállandója.

Az illesztéshez a PeakFit v4.12 programot használtam.

Az EMG függvény paraméterei alapján meghatároztam a csúcsok első és második momentumát

$$\mu_1 = t_R + \tau \qquad \mu_2 = \sigma^2 + \tau^2. \quad (49) - (50)$$

Amennyiben a fizikai-kémiai paramétereket a kromatográfias csúcsok alakja alapján határozzuk meg, több csúcscsúszélesedést okozó tényezőt is figyelembe kell venni. Ilyen az állófázis hatása (μ_s), a mozgófázis hatása (μ_m) és a rendszer oszlopon kívüli térfogatának hatása (μ_{sys}). A csúcsok első és második centrális momentumát e három hatás összegeként a

$$\mu = \mu_s + \mu_m + \mu_{sys} \quad (51)$$

egyenlettel adjuk meg.

A momentumokat korigáltam az injektálás és a rendszer okozta csúcscsúszélesedés mértékével. A hozzájárulások mértékét tiokarbamid – oszloppal (μ_m) –, ill. az inzulin – oszlop nélküli (μ_{sys}) – injektálásával mértem ki. A tányérmagasság számolásához a már korigált momentumokat használtam fel.

Az általános sebességi modell alkalmazása

A modell alkalmazása során számos különböző módszer létezik az axiális diszperzió és a pórusbeli diffúzió meghatározására.

Abban az esetben, ha minden egyes mozgófázis áramlási sebességhez tartozóan az axiális diszperziót (D_L) a Gunn korrelációval (19), a külső anyagátadási együttható (k_{ext}) értékét pedig a Wilson–Geankoplis egyenlettel (23) számoljuk, valamint a pórusbeli diffúziós együtthatót (D_p) – kísérletileg meghatározott csúcsszélesség értékek felhasználásával – a (9) egyenlettel, akkor az axiális diszperziós együtthatóra (35. ábra) és pórusbeli diffúziós együtthatóra (37. ábra) a mozgófázis sebességétől függő értéket kapunk.

A számolások során a kromatográfias csúcsok momentumait korigáltam, majd (2) egyenlet alapján meghatároztam a tányémagasságot.

Kaczmarski és Guiochon [200] porózus héjú töltet esetében a (9) egyenletet korigálta:

$$H = L \frac{\mu_2'}{\mu_1^2} = \frac{2D_L}{u_h} + \frac{2u_h}{F} \frac{k_1}{k_1 + 1} \frac{r_p^2}{3k_{ext}} + \frac{r_p^2}{15D_p} R \quad (52)$$

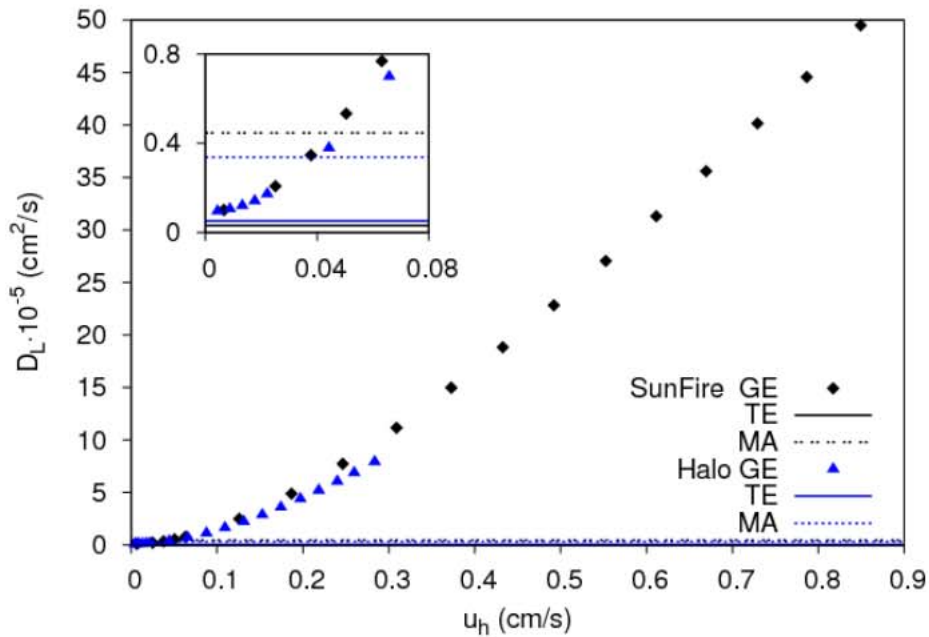
R értéke a következő egyenlettel számolható

$$R = \frac{r_p^4 + 2r_p^3 r_i + 3r_p^2 r_i^2 - r_p r_i^3 - 5r_i^4}{(r_p^2 + r_p r_i + r_i^2)^2} \quad (53)$$

ahol r_i és r_p a porózus héj belső és külső sugara.

Az általam vizsgált Halo C₁₈ töltetre $R = 0,588$, a teljesen porózus töltetek esetében pedig $R = 1,000$.

Axiális diszperzió meghatározása



35. ábra. Az inzulin axiális diszperziós együtthatója a mozgófázis sebességének függvényében

[A Gunn egyenlettel (GE), a Tányérmagasság egyenlettel (TE) és Momentum analízissel (MA) számolva]

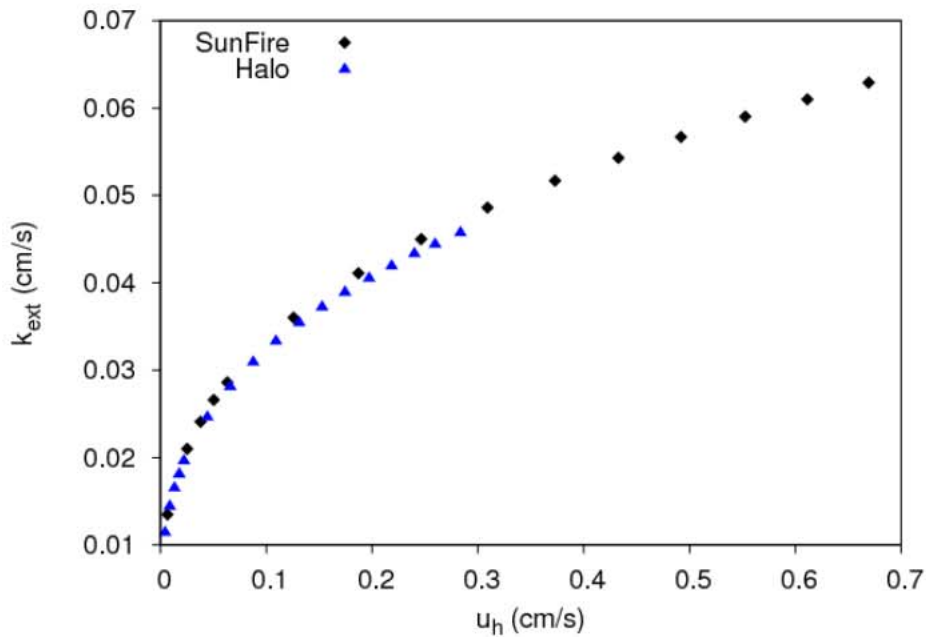
A Gunn-egyenlettel a teljes – 0,02 - 1,3 cm³/perc – áramlási sebesség tartományban minden egyes sebességhez meghatároztam az axiális diszperzió értékét. A kapott eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. Táblázat. Az inzulin axiális diszperziós együtthatói (D_L , cm²/s).

SunFire	Halo
$1,00 \cdot 10^{-6} - 4,95 \cdot 10^{-4}$	$9,51 \cdot 10^{-7} - 7,91 \cdot 10^{-5}$

Külső anyagátadási állandó meghatározása

A Wilson-Geankoplis-korreláció (23 egyenlet) a külső anyagátadási állandó meghatározására általánosan alkalmazott összefüggés. A külső anyagátadási állandót, k_{ext} -et a (23) egyenlettel a Reynolds-szám, a Schmidt-szám és a molekuláris diffúzió ismeretében a (21) egyenlet alapján kiszámolt Sherwood-szám segítségével meghatároztam. Az áramlási sebesség emelésével k_{ext} értéke növekszik, mivel csökken az állófázis szemcséit borító folyadékfilm rétegvastagsága.



36. ábra. A külső anyagátadási állandó a mozgófázis sebességének függvényében

□

A külső anyagátadási állandó (k_{ext}) értékek a Wilson-Geankoplis-korrelációval (23 egyenlet) számolva $1,1 \cdot 10^{-2}$ - $6,8 \cdot 10^{-2}$ cm/s tartományba esnek – a vártnak megfelelnek (az értékek a mozgófázis sebességétől erősen függenek), és az irodalmi adatokkal jó egyezést mutatnak [139].

Az állófázisok külső anyagátadási állandóinak (k_{ext}) értéke eltér. Ez az eltérés, ami a különböző méretű részecskéknek köszönhető, azonban elhanyagolható.

Megállapítottuk tehát, hogy az inzulin esetében a külső anyagátadási együttható hozzájárulása a sávszélesedéshez elhanyagolható, a legfontosabb sávszélesedést okozó tényező a pórusbeli diffúzió. □

□

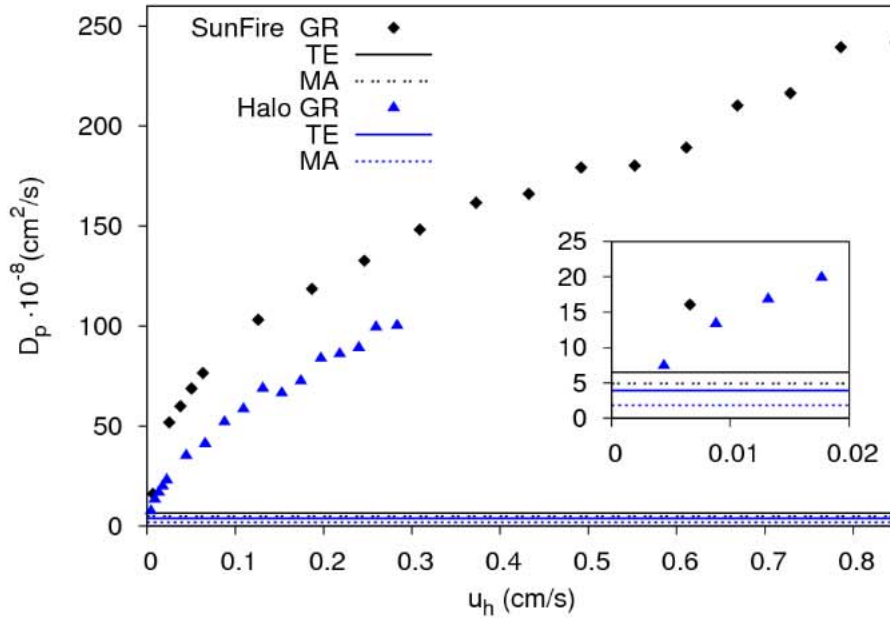
□

Pórusbeli diffúziós együttható meghatározása

Az állófázis pórusaiban a folyadék fázis nem áramlik, és a mintamolekulák különböző irányú diffúzióval jutnak át az állófázis pórusrendszerén, a diffúziók összegződnek, együttesen határozzák meg a pórusbeli diffúziós együtthatót.

A pórusbeli diffúzió a sávszélesedés egyik lehetséges oka. A sávszélesedéshez való hozzájárulás D_L és a k_{ext} ismeretében kiszámolható. A (10) egyenletből kiszámítottam a pórusbeli diffúzió hozzájárulását a tányémagassághoz, és a (13) egyenlettel meghatá-

roztam az állandó értékét minden egyes áramlási sebesség mellett (39. ábra és 7. táblázat).



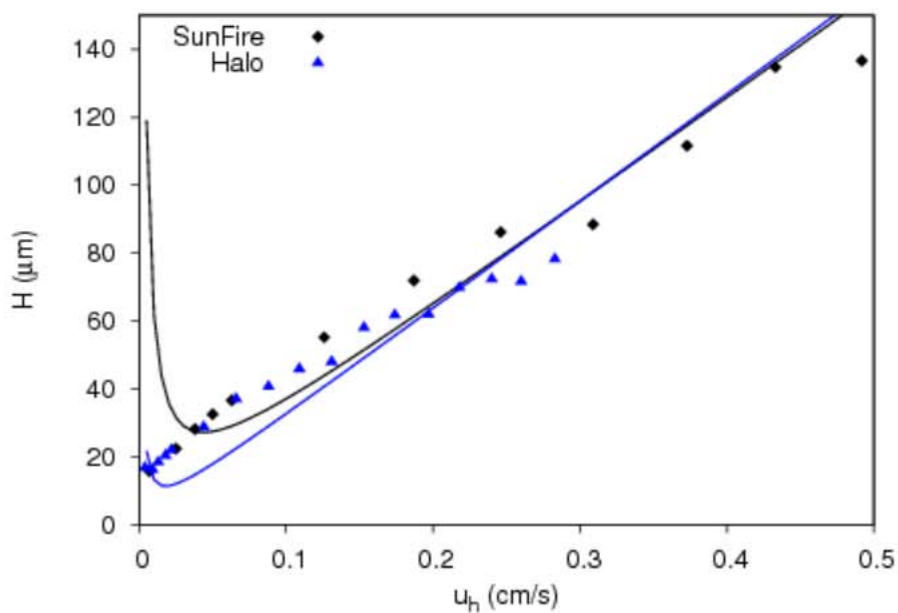
37. ábra. Az inzulin pórusbeli diffúziós együtthatója a mozgófázis sebességének függvényében
[Általános sebességi (GR) modell, Tányérmagasság egyenlet (TE) és a Momentum analízis (MA) alapján]

7. Táblázat. Az inzulin pórusbeli diffúziós együtthatói (D_p , cm^2/s)

SunFire	Halo
$1,61 \cdot 10^{-9} - 2,39 \cdot 10^{-8}$	$7,41 \cdot 10^{-10} - 1,00 \cdot 10^{-8}$

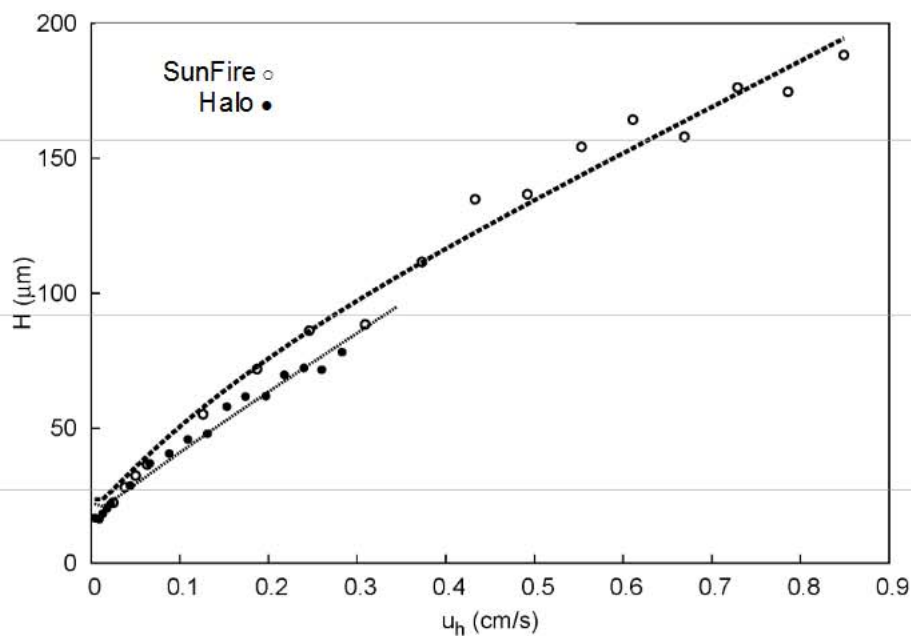
A van Deemter-egyenlet alkalmazása

Az anyagátadási együtthatókat a van Deemter-egyenlet illesztésével is megkaphatjuk. A komponensek csúcsainak momentumait a rendszer oszlopon kívüli térfogatával (μ_{sys}) korrigálva számítottam ki a tányérmagasságot.



38. ábra. Tányérmagasság a mozgófázis sebességének függvényében
 [A jelek mért, a vonalak illesztett adatok van Deemter egyenlet szerint (25)]

Mivel az általános sebesség modell tányérmagasság egyenlete nem tartalmazza az A együtthatót, az anyagátadási együtthatók meghatározásához a kromatográfiai folyamatokban szereplő fizikai-kémiai jelenségekről a B/u_h és a Cu_h tagból nyerhető információ. A 38. ábrán a kísérleti adatok alapján számolt tányérmagasság értékeket ábrázoltam mindkét állófázis esetében, a mérési pontokra a (25) egyenletet illesztettem.



39. ábra. Tányérmagasság a mozgófázis sebességének függvényében
 [A jelek mért, a vonalak illesztett adatok]

