

Fordított fázisú HPLC-s kolonnák általános jellemzésére és pontos helyettesítőjük megtalálására szolgáló eljárások

(Ajánlott olvasmány a Műszeres analitika laboratóriumi gyakorlat HPLC fejezetéhez)

Dr. Lázár István

Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

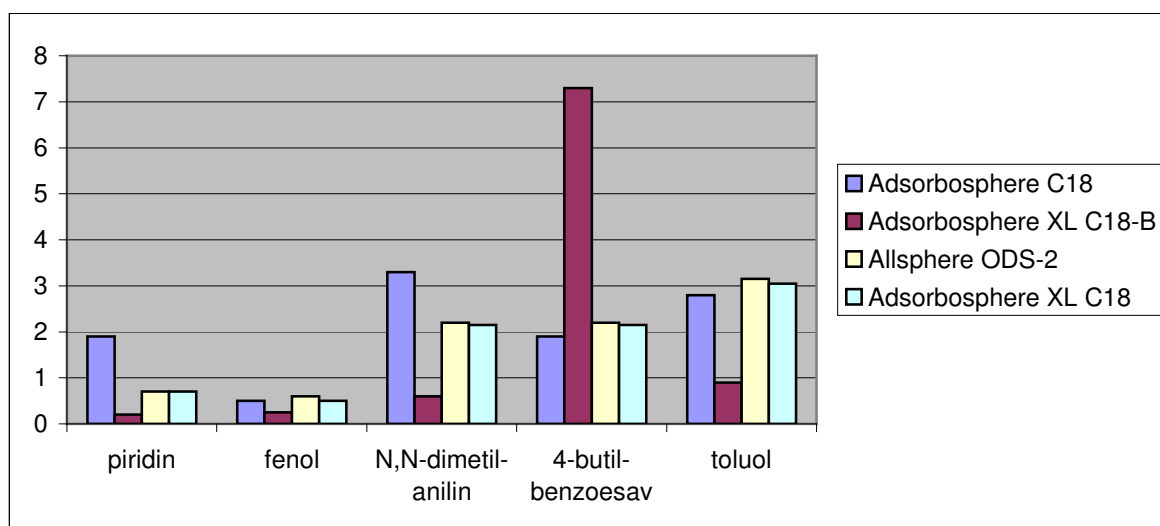
2004. szeptember 12.

A legszélesebb körben használt gyakorlat szerint egy adott kolonna helyettesítőjének a megkeresése során a geometriai paraméterek (hossz, átmérő) megegyezésén túl a legegyszerűbb esetben az állófázis hordozójának anyagát, a részecskék méretét, a részecskék alakját (szabálytalan szemcsék vagy mikrogömbök), átlagos pórusméretét, az állófázis fajlagos felületét, a százalékos széntartalmát és az állófázis típusát (monomer vagy polimer) hasonlítják össze, valamint azt, hogy a szilanolcsoportok véglezártak-e, vagy sem. Ezt a gyakorlatot követve az 1. táblázatban felsorolt véglezárt C18-as kolonnák egymás jó közelítéssel megfelelő helyettesítői kell legyenek (kiragadott példánkban minden kolonna az Alltech terméke):

1. táblázat

töltet neve	hordozó	alak	méret (μ)	C%	pórusméret (Å)	fajl.fel. (m^2/g)	fázis	véglezárt
Adsorbosphere C18	szilika	gömb	5	12	80	200	monomer	igen
Adsorbosphere XL C18-B	szilika	gömb	5	12	90	200	monomer	igen
Allsphere ODS-2	szilika	gömb	5	12	80	220	monomer	igen
Adsorbosphere XL C18	szilika	gömb	5	11	90	200	monomer	igen

Ha megnézzük azonban ezeknek a kolonnáknak a teljesítményét valós körülmények között, akkor azt tapasztaljuk, hogy az öt kiválasztott standard esetén a kísérletileg meghatározott kapacitásfaktorok két esetben drámaian eltérnek, míg két esetben közelítőleg egyenlőek. A grafikon alapján az utolsó két kolonnát tudnánk egymással megfelelően helyettesíteni, míg a másik két, látszólag azonos kolonna tulajdonságai nagyon számottevően különböznek.



1. grafikon

A csúcsalakok torzulását figyelembe véve is megerősíthető az utolsó két kolonna hasonlósága, mert mindkettő tailinges csúcsot ad piridin, N,N-dimetil-anilin és 4-butyl-benzoic acid (azaz mind savas,

mind bázikus standardok) esetén. A különbség a másik kettő kolonna esetén ebben a vonatkozásban is kitűnik, hiszen az első piridin és N,N-dimetil-anilin (azaz a bázikus standardok) esetén, míg a második kolonna a 4-butil-benzoészav (azaz savas standard) esetén ad tailing csúcsot.

Az eddigiek alapján nyilvánvaló, hogy az előbbi választási módszer nem használható arra, hogy egy bizonyos kolonnának a pontos helyettesítőjét megtaláljuk.

Mindezeket túl nem árt ha tudjuk, hogy még abban az esetben is jelentkezhetnek kisebb eltérések, ha hosszú időn keresztül mindig ugyanattól a gyártótól származó, ugyanolyan töltetet tartalmazó kolonnát vásárolunk. Ennek az az oka, hogy még a legmodernebb gyártási technológia esetén is előfordul bizonyos fokú ingadozás a termék tulajdonságaiban. Példaként említhetjük a Hypersil BDS C18-as töltetét, amely esetén megadott standardok esetén mérve a hat év során készített 76 reakcióból származó terméket $\pm 6\%$ ingadozás volt tapasztalható a szelektivitásban, a C% pedig 10,7–11,9% között változott.

Helyettesítő kolonna keresése táblázatok segítségével

A gyakorlatban felmerült kolonnaválasztási, helyettesítési nehézségek miatt szükségünk van olyan eljárásra, amely segítségével egy megadott gyártó megadott állófázissal töltött kolonnájának gyorsan megtalálhatjuk a legközelebbi helyettesítőjét. A probléma megoldására számos eljárást dolgoztak ki, a módszerek egy része valamilyen standardok sorozatát használja.

Ilyen eljárás során sokféle standardból összeállított sorozatot használhatnak, például az 1. grafikon készítéséhez is használt, öt standardot tartalmazó sorozatot, amelynek a tagjai: piridin, fenol, N,N-dimetil-anilin, 4-butyl-benzoésav, toluol. A gyakorlatban kísérletileg meghatározzák az egyes standardok futtatása után a kapacitásfaktorokat, majd egyes HPLC termékekre specializálódott kromatográfiai katalógusokban (pl. Alltech) megtalálható táblázatokból megkeresik a tuéajdonságaiban legközelebb álló kolonnát az ott megadott szabályok felhasználásával. Ezek a szabályok egyszerűek, példaként álljanak itt a fenti standardsorozat alkalmazása esetén követendő kiválasztási lépések: Elsőként megkeresik azokat a kolonnákat, amelyek a toluol esetén az általunk mért értékhez a legközelebb állnak, majd a találtak között megkeresik azokat a kolonnákat, amelyek esetén a poláris komponensek elúciós sorrendje megegyezik, ezután pedig a választást tovább szűkítik azokra, amelynél a poláris komponensek kapacitástényezői is a legközelebb állnak. Végül ellenőrzik, hogy ugyanazon standardok esetén ad-e a helyettesítő kolonna tailinges csúcsot, vagy pedig nem. A retenciós idők hasonlóságának biztosítására a legvégén még ellenőrzik az uracillal mért holtidők azonosságát.

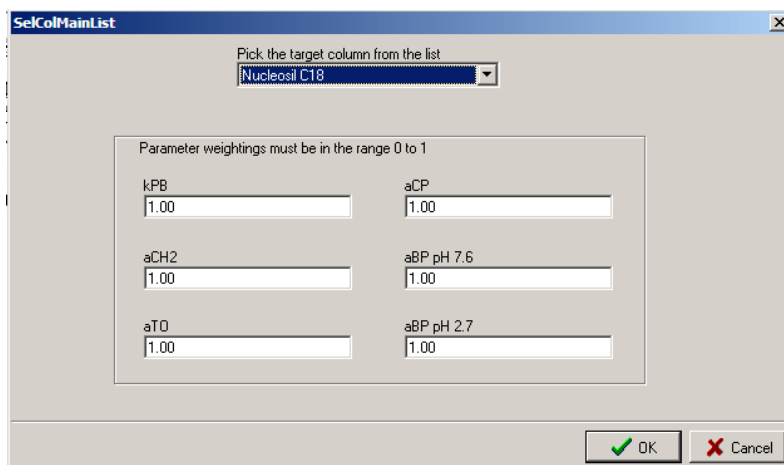
A táblázatos módszerek másik csoportjában nem található meg a fenti adatok, hanem az adott terméksorozat előállító cég egy teljes vagy részleges egyezési listát ad meg, amely alapján eldönthetjük, hogy a jelenlegi kolonnánk az adott cég melyik termékével helyettesíthető (teljesen vagy részlegesen).¹ Mivel ilyen esetben gyakran nem tudjuk, hogy az ekvivalencia megadása milyen mérések alapján történik, így rajtunk áll, hogy megbízunk-e az állításban, vagy pedig nem. Gyakran az egyezést úgy bizonyítják, hogy egymás mellett feltüntetik az azonos körülmények között felvett kromatogramokat.

¹ Vannak gyártók, amelyek visszavásárlási garanciát adnak azon termékeikre, amelyeket tökéletes helyettesítőként forgalmaztak, és mégsem tudta teljesíteni valamilyen vegyületcsalád esetén az elvárásokat.

Helyettesítő kolonna keresése számítógépes módszerrel

Az utóbbi időben egyre inkább terjednek azok az eljárások, amelyeknél megadott standardsorozat futtatásával kapott retenciós paramétereket kemometriai² eljárással elemezzük, és az eredmények felhasználásával megkísérelnek olyan valódi kémiai jelentéssel bíró általános tulajdonságokat hozzárendelni a töltetanyagokhoz, mint a felületborítottság mértéke, az ioncserélő kapacitás, a szabad szilanolcsoportok aránya, stb. Ezeknek az új eljárásoknak azért van különösen nagy jelentősége, mert az Európai Gyógyszerkönyv a gyógyszerkészítmények tisztasági vizsgálatára és a hatóanyagtartalom meghatározására HPLC-s elemzést ír elő, a kolonna megadásánál azonban csak arra kénytelen szorítkozni, hogy pl. C18-as fordított fázisú kolonna legyen, megadott körülmények között. Amennyiben sikerülne általánosan elfogadott jellemzőket találni, úgy a mérési körülmények sokkal pontosabb megadására lenne mód, aminek eredményeképpen pl. a szennyezők meghatározása sokkal nagyobb biztonsággal lenne elvégezhető, a mérések pedig nehézség nélkül átültethetők lennének különböző gyártmányú kolonnákra.

A továbbiakban egy 2003-ban megjelent tudományos közlemény alapján olyan eljárást ismertetünk, amely lehetőséget ad a kromatográfusnak arra, hogy az általa használt kolonna helyettesítőjét egy egyszerűen használható, ingyenes és mindenki számára hozzáférhető számítógépes program segítségével könnyen és hatékonyan megtalálhassa.



1. ábra A kolonna-helyettesítő keresése ebben az egyszerű párbeszédablakban indítható el. Amennyiben tudjuk, hogy a hat kiválasztható paraméter közül az elválasztásunk szempontjából melyiknek van nagyobb és kisebb jelentősége, úgy a kis jelentőségű paraméterek súlyát a kiválasztás során a szorzótényező 0,00-1,00 közötti beállításával módosíthatjuk.

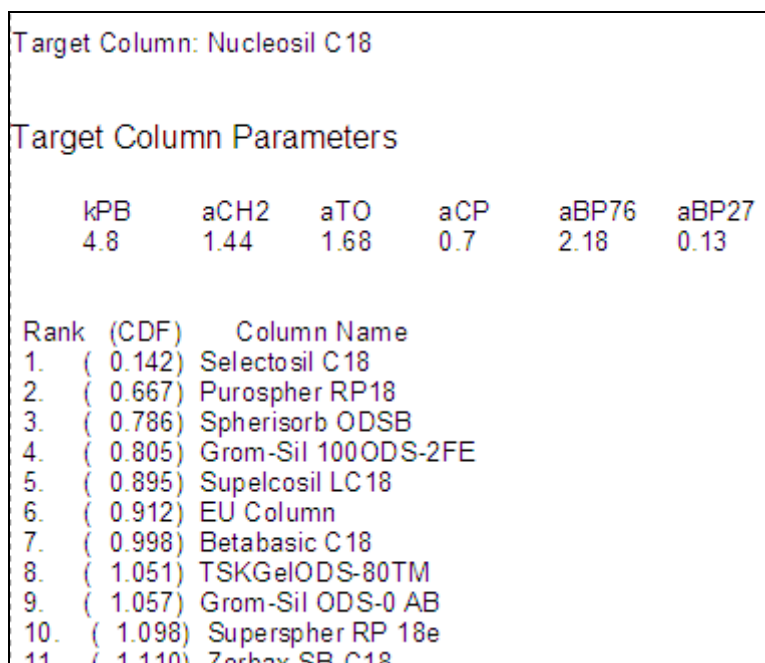
Az irodalomjegyzékben megadott cikkben leírt vizsgálatok eredményei alapján hat kromatográfiai paramétert lehet kísérletileg meghatározni ahhoz, hogy az általunk kiválasztott kolonna

² (kemometria = nagyszámú kémiai adat rejtett összefüggéseinek számítógépes program segítségével történő elemzése)

helyettesítőjének megkereséséhez nem csak az ACD Labs honlapjáról ingyenesen letölthető³ *ChemSketch 5.0* kémiai rajzoló-számoló-modellező programjának a kolonnaválasztó kiegészítő modulját használhassuk, hanem saját magunk is készíthessünk mások által használható kolonnajellemzőket.

FIGYELEM! Magának a *ChemSketch* programnak és a kolonnaválasztó modulnak a használata nem igényel méréseket, csupán a használt kolonna nevét kell kiválasztanunk a megjelenő ablakban, így a módszer mindenki számára azonnal használható! (1. ábra).

A paramétereket tartalmazó ablakokban beállíthatjuk, hogy milyen jelentőséget tulajdonítunk az egyes paramétereknek, amelyek jelentését a következő részben tárgyaljuk. Az 1.00-ás súlyfaktor azt jelenti, hogy az a paraméter nagyon fontos a kiválasztás szempontjából, míg a 0.00-ás súlyfaktor azt jelenti, hogy annak a paraméternek a szerepe az elválasztásunk szempontjából teljesen lényegtelen. Ha minden szempontot egyformán fontosnak tartunk, vagy nem tudjuk, hogy mi fontos és mi nem az, akkor hagyjuk meg az eredeti értékeket. Jelenlegi formájában az adatbázis mintegy száz kolonna adatait tartalmazza. A program futása egy több oldalas rangsorolt listát eredményez (annak egy részlete látható a 2. ábrán)



Target Column: Nucleosil C 18

Target Column Parameters

kPB	aCH2	aTO	aCP	aBP76	aBP27
4.8	1.44	1.68	0.7	2.18	0.13

Rank	(CDF)	Column Name
1.	(0.142)	Selectosil C 18
2.	(0.667)	Purospher RP18
3.	(0.786)	Spherisorb ODSB
4.	(0.805)	Grom-Sil 100 ODS-2FE
5.	(0.895)	Supelcosil LC 18
6.	(0.912)	EU Column
7.	(0.998)	Betabasic C 18
8.	(1.051)	TSKGel ODS-80TM
9.	(1.057)	Grom-Sil ODS-0 AB
10.	(1.098)	Superspher RP 18e
11.	(1.110)	Zorbax SB-C18

2. ábra A kolonnaválasztó modul által szolgáltatott rangsorolt eredménylista első néhány sora. Minél kisebb a CDF értéke, annál nagyobb a hasonlóság a két kolonna között.

A program lehetőséget nyújt arra is, hogy két kolonna paramétereit saját magunk is összehasonlíthassuk.

³ <http://www.acdlabs.com/download/>

Fordított fázisú kolonnák jellemző paramétereinek meghatározása

A továbbiakban azokat az eljárásokat adjuk meg, amelyek segítségével saját magunk is meghatározhatjuk az egyes kolonnák jellemzőit. Az egyes paraméterek jelentése a következőkben olvasható.

Retenciós faktor pentil-benzol esetén, k_{PB}

A felület nagyságának és a felület borítottságának a mértéke (ligandumsűrűség).

Kromatográfiai körülmények: MeOH-H₂O (8:2, v/v), 1.0mL/min, 40°C, 5μL térfogatú metanolos pentil-benzol oldatot injektálunk (0.6μg/mL). Az injektált mennyiségek és az áramlási sebességek 4.6 mm belső átmérőjű kollonákra vonatkoznak. A holtidőt a tiszta metanol injektálásakor az alapvonalon jelentkező legelső zavarjelhez rendeljük hozzá.

Hidrofobicitás vagy hidrofób szelektivitás, a_{CH2}

A pentil-benzol és a butil-benzol retenciós faktorainak hányadosa, azaz

$$a_{CH2} = k_{PB}/k_{BB}$$

az állófázis felületborítottságának a mértéke, mivel az alkil-benzolok – amelyek csak egy CH₂ csoportban különböznek – közötti szelektivitás a ligandumsűrűségtől függ.

Kromatográfiai körülmények: ugyanazok, mint a k_{PB} meghatározásánál, kivéve azt, hogy a pentil-benzolt (0.6μg/mL) és a butil-benzolt (0.3μg/mL) külön-külön injektáljuk.

Alakszelektivitás, $a_{T/O}$

A trifenilén és az o-terfenil retenciós faktorának hányadosa, azaz

$$a_{T/O} = k_{T}/k_{O}$$

az alakszelektivitás mértéke, ami a ligandum térkitöltésétől és a szililező reagens alakjától/funcionalitásától függ.

Kromatográfiai körülmények: ugyanazok, mint az *aCH2* meghatározásánál, kivéve hogy az o-terfenil és trifenilén oldataiból 5–5 μ L-t injektálunk, mindkettőből 0.05mg/mL koncentrációban.

Hidrogénkötő kapacitás, *aC/P*

A koffein és a fenol retenciós faktorainak a hányadosa, azaz

$$aC/P = kC/kP$$

a hozzáférhető szilanolcsoportok számának és a véglezárás fokának a mértéke.

Kromatográfiai körülmények: MeOH-H₂O (3:7, v/v), 1.0ml/min, 40°C, külön-külön injektálunk 5 μ L fenol- (1mg/mL) and koffein-oldatot (0.5mg/mL).

Teljes ioncserélő kapacitás, *aB/P pH 7.6*

A benzilamin és a fenol retenciós faktorainak hányadosa pH=7,6 értéken, azaz

$$aB/P \text{ pH } 7.6 = kB/kP$$

a szilanol csoportok által okozott teljes ioncserélő aktivitás mértéke.

Kromatográfiai körülmények: 20mM KH₂PO₄, a pH-t 7.6-re állítjuk, MeOH-H₂O (3:7, v/v), 1.0mL/min, 40°C, külön-külön injektálunk 5 μ L-t a fenol és a benzilamin-hidroklorid 0.5mg/mL-es oldatából.

Savas ioncserélő kapacitás, *aB/P pH 2.7*

A benzilamin és a fenol retenciós faktorainak hányadosa pH=2.7 értéken, azaz

$$aB/P \text{ pH } 2.7 = kB/kP$$

a szilanol csoportok savas körülmények közötti ioncserélő aktivitásának mértéke.

Kromatográfiai körülmények: ugyanazok, mint a teljes ioncserélő kapacitás mérésénél, kivéve, hogy a KH₂PO₄ puffer pH-ját 2,7-re állítjuk.

Számítási módszerek

A kromatográfias kolonnaválasztó program a fenti hat paramétert használja és 135 kromatográfias kolonna adatait tartalmazza. Az összes kolonnára ismertek a középértékek (μ) és a sztenderd deviáció (SD) értékei. Minden egyes kolonnára minden paraméter esetén kiszámították a normalizált értékeket (x_{n1} -től x_{n6} -ig, $x_{n_x} = (x_x - \mu_x)/SD$, ahol x_x a paraméter nyers értéke. A kolonnakülönbözőségi tényezőt (column difference factor, CDF) a többdimenziós euklideszi geometria szabályai szerint számítjuk a kiválasztott kolonna és a többi kolonna között. Minél kisebb a CDF értéke, annál hasonlóbb egymáshoz a két kolonna.

$$CDF = \text{SQRT}[(x_{n1}-x_{n1})^2 + (x_{n2}-x_{n2})^2 + (x_{n3}-x_{n3})^2 + (x_{n4}-x_{n4})^2 + (x_{n5}-x_{n5})^2 + (x_{n6}-x_{n6})^2]$$

ahol $x_{n1} - x_{n6}$ a kiválasztott kolonnánk esetében a hat kromatográfias paraméter normalizált értékei, SQRT pedig a négyzetgyökvonást jelenti.

Elvégzendő mérések

Az általunk kiválasztott kolonnával a következő méréseket kell elvégezni:

A táblázatban megadott 7 standardból készíteni kell 8 ismert koncentrációjú injektálható törzsoldatot, készíteni kell 4 megadott összetételű eluenst (metanol, víz, KH_2PO_4 , pH állításához KOH és H_3PO_4), és el kell végezni összesen 11 futtatást, meghatározni a retenciós időket, majd kiszámítani a standardokra vonatkozó retenciós faktorokat, azok felhasználásával pedig a programbeli összehasonlításhoz használt hat paramétert.

injektált standard neve	standard koncentrációja/oldószer	minta térf. (μl)	eluens	áraml. seb. (ml/perc)	hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$)	mérendő paraméter	kapacitás vagy szelektivitás számítása
metanol	100%/metanol	5,0	MeOH-H ₂ O (8:2, v/v)	1,00	40	holdidő	t_0
pentil-benzol	0.6 $\mu\text{g/ml}$ metanol	5,0	MeOH-H ₂ O (8:2, v/v)	1,00	40	retenciós idő	kPB
butil-benzol	0.3 $\mu\text{g/ml}$ metanol	5,0	MeOH-H ₂ O (8:2, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aCH2

trifenilén	0.05 mg/ml	5,0	MeOH-H ₂ O (8:2, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aT/O
o-terfenilén	0.05 mg/ml	5,0	MeOH-H ₂ O (8:2, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aT/O
koffein	0.5 mg/ml	5,0	MeOH-H ₂ O (3:7, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aC/P
fenol	1.0 mg/ml	5,0	MeOH-H ₂ O (3:7, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aC/P
fenol	0.5 mg/ml	5,0	20mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.6, MeOH-H ₂ O (3:7, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aB/P pH 7.6
benzil-amin	0.5 mg/ml	5,0	20mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.6, MeOH-H ₂ O (3:7, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aB/P pH 7.6
fenol	0.5 mg/ml	5,0	20mM KH ₂ PO ₄ , pH 2.7, MeOH-H ₂ O (3:7, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aB/P pH 2.7
benzil-amin	0.5 mg/ml	5,0	20mM KH ₂ PO ₄ , pH 2.7, MeOH-H ₂ O (3:7, v/v)	1,00	40	retenciós idő	aB/P pH 2.7

Irodalom

Euerby, MR; Petersson, P. "Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis." *J. Chromatogr. A* **2003**; 994: 13-36.