

A gyors folyadékkromatográfia jelenlegi lehetőségei

FEKETE Jenő^{a*} és FEKETE Szabolcs^b

^aBME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék 1111. Budapest, Szent Gellért tér 4.

^bPost-doctorant, Université de Genève Pavillon des Isotopes - I-3

1. Bevezetés

A folyadékkromatográfia hosszú ideig csipkerózsika álmát aludta. Az 1970-es évek közepére alakult ki a műszerezettség. Ez a műszerezettség visszatükrözte az arra az időre elért eredményeket a kolonnatechnológia területén. Ekkora már megjelentek a 10 µm szemcseátmérőjű töltetek, a szabálytalan alakú szilikagél helyét fokozatosan átvették a szabályos, gömbszimmetrikus töltetek. A kolonna méreteket tekintve uralkodóvá a 15 és 25 cm hosszú és 4,6 mm belsőátmérőjűek váltak. A folyadékkromatográfia műszerezettségét is ezekhez igazították. Ennek megfelelően az adagolási térfogat 10-100 µl közé esett, az UV, UV-VIS detektorok cellatérfoga 10 µl, az összekötő vezetékek belső átmérője 0,25 mm. Az így kialakított készülék alapjaiban teljes mértékben megfelelt a követelményeknek. Hosszú ideig csak a számítógépes vezérlés és adatgyűjtés jelentette a fejlesztést. Ez a rendszer a gyógyszeripar fő analitikai módszerévé vált. A technikát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiának nevezték el (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). A kolonna töltetek, amelyek döntő többségét a szilikagél alapúak jelentették, viszont nagy fémion tartalmúak voltak, a nagy szilanolcsoport aktivitás és a kis borítottságuk miatt számos feladat megoldásnál nehezen reprodukálhatóvá tették a módszereket. Sokszor sarzsról-sarzsra változott a kolonnák felületi fizikai-kémiaja és ez visszaköszönt az elválasztásokban is. Ekkor a fő feladatot a kolonnatechnológia fejlesztése jelentette.

Kisebb fémion tartalmú, kisebb szilanolcsoport aktivitású, jól borított állófázisok és sarzsról-sarzsra való azonosság jelentették a fő célokat. A 90-es évek végére a 2000-es évek elejére, a kolonnatechnológia területén sikerült a fő célokat elérni, sőt megjelentek az 5 µm alatti szemcseátmérőjű töltetek, először a 3 µm-esek majd napjainkra, a 2 µm-esek és az alatti szemcseátmérőjűek is. A kis csúcshélesség, amelyet a kis szemcseátmérőjű töltetekkel lehet elérni, jelentősen megnövelte a technika hatékonyságát. Értve ez alatt, hogy kis szerkezeti különbségű anyagokat lehetett rövid idő alatt elválasztani, egységnyi idő alatt viszonylag nagyszámú mintát lehetett elemezni, megnőtt a kolonna csúcshélesség kapacitása. Hagyományos HPLC technikánál a felső nyomás határ, a készülék maximális teljesítménye 400 bar. Ma amikor HPLC-ről beszélünk ezzel a műszerezettséggel működő folyadékkromatográfias rendszert értjük alatta. Ezt a műszerezettséget alkalmazva az elemzési idő általában 5-60 perc közé esett, az elválasztásokban tapasztalt csúcshélességek nagyok voltak. Adva volt ezzel a fő feladat, csökkenteni a kromatográfias csúcsok szélességét, azaz növelni a kinetikai hatékonyságot. A megoldásra több út kínálkozott, az egyik csökkenteni a kolonna szemcseméretet, a másik növelni a hőmérsékletet, a harmadik pedig új, nagyobb permeabilitású kolonnákat

készíteni. Ez a harmadik megoldás vezetett el egyrészt a monolit kolonnához, másrészt a héjszerű töltetek bevezetéséhez. Ennek az összeállításnak is középpontjába ezek az új kolonnatechnológiák állnak: nevezetesen a 2 µm szemcseátmérő alatti teljesen porózus, a 3 µm szemcseátmérő alatti héjszerű töltetek, kiegészítve a gyorsfolyadékkromatográfia nagyhőmérsékletű ágával. A 2 µm teljesen porózus, a 3 µm szemcseátmérő alatti héjszerű töltetek, a monolit kolonnák és a nagy hőmérséklet alkalmazása megköveteli, hogy új készüléket használjunk. Az új kolonnatechnológiával és műszerezettséggel végrehajtott elválasztásokat, megkülönböztetve a hagyományos HPLC technológiától, továbbiakban ultra nagyhatékonyságú vagy ultra nagynyomású folyadékkromatográfiának (Ultra High Performance/Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) nevezzük összefoglaló néven. A cikk tárgyalja a gyors folyadékkromatográfiával kapcsolatos elméleti megközelítéseket, azok gyakorlatba való átültetését.

2. Folyadékkromatográfias elválasztások gyorsítása

A gyors folyadékkromatográfias módszereknél a következő problémákkal állunk szemben: vajon a kisméretű kolonnák alkalmazása megengedi-e az eddig hagyományosnak tekintett nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias rendszerek használatát (HPLC). Értve ez alatt, hogy az adagolt minta mennyisége és térfogata ugyanolyan határok között változhat-e, a megszokott műszer konfiguráció alkalmas-e, hogy mindazokat az előnyöket kihasználjuk, amelyeket ezek a kis térfogatú kolonnák nyújtanak. Először is nézzük meg, hogy milyen előnyöket adnak ezek a nagy hatékonyságú és kis térfogatú kolonnák. A szakirodalom elsődlegesen a kis szemcseátmérőt hangsúlyozza, holott a kis térfogat szorosan összefügg a gyorsasággal és a zóna maximumban mért koncentrációval is. A kisebb holtterefogat kisebb komponenshígulást jelent, amely eredménye a jobb kimutatási határ, vagy másképpen a nagyobb érzékenység. A gyorsaság megítéléséhez a következő alapösszefüggésből kell kiindulnunk:

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

A kifejezésben t_r a bruttó retenciósidőt jelenti, a t_0 a holtidő vagy hold-up idő, a k a visszatartási tényező, vagy retenciósfaktor.

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

ahol az L a kolonna hossz és az u a lineáris áramlási sebesség. Az 1-t, a 2-be helyettesítve kapjuk:

* Fekete Jenő Tel.: +36/1/4631596 ; fax: ; e-mail: feketje@mail.bme.hu

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

Az összefüggésből egyértelműen kiderül, hogy az elemzési idő csökkentésének két útja van: vagy a kolonna hossz nagymértékű csökkentése, vagy a lineáris áramlási sebesség növelése. A k érték csökkentése nem lehetséges, mert akkor az interferencia veszély, azaz, hogy két romatográfias csúcs együtt eluálódjon jelentősen megnő. A hagyományos kolonna hosszak 10-25 cm között változnak. Ezeket a kolonnákat a hagyományos HPLC készülékekben a megengedett kolonnán kívüli zónaszéledéssel használhatjuk. Amennyiben a kolonnahosszakat 2-5 cm-re csökkentjük, akkor kb. ötödére csökken az elemzési idő. Ezzel ugyan a gyorsasági kritérium teljesül, mert az elemzési időt ötödére csökkentettük, de ez együtt jár a felbontás csökkenésével, hiszen a kinetikai hatékonyság az elérhető tányérszámok a kolonna hosszától függenek. Ahhoz, hogy ne változzon az elválasztás minősége, a kisméretű kolonnák kinetikai hatékonyságát meg kellett növelni. Az elválasztás úgy is gyorsítható, ha megnöveljük a mozgófázis sebességét. A lineáris áramlási sebesség növelése fordított arányban áll az elemzési idővel.

2.1. Teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű töltetek

Szemcsés töltetek esetén a kinetikai hatékonyságot elsősorban a szemcseátmérő csökkentésével növelhetjük. Ez könnyen belátható, ha az általános tányér-egyenletet hívjuk segítségül. Először van Deemter és kollégái mutatták meg, hogy az elméleti tányérmagasság a lineáris sebesség függvényében egy minimumos görbével írható le.¹ Az általuk bevezetett függvény általános alakja a következő volt:

$$H = a + \frac{b}{u} + cu \quad (4)$$

Az egyenletben H az elméleti tányérmagasság, a az örvénydiffúzióra, b a hosszirányú diffúzióra és c az anyagátadási ellenállásra jellemző együtthatók. Ezt az alapegyenletet azóta sokan tovább fejlesztették (Giddings, Knox, Golay, Hubert, Horváth, Myabe, Guiochon...), az eredeti van Deemter által leírt forma csak egy közelítés. Ha szemléltetni akarjuk a szemcseátmérő és diffúziós tulajdonságok hatását az elválasztás hatékonyságára, akkor U.D. Neue szerint a következő egyszerűsített formát írhatjuk fel:²

$$H = A \cdot d_p + \frac{B \cdot D_M}{u} + C \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M} \quad (5)$$

Ahol d_p a töltet szemcseátmérőt jelenti, D_M pedig az adott komponens diffúziós állandóját. Hangsúlyozzuk, hogy az 5-egyenlet sok elhanyagolást tartalmaz (pl. a diffúziós állandó nem azonos a szemcsék közötti folyadék fázisban és a szemcsén belüli stagnáló folyadékban, vagy az örvénydiffúzió a valóságban nem független a lineáris sebességtől, illetve az egyenlet nem különbözteti meg az anyagátadás álló- illetve mozgófázis járulékát) de első közelítésben jól szemlélteti, hogy az örvénydiffúzió egyenesen arányos a szemcseátmérővel, míg az anyagátadási tag a szemcseátmérő négyzetétől függ. Az egyenletből egyértelműen következik,

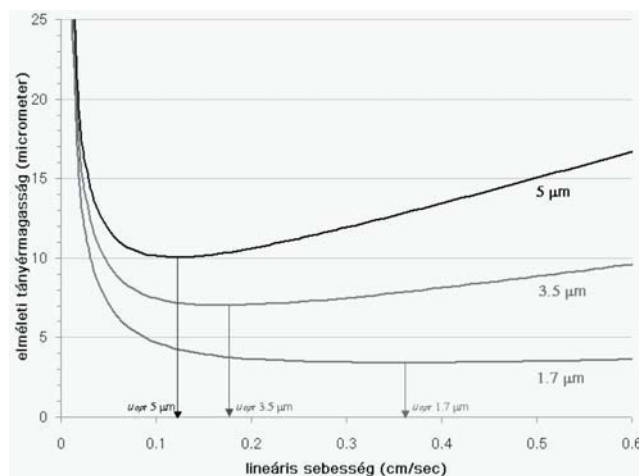
hogy a szemcseátmérő csökkentése jelentős tányérmagasság csökkenést (tányérszám növekedést) eredményez. Másik következmény, hogy az egyenlet által leírt görbe minimum helye a nagyobb lineáris sebességi tartományba tolódik, ha a szemcseátmérőt csökkentjük. A függvény optimum (minimum) helye ott van ahol a $dH/du=0$ teljesül. Ekkor az optimális lineáris sebesség (u_{opt}) a következők szerint írható le:

$$u_{opt} = \frac{\sqrt{D_M}}{d_p} \sqrt{\frac{B}{C}} \sim \frac{1}{d_p} \quad (6)$$

Tehát a lineáris sebesség optimuma fordítva arányos a szemcseátmérővel. A 6 egyenletet 5-be helyettesítve megkapjuk a tányérmagasság minimum értékét (H_{min}):

$$H_{min} = d_p (A + 2\sqrt{CB}) \sim d_p \quad (7)$$

Azaz az elérhető legkisebb tányérmagasság (legnagyobb tányérszám) egyenesen arányos a töltet szemcseátmérőjével. Láthatjuk, hogy a szemcseátmérő csökkentés előnyös az elválasztás gyorsítása és a kinetikai hatékonyság fokozása szempontjából is. Az 1 ábra mutatja a szemcseátmérő hatását a $H-u$ görbe lefutására.



1. Ábra. Az elméleti tányérmagasság minimumának és a lineáris sebesség optimumának változása a különböző szemcseátmérőjű töltetekkel.

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

$$\Delta p = \frac{\Phi \eta L u}{d_p^2} \quad (8)$$

ahol a Φ a kolonna áramlási ellenállása, egyes szerzők szerint értéke 500 és 1000 között van és η a mozgófázis viszkozitása. Tehát a szemcseátmérő csökkenésével, a kolonnán létrejövő nyomásesés négyzetesen növekszik. A különböző cégek által forgalmazott azonos átlagos szemcseátmérőjű kolonnákon a nyomásesés eltérő lehet. Ennek két oka lehetséges, a nagyobb nyomásesésű kolonnán a szemcseátmérő eloszlás szélesebb, és a kisebb szemcseátmérőjűből több van, vagy pedig a töltés során a szemcsék sérülnek és a kis szemcseátmérőjű törmelék elzárja az áramlási csatornákat. Itt kiegészítjük azzal, hogy különbséget kell tenni a hagyományos HPLC-

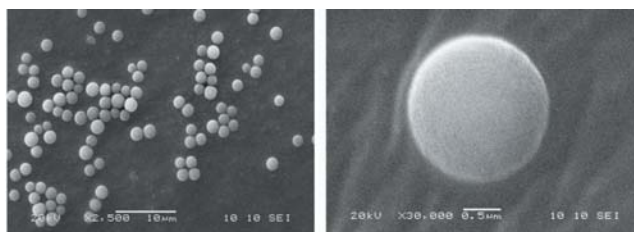
re tervezett töltetek és az ultra nagynyomásra tervezett töltetek között. A töltési nyomásnak, ugyanis nagyobbak kell lenni, mint a használatkor mért vagy esetünkben a megengedett legnagyobb nyomásnak. A hagyományos HPLC készüléknél ez a felső nyomás 400 bar, az ultra nagynyomású készülékeknél (UHPLC) ez ma 1000-1300 bar. Könnyű belátni, hogy annak az esélye, hogy a szemcsék sérülnek annál nagyobb, minél nagyobb a töltési nyomás. Önmagában véve a 10 nm pórus átmérőjű szilikagélek többsége bírja a 400 bárnál nagyobb nyomásokat is. A hagyományos HPLC-re tervezett töltetknél a kolonna töltési nyomás kisebb, mint 1000 bar. Így lehetséges, hogy a gyártók a 2 μm szemcséátmérőjű tölteteket ajánlják a hagyományos készülékekhez gyors kromatográfiai módszerek alkalmazására. Ennek azonban vannak feltételei. Nyomásesés oldalról az, hogy a mozgófázisnak kis viszkozitásúnak kell lennie. Ezért kerülnek előtérbe az acetonitril tartalmú mozgófázisok szemben a metanol tartalmúakéval. Gradienselúció alkalmazásakor nagy víz tartalmú oldószerből indulva a metanol tartalom függvényében maximumos görbével írható le a viszkozitás változása. A görbe maximumát kb. 50 tf. % víz-metanol elegynél éri el. Ekkor kb 1,5-ször nagyobb a viszkozitás, mint a kiindulási mozgófázisnál volt. Acetonitril-víz elegynél a hatás sokkal kisebb, szobahőmérsékleten a maximális viszkozitás alig haladja meg az 1 cP-t. Így a nyomásesés még a legkedvezőtlenebb körülmények között is kb. 50 %-kal kisebb, mint a metanol-víz elegynél mért. A nagy viszkozitású mozgófázisok másik hátránya, hogy az agyagátadási ellenállást (lásd: 4 és 5 egyenlet) kedvezőtlenül befolyásolják. Ennek eredményeként a lineáris sebesség növelésével lényegesen romolhat az elválasztás hatékonysága (meredekebb felszálló ág a *H-u* görbék – pl. van Deemter típusú - nagy lineáris sebességű tartományában).

A sebesség növelésének határt szab a készülék maximális nyomás teljesítménye. Mára a hagyományosnak tekinthető nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában (HPLC) ez 400 bar (6000 psi). Ma már szinte minden készülékgyártó forgalmaz UHPLC készüléket, amelyek 1000-1300 bar tartományig is képesek a mozgófázist szállítani. Az UHPLC-s elválasztások hatékonyságát két hatás külön-külön vagy együttesen is leronthatja. Az első hatás abból ered, hogy a nagy nyomással bevitt energia hővé alakul, amely eredményeképp hossz- és keresztirányú hőmérséklet gradiens alakul ki a kolonnán. Ezek következménye elsősorban káros csúcshézesedés, illetve a retenció tulajdonságok megváltozása.³ A hőátadás a környezetnek a kolonna átmérőtől függ, minél kisebb a kolonna átmérő annál nagyobb az egységnyi kolonna-térfogatra jutó hőátadó felület. Ebből következik, hogy ekkor inkább a 2 mm körüli vagy az alatti kolonnák alkalmazása teszi lehetővé, hogy ne alakuljanak ki olyan hőmérséklet különbségek, amelyek jelentős csúcshézesedést okoznak (sűrűlási hőeffektusok). Ekkor viszont előtérbe kerülnek a kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások, és az abból eredő készülék problémák. A kis kolonna hosszhoz, tehát kis belsőátmérő kell, hogy tartozzon.

Egybevetve az eddigieket megállapítható, hogy gyors folyadékkromatográfiát teljesen porózus töltetekkel kis szemcséátmérővel és kis kolonna térfogattal lehet

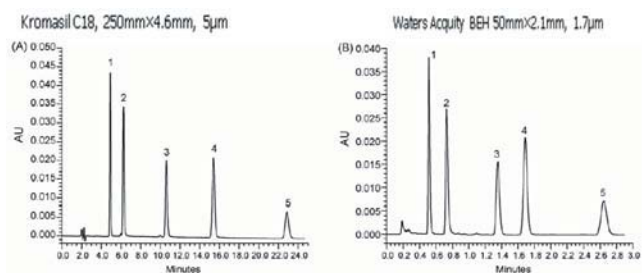
megvalósítani. Egyik lehetséges megoldás, hogy a 3 összefüggés értelmében a kolonna hosszát csökkentjük és ekkor a hagyományosnak mondott HPLC (400 bar) is alkalmazható, vagy a készülék nyomás teljesítményét növeljük meg ahhoz, hogy a lineáris áramlási sebességet ne kelljen csökkenteni, esetleg növelni lehessen. Az első esetben jó kompromisszumnak tűnik, ha a szemcséátmérőt 3 μm körül tartjuk, a második esetben alkalmazhatjuk, az ún. szub-2 mikron szemcséátmérőjű tölteteket.

2004 mérföldkö volt a folyadékkromatográfia történetében. Ekkor a Waters cég piacra dobta az első 1000 bar-ig (15 000 PSI) működő – és kis kolonnán kívüli térfogatú - gyors folyadékkromatográfját. Ezt UPLC-nek nevezte el, amely az ultra performance liquid chromatograph betűszava. Ezzel egy időben 1,7 μm átlagos szemcséátmérőjű szerves és szerves szilánból (brigde ethylene hybrid, BEH) készült teljesen porózus állófázissal töltött kolonnákat is forgalomba bocsátottak.^{4,5} A szemcse elektronmikroszkopos képét a 2. ábrán adtuk meg.⁶



2. Ábra. Az 1,7 μm -es Waters Acquity BEH szemcse elektronmikroszkopos képe.

A szemcse teljesen gömbszimmetrikus, a felületén nincsenek kiugrások vagy mélyedések. Ez több szempontból is fontos, egyrészt a mechanikai stabilitás miatt, másrészt a szemcsét körül vevő álló folyadékfilm okozta zónaszélesedés kisebb (film diffúzió). A töltet szemcséátmérő eloszlása is szűkebb a hagyományos HPLC-és töltetekhez képest. A szakirodalomban jelenleg is vita van a szemcséátmérő eloszlás szerepéről, elsősorban a kinetikai hatékonyságra gyakorolt hatásáról (örvény diffúzió, töltet sűrűség, töltési tulajdonságok), műveleti szempontból előnyös a kis szemcséátmérő eloszlás.⁷ Wang és mtsai az elsők között mutatták be, hogy a hagyományos HPLC-s módszerek (25 cm-es, 5 μm -es kolonna, 400 bar nyomás) analízis ideje akár a hetedére is csökkenthető 5 cm-es 1,7 μm -es BEH kolonnát és 900-1000 bar nyomást alkalmazva.⁸ A 3. ábrán egy hagyományos módszer gyors módszerre transzferálását láthatjuk.⁸



3. Ábra. Egy izokratikus hagyományos HPLC elválasztás UHPLC-s felgyorsítása. (gyógyszerhatóanyagok elválasztása).

A Waters BEH 1,7 μm -es töltet sikere után hamarosan más gyártók is forgalomba hoztak 2 μm -es vagy az alatti

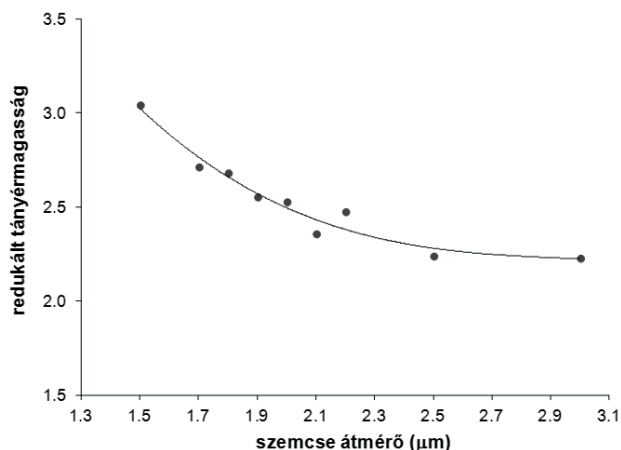
töltetüket. Először az Agilent Zorbax RHD 1,8 μm -es, a Thermo Hypersil Gold 1,9 μm -es majd a Grace Vision HT 1,5 μm -es töltetei jelentek meg. Mára már minden kolonna gyártó cég ajánlja a saját teljesen porózus UHPLC-s töltetét. Az 1. táblázat a 2011-ig kereskedelmi forgalomban megjelent 2 μm és az alatti tölteteket foglalja össze.⁹

1. Táblázat. Kereskedelmi forgalomban megjelent (2011-ig) 2 μm -es és az alatti töltetek.

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

Azt azért megjegyezzük, hogy ugyan a 2 μm alatti töltetek abszolút értékben igen jó tányérmagasságokat (H_{min}) valósítanak meg, de az ún. redukált tányérmagasság ($h=H/d_p$) minimuma, ezekkel a töltetekkel elmarad a 3-5 μm -es töltetekhez képest. A redukált tányérmagasság egy dimenziómentes mérőszám (Giddings vezette be), amivel a különböző szemcseméretű kolonnák hatékonyságát vehetjük össze függetlenül a szemcsemérettől. Elmélet szerint egy jól töltött teljesen porózus töltetű kolonnának $h=2-2,5$ közötti

redukált tányérmagasság minimumot kellene adnia. Sok esetben a szemcseátmérő és redukált tányérmagasság között fordított arány figyelhető meg (4. ábra).¹⁰ Ez azt jelenti, hogy a 2 μm alatti töltetek hatékonysága a gyakorlatban elmarad az elméletileg elvárhatótól ($h_{min} \sim 3$). Ennek több oka lehet, 1) a már említett hőeffektusok 2) kolonna töltési problémák illetve 3) a káros oszlopon kívüli térfogatok is nagyban leronthatják a kolonnák hatékonyságát.

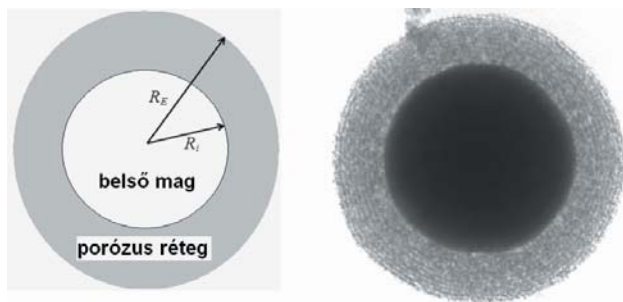


4. Ábra. A redukált tányérmagasság minimum értékének változása a töltet szemcseátmérő függvényében. Ez esetben a csúcsszélesedéseket korrigáltuk az oszlopon kívüli csúcsszélesedésre illetve fontos megjegyezni, hogy a töltetek/kolonnák különböző gyártóktól származnak.

2.2. Héjszerkezetű (mag-héj) töltetek

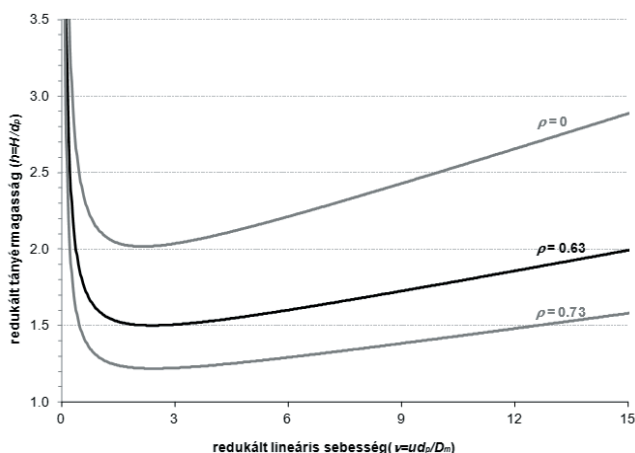
A zónaszélesedés csökkentésének másik megoldása, ha a diffúziós úthosszat rövidítjük. Ez hozta el a héjszerű töltetek jelenlegi reneszánszát. Horváth és Kirkland közel negyven éve bevezette ezeket a tölteteket, amelyeket, akkor pellikularisnak neveztek.¹¹⁻¹³ Horváthék először a 60-as évek legvégén, 50 μm üvegyöngyöt használtak, amelyet 1 μm szerves polimer alapú ioncsereelővel vettek körül. Utána Kirkland volt az, aki 30-40 μm átmérőjű töltetet készített 1 μm -es aktív réteggel. Az ilyen típusú tölteteknek az anyagátadási ellenállása jobb, mint a hasonló méretű teljesen porózus tölteteknek. Ez a töltet azonban nem lett népszerű a folyadékromatográfiás társadalomban, mert a teljesen porózus szilikagél alapú töltetfejlesztés vált döntővé és megjelentek a 10, 5 később a 3 μm szemcseátmérőjű teljesen porózus töltetek. A kezdeti sikertelenség oka a nagy inaktív mag (az aktív réteghez képest), aminek a következménye a kolonnák kis terhelhetősége és a visszatartása csökkenése volt. 2007-ben újból megjelentek ezek a töltetek (harmadik generáció), amikor a szemcseátmérő már kisebb volt 3 μm -nél. Ez óriási áttörést hozott a gyors folyadékromatográfiában. Az első 2,7 μm -es héjszerkezetű töltetek Halo és Ascentis Express néven kerültek kereskedelmi forgalomba, s ismét Kirkland volt az, aki bevezette.¹⁴

Kezdetben, az alap koncepció az volt, hogy makromolekulák elválasztásának hatékonyságát javítsák úgy, hogy a csökkentett diffúziós úthossz következtében felgyorsulnak a szemcsén belüli anyagátadási folyamatok. Ezt úgy lehet elérni, hogy a töltet tartalmaz egy nem porózus magot és ezt veszi körül az elválasztásban szerepet játszó aktív porózus réteg. Az 5. ábra a héjszerkezetű töltetek sematikus képét mutatja.



5. Ábra. Héjszerkezetű töltetek sematikus képe (balra), illetve elektronmikroszkópos felvétele (jobbra).

Az új generációs héjszerkezetű töltetek kis szemcseméretéből adódik az előnyös örvény- és tengelyirányú diffúziós tulajdonság, a vékony porózus réteg következtében pedig gyorsabb részecskén belüli anyagátadás és kedvezőbb hosszirányú diffúzió várható. Kaczmarski és Guiochon levezetései alapján, a részecskén belüli diffúzió a belső mag átmérő és a teljes szemcse átmérő hányadosának (ρ) függvényében leírható.¹⁵ Ahogy ez az arány növekszik ($\rho=1$ megfelel a nem-porózus töltetnek, míg $\rho=0$ a teljesen porózusnak) úgy válik egyre gyorsabbá az anyagátadási kinetika az aktív héjban (van Deemter összefüggés C tagja, nevezetesen az állófázis járuléka). Ez az előnyös tulajdonság elsősorban a nagy lineáris sebességeknél jelentkezik. Másrészt a hosszirányú diffúzió is csökkennie kell az inert belső mag miatt (van Deemter összefüggés B tagja). Ennek elsősorban a kis lineáris sebességi tartományban van jelentősége. Az általános sebességi elméletből az is levezethető, hogy az anyagátadás mozgófázis járuléka is függ közvetve a héj-vastagságtól (mert a visszatartás csökken a rétegvastagság csökkentésével).¹⁶ Az elméleti levezetések szerint körülbelül 2,3-szor illetve 1,7-szer gyorsabb részecskén belüli anyagátadás várható a kereskedelmi forgalomban kapható 2,6 és 2,7 μm -es héjszerkezetű töltetekkel (Kinetex and Halo/Ascentis Express/Poroshell-120, $\rho = 0.73$ és $\rho = 0.63$), mint az azonos méretű teljesen porózus töltetekkel. A 6. ábra néhány elméleti h - v görbét mutat (v a redukált lineáris sebesség) azonos szemcseátmérőjű, de különböző szerkezetű töltetekre.⁹



6. Ábra. Számolt h - v görbék teljesen porózus és héjszerkezetű töltetekre. Feltételezett mozgófázis összetétel: 50% acetonitril-50% víz, komponens molekulatömege 1000 g/mol.

A 6. ábra mutatja, hogy teljesen porózus töltetekkel kb. $h_{\min} = 2.0$, míg a jelenlegi héjszerkezetű töltetekkel $h_{\min} = 1.2$ -

1,5 körüli redukált tányérmagasság minimum várható. Meg kell jegyeznünk, hogy az irodalomban található rendkívül jó hatékonysági adatok kromatográfiásan kis molekulákra, nem magyarázhatóak a jelenlegi elméletekkel. Több szerző is lényegesen kedvezőbb örvény diffúziós tulajdonságot (van Deemter összefüggés A tagja) figyelt meg a héjszerkezetű töltetekre, mint a teljesen porózusokra. Elvileg a szemcse szerkezetnek nem kellene hatással lennie az örvénydiffúzióra, de most úgy tűnik, hogy ez lehet az oka a rendkívüli jó hatékonyságnak a kismolekulás elválasztásokra. Van, aki a héjszerkezetű töltetek kitűnő szemcseméret eloszlásával, van aki pedig a viszonylag gömbös felülettel és az ennek köszönhető jobb kolonna töltési tulajdonságokkal (homogénebb töltetágy) magyarázza a jelenséget.^{17,18} Jelenleg a héjszerkezetű töltetek reneszánszukat élik, remek hatékonyságot produkálnak mind kis, illetve makromolekulák elválasztásakor.

Az eddig tárgyalt előnyök mellett néhány hátrányos tulajdonságot is meg kell említeni. A vékony aktív porózus réteg miatt könnyen belátható, hogy azonos méretű teljesen porózus töltethez képest kisebb terhelhetőség és kisebb visszatartás várható a héjszerkezetű töltetekkel. Kísérleti adatok alapján, az új generációs héjszerkezetű töltetek terhelhetősége nagyjából megegyezik a 2 μm -nél kisebb teljesen porózus töltetével.^{19,20} Az is bebizonyosodott, hogy a visszatartás csökkenése a jelenlegi $\rho=0,6-0,8$ szemcse szerkezet esetén még nem kritikus.²¹ Elsősorban $\rho > 0,8$ szemcse szerkezet esetén (pl. Aeris WP töltet) válik jelentősé.

Mára már szinte minden töltet-gyártó forgalmaz új generációs héjszerkezetű állófázisokat. Először a 2-3 μm szemcseátmérő közötti töltetek jelentek meg, amelyeknél a héj vastagsága 0,35-0,50 μm között volt (Halo, Ascentis Express, Poroshell, Kinetex). Érdekes, hogy ezen töltetek átlagos pórus átmérője 90-100 Å közötti volt, holott a héjszerkezetű töltetek, elmélet szerint makromolekulákra teljesítenek a legjobban. Mára már megjelentek a 160, 200 és 300 Å körüli héjszerkezetű állófázisok is (Halo Peptide ES, Aeris WP...), amelyek remek hatékonysággal alkalmazhatók fehérje elválasztásokban.^{20,21} A 2. táblázatban a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható új generációs héjszerkezetű tölteteket foglaltuk össze. Nemrégiben a 2 μm alatti és a 3-5 μm közötti töltetek is megjelentek. Az előbbieket hihetetlen, eddig sosem tapasztalt kinetikai hatékonyág elérésére teszik képessé az alkalmazót, az utóbbiakat pedig elsősorban a hagyományos HPLC-s töltetek (3-5 μm teljesen porózus) helyettesítésére javasolják a gyártók.

2.3. Monolit kolonnák

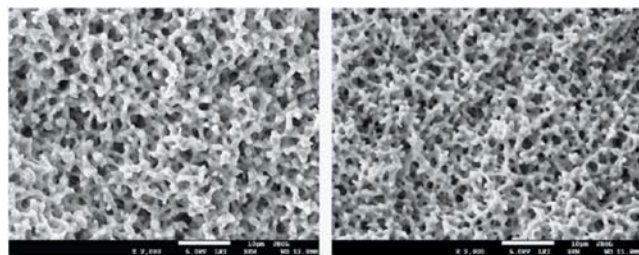
A monolit eredeti jelentése nagy kő. Kromatográfias szempontból ez annyit jelent, hogy egyetlen polimer adja a kolonnát, amelyben két fajta pórus található (szilikagél alapú monolitok estén). A nagyobbik pórus átmérője 1-3 μm , ezt nevezzük átfolyó pórusnak, míg a szilárd polimerben található a mezopórusok, amelyek a komponensek megkötődését biztosítják. A kereskedelmi forgalomban, mind szerves polimer, mind szilikagél alapú monolit kolonnák kaphatók. Mi továbbiakban csak a szilikagél alapúakkal foglalkozunk. Rövid történeti áttekintés kedvéért néhány ezen a területen tevékenykedő szakembert sorolunk fel. Úttörő munkát végzett ezen a területen Hjertén, Svec,

2. Táblázat. Kereskedelmi forgalomban megjelent új generációs héjszerkezetű töltetek.

| gyártó | kolonna/termék neve | névleges szemcseátmérő (μm) | réteg vastagság (μm) |
|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Agilent | Poroshell 300 | 5,0 | 0,25 |
| | Poroshell 120 | 2,7 | 0,50 |
| Advanced Material Technology | Halo | 2,7 | 0,50 |
| | Halo Peptide-ES 160 Å | 2,7 | 0,50 |
| | Halo-5 | 5,0 | 0,60 |
| Sigma-Aldrich | Ascentis Express | 2,7 | 0,50 |
| | Ascentis Express Peptide-ES 160 Å | 2,7 | 0,50 |
| | Ascentis Express F5 | 5,0 | 0,60 |
| Phenomenex | | 5,0 | |
| | | 2,6 | 0,35 |
| | Kinetex | 1,7 | 0,23 |
| | | 1,3 | |
| | Aeris Peptide | 3,6 | 0,50 |
| | | 1,7 | 0,23 |
| Thermo Scientific | Aeris Widepore | 3,6 | 0,20 |
| | Accucore | 2,6 | 0,50 |
| Macherey-Nagel | Nucleoshell | 2,7 | 0,50 |
| | Brownlee SPP | 2,7 | 0,50 |
| Perkin Elmer | Brownlee SPP Peptide-ES | 2,7 | 0,50 |
| | Sunniest | SunShell | 2,6 |
| jelenleg nem kapható | | 1,7 | 0,35 |
| | Eiroshell | 1,7 | 0,25 |
| | | 1,7 | 0,15 |

Horváth, Tanaka és az általuk kialakított műhelyek és azok munkatársai.²²⁻²⁵ Kereskedelmi forgalomban a Merck és a Phenomenex cég által forgalmazott termékek vannak (Chromolith, illetve Onyx). Az utóbbi a Merck liszenca alapján gyártja a kolonnát. Az első generációs szilikagél alapú monolit 2000-ben került kereskedelmi forgalomba. Tavaly jelent meg a továbbfejlesztett változat, ami a második generációs monolit nevet kapta. A töltetek elektronmikroszkópos felvételét a 7. ábrán mutatjuk be.²⁶

A 7. ábrán a sötét rész az átfolyó pórus a világos a szilikagél váz (skeleton). A világos részek adják a szilikagél alapvázat, míg a sötét részek a nagy átmérőjű pórusokat. A szerkezet olyan szivacshoz hasonlít, ahol a pórusok nyitottak és egymással összeköttetésben vannak. A mozgófázis áramlása ezekben a μm-es nagyságrendű pórusokban történik. Ahogy a 7. ábrán is jól látható, a pórusok átmérője közel állandó.



7. Ábra. Első (balra) és második generációs (jobbra) szilikagél alapú monolitok elektronmikroszkópos képei.

Ebből következik, hogy áramlási ellenállás oldaláról nézve nincs szűk keresztmetszet, amelyet a szemcsés töltetknél a legkisebb átmérőjű csatorna ad meg. Töltetes kolonnáknál az áramlási csatornák átmérőjét a szemcseátmérőből lehet becsülni. Szabályos alakú, gömbszimmetrikus töltetknél ez a szemcseátmérő 1/3 része. Tehát egy 3 μm-es töltetnél ez 1 μm-nek felel meg. Ez csak akkor igaz, ha a töltés során a részecskék nem sérülnek és a szemcseátmérő eloszlás szűk és az átlagos szemcseátmérőnél sokkal kisebb szemcséket töltés előtt eltávolították. A mozgófázis áramlása ezekben az egymással összeköttetésben lévő pórusokban történik, míg a visszatartást a vázban lévő mezopórusok adják. Az áramlást lehetővé tevő pórusok átmérője 1-3 μm, a visszatartást eredményező mezopórusok átlagos átmérője 10-20 nm, a kereskedelmi forgalomban lévőé 13 nm. Ennek a töltetnek a fajlagos felülete nagyobb, mint 100 m²/g, ami megfelel a szemcsés töltetknél mért értékeknek. Az ábrából az is látható, hogy a pórustérfogat (sötétebb rész) aránya nagy a váz (világosabb rész) arányához képest (kis fázisarány). A monolit kolonna porozitása, összevetve a szemcsés töltetű kolonnákkal, sokkal nagyobb. Ez megszabja a kolonna áramlási ellenállását (permeabilitását), ebből következik, hogy ugyanolyan térfogat-áramlási sebességhez sokkal kisebb nyomásesés tartozik. Ez igaz, mind a szilikagél alapú, mint a szerves polimer alapú monolitokra. Az első monolitok 10 cm hosszúak voltak, nagy áramlási sebesség mellett használták az elemzési idő csökkentés érdekében. Ezek nem feleltek meg a folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) csatolt technikának. Ez vezetett el az ultragyors monolit kialakításához. Először a kolonna hosszát csökkentették 5 majd 2,5 cm-re, majd a kolonna belsőátmérőjét 4,6 mm-ről 3, majd 2 mm-re. Az 5 cm hosszú 2 mm átmérőjű monolit kolonna (Chromolith FastGradient) jól alkalmazható LC-MS módszerekhez, illetve UHPLC készülékekben használva gyors és hatékony elválasztások megvalósítására.

Az egybefüggő, és közel azonos átmérőjű pórusok a kolonna permeabilitását nagyban növelik. Elméletileg levezetve ezt, visszajutunk a klasszikus Kármány-Kozeny összefüggéshez.

$$K = \frac{\varepsilon^3}{180(1-\varepsilon)} d_p^2 \quad (9)$$

ahol a K jelenti a kolonna permeabilitását, ε a porozitást és a d_p szemcsés töltetű kolonnáknál a szemcseátmérőt, mint karakterisztikus paramétert (domain size), a monolit kolonnáknál az áramlást biztosító pórusok átmérőjének és a szilárd fázis vastagságának az összege. A kolonna porozitását a hagyományos módon tudjuk értékelni,

nevezetesen a kolonnán belül található üres térfogat és a kolonna össz-térfogatának hányadosaként. A permeabilitás és a kolonnán létrejövő nyomásesés között a következő összefüggés teremt függvény kapcsolatát:

$$K = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta p} \quad (10)$$

ahol az η a mozgófázis viszkozitását jelenti. Átrendezve az egyenletet Δp -re a következő összefüggést kapjuk:

$$\Delta p = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{K} \quad (11)$$

Tehát a kolonna áramlási ellenállása (permeabilitása) közvetlenül megszabja a kolonnán a nyomásesést. Ez viszont a kolonna porozitásával függ össze. Szilikagél alapú monolit kolonnáknál a teljes porozitás $\varepsilon=81\%$.²⁶ Szemcsés kolonnáknál, amelyeket a hagyományos HPLC és UHPLC technikánál használunk ez az érték 50-70% ugyan, de az áramlási csatornákat adó szemcsék közötti porozitás kisebb, mint 40%, ehhez járul a nem egyenletes csatorna-átmérő, aminek következtében a K értéke tovább csökken. Az UHPLC technikában a mechanikai stabilitás növelése miatt a porozitás értéke $\varepsilon \sim 50\%$. Bevezethetjük a ϕ paramétert, amely az áramlási ellenállással arányos tényező:

$$\phi = \frac{d_p^2}{K} = \frac{d_{dom}^2}{K} \quad (12)$$

Az összefüggés egyértelmű függvénykapcsolatot ad a karakterisztikus méret (szemcseméret vagy domain méret $/d_{dom}/$) és az áramlási ellenállás valamint a karakterisztikus méret és a ϕ között. A monolit kolonnáknál, ahol az átfolyó pórus és a váz átmérő viszony közel állandó, a ϕ értéke is állandó, összevetve egy 5 μm átlagos szemcseátmérőjű kolonnával, közel egy nagyságrenddel kisebb. Az áramlási ellenállás tehát kevésbé szab határt az elemzések gyorsításának. Ha figyelembe vesszük egy kolonna által elért tányérszámot, retenciós időt és a létrejövő nyomásesést (azaz a permeabilitást) akkor a kolonna abszolút teljesítménye az elválasztási ellenállással (E) definiálható:

$$E = \frac{t_R \Delta p}{N^2 \eta (1+k)} \quad (13)$$

A monolit kolonnák elméletileg nagy lehetőséget adnak a gyors elválasztásokra, az elválasztási ellenállásuk igen kedvező, sok esetben jobb, mint a szemcsés tölteteké. Gyakorlatban azonban technikai problémák okozzák, hogy az elméletinél kisebb hatékonyságot lehet velük elérni. Ezt, a nemrég megjelent második generációs monolit töltetek részben kiküszöbölik, ahol az átfolyó pórusok egyenletességének növelésével nagyobb kinetikai hatékonyságot tudtak elérni. A második generációs monolit porozitása azonos az első generációval, viszont az átfolyó pórusok és a falvastagság valamivel kisebbek, mint az elődjénél voltak. Ennek következménye természetesen az áramlási ellenállás növekedése. Azonos dimenziójú második generációs kolonnán – azonos térfogat áram mellett – kb. kétszer nagyobb nyomás esik, mint egy első generációs monoliton. A szilikagél alapú monolit kolonnák műanyag

házban kerülnek forgalomba (poliéter-éter-keton), ez behatárolja az alkalmazható felső nyomást, ami 200 bar.

Meg kell említenünk néhány szóban a szerves polimer alapú (polimetakrilát, poliakrilamid, poli-sztirén-divinilbenzol) monolitokat is, amelyeket elsősorban makromolekulák (fehérjék, peptidok, oligonukleotidok) elválasztására sikeresen alkalmaznak.²⁷⁻³² Elsősorban jó pH és hőstabilitásuk, valamint a szilanol csoportok hiányából eredő - káros másodlagos kölcsönhatások, ioncserés hajlam hiánya miatti – kedvező tulajdonságok végett terjedtek el a fehérje analitikában. Kereskedelmi forgalomban a Thermo Scientific cég ProSwift név alatt megjelent kolonnái (RP-1S, RP-2H, RP-3U és RP-10R) kaphatók.

2.4. Szemcsés teljesen porózus, héjszerkezetű és monolit kolonnák összehasonlítása

A gyakorlatban általában arra vagyunk kíváncsiak, hogy melyik kolonna adja a leggyorsabb vagy a legnagyobb hatékonyságú elválasztást. Eddig szó esett a van Deemter típusú ($H-u$) görbéről, amelyek megmutatják, hogy adott kolonnával milyen elméleti tányérmagasság érhető el, egy adott lineáris sebesség (vagy mozgófázis térfogatáram) tartományban. Ezekkel a görbékkel összehasonlíthatjuk a különböző kolonnákat aszerint, hogy melyik kolonna ad jobb tányérszámot egy adott lineáris sebességnél. Viszont ezek a $H-u$ görbék nem adnak tájékoztatást arról, hogy egy adott elválasztás mennyi időt igényel, illetve hogy mi is az a maximális tányérszám vagy leggyorsabb elválasztás, ami megvalósítható az adott kolonnával. Hogy ilyen következtetéseket vonjunk le, figyelembe kell vennünk a kolonnák permeabilitását, illetve mechanikai stabilitását (nyomásállóságát) is. Másik nehézség a $H-u$ görbékkel a különböző morfológiájú töltetek összehasonlítása, hiszen a karakterisztikus tulajdonságok eltérőek egy monolitinál, egy teljesen porózus vagy egy héjszerkezetű szemcsés töltetnél.

A kinetikus görbék módszerével - a kísérletileg felvett $H-u$ adatokat felhasználva - egyszerűen elvégezhetjük az analízis idő és tányérszámok „extrapolálását” egy adott (pl. maximális) nyomásértékre. Így megtudhatjuk, hogy mi a maximális elérhető tányérszám adott analízis időn belül, illetve hogy mi a legrövidebb idő egy adott tányérszám megvalósítására. Ehhez kísérletileg meg kell határoznunk a kolonna permeabilitását (lásd 10. egyenlet).

Ezután, - a mozgófázis viszkozitásának ismeretében - egy adott nyomásesésre (ΔP_{max}) egyszerűen kiszámolhatjuk t_0 illetve N értékét (extrapolált) az alábbi összefüggéseket alkalmazva:

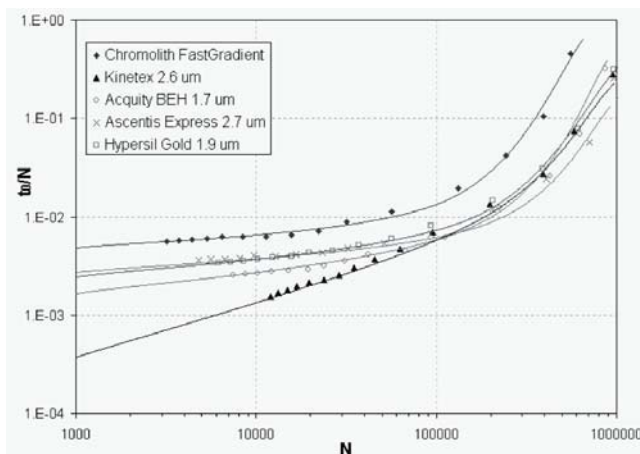
$$t_0 = \frac{\Delta P_{max}}{\eta} \left(\frac{K}{u^2} \right) \quad (14)$$

$$N = \frac{\Delta P_{max}}{\eta} \left(\frac{K}{u H} \right) \quad (15)$$

A kapott adatokat többféle képen is ábrázolhatjuk. Leggyakrabban a t_0 , t_0/N vagy t_0/N^2 értékeket szoktuk megjeleníteni a tányérszám függvényében. Mindhárom

érték arányos az analízis idővel. Továbbá, az adott tányérszámhoz tartozó kolonna hossz is meghatározható, hiszen kísérletileg megmértük a H értékeket és kiszámoltuk a maximális nyomáshoz tartozó tányérszámot. A kétfoldos szorzata megadja azt a kolonna hosszát, amivel az adott tányérszám elérhető. A kinetikus elmélet további részleteit nem tárgyaljuk, számos közleményben olvasható.³³ Ha a kinetikus görbék módszerével összehasonlítjuk a jelenlegi leghatékonyabb különböző morfológiájú tölteteket, érdekes következtetéseket vonhatunk le.

A következő példában 5 cm-es kolonnák kinetikai tulajdonságát hasonlítottuk össze, kis gyógyszer molekulák elválasztására (monolit, teljesen porózus 2 µm alatti, illetve héjszerkezetű 2,6 és 2,7 µm-es töltetek) (8. ábra).³⁴



8. ábra. Összehasonlító kinetikus görbék (monolit, 1,7 és 1,9 µm-es teljesen porózus és 2,6-2,7 µm-es héjszerkezetű töltetek).

Korábban részleteztük, hogy az adott töltet típusokkal milyen tányérszámok várhatók, illetve beszéltünk a kolonnák permeabilitásáról (áramlási ellenállásáról). Jelenleg a legjobb tányérszámok, a legnagyobb kinetikai hatékonyság, a 2 µm alatti teljesen porózus, illetve a 2,6-2,7 µm-es héjszerkezetű töltetekkel érhető el. E két töltettel nagyjából azonos tányérszámokat tudunk megvalósítani, viszont a 2,6-2,7 µm-es héjszerkezetű töltetekkel fele vagy harmad akkora nyomáson tudunk dolgozni, mint a 2 µm alatti töltetekkel. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható monolitoknak rendkívül kedvező a permeabilitása, viszont az elérhető tányérszámok jóval elmaradnak az előző két szemcsés töltethez képest. Figyelembe kell vennünk a kolonnák mechanikai stabilitását is. A szilikagél alapú monolitoknak általában 200 bar, a 2,6-2,7 µm-es héjszerkezetű tölteteknek 600-1000 bar és a 2 µm alatti teljesen porózus tölteteknek 800-1200 bar a nyomásállósága. A 8. ábra ezeket a tulajdonságokat együttesen foglalja össze. Az időegységre jutó tányérszámot (t_g/N) ábrázoltuk az elválasztáshoz szükséges tányérszám függvényében. Az ábrán a kis t_g/N , illetve az alacsony N szakasz ($N < 20-30000$) felel meg a gyors elválasztásoknak (viszonylag kis tányérszám és rövid analízis idő). Ebben a tartományban (az ábra bal alsó negyede) azt látjuk, hogy adott tányérszám (pl. $N=20000$) leggyorsabban a 2,6 µm-es héjszerkezetű (Kinetex) töltettel valósítható meg. A gyakorlatban általában ez a tartomány ahol dolgozni szoktunk. Kicsit elmarad ettől a teljesen porózus 1,7 µm-es Acquity BEH, majd a 2,7 µm-es héjszerkezetű Ascentis Express, és a teljesen porózus

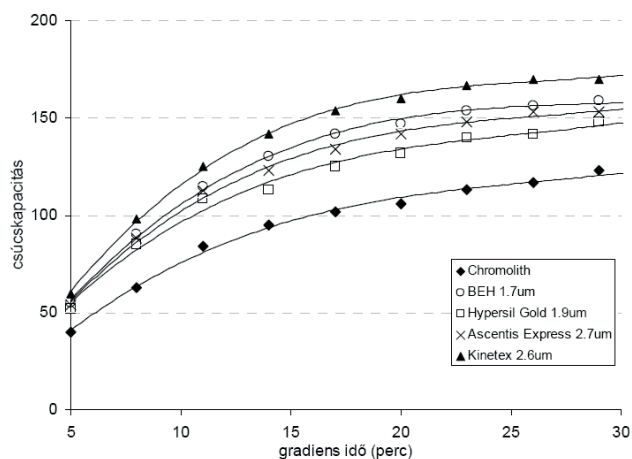
1,9 µm-es Hypersil Gold szinte azonosan teljesít. Végül a monolit kolonnával (Chromolith) kapjuk a leghosszabb idejű elválasztást. Kissé eltérő rangsort kapunk a nagyfelbontású elválasztások tartományában (az ábra jobb oldali fele). Például, ha az elválasztás tányérszám igénye 300000, akkor a két teljesen porózus 2 µm alatti és a két héjszerkezetű töltet nagyjából azonos analízis időt biztosít, viszont a monolit kolonnát használva lényegesen hosszabb időre van szükség a 300000-es tányérszám elérésére.

A példából jól látszik, hogy az elválasztás céljának megfelelően kell kolonnát választanunk. Nem mondhatjuk ki, hogy melyik kolonna a legjobb. A héjszerkezetű 2,6-2,7 µm-es töltetek általában jól teljesítenek, alkalmazhatóak gyors és nagyfelbontású elválasztásokra egyaránt.

A gyakorlatban a folyadékkromatográfiás elválasztások többségét gradiens elúciós módban végezzük. A gradiens elválasztás hatékonyságát általában a csúskapacitással jellemezzük. A csúskapacitás annak a mérőszáma, hogy adott idő alatt (pl. a gradiens program ideje) hány darab csúcsot tudunk egymástól elválasztani egy meghatározott csúcsfelbontással (általában $R_s=1$). Számos összefüggés található az irodalomban a csúskapacitás (n) leírására, a gyakorlatban általában a gradiens idő (t_g) és a csúcsszélesség (w) hányadosát vesszük alapul:

$$n = 1 + \frac{t_g}{w} \quad (16)$$

Természetesen a csúskapacitás sok változótól függ. Nagymértékben függ a gradiens időtől, a térfogatáramtól, a gradiens meredekségétől vagy a mozgófázis hőmérsékletétől. A következő példában szintén 5 cm-es kolonnák hatékonyságát hasonlítottuk össze azonos gradiens meredekség, gradiens idő, hőmérséklet és térfogatáram mellett (9. ábra).



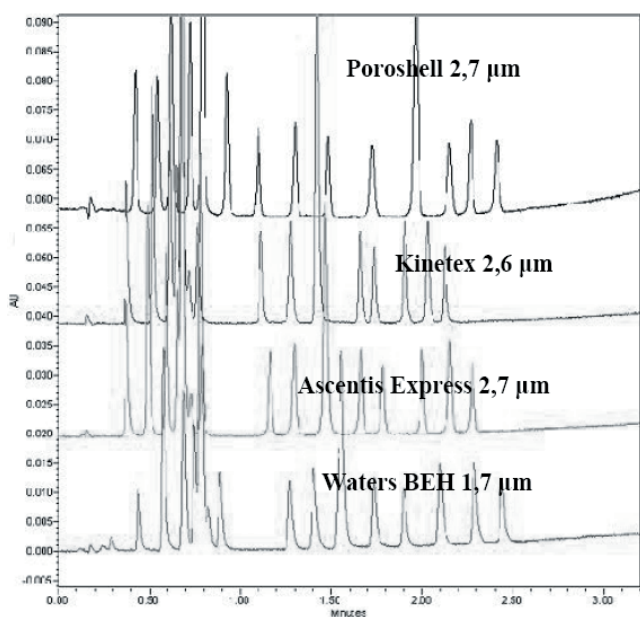
9. ábra. Összehasonlító csúskapacitás görbék (monolit, 1,7 és 1,9 µm-es teljesen porózus és 2,6-2,7 µm-es héjszerkezetű töltetek, 5 cm x 2,1 mm kolonnák), tesztkomponensek: szteroidok.

A 9. ábra szerint – az alkalmazott kísérleti körülmények között – a 2,6 µm-es héjszerkezetű Kinetex töltet adja a legnagyobb csúskapacitást. Fél órás gradiens programmal, az 5 cm-es kolonnával akár 170-180 csúcsot is elválaszthatunk egymástól. Kicsit elmarad a két teljesen porózus 2 µm alatti és 2,7 µm-es teljesen porózus töltet,

bár még ezekkel is igen nagy csúskapacitás érhető el. Az 5 cm-es monolit kolonnával maximum 110-120 közötti csúskapacitás érhető el, ami körülbelül azonos, mint egy 3-4 μm -es teljesen porózus töltet hatékonysága.

Hasonlóan az izokratikus elúciós módhoz, gradiens módban is számolhatunk elválasztási ellenállást vagy kinetikus görbéket és hasonló eredményt kapunk, mint izokratikus módban. Jelenleg a legígéretesebbnek a 2-3 μm közötti héjszerkezetű töltetek tűnnek, hiszen kiváló kinetikai hatékonyságuk viszonylag nagy kolonna permeabilitással társul. Nemrégiben kerültek forgalomba 2 μm alatti héjszerkezetű töltetek, amelyek rendkívül nagy kinetikai hatékonyságot mutatnak. Egy 5 cm-es, 1,7 μm -es héjszerkezetű töltettel akár $N=17000$ tényérszám is elérhető, ami korábban elképzelhetetlen volt.

A következő ábrán (10. ábra) gyors gradiens elválasztásokra mutatunk be példát. Korszerű 5 cm-es kolonnákkal 14 szteroidot választottunk el, mindössze 2,5 perc alatt.³⁵ A gyógyszeriparban különösen nagy jelentősége van az elválasztások gyorsításának, hiszen mind a módszerfejlesztési- mind pedig a rutin vizsgálatok ideje drasztikusan csökkenthető. Hagyományos készülékeken, 15-25 cm-es kolonnával (3-5 μm -es töltet) egy hasonló minőségű elválasztás körülbelül 8-15 percet igényelne. Korszerű 5 cm x 2,1 mm-es kolonnák alkalmazásával a módszerfejlesztési idő körülbelül harmadára-negyedére csökkenthető a hagyományos kolonnákhoz képest.



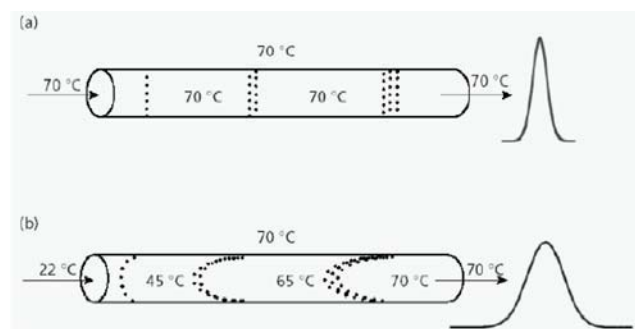
10. Ábra. Szteroidok elválasztása 5 cm x 2,1 mm kolonnákon (3 perc gradiens program, 0,8 mL/perc térfogatáram).³⁵ Kolonnák: Héjszerkezetű Kinetex 2,6 μm , Poroshell 2,7 μm , Ascentis Express 2,7 μm és teljesen porózus Waters BEH 1,7 μm .

2.5. Nagyhőmérsékletű elválasztások

Folyadékkromatográfias elválasztások sebessége gyorsítható a mozgófázis hőmérsékletének emelésével is. A hőmérséklet emelésével ugyanis csökken a mozgófázis viszkozitása és gyorsul az anyagátadás (nő a diffúziós állandó). A $H-u$ görbék optimuma a nagyobb lineáris sebességek irányába tolódik el és felszálló ágak (C tagra

jellemző tartomány) meredeksége csökken. Ez könnyen belátható a 6. egyenletből, hiszen a lineáris sebesség optimuma a diffúziós állandó négyzetgyökével arányos. A csökkent viszkozitás miatt a nyomásesés is kisebb lesz, tehát a lineáris sebességet tudjuk fokozni anélkül, hogy nagy nyomás teljesítményre volna szükség. Elméletileg tehát nagyon ígéretes a mozgófázis hőmérsékletének emelése. Természetesen a hőmérséklet előnyös hatását már nagyon korán felismerték és 1969-ben a technikát HTLC-nek (**H**igh **T**emperature **L**iquid **C**hromatography) nevezték el. Antia és Horváth különösen nagy előnyöket tapasztalt makromolekulák elválasztásakor.³⁶ Később, 1995-ben Chen és Horváth fehérjét választott el 120 °C-os mozgófázis hőmérséklet alkalmazva, az elválasztás mindössze 10 másodperces volt!³⁷ Akkoriban ez megdöbbentette a kromatográfias világot, senki nem gondolta, hogy fehérjét lehet ilyen magas hőmérsékleten vizsgálni. Azóta viszont a 70-90 °C-os mozgófázis hőmérséklet teljesen rutinszerű lett a fehérjék fordított fázisú elválasztásaiban. Makromolekulák anyagátadási tulajdonságai nagymértékben javíthatók a diffúziós tulajdonságok fokozásával. A molekulák diffúziós állandóját pedig elsősorban a hőmérséklet szabja meg.

A HTLC-s módszerek egyik kritikus eleme, a mozgófázis megfelelő előmelegítése (pre-heating). Ennek már 60 °C feletti is döntő jelentősége lehet.³⁸ Nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában a csúcsalak nagymértékben függ az előfűtött mozgófázis tömegétől (pre-heater térfogattól) az adagolt térfogattól és a mintaoldat oldószerétől.³⁹ Azok a készülékek, amelyek csak az oszlopetert fűtik, általában nem használhatóak 60 °C feletti elválasztásokhoz. A 11. ábrán szemléltetjük a mozgófázis előfűtés szerepét. A kolonna után viszont a mozgófázis lehülésére van szükség, hogy a káros detektorzajokat csökkentsük.⁴⁰ A detektor cella termosztálása nélkülözhetetlen, illetve megfelelő hosszúságú összekötő vezetékre van szükség a kolonna kimenet és detektor cella között, hogy a lehülés megtörténhessen. Ez természetesen növeli a kolonnán kívüli térfogatokat.



11. Ábra. Csúcsszélesedés a nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában mozgófázis előfűtést alkalmazva (a) és csak a kolonna teret fűtve (b).

A nagyhőmérsékletű elválasztások nem nagyon terjedtek el a gyakorlatban, persze van néhány speciális terület ahol jól alkalmazhatók. Ennek két fő oka van, 1) kevés hő-stabil állófázis kapható kereskedelmi forgalomban, illetve 2) a nem hő-stabil komponensek lehetséges kolonnán létrejövő termikus bomlása. Állófázis oldalról, elsősorban a cirkónium-oxid alapú töltetek ugyan ígéretesek,^{41,42} de a retenciós tulajdonságok lényegesen eltérnek a szilikagél alapú töltetekhez képest, ezért a gyógyszeripar még „nem fogadta el” ezt a típusú állófázist. Néhány szerves polimer és

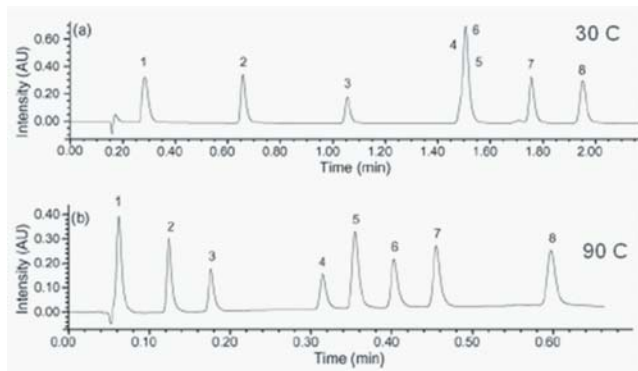
grafit alapú állófázis is igen jó hőstabilitási tulajdonságokat mutat, akár 150-200 °C-ig is alkalmazhatóak.⁴³

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

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (17)$$

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

A mérsékelt nagyhőmérsékletnek (60-90 °C) igen nagy jelentősége lehet az UHPLC és HTLC technikák kombinálásakor. A kis szemcsés töltetek alkalmazása megemelt hőmérsékleten nagyon ígéretes lehet, hiszen a viszkozitást csökkentjük, azaz nagyobb térfogatárammal is tudunk dolgozni. Szerencsés esetben a szelektivitás is kedvezően alakulhat a magasabb hőmérsékleten, ekkor jelentősen lefaraghatunk az elválasztás idejéből. Erre mutat egy példát a 12. ábra.⁴⁴



12. Ábra. kismolekulás gyógyszerhatóanyagok elválasztása 1.7 μm -es tölteten 30, illetve 90 °C-on.

3. Elvárások egy gyors kromatográfias mérésekre alkalmas készülékkel szemben

Az előző fejezetben az elméleti lehetőséget vizsgáltuk meg, hogy hogyan növelhető az elemzés gyorsasága. Ebben a részben azt vizsgáljuk, hogy műszer oldalról nézve milyen követelmények vannak a különböző lehetőségek megvalósítására. Ennek megítéléséhez abból kell kiindulnunk, hogy a kromatogramon mért zónaszélesedés az két fő részből tevődik össze, az egyik a kolonna megszabta, a másik a kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások. Ezért a kromatogramon mért zónaszélesedés (variancia) tehát a kolonnán és azon kívüli hatásokból tevődik össze:

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{ec}}^2 + \sigma_{\text{col}}^2 \quad (18)$$

ahol a σ_{col}^2 és a σ_{ec}^2 jelentik a kolonnán és a kolonnán kívüli zónaszélesedést.

Az adagolóban és az összekötő vezetékben azért van zónaszélesedés, mert az áramlás lamináris és a sebességi profil parabolikus, továbbá az egyes rétegek közötti keveredés elhanyagolható. Így a molekulák, melyek a cső falához közelebb vannak körülbelül fele sebességgel haladnak, mint a középső rétegben lévők. Ez az áramlási csúcscsúszperzió. A detektorban ehhez járul az áramlási sebesség változása is, és ha az elektronika lassú, akkor pedig un. alul mintavételezett jelet kapunk és nem megfelelő számú pontból épül fel a kromatográfias csúcs. Megállapodás szerint az oszlopon kívüli zónaszélesedés összege nem lehet nagyobb, mint a kolonnán mért csúcscsúszperzió tizede.

$$\sigma_{\text{ec}}^2 \leq 0,1 \cdot \sigma_{\text{col}}^2 \quad (19)$$

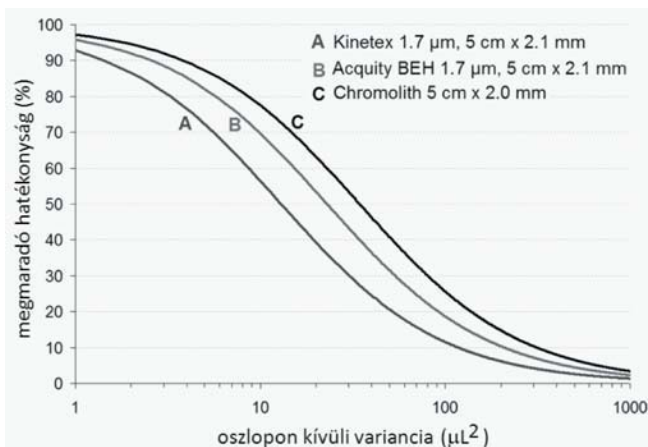
A csúcscsúszperzió (varianciát) térfogat-négyzet vagy idő-négyzet dimenziókkal tudjuk kifejezni. Minél kisebb a kolonna térfogata annál kisebb az eluálódó csúcs varianciája. Tehát minél kisebb a kolonna térfogat és minél jobb a kolonna hatékonysága, úgy válik egyre kritikusabbá az oszlopon kívüli csúcscsúszperzió hatás. Bevezethetjük a látszólagos tányérszám (N_{app}) fogalmát, ami felírható a kolonna által teljesített saját tányérszám (N_{col}) és az oszlopon létrejövő illetve azon kívüli varianciák viszonyával:

$$N_{\text{app}} = N_{\text{col}} \frac{1}{1 + \frac{\sigma_{\text{ec}}^2}{\sigma_{\text{col}}^2}} \quad (20)$$

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

$$E_r = 100 \cdot \frac{\sigma_{\text{col}}^2}{\sigma_{\text{total}}^2} \quad (21)$$

A következő példában 3 darab 5 cm-es kis átmérőjű (2 illetve 2,1 mm) korszerű kolonnák megmaradó hatékonyságát mutatjuk be az oszlopon kívüli variancia függvényében.⁴⁵ A 13. ábráról jól látszik, hogy ilyen kolonna dimenziókhöz, a készülék oldalról 1-2 μL^2 variancia engedhető meg. Hagyományos HPLC készülékek oszlopon kívüli csúcs varianciája általában $\sigma_{\text{ec}}^2 = 40-200 \mu\text{L}^2$ közé esik, míg az UHPLC készülékek általában $\sigma_{\text{ec}}^2 = 4-9 \mu\text{L}^2$ -tel járulnak hozzá a kromatográfias csúcs szélesedéséhez.⁴⁵ Azok a készülékek, amelyeket a gyártók mind a hagyományos HPLC-s, mind pedig az UHPLC-s elválasztásokhoz javasolnak (un. hibrid készülékek) általában $\sigma_{\text{ec}}^2 = 10-40 \mu\text{L}^2$ -tel járulnak hozzá a csúcs szélesedéséhez.⁴⁵ A tavaly megjelent legújabb fejlesztésű UHPLC készülék (Waters UPLC I-Class) oszlopon kívüli varianciája, a mérés körülményeitől függően $\sigma_{\text{ec}}^2 = 0,5-4 \mu\text{L}^2$ közé esik. Tehát a legkorszerűbb UHPLC készülékeket alkalmazva is jelentős hatékonyságot veszthetünk, nem tudjuk kihasználni a jelenlegi kolonna technológia valódi lehetőségeit. Jó kompromisszumnak tűnik a 3 mm-es átmérőjű kolonnák használata. Persze ekkor az analízis idő rovására tudjuk csak a hatékonyságot fokozni.



13. Ábra. Kis méretű korszerű kolonnák megmaradó hatékonysága az oszlopon kívüli zónaszélesedés (variancia) függvényében.

Összességében megállapíthatjuk, hogy jelenleg a kolonnatechnológia elhaladt a készülék fejlesztések mellett, és elsősorban új, még kisebb oszlopon kívüli térfogatokkal rendelkező készülékek fejlesztése a cél annak érdekében, hogy a meglévő kolonnákat megfelelően tudjuk üzemeltetni.

4. Összefoglalás

A cikk a jelenlegi leghatékonyabb kolonnák lehetőségeit és a gyors folyadékkromatográfia fejlesztési irányait foglalja össze. A kolonna térfogat csökkentése, a mozgófázis sebességének növelése és a kinetikai hatékonyság fokozása számos lehetőséget kínál az elválasztások gyorsítására. Emellett a kolonna permeabilitás növelése és a készülékek nyomás teljesítményének további fokozása mind hozzájárulhatnak az elemzési idők jelentős csökkentéséhez. A jelenkori kolonna-technológia forradalmában négy technika vetélkedik folyamatosan egymással. Nevezetesen az 1) egyre kisebb szemcséjű teljesen porózus töltetek, 2) héjszerkezetű töltetek, 3) monolit kolonnák és a 4) nagyhőmérsékletű elválasztások. Legsikeresebbnek az 1,7-2 μm-es teljesen porózus és a 2,6-2,7 μm-es héjszerkezetű töltetek bizonyulnak. Az 5 cm hosszú, 2,1 mm belső átmérőjű kolonnákkal az elemzési idő ma 1-5 perc közé esik, miközben akár 17000 tányérszám is elérhető.

Ma, az UHPLC készülékek segítségével akár 1000-1300 bar nyomáson is dolgozhatunk. Azonban, ezeknek a rendkívül hatékony kolonnáknak a valódi teljesítménye (felbontó ereje) mégsem használható ki, mert a készülékek oszlopon kívüli térfogatai nagyban lerontják a kolonna látszólagos hatékonyságát. Jelenleg a kolonnatechnológia elhaladt a készülék fejlesztések mellett, és elsősorban új, még kisebb oszlopon kívüli térfogatokkal rendelkező készülékek fejlesztése a cél annak érdekében, hogy a meglévő kolonnákat megfelelően tudjuk üzemeltetni.

Hivatkozások

- van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J.; Klinkenberg, A. *Chem. Eng. Sci.* **1956**, *5*, 271-289.
- Neue, U.D. *HPLC Columns*, Wiley-VCH: New York, **1997**.
- Neue, U.D.; Kele, M. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149*, 236-244.
- Swartz, M.E.; Murphy, B. *American Laboratory* **2005**, *37*, 22-35.
- Swartz, M.E. *J. Liquid Chrom.* **2005**, *28*, 1253-1263.
- Fekete, Sz.; Fekete, J.; Ganzler, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 64-71.
- Gritti, F.; Farkas, T.; Heng, J.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8209-8221.
- Wang, J.; Li, H.; Jin, C.; Qu, Y.; Xiao, X. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *47*, 765-770.
- Fekete, Sz.; Oláh, E.; Fekete, J. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 57-71.
- Fekete, Sz.; Ganzler, K.; Fekete, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 56-64.
- Horváth, Cs.; Preiss, B.A.; Lipsky, S.R. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1422-1428.
- Horváth, Cs.; Lipsky, S.R. *J. Chromatogr. Sci.* **1969**, *7*, 109-116.
- Kirkland, J.J. *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 218-220.
- Gritti, F.; Cavazzini, A.; Marchetti, N.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 289-303.
- Kaczmarek, K.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4648.
- Gritti, F.; Guiochon, G. *AIChE J.*, AICHE-09-11893.
- Gritti, F.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2012**, 121852, 31-44.
- Cabooter, D.; Fanigliulo, A.; Bellazzi, G.; Allieri, B.; Rottigni, A.; Desmet, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7074.
- Ruta, J.; Zurlino, D.; Grivel, C.; Heinisch, S.; Veuthey, J.L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 221-231.
- Fekete, Sz.; Berky, R.; Fekete, J.; Veuthey, J.L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1236*, 177-188.
- Fekete, Sz.; Berky, R.; Fekete, J.; Veuthey, J.L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1252*, 90-103.
- Hjertén, S.; Liao, J.L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, *473*, 273.
- Svec, F.; Frechet, J.M. *J. Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820.
- Gusev, I.; Huang, X.; Horvath, C. *J. Chromatogr. A* **1999**, *885*, 273.
- Minakuchi, H.; Nagayama, H.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **1998**, *797*, 121.
- Hormann, K.; Müllner, T.; Bruns, S.; Hölzel, A.; Tallarek, U. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1222*, 46-58.
- Frieder, A.; Trojer, L.; Huck, C.W.; Bonn, G.K. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7747-7754.
- Levkin, P.A.; Eeltink, S.; Stratton, T.R.; Brennen, R.; Robotti, K.; Yin, H.; Killeen, K.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1200*, 55-61.
- Li, Y.Y.; Tolley, H.D.; Lee, M.L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9416-9424.
- Sneekes, E.J.; Hun, J.; Elliot, M.; Ausio, J.; Borchers, C. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2691-2698.
- Holz, G.; Oberacher, H.; Pitsch, S.; Stutz, A.; Huber, C.G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 673-680.
- Oberacher, H.; Parson, W.; Oefner, P.J.; Mayr, B.M.; Huber, C.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 510-522.
- Desmet, G.; Clicq, D.; Gzil, P. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4058-4070.
- Oláh, E.; Fekete, Sz.; Fekete, J.; Ganzler, K. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3642-3653.
- Fekete, Sz.; Fekete, J. *Talanta* **2011**, *84*, 416-423.
- Antia, F.D.; Horvath, Cs. *J. Chromatogr.* **1988**, *435*, 1.
- Chen, H.; Horváth, Cs. *J. Chromatogr.* **1995**, *705*, 3.
- Greibrokk, T.; Andersen, T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 743.
- Fields, S.M.; Ye, C.Q.; Zhang, D.D.; Branch, B.R.; Zhang, X.J.; Okafe, N. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 197.
- Heinisch, S.; Rocca, J.L. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 642.
- Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCornich, A.; Carr, P.W.; Pert, I. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 1.

42. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; Zhao, J.; McNeff, C.V.; McCormick, A.; Carr, P.W.; Part, I.I. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 31.
43. Neff, C.Mc.; Zigan, L.; Johnson, K.; Carr, P.W.; Wang, A.; Weber-Main, A.M. *LC GC* **2000**, *18*, 514.
44. Nguyen, D. T.T.; Guillarme, D.; Heinisch, S.; Barrioulet, M.P.; Rocca, J.L.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1167*, 76–84.
45. Fekete, Sz.; Fekete, J. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5286-5291.

Summary

This paper presents the possibilities of recent very efficient columns in fast liquid chromatographic separations. Decreasing the column dimensions, increasing the mobile phase velocity and the kinetic efficiency are the obvious ways of speeding up the separations. However, improving the column permeability and the pressure capability of liquid chromatographic instrumentations, are also of interest. The current rivalling approaches are the use of 1) very fine porous particles, 2) superficially porous particles, 3) monolithic columns and 4) elevated temperature. Among the fast liquid chromatographic techniques, sub-2 μm and core-shell

particles are the most popular and widespread ones today. Using 5 cm long, narrow bore very efficient columns enables to cut the analysis time into 1-5 minute interval.

The introduction of current UHPLC instrumentations now allows working at 1000-1300 bar. Extra-column band spreading also affects the measured performance (apparent plate number) of very efficient columns, especially for short columns with an internal diameter smaller than the classical standard of 4.6 mm. Today it is not possible to utilize the potential of these very efficient small columns.