

# Spektrofotometria és spektrofluorimetria alkalmazása a gyógyszeranalitikában

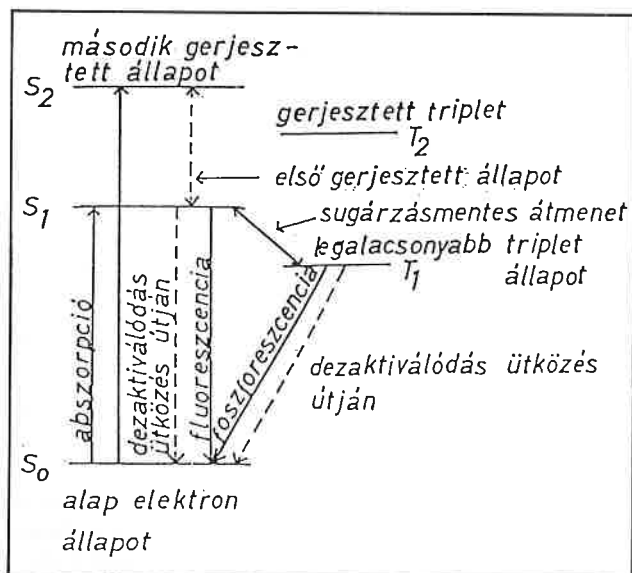
Dr. Milch György

Az ultraibolya és látható tartományú spektrofotometria és spektrofluorimetria történetének áttekintése számos érdekességet tartalmaz, részletes visszatekintésnek azonban itt most sajnos nincs helye. Az századforduló táján indult jelentős fejlődésnek azoknak az optikai műszereknek a kifejlesztése, amelyek a mai korszerű spektrofotométerek és spektrofluoriméterek őseinek tekinthetők. E rövid összefoglaló áttekintésben az ultraibolya és a látható spektrofotometria és spektrofluorimetria gyógyszeranalitikai alkalmazásáról kívánunk képet adni.

Ismeretes, hogy a gyógyszeranyagok nagy többsége csaknem színtelen, vagy fehér kristályos por, kevés köztük a színes anyag. Az a törvényszerűség, hogy valamely színes anyag alkalmas oldószerezrel készült oldatának színintenzitása, rétegvastagsága és koncentrációja között egyenes arányú összefüggés áll fenn, már viszonylag régóta ismert. A *Bouguer-Lambert-Beer* féle törvény értelmében (a három kutató ezt egymástól függetlenül állapította meg) a mért oldat koncentrációja, a rétegvastagság és a fényáteresztésből levezethető abszorbancia értéke között egyenes arányú összefüggés áll fenn. Színes oldatok fotometriás mérésére lényegesen hosszabb ideje van lehetőség, mint ultraibolya spektrofotometriás mérésekre és ezek korántsem korlátozódtak eleve színes anyagokra. Alkalmazásuk köre színes származékok képzésével és e származékok fényabszorpciójának mérésével jelentősen kibővült.

Megállapíthatjuk azonban, hogy a spektrofotometriás mérések ultraibolya tartományra való kiterjesztése hozta e területen a valóban nagy fejlődést.

Csupán egészen vázlatos áttekintést mutatunk be az elektromágneses sugárzás tartományairól, amelyből ezúttal tulajdonképpen csak egy kis résszel, az ultraibolya és látható spektrumtartományról foglalkozunk. Az ábrával is csak vázlatos formában szemléltetjük a spektrofotometria és a spektrofluorimetria energiaszintjeit, az elektrogerjesztési (abszorpció) és a lumineszcenciás (fluoreszcenciás és foszforeszcenciás) emissziós spektrumok létrejöttét.



## Spektrofotometriai elemzések

A spektrofotometriát a gyógyszeranalitikában többféle célra alkalmazzák. Így azonossági vizsgálatként, szennyezés(ek) vizsgálatára, tartalmi meghatározásként, stabilitási vizsgálatához, szerkezetfelfedező módszerként.

Lássuk először is az **azonossági vizsgálat**ként történő alkalmazást. Ha a spektrum csupán egyetlen fényelnyelési maximumot mutat, kevésbé alkalmas biztos azonossításra. Ha két, vagy több maximummal rendelkezik,

erre már sokkal alkalmasabbá válik, hiszen az abszorpciós maximumok, minimumok hullámhossza és a maximumok és minimumok abszorbancia értékeinek hányadosai már megbízható felvilágosítást adhatnak az anyag azonosságára. Segítségét jelenthetnek egyes színreakciók is, ezek azonban ritkán jellemzőek egyetlen gyógyszermolekulára, inkább egy-egy molekulacsoportra; egyéb reakciókkal, vizsgálati módszerekkel társítva azonban jó szolgálatot tehetnek.

**Tisztasági vizsgálatok** céljára a spektrofotometriás vizsgálatok ma már ritkán jelentenek egymagukban megfelelő megoldást. Egyre jobban előtérbe kerültek a *kromatográfiás elválasztáson* alapuló módszerek, amelyek detektálásra gyakran alkalmaznak mind spektrofotometriás, mind spektrofluorimetriás módszereket. Az utóbbi években ezek a kapcsolt módszerek, amelyeket az angolszász nomenklatúra *hyphenated technics* néven ismer, egyre kiterjedtebb alkalmazást nyernek. Ezek az uralkodóak a szerkezetfelfedési és stabilitásvizsgálati módszerek során is, amelyek céljára a spektrofotometriás és spektrofluorimetriás módszerek egymagukban csak ritkán alkalmasak.

**Tartalmi meghatározás** céljára is gyakran alkalmaznak spektrofotometriás módszereket, mivel elég egyszerűen kivitelezhetők és pontosságuk is megfelelő. Jól beváltak nemcsak gyógyszeranyagok, hanem adagolási formák hatóanyagtartalmának illetve hatóanyagai tartalmának meghatározására is, bár itt gyakran kell számolni a kioldódó segédanyagok zavaró matrixhatásával, vagy éppen a hatóanyagok egymás jelenlétében történő meghatározásának feladatával. Ez utóbbiak érdekes és fontos feladatot jelentenek az analitikus számára. Az említett zavaró matrixhatás általában úgy jelentkezik, hogy az ezt okozó anyagok megnövelik a hatóanyagtartalomhoz rendelhető abszorbancia értéket (és ezzel a reálisnál magasabb hatóanyagtartalmat mutatnak), mégpedig úgy, hogy az alacsonyabb hullámhosszak felé haladva a háttérabszorpció értéke – bár nem nagy mértékben – de többé-kevésbé egyenletesen növekvő értékeket mutat. Ide tartozik az a körülmény is, hogy a tablettából készített oldószerez (pl. vizes, 0,1 N sósav, metanolos, etanolos stb.) kivonatot meg kell szűrni. Analitikai szempontból tekintve erre a legalkalmasabb az üvegszűrő alkalmazása, viszont közismert, hogy a kioldódó tisztítása (gondoljunk sorozatvizsgálatokra) idő- és munkaigényes feladat. Kvantitatív analitikai célokra szolgáló szűrőpapírok alkalmazása azért zavaró, mert az alacsonyabb hullámhosszak felé haladva 260 nm alatti hullámhossztartományban megnő a szűrőpapírból kioldódó ligninek fényelnyelést növelő hatása. Ennek kiküszöbölése, hasonlóan a kioldódó segédanyagok hatásához, annál bonyolultabb feladat, minél magasabb a zavaró fényelnyelés értéke. Tapasztalataink szerint igen jól beváltak e célra az üvegszűrő szűrőpapírok, mert egyrészt megfelelő tisztaságú oldatot biztosítanak, másrészt a kioldódó zavaró hatás lényegesen alacsonyabb, biztosabban, pontosabban kiküszöbölhető, mint a kvantitatív analitikai szűrőpapír által okozott, lényegesen nagyobb mértékű zavaró hatás.

## A zavaró hatások csökkentése

Ennek kiküszöbölésére többféle módszer is ismeretes. Ilyenek: a háttérabszorpció kiküszöbölése több hullámhosszon való méréssel, oldószerezhatásra, illetőleg pH-változtatásra érzékeny spektrumú anyagok esetében a *differencia spektrofotometria* és különösen az utóbbi két évtized eredményei alapján a *derivatív spektrofotometria*.

A többkomponensű rendszerek esetében is több lehetőség áll rendelkezésre az alkotórészek meghatározására. Ilyenek: a két és/vagy több hullámhosszon való mérés, ortogóná:is polinómak alkalmazása, derivatív spektrofotometria, számítógéppel támogatott spektrofotometria. E módszerek elvileg több (négy-, öt-, sőt még több) komponensű rendszerek alkotórészeinek meghatározására is alkalmasak, a valóságban azonban 2-3 alkotórésznél több meghatározására csak a számítógéppel támogatott spektrofotometria alkalmazása javasolható. Különösen nagymértékben vonatkozik ez azokra az esetekre, amikor az alkotórészek spektrumai nemcsak átlapolják egymást kisebb-nagyobb mértékben, hanem – legalábbis esetenként –, teljesen átfedik egymást. Ilyen esetekben csak a

számítógéppel támogatott spektrofotometria nyújthat előzetes elválasztás nélkül is elfogadható eredményt.

A derivatív spektrofotometria egyik tipikus esete annak, hogy nagyrészt az elektronika rohamos fejlődésének köszönheti gyors elterjedését, egyre kiterjedtebb alkalmazását, bár az is igaz, hogy eredete ennél jóval korábbi időkre tehető. Már sok évtizeddel ezelőtt tanították az egyetemeken és alkalmazták a gyakorlatban a matematikai deriválást nehezen kiértékelhető analitikai jelek pl. elhúzódó potenciometriás titrálási görbék egyenértékpontjának kiértékelésére. Az első derivatív spektrofotometriás próbálkozások két monokromátoros rendszeren, tehát optikai megoldáson alapultak, amellyel első derivált spektrumot lehetett képezni. Ezt azonban csakhamar kiszorították az első, második, harmadik, negyedik, n-edik derivált spektrum generálására alkalmas algoritmusok, amelyekkel egyrészt különböző típusú matrixhatásokat küszöböltek ki eredményesen, másrészt két-három-komponensű rendszerek alkotórészeit határozták meg eredményesen.

## Az elválasztási technika szerepe

Az utóbbi évtizedekben a spektrofotometria alkalmazási köre jelentős változáson ment át. Az említett gyógyszeranalitikai alkalmazási területek továbbra is fennállnak, de egyre fokozottabb mértékben előtérbe kerülnek az elválasztási technikákkal, így a *vékonyréteg-kromatográfiával*, a nagy hatékonyságú *folyadék-kromatográfiával* és legújában már a *kapillár elektroforézissel* kapcsolatos módszerek, amelyekben a spektrofotometria és a spektrofotometria egyaránt a kimutatás és igen gyakran a mennyiségi meghatározás alapját jelentik. Külön hangsúlyt érdemel a diódasor-dektoros spektrofotométerek kereskedelmi forgalomba kerülése, amely pl. a nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfiával kapcsolva és kombinálva óriási lehetőségeket kínál az analitikusnak és a szerkezet-felderítőnek egyaránt.

Külön szólnunk azokról a fontos molekulacsoportokról, amelyek nem rendelkeznek saját fényelnyeléssel. Ilyenek pl. az alifás aminok, aminosavak, cukrok. Ezek és számos egyéb molekula kimutatására, tartalmi meghatározására származékképzésen alapuló módszereket alkalmaznak. E származékképző reagensek egy része „lombik-reakcióban” is alkalmazható, mások viszont, mivel a reagensek egymagukban fényelnyelő és esetenként fluoresszkáló sajátságúak, csak elválasztástechnikai módszerrel kombinálva alkalmazhatók, hiszen a származékképző feleslegét a képződött származéktól el kell választani, mert enélkül zavarná a célvegyület meghatározását.

## Spektrofluorimetriás módszerek

A spektrofotometriás eljárásokhoz elengedhetetlen a  $\pi$ -elektronrendszer jelenléte, ez a gyógyszermolekulák széles körében megtalálható, vagy kialakítható. Amíg a spektrofotometriás elektrongerjesztési rendszer fényáteresztésen, illetve az abból leszármaztatható fényabszorpció, illetve a vékonyréteg-kromatográfia értékelése során fényreflexión alapulnak, addig a spektrofotometriás módszerek alapját az képezi, hogy a gerjesztett állapotba jutott elektronok fénykibocsátás (emisszió) alakjában térnek vissza alapállapotukba, amint az a *vázlatos ábrán* is látható. Ez azonban egyáltalán nem az egyetlen módja az alapállapotba való visszatérésnek, márpedig lumineszcenciás, ezen belül pedig fluoresszcenciás jelenség csak akkor észlelhető, ha az alapállapotba visszatérés fénykibocsátással megy végbe.

Így a spektrofotometria alkalmazási köre természetesen szűkebb, mint a spektrofotometriáé, hiszen egyrészt nincs olyan molekula, amely fluoresszcenciát mutatna anélkül, hogy UV-spektrummal rendelkezne. Ezzel szemben nagyszámú olyan gyógyszermolekula létezik, amelynek UV-spektruma van, mérhető fluoresszcenciája azonban nincs. Természetesen származékképzésen alapuló módszerekkel a fluoresszcens vegyületek köre jelentősen kiterjeszhető, de így is jóval szűkebb a fluoresszcenciás módszerrel mérhető vegyületek köre. A fluoresszcenciás mérések érzékenysége az esetek nagy többségében jóval érzékenyebb, mint a spektrofotometriás módszereké. Bár ez alól vannak kivételek, a spektrofotometriás módszerek „átlagosan” 2–3 nagyságrenddel érzékenyebbek, mint a spektrofotometriás módszerek, de esetenként ennél nagyobb különbségek is észlelhetők. Ez szinte predestinálja a spektrofotometriás módszert a spektrofotometriás módszerek tárgyalás során már említett kapcsolt módszerekben való alkalmazásra, hiszen az elválasztástechnikai módszerek gyakran eredményezik igen csekély mennyiségű anyagok elválasztását, amelyek kimutatásához, mennyiségi meghatározásához érzékeny eljárásra van szükség.

Egyes jól fluoresszkáló (kedvező kvantumhasznosítási tényezővel rendelkező) vegyületek (pl. a kinin-sók híg kénsavas oldatai) annyira intenzíven fluoresszkálnak, hogy ezek szinte közismerten kiválóan alkalmazhatók azonosítási vizsgálat céljára, de számos egyéb analitikai feladat megoldására is. Más vegyületek fluoresszcens sajátságai ezeknél jóval szerényebbek. Hogy azonban ezek köre így sem elhanyagolható, azt jól mutatja az alábbi kis felsorolás, amely – talán kissé önkényesen kiragadva – felsorol néhány olyan, jól fluoresszkáló vegyületcsaládot, amelyhez számos gyógyszermolekula tartozik, mégpedig:

- fenol és származékai
- szalicilsav és származékai
- naftalin és származékai
- szulfonamidok
- antracén és származékai
- Kinolin és származékai (kinin-sók, klorokin és származékai)
- izokinolin és származékai
- benzimidazol és származékai
- barbitursav származékok
- morfin és származékai
- tetraciklin és származékai
- vízoldható vitaminok (különös tekintettel a B-vitamin csoportra)
- zsírolható vitaminok

★

Ez a kis összefoglaló megkísérelt betekintést nyújtani e rendkívül hasznos és érdekes gyógyszeranalitikai módszerekbe. Remélem, e kísérlet nem maradt eredménytelen.

## Irodalom

1. Görög Sándor: Spektrofotometriás gyógyszeranalízis. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993.
2. Szalay L.–Damjanovich S.: Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993.
3. Láng L.: Absorption Spectra in Ultraviolet and Visible Region I–XXIV. kötet. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1959–1982.
4. Organic Electronic Spectral Data, Vol I–XXVII. Wiley – Interscience, New York, 1960–1991.
5. Dibbern H. W.: UV – und IR-spectrum wichtiger pharmazeutischer Werkstoffe. I–III. Edition Cantor. Aulendorf 1980.

951 031 155



**AZ EUROLAB SZERKESZTÉSÉBEN ÉS KIADÁSÁBAN** megjelent a *Directory of European testing and analytical laboratories 1994* című kiadvány, amely tartalmazza a nemzeti EuroLab szervezetekbe tömörült, mintegy 1000 laboratóriumra vonatkozó alapinformációkat, szervezeti felépítésükről, személyzetükről, tevékenységükről, mérési és vizsgálati módszerekről és azok alkalmazási köréről a legjellemzőbb tudnivalókat. A kiadvány ezzel segítséget nyújt a laboratóriumok közötti kapcsolatfelvételhez, a tapasztalatcseréhez és a kutatói együttműködés előkészítéséhez, az európai szabványok és irányelvek egységes értelmezéséhez és alkalmazásához. Közli továbbá az EU- és az EFTA-szervezetekre vonatkozó információkat, a rövidítések és betűszavak jelentését. Tartalmazza a vizsgálatokban és az analitikában használatos terminológiákat és definíciókat.

Figyelmükbe ajánljuk még az EuroLab firenzei szemináriumán (1994. április 25–27.) elhangzott több, mint száz előadást tartalmazó kétkötetes kiadványt, amelynek címe:

*Proceedings of the second EuroLab symposium: „Testing for the years 2000”*



## SPEKTROFLUOROMÉTER

A JOBIN YVON/SPEX bemutatja a FLUOROLOG-T2 fluoreszcencia időtartam és állandósult állapotot mérő spektrofluorométert.

A FLUOROLOG-T2 egy teljes körű, minden igényt kielégítő mérő műszert valósít meg egyetlen, rugalmas műszeregyüttesben. Ezzel a rendszerrel a felhasználó picoszekundumos élettartamról állandósult állapotra való átmenetről kaphat információt másodpercek alatt.

A FLUOROLOG-T2-vel tanulmányozható a fluoreszcencia időbeli lecsengése a frekvencia függvényében. Ez a módszer garantálja:

- a folyamatos megvilágítás biztosította nagyfokú érzékenységet
- a kitűnő pontosságot (kereszt korrelációval széles frekvencia-tartományban)
- a könnyű használatot.

A JOBIN-YVON/SPEX ezen új rendszeren kívül gyártja még:

- a FLUOROLOG-2 kutatási szintű spektrofluorométert. Ez modulokból álló rendszer, mely a kutatóknak lehetővé teszi, hogy a legnagyobb teljesítményt érje el érzékenységben, a szórt fény kiszűrésben és felbontásban.
- a FLUOROMAX kompakt spektrofluorométert, amely analitikai és rutin mérésekre egyaránt alkalmazható.

A reflexiós optika és a fotonszámoló érzékelő használatának köszönhetően a JOBIN-YVON/SPEX egy olyan műszert ajánl, mely olyan spektrumokat szolgáltat, amelyeket ebben az ártartományban semmilyen más rendszerrel nem lehet elérni.

## SPEKTROFOTOMETRIA

A SECOMAM, több mint 40 éves szakmai tapasztalat birtokában bemutatja az új UV/VIS több-küvettás spektrofotométert (ANTHELIE) a következő mérési lehetőségekre:

abszorbanciára, T %-ra, koncentrációra, kinetikára, többlépéses kalibrálásra, pásztázásra, deriválásra, zoomra.

Lehetőség 50 módszer tárolására.

Akár 9 mintát is le tud olvasni 30 másodperc alatt.

Ezen műszerről további információt kaphat;  
*keresse fel, kérem a FRANCELAB Standját a MAGYAR REGULA Kiállításon, vagy*  
érdeklődjön: FRANCELAB,  
213 rue de Versailles, 92410 VILLE D'AVRAY (France).  
Fax: (1) 47095822

# A nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) analitikai alkalmazása: biokromatográfia

Dr. Szepesy László\*

## Az elválasztástechnika jelentősége a műszeres analitikában

A kémiai analízis jelentős változáson ment keresztül az utolsó évtizedekben. Az 50-es évektől kezdődően a műszeres analitikai módszerek fokozatosan kiszorították a klasszikus „nedves” módszereket. Az utolsó két évtizedben pedig a különböző elválasztástechnikai elveket alkalmazó műszeres analitikai módszerek gyors elterjedését és térnyerését figyelhetjük meg [1]. Az egyes bonyolultabb ipari gyártási folyamatok, főleg a biotechnológia iparágai nyersanyagának, közbelső- és végtermékeinek minősítése, tisztaságának vizsgálata, továbbá a biológiai folyamatok és a környezet szennyezőinek ellenőrzése csak a nagy hatékonyságú elválasztástechnikai és a nagy érzékenységgel rendelkező detektálási módszerek együttes alkalmazásával végezhető el.

Az elválasztástechnikai módszerek a hajtóerő alapján három fő csoportba sorolhatók.

Kromatográfiában a két heterogén fázis közötti kémiai potenciál-különbség, míg elektroforézisnél a villamos feszültségkülönbség az elválasztás hajtóereje. A harmadik nagy csoport a téráramlásos frakcionálás (Field Flow Fractionation), ahol a térorösség változása (gravitáció, áramlás, villamos erő) a folyamat hajtóereje.

A kromatográfiai módszerek az áramló fázis halmazállapota szerint három csoportba sorolhatók: gázkromatográfia (GC), szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) és folyadékkromatográfia (LC).

Az áramló fázis fizikai jellemzői határozzák meg a módszer hatásosságát, gyorsaságát, teljesítményképességét és alkalmazási területeit. A legnagyobb hatásosság és gyorsaság gázkromatográfiával érhető el, ahol a diffúziós állandó több nagyságrenddel nagyobb, mint a másik két módszernél. Gázkromatográfiával (GC) azonban csak illékony, hőbomlásra nem érzékeny vegyületek vizsgálhatók, ami az összes ismert vegyületnek kevesebb mint 20%-a. A folyadékkromatográfia (LC) bármely folyékony vagy oldatba vihető anyag vizsgálatára alkalmas. A folyadékfázis nagy viszkozitása és sűrűsége következtében azonban a megfelelő áramlási sebesség csak nagy nyomással (100–400 bar) valósítható meg, a diffúziós állandó és ennek következtében a hatásosság lényegesen kisebb, mint a gázkromatográfiánál.

A szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC), közbenső helyet foglal el a gáz- és folyadékkromatográfia között.

A különböző kromatográfiai és elektroforetikus módszerekkel a nemesgázoktól kiindulva a több millió dalton molekulatömegű polimerekig

bezárólag a legkülönbözőbb anyagrendszerek elválaszthatók illetve vizsgálhatók.

A modern analitikai kémia helyzetéről készített tudományterületi felmérések a kromatográfiai módszerek egyre növekvő elterjedését mutatják.

Az 1981–1988. évek közötti időszakban a szerves vegyületek műszeres analitikai vizsgálatában megjelent közlemények 60,8%-a ismeret kromatográfiai módszereket [2]. A környezetvédelmi analitikában az 1986–89 közötti időszakban a kromatográfiai és kapcsolt technikák aránya a különböző típusú környezeti minták vizsgálatában 68–76% között van [3]. A fejlődési trendek a 90-es években a kromatográfiai és rokon módszerek további térhódítását mutatják. A fejlett ipari országokban az összes műszeres analitikai elemzés több mint 60%-át kromatográfiai módszerrel végzik. A gyógyszeriparban és a biotechnológia-iparokban ez az arány 70–80% [4].

A kromatográfiai analitikai módszerek még vázlatos ismertetése is messze meghaladja egy tanulmány kereteit. Ezért itt csak a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia módszereinek általános ismertetésével és egyik legjelentősebb analitikai alkalmazásával, gyógyszer- és biológiai anyagok vizsgálatával foglalkozunk.

## A nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia módszerei

A HPLC készülékek fejlődése és a módszer elterjedése példa nélkül áll a műszeres analitika

történetében. Ez a módszer gyorsasága (5–30 min) és hatásossága ( $N = 10^3$ – $10^5$ ) mellett az alkalmazási lehetőségek széles választékával, az utóbbi években kifejlesztett töltetek és módszerek sokféleségével magyarázható.

A folyadékkromatográfiai módszerek csoportosítását a megoszlási folyamat szerint az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Az egyes módszerek és a nagyszámú különböző típusú és rendeltetésű oszloptöltet ismeretisére itt nincs lehetőség. Az általános trendeket tekintve a 70-es években kifejlesztett és azóta folyamatosan javított minőségű, kémiailag kötött fázisú tölteteket (BP) használnak az elemzési feladatok több mint 90%-ában [5, 6]. Ezen belül a fordított fázisú töltetek aránya mintegy 70–80%. Az ioncserélő töltetek alkalmazása 10–15%. A legutóbbi felmérések szerint jelentősen nő a méret szerinti elválasztásra (SEC) és a királis elválasztásra kifejlesztett töltetek választéka és felhasználása.

A szilika-gél alapú töltetek mellett egyre növekvő arányban alkalmaznak különböző polimer alapú tölteteket (sztirol-divinil-benzol, poliakrilmetakrilát, poliéter, poliakrilamid stb.). Ezeknek a tölteteknek legnagyobb előnye, hogy a teljes pH-tartományban használhatók, míg a szilika-gél alapú töltetek pH 8 felett oldódnak.

Biomakromolekulák vagy más néven biopolimerek (polipeptidek, fehérjék, oligonukleotidok stb.) elválasztására ún. tágpórusú (WP) tölteteket fejlesztettek ki [6, 7]. Ezek általános jellemzője, hogy a pórusátmérő 30–100 (400) nm, a felület hidrofíll réteggel van borítva és ehhez kapcsolódnak a funkciócsoportokat tartalmazó ligandok. Az utolsó években kifejlesztett új bimo-

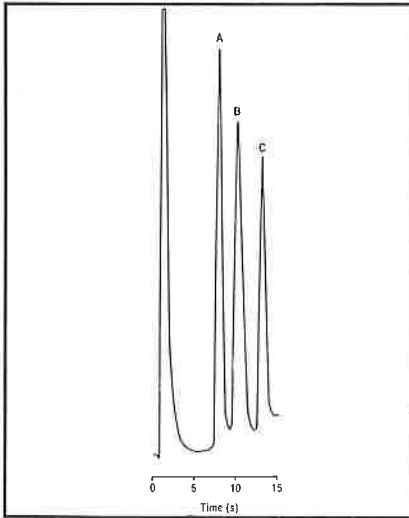
1. táblázat.

Folyadékkromatográfiai módszerek csoportosítása a megoszlási folyamat szerint

Megnevezés	Megoszlási folyamat	Stacioner fázis	Áramló fázis
Folyadék-szilárd kromatográfia (LSC)	Adszorpció	Adszorbens	Szerves
Folyadék-kötött fázisú kromatográfia (LBPC)	Szorpció	Kémiailag kötött fázis	Szerves, vizes
Normál fázis Fordított fázis		Poláris Apoláris	Szerves/apoláris Vizes/poláris
Folyadék-folyadék kromatográfia (LLC)	Megoszlás (oldódás)	Folyadék-fázis (Szilárd hordozón)	Szerves
Kizárásos (SEC) v. Gélkromatográfia (GPC)	Molekulaméret szerinti kizárás	Szabályos pórusszerkezetű szilárd anyag v. gél	Szerves, vizes
Ioncserés kromatográfia (IEC)	Ioncsere	Ioncserélő szorbens	Vizes
Affinitási kromatográfia (AC)	Biospecifikus kötődés	Biospecifikus ligand	Vizes
Fém kölcsönhatási kromatográfia (MIC)	Specifikus kötődés	Fémkelát ligand	Vizes
Immunaflatinitás kromatográfia (IAC)	Immun reakció	Antitest v. antigén	Vizes
Királis kromatográfia	Királis adduktképzés	Királis fázis	Szerves, vizes
		Akirális fázis	Vizes, szerves királis adalék

\* Budapesti Műszaki Egyetem, Kémiai Technológiai Tanszék

dális (perfúzió), hidrogéllal töltött gigapórusú és kis szemcseméretű (1–2 µm) nem porózus töltetekkel [7, 8, 9] az elemzés gyorsasága jelentősen megnövelhető és a nagyságrendű elemzési idő érhető el. Ezek a módszerek már folyamatos üzemellenőrzésre (process kromatográfok) is alkalmasak. Az 1. ábrán fehérjék gyors elválasztását mutatjuk be perfúzió fordított fázisú tölteten.



**1. ábra.** Fehérjék gyors elemzése fordított fázisú kromatográfiával perfúzió tölteten  
Oszlop: 3 cm × 2,1 mm POROS R/M  
Eluens: A 0,1% TFA vízben, B 0,1% TFA acetonitrilben (ACN)  
Grádiens: 20–60% B 0,2 min alatt  
Áramlási sebesség: 5 ml/min  
UV 220 nm  
Csúcsok: A ribonukleáz, B cytochrom C, C β-laktoglobulin

Az elválasztás hatásosságának és gyorsaságának növelése mellett az utóbbi években jelentős előrehaladás történt a kromatográfiai csúcsok pozitív azonosítása és/vagy szerkezetének meghatározása területén. A detektálás érzékenységének és szelektivitásának növelésére számos új detektor fejlesztettek ki, úgymint diódásor (DAD), lézergépesztésű fluoreszcenciás (LIFD), kemilumineszcenciás (CL), új típusú elektrokémiai (EC) és lényezőrást mérő (LSD) detektorokat [10].

Biológiai anyagok, környezetszennyező vegyületek elemzésénél a detektálás érzékenysége és szelektivitása származékkészítéssel (pre-column, post-column) és különböző specifikus reakciók (enzimek, kötő fehérjék, antitestek stb.) segítségével növelhető [11].

A kromatográfia összekapcsolt (hyphenated) spektrometriás technikák műszerei és módszerei is sokat fejlődtek és ma már elérhető áron hozzáférhetőek. LC-MS technikával az újonnan kifejlesztett mintabeviteli és ionizációs módszerekkel (thermospray, electrospray, particle beam, FAB, API stb.) reprodukálható, pontos elemzés végezhető és lehetőség van nagy molekulatömegű biológiai anyagok vizsgálatára is [12]. Szerkezetvizsgálatra az LC-FTIR, LC-FTIR-MS és a legújabb kifejlesztett LC-NMR műszeregyüttesek adnak lehetőséget.

## Biológiai anyagok elválasztása: biokromatográfia

A HPLC az utolsó évtizedben a modern biológiai tudományok legfontosabb eszközévé vált. Az élettudományok valamennyi ágában, a kutatás, fejlesztés és termelés minden területén nélkülözhetetlen. A biológiai folyamatok megismerése és leírása, számos új biológiai aktív termék kifejlesztése a HPLC alkalmazása nélkül nem lett volna lehetséges.

A 70-es években a gyógyszeripar egyre növekvő minőségi igényei jelentősen hozzájárultak a HPLC módszerek és töltetek sokrétű fejlesztéséhez. A 80-as években a biotechnológiai iparok kifejlődése jelentette a fő hajtóerőt és ez a fejlődés a 90-es években is töretlenül folytatódik.

Az angolszász irodalomban Biochromatography gyűjtőnévvel foglalják össze a biológiai anyagok és termékek elválasztására alkalmazott kromatográfiai módszereket.

A biokromatográfiai módszerek csoportosítására általános séma nem ismert és az egyes területek átlapolása következtében nem is igen képzelhető el. Az analitikai módszerek áttekintésének megkönnyítésére röviden az alábbi területekkel foglalkozunk:

- gyógyszeripari alkalmazás
- terápiás drogok vizsgálata
- biotechnológiai alkalmazás
- biokémiai és biológiai folyamatok vizsgálata

### Mintaelőkészítés

Az elemzési módszerek ismertetése előtt röviden összefoglaljuk a mintaelőkészítés módszereit [13–15]. Minthogy mind a gyógyszeripari alapanyagok és termékek, mind pedig a biológiai és biotechnológiai minták nagyszámú, különböző típusú és méretű vegyületeket tartalmaznak, a kromatográfiai elemzés előtt a minták megfelelő tisztítására, adott esetben a kis koncentrációban lévő komponensek dúsítására van szükség. A nemkívánatos szennyezők eltávolításával jelentősen megnő az elemzés reprodukálhatósága és pontossága, az elválasztás szelektivitása, a kimutatási határ és nem utolsósorban a kolonna élettartama.

Az általánosan használt módszerek mellett a minta előkészítésére kromatográfiai elemzéshez főleg az alábbi módszereket használják.

**Szilárd halmazállapotú minták előkészítésére:**

- folyadék extrakciót (Soxhlet, Soxtec, ultrahang, mikrohullám) és
- szuperkritikus fluid extrakciót (SFE) használnak.

**Folyadékminták előkészítésére:**

- kicsapatást (só, oldószer, polimer),
- centrifugálást,
- ultraszűrést,
- dialízist,
- folyadék-folyadék extrakciót (LLE),
- géliszűrést,
- szilárd fázisú extrakciót (SPE),
- gél elektroforézist és
- izoelektromos fókuszálást stb. használnak.

Az utóbbi években a szakaszos mintaelőkészítési módszerek helyett egyre jobban terjednek a folyamatos, automatizálható módszerek, pl. SFE, SPE alkalmazása. A kereskedelmi for-

galomban kapható nagyszámú különböző típusú tölteten a mintaelegy komponensei méretük, illetve polaritásuk és szerkezetük alapján elválaszthatók, illetve dúsíthatók.

### Gyógyszeripari alkalmazás

A gyógyszeripar területén egyre nő a HPLC módszerek jelentősége és elterjedése a különböző analitikai feladatok megoldására. A széles körű elterjedést jelentősen segítették különböző nemzeti és nemzetközi szervezetek (FDA, EPA, WHO, FAO), majd ezekhez kapcsolódóan a gyógyszerkódyvek és szabványtervezetek előírásai és ajánlásai.

A gyógyszeranalitikai feladatok rendkívül sokrétűek, a gyógyszeralapanyag-gyártás kiindulási anyagainak (növényi extraktok, állatszerv-kivonatok stb.) vizsgálatától kezdve az alapanyagok, intermedierek, végtermékek és készített gyógyszerkészítmények vizsgálatáig terjednek [16–18]. Új gyógyszerkészítmények fejlesztésénél ehhez járulnak még a farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok.

Az elemzési feladatok célja is jelentősen eltérő igényt támaszt a módszerrel szemben. Ez a hatóanyagtartalom meghatározása mellett tisztaságvizsgálatot, a szennyező vegyületek minőségének és mennyiségének meghatározását, stabilitás-vizsgálatot és a bomlástermékek meghatározását jelenti.

Az utóbbi években új követelményként jelentkezik az optikai tisztaság bizonyítása, ami az optikai izomerek elválasztását teszi szükségessé. A farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokkal a terápiás drogokhoz kapcsolódóan foglalkozunk.

A HPLC gyógyszeranalitikai alkalmazása még felsorolásszerűen is meghaladja egy tanulmány kereteit.

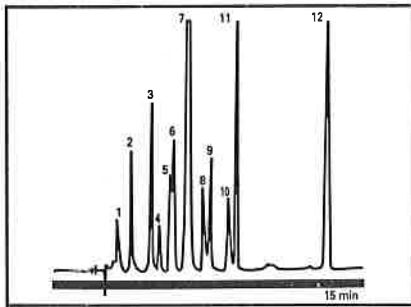
Az Analytical Chemistry két évenként megjelenő összefoglaló közleményeiben (Pharmaceuticals and Related Drugs) 700–800 hivatkozás található [19–21]. Külön összefoglaló jelenik meg a peptidok és a fehérjék vizsgálati módszereiről [22].

Minthogy a biológiai anyagok és gyógyszerkészítmények túlnyomó részben poláris, vizes közegben oldható vegyületek, az analitikai módszerek döntő többsége fordított fázisú (RP) rendszerrel használ. Ionos vegyületek elválasztására az ioncserés kromatográfia (IEC) mellett jelentős mértékben ionpár kromatográfiát (IPC) alkalmaznak fordított fázisú rendszerben. A komponensek detektálását túlnyomórészt UV(DAD) detektorokkal, néhány módszernél elektrokémiai detektorokkal, illetve kapcsolt technikával (LC-MS) végzik.

Az alábbiakban felsoroljuk a legfontosabb vegyületcsoportokat és néhány általános irodalmi hivatkozást [19–21, 23–34].

- Alkaloidok (tropán, ergot, opium, cinchona, xantin stb.).
- Antibiotikumok (Cefalosporinok, penicillinek, sztreptomocinek, tetraciklinek, szulfonamidok, króramfenikol stb.).
- Fájdalomcsillapítók, lázcsillapítók (aszpirin, amidopirin, phenazon, acetaminofen stb.).
- Gyulladásgátlók (indometacin, fenilbutazon, fenacetin stb.).
- Antihisztaminok
- Prostaglandinok

- $\beta$ -blokkolók
- Szteroidok
- Vitaminok (vízoldható, zsírolható)



**2. ábra.** Gyógyszerkészítmény hatóanyagainak elválasztása fordított fázisú kromatográfiával.  
Oszlop: 25 cm  $\times$  0,46 mm Vydac C18  
Eluens: A 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 4  
B ACN  
Grádiens: 20–100% B 15 min alatt  
Csúcsok: 1 oldószer, 2 barbital, 3 primidon, 4 fenacetamid, 5 szennyezés, 6 fenobarbital, 7 fensuximid, 8 mfenitoin, 9 etotoin, 10 metsuximid, 11 acetazolamid, 12 diazepam

A 2. ábrán példaként bemutatjuk görcsoldók elválasztásának kromatogramját C18 oszlopon.

## Terápiás drogok vizsgálata

A HPLC különösen alkalmas biológiai mátrixokban terápiás gyógyszerek és metabolitjaik elválasztására és mennyiségi meghatározására. Új gyógyszerek fejlesztésénél és tesztelésénél a farmakokinetikai vizsgálatok és összeférhetőségi tesztek a legtöbb esetben csak HPLC-vel végezhetőek.

Klinikai vizsgálatokban a gyógyszerek lebomlásának és kiürülésének ellenőrzése a kis mintamennyiség és a vegyületek igen alacsony koncentrációja miatt csak megfelelő mintaelőkészítési és nagy hatékonyságú elválasztás együttes alkalmazásával érhető el. A HPLC módszer nagy előnye, hogy megfelelően automatizálható mintaelőkészítési módszerrel (SPE), automatikus mintaadagolóval nagyszámú minta folyamatos analizésére használható. Az elemzési adatok pontossága és megbízhatósága megfelelő kalibrációs görbék felvételével és az adatok folyamatos statisztikai értékelésével biztosítható.

Az irodalomban rutin módszereket ismertettek asztmaellenes (teofilin, koffein stb.) anti epilepsziás (primidon, fenobarbital, karbazepim stb.) antiaritmiás (quinidin, dizopyramid, procainamid stb.) szerek és metabolitjaik mennyiségi meghatározására [35–39].

## Biotechnológiai alkalmazás

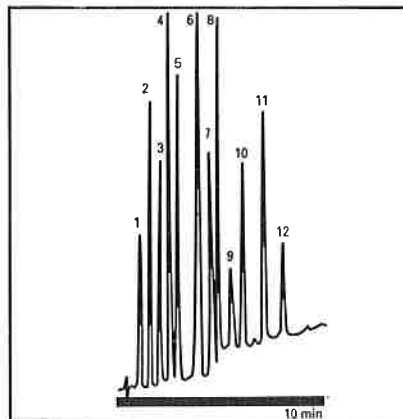
Az utolsó három évtizedben a biológiai tudományok forradalmi fejlődése ment végbe a molekuláris biológia és biokémia területén. A 70-es években egy új iparág fejlődött ki a biotechnológia, mely biológiai organizmusok, rendszerek és folyamatok alkalmazása a termelő és szolgáltató iparokban. Mind a biológiai tudományok, mind a biotechnológia fejlődése szempontjából alapvető és meghatározó jelentőségű a korszerű elválasztástechnikai módszerek, elsősorban a nagy hatékonyságú kromatográfiai és elektroforitikus módszerek kifejlesztése és alkalmazása.

Ma már általánosan elfogadott az a felismerés, hogy a biológiai kutatás és fejlesztés szellemi és költségráfordításának mintegy 80–90%-a az elválasztási (downstream) és azonosítási problémákra fordítódik.

A DNA felfedezése és a korszerű biotechnológia kialakulása, jelentős hatással volt a HPLC fejlődésére. Ez a hatás kölcsönös volt, mert a 70-es években alkalmazott elválasztástechnikai módszerek nem voltak alkalmasak a különböző biológiai folyamatokban keletkező nagyszámú, hasonló szerkezetű, sok esetben igen kis mennyiségben jelenlévő vegyület elválasztására és mennyiségi meghatározására.

A biotechnológiai eljárások során a termékek tisztításán túlmenően a terméktisztaságot és a jelenlévő szennyezések mennyiségét validált módszerekkel kell bizonyítani. Biotechnológiával előállított drogok hatásosságát, toxicitását és a metabolizmus termékeit ugyancsak vizsgálni kell. A HPLC különböző módszereivel lehetőséget nyújt ezen elemzési feladatok hatáson, gyors és jól reprodukálható megoldására. A HPLC-t rutinszerűen használják aminosavak, peptidok és fehérjék meghatározására [22, 40–43]. Nukleinsavak, nukleotidok, oligonukleotidok, nucleosidok ezek bázisainak és adduktjainak vizsgálatára is számos módszert fejlesztettek ki, [41].

Nukleotidok elválasztása és meghatározása anioncserélő töltetű kolonnán végezhető el, mint azt a 3. ábra mutatja.



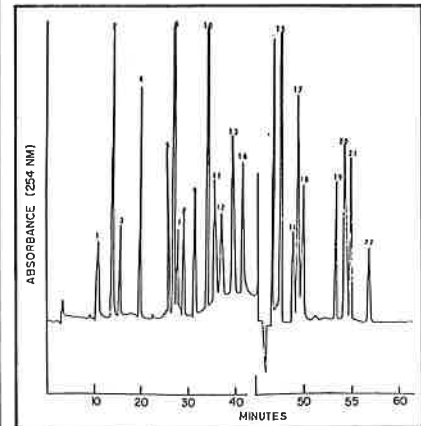
**3. ábra.** Nukleotidok elválasztása ioncserélő kromatográfiával  
Oszlop: 5 cm  $\times$  0,46 mm Vydac 303 NT anioncserélő  
Eluens: A 0,045 M  $\text{NH}_4\text{COOH}$ , pH 4,6  
B 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 2,7  
Áramlási sebesség: 2 ml/min  
Csúcsok: 1 CMF, 2 UMF, 3 AMF, 4 GMF, 5 CDF, 6 ADF, 7 UDF, 8 CTF, 9 GDF, 10 ATF, 11 UTF, 12 GTF

Komplex elegyek elválasztására kombinált kolonnákat javasolnak, mint az a 4. ábrán látható, [44].

A különböző termékek elemzése mellett fehérjék, nukleinsavak stb. szerkezetvizsgálatnál is nélkülözhetetlenek a HPLC módszerek. Így például fehérjék szerkezetének vizsgálatában kémiai vagy enzimes bontás után a peptid összetétel (peptid mapping), majd az aminosav sorrend (szekvenca) meghatározása HPLC-vel történik.

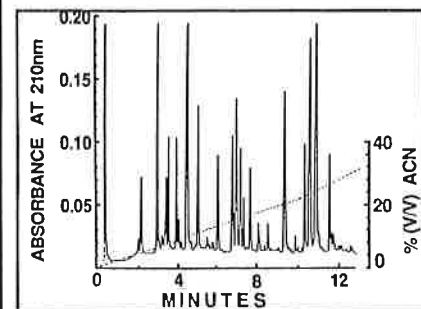
A nagyszámú bomlástermék elválasztása fordított fázisú rendszerben, porózus tölteten

40–80 min. Rövid, nemporózus töltetű oszlopon az elemzés 10–15 min alatt elvégezhető, [9].  $\beta$ -lactoglobulin tripszines bontásával kapott termékek elválasztását az 5. ábra mutatja.



**4. ábra.** Nukleotidok, nukleozidok és bázisok elválasztása fordított fázisú és ioncserélő kromatográfia kombinálásával.  
Oszlop: I. Partisil SAX anioncserélő  
II. Partisil ODS 3 fordított fázisú  
Csúcsok: 1 CMF, 2 TMF, 3 AMF, 4 GMF, 5 XMF, 6 TDF, 7 CDF, 8 ADF, 9 GDF, 10 TTF, 11 CTF, 12 ATF, 13 GTF, 14 XTF, 15 uracil, 16 citozin, 17 hipoxantin, 18 xantán, 19 xantozin, 20 inozin, 21 quanozin, 22 adenozin

A nukleotidok (1–14) elválasztása ioncserélő, a nukleozidok és a bázisok (15–22) elválasztása fordított fázisú oszlopon.



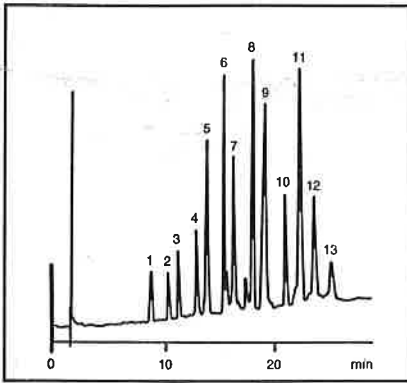
**5. ábra.**  $\beta$ -lactoglobulin tripszines bontásánál képződő termékek elválasztása porózus felületű C18 tölteten.  
Oszlop: 7,5 cm  $\times$  4,6 mm C18, micropellicular  
Eluens: A 5 mM oktil nátrium-szulfát és 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 2,8  
B 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  60% acetonnitrilben (ACN), pH 2,8  
Áramlási sebesség: 1,8 ml/min, T = 80°C

A fordított fázisú (RP) elválasztás igen gyors és hatáson, de sok esetben az erős hidrofób kölcsönhatás és az alkalmazott szerves oldószer következtében a biopolimérek szerkezete megváltozik és részben vagy egészben elvesz biológiai aktivitásuk.

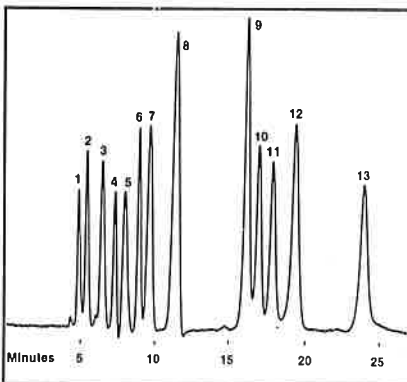
Fehérjék fordított fázisú elválasztásának kromatogramja a 6. ábrán látható.

A hidrofób kölcsönhatású kromatográfiában (HIC) az elválasztást ugyancsak a hidrofobicitás szerint végzik, de lényegesen gyengébb hidrofobicitású tölteten sóoldat jelenlétében a biológiai aktivitás megtartásával, [45].

Az ioncserés kromatográfiában (IEC) az elektrosztatikus kölcsönhatás erőssége szabja



**6. ábra.** Peptidek és fehérjék elválasztása fordított fázisú oszlopon.  
Oszlop: Zorbax Protein Plus  
Eluens: A 0,1% TFA vízben  
B 0,1% TFA acetonitrilben  
Grádiens: 0–60% B 25 min alatt  
Áramlási sebesség: 2 ml/min  
Csúcsok: 1 metionin enkefalin, 2 leucin enkefalin, 3 angiotenzin II., 4 angiotenzin I., 5 ribonukleáz A, 6 Inzulin (BS), 7 citokrom c, 8 lizozim, 9 albumin (BS), 10 melittin, 11 karboanhidráz, 12  $\beta$ -amiláz, 13 ovalbumin



**7. ábra.** Szénhidrátok és aminosavak elválasztása ioncsereűs oszlopon  
Oszlop: 30 cm  $\times$  7,8 mm Aminex HPX-87 C (Bio Rad)  
Eluens: 0,01 M CaSO<sub>4</sub>, pH 5,5  
Áramlási sebesség: 1 ml/min  
Hőmérséklet: 85°C, Detektor: RI  
Csúcsok: 1 melezitóz, 2 maltoz, 3 gliükóz, 4 mannoz, 5 fruktoz, 6 ribitol, 7 glutamin-sav, 8 aszparagin-sav, 9 treonin, 10 szerin, 11 alanin, 12 glutamin, 13 prolin

meg a visszatartást, a biológiai aktivitás itt is kevésbé változik. A 7. ábrán példaként bemutatjuk szénhidrátok és aminosavak elválasztásának kromatogramját ioncsereűs töltetű kolonnán.

A méret szerinti kizárásos kromatográfia (SEC) biopolimérek molekulaméret szerinti elválasztása mellett aggregációs folyamatok és konformáció változás vizsgálatára is alkalmas, [46, 47].

Az affinitási kromatográfia különböző változataival (lásd 1. táblázat) biológiai anyagok elválasztásának és tisztításának legszelektívebb módszere, [48–50]. A forgalomban lévő igen nagyszámú, különböző ligandokat tartalmazó stacionér fázis fejlesztése tovább folytatódik. Különösen jelentős a sztereo- és enancio-szelektív fázisok fejlesztése szerkezeti és optikai izomerek elválasztására.

Biopolimérek elválasztására az utóbbi néhány évben a kapilláris elektroforézis (CE) a

HPLC versenytársává vált, [51, 52]. Kapilláris elektroforézissel igen nagy hatásosság ( $10^6$ – $10^7$  N) és viszonylag gyors elválasztás érhető el a biológiai anyagok nagy részénél. Újabb vélemények szerint a két módszer nem konkurens, hanem jól kiegészítik egymást és maximális eredmény együttes alkalmazásukkal érhető el.

### Biokémiai és biológiai folyamatok vizsgálata

Az ismertetett területek és vegyülettípusok vizsgálati módszerei természetesen ugyancsak alkalmazásra kerülnek a biokémiai és biológiai folyamatok vizsgálatában. A korszerű molekuláris biológiai kutatásokhoz a különböző HPLC módszerek (RPC, HIC, IEC, SEC, AC) ma már nélkülözhetetlenek és sok esetben csak kombinált alkalmazásuk vezet eredményhez. A biotechnológiában és a klinikai elemzésben vizsgált területek mellett a biokromatográfia valamennyi biológiailag aktív vegyület vizsgálatával foglalkozik.

Egyik fontos új terület a drog – fehérje kölcsönhatás vizsgálata, [53]. Stacionér fázisként kötött fehérjéket tartalmazó kolonnán a sztereoselektív kötődés, királis stacionér fázison az enancioselektív kötődés is vizsgálható, [54].

A biológiai folyamatok megismerésének egyik fontos területe az enzimaktivitás mérése, [55]. A különböző HPLC módszerekkel lehetőség van az egyes enzimek aktivitásváltozásának nyomonkövetésére, a másodlagos reakciók hatásának vizsgálatára és a metabolitok változásának követésére egy többenzimes rendszerben. Végül, de nem utolsósorban új enzimek felismerésére is alkalmas nemvárt új reakciótermékek meghatározásával.

A klinikai orvostudományban is jelentős fejlődést hozott a HPLC módszerek bevezetése. Különböző testnedvek vizsgálatával megismerhetők az egészséges és a beteg szervezet anyagcsere folyamatai, a betegségek kialakulása, egyes betegségekre jellemző biokémiai változások és irányt mutatnak a kezelési lehetőségekre. Így például neurotranszmitterek és metabolitjaik (adrenalin, noradrenalin stb.), purin származékok, aszkorbinsav és antidepressziós gyógyszerek koncentrációjának és változásának vizsgálata jelentősen hozzájárult a neurológia fejlődéséhez, mind a diagnosztika, mind a gyógyszeres kezelés javításához, [56].

A felsorolt néhány példa csak szemlélteti a HPLC lehetőségeit a biológiai anyagok és folyamatok vizsgálatában és korántsem tekinthető teljesnek. Az elkövetkező években a HPLC töltetek és módszerek további fejlődése jelentősen hozzájárulhat a biológiai anyagok szerkezetének, retenciós viselkedésének és biológiai funkciójának jobb megismeréséhez és mennyiségi leírásához. Ez vezethet el a biológiai folyamatok egydimenziós „molekuláris biológiai” leírása helyett a biomolekulák háromdimenziós atomos kölcsönhatásának megismeréséhez és mennyiségi értelmezéséhez, [57].

Bár a HPLC módszerek fejlesztése az utolsó évtizedben legrávolgósabb eredményeit a biokémiai, orvostudományi, biotechnológiai és gyógyszeripari kutatások területén érte el, ezek a területek a HPLC analitikai alkalmazásának csak mintegy, 50–60%-át jelentik. Az egyéb tu-

dományágak, a vegyipar és a rokon iparágak területén a kromatográfias és ezen belül döntő mértékben a HPLC módszerek nélkülözhetetlenek és különböző reakciók és gyártási folyamatok alapanyagainak, közbenő és végtermékeinek ellenőrzésében, tisztaság vizsgálatában és minősítésében. A legfontosabb alkalmazási területek: környezetvédelem, élelmiszeripar, kozmetikai iparok, műanyagipar, petrokémiai iparok és köolajipar.

A szerző köszönetét fejezi ki az OTKA 1989/91 téma keretében kapott pénzügyi támogatásért.

### Irodalom

- [1] Szepesy L.: Magy. Kém. Folyóirat 100 (8) 340 (1994)
- [2] T. Braun, S. Zsindely: TRAC. 11, 167 (1992)
- [3] T. Braun, S. Zsindely: Anal. Proc. 28, 283 (1991)
- [4] R. R. Jones: R. a. D. Magazine Jan. 54 (1991)
- [5] R. E. Majors: LC-GC Intl. 6 (4) 196 (1993)
- [6] R. E. Majors: LC-GC Intl. 7 (6) 310 (1994)
- [7] N. B. Afeyan, S. P. Fulton, F. E. Regnier: J. Chromatogr. 544, 267 (1991)
- [8] K. K. Unger, R. Janzen, G. Jilge: Chromatographia 24, 144 (1987)
- [9] K. Kalghaigi, Cs. Horváth: J. Chromatogr. 443, 343 (1988)
- [10] C. A. Bruckner, M. D. Foster et al.: Anal. Chem. 66, 1R–16R (1994)
- [11] H. Lingeman, W. J. Underberg (eds): Detection Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography, Marcel Dekker, New York, 1990.
- [12] K. Tomer in HPLC Detection, Patonay G. (Ed.) VCH, New York (1992)
- [13] R. E. Majors, D. Hardy: LC-GC Intl. 5 (6) 11 (1992)
- [14] R. D. McDowall: J. Chromatogr. 492, 3 (1989)
- [15] D. C. Turnell, J. D. H. Cooper: J. Chromatogr. 492, 59 (1989)
- [16] Szepesi G.: Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és gyógyszeranalitikai alkalmazása, Magyar Gyógyszerészeti Társaság, Budapest, 1987.
- [17] J. A. Adamovics (Ed): Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1991.
- [18] F. Emi: J. Chromatogr. 507, 141 (1990)
- [19] R. K. Gilpin, L. A. Pachla: Anal. Chem. 61, 191 R (1989)
- [20] R. K. Gilpin, L. A. Pachla: Anal. Chem. 63, 130 R (1991)
- [21] R. K. Gilpin, L. A. Pachla: Anal. Chem. 65, 117 R (1993)
- [22] C. Schöneich, S. K. Kwork et al.: Anal. Chem. 65, 67 R (1993)
- [23] G. G. Gilbault, R. D. Schmid: Biotechnol. Appl. Biochem. 14 (2), 133 (1991)
- [24] A. Hermans-Lokkerbol, T. Van der Leer, R. Verpoorte: J. Chromatogr. 479, 39 (1989)
- [25] P. Salvadori et al.: Chirality, 4 (1), 43 (1992)
- [26] K. Holzhauser-Rieger, W. Zhou, K. Schugert: J. Chromatogr. 449, 609 (1990)
- [27] W. A. Korfmacher et al.: J. Chromatogr. Sci. 28 (5), 236 (1990)
- [28] R. J. Denchak, J. G. MacConnell: J. Chromatogr. 511, 353 (1990)
- [29] F. M. El Anwar et al.: Anal. Lett. 24 (5) 767 (1991)
- [30] G. Santoni et al.: Int. J. Pharm. 80 (2–3) 263 (1992)
- [31] J. E. Kountourellis et al.: J. Chromatogr. 502, 189 (1990)
- [32] B. Herényi, S. Görög: J. Chromatogr. 592, 297 (1992)

(Folytatás a 39. oldalon)

# Infravörös spektroszkópia az analitikai gyakorlatban és a molekulaszervezet-vizsgálatban

Kissné Dr. Eröss Klára

Az infravörös spektroszkópia gyakorlati alkalmazásánál kedvező körülmény, hogy az anyag mindhárom halmazállapotában mérhető.

Az **elméleti infravörös spektroszkópia** az infravörös színek és más spektroszkópiai módszerek által szolgáltatott információk segítségével a molekulák szerkezetvizsgálatával foglalkozik, erőállandókat, kötőszögeket, kötéstávolságokat számol és következtet a molekula szimmetriájára, az egyensúlyi konformációra.

A **gyakorlati spektroszkópia** területéhez szintén hozzátartozik a molekulaszervezet vizsgálata, valamint a minőségi és mennyiségi analitika alkalmazása.

Az infravörös színekéből nyerhető *információk* a következők: az elnyelési sávok száma és helye, valamint az intenzitás.

Az említett adatok *felhasználási módja* a gyakorlati spektroszkópia területén a következő:

A **kémiailag homogén** azaz egykomponensű *minta* esetén az infravörös színek segítségével minőségileg *azonosítható az anyag*, illetve szerkezete meghatározható, mivel a spektrum az anyag ujjenyomatának tekinthető. Legegyszerűbb eset az, ha valamilyen mintáról igazolni kell, hogy valóban egy feltételezett vegyület. Ez esetben, ha van összehasonlító színeképünk, akkor a színeképek azonossága teljes biztonsággal döntést nyújt az anyag minőségére vonatkozóan. Ha nincs összehasonlító színekép, akkor az elnyelési sávok helyéből megállapíthatók a molekulában lévő funkciós csoportok, mivel nagyon sok anyagi infravörös színeképek tanulmányozásából, valamint a normálkoordináta-analízis számítási módszeréből az adódott, hogy bizonyos kötéseknek (pl.: OH, NH, CH, C=C, C=O) és bizonyos csoportoknak (pl.: CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, aromás-gyűrű, COOH, NO<sub>2</sub>) jellemző elnyelési sávjaik vannak, közel függetlenül attól, hogy milyen molekulában fordulnak elő. E sávok helye elsősorban a kötésben vagy csoportban szereplő atomok minőségétől, valamint az atomok közötti kémiai kötés erősségétől függ és csak kisebb mértékben befolyásolja a molekula többi része. Az egyes kötésekre, illetve csoportokra jellemző elnyelési sávok maximumainak helyeit *jellemző frekvenciáknak nevezzük, bár értéküket ma már mindig hullámszámban (cm<sup>-1</sup>) adják meg*. E frekvenciákat számos kézikönyv, táblázat, diagram tartalmazza és segítségével a színekép alapján elvégezhető a *funkciós csoportanalízis*. Ennek segítségével és az összegképlet ismeretében, vagy más spektroszkópiai módszerek adatainak birtokában a szerkezet meghatározható.

A karakterisztikus frekvenciájú normálrezgéseket aszerint lehet csoportosítani, hogy az atomcsoport atomjainak kitérése a kötés irányában vagy arra merőlegesen nagy-e. Az előzőeket *vegyértékrezgéseknek*, az utóbbiakat *deformációs rezgéseknek* nevezzük. Minthogy a vegyértékirányokban az erőállandók nagyobbak, a vegyértékrezgések frekvenciája általában nagyobb, mint a deformációs rezgéseké. A vegyértékrezgések kísérletileg mért frekvenciájából a vegyértékkötés erőállandójára következtethetünk, a deformációs rezgések frekvenciájából a vegyértékszög megváltozásához szükséges erőre (vagyis a vegyértékkötés „merevségére”) kapunk felvilágosítást. Különböző vegyületek azonos csoportjainak jellemző sávjából a kémiai kötések erősségére lehet következtetni. A vegyértékkötések mint tengelyek körül torziós rezgések is felléphetnek (deformációs rezgések) és ezek, ha nincs gátló tényező (többszörös kötés, térbeli gátlás) szabad forgásba is átmehetnek. A rezgéstípusok jelölésére többféle szimbólumrendszer alkalmaznak.

Napjainkban már számítógépes programok vagy infravörös adatbankok segítségével is lehet szerkezetfelderítést végezni. A programok az elnyelési sávok helyéből, valamint NMR és MS spektroszkópiás adatokból találják meg a csoportokat, az adatbankok pedig lehetővé teszik, hogy pár százezer, esetleg millió vegyület színeképét tárolják és rövid idő alatt kikeressék a kérdéses minta színeképével azonosat.

**Kémiailag heterogén minta** esetén csak előzetes elválasztás után szabad a szerkezetfelderítést, illetve azonosítás feladatát megoldani. Ha nem történik elválasztás, akkor az infravörös színeképek a komponensek együttes elnyeléséből adódik és segítségével a mintában előforduló funkciós csoportok ismerhetők fel.

Többkomponensű rendszert csak akkor lehet azonosítani, ha van standard, pl. egy többalkotójú növényvédőszerrel kell bebizonyítani, hogy egy adott készítmény, benne van minden komponens és azok koncentrációja megfelelő. Ha rendelkezésre áll az ismert minőségi és mennyiségi összetételű növényvédőszer és a vizsgálandó minta színeképe és azok megegyeznek az elnyelési sávok számában, helyében és intenzitásarányában, akkor ez esetben is kimondható az azonosság, elválasztás nélkül. Ilyen feladat pl. a különböző vegyigyárak termékeinek minősítése is.

Az infravörös színeképek segítségével a Lambert–Beer törvény alapján *mennyiségi elemzés* is végezhető. Az alkalmazás feltétele az, hogy az alkotók tiszta állapotban is rendelkezésre álljanak és ismerjük a minta minőségi összetételét. Ilyenkor kalibrációs sorozatok segítségével a meghatározandó alkotó egy olyan sávja abszorbanációjának koncentráció függését mérjük ki, melynek megjelenési intervallumában a kísérő alkotók elnyelése háttér jellegű, szürketeleszerű. Lehetséges egymás mellett több alkotó (2–10) mennyiségi meghatározása is.

A többkomponensű rendszerek mennyiségi elemzése többszöri megmérés egyenletrendszer segítségével is megoldható.

## Az infravörös spektroszkópia alkalmazási területei

Az infravörös spektroszkópia két fő alkalmazási területe a szerkezetfelderítés, illetve kvalitatív analízis.

A **kvalitatív analízis** során ismeretlen mintában kell ismert szerkezetű vegyület, vagy vegyületek jelenlétét megállapítani, azok infravörös spektruma, vagy egymásra szuperponálódott infravörös spektrumaik alapján.

A **szerkezetfelderítés**nél valamilyen újonnan előállított, vagy eddig ismeretlen felépítésű molekula szerkezetét kell meghatározni. Ilyenkor az infravörös spektrum és más szerkezetvizsgáló módszerek információi alapján a jellemző funkciós csoportokat határozzuk meg, majd azok elrendeződését, a molekula szimmetriáját, a molekulát alkotó atomok egymástól való távolságát és a vegyértékszögeket, illetve az egyes kötéseknek megfelelő erőállandókat.

A kvalitatív analízis és szerkezetfelderítés IR spektroszkópiás módszerére nem lehet szigorú szabályokat és sorrendet megadni. A megoldás menete a feladat jellegétől függ és sok egyéni vonást tartalmazhat. A két feladatkör megoldásának módja eltérő, bár sok közös vonással rendelkeznek.

Az alábbiakban a legáltalánosabb szabályokat foglaljuk össze az infravörös spektrumértékelés menetére kvalitatív analitikai szempontból, majd röviden utalunk a szerkezetfelderítés problémáinak megoldási lehetőségeire.

A **kvalitatív analitikai feladatok** sokfélék lehetnek.

A legegyszerűbb esetben a feltételezett vegyület, vagy vegyületek spektrumai rendelkezésre állnak és egyszerű spektrum-összehasonlításal az egyes anyagok jelenléte megállapítható.

Sokkal gyakoribb eset azonban, hogy nem tudunk semmit a vizsgált mintáról. Ilyenkor célszerű, ha először kvalitatív és kvantitatív elemalízist csináltatunk. Az összegképlet és az infravörös spektrumban megjelenő jellemző elnyelési sávok alapján meghatározzuk az egyes kötéstípusokat, illetve funkciós csoportokat, és azonosítjuk a mintát. Az így kapott eredmények közelítő jellegűek, bár általában helyesek. Célszerű mégis feltételeinket kémiai vagy más módszerekkel is igazolni.

Végül néhány **ipari alkalmazási területet** említünk meg. Az infravörös spektroszkópia felhasználható közetek, üvegek, ércék, salakok, kerámiai anyagok, talajok, papír és papíripari nyersanyagok, élelmiszerek (szénhidrátok, olajok, zsírok, lipidek, tej, liszt, tojás, csokoládé, kávé, tea stb.), gázok (CO<sub>2</sub>, CO, acetilén, levegőszennyezők, SO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, HFR, NH<sub>3</sub> stb.), *gyógyszerek*, illóolajok, kozmetikai szerek, kóolaj és származékai, lakkok, színezékek, gyanták, műanyagok, gumik, illetve mindenféle polimer, *mosószerek, növényvédőszer*ek, *műtrágyák*, robbanóanyagok, textiliák, ros-



tok, szálás anyagok vizsgálatára. Ezeket kívül a módszer a szerves, a szervetlen és komplexkémiai kutatások nélkülözhetetlen eszköze. Segítségével a szerves szintézisek egyes lépéseinek a kívánt termék, vagy termékek keletkezése gyorsan bizonyítható. Felhasználják a módszert biológiai anyagok (pl. vér, csont, hormonok, enzimek stb.) vizsgálatára is. Az űrhajósok mérőberendezései között nélkülözhetetlen az IR spektrofotométer a bolygók légkörének és talajának, valamint a világűrben előforduló molekulák tanulmányozásához. A bűnüldözésnek is fontos eszköze a módszer a bizonyítékanyagok azonosításához.

## Kvalitatív analízis és szerkezetfelfedezés az infravörös spektrumok alapján

A spektrumok értékelésének menete az alábbiakban foglalható össze:

A vizsgálatunkat először az intenzív és közepes intenzitású sávok értelmezésével kezdjük a jellemző frekvenciák táblázatainak segítségével (pl. a Colthup összeállítás).

Az értékelés első lépése az OH-, NH- és CH-vegyértékrezgések tartományának (3600–2800  $\text{cm}^{-1}$ -ig) tanulmányozása. Ebben a tartományban már az OH- és NH-csoportok jelenléte, vagy hiánya biztosan eldönthető, (probléma csak akkor merül fel, ha erős H-híd képződés miatt az OH- vagy NH-sáv beleolvad az alapvonalba), és általában meg is különböztethetők egymástól. Az alifás és aromás CH-csoportok is a legtöbb esetben nagyon jól felismerhetők és megkülönböztethetők. Itt az aromás CH-vegyértékrezgések kis intenzitása jelent problémát, mert sok esetben ezek a sávok egybeolvadnak más, erősebb sávokkal. A telítetlen csoportok CH-vegyértékrezgéseinek állapotának az aromás CH-vegyértékrezgéseinek tartományon, ezért a deformációs rezgések segítségével lehet a telített, telítetlen vagy aromás CH-csoportokat teljes biztonsággal definiálni.

2850–1850  $\text{cm}^{-1}$  között nem túl sok sáv jelentkezik a spektrumban. Ebben a tartományban a karboxilcsoportok, hidrokloridok, SH-csoportok, hármás és kumulált kettős kötések, valamint az alfa-aminosavak okoznak elnyelést. Néhány kombinációs sáv, vagy felhang is jelentkezhet ezeken kívül.

1850–1470  $\text{cm}^{-1}$  között a kettős kötések, aromás vázrezgések és NH-deformációs rezgések abszorbeálódnak. Az itt megjelenő sávok alapján feltételezett csoportok (pl. karbonil-, aromás-, amin-, nitrocsoportok stb.) kiegészítő sávjait a nagyobb, illetve kisebb hullámszámok tartományában nézzük meg.

1500–650  $\text{cm}^{-1}$  között a legbonyolultabb a spektrum. Az összes sáv azonosítása lehetetlen és nem is tanácsos, mert értelmezésük ügyi megbízhatatlan. Ebben a tartományban a vegyérték-, deformációs és csoportrezgések változatos sokasága jelentkezik. Ha sikerül közvetlen spektrumösszehasonlítást végezni, ennek a tartományban az azonosítása már a két anyag azonoságát jelenti. Joggal nevezik ezt a tartományt az ún. „ujjlenyomat tartományának”, melyben megjelenő sávok frekvenciáit a molekula többi része erősebben befolyásolja, tehát jobban jellemző az illető molekulára, mint a magasabb hullámszámok tartománya, melyekben megjelenő sávok általában tisztán valamilyen kötéshez rendelhetők és a molekula többi része csekély befolyással bír rájuk.

Amikor már az intenzív és közepes intenzitású sávok eredete többé-kevésbé ismert, akkor a kis intenzitású sávokat vizsgáljuk meg. Ez sokkal nehezebb feladat, mivel a kombinációs sávok és felhangok sokasága ilyen

intenzitással jelentkezik és nehezen vagy egyáltalán nem különböztethető meg a hasonlóan gyenge alapsávoktól.

Vigyáznunk kell arra, hogy a sávok helyére a konjugáció, asszociációs szerkezetek kialakulása, felvételi körülmények stb. erős befolyást gyakorolhatnak.

Bizonyos, megfelelő helyen észlelhető sáv jelenléte nem mindig bizonyítja az illető csoport jelenlétét. Igazolásul a csoport más jellemző sávjait is meg kell keresni a spektrumban.

A sávok hiánya se mindig negatív bizonyíték, mert erős kölcsönhatások (pl. kelátképződés vagy más erős hidrogénhidás szerkezet) nagyon eltölthetnek vagy az alapvonalba olvaszthatnak bizonyos sávokat.

A spektrum alapján először különböző lehetséges szerkezeteket tételezünk fel, melyekből a tapasztalati képlet és esetleg egyéb más fizikai, kémiai módszerek segítségével kiválaszthatjuk a valódit, vagy azt legjobban megközelítőt. Spektrumatlásokból vett összehasonlító szinképek is lehetővé tehetik a szerkezet felderítését.

Jó segítség a szerkezet eldöntésében a különböző származékok vagy bomlástermékek vizsgálata. A hidrogénezés, deuterálás, észterezés, metilézés, sóképzés, acilézés stb. hatására egyes elnyelési sávok megváltoztatják helyüket, alakjukat, intenzitásukat és számukat. Ezekből a változásokból számos következtetés vonható le az illető csoportokra vonatkozólag.

Gyakran az is segítséget nyújt, ha egy anyag spektrumát többféle állapotban vizsgáljuk [szilárd vagy folyadék forma, különböző oldószerekkel és különböző koncentrációkból készített oldatok, nujolos (paraffinolajos) felvétel]. A spektrum változásából az inter- és intramolekuláris kapcsolatok módjára következtethetünk. A különböző oldószerek alkalmazásakor bekövetkező frekvenciaeltolódás is támpontot nyújt az illető csoport természetére vonatkozóan.

A sávok intenzitásértékeit is tekintetbe kell venni az értelmezéskor. Az intenzitásértékek jól felhasználhatók egyes csoportok biztos felismerésére állapotok esetén. Ilyenkor irodalmi adatokkal vagy standard modellvegyületek megfelelő sávjainak intenzitásmérésével dönthetünk.

Nagyon fontos, hogy a vizsgált anyag nagy tisztasággal álljon rendelkezésre, mert a szennyezések zavaró sávjai az asszignációt (hozzárendelést) meghamisítják.

## Irodalom

1. Kissné Erőss K.: Az infravörös spektroszkópia analitikai alkalmazása Bp. Műszaki Kiadó, 1974.
2. Holly S., Sohar P.: Infravörös spektroszkópia. Bp. Műszaki Kiadó, 1968.
3. The Aldrich Library of Infrared Spectra, 040 ul. St. Paul Ave. Milwaukee Wisconsin, Aldrich Chem. Comp. Inc. 1975.
4. ASTM Molecular Formula List of Compounds, Names and References to 92.000 Published Infrared Spectra. I-III. Philadelphia, 1963.
5. Dokumentation der Molekülspektroskopie (DMS-IR-Spektrenkartei) Weinheim, Verlag Chemie; London, Butterworths 1962-ig. DMS-Index S1 1963; S2 1965; S3 1967; DMS-Literaturdienst IR Raman Mikrowellen Vol I-V. 1963-1972.
6. Láng L. (ed.), Holly-Sohár: Absorption Spectra in the Infrared Region, Vol 1-4. Bp. Akadémiai Kiadó, 1974-1978.
7. Miller R. G. I., Willis H. A.: IRSCOT System, IR Struktur Correlation Tables, London, Heyden 1969.
8. Dolphin D., Wick A. E.: Tabulation of infrared spectral data, John Wiley-Sons, New York, 1977.
9. Pretsch-Clerc-Seibl-Simon: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer, Heidelberg, 1981.

951 038 157

(Folytatás a 37. oldalról)

- [33] S. Görög (Ed): Steroid Analysis in the Pharmaceutical Industry, Horwood, Chichester, UK. 1991.
- [34] K. Shimada, N. Kobayashi: TRAC, 10 (3) 103 (1991)
- [35] J. A. F. de Silva: J. Chromatogr. 340, 3 (1985)
- [36] A. Werner: J. Chromatogr. 618, 3 (1993)
- [37] K. K. Unger: Chromatographia, 31, 507 (1991)
- [38] V. Jürgens: J. Liq. Chromatogr. 10, 507 (1987)
- [39] M. Wrenger, M. Celerich, E. Raude, M. Riedmann: Fresenius 2. Anal. Chem. 324 (1986)
- [40] K. M. Gooding, F. E. Regnier (Eds): HPLC of Biological Macromolecules, Marcel Dekker, New York, 1990.
- [41] M. T. W. Hearn (Ed): HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, VCH Press, New York, 1991.

- [42] C. T. Mant, R. S. Hodges (Eds.): HPLC of Peptides and Proteins, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- [43] W. S. Hencock (Ed.): HPLC in Biotechnology, Wiley Int. New York, 1990.
- [44] A. P. Halfpenny, P. R. Brown: Chromatographia, 21, 317 (1986)
- [45] L. Szepegy, G. Rippel: LC. GC Intl. 5(11) 24 (1992)
- [46] H. G. Barth, B. E. Boyes: Anal. Chem. 64, 428 R (1992)
- [47] M. C. Bano, L. Braco, C. Abad: Biochemistry, 30, 886 (1991)
- [48] S. Ostrove: Methods Enzymol. 182, 357 (1990)
- [49] W. H. Scouten: Curr. Opin. Biotechnol. 2, 37 (1991)
- [50] J. Porath: Protein Expression Purif. 3, 263 (1992)
- [51] K. G. Kuhr, C. A. Monnig: Anal. Chem. 64, 389 R (1992)

- [52] C. A. Monnig, R. T. Kennedy: Anal. Chem. 66, 280 R (1994)
- [53] A. F. Aubry, A. McGann: LC-GC Int. 7 (7) 389 (1994)
- [54] I. W. Wainer: J. Chromatogr. 666, 221 (1994)
- [55] E. F. Rossomando: J. Chromatogr. 566, 275 (1991)
- [56] Nagy E.: A neurotranszmitterek, a purin, az aszkorbinsav anyagcsere, valamint pszichofarmakonok vizsgálatára kifejlesztett analitikai módszerek HPLC-vel. Kandidátusi értekezés, 1994.
- [57] M. T. W. Hearn: in HPLC of Peptides, Proteins and Polynucleotides, VCH Press, New York, 1991. Chapter

951 034 156