

Országos Igazságügyi
Toxicológiai Intézet
(igazgató: Dr. Faragó Endre)

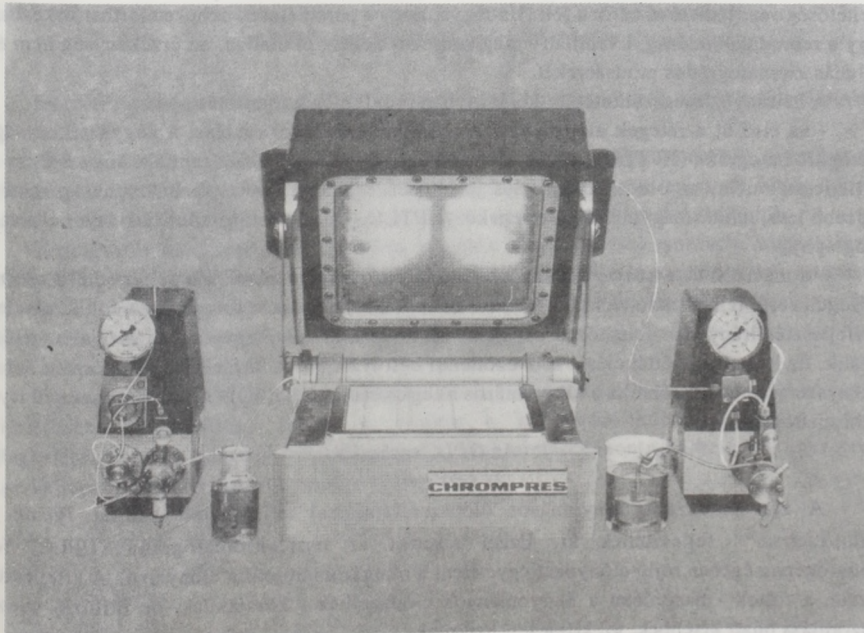
A túlnyomásos rétegekromatográfia (OPLC)

Dr. Pernecki Sándor okleveles gyógyszerész

Érkezett: 1991. 12. 12.

Kulcsszavak: túlnyomásos rétegekromatográfia (OPLC)

Szerző ismerteti a korszerű biológiai kémiai analízisben napjainkban használatos gyors, jól differenciáló túlnyomásos rétegekromatográfias eljárást, az OPLC-t. Saját szempontjai alapján rávilágít gyakorlati értékeire.



A túlnyomásos rétegekromatográfiahoz (OPLC) használt készülék

A korszerű analitikai vizsgálatokban döntő szerephez jutnak a különféle kromatográfiás eljárások. A kezdeti oszlop-, réteg-, majd gázkromatográfia után, ma a nagynyomású folyadék-kromatográfia virágkorát éljük, de már megjelent a két utóbbi módszer találkozásai pontjában a „szuperkritikus kromatográfia”, ahol kritikus halmazállapotú eluent alkalmazunk. A módszerek egyre inkább finomodtak, kialakultak a nagyhatékonyságú (High performance) technikák - HPTLC, kapillár-kolonnák stb. Fejlődésük másik fontos iránya a detektálási lehetőségek szélesedése, elsősorban a kapcsolat technikák, pl. gázkromatográf, folyadék-kromatográf kapcsolódása tömegspektrométerhez, furier transzformációs infravörös spektrométerhez.

Jól szervezett laboratóriumban a különböző módszerek nem versenyeznek egymással, hanem a feladatnak megfelelően, az egyes meghatározási módok előnyeinek kihasználásával, hátrányainak kiküszöbölésével választunk¹.

A közleményben egy új, választható eljárást, a túlnyomásos rétegekromatográfiát (OPLC) mutatom be.

A rétegekromatográfia jelene

A sokkomponensű, teljesen ismeretlen összetételű minták vizsgálatában ma is fontos szerepet kap a rétegekromatográfia. Különösen nagy jelentősége van biológiai anyagok elemzésében, pl. klinikai, toxikológiai analízisben. Az előkészítés folyamán nincs szükség nagy tisztaság elérésére, mint pl. gáz-, folyadék-kromatográfiánál, a felhasználásban van, - réteg, oldószer - olcsóbbak. Legnagyobb előnye a detektálásban van, hiszen egyetlen rétegen, egymás után akár több módon is elvégezhető és alkalmazhatunk gyakorlatilag bármilyen szelektív előhívószert. Nem elhanyagolható, hogy a detektálás során közvetlen érzékelésre is lehetőség van: láthatóvá válik a folt. Hátránya, hogy a paraméterek nehezen tarthatók kézben, így a reprodukálhatóság, kvantitatív meghatározás nehéz, pontatlan, az érzékenység nem éri el más kromatográfiás módszerekét.

A hátrányok megszüntetésére két irányban indult meg a fejlesztés:

- az első út a rétegek alapanyag-szemcseméretének csökkentése, a nagyhatékonyságú rétegekromatográfia (HPTLC) volt. Alkalmazásánál figyelembe kell vennünk, hogy 5-6 cm-es kifejlesztés után, az oldószervándorlás jelentősen csökkent, emiatt a hatékonyság romlik, kisebb lesz, mint a hagyományos rétegeké. (HPTLC = high performance thin layer chromatography.)

- a második út a kényszeráramlásos módszerek megjelenése. A legerterjedtebb a centrifugális erő felhasználó technika, amikor a lapot kifejlesztéskor forgatják. A folt átmérője a kifejlesztés irányában jelentősen csökken, azonban arra merőlegesen nő, alakja ívszerűvé válik. Ez kvantitatív értékelését kedvezőtlenül befolyásolja. A hazánkban kifejlesztett másik kényszeráramlásos technika a túlnyomásos rétegekromatográfia, (OPLC = overpressured layer chromatography).

Az OPLC technika

A zárt rendszerű túlnyomásos oldószéráramlással működtetett kamrát Tyihák és munkatársai^{2,3} fejlesztették ki. Ezzel sikerült az oszlopkromatográfia (IPLC) felbontóképességében rejlő előnyöket egyesíteni a rétegekromatográfia előnyeivel. A kifejlesztés után, a foltok - hasonlóan a hagyományos módszerhez - kör alakúak, de diffúzió visszahatása miatt kisebbek, jól kifejezett határuak.

A zárt rendszer kialakítása a réteglapok széleinek impregnálásával és a lapra boruló víz-párna nyomásával történik. A kialakítható maximális nyomás a Chrompress (Labor Rt.) készüléktől függően 10, illetve 25 bar lehet (ábra). Az eluenst a lineáris biztosító csatornán keresztül a rétegre.^{4, 5, 6} A kifejlesztés sebessége a front előrehaladtával nem változik.

A módszer alkalmas arra, hogy a lapokon egy meghatározott magasságig - 10-18 cm - végezzük a kifejlesztést, de lehetőség van arra is, hogy „túlfuttassunk”, az eluenst elvezessük a detektorba és a nagynyomású folyadékkromatográfiában ismert módon értékeljük. Megoldható az is, hogy a meghatározandó anyagok egy részét az eluenssel elvezetve detektáljuk, míg a többi a rétegen marad és a lapon értékeljük.^{7, 8, 9}

Alkalmazásakor a paraméterek végig ellenőrizhetők, kézben tarthatók, és így reprodukálhatók. A felhasznált oldószer mennyisége csekély - 4-5 ml. A kifejlesztés ideje nagymértékben csökken, az optimális eluens-áramlási sebesség általában 2 ml/perc, ami a folyadékkromatográfiából is ismert összefüggés, tányérmagasság-eluensáramlás, az úgynevezett II-u görbe alapján itt is meghatározható. A diffúzió erőteljes visszaszorulása miatt, a kimutatási határ lényegesen csökken, elérhető az 5-10 ng/folt érzékenység.

A módszer előnyeit igazán akkor tudjuk kihasználni, ha megfelelő értékelőt is alkalmazunk. Mint minden kromatográfiai eljárásnál, szükség van műszeres kiértékelési lehetőségre, detektorra, denzitométre, s akkor válik egy rendszer teljessé. Ilyen vonatkozásban az említett két fejlődési irányzat - lapminőség, technikai újítások - összekapcsolódnak. Jelenleg a legjobb eredményeket a nagyhatékonyságú (HPTLC) és túlnyomásos réteggromatográfia (OPLC) együttes alkalmazásával érhetjük el, hiszen a kifejlesztés sebességének csökkenése nem következik be, tehát a diffúziót a lapminőség és a technika egyszerre, összegződve csökkenti.

OPLC néhány alkalmazási lehetősége

Intézeti munkánk során az OPLC-s vizsgálatokat humán eredetű szervek vizsgálatokor alkalmazzuk.

A szervek előkészítése aceton-alkoholos kivonás és savas, lúgos közegből, kloroformos extrakcióval történik. Vér és vizelet vizsgálatokor elégséges a közvetlen savas, lúgos, kloroformos extrakció is. Az így nyert kivonatok további tisztítás nélkül felhasználhatók.

Kidolgozott módszereinkkel rutinban végzünk kvalitatív és kvantitatív meghatározásokat OPLC-s kifejlesztéssel és dezintometriás értékeléssel. Kiváló eredményeket értünk el barbitálok, fenothiazinok, benzodiazepinek, szulfonamidok, bétablokkolók, morfin, morfin-származékok és foszforsavészterek analízisében. A módszerek alkalmasak mint toxikus, mind terápiás adatok meghatározására.

Tapasztalataink alapján jól alkalmazható a módszer kábítószerélvezők vérének, vizeletének vizsgálatában, akkor is, amikor a kábítószer kiürülési fázisban van. Meghatározhatók az alacsony terápiás adagot 4-5 ml mintából, kontrollálható a gyógyszerek - pl. antiepileptikumok, szulfonamidok - adagolása is.

IRODALOM

1. *I. L. R. TREIBER* - Utility of Thin Layer Chromatography as an Analytical Tool. - J. of Chrom. Sci. 220. 24. (1986)
2. *Tyihák E., Kalász H., Mincsovcics E., Nagy J.*: Proc. Annu. Hung. Biochem. Meet. - Kecskemét, 1977. 49-50. C. A. 88, 15386 u (1978)
3. *Tyihák E., Mincsovcics E., Kalász H.*: J. Chromatogr. 174. 75. (1979)
4. *Mincsovcics E., Tyihák E., Kalász H.*: J. Chromatogr. 191. 93. (1980)
5. *Kalász H., Nagy J.*: J. Liquid Chromatogr. 4. 985. (1981)
6. *Tyihák E., Mincsovcics E.*: J. of Plan. Chromatogr. 1. (1988)
7. *Mincsovcics E., Tyihák E., Siouffy A. M.*: J. of Plan. Chromatogr. 141. 1. (1988)
8. *Mincsovcics E., Tyihák E.*: J. of Plan. Chromatogr. 309. 1. (1988)
9. *Dallenbach-Tölke, K., Sticher O.*: J. of Plan. Chromatogr. 73. 1. (1988)

Szerző címe: *Perneczki Sándor, 2094 Nagykovácsi, Templomkert u. 2-4.*

S. Perneczki M.D.

OVERPRESSURE LAYER CHROMATOGRAPHY (OPLC)

The author describes the overpressure layer chromatography (OPCL) - an express and well-differentiating method used in the practice of up-to-date biochemical analyses. Relying on his experience he emphasizes its practical values.