

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd**

**Green HPLC**

**Bakalářská Práce**

**Milan Hodes**

**2012**

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd**

**Green HPLC**

**Bakalářská Práce**

**Autor práce: Milan Hodes**

**Vedoucí práce: doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.**

**2012**

**Univesity of Pardubice**  
**Faculty of chemical-technology**  
**Department of Biological and Biochemical Sciences**

**Green HPLC**

**Bachelor thesis**

**Author: Milan Hodes**

**Supervisor: doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.**

**2012**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré zde využití literární prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona, a také se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolnosti až do jejich skutečné výše. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 5. 2012

.....  
Milan Hodes

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za zadání zajímavého tématu a jeho odborné vedení.

Zároveň chci poděkovat rodině za velikou podporu při studiu a poskytnutí gramatické kontroly mé práce.

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Milan Hodes**  
Osobní číslo: **C09345**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **”Zelená” vysokoúčinná kapalinová chromatografie**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Seznamte se s literárními údaji zabývající se tematikou ”Green HPLC”. Využijte například databázi Medline, Current Contents.

Vypracujte přehlednou práci zabývající se tématem zelené a vysokoteplotní kapalinové chromatografie.

Diskutujte výhody a nevýhody zelené a vysokoteplotní chromatografie v porovnání s klasickou analytickou kapalinovou chromatografií.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

## Souhrn

Analytická chemie a také další chemické obory se v poslední době snaží být ekologicky a zároveň ekonomicky efektivní. Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (HTLC) s podkritickou vodnou mobilní fází splňuje obě tato kritéria. Teoretické základy této techniky byly položeny již v osmdesátých letech dvacátého století, ale kvůli nedostačujícím parametrům tehdejší instrumentace nebyla uvedena do analytické praxe. Poslední vývoj termicky odolných (až do 200 °C) stacionárních fází na bázi zirkonu, titanu a organických polymerů umožnila výzkum a následnou aplikaci teplotních gradientů v kapalinové chromatografii pro běžné analytické separace. HTLC s podkritickou vodou nejen že dokáže nahradit v LC separacích toxická organická rozpouštědla, ale navíc nabízí i 5 – 20krát rychlejší separaci s vyšším rozlišením než konvenční HPLC. Tyto skutečnosti jsou způsobeny snížením viskozity a polarity mobilní fáze za vyšší teploty, která také zajistí zvýšení difúzních koeficientů analytu. Použití 100%ní vodné mobilní fáze má mnohem více výhod. Mezi nejvýznamější lze zařadit zlepšený eluční profil a detekovatelnost. Tato práce je také zaměřena na některé biologické a ekologické aplikace HTLC.

Klíčová slova: Vysokoučinná kapalinová chromatografie, Vysokoteplotní kapalinová chromatografie, teplotní gradienty, podkritická voda, termicky odolné stacionární fáze, triazolové fungicidy, brombenzoové kyseliny



## Summary

Analytical chemistry as well as other fields of chemistry nowadays make efforts to be more ecologically and when it's possible also economically effective. High temperature liquid chromatography (HTLC) using superheated water as a mobile phase covers both criteria. This new emerging technique was first theoretically discussed in 1980's but due to lack of appropriate equipment it wasn't introduced into analytical practice. Recent developments of thermally resistant (up to 200 °C) stationary phases based on zirconia, titania and organic polymers allowed to study and use of high temperatures in liquid chromatography on daily basis. Not only that HTLC with superheated water can in some cases replace HPLC which is using toxic organic solvents but HTLC also offers 5 – 20 times faster separations with greater resolution. This is caused by viscosity and mobile phase polarity decrease while solute diffusion coefficients increase. Using 100% water mobile phase have many more advantages than just speed. One of them is improved detectability and peak shape. This thesis focuses on some of the biological as well as the ecological application of HTLC.

Keywords: High performance liquid chromatography, High temperature liquid chromatography, temperature programming, superheated water, thermally resistant stationary phases, triazole fungicides, brombenzoic acids

# Obsah

Úvod .....	1
A. Teoretická část .....	2
1. Udržení mobilní fáze v kapalném stavu .....	4
2. Efekt teploty na zpětný tlak v koloně .....	6
3. Stabilita vzorku při vysokých teplotách .....	6
4. Teplotní gradienty a kolony o malém vnitřním průměru .....	8
5. Možnosti aplikace podkritické vody v extrakci .....	9
B. Instrumentace ve vysokoteplotní kapalinové chromatografii .....	11
1. Úvod do problematiky stacionárních fází: .....	12
1.1 Modifikování povrchů oxidů kovů .....	12
a) Dynamické, chemické modifikace .....	12
b) Permanentní (stálé) kovalentní chemické modifikace .....	12
c) Fyzikální síťování .....	13
1.1.a) Dynamická modifikace .....	13
1.1.b) Permanentní kovalentní modifikace .....	14
1.1.b.1. Alkyl-vázané fáze (alkyl-bonded phases) .....	14
1.1.2.2. Silanizace .....	14
1.2 Alternativní termicky stabilní stacionární fáze pro HTLC .....	16
1.2.1 Grafítové stacionární fáze .....	16
1.2.2 Stacionární fáze složené z organických polymerů .....	16
2. Řešení ohřevu a chlazení mobilní fáze a kolony .....	17
2.1 Předehřívání mobilní fáze před vstupem do kolony .....	17
2.2 Chlazení eluentu před vstupem do detektoru .....	18
3. Detektory používané při HTLC separacích .....	19
3.1 HTLC – UV .....	19
3.2 HTLC – FID (Flame Ionization Detection) .....	19
3.2.1 Aplikace .....	20
3.3 HTLC – MS (Mass Spectrometry) .....	20
3.4 HTLC – ICP – AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) nebo ICP – MS (ICP – Mass Spectrometry) .....	21
C. Aplikace Vysokoteplotní kapalinové chromatografie při analýze biologických vzorků ..	22
1. Aplikace HTLC při stanovení fungicidů .....	22

1.1	Limity detekce .....	24
2.	HTLC stanovení metabolitů 2-, 3- a 4- brombenzoové kyseliny.....	26
3.	HTLC stanovení kofeinových derivátů .....	30
D.	Diskuze: .....	31
1.	Výhody HTLC.....	31
1.1	Rychlost .....	31
1.2	Účinnost separace a rozlišení .....	31
1.3	Selektivita .....	32
1.4	Minimální spotřeba organických rozpouštědel (Green HPLC) .....	32
1.5	Zlepšená detekovatelnost .....	32
1.6	Lepší tvar (profil) píků .....	32
1.7	Teplotní gradient .....	33
2.	Nevýhody HTLC .....	33
2.1	Stabilita analytu.....	33
2.2	Stabilita náplně kolony .....	34
2.3	Instrumentace ohřevu .....	34
3.	Budoucnost HTLC .....	35
E.	Závěr.....	37
	Seznam literatury .....	38
	Seznam obrázků .....	43
	Seznam tabulek .....	43
	Seznam rovnic .....	43

## **Seznam zkratek:**

**ACN** – acetonitril

**AES** – atomová emisní spektrometrie

**APCI** – ionizace kombinací vypařování za vysoké teploty a el. Výboje

**BBA** – brombenzoová kyselina

**EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová

**ESI** – ionizace elektrosprejem

**FID** – plamenově ionizační detektor

**GC** – plynová chromatografie

**HTLC** – vysokoteplotní kapalinová chromatografie

**ICP** – iontově vázaná plazma

**LC** – kapalinová chromatografie

**MeOH** – methanol

**MS** – hmotnostní spektrometrie

**NMR** – nukleární magnetická rezonance

**ODS** – oktadecylsilikagel

**PAH** – polyaromatické uhlovodíky

**PBD** – polybutadien

**PEG** – polyetylenglykol

**PGC** – pórovitý grafitový uhlík

**PRP** – polymerní reverzní fáze

**PS-DVB** – polystyren – divinylbenzen

**RP-HPLC** – vysokotlaká kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

**RPLC** – kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

**SPE** – extrakce na pevné fázi

**SWC** – chromatografie s podkritickou vodou

**SWE** – extrakce podkritickou vodou

**THF** – tetrahydrofuran

**TLC** – tenkovrstvá kapalinová chromatografie

**UV** – ultrafialové záření

**UPLC** – ultravysokotlaká kapalinová chromatografie

**WRP-LC** – kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi a 100%ní vodnou mobilní fází

# Úvod

Výhody aplikace zvýšené teploty při LC separaci jsou zřejmé. Nejnápadnější je urychlení separace a redukce zpětného rázu mobilní fáze. Tyto faktory v kombinaci s použitím specifické instrumentace a po optimalizaci techniky vedou k vysoké účinnosti HTLC separace, velké citlivosti (rozlišení) a větší symetrii píků. Některé detektory (např. ICP – MS, viz dále) prokazují vyšší limity detekce při použití HTLC než u konvenční HPLC. Díky snížené retenci lze výrazně snížit nebo v některých případech zcela eliminovat použití organických rozpouštědel a nahradit je čistě vodnou mobilní fází. Nižší zpětný tlak také umožňuje náhradu toxických rozpouštědel, jako jsou methanol nebo acetonitril, netoxickým ethanolem. Jak voda, tak ethanol jsou netoxické vůči životnímu prostředí, jsou recyklovatelné (na rozdíl od některých výše zmíněných organických rozpouštědel) a tudíž mohou být považovány za ekologické alternativy. Proto je vysokoteplotní kapalinová chromatografie (HTLC) někdy označována jako Green HPLC, tedy zelená kapalinová chromatografie. Výhody HTLC ale nespočívají pouze v ekologii, ale také v ekonomickém aspektu analýz. Organické rozpouštědla, kterých je v současných analytických (chromatografické či extrakční aplikace) laboratořích denně spotřebováno na miliony litrů, jsou velmi ekonomicky nákladné jak na nákup, tak na následnou likvidaci (většinou jsou nerecyklovatelné pro opakované použití). V literatuře se můžeme setkat také s pojmy jako extrakce podkritickou vodou (SWE – subcritical water extraction), tato problematika je v této bakalářské práci zmíněna pouze okrajově, a to zejména její propojení s chromatografií.

V cizojazyčné literatuře lze nalézt v souvislosti s HTLC (High Temperature Liquid Chromatography) a Green HPLC ještě jiná označení: superheated water HPLC (HPLC s velmi horkou vodnou mobilní fází), subcritical water HPLC (HPLC s vodnou mobilní fází v podkritickém stavu). Je třeba si tyto pojmy definovat. Podkritická voda (velmi horká voda) je voda v kapalném stavu nad svým bodem varu  $t_{bv} = 100\text{ °C}$  (tento je definován pro normální atmosférický tlak 101,325 kPa). V HTLC je ale voda ve vysokotlakém systému udržována v kapalném stavu i při teplotách kolem 200 °C, tedy v podkritickém stavu ( $t_k \text{ H}_2\text{O} = 374\text{ °C}$ , což je kritická teplota, nad kterou nelze pouhým zvyšováním tlaku dosáhnout kapalného stavu) [1].

## A. Teoretická část

Chromatografie s obrácenými fázemi (RPLC – reversed phase liquid chromatography) je nejvíce používanou technikou kapalinové chromatografie. Zjednodušeně lze stavbu tohoto systému popsat jako nepolární stacionární fázi, většinou alkylový ligand vázaný na povrch oxidu křemičitého a polární mobilní fázi. V případě klasické RPLC je mobilní fáze směsí vody a organického rozpouštědla, jako například methanolu nebo acetonitrilu. Za určitých podmínek lze použít pouze čistou vodu. Samotná voda je bohužel při pokojové teplotě (20 °C) velmi slabým eluentem pro všechny analyty, s výjimkou vysoce polárních sloučenin. Kvůli této vlastnosti je tedy v klasické RPLC přídavek organického rozpouštědla do mobilní fáze nutností [2].

V posledních letech se použití podkritické vody jako mobilní fáze/rozpouštědla ukázalo jako velmi dostupné a užitečné jak pro chromatografické, tak i extrakční aplikace. Tato technika by mohla eliminovat nebo redukovat spotřebu organických rozpouštědel, nákladů na ně vynaložených, stejně tak jako jejich dopad na zdraví a životní prostředí. Použití podkritické vody jako eluentu také nabízí řadu chromatografických výhod. Má mnohem nižší viskozitu než obvykle používaná směs vody a organického rozpouštědla v RP-HPLC. Nízká viskozita zvyšuje difúzní poměr a zlepšuje převod hmoty (snižuje odpor proti převodu hmoty) jak pro chromatografii, tak extrakci. Teplotní programování separace (teplotní gradient) může být využito také k napodobení gradientové eluce vhodné pro ovlivnění polaritativity vody, která se při zvýšené teplotě snižuje. Podkritické vody bylo použito jako mobilní fáze při RP-HPLC separaci mírně polárních a nepolárních analytů, jako například aromatické uhlovodíky, léčiva a vitamíny za současného použití sestavy stacionárních fází na bázi zejména polystyren - divinylbenzenu (PS-DVB), oxidů zirkonia a porovitého grafitového uhlíku (PGC) [2].

I když tomuto aspektu mnoho z uživatelů chromatografických technik nepřikládá patřičnou důležitost, teplota může u chromatografické separace hrát velkou roli při optimalizaci podmínek separace. S pomocí nově zavedených stacionárních fází, které jsou více termicky stabilní, tak náplň chromatografické kolony vydrží až několik set separací (stanovení). Je tedy důležité zjistit vliv vyšší teploty na účinnost separace u kapalinové chromatografie, což zahrnuje i matematickou závislost výšky teoretického

patra kolony na teplotě. Tyto souvislosti budeme zkoumat zejména u kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (HPLC-RP = RPLC) [2].

Dosud byl hlavní zájem při optimalizaci parametrů separace věnován zejména pH, iontové síle, typu mobilní fáze, velikosti částic stacionární fáze a jejich pórovitosti. Teplota zde měla až druhotnou důležitost. Některé studie LC separací ovšem prokázaly velký vliv teploty na účinnost separace. Současná instrumentace, zejména tedy náplň kolon a jejich vyhřívání, které je možné u některých přístrojů nastavit až na teploty nad 150 °C, umožňují rozvoj výzkumu vlivu tohoto parametru na separaci. Velmi důležitý je fakt, že při vzrůstající teplotě mobilní fáze (eluent) klesá její viskozita a to má pozitivní vliv na difúzi a na převod hmoty v chromatografické koloně (zvyšuje je, viz van't Hoffova, van Deemterova rovnice). Nižší viskozita eluentu také zvyšuje rychlost průtoku mobilní fáze kolonou, a snižuje zpětný ráz mobilní fáze při použití delších kolon (tedy zvýšení počtu teoretických pater). Dalšími neméně důležitými faktory jsou též snížená dielektrická konstanta a v neposlední řadě také nižší povrchové napětí. Všechny tyto podmínky příznivě ovlivňují retenci vzorku, a tedy rychlost analýzy. Velikost snížení retence vzorku při aplikaci vyšší teploty ovšem není vždy lineární, ale je individuálně závislá na soluentu (stanovované rozpuštěné látce) [2].

Efekt teploty na účinnost chromatografické separace byl poprvé diskutován již v sedmdesátých letech dvacátého století. Výhody vysoké teploty eluentu již byly v této práci zmíněny. Jak už bylo výše uvedeno, viskozita mobilní fáze se při vysoké teplotě snižuje a to vede také ke snížení zpětného rázu (backpressure) při konstantní průtokové rychlosti. To znamená, že při aplikaci vyšší průtokové rychlosti a kolon s částicemi o menším průměru může být separace značně zrychlena, samozřejmě nesmí být překročen určitý mezní tlak pro daný HPLC systém. Zvýšením teploty navíc snížíme i odpor proti převodu hmoty mezi dvě fáze a tím se zvýší i difúze molekul analytu. Následkem těchto změn se optimum průtokové rychlosti posune do vyšších hodnot, jak teoreticky diskutovali Antia a Horvath v roce 1988 [18], což bylo v praxi mnohými prokázáno. Za normálních podmínek je čistá voda nejslabším eluentem v RP-HPLC. To je způsobeno vysokou hodnotou její dielektrické konstanty (viz výše). Zvýšením teploty se hodnota dielektrické konstanty sníží natolik, že voda je svými elučními vlastnostmi podobná spíše ethanolu či methanolu, a to již při teplotách kolem 200 °C. Této změny v eluční síle vody může být využito k nahrazení gradientové eluce (změna složení mobilní fáze) teplotním gradientem. Největší výhodou použití čisté vody, jako mobilní



fáze v RP-HPLC je její absolutní ekologická nezávadnost a nenákladnost v porovnání s toxickými organickými rozpouštědly [3].

## 1. Udržení mobilní fáze v kapalném stavu

V praxi se při HTLC aplikacích udržuje voda v kapalně fázi pomocí regulace (downregulation) zpětného tlaku v koloně. Pro určení tlaku potřebného k zabránění vypařování vody může být využita Clausius - Clapeyronova rovnice, kde:

(**p**) je tlak, (**A**) je konstanta,  $\Delta H_{\text{vyp}}$  je entalpie vypařování, (**T**) je termodynamická teplota [K] a (**R**) je plynová konstanta.

$$p = A \exp\left(\frac{-\Delta H_{\text{vyp}}}{RT}\right)$$

**Rovnice 1:** Clausius - Clapeyronova rovnice

Jde-li navíc o teplotní gradient (postupnou změnu teploty), pak musíme počítat s tím, že při každé teplotě (**T<sub>1</sub>**, **T<sub>2</sub>**) je za potřebí jiný tlak (**p<sub>1</sub>**, **p<sub>2</sub>**) pro udržení kapalně mobilní fáze. Potom má tedy Clausius – Clapeyronova rovnice tento tvar:

$$\ln\left(\frac{p_1}{p_2}\right) = \frac{\Delta H_{\text{vyp}}}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right)$$

**Rovnice 2:** Clausius - Clapeyronova rovnice pro teploty **T<sub>1</sub>** a **T<sub>2</sub>**

Clausius – Clapeyronova rovnice tedy umožňuje odhadnout, jak velký nárůst tlaku bude třeba aplikovat při měnící se teplotě. Pro získání tohoto odhadu je třeba znát vypařovací entalpii pro danou mobilní fázi.

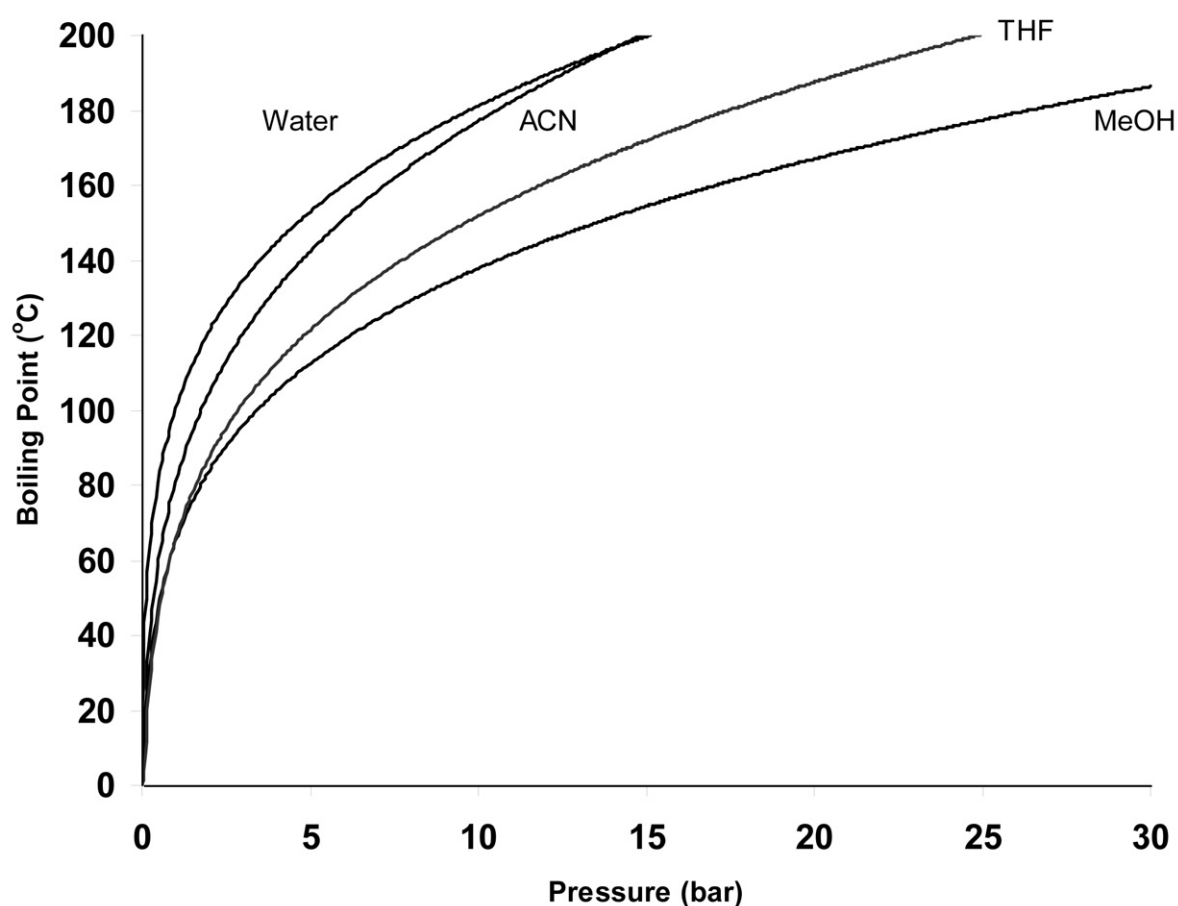
Další empiricky (zkusmo) odvozenou rovnicí, která se často používá pro odhad potřebného tlaku při zvýšených teplotách je Antoineova rovnice:

$$\log p = A - \left(\frac{B}{T - C}\right)$$

**Rovnice 3:** Antoineova rovnice

Kde je tlak ( $p$ ) vyjádřen v mm Hg sloupce, ( $T$ ) teplota vyjádřena v ° C, a ( $A$ ,  $B$ ,  $C$ ) jsou Antoineovy koeficienty, které se liší v závislosti na druhu kapaliny (směsi kapalin). Antoineova rovnice je přesná až na velmi malé procento těkavých látek (tenze par nad 1,3 kPa). Antoineovy koeficienty jsou pro většinu známých látek tabelovány [4].

Následující graf ukazuje body varu běžných HPLC mobilních fází v závislosti na tlaku. Jak na grafu můžeme vidět, vodu lze udržet kapalnou pro HTLC aplikace až na 200 °C pomocí zpětného tlaku pouhých 15 bar (1500 kPa) [4].



**Obrázek 1:** Závislost teploty varu na zpětném tlaku pro obvyklé mobilní fáze v HPLC vypočtené z Antoineovy rovnice pro vodu, ACN (acetonitril), THF (tetrahydrofuran), MeOH (methanol) [4].

## 2. Efekt teploty na zpětný tlak v koloně

Zpětný tlak v koloně (na koloně) je tlak mobilní fáze, který musí čerpadlo vyvinout, aby mobilní fáze prošla přes celou délku kolony naplněnou stacionární fází až k detektoru. Zpětný tlak vyvolaný naplněnou HPLC kolonou je přímo úměrný délce této kolony  $L$  a nepřímo úměrný velikosti částic sorbentu  $d_p$  a vnitřnímu průměru kolony  $d_c$ , takže v případě, že se velikost částic sorbentu zmenší 3krát, pak zpětný tlak na koloně vzroste 9krát. Experimentální výsledky z některých studií ukázal, že tlak na koloně byl při 200 °C 1,6krát vyšší než při 25 °C. Také nelze opomenout nutnost vnějšího omezovače tlaku, který je potřebný pro použití podkritické vody (200 °C) jako mobilní fáze, jenž sám o sobě odebírá ze systému tlak 2 MPa. Tyto závěry tedy prokazují, že pracovní tlak při teplotě mobilní fáze kolem 200 °C je až dvakrát větší než při pokojové teplotě [4].

## 3. Stabilita vzorku při vysokých teplotách

Nyní se zaměříme na chromatografickou spolehlivost a stabilitu analytu při vysokých teplotách. Reakce uvnitř kolony konvenčního kapalinového chromatografu již byly prozkoumány za standardních podmínek. Stabilita analytu je zaručena různými aditivy, optimálním pH a použitím chlazeného automatického dávkovače vzorků. Mezi hlavní chemické reakce, které mohou narušit stabilitu vzorku, patří: hydrolýza, oxidace, izomerizace a epimerizace. Již v roce 1960 prokázaly studie Kellera a Giddingse [17], že reakce prvního řádu mohou mít nepříznivý vliv na profil elutu. Horvath a kolektiv [18] zjistili, že nežádoucí katalýzou zbytkového (reziduálního) železa, obsaženého v silikagelové stacionární fázi, stoupá oxidačně redukční poměr substituovaných methoxyhydrochinonů při srovnání s oxidačně redukčním poměrem ve volném roztoku (mimo kolonu). Dalším analytem, který podpořil tyto závěry, byl prolinový dipeptid. Ten v průběhu (2 – 3 min) typické chromatografické separace podléhal izomerizaci a tvořil zkreslenou a zdvojenou eluční křivku. Bylo zjištěno, že teplota, délka kolony, pH a průtoková rychlost mohou být upraveny ve prospěch profilu píku (jeho tvaru), tím tedy bude zamezeno rozmývání píku způsobené nežádoucími reakcemi. Potenciální nevýhodou při používání vysokých teplot je možná akcelerace nežádoucích reakcí uvnitř kolony při stanovení termolabilních analytů. Klíčovým

parametrem při rozhodování, zda se jedná o nežádoucí reakce, je vztah mezi retenčním časem analytu a jeho reakčním poměrem za daných podmínek v koloně. Tento vztah je vyjádřen Damköhlerovým číslem ( $Da$ ) [4].

$$Da = \frac{kL(1 + k')}{u_0}$$

**Rovnice 4:** Damköhlerova rovnice

Toto číslo je definováno jako poměr mezi retenčním časem analytu a časem potřebným k reakci, kde: **k** je (rychlostní konstanta) reakce prvního (pseudo-prvního) řádu ( $s^{-1}$ ), **L** je délka kolony (v cm), **k'** je retenční faktor a  **$u_0$**  představuje intersticiální (meziprostorovou) lineární průtokovou rychlost (cm/s). Pokud neprobíhá žádná vedlejší reakce, pak je  $Da \ll 1$  nebo pokud je reakce velmi rychlá je  $Da > 50$ , můžeme očekávat ostré samostatné píky. Střední hodnota Damköhlerova čísla pro rozmyté (neostré, šikmé) píky se pohybuje kolem hodnot 0,1 - 50 ( $0,1 < Da < 50$ ). V tomto případě se analyt v průběhu separace rozpadá a jeho intermediáty (meziprodukty) a fragmenty budou rozdílně migrovat po celé délce kolony, čímž vytvoří zdvojené eluční křivky. Za předpokládaných konstantních podmínek se Damköhlerovo číslo bude zvětšovat při zkracování kolony, současném zvyšování lineární průtokové rychlosti, snižování retenčního faktoru a snižujícího se reakčního poměru [4].

Horváth a spol. [18] zdokonalili teorii, která předpovídá efekt času analýzy na rozsah nežádoucích reakcí. Zvýšením teploty v koloně se také zvýší reakční poměr, což naznačuje, že nižší teploty jsou více preferovány. Nicméně bylo prokázáno, že Damköhlerovo číslo se může zvyšovat za zvýšené teploty eluentu při současně dramaticky sníženém retenčním času, tedy že vliv zvýšené teploty je mnohem důležitější než doprovodné nežádoucí zvýšení reakčního poměru. Kritický parametr pro zjištění, zda se bude reakční poměr snižovat při zrychlené separaci, lze vyjádřit jako rozdíl mezi volnou entalpií ( $\Delta H$ ) a aktivační energií ( $\Delta E_a$ ) reakce uvnitř kolony. Za příznivých počátečních podmínek je analyt eluován dříve než stačí zreagovat, a reakce

uvnitř kolony bude při zvýšení teploty nepodstatná. Když ale analyt podléhá nežádoucí reakci uvnitř kolony, tedy Damköhlerovo číslo nabývá středních hodnot, pak lze potenciálně očekávat určité nepříznivé výsledky, jako je například tvar píku, jeho plocha a výška [4].

#### **4. Teplotní gradienty a kolony o malém vnitřním průměru**

Již od počátečních pokusů o teplotní gradienty v HPLC, které byly prováděny již před 40 lety, bylo jasné, že pro tyto aplikace bude nutné zmenšit parametry kolony, zejména její průměr. Zjednodušeně lze říci, že malý průměr kolony klade menší odpor pro vedení tepla, takže kolona s vnitřním průměrem (i.d.) 4,6 mm pojme 20krát více mobilní fáze než kolona s i.d. 1 mm, tpak ustálení teploty v menší koloně je mnohem rychlejší. V některých studiích z poslední doby byly aplikovány teplotní gradienty na mikronápňové kapilární kolony. Náplň limituje radiální teplotní gradienty a s nimi spojené ztráty účinnosti [4].

Například Greibrokk a kol. [22] testovali kolony s rozdílnými průměry v rozsahu 0,32 – 4,6 mm a aplikoval na ně teplotní gradienty (1 – 20 °C/min). Tyto testy sice prokázaly, že průměr kolony není limitujícím faktorem při aplikaci teplotních gradientů mezi 30 – 90 °C, ale HTLC přináší největší výhody při vysokých teplotách od 150 °C a výše, takže potvrdil, že pro HTLC lze úspěšně použít pouze kolony s malým průměrem. V této studii ale bylo dosaženo několik zajímavých poznatků týkajících se teplotních gradientů. Tak například při separaci polyethylenglykolů (PEG) bylo výhodnější použít inverzního teplotního gradientu, což dokazuje, že retence velkých molekul se zvyšuje se stoupající teplotou. Délku analýzy PEG, při současném udržení selektivity, tedy lze nejlépe redukovat tak, že na začátku analýzy aplikujeme nejvyšší teplotu a poté ji postupně snižujeme (negativní teplotní gradient, u PEG z 80 °C na 25 °C o 21,5 °C/min) [4].

Houdiere a kol. [19, 20] hodnotili efekt současného teplotního gradientu s programováním rychlosti průtoku mobilní fáze. Tento výzkum má logický základ, protože optimální rychlost průtoku se zvyšuje se zvyšující se teplotou. Pak je tedy možné snížit retenci některých nejvíce zadržovaných sloučenin se současným udržením vysoké selektivity separace. Tento typ dvojitého gradientu byl proveden na kapilárních

a mikronáplňových kolonách. Tímto způsobem byla analyzována směs 10 aromatických sloučenin, při teplotním gradientu z maxima 130 °C při teplotním skoku 6 °C a průtoku 3 ml/min. Tyto dva současné gradienty umožnili 30%ní snížení délky analýzy oproti použití samostatného tepelného gradientu [4].

Přes všechny nesporné výhody vysokoteplotní kapalinové chromatografie zatím není tato technika zcela běžně používaná v průmyslových nebo rutinních laboratořích. Problémy instrumentace, jako jsou tepelně odolné stacionární fáze, jsou v této bakalářské práci zmíněny v instrumentální části. Většina stacionárních fází založených na bázi oxidu křemičitého nejsou schopny při teplotách nad 80 °C udržet svou stabilitu po delší čas, zejména když mobilní fáze obsahuje agresivní aditiva, jako například fosfátové pufrů, nebo separace probíhá při extrémním pH. Většina překážek při aplikaci vysokoteplotní kapalinové chromatografie je technického rázu a tyto budou probrány níže v instrumentální části [4].

## **5. Možnosti aplikace podkritické vody v extrakci**

Analytická extrakce podkritickou vodou byla poprvé provedena Hawthronem v roce 1994 [21]. Od té doby je tato metoda používána zejména pro extrakci analytů z půdy a ze vzorků pro ekologické účely. Tato metoda byla využita také například pro analýzu potravin a vzorků rostlinného původu. Pomocí extrakce podkritickou vodou lze vyextrahovat stopová množství kovů z uhlí a pevných matic. Pro separaci extrahovaného analytu z vodného prostředí bylo při většině těchto extrakcí použito organické rozpouštědlo, jako například dichlormethan nebo chloroform. Alternativou tohoto postupu bylo použití extrakce na pevné fázi (SPE), a následné promytí SPE kolony organickým rozpouštědlem, se kterým se s ním vyeluoval i extrahovaný analyt. Tato technika byla přímo propojena s konvenčním HPLC rozpouštědlovým systémem nebo mohl být organický vzorek zakoncentrován a poté změřen separační metodou. Yang a Li [23] předvedli nepřímé propojení SWE (superheated water extraction) s HPLC. Crescenzi a kol. [24] vyvinuli přímé propojení extrakce vzorků půdy fosfátově pufrůvanou (pH = 6 - 8,5) podkritickou vodou s LC-MS (kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí) systémem. Dalším příkladem je Hýtöyläina a kol. [25], kteří použili přímé propojení SWE s LC-GC (kapalinová chromatografie -

- plynová chromatografie) pro stanovení polyaromatických uhlovodíků (PAH) v sedimentu. Vzorek sedimentu byl extrahován vodou za vysoké teploty a vysokého tlaku, kdy analyt byl pevně adsorbován do pevné fáze (solid-phase trap), která zároveň sloužila jako kolona pro LC a měla za úkol odstranit většinu interferujících látek z matrice před vstupem analytu (extraktu) do GC. Young a kol. [26] zavedli propojení SWE s WRP-LC (water-only reversed LC). Extrakce bylo dosaženo za pomoci horké či podkritické vody. Tento vodný extrakt byl v intervalech dávkován do kolony, tvořené novou nízko-retenční stacionární fází, za použití 100% vody jako mobilní fáze. Za laboratorní teploty tyto metody bohužel stále vykazovaly mnoho odpadního materiálu. Ve většině těchto propojených metod bylo k eluci analytů ze sorbetu a k separačním procesům zapotřebí velkých objemů organických rozpouštědel [5].

Podkritická voda může být použita jak pro separaci tak extrakci, takže studie Tajuddina a Smithe [16] zkoumala propojení extrakce podkritickou vodou s chromatografií s podkritickou vodou jako mobilní fází (SWE-SWC) tak, aby bylo použití organických rozpouštědel z procesu vypuštěno. První práce ukázali, že analyt lze adsorbovat na SPE kolonu z vody a analyt může být extrahován z SPE zpět také vodou, která bude ale ohřána na vyšší teplotu. Cílem současných prací je ukázat možnost přímého propojení SWE na SWC přes sorbent (sorbent trap) jako mezičlánek, takže celá sekvence extrakčního zakoncentrování a analytická separace může být dosažena použitím pouze vodné mobilní fáze a teplotního gradientu beze ztrát vzorku [5].

## **B. Instrumentace ve vysokoteplotní kapalinové chromatografii**

Použití rychlé vysokoteplotní kapalinové chromatografie má tři hlavní instrumentální úskalí. První je stacionární fáze, která musí být termicky odolná. Za posledních deset let bylo vynalezeno několik stacionárních fází, které jsou tepelně stabilní i kolem 200 °C. Za druhé, je to teplotní rozdíl mezi procházejícím eluentem a náplní kolony, který nesmí přesáhnout 5 °C, protože vyšší rozdíl teplot by způsobil rozmytí píku, zejména při vysokorychlostních separacích. Tento problém může být částečně vyřešen použitím úzkých náplňových kolon (s průměrem částic 2,1 mm) za vysoké lineární průtokové rychlosti. Třetí překážkou je termická nestabilita analytu po celou dobu separace. Některé studie prokázaly, že velké množství léčiv je stabilní pouze po velmi krátkou dobu, tedy jsou vhodné jenom pro velmi rychlé separace [5].

Překonání těchto překážek v instrumentaci může za použití teplot kolem 150 – 200 °C, jak předpověděli již v 80. letech minulého století Antia a Horváth [18], snížit čas analýz až 20krát. Současně používané kolony pro HPLC, které jsou naplněné silikagelem, nejsou schopny nabídnout takový teplotní rozsah. Ve skutečnosti vydrží pouze relativně malé zvýšení (standardní teplota kolem 50 °C) teploty (o 30 – 40 °C). Nicméně řada velmi stabilních a vysoce účinných stacionárních fází na bázi oxidů kovů je schopna obstát při vysokých teplotách (vyšších než 150 °C) [5].



## 1. Úvod do problematiky stacionárních fází:

Oxid zirkoničitý ( $ZrO_2$ ) je mnohem méně ve vodě rozpustný než silikagel. Stacionární alkyl-vázané zirkoniové fáze jsou jedny z termicky nejvíce odolných, tedy nejvhodnějších pro aplikaci v RP-HTLC. Výrobce těchto stacionárních fází (ZirChrom) sice uvádí jako doporučenou maximální teplotu separace s těmito kolonami na 150 °C, předběžné studie ale ukázaly, že náplň kolony byla stabilní i po průchodu 1300 kolonových objemů při teplotě 200 °C. Dokonce bylo zjištěno, že účinnost separace kolonou se po expozici vysokým teplotám (150 – 200 °C) často ještě zvýšila. Tento nárůst byl zhodnocen jako 300% navýšení počtu teoretických pater po 1300 kolonových objemech při 200 °C. V poslední době byla prokázána stabilita zirkoniových fází i po 5000 kolonových objemech při aplikaci 195 °C. Jediným větším nedostatkem těchto kolon je jejich občasné zavzdušnění při použití teplotních gradientů. Toto zavzdušnění zapříčinilo několik problémů, zejména při kvantifikaci. Avšak pro lepší porozumění vlivu tohoto jevu na separaci je třeba získat více experimentálních dat. I přes výše uvedenou nevýhodu mají zirkoniové (titanové, popř. hliníkové) stacionární fáze velmi uspokojivou termickou stabilitu (oproti silikagelu) a v porovnání s dalšími alternativami stacionárních fází pro RP-HTLC (viz níže) jsou jednou z nejlepších možností pro chromatografické separace s teplotním gradientem [4].

### 1.1 Modifikování povrchů oxidů kovů

Nemodifikované oxidy kovů (zirkon, titan atd.) mají podstatně komplexnější stavbu svého povrchu než je tomu u oxidů křemíku, který byl mnohokrát modifikován pro účely RP-LC.

Jak již bylo v předešlých studiích zmíněno, tyto modifikace lze rozdělit do tří skupin:

- a) **Dynamické, chemické modifikace** - ty jsou uskutečněny zavedením velmi reaktivní sloučeniny do mobilní fáze.
- b) **Permanentní (stálé) kovalentní chemické modifikace** - například silylace (deprivatizace) nebo jiná forma přímé vazby.

- c) **Fyzikální síťování** – například depozice (nanášení) polymeru na oxid nebo potahování oxidu uhličkovými vrstvami.

### 1.1.a) Dynamická modifikace

Dynamická modifikace povrchu může být použita ke dvěma účelům:

- a) Suprese (potlačení) nežádoucích (nepotřebných) míst na povrchu stacionární fáze
- b) Generování „dočasně vázaných fází na povrchu nosiče“

Dynamická chemická modifikace je používána již léta pro eliminaci nežádoucích silanofobních interakcí mezi křemíkovými náplněmi kolon a organickými bázemi. Této eliminaci je většinou dosaženo přidávkem aminu nebo kvartérní amoniové soli do mobilní fáze. Vzhledem k tomu, že některé oxidy kovů (titan, zirkon) mohou být použity při daleko vyšším pH než oxid křemičitý, není již třeba přidávat žádné z výše zmíněných aditiv. Nicméně forma dynamické modifikace povrchu stacionární fáze je stále používána pro blokování Lewisových kyselin přítomných na oxidu kovu. Tato blokáce je provedena přidávkem silné Lewisovy báze, jako jsou například anorganické fosfáty, fluoridy nebo silné komplexotvorné sloučeniny, jako například EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) do eluentu (mobilní fáze). Dynamická modifikace přidávkem Lewisovy báze byla rozsáhle zkoumána na náplních z oxidu zirkonu (nebo modifikovaném zirkonu) kdy jako Lewisovy báze vystupovaly fluoridy, fosfáty a karboxyláty. Koncept pro vytvoření „dočasně vázané fáze“ byl vynalezen Hansenem a kol. [32], kteří modifikovali oxid křemičitý přidávkem kvartérní amoniové soli do mobilní fáze. Rigney [33] tento postup napodobil použitím alkyfosfonátů, které jsou ovšem v dnešní době nahrazeny přidávkem jiných solí do eluentu [7].

## **1.1.b) Permanentní kovalentní modifikace**

### **1.1.b.1. Alkyl-vázané fáze (alkyl-bonded phases)**

Cílem mnoha výzkumů je již nějakou dobu tvorba RP – vázané fáze na oxidech kovů. Jestliže by byla připravena RP-vázaná fáze na oxidech hliníku, oxidech titanu (oxid titaničitý) nebo zirkonia (oxid zirkoničitý), pak by došlo k úplné izolaci míst pro Lewisovy báze (kyseliny) a tím by mohli být stacionární fáze na bázi křemíku na trhu zcela nahrazeny. Komerčně dostupné RP-vázané stacionární fáze na oxidech zirkonia a hliníku nejsou založeny na silanizaci povrchu. K dispozici je několik konceptů, které se zabývají přípravou RP - pevně vázané na oxidech kovů [7].

### **1.1.2.2. Silanizace**

Navzdory faktu, že Schindler a Schmidbaur [27] jasně stanovili hydrolytickou stabilitu vazeb na oxidu křemíku:  $\text{Si-O-Si-R} > \text{Zr-O-Si-R} > \text{Ti-O-Si-R} > \text{Al-O-Si-R}$ , bylo provedeno několik pokusů o modifikaci oxidu kovu silanizací. Tyto pokusy byly podloženy znalostmi z aplikace silanizace na oxidu křemíku. Podle výše zmíněné hydrolytické řady jsou silanizované oxidy zirkonu, titanu a hliníku náchylné k hydrolyze více než modifikovaný oxid křemíku. V literatuře jsou popisovány jak výsledky podporující tuto teorii, tak výsledky které jí odporují. Nejenom že nestabilita vazby Si-O-Zr limituje praktický vývoj silanizovaného povrchu oxidu zirkoničitého, ale také struktura hydroxylů na povrchu oxidu zirkoničitého a jejich bazicita znevýhodňuje postup jednoduché silanizace při přípravě permanentní modifikace. Důležitým faktem pro pochopení těchto nevýhod je skutečnost, že většina hydroxylů přítomných na povrchu oxidu zirkoničitého existuje ve formě mostů, tedy ve formě, která je velmi odlišná od povrchu oxidu křemičitého, tato forma tudíž nepodléhá silanizaci. Hydroxyly oxidů hliníku, zirkonu a titanu jsou daleko více bazické než silanoly oxidu křemičitého [7].

Počátek mnoha pokusů o silanizaci oxidů kovů pro vznik hydrofobních povrchů vázané stacionární fáze začal již v polovině sedmdesátých let dvacátého století [7].

Výsledek těchto pokusů lze shrnout asi takto:

- Většina pokusů s monofunkčními silanizačními činidly byla neúspěšná. To potvrzuje dřívější práce Schindlera a Schmidbaura stejně jako Arenase a Foleyho a také Laurenta a kol. [27, 28, 29]
- Některé studie prohlašují, že bylo dosaženo relativně stabilních fází na bázi trifunkčních silanů, z nichž některé nebyly potvrzeny chromatograficky.
- Úspěšná modifikace povrchu oxidu kovu trifunkčními silany ovšem nemusí nutně odporovat závěrům Schindlera a Schmidbaura nebo Laurenta a kol. [27, 29].

Již nějakou dobu je známo, že silany mohou na povrchu stacionární fáze tvořit tzv. horizontální polymery. Je tedy možné, že i nechtěná (samovolná) polymerace může vést k částečnému pokrytí povrchu stacionární fáze. V literatuře můžeme najít pouze jediný pokus o vytvoření samopolymerujících monovrstev C30 silanů na povrchu oxidu zirkonu nebo titanu. Koordinačně vázaná voda na povrchu oxidů kovů podle některých studií podporuje proces horizontální polymerizace. Monovrstvy na povrchu oxidu titanu a zirkonia byly charakteristické vyšším uspořádáním řetězce, než tomu bylo na amorfních substrátech. Výsledkem této uspořádanosti je vysoká schopnost rozpoznání tvaru molekul (higher molecular shape recognition). Žádná studie se ovšem zatím nezabývala stabilitou samopolymerujících monovrstev na povrchu stacionárních fází oxidu zirkonu a titanu [7].

Povrchy kovových oxidů modifikujeme proto, aby bylo dosaženo podobné hydrofobicity a chemické selektivity jako u konvenčních RP - silikagelů. Když zvážíme pouze neelektrolytové analyty, tak těchto cílových vlastností již bylo dosaženo například potahováním různých kovových oxidů (hliníku, zirkonu) polybutadienem (PBD). Tyto stacionární fáze interagují s neionizovatelnými vzorky zásadně RP – mechanismy. Avšak pro ionizovatelné vzorky u všech povrchových modifikací musí zároveň s RP procesy platit mechanismus „kombinovaného retenčního módu“, tedy výměny ligandů (mezi Lewisovou kyselinou a bazí) a výměna iontů (Coulombický děj). Jakmile analytik pochopí interakce „kombinovaného retenčního módu“, může této verze při chromatografické separaci využít pro jinak obtížně separovatelné analyty, což

souvisí zejména s vyšší chemickou a termickou stabilitou oxidů kovů v porovnání s vázanými fázemi na bázi oxidu křemíku [7].

## **1.2 Alternativní termicky stabilní stacionární fáze pro HTLC**

Dalšími alternativami stacionárních fází pro RP-HTLC mohou být grafitové stacionární fáze a stacionární fáze složené z organických polymerů

### **1.2.1 Grafitové stacionární fáze**

Grafit je hydrofobnější než jakákoliv existující stacionární fáze. Pro mnoho analytů je grafit velmi retentní (zadržuje je déle), proto aby byla eluce provedena v rozumném čase, musí být použita organická rozpouštědla. Procentuální zastoupení těchto organických látek v mobilní fázi je o 20-40 % vyšší než je zapotřebí u silikagelu. Kromě silné retence má tento materiál velmi složitou a proměnlivou kinetiku reakcí analytu se stacionární fází pórovitého grafitu, což má za následek rozmytý tvar píku a/nebo nižší účinnost separace pro některé analyty. Velkou výhodou grafitu je jeho vysoká tepelná stabilita. Grafitové kolony mohou pracovat až do 225 °C. Stabilita pórovitého grafitu byla studována Yamakim [30]. Jeho práce popisuje separaci peptidů a aminokyselin při 160 °C na grafitové koloně. Kolona byla stabilní po dobu průchodu 3000 kolonových objemů [4].

### **1.2.2 Stacionární fáze složené z organických polymerů**

Nejvíce HTLC studií uveřejněných do dnešní doby používalo jako stacionární fázi polystyrendivinylbenzen. Tento typ vysoce zesíťovaného polymeru je stabilní i při použití 100% subkritické vody jako mobilní fáze. Stabilita PRP (polymerní reverzní fáze) byla důkladně studována a byla

potvrzena její stabilita po průchodu 9000 kolonových objemů při 150 °C. Stabilita byla vyhodnocena jak z pohledu retence, tak účinnosti a dokonce obstála při použití subkritické vody při 225 °C. Problém tohoto materiálu je podobný jako u porézního grafitu: kinetika je velmi pomalá a účinnost je nízká, což je samozřejmě závislé i na povaze analytu [4].

## **2. Řešení ohřevu a chlazení mobilní fáze a kolony**

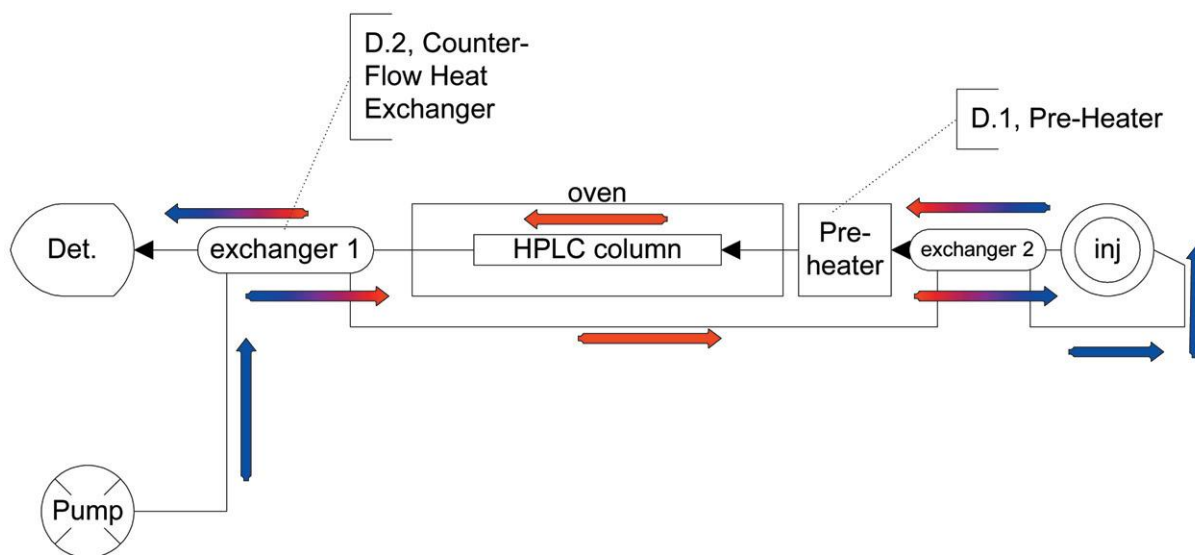
Jeden z největších problémů vysokoteplotní kapalinové chromatografie je vytvoření chromatografického systému, který minimalizuje zvyšování teplotního rozdílu a vyrovnává přenos tepla mezi předkolonovým ohřívacím prostorem a vnějším ohřevem kolony [3].

Efekt teploty na účinnost chromatografické separace byl poprvé diskutován již v sedmdesátých letech dvacátého století. Výhody vysoké teploty eluentu již byly v této práci zmíněny. Nyní se konkrétně zaměříme na systém ohřevu mobilní fáze. Jak už bylo výše uvedeno, viskozita mobilní fáze se při vysoké teplotě sníží a to vede také ke snížení zpětného rázu mobilní fáze (backpressure) při konstantní průtokové rychlosti.

### **2.1 Předehřívání mobilní fáze před vstupem do kolony**

K zajištění krátkých (rychlých) analýz je zapotřebí účinných řešení v oblasti ohřevu a chlazení jednotlivých částí HPLC systému. Jedním z největších zádrhelů pro konstruktéry těchto zařízení je problém předehřívání mobilní fáze. Je dobře známo, že tepelný rozdíl mezi teplotou mobilní fáze a teplotou kolony způsobuje deformace eluční křivky. To samozřejmě znamená sníženou účinnost (přesnost) analýzy. Teplotní rozdíl není problémem pouze u vysokoteplotní LC ale také u obvyklé HPLC za normálních teplot. Jakmile mobilní fáze vstupí do kolony, vysoký tlak způsobí rozptyl tepla zejména v místě nástřiku vzorku. Tato skutečnost byla zdůrazněna Welschem a kol. [31], kteří porovnali počet teoretických pater a rozložení daného píku v závislosti na teplotě mobilní fáze. Výsledkem této studie bylo zjištění, že v některých

případech je nutné ochladit mobilní fázi předtím, než je vedena do HPLC kolony, což kompenzuje tepelné gradienty u hlavy kolony, které vznikly laminárním tepelným rozptylem. Tento příklad ukazuje, že pro dosažení uspokojivých výsledků je nutný nezávislý tepelný ohřev mobilní fáze vstupující do kolony a kolony samotné [3].



**Obrázek 1:** Diagram rozložení tepelných zón mobilní fáze v HTLC systému a schéma ohřevu a chlazení. [8]

## 2.2 Chlazení eluentu před vstupem do detektoru

Tato operace je posledním technickým krokem HTLC separace před detekcí a zabraňuje rozmytí píků stanovovaných složek analytu. Jednou z možností snížení teploty mobilní fáze vycházející z kolony je použití účinného tepelného výměníku. U této možnosti se jedná o ochlazení mobilní fáze z teploty kolem 150 °C na horní tepelný limit detektoru (pro často používané UV detektory se jedná o teplotu 80 °C). Existuje přímý vztah mezi délkou potrubí tepelného výměníku a účinností kolony. Zjednodušeně lze říci, že čím větší je objem tepelného výměníku, tím nižší je chromatografická účinnost. Teplo získané ochlazováním poté může být předáno mobilní fázi, která teprve vstupuje do kolony, tím dojde k úspoře energie. Pro potřeby HTLC (100% vodná mobilní fáze) lze například použít chladicí systém Metalox 200C, který byl navržen pro ochlazení 100% vodné mobilní fáze z 200 °C na 75 °C při průtokových

rychlostech do 5ml/min. V tomto systému je aplikována tyč ze stříbra a mědi, které díky své vysoké tepelné vodivosti odvedou zpět k přehřátí mobilní fáze až 90 % tepla. Velmi jednoduchou alternativou je použití ledové lázně kam zavedeme potrubí, které vede eluent k detektoru [8].

### **3. Detektory používané při HTLC separacích**

Nejčastěji používaným detektorem v konvenční HPLC je UV detektor, jehož hlavními výhodami je univerzálnost a nízká cena. Většina HTLC separací také využívá tento druh detekce. Díky nízkým koncentracím organického solventu v mobilní fázi, nebo dokonce 100% vodné mobilní fázi, lze použít také FID (flame ionization detection) a další detektory [4].

#### **3.1 HTLC – UV**

Jak bylo mnohými prokázáno,  $pK_a$  (disociační konstanta) jednoduchých sloučenin se se zvyšující teplotou, stejně jako pozitivní ionizace, snižuje. Tento fenomén umožňuje snažší eluci jednoduchých sloučenin v jejich molekulární formě bez nutnosti použití vysokých pH [4].

Výhodou UV detekce při HTLC (100% vodná fáze) je vysoká transparence (průsvitnost) vody, takže lze použít velmi nízkých vlnových délek kolem 200 nm, kde má většina sloučenin maximální absorpční. Naopak nevýhodou použití takto nízkých vlnových délek u reálných vzorků je skutečnost, že většina maticí také velmi dobře absorbují při 200 nm a mohou tedy „skrýt“ stanovovaný analyt [4].

#### **3.2 HTLC – FID (Flame Ionization Detection)**

Eluent (zejm. organické sloučeniny) přicházející do FID detektoru je rozprášen (nebulizován) do komory detektoru, kde hoří kyslíkovo – vodíkový plamen. Eluent je



v plameni ionizován a množství těchto iontů (koncentrace analytu) je úměrné velikosti vzniklého proudu v elektrickém poli nad plamenem. Pro uhlovodíky je odezva úměrná počtu uhlíků v molekule [4].

Tento detektor je známý zejména z jeho použití v plynové chromatografii pro analýzu organických sloučenin. Jeho možná aplikace pouze pro organické sloučeniny byla hlavním problémem pro jeho aplikaci v HPLC, kde mobilní fáze obsahuje vždy organické rozpouštědlo, které by „oslepilo“ detektor vůči analytu [4].

HTLC se 100% vodnou mobilní fází ovšem tento problém nemá. Menším problémem je vysoká průtoková rychlost vodné mobilní fáze, která by mohla při vstupu do detektoru plamen zhasit. Je tedy třeba rozfázovat tento vysoký průtok ještě, než dosáhne detektoru, kam poté vstupuje jenom 5 – 10 % z celkového objemu vystupujícího z kolony [4].

### **3.2.1 Aplikace**

FID detekce je používána zejména při HTLC separacích lineárních a rozvětvených alkoholů  $C_1 - C_6$ , které neabsorbují v UV oblasti. Výsledky získané HTLC – FID výborně korelovaly s výsledky získané metodou GC – FID [4].

### **3.3 HTLC – MS (Mass Spectrometry)**

Největší výhodou použití hmotnostní spektrometrie je její specifita, tedy že dokáže stanovit nejen množství stanovované látky, ale také určit o jakou látku se jedná. Principem hmotnostní spektrometrie je ionizace chemické sloučeniny (např. dopadem paprsku elektronů), která je poté v elektromagnetickém poli rozložena na fragmenty vzhledem k poměru  $m/z$  (hmotnost ku velikosti náboje) a tyto nabitě fragmenty jsou vedeny k detektoru, který zaznamenává jejich průchod nebo dopad na plochu. Hmotnostní spektrometrie se používá pro zjištění chemického složení a struktury stanovované látky. MS metody se liší zejména ionizačními technikami. V současnosti nejvíce používané ionizační techniky jsou: APCI (atmospheric pressure chemical ionization) - ionizace kombinací vypařování za vysoké teploty ( $\approx 400\text{ }^\circ\text{C}$ ) a elektrického

výboje ( $\approx 5$  kV) a ESI (electrospray ionization) ionizace elektrosprejem při vysokém napětí ( $\approx 5$  kV) za současného zmlžování vzorku [4].

V případě HTLC a teplotních gradientů se více osvědčila metoda ESI – MS. Příkladem může být stanovení fosfatidylserinu a mastných kyselin. Citlivost dosažená touto metodou byla mnohem vyšší než při analýze stejných látek konvenční HPLC za použití gradientové eluce [4].

### **3.4 HTLC – ICP – AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) nebo ICP – MS (ICP – Mass Spectrometry)**

U kombinace ICP – AES jde o propojení spektrometrického detektoru (AES – atomově emisní spektrometrie) s ionizací vzorku v plazmě (místo klasického plamene). V druhém případě ICP – MS jde o další možnost ionizace vzorku v hmotnostním spektrometru. Kombinací těchto dvou velmi výkonných a účinných technologií (ICP – MS) lze získat velmi přesný a specifický detektor například pro stanovení organokovových sloučenin. Vysoká teplota mobilní fáze dokonce napomáhá ke zmlžení (nebulizaci) vzorku, která je potřebná k jeho správné ionizaci. HPLC s gradientovou elucí dává horší výsledky než HTLC právě kvůli nestabilitě plazmy při gradientové eluci (methanol – voda) [4].

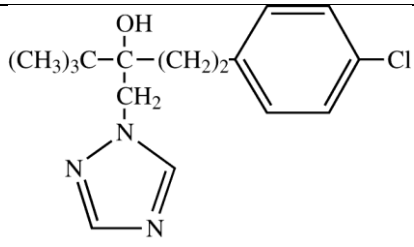
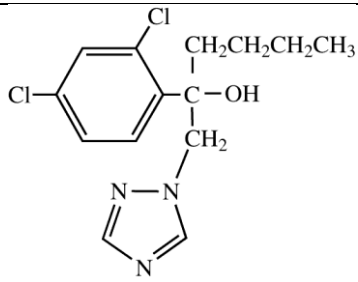
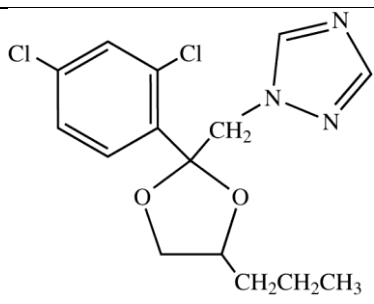
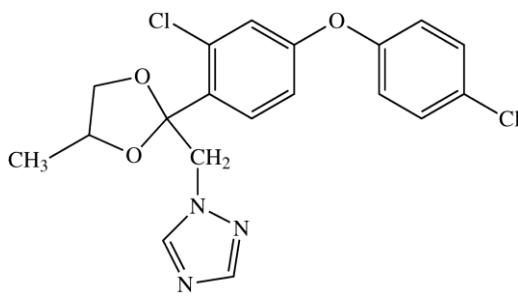
# **C.Aplikace                      Vysokoteplotní                      kapalinové chromatografie při analýze biologických vzorků**

## **1. Aplikace HTLC při stanovení fungicidů**

Triazolové fungicidy jsou jedním z hlavních pesticidů používaných na široké spektrum ovoce, zeleniny a obilnin. Tyto sloučeniny jsou charakteristické svou vysokou chemickou a fotochemickou (odolnost vůči světelnému/UV záření) stabilitou a nízkou biodegradabilitou. Souhrn těchto vlastností způsobuje trvalé zamoření půd a vod právě triazolovými fungicidy. Byl prokázán i jejich nepříznivý vliv na lidské zdraví, který je způsoben porušením funkce endokrinního systému [9].

Proto je monitorování možné kontaminace stopovým množstvím těchto fungicidů ve vodě velmi důležité. Směrnice Evropské Unie uvádí maximální přípustnou koncentraci jednotlivého pesticidu v pitné vodě jako 0,1 ng/ml. Vysoké požadavky na kvalitu vody znamenají také potřebu velmi citlivé analytické metody pro stanovení těchto nežádoucích látek. Mezi tyto metody lze zařadit například plynovou chromatografii (GC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) a tenkovrstvou kapalinovou chromatografii (TLC) [9].

**Tabulka 1:** specifikace triazolových fungicidů

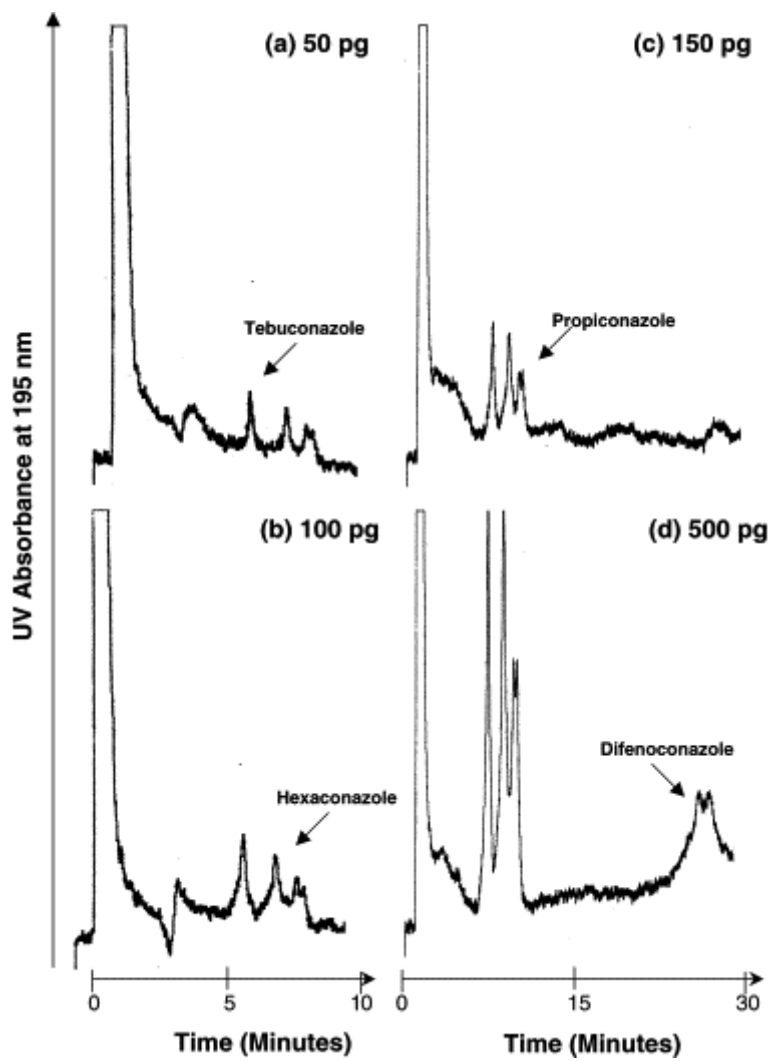
Název sloučeniny	M [g/mol]	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
Tebukonazol	307,82	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	
Hexokonazol	314,21	$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$	
Propikonazol	342,22	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	
Difenokonazol	406,26	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	

Převzato částečně z [10]

Tyto metody stanovení triazolových fungicidů ovšem předčila svým daleko vyšším rozlišením a citlivostí právě technika vysokoteplotní kapalinové chromatografie (HTLC) se 100% vodnou mobilní fází za použití polybutadienem (PBD) potaženého oxidu zirkoničitého jako stacionární fáze. Kvalitní separace byla pozorována jak u diastereoizomerů (propikonazol a difenokonazol), tak u dvou enantiomerů (tebukonazol a hexokonazol). Polybutadienem potažené stacionární fáze mají obecně vyšší hydrofobní selektivitu zejména ve vodném prostředí mobilní fáze, než konvenční monomerní nebo polymerické ODS (oktadecylsilikagel) fáze, což ještě více upřednostňuje použití HTLC při separaci těchto sloučenin [10].

### **1.1 Limity detekce**

Limit detekce je pro toto stanovení nejdůležitějším parametrem a u této konkrétní aplikace bylo dosaženo následujících hodnot: tebukonazol může být detekován až do 50 pg/l, hexokonazol do 100 pg/l, propikonazol do 150 pg/l a difenokonazol do 500 pg/l. Detekční vlnová délka (UV detekce) byla optimalizována na hodnotě 195 nm. Podmínky separace byly následující: teplota mobilní fáze při separaci je 140 °C, mobilní fáze 100% deionizovaná a dvakrát destilovaná voda (kvůli spektrometrické detekci, neupravená voda je méně transparentní), UV detekce. Vzorky musí být zakoncentrovány, což je dosaženo extrakcí vzorku na pevné fázi (SPE – solid phase extraction). Výsledky a limit detekce HTLC jsou významně lepší, než je tomu u konvenční HPLC (ODS stacionární fáze, mobilní fáze: směs methanolu a 0,1 % kyseliny octové (80:20), gradientová eluce, UV detekce při 225 nm), kde byl limit detekce pro dané triazolové fungicidy 6,8–34,5 ng/l [11].



**Obrázek 2:** Chromatografický záznam stanovení triazolových fungicidů

Převzato z: [10]

## 2. HTLC stanovení metabolitů 2-, 3- a 4- brombenzoové kyseliny

Dalším příkladem aplikace HTLC je stanovení metabolitů aromatických halogenkyselin, konkrétně 2-,3- a 4- brombenzoové kyseliny. Aromatické halogenované sloučeniny mají několik oblastí použití. Některé (difenylbromidy) jsou používány jako retardanty hoření (nehořlavé materiály = polybromované bifenylethery), dále jako pesticidy a zejména jako látky pro organickou syntézu (brombenzoové kyseliny). Zajímavostí je produkce některých organo-bromových sloučenin mikroorganismy či dokonce vodními řasami. Tyto látky tedy mohou unikat z průmyslových výroby do prostředí, nebo se mohou uvolňovat z produktů organických syntéz. V lidském organismu mohou tyto sloučeniny při dlouhodobé expozici způsobovat velké poškození zejména ledvin, plic a jater. Známa je i akutní dermální toxicita organo-bromových sloučenin [12].

Výše uvedené informace svědčí o nutnosti identifikace a kvantifikace metabolitů těchto sloučenin. Při experimentálním sledování biotransformace a identifikace toxických látek je většinou použita metoda izotopového značení (radiolabel) toxické látky pomocí izotopu uhlíku  $^{14}\text{C}$ . Takto značené metabolity jsou poté dobře detekovatelné pomocí chromatografických technik s NMR (nukleární magnetické rezonance) detekcí. Výroba značených sloučenin je ovšem velmi nákladná, a proto se hledají alternativní cesty stanovení [12].

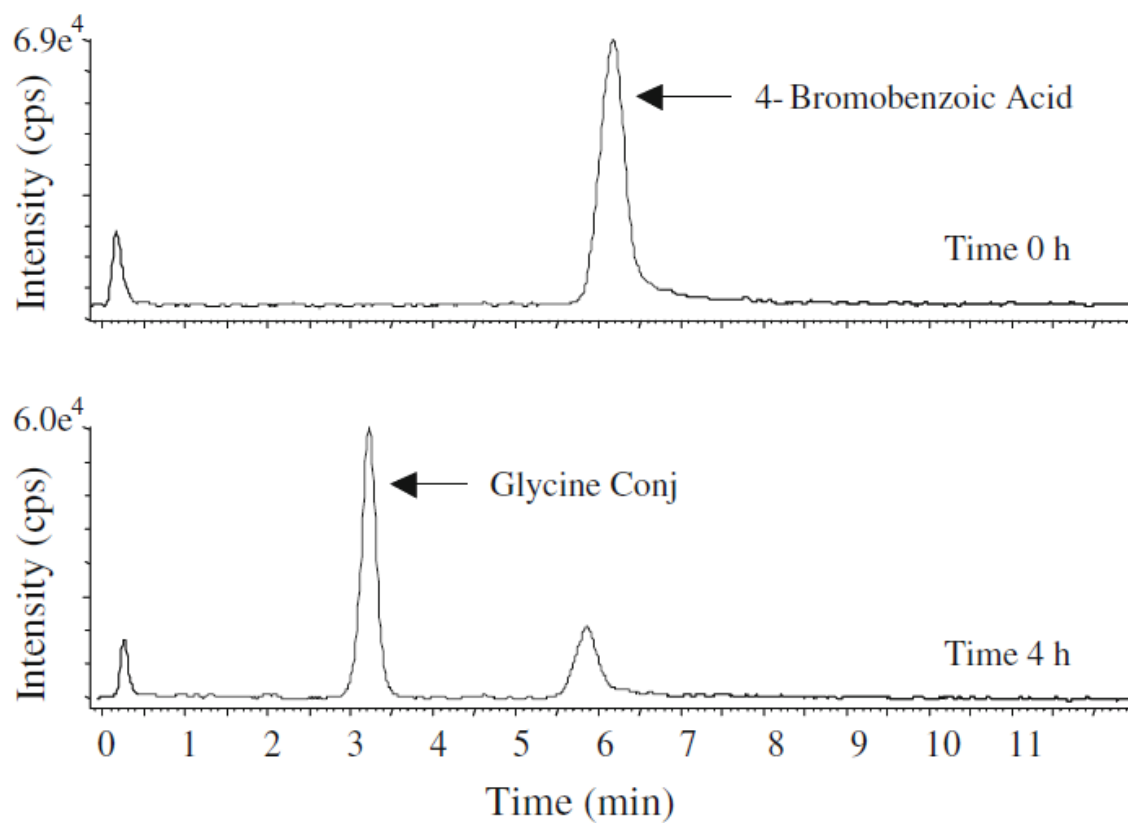
Velmi účinnou a přesnou náhradou je použití ICP-MS detekce (inductively coupled plasma – mass spectrometry / indukčně vázaná plazma – hmotnostní spektrometrie). Problémem tohoto spojení s konvenční HPLC je horší kompatibilita organického eluentu s ICP, kdy ionizováním směsi organických rozpouštědel v plazmě vzniká velký uhlíkový šum na detektoru (tento šum může zakrýt i píky stanovované látky). Methanol a acetonitril, což jsou nejobvyklejší rozpouštědla používaná v konvenční HPLC, mohou dokonce nepříznivě ovlivňovat vodivost plazmy. Tento problém je řešen přidávkou  $\text{O}_2$  do eluentu, vstupujícího do zamlžovacího zařízení před ICP hlavici, takže kyslík reaguje s uhlíkem v plazmové hlavici a tvoří CO (oxid uhelnatý), jenž je odváděn ze systému. Tento krok bohužel zcela neřeší nižší citlivost ICP/MS detekce u konvenční HPLC [12].

Proto je nasnadě pro toto stanovení využít HTLC se 100% vodnou fází. Na chromatogramech zobrazených níže, lze vidět srovnání odezvy detektoru ICP – MS při HTLC a HPLC separaci. U HTLC separace pozorujeme o jeden řád vyšší odezvu než je tomu u HPLC separace. Další otázkou stanovení je tepelná stabilita analytu (4 - brombenzoové kyseliny). HTLC separace byla provedena v rozmezí teplot mobilní fáze 100 – 135 °C a nebyla pozorována žádná nestabilita analytu po dobu 30-ti chromatografických separací [12].

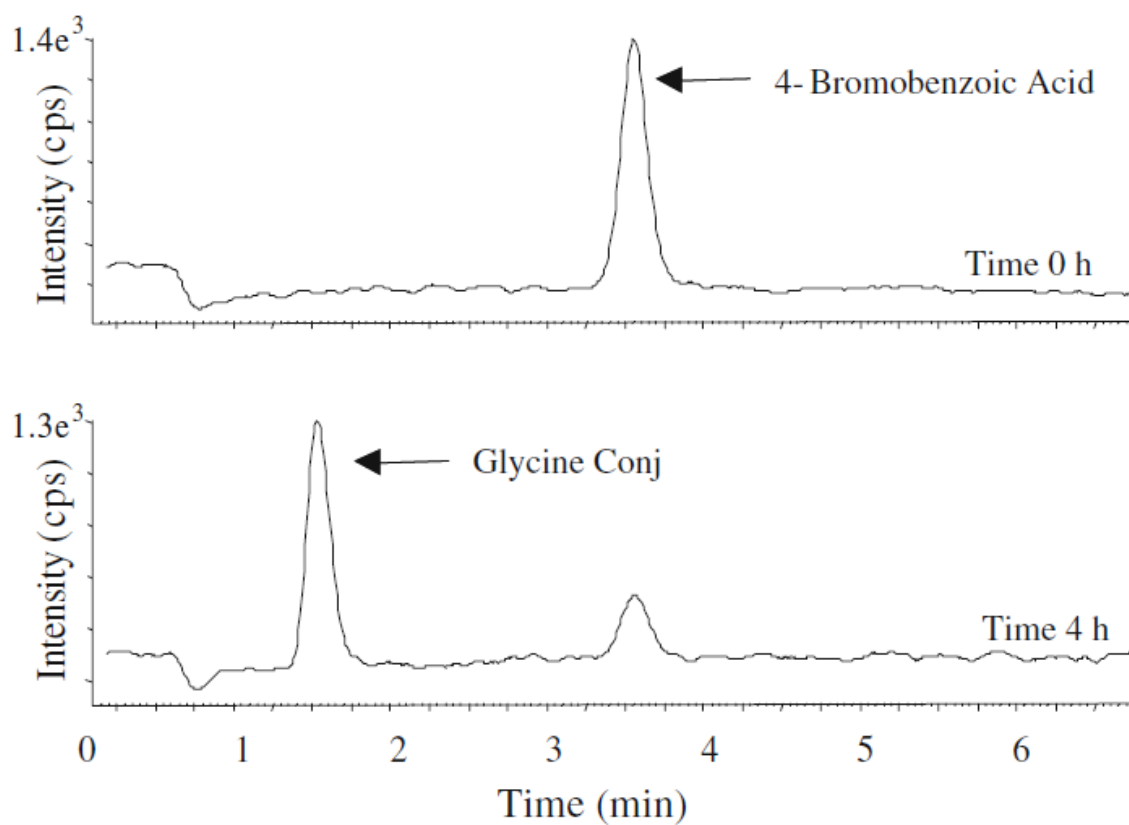
Všechny brombenzoové (BBA) substráty byly před analýzou inkubovány s krysími hepatocyty (kvůli experimentální simulaci biotransformace v játrech) a buněčná suspenze byla posléze zředěna pufrům, byl zastaven metabolismus ledovým ethanolem a po následné centrifugaci byl vzorek připraven k analýze [12].

Chromatogramy těchto separací jsou uvedeny níže. U prvního chromatogramu je uvedena inkubace vzorku s hepatocyty v čase  $T = 0$  h (ve skutečnosti 10 min) a je tedy eluována nekonjugovaná kyselina 4 – brombenzoová. Po 4 - hodinové inkubaci jsou již eluovány konjugáty metabolitů s aminokyselinou glycinem. Výsledky HTLC vs. HPLC: HTLC dosahuje vyšší citlivosti detekce než HPLC, HPLC separace je o 1 – 2 minuty rychlejší [12].



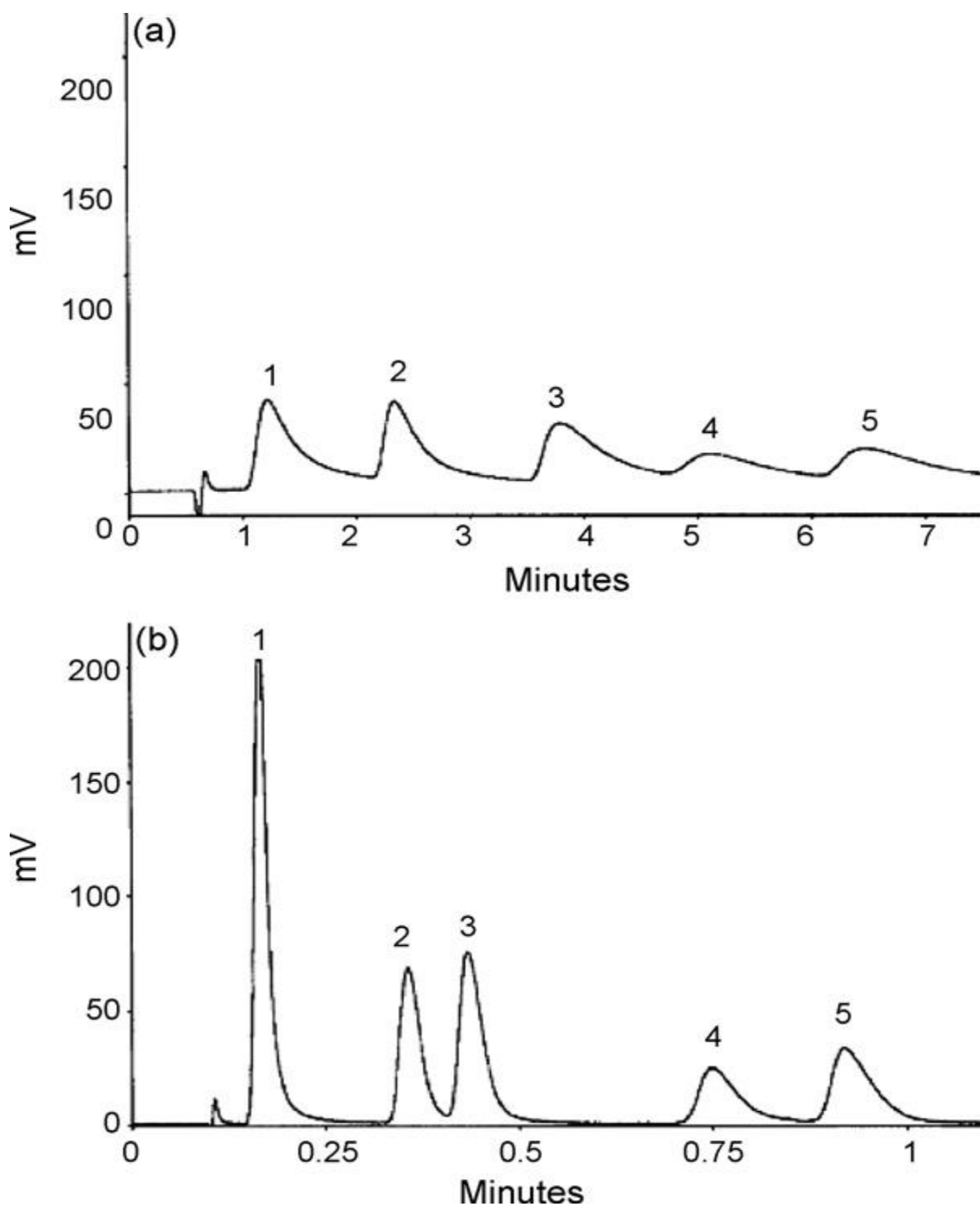


**Obrázek 3:** Eluční profily 4 – brombenzoové kyseliny (4 – BBA), T= 0 h a T = 4 h. Separace při teplotním gradientu tlaku [12].



**Obrázek 4:** Eluční profil 4 – brombenzoové kyseliny (4 – BBA), T= 0 h a T = 4 h. Gradientové eluci v systému složeném z methanolu a 0,1 % mravenčí kyseliny [12].

### 3. HTLC stanovení kofeinových derivátů



**Obrázek 5:** Efekt teploty na separaci kofeinových derivátů (1, hypoxanthin; 2, theobromin; 3, theofilin; 4, kofein; 5, hydroxy-ethyltheofilin). Kolona ZirChrom – DB – C18, 50 mm × 4,6 mm: (a) 25 °C, 1 ml/min, voda : methanol 60 : 40 (v/v); (b) 150 °C, 7 ml/min, 100% voda. Převzato z: [13]

## **D. Diskuze:**

V následujících odstavcích bych chtěl shrnout hlavní výhody a nevýhody HTLC, srovnat tuto techniku s dalšími novinkami z oblasti kapalinové chromatografie a nastínit budoucí možnosti HTLC a jejího použití zejména v biologických/biochemických analýzách [14].

### **1. Výhody HTLC**

#### **1.1 Rychlost**

Téměř u všech RP – separací způsobuje zvýšená teplota pokles retence analytu. Při vyšší teplotě navíc dochází ke snížení viskozity mobilní fáze, což znamená nižší zpětný tlak mobilní fáze v koloně. Díky takto nízkému zpětnému tlaku lze použít vyšší průtokové rychlosti. Kombinací vysoké teploty s krátkými kolonami naplněnými částicemi „sub – two-micron“, tedy velikosti  $< 2 \mu\text{m}$  můžeme dosáhnout ještě rychlejších separací. Pro plné využití těchto mikronáplňových kolon musí být použity vysoké lineární průtokové rychlosti. Pro splnění takových podmínek za normálních teplot mobilní fáze (do  $40^\circ\text{C}$ ) je třeba speciálního UPLC (ultra-high-pressure LC = ultra-vysokotlaká LC, viz tab.) vybavení, protože konvenční HPLC systém by vysoký zpětný tlak mobilní fáze v mikronáplňové koloně nevydržel. Ohřejeme-li mobilní fázi na vyšší teplotu (nad  $100^\circ\text{C}$ ), tedy snížíme zpětný tlak mobilní fáze v koloně, lze aplikovat vysoké lineární průtokové rychlosti za použití standardního HPLC systému [14].

#### **1.2 Účinnost separace a rozlišení**

Při aplikaci vyšších teplot je tranfer analyzované látky z mobilní do stacionární fáze více účinný. Pro dosažení takto velké účinnosti je nezbytné vysoké průtokové rychlosti. Účinnost a rozlišení separace je úzce spjata s délkou kolony a velikostí částic mobilní fáze. Nízký zpětný tlak umožňuje díky malé viskozitě mobilní fáze použití delších kolon, což výrazně zlepšuje rozlišení a účinnost separace, aniž by byla prodloužena délka analýzy [14].

### **1.3 Selektivita**

Díky svému jednoduchému instrumentálnímu nastavení lze považovat teplotu za jednu z nejsnazších cest k ovlivnění chromatografické selektivity. Tento parametr je nejvíce užitečný pro polární a ionizovatelné sloučeniny, vezmeme-li v úvahu že iontová rovnováha je závislá na teplotě.

### **1.4 Minimální spotřeba organických rozpouštědel (Green HPLC)**

Zvýšením teploty vodné mobilní fáze o 3,75 °C má stejný účinek na retenci jako 1% zvýšení koncentrace methanolu v mobilní fázi nebo teplotním skokem o 5 °C se retence zvýší jako by bylo množství acetonitrilu (ACN) zvýšeno o 1%. Faktem je, že když je zpětný tlak snížen při HTLC separaci viskózních solventů (rozpuštěných stanovovaných látek) stejně jako u separace neviskózních solventů při HPLC za normální teploty, nabízí se další ekologické řešení. Tímto řešením je použití netoxického ethanolu namísto toxických rozpouštědel, jako je methanol a acetonitril. Nejlepší variantou je samozřejmě použití extrémě čisté vody (několikrát destilovaná a deionizovaná) [14].

### **1.5 Zlepšená detekovatelnost**

Detekce v nízkých hodnotách vlnové délky UV záření je usnadněna u HTLC díky vysokému procentu vody v mobilní fázi nebo dokonce 100% vodné mobilní fázi, zejména kvůli své velké UV transparentnosti. Alternativní detektory, jako například FID (flame ionization detection), který byl dříve používán pouze u plynové chromatografie, nyní přichází v úvahu u HTLC, která nepoužívá organická rozpouštědla.

### **1.6 Lepší tvar (profil) píků**

Mnohé HTLC studie prokázaly, že vysoká teplota mobilní fáze zlepšuje profil chromatografického záznamu u jednodušších analytů. Při aplikaci HTLC na modifikované silikagelové termálně stabilní stacionární fáze dochází ke zmenšenému výskytu vedlejších reakcí, které byly častým důvodem deformace píků při konvenční

HPLC separaci. U obvyklé HPLC jsou pro inhibici těchto nežádoucích jevů aplikovány různé pufrы, které ovšem zkracují životnost jak kolon, tak chromatografických systémů.

### **1.7 Teplotní gradient**

Jak již bylo zmíněno výše, teplotní změny ovlivňují retenci. To znamená, že aplikace teplotního gradientu, který je normálně používán v plynové chromatografii, může nahradit gradientovou eluci, tedy gradient organických rozpouštědel, což je dosud hlavním nástrojem kapalinové chromatografie k ovlivnění retenčního faktoru. Pokud máme k dispozici systém, který je schopen vytvořit široké rozmezí teplot (40 – 200 °C), je teplotní gradient velmi účinným nástrojem pro řízení retence.

## **2. Nevýhody HTLC**

Na druhou stranu HTLC má několik speciálních požadavků a omezení, které lze považovat za nevýhody. Většina z nich byla ovšem již v nedávné době vyřešena. Úspěšná aplikace HTLC závisí na několika klíčových elementech: stabilitě analytu při vysokých teplotách, dostupnost termicky stabilních kolon, předehřev mobilní fáze před kolonou, aby se předešlo rozmytí píků, schopnost účinně a rychle ohřát jak vnější prostor kolem kolony, tak mobilní fázi vstupující do kolony a v neposlední řadě chlazení eluentu jdoucího z kolony do detektoru. Všechny tyto aspekty již byly probrány v teoretické a instrumentální části. Zde tedy pouze krátce shrnu některé z těchto aspektů [14].

### **2.1 Stabilita analytu**

Tento aspekt je u HTLC nejvíce diskutován. Avšak mnohé analyty, které byly dříve považovány za termicky labilní (např. karbamáty, fenylureové pesticidy) při experimentálním měření za vysoké teploty nedegradovaly. Důvodem je stav jejich molekul při rozpuštění, který odolává teplotě. Některé látky, jako například termicky labilní léčiva odolávají teplotě pouze po určitou dobu, takže při rychlých separacích

HTLC na vhodných stacionárních fázích nestačí dojít k degradaci stanovované látky a lze ji tedy pomocí HTLC uspokojivě stanovit [14].

## **2.2 Stabilita náplně kolony**

U klasických RP – HPLC separací je nejčastěji používána modifikovaná silikagelová stacionární fáze a často se stává, že přítomnost vody při aplikaci gradientové eluce s organickým rozpouštědlem způsobuje hydrolyzu vázané (support phase) fáze na silikagelu, tedy degradaci funkce stacionární fáze. Při vyšších teplotách potřebných pro HTLC separace ovšem klasické RP- stacionární silikagelové fáze nejsou stabilní. Proto bylo třeba vyvinout nové termicky odolné stacionární fáze, které by obstály i při teplotách kolem 200 °C. Tyto stacionární fáze (jak bylo uvedeno v instrumentální části) se skládají z modifikovaných oxidů kovů, konkrétně zirkonia, titanu a hliníku. Alternativou je i stacionární fáze složená z grafitu nebo polystyren/divinylbenzenu. V poslední době byly představeny i termicky stabilní modifikované stacionární fáze na bázi oxidu křemičitého (silikagel) [14].

## **2.3 Instrumentace ohřevu**

V minulosti byl jedním z velkých problémů také ohřev potřebných částí HPLC systému na vysoké teploty. Hlavním nedostatkem tehdejších přístrojů byl neúplný přenos tepla z ohřevové komory (termostat) na kolonu a také nepřítomnost integrovaného předehřevu mobilní fáze. Chlazení mobilní fáze před detektorem způsobovalo také velké potíže. Tyto teplotní rozdíly mezi kolonou a mobilní fází způsobovali rozmytí píků a nedostatečné rozlišení. Nynější instrumentace ohřevu mobilní fáze před kolonou, ohřevu samostatné kolony a poté chlazení eluentu před vstupem do detektoru je již na takové úrovni, že HTLC jsou nejen přesnější než HPLC, ale i rozlišení je srovnatelné s rozlišením ostatních LC metod [14].

### 3. Budoucnost HTLC

Dalším krokem ke zlepšení HTLC separací by v budoucnu mohlo být propojení několika LC kolon do série za současného teplotního a mírného rozpouštědlového gradientu. Takové instrumentální řešení by mělo přinést velmi vysoké možnosti v rozlišení a kapacitě píků, bohužel na úkor rychlosti separace. HTLC je zatím velmi novou technikou, vyzkoušenou pouze na velmi úzkém spektru analytů. V současné době je zaváděno mnoho ekologických opatření i do oblastí jako je analytická chemie a HTLC má v tomto ohledu velký potenciál využití. Ekonomická stránka HTLC, zejména Green HTLC, tedy použití 100% vodné mobilní fáze, nebo směsi voda/ethanol, je při srovnání s klasickou HPLC nesrovnatelná [14].

**Tabulka 2:** Srovnání nejnovějších LC metod s konvenční HPLC

Parametry:	konvenční	monolitová <sup>3</sup>	HTLC (green)	Sub - 2 $\mu$ m 400 bar <sup>4</sup>	UPLC <sup>5</sup>
Délka analýzy [min]	8,5	1,4	2,3	1,25	0,75
Retenční čas lidokainu [min]	7,72	0,7	2,1	1,25	0,65
Retenční faktor lidokainu <sup>1</sup> [k]	3,5	2,1	3,8	5,2	4,4
Účinnost separace lidokainu	10900	4300	9200	8800	7700
Symetrie píku lidocainu	0,98	0,76	1,12	0,92	0,87
Minimální rozlišení lidokainu <sup>2</sup>	4,8	3,1	5,9	9,2	4,4

Vysvětlivky:

1) Retenční faktor (kapacitní poměr) – udává míru zadržování dané látky v koloně, tedy poměr objemu analytu ve stacionární fázi ku objemu analytu v mobilní fázi.

2) Minimální rozlišení lidokainu – nejbližší pík po nástřiku do kolony



3) Monolitová HPLC – používá kolony s monolitovou stacionární fází, což je jediný kus pórovitého materiálu

4) Sub - 2 $\mu$ m 400 bar – HPLC s mikronáplňovou kolonou s částicemi velikosti pod 2 $\mu$ m za použití tlaku 40 MPa (400 bar).

5) Ultra Performance Liquid Chromatography - je novou separační technikou v oblasti kapalinové chromatografie. Separační proces využívá stacionárních fází připravených patentovanou technologií "bridged hybrid particle", které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Separace probíhá za velmi vysokých tlaků (1000 bar, 100 MPa).

Převzato z: [15]

## **E. Závěr**

Cílem této práce bylo zhodnotit a sestavit přehled dosavadních poznatků o vysokoteplotní kapalinové chromatografii se zaměřením na verzi používající 100%ní vodnou mobilní fázi.

Velká pozornost byla věnována instrumentálnímu řešení nové techniky, zejména rozdílům mezi instrumentací běžné HPLC a HTLC. Tyto rozdíly spočívají hlavně ve složení stacionárních fází, které umožňuje vyšší termickou stabilitu. Dalšími důležitými faktory jsou ohřev a chlazení mobilní fáze. Pokud jsou tyto instrumentální požadavky splněny, lze pomocí HTLC dosáhnout až 20krát rychlejších analýz než s klasickou HPLC při zachování vysokého rozlišení.

Analytické parametry této techniky byly zhodnoceny na několika příkladech stanovení biologických vzorků.

## Seznam literatury

- [1] VANHOENACKER, G. A SANDRA, P. Review: Elevated temperature and temperature programming in conventional liquid chromatography – fundamentals and applications. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, roč. 29, č. 12, 1822-1835.
- [2] YANG, Y. A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, roč. 558, 1-2, s. 7-10.
- [3] TEUTENBERG, T., GOETZE, H.-J., TUERK, J., PLOEGER, J., KIFFMEYER, T.K., SCHMIDT, K.G., KOHORST, W., ROHE, T., JANSEN H.-D. a WEBER. H. Development and application of a specially designed heating system for temperature-programmed high-performance liquid chromatography using subcritical water as the mobile phase. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, roč. 1114, č. 1, s. 89–96.
- [4] GUILLARME, D. a HEINISCH, S. Detection modes with high temperature liquid chromatography - A review. *Separation & Purification Reviews* [online]. 2005, roč. 34, č. 2, s. 181–216.
- [5] TEUTENBERG, T. Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, roč. 643, č. 1, s. 1-12.
- [6] COYM, J.-W. a DORSEY, J.-G. Superheated water chromatography: A brief review of an emerging technique. *Analytical Letters* [online]. 2005, roč. 37, č. 5, s. 1013-1023
- [7] NAWROCKI, J., DUNLAP, C., LI, J., ZHAO, J., MCNEFF, C.V., MCCORMICK, A. a CARR, P.W. Review Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, roč. 1028, č. 1, s. 31–62.
- [8] MCNEFF, V., YAN, B., STOLL, D.-R. a Richard A.-H. Review: Practice and theory of high temperature liquid chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, roč. 30, č. 11, s. 1672–1685.

- [9] WANG, Ch., WU, Q., WU, Ch., a WANG, Z. Application of dispersion–solidification liquid–liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2011, roč. 185, č. 1, s. 71–76.
- [10] SANAGI, M., SEE, H.H., IBRAHIM, W. A. W. a NAIM, A. A. High temperature liquid chromatography of triazole fungicides on polybutadiene-coated zirconia stationary phase. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, roč. 1059, 1-2, s. 95–101.
- [11] TANG, T., QIAN K. Q., SHI, T., WANG, F., LI, J. a CAO, Y. Determination of triazole fungicides in environmental water samples by high performance liquid chromatography with cloud point extraction using polyethylene glycol 600 monooleate. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, roč. 680, 1–2, s. 26–31.
- [12] SMITH, Ch. - J., SHILLINGFORD, S., EDGE, A.-M. a BAILEY, Ch. Quantification of the in vitro and in vivo metabolic fates of 2-, 3- and 4- bromobenzoic acids using high temperature LC coupled to ICP-MS and linear ion trap MS. *Chromatographia* [online]. 2008, roč. 67, 9-10, s. 673–678.
- [13] HEINISCH, S. a ROCCA, J.-L. Review: Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, roč. 1216, č. 4, s. 642–658.
- [14] VANHOENACKER, G. a SANDRA, P. High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, roč. 390, č. 1, s. 245–248.
- [15] GUILLARME, D., NGUYEN, D. T.-T., RUDAZ, S. a VEUTHEY, J.-L. Recent developments in liquid chromatography - Impact on qualitative and quantitative performance. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, roč. 1149, č. 1, s. 20–29.

- [16] RUNZIYATI, T., a SMITH, M.-R., On-line coupled superheated water extraction and superheated water chromatography. *Analyst*. 2002, roč. 127, s. 883-885.
- [17] GIDDINGS, J. C. *Dynamics of Chromatography: Principles and Theory*. New York: Dekker, 1965. ISBN 9780824712259, s. 283–286.
- [18] ANTIA, F.D. a HORVATH, C. High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for the rapid separation of large molecules. *Journal of Chromatography*, 1988, roč. 435, č. 1, s. 1-15
- [19] DJORDJEVIC, N. M., FOWLER, P. W. J. a HOUDIÈRE, F. High temperature and temperature programming in high-performance liquid chromatography: instrumental considerations. *Journal of Microcolumn Separations*. 1999, roč. 11, s. 403-413
- [20] HOUDIÈRE, F., FOWLER, P. W. J. a DJORDJEVIC, N. M. Combination of column temperature gradient and mobile phase flow gradient in microcolumn and capillary column high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 1997, roč. 69, s. 2589 – 2593.
- [21] YANG, Y., HAWTHORNE, S. B. a MILLER, D. J. Class-selective extraction of polar, moderately polar, and nonpolar organics from hydrocarbon wastes using subcritical water. *Environmental Science and Technology*. 1997, roč. 31, s. 430–437.
- [22] GREIBROKK, T. a ANDERSEN, T. Temperature programming in liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2001, roč. 24, s. 899–909.
- [23] LI, B., YANG, Y., GAN, Y., EATON, C. D., HE, P. a JONES, A. D. On-line coupling of subcritical water extraction with high-performance liquid chromatography via solid-phase trapping. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 873, č. 2, s. 175–184.

[24] CRESCENZI, C., D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., NAZZARI, M., MARCHESE, S. a SAMPERI, R. Multiresidue Herbicide Analysis in Soil: Subcritical Water Extraction with an On-Line Sorbent Trap. *Analytical Chemistry*. 1999, roč. 71, s. 2157–2163.

[25] KUOSMANEN, T., HYÖTYLÄNEN, K., HARTONEN, J., JÖNSSON, Å. a RIEKKOLA, M.-L. Analysis of PAH compounds in soil with on-line coupled pressurised hot water extraction microporous membrane liquid - liquid extraction gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, roč. 375, č. 3, s. 389–399.

[26] YOUNG, T. E., ECKER, S. T., SYNOVEC, R. E., HAWLEY, N. T., LOMBER, J. P. a WAI, C. M. Bonded stationary phases for reversed phase liquid chromatography with a water mobile phase: application to subcritical water extraction. *Talanta*. 1998, roč. 45, s. 1189-99.

[27] SHINDLER, F., SCHMIDBAUR, H. *Angewandte Chemie*. 1967, roč 79, s. 683–697.

[28] ARENAS, R. V. a FOLEY, J. P. Selectivity of polymer-coated alumina stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. Part 1. Methylene group selectivity. *Analyst*. 1994, roč. 119, s. 1303–1314.

[29] LAURENT, C., BILLIET, H. A. H. a DE GALAN, L. On the use of alumina in HPLC with aqueous mobile phases at extreme pH. *Chromatographia*. 1983, roč. 17, č. 5, s. 253–258.

[30] YAMAKI, S. Reversed-phase liquid chromatography on a microspherical carbon column at high temperature. *Journal of Chromatography A*. 1996, roč. 728, s. 189-194.

[31] WELSCH, T., SCHMID, J., KUTTER, A. a KÁLMAN, J. Temperature of the eluent: a neglected tool in high-performance liquid chromatography? *Journal of Chromatography A*. 1996, roč. 728, č. 1-2, s. 299–306.

[32] HANSEN, S. H., HELBOW, P. a THOMSEN, M. *Journal of Chromatography*. 1981, roč. 544, s. 53.

[33] RIGNEY, M.P., Ph.D. Thesis, University of Minneapolis, 1988.

## Seznam obrázků

**Obrázek č. 1:** Diagram rozložení tepelných zón mobilní fáze v HTLC systému a schéma ohřevu a chlazení. **Převzato z: [8]** ..... 18

**Obrázek 2:** Chromatogram stanovení triazolových fungicidů. **Převzato z: [10]**  
..... 25

**Obrázek 3:** Eluční profily 4 – brombenzoové kyseliny (4 – BBA), T= 0 h a T = 4 h. Separace při teplotním gradientu tlaku. **Převzato z: [12]**.. ..... 28

**Obrázek 4:** Eluční profil 4 – brombenzoové kyseliny, gradientová eluce **Převzato z: [12]**.  
..... 29

**Obrázek 5:** Efekt teploty na separaci kofeinových derivátů **Převzato z: [13]** ..... 30

## Seznam tabulek

**Tabulka 1:** Specifikace triazolových fungicidů. **Převzato částečně z: [10]** ..... 23

**Tabulka 2:** Srovnání nejnovějších LC metod s konvenční HPLC. **Převzato z: [15]** ... 35

## Seznam rovnic

**Rovnice 1:** Clausius - Clapeyronova rovnice, **Převzato z: [4]**..... 4

**Rovnice 2:** Clausius - Clapeyronova rovnice pro teploty  $T_1$  a  $T_2$ . **Převzato z: [4]**..... 4

**Rovnice 3:** Antoineova rovnice. **Převzato z: [4]**..... 4

**Rovnice 4:** Damköhlerova rovnice. **Převzato z: [4]**. ..... 7



## Údaje pro knihovnickou databázi

<b>Název práce</b>	Green HPLC
<b>Autor práce</b>	Milan Hodes
<b>Obor</b>	Klinická biologie a chemie
<b>Rok obhajoby</b>	2012
<b>Vedoucí práce</b>	Doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.
<b>Anotace</b>	Analytická chemie a také další chemické obory se v poslední době snaží být ekologicky a zároveň ekonomicky efektivní. Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (HTLC) s podkritickou vodnou mobilní fází splňuje obě tato kritéria. HTLC s podkritickou vodou (Green HPLC) nejen že dokáže nahradit v LC separacích toxická organická rozpouštědla, ale navíc nabízí i 5 – 20krát rychlejší separaci s vyšším rozlišením než konvenční HPLC.
<b>Klíčová slova</b>	Vysokoučinná kapalinová chromatografie, Vysokoteplotní kapalinová chromatografie, teplotní gradienty, podkritická voda, termicky odolné stacionární fáze, triazolové fungicidy, brombenzoové kyseliny