

POKROKY V SOUČASNÉ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII

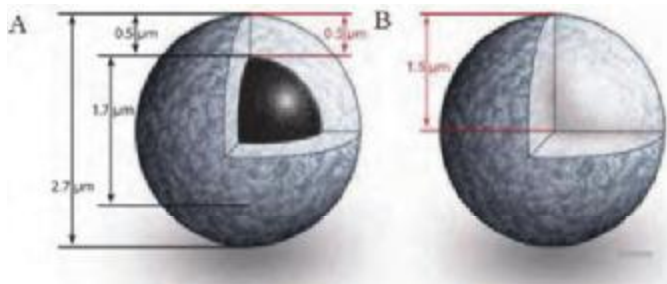
JANDERA P.

Katedra analytické chemie, FChT, Univerzita Pardubice, Pavel.Jandera@upce.cz

I když je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v současné době dobře zavedenou, široce používanou separační technikou téměř ve všech oblastech, kde se uplatňuje moderní analytická chemie, především v klinické, farmaceutické, environmentální, průmyslové, soudní analýze, analýze potravin a živých organizmů, včetně různých „omics“ oblastí, nelze její vývoj ani po více než sto letech považovat za zcela uzavřený. Stále se objevují významné novinky, rozšiřující její aplikační možnosti pro analýzy nových typů vzorků. Zvyšuje se počet látek, které lze současně analyzovat v jednom experimentu. Největší pokrok se projevuje ve vývoji nových separačních médií urychlujících analytické postupy, zvyšujících účinnost, rychlost a selektivitu separace [1].

V současné praxi se nejčastěji používají **konvenční analytické kolony** plněné částicemi se středním průměrem 5 μm , případně 3 μm . Technika **ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie** (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) pracuje s částicemi sorbentů menšími než 2 μm , při velmi vysokých tlacích, často až 100–150 MPa a poskytuje velmi úzké píky, což vyžaduje zvláštní instrumentaci, kde jsou minimalizovány vnitřní objemy a mimokolonové příspěvky k rozšiřování elučních zón [2]. Při snižování velikosti částic náplně pod 1–1,5 μm může být problémem teplo tření, vznikající při průchodu kapalně mobilní fáze, které vyvolává radiální teplotní gradient a částečně snižuje účinnost separace. U **mikrokolon** a kapilárních kolon je odvod tepla rychlejší a negativní vliv na účinnost menší než u konvenčních analytických kolon [3]. Kolony s **povrchově pórovitými sférickými částicemi** (2,6, nověji i 5 nebo < 2 μm) s inertním pevným jádrem, na němž je tenká vrstva pórovité aktivní stacionární fáze o tloušťce 0,5 μm nebo i méně (core-shell), **obr. 1**, poskytují podstatně kratší dráhu od povrchu částice k aktivním centřům adsorpce v pórech a kladou menší odpor proti toku mobilní fáze než zcela pórovitě náplně kolon. Tím umožňují rychlé a účinné separace, téměř srovnatelné s technikou UHPLC, ale na přístrojích pro konvenční HPLC (do tlaků 30–40 MPa) [4].

Obr. 1 – Částice náplně s pevným jádrem a povrchově pórovitou aktivní vrstvou o průměru 2,7 μm (A) a pórovitá částice o průměru 3 μm (B).

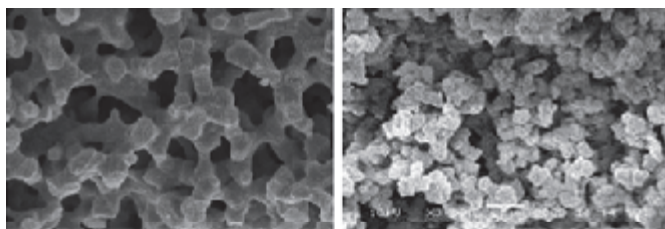


Pro separace biopolymerů jsou k dispozici **náplně s nepórovitými sférickými částicemi** o průměru 1,5–2,5 μm a náplně s perfúzními částicemi, které vedle difuzních pórů, stejných jako u běžných pórovitých náplní, obsahují i velmi široké průtočné póry (400–800 nm), procházející celou částicí, kde se urychluje převod látek mezi mobilní a stacionární fází. Byly popsány i separace biopolymerů na kapilárních kolonách, plněných nepórovitými sférickými částicemi s průměry menšími než 1 μm , což je zřejmě možné vzhledem k tomu, že látky se zadržují na povrchu a nepodléhají difuzi v pórech.

Na rozdíl od kolon plněných částicemi o přesně definované velikosti, **monolitické kolony** představují kontinuální separační média – jediný kus pórovitého materiálu, který vzniká zesítním polymerní směsi přímo v budoucí koloně, kapiláře nebo disku. Monolity mají dvojitý typ pórů – průtočné a difuzní (mezopóry). Proti náplňovým kolonám monolity vykazují menší odpor proti toku mobilní fáze a umožňují práci při vyšším průtoku [5].

Monolitické stacionární fáze na bázi modifikovaného silikagelu se připravují zesítním solu kyseliny křemičité, na něž se chemicky naváží C_{18} nebo jiné skupiny, tvořící stacionární fázi. Mají v podstatě stejné chemické vlastnosti jako analogické plněné kolony, ale odlišnou morfologii s dvojitým typem pórů (**obr. 2A**) Monolitický silikagelový skelet představuje propojenou síť mezopórů (2–50 nm) a průtočných makropórů a poskytuje účinnost srovnatelnou s kolonami plněnými částicemi o průměru 3–5 μm , ale tři- až pětikrát rychlejší separaci malých molekul [5]. Zpravidla jsou méně účinné pro separace velkých molekul biopolymerů, pro něž se osvědčují **organické polymerní** (např. polystyrenové nebo polymetakrylátové) **monolitické kolony** s vnitřní mikroglobulární strukturou připomínající květák (**obr. 2B**), které se připravují *in situ* polymerací, např. v prázdných křemenných kapilárách [6]. Organické polymerní materiály se vyznačují podstatně vyšší teplotní i pH odolností proti stacionárním fázím na bázi silikagelu.

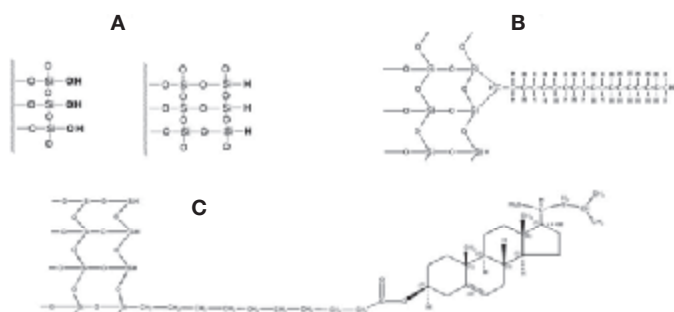
Obr. 2 – Struktura monolitů na bázi silikagelu (A) a organických polymerů (B)



Vynikající chemickou a vysokou teplotní odolností se vyznačují stacionární fáze na bázi oxidů kovů, nejčastěji oxidu zirkoničitého nebo titaničitého [7]. Jejich většímu rozšíření brání relativně nízká separační účinnost ve srovnání se silikagelovými materiály. Jiný přístup ke zlepšení chemické stability v širším rozsahu pH i při tlacích nad 100 MPa představují **hybridní organicko-anorganické stacionární fáze**, kde je část Si-OH skupin nahrazena methyly (XTerra), nebo nebo ethylenovými můstky (XBridge). Chemickou odolnost silikagelu lze výrazněji zvýšit **hydrosilací**, při níž se až 90–95% silanolových (Si-OH) skupin na povrchu silikagelu nahradí nepolárními hydridovými skupinami, Si-H. Chemicky modifikované **hydrosilované stacionární fáze** vykazují zajímavou selektivitu ve vodně-organických mobilních fázích, případně i dvojitý separační mechanismus: s převrácenými fázemi [8].

Na běžně používaných alkylsilikagelových kolonách se polární látky často příliš slabě zadržují a jejich separace činí potíže. V posledních letech rychle roste obliba **chromatografie hydrofilních interakcí** (HILIC) pro HPLC separace v oblasti kontroly životního prostředí, analýzy potravin, přírodních látek i syntetických léčiv. Při ní se polární látky zadržují silněji než látky nepolární [9] a dobře se separují na polárních kolonách v mobilních fázích s vysokým obsahem organického rozpouštědla ve vodě (nejčastěji více než 50–80% acetonitrilu). Je možno použít nemonifikovaný silikagel nebo kolony s chemicky vázanými aminopropylými, amidovými, nitrilovými, karbamátovými, diolovými, polyethylenglykolovými či polyhydroxylovými (cyklodextranovými, sorbitolovými), zwitteriontovými (sulfobetainovými či

Obr. 3 – A: Struktura silikagelu před a po odstranění silanolových skupin hydrosilací, B, C: Struktura hydrosilovaného silikagelu modifikovaného C18 a cholesterolem

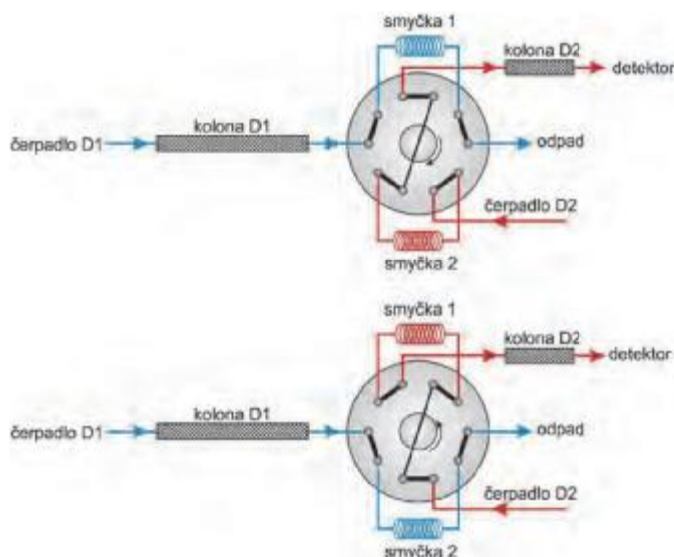


fosforylcholinovými) skupinami, i polární organické polymerní materiály [10]. Počet komerčních fází pro HILIC separace se stále rozrůstá, **obr. 3** ukazuje struktury několika častěji využívaných materiálů.

Při HILIC separacích hraje významnou roli distribuce látek mezi difúzní vrstvou vody zadržované na polárních sorbentech K retenci přispívá i přímá adsorpce na povrchu polární náplně kolony vlivem proton-donor-akceptorových a iontových interakcí.

Kvalitu separace lze zlepšit i kombinací různých kolon v **dvourozměrné kapalinové chromatografii** (2D HPLC) s přímým „in-line“ spojením dvou různých kolon (LCxLC). Eluát z první kolony v malých frakcích přímo převádíme na druhou kolonu, obvykle přes dvoupolohový (deseticestný) ventil se dvěma smyčkami (o objemu 2–100 μ l), které pracují střídavě v automaticky se opakujících pracovních cyklech A a B. (**obr. 4**). V cyklu A se plní smyčka 1 frakcí eluátu z kolony D1, zatím co předchozí frakce obsažená ve smyčce 2 se separuje na koloně D2. V následujícím cyklu B se funkce smyček vystřídají. Takto postupně projdou oběma kolonami všechny složky vzorku a teoreticky je možno dosáhnout separace celkového počtu látek (píkové kapacity), který se blíží násobku počtu rozdělených píků na první a na druhé koloně [11].

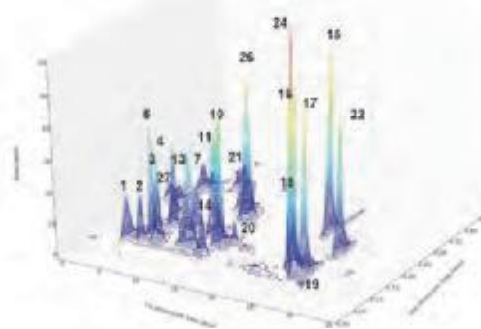
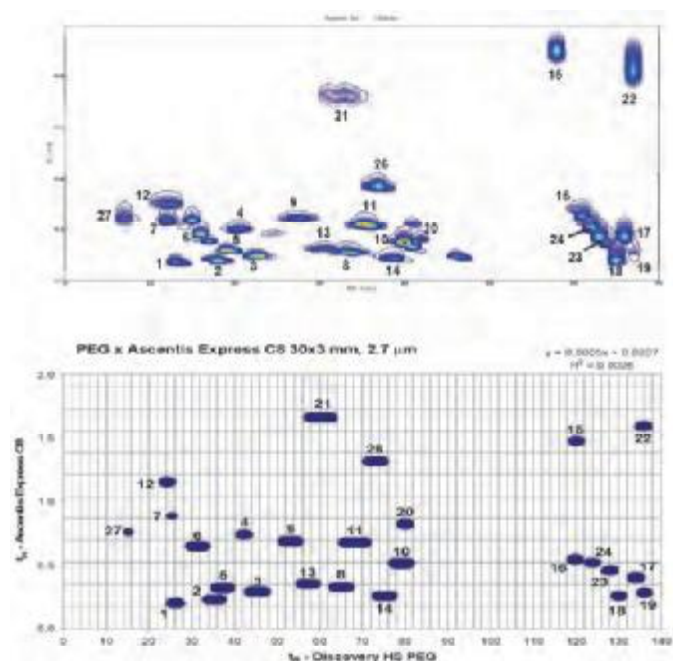
Obr. 4 – Schéma zapojení deseticestného dvoupolohového prepínacího ventilu jako rozhraní mezi první a druhou dimenzí dvourozměrné HPLC



Výhodou je možnost nezávislé volby kombinace různých separačních mechanismů (kolon a mobilní fáze). Technika LCxLC se používá zejména pro separace peptidů, proteinů a jiných biopolymerů při kombinaci dvou RP systémů s gradienty acetonitrilu ve vodě při různých pH (RPxRP), případně spojením RP systému s HILIC (HILICxRP) nebo s iontově-výměnným systémem (IEXxRP). 2D kapalinovou chromatografii lze aplikovat i při analýzách olejů, karotenoidů, flavonů, fenolických a dalších látek v potravinách, nápojích a přírodních extraktech. Kombinace chromatografie prostorové vyluky (SEC) a gradientové eluce v RP nebo NP systémech lze využít k 2D LCxLC syntetických polymerů.

Obr. 5 ukazuje příklad separace směsi fenolických kyselin a flavonů dvourozměrnou separací se souběžnou gradientovou elucí acetonitrilem v 0,05 mM octanovém pufru (pH = 3) na mikrokoloně s PEG fází chemicky vázanou na silikagelu (150 x 2,1 mm, 5 μ m) v první dimenzi a na krátké koloně Ascendis Express C18 s povrchově pórovitou náplní (30 x 3,0 mm I.D., 2,7 μ m) ve druhé dimenzi [12].

Obr. 5 – Dvourozměrná LCxLC separace 27 fenolických kyselin a flavonů



Prezentace 2D chromatogramu jako vrstevnicového grafu (nahore, osa X ukazuje retenční čas na koloně v první dimenzi, osa Y na koloně ve druhé dimenzi, intenzita signálu UV detektoru je znázorněna vrstevnicemi), grafu bez rozlišení intenzit absorpce (uprostřed) a třírozměrného chromatogram (dole, absorbance na ose Z). UV detekce při 280 nm

Závěr

Lze konstatovat, že kapalinová chromatografie ve 2. desetiletí 21. století je dáma vyzrálá, spolehlivá, plná chuti do inovací, s nejlepšími předpoklady dalšího úspěšného rozvoje.

Literatura

- [1] P.Jandera, T. Hájek, M. Staňková, *Anal Bioanal Chem* 407 (2015) 139.
- [2] D.R. Stoll, J.D. Cohen, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 123.
- [3] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 1157 (2007) 289.
- [4] J.J. DeStefano SA., Schuster, JM. Lawhom, J.J.Kirkland, *J.Chromatogr.A* 1258 (2012) 76.

Dokončení na další straně

- [5] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tahala, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3498.
- [6] F. Švec, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 250.
- [7] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. Mc Cormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1.
- [8] J. J. Pesek, M. T. Matyska, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3999.
- [9] A. J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [10] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1.
- [11] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R. A. Shalliker, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 109.
- [12] P. Jandera, T. Hájek, P. Česla, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1995.

Abstract

ADVANCES IN HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Summary: Last trends in contemporary HPLC are reviewed, focused on novel column types packed with superficially porous particles, hydrosilated silica gel and monolithic columns, with special attention to HILIC chromatography of polar compounds and to two-dimensional HPLC.

Key words: HILIC, monolithic columns, two-dimensional HPLC, core-shell particles, hydrosilated silica

VISKOZIMETRIE

VISKOZIMETR STABINGER SVMTM 3001

Měření viskozimetrem Stabinger SVMTM přináší ve srovnání s tradičními metodami měření viskozity řadu nových charakteristik, které činí toto měření přesnějším, časově výrazně méně náročným a tedy produktivnějším a v neposlední řadě také ekonomicky méně náročným.

Po ukončení jediného měřicího cyklu s velmi malým množstvím vzorku jsou k dispozici hodnoty kinematické a dynamické viskozity, hustoty, viskozitního indexu a dalších veličin. Žádný jiný viskozimetr pro měření kinematické viskozity takové informace poskytnout nemůže.

Nový viskozimetr Stabinger SVMTM 3001 vyvinutý firmou Anton Paar nabízí, vedle řady technických zlepšení v porovnání s předcházejícím typem SVM 3000, stejně komfortní a jednoduchou obsluhu a sofistikovanou správu dat, na jakou jsou uživatelé přístrojů Anton Paar zvyklí u hustoměrů řady Generation M.

Obr. 1 – Viskozimetr Stabinger SVMTM 3001



V průběhu jediného měřicího cyklu lze získat informaci o následujících parametrech:

- Kinematická viskozita ASTM D7042 v rozsahu 0,2–30 000 mm²/s.
- Stupně API (ISO 91, API 2540, ASTM D 1250, IP 200).
- Hustota (EN ISO 12185, ASTM D4052, IP 365) v rozsahu 0,6–3 g/cm³.
- Viskozitní index VI (ISO 2909, ASTM D2270).
- Dynamická viskozita (ASTM D7042)

Obr. 2 – Viskozimetr s dávkovací jednotkou



v rozsahu 0,2–30 000 mPas.

- Sayboltova viskozita (ASTM D2161).

Systém umožňuje, díky vysoce výkonné interní teplotě a vzduchovému chlazení, měření v teplotním rozsahu od –20 °C do +135 °C bez připojení jakéhokoli pomocného teplotního média (s externím kryostatem lze měřit až do –60 °C).

K nejčastějším aplikacím se tak vedle tradičních analýz paliv a mazacích olejů řadí nyní i měřicí postupy vyžadující měření při záporných teplotách, jako je analýza leteckého petroleje nebo hydraulických kapalin, které lze nyní provádět technicky jednoduchým a ekonomicky efektivním způsobem.

Dotykový displej s úhlopříčkou 10,4“ lze jednoduše ovládat i v rukavicích, vzorek se nadává stříkačkou a poklepnutím na ikonu Start se spustí měření. Celý systém lze po ukončení měření velmi jednoduše a efektivně promýt a vyčistit.

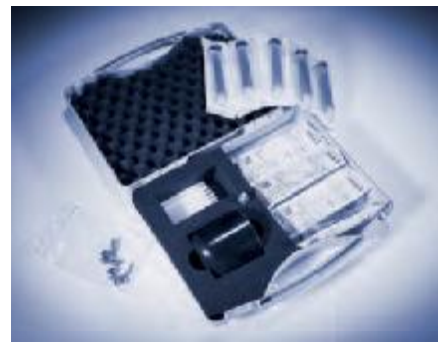
Přístroj přichází s implicitně nastavenými metodami pokrývajícími požadavky výše uvedených norem a bez jakýchkoliv dalších modifikací a kalibračních procedur jej lze ihned po dodání používat.

Průběh měření je kontrolován sofistikovanými kontrolními mechanizmy a procedurami, správné naplnění hustotní cely lze např. sledovat díky funkci Filling CheckTM. Významným zlepšením jsou rovněž kovové měřicí cely odolné vůči poškození.

Přístroj disponuje pamětí pro uložení až 1000 naměřených výsledků, které lze buď pravidelně exportovat přes rozhraní USB a na tiskárnu nebo lze nastavit kruhové ukládání dat, kdy po naplnění kapacity paměti budou nejstarší záznamy postupně přemazávány nejnovějšími naměřenými výsledky.

Vedle již zmíněného USB rozhraní lze přístroj přímo připojit do LIMS nebo na Ethernet, výsledky lze zpracovat ve formě protokolu ve formátu PDF nebo XLS.

Obr. 3 – Příslušenství viskozimetru



Při měření vysoko vřoucích vzorků lze přístroj vybavit volitelným příslušenstvím pro teplotu dávkovacích adaptérů a vyhnout se tak možnému zatuhnutí vzorku, pro zvýšení produktivity a minimalizaci provozních nákladů lze k SVM připojit i vhodný autosampler (temperovaný, netemperovaný, se zásobníkem, bez zásobníku).

Ing. Martina VILIMOVSKÁ,

Ing. Karel VOLDŘICH,

Anton Paar GmbH, org. složka, Praha, martina.vilimovska@anton-paar.com,
karel.voldrich@anton-paar.com