

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra analytické chemie**



**Tereza Šillerová**

## **NOVÉ TRENDY V HPLC ANALÝZE**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí bakalářské práce: Ing. Renata Hájková**

**Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.**

**Hradec Králové 2007**

# OBSAH

<b>1. Úvod</b>	<b>3</b>
<b>2. HPLC - od počátků k současnosti</b>	<b>4</b>
2.1. HPLC v souvislosti se základními technikami kapalinové chromatografie ( LC )	6
2.2. Typy separačních mechanismů v LC	7
<b>3. Typy interakcí v kapalinové chromatografii</b>	<b>12</b>
<b>4. Typy elucí v HPLC</b>	<b>13</b>
<b>5. Instrumentace pro HPLC</b>	<b>14</b>
<b>6. Účinnost chromatografického systému, kolony a zdánlivý počet teoretických pater</b>	<b>16</b>
<b>7. Nové trendy ve vývoji HPLC technologie</b>	<b>19</b>
7.1. HILIC - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	19
7.2. UPLC - Ultraperformance liquid chromatography	21
7.3. RRLC – Rapid resolution liquid chromatography	22
7.4. CEC – Kapilární elektrochromatografie	24
7.5. MLC – Micellar liquid chromatography	25
<b>8. STACIONÁRNÍ FÁZE PRO HPLC SYSTÉMY</b>	<b>26</b>
8.1. Základní parametry analytických kolon	27
8.2. Stacionární silikagelové fáze	28
8.2.1. RP stacionární fáze ( stacionární fáze pro revers-phase HPLC )	28
8.2.2. NP stacionární fáze ( stacionární fáze pro normal-phase HPLC )	37
8.3. Hybridní stacionární fáze	38
8.3.1. Hybridní technologie XTerra® a XBridge® firmy Waters	38
8.3.2. Hybridní technologie Twin™ ( Two-In-One Technology ) Geminy Twin™ technologie	40
8.3.3 Hybridní technologie Pathfinder	42
8.4. Monolitické stacionární fáze	43
8.4.1. ProSwift™ monolitické kolony firmy Dionex	45
8.4.2. Monolitické kolony Onyx™ firmy Phenomenex	46
8.5. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého ( ZrO <sub>2</sub> )	48
8.5.1. Zirkoniové kolony firmy ZirChrom	49
8.5.2. Discovery zirkoniové kolony firmy Sigma-Aldrich	51
8.6. Stacionární fáze na bázi oxidu titaničitého ( TiO <sub>2</sub> )	52
8.7. HILIC stacionární fáze	54
8.8. RRLC stacionární fáze	55
<b>9. Závěr</b>	<b>58</b>
<b>10. Seznam použitých zkratk</b>	<b>59</b>
<b>11. Seznam použitých odkazů</b>	<b>60</b>
<b>12. Seznam použitých tabulek a obrázků</b>	<b>61</b>

# 1. Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( HPLC – High Performance Liquid Chromatography ) je velmi populární analytickou metodou využívanou k separaci a čistění látek napříč širokým spektrem oborových laboratoří. Jedná se tedy o rutinně využívanou metodu v klinických, výzkumných, analytických, toxikologických a biochemických laboratořích, k analýze potravin, léčiv, životního prostředí, biochemických markerů a řady dalších látek..

Zjednodušeně, v celém systému, z hlediska separace, jsou nejdůležitější částí kolony naplněné sorbentem, jejichž vývoj je v dnešní době markantní a i na trhu mají velké zastoupení v podobě sorbentů klasických silikagelových, modifikovaných silikagelových, či sorbentů z jiných materiálů.

Trendem ve vývoji HPLC, jakožto u většiny metod, je pak zejména zkrácení analýzy, zvýšení citlivosti, specifičnosti a efektivity celého systému.

## 2. HPLC - OD POČÁTKŮ K SOUČASNOSTI<sup>1</sup>

Vysokoučinná kapalinová chromatografie ( HPLC – High Performance Liquid Chromatography ) se v dnešní době řadí k nejpobulárnějším analytickým technikám vůbec. K tomuto faktu přispívá zejména to, že tato metoda se vyznačuje svou jednoduchostí a dále narozdíl od plynové chromatografie neklade striktní požadavky na některé fyzikálně - chemické vlastnosti testovaných analytů, zejména na těkavost. HPLC také není limitovaná omezenou stabilitou analyzovaných látek při vysokých teplotách, se kterou se setkáváme v oblasti plynové chromatografie.

Moderní HPLC techniky v sobě dokáží skloubit procesy separace, identifikace ( za využití standardů, vhodných detektorů ), purifikace, kvantifikace, ale také strukturální analýzy celé řady rozmanitých sloučenin během jedné analýzy. Použitím vhodného detektoru lze významnou měrou zvýšit citlivost detekce, a tak například detekovat látku, která se nachází v analyzovaném materiálu ve velmi nízké koncentraci. Pomocí HPLC je možné izolovat jednotlivé látky ze směsí. Proces separace je založen na principu určitých interakcí separovaných látek se stacionární (pevnou) a mobilní (kapalnou) fází. Pevnou fází zde představuje kolona naplněná sorbetem, fází kapalnou je pak převážně směs dvou a více rozpouštědel s různým stupněm polarity. Velice důležitým aspektem pro maximální účinnou separaci látek je stupeň čistoty používaných mobilních a stacionárních fází. Zároveň není žádoucí pro analýzu pomocí HPLC, aby mobilní a stacionární fáze, případně materiál kolony, spolu interagovali a negativně tak ovlivňovali výsledek analýzy.

Vzorky určené k analýze se nejprve mísí s vhodnou mobilní fází ( rozpouštědlem ) a posléze jsou pod vysokým tlakem dávkovány do chromatografického systému za určité rychlosti průtoku mobilní fáze. Na chromatografické koloně pak dochází k jejich dělení v závislosti na jejich interakcích se stacionární fází ( popř. mobilní fází ). Interakce jednotlivých analytů jsou ovlivňovány jednak složením použité stacionární fáze, tak i směsí rozpouštědel jako

---

<sup>1</sup> Text kapitoly 2. byl vypracován ze zdrojů (1), (2), (18) a (25)

fáze mobilní. Díky možné kombinaci řady chromatografických systémů (výběr stacionární a mobilní fáze, předkolony, kolony) můžeme separovat látky různé chemické struktury.

Poprvé se s kapalinovou chromatografií setkáváme již roku 1906, kdy byla použita ruským botanistou Mikhailem S. Tswettem, který pomocí této techniky separoval barevné pigmenty obsažené v zelených listech. Ke svému pokusu využil otevřeného skleněného systému, naplněného dvěma specifickými materiály a to práškovou křídou (uhličitanem vápenatým) a aluminovou náplní. Na kolonu pak aplikoval vzorek, rozpuštěný extrakt z homogenizovaných listů rostliny, ve svislém směru. Následně vlivem gravitace došlo k separaci jednotlivých pigmentů v závislosti na jejich rychlosti, s jakou se kolonou pohybovaly. Stal se tedy zakladatelem analytické separace sloučenin na základě chemické přitažlivosti sloučenin k různým částicím. Sloučeniny pak mohly být přitahovány k částicím, které jejich pohyb směrem z kolony zpomalovaly, nebo vykazovaly vyšší afinitu k částicím, které jejich průchod systémem urychlily. Děj byl pak popsán jako proces, při němž jsou sloučeniny rozdělovány mezi pohybující se mobilní fázi a fázi stacionární, což ve svém důsledku vede k jejich separaci. Tswett pak tento proces pojmenoval chromatografií (z řeckého slova „chroma“ znamenajícího barva a „graphy“ ve smyslu psaní) čímž v podstatě popsal svůj „barevný“ experiment.

Největší rozvoj HPLC techniky se datuje od sedmdesátých let minulého století až po dnešní dobu. Na počátku sedmdesátých let došlo k rychlému vylepšení jednotlivých součástí chromatografického systému a vývoji sloupce s obalovým materiálem a začalo se využívat on-line detektorů za kolonou. Ke konci sedmdesátých let se již začaly objevovat nové metody zahrnující kapalinovou chromatografii s reverzní fází, což vedlo ke zlepšení separace mezi velice podobnými sloučeninami.

V osmdesátých letech se pak již stala kapalinová chromatografie běžně využívanou analytickou technikou pro separaci chemických sloučenin. Následné zavedení nových technik výrazně zlepšilo samotnou separaci, ale i identifikaci a čištění látek v porovnání s již dříve používanými procesy. Rozvoj výpočetní techniky a automatizace chromatografických metod přinesly celou řadu dalších výhod (vyšší

rychlost, čistota, efektivita ). Vylepšení typů kolon a tím i reprodukovatelnosti výsledků vedly k zavedení nové terminologie ( mikrokolony, afinitní kolony, atd. ).

Obrovským příslibem minulého desetiletí byl rozvoj mikrokolon a dalších, tzv. speciálních kolon. Velikost náplní kolon od počátečních 3-5 mm byla posunuta k dnes již obvyklým 1,8-200  $\mu\text{m}$ , což vedlo i k výraznému zkrácení délky kolon.

V současné době na trhu existuje a je využívána široká škála nejrůznějších typů kolon pro separaci analytů vedoucí k využití rozmanitých typů detektorů spojených s HPLC analyzátory. HPLC je tedy právem, díky své velké variabilitě, považována za jednu z nejlepších analytických technik, která si své uplatnění našla napříč různými obory ( biotechnologie, biomedicína, kosmetika, farmaceutický a potravinářský průmysl, atd. ).

## **2.1. HPLC V SOUVISLOSTI SE ZÁKLADNÍMI TECHNIKAMI KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE ( LC )<sup>2</sup>**

Klasická LC (liquid chromatography) může být prováděna třemi základními technikami ( tenkovrstvá, papírová, kolonová chromatografie ). Ve všech třech případech musí být vzorek rozpuštěn pro aplikaci na nebo do chromatografického aparátu. Kolonová kapalinová chromatografie je pak z LC nejvyužívanější technikou a je aplikována právě na HPLC metodu s řadou vylepšení. V případě kolonové chromatografie vzorek prochází kolonou obsahující vhodné částice. Částice jsou nazývány jako „chromatography packing material“, stacionární fáze, popř. adsorbent. Tok rozpouštědla ( mobilní fáze ) kolonou je kontinuální. V určitém čase dojde k nadávkování roztoku vzorku do proudu rozpouštědla, který vzorek unáší kolonou. Existuje řada způsobů jak dosáhnout kontinuálního toku rozpouštědla kolonou. Gravitace a vakuum se k udržení toku užívají u přístrojů, které nejsou konstruovány pro práci s tlakem. Velikosti částic se pak volí s ohledem na co nejsnazší generování kontinuálního toku ( obvykle  $> 50 \mu\text{m}$  ). Pro zvýšení separační rychlosti se využívá menších částic sorbentu o velikosti 10  $\mu\text{m}$  a menší. Kolony tvořené takto malými částicemi kladou toku rozpouštědla poměrně velký odpor. Jsou proto tedy konstruovány společně s pumpami tak, aby odolaly vysokým tlakům, za kterých se

---

<sup>2</sup> Text kapitoly 2.1. byl vypracován ze zdrojů (1) a (4)

v těchto případech musí pracovat. V případě řízení chromatografického procesu vysokým tlakem hovoříme o tzv. HPLC technice ( High Performance Liquid Chromatography ).

## **2.2. TYPY SEPARAČNÍCH MECHANISMŮ V LC<sup>3</sup>**

### **ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE**

Tento separační mechanismus je proces založený na opakované adsorpci a desorpci analytů na stacionární fázi.

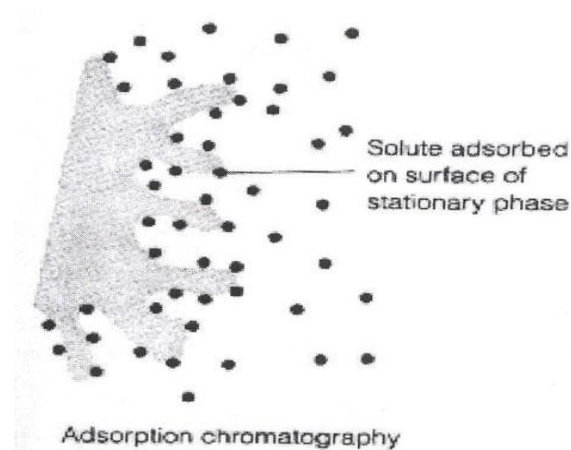
Stacionární fázi je adsorbent ( nejčastěji silikagel ), mobilní fázi je vhodné rozpouštědlo, případně směs rozpouštědel. Hovoříme tedy o tzv. liquid-solid chromatografii ( LSC ).

Tento typ chromatografie může dále probíhat ve dvou módech, kde je základem separace analytů polarita fází:

- *Chromatografie na normálních fázích* ( normal – phase chromatography )  
→ se silně polární stacionární fází, kterou bývá nejčastěji silikagel a mobilní fázi, která je nepolárním rozpouštědlem ( hexan, chloroform, uhlovodíky ). Díky vysoce polárnímu povrchu stacionární fáze jsou na něm zadržovány látky polárního charakteru déle než látky nepolární.
- *Chromatografie na obrácených neboli reverzních fázích* ( reversed – phase chromatography ) → s nepolární stacionární fází ( modifikovaný silikagel- nejčastěji C18 OSD, C8 OSS ) a polární mobilní fázi, která je směsí vody s polárním rozpouštědlem ( acetonitril, methanol, atd. ). Dochází při ní tedy k zadržování látek nepolárního charakteru.

---

<sup>3</sup> Kapitola 2.2. byla vypracována z neznámých zdrojů ze střední školy a ze zdroje (3)



Obr.č.1 Schéma principu adsorpční chromatografie

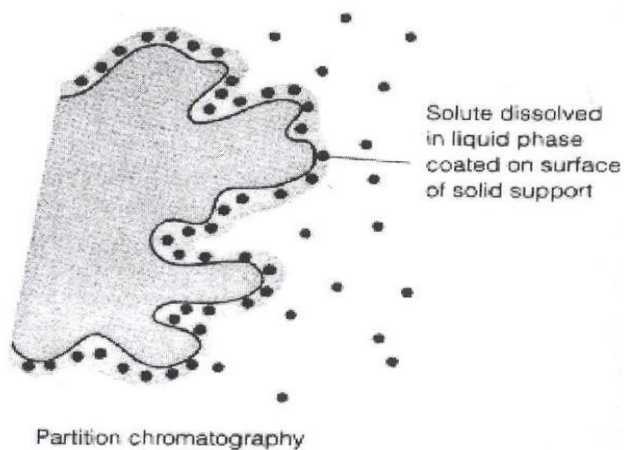
## ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

U rozdělovací chromatografie je stacionární fáze i mobilní fáze kapalná. Stacionární fáze je zakotvena na nosiči. K dělení dochází na základě rozpustnosti dané složky ve dvou nemísitelných rozpouštědlech, tedy na základě **Nernstova rozdělovacího koeficientu**:

$$k = \frac{C_i^A}{C_i^B}$$

kde ***k*** je rozdělovací koeficient,  $C_i^A$  je koncentrace složky ***i*** v rozpouštědle A,  $C_i^B$  je koncentrace složky ***i*** v rozpouštědle B. Rozdělovací koeficient je pro danou dvojici rozpouštědel a danou teplotu konstantní pro každou složku.

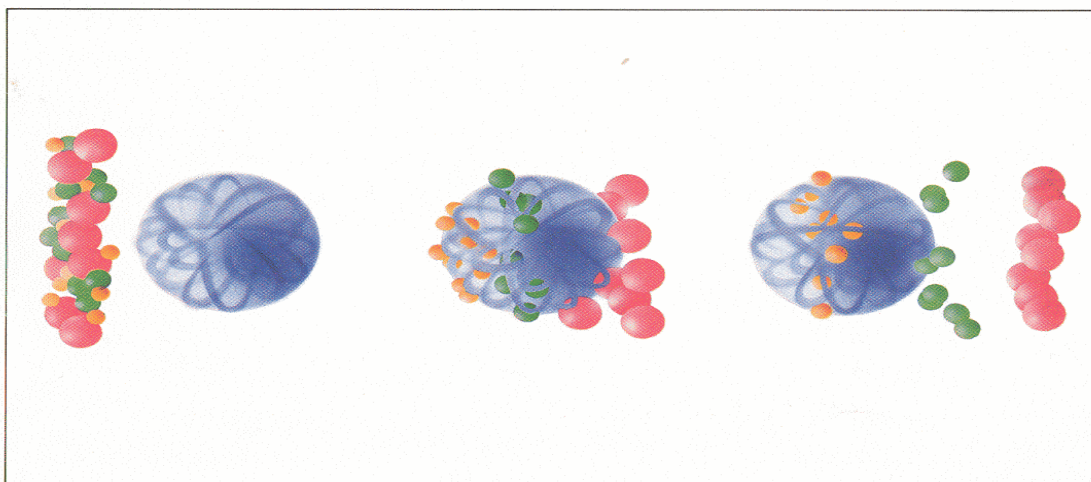




*Obr.č.2 Schéma principu rozdělovací chromatografie*

### VYLUČOVACÍ CHROMATOGRRAFIE ( ion exclusion chromatography )

Tento typ chromatografie je založen na mechanickém dělení molekul analytů na základě velikosti pórů sorbentu. Chromatografická kolona je naplněna materiálem s přesně definovanou velikostí pórů. Po aplikaci vzorku pak dochází k jeho „filtraci“ dle velikosti jeho částic. Malé molekuly penetrují hlouběji do pórů materiálu stacionární fáze a jsou tak kolonou zadržovány déle než molekuly větší.

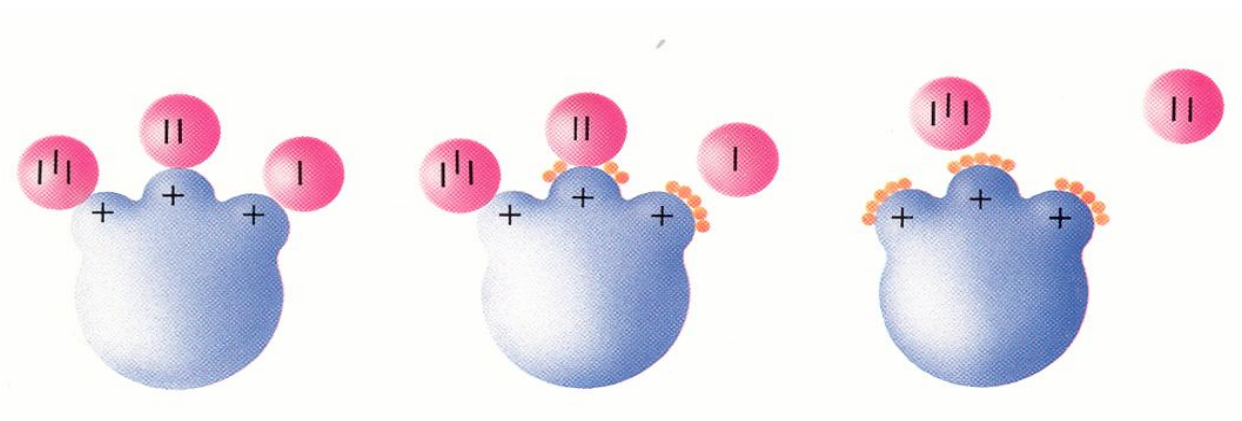


*Obr.č.3 Schéma principu vylučovací chromatografie*

## IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE ( ion exchange chromatography)

Ionexová (iontově výměnná) chromatografie separuje molekuly podle náboje. Stacionární fáze je tvořena iontoměničem s nabitými skupinami. Má-li nosič na sobě kladně nabitě skupiny, je schopen vázat a vyměňovat anionty, nazývá se tedy **anex**. Jsou-li na nosiči záporně nabitě skupiny, váže a vyměňuje stacionární fáze kationty a nazývá se **katex**. Katexy i anexy mohou být silné (jsou disociované v širokém rozmezí pH) nebo slabé (jsou disociovány jen v určitém rozmezí pH).

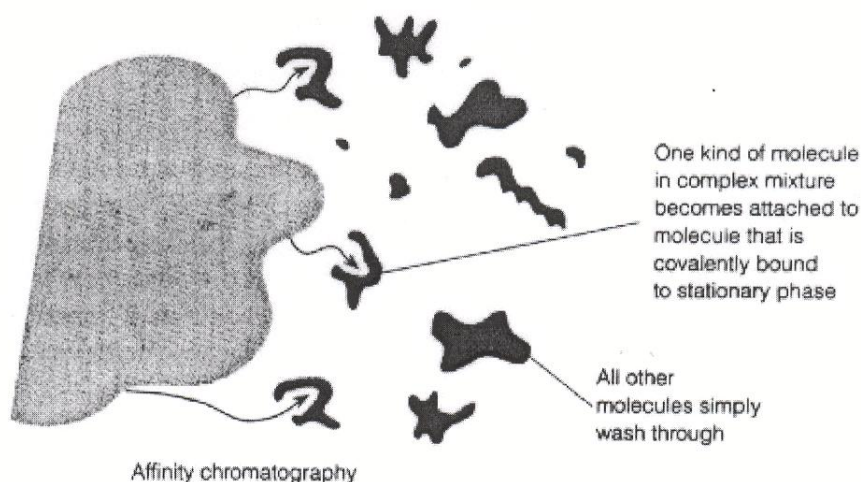
Pro ionexovou chromatografii potřebujeme dvě eluční činidla. V jednom elučním činidle nanese vzorek na kolonu a po nanesení na kolonu se vzorek naváže na nabitě skupiny nosiče. Poté musíme použít jiné eluční činidlo k uvolnění a eluci dělené směsi iontů. Směs se dělí tak, že nejdříve jsou uvolněny a eluovány komponenty s nejmenším nábojem.



*Obr.č.4 Schéma principu iontově výměnné chromatografie*

## AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Afininí chromatografie je vysoce účinná technika pro dělení biologických molekul, která využívá specifických interakcí dělených molekul s molekulami upevněnými na nosiči.

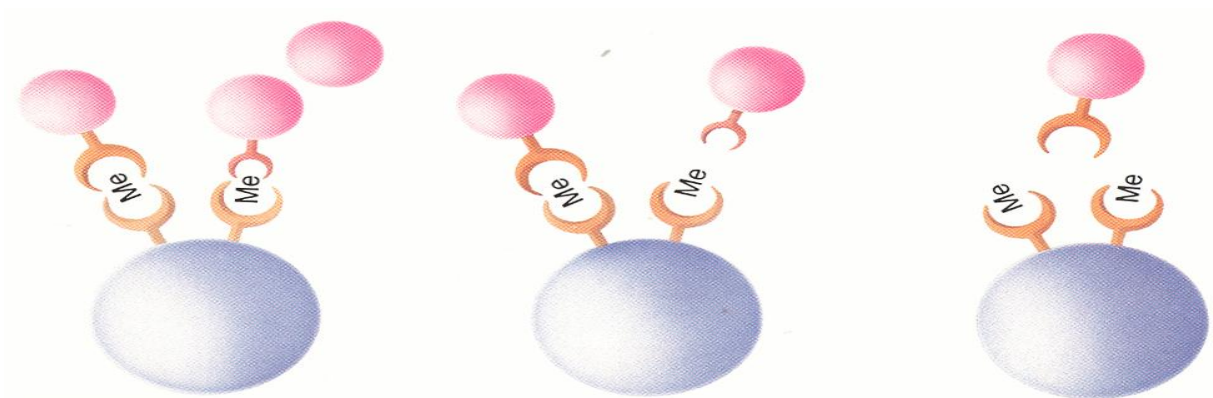


*Obr.č.5 Schéma principu afinitní chromatografie*

I při této metodě potřebujeme dvě eluční činidla. V jednom je vzorek na kolonu nanášen, jiným elučním činidlem jsou interagující molekuly analytu uvolňovány.

### CHROMATOGRAFIE VYUŽÍVAJÍCÍ TVORBY KOMPLEXŮ ("CHELÁTOVÁ CHROMATOGRAFIE", METAL CHELATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY)

Tato metoda je vhodná k separaci proteinů a využívá faktu, že prakticky všechny proteiny obsahují histidin, cystein nebo tryptofan, tj. aminokyseliny, které jsou schopné tvořit komplexy s přechodnými kovy. Na matici nosiče jsou navázány skupiny obsahující kovy tvořící komplexy, u nichž je část koordinační sféry vysycena nepevnými interakcemi s vodou jako donorem elektronového páru. Po nanesení vzorku je voda v koordinační sféře nahrazena komplexujícími aminokyselinami. Navázané bílkoviny jsou pak elučním činidlem rozdílným od roztoku, v němž byl vzorek nanášen, vymývány z kolony v závislosti na stabilitě komplexu s kovem matrice:

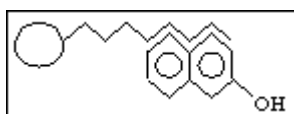


Obr.č.6 Schéma principu chromatografie využívající tvorby komplexů

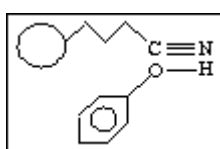
### 3. TYPY INTERAKCÍ V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII<sup>4</sup>

#### 1. van der Waalsovy síly

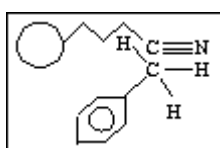
a) disperzní síly (London) - indukovaný dipól - indukovaný dipól



b) orientační síly (Keesom) - dipól – dipól

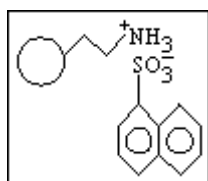


c) indukční síly (Debye) - dipól - indukovaný dipól

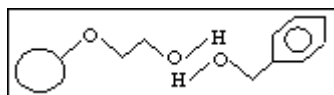


<sup>4</sup> Kapitola 3. vypracována ze zdroje (2)

## 2. elektrostatické síly (Coulomb)



## 3. vodíková vazba



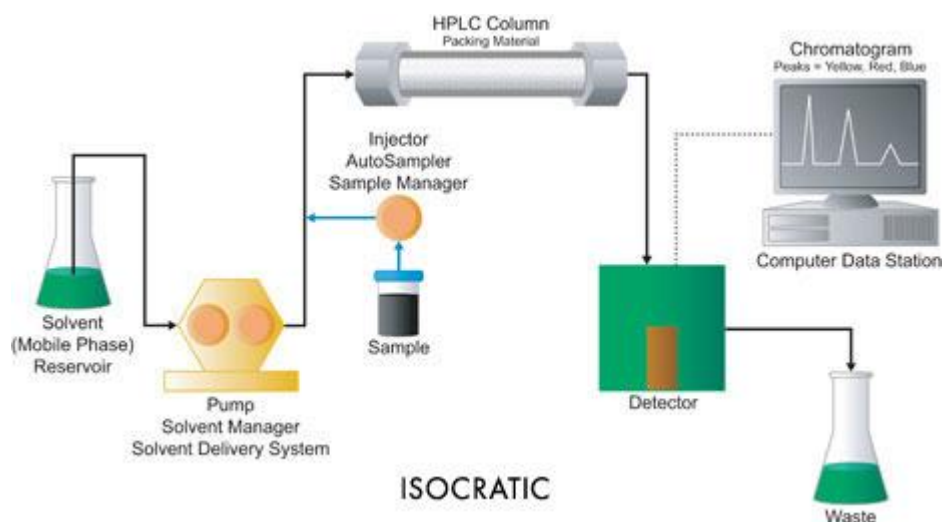
## 4. TYPY ELUCÍ V HPLC<sup>5</sup>

Tak jako u LC metody se využívá dvou typů elucí ( gradientové a izokratické ). Při izokratické eluci je po dobu analýzy využívána mobilní fáze stejného složení. Gradientová eluce je pak charakteristická změnou ve složení mobilní fáze v průběhu analýzy.

---

<sup>5</sup> Kapitola 4. vypracována ze zdroje (2)

## 5. INSTRUMENTACE PRO HPLC<sup>6</sup>



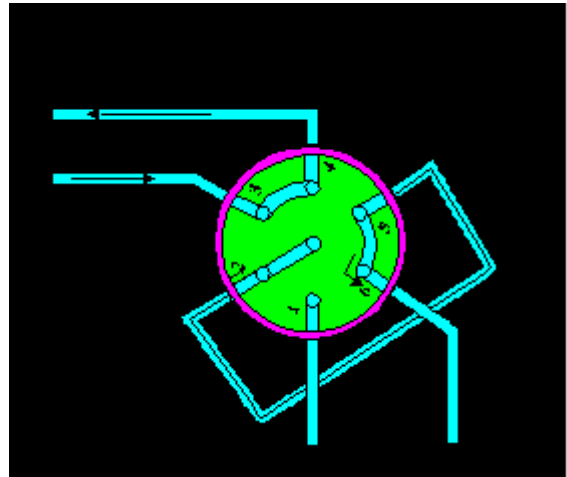
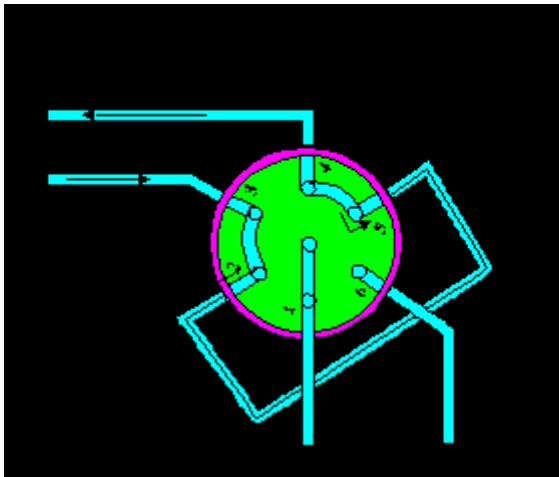
Obr.č.7 Schéma jednoduchého izokratického HPLC systému

Kromě základního kamene HPLC systémů, kterým je analytická kolona, tyto separační systémy obsahují zásobník mobilních fází, pumpu, dávkovač, detektor, vhodný procesor pro vyhodnocování dat, popř. předklonu.

- DÁVKOVAČ ( INJEKTOR )

V dnešní době u moderních HPLC systémů hrají prim především autosamplery nebo-li automatické dávkovače. Umožňují přesné nadávkování objemu vzorků v širokém rozmezí objemu (běžně desetiny  $\mu\text{l}$  až  $100 \mu\text{l}$  ) a zrychlení analýzy. Autosampler je taky nezbytný pro zlepšení některých parametrů HPLC separací jako selektivity, toku mobilní fáze a optimalizace teploty. V dnešní době se také velmi často používá šesticestných dávkovačů ( Rheodyne ) s teflonovým kohoutem.

<sup>6</sup> Text kapitoly 5. vypracován ze zdrojů (1), (2), (4)



*Obr.č.8, 9 Schéma šesticestného dávkovacího kohoutu v klidovém stavu a při dávkování*

- PUMPY ( ČERPADLA )

K udržení stabilního průtoku mobilní fáze a k jejímu protlačení kolonou, v dnešní době plněnou mikrometrovými částicemi, je nutné použití kvalitních vysokotlakých bezpulzních pump, schopných pracovat pod tlaky až 100MPa u RRLC a UPLC systému. Často se využívají dvouhlavá čerpadla se safírovými písty.

Novinkami na trhu jsou pumpy pro RRHT kolony RRLC technologie firmy Agilent. Jedná se o pumpy k systému Agilent 1200 Series, speciálně konstruované pro kolony se sub-2micronovou technologií ( částice o velikosti 1,8 $\mu$ m ) a následnou UV nebo MS detekci, které jsou schopny generovat průtok 0,05-10 ml/min.

- KOLONY

Viz. kapitola č.8 ( str.26 )

- PŘEDKLONY

Využívají se k ochraně vlastní kolony a před působením nečistot a nežádoucích částic a k prodloužení životnosti kolony.

- DETEKTORY

Detektory jsou po kolonách další důležitou součástí kolon. Nejdůležitějšími parametry pro výběr detektorů jsou pak citlivost, jako míra schopnosti rozeznat i mírné změny v koncentraci analytu. Selektivita pak mírou schopnosti jen určitého typu látky ve vícesložkových analytech.

HPLC detektory pak dle selektivity dělíme na univerzální a selektivní. Z univerzálních detektorů jsou asi nejvyužívanějším typem UV-VIS detektory s poměrně vysokou citlivostí. V dnešní době se také začíná více používat spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem ( MS ), který kromě chromatogramu poskytuje i spektrální údaje o identitě látky. MS je ale poměrně drahým detektorem vyžadujícím „interface“ mezi ním a HPLC kolonou kvůli zplynění eluentu vycházejícího z kolony a jeho následné ionizace.

Dalšími často využívanými detektory jsou Evaporative Light Scattering detektor ( ELSD ) sloužící především k detekci látek bez obsahu chromoforu či fluoroformu ( fosfolipidy, dextriny, ... ), refraktometrický detektor s poměrně nízkou citlivostí v případě použití gradientové eluce, Charged Aerosol detektor ( CAD ), amperometrické a coulometrické detektory a řada dalších.

- V některých případech se také využívá tzv. „degaserů“, jedná se o vakuová čerpadla odsávající plyny z rozpouštědel pro mobilní fázi nebo již z mobilní fáze přes semipermeabilní membránu.

## **6. ÚČINNOST CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU, KOLONY A ZDÁNĽIVÝ POČET TEORETICKÝCH PATER<sup>7</sup>**

Kapitola je krátkým zastavením u teorie účinnosti kolon a HPLC systému jako celku, protože je to jeden z parametrů, který se snaží rozvíjení této technologie zlepšit.

- VAN DEEMETEROVA ROVNICE

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

---

<sup>7</sup> Text kapitoly 6. vypracován ze zdroje (2) a (25)



V roce 1956 byla představena J.J. Van Deemeter rovnici vystihující vztahy mezi jednotlivými procesy ovlivňujícími rozšiřování chromatografických zón. Procesy které ovlivňují rozmývání zón jsou celkem čtyři:

1. Vířivá difúze (  $H_v$  ) – váže se na homogenitu stacionární fáze, kdy mobilní fáze proudí různou rychlostí v různě širokých kanálcích. Tzn. že je odvislá pouze na velikosti částic a homogenitě náplně kolony.
2. Podélná molekulární difúze (  $H_p$  ) – kdy molekuly analytu difundují z místa o vyšší koncentraci do místa s koncentrací nižší, přičemž mohou molekuly difundovat jak po směru, tak proti směru pohybu mobilní fáze. Tento parametr se uplatňuje zejména při nízkých průtokových rychlostech.
3. Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi (  $H_s$  ) – kombinuje jednak přenos hmoty uvnitř stacionární fáze a vliv adsorpční kinetiky. Díky zanedbatelnosti adsorpční kinetiky, je tento parametr závislý pouze na difúzi analytu ve stacionární fázi.
4. Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi (  $H_m$  ) – kdy rychlostní profil uvnitř kanálku je parabolický

Výškový ekvivalent teoretického patra pak můžeme vyjádřit jako součet těchto příspěvků:

$$H = H_v + H_p + H_s + H_m$$

$$H_v = A, H_p = B / u, H_s = C_s \cdot u, H_m = C_m \cdot u$$

$u$  .....průtoková rychlost mobilní fáze

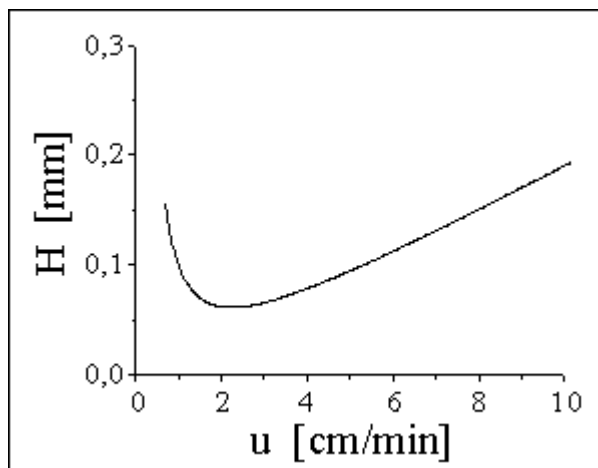
$C_s$  ....konstanta závislá na difúzním koeficientu ve stacionární fázi

$C_m$ .....konstanta závislá na difúzním koeficientu v mobilní fázi

Dosazením získáme:

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) \cdot u$$

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$



Obr.č.10 Van Deemtrova křivka závislosti účinnosti nelineárním průtokem

Minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které daná kolona vykazuje nejvyšší účinnost a dochází k minimálnímu rozšiřování koncentračních zón analytů.

- ÚČINNOST CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

Charakterizuje jak moc dochází k rozmývání koncentračních zón analytů. Mírou účinnosti pak je:

a) Počet teoretických pater dané kolony ( N )

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2 = 5,545 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_{1/2,j}} \right)^2$$

$t_R$  ..... retenční čas nebo objem, neboli vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídající dané složce  
 $w_{1/2}$  ..... šířka píku v polovině jeho výšky

Vyšší počet teoretických pater pak značí vyšší účinnost kolony. Tento parametr je silně ovlivněn délkou kolony, proto se doporučuje ke srovnání účinnosti kolon využívat výškový ekvivalent teoretického patra H.

b) Výškový ekvivalent teoretického patra H -Přesnost výpočtu zde doplňuje délka kolony .

$$H = l / N$$

N ..... počet teoretických pater

l .....délka analytické kolony

## 7. NOVÉ TRENDY VE VÝVOJI HPLC TECHNOLOGIE

Stejně jako v ostatních odvětvích, i vývoj HPLC technologií směřuje zejména k zrychlení analýzy, zvýšení selektivity procesu, citlivosti, výtěžnosti, lepším tvarům píků bez chvostování, v neposlední řadě také k miniaturizaci systému a s ním spojené minimální spotřeby rozpouštědel, automatizaci a řízení pomocí kvalitních softwarů ( v souvislosti se snížením chyby při manuálním provedení procesů ). Obsáhnout a popsat širokou škálu výrobků různých mezinárodních firem by bylo zdlouhavé, a proto se v této kapitole zmíním pouze o některých z nich, které využívají moderními technologie ( jako HILIC, UPLC, RRLC, CEC, MLC ). Svou rešeršní práci jsem směřovala zejména k vývoji kolon, které jsou z hlediska účinnosti separace a rychlosti analýzy nejdůležitější součástí těchto systémů, ať již se týkají modifikovaných klasických silika fází nebo jiných typů stacionárních fází na bázi organických či anorganických látek.

### TECHNOLOGIE VYUŽÍVAJÍCÍ ZÁKLADŮ HPLC

#### **7.1. HILIC - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography<sup>8</sup>**

Jde o speciálním typ NP-HPLC ( normal phase chromatogphy ), která byla vyvinuta jako alternativa RP – HPLC pro ( reverse phase chromatography, kde je stacionární fáze méně polární než mobilní ) separaci malých silně bazických a hydrofilních látek, které nejsou na těchto kolonách zadržovány nebo jen velmi málo.

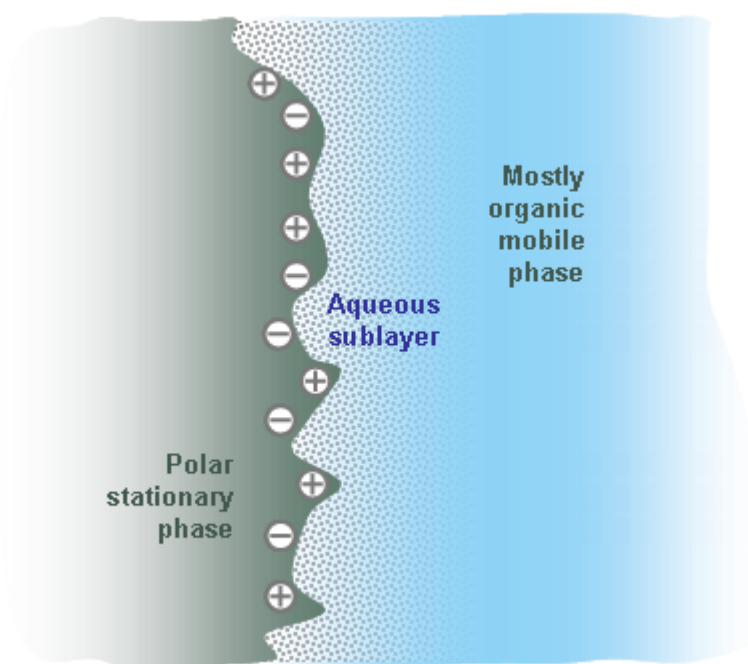
Typická mobilní fáze pro HILIC chromatografii obsahuje z větší části organické rozpouštědlo ( nejčastěji methanol, acetonitril, atd. ) s malým přídavkem vody.

---

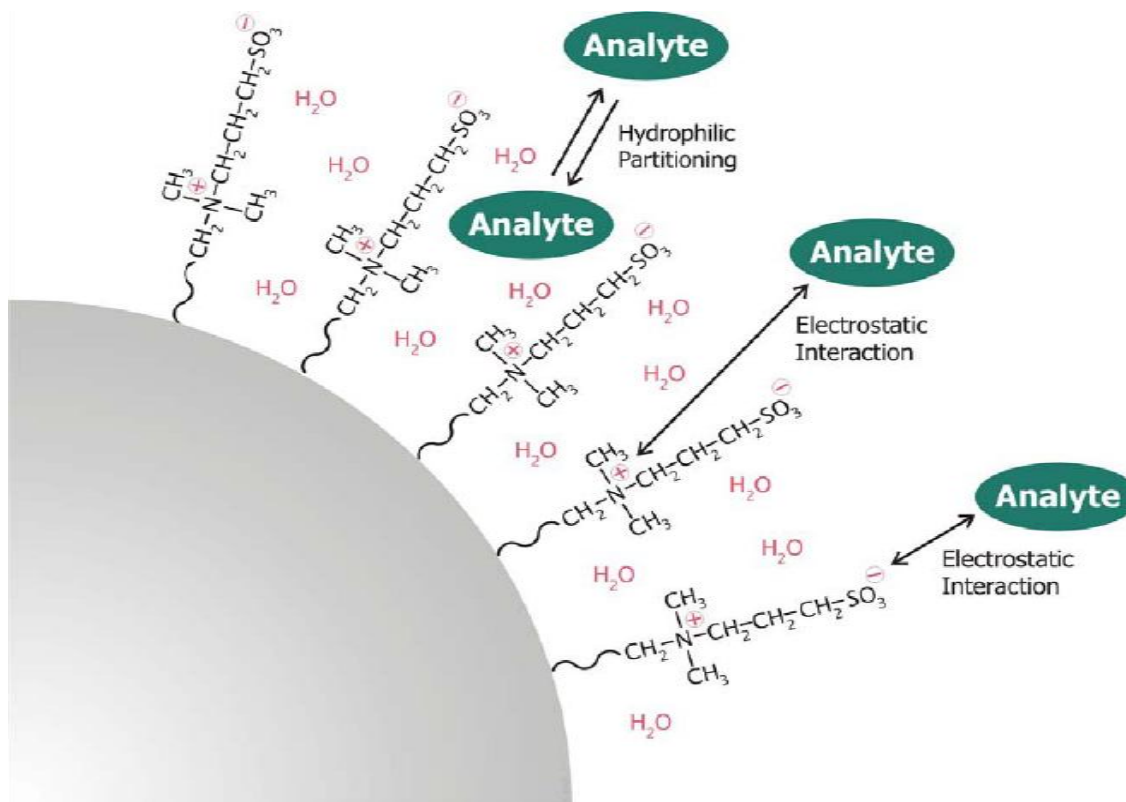
<sup>8</sup> Text kapitoly 7.1. vypracován ze zdrojů (25) a (17)

Stacionární fáze je pak polární, nejčastěji s obsahem hydroxyethyl nebo aminoskupinami. Mobilní fáze formuje povrchovou vodní vrstvu na povrchu polární stacionární fáze, čímž se vytváří systém liquid/liquid extrakce. Analyty jsou distribuovány mezi povrchovou vodní vrstvou a mobilní fází s nízkým obsahem vody. Silně polární látky se pak vyznačují vyšší afinitou k vodnému povrchu stacionární fáze než látky méně polární a proto jsou na koloně déle zadržovány. Separace látek na tomto typu kolon je tedy odvislá od jejich polaroty. Samotná stacionární fáze se těchto interakcí neúčastní, i když může vyjímečně dojít k elektrostatickým interakcím mezi povrchem stacionární fáze a analytem. Povrch stacionární fáze je obvyklé tvořen ionizovanými nebo velmi polárními skupinami pevného materiálu ( blíže pak v kapitole o stacionárních fázích ).

V dnešní době je na trhu celá řada kolon vhodných pro tuto separaci, při čemž jejich retenční profil se moc neliší.



*Obr.č.11 Znáznornění okolí vodného povrchu polární stacionární fáze*



Obr.č.12 Interakce probíhající na povrchu stacionární fáze při HILIC –hydrofilní interakce a elektrostatické interakce

Velmi často je tato metoda spojena s tandemovou MS/MS detekcí ( př. stanovení 5 – fluoruracilu v plazmě a tkáních pomocí HILIC APCI MS/MS )

## 7.2. UPLC - Ultraperformance liquid chromatography<sup>9</sup>

Nová technologie prezentovaná firmou Waters a jejím ACQUITY UPLC systémem, která přináší značné urychlení analýzy a získání kvalitních píků. Minimalizováno je také množství použitých rozpouštědel, zrychlena je i detekce a sběr dat díky kvalitnímu softwaru, zanedbatelné jsou též ztráty během samotného procesu separace. Tyto nově vyvinuté systémy, pracující pod ultravysokým tlakem, musí mít kvalitní konstrukci s použitím speciálních kapilárních spojů. Nejvyšším možným pracovním tlakem je 100MPa, díky čemuž je možno využít sorbentů s velmi malým zrněním v úzkých kolonách, výsledkem je zvýšení účinnosti separace, která je závislá právě na velikosti a kvalitě částic, vyšší rozlišení a zkrácení analýzy.

<sup>9</sup> Text kapitoly 7.2. byl vypracován ze zdrojů (6), (11) a (19)

Jedná se vlastně o přenos metod HPLC na UPLC, kde jsou zachovány stejné mechanismy separace a principy, přičemž se zvyšuje citlivost a rozlišení.

ACQUITY UPLC systém využívá sub-3 $\mu\text{m}$  technologie prezentované BEH kolonami ( ID částic = 1,7  $\mu\text{m}$  ) schopnými separace v širokém rozmezí pH. K nastavení průtoků v rozmezí 0,01 – 2,00 ml/min se využívá BSM ( Binary solvent manager ), tedy binární pumpy. Pumpa umožňuje kombinaci čtyř rozpouštědel a tím i možnost gradientové eluce. Analyty jsou do systému dávkovány automatickým dávkovačem SM ( Sample manager ), který umožňuje dávkovat objemy v rozmezí 0,1 – 50,0  $\mu\text{l}$ . Doba mezi nástřiky je velmi krátká, mezi 25 – 60 s, čímž je urychlen dávkovací cyklus. Prostor SM je také temperován v rozmezí 4 – 40°C. V SM je též zabudován termostat pro kolonu umožňující její temperaci až do 90°C. K detekci se využívá řada detektorů ( DAD, PDA, ELSD... ).

Novinkou na trhu je také nanoACQUITY UPLC systém konstruovaný pro kapilární a nano-separace proteinů. Délka kolon je okolo 20cm, velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$ . Pracují opět s BSM binární pumpou a jsou spojeny s MS detektorem. Díky své rychlosti jsou vhodné pro kvantitativní proteomickou analýzu.



*Obr.č.13 Waters nanoACQUITY UPLC™ System - Waters Micromass Q-ToF Premier™ Mass Spectrometer*

### **7.3. RRLC – Rapid resolution liquid chromatography<sup>10</sup>**

Další z nových technologií, která je vyvinuta a propagovaná firmou Agilent, urychlující separaci oproti konveční HPLC 20x s o 60% vyšším rozlišením. Tyto RRLC systémy se skládají z tzv. RRHT kolon Zorbax o velikosti částic 1,5-10  $\mu\text{m}$  s vnitřními

<sup>10</sup> Kapitola 7.3. vypracována ze zdroje (26)

parametry 4,6 x 10-300 mm ( ID x délka ). Materiál kolon je vysoce čistý silikagel, mechanicky odolný. Systém je vysoce účinný a analýzy se oproti konvečním metodám zkracují na 15-24 s.

Stálý průtok systémem je zajišťován binární hydraulickou pumpou s písty, která udržuje průtokové rychlosti v rozmezí 0,05 – 5 ml/min pod tlakem do 600bar. Autosampler pak do systému dávkuje vzorky v objemu 0,1 – 100 µl, čímž umožňuje analýzu až 2000 vzorků denně.



*Obr.č.14 RRLC systém Agilent*

Pracovní teplota kolony je 80°C, detektor pak pracuje při teplotách 50°C, proto je nutné systém termostatovat. Nejčastěji se jako detektor využívá DAD ( diod array detektor ) detektor optimalizovaný pro vlnové délky 190 – 950 nm s vysokou selektivitou.

Typ technologie	Zkratka	Velikost částic	ID	Délka kolony
<b>Rapid resolution LC</b>	RRLC	< 2µm	1 – 4,6 mm	15 – 150 mm
<b>Ultrafast LC</b>	UFLC	< 2µm	1 – 4,6 mm	15 – 50 mm
<b>Konvenční HPLC</b>	HPLC	> 2 – 10 µm	1 – 4,6 mm	15 – 300 mm
<b>Standard bore LC</b>		1,5 – 10 µm	3 – 4,6 mm	15 – 300 mm
<b>Naro-bore LC</b>		1,5 – 5 µm	1 – 2 mm	15 – 300 mm
<b>Kapilární a mikro LC</b>	CLC, µLC	1,5 – 5 µm	0.2 – 1 mm	15 – 300 mm

*Tab.1 Parametry různých HPLC systémů*

#### **7.4. CEC – Kapilární elektrochromatografie<sup>11</sup>**

Jedná se o hybridní typ chromatografie, který spojuje hnací sílu elektroforetických metod se separační silou HPLC metod. Využívá separačních technik v úzkých kapilárách založených na vysokém napětí jako je zónová elektroforéza ( CE, CZE ) a kapilární gelová elektroforéza ( CGE ). Elektrochromatografie pak využívá separaci na kolonách s velmi úzkým vnitřním průměrem se sorbentem, kterými prochází MF. Pro zachování konstantního průtoku MF systémem však není využito tlaku jako u HPLC, ale elektroosmotický tok ( EOF ), který je vysoce závislý na pH, koncentraci pufru, typu stacionární fáze a případném přidavku organické látky do MF. Pumpa je tedy nahrazena působením napětí. K separaci látek dochází stejně jako u HPLC na základě jejich rozdílné afinity k SF a MF, kdy kapiláry jsou plněny oběma fázemi, vložené napětí pak generuje EOF, který unáší analyty kapilárou. Během procesu dochází k ustavování rovnováhy mezi oběma fázemi, a tak k separaci látek.

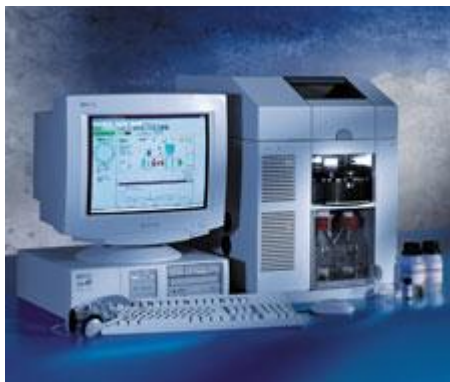
Metoda je vhodná jak pro separaci iontů, tak neutrálních částic, které se separují v závislosti na distribuci mezi obě fáze.

Výhodami této metody je zejména vyšší účinnost, absence vysokých tlaků a s tím spojené využití menších částic ( není generován vysoký tlak ). Dále je výhodou možná separace látek neutrálního a lipofilního charakteru, malá spotřeba vzorku a MF.

<sup>11</sup> Kapitola 7.4. vypracována ze zdroje (25)



Nevýhodou je složitost plnění kapilár a jejich značná křehkost. Také je zde možnost vzniku bublin při plnění mobilní fázi s hrozcí nerovnoměrnou separací. Tyto metody mají také o něco menší citlivost.



*Obr.č.15 CEC systém firmy Agilent*

### **7.5. MLC – Micellar liquid chromatography<sup>12</sup>**

Využívá se jak pro separace nabitých, tak neutrálních částic, přímo injikovaného séra a ostatních fyziologických tekutin, analýze farmaceutických produktů, separaci enantiomerů a analýze organokovů. Nedostatkem této technologie je snížená účinnost, která je způsobená právě micelami. I přes tuto nevýhodu je MLC vhodnější než iontově výměnná chromatografie pro separaci nabitých molekul nebo směsí nabitých a nenabitých molekul.

Přidáme-li do procesu RP-HPLC separace do mobilní fáze micely, získáme třetí fázi, která se může podílet na rozdělení analytů.

Látky schopné tvořit micely se nazývají povrchově aktivními látkami ( PAL ) nebo-li detergenty. Micely jsou pak částice tvořené PAL s hydrofobním jádrem a polárními konci. Polární koncové skupiny pak mohou být anionty, kationty, zwitterionty, popř. i neionogenní skupiny. Micely jsou tvořeny povrchově aktivními látkami pouze tehdy, vzroste-li jejich koncentrace v roztoku nad tzv. kritickou micelární koncentrací ( CMC – critical micelle concentration ). Vznikající micely postupně agregují do monomeru. Hodnota CMC je závislá na typu povrchově aktivní látky. I monomery tvořené různými PAL se od sebe liší. Tato odlišnost je popisována jako tzv. číslo agregace ( AN – aggregation number ).

---

<sup>12</sup> Kapitola 7.5. vypracována ze zdroje (23)

Některé detergenty užívané v MCL k tvorbě micel: sodná sůl 2,4 – deoxycholové kyseliny, sodná sůl dodecylsulfátu ( SDS ), cetyltrimethylamonium bromid ( CTAB )

Je celá řada charakteristik, kterými se řídí výběr PAL pro tvorbu určitých micel, jako je typ koncových skupin, hydrofobního jádra. Jednou z nejdůležitějších charakteristik je pak tzv. Kraftův bod, udávající teplotu, při které se rozpustnost PAL rovná CMC. Pro HPLC aplikace je pak vhodné volit takové PAL, které mají nižší Kraftův bod ( tedy i CMC ). Platí zde úměra, že vysoké hodnoty CMC vyžadují i poměrně vysoké koncentrace PAL v MF, což zvyšuje její viskozitu a je tedy pro separace nežádoucím jevem. Velkým problémem jsou i nízké hodnoty CMC klesající pod teplotu místnosti, kdy musí být použita zahřátá MF ( problém se stabilitou rozpouštědel ).

Vlastnosti micel jsou také ovlivňovány organickým přídavkem v MF. Přídavek malého množství rozpouštědla jednak zvyšuje účinnost a separaci analytů, v případě, že je však přidána poměrně velká koncentrace organické látky, může dojít k disperzi micel a hydrofobnímu efektu na celou micelární formaci. Maximální hodnota organického přídavku je pak závislá na typu micel.

Mobilní fáze pro MLC tedy kromě micel ve vodném rozpouštědle obsahují i malé množství organického rozpouštědla. Typickou stacionární RP fází užívanou u MLC je alkylovaná stacionární fáze.

Hlavní limitací tohoto procesu je tedy snížená účinnost separace, která se na chromatogramu promítá rozšířeným píkem. Vysvětlení této poměrně slabé účinnosti je pouze teoretické: Velmi malé smáčení SF vodnou micelární MF zpomaluje transfer hmoty mezi micelami a SF, což ve svém důsledku vede k snížení účinnosti.

## **8. STACIONÁRNÍ FÁZE PRO HPLC SYSTÉMY**

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, dnešní doba si vyžaduje zejména zrychlení analýzy, zvýšení citlivosti a separační schopnosti, též selektivity (používané HPLC metody/techniky) a v neposlední řadě i miniaturizaci systémů. Velký rozvoj se týká právě analytických kolon, zejména jejich náplní ( sorbentů ). Vývoj spěje

především směrem ke zvýšení kvality částic, uniformity náplně ( snížení nežádoucího difúzního a turbulentního proudění ), zmenšování částic. Kromě modifikací klasických silica materiálů se stále více rozvíjejí i jiné typy sorbentů a velké naděje se vkládají do tzv. monolitů. Jedná se o bloky vysoké porozity s velkou plochou povrchu.

### 8.1. ZÁKLADNÍ PARAMETRY ANALYTICKÝCH KOLON:<sup>13</sup>

- 1) Vnitřní průměr kolony ( ID – internal diameter ) – aspekt determinující množství analytu, které může být zavedeno na kolonu. ID může též ovlivňovat senzitivitu kolony. Kolony s vysokým ID se obvykle používají v průmyslových aplikacích k čištění lékových produktů pro další použití. Kolony s nízkými hodnotami ID se pak vyznačují lepší senzitivitou a menší spotřebou rozpouštědel pro analýzu. Dle ID rozlišujeme:
  - Velké kolony (  $ID > 10$  ) – kolony s velkou prostorovou kapacitou využívající se k čištění materiálů.
  - Analytické „scale“ kolony (ID okolo 4,6mm ) – běžně užívané typy kolon, i přes stoupající oblibu kolon menších. Používají se k běžné kvantitativní analýze vzorku a často ve spojení s UV–VIS detektory.
  - „Narrow-bore“ kolony (  $ID = 1-2$  mm ) – využívají se pro analýzy s potřebou vyšší senzitivity a v případech použití speciálních detektorů.
  - Kapilární kolony (  $ID < 0,3$  mm ) – využívají se ve speciálních případech, většinou ve spojení s MS detekcí. Obvykle se jedná o tavenou silikonovou kapiláru.
- 2) Velikost částic – klasické kolony pro HPLC systémy obsahují stacionární fáze tvořené malými sférickými částicemi. Velikost částic v HPLC systémech je pak poměrně variabilní v rozmezích 1,7 – 10  $\mu\text{m}$ . Hlavní výhodou malých částic je velký aktivní povrch, zaručující vyšší separační účinnost. Avšak takto malé částice kladou poměrně velký odpor protékající mobilní fázi s obsaženými analyty. Proto je nutné pracovat za poměrně vysokých tlaků. Velké částice se pak více uplatňují v ostatních separačních metodách, jako je například solid-phase extrakce.

---

<sup>13</sup> Text kapitoly 8.1. vypracován ze zdroje (22)

- 3) Velikost pórů – čím vyšší porozita, tím větší aktivní povrch kolony. Menší póry poskytují větší povrch, zatímco větší póry mají lepší kinetické vlastnosti. Velikost pórů pro HPLC systémy se obvykle pohybuje v rozmezích 70 – 300 Å.

Analytické kolony můžeme dělit dle několika hledisek, např. dle typu stacionární fáze, typu základového materiálu typu skupin vázaných na povrch stacionární fáze nebo typu metody, pro které kterou jsou konstruovány ( např. speciální HILIC kolony, RRHT kolony pro RRLC, nano kolony pro CEC, atd. )

<b>Charakter vázané fáze</b>	<b>Typ navázaných skupin</b>	<b>použití</b>
<b>Polární</b>	- OH, -NH <sub>2</sub> , -CN, -NO <sub>2</sub>	NP – HPLC adsorpční
<b>Nepolární</b>	- alkyl, - fenyl, - NH	RP – HPLC adsorpční
<b>Iontový</b>	NH <sup>4+</sup> , COO <sup>-</sup>	RP i NP – HPLC
<b>Chirální</b>	Chirální selektory	Chirální HPLC

*Tab.2 Ukázka charakteru SF a typů jejich ligandů*

## **8.2 STACIONÁRNÍ SILIKAGELOVÉ FÁZE<sup>14</sup>**

Hlavním limitním faktorem pro využití klasických silikagelových fází je jejich nízká pH stabilita ( stabilní v rozmezí pH 3-8 ). Při pH vyšším než 8 dochází k rozpouštění silikagelové stacionární fáze. Při pH nižším než 3 jsou hydrolyzovány skupiny vázané na stacionární fázi. Další nevýhodou klasických SF je i nestabilita při teplotách nad 60°C. Modifikací těchto klasických kolon tedy dochází k odstranění těchto nedostatků.

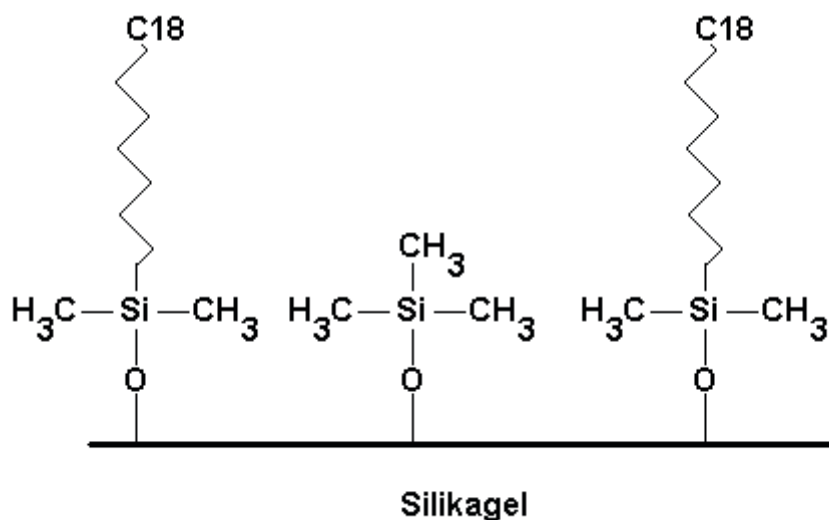
### **8.2.1 RP stacionární fáze ( stacionární fáze pro revers-phase HPLC )**

Klasické RP stacionární fáze jsou představovány nepravidelnými částicemi silikagelu s navázaným postranním uhlíkatým řetězcem o délce 1-30 uhlíkových atomů ( př. C18 ODS – oktadecylsilica ). Postranní řetězce byly na částice silikagelu vázány tzv. silanizační reakcí, která však nezajišťovala vyvázání postranních silanolových skupin silikagelu, které pak během analýzy mohly ionizovat analyty a způsobovat tak horší tvary píků, jejich chvostování a to zejména u bazických analytů.

<sup>14</sup> Texty kapitol 8.2. a 8.2.1. vypracovány ze zdrojů (2) a (12)

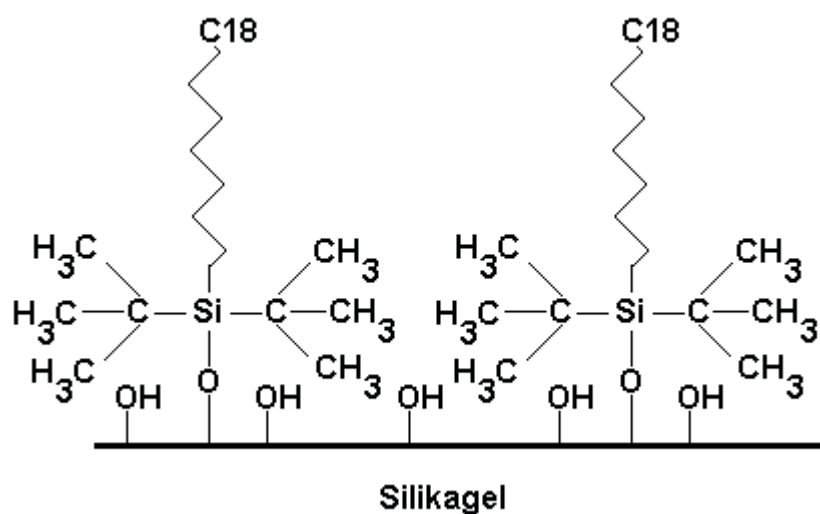
Způsoby deaktivace zbytkových silanolových skupin:

- Endcapping - Endcapping je fyzikálně-chemický proces, který redukuje počet volných silanolových skupin na nepolární fázi (na bázi silikagelu) chemickou reakcí např. s trialkylchlorosilanem (alkyl - methyl). Trimethylchlorosilan jako menší molekula než trioktadecylchlorosilan pokryje stéricky bráněné volné silanolové skupiny.



*Obr.č.16 Endcapping – navázání trimethylsilanu*

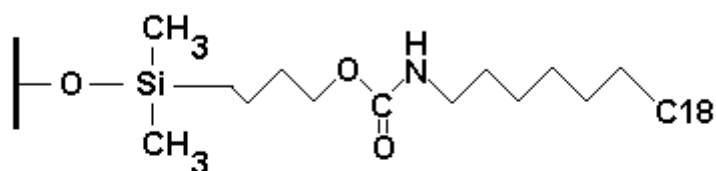
- Stérické stínění volných OH skupin - Eliminace silanolových skupin stérickým odstíněním při přípravě chemicky vázaných fází, tj. přípravou fází s delším organickým uhlíkovým řetězcem a zvýšením obsahu vázaného uhlíku v nepolární fázi (carbon load), s tímto však současně roste i retence látek. Dokonalé stérické odstínění zbytkových -OH skupin lze docílit použitím objemných alkyl substituentů R1, R3 - diisobutyl nebo diisopropyl. Jako příklad lze uvést stacionární fázi Zorbax StableBond (Agilent, USA):



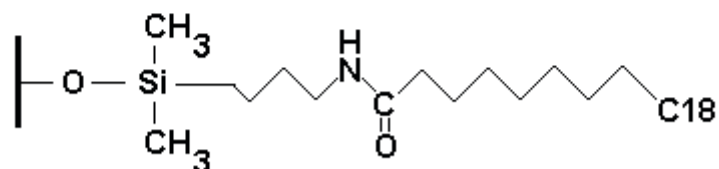
*Obr.č17 Sterické stínění volných OH skupin*

- Modifikace ligandu - Začleněním polární skupiny do organického uhlíkového řetězce stacionární fáze mezi povrch silikagelu a nepolární vrstvy (ligand) např. karbamátové skupiny - reverzní fáze SymmetryShield RP8 nebo Supelcosil ABZ<sup>+</sup>:

**SymmetryShield RP8**



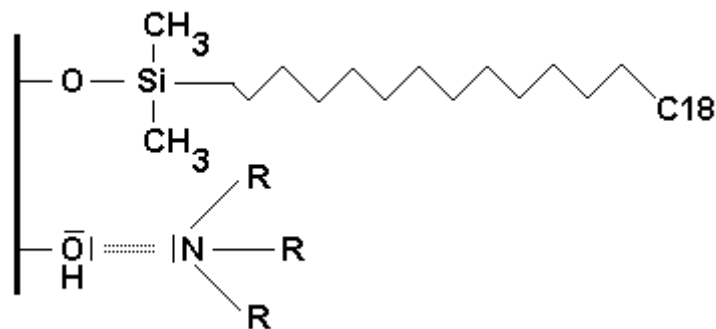
**Supelcosil ABZ+ (Discovery RP-Amide C16)**



*Obr.č.18 Ukázka zmíněné modifikace ligandů*

Tento krok zmírňuje interakci analytu s povrchovými volnými silanolovými skupinami, zejména bazických polárních látek. Pravděpodobně dochází k interakci mírně polární skupiny s volnými silanolovými skupinami a zvýšením polarity nepolární fáze dochází ke zvyšující se adsorpci vody v mobilní fázi. ( více viz. Kapitola Modifikované mobilní fáze )

- pH a složení mobilní fáze - Z popisu chování silanolových skupin k mobilní fázi je zřejmé, že tyto můžeme eliminovat i úpravou pH mobilní fáze a to přidávkem organických aminů do mobilní fáze. Ty soutěží s analytem o aktivní centra zbytkových silanolových skupin a eliminují tak jejich chování. Nejčastěji se používá triethylamin, pokud je triethylamin nedostačující, používá se trioctylamin nebo cetyltrimethylamonná sůl. Použití cetyltriethylaminu je velmi efektivní, ale prodlužuje se doba ekvibrace kolony a retenční čas chromatografovaných látek. pH takto připravené mobilní fáze se musí upravit na hodnotu pH 2-7, jinak dochází k rozpouštění silikagelu. Jako přídavek se používá kyselina fosforečná, octová nebo citronová, u cetyltrimethylamonné soli se pH upravovat nemusí. Z komerčně dostupných náplní s chemicky vázanými fázemi lze uvést nepolární fáze s alkylovými řetězci různé délky (C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>), s fenylovými a difenylovými skupinami, které mají zvýšenou polaritu a rozdílnou selektivitu zejména k fenolům a amino sloučeninám. Střední polaritou se vyznačují fáze nitrilové (alkylnitrily) a amidové, které se vykazují zvýšenou selektivitou k fenolům, cukrům a alkoholům. Aminové fáze mají slabé vlastnosti iontoměniče (anexu).



Obr.č.19 Eliminace volných silanolových skupin přidavkem aminu do vodné fáze

### Modifikované RP stacionární fáze

V dnešní době se na trhu setkáváme nejvíce s RP kolonami se stacionárními fázemi s C 18 a C 8 postranními řetězci. Kromě rozvoje kolon s modifikovanými postranními řetězci se stále častěji v nabídkách začínají objevovat i modifikované RP monolitické kolony ( firmy Merck, Phenomenex )

### Mixed Mode retention mechanism v RP - HPLC<sup>15</sup>

Snaha blokace silanolových skupin a především zabránění jimi způsobovaným reakcím vedla k vývoji 2D ( dvojdimenzionálních ) separačních mechanismů. Jde vlastně o využití dvou fází s odlišnou selektivitou v dvojdimenzionální chromatografii ( př. reverzní a iontově-výměnné fáze ). Ačkoliv má tato 2D separace výhody ve své komplexnosti, poměrně krátkém čase analýzy a získávání píků o velké kapacitě, může docházet k problémům s přípravou vzorků díky nekompatibilitě mobilní fáze pro oba systémy. Nicméně nám tento mechanismus poskytuje dva typy retenčních poloh uvnitř jediné kolony, což sebou přináší selektivní výhody.

Jako příklad může sloužit použití kolony plněné butadienem pokrytým zirkonem. Další studie použití „mix mode“ silikagelových kolon, obsahujících kationtově výměnné a hydrofobní částice, ukázaly, že silné báze mají lepší retenční charakteristiky i při nižších hodnotách pH než při použití klasických C18 RP kolon.

<sup>15</sup> Text vypracován ze zdroje (21)



Obrovský nárůst retence silných bází na 2D kolonách oproti klasickým kolonám potvrdil možnost ionizace zbytkových silanolových skupin. V případě studie retence slabých kyselin nedošlo k významnějším změnám v retenci na obou kolonách, se změnou pH. Závěrem lze tedy říci, že iontově výměnné složky těchto 2D kolon zásadně přispívají k retenci bazických sloučenin, což neplatí pro sloučeniny kyselého a neutrálního charakteru. Tím se tedy dojde k posunutí selektivity kolon směrem k silným bázím.

### **Primesep®<sup>16</sup>**

Nejnovějším typem „mixed – mode“ kolon se silikagelovým základem na trhu jsou Primesep® firmy Sielca. Kolony jsou plněny duální stacionární fází s dlouhými hydrofóbními alkylovými řetězci a se začleněnými ionizovatelnými skupinami kationtové či aniontové povahy. Jedná se o tzv. „non-encapping“ kolony, tedy bez chemické redukce silanolových skupin.

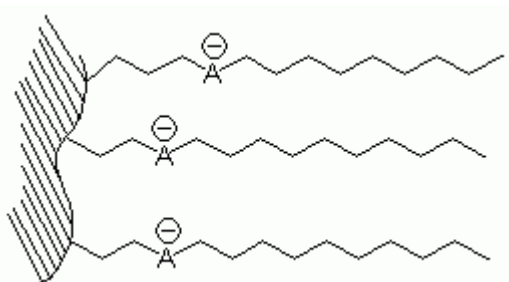
Jednotlivé typy :

- „Cation Exchange“ kolony – obsahují na svém povrchu negativně nabitě funkční skupiny. Negativně nabitě skupiny pak mohou a nemusí být ionizovány v závislosti na pH mobilní fáze.

<b>Cation-exchange kolony</b>	<b>pH při němž je ionizováno 50% kyselých skupin</b>	<b>Separované sloučeniny</b>
<b>Primesep 500</b>	pH = 5.0	Silné báze, divize, polybáze
<b>Primesep C</b>	pH = 3.5	Silné báze, dibáze
<b>Primesep 200</b>	pH = 2	Silné báze, dibáze
<b>Primesep P</b>	pH = 1	Slabé a střední aromatické báze
<b>Primesep 100</b>	pH = 1	Slabé a střední báze, kyseliny, kovy
<b>Primesep A</b>	Ionizované v rozsahu celého pracovního pH	Slabé báze, kyseliny, kovy

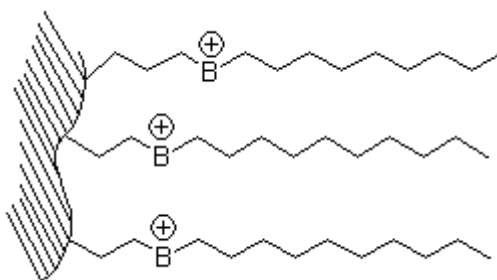
*Tab.3 Typy Cation Exchange kolon firmy Sielca*

<sup>16</sup> Text vypracován ze zdroje (21)



Obr.č.20 Schématické znázornění „cation exchange“ povrchu fáze

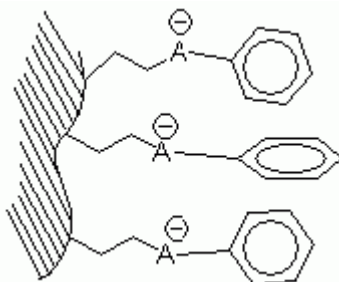
- „Aniont Exchange“ kolony – čtyři typy kolon s pozitivně nabitými skupinami na povrchu stacionární fáze. Primesep B je silně bazickou kolonou a používá se v pH rozmezí 1,5 – 4,0, které je vytvářeno přidavkem trichloroctové, fosforečné a perchlorové kyseliny do mobilní fáze. Slabě bazické kolony s karboxylovými funkčními skupinami jsou distribuovány jako Primesep B2 a pracovní pH je v rozmezí 0,5 – 7,0. Jsou vhodné pro použití některých amonných pufrů. Primesep D kolony byly vyvinuty pro přímou analýzu plazmy, ale využívají se i pro ostatní RP aplikace ( pH rozmezí 1,5 – 7,0 ). Posledním typem jsou Primesep AB kolony, které mají i vlastnosti „cation exchange“ kolon a využívají se proto k separaci směsí látek.



Obr.č.21 Schématické znázornění „anion exchange“ povrchu fáze

- Kolony Primesep C – jedná se o kolony, umožňující unikátní pořadí eluce kladně nabitých sloučenin. Jedná se o kolony kombinující vlastnosti RP kolon, cation exchange kolon a komplexometrických vlastností při interakcích s aminy, sulfo- sloučeninami a ionty kovů. Kolony pracují při pH 1-7.

- Kolony Primesep P – kombinují kromě RP a anion exchange ještě fenyl – fenyl interakce a jsou vhodné pro separace aromatických sloučenin.



Obr.č.22 Schéma Primesep P stacionární fáze

**RP kolony firmy Agilent<sup>17</sup>** – Nejnovějším typem kolon firmy Agilent jsou ZORBAX Eclipse Plus C8 a C18. Jedná se o RP kolony s modifikovanou silikagelovou stacionární fází využitelné v případě C18 kolon v rozmezí pH 2-9 ( C8 kolony pak v rozmezí pH 2-8 ). Jsou plněny částicemi o velikosti 1,8 , 3,5 a 5 $\mu$ m dle typu HPLC technologie. Vynikají dobrou účinností ( kvalitními píky a také vysokou životností.)

**RP kolony firmy Merck<sup>18</sup>** – firma Merck produkuje a distribuuje monolitické RP kolony na bázi silikagelu, Chromolith<sup>®</sup> SemiPrep 100-10 mm RP 18 ( 8 ) endcapped. Jedná se o kolony kombinující vysokou rychlost separačního procesu a jeho vysokou účinnost . Jsou vhodnou alternativou částicových kolon s ID 10mm ( popř. až do ID 21,5 mm ).

Tyto duální, vysoce porózní, monolitické tyčové kolony s ID 4,6 mm a aktivním povrchem 300 m<sup>2</sup>/g pracující za nižších tlaků než klasické částicové kolony, ale s vyšším účinkem. Kromě vysoké separační rychlosti je jednou z dalších výhod i vysoká životnost díky základu, kterým je monolit z mechanicky odolného silica materiálu.

<sup>17</sup> Text vypracován ze zdroje (26)

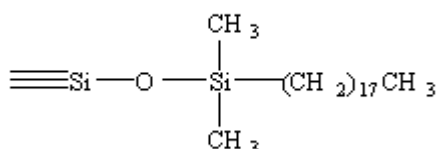
<sup>18</sup> Text vypracován ze zdroje (27)



Obr.č.23 Chromolith® SemiPrep kolona

**RP kolony firmy Sigma – Aldrich<sup>19</sup>** - Mezi současné novinky v RP kolonách patří kolony s označením Discovery HS, které vychází z anglického "high surface" (HS) - specifický povrch sorbentu je v tomto případě cca 300 m<sup>2</sup>/g. Speciální sterická vazba zamezuje úniku stacionární fáze. Snížilo se chvostování píků. Silikagel je totiž vysoce čistý, částice sorbentu jsou dokonale sférické s úzkou distribucí jejich velikostí. Kolony se dodávají s chemicky vazanými fázemi:

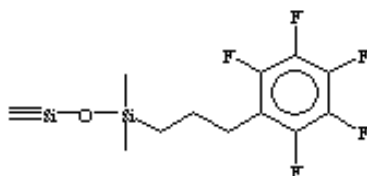
- Fáze HS C18 ( oktadecyl ) - Kolona Discovery HS C18 má stacionární fázi navázanu tak, aby nedocházelo k jejím únikům. HS C18 je určena především pro analýzu směsí látek s podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Je zvýšeně pokryta uhlíkem, což zvyšuje její hydrofobicitu.



Obr.č.24 Navázaný oktadecyl

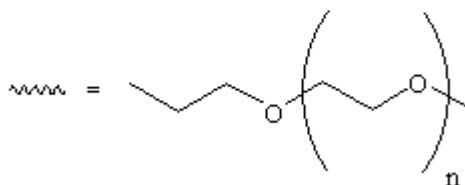
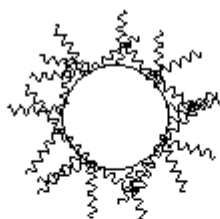
<sup>19</sup> Text vypracován ze zdroje (28)

- Fáze HS F5 ( pentafluorofenyl ) - určena pro speciální analyty, látky bazické a halogenované deriváty



Obr.č.25 Navázaný pentafluorofenyl

- Fáze HS PEG ( polyethylenglykol ) - určena pro speciální analyty, látky fenolické



Obr.č.26 Navázaný polyethylenglykol

### **8.2.2. NP stacionární fáze ( stacionární fáze pro normal-phase HPLC**

<sup>20</sup>

Dnes je využití těchto kolon pracujících v normálním módu v ústraní ve prospěch reverse-phase kolon. Je to dáno především širší využitelností RP-HPLC technologií. Hlavním problémem normálních fází je jejich vysoká aktivita a kyselost silikagelu a tedy náchylnost k vlhkosti a tím deaktivaci povrchu nebo jeho interakce se silně bazickými látkami.

I přes dnešní nízké využití normálních fází je mnoho z těchto polárních fází využíváno v reverzní chromatografii. Novinkou na trhu jsou také monolitické kolony pro NP-HPLC systémy. Příkladem může být kolona Chromolith® Si. Tyto porézní

<sup>20</sup> Text kapitoly 8.2.2. vypracován ze zdroje (12) a (25)

silikagelové monolitické kolony jsou vhodné pro separace polárních neiontových organických sloučenin.

### 8.3. HYBRIDNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE<sup>21</sup>

Nové hybridní materiály pro kolony jsou konstruovány ve snaze překonat nízkou pH stabilitu klasických silikagelových fází a mechanickou nestabilitu polymerních fází. Základem všech hybridních technologií je syntéza organicko-anorganického hybridu, obsahující jak složku anorganickou (silikagel), tak organickou, která zaručuje mechanickou odolnost těchto materiálu a širokou pH a tepelnou stabilitu. Navíc dochází i ke snížení počtu volných silanolových skupin a tím omezení dalších nežádoucích interakcí stacionárních fází.

Typ částic stacionární fáze	Výhody pro separační procesy	Slabé stránky
Silikagelové částice	mechanická odolnost reprodukovatelnost vysoká efektivita	nízká pH stabilita chemicky aktivní
Polymerní částice	účinné v širokém pH rozmezí chemicky inertní	nižší efektivita nižší mechanická odolnost nižší reprodukovatelnost
Hybridní částice – kombinace organických látek a silikagelu jako komplexní částice	široká pH stabilita vyšší efektivita a mech účinnost než u polymerů	nižší efektivita než u silici nižší účinnost než u silici nižší kapacita píky

Tab.4 Tabulka porovnání výhod a nevýhod různých typů náplně ( sorbentů ) kolon

#### 8.3.1 Hybridní technologie XTerra® a XBridge® firmy Waters<sup>22</sup>

V dnešní době jsou známi dvě generace těchto sorbentů. 1. generace XTerra stacionárních fází se vyznačovala stabilitou v širokém pH rozmezí 1-12, produkovala ostré symetrické píky bez ohledu na pH mobilní fáze a acidobazické vlastnosti analytu ( kvalitní píky jak kyselá, neutrální, tak bazická píky ).

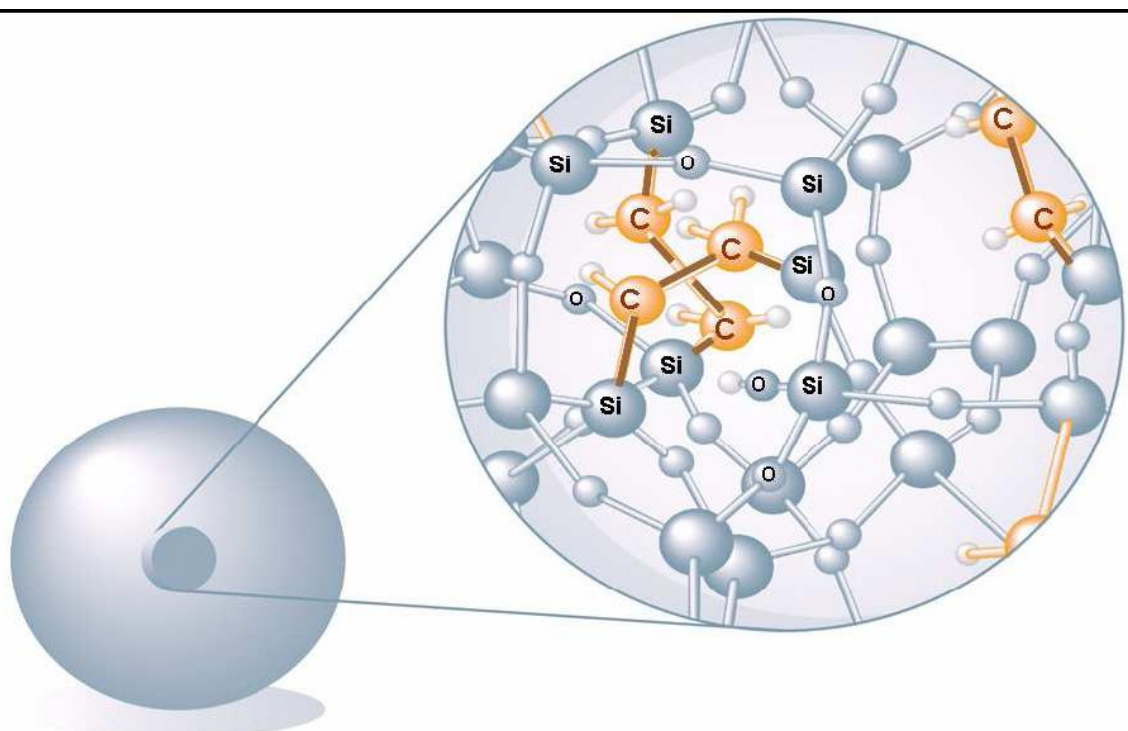
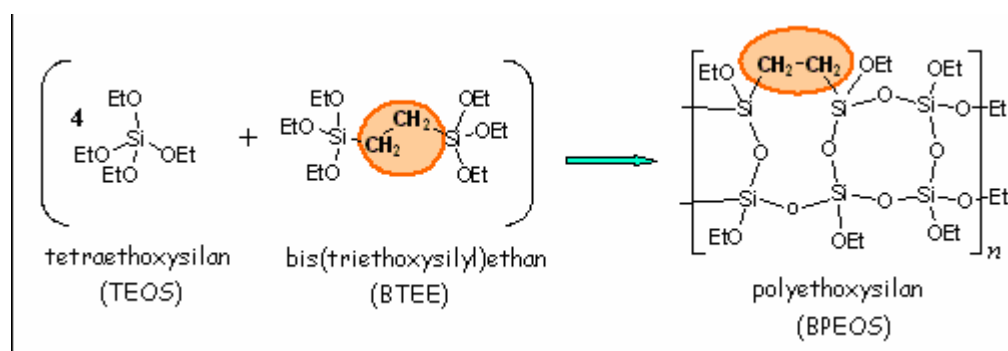
<sup>21</sup> Text kapitoly 8.3. vypracován ze zdroje (18) a (25)

<sup>22</sup> Text kapitoly 8.3.1. vypracován ze zdroje (18)

Methylované silikagelové částice sorbentů 1. generace nemají ale tak vysokou mechanickou odolnost a chybí jim i nezbytná účinnost pro realizaci plné rychlosti, senzitivity a rozlišovací schopnosti pro využití v modernějších UPLC technologiích. Proto došlo k vývoji nových, vysoký tlak tolerujících částic. Nová, 2. generace hybridních materiálů (struktura viz. Obrázek č.27 ) využívá BEH technologie ( bridge ethylsiloxane/silica ) a je prezentována ACQUITY UPLC™ BEH kolonami, které jsou výkonnější a odolnější i v širším pH rozmezí.

Jednotlivé typy ACQUITY kolon užívající BEH technologie:

- C18 a C8 kolony – univerzální kolony s 1,7 $\mu$ m částicemi pro mnoho typů UPLC separací prováděných v širokém rozmezí pH. Základem je třífunkční ligand stabilní hlavně při nízkém pH a odolný vůči „průsaku“ kolony. Jde též o tzv. endcapped kolonu, tedy s chemicky blokovanými volnými siloxanovými skupinami. Kolony poskytují ostré píky pro báze, dále jsou pak vhodné ve spojení s MS detekcí.
- Shield RP18 kolony – Jedná se o doplňkové kolony k předcházejícím. Jedná se o kombinaci Shield a BEH technologie, v silikagelovém základu fáze jsou včleněny karbamátové skupiny. Tyto ligandy pak výrazně zvyšují retenci fenolických sloučenin oproti kolonám s přímým alkylovaným řetězcem. Opět se jedná o kolony s velikostí BEH částic 1,7  $\mu$ m a použitelností v širokém rozmezí pH.
- Fenylové kolony - selektivní doplňkové kolony s širokou pH stabilitou a skvělými tvary píků pro širokou škálu sloučenin. Kolony využívají třífunkčních C6 alkylů vázaných mezi fenylovými kruhy. Tato unikátní kombinace ligandů a „endcappingu“ vytváří novou dimenzi v selektivě a efektivě pro náročné UPLC separace.



Obr.č.27 Struktura sorbetu XTerra 2.generace

### 8.3.2. Hybridní technologie Twin™ ( Two-In-One Technology )<sup>23</sup>

Opět se jedná o technologii kombinující nejlepší vlastnosti silikagelu a polymerů. Kolony jsou vysoce účinné a inertní vůči chemickým vlivům. Základem je klasický silikagel, který se vyznačuje skvělou účinností a mechanickou odolností, ale je značně limitován pracovním pH. Polymerní materiály jsou sice vysoce pH stabilní, ale pouze s krátkodobou efektivitou a nízkou schopností rozlišení.

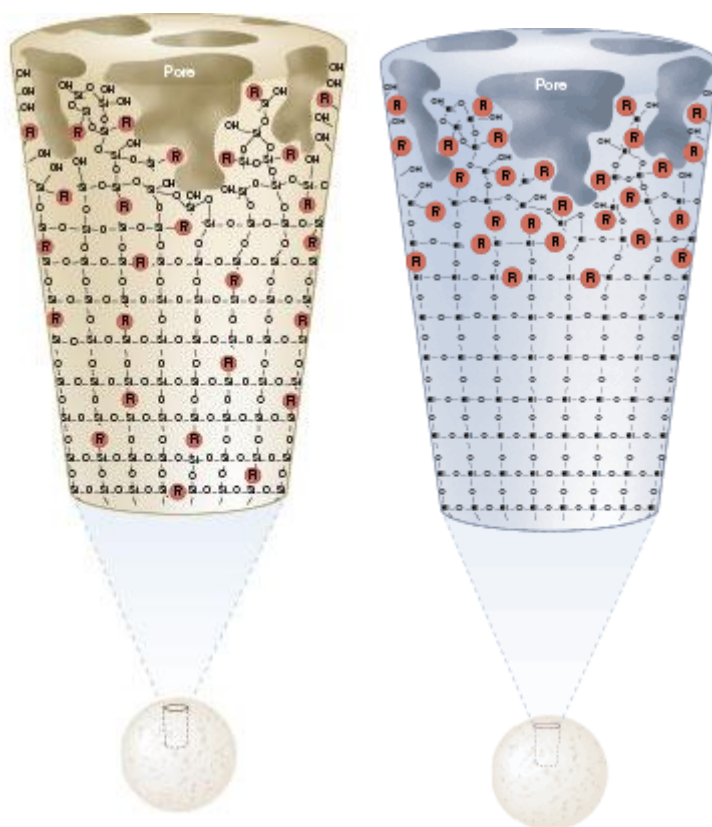
<sup>23</sup> Text kapitoly 8.3.2. vypracován ze zdroje (13) a (24)



## Geminy Twin™ technologie

Unikátní technologie firmy Phenomenex, která dala vzniku novému silica-organickému roubovanému povrchu a tím vytvoření částice s kompletně novým unikátním složením. Vnitřní silikagelový základ částice zůstává nezměněn od dříve používaných klasických silikagelů, což zajišťuje částicím vysokou mechanickou odolnost, rigiditu a efektivitu, zatímco silica-organická skořápka zajišťuje ochranu částice před chemickými vlivy a širokou pH ( pH rozmezí 1-12 ).

Kolon s touto technologií lze využít jak při izokratické, tak gradientové eluci a jsou konstruovány tak aby byly účinné pro všechny typy sloučenin ( polární báze i nepolární kyseliny ).



Obr.č.28 Porovnání struktury částice technologie Gemini Twin™ a hybridní částice

Packing Material	Particle Shape/ Size (μ)	Pore Size (Å)	Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	Carbon Load	End Capping
Gemini C18	Spherical 5, 10	110	375	14%	TMS

Tab.5 Charakteristiky materiálů Gemini Twin™ technologie

Novinkou mezi kolonami využívajícími této technologie jsou kolony Gemini C6 Phenyl. Skořápka je zde tvořena fenylovou fází s šestiuhlíkovým ( C6 ) řetězcem. Tento typ částic zaručuje retenci polárních i nepolárních sloučenin, vysokou pH stabilitu ( při pH 1-12 ), retenci i za neutrálních podmínek, vyšší aromatickou selektivitu a možnost užití methanolu jako mobilní fáze. Interakce mezi analytem a fenylovými kroužky jsou  $\pi$ - $\pi$  interakcemi.

### **8.3.3. Hybridní technologie Pathfinder<sup>24</sup>**

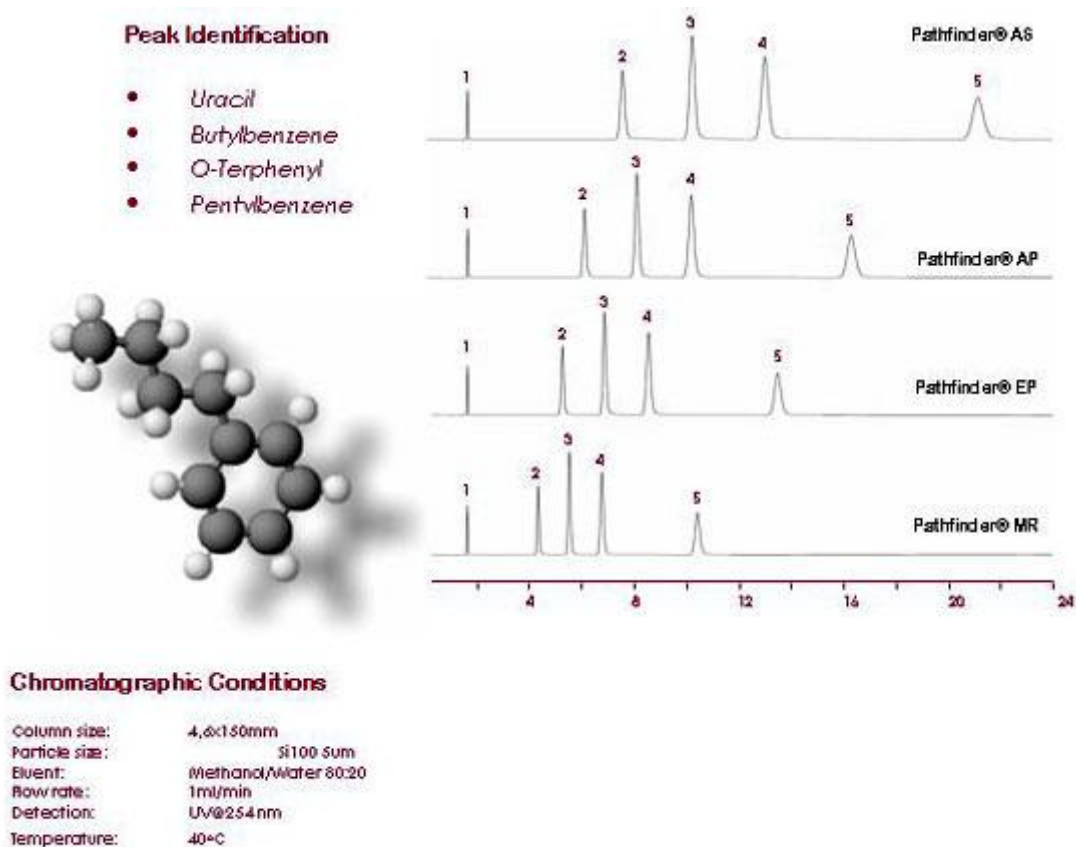
Technologie opět kombinující to nejlepší z vlastností silikagelu a polymerních fází. Jedná se o vysoce selektivní kolony díky kombinaci polárních interakcí s reverzními mechanismy. Na trhu je pět typů kolon této technologie ( AP, AS, EP, MR, PS ) lišící se vázanou organickou fází na silikagelovém základu a tedy i funkčními skupinami, kterými jsou . -CO, -NH<sub>2</sub> a TMS ( trimethylsilan ). Tyto odlišnosti vedou i k rozdílům v separaci látek na těchto kolonách. Přesnější popis struktury stacionární fáze této technologie není k dispozici.

Základní dostupné charakteristiky kolon Pathfinder:

- Velikost pórů 100 - 300Å
- Velikost částic 2,5; 3,5; 5  $\mu$ m
- ID kolon v jakékoliv délce 2,1 a 4,6 mm
- pH stabilita v rozmezí 1-12
- Tepelná stabilita 250°C

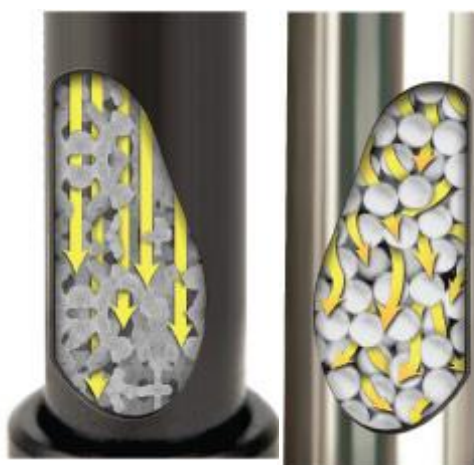
---

<sup>24</sup> Text kapitoly vypracován ze zdroje (9)



Obr.č.29 Ukázka separace na různých typech kolon Pathfinder

## 8.4. MONOLITICKÉ STACIONÁRNÍ FÁZE<sup>25</sup>



Poprvé byly kolony s monolitickou silikagelovou fází představeny v roce 1991 Minakuchim a Sogaou. Jedná se o alternativu ke klasickým sférickým částečkovým stacionárním fázím s naprosto odlišnou a vyjímečnou strukturou, kterou je blok silikagelu, nebo jiného materiálu, s velkými a četnými póry. Tato struktura pak redukuje nechtěnou difúzi a poskytuje velký aktivní povrch a obrovskou propustnost. Výsledkem je pak účinná separace. Celistvá struktura zvyšuje i mechanickou odolnost, zatímco pórovitost ( až několik nm ) minimalizuje impedanci na toku.

<sup>25</sup> Text kapitoly vypracován ze zdroje (7), (8) a (10)

Tato kombinace dovoluje rozměrově malé monolitické kolony využít při vysokých průtokových rychlostech, zároveň se vzrůstající senzitivitou.

Syntetické monolitické kolony jsou pak vyráběny sol-gel technologií. Syntéza probíhá buď „in-situ“ přímo v trubici nebo kapiláře v případě polymerních monolitů a nebo v případě monolitů na bázi silikagelu se tyčinky vyrábí odděleně. Dochází při ní k radikálové polymerizaci monomerů výchozího materiálu nebo polykondenzaci tetraalkylsiloxanů v případě silikagelu. Vysoké porozity se dosahuje pomocí zesítovadel a rozpouštědel.

Kromě silikagelu se jako materiálu pro monolitické kolony využívá i řada polymerů ( polymethakryláty, akrilamidy, deriváty vinilu, atd. ), v případě kolon pro chirální separaci jsou monolity modifikovány přísávkem chirálních selektorů.

Typickým pro monolitické kolony jsou dvojí póry ( makro- a mezopóry ). Větší póry ( 1-2  $\mu\text{m}$  ) snižují odpor kolony a umožňují použití vyšších průtoků mobilní fáze. Menší póry ( přibližně 12 nm ) stojí za zvětšením aktivního povrchu pro separaci a tím zvýšení separační účinnosti těchto kolon.

Typy stacionárních fází:

- Monolitické kolony – klasické kolony nebo kapiláry
- Monolitické disky – makroporézní, slouží k rychlým separacím biomateriálů ( nukleové kyseliny, bílkoviny )
- Monolitické tabulární kolony – typické radiálním tokem, sloužící zejména iontově výměnné chromatografii

Hlavní výhody monolitických kolon:

- Extrémně rychlá separace makromolekul
- Vysoká výtěžnost neovlivňovaná průtokovou rychlostí
- Vysoká vazebná kapacita
- Vysoká průtoková rychlost za nízkého tlaku

### 8.4.1. ProSwift™ monolitické kolony firmy Dionex<sup>26</sup>

Firma Dionex produkuje dva typy monolitických kolon, a to kolony pro iontově výměnnou chromatografii ( ProSwift WAX-1S, SAX-1S, WCX-1S ) a pro chromatografii na reverzních fázích ( PepSwift, ProSwift RP -1S, 2H a 3U ).

Kolony pro iontově výměnnou chromatografii – základním materiálem těchto kolon je polymethakrylát. Pracují v rozmezí pH 2-12 a za optimálního tlaku 3,4MPa a optimálních průtokových rychlostech 0,5 – 1,5 ml/min ( maximální hodnota 2ml/min pro všechny tyto kolony ). ID i délka kolon je stejná 4,6 x 50 mm. Kolony se liší v těchto parametrech:

	<b>ProSwift WAX-1S</b>	<b>ProSwift SAX-1S</b>	<b>ProSwift WCX-1S</b>
<b>Funkční skupiny</b>	Terciární aminy	Kvartérní aminy	Karboxylové skupiny
<b>Maximální tlak</b>	6,9MPa	8,2MPa	6,9MPa
<b>Teplota analýzy</b>	60°C	70°C	60°C
<b>Objem kolony</b>	0,73 ml	0,75 ml	0,70 ml

*Tab.6 Charakteristiky ProSwift kolon pro iontově výměnnou chromatografii*

Poslední dva typy kolon ProSwift SAX-1S a WAX-1S jsou novinkami na trhu a jsou optimalizovány pro separaci proteinů a protilátek

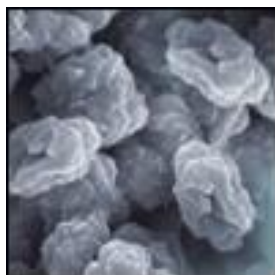
Kolony pro RP chromatografii – základním materiálem těchto kolon je polystyren – divinylbenzen na povrchu s fenylem. Pracují při optimální teplotě 70°C. Kolony se liší v těchto parametrech:

	<b>PepSwift</b>	<b>ProSwift RP-1S</b>	<b>ProSwift RP-2H</b>	<b>ProSwift RP-3U</b>
<b>ID a délka kolon</b>	100 µm x 5 cm 200 µm x 5 cm 500 µm x 5 cm	4,6 x 50 mm	4,6 x 50 mm	4,6 x 50 mm
<b>Objem kolony</b>	0,4 µl 1,6 µl 9,6 µl	0,76 ml	0,73 ml	0,65 ml
<b>Pracovní pH</b>	2,5 - 8	1 - 14	1 - 14	1 - 14
<b>Pracovní průtoková rychlost</b>	0.8–1.0 µL/min 2.5–3.0 µL/min 15–20 µL/min	0.5–4 mL/min	1–10 mL/min	1–16 mL/min
<b>Maximální průtoková</b>	1.2 µL/min 5.0 µL/min	5 mL/min	14 mL/min	20 mL/min

<sup>26</sup> Text kapitoly vypracován ze zdroje (20)

<b>rychlost</b>	30 $\mu\text{L}/\text{min}$			
<b>Pracovní tlak</b>	20MPa	10.3 MPa	10.3 MPa	10.3 MPa
<b>Maximální tlak</b>	34,4 MPa	19.3 MPa	19.3 MPa	19.3 MPa

*Tab.7 Charakteristika RP ProSwift kolon*



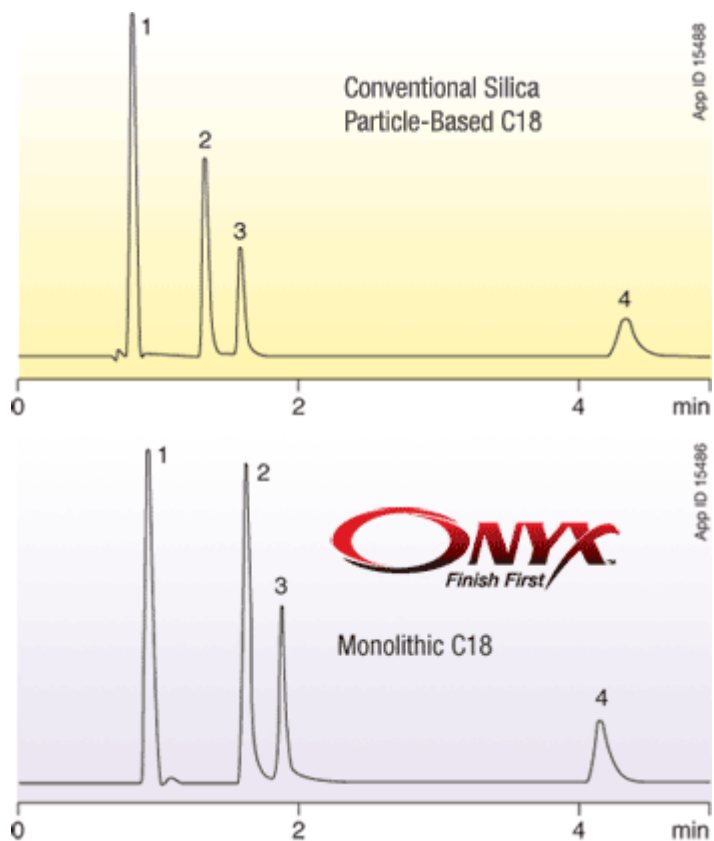
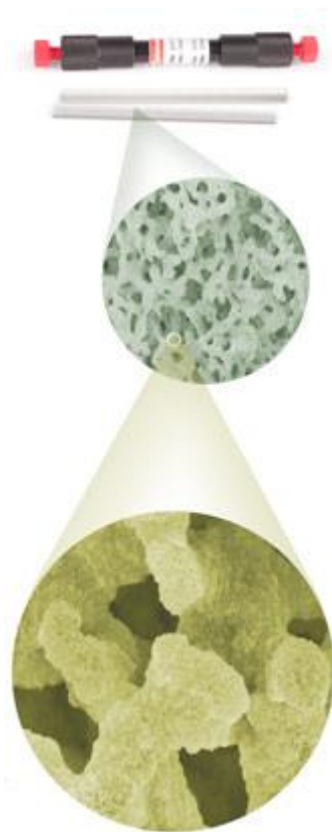
*Obr.č.30 Morfologie monolitů firmy Dionex*

#### **8.4.2. Monolitické kolony Onyx™ firmy Phenomenex<sup>27</sup>**

Jde o monolitické kolony z vysoce čistého silika materiálu, obsahující mezopóry ( 130 Å ) a mikropóry ( 2  $\mu\text{m}$  ) pracující v pH rozmezí 2,0-7,5 při maximální teplotě 45°C.

Makropóry vytváří hustou síť pórů umožňujících protékání mobilní fáze rychlostí pod 9 ml/min za nízkých tlaků ( maximálně 200 bar ), čímž se značně zrychluje separace látek na koloně. Mezopóry pak formují jemnou vnitřní strukturu kolony a vytváří tak velký aktivní povrch 300 m<sup>2</sup>/g.

<sup>27</sup> Text kapitoly vypracován ze zdroje (14)



Obr.č.31 Struktura monolitických kolon Onyx

Obr.č.32 Porovnání separací na koloně Onyx a klasické částicové C18 koloně ( viz. Poznámka č.1 )

Pozn.č.1: Podmínky separace:

### **Conditions**

Columns: Onyx™ Monolithic C18  
Conventional Silica Particulate C18

**Dimension:** 100 x 4.6mm

**Mobile Phase:** Acetonitrile / 20mM Potassium phosphate buffer, pH 2.5 (75:25, v/v)

Detection: UV @ 210nm

Flow Rate: 1.5 mL/min

Temperature: Ambient

Sample: 1. Maleic Acid  
2. Triprolidine  
3. Chlorpheniramine  
4. Diphenhydramine

## **8.5. STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI OXIDU ZIRKONIČITÉHO ( $ZrO_2$ )<sup>28</sup>**

Kovový oxid zirkoničitý je alternativním materiálem ke klasickým silikagelovým stacionárním fázím. Může existovat v mnoha krystalografických formách, ale také ve formě amorfní.

Největšími výhodami oproti klasickým silikagelovým a polymerním materiálům je jejich vysoká chemická a tepelná stabilita. Oproti klasickým silikagelovým kolonám je tento materiál stabilní v celém rozsahu pH ( 1-14 ) a to i při teplotách vyšších než 200°C a nedochází k jejich srážení nebo zvětšování působením organických složek mobilních fází ( popř. iontové síly vodné složky ) jako u materiálů polymerních. Jedná se tedy o vysoce stabilní materiál s vysokou separační účinností dovolující rychlejší a selektivnější separaci. Nevýhodou zirkoniových kolon je nevratná adsorpce látek typu Lewisových zásad na jejich povrch.

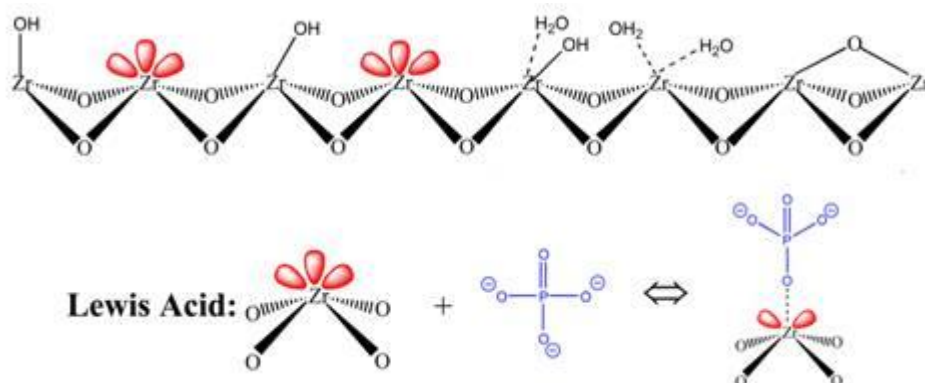
Interakce analytů s povrchem oxidu zirkoničitého probíhá na základě teorie Lewisových kyselin a zásad a to díky přítomnosti třech reaktivních míst na povrchu těchto částí – Bronstedovi kyseliny zásady a Lewisovi kyseliny – s dominantní

---

<sup>28</sup> Text kapitoly 8.5. vypracován ze zdroje (15)



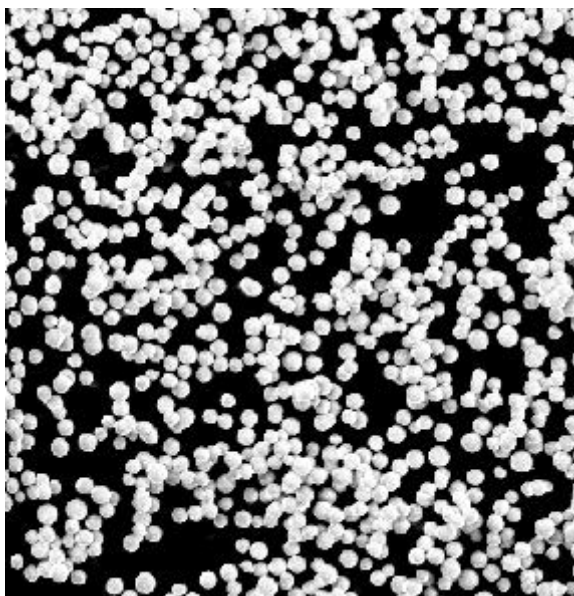
převahou míst typu Lewisova kyselina. Adsorpce složek na takovýto povrch způsobuje tvorbu chemicky sorbované vrstvy.



*Obr.č.33 Povrchový chemismus zirkoniové částice*

### **8.5.1. Zirkoniové kolony firmy ZirChrom**

Syntéza sorbentů kolon ZirChrom ® probíhá kontrolovanou polymerizací indukující agregaci amorfního oxidu do monodisperzních 3 μm zirkoniových sférických částic, které při teplotách nad 900°C splývají a vytváří monojednotkové krystalografické formy zirkonia.

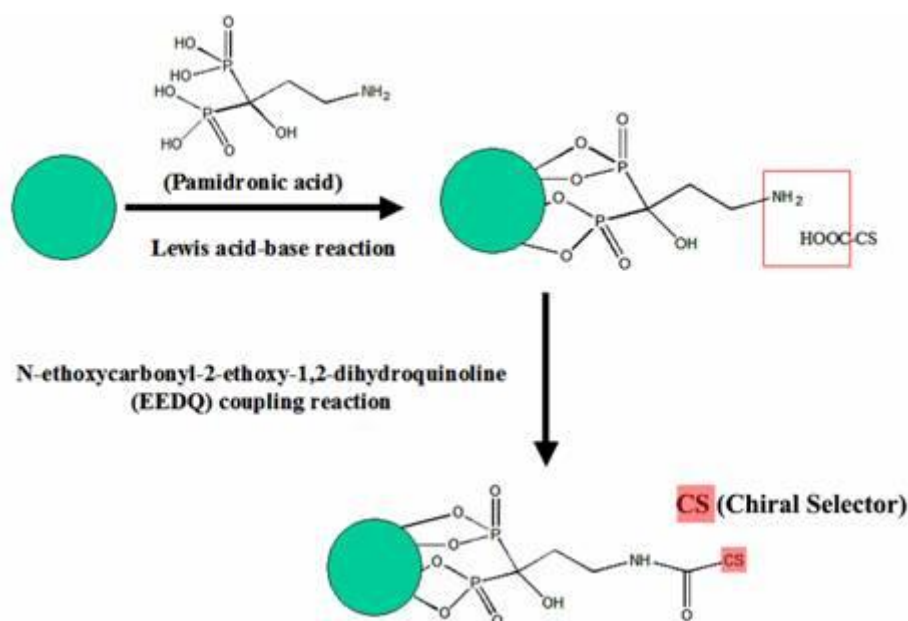


*Obr.č.34 Monodisperzní zirkoniové 3μm sférické částice*

ZirCrom RP stacionární fáze – novinkou mezi těmito fázemi jsou deaktivované stacionární fáze. Výhodou kolon s těmito deaktivovanými

fázemi je kompatibilita s těkavými, téměř neutrálními mobilními fázemi obsahujícími pufrý jako je octan nebo mravenčan amonný, zvýšená retence látek bazické povahy oproti C18-silikagelovým fázím a odlišná selektivita pro bazické látky. Mezi velké přednosti patří schopnost analyzovat látky všech charakterů ( bazické, kyselé a neutrální ).

- DiamondBond C18 – C18 modifikovaná uhlíková fáze v kombinující klasické ODS ( C18 – octadecyl ) technologie s povrchovou technologií ZirCrom.
- ZirChrom-EZ – Reverzní fáze vhodná pro separaci kyselin i bází, stabilní v rozmezí pH 1-10 při teplotě do 50°C.
- ZirChrom-MS – Reverzní fáze obdobné selektivity jako C18 fáze. Ideální pro použití při LC/MS bazických i kyselých látek a farmaceutických směsí. Stabilita jako u předchůzí fáze.
- Klasické reverzní stacionární fáze jsou pak vhodné pro mobilní fáze s vysokým obsahem vody ( Zirchrom PS – pH stabilita 1-13 do 150°C ), pro bazické látky neiontové povahy (ZirChrom PBD – pH stabilita 1-14 do 150°C ) a pro separace diastereomerů a geometrických izomerů ( ZirChrom CARB – pH stabilita 1-14 do 200°C ).



Obr.č.35 Typická chemická reakce při užití chirálního selektoru na povrchu ZirChrom CARB fáze

ZirChrom NP stacionární fáze – Jedinou fází této řady je vysoce stabilní fáze s pH rozmezím 1-14 do 150°C je polární ZirChrom PHASE.

ZirChrom iontově výměnné stacionární fáze – stacionární fáze na povrchu s iontovými skupinami kationtové nebo aniontové povahy.

- ZirChrom WCX – slabá kationtově výměnná fáze s fosfátovým povrchem, stabilní v pH rozmezí 1-10 při teplotě do 150°C
- ZirChrom PEZ – kationtově výměnná zirkoniová fáze pokrytá EDTPA ( ethylendiamin – N,N,N,N´-tetra (methylen-fosfonová) kyselina ) vhodná k analýze proteinů, vynikající pseudostacionární fáze pro separaci protilátek, stabilní v pH rozmezí 1-10 do 50°C.
- ZirChrom WAX – slabě iontově výměnná zirkoniová fáze modifikovaná polyethyleniminem, stabilní pro separace biomolekul ( zejména sacharidů ). Stabilita je zaručena v pH rozmezí 3-9 při teplotě do 200°C.
- ZirChrom SHAX – silně aniontově výměnná fáze zirkonia modifikovaná polyethyleniminem. Je více hydrofilní než předchozí ( vhodná pro separaci proteinů ), použitelná v pH rozmezí 1-12 při teplotě do 80°C.
- ZirChrom SAX – silně aniontově výměnná zirkoniová fáze modifikovaná polyethyleniminem vhodná pro separace organických i anorganických anionů ( vitamíny rozpustné ve vodě, aminokyseliny, peptidy ). Stabilita je zaručena v pH rozmezí 1-12 při teplotě do 80°C.

### **8.5.2. Discovery zirkoniové kolony firmy Sigma-Aldrich<sup>29</sup>**

- Discovery Zr-PBD fáze - částice ZrO<sub>2</sub> jsou pokryty polybutadienem. Fáze je svými separačními vlastnostmi nejvíce podobná oktadecylovým kolonám se

---

<sup>29</sup> Text kapitoly 8.5.2. vypracován ze zdroje (5)

silikagelovým nosičem. Na rozdíl od nich má ale výhodu v tepelné a pH stabilitě. Je určena pro separace bází, především aminů.

- Discovery Zr-PS fáze - částice  $ZrO_2$  jsou pokryty zesíťovaným polystyrenem. Fáze je určena pro analýzy hydrofobních látek, pro látky bazické (aminy), pro mobilní fáze s nízkým obsahem organických rozpouštědel. Doporučuje se jako alternativa k oktadecylové fázi.
- Discovery Zr-Carbon fáze - částice  $ZrO_2$  jsou pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Fáze je určena pro RP separace geometrických izomerů a diastereomerů. Povrch je vysoce hydrofobní, také vlastnostmi velice podobný grafitizovanému uhlíku. Nedoporučuje se pro analýzu aromatických sloučenin s planární strukturou, které jsou zadržovány příliš silně.
- Discovery Zr-Carbon C18 - částice  $ZrO_2$  jsou pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Uhlíková vrstva je následně modifikována kovalentně vázanými oktadecylovými skupinami. Tato fáze je hodnocena jako univerzální, ideální pro separace látek kyselých, bazických i neutrálních. Její selektivita je naprosto odlišná od oktadecylových kolon se silikagelovým nosičem.

## 8.6. STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI OXIDU TITANIČITÉHO ( $TiO_2$ )<sup>30</sup>

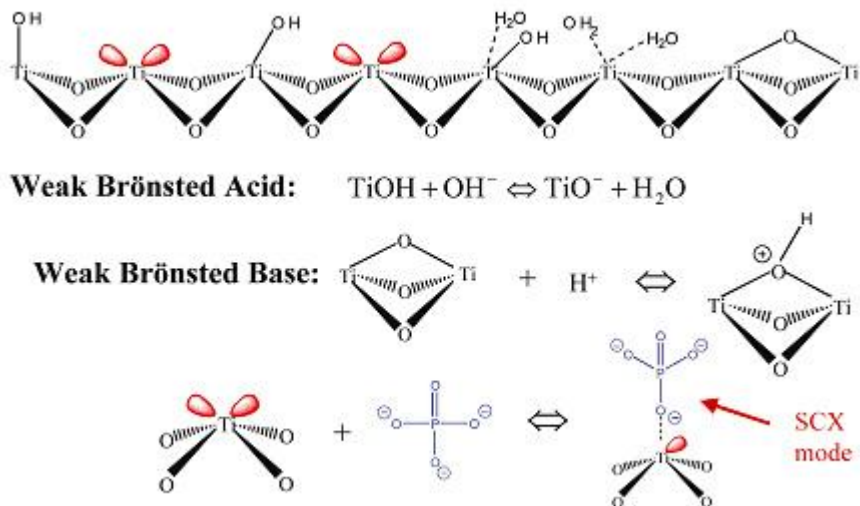
### Sachtopore® firmy ZirChrom

Sachtopore je anorganickou, porézní fází pro HPLC systémy obsahující  $TiO_2$  ( tzv. titanium ). Vlastnosti povrchu titania jsou dost odlišné od klasických silikagelových fází, ale velmi příbuzné s vlastnostmi zirkonia (  $ZrO_2$  ). Jedná se o nové fáze kombinující tepelnou a stabilitu tradičně spojovanou se zirkoniem, ale s širším rozmezím velikosti pórů a velikostí částic.

Jako v případě zirkonia, jsou povrchové interakce spojeny s teorií kyselin a zásad Bronsteda a Lewise:

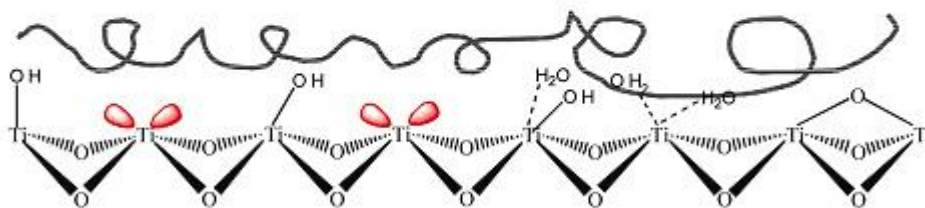
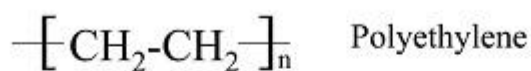
---

<sup>30</sup> Text kapitoly 8.6. vypracován ze zdroje (16)



Obr.č.36 Povrchový chemismus titaniové částice

Sachtopore titaniové fáze jsou dostupné jak pro NP, tak pro RP HPLC systémy. Sachtopore NP kolony jsou naplněny holými titaniovými částicemi, Sachtopore RP kolony jsou pak plněny titaniovými částicemi krytými polyethylenem.



Obr.č. 37 Povrch titaniové částice pro RP separaci

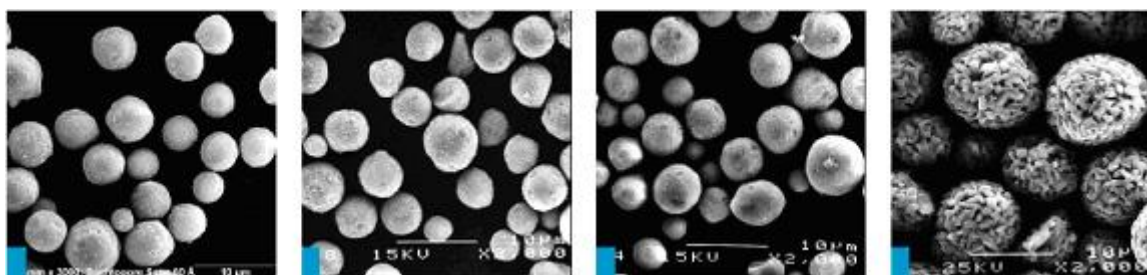
Lewisovy kyseliny na povrchu titania hrají hlavní roli při separaci elektrolytů. Selektivita těchto fází může být ovlivněna iontovou silou mobilní fáze a typem použitého pufru. Tento efekt může ovlivnit základní interakce mezi povrchem titania a pufrům. Silné interakce s povrchem titania ve svém důsledku způsobí na povrchu zvýšení negativního náboje a tím zvýší retenci sloučenin charakteru kationů.

Tabulka srovnávající fyzikální a chemické vlastnosti titania a zirkonia:

	<b>TiO<sub>2</sub></b>	<b>ZrO<sub>2</sub></b>
<b>Rozměry částic ( μm )</b>	3-80	3-25
<b>Velikost pórů ( Å )</b>	60, 100, 300, 500, 1000, 2000	300
<b>pH stabilita</b>	NP – 1-14 RP – 1-12	1-14 (PBD, CARB, PS, DB-C18))
<b>Maximální teplota</b>	Vyšší jak 100°C	Vyšší jak 200°C (CARB, DB-C18)
<b>Izoelektrický bod ( pH )</b>	5,6	6,7

*Tab.8 Srovnání fyz-chem vlastností titania a zirkonia*

Jak ukazuje tabulka, Sachtopore částice jsou variabilní jak ve velikosti pórů, tak samotných částic v obou módech ( RP i NP ).



*Obr.č.38 Elektronový mikrograf Sachtopore částic 60, 100, 300, 2000 porézních*

Vysoká variabilita, unikátní selektivita a stabilita těchto kolon umožňuje jejich široké využití v HPLC technologiích.

## **8.7. HILIC STACIONÁRNÍ FÁZE<sup>31</sup>**

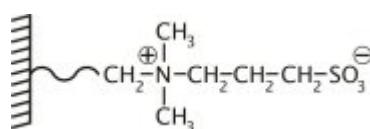
HILIC ( Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography ) je jedním z nových trendů v HPLC, lze pro ni použít stacionární NP nebo RP HPLC fázi obsahující NH<sub>2</sub> nebo OH skupiny, ale v poslední době k produkci kolon speciálně pro HILIC aplikace.

<sup>31</sup> Text kapitoly 8..7 vypracován ze zdroje (17)

## HILIC stacionární fáze:

- Neutrální ( př. dioly ) – probíhají na nich neutrální interakce, mají nižší selektivitu a jsou pH nezávislé
- Nabité ( př. amino skupiny ) – dobrá selektivita, silné iontové interakce, pH závislé
- Zwitteriontové ( př. ZIC HILIC ) – dobrá selektivita, slabé iontové interakce, pH nezávislá, tvorba stabilního vodného povrchu

Nejznámějšími typy těchto kolon firmy Sequant jsou ZIC-HILIC kolony na bázi silikagelu a ZIC-pHILIC kolony na bázi polymerů s vázaným „zwitteriontem“ ( hybridní iontová skupina ), který při separaci vyvažuje větší množství vody. Jedná se o kapilární kolony.



Obr.č.39 Zwitteriontová skupina

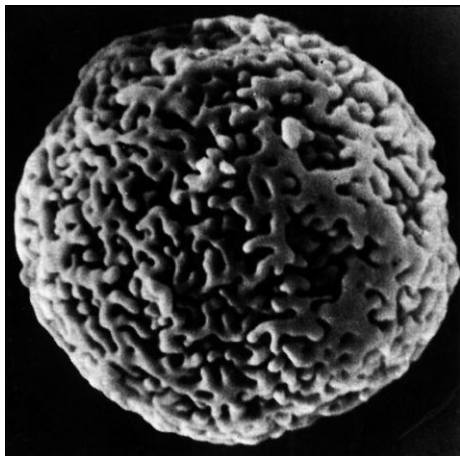
ZIC – HILIC kolony se využívají k separaci hydrofilních a polárních látek, které vykazují malou nebo žádnou retenci na RP – HPLC kolonách ( aminokyseliny, cukry, peptidy, atd. ). Jako eluenty se využívají organická rozpouštědla ( především acetonitril ) ve směsi s pufrů. ZIC-pHILIC se liší od předchozích kolon tím, že „zwitteriontová“ skupina je navázána na povrchu porézní částice polymeru a separací je dosaženo jednak hydrofilními, tak elektrostatickými interakcemi. Díky polymernímu základu jsou tyto kolony využitelné v širokém pH rozmezí.

## 8.8. RRLC STACIONÁRNÍ FÁZE<sup>32</sup>

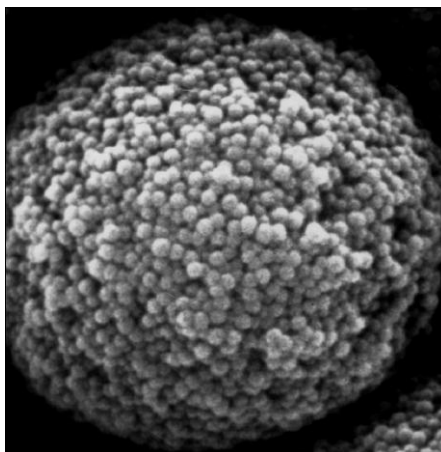
RRLC stacionární fáze jsou představovány RRHT ( Rapid resolution high throughput columns ) ZORBAX firmy Agilent.. Na trhu je více než sto těchto kolon s devíti odlišnými vázanými fázemi a s velikostí částic 1,8; 3,5 a 5 μm.

<sup>32</sup> Text kapitoly 8.8. vypracován ze zdroje (26)

Kolony jsou postavené na Rx-SIL, základem je vysoce kvalitní porézní silikagel připravovaný sol – gel technologií. Kolony se vyznačují výbornými tvary píků, rozlišením a v neposlední řadě dlouhou životností.



XEROGEL



SOL-GEL

*Obr.č.40 Elektronový mikrogram struktury polymerní xerogel a silikagelové sol-gel částice*

Sub-2 $\mu$ m částice vytvářené sol-gel technologií SOL – GEL na bázi silikagelu mají sice nižší porozitu než XEROGEL polymerní částice, ale jsou mechanicky odolnější a stabilnější v širokém pH rozmezí.

- ZORBAX Eclipse Plus – stacionární fáze vhodné pro separaci bazických sloučenin s vysokou efektivitou. Dělají se ve dvou typech, C18 a C8, s aktivním povrchem 160 m<sup>2</sup>/g, velikostí pórů 95 Å. Jsou stabilní v pH rozmezí 2–9 u C18 a 2-8 u C8 fáze.





*Obr.č.41 ZORBAX Eclipse Plus kolony*

- ZORBAX Eclipse XDB – stacionární „double-encapped“, fáze pro užití zejména při nízkých hodnotách pH ( 2-3 ), ale pH rozmezí pro separace je 2-9. Opět s několika typy vázaných fází ( C18, C8, CN a fenyl ).
- ZORBAX StableBond – stacionární fáze pracující v pH rozmezí 1-8, vyznačující se velkou stabilitou při nízkých pH. Volné siloxanové skupiny jsou v tomto případě stericky chráněny diisobutylovými, popř. diisopropylovými, řetězci. Tzn. Že se jedná o tzv. „non-encapped“ fáze ( chemicky neupravované ) a jejich stabilita je zaručena i při použití agresivních mobilních fází. Na silikagelové jádra těchto částic můžou být vázány C18, C8, CN, fenyl, C3 a pro 100% vodné mobilní fáze SB-Aq skupiny. Většina těchto stacionárních fází pracuje při teplotách do 80°C. Velikosti pórů jsou 80Å a velikost aktivního povrchu činí 160 m<sup>2</sup>/g.
- ZORBAX BonusRP – nové fáze s vázanou polární amidovou skupinou na C14 alkylovém řetězci a sterickou ochranou. Jedná se o tzv. „triple-encapped“ fáze. Jsou vhodnou alternativou předcházejícím kolon pro práci při neutrálním pH.
- ZORBAX Extend C18- kolony stabilní v pH rozmezí 2-11,5. Vysoce účinné kolony s dlouhou životností a stabilitou při vysokých pH ( pracuje se s pufrů jako triethylamin, pyrrolidin, glycin, NH<sub>3</sub>OH ). Jsou vhodné pro separace proteinů a následnou detekci pomocí MS.

## 9. ZÁVĚR

Jak již bylo řečeno v úvodu, je vysokoúčinná kapalinová chromatografie jednou z nejpobulárnějších separační metodou napříč širokým spektrem oborů. Vývoj nových technologií v dnešní době zkracuje analýzy i na časy pod 30s. Menší a tvarově uniformější částice pak zvyšují separační účinnost a efektivnost těchto systémů. V neposlední řadě miniaturizace systémů vede k snižování objemů používaných rozpouštědel a tím pádem jednak k šetření materiálu, ale i životního prostředí ( v dnešní době hodně diskutovaná otázka ).

Předložená bakalářská práce pak velmi okrajově naznačuje směry, kterými se vývoj této metody ubírá.

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AN	Agregation number- číslo agregace
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization –chemická ionizace za atmosférického tlaku
BEH	bridge ethylsiloxane/silica hybrid – hybridní technologie silikagelu a polymeru
BSM	bojary solvent manager – binární pumpa
CEC	Capillary electrochromatography – kapilární elektrochromatografie
CMC	Critical micelle concentration – kritická micelární koncentrace
DAD	Diode array detektor – detektor s diodovým polem
ELSD	Evaporative light scattering detektor
EOF	Elektroosmotický tok
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
ID	Internal diameter – vnitřní průměr
LC	Liquid chromatography – kapalinová chromatografie
MF	Mobilní fáze
MLC	Micellar liquid chromatography
MS	Mass spektrometry – hmotnostní spektrometrie
NP	Normal phase – normální fáze
ODS	Oktadecylsilica – oktadecylsilil či oktadecylsilika
OSS	Oktasilililica
PDA	Photo diode array – fotodiodové pole
PAL	Povrchově aktivní látky
RP	Reversed phase – obrácené ( reverzní ) fáze
RRLC	Rapid resolution liquid chromatography
SF	Stacionární fáze
UPLC	Ultraperformance liquid chromatography
UV – VIS	Ultra – violet/visible – ultrafialová-viditelná oblast světla

## 11. SEZNAM POUŽITÝCH ODKAZŮ

- (1) [http://hplc.chem.shu.edu/new/hplc\\_book](http://hplc.chem.shu.edu/new/hplc_book) - 04/2007
- (2) <http://www.natur.cuni~pcoufal/hplc.html> - 04/2007
- (3) <http://www.chromatography-online.org/HPLC.html> 04/2007
- (4) <http://www.pharm.uky.edu/asrg/hplc/HPLCMYTRY.html> 04/2007
- (5) [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Analytical\\_\\_Chromatography/HPLC.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Analytical__Chromatography/HPLC.html) 04/2007
- (6) <http://www.waters.cz/nn/uplc.html> 04/2007
- (7) <http://www.nxtbook.com/nxtbooks/advanstaruk/thecolumn1006/index.php?startpage=16> 04/2007
- (8) [http://www.dac.neu.edu/barnett/KargerRG/Jian\\_monolith.htm](http://www.dac.neu.edu/barnett/KargerRG/Jian_monolith.htm) 04/2007
- (9) <http://eu.shimadzu.de/products/chromato/hplc/columns/pathfinder/default.aspx> 04/2007
- (10) <http://www.genengnews.com/articles/chtitem.aspx?tid=2012&chid=1> 04/2007
- (11) <http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5WHQW6&WT.svl=1> 04/2007
- (12) <http://sweb.hplc.cz> 04/2007
- (13) [http://www.phenomenex.com/Phen/products/gemini/twin\\_tech.htm](http://www.phenomenex.com/Phen/products/gemini/twin_tech.htm) 04/2007
- (14) <http://www.phenomenex.com/Phen/Products/onyx/index.htm> 04/2007
- (15) <http://www.zirchrom.com/Intro.asp> 04/2007
- (16) <http://www.zirchrom.com/Sachtopore.asp>
- (17) [http://www.sequant.com/sn/p\\_details.php?id=8](http://www.sequant.com/sn/p_details.php?id=8) 04/2007
- (18) <http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-6VRHBW> 04/2007
- (19) <http://news.thomasnet.com/fullstory/802411/3279> 04/2007
- (20) [http://www1.dionex.com/en-us/columns\\_accessories/reversed-phase/cons35517.html](http://www1.dionex.com/en-us/columns_accessories/reversed-phase/cons35517.html) 04/2007
- (21) <http://www.sielca.com> 04/2007
- (22) <http://www.answers.com/topic/HPLC> 04/2007
- (23) [http://www.us.edu.pl/universytet/jednostki/wydzialy/chemia/acta/ac16/zrodla/05\\_AC16.pdf](http://www.us.edu.pl/universytet/jednostki/wydzialy/chemia/acta/ac16/zrodla/05_AC16.pdf) 04/2007
- (24) [http://www.phenomenex.com/Phen/products/gemini/superior\\_performance.htm](http://www.phenomenex.com/Phen/products/gemini/superior_performance.htm) 04/2007
- (25) Mgr. Lucie Nováková, Využití nových trendů při vývoji a validaci HPLC metod pro analýzu biologicky aktivních látek, Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická Fakulta v Hradci, 2005
- (26) <http://www.chem.agilent.com/Scripts/PCol.asp?IPage=181> 04/2007
- (27) [www.merckserono.net/servlet/PB/menu/1209750/index.html](http://www.merckserono.net/servlet/PB/menu/1209750/index.html) 04/2007
- (28) [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Analytical\\_\\_Chromatography/HPLC.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Analytical__Chromatography/HPLC.html) 04/2007

## 12. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ

### OBRÁZKY:

- Obr.č.1 Schéma principu adsorpční chromatografie
- Obr.č.2 Schéma principu rozdělovací chromatografie
- Obr.č.3 Schéma principu vylučovací chromatografie
- Obr.č.4 Schéma principu iontově výměnné chromatografie
- Obr.č.5 Schéma principu afinitní chromatografie
- Obr.č.6 Schéma principu chromatografie využívající tvorby komplexů
- Obr.č.7 Schéma jednoduchého izokratického HPLC systému
- Obr.č.8, 9 Schéma šesticestného dávkovacího kohoutu v klidovém stavu a při dávkování
- Obr.č.10 Van Deemtrova křivka závislosti účinnosti nelineárním průtokem
- Obr.č.11 Znázornění okolí vodného povrchu polární stacionární fáze
- Obr.č.12 Interakce probíhající na povrchu stacionární fáze při HILIC –hydrofilní interakce a elektrostatické interakce
- Obr.č.13 Waters nanoACQUITY UPLC™ System - Waters Micromass Q-ToF Premier™ Mass Spectrometer
- Obr.č.14 RRLC systém Agilent
- Obr.č.15 CEC systém firmy Agilent
- Obr.č.16 Endcapping – navázání trimethylsilanu
- Obr.č.17 Sterické stínění volných OH skupin
- Obr.č.18 Ukázka zmíněné modifikace ligandů
- Obr.č.19 Eliminace volných silanolových skupin přidávkem aminu do vodné fáze
- Obr.č.20 Schématické znázornění „cation exchange“ povrchu fáze
- Obr.č.21 Schématické znázornění „anion exchange“ povrchu fáze
- Obr.č.22 Schéma Primesep P stacionární fáze
- Obr.č.23 Chromolith® SemiPrep kolona
- Obr.č.24 Navázaný oktadecyl
- Obr.č.25 Navázaný pentafluorfenyl
- Obr.č.26 Navázaný polyethylenglykol
- Obr.č.27 Struktura sorbetu XTerra 2.generace
- Obr.č.28 Porovnání struktury částice technologie Gemini Twin™ a hybridní částice
- Obr.č.29 Ukázka separace na různých typech kolon Pathfinder
- Obr.č.30 Morfologie monolitů firmy Dionex
- Obr.č.31 Struktura monolitických kolon Onyx
- Obr.č.32 Porovnání separací na koloně Onyx a klasické částicové C18 koloně ( viz. Poznámka č.1 )
- Obr.č.33 Povrchový chemismus zirkoniové částice

- Obr.č.34 Monodisperzní zirkoniové 3 $\mu$ m sférické částice  
Obr.č.35 Typická chemická reakce při užití chirálního selektoru na povrchu ZirChrom CARB fáze  
Obr.č.36 Povrchový chemismus titaniové částice  
Obr.č.37 Povrch titaniové částice pro RP separaci  
Obr.č.38 Elektronový mikrogram Sachtofore částic 60, 100, 300 a 2000 porézních  
Obr.č.39 Zwitteriontová skupina  
Obr.č.40 Elektronový mikrogram struktury polymerní xerogel a silikagelové sol-gel částice  
Obr.č.41 ZORBAX Eclipse Plus kolony

**TABULKY:**

- Tab.1 Parametry různých HPLC systémů  
Tab.2 Ukázka charakteru SF a typů jejich ligandů  
Tab.3 Typy Cation Exchange kolon firmy Sielca  
Tab.4 Tabulka porovnání výhod a nevýhod různých typů náplně ( sorbentů ) kolon  
Tab.5 Charakteristiky materiálů Gemini Twin <sup>TM</sup> technologie  
Tab.6 Charakteristiky ProSwift kolon pro iontově výměnnou chromatografii  
Tab.7 Charakteristika RP ProSwift kolon  
Tab.8 Srovnání fyz-chem vlastností titania a zirkonia