



Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

Část 2, Základní principy HPLC

Chromatografická separace

Chromatografie je dělicí proces, při kterém dochází k distribuci látek obsažených ve vzorku mezi dvěma fázemi. Jedna fáze, umístěná v koloně, je stacionární, druhá protéká skrz chromatografické lože a označuje se jako mobilní. Stacionární fáze je dnes nejčastěji reprezentována porézním materiálem ve formě malých částic (několik mikrometrů v průměru) s poměrně velkým povrchem. Mobilní fáze je kapalina různého složení.

Realizace sloupcové kapalinové chromatografie

Sloupcová chromatografie může být provedena ve třech různých uspořádáních, a sice jako tzv. frontální chromatografie, vytěšňovací chromatografie a nebo eluční chromatografie. Nejbežnější je uspořádání eluční a výhradně tomu bude dále věnována pozornost. Při této technice je do proudu mobilní fáze nastříknut vzorek obsahující různé složky, které se následně dělí na koloně podle jejich distribuční konstanty.

ROZŠÍŘOVÁNÍ PÍKU - důvody

Existuje mnoho příčin přispívajících k rozšiřování píků na koloně a je důležité je chápat a vědět, jak tyto příspěvky minimalizovat, aby počet teoretických pater kolony byl co nejvyšší. Problematikou rozšiřování píků se zabývá tzv. dynamické teorie chromatografie a za jejího otce je považován van Deemter.

První příčina: Vířivá difúze

Kolona je naplněna malými částicemi sorbentu. Mobilní fáze protéká sorbentem a unáší dělené látky. Některé molekuly jedné a téže složky na cestě kolonou urazí delší celkovou

dráhu než jiné, protože putují po odlišné dráze skrz separační lože. Obecně jsou tedy trajektorie jednotlivých molekul těžé látky různě dlouhé. Tento efekt se označuje jako vířivá difuze a obvykle se předpokládá, že je její příspěvek k rozmývání píku nezávislý na lineární rychlosti toku mobilní fáze. Na druhou stranu je tento příspěvek možno potlačit menším zrnem sorbentu, jeho pravidleným tvarem, vysokým stupněm monodisperzity částic a kvalitním plněním sorbentu do kolony, kdy je zamezeno vzniku nehomogenit ve sloupci stacionární fáze.

Druhá příčina: Podélná difuze v mobilní fázi

Molekuly látky obecně difundují z místa s větší koncentrací látky do místa s nižší koncentrací, tento proces probíhá spontánně bez vnějšího vlivu a označuje se jako podélná difuze. I tento efekt má nepříznivý vliv na rozmývání píku především pokud je malá rychlost toku mobilní fáze vzhledem k velikosti částic sorbentu, a pokud má analyt vysoký difuzní koeficient. Zvyšování průtoku mobilní fáze vede k poklesu tohoto příspěvku k rozmývání píku na koloně.

Třetí příčina: Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi

Analyt při své cestě kolonou interaguje se stacionární fází a přitom dochází k jeho difuzi do stacionární fáze. Celkové dráhy jednotlivých molekul analytu při postupu kolonou se budou lišit, protože každá molekula uzazí ve stacionární fázi poněkud odlišnou dráhu. Tento efekt označovaný jako odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi je závislý na tloušťce vrstvy stacionární fáze, na difuzním koeficientu analytu ve stacionární fázi a dalších faktorech. Podstatné je to, že zvýšení průtoku mobilní fáze vede ke zvýšení tohoto příspěvku.

Čtvrtá příčina: Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi

Mobilní fáze neprotéká kolonou stejnou rychlostí nezávisle na místě v koloně. U stěn kolony a v blízkosti sorbentu se pohybuje rychlostí menší než uprostřed větších kanálků mezi částicemi sorbentu. Také tento rozdíl v distribuci rychlostí v koloně může vést k rozšiřování chromatografického píku. Podobně jako v případě odporu proti přenosu hmoty ve stacionární fázi i zde platí, že zvýšení lineární rychlosti toku mobilní fáze vede ke zvětšení tohoto nežádoucího efektu na šířku píku.

Výše popsané efekty působí současně, jejich vliv ale může být značně rozdílný podle typu chromatografie. Obvykle se předpokládá vzájemná nezávislost a aditivnost jednotlivých příspěvků. Reprezentace uvedených efektů je většinou demonstrována formou tzv. van Deemterových závislostí, kdy proti výškovému ekvivalentu teoretického patra (výšce patra) je vynášena lineární rychlost toku mobilní fáze (Obr. 1). Z grafu je patrné, že při určité hodnotě lineární rychlosti dosahuje závislost svého minima, což odpovídá maximu separační účinnosti. Jinými slovy lze takto nalézt optimální průtokovou rychlost pro dosažení nejvyšší separační účinnosti a to je také jedním z hlavních cílů konstrukce van Deemterových závislostí.

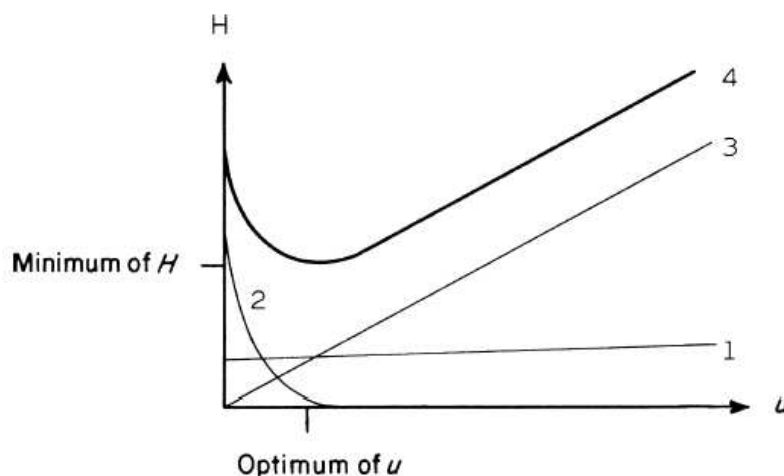
Vztah mezi účinností, N , a výškou patra H , je dán takto jako, $H = L/N$, kde L je délka kolony. Chromatografická účinnost, N , se počítá podle vztahů:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

nebo

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

kde t_R je retenční čas analytu, a w a $w_{1/2}$ jsou šířky píku při jeho základně, respektive v polovině jeho výšky.



CHROMATOGRAM A JEHO VYHODNOCENÍ

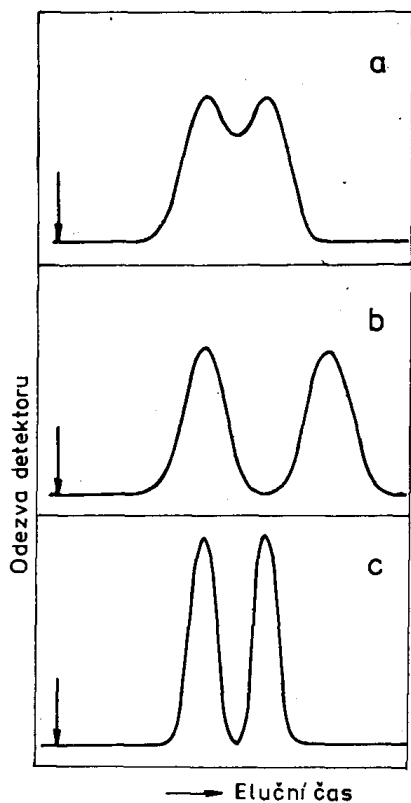
Eluované látky jsou transportovány mobilní fází z kolony do detektoru. V ideálním případě mají tvar popsatelný Gaussovou funkcí (symetrická zvonovitá křivka). Signály látek jsou

označovány jako píky a celý záznam jako chromatogram. Píky poskytují kvalitativní i kvantitativní informaci o dělené směsi:

- (a) *Kvalitativní informace:* retenční čas je jistou konstantou pro danou látku za identických chromatografických podmínek. Retenční čas dané látky je doba od nástřiku vzorku do registrace maxima píku této látky. Chromatografické podmínky jsou dány rozměry kolony, typem stacionární fáze, složením mobilní fáze, rychlostí toku, velikostí nástřiku a teplotou. Pík tak může být identifikován nástřikem standardu odpovídající látky a porovnáním retenčních časů.
- (b) *Kvantitativní informace:* Jak výška píku, tak jeho plocha mají vztah k množství nastříknuté látky. Nastříknutím známých množství dané látky může být získána kalibrační křivka, tedy závislosti výšky/plochy píku koncentraci látky. Následně při analýze vzorku obsahující neznámé množství analytu je kvantita zjištěna porovnáním výšky/plochy píku s kalibračním grafem.

ROZLIŠENÍ DVOU SOUSEDÍCÍCH PÍKŮ

Dvě látky separované na koloně se mohou úplně nebo jen částečně dělit od sebe. Jejich vzájemné dělení je ovlivněno jednak termodynamickým vlivem, ale vedle toho také vlivem kinetickým. Následující obrázek jasně ukazuje tyto dva příspěvky k separaci dvou látek při chromatografii. Pokud je dělení látek jen částečné (a) je možnou cestou pro jeho zlepšení ovlivnění retence alespoň jedné z látek a to tím způsobem, že je změněna distribuční konstanta příslušné látky (b), což je záležitost termodynamická. Druhou možností zlepšení separace je ovlivnění kinetiky procesu, což je realizováno zvýšením účinnosti separace (c). Případně lze kombinovat oba příspěvky pro dosažení zvýšení rozlišení.



Rozlišení, R , dvou píků je závislé na separačním faktoru, α , na počtu teoretických pater, N , a retenčním faktoru, k . Nejčastěji je rozlišení definováno takto:

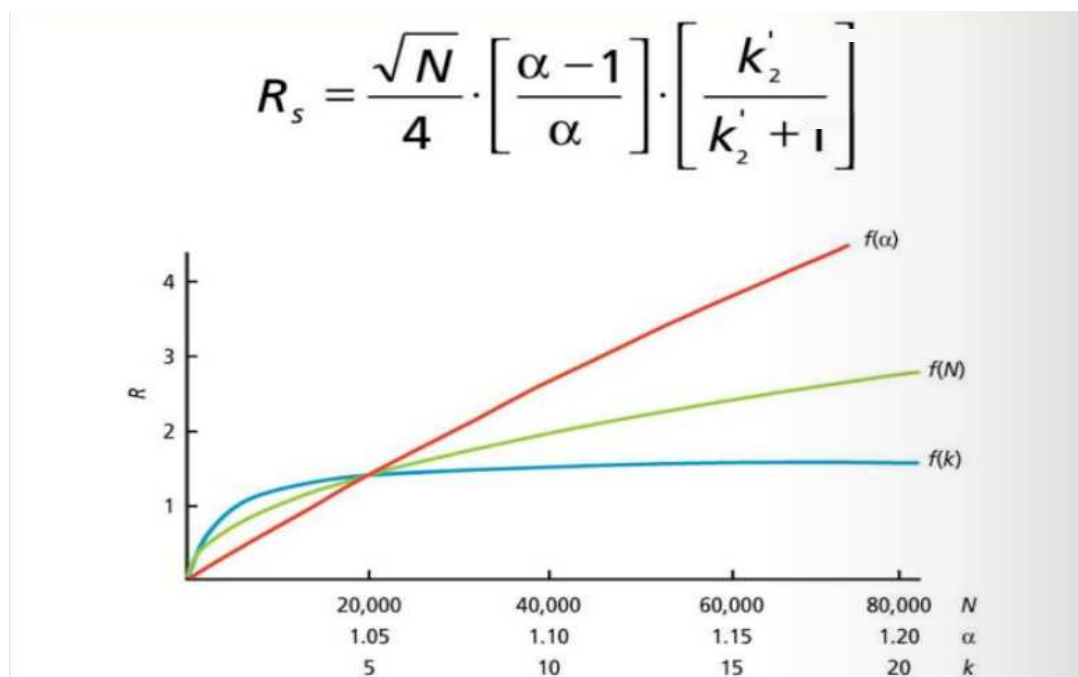
$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2}{1 + k_2}$$

N je měřítkem účinnosti kolony. Počet pater roste s kvalitou naplnění kolony, délkou kolony a při výběru optimálního průtoku na koloně. Kolona s velkým počtem pater může rozdělit směsi látek s podobnými retenčními faktory. Čtyřnásobný nárůst účinnosti alke vede jen ke zdvojnásobení rozlišení.

α je měřítkem chromatografické selektivity a je definováno jako poměr retenčních faktorů příslušných separovaných látek, tedy: $\alpha = k_2/k_1$. Retenční faktor, k , je definován takto: $k = (t_R - t_0)/t_0$, kde t_R je retenční čas a t_0 je tzv. mrtvý čas. Hodnota α je vysoká pokud se interakce separovaných látek se stacionární a mobilní fází podstatně liší. Typ interakcí (např. disperzní síly, dipol-dipol interakce, vodíkové vazby, π - π interakce, pH v případě iontově-výměnné chromatografie) hraje zásadní roli.

V poslední části rovnice figuruje retenční faktor více zadržené složky.

Grafické znázornění souvislosti R s účinností, selektivitou a retenčním faktorem velmi ilustrativně reprezentuje následující obrázek.



Velmi názorně je vidět, že největší vliv na rozlišení má separační selektivita, tedy termodynamický vliv na kvalitu dělení. Dynamický příspěvek je také podstatný, je reprezentován separační účinností, ale je patrné, že velký nárůst počtu pater vede jen k poměrně malému zlepšení rozlišení. Konečně i vliv retenčního faktoru je třeba uvážit. Ukazuje se, že jistá retence je naprosto nezbytná pro dosažení rozlišení, takže retenční faktor méně zadržené látky musí být výrazně odlišný od nuly, na druhou stranu zvyšování retenčního faktoru nad hodnotu ~ 5 již nevede k významnému zlepšení rozlišení.

Možnosti zlepšení rozlišení

Pokud je rozlišení nedostačující, je několik způsobů jeho zvýšení.

- (a) Řešením může být zvýšení počtu pater: (i) použitím sorbentu s menší velikostí částic nebo lepším naplněním kolony, (ii) užitím delší kolony nebo spojením dvou a více kolon za sebou nebo, (iii) nastavením optimálního průtoku mobilní fáze (viz van Deemterovy závislosti). Nicméně je třeba si uvědomit, že rozlišení je úměrné odmocnině počtu pater,

nárůst počtu pater na dvounásobek vede k zlepšení rozlišení jen 1,4 násobnému. Pokud je zvýšení účinnosti kolony dosaženo jejím prodloužením, je to spojeno s delším retenčním časem a vyšším tlakem mobilní fáze. Zmenšení velikosti sorbentu také vede k velkému zvýšení tlaku na koloně.

- (b) Efektivnějším způsobem zvýšení rozlišení je zlepšení separační selektivity, α . To však v parxi nemusí být snadné. Může pomoci změna stacionární fáze (např. alumina místo silikagelu, nebo reverzní fáze místo fáze normální). Nicméně prvním krokem bývá spíše změna mobilní fáze. Jiná mobilní fáze může podporovat jiné typy interakcí a to ve svém důsledku může pozitivně ovlivnit rozlišení dvou sousedících látek.
- (c) Také retenční faktor přispívá k rozlišení, platí, že by se měl pohybovat v rozmezí do 1 do asi 10. Pokud se blíží k jiné, dochází k rychlému poklesu rozlišení. Je třeba změnit složení mobilní fáze tak, aby se zvětšila retence analytů na koloně.

MIMOKOLONOVÉ OBJEMY

Všechny objemy HPLC systému mimo kolonu ovlivňující dělení jsou označovány jako mimokolonové objemy. Jde o objem injektoru, kapiláry mezi nástřikovým ventilem a kolonou, mezi kolonou a detektorem, celý detektor, spojovacích součástek, případně kapiláry v termostatu a přepínacích ventilech. Objemy před nástřikovým ventilem a za detektorem do mimokolonových objemů nepatří, protože neovlivňují rozmývání píku.

Mimokolonové objemy by měly být minimální, protože mají negativní vliv na separaci. Jsou jednou z příčin rozšíření píků a chvostování píků. Jejich příspěvky k rozšiřování píků jsou aditivní.¹ Pokud každá taková příspěvek přidá sníží rozlišení píků o 5 %, pak celkový pokles rozlišení může být skutečně velký. Zatímco je obtížné nějak snížit objem injektoru nebo detektoru, rozměry spojovacích kapilár mohou být vhodně zvoleny tak, aby jejich negativní vliv na separaci byl malý. V případě běžných HPLC separací v analytickém měřítku, kdy kolony mají průměr 2 mm a více, je obvyklé používat kapiláry s vnitřním průměrem 0.17 mm nebo menším a délka kapilár má být co nejmenší. Nároky na minimalizaci mimokolonových objemů HPLC systému rostou s poklesem objemu kolony. Pokud vykazují analyty s malými retenčními faktory podstatně nižší účinnosti než analyty s větší retencí, může to být způsobeno příliš velkými mimokolonovými objemy.

¹ Rozptyly σ^2 související s nástřikovým zařízením, kapilárami, spojovacími díly, kolonou (tj. separačním procesem) a detektorem, efekty jsou aditivní, proto šířka $w = 4\sigma$ Gaussůva píku je:

$$w = 4(\sigma_{inj}^2 + \sigma_{kap}^2 + \sigma_{spoj}^2 + \sigma_{kol}^2 + \sigma_{det}^2)^{0,5}$$

DEFORMACE TVARU PÍKU

Při bližším pohledu na reálné píky je většinou patrné, že nejsou zcela symetrické, většinou jsou rozmyté směrem k vyšším retenčním časům, mají “chvost“, a proto se tento efekt označuje jako chvostování. Spíše výjimečně je pozorován jev opačný, kdy pík je rozmytý v přední části, a pak se jedna o tzv. frontování píku.

Malé odchylky od Gaussovy funkce jsou běžné a dají se tolerovat. Ovšem větší asymetrie píků svědčí o tom, že systém je daleko od optimálního stavu. Chvostování zhoršuje separační účinnost, tím dosažitelné rozlišení a je třeba najít jeho příčiny a ty eliminovat. U chvostujících píků je obtížné definovat jejich konec při integraci píku. Chvostování může být způsobeno následujícími příčinami.

Špatně naplněná kolona nebo poškozené lože sorbentu v koloně, vznik kanálků v koloně
Může vést ke vzniku ramének píků a dokonce ke zdvojení píku.

Velké mimokolonové objemy

Tato příčina vede nejen k rozšíření píků, ale i k chvostování. Řešením je aplikace kratší kapiláry mezi nástřikem a kolonou a kolonou a detektorem, menší průměr kapilár, zmenšení detekční cely, atd.

Přetížení kolony

Kolona má omezenou separační kapacitu, tj. množství látky, které může být na kolonu aplikováno bez jejího přetížení je omezené. Pokud je množství na kolonu naneseného vzorku příliš velké, začne záviset retenční faktor na čase a dochází k deformaci píku. Píky začnou být asymetrické a retenční časy se s nárůstem množství dané látky většinou zkracují.

Často je kolona považována za přetíženou, pokud dojde k poklesu retenčního faktoru o 10 % ve srovnání se stavem bez přetížení kolony. Pro většinu stacionárních fází k přetížení dochází, pokud je hmotnost aplikovaného vzorku větší než ~10 mikrogramů na gram sorbentu.

Nekompatibilita vzorku se stacionární nebo mobilní fází

Pokud je zvolený systém stacionární a/nebo mobilní fáze nekompatibilní se vzorkem, může dojít také k deformaci píků a snížení účinnosti.

Příčinou může být např:

- (a) Špatná rozpustnost vzorku v mobilní fázi.
- (b) Směsný interakční mechanismus – uplatnění dvou nebo více interakčních mechanismů současně.
- (c) Příliš vysoká aktivita stacionární faze, např. v případě adsorpční chromatografie.

Řešením může být změna stacionární a/nebo mobilní fáze, změna pH mobilní fáze, použití jiného separačního modu.

Příliš velká časová konstanta

Příliš velká časová konstanta detektoru způsobuje pokles účinnosti a asymetrii píků.

PÍKOVÁ KAPACITA A STATISTICKÁ PRAVDĚPODOBNOST ROZLIŠENÍ

Účinnost dělicího systému je nejlépe charakterizovatelná pomocí tzv. píkové kapacity, n . Ta odpovídá počtu komponent, které by mohly být systémem maximálně rozděleny při jisté hodnotě retenčního faktoru, k , a při rozlišení píků, R , rovném jedné. Pro výpočet musí být znám počet pater, N , daného separačního systému. Pro izokratické dělení pak platí vztah:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(1 + k_{\max})$$

kde $k_{\max}$ = maximální hodnota k .

Chvostování snižuje píkovou kapacitu. V reálných případech není účinnost úplně stejná pro celý rozsah retenčních faktorů. Ještě důležitější je skutečnost, že píkovou kapacitu je třeba chápat jako hypotetické číslo, protože výpočet předpokládá zcela pravidelnou a ideální distribuci píků v chromatogramu.

Jaká je pravděpodobnost, že jistá komponenta dělené směsi bude eluována jako jeden pík bez překryvu s ostatními komponentami vzorku?

$$P \approx e^{-2m/n}$$

kde:

P = pravděpodobnost vztahená na jednu složku (komponentu)

m = počet složek ve vzorku

Počet složek ovšem nikdy v reálných vzorcích není přesně znám. Spíše je třeba předpokládat, že počet složek je neznámý a ty se mohou eluovat kdykoliv, i v době eluce sledovaných složek. Nicméně, je užitečné si udělat určitou představu o možnosti dělení látek na základě statistiky a pravděpodobnosti podle vztahu výše uvedeného.

Jaká je pravděpodobnost, že všechny složky směsi budou rozděleny?

$$P' = \left(1 - \frac{m-1}{n-1}\right)^{m-2}$$

P' = pravděpodobnost pro všechny složky

Tyto výše prezentované skutečnosti ovšem neznamenají, že současné separační metody jsou nevhodné. Ve skutečnosti může být reálná situace lepší, protože píky nejsou distribuovány v chromatogramu statisticky, ale podle jejich fyzikálně-chemických vlastností. Např. homology jsou děleny podle rostoucí délky uhlovodíkového řetězce na obrácené fázi. Ovšem na druhou stranu ani sebevětší separační účinnost v některých skutečných případech nestačí k dosažení úplné separace. Výše uvedené vztahy mají poskytnout jistou představu a udělat si názor na to, co je, a co není možné očekávat v reálných situacích při dělení složitých směsí látek.

Řešením složitých separačních problémů může být aplikace vysoce specifické detekce, derivatizace solutů, spojení se spektroskopickými metodami, optimalizace separačních podmínek, nebo vícerozměrná separace.

VLIV TEPLOTY V HPLC²

Neexistují obecně platná pravidla týkající se vlivu teploty na HPLC dělení. Při zvyšování teploty je většinou pozorován vzrůst separační účinnosti díky snížení viskozity a zlepšení přenosu hmoty, nicméně je známa řada případů, kdy byl naopak pozorován pokles dělící výkonnosti systému. Separační faktor může růst nebo naopak klesat se změnou teploty. Výhodou vyšší teploty je možnost zrychlit separace, protože snížení viskozity vede k zvýšení difuzních koeficientů a možnosti aplikovat vyšší průtoky bez přílišného zvýšení tlaku. V určitých případech je vysloveně nutno za vyšších teplot pracovat, protože to vyžaduje použitá mobilní fáze nebo separovaný vzorek, kvůli jejich viskozitě.

Pro optimalizaci dělení je tedy obecně nutné vliv teploty prostudovat. Lze pracovat i při teplotách kolem 200 °C, to ale vyžaduje určité úpravy v HPLC systému.

Zvýšení teploty má následující nevýhody:

- (a) Rozpouštědla a složky vzorku se snadněji rozkládají.
- (b) Zvýší se tlak par rozpouštědla, což může vést ke vzniku bublin v mobilní fázi, kavitaci čerpadla, zhoršení šumu detektoru, objevení falešných píků, případně ke znemožnění detekce.
- (c) Všechny chromatografické rovnováhy jsou teplotně závislé, zvláště všechny iontové rovnováhy ve vodných mobilních fázích (chromatografie na brácených fázích a na měničích iontů). Obdobně, rovnováha mezi vodou rozpuštěnou v mobilní fázi a adsorbovanou v adsorpční chromatografii je teplotně závislá a je obtížnější ji řídit za vyšších teplot. Většinou právě tyto rovnováhy jsou rozhodující vzhledem k chromatografickým vlastnostem sorbentu. Tudiž, pokud není systém řádně termostatován, může být špatná reprodukovatelnost separace.
- (d) Rozpustnost silikagelu podstatně stoupá s teplotou.

Termostatování kolony nebývá u současných přístrojů problém, protože jsou běžně vybaveny termostatem. U méně pokročilých instrumentů je možno použít nerezový nebo skleněný plášť na kolonu, a ta je následně termostatována vhodnou kapalinou. Také mobilní fáze by měly být před vstupem do kolony termostatována na stejnou teplotu jako kolona,

² C. Zhu, D.M. Goodall and S.A.C. Wren, *LCGC Eur.*, **17**, 530 (2004) or *LCGC North Am.*, **23**, 54 (2005); G. Vanhoenacker and P. Sandra. *J. Sep. Sci.*, **29**, 1822 (2006).

provádí se to většinou smyčkou/kapilárou, která je umístěna v termostatu nebo v termostatovaném plášti. Dokonce existují i termostatovaná čerpadla a detektory.

Maximální teplota pro silikagelové sorbenty je kolem 120 °C a pro vázané fáze na silikagelu 80 °C.

Neměla by být podceňována i skutečnost, že se mobilní fáze průchodem kolonou zahřívá. Přibližně platí, že teplota vzroste o 0,1 °C při nárůstu tlaku o 1 bar, tedy o 10 °C při vzrůstu tlaku o 100 bar. Pro práci s těkavými rozpouštědly může být velmi vhodné kolonu chladit a používat nízké průtoky (např. při použití pentanu s bodem varu 36 °C).