

NOVÉ UHPLC KOLONY A JEJICH ALTERNATIVY

Nejnovější trendy směřující ke zvýšení separační účinnosti HPLC kolon, acetonitrilová krize, zvýšené nároky na čistotu aktivních látek, to vše umožnilo komerční dostupnost kolon označovaných jako UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography).

Protože se šířky píků, získaných touto technikou, pohybují maximálně v oblasti jednotek sekund, není možné separační účinnost zvýšit bez odpovídajícího minimálního upgradu přístrojového vybavení. Jde obecně o optimalizaci části chromatografu mezi kolonou a kyvetou detektoru, kritickým bodem se stává právě zmiňovaná cela detektoru, jejíž vnitřní objem by měl být v oblasti 1–3 μl . Nezbytné úpravy je nutné provést též v nastavení sběru dat, zejména frekvence sběru datových bodů (alespoň 0,1 s).

Zvýšení separační účinnosti se zpravidla dosahuje snížením velikosti částic do rozsahu 1,5–2,0 μm , čímž se počet teoretických pater zvýší na hodnoty okolo 180 000/m. Typické pracovní tlaky se pohybují okolo 600 barů. Přestože je vliv velikosti částic na separační účinnost

velmi dobře znám, do realizace tohoto kroku do neznáma se dlouho žádný z výrobců nechtěl odhodlat. Existují totiž dobře známé negativní efekty:

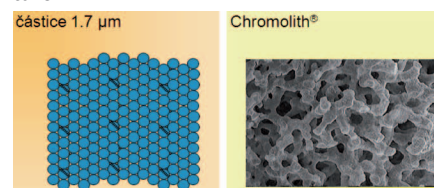
- zvýšený zpětný tlak a jeho vliv na životnost chromatografu,
- zvýšené nároky na čistotu rozpouštědel používaných jako mobilní fáze, zejména obsah částic (mechanické nečistoty),
- snížená životnost kolon daná větší citlivostí na čistotu mobilní fáze i vzorku,
- vyšší cena kolon.

Vážným problémem se v současné době jeví náchylnost k ucpání kolony, a to mechanickými částicemi, které pocházejí z:

- mobilní fáze (mechanické částice),
- vzorku (precipitát, nerozpustné komponenty),
- HPLC systému (degasser, obložení ventilů atd.).

Příčinou je fakt, že snížením velikosti částic došlo i ke zmenšení objemu mezi sousedícími částicemi, takže maximální

Obr. 1 – Detailní pohled na detaily ve struktuře



vzdálenost mezi sousedícími kulovými částicemi (která určuje prostupnost nerozpustných částic skrz kolonu) klesla na hodnotu 0,3 μm . Proto bývají rozpouštědla určena pro techniku UHPLC deklarována s filtrací přes filtry s velikostí pórů 0,2 μm . Ostatní způsoby vzniku mechanických částic ale jednoduše eliminovat nelze.

Přesto po rozpačitém začátku došlo k rozšíření UHPLC kolon mezi chromatografickou komunitou, a to hlavně zásluhou pokroků ve vývoji HPLC instrumentace, jednoznačně eliminující tradiční tlakový limit 400 barů. Tradiční výrobci UHPLC systémů nyní proklamují tlakový limit v hodnotách nad 1000 barů.

Dokončení na další straně

Dalším impulzem se stala krize v oblasti dodávek acetonitrilu, kde je přechod na techniku UHPLC jednou z alternativ díky nižšímu průtoku a tím nižší spotřebě acetonitrilu.

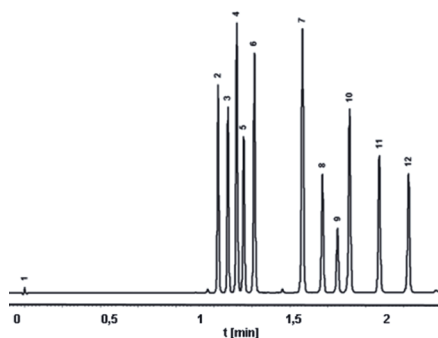
Další možností jak zvýšit separační účinnost, je zvýšení specifického povrchu u monolitických kolon (Chromolith) a jejich instalaci do podmínek UHPLC (průměr kolony 2 mm, optimalizovaný systém).

Výsledný zpětný tlak je na úrovni běžné instrumentace (do 200 barů). I když výsledná separační účinnost nedosahuje hodnot běžných u částicových kolon, je významně vyšší oproti běžným kolonám s velikostí částic 5 μm , absence dalších nevýhod činí z monolitických kolon významnou alternativu nezávislou na tlakovém limitu celého chromatografu.

Zejména reálná životnost kolony je významně vyšší oproti částicovým kolonám, díky duální porézní struktuře, dovolující

Obr. 2 – Dva příklady použití částicových a monolitních UHPLC kolon:

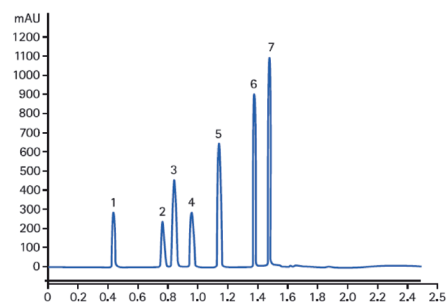
a) Ultrarychlá analýza anabolických steroidů – Chromolith FastGradient RP-18e, 50-2 mm



extrémní prostupnost v případě mechanických částic (a vlastní mobilní fázi) – obr. 1.

V současné době nabízí Merck varianty obě, a dává tak uživateli svobodu v rozhodování, zda-li obětuje zlomek separační účinnosti ve prospěch vyšší životnosti kolony. K dispozici jsou dvě základní řady UHPLC kolon:

b) Separace 7 fenolů během 1.5 minuty – Hibar® HR 50–2.1, Purospher® STAR RP-18 endcapped, 2 μm



– **Částicové** – Purospher STAR HR 2 μm (30 mm, 50 mm),

– **Monolitní** – Chromolith 2 mm ID (Fast-Gradient 50 mm, Performance 100 mm).

RNDr. Milan KALINA,
Merck spol. s r. o.,
milan.kalina@merck.cz