

## RYCHLÉ CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE

LUCIE BOROVCOVÁ, VLADIMÍR HAVLÍČEK  
a KAREL LEMR

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083,  
142 20 Praha 4  
lucie.borovcova@volny.cz

Došlo 26.10.18, přepracováno 26.2.19, přijato 1.3.19.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, superkritická  
fluidní chromatografie, hmotnostní spektrometrie,  
stacionární fáze

### Obsah

1. Úvod
2. Rychlé chromatografické separace
3. Detekce úzkých chromatografických zón
4. Příklady aplikací rychlých chromatografických separací
5. Závěr

### 1. Úvod

Termín rychlé separace je relativní. V iontové mobilní spektrometrii je dosahováno separace iontů během desítek milisekund, v chromatografii jsou při rychlých separacích složky vzorku eluovány v jednotkách minut příp. sekund. Narůstající zájem o vývoj rychlých separací je vyvoláván potřebou získat rychle výsledky při velkém počtu prováděných analýz a to i matričně složitých a rozmanitých vzorků. Cílem je dospět k co nejrychlejší separaci dosahující potřebné účinnosti a rozlišení s následnou citlivou a selektivní detekcí. Rychlé separace nacházejí uplatnění v mnoha oblastech, jako například v toxikologii nebo klinické chemii, kde je kladen důraz na včasné získání výsledku nezbytného pro diagnostické účely (odhalení příčiny otravy apod.). Zkrácení doby separace je obecněji významné u aplikací, kde je vyžadována účinná separace velmi komplexních vzorků obsahujících až stovky složek (proteomika, metabolomika, analýza pesticidů aj.). Ačkoli se nutně nejedná o minutové analýzy, nové přístupy nabízejí významnou časovou úsporu.

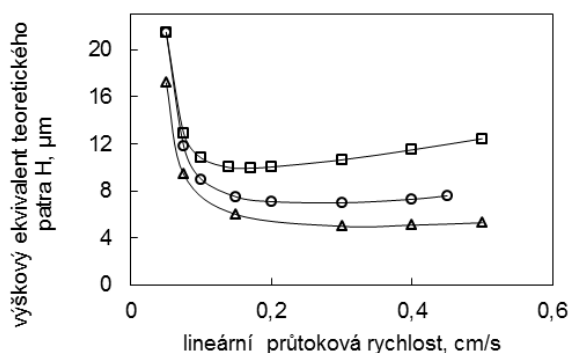
V posledních letech je pozornost soustředěna na vývoj vysokotlakých chromatografických technik poskytujících výsledky ve významně kratších časech ve srovnání

s technikami konvenčními. Mezi tyto techniky, dnes již běžně používané, řadíme ultra-vysokoúčinnou kapalinou chromatografii (UHPLC), která pro zvýšení účinnosti separace může využívat stacionární fáze s plně porézními částicemi o průměru menším než 2  $\mu\text{m}$ . Rychlých separací lze však dosáhnout i jinými cestami, než je zmenšování plně porézních částic, např. použitím monolitických kolon nebo povrchově porézních částic. Později na trh uvedená ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) není prozatím tak běžnou technikou, dovoluje však rovněž dosáhnout krátkých separačních časů a v mnoha případech se osvědčila jako vhodná alternativa k UHPLC. Obě techniky byly vzájemně porovnávány například při analýze léčiv<sup>1-3</sup>, odhalování dopingů<sup>4-6</sup> nebo stanovení nových syntetických drog<sup>7</sup>. Rovněž elektromiografická technika je možné využít k rychlým separacím. To dokládá řada aplikací, při kterých je v módu kapilární elektroforézy (CE) dosahováno separací v řádu sekund až jednotek minut<sup>8-11</sup>.

### 2. Rychlé chromatografické separace

Jednou z možností, jak dosáhnout rychlejších separací s požadovaným rozlišením, je zmenšování plně porézních částic chromatografického sorbentu až na průměr menší než 2  $\mu\text{m}$ , což ovšem přináší zvýšené nároky na chromatografickou instrumentaci z hlediska pracovního tlaku. Nezbytná je minimalizace mimokolonových příspěvků a rychlá detekce, aby nezhoršovaly rozlišení a úzké píky byly dostatečně prokresleny. Tento směr vývoje rychlých separací se začal prosazovat od roku 2004 příchodem prvního komerčně dostupného UHPLC systému Acquity UPLC od firmy Waters. Dnešní moderní systémy jsou schopny pracovat až do tlaků 1500 barů (~ 22 000 psi)<sup>12</sup>. Z Van Deemterovy křivky pro různé průměry plně porézních částic sorbentu (obr. 1) je zřejmé, že optimální separační účinnosti pro menší částice je dosaženo při vyšších lineárních průtokových rychlostech a v jejich širším rozsahu, a to z důvodu nízkého odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi. Kolony naplněné částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  nabízejí lepší účinnosti, rozlišení a zkrácení doby analýzy<sup>13,14</sup>.

Na druhou stranu nárůst tlaku v systému, který je dle Darcyho zákona<sup>15,16</sup> nepřímo úměrný druhé mocnině průměru částic, může omezovat zvyšování průtoku mobilní fáze (skutečně použitelný rozsah lineární průtokové rychlosti). Při rychlých a účinných separacích za ultra-vysokého tlaku je kladen velký důraz na kvalitu a stabilitu stacionární fáze, což si vyžádalo vývoj nových stacionárních fází. Při jejich vývoji se zohledňují tři hlavní požadavky: a) vysoká chemická stabilita (možnost použití širo-



Obr. 1. Znárodnění van Deemterovy křivky pro různé průměry plně porézních částic stacionární fáze. □ – XBridge 5  $\mu\text{m}$ ; ○ – XBridge 3,5  $\mu\text{m}$ ;  $\Delta$  – Acquity 1,7  $\mu\text{m}$  (převzato z cit.<sup>14</sup> a přepracováno)

kého rozmezí pH), b) mechanická stabilita (odolnost vůči ultra-vysokým tlakům), c) možnost modifikace stacionární fáze (ovlivňování selektivity separace). V dnešní době jsou pro techniku UHPLC dostupné různé typy stacionárních fází (pro systém obrácených fází, normálních fází, hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) aj.) v rozmezí průměru částic sorbentu 1,5–2  $\mu\text{m}$ . Délka kolon pro UHPLC separace se pohybuje typicky mezi 50 až 150 mm s vnitřním průměrem obvykle 2,1 mm. Tento typ kolon se s úspěchem využívá v řadě odvětví, jako je např. farmacie, biomedicína, analýza potravin a sledování složek životního prostředí<sup>17–24</sup>.

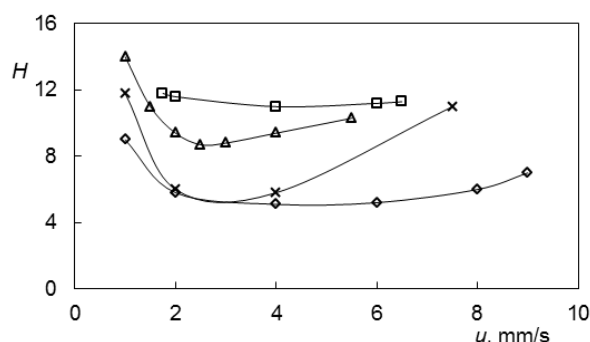
Další směr ve vývoji stacionárních fází představují povrchově porézní částice (SPP – superficially porous particles, označované také jako „fused-core“, „core-shell“ nebo „solid-core“). Jsou tvořeny pevným neporézním jádrem o průměru  $\sim 1,7 \mu\text{m}$  a pórovitou vnější vrstvou o tloušťce  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ . Uvedené dnes typické rozměry řeší problém nízké kapacity kolon (malý objem stacionární fáze v koloně), který nastává při použití klasických povrchově porézních částic s většími rozměry. Používané malé rozměry povrchově porézních částic pozitivně ovlivňují odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi, podélnou a vířivou difuzi<sup>25–28</sup>. Koncept povrchově porézních stacionárních fází s průměrem částic pod 3  $\mu\text{m}$  byl komercializován v roce 2007 představením této nové generace částic určených pro separaci malých i velkých molekul<sup>29</sup>. Použití kolon naplněných tímto typem částic umožňuje dosáhnout podobných výsledků jako u UHPLC kolon, ale s 2–3krát nižšími tlaky<sup>30,31</sup>. SPP kolonová technologie představuje jednoho z hlavních konkurentů k UHPLC kolonám a počet výrobců těchto kolon narůstá<sup>26,32,33</sup>.

Zrychlení chromatografické separace lze také docílit pomocí monolitických stacionárních fází. Jsou tvořeny jedním blokem porézního pevného materiálu s jedinečnými vlastnostmi z hlediska permeability a účinnosti<sup>34,35</sup>. Na monolitických fázích lze pozorovat dva typy pórů: a) makropóry – umožňují rychlý tok mobilní fáze skrz monolit při relativně nižších tlacích, b) mesopóry –

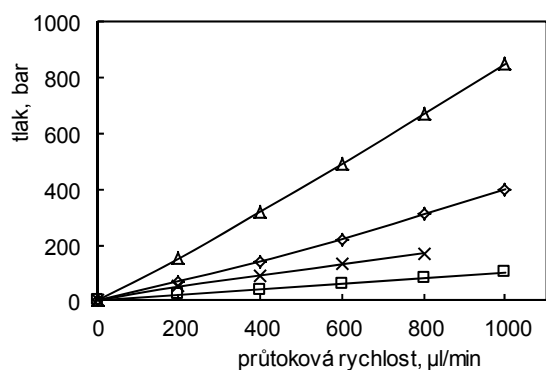
zajišťují velký povrch monolitu a tím i vysokou separační kapacitu<sup>36</sup>. Během 90. let 20. století byly vyvinuty jak organické monolity např. na bázi polymethakrylátu (vhodné k separaci biomolekul včetně oligonukleotidů, peptidů a intaktních proteinů<sup>37,38</sup>), tak anorganické monolity založené např. na oxidu křemičitém. Ty nacházejí uplatnění při separaci malých molekul. Dnes je rozšířená druhá generace monolitů uvedených na trh v roce 2011, které mají menší makropóry ( $\sim 1,2 \mu\text{m}$ ) a větší mesopóry ( $\sim 15 \text{ nm}$ )<sup>39</sup>. Ve srovnání s kolonami plněnými klasickými plně porézními částicemi o průměru 5  $\mu\text{m}$  umožňují monolitické kolony dosažení vyšší účinnosti při nižších pracovních tlacích<sup>40,41</sup>. Komerčně dostupné monolitické kolony z oxidu křemičitého se připravují v PEEK kolonách a mohou být vystaveny maximálnímu tlaku 200 bar (cit.<sup>42</sup>). Na obr. 2 a 3 jsou srovnány různé typy výše popsaných stacionárních fází z hlediska účinnosti a pracovních tlaků při daných průtocích<sup>43</sup>.

Stacionární fáze jsou využívány nejen při výrobě klasických kolon, ale také se používají jako náplň kanálků separačních mikročipů<sup>44</sup>, které mohou být základem konstrukce mobilních analytických systémů. Další zajímavou oblastí, ve které se s úspěchem využívá nových stacionárních fází, jsou tzv. sub-sekundové separace. Pracuje se s krátkými kolonami (50  $\times$  4,6 mm i. d.) plněnými různými stacionárními fázemi (obvykle povrchově porézními částicemi). Separovány byly směsi chirálních a achirálních látek (dvou až čtyř) v čase kratším než jedna sekunda. Tyto mimořádně rychlé separace by se mohly uplatnit při rychlém screeningu nebo ve dvourozměrné kapalinové chromatografii<sup>45</sup>.

S vývojem nových a stabilnějších stacionárních fází se začal na poli chromatografické separace více studovat vliv vysoké teploty, což směřovalo k nové technice – ultra rychlé kapalinové chromatografii za zvýšené teploty (UFHTLC – Ultra Fast High Temperature Liquid Chromatography). S rostoucí teplotou klesá viskozita mobilní fáze<sup>46</sup>, snižuje se pracovní tlak v systému a lze pracovat za vyšších průtoků, což vede k rychlejšímu vymytí látek z kolony<sup>47</sup>. Při extrémně vysokých teplotách (100–250  $^{\circ}\text{C}$ )



Obr. 2. Zobrazení van Deemterovy křivky pro různé typy stacionárních fází; □ – monolit;  $\Delta$  – 3  $\mu\text{m}$ ;  $\times$  –  $< 2 \mu\text{m}$ ;  $\diamond$  – 2,6  $\mu\text{m}$  povrchově porézní částice (převzato z cit.<sup>43</sup> a přepracováno)



Obr. 3. Závislost pracovního tlaku na průtokové rychlosti pro různé stacionární fáze při rozměru kolon  $100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$ , použití mobilní fáze voda:acetonitril (1:1 v/v) a teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\square$  – 1. generace monolitických kolon;  $\times$  –  $3 \mu\text{m}$ ;  $\diamond$  –  $2,6 \mu\text{m}$  povrchově porézní částice;  $\triangle$  –  $< 2 \mu\text{m}$  (převzato z cit.<sup>43</sup> a přepracováno)

postačí pro separaci čistě vodná mobilní fáze, která oproti organickým mobilním fázím přináší řadu výhod z hlediska ceny, toxicity a vlivu na životní prostředí. Na druhou stranu tato technika sebou nese i řadu úskalí, např. degradaci termolabilních analytů, nároky na teplotní stabilitu stacionární fáze a konstrukční náročnost instrumentace<sup>48</sup>.

V oblasti rychlých separací se lze stále častěji setkat s aplikací superkritické fluidní chromatografie (SFC), která se v posledních letech stává užitečnou alternativou k UHPLC. SFC je založena na jedinečných fyzikálních vlastnostech mobilní fáze, kdy je využíván především oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ) v nadkritickém stavu. Nevýhodou  $\text{CO}_2$  je jeho nízká polarita, s čímž je spojena nedostatečná eluce polárních látek z kolony. Tento problém je často vyřešen přidáním modifikátoru do mobilní fáze. Obvykle se jedná o polární organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril apod.). Vlastnosti mobilní fáze lze dále ovlivnit přidáním aditiva (octová nebo mravenčí kyselina, jejich amonné soli apod.). Při separaci se pracuje při teplotě a tlaku vyšším, než jsou kritické hodnoty. Za těchto podmínek mobilní fáze vykazuje vyšší hustotu než plyn, což přispívá k rychlejší eluci látek bez vzniku nadměrného pracovního tlaku v systému<sup>49</sup>. Difuzivitou a viskozitou se nadkritická mobilní fáze k plynu přibližuje. Hodnoty difuzních koeficientů látek se v nadkritickém stavu pohybují o 1–2 řády výše než v kapalinách<sup>50</sup>. Je však třeba upozornit, že zdaleka ne vždy jsou nadkritické podmínky dodrženy. Například při gradientu modifikátoru se s jeho zvyšujícím obsahem systém dostává z nadkritické do podkritické oblasti, ale označení SFC se zachovává. Ukazuje se, že tato změna v průběhu analýzy nemusí být na závadu a nenarušuje separaci. Stejně jako v případě vývoje kapalinové chromatografie, kdy byl v roce 2004 představen systém UHPLC, tak i vývoj SFC vedl ke vzniku systému UHPSFC (ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie), který umožňuje analýzy s vyšší účinností a to i za použití plně porézních stacionárních fází s průměrem částic pod  $2 \mu\text{m}$ .

První komerčně dostupný ultra-vysokoúčinný superkritický fluidní chromatograf Acquity UPC<sup>2</sup> byl v roce 2012 představen firmou Waters<sup>1,51</sup>.

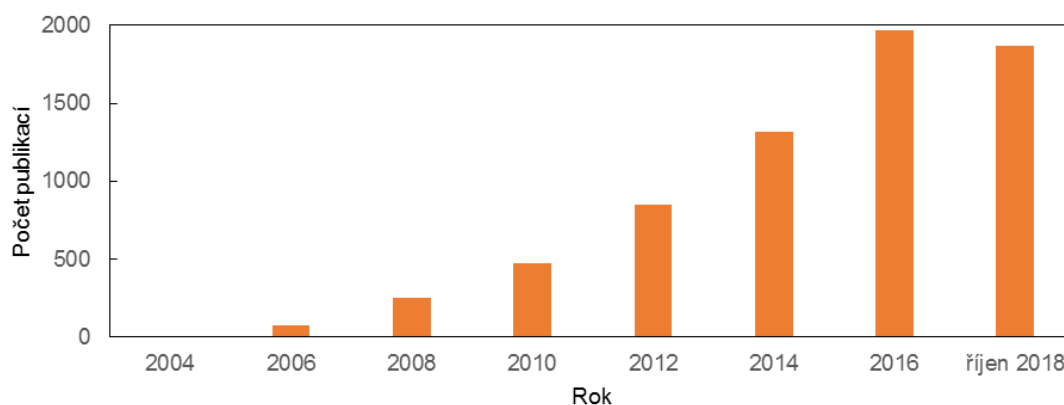
Rychlé separace jsou také významné pro dvourozměrnou chromatografii, např. 2D-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (2D-HPLC). Využívá se dvou separačních systémů s rozdílnou selektivitou. Při on-line spojení musí být jednotlivé podíly eluované z první kolony rychle separovány na koloně druhé. Během jedné analýzy v první dimenzi je mnohokrát opakována analýza ve druhé dimenzi. Dvourozměrná chromatografie nabízí významné zvýšení píkové kapacity, umožňuje separaci velkého počtu látek ve složitých vzorcích v jednom nástřiku, kdy je separace na jedné koloně nedostačující (např. analýza biologických vzorků (peptidů, proteinů, biopolymerů), rostlinných materiálů, potravin a nápojů<sup>52–54</sup>). Ve 2D-HPLC jsou využívány kolony s různým typem sorbentu (plně porézní částice s průměrem pod  $2 \mu\text{m}$ , povrchově porézní částice, monolitické kolony založené na bázi anorganické i organické)<sup>52</sup>.

Rychlé separace se uplatňují taktéž v plynové chromatografii. Takzvaná rychlá plynová chromatografie (Fast GC) dovoluje 3–10krát snížit časovou náročnost analýzy oproti konvenční plynové chromatografii. Od ní se odlišuje v použití kratších kolon s užším průměrem a tenčím filmem stacionární fáze, rychlejšími teplotními programy, volbou nosného plynu (vodík) a jeho průtokovou rychlostí<sup>55,56</sup>.

### 3. Detekce úzkých chromatografických zón

K rychlému získání kvalitních analytických výsledků je zapotřebí nejen dobře optimalizované separace, ale i správně zvolená detekční technika kompatibilní s chromatografickým systémem. S rozšířením ultra-vysokoúčinných chromatografických separací, kdy analyty jsou eluovány v úzkých zónách, se projevují některá omezení při jejich spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Pro rychlé separace a zachování rozlišení/účinnosti je zapotřebí i adekvátně rychlý pracovní cyklus detektoru, v případě hmotnostní spektrometrie hmotnostního analyzátoru. Nejnovější generace hmotnostních spektrometrů tato spojení již umožňují. Některé analyzátorů jsou vhodnější pro UHPLC a UHPSFC (např. trojitý kvadrupól nebo průletový analyzátor) než jiné (např. iontová past nebo hmotnostní analyzátor s Fourierovou transformací). Nelze tvrdit, že např. analyzátor s Fourierovou transformací je pro rychlé (minutové) separace nepoužitelný, ale při rychlejší měření hmotnostního spektra klesá jeho rozlišovací schopnost.

Z důvodu používání kolon s malým objemem je třeba počítat s významnějším vlivem mimokolonových příspěvků k rozšiřování píků, tedy i příspěvku detektoru. Nejnovější vývoj v oblasti hmotnostně spektrometrické instrumentace spočívá v úpravách designu iontové optiky a analyzátorů. To vede k lepší transmisi iontů a dosažení vyšší citlivosti a rychlosti měření, což je výhodné pro spojení ultra-vysokoúčinné chromatografie s hmotnostní spektrometrií.



Obr. 4. Počty publikací využívajících techniku UHPLC-MS v letech 2004 až říjen 2018. (vyhledávání na Web of Science dle slov „(UPLC or UHPLC) and MS“ 17. 10. 2018)

metrii na poli rychlých separací<sup>32,57</sup>. Toto tvrzení je doloženo prudkým nárůstem počtu publikací zabývajících se technikou UHPLC-MS (obr. 4). Mezi nejčastěji využívané hmotnostní analyzátoři ve spojení UHPLC-MS patří trojitý kvadrupól (QqQ) a kombinace kvadrupólu s průletovým analyzátořem (Q-TOF), což ale může být ovlivněno i rozšířením jednotlivých typů analyzátořů v laboratořích<sup>32</sup>.

#### 4. Příklady aplikací rychlých chromatografických separací

S rychlými chromatografickými separacemi se setkáváme v celé řadě oblastí, kde se využívají k identifikaci a kvantifikaci různých typů analytů. Tato kapitola pojednává o praktické aplikaci dvou technik ultra-vysokoúčinné chromatografické separace (UHPLC a UHPSFC) především v oblasti bioanalýzy, studia metabolismu léčiv, multireziduálního screeningu vzorků potravin a životního prostředí.

UHPLC-MS se uplatňuje při cílené analýze léčiv v biologických matricích, jako je plazma, moč, sliny, tkáň, vlasy aj. Součástí tohoto typu vzorků je celá řada endogenních sloučenin, které mohou interferovat se sledovaným analytem a překrývat jeho signál. Proto je důležité minimalizovat matriční efekty a zlepšit analytické postupy od přípravy vzorku, přes chromatografickou separaci a detekci až po způsoby kvantifikace (např. použití standardů značených stabilními isotopy). V případě analýzy matričně složitých vzorků se proto jako výhodné jeví spojení UHPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií<sup>32,58</sup>. Tato kombinace technik byla využita při vývoji metody pro stanovení léčiva nifedipinu (blokátor vápníku používaný při léčbě kardiovaskulárních poruch) v lidské plazmě u 30 dobrovolníků. Metoda založená na separaci na stacionární fázi (UPLC BEH (Bridged Ethylene Hybrid) C18) s velikostí částic 1,7  $\mu\text{m}$  v čase do 1,2 min byla validována

v širokém koncentračním rozmezí (0,05–150  $\text{ng ml}^{-1}$ ) a její reprodukovatelnost byla ověřena opakovanou analýzou 116 vzorků<sup>59</sup>. Kombinace separace na monolitické koloně a fluorescenční detekce byla aplikována při stanovení telmisartanu v krevní plazmě. Po jednoduchém zpracování vzorku (vysrážení proteinů acetonitrem) bylo dosaženo separace a detekce telmisartanu do 2 min (cit.<sup>60</sup>).

V případě studia metabolismu léčiv rozlišujeme dva typy přístupů. Prvním je cílená analýza, kdy jsou struktury metabolitů známy či předpokládány. Využívá se především při studiu stability, aktivity či při stanovení metabolitů. Po chromatografické separaci se jako detekční technika nejčastěji volí trojitý kvadrupól pracující v režimu SRM (selected reaction monitoring, sledování vybrané reakce). Druhý přístup se uplatňuje při identifikaci metabolitů a zkoumání metabolických cest léčiv. Jedná se o necílenou analýzu a využívá se hmotnostně spektrometrických systémů s vysokou rozlišovací schopností<sup>32,58</sup>. UHPLC-MS/MS nachází uplatnění ve farmakologii a farmakokinetice při tzv. ADME screeningu léčiv. Jedná se o sledování absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece aktivní léčivé látky. UHPLC separace na koloně BEH C18 s částicemi o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$  například umožnila zkrátit celkovou dobu analýzy o 75 % ve srovnání s klasickou HPLC separací<sup>61</sup>.

Další oblastí, kde se s výhodou uplatňuje UHPLC, je multireziduální screening. Důležitá je vhodná volba extrakční techniky (úpravy vzorku) a dosahované chromatografické rozlišení, aby byl minimalizován vliv matrice a byl dostatečně rozlišen často velký počet sledovaných látek. Do této kategorie spadá analýza početných a komplexních vzorků potravin, životního prostředí aj. Při analýzách je rovněž podstatné snížit riziko falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Náročnost vývoje metody pro multireziduální screening vyplývá z nutnosti sledovat značný počet sloučenin různých struktur v komplexní matici na nízkých koncentračních úrovních<sup>32,58</sup>. Jako příklad využití UHPLC-MS v oblasti multireziduálního screeningu

lze uvést analýzu 23 perfluorovaných alkylových sloučenin v potravinách živočišného původu (mléko a ryby). Vyvinutá metoda zahrnuje prekoncentraci analytů disperzní extrakcí tuhou fází pomocí sorbentu C18 a ENVI-Carb, což umožnilo dosáhnout limitů kvantifikace perfluorovaných sloučenin v rozsahu 0,001–0,006  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pro mléko a 0,002–0,013  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pro ryby<sup>62</sup>. V případě analýzy mléka stojí také za zmínku screening 21 veterinárního léčiva metodou kombinující rychlé zpracování vzorku postupem QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) s UHPLC separací a QqQ detekcí s celkovým časem separace 3 min (cit.<sup>63</sup>). Technika UHPLC s MS/MS detekcí byla rovněž využita při stanovení polyfenolických látek (*cis*- a *trans*-resveratrolu a piceidu) v pokrutinách ze semen révy vinné. Navržená rychlá separace (s časem do 3,5 min) umožnila analyzovat pokrutiny z různých druhů vinné révy i různých lokalit. Byla prokázána závislost obsahu sledovaných analytů na odrůdě, lokalitě i ročníku pěstování vinné révy<sup>64</sup>.

Podobně jako v jiných oblastech i při analýze reziduí v potravinách nacházejí uplatnění také monolitické kolony. Příkladem je sledování azobarviv (Para-Red a Sudan) v koření. Pomocí izokratické separace byla jednotlivá barviva detegována v čase do 5 min v rozmezí mezi detekce 0,5–2  $\mu\text{g g}^{-1}$  (cit.<sup>65</sup>). Za zmínku stojí také studie zabývající se rychlou analýzou vitaminů rozpustných v tucích, která porovnávala separační účinnost první a druhé generace monolitů RP-18e s kolonou s povrchově porézními částicemi (pentafluorfenyl propyl). Prostřednictvím všech tří kolon bylo dosaženo dobrých separací v časech pod 5 min a s rozlišením větším než 5. Výhoda monolitických kolon spočívala v nižším zpětném tlaku, v případě kolony s povrchově porézními částicemi bylo dosaženo lepší symetrie piků<sup>66</sup>.

V oblasti metabolomiky se často setkáváme s analyty s velmi podobnými chemickými strukturami (např. isomery lišící se polohou hydroxy skupiny). Tyto sledované analyty jsou navíc součástí komplexních biologických matic, jako jsou tkáň a tělní tekutiny. Proto je nezbytné použít separační metodu s vysokým rozlišením a citlivostí, aby bylo možné detegovat a kvantifikovat i jejich velmi nízké obsahy<sup>32,58</sup>. Příkladem využití UHPLC-MS je stanovení biomarkerů značících rozvoj Alzheimerovy choroby. Onemocnění je možné rozpoznat na základě množství amyloidních  $\beta$ -peptidů v mozkomíšním moku. Jejich izolace ze vzorku byla provedena extrakcí pevnou fází (SPE, Oasis MCX), následovala UHPLC separace na koloně BEH300 C18 (2,1  $\times$  150 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) v čase pod 7 min a detekce trojitým kvadrupólem (QqQ) na základě sledování MRM přechodů (multiple reaction monitoring, sledování více reakcí). Bylo dosaženo hodnot LOQ lepších než 0,1  $\text{ng ml}^{-1}$  mozkomíšního moku<sup>67</sup>.

Kromě širokého uplatnění UHPLC v oblasti rychlých separací se stále častěji dostává do popředí technika UHPSFC. Ta je vhodná pro širokou škálu analytů a v řadě publikací jsou právě tyto dvě separační techniky srovnávány. Technikou UHPSFC byly analyzovány např. směsi běžně

užívaných léčiv<sup>51</sup>, látky zneužívané při dopingování (anabolika, hormony, kanabinoidy, glukokortikoidy aj.)<sup>4-6,68</sup>, nové syntetické drogy<sup>69</sup>, isomery farmaceuticky zajímavých látek<sup>2</sup> a textilní barviva<sup>70</sup>. Zajímavé jsou forenzní aplikace superkritické fluidní chromatografie<sup>71</sup>. S narůstající rafinovaností dopingových podvodů v profesionálním i amatérském sportu je nezbytné pracovat na vývoji nástrojů a metod odhalujících zneužívání zakázaných látek sportovci. V rámci antidopingových kontrol bývá zkoumána přítomnost nelegálních látek nebo jejich metabolitů v těle sportovce. Za jednu ze slibných metod odhalujících přes sto dopingových látek v moči lze považovat UHPSFC-MS/MS metodu vyvinutou L. Novákovou a spol.<sup>4,5</sup>. Jejich výsledky byly porovnány s výsledky získanými UHPLC-MS/MS systémem. Obě metody umožňují separaci během 7 min včetně ekvilibrace. UHPLC-MS/MS poskytovala nižší limit mez pro 21 % analytů, UHPSFC-MS/MS pro 32 %. Pro zbylé látky se obě metody v mezích detekce významně nelišily<sup>4,5</sup>.

Aplikační možnosti UHPSFC-MS/MS metody byly prokázány rovněž při kontrole alergenních disperzních barviv přítomných v textilních výrobcích. Po ultrazvukem asistované extrakci vzorku textilu následovala chromatografická separace 17 barviv na koloně BEH C18 v čase kratším než 5 min (cit.<sup>70</sup>).

UHPSFC nachází své uplatnění při kontrole kvality farmaceutických produktů. Jako příklad lze uvést analýzu tablet agomelatinu, který patří do skupiny nových antidepresiv. Aktivní farmaceutická složka agomelatinu může být při výrobě doprovázena až šesti strukturálně velice podobnými nečistotami. Nejlepší chromatografická separace s úplným rozlišením byla dosažena na stacionární fázi BEH 2-EP při použití  $\text{CO}_2$  s gradientem organického modifikátoru (methanolu) od 5 do 30 % s přidávkem 20  $\text{mmol l}^{-1}$  mravenčanu amonného a 5 % vody v čase do 4,1 min včetně ekvilibrace. Látky byly detegovány UV/Vis detektorem při 225 nm (cit.<sup>3</sup>).

S narůstajícím počtem nových psychoaktivních látek (NPS) vyskytujících se na ilegálním trhu je nezbytné disponovat selektivními a časově nenáročnými metodami umožňujícími identifikovat jak čisté látky (zabavené např. při celní kontrole), tak látky přítomné v biologických vzorcích (např. při předávkování). Techniky UHPLC a UHPSFC byly úspěšně použity pro separaci polárních syntetických kationů a silně bazických fenylethylaminů v moči. Skupina 15 látek zahrnující rovněž 4 isomerní páry byla úspěšně separována pomocí UHPSFC během 2,5 min. Obě dvě metody poskytovaly limity detekce v setinách až jednotkách  $\text{ng ml}^{-1}$  (cit.<sup>7</sup>).

Kromě výše zmíněných aplikací existuje celá řada dalších studií zabývajících se využitím obou ultravysokoúčinných chromatografických technik. Z těchto studií vyplývá, že rychlé separace budou stále častěji vytěšňovat klasické časově náročnější techniky/metody, což může v konečném důsledku vést ke snížení provozních nákladů, popř. k omezení vlivu na životní prostředí díky menší spotřebě rozpouštědel.

## 5. Závěr

Nárůst v počtu prováděných analýz a požadavky na získání výsledků ve velice krátkých časech, a to i v případě analýz matričně složitých vzorků, vede ke zvýšenému zájmu o techniky umožňující rychlé separace. V kapalinové chromatografii k nim patří separace na plně porézních částicích s průměrem pod 2 μm nebo povrchově porézních částicích (cca 2 μm), případně na monolitických stacionárních fázích. Dosahováno je separací v jednotkách minut někdy dokonce sekund. Každá z uvedených možností má své výhody a nevýhody. K těm patří např. vysoký pracovní tlak při použití plně porézních částic nebo menší mechanická stabilita monolitů. Rychlé separace jsou podmíněny dostatečnou účinností kolon, kvalitní instrumentací s minimálními mimokolonovými příspěvky a rychlým pracovním cyklem detektoru. Novější technikou, která stále častěji nachází své místo na poli rychlých separací je ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie, která bývá srovnávána z hlediska dosahovaných výsledků s ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Aplikovatelnost a výhody rychlých chromatografických separací dokládá řada publikací v nejrůznějších oblastech (dopingová kontrola, analýza drog, metabolitů aj.). Rychlé separace představují důležitý směr vývoje chromatografických metod, ale jejich skutečný přínos je třeba vždy posuzovat v kontextu celého procesu analýzy. Z hlediska času samotná analytická separace nemusí být kritickým krokem, tím může být zpracování a úprava vzorku nebo vyhodnocení a interpretace dat.

*Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LO1509).*

### Seznam zkratk

BEH	Bridged Ethylene Hybrid
CE	capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza
GC	gas chromatography, plynová chromatografie
HILIC	hydrophilic interaction chromatography, hydrofilní interakční chromatografie
i. d.	internal diameter, vnitřní průměr
LOQ	limit of quantitation, mez stanovitelnosti
MRM	multi-reaction monitoring, sledování více reakcí
MS/MS	tandem mass spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie
NPS	new psychoactive substances, nové psychoaktivní látky
PEEK	polyether ether ketone, polyether ether keton
QqQ	triple quadrupole, trojitý kvadrupól
Q-TOF	quadrupole-time of flight, kvadrupól s průletovým analyzátozem
QUEChERS	quick easy cheap effective rugged safe, rychlý jednoduchý levný efektivní robustní bezpečný

SFC	supercritical fluid chromatography, superkritická fluidní chromatografie
SPE	solid phase extraction, extrakce tuhou fází
SPP	superficially porous particles, povrchově porézní částice
SRM	single reaction monitoring, sledování jedné/vybrané reakce
UFHTLC	ultra fast high temperature liquid chromatography, ultra rychlá kapalinová chromatografie za zvýšené teploty
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	ultra-high performance supercritical fluid chromatography, ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie
2D-HPLC	dvourozměrná vysokoúčinná kapalinová chromatografie

### LITERATURA

- Perrenoud A. G.-G., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* 1266, 158 (2012).
- Gourmel Ch., Perrenoud A. G.-G., Waller L., Reginato E., Verne J., Dulery B., Veuthey J.-L., Rudaz S., Schappler J., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* 1282, 172 (2013).
- Plachká K., Chrenková L., Douša M., Nováková L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 125, 376 (2016).
- Nováková L., Perrenoud A. G.-G., Nicoli R., Saugy M., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *Anal. Chim. Acta* 853, 637 (2015).
- Nováková L., Rentsch M., Perrenoud A. G.-G., Nicoli R., Saugy M., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *Anal. Chim. Acta* 853, 647 (2015).
- Desfontaine V., Nováková L., Ponzetto F., Nicoli R., Saugy M., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* 1451, 145 (2016).
- Borovcová L., Pauk V., Lemr K.: *J. Sep. Sci.* 41, 2288 (2018).
- Costa A. C. O., Costa J. L., Tonin F. G., Tavares M. F. M., Micke G. A.: *J. Chromatogr. A* 1171, 140 (2007).
- Rizelio V. M., Tenfen L., Silveira R., Gonzaga L. V., Costa A. C. O., Fett R.: *Talanta* 93, 62 (2012).
- Jiang Y., Ma Y.: *Anal. Chem.* 81, 6474 (2009).
- Banks J. F. Jr., Dresch T.: *Anal. Chem.* 68, 1480 (1996).
- Anonymous: *TrAC Trends Anal. Chem.* 61, iv (2014).
- Nguyen D. T., Guillaume D., Rudaz S., Veuthey J. L.: *J. Sep. Sci.* 29, 1836 (2006).
- Villiers A., Lestremou F., Szucs R., Gélébart S., David F., Sandra P.: *J. Chromatogr. A* 1127, 60 (2006).
- Farkas T., Zhong G., Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* 849, 35 (1999).
- Wu N., Clausen A. M.: *J. Sep. Sci.* 30, 1167 (2007).
- Guillaume D., Veuthey J. L. (ed.): *UHPLC in Life Sciences*, R. Soc. Chem. (2012), <http://>

- quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/uhplc-in-life-sciences-2012.pdf, staženo 5. ledna 2018.
18. Vaijanath G. D., Pravin P. K., Pilla P. R., Ashok K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**, 236 (2008).
  19. Toporisic R., Mlakar A., Hvala J., Prislán I., Zupancic-Kralj L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**, 294 (2010).
  20. Prasad B. H., Hae W. L., Mi-Sun L., Eun-Hee K., Sung-Doo K., Jeonghyeon P., Miran L., Sung-Kyu H., Young-Ran Y.: *J. Chromatogr. B* **878**, 1718 (2010).
  21. Mayer H. K., Fiechter G., Fischer E.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 3251 (2010).
  22. Sachin S., Najar I. A., Sharma S. C., Verma M. K., Reddy M. V., Anand R., Khajuria R. K., Koul S., Johri R. K.: *J. Chromatogr. B* **878**, 823 (2010).
  23. Hong L., Zhenxia D., Qipeng Y.: *J. Chromatogr. B* **877**, 4159 (2009).
  24. Fekete S., Ganzler K., Fekete J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 56 (2009).
  25. Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* **1126**, 6 (2006).
  26. Fekete S., Oláh E., Fekete J.: *J. Chromatogr. A* **1228**, 57 (2012).
  27. Tanaka N.: *Anal. Chem.* **88**, 279 (2016).
  28. Deridder S., Desmet G.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 46 (2011).
  29. Gritti F., Cavazzini A., Marchetti N., Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* **1157**, 289 (2007).
  30. Fekete S., Fekete J., Ganzler K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 64 (2009).
  31. Ruta J., Zurlino D., Grivel C., Heinisch S., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* **1228**, 221 (2012).
  32. Rodriguez-Aller M., Gurny R., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* **1292**, 2 (2013).
  33. Guiochon G., Gritti F.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 1915 (2011).
  34. Švec F., Frechet J. M. J.: *Anal. Chem.* **64**, 820 (1992).
  35. Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N.: *Anal. Chem.* **68**, 3498 (1996).
  36. Roper D. K., Lightfoot E. N.: *J. Chromatogr. A* **702**, 3 (1995).
  37. Eeltink S., Wouters B., Desmet G., Ursem M., Blinco D., Kemp G. D., Treumann A.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 5504 (2011).
  38. Detobel F., Broeckhoven K., Wellens J., Wouters B., Swart R., Ursem M., Desmet G., Eeltink S.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 3085 (2010).
  39. Hormann K., Müllner T., Bruns S., Höltsel A., Tallarek U.: *J. Chromatogr. A* **1222**, 46 (2012).
  40. Onyx brochure, Phenomenex. <https://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/zhonyx.pdf>, staženo 5. ledna 2018.
  41. Wu N., Dempsey J., Yehl P. M., Dovletoglou A., Ellison D., Wyvratt J.: *Anal. Chim. Acta* **523**, 149 (2004).
  42. Fekete S., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* **1408**, 1 (2015).
  43. Hayes R., Ahmed A., Edge T., Zhang H.: *J. Chromatogr. A* **1357**, 36 (2014).
  44. Grinias J. P., Kennedy R. T.: *TrAC Trends Anal. Chem.* **81**, 110 (2016).
  45. Wahab M. F., Wimalasinghe R. M., Wang Y., Barhate C. L., Patel D. C., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* **88**, 8821 (2016).
  46. Chen H., Horvath C.: *Anal. Methods Instrum.* **1**, 213 (1993).
  47. Antia F. D., Horvath C.: *J. Chromatogr.* **435**, 1 (1988).
  48. Smith R. M.: *J. Chromatogr. A* **1184**, 441 (2008).
  49. Fekete S., Perrenoud A. G.-G., Guillaume D.: *Curr. Chromatogr. I*, 15 (2014).
  50. Gere D. R.: *Science* **222**, 253 (1983).
  51. Perrenoud A. G.-G., Boccard J., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *J. Chromatogr. A* **1262**, 205 (2012).
  52. Jandera P., Hájek T., Staňková M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 139 (2015).
  53. Jandera P.: *J. Chromatogr. A* **1255**, 112 (2012).
  54. Česla P., Křenová J.: *J. Sep. Sci.* **40**, 109 (2017).
  55. Fast GC Brochure. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t407096.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t407096.pdf), staženo 5. ledna 2018.
  56. Brunelli C., Bicchi C., Di Stilo A., Salomone A., Vincenti M.: *J. Sep. Sci.* **29**, 2765 (2006).
  57. Fekete S., Schappler J., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *TrAC Trends Anal. Chem.* **63**, 2 (2014).
  58. Guillaume D., Schappler J., Rudaz S., Veuthey J.-L.: *TrAC Trends Anal. Chem.* **29**, 15 (2010).
  59. Patel D. P., Sharma P., Sanyal M., Singhal P., Shrivastav P. S.: *Biomed. Chromatogr.* **26**, 1509 (2012).
  60. Zhang H., Jiang Y., Wen J., Zhou T., Fan G., Wu Y.: *J. Chromatogr. B* **877**, 3729 (2009).
  61. Plumb R. S., Potts W. B., Rainville P. D., Alden P. G., Shave D. H., Baynham G., Mazzeo J. R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2139 (2008).
  62. Lacina O., Hradková P., Pulkrabová J., Hajšlová J.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 4312 (2011).
  63. Martínez Vidal J. L., Frenich A. G., Aguilera-Luiz M. M., Romero-González R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2777 (2010).
  64. Pšeničnaja O., Kotíková Z., Hejtmánková A., Lachman J., Pivec V., Štřalková R., Dědina M.: *Chem. Listy* **111**, 381 (2017).
  65. Zacharis C. K., Kika F. S., Tzanavaras P. D., Rigas P., Kyranas E. R.: *Talanta* **84**, 480 (2011).
  66. Kurdi S. E., Muailaq D. A., Alhazmi H. A., Bratty M. A., Deeb S. E.: *Acta Pharm.* **67**, 203 (2017).
  67. Lame M. E., Chambers E. E., Blatnik M.: *Anal. Biochem.* **419**, 133 (2011).
  68. Nováková L., Desfontaine V., Ponzetto F., Nicoli R., Saugy M., Veuthey J.-L., Guillaume D.: *Anal. Chim. Acta* **915**, 102 (2016).
  69. Pauk V., Žihlová V., Borovcová L., Havlíček V., Schug K., Lemr K.: *J. Chromatogr. A* **1423**, 169 (2015).
  70. Zhou Y., Du Z., Zhang Y.: *Talanta* **127**, 108 (2014).
  71. Pauk V., Lemr K.: *J. Chromatogr. B* **1086**, 184 (2018).

**L. Borovcová, V. Havlíček, and K. Lemr** (*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Fast Chromatographic Separation**

Runtime is one of the essential parameters that are taken into account during development of analytical methods. Very sensitive and selective techniques based on chromatographic separation coupled with mass spectrometric detection are often utilized to meet heavy demands on the analysis of various samples. The separation time is critical during analysis of large numbers of samples or on the second column of two-dimensional chromatography.

There are various approaches allowing for effective and rapid separation. These include applications of stationary phases based on fully porous particles with sub- 2  $\mu\text{m}$  diameter, superficially porous particles or monolithic stationary phases. Compared to today's conventional fully porous particles (3  $\mu\text{m}$  diameter and greater), higher efficiency is achieved, even at faster mobile phase flows. However, certain limitations, e.g. high working pressure (especially for sorbents with particles below 2  $\mu\text{m}$ ) might come into play. Furthermore, high separation efficiency provides narrow chromatographic zones, which is certainly

desirable for distinguishing substances but may complicate their detection. Slow scan speed of a detector can be an issue. Ultra-high performance liquid chromatography, which is a well-established technique in analytical laboratories, is more and more often compared with previously uncommon ultra-high performance supercritical fluid chromatography. Both approaches achieve short separation times. This article presents examples of applications and mutual comparison of the mentioned techniques. Rapid chromatographic separations have become a common tool in research and control laboratories. It should be mentioned that the total duration of analysis, i.e., from sample preparation to separation and detection, followed by data interpretation, should be also considered.

**Keywords:** liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, mass spectrometry, stationary phase

*Acknowledgements*

*This work was supported by grant from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant number: LO1509).*