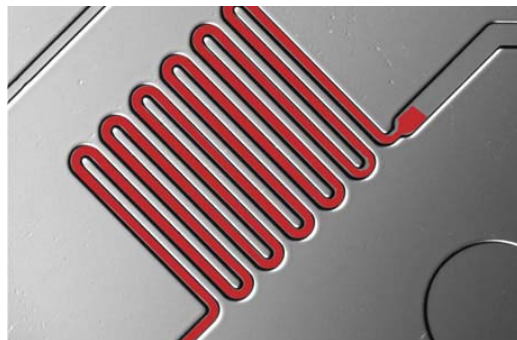


# Vysokoučinná kapalinová chromatografie

## Trendy a novinky v HPLC

Josef Cvačka, 28. 11. 2023

## Chromatografie na čípech



## CHROMATOGRAFIE NA ČIPECH

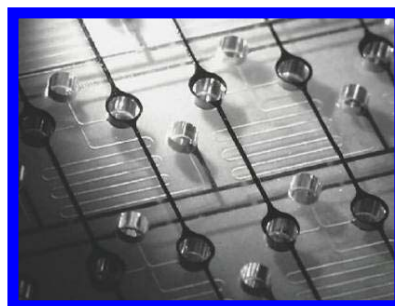
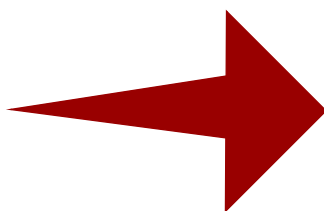
Miniaturizace separačních systémů

Mikrofluidní čipy

Mikrofabrikace

Chromatografické mikrofluidní čipy s MS detekcí

Praktické využití čipové technologie



## Miniaturizace separačních systémů

### Proč miniaturizace ?

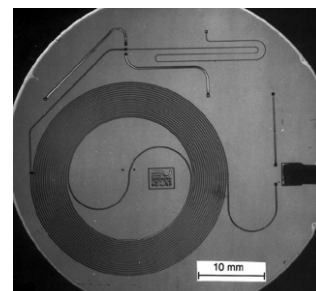
snížení objemu vzorku – velmi důležité např. u klinických vzorků (mozkomíšni mok, časté odběry u diabetiků apod.)

zkrácení doby analýzy – velmi rychlá diagnostika, větší množství analýz za časovou jednotku

další důvody: zmenšení instrumentace, snížení spotřeby činidel, rozpouštědel, snížení spotřeby elektrické energie, výroba přenosných přístrojů, finanční důvody

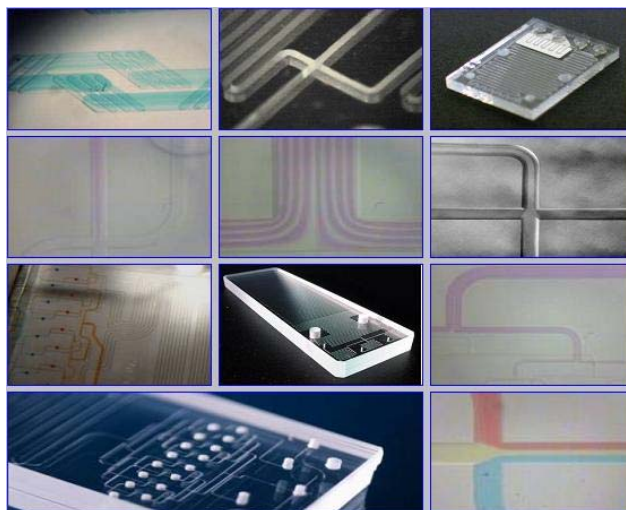
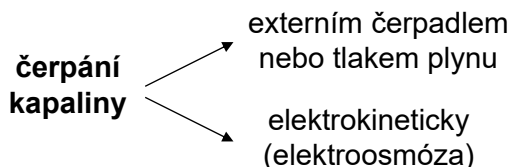
Laboratoř na čipu (lab on a chip)

zařízení, která integrují různé analytické procesy na jediném čipu o rozměrech několika mm<sup>2</sup> až cm<sup>2</sup>. Čipy obsahují mikrofluidní kanály, směšovače, ventily, pumpy, dávkovací zařízení a pod. Jedním z prvních zařízení byl plynový chromatograf (Terry, 1975).



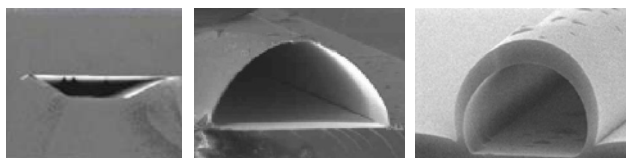
## Mikrofluidní čipy

**Mikrofluidika** – věda, která se zabývá chováním a možnostmi manipulace mikrolitrových objemů vzorku. Vznikla před cca 20 lety s vývojem inkoustových tiskáren.



rozměry kanálků – průměr – mikrometry, délka - centimetry

materiály – sklo, plasty, křemík, diamant apod.



různé tvary mikrofluidních kanálů, průměr ~ 5 um

## Mikrofabrikace

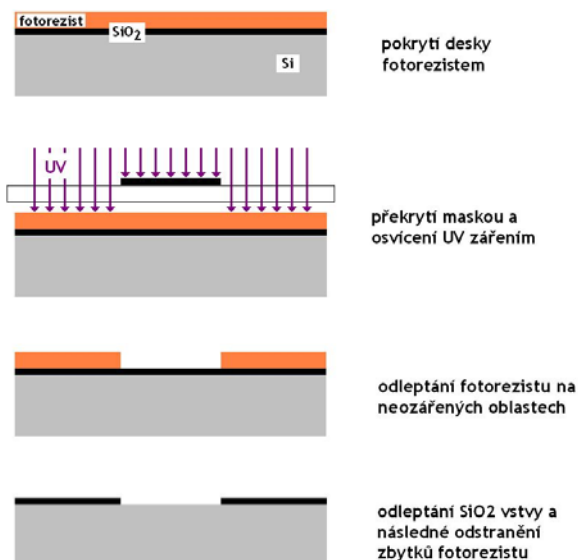
**Mikrofabrikace** – výroba struktur s rozměry v řádech mikrometrů. technologiemi převzatými z počítačového průmyslu

**Fotolitografie:** technika přenosu vzoru na povrch substrátu, nejčastěji křemík (možno i na sklo, kov atd)

Křemíková deska pokrytá vrstvou oxidu křemičitého se ovrství tzv. fotorezistem. Ten se působením UV světla vytvrdí. Následnými chemickými procesy se postupně odmyje nevytvrzený fotorezist, odleptá se vrstva  $\text{SiO}_2$  v přístupných oblastech (HF), a odstraní se zbytky fotorezistu ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )



### FOTOLITOGRAFIE



## Mikrofabrikace



Struktury na Si desce se mohou použít jako vzor pro otisk do plastu a výrobu mnoha replik. Lze použít lisování za tepla, případně přímou polymeraci na desce.



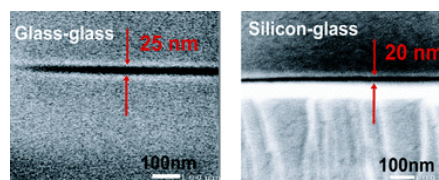
### Uzavření kanálků

- spojení Si desky s vyleptanými nebo přenesenými strukturami s planární deskou

planární deska – sklo, polymer apod.

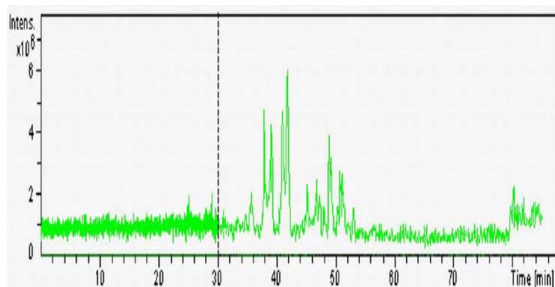
sklo-sklo nebo sklo-křemík lze spojit postupem zvaným "anodic bonding"

### "SLEPENÍ ČIPU"

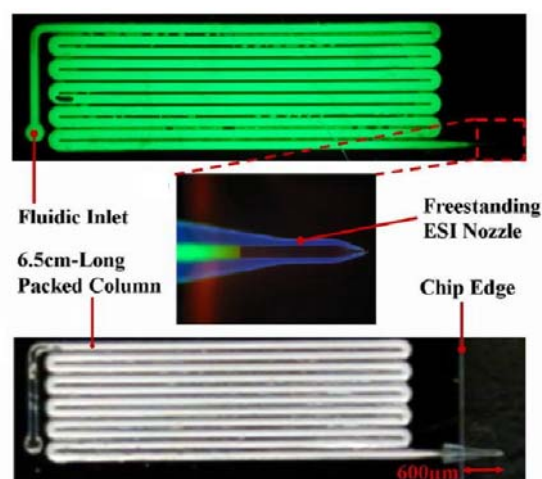


## Chromatografické mikrofluidní čipy s MS detekcí

Separční kanál může být plněn sorbentem, případně monolitem. Mobilní fáze je čerpána externí pumpou (tlakem). Je možno využít i elektrokinetické čerpání fáze -> elektrochromatografické čipy.

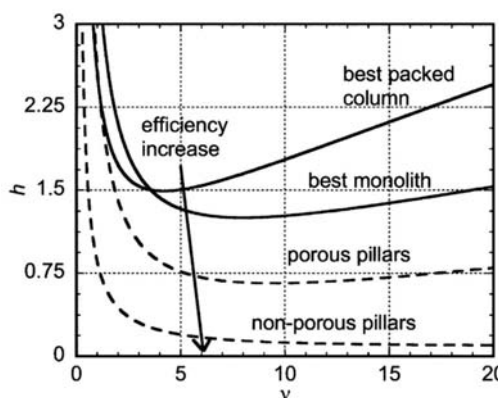


Chromatogram tryptického digestu cytochromu C separovaného na čipu s on-line MS detekcí.



LC-ESI/MS čip s integrovanou HPLC kolonou, fritou a nanoESI sprejovací tryskou. Kolona – 65 x 0.1 x 0.025 mm, plněná 5 μm C18.

## Chromatografické mikrofluidní čipy s MS detekcí



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

příspěvek vířivé difúze, souvisí s uniformitou kanálků ve stac. fázi

Simulace Van Deemterovy rovnice pro různé geometrie stacionární fáze v koloně. Nejnižší výškový ekvivalent se dosáhne pro pravidelné struktury dosažitelné mikrofabrikací, např. sloupky.

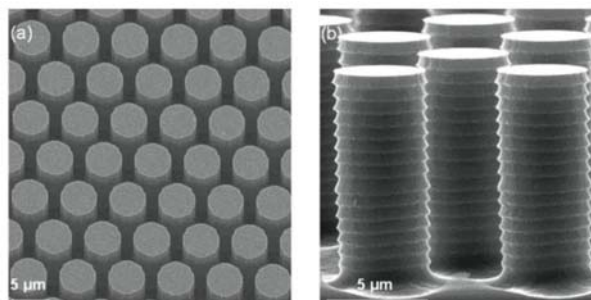


Fig. 2 (a) SEM image of the micromachined pillar array used by Eghbali *et al.* for on-chip reversed-phase LC; (b) SEM image of individual pillars with indentations caused by the Bosch<sup>®</sup> dry etching process. Image reproduced from ref. 18 with permission.

## Praktické využití čipové technologie

Čip = mikrofabrikovaná chromatografická kolona

Kanály plněné 3-µm částicemi C18; mikrofabrikované struktury (hráze) na konci kanálů mají minimální mrtvý objem (13 pL)

Výhody: jednoduchá obsluha, minimální mrtvé objemy

Využití: analýza peptidů



cHiPLC column



Dokovací stanice pro 3 čipy.

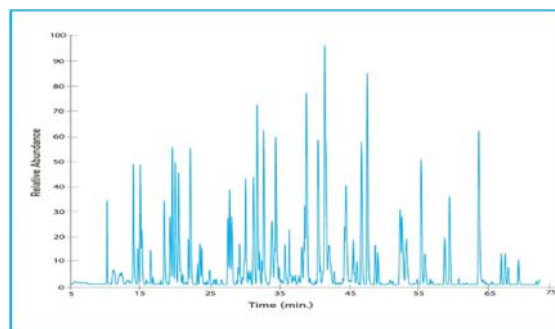


Figure 4. Separation of a BSA digest on a nano cHiPLC column of 15 cm x 75 µm, packed with ChromXP C18-CL 3 µm 300Å. Flowrate is 250 nL/min; gradient slope 0.5% Acetonitrile/min.

## Praktické využití čipové technologie



- 150 µm ID Channel
- Sub-2-µm UPLC® Chemistries
- 10,000 psi Pressure Capability
- 1-7 pH Range
- Plug and Play Design
- Built-in eCord™
- Built-in Emitter
- Embedded Column Heater



Čip = mikrofabrikovaná chromatografická kolona pro UHPLC, spojovací kapilára a nanoelektrosprejer (keramický materiál)

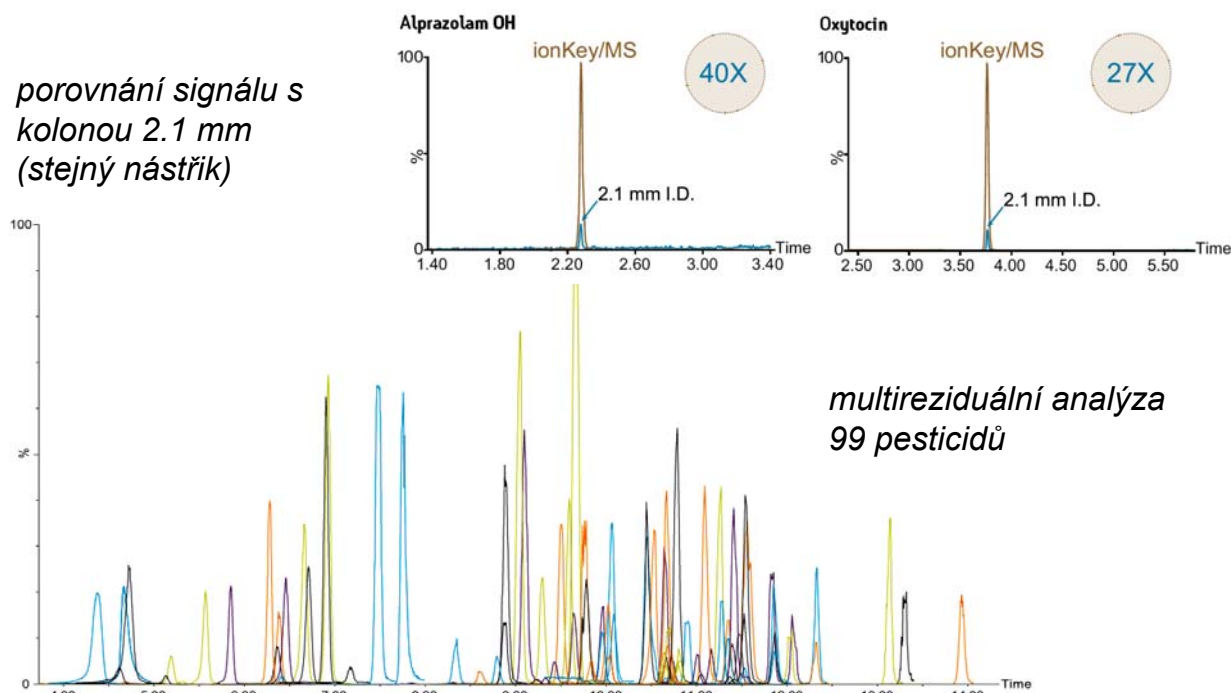
- vyšší citlivost (kanálek průměru 150 µm, sub-2 µm částice)
- jednoduché použití (netřeba spojovacích šroubení)
- analýza menších objemů vzorku
- snížení spotřeby rozpouštědel

Zdroj: Waters

## Praktické využití čipové technologie

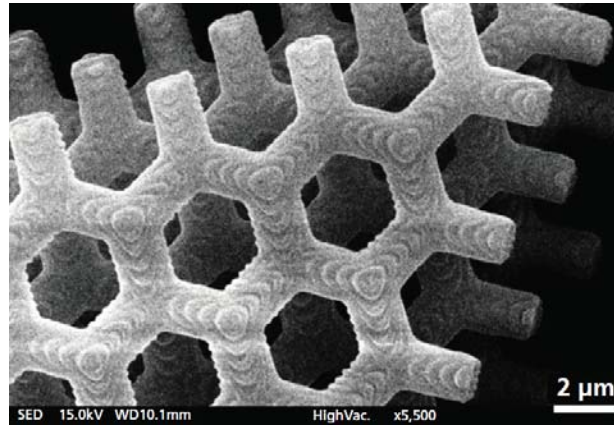
**UHPLC:** vysoká citlivost, vysoká píková kapacita

*porovnání signálu s kolonou 2.1 mm (stejný nástřik)*



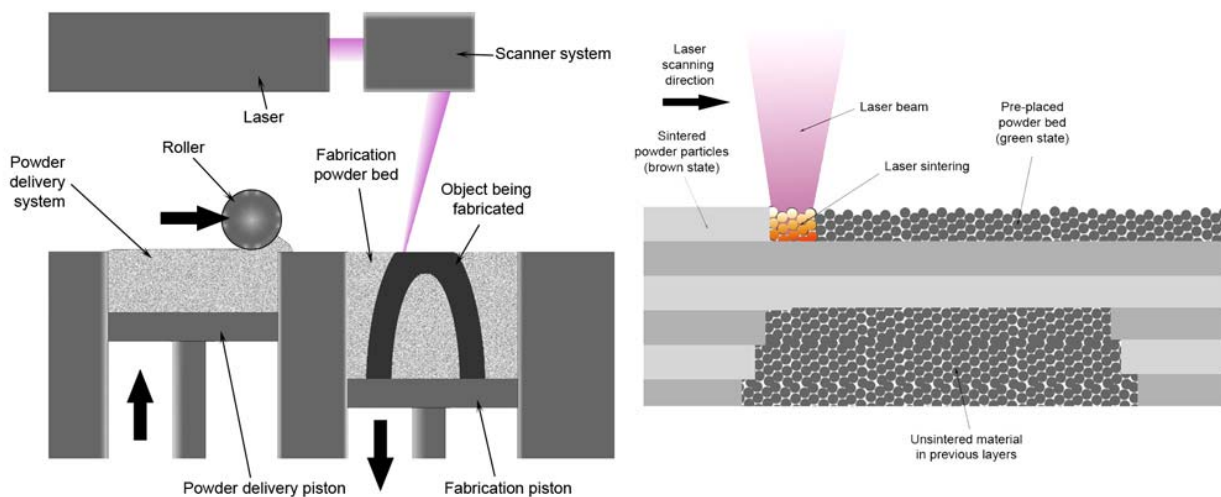
Zdroj: Waters

## 3D tisk v přípravě HPLC kolon



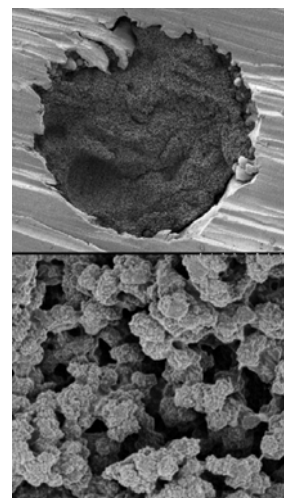
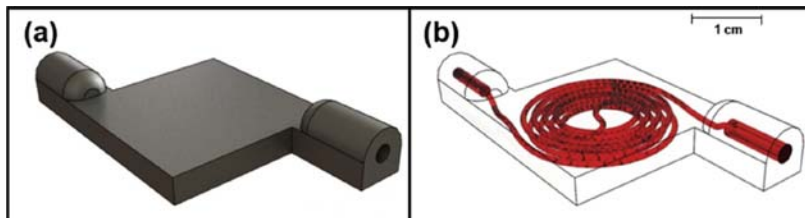
### 3D tisk kovů

- laserová technologie využívající kovy ve formě prášku. Vysoce výkonný laser selektivně spojuje částice prášku. Po dokončení díl prochází tepelným zpracováním.

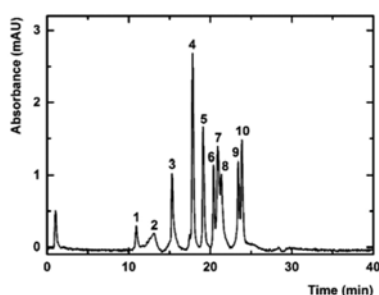


## 3D tisk kovové chromatografické kolony

- Kolona 600 mm x 1,0 mm ve formě spirálovitého kanálu v desce (čipu) z titanové slitiny (5 x 30 x 30 mm).
- Peltiérův článek pro chlazení/vyhřívání kolony



Monolitická stacionární fáze Poly(BuMA-co-EDMA)



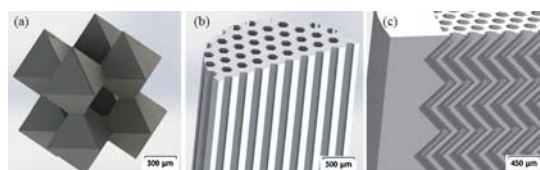
### Separace proteinů

**Fig. 7.** Separation of intact proteins using  $\Delta\phi = 0-0.40$  ACN with  $t_c = 30$  min at a flow rate of  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$  and a temperature of  $44^\circ\text{C}$ , UV detection was performed at  $280 \text{ nm}$ . Elution order is ribonuclease A (1), trypsin inhibitor (2), cytochrome C (3), lysozyme (4), trypsinogen (5),  $\alpha$ -lactalbumin (6), transferrin (7), myoglobin (8),  $\beta$ -lactoglobulin A (9),  $\beta$ -lactoglobulin B (10).

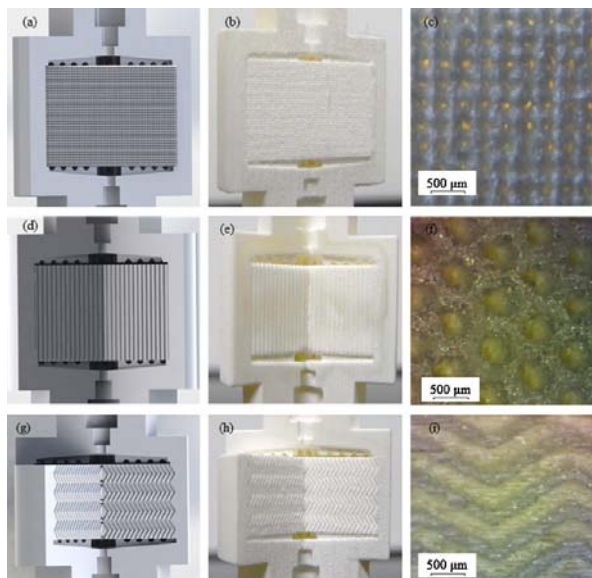
V. Gupta et al. / *Analytica Chimica Acta* 910 (2016) 84-94

## 3D tištění stacionární fáze

- Standardní plnění kolon suspenzí fáze není dokonalé (náhodné uspořádání částic náplně)
- 3D tisk nabízí zcela uniformní „naplnění“ kolony – eliminace vířivé difúze, vyšší účinnosti kolon
- zatím ve fázi vývoje
- Akrylonitrilbutadienstyren (ABS)
- Částice  $200 \mu\text{m}$ , kanály  $300 \mu\text{m}$
- Kolony s objemem fáze  $\sim 1 \text{ ml}$



**Fig. 1.** The three bed geometric designs: (a) simple cubic beads, (b) straight channels, (c) herringbone channels.

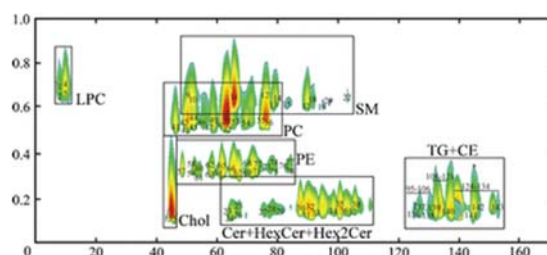


- menší struktury lze vyrobit technologií dvoufotonové fotopolymerace

C. Fee et al. / *J. Chromatogr. A* 1333 (2014) 18-24



## Dvourozměrné HPLC separace



Holcapek et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407, 5033

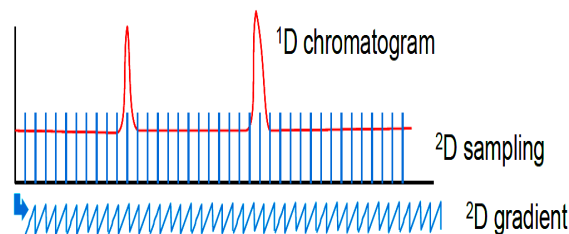
## Dvourozměrná HPLC

**Dvourozměrná HPLC:** Separační systém, ve kterém jsou frakce z první kolony dávkovány na druhou kolonu s použitím dávkovacích smyček a prepínacích ventilů. Hlavním cílem je zvýšení počtu separovaných látek v průběhu jedné analýzy ve složitých vzorcích.

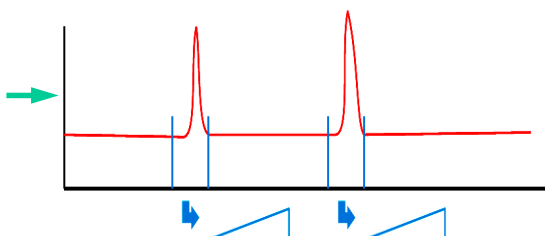
*Výhodou* je tedy vyšší rozlišení, selektivita, a kapacita píků ve srovnání s jednorozměrnou HPLC.

*on-line vs. off-line* uspořádání

**Komprehensivní (úplná) 2D-HPLC:** všechny frakce z první kolony jsou postupně vzorkovány na druhou kolonu.

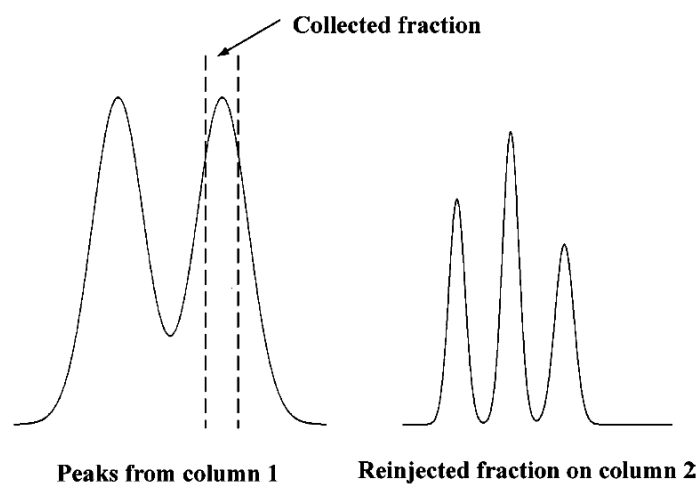


**“Heart-cutting” (částečná) 2D-HPLC:** pouze vybrané frakce z první kolony jsou vzorkovány na druhou kolonu



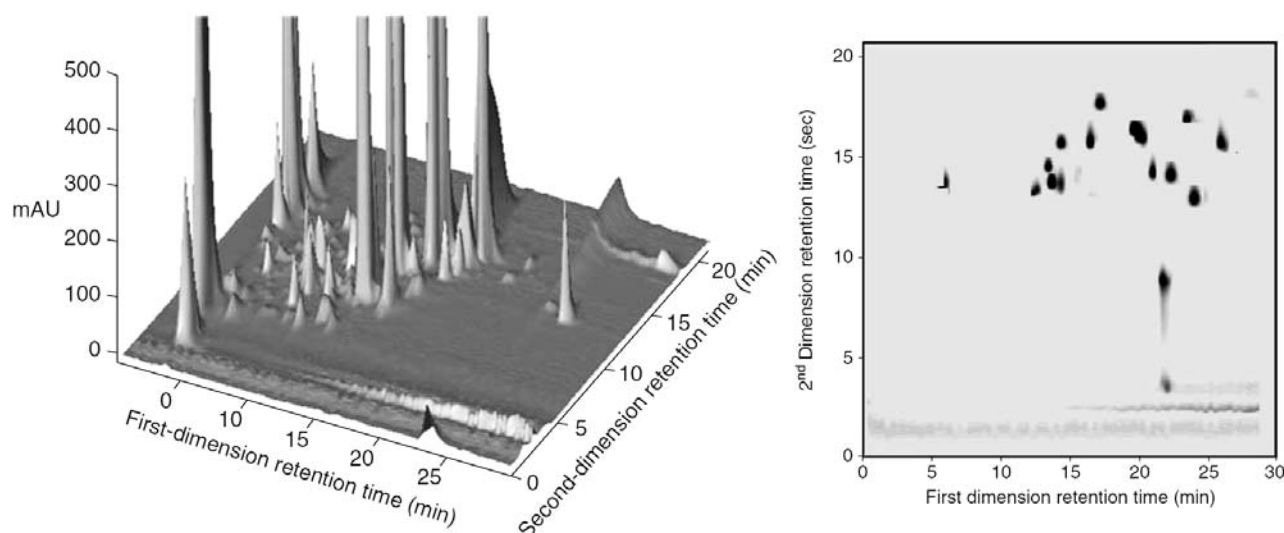
## Heart-cutting 2D-HPLC

- systém vhodný pro separaci píků ve specifické oblasti chromatogramu (zajištění selektivity, kterou první kolona neposkytuje)
- je nutné dopředu znát oblasti první dimenze, kde dochází ke koeluci
- většinou delší čas pro separaci ve druhé dimenzi

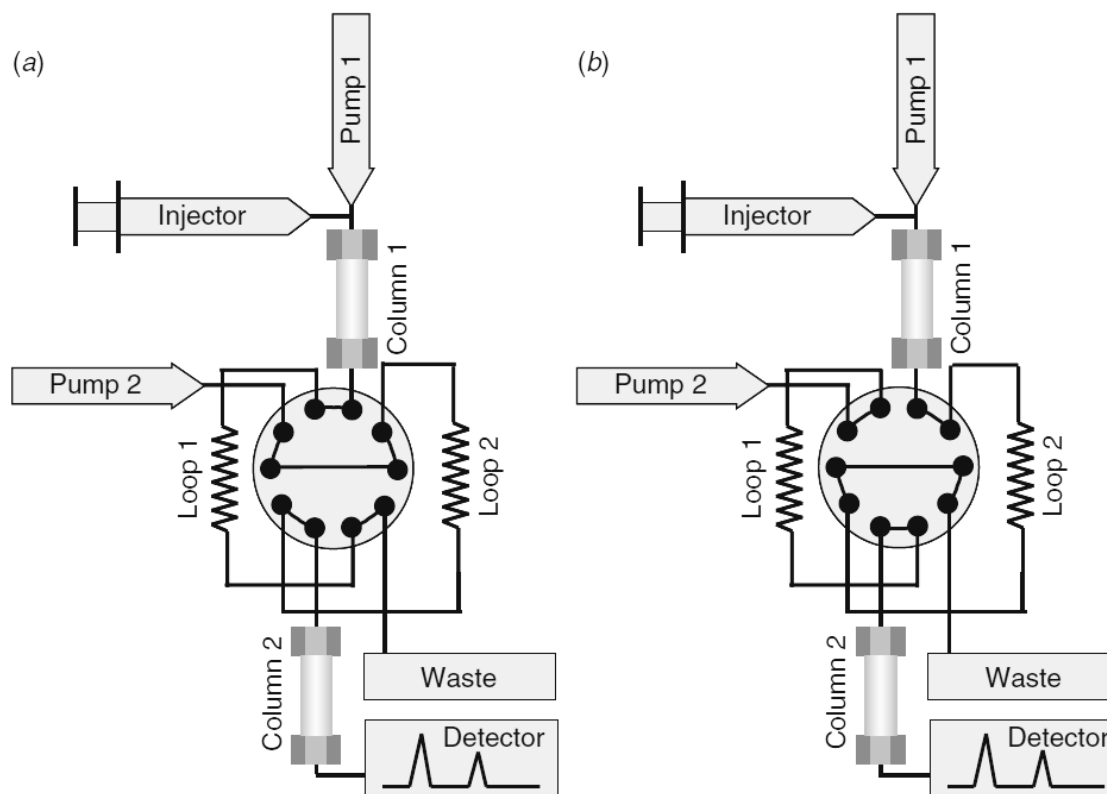


## Komprehensivní 2D-HPLC

- vhodná pro analýzu komplexních směsí
- v *on-line* uspořádání musí být separace ve druhé dimenzi podstatně rychlejší než v první dimenzi (doba sběru frakce v 1.d = doba analýzy ve 2.d)



## Komprehensivní 2D-HPLC



*Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley 2010*

## Komprehensivní 2D-HPLC

**Ortogonalita separačních systémů:** vlastnost systémů založená na vzájemné korelaci retenčních časů analytů.

*Ortogonalní systémy* = systémy se zcela odlišnými mechanismy retence poskytující vzájemně nekorelovaná retenční data.

**Kapacita píků:** součin kapacit píků v obou dimenzích (platí jen pro zcela ortogonální separační systémy). Kapacita píků pro 1D systémy řádově stovky, pro 2D systémy řádově tisíce.

V praxi je kapacita výrazně nižší než teoretická hodnota

- omezená ortogonalita systémů
- používá se pouze část chromatogramu
- nižší frekvence vzorkování z 1. dimenze

## Komprehensivní 2D-HPLC – vývoj metody

### *Optimalizace metody v 1D HPLC:*

-optimalizace selektivity pro dosažení  $R \geq 2$  (např.) pro všechny píky

### *Optimalizace metody v 2D HPLC:*

- nalezení ortogonálních separačních systémů
- kompatibilita mobilních fází
- optimalizace podmínek pro maximalizaci kapacity píků, s vědomím výrazně kratších separací ve druhé dimenzi

### Ortogonalní separační systémy:

- s ohledem na kompatibilitu fází se nejčastěji volí RPC x IEC
- lze použít i RPC x RPC na různých kolonách, v různých rozpouštědlech, pH, teplotě

### Kompatibilita mobilních fází:

- mobilní fáze z první dimenze je rozpouštědlem vzorku pro druhou dimenzi
- nutno uvažovat mísitelnost a eluční sílu, abychom minimalizovali rozmývání píků

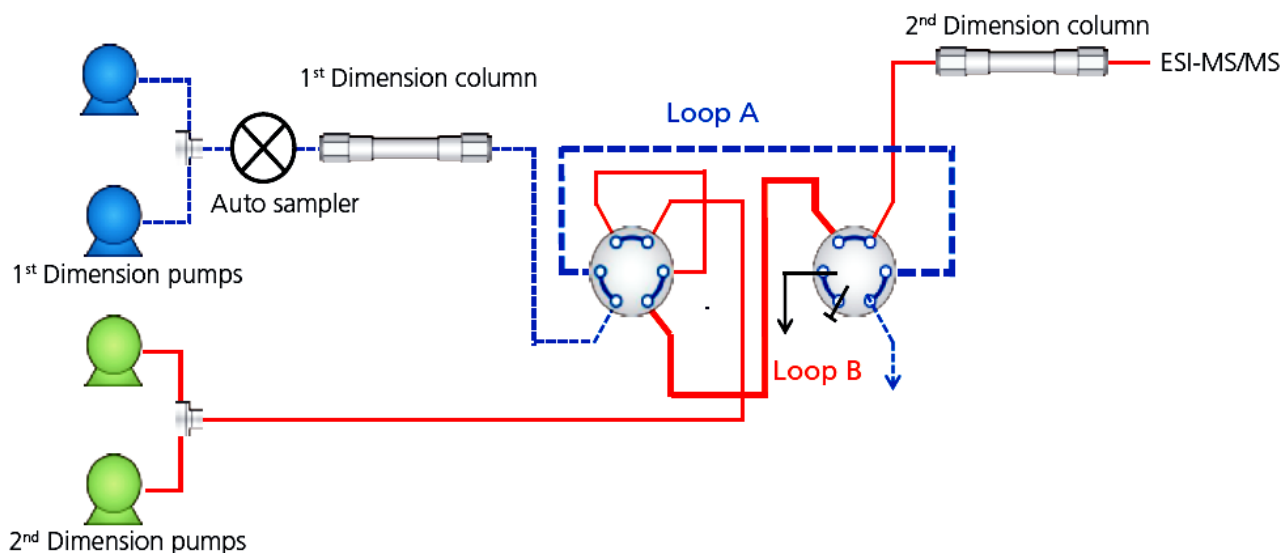
## Komprehensivní 2D-HPLC – vývoj metody

### *Příklad separačních podmínek*

| Parameter                                  | First Dimension  | Second Dimension |
|--|------------------|------------------|
| Pressure drop (psi)                        | 6000             | 6000             |
| Eluent viscosity (cPoise)                  | 0.75             | 0.75             |
| Analyte diffusivity (cm <sup>2</sup> /sec) | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-5</sup> |
| Gradient time                              | 300 min          | 30 sec           |
| Column diameter (mm)                       | 1                | 4.6              |
| Injection volume (μL)                      | 5                | 20               |
| Flow rate (μL/min)                         | 20               | 1500             |
| Particle size (μm)                         | 5                | 1.5              |
| Column length (mm)                         | 950              | 25               |
| $k^*$                                      | 4                | 3                |
| Peak capacity                              | 700              | 100              |
| Peak width (sec)/number of fractions       | 26 sec/1400      |                  |

## Komprehensivní 2D-HPLC – analýza lipidů

- Separace glycerofosfolipidů v NPC x RPC
- detekce pomocí MS (QqQ, IT-TOF)



Shimadzu ASMS 2015 TP 259

## Komprehensivní 2D-HPLC – analýza lipidů

### HPLC conditions ( Nexera-e system )

|                |   |
|----------------|---|
| 1D Column      | : Nucleosil SIL (150 mm L. x 1 mm I.D., 3 µm)   |
| Mobile phase   | : A : Isooctane / Acetone / Ethyl Acetate / Acetic acid<br>= 40/20/20/0.03 (v/v/v/v)<br>B : Isooctane / 2-propanol / Water / Acetic acid / 28 % Ammonium hydroxide<br>= 40/51/9/0.03/0.03 (v/v/v/v/v) |
| Flow rate      | : 0.02 mL / min.  |
| Time program   | : B Conc. 30 % B (0 min) → 40 % (25 min.) → 100 % (40 min)<br>→ 100 % (55 min) → 30 % (55.1 min) → 30 % (55.1 min) → STOP (70 min)  |
| Column Temp.   | : 40 °C   |
| Injection Vol. | : 5 µL  |
| Loop Vol.      | : 20 µL   |
| 2D Column      | : Phenomenex Kinetex C18 (50 mm L. x 4.6 mm I.D., 2,6 µm)   |
| Mobile phase   | : A : Methanol / Water / Acetic acid / 28 % Ammonium hydroxide<br>= 100/10/0.05/0.05 (v/v/v/v)<br>B : 2-propanol / Acetic acid / 28 % Ammonium hydroxide<br>= 100/0.05/0.05 (v/v/v)                   |
| Flow rate      | : 3.5 mL/min (50 % split to MS)   |
| Time program   | : B Conc. 10 % B (0 min) → 50 % (0.75 min.) → 10 % (0.76 min)<br>→ STOP (1 min)<br>The initial B Concentration was changed by a stepwise method   |

### MS conditions

#### LCMS-8050

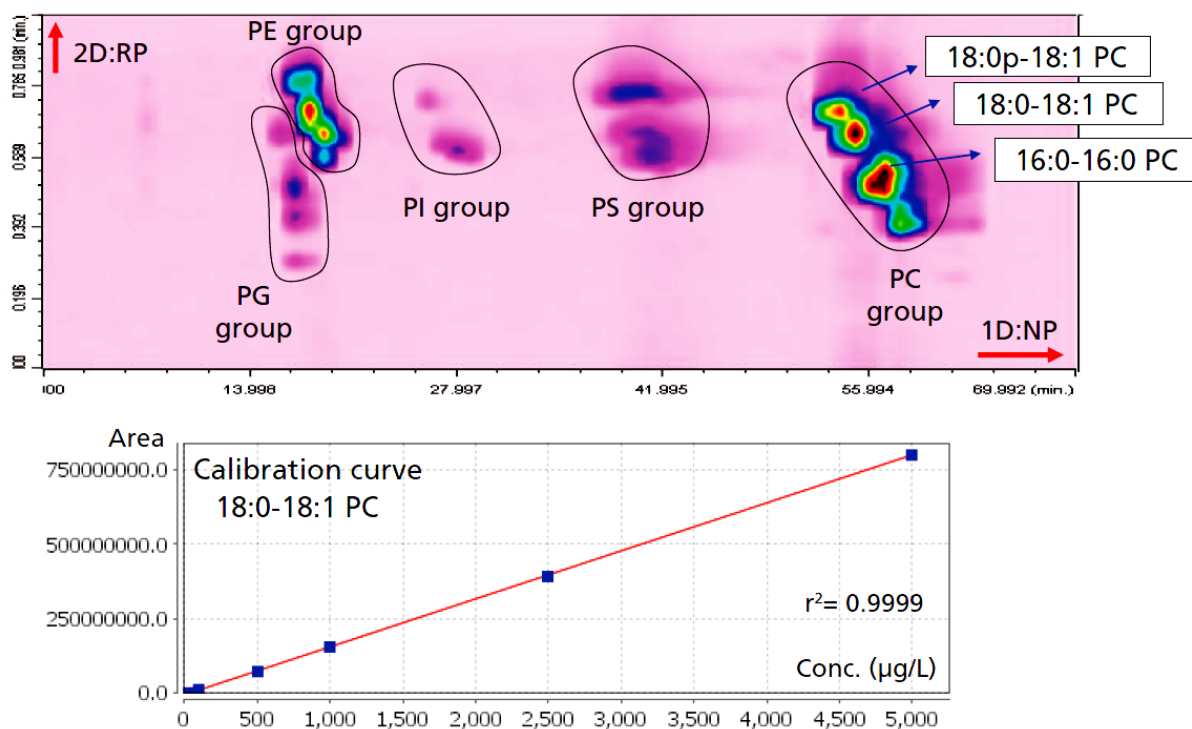
|            |   |
|------------|---|
| Ionization | : ESI (Positive)  |
| MRM        | : 31 MRM transitions<br>Dwell time 5 msec. / Pause time 1 msec. |

#### LCMS-IT-TOF

|            |                           |
|------------|---------------------------|
| Ionization | : ESI (Positive/Negative) |
| Scan       | : <i>m/z</i> 700-800      |

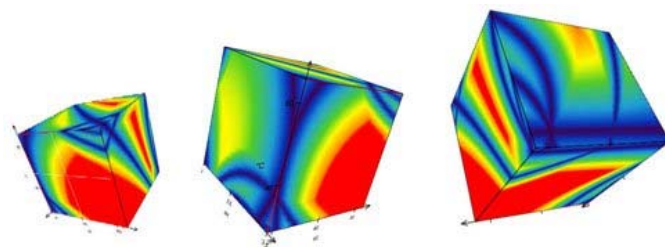
Shimadzu ASMS 2015 TP 259

## Komprehensivní 2D-HPLC – analýza lipidů



Shimadzu ASMS 2015 TP 259

## Vývoj HPLC metod s využitím počítačových programů



## Počítačové programy pro optimalizaci separace

**Počítačové simulační programy** modelují separaci látek v závislosti na jednom nebo více experimentálních parametřích. K tomu vyžadují experimentální data z několika předběžných měření.

**Hlavní výhoda:** výrazné snížení experimentální práce pro dosažení optimální separace směsi látek

**Příklad:** isokratická eluce v RPC, predikce separace v závislosti na eluční síle mobilní fáze (% B).

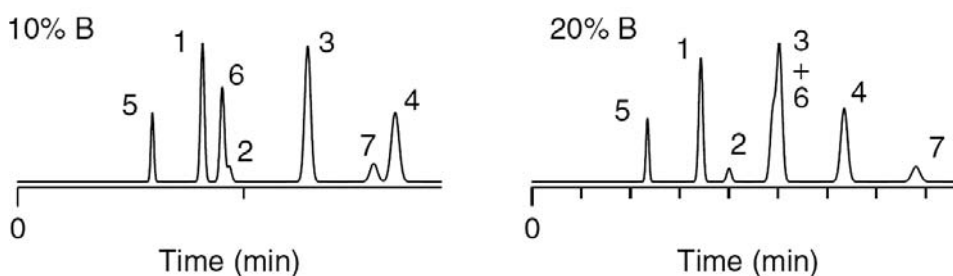
- 1/ dvě měření s použitím mobilní fáze obsahující 10 % a 20 % složky B
- 2/ retenční časy látek zadány do počítačového programu
- 3/ zadány další parametry analýz (rozměry kolony, velikost částic, průtok, teplota).

Počítač spočítá model - predikci separace v závislosti na složení mobilní fáze (tj. % B), průtoku, rozměrech kolony a velikost částic.

*Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley 2010*

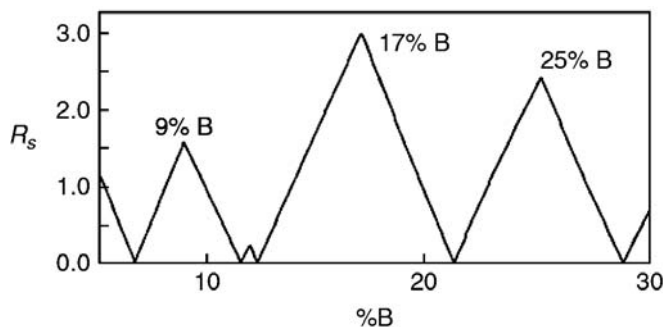
## Počítačové programy pro optimalizaci separace

**Experimentální data:**



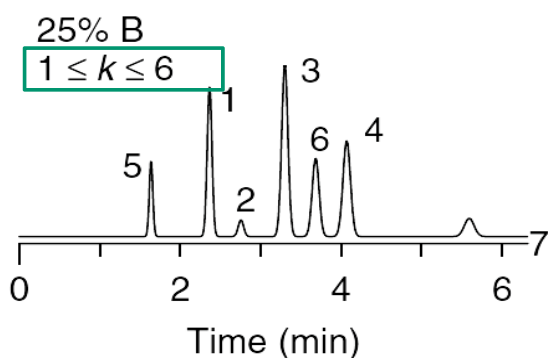
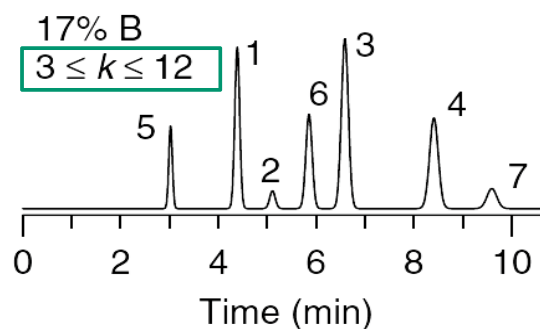
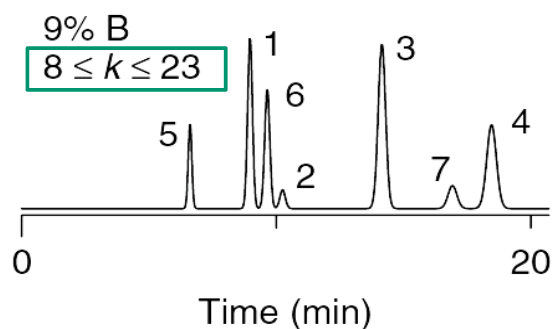
Program zobrazí **mapu rozlišení** – závislost kritického rozlišení v závislosti na složení mobilní fáze

**Kritické rozlišení  $R_s$ :** rozlišení píků, které se za daných podmínek nejméně separují



*Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley 2010*

## Počítačové programy pro optimalizaci separace



- velmi dobré rozlišení ( $R_s=2,4$ )
- optimální rozmezí k ( $1 < k < 10$ )

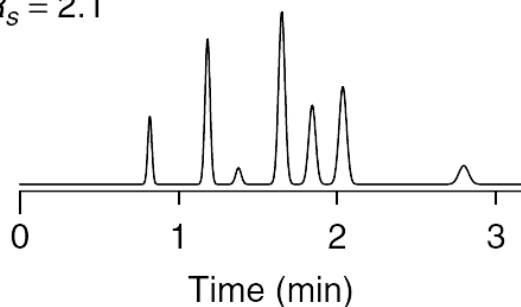
... ale lze dále optimalizovat!

(program ukáže vliv parametrů kolony, zvýšení průtokové rychlosti...)

Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley 2010

## Počítačové programy pro optimalizaci separace

25% B, 75-mm, 3- $\mu$ m column  
 $R_s = 2.1$



Navržené podmínky a simulovaný chromatogram pro minimální dobu analýzy a dostatečnou separaci látek

Počítačové simulace uvažují různé teoretické i empirické vztahy.

Vztah mezi retenčním poměrem k a koncentrací rozpouštědla B v mobilní fázi pro RPC:

$$\log k = \log k_w - S\Phi$$

kde  $\Phi$  je hmotnostní zlomek složky B, S je konstanta a  $k_w$  je retenční poměr látky ve vodě (tj. 0% B)

Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley 2010



## Využití počítačových simulačních programů

### Kdy použít?

- separace s gradientovou elucí
- větší počet separovaných látek (> 5-10)
- jsou vyžadovány velmi krátké retenční časy
- je kladen velký důraz na robustnost metody

### Nevýhody:

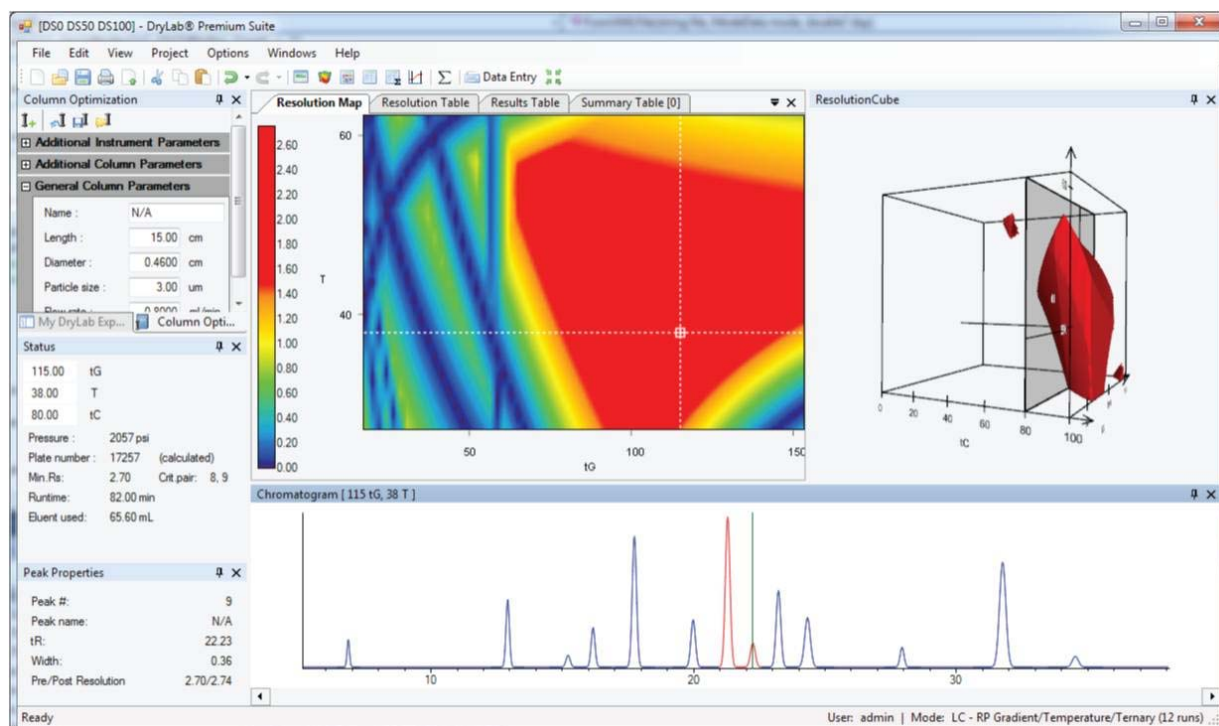
- vysoká cena počítačových programů
- čas potřebný na zaučení s počítačovým programem

*Počítačové simulace nemohou nahradit znalosti a zkušenosti analytického chemika.*

*Jsou to pouze nástroje pro zrychlení vývoje metody a snížení nákladů.*

*Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley 2010*

## DryLab



## Predikce retenčního chování ze struktury analytu

Některé simulační programy modelují retenci látek v závislosti na **struktuře analytu**. Teoreticky tak není nutné provádět skutečné experimenty pro vývoj metody.

“**Virtuální chromatografie**” – počítačová simulace založená na retenčním modelu vypočítaném ze strukturních parametrů analytů a vlastností komerčních chromatografických kolon

$$\ln k' = aV^{2/3} + b\Delta G + c$$

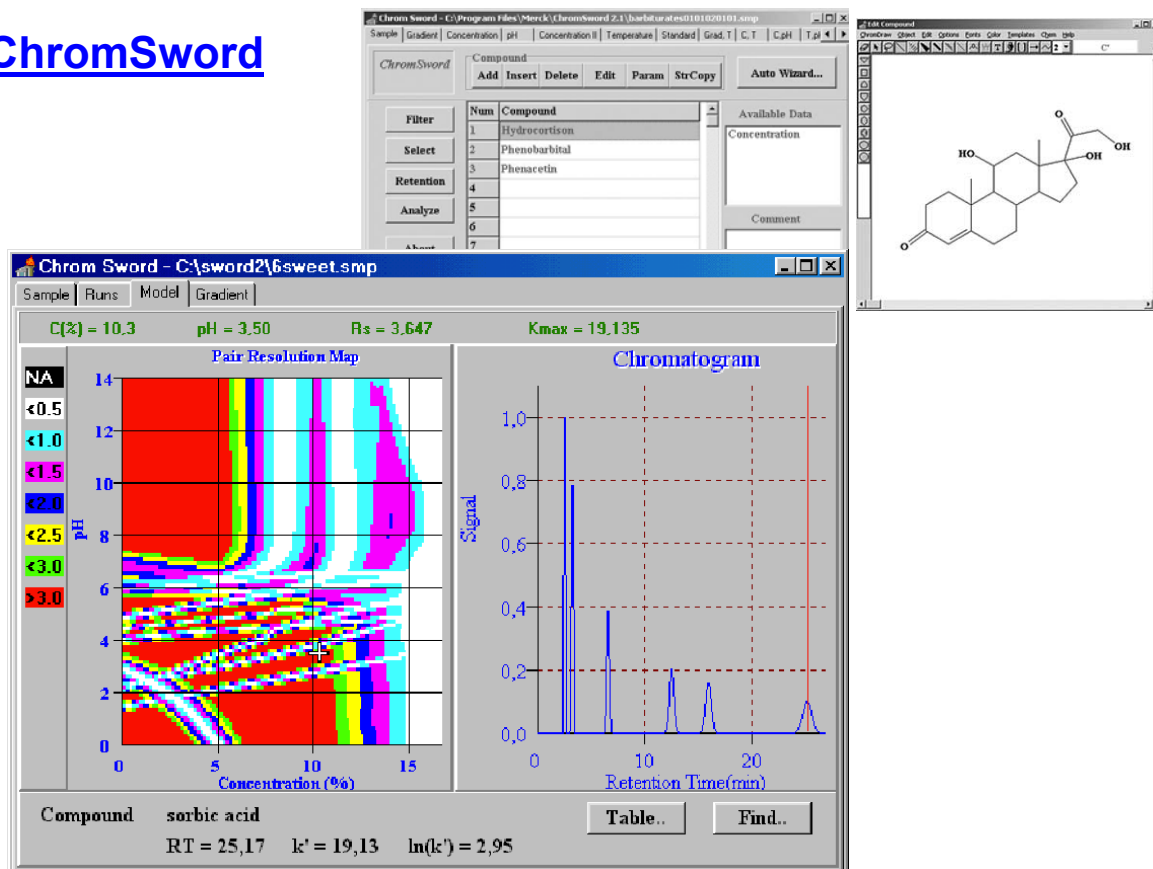
V: molární objem látky

$\Delta G$ : energie interakce látky s vodou

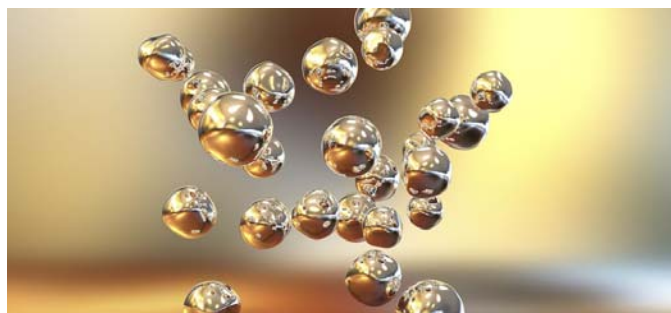
a, b, c: charakteristiky RPC kolony v dané mobilní fázi

**Výhoda:** program navrhne počáteční separační podmínky (typ komerční kolony, mobilní fázi) pouze na základě strukturních vzorců analytu. Pro další optimalizace (tj. pro korekci teoretického modelu) jsou však vyžadována experimentální data.

## ChromSword



# Kapalinová chromatografie nanočástic



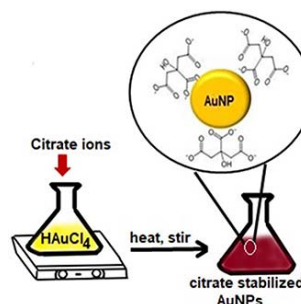
<https://www.istockphoto.com/>

## Kapalinová chromatografie nanočástic

Charakterizace velikosti nanočástic – tradiční metodou je TEM, alternativy CE, LC



*Au NPs ve vodě*

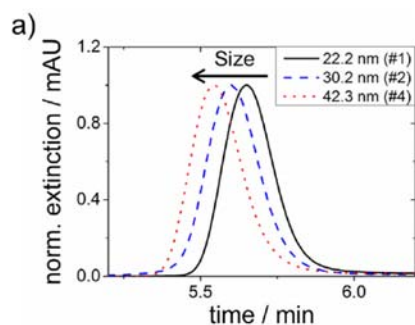


*Příprava AuNPs: redukce HAuCl<sub>4</sub> citrátem sodným ve vodném prostředí (Turkevič, 1951)*

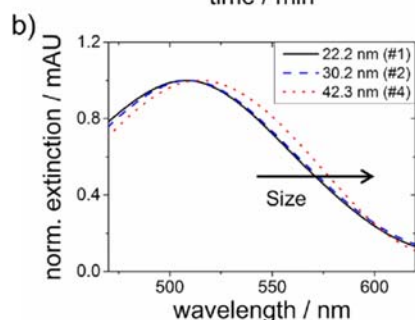
*HPLC nanočástic: nejčastěji SEC a RP, pro nanočástice s permanentním nábojem lze IEC*

## Kapalinová chromatografie nanočástic: SEC

Př.: separace zlatých nanočástic s různou střední velikostí částic



- posun ke kratším retenčním časům s rostoucí velikostí částic - v souladu s mechanismem SEC (menší Au NPs snáze difundují do pórů stacionární fáze a tak se více zdržují)



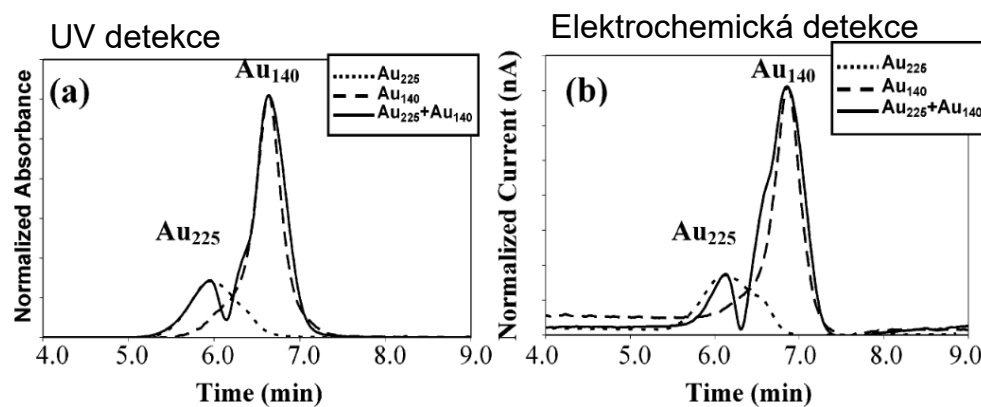
*Kolona:* SEC, velikost částic 10  $\mu\text{m}$ ; póry 100 nm (PSS Polymer Standards Service GmbH)

*Mobilní fáze:* 7,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1 ml/min

*Powder Technology* 339 (2018) 264–272

## Kapalinová chromatografie nanočástic: RP-HPLC

Př.: separace thiolem-modifikovaných zlatých nanočástic  $\text{Au}_{225}[(\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3)]_{75}$  a  $\text{Au}_{140}[(\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3)]_{53}$



*Kolona:* BioBasic C8 (250 x 4.6 mm) v sérii s BioBasic phenyl (150 x 4.6 mm i.d., Thermo Hypersil)

*Mobilní fáze:*  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (+ 0.1 M  $\text{Bu}_4\text{-NClO}_4$  jako elektrolyt pro amperometrickou detekci)

*Anal. Chem.* 2006, 78, 1167-1173

# Green analytical chemistry



<https://www.uantwerpen.be/>

## Zelená analytická chemie

**Zelená analytická chemie:** koncept směřující k tomu, aby analytické metody byly šetrnější k životnímu prostředí a bezpečnější pro lidi.

„zelenost“ *analytického postupu* - vícerozměrný parametr zahrnující např. množství a toxicitu rozpouštědel a činidel, energetické nároky, miniaturizaci nebo automatizaci

→ snahy kvantifikovat „zelenost“ metod, snahy o přehledné zobrazení výsledků

12 principů zelené analytické chemie

- skóre pro každý princip
- vizualizace v programu AGREE

<https://agreeprep.anvil.app/>



## Zelená analytická chemie

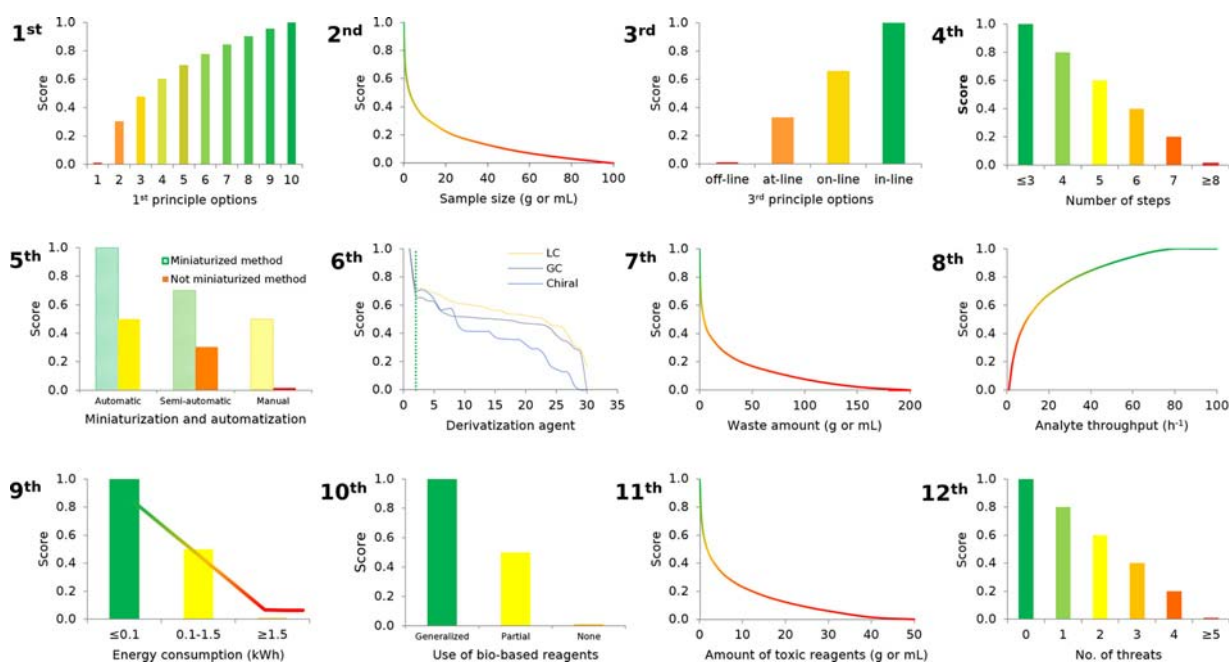
### 12 principů zelené analytické chemie

1. Omezení zpracování vzorku, použití přímých analytických metod
2. Minimalizace velikosti vzorku a počtu vzorků.
3. Analýzy co nejbližší místu odběru vzorků.
4. Integrace analytických procesů - šetří energii, snižuje spotřebu činidel.
5. Preference automatizovaných a miniaturizovaných metod.
6. Je třeba se vyhnout derivatizaci.
7. Minimalizace odpadu, správné nakládání s odpadem.
8. Upřednostňují se multi(reziduální) metody oproti cílení na jeden analyt.
9. Spotřeba energie by měla být minimalizována.
10. Upřednostňována by měla být činidla získaná z obnovitelných zdrojů.
11. Toxická činidla by měla být odstraněna nebo nahrazena.
12. Měla by být zvýšena bezpečnost obsluhy.

*Trends in Analytical chemistry 50 (2013) 78–84*

## Zelená analytická chemie

### Kvantifikace – skóre každého z 12 principů zelené analytické chemie



## Zelená analytická chemie

Příklad: určení skóre pro způsob úpravy vzorku

| Způsob úpravy vzorku                                   | Skóre |
|--|-------|
| vzdálený průzkum bez poškození vzorku                  | 1.00  |
| vzdálený průzkum s malým poškozením vzorku             | 0.95  |
| neinvazivní analýza                                    | 0.90  |
| vzorkování v místě a přímá analýza                     | 0.85  |
| vzorkování v místě a on-line analýza                   | 0.78  |
| on-line analýza  | 0.70  |
| at-line analýza  | 0.60  |
| off-line analýza                                       | 0.48  |
| externí úprava a zpracování vzorků (malý počet kroků)  | 0.30  |
| externí úprava a zpracování vzorků (velký počet kroků) | 0.00  |

*Anal. Chem. 2020, 92, 14, 10076-10082*

## Zelená analytická chemie

Příklad aplikace: porovnání dvou analytických metod pro analýzu 5 analytů (účinné látky v léčivech)

HPLC-DAD: Zorbax SB C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm); fosforečnanový pufr / acetonitril (42:58, v/v), 1 mL/min, UV detekce

HPTLC: silikagelové TLC desky, chloroform: methanol: kyselina octová, 92:8:0.25, v/v/v), densitometrická detekce

