

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

Analýza vybraných léčiv kvapalinovou chromatografiou I.

Bakalárska práca

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Ivana Turňová

Vedúci bakalárskej práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Názov bakalárskej práce: Analýza vybraných liečiv kvapalinovou chromatografiou I.

Vysokoteplotná kvapalinová chromatografia (HTLC – *high-temperature liquid chromatography*) je jednou z možností rozvoja a ďalšieho pokroku na poli kvapalinovej chromatografie, ktorá sa radí medzi najvyužívanejšie separačné metódy aj vo farmaceutickej analýze. Zároveň HTLC patrí do tzv. *green chemistry* („zelenej chémie“), ktorá kladie dôraz na vykonávanie chemickej praxe spôsobom čo najmenej poškodzujúcim životné prostredie. Táto práca predkladá problematiku HTLC vo forme rešerše zameranej na charakteristiku podstatných vlastností HTLC a zásadného vplyvu zvýšenia teploty na dané chromatografické procesy. Popisuje najdôležitejšie výhody, ale i obmedzenia metódy HTLC, predovšetkým pri možnosti jej použitia pri rutinných analýzach. Nakoniec práca uvádza výber z výsledkov niekoľkých experimentálnych štúdií, ktoré sa doteraz zaoberali použitím HTLC v analýze konkrétnych látok zo skupiny liečiv.

Kľúčové slová

vysokoteplotná kvapalinová chromatografia, analýza liečiv, green chemistry

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Ivana Turňová

Supervisor: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Title of Bachelor Thesis: Analysis of selected drugs by liquid chromatography I.

High-temperature liquid chromatography (HTLC) is one of the possibilities of development and further progress in the field of liquid chromatography that is ranked among the most used separation methods also in the pharmaceutical analysis. Also, HTLC belongs in the so-called „green chemistry“, which highlights performing the chemical practice in the most environment-friendly way. This thesis presents the HTLC issues in the form of literature search focused on the characterization of the fundamental features of HTLC and essential effect of the elevated temperature on the chromatographic processes given. It describes the most important advantages but also the limits of the HTLC method, mainly in its possible use in routine analyses. Finally, the thesis gives the overview of the selected results of several experimental studies, which have dealt with the use of HTLC in the analysis of some concrete drugs.

Key words

high-temperature liquid chromatography, drug analysis, green chemistry

„Vyhlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri vypracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 12. máj 2015

Ivana Turňová

Pod'akovanie

Chcela by som sa na tomto mieste pod'akovať vedúcej mojej práce PharmDr. Pavle Pilařovej, Ph.D. za všetky rady, pripomienky a odbornú pomoc pri vypracovaní bakalárskej práce.

Obsah

Zoznam obrázkov	8
Zoznam tabuliek	9
Zoznam symbolov a skratiek	10
1 Úvod a cieľ práce.....	13
2 Vysokoteplotná kvapalinová chromatografia.....	14
3 Zvýšená teplota a vlastnosti chromatografických systémov	16
3.1 Vplyv teploty na účinnosť	16
3.2 Vplyv teploty na rýchlosť analýzy	20
3.3 Vplyv teploty na rozlíšenie.....	21
3.4 Vplyv teploty na selektivitu.....	23
3.5 Vplyv teploty na tvar píkov	24
3.6 Vplyv teploty na detekovateľnosť	26
3.7 Vplyv teploty na spotrebu organických rozpúšťadiel.....	28
4 Chromatografické systémy vo vysokoteplotnej kvapalinovej chromatografii	30
4.1 Mobilné fázy – teplotný gradient a termostatovanie kolón	30
4.1.1 Predhrievanie mobilnej fázy	31
4.2 Stacionárne fázy – používané náplne kolón a termostabilita	32
4.2.1 Anorganické oxidy – silikagél	32
4.2.2 Anorganické oxidy ďalších kovov	33
4.2.3 Chemicky viazané fázy na báze silikagélu	34
4.2.4 Polymérne stacionárne fázy	36
4.2.5 Hybridné stacionárne fázy	36
4.2.6 Stacionárne fázy na báze grafitového uhlíka	37
4.3 Detekcia – spôsoby a špecifiká.....	37
4.3.1 Spektrofotometrické detektory.....	38
4.3.2 Plameňovo-ionizačné detektory.....	38
4.3.3 Odparovací detektor rozptylu svetla	39
4.3.4 Spektroskopia pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie a hmotnostne spektrometrické detektory.....	40

5	Vysokoteplotná kvapalinová chromatografia vo farmaceutickej analýze.....	41
5.1	Opiáty a produkty ich metabolizmu	41
5.2	Vitamíny skupiny B.....	43
5.3	Cytostatiká	44
5.4	Talidomid	45
5.5	Levonorgestrel	47
5.6	Analgetiká.....	50
6	Záver.....	52
	Zoznam použitej literatúry	54

Zoznam obrázkov

Obr. 1 Van Deemterova krivka a optimálna prietoková rýchlosť mobilnej fázy	18
Obr. 2 Zobrazenie vplyvu teploty na výšku priehradky H (= účinnosť kolóny) pri rôznych teplotách	18
Obr. 3 Graf závislosti výšky priehradky H na lineárnej prietokovej rýchlosti u	19
Obr. 4 Graf závislosti retenčného času na teplote kolóny	20
Obr. 5 Vplyv rozdielnej teploty a dĺžky kolóny na rozlíšenie a rýchlosť separácie pri analýze farmaceutickej zmesi.....	22
Obr. 6 Vplyv teploty kolóny na elučné poradie siedmich štruktúrne nepríbuzných analgetík.....	24
Obr. 7 Analýza zmesi sulfónamidov v podmienkach gradientovej elúcie a teplotného programovania.....	26
Obr. 8 Porovnanie pomeru S/N pri MS-ESI detekcii bázičných látok pri rôznej teplote a hodnote pH	28
Obr. 9 Separácia derivátov kofeínu	29
Obr. 10 Vplyv teploty kolóny na retenciu morfinu a produktov jeho metabolizmu	42
Obr. 11 Elúcia talidomidu pri rôznych chromatografických podmienkach.....	45
Obr. 12 Van Deemterova krivka separácie levonorgestrelu pri rôznych podieloch organického modifikátora v mobilnej fáze	49
Obr. 13 Chromatogramy výslednej optimalizovanej a úvodnej testovacej separácie levonorgestrelu.....	49

Zoznam tabuliek

Tab. 1 Chromatografické podmienky pri analýze talidomidu	46
Tab. 2 Chromatografické podmienky pri úvodnej separácii levonorgestrelu.....	48
Tab. 3 Retenčné časy pri separácii analgetík pomocou chromatografie s veľmi horúcou vodou	51

Zoznam symbolov a skratiek

A	symmetry factor (faktor symetrie)
APCI	atmospheric pressure chemical ionization) (chemická ionizácia pri atmosférickom tlaku)
CAD	charged aerosol detector (detektor nabitého aerosólu)
CEC	capillar electrochromatography (kapilárna elektrochromatografia)
ELSD	evaporative light scattering detector (odparovací detektor rozptylu svetla)
ESI	electrospray ionization (ionizácia elektrosprejom)
FID	flame ionization detector (plameňovo-ionizačný detektor)
GC	gas chromatography (plynová chromatografia)
H	plate height (výška priehradky)
HETP	height equivalent to a theoretical plate (výškový ekvivalent teoretickej priehradky)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia)
HTLC	high-temperature liquid chromatography (vysokoteplotná kvapalinová chromatografia)
k	retenčný faktor
LC	liquid chromatography (kvapalinová chromatografia)

LOD	limit of detection medza detekcie
MEKC	micellar electrokinetic chromatography (micelárna elektrokinetická chromatografia)
MF	mobilná fáza
MS	mass spectroscopy, mass spectrometer (hmotnostná spektroskopia, hmotnostný spektrometer)
N	number of theoretical plates (počet teoretických priehradok)
NMR	nuclear magnetic resonantion (nukleárna magnetická rezonancia)
n_p	kapacita separácie
ODS	oktadecylsilikagél
Pc	peak capacity (kapacita separácie)
PGC	porous grafitic carbon (porézny grafitový uhlík)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxóniových katiónov
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociačnej konštanty kyseliny K _a
PS-DVB	polystyrén-divinylbenzén
PVA	polyvinylalkohol
R	resolution (rozlíšenie)
RP-HPLC	reversed phase-high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverzných fázach)
S/N	signal-to-noise ratio pomer signálu a šumu
SF	stacionárna fáza

SFC	supercritical fluid chromatography (superkritická fluidná chromatografia)
SHW	superheated water (veľmi horúca voda)
SHWC	superheated water chromatography (chromatografia s veľmi horúcou vodou)
SWC	subcritical water chromatography (chromatografia so subkritickou vodou)
T	teplota
T _f	tailing factor (faktor chvostovania)
u	lineárna prietoková rýchlosť mobilnej fázy
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UV	ultra violet (ultrafialový)
v	volume (objem)
VIS	visible (viditeľný)

1 Úvod a cieľ práce

V súčasnosti medzi najvyužívanejšie separačné metódy v oblasti analýzy liečiv patrí vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC – *high performance liquid chromatography*). Výhodami HPLC sú vysoká citlivosť, selektivita a rýchlosť analýzy. K hojnému využitiu prispieva tiež možnosť automatizácie celého procesu, ktorá uľahčuje každodennú činnosť v laboratóriu. Pri vysokom počte analýz však dochádza k vysokej spotrebe organických rozpúšťadiel a preto nemožno prehliadať ich vplyv na životné prostredie.

Do popredia sa dostáva problematika tzv. zelenej chémie (*green chemistry*), ktorá sa snaží modifikovať jednotlivé procedúry na ich ekologickejšie formy. Jednou z možností „zozelenenia“ HPLC je využitie vysokoteplotnej kvapalinovej chromatografie.

Cieľom tejto práce je formou rešerše popísať vysokoteplotnú kvapalinovú chromatografiu (HTLC – *high-temperature liquid chromatography*), podať prehľad vybraných experimentálne získaných poznatkov, a na príkladoch konkrétnych liečiv načrtnúť eventuálne využitie HTLC v rutinej farmaceutickej analýze.

2 Vysokoteplotná kvapalinová chromatografia

V spojení s kvapalinovou chromatografiou a termínom „*high-temperature*“ je možné v literatúre nájsť viacero rôznych definícií, ako napríklad „teplota vyššia než laboratórna teplota“, „teplota vyššia než bod varu rozpúšťadla (bod varu mobilnej fázy)“ alebo „teplota vyššia než 100°C“ (1). Vo všeobecnosti ide pri vysokoteplotnej kvapalinovej chromatografii (HTLC – *high-temperature liquid chromatography*) o akúkoľvek separáciu pri teplote vyššej než je teplota prostredia, obvykle v rozmedzí 40°C až 200°C (2). Okrem týchto pojmov je možné stretnúť sa aj s termínom chromatografia s veľmi horúcou vodou (SHWC – *superheated water chromatography*), chromatografia so stlačenou vodou (*pressurized water chromatography*) alebo chromatografia so subkritickou vodou¹ (SWC – *subcritical water chromatography*) (3).

Ako v roku 2009 uvádzajú Heinisch a Rocca (2), názov HTLC sa rozšíril pomerne nedávno, aj keď záujem o otázku teploty v kvapalinovej chromatografii (LC– *liquid chromatography*) sa objavil už pri počiatkových pokrokoch v oblasti vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC – *high performance liquid chromatography*). Teplota ale nie je považovaná za kľúčový parameter LC a v rutinných analýzach sa HTLC príliš často nepoužíva. Teplota v kolóne však môže skrátiť čas analýzy, upraviť retenciu analytov a selektivitu, ovplyvniť účinnosť separácie či zvýšiť detekčnú citlivosť, preto je dnes HTLC považovaná za hodnotnú techniku vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na reverzných fázach (RP-HPLC – *reversed phase-high performance liquid chromatography*).

Voda je v RP-HPLC považovaná za slabý eluent a primárne sa používa na zníženie elučnej sily silnejších nepolárnych modifikátorov mobilnej fázy (metanol, acetonitril, tetrahydrofurán). Pri zahrievaní pod tlakom na teplotu 80°C až 200°C však polarita kvapalnej vody výrazne poklesne až do takej miery, že voda môže nahradiť organický modifikátor a stať sa jediným eluentom. Tento fakt zaraďuje HTLC medzi metódy tzv. zelenej chémie (*green chemistry*) ako techniku, ktorá je priateľská životnému prostrediu, pretože znižuje tak spotrebu organických rozpúšťadiel, ako aj odpad vznikajúci pri ich používaní (3).

¹ Subkritická voda je voda v kvapalnom stave pri teplotách medzi bodom varu vody (100 °C) pri atmosférickom tlaku (101,325 kPa) a kritickou teplotou vody (374 °C). Na udržanie vody v kvapalnom stave sa využíva tlak. Tlak môže byť rovný tlaku pary vody pri danej teplote alebo vyšší. Často je záujem o teploty nad 200 °C. Potrebný tlak sa preto pohybuje v rozmedzí 1,6 MPa pri teplote 200 °C až 22,6 MPa pri teplote 374 °C.

Rozsiahlejšie využitie HTLC je ohraničené pravdepodobne nedostatkom komerčne dostupného prístrojového vybavenia, ktoré by umožnilo ohrev mobilnej fázy na veľmi vysoké teploty (okolo 200°C) a nedostatkom spoľahlivých termicky stabilných stacionárnych fáz. Od využitia tejto metódy odrádza zrejme aj zložitosť zmien početných fyzikálno-chemických parametrov, ktoré s teplotou súvisia. Ďalším dôvodom môže byť fakt, že sa príliš kladie dôraz na jeden následok vplyvu teploty (napr. pokles viskozity mobilnej fázy vedúci k poklesu tlaku na kolóne), zatiaľ čo iné dôležité následky sa zanedbávajú (zmena elučnej sily a selektivity, nárast difúzie, zmena disociačného stupňa ionizovateľných zlúčenín) (2).

Nasledujúce kapitoly sa venujú teoretickému pozadiu vybraných chromatografických parametrov v HTLC a niektorým otázkam potrebného technického zabezpečenia a prístrojového vybavenia.

3 Zvýšená teplota a vlastnosti chromatografických systémov

Zvyčajne sa pri optimalizácii chromatografických systémov kladie dôraz na zloženie, *pH* a iónovú silu mobilnej fázy, ďalej na veľkosť, typ a porozitu častíc stacionárnej fázy a tiež na rozmery kolóny. Teplota ale takisto patrí medzi dôležité parametre LC separácií (4).

Väčšina chromatografických separácií je optimalizovaná pre teplotné rozmedzie 20°C až 50°C. V praxi sa mnohokrát pracuje pri teplote prostredia, pričom termostat sa využíva na kontrolu teploty separácie, a nie na ohrev kolóny na vysokú teplotu (a tým na významné ovplyvnenie retenčného času). Kinetika i termodynamika chromatografických procesov sú však funkciami teploty (5), preto je potrebné venovať jej dostatočnú pozornosť.

Zvýšená teplota v RP-LC znižuje viskozitu rozpúšťadla a zároveň zvyšuje difúziu a prevod hmoty rozpúšťaných látok. V dôsledku zníženej viskozity je znížený aj spätný tlak na kolóne, čo umožňuje použiť dlhšie kolóny (resp. niekoľko sériovo zapojených kolón) a zvýšiť tak počet teoretických priehradiek. Znížená viskozita rovnako umožňuje použiť vyššie prietokové rýchlosti rozpúšťadla pri primeranom spätnom tlaku, čo vedie k urýchleniu analýzy. Čas analýzy výrazne skraca tiež znížená retencia látok, pretože pri separácii pri zvýšenej teplote poklesne aj dielektrická konštanta a povrchové napätie mobilnej fázy (4).

3.1 Vplyv teploty na účinnosť

Ukazovateľom kvality chromatografickej separácie je účinnosť kolóny, ktorá charakterizuje mieru rozširovania elučných zón analytov. Mierou účinnosti kolóny je počet teoretických priehradiek *N* (*number of theoretical plates*). Počet teoretických priehradiek *N* je bezrozmerná veličina a čím je jej hodnota vyššia, tým je kolóna účinnejšia (elučná zóna analytu bola počas prechodu kolónou menej rozšírená). Na počet teoretických priehradiek má vplyv dĺžka kolóny, retenčný čas (resp. retenčný faktor), prietoková rýchlosť a viskozita mobilnej fázy, veľkosť častíc náplne kolóny a teplota. Pre praktické účely sa pri výpočte *N* (a teda účinnosti) používa viacero metód, pričom sa účinnosť kolón s rôznymi dĺžkami porovnáva pomocou výškového

ekvivalentu teoretickej priehradky $HETP^2$ (*height equivalent to a theoretical plate*). Tento parameter je definovaný ako dĺžka kolóny, ktorá pripadá na jednu priehradku. Obvykle sa udáva v μm . V tomto prípade je požadovaná čo najnižšia hodnota (6).

Maximálnu účinnosť kolóny je možné zistiť na základe dynamickej van Deemterovej teórie (6). Účinnosť separácie ako hodnotu $HETP$ (resp. H) je možné vyjadriť prostredníctvom príspevkov troch nezávislých aditívnych procesov, ktoré spôsobujú rozmývanie elučnej zóny. Ide o

- vírivú (Eddyho) difúziu analytu v mobilnej fáze pri prechode náplňou kolóny (člen H_p),
- pozdĺžnu (molekulárnu) difúziu analytu v mobilnej fáze (člen H_d),
- odpor proti prevodu hmoty medzi medzi mobilnou a stacionárnou fázou (člen H_m).

Účinnosť kolóny je teda daná súčtom

$$H = H_p + H_d + H_m ,$$

d'alej platí $H_p = A$, $H_d = \frac{B}{u}$, $H_m = C * u$

A, B, C hodnoty vypočítané na základe charakteristík mobilnej a stacionárnej fázy a príslušných koeficientov,

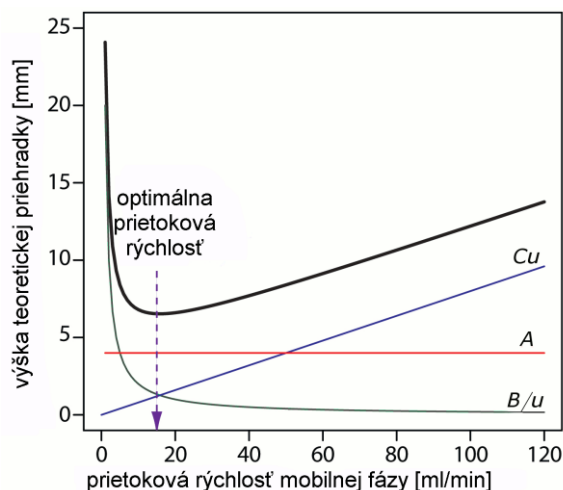
u lineárna prietoková rýchlosť mobilnej fázy.

Celkové rozmytie elučných zón potom vyjadruje súhrnná van Deemterova rovnica v tvare

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

Z tejto rovnice je možné odvodiť charakteristickú van Deemterovu krivku, ktorej minimum zodpovedá najnižšej dosiahnutej hodnote H , teda optimálnej účinnosti za daných podmienok. Najlepšia účinnosť sa teda dosiahne pri prietokovej rýchlosti mobilnej fázy, ktorá zodpovedá minimu van Deemterovej krivky (6), ako to znázorňuje Obr. 1.

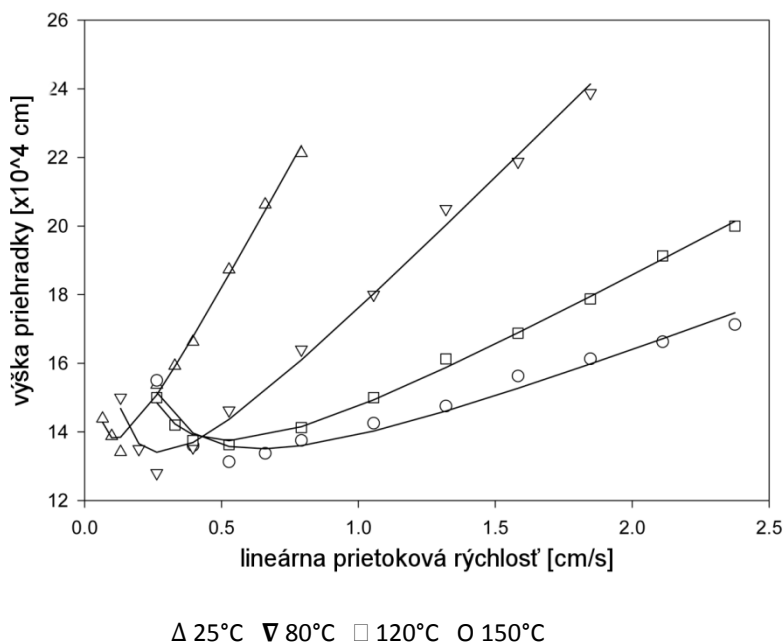
² Niekedy sa výškový ekvivalent teoretickej priehradky $HETP$ nazýva iba ako výška priehradky H (*plate height*).



Obr. 1 Van Deemterova krivka a optimálna prietoková rýchlosť mobilnej fázy

Zdroj: Upravené podľa (6)

Ukázalo sa, že s rastúcou teplotou dochádza k zníženiu odporu voči prevodu hmoty (teda členu C van Deemterovej rovnice) a vidieť tiež výrazný posun minima van Deemterovej krivky smerom k vyšším lineárnym prietokovým rýchlostiam (7). Vplyv zvýšenej teploty na účinnosť kolóny zobrazuje Obr. 2.



Obr. 2 Zobrazenie vplyvu teploty na výšku priehradky H (= účinnosť kolóny) pri rôznych teplotách

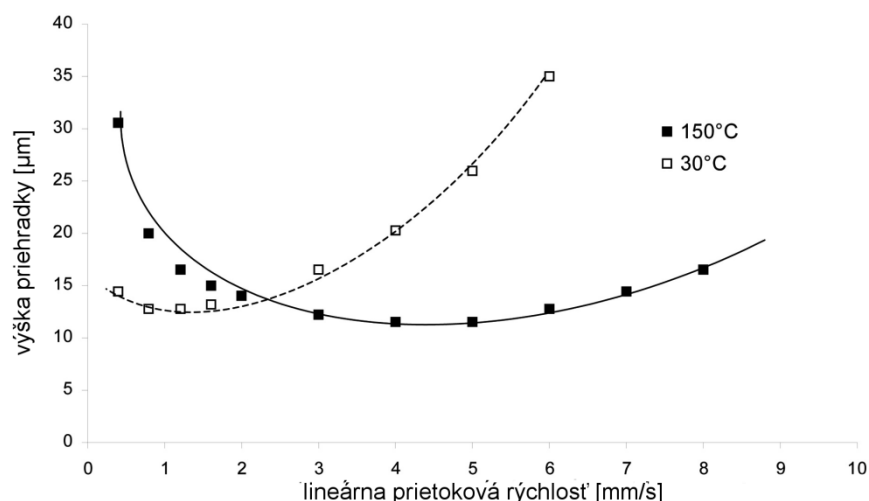
Zdroj: (8)

V literatúre sa často konštatuje, že účinnosť sa pri rastúcej teplote mobilnej fázy vždy zvyšuje, ale Teutenberg (9) uvádza, že van Deemterova teória túto hypotézu nepotvrdzuje. Teplotne závislé sú iba dva členy van Deemterovej rovnice: člen B je priamo a člen C nepriamo úmerný difúznemu koeficientu. Difúzny koeficient je priamo

úmerný teplote podľa Wilke-Changovej rovnice. Člen A fyzikálne na teplote závislý nie je. To znamená, že s rastúcou teplotou sa zvyšuje difúzia analytov v mobilnej a stacionárnej fáze, a tento jav navyše podporuje silná teplotná závislosť viskozity, ktorá s rastúcou teplotou klesá (10).

Model vplyvu teploty na účinnosť kolóny v HTLC vypracoval Yang (4) so záverom, že pri nižších teplotách prevažuje v separačnom procese člen prevodu hmoty (člen C z van Deemterovej rovnice), zatiaľ čo pri vyšších teplotách je to člen B – pozdĺžna difúzia. V rozmedzí nižších teplôt výška priehradky H s rastúcou teplotou klesá, ale v rozmedzí vyšších teplôt výška priehradky s rastúcou teplotou rastie. V procese analýzy je teda možné teplotu optimalizovať tak, aby sa dosiahla minimálna výška priehradky H (= maximálna účinnosť).

Experimenty (9) ukázali, že účinnosť ako taká (vyjadrená počtom teoretických priehradiek N), je na teplote relatívne nezávislá. Maximálna účinnosť (vyjadrená ako minimálna výška priehradky H) sa na van Deemterovej krivke posúva smerom k vyšším lineárnym prietokovým rýchlostiam. Možno teda konštatovať, že rastúca teplota zvyšuje účinnosť systému pri lineárnych prietokových rýchlostiach vyšších, než je teoreticky vypočítaná optimálna lineárna prietoková rýchlosť. Všetky uvedené skutočnosti vedú pri zvýšenej teplote k relatívne konštantnej minimálnej hodnote výšky priehradky H (9). Ilustruje to Obr. 3, ktorý porovnáva závislosť výšky priehradky H na lineárnej prietokovej rýchlosti u pri separáciách pri teplote 30°C a 150°C.



Obr. 3 Graf závislosti výšky priehradky H na lineárnej prietokovej rýchlosti u

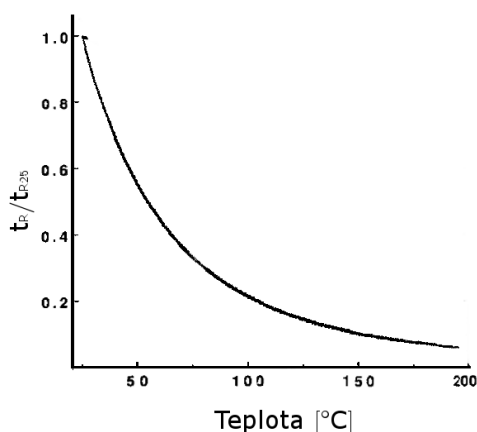
Zdroj: (10)

3.2 Vplyv teploty na rýchlosť analýzy

Možnosť podstatne zvýšiť rýchlosť analýzy je daná vyššou lineárnou prietokovou rýchlosťou, ktorá sa dosiahne v dôsledku poklesu viskozity mobilnej fázy so zvyšujúcou sa teplotou.

Úlohu teploty v LC detailne analyzovali Antia a Horváth (11) vo svojej významnej štúdií pred takmer 30 rokmi a predpovedali viacero zásadných zlepšení, ktoré by bolo možné dosiahnuť použitím *veľmi* vysokých teplôt. Kľúčovým zistením analýzy (vykonávanej v širokom rozmedzí meniacich sa parametrov) bolo, že zvýšenie teploty síce nezlepší hodnotu $HETP^3$, ale zmeny teploty od 25°C do 175°C predpokladajú urýchlenie prevodu hmoty medzi fázami. Bude teda možné pracovať pri omnoho vyšších lineárnych prietokových rýchlostiach a zachovať vysokú hodnotu N (počtu priehradiek) zaznamenanú pri optimálnej rýchlosti.

Názornú ilustráciu skrátenia analýzy poskytuje Obr. 4, ktorý znázorňuje závislosť pomeru retenčného času pri teplote T a retenčného času pri teplote $T = 25^\circ\text{C}$ na rastúcej teplote kolóny (v podmienkach konštantného poklesu tlaku, veľkosti častíc a počtu priehradiek). Na grafe je možné pozorovať, že pri zvýšení teploty na 200°C poklesne pomer daných retenčných časov 20-násobne.



Obr. 4 Graf závislosti retenčného času na teplote kolóny

Zdroj: Upravené podľa (11)

Takmer vo všetkých separáciách v RP-LC zvýšenie teploty spôsobí pokles retencie. Zvýšená teplota zároveň znižuje viskozitu mobilnej fázy, to znamená, že je

³ Ukázalo sa, že za podmienok konštantného poklesu tlaku, veľkosti častíc a počtu priehradiek, je výška priehradky závislá na teplote len slabou.

možné zvýšiť prietokovú rýchlosť a tak zvýšiť rýchlosť analýzy bez obmedzenia účinnosti⁴ (10).

Súčasným trendom v snahe o zvýšenie rýchlosti LC je používanie krátkych kolón naplnených malými časticami, spravidla s priemerom menším než 2 μm . V porovnaní s kolónami naplnenými tradičnejšími 3 – 5 μm časticami však v týchto tzv. „*sub-two-microne*“ kolónach dochádza k rapidnému poklesu tlaku. Navyše je k plnému využitiu ich potenciálu nutné použiť vysoké prietokové rýchlosti. Pri analýzach pri teplote prostredia kombinácia vysokého vnútorného spätného tlaku a požadovanej vysokej prietokovej rýchlosti zvyčajne presahuje horné tlakové limity bežne používaného LC vybavenia. Čiastočne bol tento problém odstránený príchodom ultra-vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC – *ultra-high performance liquid chromatography*), ktorá ale požaduje špeciálne určené vybavenie i kolóny. Pri zvýšenej teplote však možno pracovať so „*sub-two-microne*“ kolónami aj na štandardnom LC vybavení za použitia podstatne vyšších lineárnych prietokových rýchlosti mobilnej fázy v porovnaní s operáciami pri teplote prostredia (5)(10).

3.3 Vplyv teploty na rozlíšenie

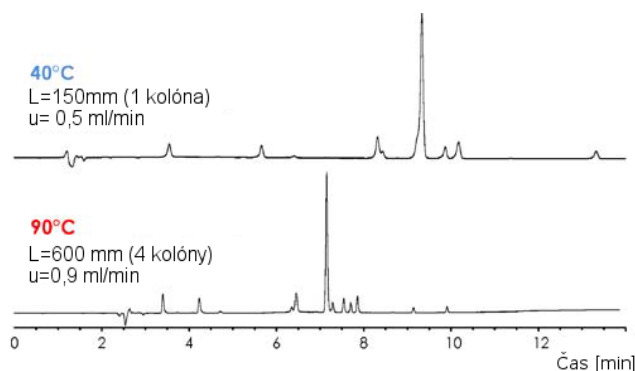
Dosiahnutie prijateľného rozdelenia analytov v primeranom čase je hlavným cieľom chromatografickej separácie. Stupeň rozdelenia analytov (dokonalého alebo nedokonalého) je možné kvantitatívne vyjadriť pomocou parametru rozlíšenia $R_{1,2}$. Rozlíšenie udáva mieru kvality separácie dvoch susedných pík. Hodnota rozlíšenia sa určí na základe retenčných časov analytov a šírky ich pík na úrovni základnej línie a šírky v polovičnej výške pík. Vyššia hodnota $R_{1,2}$ znamená lepšiu separáciu, no pri voľbe chromatografických podmienok nie je až tak dôležité dosiahnutie čo najvyššieho rozlíšenia, ale dosiahnutie práve potrebnej hodnoty. Väčšinou je potrebné, aby pre rozlíšenie platilo $R_{1,2} > 1,5$. Pri takýchto hodnotách dochádza k 0,1 %-nému prekrytiu dvoch separujúcich sa pík (6).

Popísaná vyššia možná prietoková rýchlosť je užitočná hlavne pri vysoko výkonných analýzach relatívne čistých a jednoduchých vzoriek. V prípade zložitejších

⁴ Ako bolo uvedené v 3.1, zvýšená teplota „splošťuje“ van Deemterovu krivku, čo umožňuje použiť vyššiu prietokovú rýchlosť bez obmedzenia účinnosti. Znížená viskozita mobilnej fázy pri zvýšenej teplote tiež vedie k nižšiemu spätnému tlaku.

vzoriek, kde sa vyžaduje vysoké rozlíšenie (a kapacita separácie⁵), je neželaným dôsledkom predĺženie času analýzy. Pri separáciách na kvapalnej fáze je možné rozlíšenie značne zvýšiť napríklad použitím UHPLC, superkritickej fluidnej chromatografie (SFC – *supercritical fluid chromatography*), kapilárnej elektrochromatografie (CEC – *capillar electrochromatography*) alebo micelárnej elektrokinetickej chromatografie (MEKC – *micellar electrokinetic chromatography*). Okrem týchto metód je však možné použiť aj bežné chromatografické vybavenie a na zlepšenie rozlíšenia využiť potenciál vysokej teploty, respektíve teplotného programovania. Faktory dôležité pre rozlíšenie (teda účinnosť, selektivita, retencia) sú totiž ovplyvnené teplotou (10).

Rozlíšenie je tiež spojené s veľkosťou častíc náplne kolóny a jej dĺžkou. Nižší spätný tlak v dôsledku zníženej viskozity pri zvýšenej teplote dovoľuje použiť dlhšie kolóny a vyššie prietokové rýchlosti zvýšia rozlíšenie (zároveň s účinnosťou) bez toho, aby sa čas analýzy značne predĺžil (5). Názorný príklad takéhoto prístupu poskytuje Obr. 5.



Obr. 5 Vplyv rozdielnej teploty a dĺžky kolóny na rozlíšenie a rýchlosť separácie pri analýze farmaceutickej zmesi

Zdroj: (5)

Zmes farmaceutického prípravku a pridaných nečistôt bola analyzovaná pri teplote 40°C na kolóne s dĺžkou 150 mm a následne pri teplote 90°C na štyroch sériovo zapojených 150 mm kolónach, teda s celkovou dĺžkou 600 mm. V dôsledku zníženého spätného tlaku a vyššej hodnoty optimálnej lineárnej prietokovej rýchlosti pre separáciu pri vysokej teplote bola použitá vyššia prietoková rýchlosť, a je možné vidieť poznateľne vyššie rozlíšenie dosiahnuté v kratšom čase.

⁵ Kapacita separácie n_p , resp. P_c (*peak capacity*) sa definuje ako počet pík, ktoré môžu byť v určitom časovom úseku rozlíšené tak, aby všetky látky boli na základnej línii rozdelené s rozlíšením $R = 1$ (6).

3.4 Vplyv teploty na selektivitu

Selektivita charakterizuje schopnosť chromatografického systému separovať – rozlíšiť rôzne zložky zmesi. Pri nastavení selektivity separácie patrí okrem typu stacionárnej fázy, *pH* mobilnej fázy, organických modifikátorov a ďalších parametrov, medzi dôležité faktory aj teplota. Obzvlášť užitočné je to v prípade polárnych a ionizovateľných zlúčenín, pretože ionizačné rovnováhy sú teplotne závislé (5).

Veľkou výhodou teploty je jednoduchá a priamočiara možnosť jej zmeny a kontrolovania, väčšinou totiž stačí parameter nastaviť pomocou softvéru alebo prístrojového panelu. Pretože ide o prístrojové nastavenie, riadenie teploty na danom vybavení je viac reprodukovateľné, ako napríklad zloženie alebo *pH* pufrovanej mobilnej fázy. Ďalšou výhodou je rozsah zmien v selektivite, ktoré možno dosiahnuť zmenou teploty: od menších zmien, ktoré zaistia na základnej línii požadovanú separáciu, až po veľké zmeny či dokonca zmenu v poradí elúcie analytov (10).

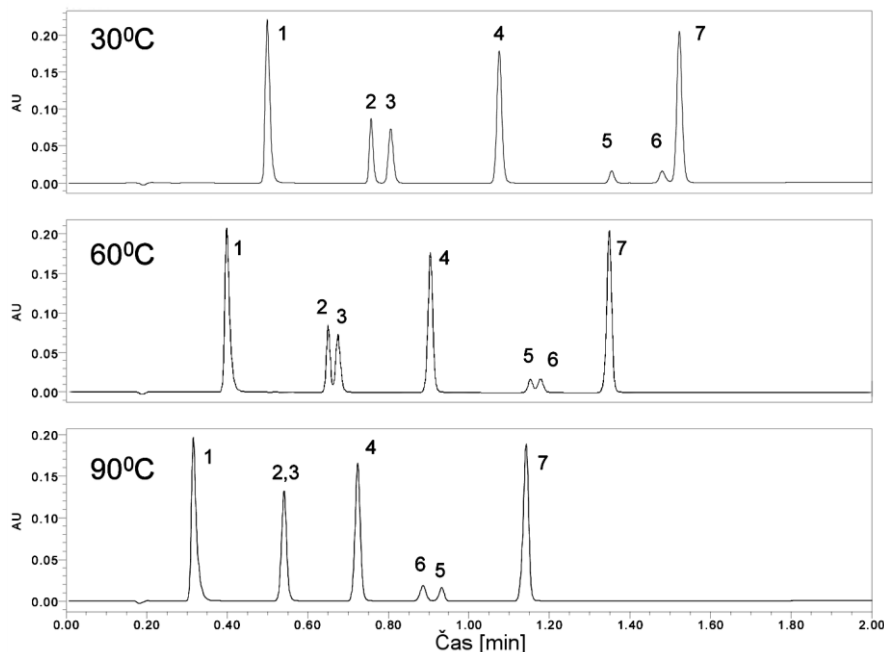
Li a Carr (12) konštatujú, že upravovanie teploty znateľne nepomôže pri separáciách jednoduchých zmesí, kde prevláda jeden retenčný mechanizmus. Optimalizácia procesu separácie prostredníctvom zmeny teploty sa však môže osvedčiť pri zložitejších zmesiach obsahujúcich polárne a ionizovateľné zlúčeniny.

V súčasnosti ale nie je k dispozícii komplexný model, ktorý by zahŕňal všetky parametre a tak predpovedal retenciu analytov v závislosti na teplote. Skutočnosť, že teplote sa pri ovplyvňovaní selektivity neprpisuje veľká úloha, možno prisúdiť tomu, že často sa študuje len veľmi úzky interval teplôt (9). Ak však vezmeme do úvahy široký teplotný interval, môže dôjsť aj k obrátenému elučnému poradiu, ako už bolo vyššie uvedené a demonštruje to Edge a kol. (13) pri analýze zmesi deviatich látok pri rôznych teplotách v rozmedzí 40°C až 180°C za použitia SHWC. V prípade kofeínu a aminoantipyrínu dochádzalo pri nižších teplotách k separácii, pri teplote 113°C píky splynuli, ale pri ďalšom zvyšovaní teploty sa tieto látky znova separovali, avšak v opačnom poradí.

Vypracovaniu komplexného teoretického modelu by sa preto malo venovať viac úsilia a nemal by byť založený na jedinom retenčnom mechanizme. Doteraz žiaľ nie je dostupný ani žiadny protokol na prenos už existujúcej metódy používanej pri teplote prostredia na metódu, ktorá by používala vysoké teploty (9).

Práve účinok teploty na poradie elúcie môže byť v procese vývoja metódy mäťúci, pretože poradie pík sa môže zmeniť. Na Obr. 6 vidieť tento fakt spolu so zníženým

retenčným časom všetkých analytov pri zvýšenej teplote. K zmenám však nedošlo v rovnakej miere: píky 2 a 3 sú pri teplote 30°C oddelené, ale pri teplote 90°C tieto látky eluujú spoločne, zatiaľ čo látky 5 a 6 rovnako dobre separované pri teplote 30°C, si pri teplote 90°C navzájom vymenili poradie.



Obr. 6 Vplyv teploty kolóny na elučné poradie siedmich štruktúrne nepríbuzných analgetík

Zdroj: (14)

Vplyv teploty na selektivitu je dosť zložitý, preto jednoduchý prenos metódy separácie pri teplote prostredia na separáciu pri vysokej teplote nie je ani možný. Veľmi dobrý príklad ilustrujúci tento fakt poskytol vo svojej štúdií Plumb a kol. (14).

3.5 Vplyv teploty na tvar píkov

Ďalšou praktickou veličinou kvality chromatografického procesu je tzv. symetria píku, ktorú je možné vyjadriť dvoma spôsobmi, a to ako faktor chvostovania T_f (*tailing factor*) alebo ako faktor symetrie A (*symmetry factor*). Faktor symetrie A sa určí ako pomer šírky zostupnej časti píku k šírke vzostupnej časti píku, najčastejšie v 5 % (resp. v 10 %) výšky píku. Ak platí, že hodnota $A = 1$, pík má ideálnu symetriu. Ak má faktor symetrie (alebo faktor chvostovania) vyššiu hodnotu, dochádza k chvostovaniu píku. V prípade nižšej hodnoty ide o tzv. frontovanie píku (hrnutie) (6).

Mnoho zlúčenín vo farmaceutickej analýze obsahuje bázičné skupiny. Tieto zlúčeniny môžu pri RP-HPLC s kolónami na báze silikagélu poskytovať nedostatočnú ostrosť píkov, čo vedie k problémom s kvantifikáciou a rozlíšením alebo k problémom

s rozdielnou retenciou v závislosti na množstve analyzovanej látky. Neuspokojivý tvar píkov bázičkých zlúčenín sa týka viacerých faktorov, za ktoré sú zrejme zodpovedné predovšetkým (kinetické) javy spôsobené zvyškovými silanolovými skupinami⁶ na povrchu kolóny. Experimentálne sa touto otázkou zaoberal McCalley (15), ktorý zistil, že zvýšená teplota nielen významne zvýši počet priehradiek N pri $pH = 3$ aj $pH = 7$ (kedy je nárast väčší), ale často dochádza aj k znateľnej redukcii v asymetrii píkov.

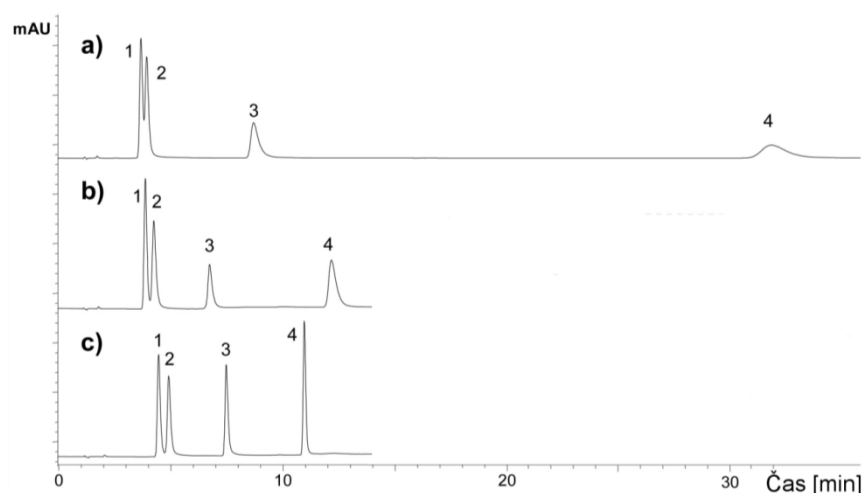
Podstatnú zmenu v zlepšení tvaru píkov pri zvýšenej teplote zdokumentoval aj Buckenmaier (16). Najslabšie analyzované bázy ($pK_a \sim 8$) ukázali výraznejšie zlepšenie než najsilnejšie bázy ($pK_a \sim 10$). Na základe ďalších meraní Buckenmaier predpokladá, že zlepšenie (aj čo sa týka účinnosti) môže byť značne ovplyvnené poklesom pK_a bázičkých analytov pri zvýšenej teplote, ktorý vedie k menšej miere protonácie. Zlepšenie účinnosti nastáva pravdepodobne v dôsledku zvýšenej kinetiky iónovej výmeny silanolov, prinajmenšom v študovanom teplotnom rozmedzí (do 70 °C).

Obmedzenie sekundárnych interakcií analytov so silanolovými skupinami prostredníctvom zvýšenia analytickej teploty sa javí byť vhodnejším riešením, ako zabrániť chvostovaniu píkov, než používať pufre s vysokou iónovou silou a extrémnym pH , čo sa negatívne odrazí na životnosti kolóny i chromatografického systému (5)(10).

Obr. 7 vzájomne porovnáva analýzy zmesi sulfónamidov v podmienkach gradientovej elúcie a teplotného programovania pri použití stacionárnej fázy na báze grafitového uhlíku:

- a) izotermické a izokratické podmienky poukazujú na silné retenčné charakteristiky použitej stacionárnej fázy,
- b) v izotermických podmienkach pri použití gradientovej elúcie sa čas analýzy skracuje a tvar píkov sa zlepšuje,
- c) najlepšie výsledky poskytujú izokratické podmienky v kombinácii s programovaním teploty – najkratší čas analýzy a vynikajúci tvar píkov.

⁶ Sekundárne interakcie často vedú k chvostovaniu píkov.



Obr. 7 Analýza zmesi sulfónamidov v podmienkach gradientovej elúcie a teplotného programovania

Zdroj: Upravené podľa (10)

Zlepšenie tvaru píkov bolo zaznamenané (17) aj v prípade stacionárnej fázy na báze oxidu zirkoničitého pokrytého uhlíkom a vysvetľuje sa zredukovaním silných elektrónových interakcií medzi polárnymi skupinami analytov a uhlíkovým povrchom, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné za výrazné chvostovanie píkov pri nízkych teplotách.

3.6 Vplyv teploty na detekovateľnosť

Teplota môže mať na citlivosť detekcie pozitívny, ale aj negatívny dopad, ak je citlivosť detektora ovplyvnená teplotou vstupujúcej mobilnej fázy tak, že v dôsledku zvýšenej teploty dochádza k redukcii signálu. Oba javy sú zdokumentované. Ukázal to napr. Agarwal (18) na prípade fluorescencie u aduktu malónďaldehydu a kyseliny tiobarbiturovej, kde pri každom poklese teploty o 1°C fluorescencia vzrástla o 2,5 % (chladením krytu fluorescenčnej lampy). V prípade fluorescenčnej detekcie je preto na dosiahnutie maximálnej citlivosti potrebné postkolónové ochladzovanie eluentu.

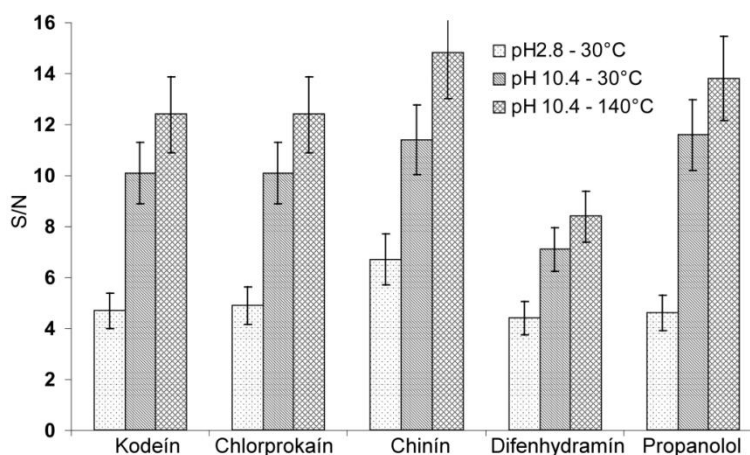
Ako uvádza iná štúdia (9), tieto zistenia potvrdzujú aj závery Giegolda, ktorý skúmal vplyv vysokej teploty eluentu na fluorescenčné a ultrafialové (UV – *ultra violet*) detektory a odparovací detektor rozptylu svetla (ELSD – *evaporative light scattering detector*). V prípade prvých dvoch detektorov došlo pri náraste teploty k redukcii plochy pod píkom, zatiaľ čo v prípade ELSD pri rovnako zvýšenej teplote odozva detektora vzrástla. Z vysokej teploty eluentu môžu teda vyťažiť detekčné systémy založené na premene eluentu v kvapalnom stave na stav plyný. Postkolónové

ochladzovanie nie je nevyhnutné pri použití ELSD a hmotnostného spektrometra (MS – *mass spectrometer*).

Zvyčajne sa citlivosť metódy LC-MS určuje ako pomer signálu a šumu chromatografického píku S/N (*signal-to-noise ratio*) pre jednotlivé eluenty. Ovplyvňujúcimi parametrami sú prietoková rýchlosť, zloženie a pH mobilnej fázy a pomer organickej a vodnej zložky v mobilnej fáze. Mobilné fázy s vysokým podielom organickej zložky poskytujú vyššiu citlivosť pri použití ionizácie elektrosprejom (ESI – *electrospray ionization*) v dôsledku nižšieho povrchového napätia a tak lepšieho sprejovania. Možno očakávať, že ak sa mobilná fáza dostane k zdroju ionizácie pri vysokej teplote, desolvatácia analytov sa zlepší. Takisto sa pri zahrievaní mobilnej fázy na vysokú teplotu bude meniť proces ionizácie analytov v mobilnej fáze pri použití ESI a proces vyparovania pri použití chemickej ionizácie za atmosférického tlaku (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*). Z týchto dôvodov je pri operáciách pri LC-MS pri vysokých teplotách potrebné posudzovať zmeny v chromatografii i ionizáciu v zdroji detekcie (19).

Experimentálne bolo u skúmaných sulfónamidov pozorované (19) zlepšenie signálu pri oboch spôsoboch ionizácie. Pomer S/N bol meraný v rozmedzí teplôt od 30 °C až do 180 °C, pričom pri teplote 180 °C došlo k 4-násobnému zlepšeniu v prípade APCI a pri teplote 90 °C k 1,7-násobnému zlepšeniu v prípade ESI. Aj teploty vyššie ako 90 °C spôsobili u ESI nárast signálu, ale tiež nárast šumu, čo v skutočnosti pomer S/N znížilo.

Názornú ukážku zlepšenia pomeru S/N pri MS detekcii s použitím ESI poskytuje Obr. 8 na príklade piatich farmaceutických látok, ktoré boli detegované pri teplotách 30 °C a 140 °C.



Obr. 8 Porovnanie pomeru S/N pri MS-ESI detekcii bázičkých látok pri rôznej teplote a hodnote pH

Zdroj: Upravené podľa (20)

Skúma sa tiež uskutočniteľnosť spojenia HTLC s plameňovo-ionizačnou detekciou (FID – *flame ionization detection*), ktorá je univerzálna a veľmi senzitívna v porovnaní s tradičnými UV detektormi. Toto spojenie LC a FID je umožnené použitím čistej vody ako mobilnej fázy pri SHWC (21).

3.7 Vplyv teploty na spotrebu organických rozpúšťadiel

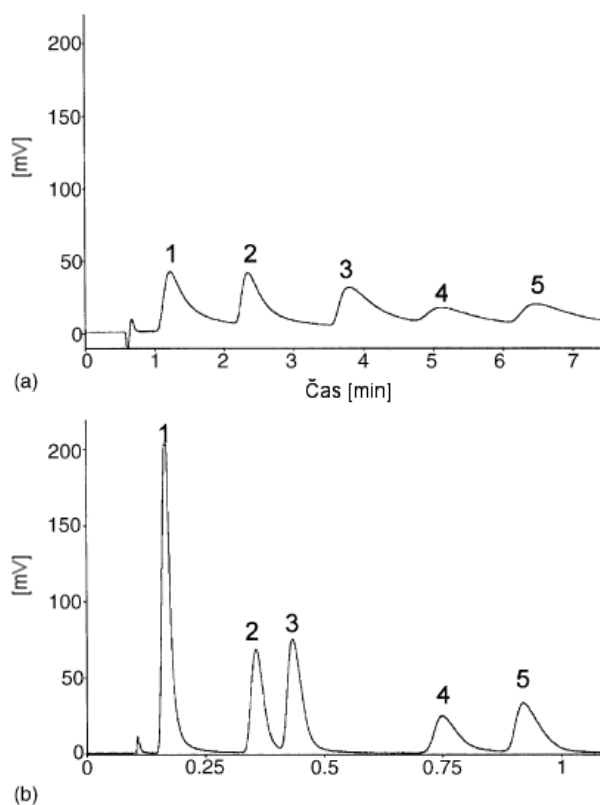
V neposlednom rade je potrebné oceniť vplyv HTLC na zloženie mobilných fáz v LC. Denne sa pri analýzach spotrebuje množstvo nákladných organických rozpúšťadiel a vzniká toxický odpad, ktorý predstavuje ďalšie zvýšené náklady na svoju likvidáciu. Nezanedbateľný je samozrejme aj výrazný ekologický aspekt chromatografických procesov, umožnený použitím zvýšenej teploty pri analýze. Zvýšená teplota dovoľí pri zachovanej retencii znížiť podiel organického rozpúšťadla. Napríklad pri teplotnom programovaní a náraste teploty o 5 °C je zdokumentovaný (22) podobný účinok, ako má pri gradientovej elúcii zmena objemu acetonitrilu o 1 %, prípadne v starších štúdiách (10) je zdokumentovaný teplotný nárast o 3,75 °C s efektom ako nárast metanolu o 1 %.

Pri zvýšenej teplote dochádza pri procesoch s viskóznymi rozpúšťadlami k poklesu spätného tlaku a tieto analýzy je potom možné uskutočniť v čase porovnateľnom s procesmi s neviskóznymi rozpúšťadlami pri teplote prostredia. To dovoľí použiť etanol ako praktickú alternatívu voči toxickým rozpúšťadlami, akými sú acetonitril a metanol (5). Dokonca je možné použiť čistú veľmi horúcu vodu (SHW – *superheated water*), pričom termodynamické zmeny pozorované pri náraste teploty

medzi 100 °C až 200 °C sú podobné ako pri zmenách mobilnej fázy pridaním organického modifikátora pri stálej teplote (23).

Pri použití subkritickéj vody s teplotou 210 °C bez organického modifikátora sa podarilo na polymérnej stacionárnej fáze separovať polárne aj hydrofóbne látky, hlavne zo skupiny fenolov a liečiv (8). Ukázalo sa, že je možná ich UV detekcia aj pri veľmi nízkych vlnových dĺžkach (190 nm) a tak môžu byť detegované aj mnohé látky, ktoré pri vyšších vlnových dĺžkach neabsorbujú.

Obr. 9 ukazuje výrazný rozdiel v chromatogramoch pri separácii derivátov kofeínu pri použití mobilnej fázy voda : metanol (60 : 40, v/v) pri teplote 25 °C (obrázok (a)) a následne pri použití čistej vody s teplotou 150 °C (obrázok (b)).



1 – hypoxantín, 2 – teobromín, 3 – teofylín, 4 – kofeín, 5 – β -(hydroxyetyl)teofylín

Obr. 9 Separácia derivátov kofeínu

Zdroj: (24)

Nespornou výhodou použitia vody sú okrem netoxicity aj jej ďalšie vlastnosti ako napríklad nehorľavosť (7), čo zase zvyšuje bezpečnostný aspekt laboratórnej praxe.

4 Chromatografické systémy vo vysokoteplotnej kvapalinovej chromatografii

Kvapalinový chromatograf sa všeobecne skladá z týchto častí s uvedenými funkciami:

- zásobníky mobilnej fázy a vysokotlakové čerpadlo: uchovávanie a transport mobilnej fázy,
- autosampler, resp. manuálny dávkovací ventil: dávkovanie vzorky,
- chromatografická kolóna a termostat kolóny: separácia látok,
- detektor: detekcia látok,
- počítač a softvér: záznam dát a následné vyhodnotenie (6).

Úspešné zavedenie HTLC sa musí vysporiadať predovšetkým s nasledovnými obmedzeniami:

- teplotná stabilita kolón a ich komerčná dostupnosť,
- predhrievanie mobilnej fázy (má zabrániť rozmývaniu elučných zón v dôsledku rozdielnych teplôt na kolóne),
- účinný ohrev priestoru okolo kolóny a zároveň vstupujúcej mobilnej fázy (má umožniť rýchle programovanie teplôt),
- ochladenie a udržanie efluentu⁷ v kvapalnom stave (5).

4.1 Mobilné fázy – teplotný gradient a termostatovanie kolón

Pri prietoku mobilnej fázy kolónou pri veľmi vysokom tlaku sa (trením) mechanická energia mobilnej fázy mení na energiu tepelnú, ktorá je ďalej rozptyľovaná do mobilnej fázy a kolóny. V dôsledku vzniku trecieho tepla (*frictional heating*) a jeho rozptylu sa na kolóne utvárajú teplotné gradienty – axiálny a radiálny.

Radiálny gradient vzniká rozptylom tepla naprieč prierezom kolóny, teda teplota klesá smerom od stredu kolóny k plášťu. Teplota ovplyvňuje viskozitu mobilnej fázy i rovnovážne konštanty analytov, čo vedie k rozdielnym rýchlostiam elúcie v rôznych častiach elučnej zóny, prípadne k významnej strate separačnej účinnosti. Radiálny gradient sa tvorí v kolónach, ktoré sú umiestnené v termostate za izotermických

⁷ Efluent je mobilná fáza na výstupe z kolóny.

podmienok, t. j. teplovzdušný ohrev s nútenou cirkuláciou vzduchu (*forced-air oven*) alebo termostatovaný vodný kúpeľ.

Axiálny (pozdĺžny) gradient môže spôsobiť zmeny v retencii látok, ale na účinnosť kolóny významný vplyv nemá. Axiálny gradient vzniká pri umiestnení kolóny do termostatu bez cirkulácie vzduchu. Pri tzv. adiabatickom deji, kedy teplota steny kolóny nie je konštantná, vyvoláva nízky prevod tepla ohrievanie kolóny smerom k jej výstupu (6).

4.1.1 Predhrievanie mobilnej fázy

Vo všeobecnosti sa uznáva, že predhrievanie mobilnej fázy je absolútne nevyhnutné za účelom zabránenia vzniku uvedených teplotných gradientov. Tento problém sa označuje ako *thermal mismatch*⁸ a vzniká, pretože v porovnaní s kolónami vyrobenými z nehrdzavejúcej ocele sú silikagélové alebo polystyrénové náplne kolón len slabými tepelnými vodičmi. Diskusie o prijateľnom rozdieli teplôt medzi vstupujúcou mobilnou fázou a stacionárnou fázou často nie sú experimentálne podložené (9).

V niektorých prípadoch môže v dôsledku *thermal mismatch* dôjsť až k rozštípeniu píkov, ako to zaznamenal Fields (25). Tento jav nastal pri použití 15 cm dlhej ohrievacej cievky a teplote 160 °C pri prietokových rýchlostiach vyšších ako 1 ml/min, ale pri nahradení cievkou s dĺžkou 150 cm boli píky symetrické aj pri najvyššej prietokovej rýchlosti – 1,5 ml/min. Teutenberg (26) so spolupracovníkmi však na špeciálne navrhnutom systéme ohrevu pre procesy pri vysokoteplotnom gradiente demonštrovali, že na získanie ostrých píkov nie je nevyhnutná tak dlhá predhrievacia cievka. Pri separácii zmesi obsahujúcej štyri steroidy obdržali symetrické píky pri teplote 185 °C a prietokovej rýchlosti 5 ml/min.

Vzniknuté rozdielne výsledky sú závislé na spôsobe ohrevu: Fields použil teplovzdušný ohrev s nútenou cirkuláciou vzduchu, kým Teutenberg použil vyhrievací blok s predhrievacou kapilárou tesne zovretou medzi dvoma hliníkovými blokmi. V porovnaní s teplovzdušnými i kvapalinovými termostatmi⁹ sa vyhrievacie bloky javia ako najvhodnejšie, pretože vďaka tesnému kontaktu kolóny a vyhrievacej jednotky v nich dochádza k najefektívnejšiemu prenosu tepla. Diskutabilným však ostáva, do

⁸ *Thermal mismatch* sa definuje ako rozdiel medzi teplotami kolóny a mobilnej fázy, ktorý vytvára teplotný profil (gradient) naprieč polomer kolóny (5).

⁹ t. j. s vodnými alebo olejovými kúpeľmi

akej miery údaj zobrazovaný na displeji (nastavená teplota) zodpovedá skutočnej teplote na určitom mieste vo vnútri kolóny (9).

Isté problémy tak prináša aj prenos metódy medzi laboratóriami. Aj keď sa prístrojové vybavenie líši len nepatrne a všetky parametre metódy sa presne zachovávajú, získané výsledky sú rôzne. Je teda nutné dôkladne špecifikovať typ termostatovania kolóny, pretože inak môžu byť skutočné teploty kolón rozdielne (27). Skutočnú teplotu je možné určiť pomocou korekčného faktora¹⁰, na ktorý poukázal Nikitas (28).

4.2 Stacionárne fázy – používané náplne kolón a termostabilita

Stacionárne fázy (SF) tvoria nepohyblivú časť chromatografického systému. Ide teda o náplň kolóny, na ktorej dochádza k vlastnému separačnému procesu, preto sú na stacionárne fázy kladené viaceré všeobecné požiadavky. Stacionárne fázy by mali byť chemicky a teplotne stabilné, nesmú reagovať s mobilnou fázou, ani sa v nej rozpúšťať. Vymývanie stacionárnej fázy z kolóny sa môže prejaviť znížením citlivosti detekcie, resp. jej úplným znemožnením. Spravidla je vymývanie spôsobené použitím nevhodnej mobilnej fázy alebo vysokej teploty.

Podľa chemického zloženia možno stacionárne fázy¹¹ rozdeliť na:

- anorganické oxidy (oxid kremičitý – silikagél, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý, oxid titaničitý),
- chemicky viazané fázy na báze silikagélu,
- polymérne stacionárne fázy,
- hybridné stacionárne fázy,
- stacionárne fázy na báze grafitového uhlíku (6).

Možné použitie jednotlivých typov stacionárnych fáz v HTLC, resp. SHWC, je rozvedené v nasledujúcom texte.

4.2.1 Anorganické oxidy – silikagél

Silikagél je všeobecne najrozšírenejší anorganický sorbent. Je to takmer ideálny nosič, ktorý je po chemickom naviazaní ligandov vhodný pre RP-LC separácie. Jeho vysoká mechanická odolnosť umožňuje tiež použitie pri vysokých tlakoch používaných

¹⁰ Priemerná chyba (*average percentage error*) medzi experimentálne zistenými a predpokladanými retenčnými časmi bola menej ako 2 %.

¹¹ Stacionárna fáza môže byť: a) tuhá látka; b) film kvapaliny zakotvený alebo chemicky naviazaný na tuhú maticu (nosič) (6).

v HPLC. Najčastejšie má silikagél poréznu amorfnú formu so zložením $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, pričom voda je chemicky viazaná v nestechiometrickom množstve za vzniku silanolových skupín Si-OH.

Silanolové skupiny sú aktívnymi centrami na povrchu silikagélu, ktoré sú na ňom nerovnomerne rozmiestnené a líšia sa svojou kyslosťou. Povrchu silikagélu udeľujú polárny charakter a využívajú sa aj pri príprave chemicky viazaných fáz. Silanolové skupiny môžu byť izolované, vicinálne, geminálne alebo viazané vodíkovými väzbami (susedné skupiny pri vhodnej polohe). Rozmiestnenie skupín závisí na spôsobe spracovania silikagélu.

Pri vysokej teplote dochádza k odstráneniu geminálnych i vodíkovými väzbami viazaných silanolových skupín, ale jednoduché a izolované skupiny sa naopak ustávajú. Vodíkovou väzbou je na silanolovú skupinu adsorbovaná aj voda, ktorú možno odstrániť zahriatím na 150 °C, čím sa silikagél aktivuje. Pri teplote vyššej ako 200 °C nastanú ireverzibilné zmeny. Pri teplotách 300 °C až 500 °C susedné hydroxylové skupiny kondenzujú na siloxanové a pri normálnej teplote ich nie je možné hydratovať. Pri teplote vyššej ako 500 °C sa voľné hydroxylové skupiny odštiepia a silikagél získa hydrofóbne vlastnosti.

Vďaka slabo kyslému charakteru povrchu silikagélu sa na ňom bázické látky zdržiavajú viac ako kyslé a neutrálne. Zároveň ale u bázických látok môže dochádzať k chvostovaniu pík, ktorému sa dá zabrániť pridaním slabej organickej bázy (napr. trietylamínu) do mobilnej fázy. Hodnota *pH* však nesmie byť vyššia ako 8, pretože pri nej dochádza k rozpúšťaniu silikagélu. Použitie silikagélu v limitovanom rozsahu *pH* do hodnoty 7 predstavuje jeho hlavnú a zásadnú nevýhodu (6).

4.2.2 Anorganické oxidy ďalších kovov

Stacionárne fázy na báze kovových oxidov patria medzi polárne sorbenty rovnako ako silikagél, ktorý začali nahradzovať vďaka svojej omnoho väčšej chemickej stabilite. Hlavným prínosom je potom dlhšia životnosť kolón, vyššia flexibilita pri vývoji metód (možnosť pracovať v celom rozsahu *pH* a pri teplotách asi do 200 °C) a menšie vymývanie ligandu. Uplatnenie v HPLC našli oxid titaničitý, oxid hlinitý (alumina; v súčasnosti sa ako SF takmer nepoužíva) a oxid zirkoničitý, ktorý je najviac skúmaný i prakticky používaný.

Oxid zirkoničitý (pripravený vo forme monodisperzných poréznych sférických častíc) vykazuje v porovnaní so silikagélovými kolónami porovnateľnú účinnosť. Jeho

najväčšou výhodou je už spomenutá chemická, teplotná i mechanická stabilita (odolnosť pri vysokom tlaku). Vďaka vyššiemu izoelektrickému bodu nedochádza k interakciám s bázickými látkami v takej miere ako u silikagélu. Okrem analogicky prítomných hydroxylových skupín sa na povrchu oxidu zirkoničitého nachádzajú adsorpčné centrá charakteru Lewisových kyselín. Povrch býva často modifikovaný tenkou vrstvou polybutadiénu, polystyrénu alebo pyrolyticky vylúčeného uhlíka (prípadne ďalej modifikovaného ligandom C₁₈) (6).

Napriek teplotnej stabilite predpokladanej u všetkých troch vyššie uvedených oxidov, je aj v oblasti HTLC najviac zdokumentované použitie oxidu zirkoničitého. Zrejme je to spôsobené rozpustnosťou hliníka pri nízkom *pH* a nedostupnosťou kolónových náplní na báze titánu vhodných pre chromatografiu, a tiež nedostatkom poznatkov o povrchových vlastnostiach týchto kovov (29).

Testované boli viaceré modifikácie SF na báze oxidu zirkoničitého, napríklad SF pokryté polystyrénom, polyetylénimínom, fosfátom alebo uhlíkom. Väčšina sa ukázala byť ako teplotne stabilná (30). Pozoruhodné výsledky boli zaznamenané (31) pri separácii polycyklických aromatických uhlíkovodíkov na kolóne pokrytej polybutadiénom. Pri teplote 200 °C bola táto kolóna stabilná najmenej 1 300 kolónových objemov, jej účinnosť sa dokonca po vystavení vysokej teplote zvýšila. Na ilustráciu, pri následnej separácii pri teplote 40 °C sa parameter *N* zvýšil približne o 300 % v porovnaní s hodnotou pred vystavením kolóny teplotnej záťaži. Vďaka lepšej stabilite a robustnosti SF na báze oxidu zirkoničitého sú tieto kolóny dobrou voľbou pre použitie pri HTLC s čistou vodou ako mobilnou fázou – pri SHWC (29).

Obyčajne sa pri použití kolón na báze oxidu zirkoničitého pracuje pri SHWC v rozmedzí teplôt 100 °C až 200 °C, najvyššia testovaná teplota bola 370 °C (32). Pri zachovaní retencie aj účinnosti pri teplote 100 °C bola kolóna pokrytá polystyrénom stabilná pri najmenej 7 600 kolónových objemoch (33).

4.2.3 Chemicky viazané fázy na báze silikagélu

Stacionárne fázy chemicky viazané na silikagélovom nosiči prinášajú niekoľko praktických výhod. V prvom rade takmer nedochádza k vymývaniu stacionárnej fázy z nosiča. Nedochádza ani k jej rozpúšťaniu v mobilnej fáze a mechanickému strhávaniu pri vysokej prietokovej rýchlosti mobilnej fázy. Výhodná je tiež robustnosť stacionárnej fázy k zmene teploty a zloženiu mobilnej fázy, preto na kolóne nedochádza k porušeniu rovnováhy a tak je možné operovať v rôznych pracovných podmienkach (voliť zloženie

mobilnej fázy i meniť teplotu). Povrchové hydroxylové skupiny silikagélu sú modifikované príslušnou chemickou reakciou s organickými zlúčeninami – ligandmi. Od charakteru ligandu potom závisí selektivita pripravenej fázy.

Komerčne sú dostupné nepolárne stacionárne fázy s alkylovými reťazcami s dĺžkou C₂ až C₃₀, ktoré možno univerzálne použiť pre polárne i nepolárne analyty. Najrozšírenejšou stacionárnou fázou tohto typu je oktadecylsilikagél (ODS) – chemicky viazaný alkyl C₁₈. Vyššiu polaritu majú fenylové, alkylfenylové (napr. fenylohexylová, propylfenylová) a difenylové stacionárne fázy. V rozmedzí *pH* 1 až 7 je na alkylfenylových a difenylových SF možné používať 100 %-nú vodnú mobilnú fázu bez rizika zrútenia stacionárnej fázy, čo v prípade ODS nie je možné.

Stredne polárne sú nitrilové (alkylnitrily) a amínové stacionárne fázy. Z ďalších používaných stacionárnych fáz možno spomenúť kyanopropylovú SF, diolovú SF, nitrofenylovú SF či fluorované SF – napr. pentafluórfenylpropylovú SF, na ktorej má separácia podobný priebeh ako na ODS.

Najväčšou nevýhodou chemicky viazaných fáz na báze silikagélu je ich obmedzená stabilita v bázičkom (rozpúšťanie silikagélu a pokles účinnosti až deštrukcia SF) a silne kyslom prostredí (hydrolýza siloxanovej skupiny až strata viazanej fázy). To znamená potrebu striktno udržiavať *pH* mobilných fáz v rozmedzí *pH* 3 až 8. Možnosť optimalizácie zloženia mobilnej fázy je tak výrazne limitovaná (6).

Pri použití vysokej teploty je hlavným problémom hydrolýza náplne kolóny na báze silikagélu a preto sa väčšina separácií uskutočňuje pri relatívne nízkej teplote¹². Napriek svojej teplotnej nestabilite tieto kolóny poskytujú lepší tvar pík a vyššiu účinnosť v porovnaní s polymérnymi SF (29). Väčšinou sú teda popisované separácie pri teplotách pod 100 °C, ale novo vyvinuté hyperzosieťované silikagélkové náplne (najmä C₈) boli odolné v kyslom prostredí až do teploty 150 °C (34).

Na stacionárnych fázach na báze silikagélu sa uskutočňuje väčšina chromatografických separácií práve pre použitie SHWC, pričom typické teplotné rozmedzie je 50 °C až 150 °C. Extrémnym prípadom je teplota 300 °C (35). Väčšina dostupných štúdií však nehodnotí teplotnú odolnosť z dlhodobejšieho hľadiska. Pri používaní teplôt v rozsahu 23 °C až 160 °C bola kolóna Hypersil BDS¹³ (*base deactivated silica*) stabilná iba približne dva dni práce, ale pri teplote 60 °C ukázala

¹² Napr. rýchla separácia peptidov, proteínov a nukleových kyselín pri teplote 80 °C.

¹³ Hypersil BDS C₁₈ (100 x 3 mm, 3 µm); Thermo, Runcorn, Veľká Británia

prakticky použiteľný potenciál, napríklad pri analýze močových vzoriek obsahujúcich paracetamol (36). Iná štúdia (33) ukázala stabilitu kolóny Hypersil BDS pri teplote 100°C pri viac ako 1000 kolónových objemoch, čo sa týka zachovania retencie, ale účinnosť značne poklesla po približne 400 objemoch. Kolóny s naviazanými alkylmi C₈¹⁴ a C₁₈¹⁵ boli pri rovnakej teplote stabilné až viac než 6000, resp. 8000 objemov. Podľa Yanga (29) sú to výsledky povzbudzujúce viac, ako sa na prvý pohľad javia.

4.2.4 Polymérne stacionárne fázy

Polymérne stacionárne fázy väčšinou vyhovujú požiadavke väčšej stability a možnosti pracovať v celom rozsahu *pH* i pri vysokých teplotách. Sú tvorené sieťou maličkých mikrosfér, ktoré vytvárajú poréznu štruktúru. Nevýhodou sú v tomto prípade mikropóry (asi 1 nm) v časticiach polymérneho sorbentu, ktoré predovšetkým u malých molekúl zabraňujú prevodu hmoty. Obmedzením polymérnych SF je aj maximálny pracovný tlak na kolóne, a to 20 MPa. Pri RP-LC sú polymérne SF kompatibilné s konvenčnými organickými rozpúšťadlami, ale pri vysokom podiele organickej zložky v mobilnej fáze sa môžu tieto SF zrážať alebo bobtnať. Najčastejšie používaným typom je kopolymér styrénu a divinylbenzénu (PS-DVB), prípadne polyvinylalkoholové (PVA) a metakrylátové fázy. Vrstva polyméru (napr. polysiloxany, polyétery) môže byť nanosená aj na anorganický substrát (silikagél, oxid zirkoničitý). Vznikne tak výhodná kombinácia mechanickej odolnosti anorganického základu so selektivitou a chemickou stabilitou polyméru (6).

Podľa údajov získaných Yangom (29) je v HTLC najpoužívanejším polymérnym materiálom PS-DVB, ktorý sa typicky používa v teplotnom rozmedzí 100 °C až 200 °C bez výrazného vymývania stacionárnej fázy. Polymérna kolóna typu PS-DVB¹⁶ bola z hľadiska stability testovaná (33) pri teplote 100 °C, kde vydržala 11 000 kolónových objemov. Tá istá kolóna bola potom pri zahriatí na 150 °C stabilná ďalších 9 000 objemov, pričom neklesla retencia ani účinnosť, čo svedčí o vynikajúcej stabilite pri daných teplotných podmienkach.

4.2.5 Hybridné stacionárne fázy

Hybridné stacionárne fázy boli predstavené okolo roku 2000. Ide o sorbenty, ktorých základ vznikol spojením anorganického silikagélu a organického organosilanu –

¹⁴ Zorbax RX-C₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm); Agilent Technologies, Wilmington, Delaware, USA

¹⁵ Nucleosil C₁₈ AB (150 x 2 mm, 5 µm); Macherey-Nagel, Düren, Nemecko

¹⁶ PRP-1 (150 x 2,1 mm, 10 µm); Hamilton, Reno, Nevada, USA

polyméru $R_3[-O-Si(OR)(CH_3)-O]-SiR_3$, pričom R je metyl alebo etyl. Taktiež by hybridné stacionárne fázy mali spájať výhody silikagélu (vysoká účinnosť, mechanická odolnosť) s výhodami polyméru (chemická a teplotná stabilita, eliminácia zvyškových silanolových skupín). Na hybridných stacionárnych fázach je tým pádom u bázičných látok výrazne obmedzené chvostovanie píkov, ktoré dosahujú omnoho lepšiu symetriu v porovnaní s konvenčnými silikagélovými fázami (6).

V dostupnej literatúre sa zatiaľ o použití hybridných SF vyskytujú len ojedinelé zmienky, ale ich potenciál sa postupom času stáva objektom širšieho skúmania.

4.2.6 Stacionárne fázy na báze grafitového uhlíka

Výskum vlastností uhlíka ako stacionárnej fázy pre chromatografiu ukázal, že najvhodnejší je porézny grafitový uhlík (PGC – *porous grafitic carbon*), ktorý sa v súčasnosti vyrába pod viacerými komerčnými názvami. Grafitový uhlík je veľmi silný sorbent a pri použití vodno-organických mobilných fáz dochádza k silnej retencii veľkých molekúl. Presný mechanizmus retencie nie je v dôsledku svojej komplikovanosti zatiaľ vysvetlený. Čo sa týka retencie hydrofóbných látok, uhlíkový sorbent má v porovnaní so sorbentmi typu alkylsilikagélov vyššiu afinitu. Táto afinita sa ešte zvyšuje v prípade aromatických a polárnych látok.

Výhodou uhlíkových SF je tiež možnosť zmeny retencie bázičných látok zmenou *pH* mobilnej fázy ako aj možnosť lepšie predvídať ich správanie (alkylsilikagély obsahujú zvyškové silanolové skupiny a v alkalických oblastiach *pH* sa rozpúšťajú) (6).

PGC sa okrem odolnosti voči agresívnym mobilným fázam v celom rozmedzí *pH* od 0 do 14 vyznačuje tiež odolnosťou voči vysokým teplotám približne okolo 200 °C, čím je dovolené aj jeho použitie v HTLC (37). Ako príklad je možné uviesť separáciu polárnych látok na PGC kolóne¹⁷ pri teplote 225 °C. Pre niektoré analyty si kolóna zachovala veľmi vysokú retenciu aj pri daných extrémnych teplotných podmienkach (36).

4.3 Detekcia – spôsoby a špecifiká

V konvenčnej kvapalinovej chromatografii dominujú v oblasti detekcie spektrometrické metódy v ultrafialovej a viditeľnej (UV-VIS – *ultra violet-visible*) oblasti svetla a fluorescenčné spektrometrické metódy, pretože detekčné možnosti sú často ovplyvnené prítomnosťou organického rozpúšťadla v mobilnej fáze. V menšej

¹⁷ ZirChrom-CARB (150 x 4,6 mm, 3 µm); ZirChrom Separations, Anoka, Minnesota, USA

miere sa používajú tiež elektrochemické alebo refraktometrické detektory. Stále viac sa ale rozširujú iné metódy, ako napríklad hmotnostný spektrometer (MS – *mass spectrometer*), odparovací detektor rozptylu svetla (ELSD – *evaporative light scattering detector*) alebo detektor nabitého aerosolu (CAD – *charged aerosol detector*). Tieto sú však najčastejšie obmedzené nežiaducou prchavosťou (tekavosťou) analytov, ktorá musí byť výrazne nižšia ako prchavosť zložiek mobilnej fázy. Výhodou úplne neorganického eluentu (v prípade SHWC) by bola uskutočniteľnosť predovšetkým plameňovo-ionizačnej detekcie (FID – *flame ionization detection*) alebo zjednodušenie detekcie pomocou MS. V prípade MS detekcie môžu zmeny rozpúšťadla pozmeniť ionizačný proces, preto je výhodnejšie namiesto gradientovej elúcie použiť teplotné programovanie, ktoré rovnako umožní elúciu analytov v širokom rozmedzí polarít. Konštantné zloženie mobilnej fázy je vhodné aj pre nebulizačné systémy (napr. ELSD), kde ostanú vlastnosti spreja nezmenené (3).

Možnostiam aplikácie a špecifikám bežných i menej tradičných LC detektorov pri použití v HTLC (resp. SHWC) sú venované jednotlivé podkapitoly.

4.3.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrická detekcia absorbancie v UV-VIS oblasti spektra nachádza široké uplatnenie aj v SHWC. Výhodou použitia 100 %-ne vodnej mobilnej fázy je fakt, že na pozadí nie je nameraná žiadna absorbancia eluentu. Obmedzením v SHWC je však potreba zaistiť dostatočnú odolnosť detekčnej cely, aby vydržala spätný tlak, ktorý bol použitý na kolóne, aby sa zabránilo vareniu vody. Je tiež žiaduce kontrolovať teplotu eluentu na výstupe z kolóny pred vstupom do detektora, pretože teplotné zmeny môžu na základnej línii spôsobiť šum (3).

Vysoká UV priepustnosť vody dovoľuje pracovať s krátkymi 200 nm vlnovými dĺžkami, kde má väčšina analytov maximum absorbancie. V prípade čistých vzoriek to umožňuje zvýšiť senzitivitu použitím vlnových dĺžok pod 200 nm. V prípade reálnych vzoriek je však práca v oblasti pod 200 nm obmedzená, pretože väčšina zložiek matrice takisto silno absorbuje veľmi krátke UV vlnové dĺžky a mohli by tak „ukryť“ analyt (38).

4.3.2 Plameňovo-ionizačné detektory

Princípy plameňovo-ionizačného detektora boli prvýkrát popísané pred takmer 60 rokmi a postupom času sa FID stal najpoužívanejším, citlivým a spoľahlivým

detektorom v plynovej chromatografii (GC – *gas chromatography*). FID je takmer univerzálny, pretože deteguje všetky molekuly obsahujúce uhlík. V prípade LC však mobilná fáza obsahuje organické molekuly, ktoré by FID „zaslepili“. Početné pokusy spojiť FID s LC boli založené na nebulizácii a odparovaní malých kvapôčok. Podmienkou detekcie pomocou FID je neprchavosť (netekavosť) analytov, a tak neboli tieto systémy veľmi užitočné, pretože dochádzalo k strate analytov počas odparovania rozpúšťadla. V posledných rokoch boli pre spojenie LC-FID predložené mnohé technické zlepšenia, všetky založené na eliminovaní organického rozpúšťadla pred detekciou.

Spojenie LC-FID predpokladá prácu so 100 %-ne vodnou mobilnou fázou, ale pri teplote prostredia je voda v RP-LC veľmi slabou mobilnou fázou. Problém elučnej sily však odstraňuje skutočnosť, že pri náraste teploty polarita vody klesá (elučná sila sa zvyšuje). Ako príklad možno uviesť, že pri teplote 150 °C sa predpokladá elučná sila čistej vody porovnateľná so zmesou metanol : voda (50:50, v/v) pri teplote prostredia. Pretože čistá voda neobsahuje žiadne organické molekuly, v prípade SHWC je možné priame spojenie s FID. Niekedy je však potrebné vysoké prietokové rýchlosti rozdeliť a do FID sa posiela len 5 % až 10 % (38).

Pri dlhodobej práci so 100 %-nou vodnou fázou by mohlo dôjsť k bakteriálnemu nárastu na kolóne, ale Guillaume (38) tento problém nespozoroval, v jeho prípade ju nebolo ani nutné čistiť alebo regenerovať. Použitá čistá voda s teplotou vyššou ako 150 °C sterilizovala potenciálne kontaminanty, ktoré by mohli byť prítomné pri teplote prostredia.

Pomocou HTLC-FID boli testované mnohé látky, ktoré neabsorbujú v UV oblasti. Uhl'ovodíky, karboxylové kyseliny aj aminokyseliny poskytli vždy dobre separované symetrické píky. Najčastejšie sa však HTLC-FID používa pri separáciách alkoholov s dĺžkou reťazcov medzi C₁ až C₆. Pri porovnaní výsledkov dosiahnutých v HTLC-FID s výsledkami v GC-FID alebo GC-MS bola v prípade oboch metód zaznamenaná vynikajúca korelácia (38).

4.3.3 Odparovací detektor rozptylu svetla

Princíp odparovacieho detektora rozptylu svetla (ELSD) je založený na nebulizácii eluentu plynom, vysušení kvapôčok vzniknutého aerosolu v odparovacej komôrke a následnej detekcii neprchavých zostatkov (analytov) meraním intenzity rozptylu svetla fotonásobičom. Zatiaľ čo UV detekcia je závislá na chromoforoch, ELSD deteguje

všetky látky, ktoré sú pevné alebo menej prchavé ako mobilná fáza. Odozva detektora je takmer nezávislá na štruktúre analytov. Väčšina aplikácií ELSD bola vyvinutá pre lipidy, aminokyseliny, cukry, uhľovodíky alebo surfaktanty neabsorbujúce v UV oblasti.

Vysoká teplota použitá v HTLC môže uľahčiť odparovanie mobilnej fázy v procese ELSD, ale o spojení HTLC-ELSD existuje len málo štúdií. Tento fakt možno vysvetľujú slabé stránky ELSD ako obmedzená senzitivita, nelinearita medzi množstvom a intenzitou signálu a odozva ovplyvnená zložením mobilnej fázy (38).

4.3.4 Spektroskopia pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie a hmotnostne spektrometrické detektory

Spektroskopia pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR – *nuclear magnetic resonantion*) je dobre zavedená ako účinný analytický prístup určovania štruktúry molekúl i skúmania rôznych dynamických procesov, vrátane difúzie a väzieb. V oblasti NMR bolo vyvinuté široké pole experimentálnych možností aj hardvéru, ale NMR je stále rádovo menej citlivá ako iné analytické metódy. Dôležitou výhodou NMR je však jej nedeštruktívnosť.

V uplynulých rokoch bola vyriešená väčšina praktických problémov týkajúcich sa spojenia LC s NMR. Hlavným problémom je silný signál protónov na pozadí v nedeuterovaných vodných mobilných fázach. Minimálne interferujúce signály protónov poskytujú drahé deuterované rozpúšťadlá NMR-kvality (deuterovaný metanol alebo acetonitril). V porovnaní s konvenčnými HPLC organicko-vodnými eluentami je použitie SHW výhodné, pretože deuterovaná SHW s vysokou čistotou nie je tak nákladná (38).

NMR spektrá získané pri použití deuterovanej vody obsahovali menej interferencií ako pri použití konvenčných HPLC-NMR eluentov, naviac kombinácia deuterovanej SHW s NMR-MS detekciou umožňuje získavať obe spektrá, NMR i MS, pre tú istú vzorku súčasne – jednoducho tak možno získať jedno- alebo dvojrozmerné spektrá. Týmto spôsobom boli experimentálne analyzované niektoré analgetiká (39), barbituráty (40) i sulfónamidy (41).

5 Vysokoteplotná kvapalinová chromatografia vo farmaceutickej analýze

V obmedzenom rozsahu tejto práce nie je možné poskytnúť dostatočne široký prehľad doterajších zistení pri použití HTLC v oblasti skúmania liečiv, preto boli látky v nasledujúcich podkapitolách zvolené so zámerom pokryť čo najširšie spektrum špecifických možností HTLC vo farmaceutickej analýze.

Separácia produktov metabolizmu morfinu a kodeínu načrtáva problematiku rozdielnej lipofility parentných látok a analýza vybraných vitamínov ukazuje možnosti separácie látok citlivých na svetlo a teplo. Ďalej je popísaná snaha o separáciu cytostatík pri úplnom vynechaní organického modifikátora mobilnej fázy, teda s použitím 100 %-ne vodnej mobilnej fázy. Separácia talidomidu predstavuje dve vysokoteplotné metódy LC ako ekvivalentné, vzhľadom na stanovenie pomocou konvenčnej metódy pri 30 °C. Na komerčne dostupnom vybavení bola skúmaná separácia levonorgestrelu a jeho nečistôt, a nakoniec je uvedený príklad separácie analgetík s alternatívnymi spôsobmi detekcie (MS, NMR), ktoré na rozdiel od UV detektorov umožňujú zároveň študovať aj štruktúru separovaných látok.

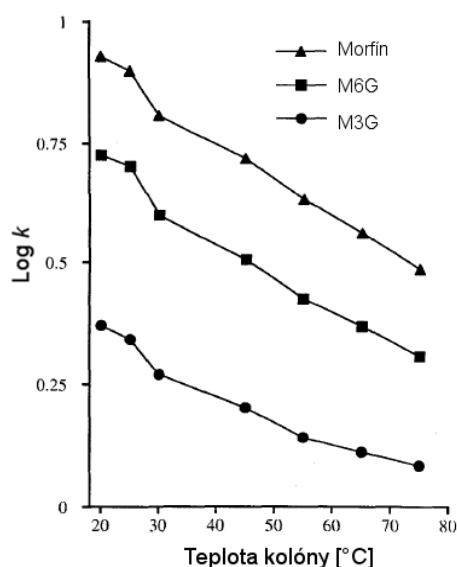
5.1 Opiáty a produkty ich metabolizmu

Analytické štúdie produktov metabolizmu liečiv často vyžadujú separáciu viacerých vysoko polárnych metabolitov od lipofilnejšej parentnej látky. Pri použití stacionárnych fáz na báze silikagélu s naviazaným ODS je v RP-LC normálne lipofilná parentná látka dobre zadržovaná, ale glukuronidové alebo sulfátové metabolity nie sú pri rovnakých chromatografických podmienkach zadržované vôbec. Zvyčajne sú preto pre parentnú látku a polárne konjugované metabolity potrebné samostatné izokratické metódy.

Pre opiáty morfin a kodeín a ich metabolity (normorfin, norkodeín, morfin-3-glukuronid (M3G), morfin-6-glukuronid (M6G) a morfin-3-O-sulfát (M3S)) tiež platí, že obsahujú množstvo rôznych ionizovateľných skupín a hodnoty ich lipofility sa nachádzajú v širokom rozmedzí, takže je náročné separovať ich jedinou izokratickou HPLC analýzou. Predošlé separácie na silikagélových stacionárnych fázach s ODS vyžadovali použitie iónovo-párových činidiel a mobilnej fázy s hodnotou *pH* približne 2. Vzhľadom na kyslý charakter mobilnej boli chromatografické

podmienky veľmi citlivé aj na malé zmeny pH mobilnej fázy a tiež teplotu kolóny a dochádzalo k degradácii jej náplne. Silné sekundárne interakcie medzi kyslými silanolovými skupinami a aminoskupinami opiátov často spôsobovali chvostovanie pík a nízku účinnosť (42). Bolo by preto vhodné tieto opiáty analyzovať pri alkalickom pH , kedy by aminoskupiny neboli ionizované. Silikagelové náplne sú pri alkalickom pH nestabilné, ale experimenty (43) ukázali, že je možné úspešne separovať polárne a štruktúrne príbuzné látky na stacionárnych fázach na báze PGC.

Rozlíšenie všetkých vyššie uvedených opiátov na základnej línii pri použití SF na báze PGC¹⁸ dosiahol v rozmedzí pH 8,5 až 11,6 Barrett (42) a tiež skúmal možnosti ovplyvniť retenciu prostredníctvom zvýšenej teploty. Typické elučné poradie (pri laboratórnej teplote) bolo normorfín – M3G – M3S – M6G – morfín – kodeín, pričom napr. pri pH 10,6 netrvala izokratická separácia viac ako 30 min. Vplyv teploty kolóny na retenciu morfínu, M6G a M3G dokumentuje Obr. 10.



MF: amónno-acetátový pufer : metanol (40 : 60, v/v), pH 9,2

Obr. 10 Vplyv teploty kolóny na retenciu morfínu a produktov jeho metabolizmu

Zdroj: (42)

V sledovanom teplotnom rozmedzí 25 °C až 75 °C bol pre uvedené analyty zaznamenaný približne lineárny pokles hodnoty $\log k$ ¹⁹ a malé zvýšenie účinnosti chromatografického procesu. Zvýšená teplota spôsobila nárast rozpustnosti analytu v mobilnej fáze a taktiež uľahčila prevod jeho hmoty do porézneho materiálu kolóny.

¹⁸ Hypercarb (100 x 4,6 mm, 7 μ m); Thermo, Runcorn, Veľká Británia

¹⁹ Retenčný faktor k predstavuje mieru retencie analytu na kolóne ako pomer látkového množstva analytu v SF a látkového množstva analytu v MF. Nižšia hodnota k znamená, že daný analyt je na kolóne menej zadržovaný, a teda bude eluovať rýchlejšie.

Skrátenie retenčného času pri vysokej teplote má teda praktický dopad: dovoľuje rýchlejšiu prácu pri udržaní dostatočnej selektivity pre analýzu jednotlivých opiátov (42).

5.2 Vitamíny skupiny B

Predmetom záujmu pri skúmaní perspektív SHWC a rôznych spôsobov detekcie bola tiež teplotná stabilita niektorých vitamínov. Študované vitamíny zo skupiny B (B₁, B₂ a B₆) sú dobre známe svojou nestabilitou voči svetlu a teplu. Výberom vhodných chromatografických podmienok (typ kolóny, *pH* eluentu, teplota) dosiahol Chienthavorn a kol. (44) prijateľné retenčné časy i rozlíšenie.

V konvenčnej HPLC sa pri separácii vo vode vysoko rozpustného **vitamínu B₆ (pyridoxínu)** štandardne používajú ODS kolóny. Pri separácii pomocou SHWC pri teplote 180 °C bola bez regulovania *pH* eluentu a použitia iónovo-párových činidiel použitá kolóna typu PS-DVB²⁰. Analyt nejavil žiadne známky degradácie, poskytol jediný pík s krátkym retenčným časom (2,94 min) a bez ťažkostí bol detekovateľný UV detektorom (254 nm) i fluorimetrickým detektorom (excitačná vlnová dĺžka 317 nm, emisná 376 nm), čo potvrdzuje uskutočniteľnosť fluorimetrickej detekcie po SHWC separácii (44).

Na rovnakej kolóne ako pyridoxín bol analyzovaný aj **vitamín B₂ (riboflavín)**. Ako eluent bola použitá nepufrovaná voda s teplotou 200 °C a bol dosiahnutý retenčný čas 3,78 min. Takisto bola možná aj UV detekcia pri 254 nm a fluorescenčná detekcia (excitačná vlnová dĺžka 450 nm, emisná 530 nm) s lineárnou odozvou od 5 do 24 ng a medzou detekcie *LOD (limit of detection)* 3,6 ng. Napriek nízkej rozpustnosti riboflavínu vo vode, nebola pri ochladzovaní eluentu pred vstupom do detektora pozorovaná žiadna precipitácia analytu. Dosiahnutá citlivosť bola porovnateľná s hodnotou 0,5 ng pri optimalizovanej separácii na ODS kolóne pri použití mobilnej fázy acetonitril : pufer, *pH* 4 (13 : 77, v/v). On-line ¹H NMR spektrum získané v *stop-flow* móde²¹ pri použití deuterovanej vody s teplotou 200 °C sa tiež do značnej miery zhodovalo so spektrom zaznamenaným v minulosti v okyslenej deuterovanej vode.

Pri použití SHW pri analýze **vitamínu B₁ (tiamín)** boli očakávané ťažkosti, pretože tiamín je citlivý na teplotu i zmenu *pH* a ľahko sa rozkladá na 4-metyl-5-tiazol-

²⁰ PLRP-S (150 x 4,6 mm, 5 μm); Polymer Laboratories, Church Stretton, Veľká Británia

²¹ Pri *stop-flow* detekcii detektor sníma spektrá látok v mernej cele pri zastavenom prietoku mobilnej fázy.

etanol a približne 60 ďalších produktov. Pri separácii na PS-DVB kolóne bola použitá deuterovaná voda (pufrovaná fosfátom, *pH* 3) s teplotou 160 °C. UV spektrofotometer zaznamenal v retenčnom čase 3,77 min široký chvostujúci pík a v čase 8,55 min druhý menší chvostujúci pík, ktorý bol na základe ¹H NMR a MS spektier identifikovaný ako produkt teplotnej dekompozície tiamínu, teda 4-metyl-5-tiazol-etanol. Následné analýzy a porovnania so spektrami štandardov ukázali výskyt viacnásobnej výmeny atómov deutéria u oboch látok. Chvostovanie tiazolového píku v čase 8,55 min naznačovalo, že v priebehu separácie dochádza ku kontinuálnej teplotnej dekompozícii. Pri porovnaní so zdokumentovanými separáciami pri teplote prostredia vznikla domnienka, že aktuálne použitá teplota pri SHWC je zbytočne vysoká, preto bola separácia zopakovaná pri teplote 50 °C. V tomto prípade sa *continuous-flow*²² ¹H NMR spektrum tiamínu veľmi podobalo referenčnému spektru v deuterovanej vode pri teplote prostredia, ale zaznamenané rozdiely znova svedčili o výmene atómov deutéria na kolóne aj pri teplote 50 °C.

Uvedené zistenia ukazujú, že SHW môže byť použitá na chromatografickú separáciu komplexných, teplotne nestabilných prírodných produktov (napr. vitamínov) za predpokladu, že sa venuje primeraná pozornosť zabezpečeniu toho, aby bol analyt vhodný pre vybraný typ kolóny a použila sa minimálna teplota vyžadovaná pre danú separáciu. Pri použití deuterovanej vody ako eluentu a následnej interpretácii on-line ¹H NMR a MS spektier je tiež potrebné mať na zreteli už spomenuté potenciálne výmeny atómov deutéria (44).

5.3 Cytostatiká

O vývoj metódy vhodnej na separáciu cytostatík pri použití 100 %-nej vodnej mobilnej fázy sa usiloval Teutenberg (45). Rovnako ako už predošli bádatelia, zvolil pre testovací proces PS-DVB kolónu²³, pretože pri jeho experimentoch ODS kolóna náchylná na degradáciu stacionárnej fázy pri teplotách nad 120 °C, bola nestabilná po približne 40 hodinách používania. Študované rozmedzie sa pohybovalo od teploty prostredia až do teploty 160°C a *pH* mobilnej fázy bolo fosfátovým pufrom upravované na hodnoty 11,5 a 3,5. Analyzované látky (5-fluorouracil, metotrexát, 7-hydroxymetotrexát, etoposid) bolo možné separovať v jednom chromatografickom procese s celkovým elučným časom kratším ako 13 min. Vývoj metódy možno

²² Pri *continuous-flow* detekcii sú NMR spektrá získavané v priebehu trvania elúcie.

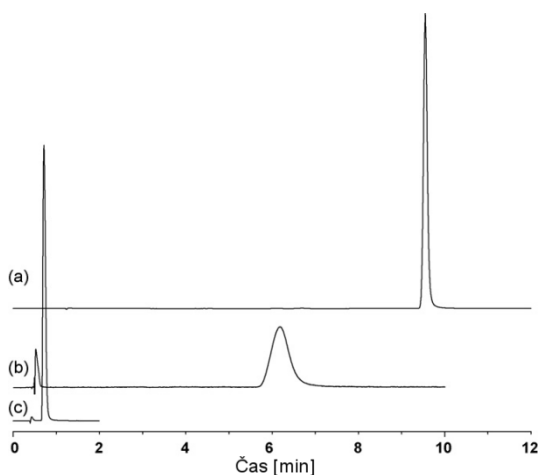
²³ Nucleogel RP 100-5 (150 x 4,6 mm, 5 µm); Macherey-Nagel, Düren, Nemecko

považovať za úspešný, pretože ostrosť píkov i retenčné faktory pre všetky dané látky boli prijateľné. V priebehu trvania celej analýzy nebola na použitej PS-DVB kolóne spozorovaná žiadna degradácia SF. Najlepšia separácia bola dosiahnutá pri teplote 150 °C, hodnote *pH* 3,5 a prietokovej rýchlosti 1 ml/min. Za zmienku ďalej stojí fakt, ktorý poukazuje na vplyv teploty na elučnú silu vody; metotrexát, 7-hydroxymetotrexát a eposid neeluovali pri teplote prostredia a *pH* 11,5 ani po 60 min.

Pri tomto testovaní nových materiálov stacionárnych fáz bolo teda zaznamenané zvýšenie účinnosti separačného procesu, na druhej strane je podľa Teutenberga (45) ešte potrebné vyriešiť niektoré ďalšie technické aspekty, týkajúce sa predhrievania mobilnej fázy a ohrevu kolóny. Aby bolo možné túto metódu zaviesť do analýzy vzoriek sér pacientov, respektíve povrchových vôd, je potrebné ďalej preskúmať vplyv matrice na separáciu. V prípade látok v matrici s vyšším retenčným faktorom ako posledný eluovaný analyt bude potrebné zaistiť, aby na kolóne nedochádzalo ku koelúcii s nepolárnymi súčasťami analytu.

5.4 Talidomid

Po dramatickej histórii talidomidu v tzv. Conterganovej afére (silná teratogenita S-enantioméru) sa v posledných rokoch toto liečivo skúma ako nádejný prostriedok v podpornej liečbe mnohopočetného myelómu. S cieľom porovnať možnosti kvantifikácie talidomidu v tabletách a možný negatívny dopad vysokej teploty na jeho stanovenie, boli skúmané (46) tri metódy: konvenčná pri 30 °C a dve vysokoteplotné pri 180 °C. Pri chromatografických podmienkach uvedených v Tab. 1 boli zaznamenané chromatogramy, ktorých porovnanie ukazuje Obr. 11.



Obr. 11 Elúcia talidomidu pri rôznych chromatografických podmienkach

Zdroj: (46)

Tab. 1 Chromatografické podmienky pri analýze talidomidu

		Teplota [°C]	Prietoková rýchlosť [ml/min]	Max. spätný tlak [bar]
a.	konvenčná metóda (štandardná)	30	1,0	150
	SF: Nucleosil C ₁₈ PAH ²⁴			
	MF: lineárny gradient 5 % – 38 %, acetónitril : voda + 0,1 % kyselina mravčia			
b.	vodná vysokoteplotná metóda	180	0,7	275
	SF: PS-DVB ²⁵			
	MF: 100 % voda + 0,1 % kyselina mravčia			
c.	rýchla vysokoteplotná metóda	180	1,0	270
	SF: PS-DVB ²⁶			
	MF: acetónitril : deionizovaná voda (20 : 80, v/v) + 0,1 % kyselina mravčia			

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa (46)

Štandardná analýza pri 30 °C využíva gradientovú metódu. Cieľom bolo transformovať túto gradientovú metódu na izokratickú. Pri izokratickej elúcii je možné značne skrátiť časový interval medzi nástrekmi, pretože nie je potrebná reekvilibrácia stacionárnej fázy. Použitie izokratickej elúcie pri vysokej teplote 180 °C (metóda c.) potom umožnilo rýchlu elúciu a stanovenie koncentrácie hlavnej zložky približne v čase 60 s. Ďalším zámerom bolo dosiahnuť elúciu talidomidu bez pridania organického modifikátora do mobilnej fázy (metóda b.). Oba tieto ciele – použitie HTLC pre rýchlu i 100 %-ne vodnú separáciu – boli dosiahnuté. Štatistické vyhodnotenie vzoriek pripravených z 18 tabliet talidomidu analyzovaných všetkými metódami ukázalo, že priemerné hodnoty uvedených metód sa štatisticky nelíšia: tri rôzne metódy poskytujú rovnaké výsledky stanovenia obsahu talidomidu v analyzovaných tabletách.

Pri analýze pri vysokej teplote má však zásadný vplyv použitá kolóna, preto je v procese vývoja metódy nevyhnutné zaistiť, aby teplotná stabilita analytu bola skúmaná na rovnakej kolóne, aká sa bude následne rutinne používať pri analýzach danou metódou. V tomto prípade bol efekt teploty na stabilitu talidomidu skúmaný na rozdiel od väčšiny dostupných štúdií nie teoreticky, ale experimentálne, a to na dvoch rôznych typoch kolón za pomoci UV detekcie. Pri konštantnej prietokovej rýchlosti

²⁴ Nucleosil 100-5 C₁₈ PAH (150 x 4 mm, 5 µm); Macherey-Nagel, Düren, Nemecko

²⁵ PLRP-S (150 x 4,6 mm, 3 µm); Polymer Laboratories, Church Stretton, Veľká Británia

²⁶ PLRP-S (150 x 4,6 mm, 3 µm); Polymer Laboratories, Church Stretton, Veľká Británia

a lineárnej odozve detektora je nastrekované množstvo analytu úmerné ploche píku. Ak je rovnaké množstvo analytu nastrekované pri rôznych teplotách, degradácia analytu sa prejaví zmenšením plochy píku, zatiaľ čo konštantná plocha bude znamenať, že k degradácii na kolóne nedochádza.

Bolo zistené, že pri elúcii talidomidu na polymérnej kolóne (PS-DVB) vzrástla výška píku a jeho plocha ostala nezmenená, navyše sa značne znížila hodnota symetrie píku (pri teplotách nad 100 °C platilo, že $A < 1,41$, pričom pri teplotách od 60 °C do 80 °C sa tieto hodnoty pohybovali medzi 2,01 a 1,58). Použitím zvýšenej teploty sa teda zlepšuje kvantifikácia, pretože dochádza k zlepšeniu tvaru píkov. Naopak, pri použití kolóny na báze oxidu zirkoničitého pokrytej uhlíkom sa s rastúcou teplotou symetria píkov dokonca zhoršila a zmenšila sa aj plocha píkov, čo svedčí o teplotnej degradácii na kolóne. Z týchto experimentálnych zistení vyplýva, že na stabilitu analytu má kľúčový vplyv systém SF a metóda nemôže byť jednoducho prenesená na inú kolónu s rozdielnymi povrchovými vlastnosťami bez predošlých testovacích meraní. Na teplotne stabilných PS-DVB kolónach následne použitých pre vývoj vyššie uvedených metód b. a c. nebola počas 12 h v priebehu štúdie pozorovaná žiadna degradácia (46).

Záverom možno konštatovať, že obe vyvinuté HTLC metódy poskytujú rovnaké výsledky ako konvenčná HPLC metóda, a všetky tri je možné ekvivalentne použiť na stanovenie talidomidu v tabletách.

5.5 Levonorgestrel

V roku 2001 Berta (47) uverejnila štúdiu, ktorá skúma chromatografické správanie levonorgestrelu a jeho štruktúrne príbuzných nečistôt pri zvýšenej teplote a popisuje optimalizáciu separačnej metódy na komerčne dostupnom systéme ohrevu kolóny. Levonorgestrel a jeho nečistoty 6 β -OH-levonorgestrel, 10 β -OH-levonorgestrel, Δ 8(14)-levonorgestrel, levonorgestrel-ABC-trién a levodion sú látky steroidnej povahy. Použitý bol ohrev kolóny s teplotne programovateľným predhrievaním mobilnej fázy od 50 °C do 150 °C s presnosťou ± 1 °C (Polartherm Series 9000; Selerity, Salt Lake City, Utah, USA).

Chromatografické podmienky pri úvodnej separácii sú uvedené v Tab. 2.

Tab. 2 Chromatografické podmienky pri úvodnej separácii levonorgestrelu

	Teplota [°C]	Prietoková rýchlosť [ml/min]	Nástrek
SF: Discovery Zr-Carbon C ₁₈ ²⁷	50	0,5	20 µl modelového roztoku, c = 0,01 mg/ml
MF: metanol : voda (60 : 40, v/v)			

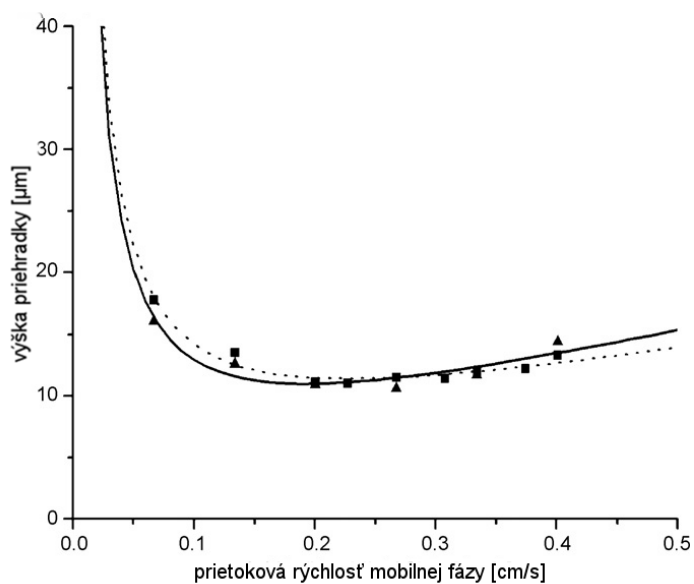
Zdroj: Vlastné spracovanie podľa (47)

Závislosť retencie na teplote bola študovaná v teplotnom rozmedzí 50 °C až 150 °C, čo je horná hraničná hodnota teplotnej stability analyzovaných látok. S rastúcou teplotou bol pozorovaný systematický pokles hodnoty retenčného faktora k , pričom pri prietokovej rýchlosti 0,5 ml/min bola medzi hodnotami $\ln k$ a $1/T$ zaznamenaná lineárna závislosť s korelačným koeficientom $R > 0,99$. Smernice priamok danej závislosti a zmeny entalpie vypočítané podľa van't Hoffovej rovnice sa pre tieto štruktúrne príbuzné látky takmer zhodovali. Vzťah medzi teplotou a retenčným časom pre levonorgestrel a jeho nečistoty bol veľmi podobný, preto boli ďalšie parametre optimalizácie skúmané iba pre levonorgestrel ako hlavný pík.

V teplotnom rozmedzí 100 °C až 150 °C s rastúcou teplotou člen C van Deemterovej rovnice, ktorý charakterizuje odpor voči prevodu hmoty, značne poklesol. Hlavným dôvodom tohto poklesu je zmena difúzneho koeficientu analytu v mobilnej fáze, ktorá umožní rýchlejšiu a účinnejšiu separáciu, preto bola pre ďalšie kroky optimalizácie metódy zvolená teplota 150 °C.

Pri izokratickej elúcii je retencia analytu závislá na objeme organického rozpúšťadla v mobilnej fáze, pričom s rastúcim podielom organickej zložky retencia analytu klesá. Čo sa týka vplyvu podielu organického modifikátora v mobilnej fáze na účinnosť separácie, na Obr. 12 je možné vidieť, že pri separácii levonorgestrelu nevzniká na van Deemterovej krivke medzi rôznymi obsahmi metanolu v MF významný rozdiel, preto sa ďalej pracovalo s nižším, t.j. 50 %-ným podielom metanolu (minimá van Deemterovej krivky pre testované objemy sú takmer identické, tzn. dosiahne sa aj takmer identická výška priehradky H – účinnosť kolóny).

²⁷ Discovery Zr-Carbon C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3,5 µm); Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA



△ voda : metanol (50 : 50, v/v) □ voda : metanol (40 : 60, v/v)

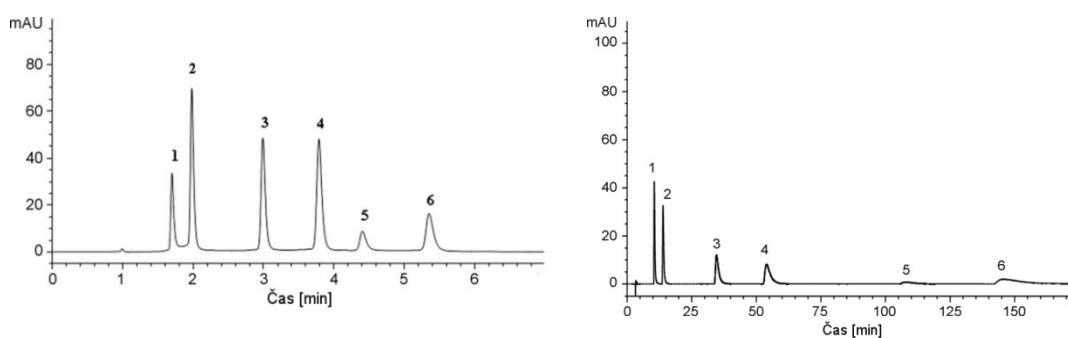
Obr. 12 Van Deemterova krivka separácie levonorgestrelu pri rôznych podieloch organického modifikátora v mobilnej fáze

Zdroj: (47)

Obr. 12 zároveň demonštruje, že minimálna výška priehradky H , a teda najvyššia účinnosť separácie, je dosiahnutá v rozmedzí prietokových rýchlostí 1,5 až 2,0 ml/min. Po zhrnutí výsledkov boli teda určené nasledovné optimálne parametre:

- teplota 150°C,
- prietoková rýchlosť 1,5 ml/min,
- MF: metanol : voda (50 : 50, v/v).

Chromatogramy získané pri výslednej separácii pri takto optimalizovaných podmienkach (obrázok vľavo) a pri úvodnej testovacej separácii pri podmienkach uvedených v Tab. 2 (obrázok vpravo) sú znázornené na Obr. 13.



Obr. 13 Chromatogramy výslednej optimalizovanej a úvodnej testovacej separácie levonorgestrelu

Zdroj: (47)

Pri porovnaní oboch chromatogramov na Obr. 13 je možné pozorovať, že pri výslednej optimalizovanej separácii boli dosiahnuté náležité hodnoty rozlíšenia medzi kritickými dvojicami píkovo vo veľmi krátkom čase analýzy, preto by táto HTLC metóda mohla byť zavedená do rutínnej praxe pri kontrole čistoty levonorgestrelu (47).

5.6 Analgetiká

Kvapalinová chromatografia spojená s NMR spektroskopiou a/alebo hmotnostnou spektrometriou (MS) je dôležitou technikou identifikácie a objasnenia štruktúry analytov v komplexných zmesiach vznikajúcich napr. pri metabolizme liečiv alebo pri metódach ich syntézy. On-line HPLC-NMR spektroskopia je už niekoľko rokov zavedená do rutínnej praxe, ale stále sa objavujú komplikácie so silnými signálmi protónov zložiek mobilnej fázy na pozadí, ktoré sa môžu prekryvať s rezonanciou analytov. Dokonca aj najčistejšie konvenčné „HPLC-grade“ zložky mobilnej fázy môžu obsahovať nečistoty, ktoré prispievajú ďalšími interferujúcimi signálmi. Použiteľné „NMR-quality“ deuterované rozpúšťadlá (napr. D₃-acetonitril) sú však príliš drahé a neprotónové rozpúšťadlá (superkritický CO₂) naopak predlžujú celý proces kvôli dlhšiemu času potrebnému na relaxáciu spin – mriežka. Ako vhodná alternatíva pre spojenie LC s NMR spektroskopiou sa ukazuje deuterovaná voda (D₂O), ktorá nie je v porovnaní s deuterovanými organickými rozpúšťadlami nákladná a je dostupná vo vysokom stupni čistoty bez organických nečistôt. Hlavnou nečistotou D₂O je nedeuterovaná voda (0,1 %) a jej signály je možné potlačiť bežnými NMR pulznými technikami (39).

Predchádzajúce experimenty (40) už poukázali na možnosť použitia deuterovanej vody s veľmi vysokou teplotou, napr. pri HPLC-NMR separáciách barbiturátov. Tieto skutočnosti boli podnetom pre skúmanie rozšírené na separáciu modelových liečiv (analgetík a kofeínu) s cieľom demonštrovať, že je možné získať jedno- aj dvojrozmerné spektrá a takisto v spojenom systéme HPLC-NMR-MS získať obe spektrá (NMR aj MS) z tej istej separácie.

Na určenie vhodných chromatografických podmienok bol pripravený salicylamid s koncentráciou približne 10 mg/ml v acetonitrile. Na PS-DVB kolóne²⁸ pri teplote 180 °C eluoval s retenčným časom 5,22 min a bol on-line detegovaný UV detektorom pri 254 nm i fluorescenčným detektorom (excitačná vlnová dĺžka 300 nm, emisná

²⁸ PLRP-S (150 x 4,6 mm, 3 μm); Polymer Laboratories, Church Stretton, Veľká Británia

430 nm). Pomocou NMR-spektrometra bol salicylamid (200µg) v móde *continuous-flow* detekovateľný ako homogénny roztok v čase 4,7 min a získané spektrum ukázalo očakávané charakteristické signály protónov aromatického kruhu bez výrazných interferujúcich signálov. Senzitivita bola zvýšená použitím *stop-flow* meraní a úspešne bolo získané aj dvojrozmerné spektrum (2D-COSY), čo sa zhoduje so zamýšľanými zámermi. V otázkach užitočnosti kombinácie NMR a MS v jednom systéme na získanie informácií o štruktúre látok separovaných HPLC, bola ukázaná vhodnosť SHW ako eluentu pre takéto inštrumentálne usporiadanie. Získanie oboch spektier z jedného nástreku bolo dosiahnuté rozdelením toku krátko pred vstupom do NMR prietokovej cely (95 % vzorky) a zvyšných 5 % smerovalo do hmotnostného spektrometra (39).

V priebehu štúdie boli pri separáciách použité dva typy kolón: PS-DVB pri teplote 190 °C a ODS pri teplotnom gradiente 8 °C/min v rozmedzí od 80 °C do 130 °C. Dosiahnuté retenčné časy sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 Retenčné časy pri separácii analgetík pomocou chromatografie s veľmi horúcou vodou

Typ kolóny	paracetamol (acetaminofen)	kofeín	fenacetín
PS-DVB ²⁹	2,5 min	5,77 min	14,04 min
ODS ³⁰	0,94 min	3,06 min	4,58 min

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa (39)

Na kolóne typu PS-DVB separované látky eluovali v prijateľnom čase a stacionárna fáza bola v priebehu experimentov stabilná. Aspirín (kyselina acetylsalicylová) však rýchlo eluoval ako kyselina salicylová a Smith (39) uvádza, že predstavuje prvú zatiaľ skúmanú látku, ktorá počas SHWC hydrolyzovala.

Rýchlejšie separácia prebehla pri použití teplotného gradientu na kolóne typu ODS a boli získané ostré píky. Analýza NMR spektra potvrdila, že látky boli separované bez degradácie na kolóne. Napriek tomu, že sa ukázala úspešnosť separácie na ODS kolóne, pri nasledujúcich separáciách poklesla retencia všetkých analytov, čo naznačuje degradáciu stacionárnej fázy (39). Použitie SF typu ODS je teda obmedzené, pretože podobné problémy s týmto materiálom boli zaznamenané aj v iných štúdiách. Vyššia efektívnosť ODS kolón by však bola veľmi cenná, ak by sa podarilo prekonať ťažkosti so stabilitou SF.

²⁹ PLRP-S (150 x 4,6 mm, 5 µm); Polymer Laboratories, Church Stretton, Veľká Británia

³⁰ Novapak C₁₈ (150 x 4 mm, 5 µm); Waters, Milford, Massachusetts, USA

6 Záver

Stanoveným cieľom predkladanej práce bol popis metódy HTLC a súčasného stavu poznania v tejto oblasti. Práca sumarizuje najvýznamnejšie aspekty vplyvu zvýšenej teploty na priebeh a výsledky chromatografického procesu HTLC. Venuje sa niektorým otázkam vplyvu teploty na usporiadanie HTLC chromatografických systémov, hlavne v otázkach zloženia a predhrievania mobilných fáz a stability stacionárnych fáz. Uvádza tiež spôsoby novej detekcie. Posledná kapitola sa zaoberá doterajším experimentálnym bádáním zameraným na potenciálne využitie HTLC v rutinnej analýze vybraných liečiv.

Na základe dostupných poznatkov možno konštatovať, že metódy HTLC boli skúmané predovšetkým so zámerom porozumieť zákonitostiam a úskaliam tejto techniky na testovacích zmesiach látok, zatiaľ čo záujem aplikovať HTLC pre rutinné analýzy sa stále stretáva s váhaním, či obavami. Možné dôvody takéhoto postoja sú predpokladaná nestabilita analytu a fakt, že je potrebné zabezpečiť špecializovanejšie chromatografické vybavenie a veľmi odolné kolóny, ktoré vydržia vysoké teploty.

Hoci prvé systémy a kolóny sú už komerčne dostupné, chýba dostatok informácií o ich dlhodobej teplotnej stabilite pri používaní v extrémnych podmienkach. Najmä v otázke použitia vhodných materiálov pri výrobe stacionárnych fáz neexistuje univerzálny test, ktorý by umožnil objektívne porovnanie rôznych kolón. Je nutné poznamenať, že dobrá teplotná stabilita pri určitých podmienkach nie je zárukou dlhodobej teplotnej stability pri iných podmienkach. Napríklad kolóny založené na báze oxidu zirkoničitého, ktoré sa pri izotermických separáciách pri teplotách do 200 °C dajú použiť, nie sú na rozdiel od iných testovaných kolón vhodnými kandidátmi pre teplotne programovanú HTLC. Nepochybne budú potrebné určité vylepšenia odolnosti kolón, aby sa aj širšia odborná verejnosť presvedčila o vhodnosti a užitočnosti metódy HTLC nielen pre špecifické aplikácie.

Vzhľadom na relatívne krátky čas, počas ktorého analyt zotrvá na kolóne pri vysokej teplote, sa predpokladá, že stabilita analytu nebude kľúčovým problémom. V každom prípade však teplotná stabilita analytu na kolóne musí byť vždy overená, čím sa zaistí, že v konkrétnych podmienkach je použitie vysokoteplotnej analytickej metódy odôvodnené. Napríklad analýza talidomidu (viď kap. 5.4) ukázala, že pri použití HTLC

nemajú hlavný vplyv na stabilitu analytu len teplota a retenčný čas, ale zásadný je tiež typ stacionárnej fázy.

Napriek nesporným výhodám HTLC (predovšetkým urýchleniu analýzy, zlepšeniu účinnosti, rozlíšenia i selektivity) a pozitívnemu dopadu zloženia mobilnej fázy na životné prostredie aj na ekonomický aspekt farmaceutickej analýzy, je potrebné mať na zreteli aj uvádzané obmedzenia a nevyriešené otázky problematiky HTLC, a kriticky hodnotiť budúce možnosti aplikácie v celom kontexte rutinného používania.

Zoznam použitej literatúry

- (1) Greibrokk, T.; Andersen, T. High-Temperature Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 743-755.
- (2) Heinisch, S.; Rocca, J.-L. Sense and Nonsense of High-Temperature Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 642-658.
- (3) Smith, R. M. Superheated Water Chromatography – A Green Technology for the Future. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 441-455.
- (4) Yang, Y. A Model for Temperature Effect on Column Efficiency in High-Temperature Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558*, 7-10.
- (5) Vanhoenacker, G.; Sandra, P. High Temperature and Temperature Programmed HPLC: Possibilities and Limitations. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 245-248.
- (6) Nováková, L.; Douša, M.; Blatný, P.; Jandera, P.; Planeta, J.; Maier, V.; Znaležiona, J. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*; Lucie Nováková, Michal Douša: Praha, CZ, 2013.
- (7) Yan, B.; Zhao, J.; Brown, J. S.; Blackwell, J.; Carr, P. W. High-Temperature Ultrafast Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1253-1262.
- (8) McNeff, C. V.; Yan, B.; Stoll, D. R.; Henry, R. A. Practice and Theory of High Temperature Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1672-1685.
- (9) Teutenberg, T. Potential of High Temperature Liquid Chromatography for the Improvement of Separation Efficiency – A Review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *643*, 1-12.
- (10) Vanhoenacker, G.; Sandra, P. Elevated Temperature and Temperature Programming in Conventional Liquid Chromatography – Fundamentals and Applications. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1822-1835.
- (11) Antia, F. D.; Horváth, C. High-Performance Liquid Chromatography at Elevated Temperatures: Examination of Conditions for the Rapid Separation of Large Molecules. *J. Chromatogr.* **1988**, *435*, 1-15.
- (12) Li, J.; Carr, P. Evaluation of Temperature Effects on Selectivity in RPLC Separations Using Polybutadiene-Coated Zirconia. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2202-2206.
- (13) Edge, A. M.; Shillingford, S.; Smith, C.; Payne, R.; Wilson, I. D. Temperature as a Variable in Liquid Chromatography: Development and Application of a Model for the Separation of Model Drugs Using Water as the Eluent. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1132*, 206-210.
- (14) Plumb, R.; Mazzeo, J. R.; Grumbach, E. S.; Rainville, P.; Jones, M.; Wheat, T.; Neue, U. D.; Smith, B.; Kelly, A. J. The Application of Small Porous Particles, High Temperatures, and High Pressures to Generate Very High Resolutions LC and LC/MS Separations. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1158-1166.

-
- (15) McCalley, D. V. Effect of Temperature and Flow-Rate on Analysis of Basic Compounds in High-Performance Liquid Chromatography Using a Reversed-Phase Column. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *902*, 311-321.
- (16) Buckenmeier, S. M. C.; McCalley, D. V.; Euerby, M. R. Rationalisation of Unusual Changes in Efficiency and Retention With Temperature Shown for Bases in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography at Intermediate pH. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1060*, 117-126.
- (17) Mao, Y.; Carr, P. W. Application of the Thermally Tuned Tandem Column Concept to the Separation of Several Families of Environmental Toxicants. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2788-2796.
- (18) Agarwal, R. Temperature Sensitivity and Fluorescence Detection. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 128-132.
- (19) Pereira, L.; Aspey, S.; Ritchie, H. High Temperature to Increase Throughput in Liquid Chromatography and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with a Porous Graphitic Carbon Stationary Phase. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1115-1124.
- (20) Albert, M.; Cretier, G.; Guillarme, D.; Heinisch, S.; Rocca, J.-L. Some Advantages of High Temperature for the Separation of Pharmaceutical Compounds with Mass Spectrometry Detection. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1803-1811.
- (21) Guillarme, D.; Heinisch, S.; Gauvrit, J. Y.; Lanteri, P.; Rocca, J.-L. Optimization of the Coupling of High-Temperature Liquid Chromatography and Flame Ionization Detection. Application to the Separations of Alcohols. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1078*, 22-27.
- (22) Chen, M. H.; Horváth, C. Temperature Programming and Gradient Elution in Reversed-Phase Chromatography with Packed Capillary Columns. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *788*, 51-61.
- (23) Coym, J.; Dorsey, J. G. Reversed-Phase Retention Thermodynamics of Pure-Water Mobile Phases at Ambient and Elevated Temperature. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1035*, 23-29.
- (24) Guillarme, D.; Heinisch, S.; Rocca, J.-L. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1052*, 39-51.
- (25) Fields, S. M.; Ye, C. Q.; Zhang, D. D.; Branch, B. R.; Zhang, X. J.; Okafo, N. Superheated Water as Eluent in High-Temperature High-Performance Liquid Chromatographic Separations of Steroids on a Polymer-Coated Zirconia Column. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *913*, 197-204.
- (26) Teutenberg, T.; Goetze, H.-J.; Tuerk, J.; Ploeger, J.; Kiffmeyer, T. K.; Schmidt, K. G.; Kohorst, W.; Rohed, T.; Jansen, H.-D.; Weber, H. Development and Application of a Specially Designed Heating System for Temperature-Programmed High-Performance Liquid Chromatography Using Subcritical Water as the Mobile Phase. *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1114*, 89-96.
-

-
- (27) Spearman, L.; Smith, R. M.; Dube, S. Monitoring Effective Column Temperature by Using Shape Selectivity and Hydrophobicity and the Effects of Mobile Phase Temperature. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 147-151.
- (28) Nikitas, P.; Pappa-Louisi, A.; Papachristos, K.; Zisi, C. Theory and Application of the Two-Mode Gradient Elution in Liquid Chromatography Involving Simultaneous Changes in Temperature and Mobile-Phase Composition. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5508-5514.
- (29) Yang, Y. Stationary Phases for LC Separations at Elevated Temperatures. *LCGC North Am.* **2006**, *24* (Suppl. 4), 53-58.
- (30) Dunlap, C. J.; McNeff, C. V.; Stoll, D.; Carr, P. W. Zirconia Stationary Phases for Extreme Separations. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 599A-607A.
- (31) Li, J.; Hu, Y.; Carr, P. W. Fast Separations at Elevated Temperatures on Polybutadiene-Coated Zirconia Reversed-Phase Material. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3884-3888.
- (32) Kephart, T. S.; Dasgupta, P. K. Superheated Water Eluent Capillary Liquid Chromatography. *Talanta* **2002**, *56*, 977-987.
- (33) He, P.; Yang, Y. Studies on the Long-Term Thermal Stability of Stationary Phases in Subcritical Water Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *989*, 55-63.
- (34) Yang, X.; Ma, L.; Carr, P. W. High Temperature Fast Chromatography of Proteins Using a Silica-Based Stationary Phase with Greatly Enhanced Low pH Stability. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1079*, 213-220.
- (35) Hooischoor, E. W. J.; Kientz, C. E.; Brinkman, U. A. T. Potential of Flame Ionization Detection Coupled On-Line with Microcolumn Liquid Chromatography Using Aqueous Eluents and an Eluent-Jet Interface. *J. High Resolut. Chromatogr.* **2000**, *23*, 309-316.
- (36) Wilson, I. D. Investigation of a Range of Stationary Phases for the Separation of Model Drugs by HPLC Using Superheated Water as the Mobile Phase. *Chromatographia* **2000**, *52* (Suppl. 1), S 28-S 34.
- (37) West, C.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Porous Graphitic Carbon: A Versatile Stationary Phase For Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3201-3216.
- (38) Guillarme, D.; Heinisch, S. Detection Modes with High Temperature Liquid Chromatography – A Review. *Sep. Purif. Rev.* **2005**, *34*, 181-216.
- (39) Smith, R. M.; Chienthavorn, O.; Wilson, I. D.; Wright, B.; Taylor, S. D. Superheated Heavy Water as the Eluent for HPLC-NMR and HPLC-NMR-MS of Model Drugs. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4493-4497.
- (40) Smith, R. M.; Chienthavorn, O.; Wilson, I. D.; Wright, B. Superheated Deuterium Oxide Reversed-Phase Chromatography Coupled to Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Commun.* **1998**, *35*, 261-263.
-

-
- (41) Smith, R. M.; Chienthavorn, O.; Saha, S.; Wilson, I. D.; Wright, B.; Taylor, S. D. Selective Deuterium Exchange During Superheated Heavy Water Chromatography–Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy–Mass Spectrometry of Sulfonamides. *J. Chromatogr. A* **2000**, *886*, 289-295.
- (42) Barrett, D. A.; Pawula, M.; Knaggs, R. D.; Shaw, P. N. Retention Behavior of Morphine and its Metabolites on a Porous Grafitic Carbon Column. *Chromatographia* **1998**, *47*, 667-672.
- (43) Ayrton, J.; Evans, M. B.; Harris, A. J.; Plumb, R. S. Porous Graphitic Carbon Shows Promise for the Rapid Chromatographic Analysis of Polar Drug Metabolites. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1995**, *667*, 173-178.
- (44) Chienthavorn, O.; Smith, R. M.; Saha, S.; Wilson, I. D.; Wright, B.; Taylor, S. D.; Lenz, E. M. Superheated Water Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry of Vitamins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 477-482.
- (45) Teutenberg, T.; Lerch, O.; Götze, H.-J.; Zinn, P. Separation of Selected Anticancer Drug Using Superheated Water as the Mobil Phase. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3896-3899.
- (46) Giegold, S.; Holzhauser, M.; Kiffmeyer, T.; Tuerk, J.; Teutenberg, T.; Rosenhagen, M.; Hennies, D.; Hoppe-Tichy, T.; Wenclawiak, B. Influence of the Stationary Phase on the Stability of Thalidomide and Comparison of Different Methods for the Quantification of Thalidomide in Tablets Using High-Temperature Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 625-630.
- (47) Berta, R.; Babják, M.; Gazdag, M. A Study of Some Practical Aspects of High Temperature Liquid Chromatography in Pharmaceuticals Applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 458-462.