Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Testování vlastností nových „fused-core“ analytických kolon v UHPLC systému a porovnání s BEH UPLC analytickými kolonami

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2011 Jitka Nežádalová

Poděkování:

Děkuji PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady poskytnuté při zpracování diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry analytické chemie, kteří mi pomohli.

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem a nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, 6.5.2011 Jitka Nežádalová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: *Jitka Nežádalová*

Školitel: *PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.*

Název diplomové práce: *Testování vlastností nových „fused – core" analytických kolon v UHPLC systému a porovnání s BEH UPLC analytickými kolonami*

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování vlastností nových analytických kolon naplněných povrchově porézními částicemi, tzv. fused-core analytických kolon, v UHPLC systému v porovnání s BEH UPLC analytickou kolonou.

Testovány byly kolony Kinetex PFP o velikosti částic 1,7 μm a 2,6 μm (Phenomenex) a Ascentis Express Phenyl-hexyl o velikosti částic 2,7 μm (Sigma-Aldrich), tedy kolony s povrchově porézními částicemi a kolona Acquity BEH Phenyl (Waters) s celkově porézními částicemi o velikosti 1,7 μm.

K porovnání vlastností kolon bylo použito 7 estrogenních steroidů za detekce pomocí PDA detektoru při vlnové délce 280 nm. Měření probíhalo za využití isokratické eluce. Mobilní fáze se skládala z ultračisté vody a acetonitrilu.

Kolony byly hodnoceny z hlediska účinnosti, symetrie píků, rozlišení a zpětného tlaku, který vznikal na kolonách. Účinnost kolon byla vyjádřená v počtu teoretických pater a znázorněním van Deemterovy křivky. Dále byl sledován vliv rostoucí teploty a průtoků na separaci estrogenních steroidů. Se vzrůstající teplotou i průtokem docházelo ke značnému zkrácení doby analýzy a kolony byly porovnány i z hlediska rychlosti separace.

Nejlepší účinnosti v počtu teoretických pater bylo dosaženo u kolony Acquity BEH Phenyl a nepatrně nižší účinností byla vyhodnocena kolona Ascentis Express Phenyl-hexyl. Zatímco v účinnosti se tyto dvě kolony výrazně nelišily, v rámci porovnání hodnot zpětného tlaku bylo u kolony Acquity BEH Phenyl dosaženo mnohem většího nárůstu tlaku než u kolony Ascentis Express. Nejrychlejší separaci poskytnula kolona Kinetex PFP o velikosti částic 1,7 μm, avšak společně s kolonou Kinetex PFP o velikosti částic 2,6 μm byly tyto kolony vyhodnoceny horší účinností a výrazným nárůstem zpětného tlaku. Hodnoty zpětného tlaku vzniklé na koloně Kinetex PFP o velikosti částic 1,7 μm naplněné povrchově porézními částicemi byly dokonce vyšší než u kolony Acquity BEH Phenyl, která je plněná celkově porézními částicemi.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: *Jitka Nežádalová*

Supervisor: *PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.*

Title of Diploma thesis: *Evaluation of properties of new „fused – core" analytical columns in UHPLC system and a comparison with the BEH UPLC analytical columns*

This thesis was focused on testing properties of new analytical columns filled with porous shell particles (so-called fused-core) in UHPLC system and a comparison with the BEH UPLC analytical column.

The following analytical columns were tested: Kinetex PFP particle size of 1,7 μm and 2,6 μm (Phenomenex) and Ascentis Express Phenyl-Hexyl particle size of 2,7 μm (Sigma-Aldrich), which are columns with porous shell particles and Acquity BEH Phenyl column with totally porous particles size of 1,7 μm.

To compare the properties of the columns, 7 estrogen steroids were used using PDA detector at a wavelength of 280 nm for detection. Measurements were carried out using isocratic elution. The Mobile phase consisted of ultrapure water and acetonitrile.

Columns were evaluated in terms of efficiency, peak symmetry, resolution and the back pressure, which was generated on the columns. The efficiency of the columns was expressed as a number of theoretical plates and by van Deemter plots. Further, the influence of increase in temperature and flow-rate on the separation of estrogen steroids was monitored. With increasing temperature and flow-rate there was a significant reduction in analysis time. Columns were also compared in terms of speed of analysis.

The best performance expressed as a number of theoretical plates was achieved with the Acquity BEH Phenyl column and a slightly lower efficiency was evaluated on the Ascentis Express Phenyl-hexyl column. While there was no significant difference in efficiency of these two columns, comparing the values of back-pressure, much higher increase was achieved with the Acquity BEH Phenyl column compared to the Ascentis Express column. The fastest separation was obtained on Kinetex PFP column particle size of 1,7 μm. Together with the Kinetex PFP particle size of 2,6 μm these columns were evaluated to have worse efficiency and significant by increased in back-pressure. The values of back-pressure generated on the Kinetex PFP column particle size of 1,7 μm filled with porous shell particles were even higher than on Acquity BEH Phenyl column, which is filled with totally porous particles.

Obsah

1 Úvod ... 9

2 Cíl a zadání práce ... 11

3 Teoretická část ... 13

3.1 Rozšiřování chromatografických zón a dynamická van Deemterova teorie ... 14

3.2 Ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) ... 19

3.3 Ultra-vysoko účinná chromatografie při zvýšené teplotě (HT – UHPLC) ... 22

3.4 Povrchově porézní částice (Fused-core particles, Porous shell particles) ... 23

3.5 Chromatografická a separační data ... 26

3.5.1 Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater ... 26

3.5.2 Faktor symetrie ... 27

3.5.3 Rozlišení ... 27

3.6 Struktura estrogenních steroidů ... 28

4 Experimentální část ... 29

4.1 Použité chemikálie ... 30

4.2 Přístrojové vybavení ... 30

4.3 Příprava mobilní fáze a vzorků ... 31

4.4 Vlastní měření ... 31

5 Výsledky a diskuze ... 32

5.1 Kolona ACQUITY UPLC BEH Phenyl 1,7 µm / 2,1x100 mm ... 33

5.1.1 Vliv teploty na separaci ... 33

5.1.2 Vliv průtoku na separaci ... 35

5.1.3 Účinnost kolony ... 40

5.1.4 Faktor symetrie ... 42

5.1.5 Zpětný tlak ... 43

5.2 Kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl 2,7 µm / 2,1x100 mm ... 44

5.2.1 Vliv teploty na separaci ... 44

5.2.2 Vliv průtoku na separaci ... 46

5.2.3 Účinnost kolony ... 50

5.2.4 Faktor symetrie ... 52

5.2.5 Zpětný tlak ... 52

5.3 Kolona Kinetex PFP 1,7 µm / 2,1x100 mm 54
5.3.1 Vliv teploty na separaci 54
5.3.2 Vliv průtoku na separaci 55
5.3.3 Účinnost kolony 58
5.3.4 Faktor symetrie 60
5.3.5 Zpětný tlak 60
5.4 Kolona Kinetex PFP 2,6 µm / 2,1x100 mm 62
5.4.1 Vliv teploty na separaci 62
5.4.2 Vliv průtoku na separaci 63
5.4.3 Účinnost kolony 66
5.4.4 Faktor symetrie 68
5.4.5 Zpětný tlak 68
5.5 Porovnání kolon 70
5.5.1 Porovnání účinnosti 70
5.5.2 Porovnání zpětného tlaku 71
5.5.3 Porovnání symetrie 72
5.5.4 Porovnání separace za typických UHPLC podmínek 73
5.5.5 Porovnání separace za vyšší teploty 74
5.5.6 Nejrychlejší analýza při zachování optimální separace 76
6 Závěr 78
7 Použitá literatura 81

Seznam použitých zkratek

BEH	- bridged-ethyl-hybrid (hybridní sorbent)
a-EST	- α-estradiol
b-EST	- β-estradiol
ESN	- estron
ESTR	- estriol
EST-ac	- estradiol-acetát
EST-me	- estradiol-methylether
Et-EST	- ethynylestradiol
LC	- kapalinová chromatografie
PDA	- detektor s diodovým polem
SST	- system suitability test (test způsobilosti systému)
UHPLC	- ultra - vysoko účinná kapalinová chromatografie
UPLC	- ultra účinná kapalinová chromatografie (registrovaná značka firmy Waters)
HT-UHPLC	- ultra – vysoko účinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě

1 Úvod

Ultra vysoko účinná kapalinová chromatografie, jako jeden z moderních směrů v oblasti kapalinové chromatografie, se postupně dostává do popředí v celé řadě analytických laboratoří a je velmi často používanou metodou v separaci látek. Důvodem velkého rozmachu této metody je hlavně podstatné urychlení analýzy a to při zachování nebo zlepšení kvality separace z hlediska účinnosti a rozlišení. Dosažení takovéto separace je způsobeno zmenšováním částic chromatografického sorbentu až na velikost menší než 2 μm.

V současné době dochází k vývoji nových typů stacionárních fází a výrobě nových analytických kolon, které jsou naplněny povrchově porézními částicemi (fused core particles, porous shell particles). Hlavními výhodami povrchově porézních částic je vysoká účinnost chromatografické separace a zároveň rychlost analýzy bez nárůstu zpětného tlaku v systému na rozdíl od využití částic menších než 2 μm v systému UHPLC. Kolony naplněné povrchově porézními částicemi lze proto používat i při zpětných tlacích běžných pro HPLC separace.

2 Cíl a zadání práce

Diplomová práce byla zaměřena na testování vlastností nových analytických kolon naplněných povrchově porézními částicemi v systému UHPLC v porovnání s BEH UPLC analytickou kolonou naplněnou celkově porézními částicemi menšími než 2 μm. K měření bylo využito 7 látek ze skupiny estrogenních steroidů.

Cílem práce bylo porovnat vlastnosti povrchově porézních částic s částicemi menšími než 2 μm. Hodnocení probíhalo vyhodnocením SST parametrů a zároveň byl sledován nárůst zpětného tlaku, který byl generován na kolonách. Tyto parametry byly hodnoceny při použití různých průtoků a teplot. Byl sledován vliv rostoucí teploty a průtoků na separaci estrogenních steroidů. Kolony byly porovnávány z hlediska účinnosti, symetrie píků, rozlišení a zpětného tlaku. Účinnost kolon byla vyjádřená počtem teoretických pater a znázorněním van Deemterových křivek. Na závěr byly porovnány vlastnosti a výhody povrchově porézních částic a částic celkově porézních o velikosti 1,7 μm.

3 Teoretická část

3.1 Rozšiřování chromatografických zón a dynamická van Deemterova teorie

V roce 1950 se skupina holandských chemiků zabývala studiem dějů, které přispívají k rozmývání chromatografických zón [1]. J. J. van Deemter zjistil, že účinnost kolony může být zlepšena zmenšením velikosti částic. V roce 1956 představil rovnice popisující vztahy pro jednotlivé procesy ovlivňující rozšiřování chromatografických zón a vyjádřil také závislost účinnosti na lineární průtokové rychlosti [2].

V původní van Deemterově interpretaci, která byla dále rozšiřována dalšími autory jako J. C. Giddings a J. H. Knox, je rozmývání chromatografické zóny dáno třemi nezávislými aditivními procesy [2]-[5]:

- vířivou difúzí analytu v mobilní fázi při průchodu náplní kolony (A)
- molekulární (podélnou) difúzí analytu v mobilní fázi (B)
- odporem proti převodu hmoty (C)

Účinnost chromatografické separace lze vyjádřit výškovým ekvivalentem teoretického patra (HETP, H) jako součet dílčích příspěvků [6]:

$$\mathbf{H = H_F + H_L + H_M}$$

H - výškový ekvivalent teoretického patra

H_F - příspěvek vířivé difúze k výškovému ekvivalentu teoretického patra

H_L - příspěvek molekulární difúze analytu k výškovému ekvivalentu teoretického patra

H_M - příspěvek odporu proti převodu hmoty k výškovému ekvivalentu teoretického patra

1) *Vířivá difúze v mobilní fázi*

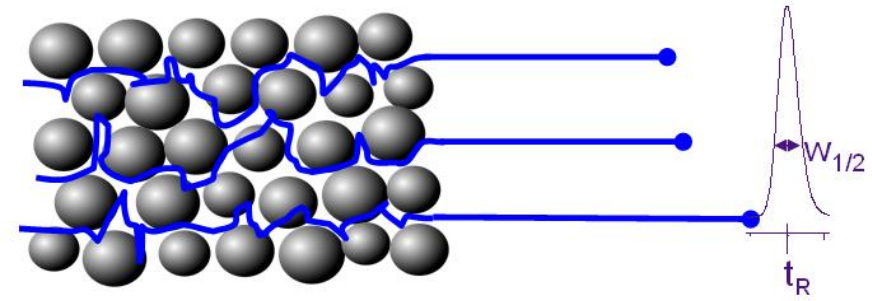
Souvisí s nehomogenitou stacionární fáze. Mobilní fáze proudí v širších kanálcích rychleji než v kanálcích užších. Molekuly procházející různými kanálky postupují různou rychlostí [6]. Člen A vzrůstá se zvyšujícím se průměrem velikosti částic (d_p) a závisí na pravidelnosti uspořádání náplně [7] – Obr. 1.

Příspěvek vířivé difúze lze vyjádřit výrazem [6]:

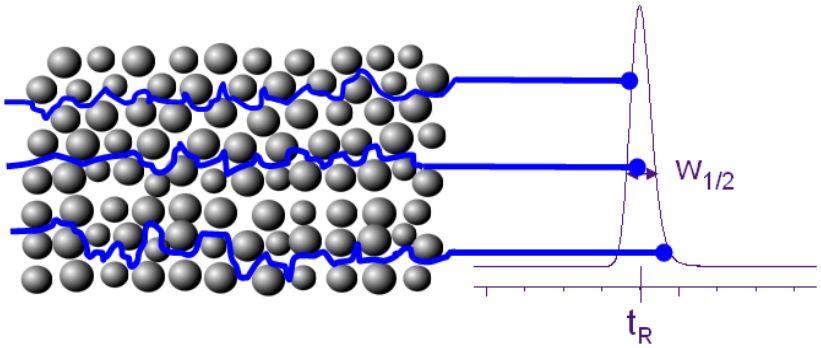
$$H_F = \lambda \, . \, d_p = A$$

λ - koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony

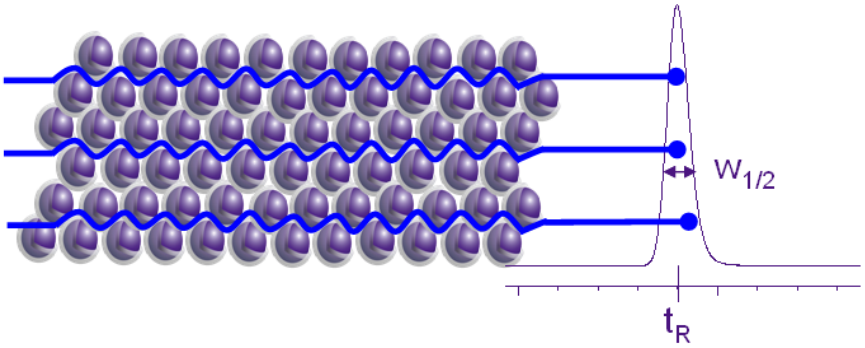
d_p - velikost částic náplně kolony



[a]



[b]



[c]

Obr. 1: Znázornění členu A – vířivé difúze u částic o velikosti 3 – 5 µm [a], částic menších než 2 µm [b] a povrchově porézních částic Kinetex [c]. Z obrázku je patrné, že příspěvek vířivé difúze k rozšiřování chromatografických zón bude klesat se zmenšujícím se průměrem částic a rovnoměrným plněním chromatografické kolony. Obrázek převzat ze zdroje [8].

2) *Molekulární difúze v mobilní fázi*

Molekuly látky difundují z místa s vyšší koncentrací do místa s nižší koncentrací a pohybují se ve směru toku mobilní fáze i proti toku mobilní fáze. Molekulární difúze je popsána podle Fickových zákonů. Difúzi ovlivňuje zejména difúzní koeficient D_m [6]. Člen B se uplatňuje zvláště při malých průtokových rychlostech, kdy je důležitá doba zdržení uvnitř kolony a při vysokých teplotách, kdy je molekulární difúze nejvyšší. Tento člen je malý při rychlé eluci [7].

Příspěvek molekulární difúze k rozmytí zón je dán vztahem [6]:

$$\mathbf{H_L = \gamma \, . \, D_m / u = B / u}$$

γ - korekční faktor charakterizující tvar kanálků v náplni kolony

D_m - difúzní koeficient

u - průtoková rychlost mobilní fáze

3) *Odpor proti převodu hmoty*

Rychlost převodu hmoty mezi fázemi je určována především difúzí analytu ve stacionární fázi nebo ve stagnantní mobilní fázi v pórech nosiče a je rovněž závislá na tvaru a velikosti zrn náplně, dále na tloušťce vrstvy stacionární fáze [6] – Obr. 2.

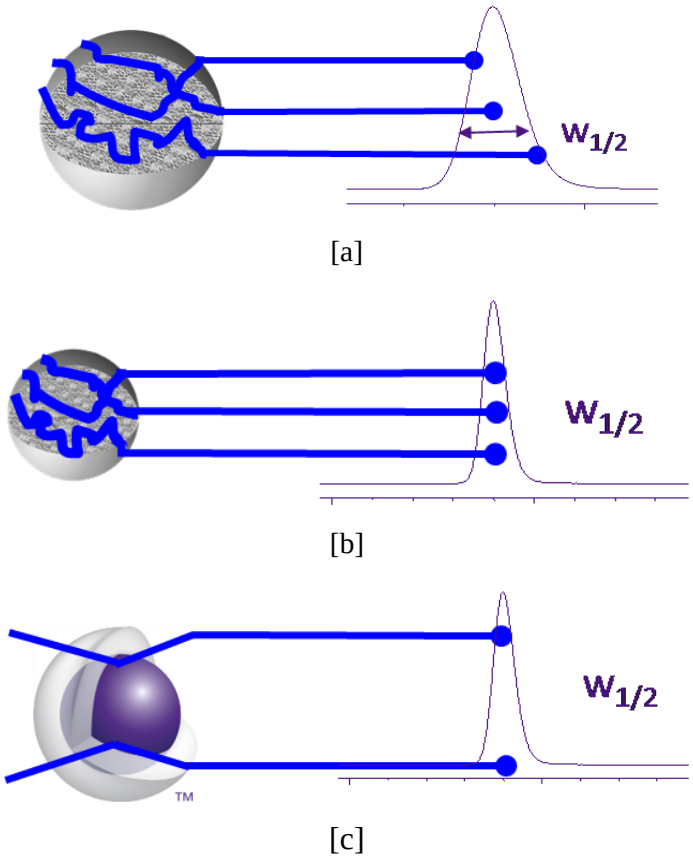
Příspěvek odporu proti převodu hmoty k rozmytí zón lze popsat vztahem [6]:

$$\mathbf{H_M = (C_M + C_S) \, . \, u = C \, . \, u}$$

C_M - konstanta závislá na difúzním koeficientu analytu v mobilní fázi

C_S - konstanta závislá na difúzním koeficientu analytu ve stacionární fázi

u - průtoková rychlost mobilní fáze

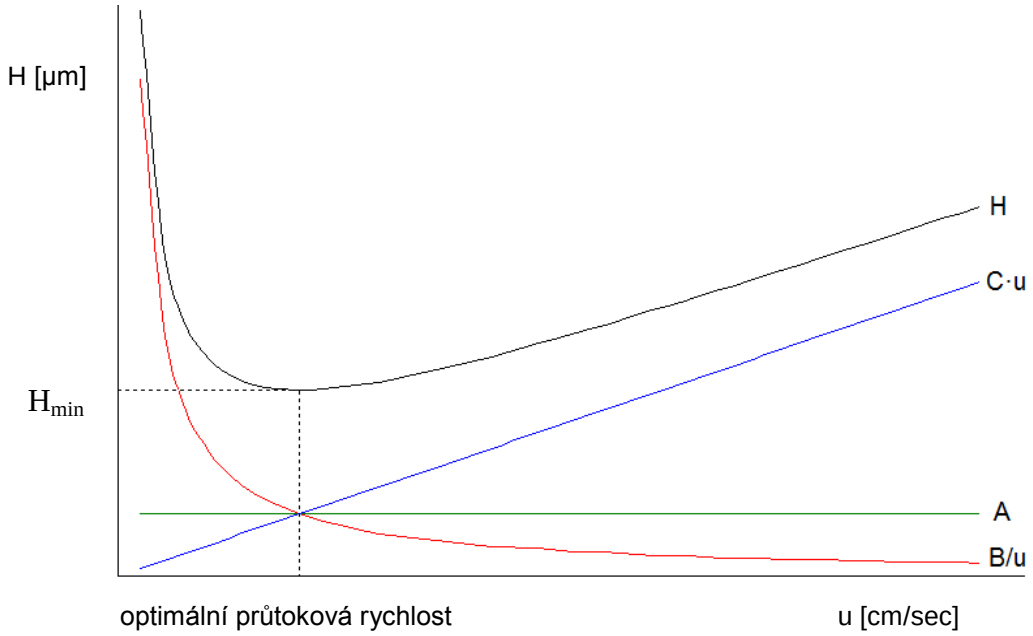


Obr. 2: Znázornění členu C – odporu proti převodu hmoty u částic o velikosti 3 µm [a], částic menších než 2 µm [b] a povrchově porézních částic Kinetex [c]. Vzdálenost, která musí být difúzí uvnitř pórů u povrchově porézních částic překonána, je podstatně kratší než u částic o velikosti 3 µm, a proto dochází ke snížení odporu proti převodu hmoty, tzn. snížení členu C. Obrázek převzat ze zdroje [8].

Van Deemterova křivka popisuje vztah mezi lineární průtokovou rychlostí (u) a výškovým ekvivalentem teoretického patra (H) a je široce používána pro vyhodnocování účinnosti kolony – Obr. 3. Celkové rozmytí chromatografických zón lze tedy vyjádřit níže uvedenou rovnicí [9]:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

kde člen A, B a C představují vířivou difúzi, molekulární difúzi a odpor proti převodu hmoty.



Obr. 3: Znázornění van Deemterovy křivky se zobrazením průběhu jednotlivých členů A, B, C a optimální průtokové rychlosti. H_{min} značí minimum křivky a nejlepší účinnost. Obrázek převzat a upraven ze zdroje [10].

Minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které daná kolona vykazuje největší účinnost a dochází tedy k minimálnímu rozšiřování zón analytů.

Pro výpočet lineární průtokové rychlosti lze použít následující vzorec:

$$u_S = \frac{Fv}{s} = \frac{f/60}{\pi.r^2}$$

u_S - povrchová průtoková rychlost [cm/sec]

Fv - objemový průtok [cm^3/sec]

s - průřez kolony [cm^2]

f - průtok [ml/min]

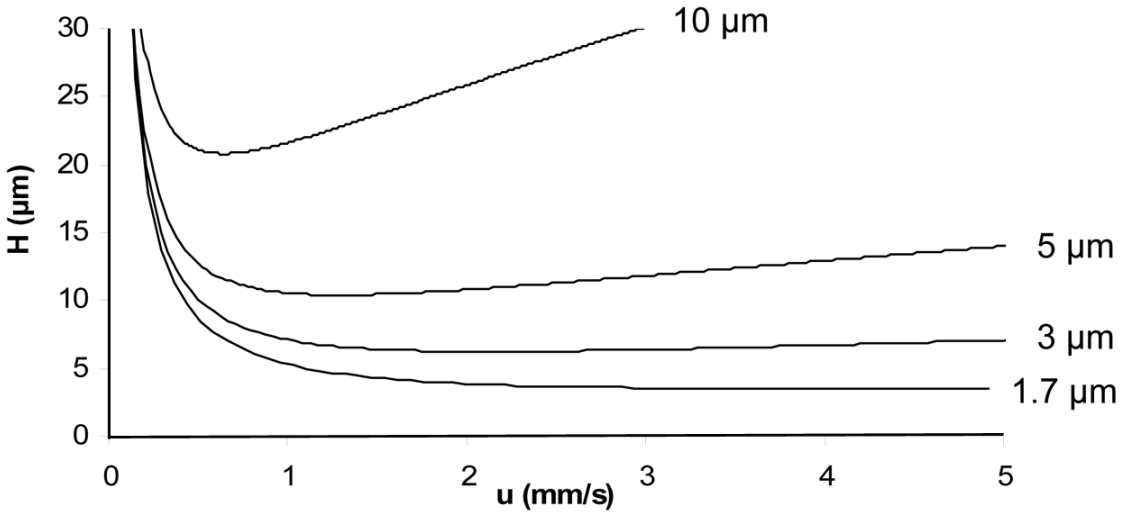
π - Ludolfovo číslo

r - poloměr kolony

3.2 Ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie je nová generace separační chromatografické techniky, která v porovnání s Vysoko účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) umožňuje zkrátit dobu analýzy při současném zlepšení citlivosti a rozlišení [11]. Je zároveň jedním z nejlepších řešení ke zlepšení chromatografické účinnosti. Hlavním nástrojem pro získání takovéto separace bylo zmenšování částic chromatografického sorbentu až na velikost menší než 2µm [12].

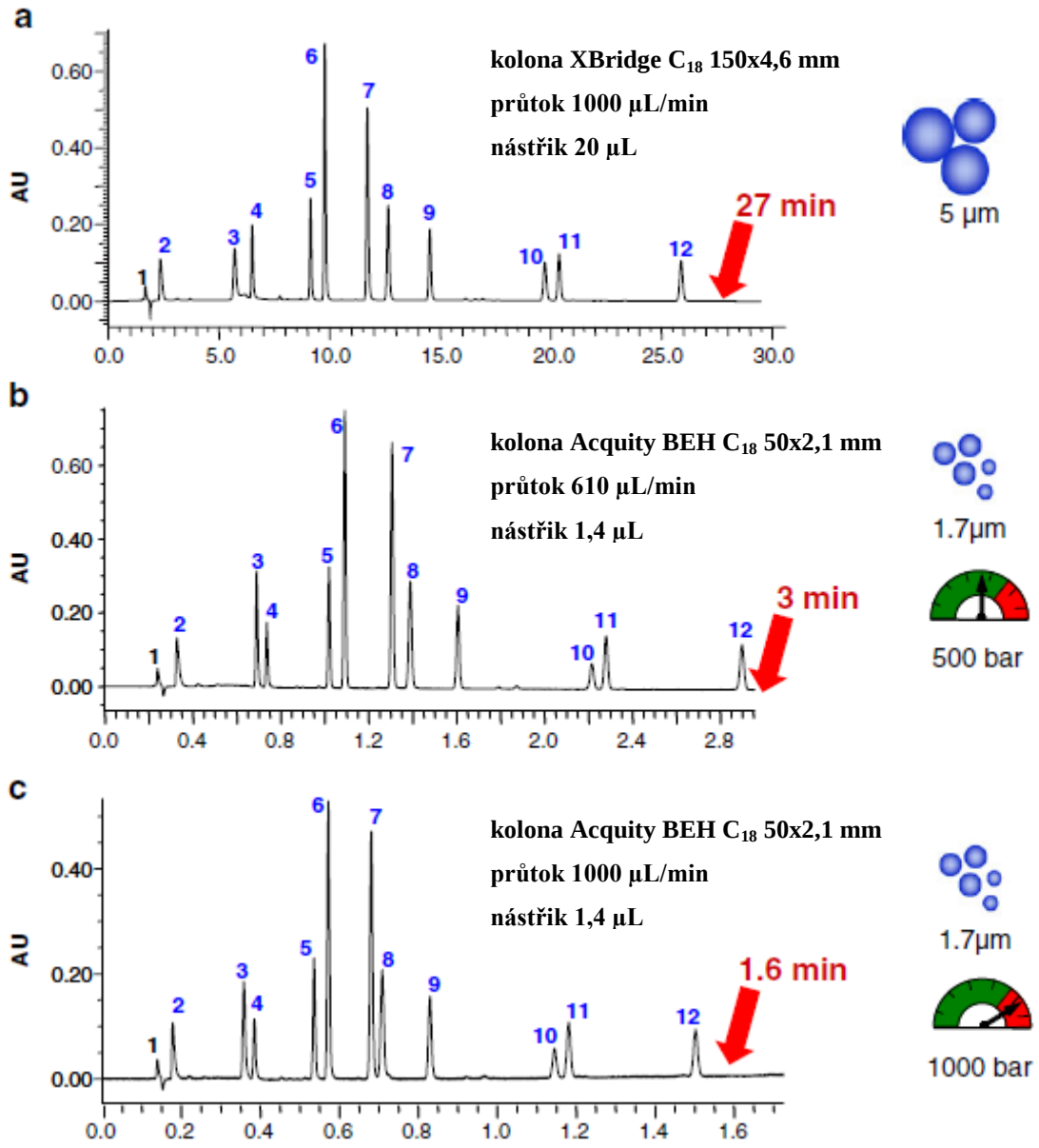
Van Deemterova křivka pro částice menší než 2 µm je podstatně méně strmá a dosahuje nižších hodnot H, tedy vyšší účinnosti ve srovnání s částicemi o větším průměru – Obr. 4.



Obr. 4: Znázornění průběhu van Deemterových křivek pro částice o velikosti 10 µm, 5 µm, 3 µm a 1,7 µm. Obrázek převzat ze zdroje [13].

Optimální separační účinnosti je dosaženo při vyšších lineárních průtokových rychlostech. Tato účinnost je zachována v širším rozsahu lineárních průtokových rychlostí a to díky nízkému odporu proti převodu hmoty. Proto mohou být částice menší než 2 µm používány pro dosažení lepší účinnosti, rozlišení píků a zkrácení doby analýzy [13].

Kolony plněné těmito částicemi se staly komerčně dostupné od roku 2004 a přinášejí spolehlivou účinnost v porovnání s konvenčními velikostmi částic [14][15]. Porovnání rychlosti separace UHPLC a konvenční HPLC separace je uvedeno na Obr. 5.



Obr. 5: Ukázka UHPLC separace s využitím částic menších než 2 µm v porovnání s konvenčními částicemi o velikosti 5 µm. Při zachování selektivity a rozlišení dochází k výraznému urychlení analýzy. Obrázek převzat a upraven ze zdroje [16].

Využití takto malých částic pro chromatografické separace však způsobí výrazný nárůst zpětného tlaku v systému a podle Darcyho zákona tento nárůst bude nepřímo úměrný druhé mocnině velikosti částice [17][18]:

$$\Delta P = \varphi \frac{\eta L u}{d_p^2}$$

φ - faktor odporu kolony

η - viskozita mobilní fáze

L - délka kolony

u - lineární průtoková rychlost mobilní fáze

d_p - velikost částice

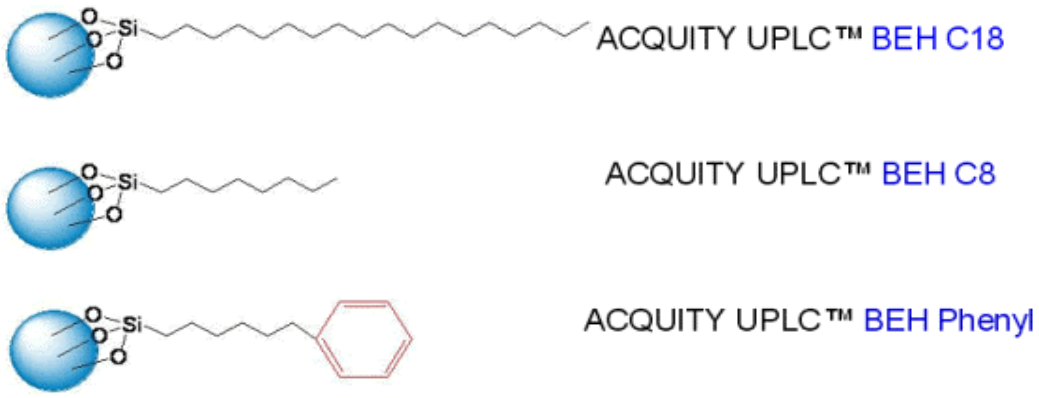
Proto musí UHPLC systém v první řadě odolávat vysokému zpětnému tlaku, ale není to pouze jediný požadavek. Musí být přizpůsobený provozu v rychlém režimu s redukovaným průměrem kolony (2,1 mm), omezeným množstvím tepla vznikajícího třením a podstatně sníženou spotřebou rozpouštědla. Požadavky pro UHPLC systém byly shrnuty v odborném článku Nguyen a kol. následovně [13]:

- robustní pumpa a dávkovací systém
- rychlé dávkovací cykly
- co nejmenší zpoždění gradientu
- vysoká frekvence sběru dat (>20 Hz)
- minimální mimokolonové objemy a nízkoobjemová detekční cela
- vhodné kolony a stacionární fáze

Klíčovým pravidlem k vykonávání účinné separace za ultravysokého tlaku je kvalita a stabilita stacionární fáze. V poslední době je mnoho nových stacionárních fází vyrobeno tak, aby došlo k urychlení analýzy a zároveň se zachovala kvalita separace z hlediska vysokého rozlišení a účinnosti. Vývoj nových stacionárních fází vede směrem k vysoké chemické (široké rozmezí pH) a mechanické stabilitě (vysoký zpětný tlak) [12].

Jako základ stacionární fáze je využíván buď silikagel nebo hybridní stacionární fáze. Stacionární fáze na bázi silikagelu je většinou možné použít v rozmezí hodnot pH 2-8, proto se někteří výrobci snaží zvýšit chemickou stabilitu samotného silikagelu, aby bylo možné pracovat i mimo tyto konvenční hodnoty pH (např. výrobce Agilent, kolona Zorbax Extend C-18, pH v rozmezí hodnot 2-11,5) [12][19]. Z hlediska chemické stability je výhodnější využití hybridních stacionárních fází, které je možno použít takřka v celém rozmezí pH stupnice, nejčastěji pH 1-12 (např. Acquity BEH stacionární fáze). V rámci získání odlišné selektivity při separaci se zavádí nové modifikace.

Stacionární fáze na bázi silikagelu a hybridní stacionární fáze jsou nejčastěji modifikovány pomocí C8, C18, fenylovou nebo kyano skupinou [12] - Obr. 6.



Obr. 6: Příklad UHPLC stacionárních fází firmy Waters. Obrázek převzat a upraven ze zdroje [20].

3.3 Ultra-vysoko účinná chromatografie při zvýšené teplotě (HT – UHPLC)

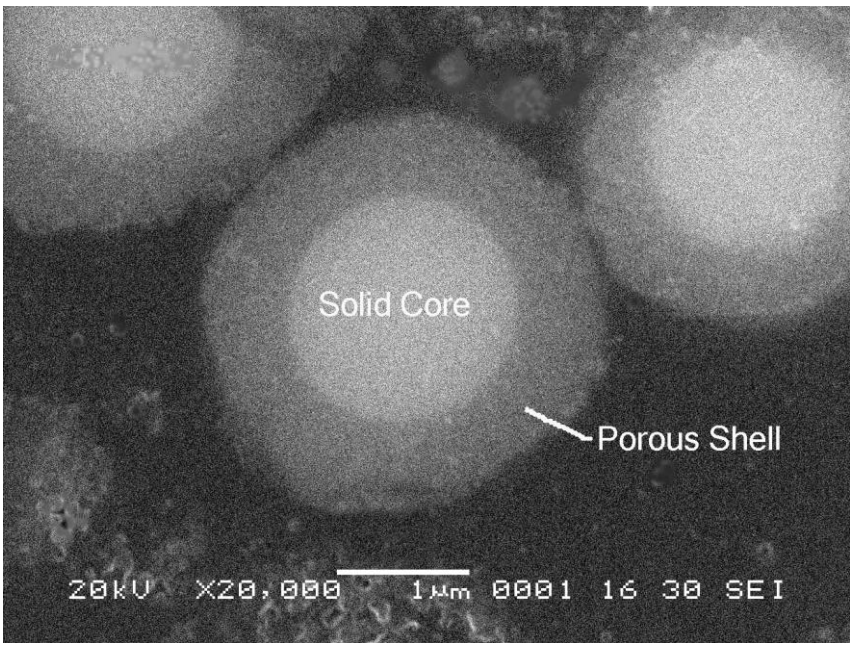
UHPLC se zdá být velice zajímavou technikou kapalinové chromatografie, zvláště když se použije ve spojení se zvýšenou teplotou. HT-UHPLC separace tedy kombinuje malé částice, ultra vysoký tlak a zvýšenou teplotu [16]. Vzrůstající teplota kolony může podstatně snížit viskozitu mobilní fáze a stejně tak současně snížit odpor proti převodu hmoty [21], což se projeví menší strmostí van Deemterovy křivky [12]. Zároveň tak dovoluje provoz při vyšším průtoku za stejného tlaku [21]. Další výhodou využití zvýšené teploty je schopnost podstatně zkrátit čas separace s minimální ztrátou účinnosti [22].

Nicméně i přes uvedené výhody není HT-UHPLC běžně využívána, jelikož má i své stinné stránky. Problémem je omezená dostupnost stabilních stacionárních fází, které jsou stálé při vysokých teplotách. A dále může docházet k rozkladu nestabilních sloučenin. Přesto někteří autoři tvrdí, že pokud je doba analýzy krátká, k rozkladu sloučenin nedojde [12].

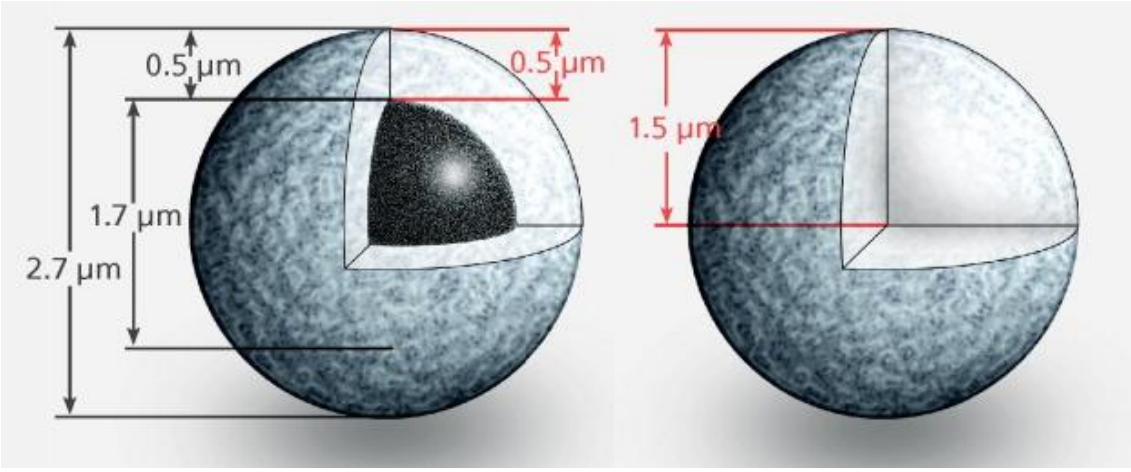
3.4 Povrchově porézní částice (Fused-core particles, Porous shell particles)

Povrchově porézní částice byly do chromatografické separace zavedeny nedávno jako náhrada částic menších než 2 µm [23]. Technologie výroby povrchově porézních částic byla objevena J. J. Kirklandem a tyto částice začaly být komerčně dodávány jako HALO částice [24] – Obr. 7. Jsou tvořeny z pevného jádra o velikosti 1,7 µm a vrstvou porézního silikagelu o šířce 0,5 µm, což celkově vytváří průměr částice 2,7 µm [23][25]. Stejné rozměry povrchově porézních částic najdeme i u kolon Ascentis (Sigma-Aldrich) a Poroshell (Agilent) [26][27], zatímco částice kolon Kinetex (Phenomenex) se rozměry liší. Jednak jsou vyráběny částice Kinetex o průměru 2,6 µm (1,9 µm pevné jádro a 0,35 µm porézní vrstva) a dále menší částice Kinetex o průměru 1,7 µm (1,25 µm pevné jádro a 0,23 µm porézní vrstva), které jsou pro UHPLC aplikace vhodnější [28].

Povrchová porézní vrstva obsahuje 9 nm póry a její objem reprezentuje cca 87 % celkového objemu částice. Kolony plněné těmito částicemi mohou být použity ve standardních přístrojích, neboť nevyžadují zvýšený tlak k dosažení požadovaných průtokových rychlostí [29].



Obr. 7: Elektronově mikroskopický snímek „fused-core“ částic (poskytnuto Dr. J. Kirklandem). Obrázek převzat ze zdroje [29].

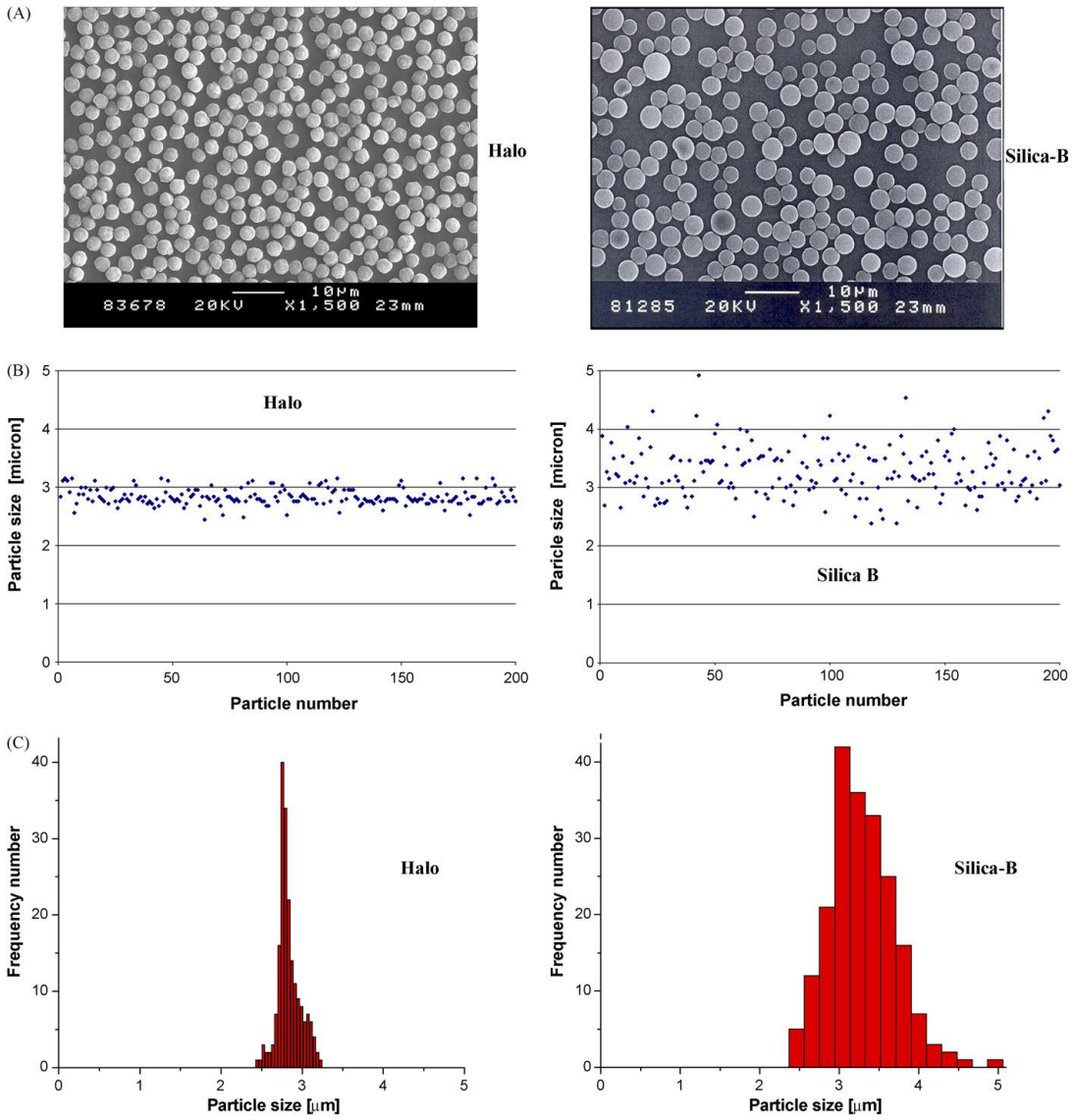


[a] [b]

Obr. 8: Porovnání povrchově porézní částice Ascentis Express [a] s celkově porézní částicí [b]. Červeně je znázorněna difúzní cesta oběma částicemi. Difúze u povrchově porézních částic je tedy mnohem menší v porovnání s celkově porézními částicemi, a proto nedochází k tak výraznému rozmývání chromatografických zón (viz. Obr. 2). Obrázek převzat a upraven ze zdroje [26].

Porovnáním s celkově porézními částicemi podobného průměru je difúze u povrchově porézních částic mnohem menší, protože vnitřní pevné jádro není propustné pro analyty [30][31] – Obr. 8. Vzdálenost, jež musí být překonána difúzí ve stagnantní mobilní fázi uvnitř pórů, není nikdy delší než 0,5 µm. Tato vzdálenost je poněkud kratší než např. 0,85 µm pro celkově porézní částice menší než 2 µm. To znamená, že rozmývání chromatografických zón je omezené, což se promítá do účinnosti [29]. Dochází tedy ke snížení odporu proti převodu hmoty, tzn. snížení členu C van Deemterovy křivky [30][31]. To vede k omezení axiální difúze a k minimálnímu rozmývání zón, zvláště při zvýšené lineární průtokové rychlosti [32]. Rovněž je omezena i vířivá difúze (snížení členu A, který závisí na velikosti částic, distribuci velikosti částic a na homogenitě naplnění kolony). Zejména díky zmenšení členu C je možné používat vyšší průtoky mobilní fáze bez ztráty chromatografické účinnosti [33].

Důležité faktory, které zodpovídají za vyšší účinnost povrchově porézních částic, jsou tedy následující: relativně malý průměr částic, přítomnost porézní slupky a také daleko pravidelnější distribuce a hustota naplnění kolony ve srovnání s celkově porézními částicemi klasického silikagelu [34] – Obr. 9.



Obr. 9: Porovnání distribuce povrchově porézních částic HALO a porézních částic klasického silikagelu typu B. Obrázek převzat ze zdroje [34].

Využití povrchově porézních částic nabízí praktickou alternativu částic menších než 2 μm [30]. Kolony naplněné těmito částicemi poskytují rychlou a účinnou separaci podobnou kolonám s částicemi menšími než 2 μm, avšak bez nárůstu zpětného tlaku v systému [35][36].

Nevýhodou ovšem je, že dosud dostupné stacionární fáze, jsou pouze na bázi silikagelu (Tab. 1). To přináší omezení chemické stability (pH cca 2-8), ale i teplotní stability (teplota většinou do 60 °C) povrchově porézních částic.

Název kolony	Velikost částice [µm]	modifikace stacionární fáze	Výrobce
Ascentis Express	2,7	C18, C8,RP-Amid, Fenyl-hexyl, HILIC, PFP	Sigma-Aldrich
Kinetex	1,7 2,6	C18, PFP, HILIC, C8, XB-C18 C 18, PFP, HILIC, C8, XB-C18	Phenomenex
Poroshell	2,7	C18, C8, C3	Agilent
HALO	2,7	C18, C8, RP-Amid Fenyl-hexyl, HILIC	Mac-Mod Analytical

Tab. 1: Přehled dostupných stacionárních fází tvořených povrchově porézními částicemi.

3.5 Chromatografická a separační data

3.5.1 Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony se může vypočítat jako zdánlivý počet teoretických pater (N). Použije se následující vzorec, hodnoty t_R a w_h se musí vyjádřit ve stejných jednotkách [37]:

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

t_R - retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

w_h - šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části kolony se nazývá výškový ekvivalent teoretického patra (H). Proto kolona o délce L má výškový ekvivalent teoretického patra [38]:

$$H = \frac{L}{N}$$

Kolona je tím účinnější, čím více má teoretických pater a čím menší má výškový ekvivalent teoretického patra.

3.5.2 Faktor symetrie

Faktor symetrie píku (A_s, nebo faktor chvostování píku) se vypočítá podle vzorce [37]:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.

3.5.3 Rozlišení

Rozlišení (R_s) mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce [37]:

$$R_S = \frac{1{,}18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$, kde $t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1} a t_{R2} - retenční časy

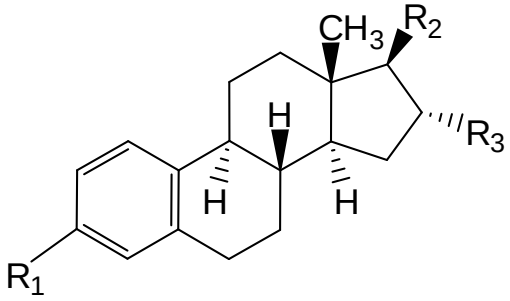
w_{h1} a w_{h2} - šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

3.6 Struktura estrogenních steroidů

Všechny steroidy mohou být odvozeny z cholesterolu, skládají se ze tří šestičlenných a jednoho pětičlenného uhlíkatého kruhu. Obvykle jsou uspořádány do struktury 6-6-6-5, ke které jsou připojeny různé funkční skupiny a postranní řetězce. Tři hlavní přírodní estrogeny (estradiol, estriol, estron) jsou 18- ti uhlíkaté steroidy, které se liší oxidačními stavy na konci pěti uhlíkatého cyklu. Syntetický steroid ethynylestradiol je odvozený od estradiolu [39].

Z hodnot dekadického logaritmu rozdělovacího koeficientu (log P) vyplývá, že steroidní hormony jsou lipofilní sloučeniny [40]. Rozdělovací koeficient (P) vyjadřuje poměr celkové koncentrace látky rozpuštěné v lipidech k celkové koncentraci léčiva rozpuštěného ve vodní fázi. Hodnoty log P hrají důležitou roli při prostupu léčiv přes biologické membrány [41]. Pro dobrou prostupnost membránami a distribuci je optimální hodnota log P přibližně 2. Podle Lipinského pravidla pěti špatná absorpce léčiva přes biologické bariéry obvykle nastane, když má molekula léčiva hodnotu log P větší než 5. Podle hodnot pKa jsou estrogenní steroidy slabými kyselinami (Tab. 2).



Estrogenní steroidy	R1	R2	R3	log P	pKa	molekulová hmotnost
Estriol	−OH	−OH	−OH	2,53±0,29	10,25±0,7	288,38
β-estradiol	−OH	−OH		4,15±0,26	10,27±0,6	272,38
α-estradiol	−OH	..OH		4,15±0,26	10,27±0,6	272,38
Ethynyl estradiol	−OH	−OH, CΞCH		4,11±0,32	10,24±0,6	296,40
Estron	−OH	O		3,62±0,37	10,25±0,4	270,37
Estradiol-3-methyléter	$-OCH_3$	−OH		4,98±0,26	15,07±0,4	286,41
Estradiol-17-acetát	−OH	$-O-CO-CH_3$		5,03±0,26	10,26±0,6	314,42

Tab. 2: Struktura a vlastnosti estrogenních steroidů

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Acetonitril Chromasolv for HPLC gradient grade (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Ultračistá voda Millipore MilliQRG (Millipore Corp., USA)

Estriol 99,9 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

β-estradiol, minimum 98 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

α-estradiol hemihydrát 98,8 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Ethynylestradiol ≥ 98 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Estron 99+ % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Estradiol-3-methyléter 98,3 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Estradiol-17-acetát 99,3 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

4.2 Přístrojové vybavení

- K měření byl použit přístroj ACQUITY Ultra Performance LC, který se skládá ze soustavy:
  - ACQ-binary solvent manager (čerpadlo)
  - ACQ-sample manager (autosampler)
  - ACQ-column manager (kolonový termostat)
  - ACQ-PDA detektor (detektor s diodovým polem)

- Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Ultrazvuková vodní lázeň: Sonorex Digitec, BANDELIN ELECTRONIC, Berlín
- Vakuová pumpa: MEDIST s.r.o., Slovensko
- Automatické pipety: Biohit, FISHER SCIENTIFIC, ČR
- Minitřepačka: Ika Works, USA

- Kolony:
  - Analytická kolona ACQUITY UPLC BEH Phenyl 1,7 µm 2,1x100 mm
  - Analytická kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl 2,7 µm 2,1x100 mm
  - Analytická kolona Kinetex PFP 2,6 µm 2,1x100 mm
  - Analytická kolona Kinetex PFP 1,7 µm 2,1x100 mm

	Acquity BEH Phenyl	Ascentis Express Phenyl Hexyl	Kinetex PFP	Kinetex PFP
výrobce	Waters	Sigma-Aldrich	Phenomenex	Phenomenex
rozměry kolony	2,1 x 100 mm	2,1 x 100 mm	2,1 x 100 mm	2,1 x 100 mm
velikost částic	1,7 µm	2,7 µm	1,7 µm	2,6 µm
typ částic	menší než 2 µm	povrchově porézní	povrchově porézní	povrchově porézní
pH	1–12	2–9	1,5-8	1,5-8
T_{max} [°C]	90 °C	60 °C	60 °C	60 °C
P_{max} [psi]	15000	15000	14500	8700
carbon load [%]	15 %	–	9 %	9 %

Tab. 3: Charakteristika kolon.

4.3 Příprava mobilní fáze a vzorků

Jako mobilní fáze byla použita ultračistá voda filtrovaná přes 0,45 µm membránový filtr a acetonitril. Poměr těchto složek mobilní fáze při isokratické eluci byl 60:40 (H_2O:ACN).

K separaci byly použity standardy sedmi estrogenních steroidů. Zásobní roztoky těchto standardů byly připraveny rozpuštěním přibližně 1 mg každého steroidu přesně v 1 ml acetonitrilu. Pouze Estriol byl rozpouštěn ve směsi acetonitrilu a vody v poměru 50:50, protože v samotném acetonitrilu byl špatně rozpustný. K urychlení rozpouštění standardů byl použit ultrazvuk a třepačka. Směs steroidů použitá k měření byla připravena smícháním 50 µl od každého zásobního roztoku (350 µl), 50 µl acetonitrilu a 600 µl ultračisté vody tak, aby složením odpovídala poměru mobilní fáze a bylo tak vyloučeno ovlivnění tvaru píku.

4.4 Vlastní měření

Testování vlastností nových fused-core analytických kolon v porovnání s BEH UPLC analytickou kolonou probíhalo na přístroji ACQUITY UPLC za detekce na PDA detektoru při vlnové délce 280 nm. Měření bylo prováděno za použití isokratické eluce a nástřiku 3 µl směsi steroidů. Pro větší přesnost výsledků měření bylo provedeno 5 nástřiků u každého průtoku a použité teploty. Byl sledován vliv průtoku a teploty na separaci steroidů. Zároveň byl sledován i nárůst zpětného tlaku, který byl generován na koloně.

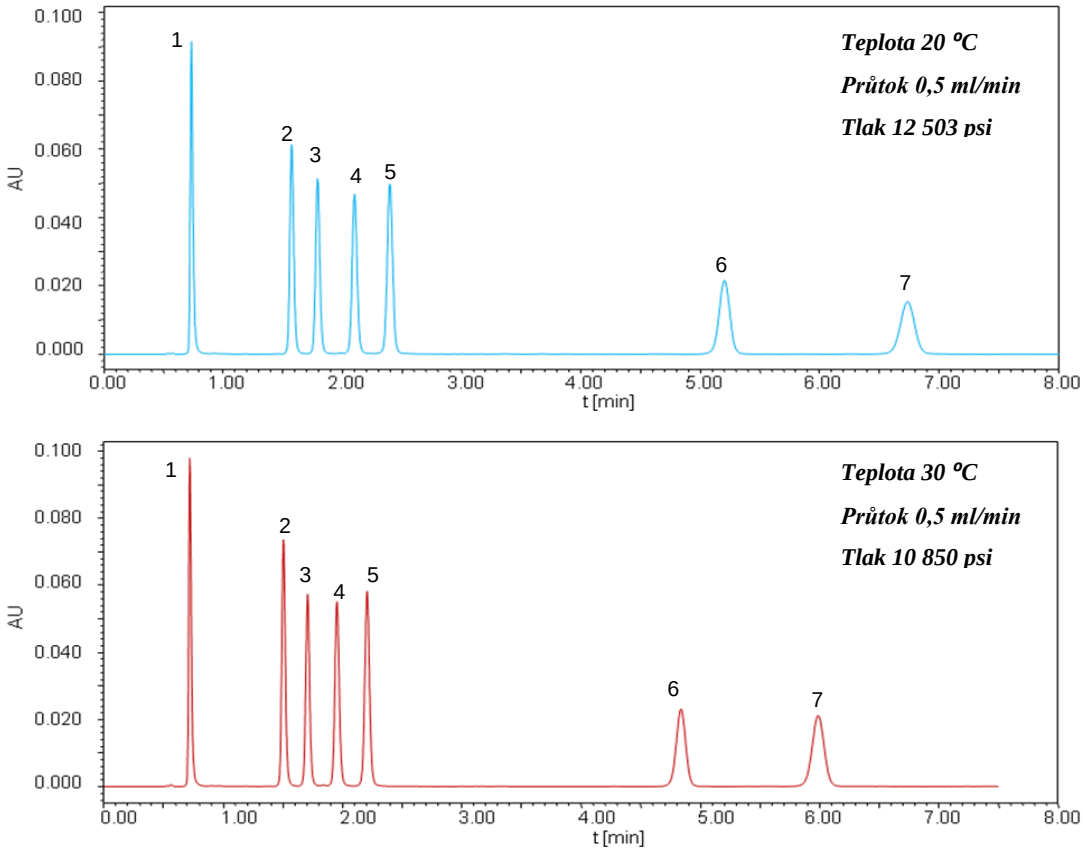
5 Výsledky a diskuze

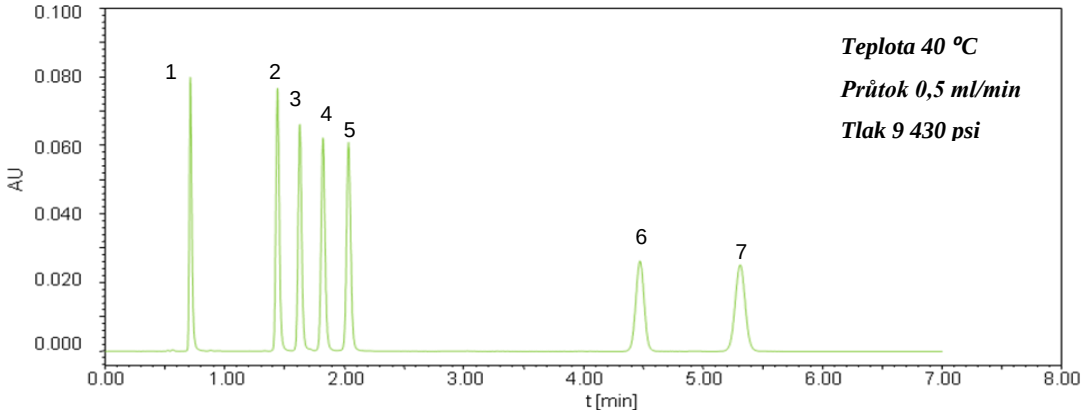
5.1 Kolona ACQUITY UPLC BEH Phenyl 1,7 µm / 2,1x100 mm

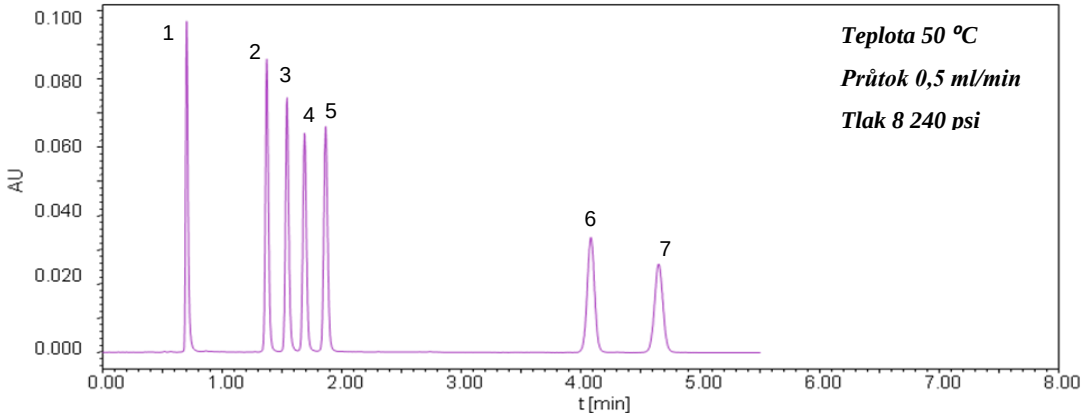
5.1.1 Vliv teploty na separaci

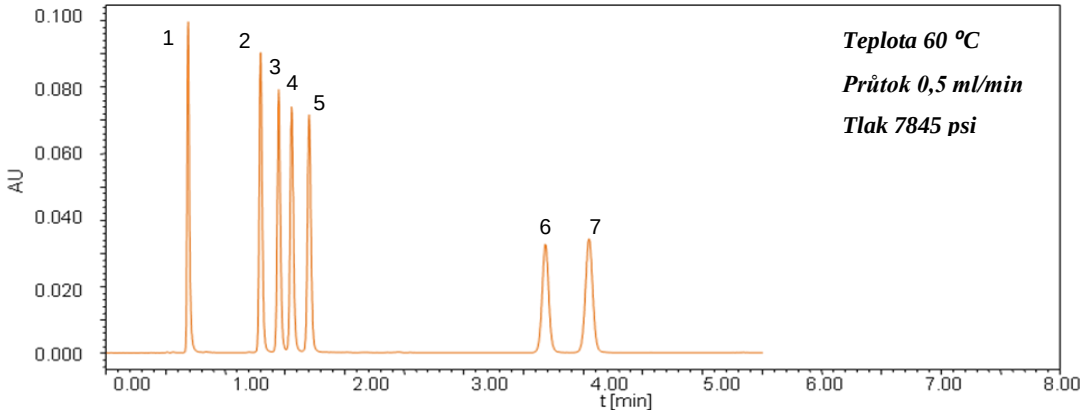
Rostoucí teplota měla zásadní vliv na rychlost separace. Při teplotě 20 °C trvala analýza 7 minut a při nejvyšší teplotě 90 °C došlo k eluci za necelé 3 minuty. Z výsledků však vyplývá, že již teplota 80 °C a vyšší není k separaci vhodná. Podmínky, při kterých ještě došlo k optimálnímu dělení píků, byly při teplotě 70 °C a průtocích nižších než 0,5 ml/min. Teplota měla navíc zásadní vliv na zpětný tlak, který působil na kolonu. Se zvyšující se teplotou tlak klesal, a proto mohlo být použito vyšších průtoků. Při teplotě 20 °C byl maximální možný průtok 0,6 ml/min a při teplotě 90 °C mohl průtok dosahovat až 1,3 ml/min. Avšak při takto vysoké teplotě a průtoku již nedocházelo k optimálnímu dělení téměř všech estrogenních steroidů (β-estradiol, α-estradiol, ethynylestradiol, estron, estradiol-methyléter a estradiol-acetát). Experimenty se složením mobilní fáze k získání potřebné selektivity nebyly předmětem této práce.

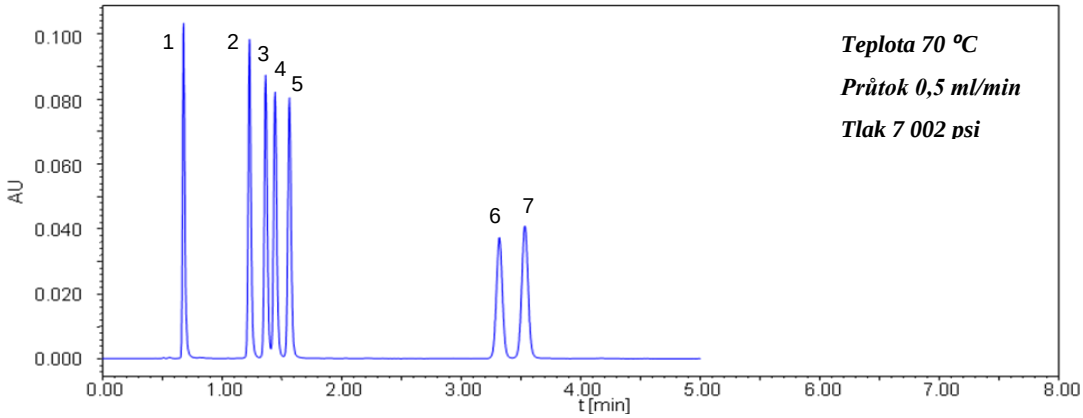
Následující chromatogramy (Obr. 10) znázorňují vliv zvyšující se teploty na separaci. Chromatogramy jsou uvedeny vzestupně od nejnižší teploty (20 °C) až po teplotu nejvyšší (90 °C) při průtoku 0,5 ml/min.

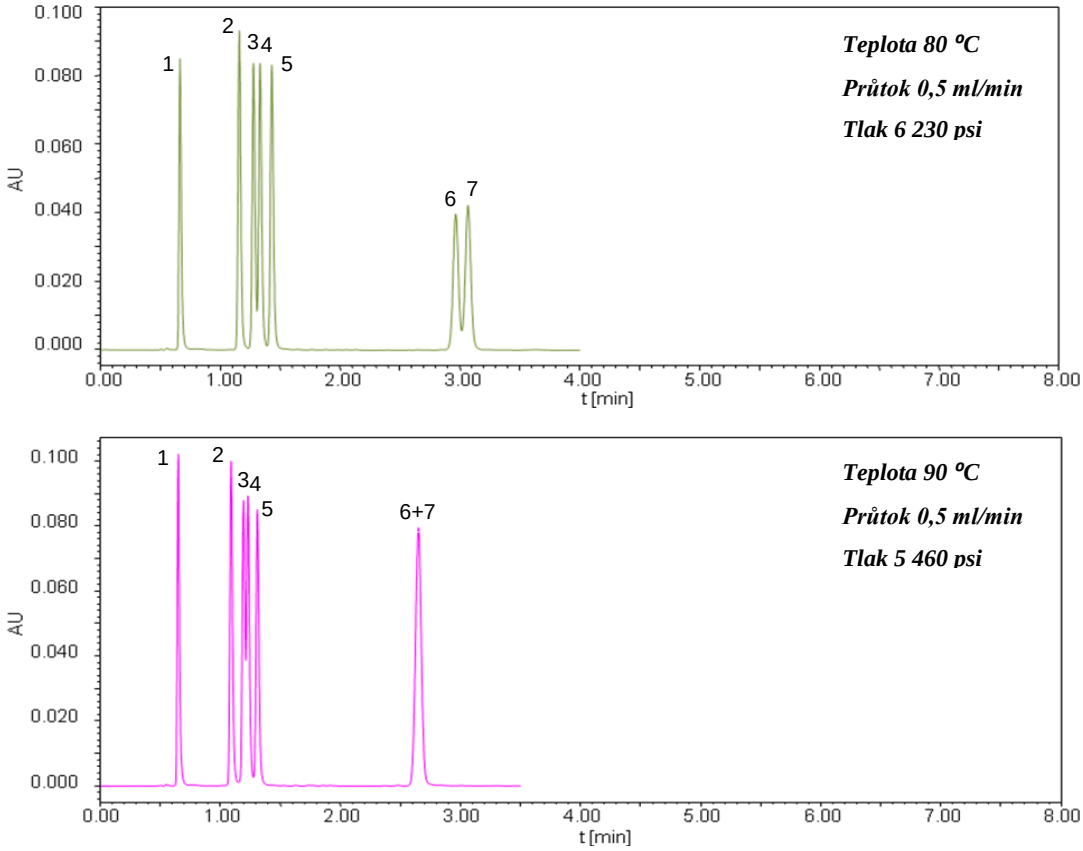



Teplota 40 °C
Průtok 0,5 ml/min
Tlak 9 430 psi
AU
t [min]


Teplota 50 °C
Průtok 0,5 ml/min
Tlak 8 240 psi
AU
t [min]


Teplota 60 °C
Průtok 0,5 ml/min
Tlak 7845 psi
AU
t [min]


Teplota 70 °C
Průtok 0,5 ml/min
Tlak 7 002 psi
AU
t [min]

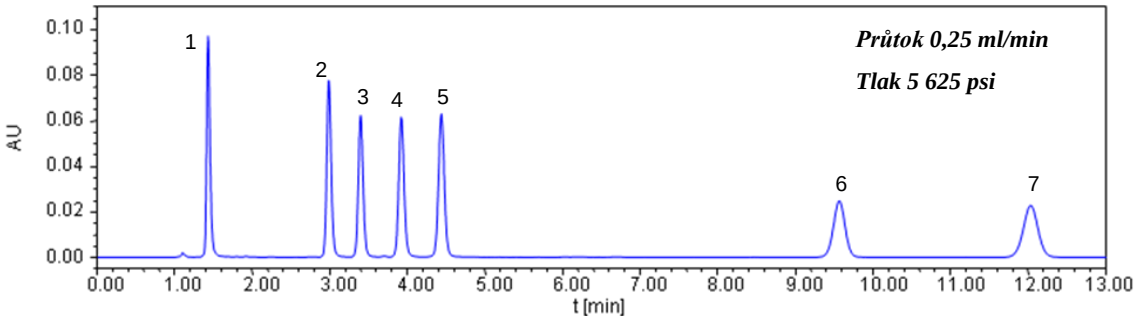


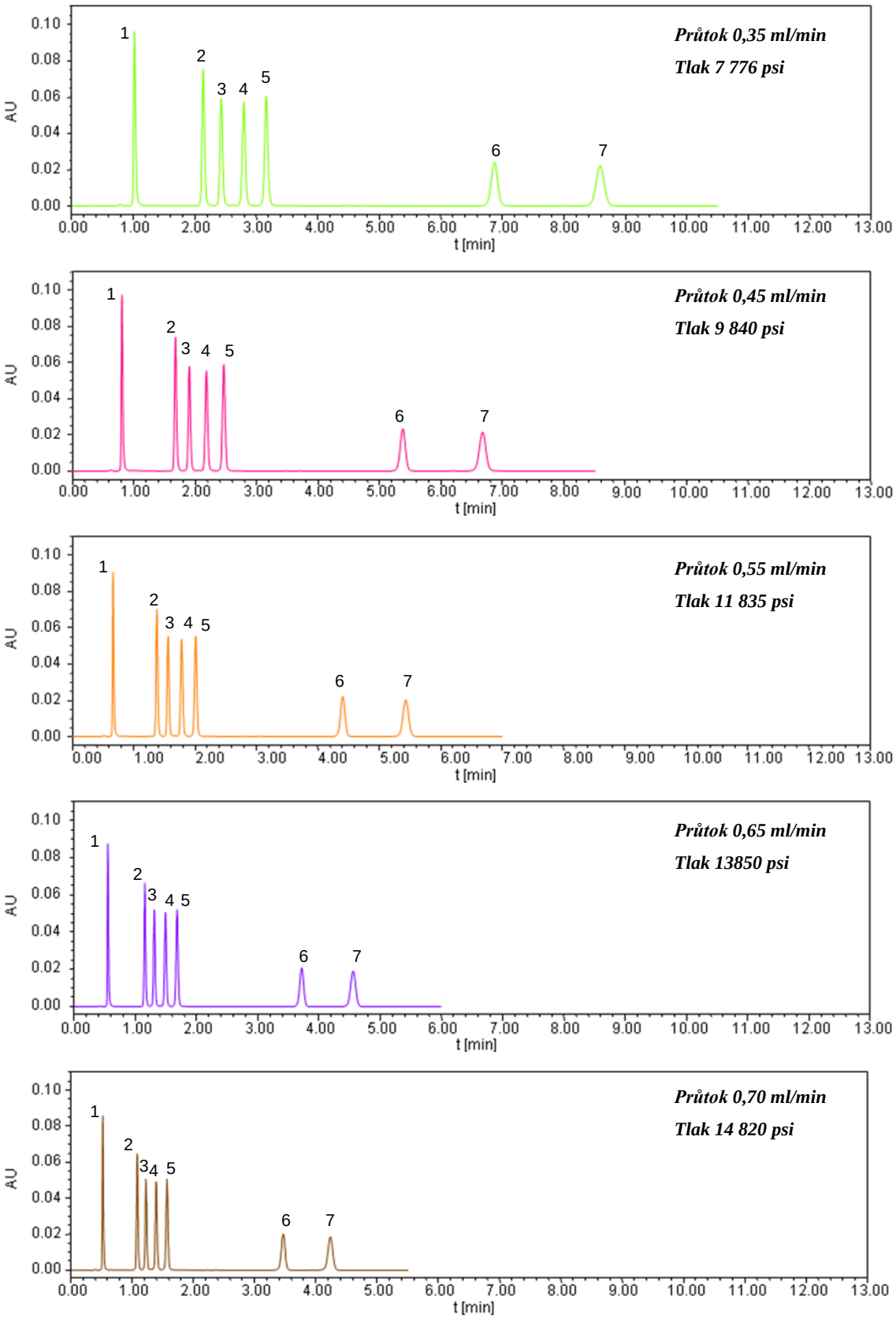
Obr. 10: Sledování vlivu teploty na separaci steroidů (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.1.2 Vliv průtoku na separaci

S rostoucím průtokem došlo ke zkrácení doby analýzy a tedy k rychlejší separaci. Při teplotě 30 ˚C trvala separace při nejnižším průtoku 0,25 ml/min téměř 13 minut, zatímco při nejvyšším možném průtoku 0,7 ml/min (tlak 14 820 psi) došlo k separaci již za 4,5 minuty (Obr. 11).

A. Teplota 30 °C

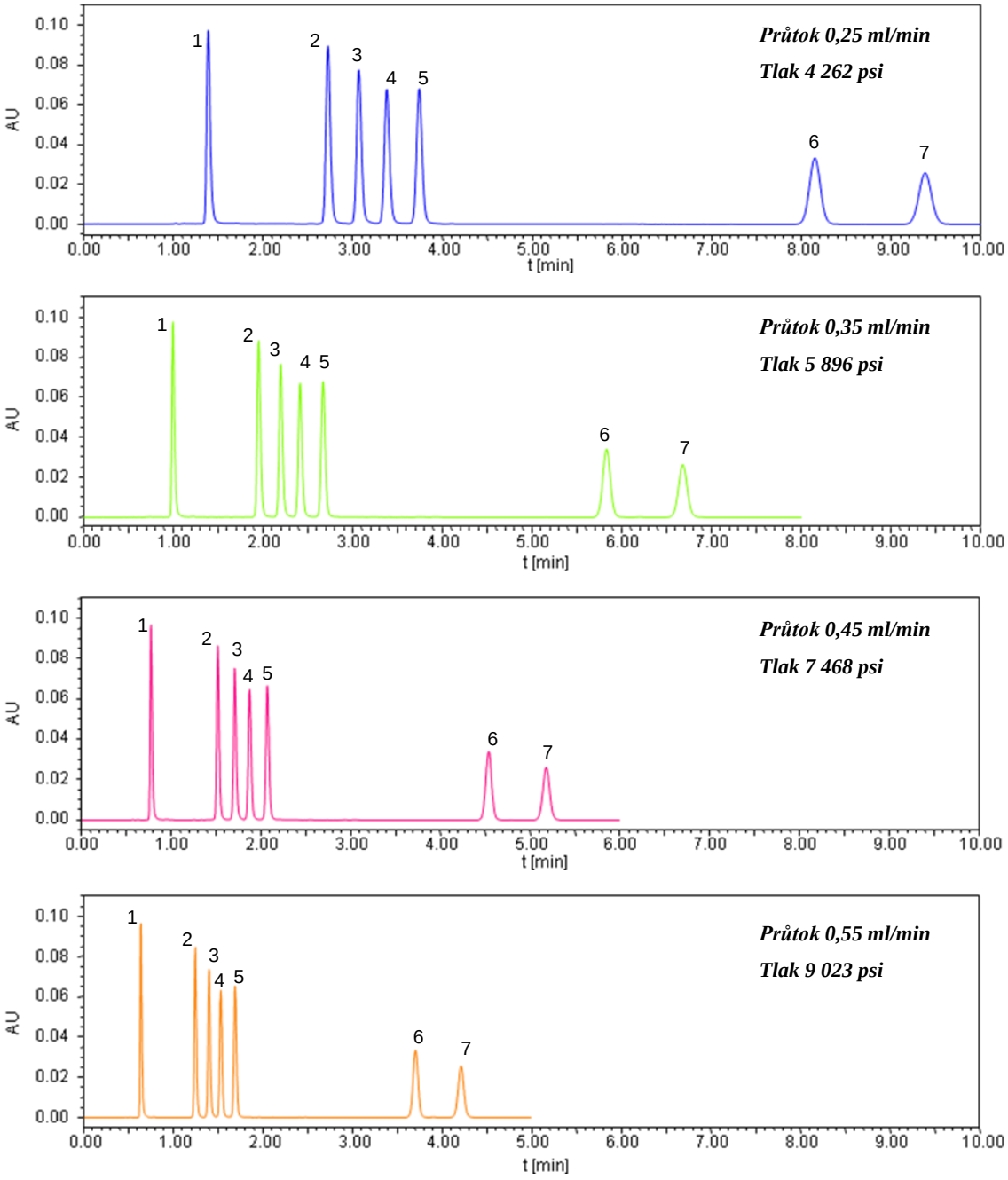


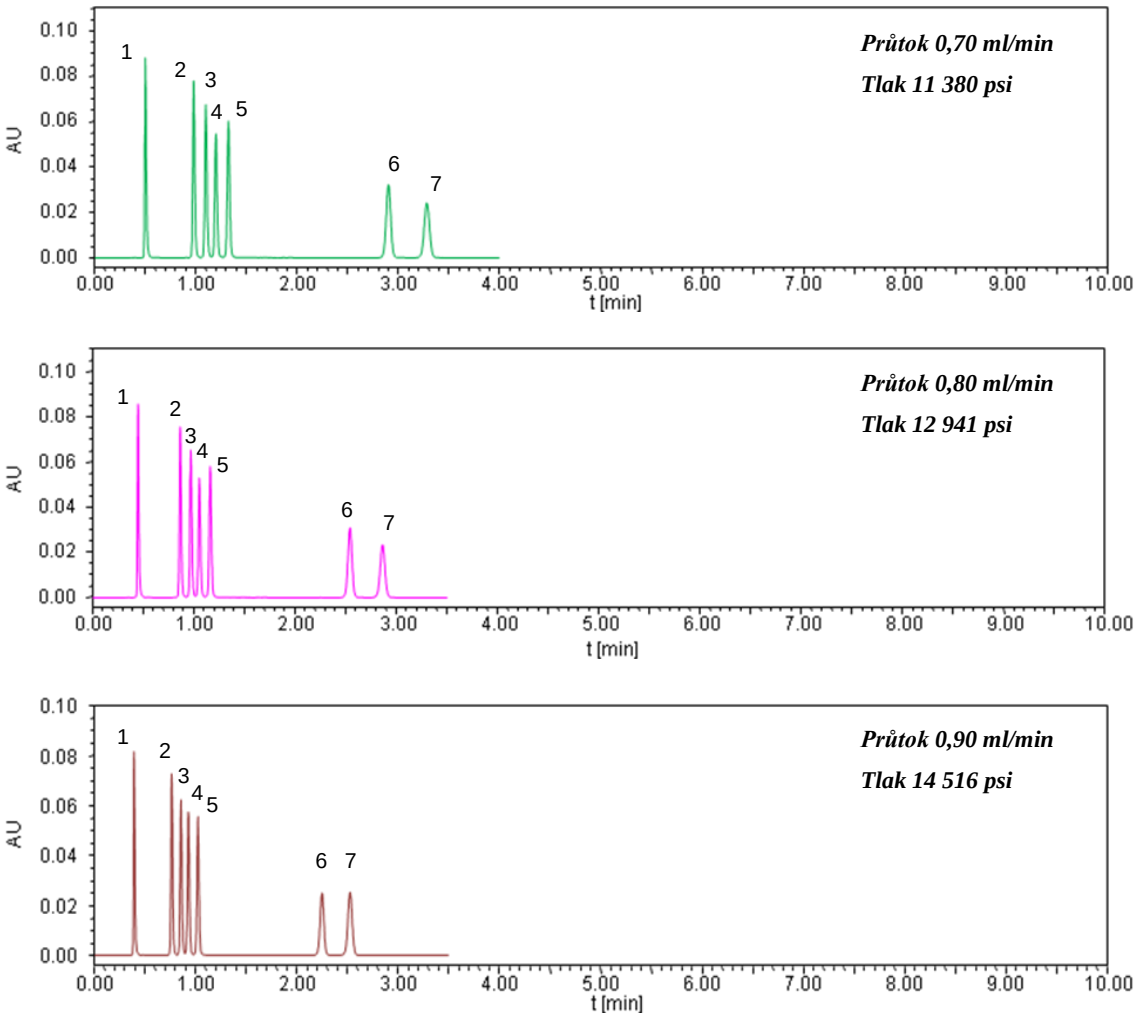


Obr. 11: Porovnání separace 7 steroidů na koloně ACQUITY BEH Phenyl při teplotě 30 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

Při teplotě 50 °C a průtoku 0,25 ml/min došlo k separaci již za 10 minut a při nejvyšším průtoku 0,9 ml/min (14 516 psi) trvala separace 2,7 minut. I při nejvyšším možném průtoku došlo k optimálnímu dělení estrogenních steroidů až na základní linii (Obr. 12).

B. Teplota 50 °C

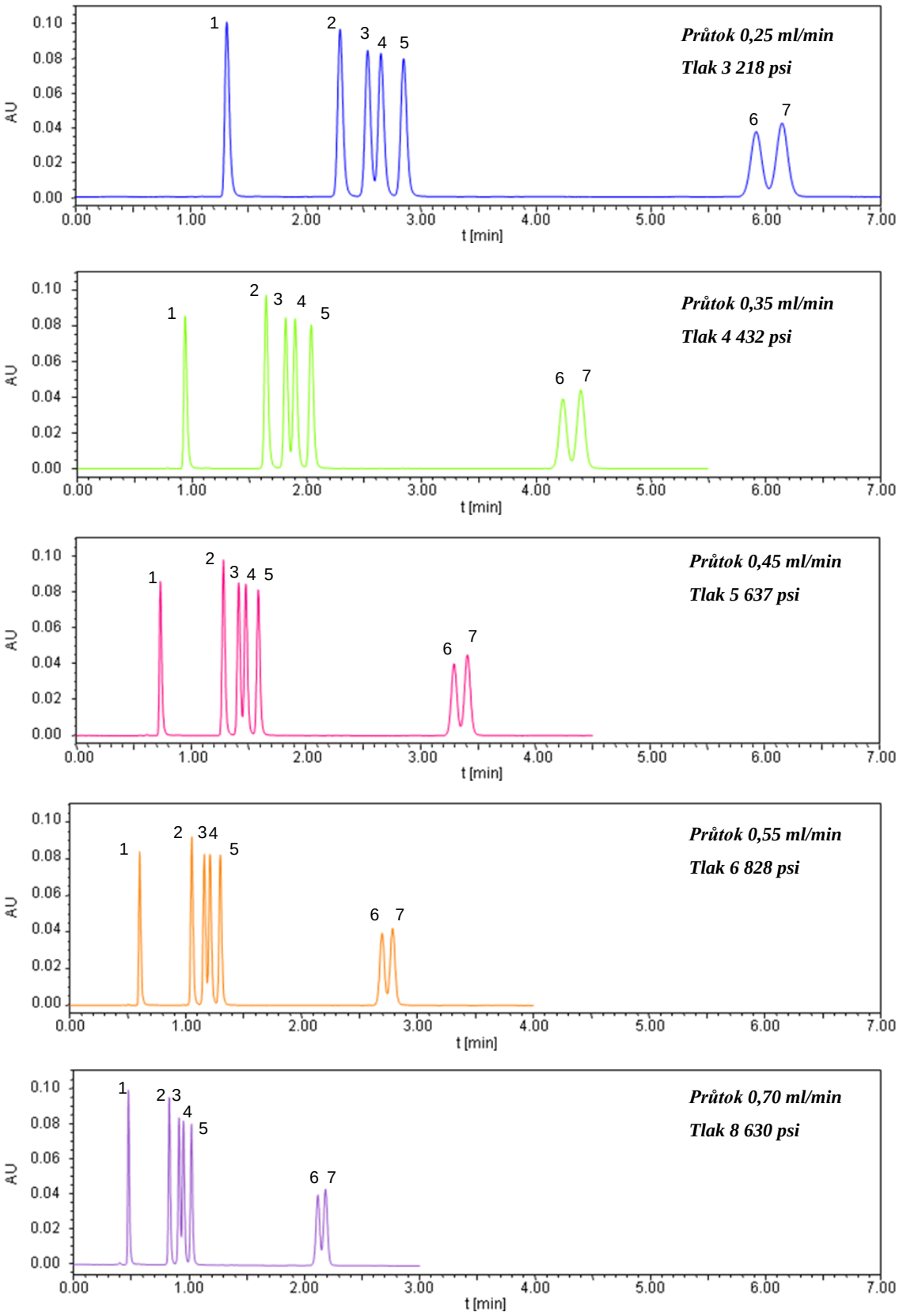


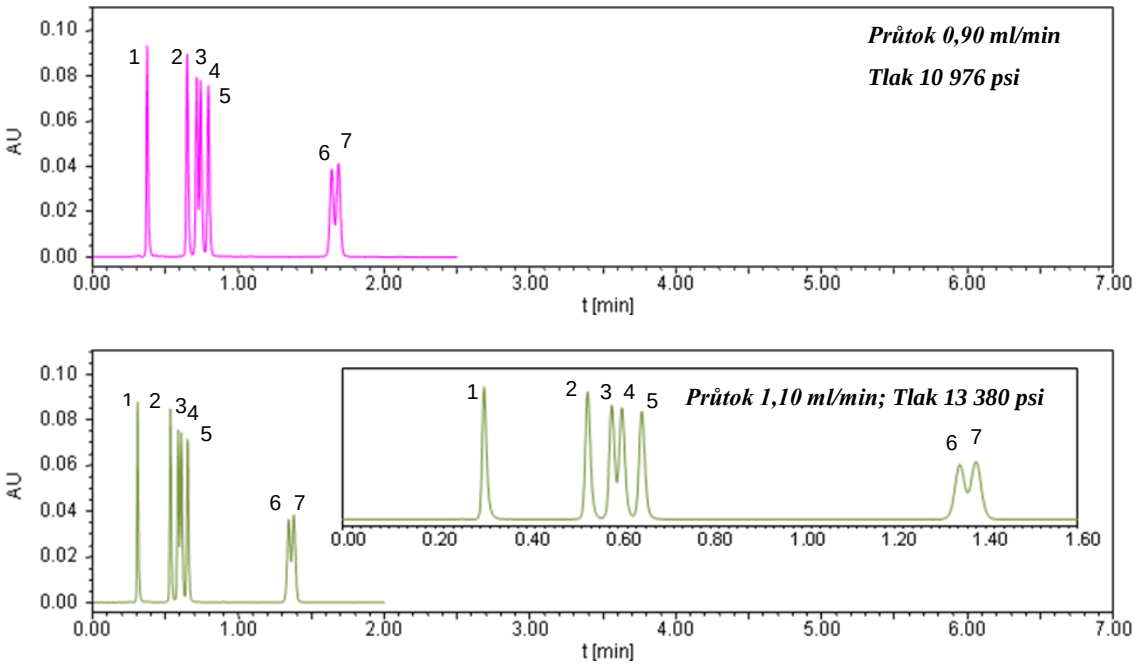


Obr. 12: Porovnání separace 7 steroidů na koloně ACQUITY BEH Phenyl při teplotě 50 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

Při teplotě 80 °C a průtoku 1,1 ml/min došlo ke zkrácení analýzy až na 1,5 minuty, avšak tato teplota již není k separaci vhodná. Ani při nejnižším použitém průtoku 0,25 ml/min nedošlo k rozdělení všech píků na základní linii a rozlišení některých estrogenních steroidů nebylo větší než 1,5 (při průtoku 0,25 ml/min bylo rozlišení α-estradiolu a ethynyl-estradiolu - 1,29; estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu - 1,22). Důvodem byla změna selektivity separace za zvýšené teploty (Obr. 13).

C. Teplota 80 °C





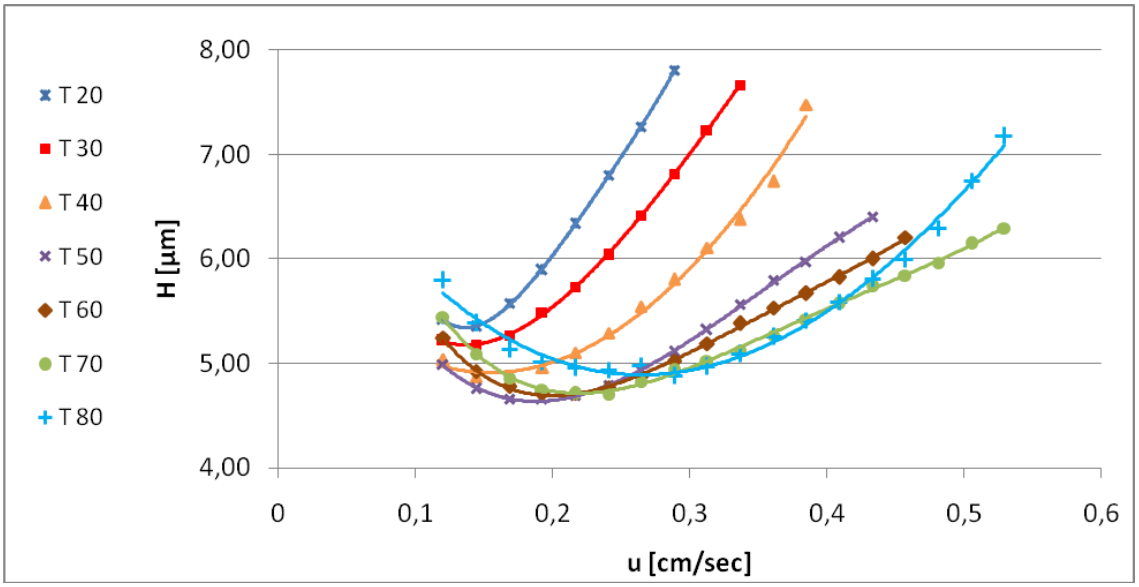
Obr. 13: Porovnání separace 7 steroidů na koloně ACQUITY BEH Phenyl při teplotě 80 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.1.3 Účinnost kolony

Se zvyšujícím se průtokem účinnost kolony nejprve mírně stoupala a následně se opět snižovala (klasický průběh van Deemterovy křivky). Pro příklad jsou uvedeny hodnoty účinnosti dvou vybraných estrogenních steroidů (estradiol-acetát a β-estradiol). V tabulkách (Tab. 4 a Tab. 5) jsou zeleně vyznačeny hodnoty nejvyšší účinnosti při dané teplotě a průtoku (tedy průtok, který by měl být u dané teploty použit, aby bylo dosaženo nejvyšší účinnosti). Pro vybrané příklady estrogenních steroidů bylo nejvyšší účinnosti dosaženo při teplotě 50 °C a průtoku 0,4 ml/min (estradiol-acetát), respektive 0,3 ml/min (β-estradiol).

Vzhledem k tomu, že při teplotě 90 °C již nebylo dosaženo optimálního dělení estrogenních steroidů (došlo ke smytí píků estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu), je účinnost vyhodnocena do teploty 80 °C.

Účinnost chromatografické separace byla hodnocena také pomocí van Deemterových křivek, kdy se minimum těchto křivek se zvyšující se teplotou posouvalo k vyšším lineárním průtokovým rychlostem. Z hlediska účinnosti byl nejvhodnější průtok v rozmezí 0,3 - 0,5 ml/min. Graficky jsou vyhodnoceny křivky pro estradiol-acetát (Graf 1).



Graf 1: Van Deemterovy křivky při teplotách 20 °C – 80 °C (estradiol-acetát).

EST-Ac		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	18450	19168	19879	20033	19074	18357	17267
	0,3	18697	19310	20535	21037	20299	19654	18580
	0,35	17942	18977	20640	21444	20919	20577	19495
	0,4	16977	18214	20173	21492	21217	21044	19944
	0,45	15792	17456	19607	21316	21211	21238	20187
	0,5	14710	16576	18909	20857	20952	21243	20251
	0,55	13760	15590	18036	20254	20488	20730	20078
	0,6	12815	14684	17236	19581	19909	20282	20051
	0,7	x	13047	15679	17977	18576	19508	19664
	0,8	x	x	13376	16748	17631	18450	18471
	0,9	x	x	x	15615	16658	17433	17238
	1	x	x	x	x	15685	16774	15886
	1,1	x	x	x	x	x	15890	13947
	1,2	x	x	x	x	x	x	–

Tab. 4: Účinnost kolony ACQUITY BEH Phenyl (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro estradiol-acetát.

b-EST		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	12932	13354	13612	13992	13391	12399	11848
	0,3	12973	13552	13931	14321	13766	12945	12220
	0,35	12754	13181	13616	14263	13635	13379	12577
	0,4	12382	12860	13330	14215	13689	13528	12680
	0,45	11654	12592	13197	14194	13734	13631	12694
	0,5	11148	12322	13080	14031	13610	13555	12697
	0,55	10756	11621	12473	13647	13083	12761	12489
	0,6	10254	11078	11949	13184	12634	10402	12797
	0,7	x	10088	11115	12021	11861	11756	12131
	0,8	x	x	10176	11437	11256	11351	11673
	0,9	x	x	x	10961	11029	10914	11237
	1	x	x	x	x	10472	10723	10873
	1,1	x	x	x	x	x	10402	10735
	1,2	x	x	x	x	x	x	10405

Tab. 5: Účinnost kolony ACQUITY BEH Phenyl (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro β-estradiol.

5.1.4 Faktor symetrie

Z hlediska symetrie píků byl nejhůře vyhodnocen estriol a téměř ideální symetrie bylo dosaženo u estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu. Se vzrůstající teplotou hodnoty symetrie nepatrně stoupaly nebo se téměř neměnily. Rostoucí průtok neměl na symetrii výrazný vliv, jak je ukázáno v následujících tabulkách při porovnání průtoku 0,25 ml/min a 0,5 ml/min (Tab. 6 a Tab. 7).

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,34	1,31	1,34	1,33	1,33	1,33	1,34
b-EST	1,13	1,13	1,17	1,16	1,16	1,18	1,19
a-est	1,10	1,1	1,13	1,14	1,14	1,16	-
et-EST	1,08	1,08	1,12	1,12	1,13	1,13	-
ESN	1,04	1,05	1,08	1,09	1,10	1,12	1,14
EST-me	0,98	0,98	1,00	1,00	1,01	1,01	-
EST-ac	1,00	0,98	1,00	1,02	1,01	1,02	-

Tab. 6: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,25 ml/min a rostoucí teplotě.

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,35	1,34	1,36	1,38	1,39	1,38	1,39
b-EST	1,12	1,12	1,17	1,17	1,19	1,21	1,22
a-est	1,09	1,09	1,13	1,15	1,15	1,18	-
et-EST	1,07	1,07	1,12	1,13	1,15	1,14	-
ESN	1,04	1,05	1,09	1,10	1,12	1,14	1,17
EST-me	0,97	0,98	1,00	1,00	1,01	1,00	-
EST-ac	0,98	0,98	1,00	1,01	1,01	1,02	-

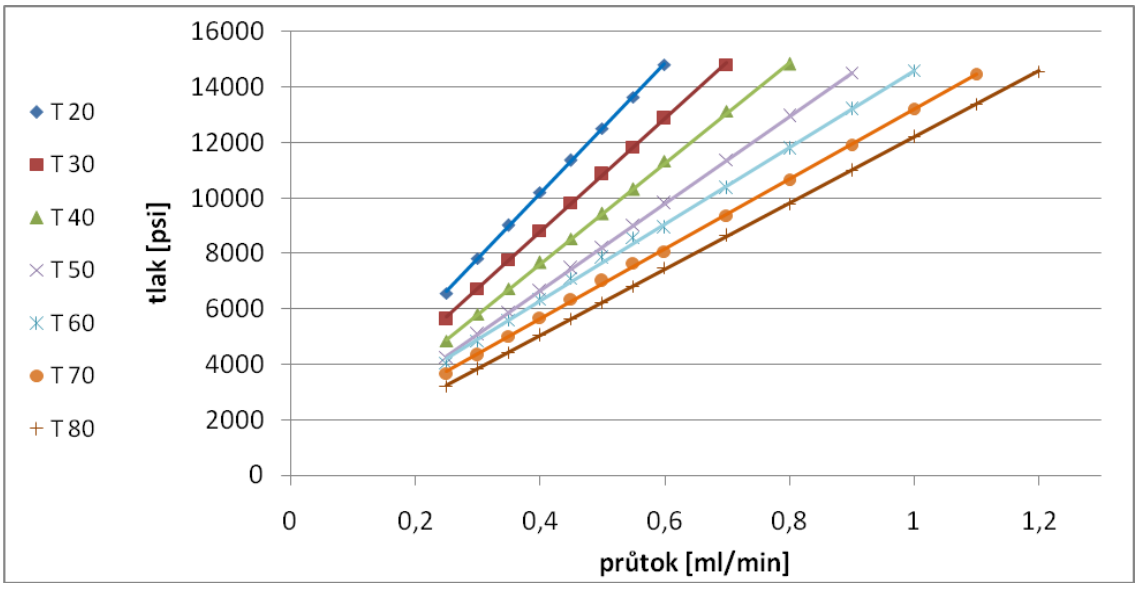
Tab. 7: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,5 ml/min a rostoucí teplotě.

5.1.5 Zpětný tlak

Kolona ACQUITY BEH Phenyl může pracovat až do tlaku 15000 psi. Se zvyšující se teplotou tlak klesal a tím mohlo být použito i vyšších průtoků. S rostoucím průtokem se naopak hodnoty zpětného tlaku zvyšovaly (Graf 2). Z tabulky vyplývá, že při nejnižší teplotě 20 °C byl maximální možný průtok 0,6 ml/min (14 800 psi) a při teplotě 80 °C průtok dosahoval až 1,2 ml/min (14 572 psi). Při teplotě 80 °C byl tlak přibližně o 50 % nižší než při teplotě 20 °C (Tab. 8).

		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	6565	5625	4855	4262	4054	3665	3218
	0,3	7815	6725	5807	5087	4840	4332	3828
	0,35	9015	7776	6724	5896	5598	5014	4432
	0,4	10200	8815	7680	6687	6355	5690	5038
	0,45	11360	9840	8535	7468	7115	6346	5637
	0,5	12503	10850	9430	8240	7845	7002	6230
	0,55	13650	11835	10318	9023	8585	7648	6828
	0,6	14800	12860	11334	9801	8922	8077	7494
	0,7	x	14820	13130	11380	10352	9373	8630
	0,8	x	x	14838	12941	11774	10659	9793
	0,9	x	x	x	14516	13198	11923	10976
	1	x	x	x	x	14599	13220	12188
	1,1	x	x	x	x	x	14480	13380
	1,2	x	x	x	x	x	x	14572

Tab. 8: Porovnání zpětného tlaku při teplotách 20 °C – 80 °C a různých průtocích.



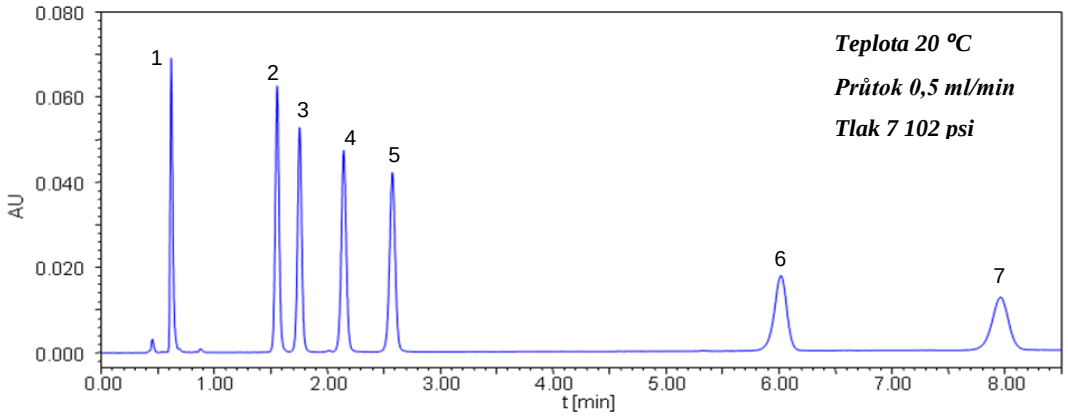
Graf 2: Znázornění rostoucího tlaku v závislosti na zvyšujícím se průtoku (teploty 20 °C – 80 °C).

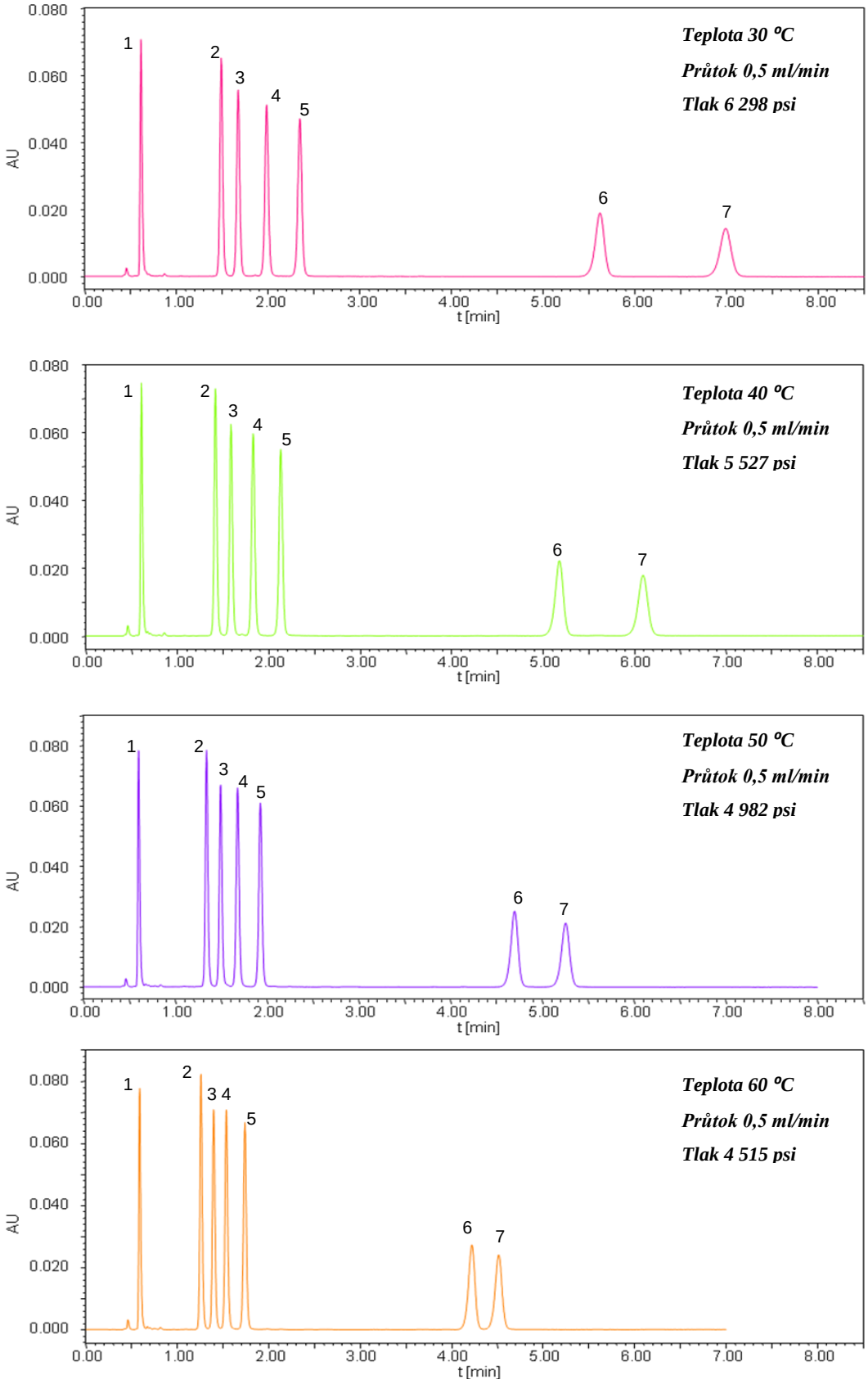
5.2 Kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl 2,7 µm / 2,1x100 mm

5.2.1 Vliv teploty na separaci

S rostoucí teplotou docházelo ke zkrácení doby separace. Při teplotě 20 °C trvala analýza 8,3 minut a při nejvyšší použitelné teplotě 60 °C došlo k eluci za 4,8 minut. Teplota 60 °C je zároveň maximální použitelnou teplotou pro tuto kolonu. I při této teplotě bylo dosaženo optimálního rozlišení a rozdělení píků až na základní linii.

Chromatogramy jsou uvedeny vzestupně od teploty 20 °C až po teplotu 60 °C při průtoku 0,5 ml/min (Obr. 14).



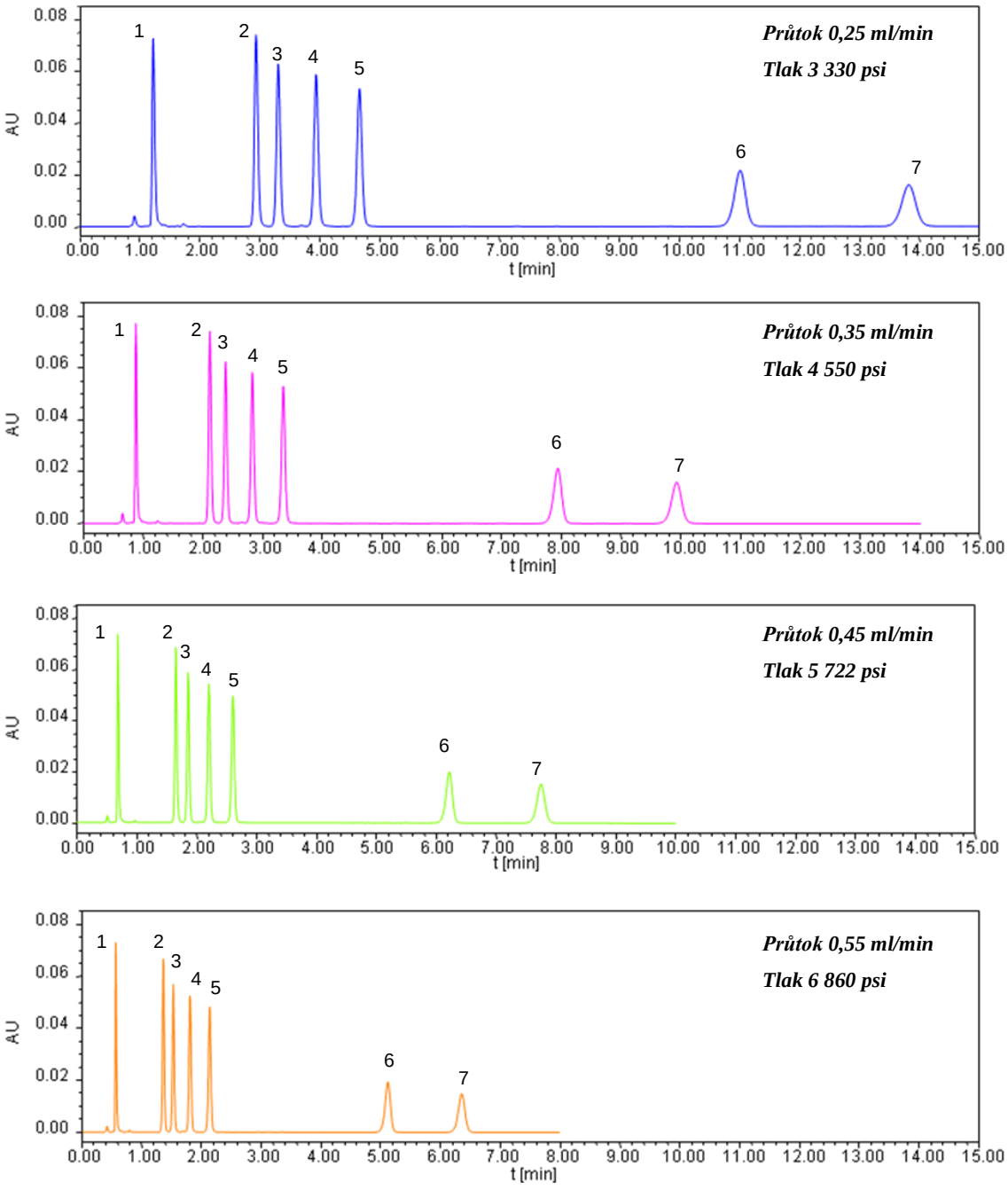


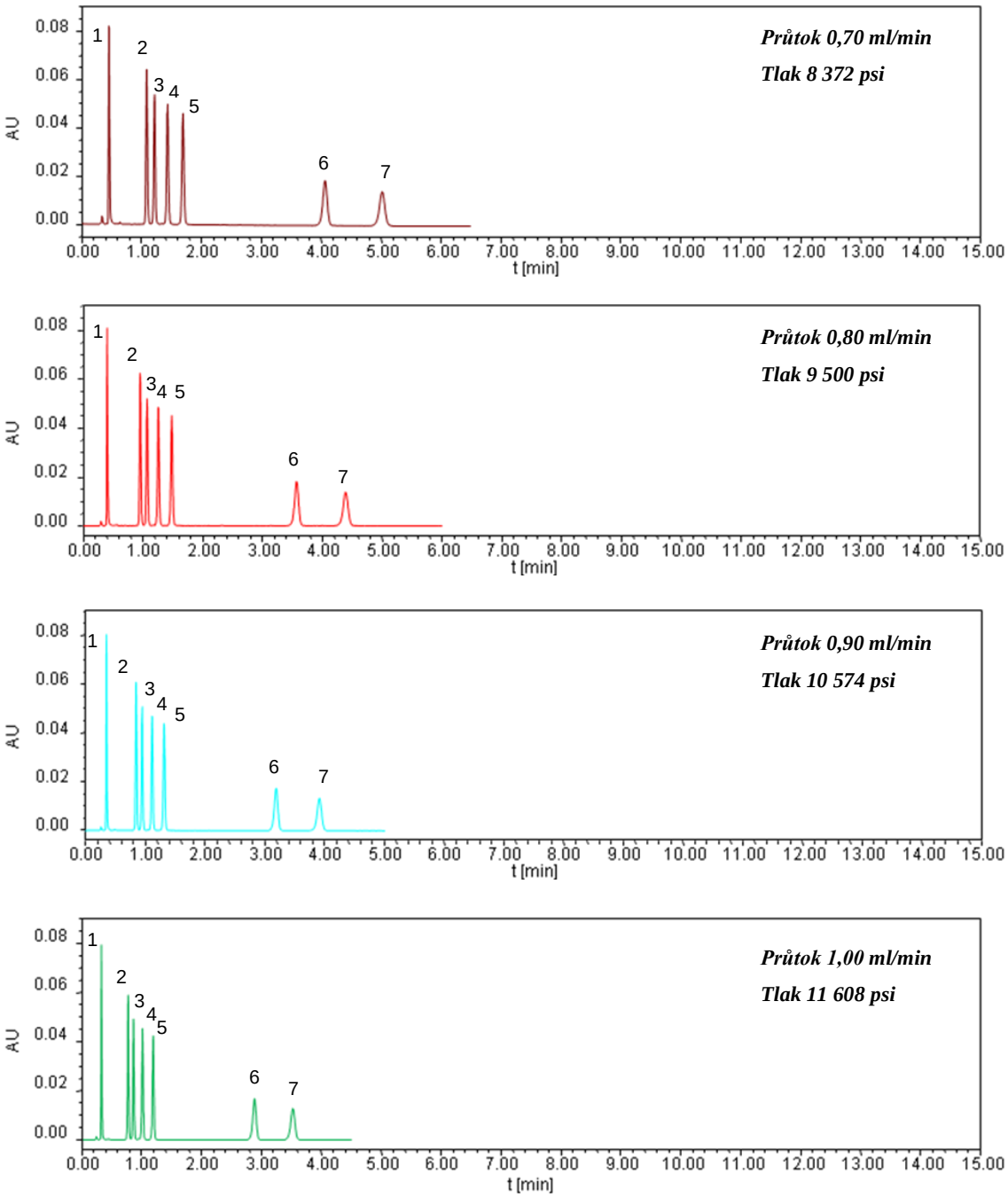
Obr. 14: Sledování vlivu teploty na separaci steroidů (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.2.2 Vliv průtoku na separaci

Ve srovnání s kolonou Acquity BEH Phenyl trvala separace při teplotě 30 °C a nejnižším průtoku 0,25 ml/min téměř o 2 minuty déle, avšak bylo dosaženo vyšších průtoků. Při nejvyšším použitém průtoku 1,00 ml/min trvala separace necelé 4 minuty a i při takto vysokém průtoku došlo k optimálnímu rozdělení estrogenních steroidů až na základní linii (Obr. 15).

A. Teplota 30 °C

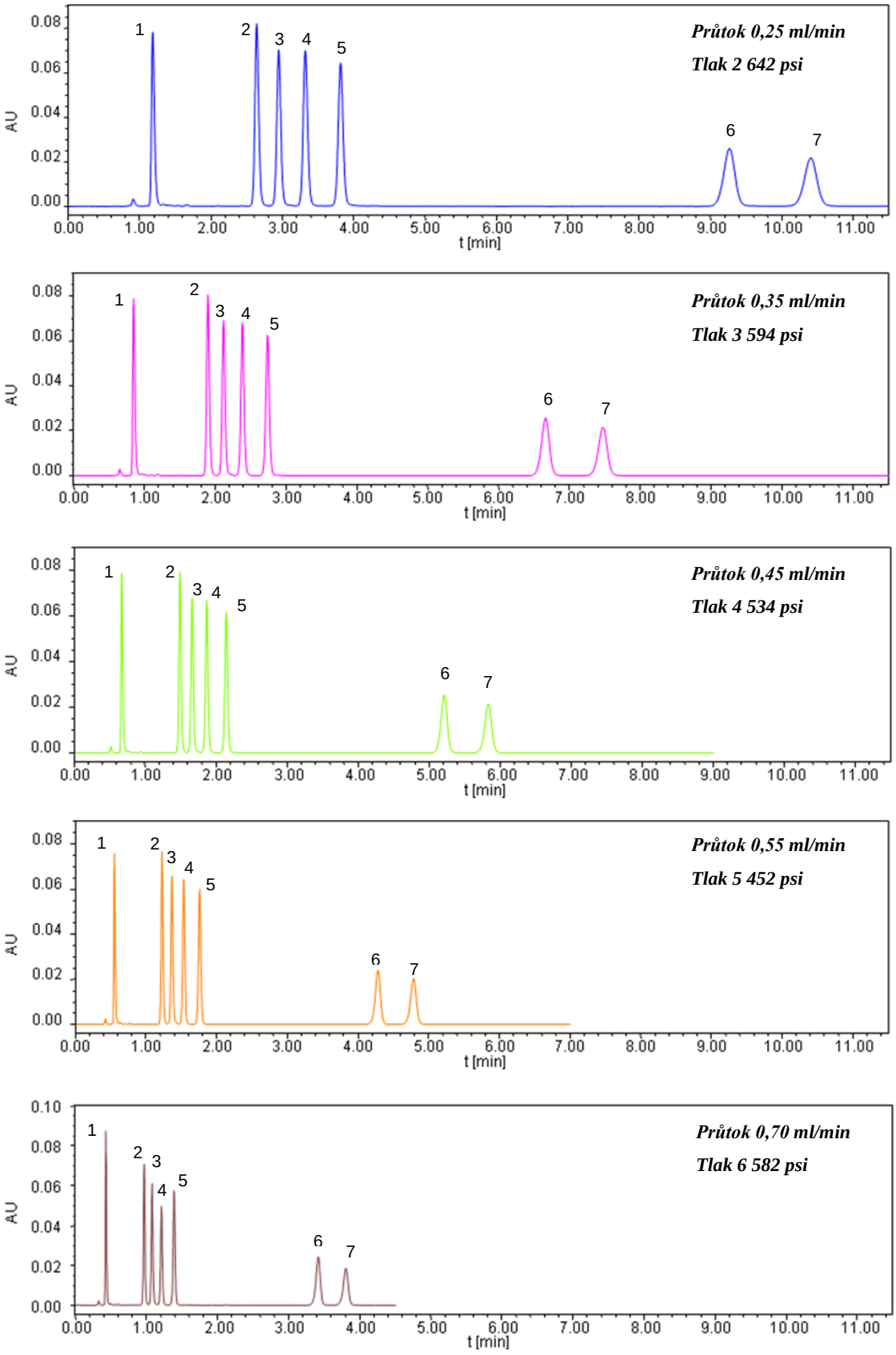


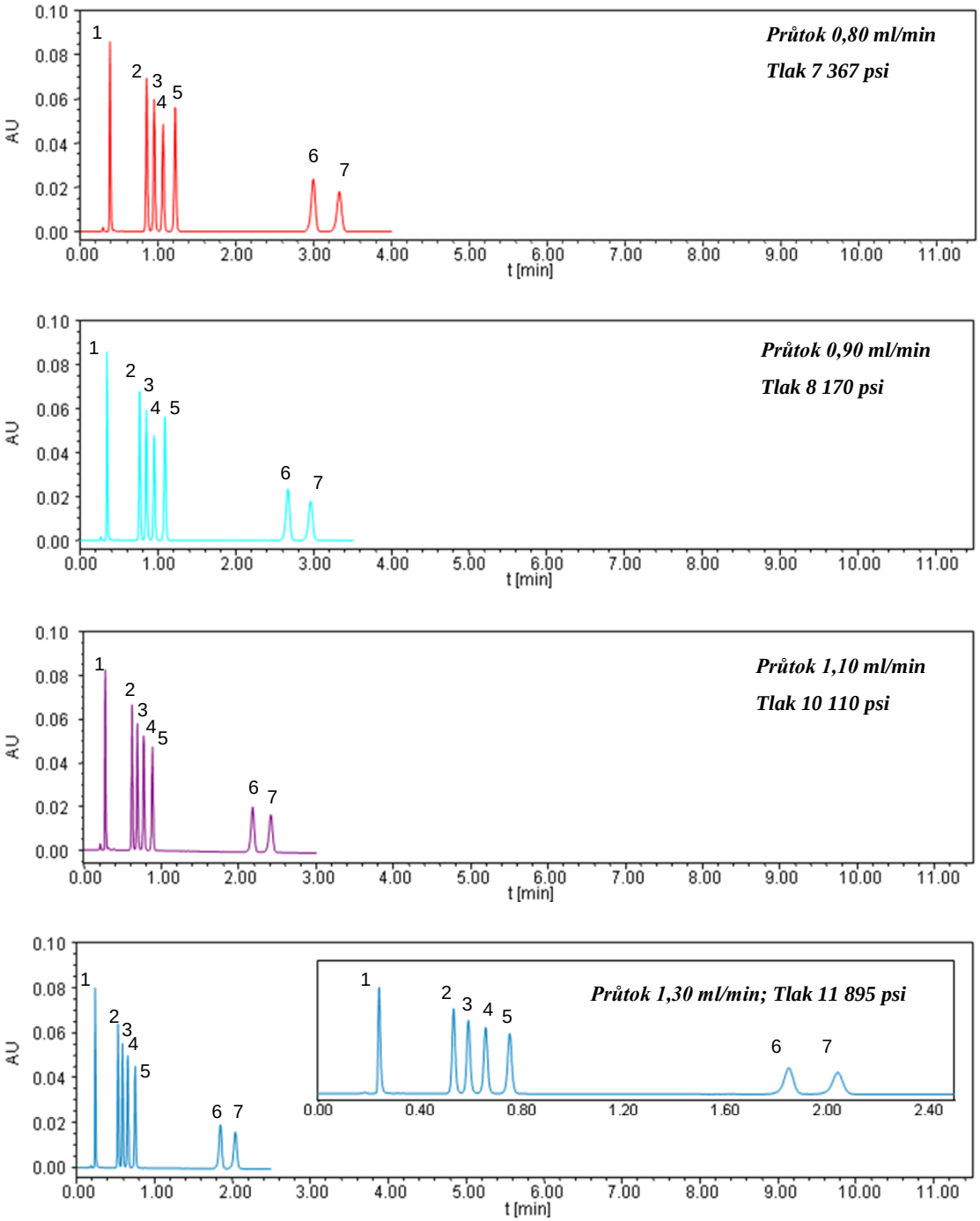


Obr. 15: Porovnání separace 7 steroidů na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl při teplotě 30 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

Teplota 50 °C je vhodná k separaci estrogenních steroidů při všech průtocích. Optimální separace bylo dosaženo i při nejvyšším použitém průtoku 1,3 ml/min a to v čase 2,2 minuty (Obr. 16).

B. Teplota 50 °C

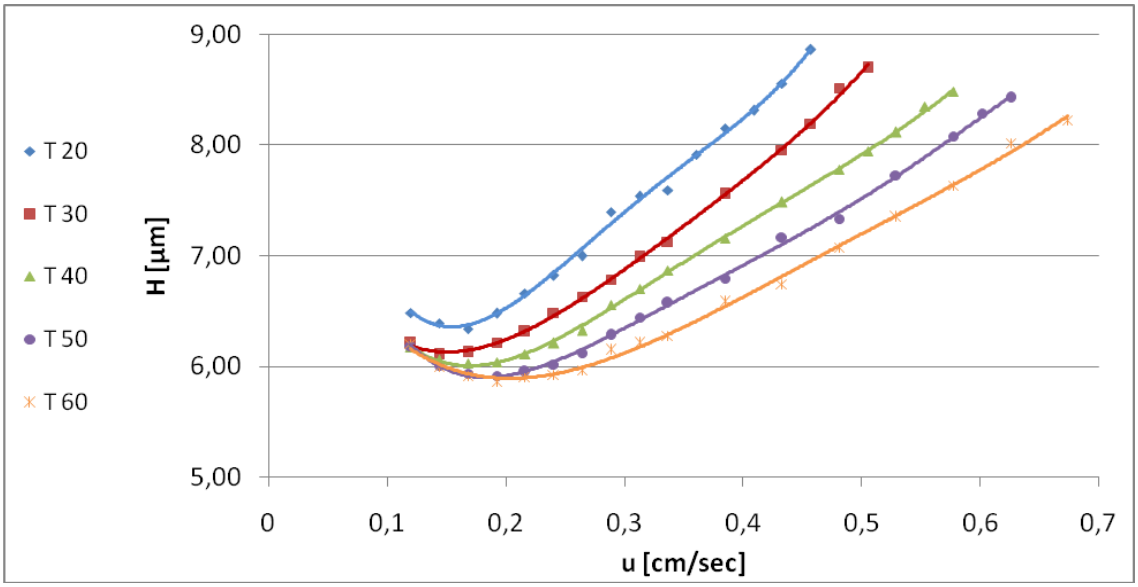




Obr. 16: Porovnání separace 7 steroidů na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl při teplotě 50 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.2.3 Účinnost kolony

Podobně jako u předchozí kolony ACQUITY BEH Phenyl, kdy účinnost kolony nejprve mírně stoupala se zvyšujícím se průtokem a poté se při vyšších průtocích opět snižovala, bylo téhož dosaženo i u této kolony. Tento fakt odpovídá i tvaru van Deemterovy křivky. Pro příklad jsou uvedeny křivky pro estradiol-acetát při teplotách 20 °C – 60 °C (Graf 3). Se zvyšující se teplotou bylo dosaženo nižších hodnot H (vyšší účinnosti) a minimum van Deemterových křivek se posouvalo k vyšším lineárním průtokovým rychlostem. Průtok v rozmezí 0,25 - 0,4 ml/min byl z hlediska účinnosti nejvýhodnější. V tabulkách jsou zeleně opět vyznačeny hodnoty nejvyššího počtu teoretických pater při daných teplotách a průtocích uvedené pro estradiol-acetát a β-estradiol (Tab. 9 a Tab. 10).



Graf 3: Van Deemterovy křivky při teplotách 20 °C – 60 °C (estradiol-acetát).

EST-Ac		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	15420	16108	16205	16176	16118	x	x
	0,3	15648	16379	16517	16642	16683	x	x
	0,35	15770	16322	16600	16862	16917	x	x
	0,4	15436	16100	16570	16915	17065	x	x
	0,45	15025	15843	16368	16809	16957	x	x
	0,5	14662	15431	16106	16627	16883	x	x
	0,55	14296	15081	15814	16336	16762	x	x
	0,6	13519	14745	15251	15924	16272	x	x
	0,7	13173	14028	14558	15216	15940	x	x
	0,8	12273	13233	13967	14717	15192	x	x
	0,9	11687	12569	13366	13959	14832	x	x
	1	x	11743	12862	13636	14139	x	x
	1,1	x	x	12323	12942	13606	x	x
	1,2	x	x	11789	12379	13103	x	x
	1,3	x	x	x	11871	12471	x	x
	1,4	x	x	x	x	12164	x	x
	1,5	x	x	x	x	11900	x	x

Tab. 9: Účinnost kolony Ascentis Express Phenyl-Hexyl (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro estradiol-acetát.

b-EST		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	11786	11843	11926	11765	12077	x	x
	0,3	11673	12022	12093	12104	12058	x	x
	0,35	11577	12114	12362	12017	11825	x	x
	0,4	11226	11898	11920	11821	11722	x	x
	0,45	10988	11273	11446	11707	11538	x	x
	0,5	10530	10907	11107	11528	11236	x	x
	0,55	10244	10622	11018	11046	11047	x	x
	0,6	9940	10398	10717	10810	10684	x	x
	0,7	9224	9792	10052	10172	9916	x	x
	0,8	8779	9200	9592	9765	9554	x	x
	0,9	8527	8768	9256	9436	9281	x	x
	1	x	8443	9039	9268	9135	x	x
	1,1	x	x	8830	8825	8955	x	x
	1,2	x	x	8540	8678	8784	x	x
	1,3	x	x	x	8532	8378	x	x
	1,4	x	x	x	x	8269	x	x
	1,5	x	x	x	x	8101	x	x

Tab. 10: Účinnost kolony Ascentis Express Phenyl-Hexyl (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro β-estradiol.

5.2.4 Faktor symetrie

Zvyšující se průtok mobilní fáze ani rostoucí teplota neměly výrazný vliv na změnu symetrie píků. U všech teplot a průtoků bylo dosaženo požadované symetrie píků, tedy hodnoty nižší než 1,5 (Tab. 11 a Tab. 12).

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,41	1,36	1,33	1,33	1,33	x	x
b-EST	1,08	1,10	1,10	1,11	1,12	x	x
a-est	1,04	1,07	1,07	1,08	1,10	x	x
et-EST	1,01	1,04	1,06	1,07	1,08	x	x
ESN	0,98	1,00	1,01	1,03	1,05	x	x
EST-me	0,91	0,92	0,94	0,94	0,96	x	x
EST-ac	0,95	0,96	0,96	0,97	0,96	x	x

Tab. 11: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,25 ml/min a rostoucí teplotě.

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,48	1,40	1,40	1,39	1,40	x	x
b-EST	1,07	1,08	1,10	1,11	1,13	x	x
a-est	1,04	1,04	1,06	1,06	1,11	x	x
et-EST	1,02	1,02	1,04	1,05	1,08	x	x
ESN	0,98	0,98	1,00	1,01	1,03	x	x
EST-me	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	x	x
EST-ac	0,95	0,93	0,92	0,92	0,92	x	x

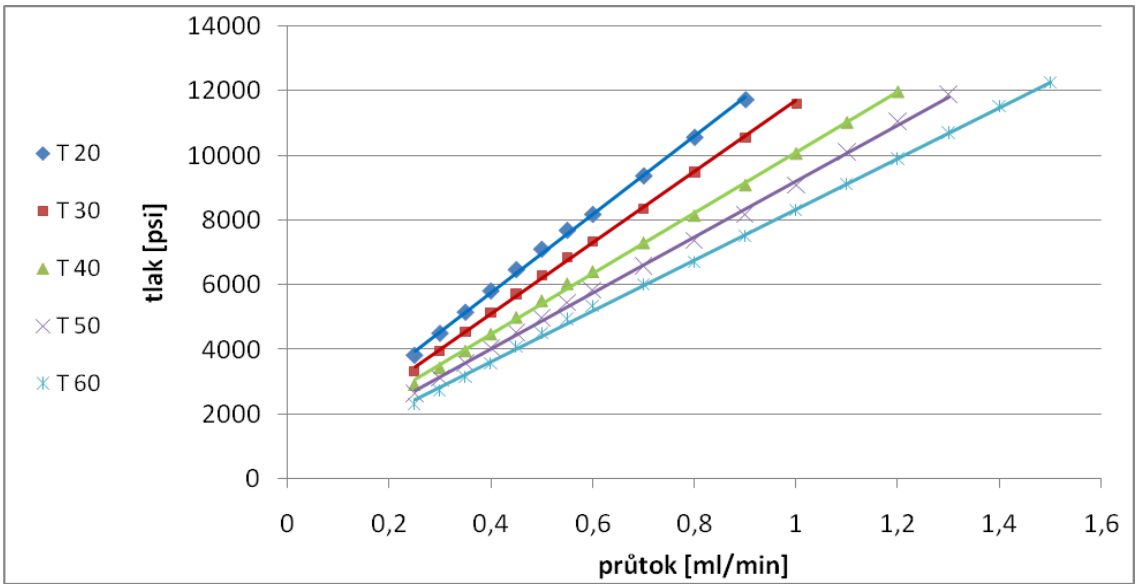
Tab. 12: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,5 ml/min a rostoucí teplotě.

5.2.5 Zpětný tlak

Kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl může rovněž pracovat při tlaku až do 15 000 psi. Mohlo být použito daleko vyšších průtoků než u předchozí kolony naplněné celkově porézními částicemi. U povrchově porézních částic tohoto typu tedy nedošlo k tak výraznému nárůstu zpětného tlaku. Z hlediska získání dostatečně vysokých průtoků (1,5 ml/min při 60 °C) nebylo potřeba měřit hodnoty vyšší, při kterých by se tlak blížil maximálnímu. Nejvyšší tlak, který byl na koloně generován, se pohyboval okolo 12 000 psi (Tab. 13). Hodnoty tlaku v závislosti na rostoucím průtoku jsou zaznamenány graficky (Graf 4).

		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	3824	3330	2928	2642	2332	x	x
	0,3	4502	3950	3448	3122	2742	x	x
	0,35	5155	4550	3968	3594	3165	x	x
	0,4	5812	5146	4490	4064	3572	x	x
	0,45	6472	5722	5010	4534	4090	x	x
	0,5	7102	6298	5527	4982	4515	x	x
	0,55	7686	6860	6050	5452	4950	x	x
	0,6	8178	7338	6425	5840	5350	x	x
	0,7	9370	8372	7315	6582	6020	x	x
	0,8	10562	9500	8154	7368	6710	x	x
	0,9	11725	10574	9102	8170	7512	x	x
	1	x	11608	10078	9088	8307	x	x
	1,1	x	x	11036	10110	9105	x	x
	1,2	x	x	11985	11060	9898	x	x
	1,3	x	x	x	11895	10700	x	x
	1,4	x	x	x	x	11520	x	x
	1,5	x	x	x	x	12236	x	x

Tab. 13: Porovnání zpětného tlaku při teplotách 20 °C – 60 °C a různých průtocích.



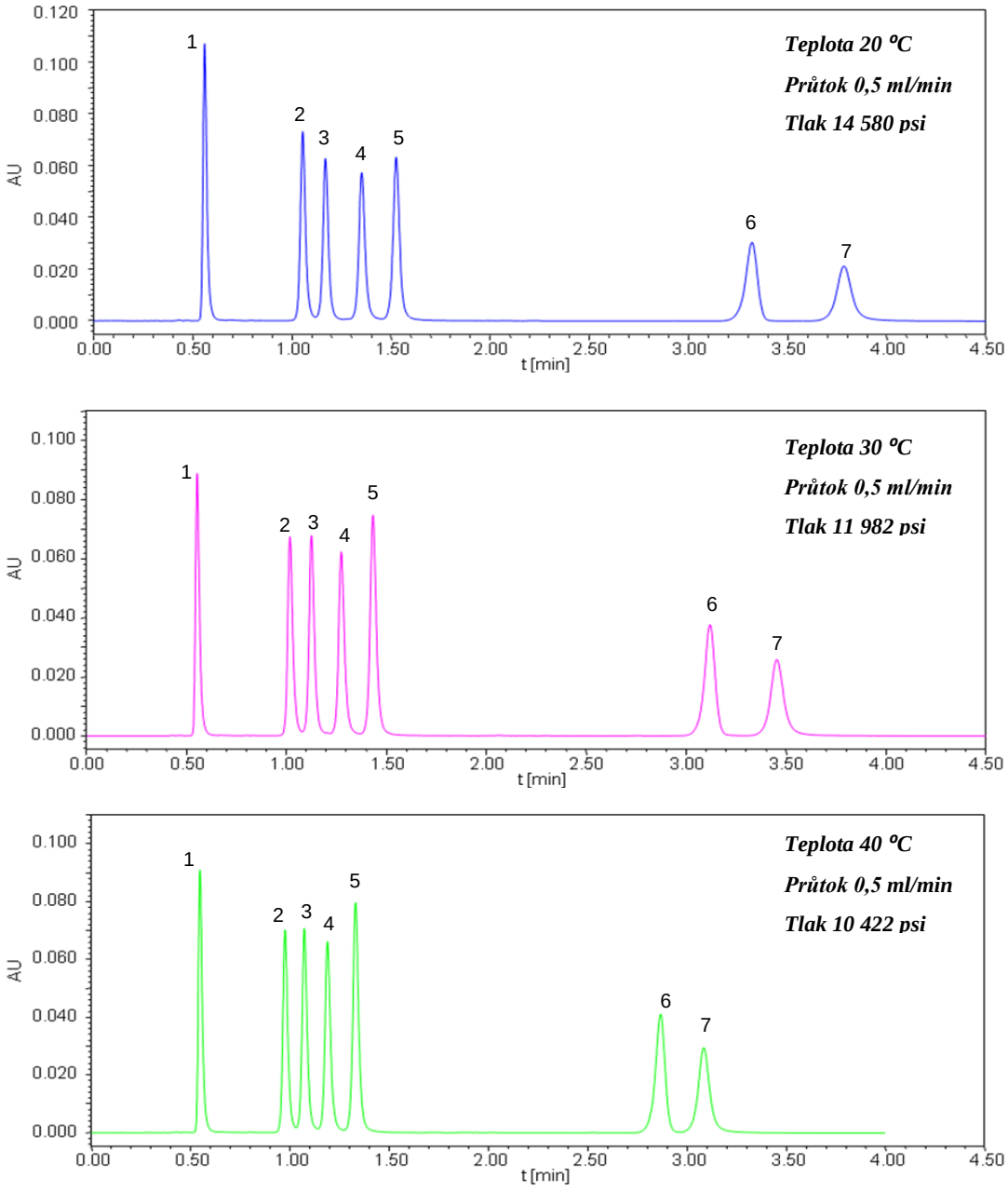
Graf 4: Znázornění rostoucího tlaku v závislosti na zvyšujícím se průtoku (teploty 20 °C – 60 °C).

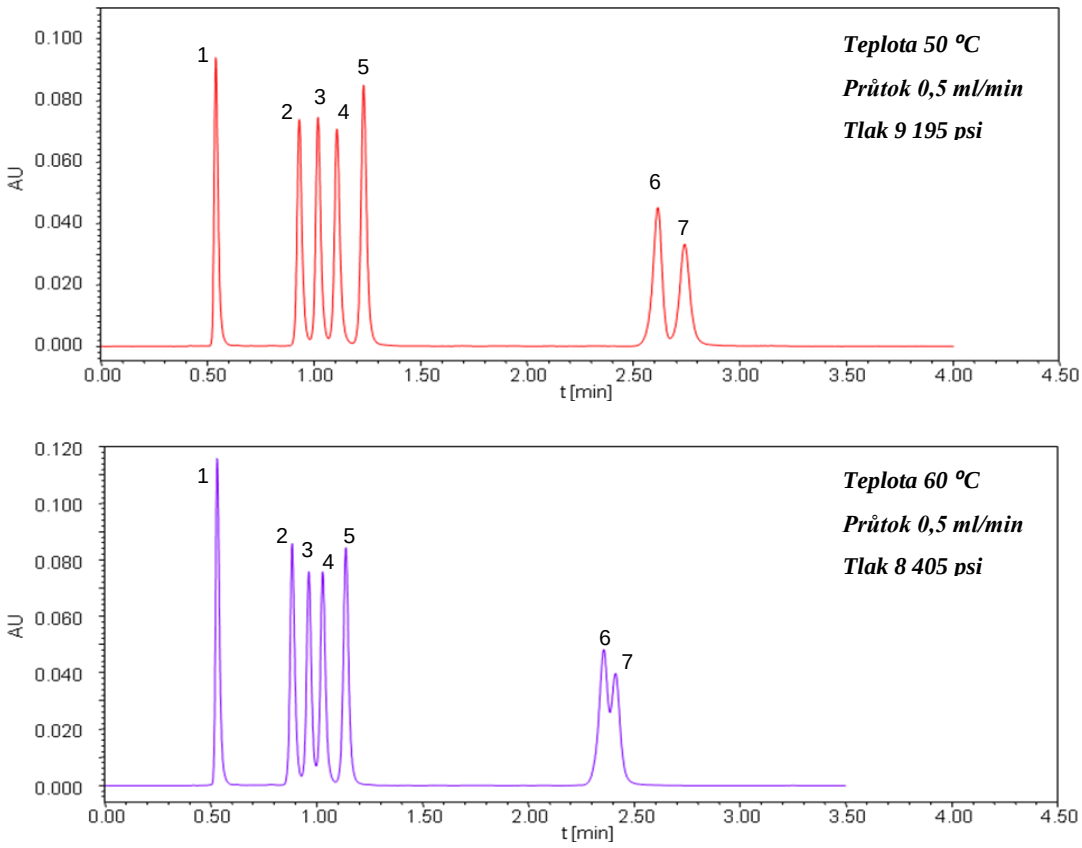
5.3 Kolona Kinetex PFP 1,7 µm / 2,1x100 mm

5.3.1 Vliv teploty na separaci

Nejvyšší teplota, při které docházelo k optimální separaci estrogenních steroidů, činila 50 °C. Teplota 60 °C již není k separaci vhodná, protože docházelo ke změně selektivity a tím ke smývání píků estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu.

Chromatogramy jsou uvedeny vzestupně od nejnižší teploty (20 °C) až po maximální teplotu (60 °C) při průtoku 0,5 ml/min (Obr. 17).



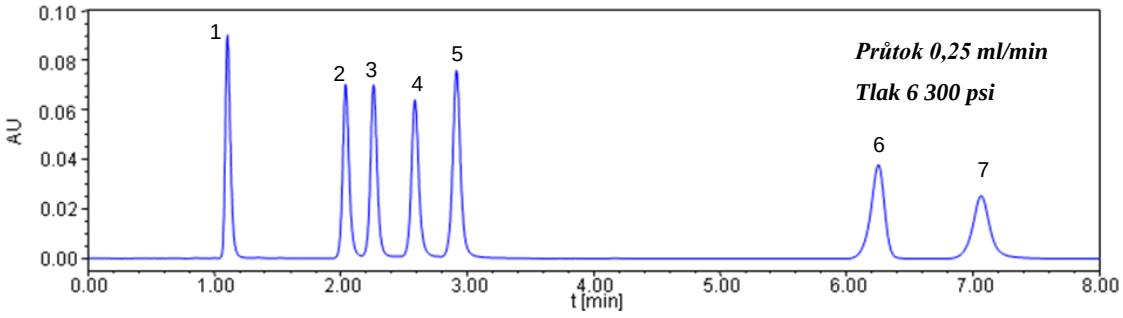


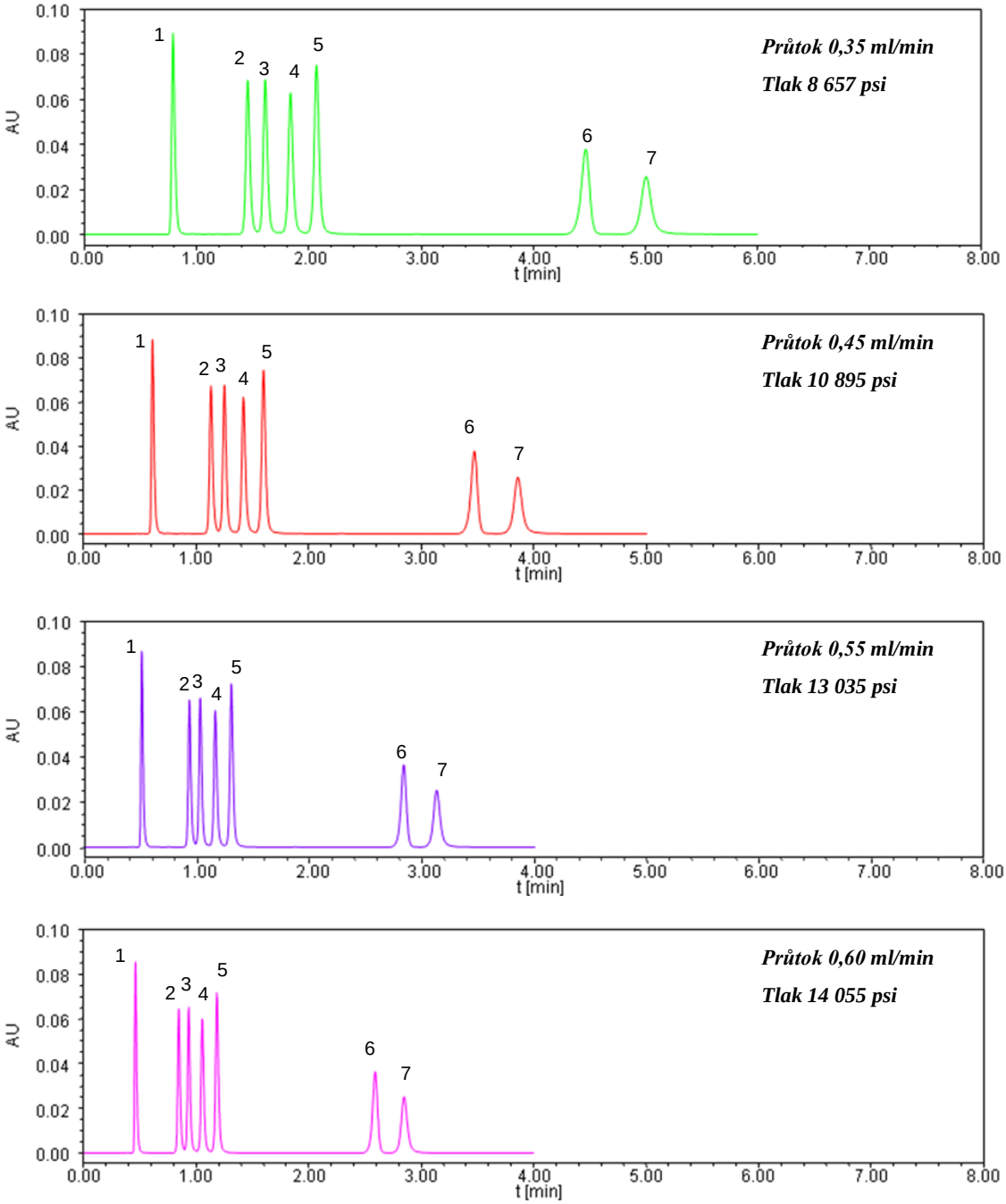
Obr. 17: Sledování vlivu teploty na separaci steroidů (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.3.2 Vliv průtoku na separaci

Při teplotě 30 °C a průtoku 0,25 ml/min trvala separace pouhých 7,4 minut, což je ve srovnání s předchozími kolonami podstatné zkrácení doby separace. Avšak maximální použitelný průtok byl 0,6 ml/min (Obr. 18). Vyšší průtoky nemohly být použity kvůli vysokému nárůstu zpětného tlaku. Tlak, který působil na kolonu při průtoku 0,6 ml/min, činil 14 055 psi.

A. Teplota 30 °C



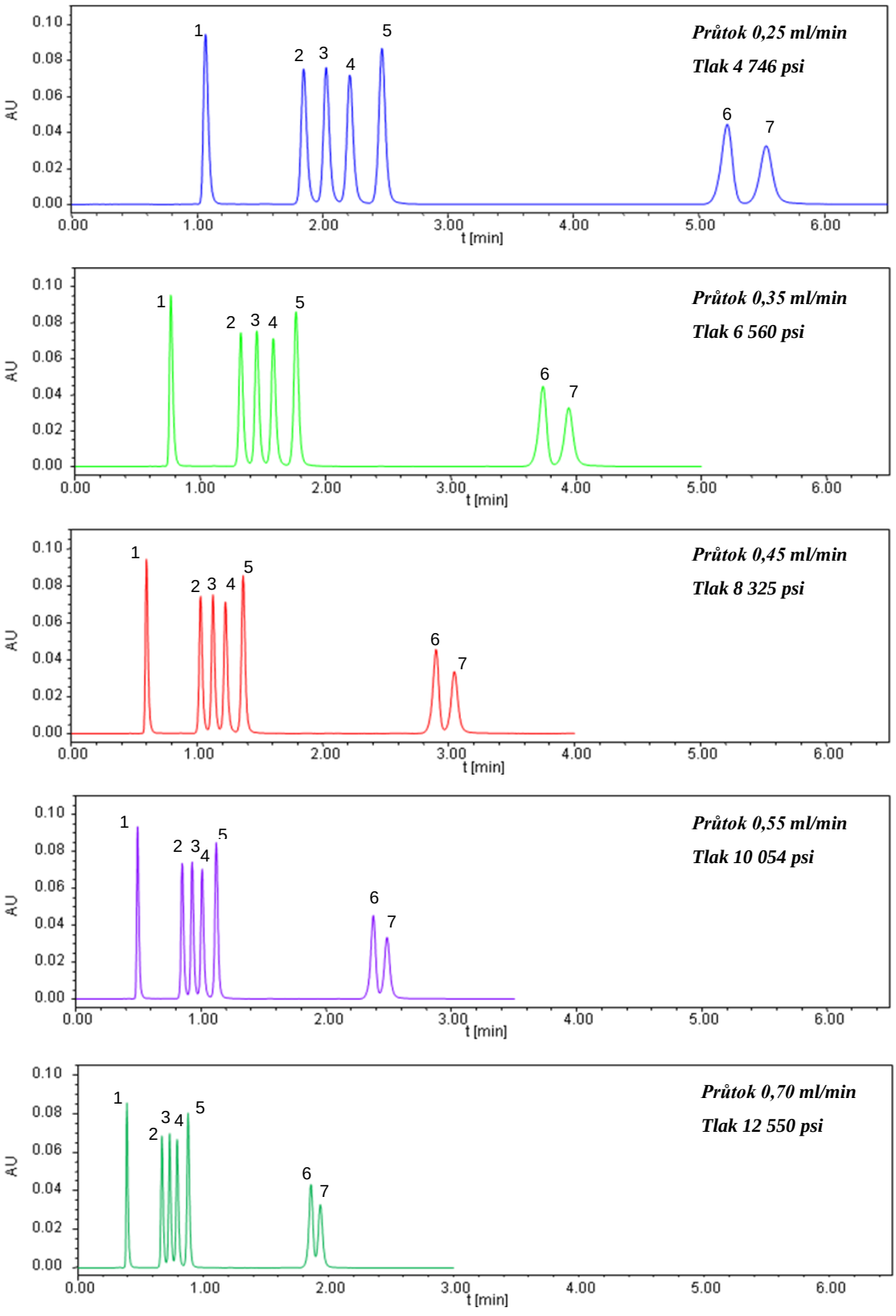


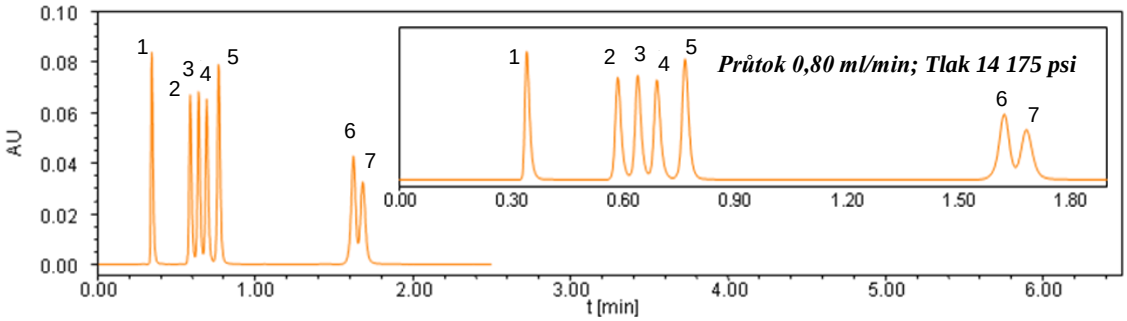
Obr. 18: Porovnání separace 7 steroidů na koloně Kinetex PFP 1,7 µm při teplotě 30 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

Při teplotě 50 °C nebyly pro separaci estrogenních steroidů vhodné průtoky větší než 0,5 ml/min. U těchto průtoků již nedocházelo k úplnému rozdělení estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu na základní linii a rozlišení nebylo větší než 1,5 (při průtoku 0,55 ml/min bylo rozlišení u estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu 1,44 a při průtoku 0,8 ml/min pouze 1,08). U ostatních steroidů bylo rozlišení i při nejvyšším

použitém průtoku stále větší než 1,5 (při průtoku 0,8 ml/min bylo rozlišení α-estradiolu a ethynylestradiolu 1,69) – Obr. 19.

B. Teplota 50 °C



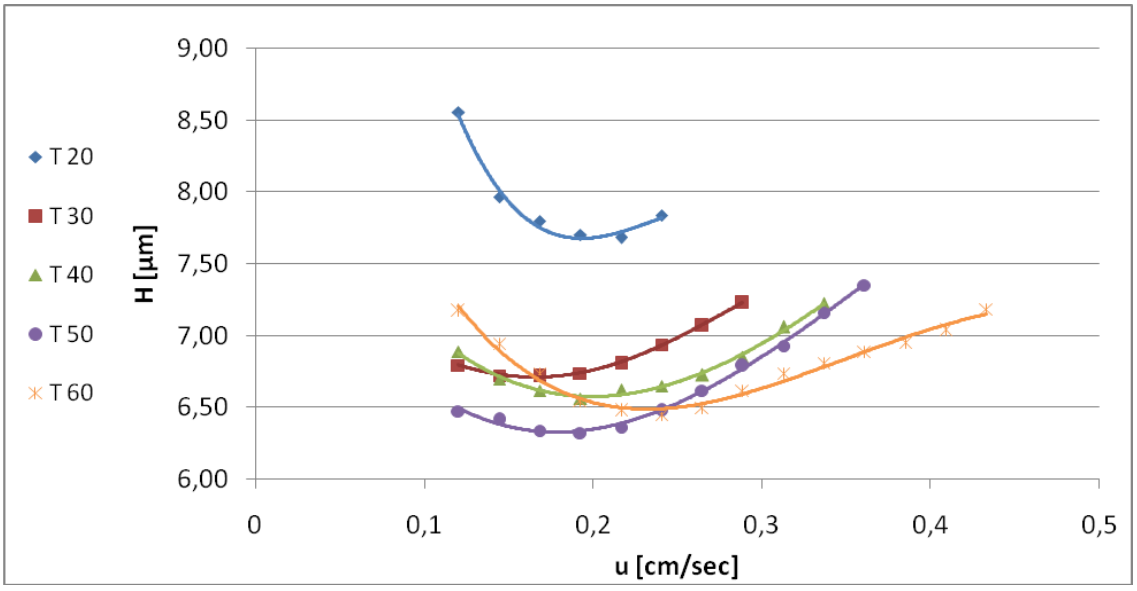


Obr. 19: Porovnání separace 7 steroidů na koloně Kinetex PFP 1,7 µm při teplotě 50 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.3.3 Účinnost kolony

U této kolony bylo dosaženo nejvyšší účinnosti v rozmezí průtoků 0,3 - 0,5 ml/min. Minimum van Deemterových křivek se posouvalo se zvyšující se teplotou k vyšším lineárním průtokovým rychlostem (Graf 5).

Hodnoty účinnosti vyjádřené počtem teoretických pater jsou uvedeny pro estradiol-acetát a β-estradiol. Zeleně jsou opět zvýrazněny hodnoty nejvyšší účinnosti při dané teplotě a průtoku (Tab. 14 a Tab. 15).



Graf 5: van Deemterovy křivky při teplotách 20 °C – 60 °C (estradiol-acetát).

EST-Ac		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	11685	14715	14511	15039	13943	x	x
	0,3	12551	14877	14931	15443	14397	x	x
	0,35	12824	14884	15109	15589	14844	x	x
	0,4	12978	14840	15243	15779	15274	x	x
	0,45	13017	14694	15089	15815	15434	x	x
	0,5	12756	14414	15039	15715	15508	x	x
	0,55	x	14145	14869	15438	15387	x	x
	0,6	x	13835	14606	15110	15110	x	x
	0,7	x	x	13849	14427	14682	x	x
	0,8	x	x	x	13599	14380	x	x
	0,9	x	x	x	x	13917	x	x
	1	x	x	x	x	x	x	x
	1,1	x	x	x	x	x	x	x
	1,2	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 14: Účinnost kolony Kinetex PFP 1,7 µm (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro estradiol-acetát.

b-EST		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	7868	8376	7946	7972	7597	x	x
	0,3	8327	8385	7934	7989	7757	x	x
	0,35	8610	8236	8019	8100	7840	x	x
	0,4	8639	8112	8203	8222	8007	x	x
	0,45	8687	8053	8012	8089	8008	x	x
	0,5	8538	8049	7996	8120	7962	x	x
	0,55	x	7698	7889	7984	7766	x	x
	0,6	x	7508	7695	7669	7458	x	x
	0,7	x	x	7049	7056	6853	x	x
	0,8	x	x	x	6751	6844	x	x
	0,9	x	x	x	x	6748	x	x
	1	x	x	x	x	x	x	x
	1,1	x	x	x	x	x	x	x
	1,2	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 15: Účinnost kolony Kinetex PFP 1,7 µm (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro β-estradiol.

5.3.4 Faktor symetrie

Při zvyšujícím se průtoku došlo k nepatrnému nárůstu faktoru symetrie, avšak u všech teplot a průtoků nebyla hodnota větší než 1,5. S rostoucí teplotou hodnoty mírně stoupaly nebo zůstávaly téměř stejné. Nejvyšší hodnoty byly naměřené pro estriol (Tab. 16 a Tab. 17).

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,30	1,31	1,32	1,33	1,32	x	x
b-EST	1,15	1,15	1,17	1,18	1,19	x	x
a-est	1,06	1,11	1,13	1,15	1,18	x	x
et-EST	1,10	1,13	1,15	1,17	1,06	x	x
ESN	1,05	1,07	1,09	1,10	1,10	x	x
EST-me	0,82	0,85	0,87	0,87	–	x	x
EST-ac	1,04	1,04	1,05	1,04	–	x	x

Tab. 16: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,25 ml/min a rostoucí teplotě.

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,40	1,44	1,42	1,41	1,39	x	x
b-EST	1,17	1,24	1,24	1,25	1,24	x	x
a-est	1,12	1,16	1,15	1,19	–	x	x
et-EST	1,15	1,2	1,21	1,16	–	x	x
ESN	1,08	1,13	1,13	1,14	1,13	x	x
EST-me	0,85	0,88	0,87	0,92	–	x	x
EST-ac	1,07	1,07	1,06	–	–	x	x

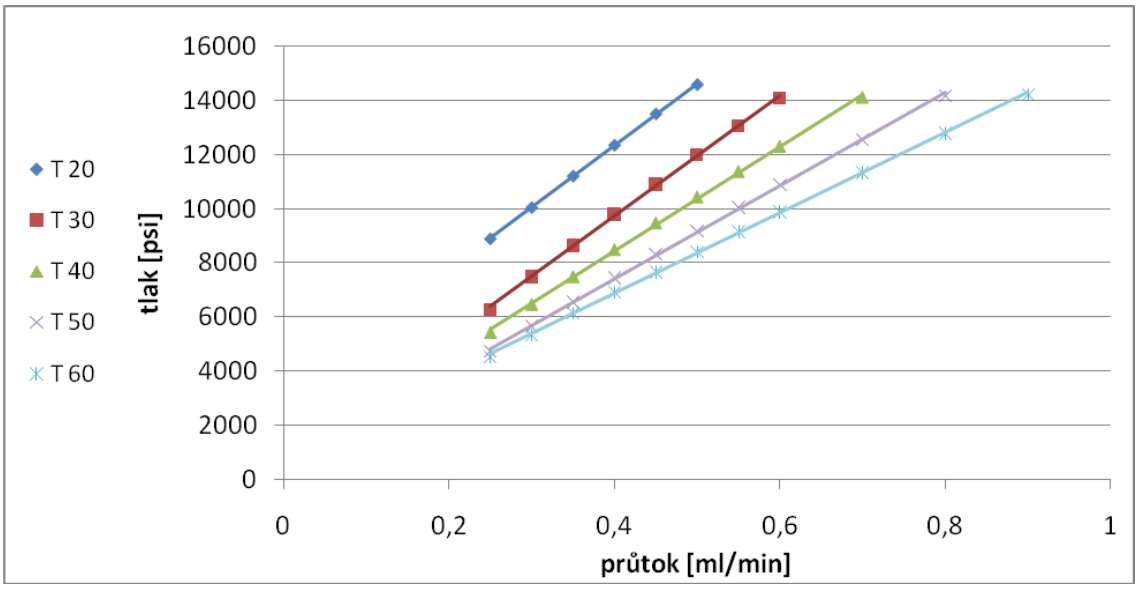
Tab. 17: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,5 ml/min a rostoucí teplotě.

5.3.5 Zpětný tlak

Kolona Kinetex PFP o velikosti částic 1,7 µm je schopná pracovat při hodnotách tlaku do 15 000 psi. Se zvyšující se teplotou tlak klesal, tím mohlo být použito i vyšších průtoků. Z Tab. 18 vyplývá, že při nejnižší teplotě 20 °C byl maximální možný průtok 0,5 ml/min (14 580 psi) a při teplotě 60 °C průtok dosahoval 0,9 ml/min (14 205 psi). Při teplotě 60 °C byl tlak o 42 – 49 % nižší než při teplotě 20 °C. S rostoucím průtokem zároveň docházelo k nárůstu hodnot zpětného tlaku (Graf 6).

		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	8900	6300	5426	4746	4530	x	x
	0,3	10055	7498	6465	5662	5335	x	x
	0,35	11210	8657	7485	6560	6135	x	x
	0,4	12348	9804	8486	7446	6900	x	x
	0,45	13500	10895	9467	8325	7655	x	x
	0,5	14580	11982	10422	9195	8405	x	x
	0,55	x	13035	11366	10054	9150	x	x
	0,6	x	14055	12294	10900	9885	x	x
	0,7	x	x	14100	12550	11340	x	x
	0,8	x	x	x	14175	12776	x	x
	0,9	x	x	x	x	14205	x	x
	1	x	x	x	x	x	x	x
	1,1	x	x	x	x	x	x	x
	1,2	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 18: Porovnání zpětného tlaku při teplotách 20 °C – 60 °C a různých průtocích.



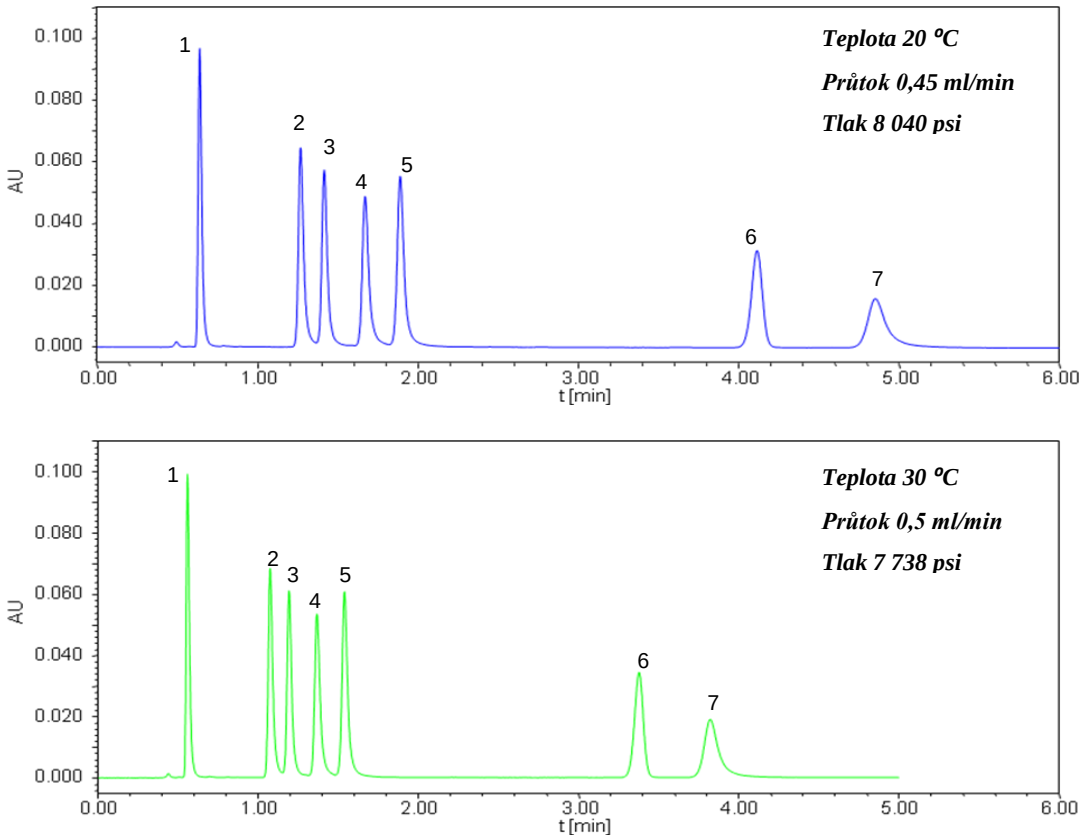
Graf 6: Znázornění rostoucího tlaku v závislosti na zvyšujícím se průtoku (teploty 20 °C – 60 °C).

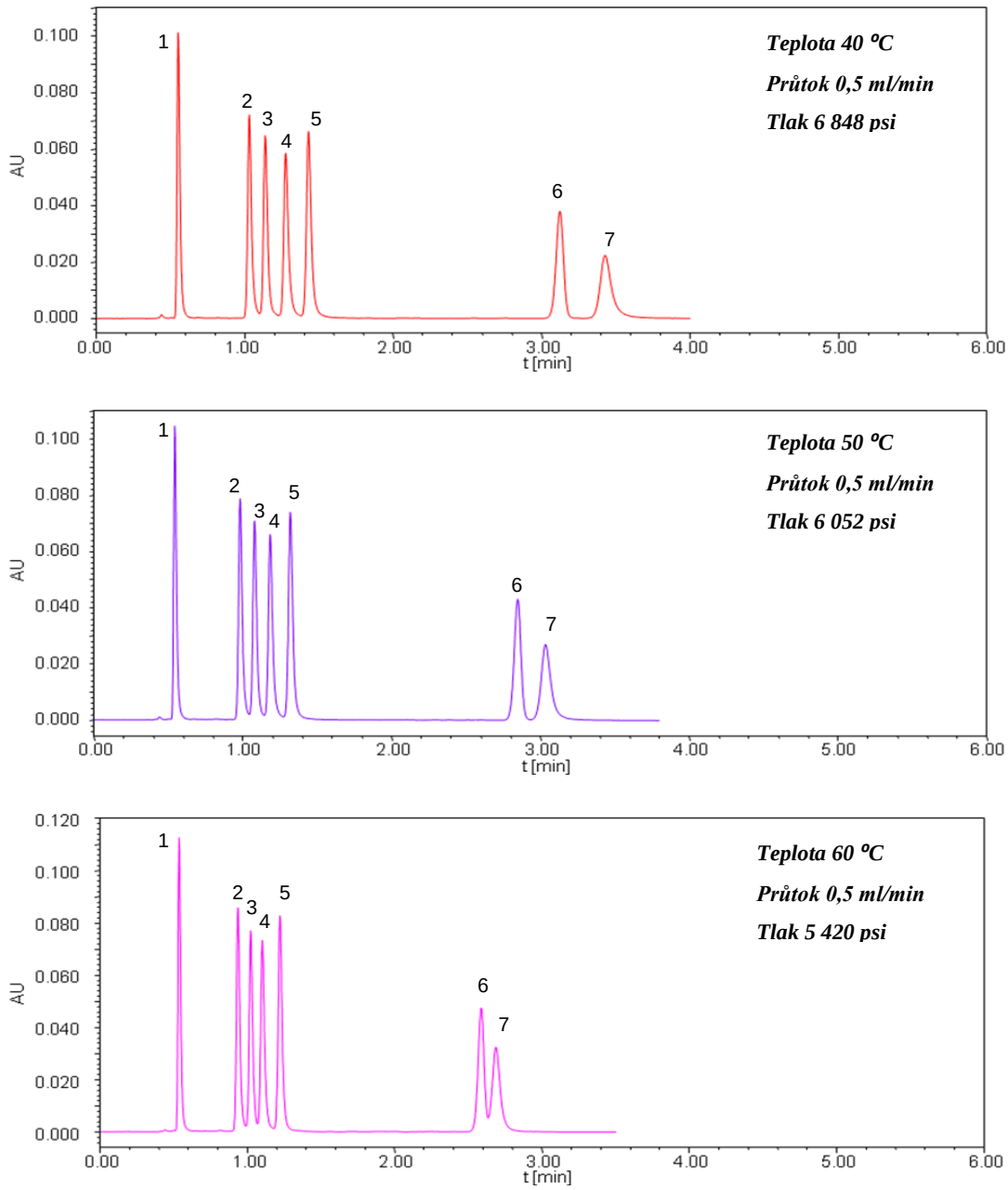
5.4 Kolona Kinetex PFP 2,6 µm / 2,1x100 mm

5.4.1 Vliv teploty na separaci

Chromatogramy jsou znázorněny při průtoku 0,5 ml/min kromě teploty 20 °C, kdy je uveden průtok 0,45 ml/min a to kvůli hodnotám tlaku, který byl na koloně generován. U této kolony uvádí výrobce maximální tlak pouze do 8 700 psi, proto nemohlo být vyšších průtoků využito (při teplotě 20 °C a průtoku 0,45 ml/min činil tlak 8 040 psi).

Teplota 60 °C již není k optimální separaci vhodná. Ani při nejnižším použitelném průtoku 0,25 ml/min nedošlo k rozdělení píků estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu až na základní linii (rozlišení 1,39). Při průtoku 0,5 ml/min bylo rozlišení estradiol-methyléteru a estradiol-acetátu 1,16. Chromatogramy při teplotách 20 °C – 60 °C jsou uvedeny na Obr. 20.



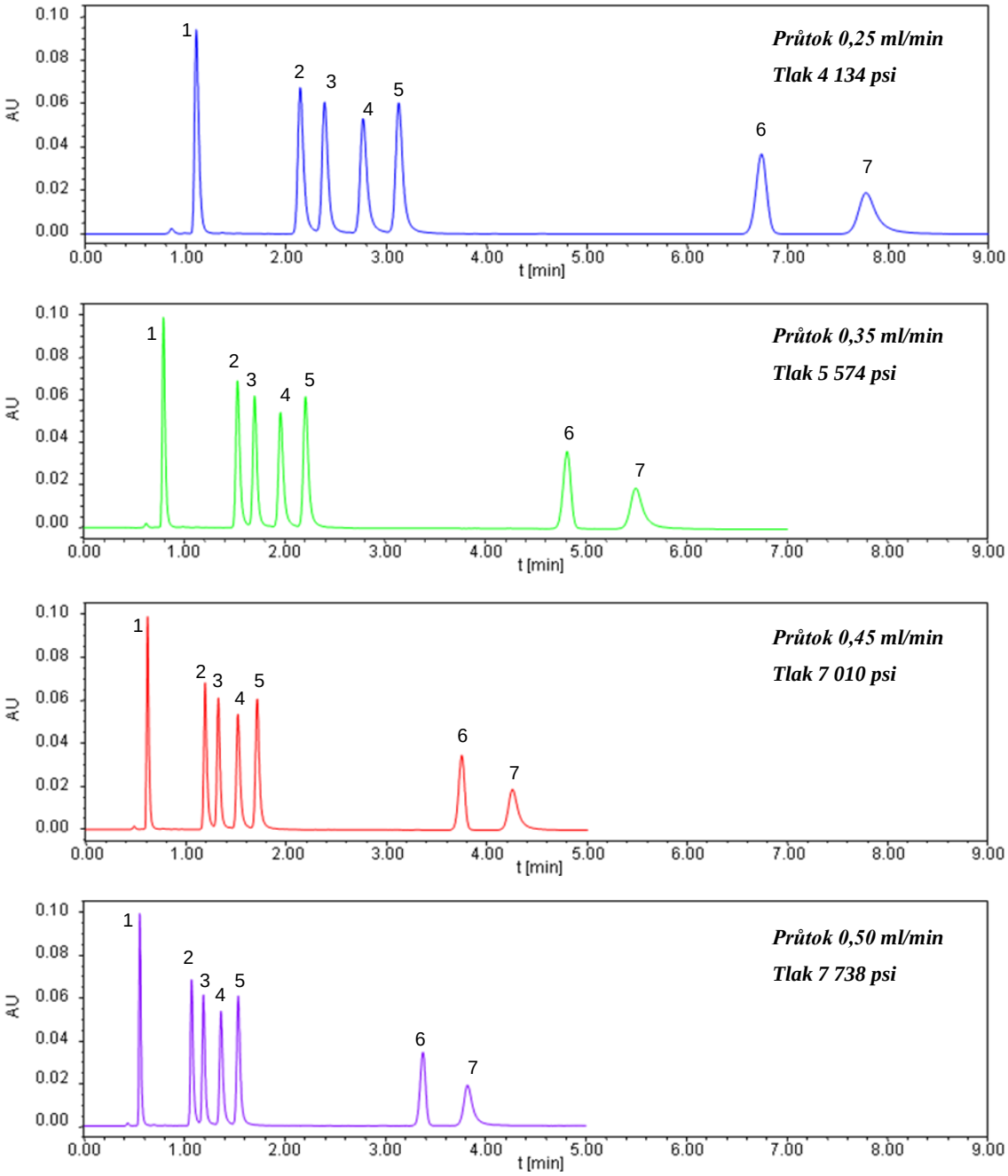


Obr. 20: Sledování vlivu teploty na separaci steroidů (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.4.2 Vliv průtoku na separaci

Při teplotě 30 °C a průtoku 0,25 ml/min trvala separace 8 minut, což je téměř srovnatelné s kolonou Kinetex o velikosti částic 1,7 µm. Maximální průtok, který byl při této teplotě použit, činil 0,5 ml/min a k eluci došlo za 4 minuty (Obr. 21). Vyšších průtoků nebylo využito z důvodů uvedených v kapitole 5.4.1.

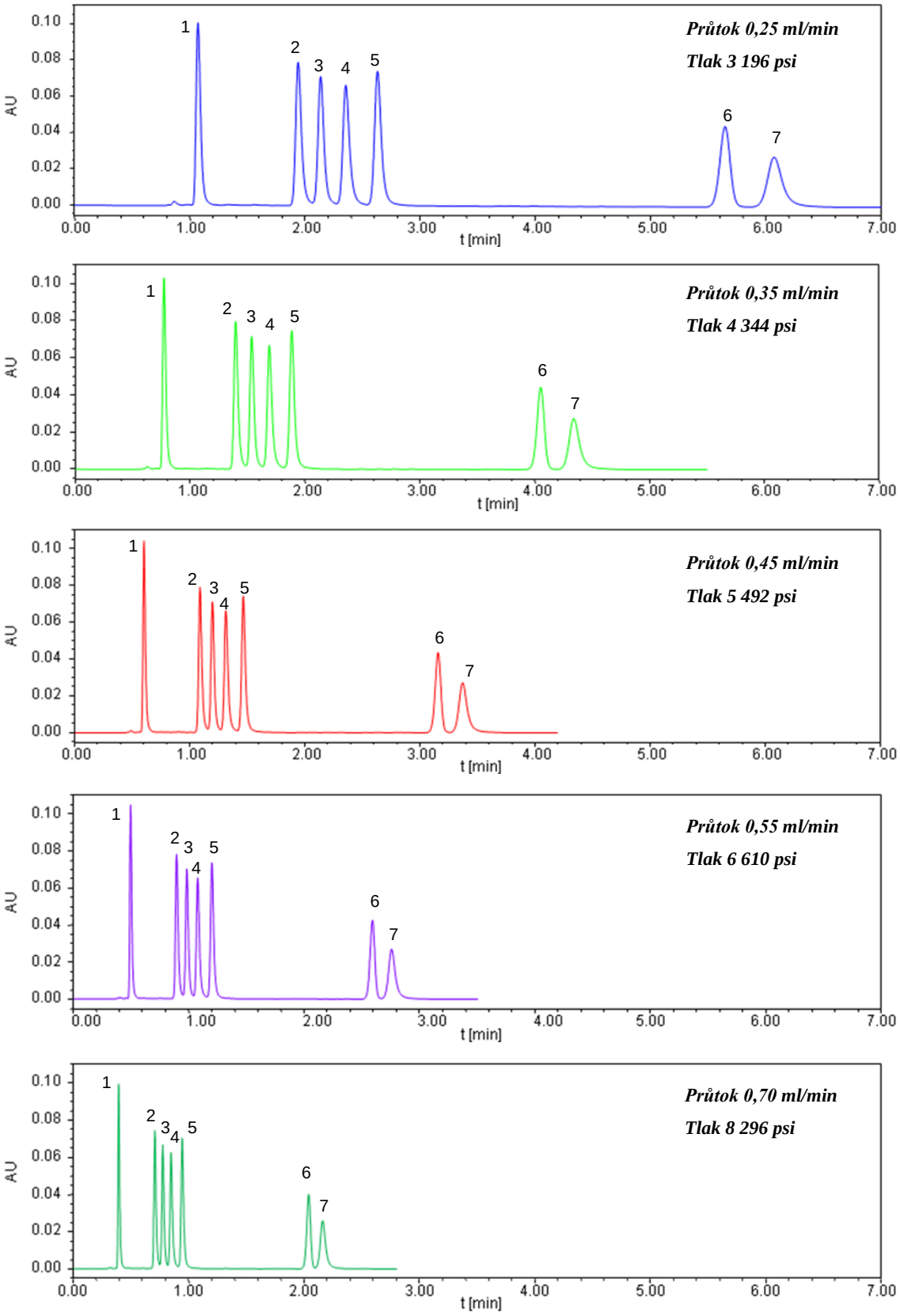
A. Teplota 30 °C



Obr. 21: Porovnání separace 7 steroidů na koloně Kinetex PFP 2,6 µm při teplotě 30 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

Při porovnání s kolonou Kinetex o velikosti částic 1,7 µm došlo při teplotě 50 °C k optimální separaci i při nejvyšším možném průtoku 0,7 ml/min, kdy u výše jmenované kolony již došlo ke smývání píků (Obr. 22).

B. Teplota 50 °C

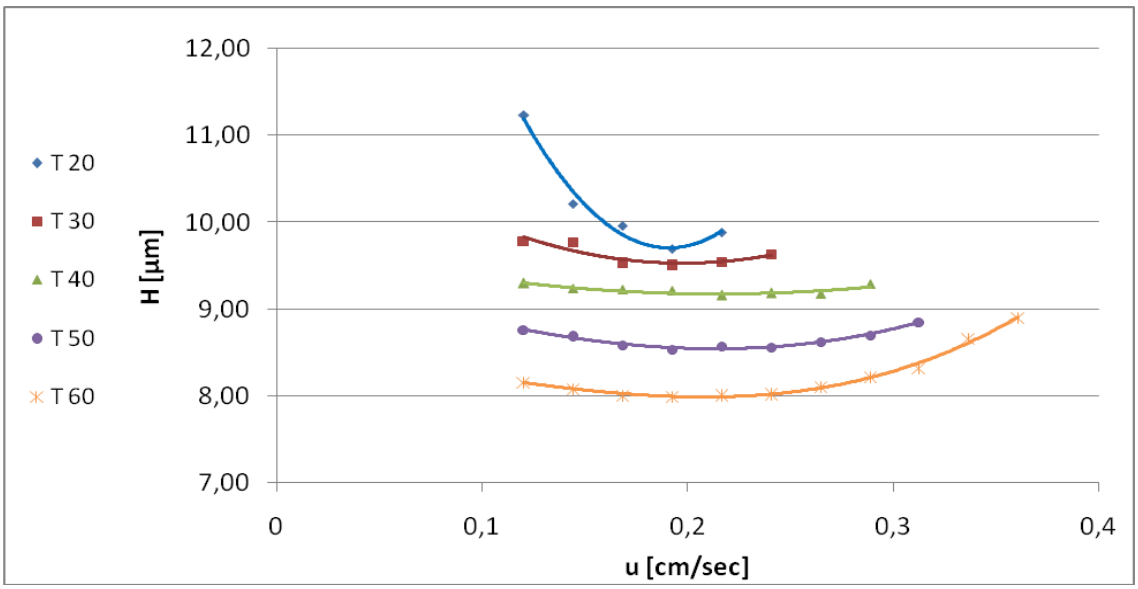


Obr. 22: Porovnání separace 7 steroidů na koloně Kinetex PFP 2,6 µm při teplotě 50 °C a zvyšujícím se průtoku (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.4.3 Účinnost kolony

S rostoucí teplotou docházelo k nárůstu účinnosti, při teplotě 60 °C bylo u této kolony dosaženo nejvyššího počtu teoretických pater. Tomuto faktu odpovídají i hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra (H) znázorněné pomocí van Deemterových křivek, kde křivce s nejnižší hodnotou H odpovídá právě teplota 60 °C. (Graf 7). Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo v rozmezí průtoků 0,4 – 0,5 ml/min. Hodnoty účinnosti v počtu teoretických pater jsou v tabulkách uvedeny opět pro estradiol-acetát a β-estradiol. Zeleně jsou vyznačeny nejvyšší hodnoty u daného průtoku a teploty (Tab. 19 a Tab. 20).

U kolony Kinetex o velikosti částic 2,6 µm bylo dosaženo nejnižší účinnosti, což je patrné z grafického zpracování van Deemterových křivek, kde jsou hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra v porovnání s předchozími kolonami nejvyšší.



Graf 7: Van Deemterovy křivky při teplotách 20 °C – 60 °C (estradiol-acetát).

EST-Ac		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	8897	10223	10756	11411	12266	x	x
	0,3	9790	10232	10823	11523	12375	x	x
	0,35	10040	10498	10836	11646	12489	x	x
	0,4	10316	10525	10853	11718	12516	x	x
	0,45	10119	10477	10917	11670	12505	x	x
	0,5	x	10382	10889	11682	12487	x	x
	0,55	x	x	10900	11598	12342	x	x
	0,6	x	x	10766	11500	12168	x	x
	0,7	x	x	x	11315	11546	x	x
	0,8	x	x	x	x	x	x	x
	0,9	x	x	x	x	x	x	x
	1	x	x	x	x	x	x	x
	1,1	x	x	x	x	x	x	x
	1,2	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 19: Účinnost kolony Kinetex PFP 2,6 µm (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro estradiol-acetát.

EST-Ac		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	6986	7124	7284	7746	8036	x	x
	0,3	7386	7453	7497	7786	8113	x	x
	0,35	7576	7715	7576	7792	8228	x	x
	0,4	7729	7720	7621	7853	8272	x	x
	0,45	7890	7801	7732	7901	8401	x	x
	0,5	x	7860	7761	7940	8359	x	x
	0,55	x	x	7688	7871	8214	x	x
	0,6	x	x	7551	7772	8038	x	x
	0,7	x	x	x	7431	7568	x	x
	0,8	x	x	x	x	x	x	x
	0,9	x	x	x	x	x	x	x
	1	x	x	x	x	x	x	x
	1,1	x	x	x	x	x	x	x
	1,2	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 20: Účinnost kolony Kinetex PFP 2,6 µm (počet teoretických pater), hodnoty naměřené pro β-estradiol.

5.4.4 Faktor symetrie

Symetrie některých píků se často blížila hodnotám 1,5. Při průtoku 0,25 ml/min a teplotě 20 °C bylo několik hodnot dokonce větších, což je nevyhovující (v Tab. 21 jsou vyznačeny červeně). S rostoucí teplotou hodnoty klesaly a bylo tak dosaženo lepší symetrie píků.

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,46	1,44	1,43	1,41	1,36	x	x
b-EST	1,61	1,46	1,38	1,36	1,26	x	x
a-EST	1,42	1,31	1,30	1,25	1,23	x	x
et-EST	1,58	1,44	1,40	1,36	1,31	x	x
ESN	1,53	1,38	1,35	1,29	1,25	x	x
EST-me	0,96	0,95	0,96	0,96	0,98	x	x
EST-ac	1,54	1,39	1,36	1,28	1,16	x	x

Tab. 21: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,25 ml/min a rostoucí teplotě.

	teplota [°C]						
	20	30	40	50	60	70	80
ESTR	1,48	1,47	1,47	1,45	1,42	x	x
b-EST	1,47	1,44	1,43	1,40	1,35	x	x
a-EST	1,32	1,30	1,29	1,31	1,27	x	x
et-EST	1,44	1,43	1,41	1,33	1,26	x	x
ESN	1,37	1,36	1,34	1,30	1,26	x	x
EST-me	0,94	0,94	0,95	0,94	–	x	x
EST-ac	1,38	1,36	1,35	1,26	–	x	x

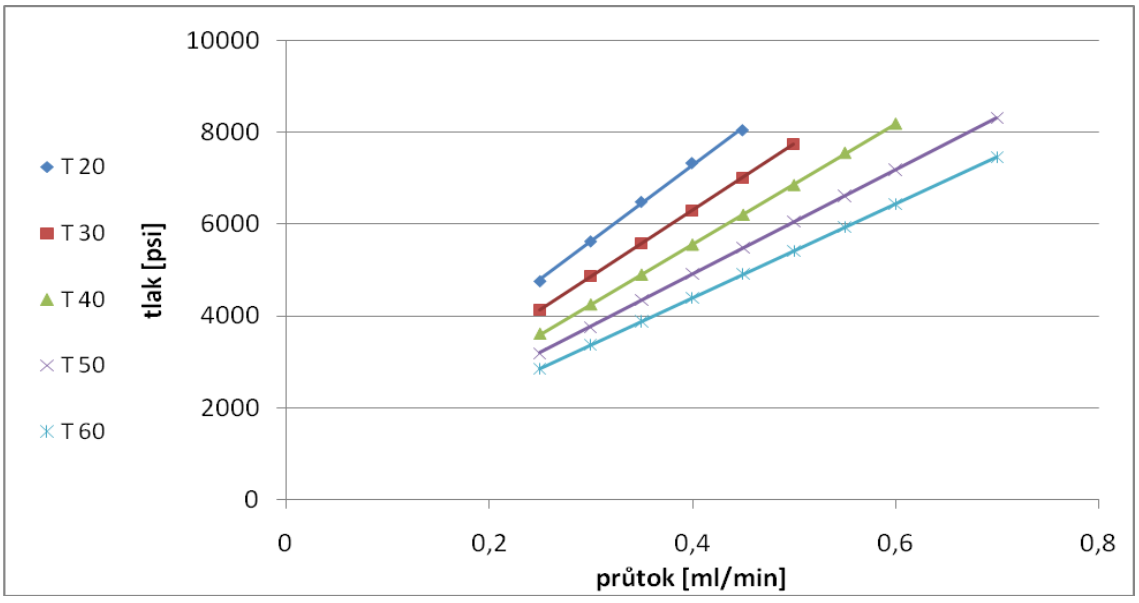
Tab. 22: Porovnání symetrie píků při průtoku 0,45 ml/min (20 °C), 0,5 ml/min (30 °C – 60 °C) a rostoucí teplotě.

5.4.5 Zpětný tlak

Maximální tlak, při kterém může kolona pracovat je do 8700 psi. Z tohoto důvodu nebylo dosaženo vyšších průtoků než 0,7 ml/min. Z tabulky vyplývá, že při nejnižší teplotě 20 °C dosahoval průtok pouze 0,45 ml/min a při maximální teplotě 60 °C činil 0,7 ml/min (Tab. 23). Graficky jsou znázorněny rostoucí hodnoty tlaku v závislosti na zvyšujícím se průtoku (Graf 8).

		teplota [°C]						
		20	30	40	50	60	70	80
průtok [ml/min]	0,25	4765	4134	3610	3196	2852	x	x
	0,3	5629	4864	4246	3764	3366	x	x
	0,35	6486	5574	4898	4344	3884	x	x
	0,4	7328	6288	5552	4918	4396	x	x
	0,45	8040	7010	6200	5492	4910	x	x
	0,5	x	7738	6848	6052	5420	x	x
	0,55	x	x	7552	6610	5936	x	x
	0,6	x	x	8186	7175	6444	x	x
	0,7	x	x	x	8296	7455	x	x
	0,8	x	x	x	x	x	x	x
	0,9	x	x	x	x	x	x	x
	1	x	x	x	x	x	x	x
	1,1	x	x	x	x	x	x	x
	1,2	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 23: Porovnání zpětného tlaku při teplotách 20 °C– 60 °C a různých průtocích.



Graf 8: Znázornění rostoucího tlaku v závislosti na zvyšujícím se průtoku (teploty 20 °C – 60 °C).

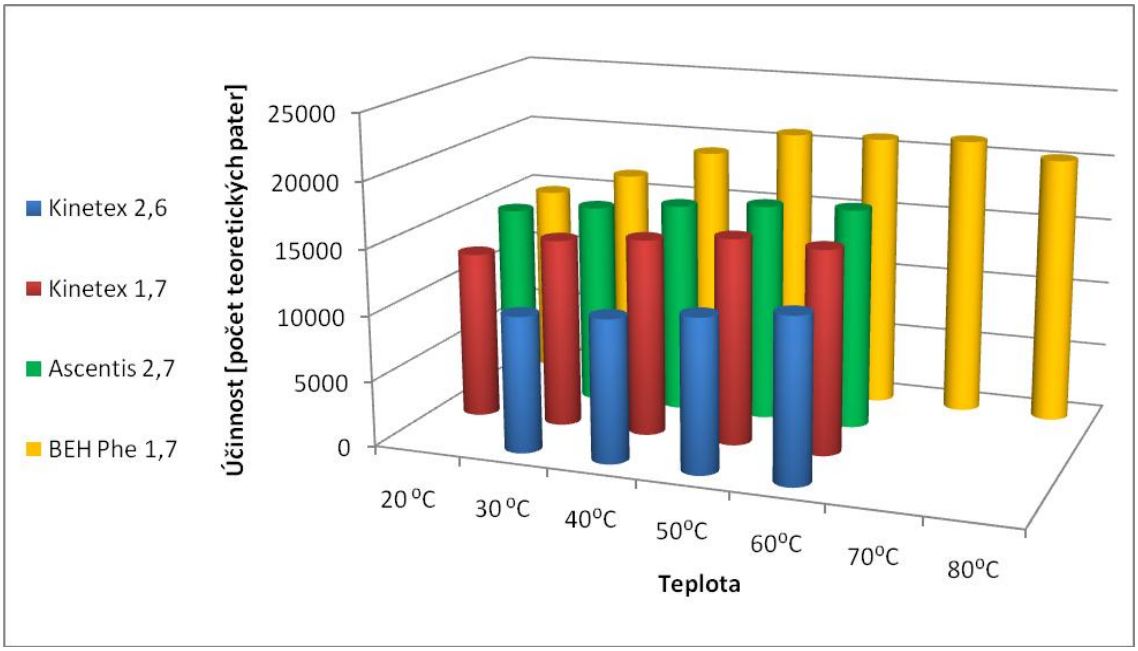
5.5 Porovnání kolon

5.5.1 Porovnání účinnosti

Z hlediska účinnosti byla nejlépe vyhodnocena kolona ACQUITY BEH Phenyl, tedy kolona naplněná celkově porézními částicemi menšími než 2 µm. Nepatrně nižší účinnost měla kolona Ascentis Express. Nejhůře byly vyhodnoceny kolony Kinetex 2,6 µm a 1,7 µm. O výsledcích vypovídá Tab. 24, kde je srovnána účinnost kolon vyjádřením počtu teoretických pater při všech teplotách a průtoku 0,5 ml/min. Graficky jsou znázorněny hodnoty účinnosti v závislosti na rostoucí teplotě (Graf. 9). Pro porovnání kolon jsou uvedeny hodnoty naměřené pro estradiol-acetát.

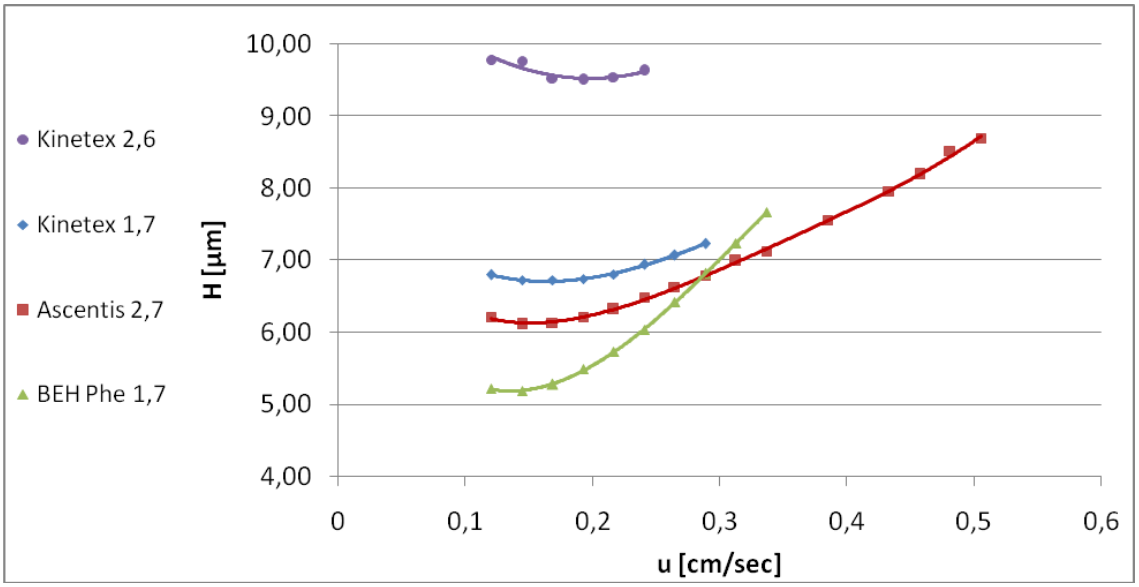
EST-Ac	BEH Phe 1,7 µm	Ascentis 2,7 µm	Kinetex 1,7 µm	Kinetex 2,6 µm
průtok	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
20 °C	14710	14662	12756	x
30 °C	16576	15431	14414	10382
40 °C	18909	16106	15039	10889
50 °C	20857	16627	15715	11682
60 °C	20952	16883	15508	12487
70 °C	21243	x	x	x
80 °C	20251	x	x	x

Tab. 24: Porovnání účinnosti kolon (v počtu teoretických pater) při průtoku 0,5 ml/min.



Graf 9: Porovnání účinnosti kolon v závislosti na rostoucí teplotě.

Účinnost byla dále vyjádřena pomocí van Deemterových křivek (Graf 10). Z obrázku vyplývá, že nejhorší účinnost měla kolona Kinetex 2,6 µm, jejíž křivka je umístěna nejvýše a dosahuje tedy nejvyšších hodnot výškového ekvivalentu teoretického patra (H). S klesajícími hodnotami H stoupala účinnost uvedených kolon.



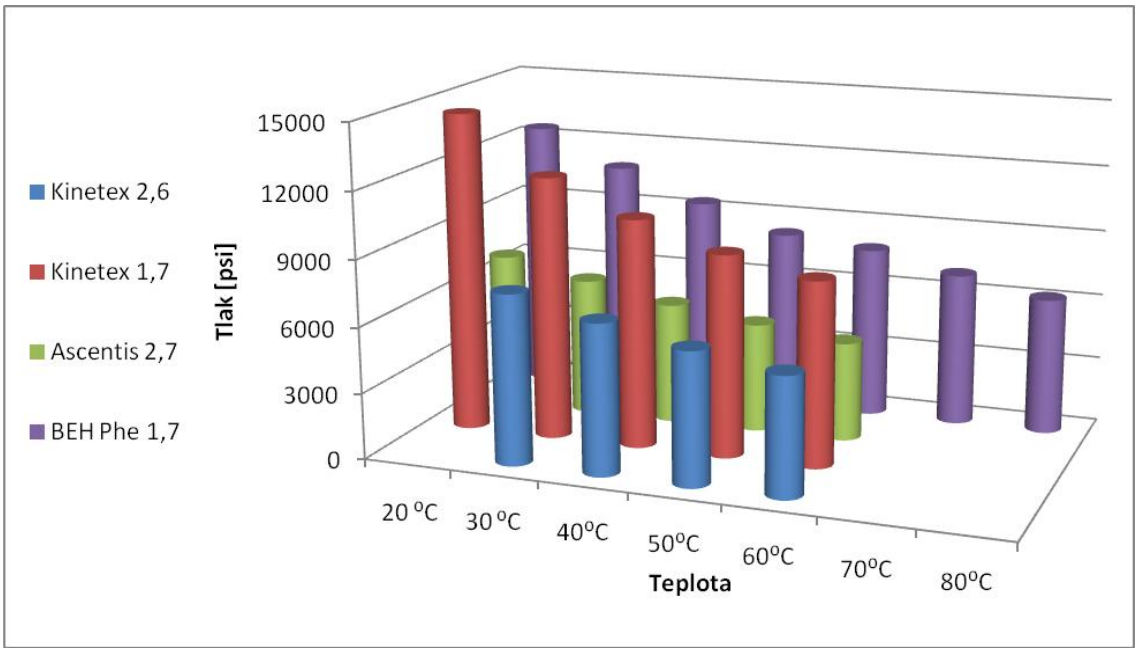
Graf 10: Ukázka vyhodnocení účinnosti kolon pomocí van Deemterových křivek při teplotě 30 °C. Pro příklad jsou uvedeny hodnoty naměřené pro estradiol-acetát.

5.5.2 Porovnání zpětného tlaku

K nejmenšímu nárůstu zpětného tlaku došlo u kolony Ascentis Express, mohlo tak být použito daleko vyšších průtoků než u ostatních kolon. Porovnáním kolony Ascentis Express, která je naplněná povrchově porézními částicemi s kolonou ACQUITY BEH Phenyl, naplněnou celkově porézními částicemi menšími než 2 µm, byl tlak při teplotě 20 °C a průtoku 0,5 ml/min o 43% nižší. U kolony Kinetex 1,7 µm naplněné povrchově porézními částicemi došlo ke značnému nárůstu zpětného tlaku, který byl vyšší než u kolony ACQUITY BEH Phenyl (Tab. 25). Přehled naměřených hodnot zpětného tlaku v závislosti na rostoucí teplotě je znázorněn i graficky (Graf 11).

	BEH Phe 1,7 µm	Ascentis 2,7 µm	Kinetex 1,7 µm	Kinetex 2,6 µm
průtok	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
20 °C	12503	7102	14580	x
30 °C	10850	6298	11982	7738
40 °C	9430	5527	10422	6848
50 °C	8240	4982	9195	6052
60 °C	7845	4515	8405	5420
70 °C	7002	x	x	x
80 °C	6230	x	x	x

Tab. 25: Porovnání zpětného tlaku, hodnoty jsou uvedeny při průtoku 0,5 ml/min.



Graf 11: Porovnání zpětného tlaku v závislosti na rostoucí teplotě.

5.5.3 Porovnání symetrie

Nejlepších hodnot symetrie bylo dosaženo u kolon Ascentis Express a ACQUITY BEH Phenyl. Naopak nejhorší symetrií píků byla vyhodnocena kolona Kinetex 2,6 µm, kde se hodnoty nejvíce blížily číslu 1,5. Pro srovnání jsou uvedeny teploty 30 °C a 50 °C při průtoku 0,5 ml/min (Tab. 26 a Tab. 27).

A. Teplota 30 °C

	BEH Phe 1,7 µm	Ascentis 2,7 µm	Kinetex 1,7 µm	Kinetex 2,6 µm
průtok	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
ESTR	1,34	1,40	1,44	1,47
b-EST	1,12	1,08	1,24	1,44
a-EST	1,09	1,04	1,16	1,30
et-EST	1,07	1,02	1,20	1,43
ESN	1,05	0,98	1,13	1,36
EST-me	0,98	0,90	0,88	0,94
EST-ac	0,98	0,93	1,07	1,36

Tab. 26: Porovnání symetrie při teplotě 30 °C a průtoku 0,5 ml/min.

B. Teplota 50 °C

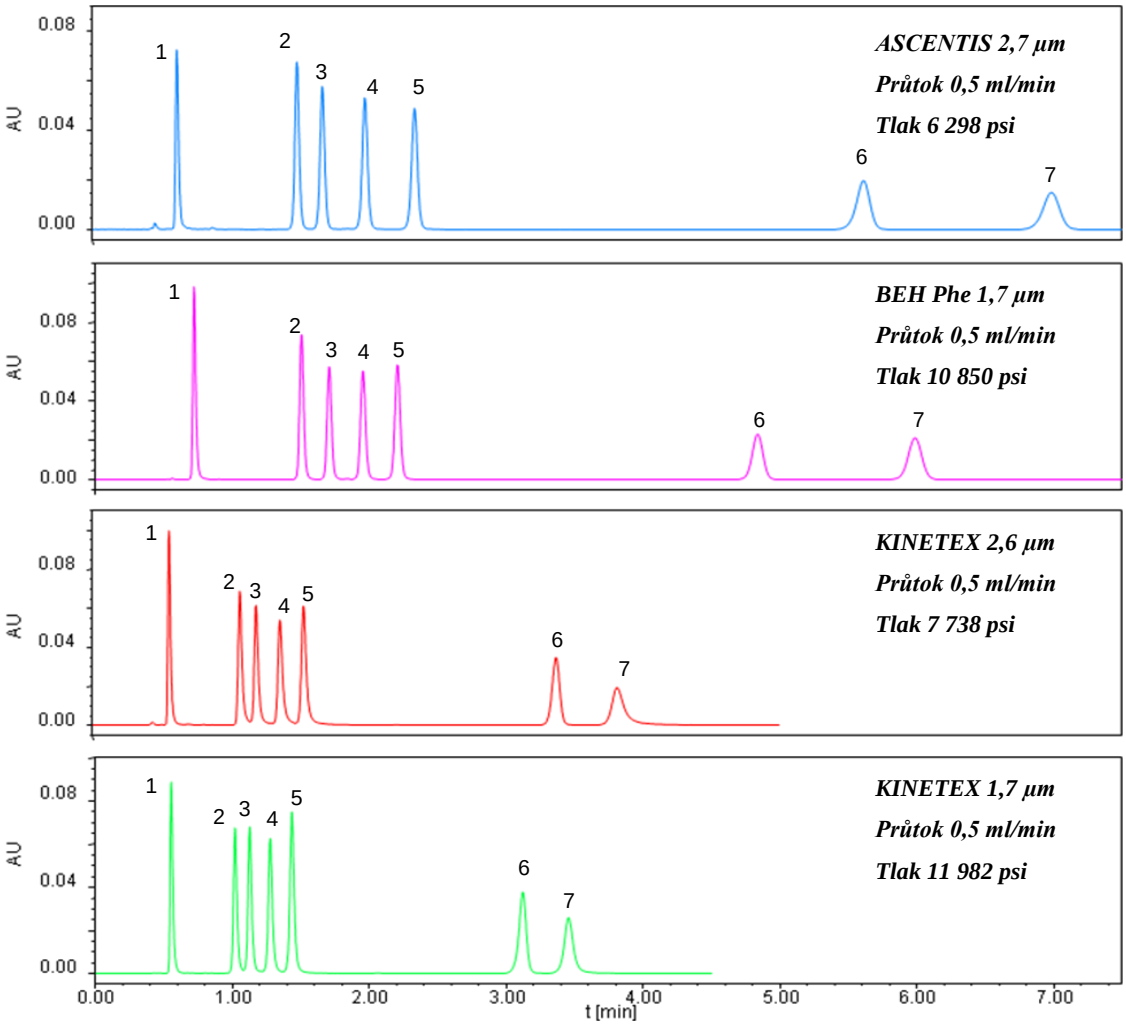
	BEH Phe 1,7 µm	Ascentis 2,7 µm	Kinetex 1,7 µm	Kinetex 2,6 µm
průtok	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
ESTR	1,38	1,39	1,41	1,45
b-EST	1,17	1,11	1,25	1,40
a-EST	1,15	1,06	1,19	1,31
et-EST	1,13	1,05	1,16	1,33
ESN	1,10	1,01	1,14	1,30
EST-me	1,00	0,90	0,92	0,94
EST-ac	1,01	0,92	–	1,26

Tab. 27: Porovnání symetrie při teplotě 50 °C a průtoku 0,5 ml/min.

5.5.4 Porovnání separace za typických UHPLC podmínek

V rychlosti separace za typických laboratorních podmínek byla nejlépe vyhodnocena kolona Kinetex o velikosti částic 1,7 µm, kdy došlo při teplotě 30 °C a průtoku 0,5 ml/min k separaci již za 3,6 minut. V porovnání s kolonou Ascentis Express byla tato separace o polovinu kratší. Při této teplotě došlo k optimální separaci u všech použitých kolon (Obr. 23).

Teplota 30 °C



Obr. 23: Porovnání separace estrogenních steroidů při teplotě 30 °C a průtoku 0,5 ml/min (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.5.5 Porovnání separace za vyšší teploty

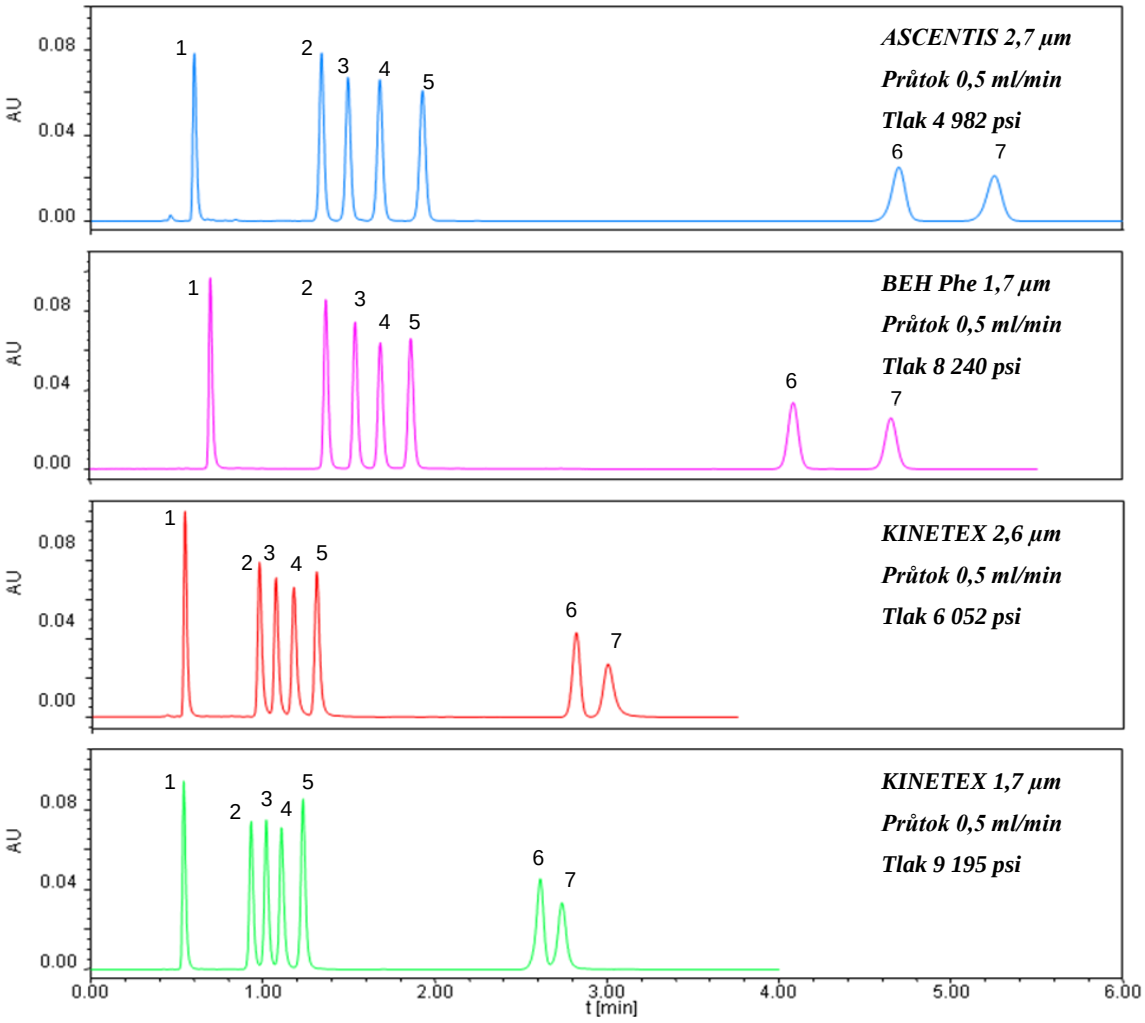
Při teplotě 50 °C a průtoku 0,5 ml/min došlo k optimální separaci u všech použitých kolon (Obr. 24). Nejkratší separace bylo opět dosaženo u kolony Kinetex 1,7 µm a nejdelší u Ascentis Express.

Při teplotě 60 °C a průtoku 0,7 ml/min bylo u kolony Kinetex 1,7 µm a 2,6 µm dosaženo rychlejší separace než u kolon ACQUITY BEH Phenyl a Ascentis Express, ale již nedošlo k optimálnímu dělení na základní linii a píky estradiol-acetátu a estradiol-methyléteru se smívaly (Obr. 25). Oproti tomu, u kolony Ascentis Express mohlo být využito daleko vyšších průtoků, při kterých došlo k urychlení separace

a optimálnímu dělení všech estrogenních steroidů (příkladem je separace při teplotě 60 °C a průtoku 1,2 ml/min, kdy separace trvala dvě minuty).

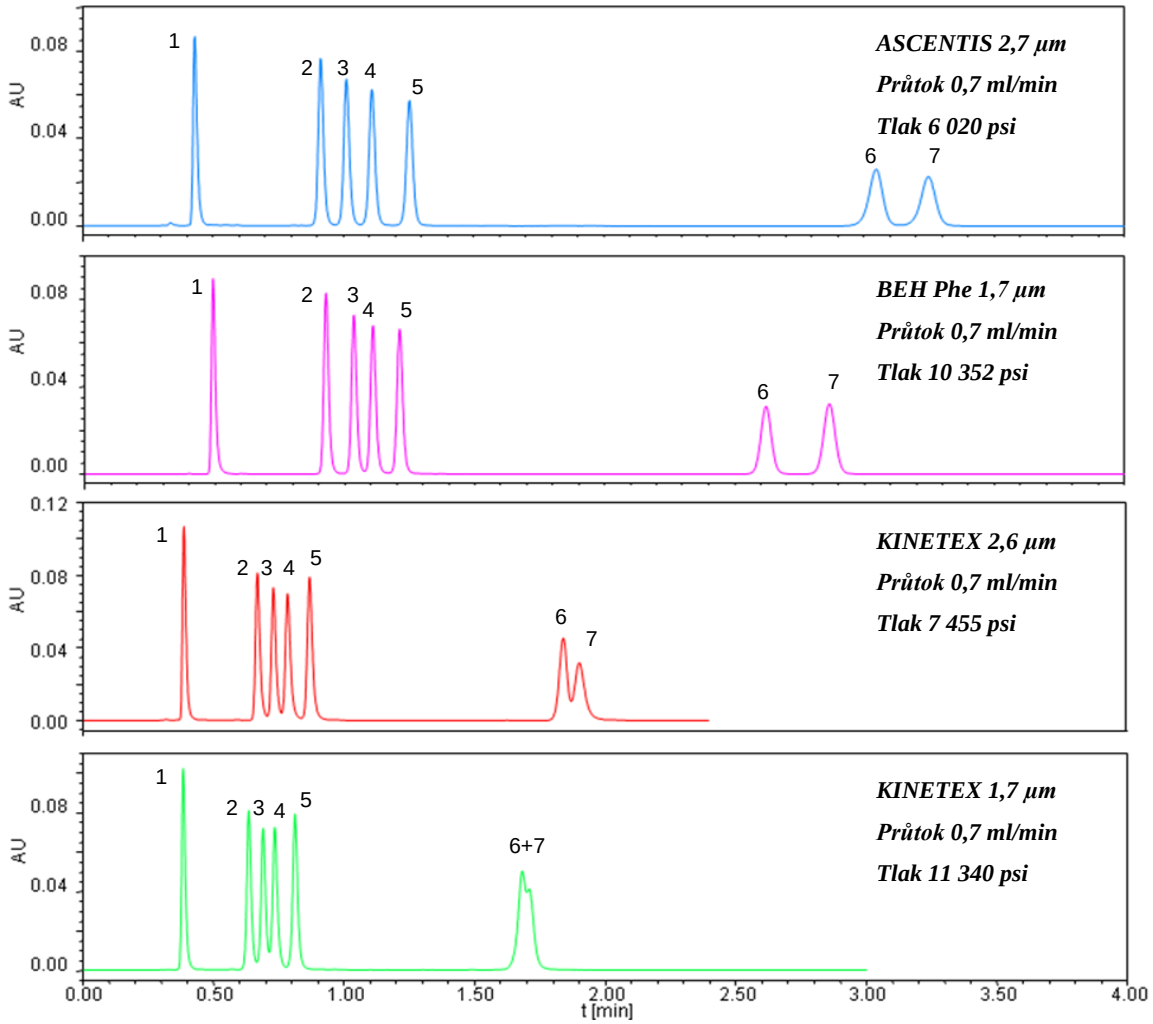
Kolona ACQUITY BEH Phenyl byla jedinou, u které se dalo využít i vyšších teplot. Avšak z vyšších teplot šla k separaci použít pouze teplota 70 °C a průtoky menší než 0,5 ml/min, protože při teplotách 80 °C a 90 °C již nedocházelo k optimálnímu rozlišení píků.

Teplota 50 °C



Obr. 24: Porovnání separace estrogenních steroidů při teplotě 50 °C a průtoku 0,5 ml/min (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

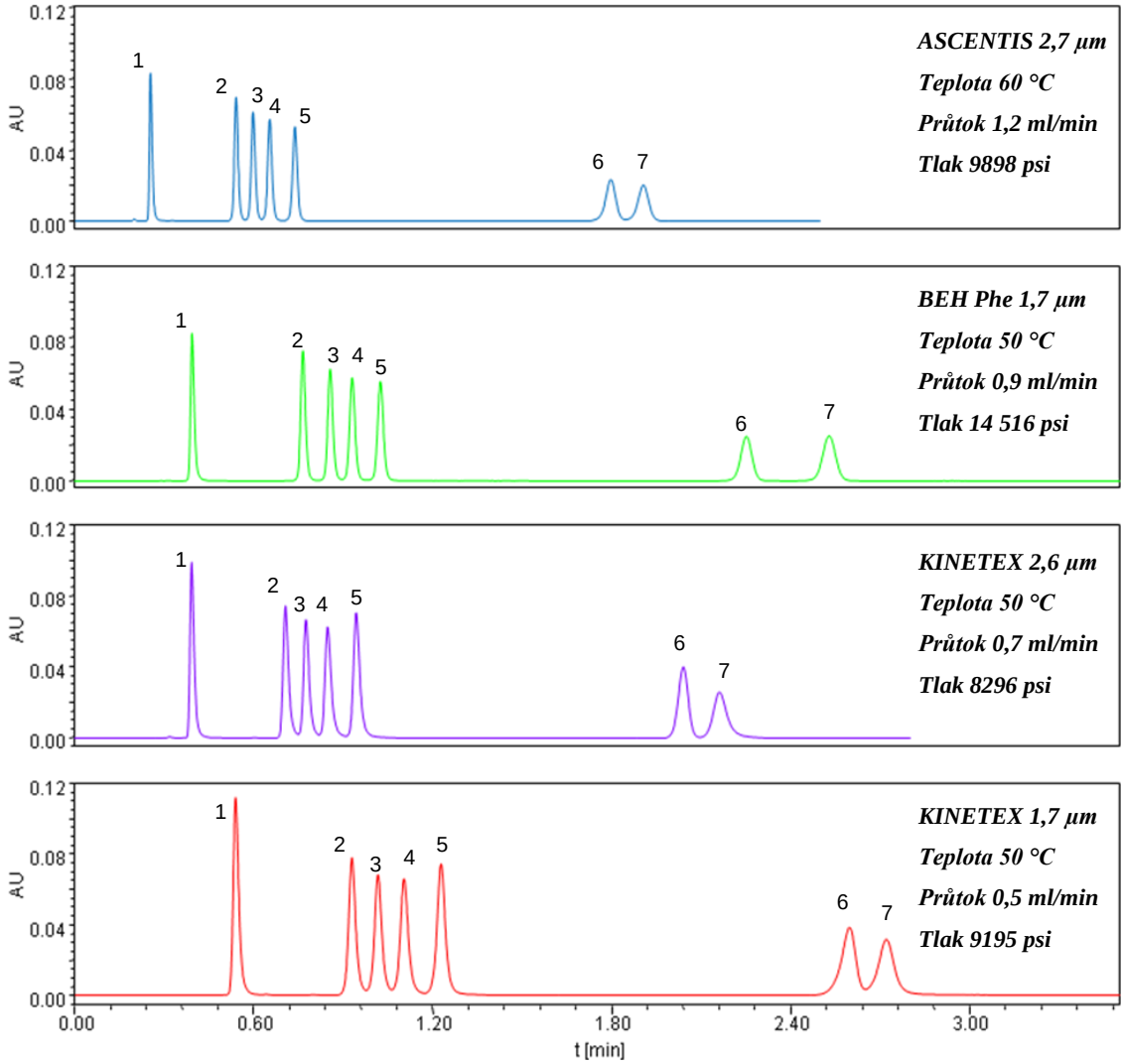
Teplota 60 °C



Obr. 25: Porovnání separace estrogenních steroidů při teplotě 60 °C a průtoku 0,7 ml/min (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

5.5.6 Nejrychlejší analýza při zachování optimální separace

Nejrychlejší analýzy při zachování optimální separace bylo dosaženo během dvou minut u kolony Ascentis Express při teplotě 60 °C a průtoku 1,2 ml/min. Kolony Kinetex PFP se v rychlosti separace lišily. Kolona Kinetex 2,6 µm v čase 2,3 minuty dosáhla po koloně Ascentis Express druhé nejrychlejší separace a to při teplotě 50 °C a průtoku 0,7 ml/min, který byl zároveň nejvyšším použitelným průtokem u této teploty. Následovala kolona ACQUITY BEH Phenyl, kdy nejrychlejší analýzy bylo dosaženo při 50 °C a průtoku 0,9 ml/min v čase 2,6 minuty. Nejpomalejší separace bylo dosaženo u kolony Kinetex 1,7 µm při 50 °C a průtoku 0,5 ml/min za 2,8 minuty (Obr. 26).



Obr. 26: Porovnání kolon z hlediska rychlosti separace (1. ESTR, 2. b-EST, 3. a-EST, 4. Et-EST, 5. ESN, 6. EST-me, 7. EST-ac).

6 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování vlastností nových fused-core analytických kolon naplněných povrchově porézními částicemi v UHPLC systému v porovnání s BEH UPLC analytickou kolonou naplněnou celkově porézními částicemi menšími než 2µm.

Porovnání kolon a vyhodnocení výsledků probíhalo za použití estrogenních steroidů za detekce pomocí PDA detektoru a při vlnové délce 280 nm. Ke stanovení byla použita isokratická eluce. Mobilní fáze se skládala z ultračisté vody a acetonitrilu v poměru 60:40.

Kolony byly hodnoceny na základě účinnosti (počtem teoretických pater a znázorněním van Deemterovy křivky), symetrie píků, rozlišení a hodnotami zpětného tlaku. Dále byl sledován vliv průtoku a teploty na separaci estrogenních steroidů.

Získané hodnoty a data byly zpracovány do tabulek a grafů a kolony byly vzájemně porovnány. Z hlediska účinnosti byla nejlépe vyhodnocena kolona ACQUITY BEH Phenyl, která dosáhla nejvyššího počtu teoretických pater. V průběhu měření však byla zaznamenána klesající účinnost této kolony. Výsledky naměřené po cca 300 nástřicích pro stejný průtok a teplotu se lišily až o 2000 teoretických pater. Nepatrně nižší účinnosti bylo dosaženo u kolony Ascentis Express a nejmenší účinností byly vyhodnoceny kolony Kinetex PFP 1,7 µm a 2,6 µm.

Nejnižšího nárůstu zpětného tlaku bylo dosaženo u kolony Ascentis Express, tedy kolony naplněné povrchově porézními částicemi. Stejné výsledky by se daly očekávat i u kolon Kinetex PFP, které jsou rovněž naplněny povrchově porézními částicemi, avšak u těchto kolon došlo k výraznému nárůstu zpětného tlaku, který byl vyšší než u kolony ACQUITY BEH Phenyl naplněné celkově porézními částicemi menšími než 2 µm. U kolon Kinetex PFP bylo tedy dosaženo daleko vyšších tlaků, než se původně očekávalo. Díky nízkým hodnotám zpětného tlaku mohlo být u kolony Ascentis Express použito daleko vyšších průtoků, které v porovnání s kolonou Kinetex PFP 2,6 µm dosahovaly až dvojnásobných hodnot.

Ideální hodnotě faktoru symetrie (1,0) se nejvíce blížily výsledky naměřené pro kolony Ascentis Express a ACQUITY BEH Phenyl. U kolony Kinetex PFP o velikosti částic 2,6 µm byly zjištěné hodnoty největší a některé převyšovaly stanovenou hodnotu 1,5, která by neměla být překročena.

Z hlediska rychlosti separace při stejných podmínkách měření bylo nejlepších výsledků dosaženo u kolon Kinetex PFP. Avšak při vyšších teplotách a průtoku

(př. 60 °C a průtok 0,7 ml/min) již docházelo ke smývání píků, zatímco u kolon Ascentis Express a ACQUITY BEH Phenyl bylo stále dosaženo rozdělení píků až na základní linii (viz. Obr. 25). Nejrychlejší analýza při zachování optimální separace byla dosažena u kolony Ascentis Express při 60 °C a průtoku 1,2 ml/min. Rychlejší separace kolon Kinetex PFP by mohla být způsobena menším pokrytím uhlíku na stacionární fázi (nižší hodnota carbon load), což vede k menšímu zadržování separovaných sloučenin a tudíž rychlejší separaci (viz. uvedené hodnoty v Tab. 3).

U kolony ACQUITY BEH Phenyl mohla být použitá teplota až o 30 °C vyšší (tedy 90 °C) než u ostatních kolon. K optimálnímu dělení však docházelo jen při teplotě 70 °C a průtoku menším než 0,5 ml/min, teploty 80 °C a 90 °C již tedy nebyly k separaci vhodné. Avšak u kolon naplněných povrchově porézními částicemi mohla být nejvyšší použitelná teplota pouze 60 °C.

V rámci této diplomové práce byly nejlépe vyhodnoceny kolony Ascentis Express a ACQUITY BEH Phenyl. U kolon Kinetex PFP 1,7 µm a 2,6 µm nebylo dosaženo optimálních výsledků, které byly od kolon očekávány.

7 Použitá literatura

[1] S. J. Hawkes, J. Chem. Educ. 60 (1983) 393.

[2] J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klingengerg, J. Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 272.

[3] J. C. Giddings, Anal. Chem. 37 (1965) 60.

[4] J. C. Giddings, J. Chromatogr. 5 (1961) 46.

[5] J. H. Knox, J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 352.

[6] http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm, únor 2011.

[7] F. Gritti, G. Guiochon, Anal. Chem. 78 (2006) 5329.

[8] Přednáška Kinetex™ Ultra-High Performance On any LC system, Phenomenex, 2010.

[9] W. Song, D. Pabbisetty, E. A. Groeber, R. C. Steenwyk, D. M. Fast, J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 491.

[10] http://www.wikiweise.de/wiki/Bild%3AVan-Deemter-Diagramm.png, únor 2011.

[11] M. L. Latorre-Moratalla, J. Bosch-Fusté, T. Lavizzari, S. Bover-Cid, M. T. Veciana-Nogués, M. C. Vidal-Carou, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7715.

[12] Lucie Nováková, Hana Vlčková, Analytica Chimica Acta 656 (2009) 8.

[13] D. T. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1836.

[14] D. T. T Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, J. Chromatogr. A 1128 (2006) 105.

[15] J. R. Mazzeo, U. D. Neue, M. Kele, R. S. Plumb, Anal. Chem. 77 (2005) 460A.

[16] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1069.

[17] T. Farkas, G. Zhong, G. Guichon, J. Chromatogr. A 849 (1999) 35.

[18] N. Wu, A. M. Clausen,J. Sep. Sci., 30 (2007) 1167.

[19] http://www.home.agilent.com/agilent/home.jspx, duben 2011.

[20] http://www.hplc.cz/UPLC/columns_uplc.html, leden 2011.

[21] K. Hartonen, M. L. Riekkola, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 1.

[22] Y. Xiang, Y. Liu, M. L. Lee, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 198.

[23] J. M. Cunliffe, T. D. Maloney, J. Sep. Sci. 30 (2007) 3104.

[24] J. J. Kirkland, Anal. Chem. 64 (1992) 1239.

[25] http://www.advanced-materials-tech.com/halo.html, leden 2011.

[26] Ascentis Express HPLC columns with fused-core technology, Sigma Aldrich, 2008.

[27] Agilent Poroshell 120 columns for HPLC and UHPLC, Agilent Technologies, 2010, USA.

[28] Kinetex brožura, Chromservis, Praha, 2009.

[29] F. Švec, Chem. Listy 103 (2009) 266.

[30] J. J. Salisbury, J. Chromatogr. Sci. 46 (2008) 883.

[31] A. Cavazzini, F. Gritti, K. Kaczmarski, N. Marchetti, G. Guichon, Anal. Chem. 79 (2007) 5972.

[32] J. J. Destefano, T. J. Langlois, J. J. Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 46 (2008) 254.

[33] G. Guiochon, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 6.

[34] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, J. Chromatogr.A 1157 (2007) 289.

[35] J. M. Cunliffe, T. D. Maloney, J. Sep. Sci. 30 (2007) 3104.

[36] S. Fekete, J. Fekete, K. Ganzler, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 64.

[37] Český lékopis 2009, Grada Publishing, a.s., Praha 2009.

[38] http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC02.pdf, únor 2011.

[39] G. Streck, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 635.

[40] Databáze SciFinder – duben 2011.

[41] J. Hartl, K. Palát, Farmaceutická chemie I., Karolinum 2007.