

Chromatografia w dwóch odsłonach (cz. II)

Co nowego w chromatografii?

Rajmund Michalski*

„Serce” każdego chromatografu jest kolumna analityczna, a w zasadzie jej wypełnienie, które decyduje o skuteczności i jakości rozdzielania. Mimo sukcesywnego wprowadzania nowych wypełnień do kolumn chromatograficznych takich, jak min.: polimery porowate, węgle, adsorbenty złożone (karbosile) oraz czyste i modyfikowane tlenki glinu, cyrkonu i tytanu – nadal podstawową grupę stanowią wypełnienia z chemicznie związanymi fazami na bazie adsorbentów krzemionkowych [8]. Obecnie sytuacja na rynku faz stacjonarnych do chromatografii jest taka, że dostępne są niemal wszystkie popularne modyfikacje krzemionki (w tym poza C18, również C8, Phenyl, HILIC, Silica, Amide, Fluoro-Phenyl, Phenyl-Hexyl), ale wybierać można także pomiędzy różnymi technologiami, co ułatwia dobór kolumny o odpowiedniej selektywności.

We wczesnych latach 70-tych XX wieku komercyjnie dostępne były kolumny chromatograficzne wypełnione nieporowatym żelem krzemionkowym o wymiarach około 40 μm . Ich sprawność była niska – przy długości 1 metra złoża liczba pól teoretycznych wynosiła zaledwie

około 1000. W późnych latach 70-tych na rynku pojawiały się kolumny z ziarnem o średnicy 10 μm , a w latach 80-tych znane już były popularne obecnie kolumny z żelem krzemionkowym ze sferycznym, porowatym ziarnem o średnicy 5 μm . Charakteryzuje się ono sprawnością wynoszącą około 12 000 pól teoretycznych przy długości kolumny 150 mm. W latach 90-tych XX wieku uważano, że dalsze zmniejszanie średnicy ziarna w fazach stacjonarnych nie ma uzasadnienia, ze względu na koszty ich produkcji oraz problemy związane z ich stosowaniem. Tak było do czasu aż pojawiła się ultraszybka wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *Ultra-Fast High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC). Zmiana tego poglądu nastąpiła w roku 2004, kiedy to na rynku pojawił się nowy model chromatografu cieczowego firmy Waters – Acquity UPLC wyposażony w kolumny analityczne z wypełnieniem o średnicy ziaren 1,7 μm . Warto dodać, że UPLC jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Waters, dlatego pozostałe firmy stosują różne synonimy m.in. RRLC (ang. *Rapid Resolution LC*), RSLC (ang. *Rapid*

Separation LC), czy FPLC (ang. *Fast Performance LC*) lub UFLC (ang. *Ultrafast LC*).

Prognozuje się, że już w bieżącym 2013 roku systemy UHPLC będą stanowiły 50% rynku, co wydaje się prawdopodobne, gdyż cena nowych systemów jest już niewiele wyższa, niż systemów standardowych. Zasadniczymi zaletami techniki UHPLC są: skrócenie czasu analizy oraz poprawa czułości oznaczania i rozdzielczości pików. Chromatograf do ultraszybkiej wysokosprawnej chromatografii cieczowej różni się w wielu elementach od klasycznego przyrządu do HPLC, począwszy od konstrukcji pomp, przez dozownik, a kończąc na detektorach, w których obniżono objętość cel pomiarowych. Zmiany te podporządkowane zostały dwóm zasadniczym celom: obniżeniu do maksimum objętości martwej oraz przystosowaniu do pracy pod kilkukrotnie wyższymi ciśnieniami niż w standardowym systemie HPLC. Skracając czas analizy zasadniczo zmniejsza się ich koszty – poprzez efektywniejsze wykorzystanie sprzętu oraz zmniejszenie zużycia odczynników. Dodatkowy wpływ na to ma skrócenie czasu stabilizacji układu, gdyż objętość martwa uległa

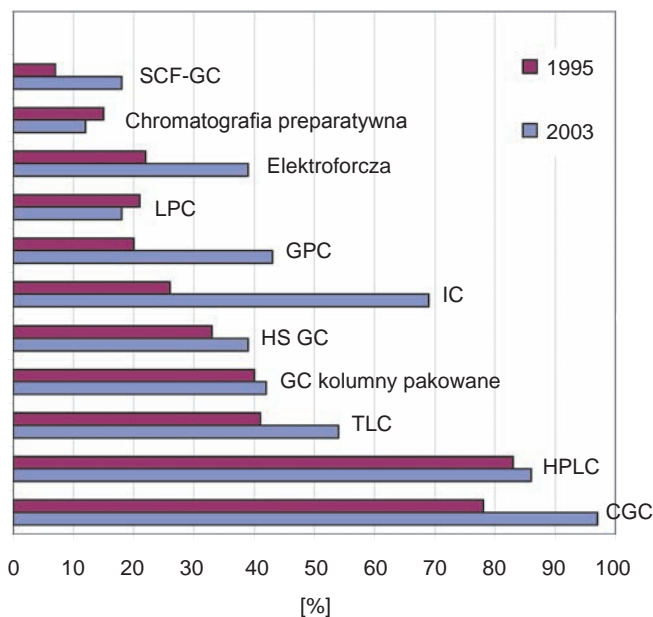
zmniejszeniu z około 1 ml do około 100 μl . Na podstawie publikacji z zakresu chromatografii cieczowej można zauważyć, że systemy UHPLC zaczynają powoli wypierać standardowe systemy HPLC. Dzisiaj powszechnie są one coraz częściej stosowane w przemyśle, w szczególności w branży farmaceutycznej. Warto zauważyć, że system UHPLC pozwala na znaczne skrócenie czasu nie tylko pojedynczej analizy, ale również czasu potrzebnego na stabilizację układu do kilku minut [9].

Na rynku pojawiły się także nowe generacje inteligentnych kolumn chromatograficznych (do chromatografii jonowej), które pozwalają na natychmiastową dostępność wszystkich danych o kolumnie oraz aktywne monitorowanie jej istotnych funkcji. Wprowadziła je na rynek pod nazwą iColumns szwajcarska firma Metrohm. Kolumny te po zamontowaniu do chromatografu z serii Professional IC są natychmiast rozpoznawane przez program softwarowy, dzięki czemu wiadomo jaka kolumna separacyjna jest aktualnie do dyspozycji oraz co należy zrobić, aby program wczytał specyficzne dla kolumny dane, takie jak: standardowe eluenty, typowy

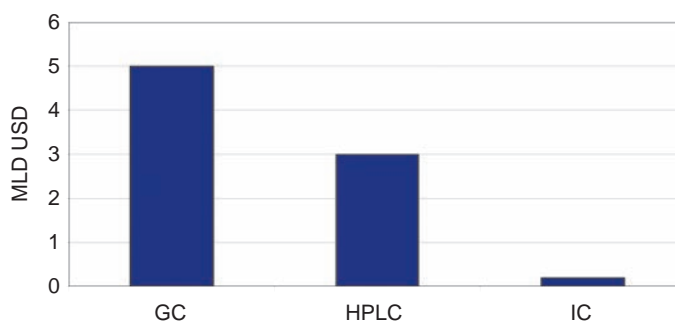


przepływ, maksymalne ciśnienie i maksymalny przepływ eluentu. Odpowiednie czynniki zamontowane na kolumnie pozwalają na przechowywanie danych o tym, przez ile godzin kolumna była używana i jak wiele analiz próbek na niej wykonano. Jeśli parametry kolumny spadną poniżej ustalonych wartości, program może przez e-mail powiadomić użytkownika o konieczności zamówienia nowej kolumny. Daje to pełną informację na temat kolumny oraz zapewnienia spełnienia wymagań GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej) i ułatwia to w sposób znaczący walidację systemu chromatograficznego.

Nowe rozwiązania i kierunki rozwoju metod separacyjnych opisali Buszewski i Krupczyńska w artykule zatytułowanym „Nowe rozwiązania i wyzwania w chromatografii i technikach pokrewnych u progu XXI. Quo Vadis Chromatographia?” [10]. Techniki chromatograficzne ze względu na swoje zalety znajdują ogromną popularność w większości laboratoriów i tak jak wszystkie inne ulegają ciągłemu doskonaleniu. Z roku na rok pojawiają się nowsze modele przyrządów, jak i poszerza się baza akcesoriów chromatograficznych. Na rysunku 1 przedstawiono wyniki ankiety dotyczącej popularności różnych metod i technik separacyjnych stosowanych w 118 wybranych laboratoriach europejskich. Dane te dotyczą wprawdzie porównania lat 1995 i 2003 i nie uwzględnia najnowszych trendów (np. UHPLC czy HILIC), tym niemniej oddaje pewne tendencje widoczne już 10 lat temu.



Rys. 1. Techniki separacyjne stosowane w wybranych laboratoriach europejskich w latach 1995 i 2003



Rys. 2. Wartość sprzedaży [mld USD] aparatury i akcesoriów do GC, HPLC i IC w roku 2011

Na rysunku 2 przedstawiono wartość sprzedaży chromatografów gazowych i cieczowych na świecie w roku 2011 [11].

Najważniejszym światowym wydarzeniem w zakresie prezentacji najnowszych osiągnięć aparatury kontrolno-pomiarowej i naukowo-badawczej jest coroczna konferencja Pittcon, która od 65 lat odbywa się w USA. Początkowo była ona znana jako Konferencja Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej i odbywała się w Pittsburgu. W tym roku po raz

pierwszy miała ona miejsce w Filadelfii w stanie Pensylwania w dniach 17-21 marca. Tegoroczna impreza gościła ponad 1000 producentów i dostawców przyrządów laboratoryjnych z ponad 30 krajów świata, którzy oferowali swoje produkty na niemalże 2000 stoiskach. Tak jak i w Europie, również w Stanach Zjednoczonych odczuwa się skutki światowej kryzysu w związku z czym liczba wystawców na tegorocznych targach Pittcon 2013 nieco zmalała, ale i tak było to ponad 12 000 zwiedzających z 90 krajów świata..

Ponad połowa wystawców przestawiła na tegorocznych targach swoją zupełnie nową ofertę produktów. W ramach wystawy czynne były m.in. specjalne stoiska tematyczne (Nowy Wystawca; Nauki o Życiu; Systemy informatyczne w laboratorium), a także pawilony narodowe (w tym roku niemiecki i japoński).

Program wystawienniczy, naukowy, jak i szkoleniowy był bardzo bogaty i nie sposób w tak krótkim artykule opisać wszystkiego. Na tegorocznym Pittconie swoje wystąpienia mieli min. laureat Nagrody Nobla - prof. Wallace H. Coulter (*Exometer Objects to Nanometer Ones and Back Again*) oraz prof. Michael Barnett (*How The Higgs Boson Saved Us From A Cold, Dark, Lifeless Universe*). Z kolei wykład zatytułowany *Applications of Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography* przedstawił prof. Dwight R Stoll z Gustavus Adolphus College, a naukowcy z Uniwersytetu na Florydzie przedstawili interesujący wykład na temat *Microfluidics for Detection of Circulating Tumor Cells*. Przedstawiciele Północnoamerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (U.S. EPA) omówili zagadnienia związane z *Advanced Mass Spectrometry for Food Safety and Cosmetics*, a wykład zatytułowany *New Ionization Approaches in Mass Spectrometry: Molecular Imaging* przedstawił naukowcy z State University w Arizonie. Zastosowania wysokorozdzielczej spektrometrii mas w analizie środowiskowej (*Environmental Applications of High Resolution Mass Spectrometry*) przedstawił naukowcy

z University of Colorado. Podali oni wiele przykładów zastosowania tej techniki w analizie pestycydów i farmaceutyków oraz produktów ich degradacji, a także w proteomice. Podczas forum chromatograficznego prof. Irving W. Wainer z National Institute on Ageing w stanie Maryland omówił zagadnienia związane z wykorzystaniem metod chromatograficznych w badaniach metabolizmu leków, a także w badaniach leków w próbkach biologicznych.

Jak co roku podczas targów Pittcon 2013 przyznano kilka prestiżowych nagród. Ich laureatem w kategorii młody naukowiec został Bo Zhang z University of Washington (za wybitne osiągnięcia w zakresie elektrochemii). Z kolei laureatem nagrody im. Roberta Boyle'a w zakresie chemii analitycznej został prof. Norman Dovichi z Notre Dame University w stanie Indiana (za pionierskie prace w zakresie kapilarnej elektroforezy). Nagrodę w zakresie nauk o rozdzielaniu otrzymał prof. Kevin A. Schug z University of Texas w Darlington w stanie Teksas.

Przeprowadzono także wiele szkoleń i warsztatów zarówno dla początkujących, jak i doświadczonych naukowców i użytkowników aparatury pomiarowej. Dotyczyły one takich zagadnień, jak min. postępów w chromatografii gazowej i cieczowej; zastosowaniom technik LC-MS; postępów w kapilarnej chromatografii gazowej oraz zastosowaniom chromatografii nadkrytycznej w przemyśle farmaceutycznym.

Tak, jak w poprzednich latach, istotną grupą towarów prezentowanych podczas targów Pittcon 2013 były przyrządy i akcesoria do chromatografii. Wśród nich dominowały kolumny i inne akcesoria polecane przez producentów przede wszystkim do rozdzielania zarówno prostych analityków, ja i złożonych biomolekuł. Były to min. kolumny do HPLC z odwróconą i normalną fazą; kolumny do chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) i chromatografii w stanie nadkrytyczny (SFC), a także cała gama produktów z zakresu chromatografii jonowej w różnych ich odmianach.

W tym roku największa oferta produktów dotyczyła układów GC-MS/MS oraz UHPLC. Są to techniki coraz bardziej dostępne, a biorąc pod uwagę możliwości jakie one stwarzają, wydaje się, że takie będą kierunki rozwoju chromatografii w najbliższych latach. W zakresie nowych wypełnień do kolumn stosowanych w HPLC pojawiły się nowe typy faz o średnicy 2 µm do UHPLC, a także kilka faz typu „core-shell” o średnicach 1,3 µm. Główni producenci układów do UHPLC wprowadzają na rynek przyrządy w których dopuszczają się prace pod ciśnieniem do 20 000 psi!!! W zakresie chromatografii gazowej pojawiło się kilka nowych faz stacjonarnych w tym do rozdzielania związków chiralnych, WWA, VOC. Przedstawiono także kilka nowych kolumn w których górne granice temperatury są znacznie wyższe niż w dotychczas stosowanych.

Pamiętać jednak należy, że nawet dysponując bardzo wyrafinowanymi metodami i technikami analitycznymi, kolumnami chromatograficznymi o wysokiej rozdzielczości – najbardziej

czasochłonnym etapem analizy, a jednocześnie etapem podczas którego popełniamy najczęściej błędów jest etap przygotowania próbki do analizy (pobieranie, utrwalanie, transport, przechowywanie i przygotowanie). Dlatego bardzo ważną częścią targów Pittcon 2013 były prezentacje przyrządów i akcesoriów do prawidłowego przygotowania próbek do analizy. W tym zakresie obowiązuje zasada QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe). Trudno wymienić całą prezentowaną ofertę, ale podkreślić należy dalszy wzrost oferty w zakresie techniki SPE, SPIM, czy metod filtracji. Pełną informację na temat oferty prezentowanej podczas tegorocznej wystawy Pittcon 2013 została przedstawiona w majowym numerze czasopisma LC GC Europe jak również jest dostępna na stronach:

<http://www.chromatography-online.com/lcgc/Articles/New-Chromatography-Columns-and-Accessories-at-Pitt/ArticleStandard/Article/detail/810298> oraz http://images2.advantstar.com/lcgeurope/Enews/2013/newsupdate_5172013.html

Zostań członkiem

Klubu

Polskich Laboratoriów Badawczych

www.pollab.pl





Podsumowanie

Jaka będzie przyszłość chromatografii? Tego oczywiście nikt nie wie, ale biorąc pod uwagę to co dzieje się w ostatnich latach w tym zakresie (min. na targach takich jak Pittcon, publikacje i liczne konferencje naukowe) można spodziewać się dalszego doskonalenia sprzętu, podnoszenia jego precyzji i niezawodności. Poza tym można stwierdzić, że najbliższe lata w świecie chromatografii to dalsze prace związane z:

- technologią nowych wypełnień do kolumn chromatograficznych,
- poszukiwaniem nowych typów specyficznych detektorów i układów identyfikujących,
- miniaturyzacja układów separacyjnych i detekcyjnych,

- dalsze obniżanie granic wykrywalności i oznaczalności,
- opracowaniem nowych metod przygotowania próbek i łączenie ich w układy on-line,
- opracowywanie nowych i prostych metod i procedur analitycznych, w tym metod standaryzowanych,
- przygotowanie nowych wzorców i materiałów odniesienia jak również bibliotek widm i danych retencyjnych,
- automatyzacją i robotyzacją procesu rozdzielania poprzez stosowanie układów wielowymiarowych i technik łączonych.

Literatura

- [1] Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P., *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, Cen-

trum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 2003.

- [2] Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*, WNT Warszawa, 2011.
- [3] Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, wyd. 4, WNT Warszawa 2005.
- [4] Michalski R., *Chromatografia jonowa. Podstawy i zastosowania*. SWSZ Katowice, 2011.
- [5] Buszewski B., *Techniki elektromigracyjne*, Malamut, Warszawa, 2012.
- [6] *Słownik Chromatografii i Elektroforezy* pod red. Z. Witkiewicza i J. Hetpera, PWN, Warszawa 2004.
- [7] Michalski R., Jabłoński-Czapla M., Szopa S., Łyko A., *Techniki łączone w analizie spe-*

cyjnej - problemy i wyzwania [w] *Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce*, nowe wyzwania i możliwości, UMCS, Lublin, 2013, str. 26-45.

[8] Z. Witkiewicz, J. Hetper, *Chromatografia gazowa*, WNT, Warszawa 2009, 255 stron.

[9] Jarosław Szufilar, *Transfer metod HPLC do UHPLC*, Laborant, 1, 2010, 8-14.

[10] www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/.../rozdzial_002.doc.

[11] Worldwide Ion Chromatography Demand, LCGC North America, August 1, 2012, Global Assessment Report, 131th Edition, Los Angeles, 2012.

* Prof. Rajmund Michalski, Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, Zabrze; e-mail: michalski@ipis.zabrze.pl



PROLAB Biuro Naukowo Techniczne

Józef Izydorczyk

44-100 Gliwice, ul. Sowińskiego 5

Tel./faks: 32 238 03 31

biuro@prolabgliwice.com.pl

prolab@poczta.one.pl

Szkolenia:

- ISO/IEC 17025 - System zarządzania i kompetencje techniczne laboratoriów
- Spójność pomiarowa i wzorcowanie wyposażenia
- Sterowanie jakością i materiały odniesienia
- Walidacja metod badań i wzorcowań
- Wyznaczanie niepewności pomiarów
- Warsztaty - walidacja i niepewność pomiarów
- Pobieranie próbek. Walidacja, niepewność i sterowanie jakością
- Nadzorowanie wyposażenia pomiarowego
- ISO/IEC 17025 - Warsztaty dla auditorów wewnętrznych
- Badania biegłości i porównania międzylaboratoryjne

www.prolabgliwice.com.pl