

# ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC)

## ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPC)

**Pokroky v moderních separačních metodách,  
2012**

**Eva Háková**

# CHARAKTERISTIKA UPLC

- Nová, velmi účinná separační technika v oblasti kapalinové chromatografie nabízí práci s širokým rozsahem průtoků a významně zkracuje dobu analýzy.
- Celý separační proces probíhá za **velmi vysokých tlaků** (15000 psi, 1000 bar, 100 MPa). Maximální průtoková rychlost je **5 ml/min**. Využívá chromatografické kolony s částicemi **< 2 $\mu$ m**.
- Oproti HPLC má řadu předností:
  - **kratší** doba analýzy
  - **snížení** nákladů
  - **zvýšení** separační účinnosti
  - **snížení** meze detekce **x** **zvýšení** citlivosti
  - **více** kvalitativních informací



**Knauer, PLATINblue UHPLC system**



**Waters, ACQUITY UPLC® System**

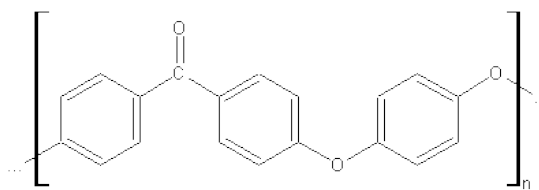


**UHPLC Agilent 1290 Infinity**

# MATERIÁLY POUŽÍVANÉ V UPLC

Moderní UPLC systémy vyžadují vysoce odolné šroubení, které vydrží vysoké tlaky a teploty (do 1500-2000 bar, 150°C).

- **Materiály:** ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel-PEEK, vysoce odolný PEEK.
- Speciálně navržený spojovací materiál, předkolony a jejich držáky, kapiláry – ocel, standardní PEEK do 500 bar, zapouzdřený v niklu 2500 bar.



Polyetheretherketon (PEEK)

Jednotky tlaku v HPLC/UPLC

**1 bar  $\approx$  1atm  $\approx$  101 kPa**

**1 bar = 14,5 psi (pound per square inch)**

# CHROMATOGRAFICKÉ PARAMETRY

## ○ Doba analýzy

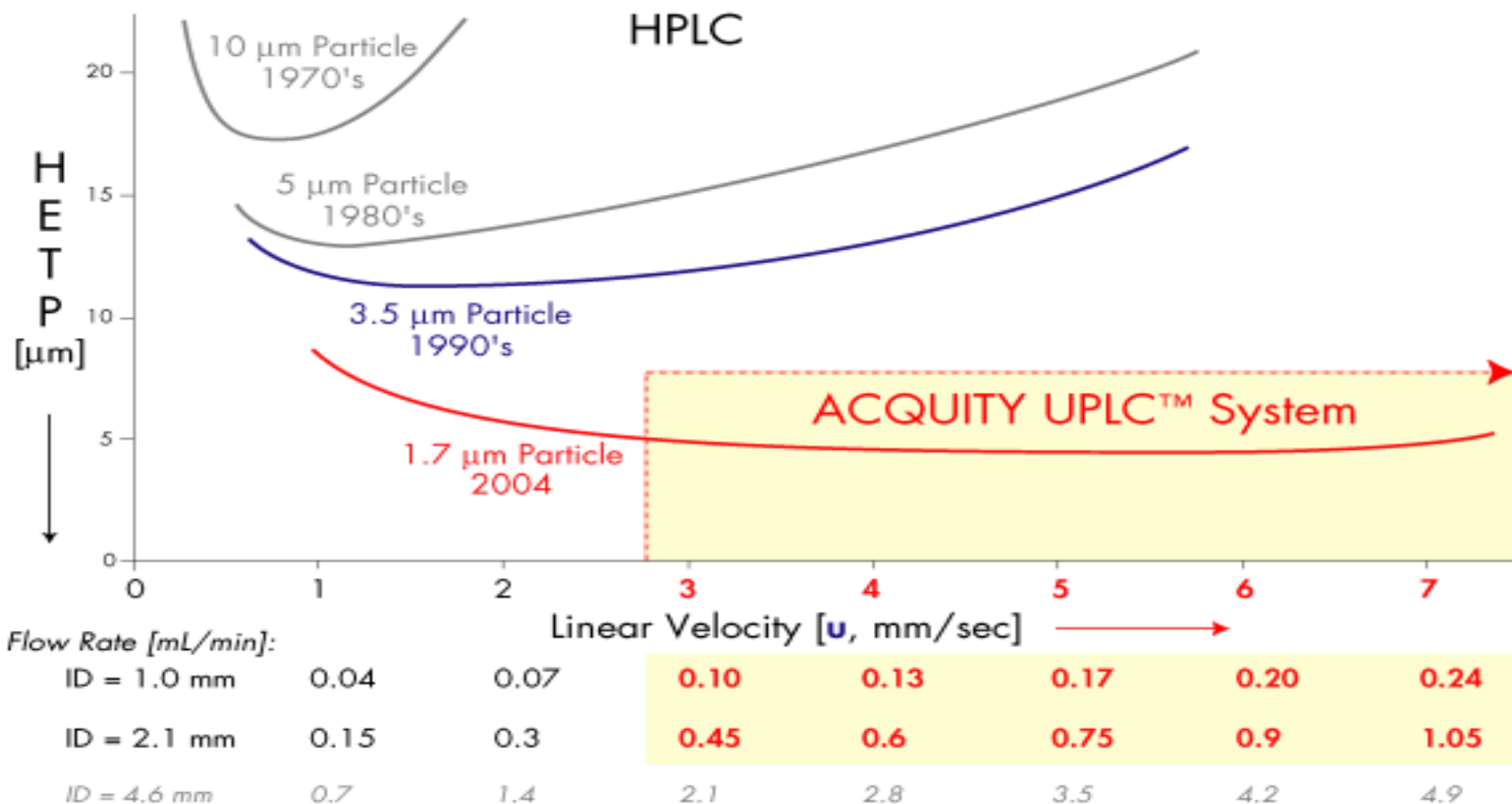
Doba analýzy je **přímo úměrná** délce kolony, vnitřnímu průměru kolony a **nepřímo úměrná** objemovému průtoku. Jinak řečeno doba analýzy se zkrátí **zkrácením kolony, zmenšením jejího vnitřního průměru a zvýšením objemového průtoku mobilní fáze.**

$$t_a = \frac{L\pi d_c^2 \varepsilon_T}{4F_m} (k_{max} + 1)$$

## ○ Účinnost separace

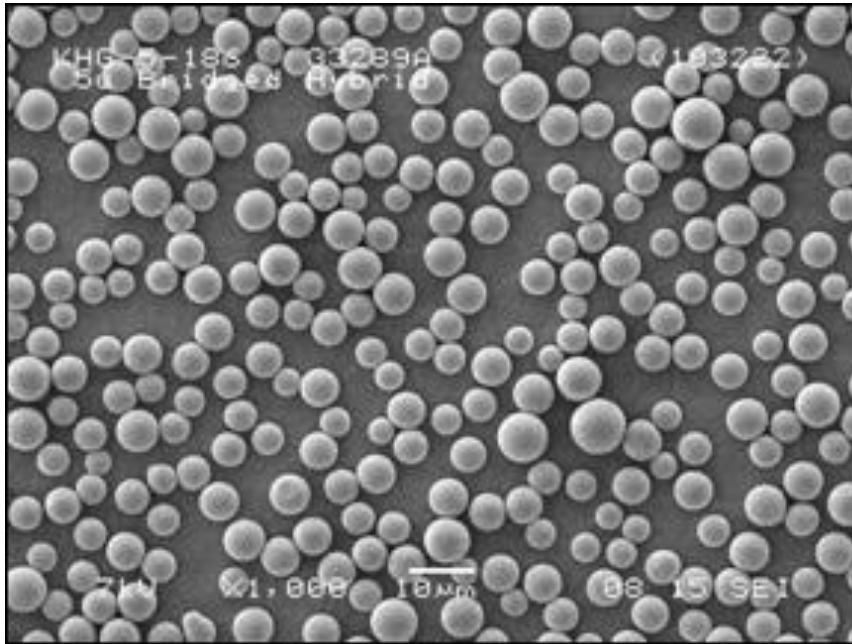
Výškový ekvivalent teoretického patra popisuje van Deemterova rovnice, z které plyne, že účinnost separace je nepřímo úměrná velikosti sorbentu.

$$n = \frac{L}{H} \quad H = A(d_p) + \frac{B}{u} + C(d_p)^2 u$$

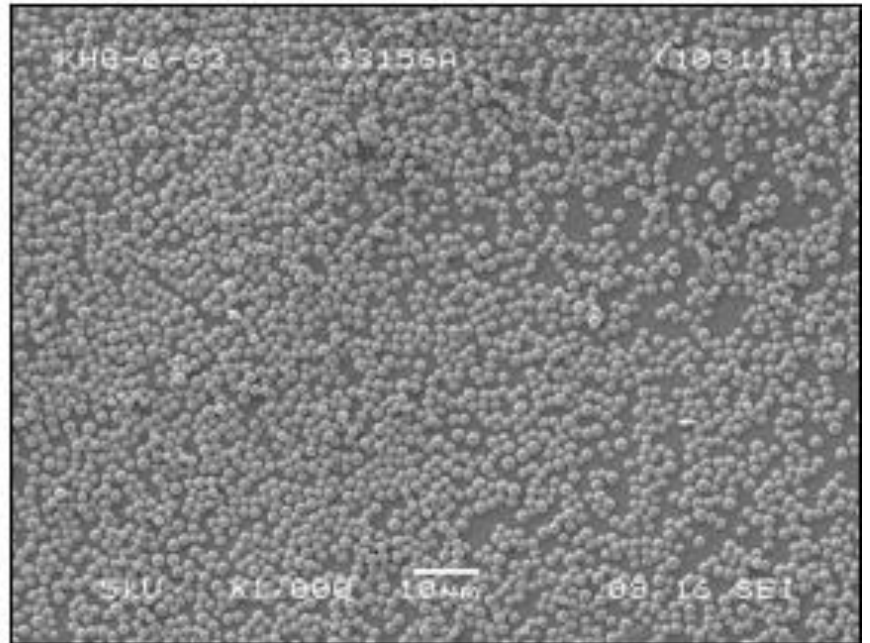


Vliv lineární rychlosti mobilní fáze na výškový ekvivalent teoretického patra v závislosti na velikosti sorbentu. V UPLC se pracuje při vyšších lineárních rychlostech než při klasické HPLC. To je umožněno zejména tím, že HETP křivky jsou plošší. **Optimální objemový průtok je nepřímo úměrný velikosti částic sorbentu.** Snížením velikosti sorbentu se proporcionálně zvyšuje optimální objemový (lineární) průtok mobilní fáze.

Velikost částic UPLC se pohybuje okolo 1,7  $\mu\text{m}$ , což je optimální velikost pro UPLC, další snižování velikosti částic vede pouze ke zvyšování zpětného tlaku a zvýšení účinnosti je již zanedbatelné.



**5  $\mu\text{m}$  Particles**

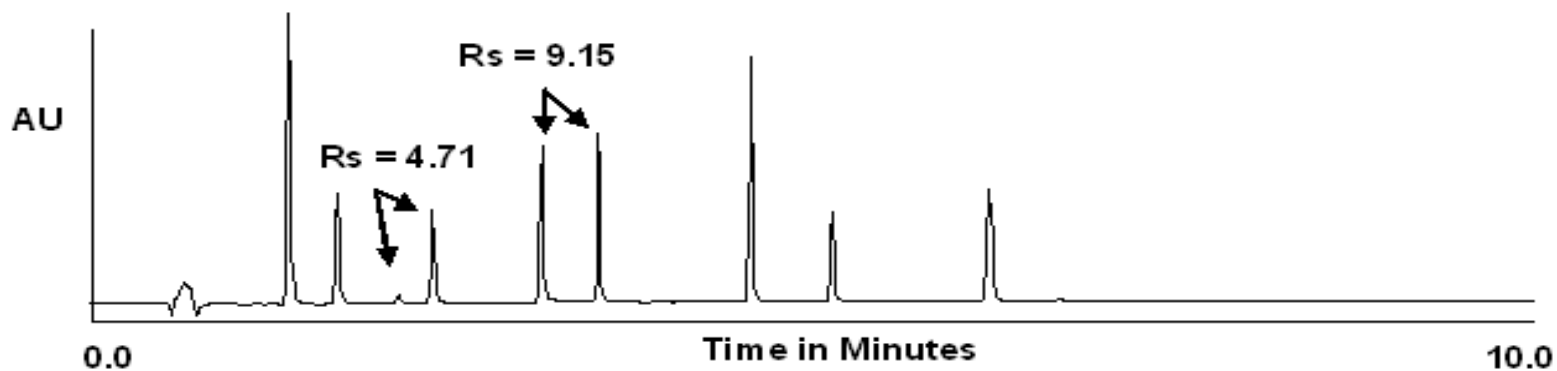
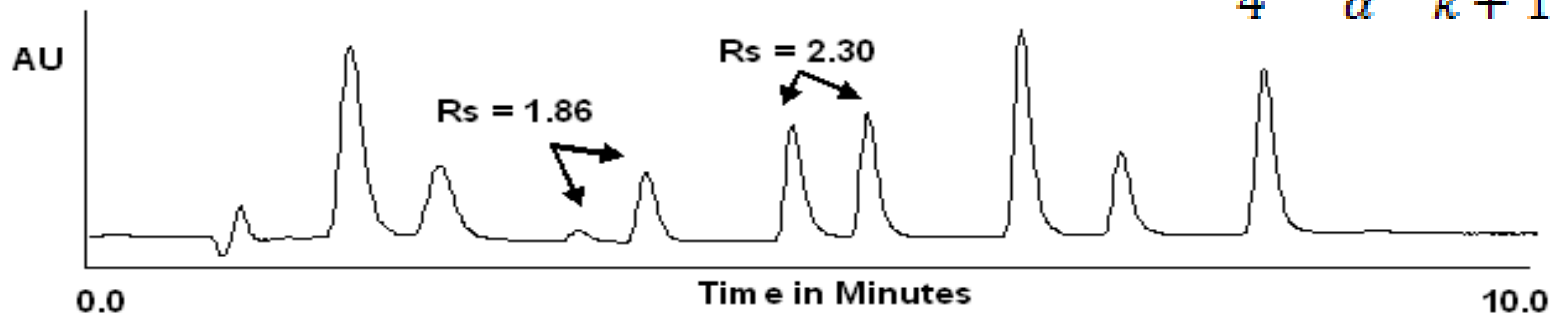


**1.7  $\mu\text{m}$  UPLC Particles**

## ○ Rozlišení

Největší vliv na rozlišení má selektivita (mobilní fáze, stacionární fáze, teplota). Pokud se tedy účinnost (délka kolony, velikost částic, průtok) systému zvýší **3krát**, rozlišení vzroste i rozlišení **1,7krát**.

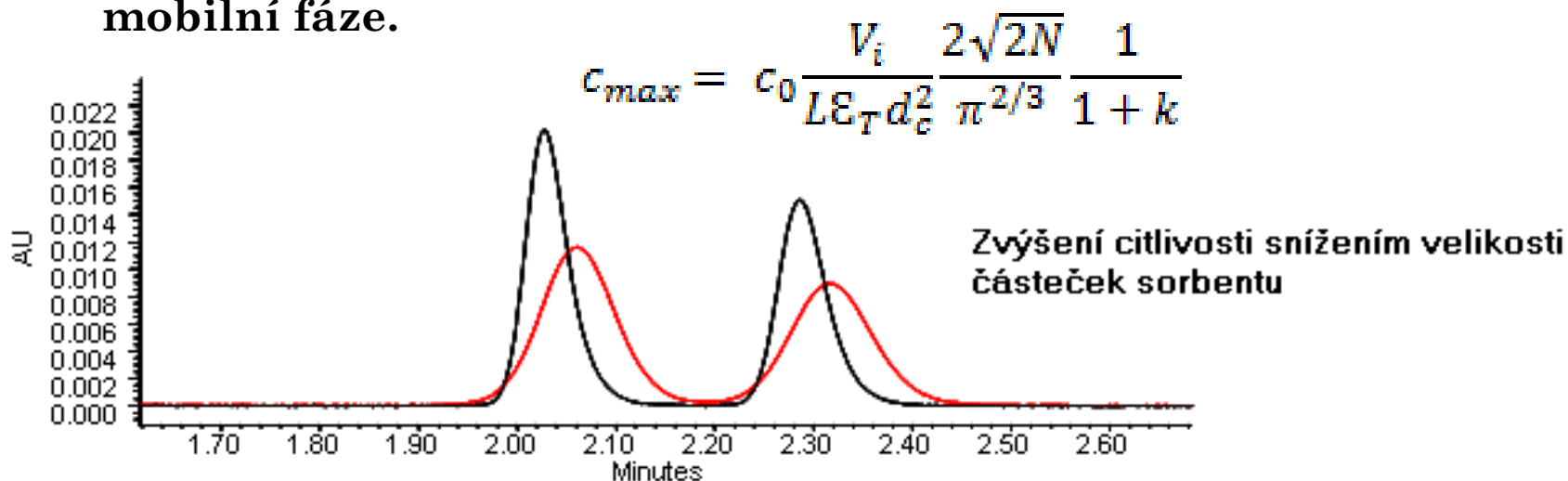
$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N} \alpha - 1}{4} \frac{k}{\alpha k + 1}$$



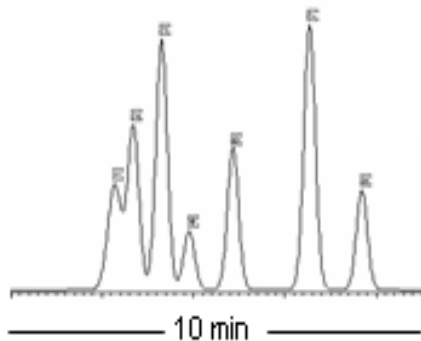


## ○ Citlivost

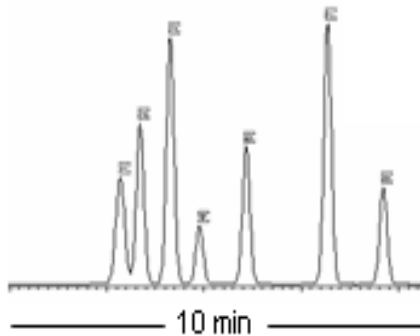
Změnou geometrie chromatografické kolony (délky a vnitřního průměru) a zmenšením částeček sorbentu dochází k výraznému zvýšení citlivosti. **Koncentrace solutu se zvyšuje s objemem nástřiku vzorku, zkracující se délkou kolony a snížením jejího vnitřního průměru a zvyšující se eluční silou mobilní fáze.**



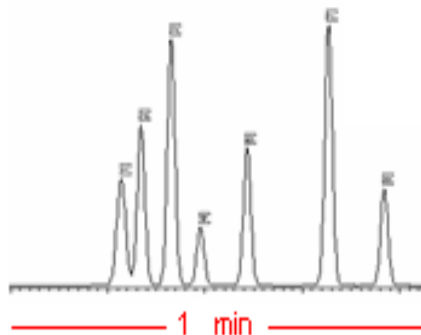
Za předpokladu, že se velikost vnitřního průměru kolony sníží z 3,9 mm na **2,1 mm** a velikost sorbentu se sníží asi 3krát, pak by citlivost měla vzrůst asi 10krát. Protože však dojde současně ke snížení objemu nástřiku a zkrácení délky kolony (snížení účinnosti), nárůst citlivosti je asi **2 - 3krát**.



10  $\mu\text{m}$  micro-porous  
1000-2500 psi  
**25,000 plates/meter**  
3.9 x 300mm



3.5 – 5  $\mu\text{m}$  spherical micro-porous  
1500-4000 psi  
**50,000 - 80,000 plates/meter**  
3.9 x 300mm



**1.7  $\mu\text{m}$  hybrid particle**  
**about 15,000 psi**  
**160,000 plates/meter**  
**2.1 x 100 mm**

## ○ Tlak v koloně

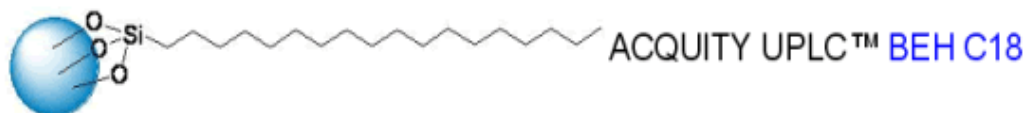
Zpětný tlak vyvolaný naplněnou UPLC kolonou je přímo úměrný délce této kolony a nepřímo úměrný velikosti sorbentu a vnitřnímu průměru kolony. V případě, že se velikost sorbentu zmenší 3krát, pak zpětný tlak na koloně vzroste 9krát.

$$\Delta p = 4000 \frac{F_m \eta L}{\pi d_c^2 d_p^2}$$

# KOLONY

- UPLC kolony jsou **5 až 10 cm** dlouhé a s průměrem nejčastěji **2,1 mm nebo 1 mm**. Jsou plněny za vysokého tlaku (20 000 psi tj. 1379bar), která zaručuje optimální uchování částic sorbentu v těle kolony a jejich stabilitu. Koncové spoje kolony jsou přizpůsobeny dosahovanému vysokému tlaku.
- Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem.

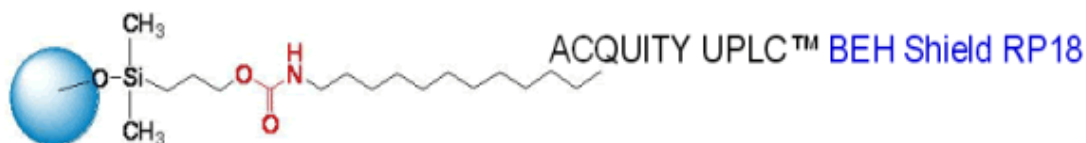
1. C18



2. C8



3. polární skupina  
(karbamát)



4. fenylová skupina



# SORBENTY

Používají se sorbenty anorganického (silikagel) nebo organického typu (polymer, uhlík).

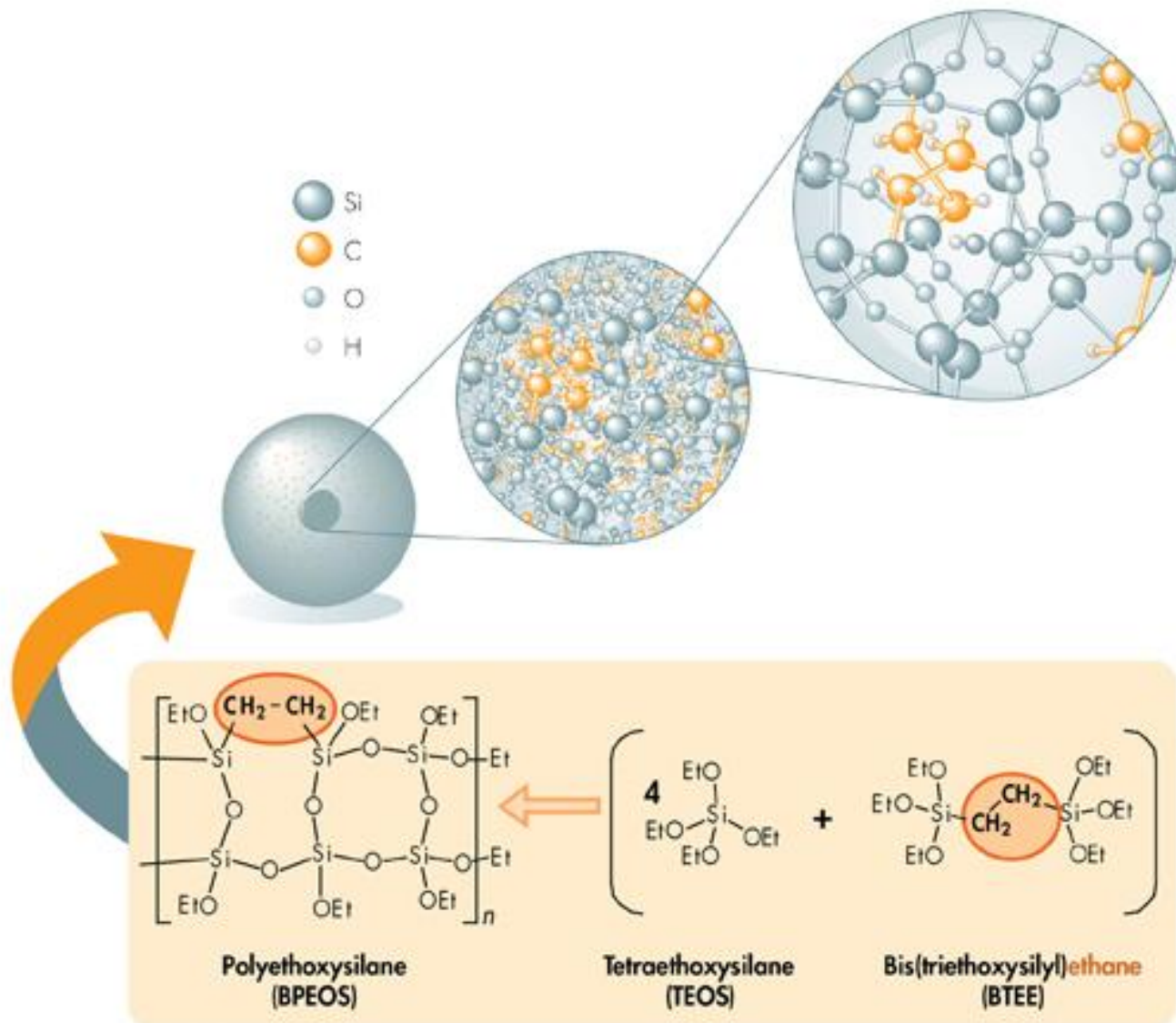
- Sorbenty založené na **silikagelu** jsou mechanicky poměrně odolné, sorbenty vykazují vysokou účinnost a na těchto sorbentech se dobře dají predikovat retence solutů. Jejich nevýhodou je limitovaný rozsah pH mobilní fáze, chemická nestabilita a chvostování bazických solutů.
- Sorbenty založené na **polymerní fázi** mohou pracovat v široké oblasti pH, jsou chemicky stabilní a nedochází na nich k iontovým interakcím. Jejich nevýhodou je jejich nižší mechanická odolnost, nižší účinnost a špatně předvídatelná retence solutů.

- **Hybrid Particle Technology (HPT)**

Spojení výhodných vlastností obou typů sorbentů se dosáhlo optimálních vlastností sorbentů. “Hybrid Particle Technology,, využívá tzv. *methylenových můstků*. Kombinací methylenových můstků se silikagelem se podařilo vyrobit materiál vynikající mechanické pevnosti, mimořádnou separační účinností a vynikající pH stability v širokém rozmezí pH.

- **Ethylene-Bridged Hybrids (BEH Technology)**

Druhá generace hybridních materiálů **Ethylene-Bridged Hybrids** ve struktuře využívá tzv. *ethylenové můstky*. Ve srovnání sves první generací, vykazují BEH výrazně lepší účinnost, mechanickou pevnost a pH rozsahem 1 - 12 pH. Dostupná velikost pórů je v současné době 130 Å, 200 Å a 300 Å.



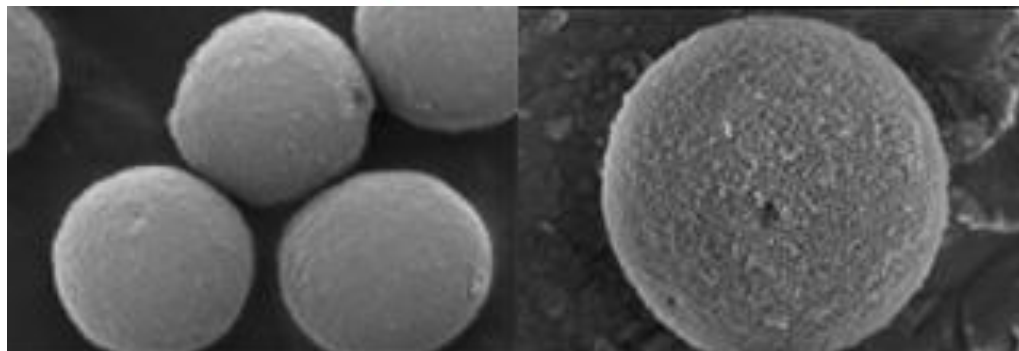
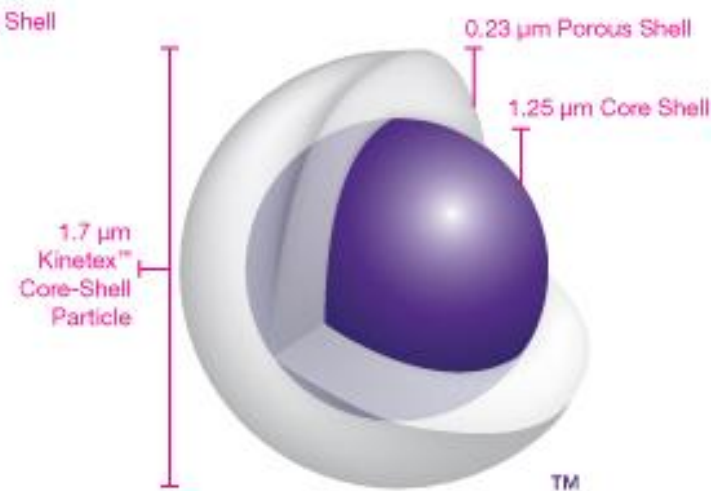
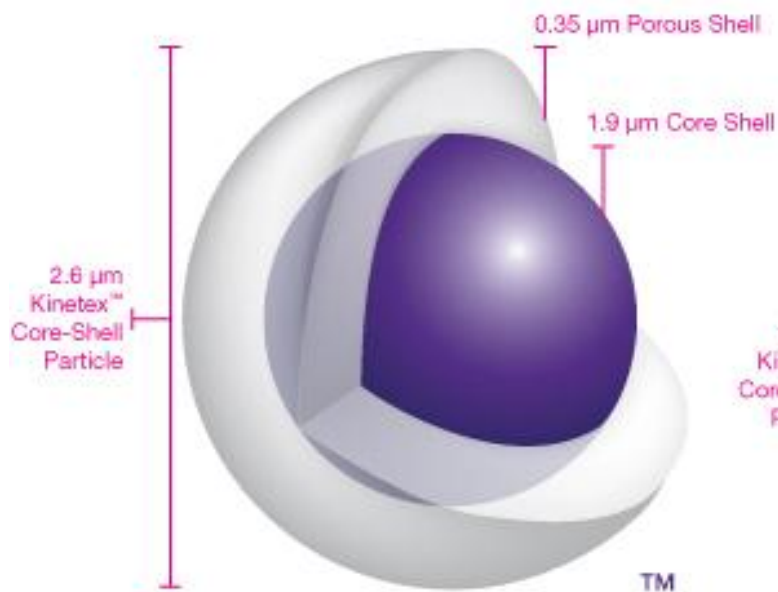
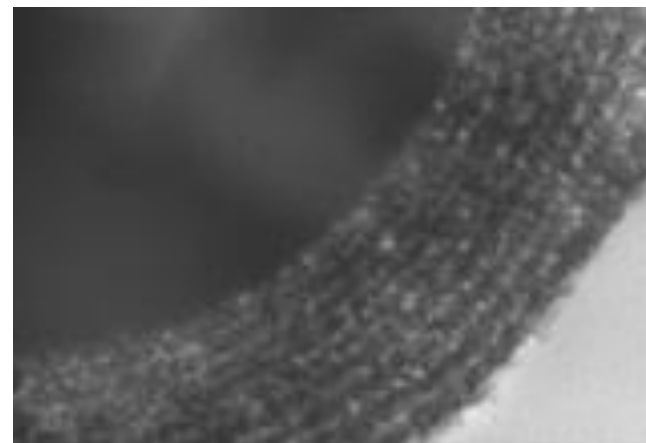
Anal. Chem. 2003, 75, 6781-6788

Umístění ethylenových můstků znázorněno v matrici silikagelového nosiče.

- **Technologie s pevným jádrem a porézním povrchem**

Částice s pevným jádrem není plně porézní. Pomocí techniky koloidních roztoků a technologie uspořádávání nano-částic dochází k tvorbě *homogenního porézního obalu* na pevném jádře silikagelu. Výsledkem tohoto dokonale optimalizovaného procesu v kombinaci s rovnoměrnou distribucí částic je kolona s extrémně vysokým počtem teoretických pater. Částice o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$  se vyznačují minimální difúzí a vyšší účinnosti ve srovnání s tradičními plně porézními částicemi o velikosti zrna pod 2  $\mu\text{m}$ . Zpětný tlak je obvykle pod 400 barů.

# Částice s pevným jádrem





# DETEKTORY

- **Spektrofotometrický detektor (UV/VIS)**

Měří absorbanci eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 700 nm.

- **UV/VIS detektor s diodovým polem (PDA, DAD)**

Zaznamená celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Měří v oblasti vlnových délek od 190 do 500 nm.

- **Odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD)**

Zaznamená rozptyl světla na částicích analytu, které vznikají po zmlžení eluentu a následném odpaření rozpouštědla.

- **Fluorescenční detektor (FLR)**

Měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Dojde k přechodu molekul do vyšších vibračních hladin a absorbovanou energii analyt vyzáří jako fluorescenci.

- **Hmotnostní detektor (MS)**

Deteguje ionty, které vznikají ionizací analytů.

# REAGENCIE POUŽÍVANÉ V UPLC

- Rozpouštědla, pufry a modifikátory mají maximální čistotu, jakou tato instrumentace vyžaduje:
  - velmi nízký posun UV signálu při gradientní eluci
  - minimální obsah nečistot
  - nejnižší pozadí (obsah iontů) v MS detektorech
  - méně než 100 ppb alkalických kovů
- Rozpouštědla jsou *filtrována* přes mikrofiltr **0,1 μm**, mají odparek max. 1 ppm a jsou balena v inertní atmosféře, čímž je zajištěna jejich delší stabilita při skladování.

# APLIKACE

UPLC systém nabízí jedinečné řešení pro všechna průmyslová odvětví:

- ADME screening
- farmaceutický průmysl
- bezpečnost potravin
- bioanalýza
- klinické aplikace
- identifikace metabolitů
- vývoj metody
- rutinní screening

# PŘENOS METOD DO UPLC

Přenos metod z klasické HPLC do UPLC vyžaduje nejprve optimalizaci selektivity a účinnosti kolony pro požadovanou aplikaci. Jakmile je tato část vývoje metody hotová, je možno přistoupit k přenosu metody do UPLC.

- Volba délky kolony
- Optimalizace nástřikového objemu
- Nastavení průtoku
- Nastavení časového programu

- **Volba délky kolony**

Při zachování délky kolony a snižování velikosti částic se zvýší počet teoretických pater dané kolony. Proto je možné kolonu *zkrátit* aniž by se ztratilo rozlišení.

- **Optimalizace nástřikového objemu**

Snižováním vnitřního průměru a délky kolony se *sníží její celkový objem a kapacita vzorku*. Díky snížení celkového objemu kolony je velice důležité, aby byla zajištěna kompatibilita rozpouštědla vzorku se složením mobilní fáze. V opačném případě dojde k nereprodukovatelnosti retenčních časů, účinnosti a dokonce může dojít ke změně selektivity.

- **Nastavení průtoku**

Průtok je nutné nastavit tak, aby byla u menší kolony zajištěna vhodná lineární rychlost. Aby byla zachována stejná lineární rychlost, která je důležitá pro zachování účinnosti, musí být *průtok mobilní fáze snížen se zmenšením průměru kolony*.

- **Nastavení časového programu**

Při přenosu metody z konvenční HPLC do UPLC se musí upravit *počátek gradientu* tak, aby docházelo k interakcím fáze ve stejnou dobu.

# MATERIÁL

- [1 ] Agilent Technologies [online]. Dostupné z: <http://www.home.agilent.com/>
- [2 ] *HPLC.cz* [online]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [3 ] *Chromservis* [online]. Dostupné z: <http://chromservis.cz/?lang=CZ>
- [4 ] *Knauer* [online]. Dostupné z: <http://www.knauer.net/>
- [5 ] Novel Achievement of HPLC: UPLC. *International Journal of PharmTech Research*. 2011, Vol.3, No.3, pp1423-1429.
- [6 ] *Waters: The science of what's possible* [online]. Dostupné z: <http://www.waters.com/waters/home.htm>
- [7 ] WATERS. *A Review of Waters Hybrid Particle Technology*. 2004.
- [8 ] WATERS. *ACQUITY UPLC system: Operator's Guide*. 2004 - 2010.
- [9 ] Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 68 (2006) 908–918

DĚKUJI ZA POZORNOST