

POKROKY V CHROMATOGRAFII A JEJICH VYUŽITÍ PŘI ANALÝZE VOD

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická,
VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, e-mail: caslavsky@fch.vutbr.cz

Chromatografie tohoto roku oslavila již 107. narozeniny. Těžko hodnotit, zda je to hodně nebo málo, ale nesporné je, že chromatografické separační metody přinesly velmi výrazný pokrok a rozšířily možnosti analytické chemie způsobem tehdy těžko předvídatelným, přičemž je evidentní, že možnosti této techniky ještě zdaleka nebyly vyčerpány.

Začátky této techniky byly velmi skromné. 21. března 1903 pronesl ruský botanik Michail Semjonovič Cvět ve Varšavě na schůzi botanické pobočky přírodovědné společnosti přednášku, ve které prezentoval své výsledky při studiu respiračních pigmentů rostlin, které úspěšně separoval na sloupci vytvořeném valchářskou hlinkou (jemně rozemletý vápenec) nasýpanou do svisle umístěné trubice. Po nanesení extraktu listových barviv na horní část sloupce separoval jednotlivé složky elucí petroleum benzinem (směs alkanů s 5 až 7 atomy uhlíku). Tato přednáška nevyvolala nějaký mimořádný zájem, stejně tak jako publikace na toto téma, která vyšla o dva roky později [1], avšak v ruštině, a pouze v lokálním časopise. V obecnější známost vešly jeho výsledky až po publikaci překladu uvedeného článku v rozšířeném časopise německé botanické společnosti o rok později [2]. Nicméně v následujících dvou desetiletích byla chromatografie objektem zájmu pouze několika jedinců, a je třeba dodat, že i pro Cvěta samotného byly hlavním objektem studia listová barviva, nikoliv chromatografie; ta chromatografie byla pouze prostředkem, nikoliv cílem. Navzdory tomu všemu je Cvětova přednáška považována za počátek chromatografické éry v analytické chemii, neboť – na rozdíl od jeho předchůdců – Cvět správně popsal princip a podstatu chromatografického separačního procesu.

Zhruba ve 30. letech minulého století se situace začala měnit. Kromě Cvětovy techniky, označované dnes jako sloupcová chromatografie, se objevila papírová chromatografie, využívající filtračního papíru, a chromatografie tenkovrstvá, realizovaná na tenké vrstvě adsorbentu nacházejícího se na pevné podložce. Chromatografie se postupně stala všeobecně akceptovanou a stále častěji využívanou analytickou technikou, která výrazným způsobem zjednodušila řešení celé řady problémů, zejména těch souvisejících s analýzou směsí látek. Všechny chromatografické techniky té doby využívaly kapalnou mobilní fázi. Revolučním krokem bylo využití inertního plynu jako mobilní fáze; rozdělovací plynová chromatografie byla poprvé popsána roku 1952 [3], adsorpční plynová chromatografie byla objevena zhruba ve stejné době, a to Jaroslavem Janákem v Brně při studiu složení plynů provázejících ložiska jihomoravské ropy [4].

Následující léta lze označit jako zlatý věk plynové chromatografie. Tato technika postupně našla velmi široké uplatnění při analýze látek vykazujících alespoň nepatrnou snahu přejít do plynného skupenství při zvýšené teplotě a nepodléhajících při tom degradaci. Významným příspěvkem ke zvýšení separační efektivity byl objev

kapilárních kolon, tvořených tenkými trubicemi o vnitřním průměru nejčastěji 200 – 530 μm a délce většinou 10 – 50 m, se stacionární fází deponovanou na jejich vnitřní stěny, jejichž účinnost významně převyšovala kolony náplňové, převzaté z chromatografie kapalinové [5]. Vývoj kapilárních kolon byl dovršen využitím slinutého křemene vysoké čistoty jako materiálu pro přípravu vysoce inertních kapilár, jejich pokrytím vrstvičkou polyimidu, což jim zajistilo pružnost [6], a vytvořením chemické vazby mezi zpolymerovanou stacionární fází a vnitřní stěnou kolony. Kolony tohoto typu jsou všeobecně využívány v posledních dvou desetiletích, přičemž lze pozorovat trend k využívání kolon o stále menším průměru (až 100 μm), což na jedné straně vede k dalšímu zvýšení účinnosti separace, případně rychlosti analýzy, ovšem na druhou stranu se zvyšují nároky na instrumentaci a na optimalizaci plynové chromatografické separace.

Kapalinová chromatografie zahájila další etapu svého vývoje na přelomu 60. a 70. let minulého století, kdy byla do praxe uvedena možnost zvýšení separační účinnosti kapalinově chromatografických kolon snížením průměru částic náplně, zúžením jejich velikostní distribuce a zlepšením jejich tvaru. K dosažení potřebných průtoků pak bylo nutno používat vysokých vstupních tlaků, proto se zkratka HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) používaná k označení této metodiky kromě originálního významu (vysokoučinná kapalinová chromatografie) někdy interpretovala i jako „vysokotlaká kapalinová chromatografie“ (High-Pressure Liquid Chromatography). Vývoj kvality náplní byl provázen i vývojem příslušné instrumentace, umožňující plně využít kvality vysoce účinných kolon, a současně i zvyšujícím se stupněm poznání teoretických aspektů chromatografické separace. Krom zmenšování částic náplně lze pozorovat i trend ke snižování rozměrů celých kolon; od původních typických kolon s vnitřním průměrem 4,6 mm a délce 25 cm s průměrem částic náplně 10 μm jsou dnes typické rozměry 2 mm x 15 cm, přičemž průměr částic je 3 μm i méně. Postupné snižování průměru částic vedlo ke zvyšování vstupního tlaku na koloně, a tedy i ke zvyšování nároků na čerpadla mobilní fáze. Při snížení průměru částic pod 2 μm už standardní tlakový limit 40 MPa nedostačoval; proto byla na trh uvedena nová generace kapalinově chromatografické instrumentace, označovaná jako UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) [7-8] nebo UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography), umožňující pracovat při tlacích do 100 MPa, případně do 120 MPa [9].

Významnou roli při praktickém využívání chromatografie zaujímají tandemové techniky. Ty lze rozdělit zhruba do dvou skupin. Do první patří systémy založené na kombinaci dvou separačních mechanismů s cílem zvýšení separační účinnosti celého systému, do druhé pak tandemy koncipované pro využití spektrometrických technik jako detekční metody v chromatografii. Toto spojení bylo motivováno snahou zvýšit spolehlivost identifikace separovaných složek, která je při využití klasických chromatografických detektorů založena na porovnání retenčního chování standardní látky a složky neznámého vzorku. Mezi systémy tohoto typu dominují tandemy GC/MS, které mají více než padesátiletou tradici - první GC/MS systém byl sestaven roku 1956 [10] a zhruba od roku 1967 byly tyto přístroje komerčně dostupné. Všeobecný přechod k využívání kapilárních kolon v plynové chromatografii pak výrazně zvýšil využívání těchto systémů, neboť díky malému průtoku nosného plynu bylo možno spojit plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem přímo (kapilární kolona byly zavedena do iontového zdroje hmotnostního spektrometru). Separované složky opouštějící kolonu v plynném stavu umožňovaly efektivní využívání elektronové ionizace (EI), díky které bylo možno naměřená spektra porovnávat s knihovními a tak bylo možno identifikovat sloučeninu bez nutnosti disponovat příslušným standardem. Další výhodou je

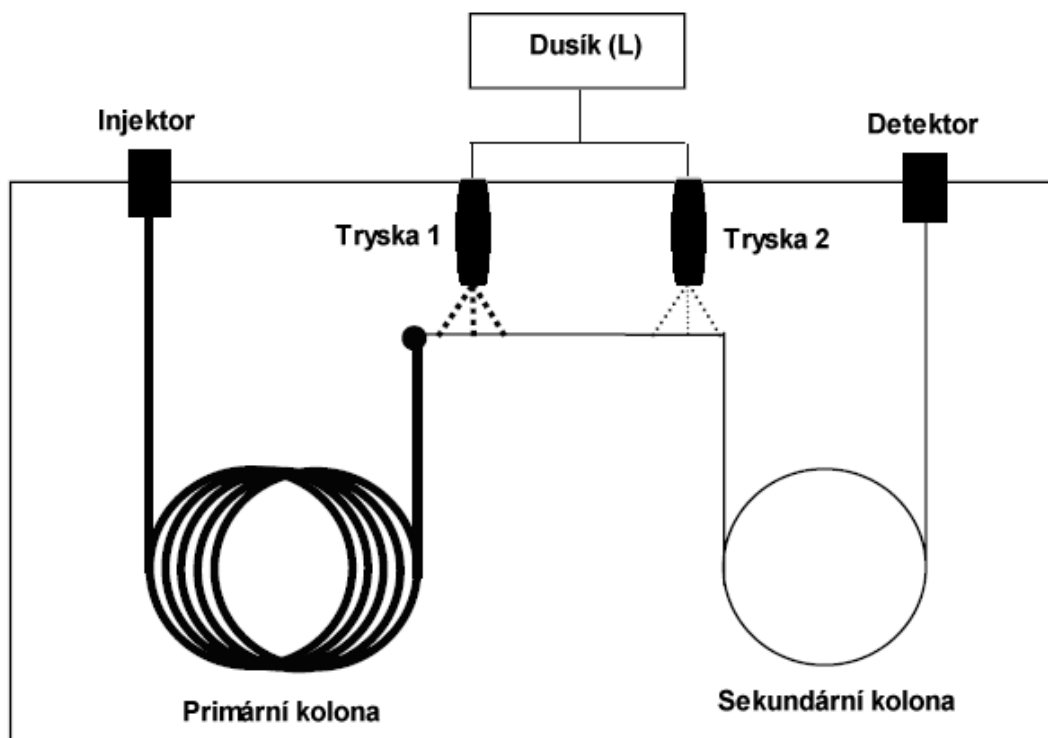
skutečnost, že množství individuálních sloučenin separovaných kapilárními kolonami jsou dostačující pro sejmnutí kompletního hmotnostního spektra. Systémy GC/MS dodnes představují velmi oblíbený prostředek pro finální analýzu těkavých a polotěkavých sloučenin, přičemž je možno využívat hmotnostní spektrometr jako univerzální detektor schopný identifikace separovaných složek na stopové úrovni, nebo jako vysoce selektivní zařízení pro detekci pouze vybraného cílového analytu na úrovni ultrastopové.

Při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla situace daleko komplikovanější. Jednak se pomocí kapalinové chromatografie separují látky netěkavé nebo termolabilní, jednak separované sloučeniny opouštějí chromatografickou kolonu v kapalně mobilní fázi. Oba tyto faktory jsou pro hmotnostní spektrometrii velmi nepříznivé. Uspokojivým řešením bylo až využití technik ionizace za atmosférického tlaku, zejména elektrospreje (ESI), což je technika převodu iontů z kapalně do plynné fáze působením elektrostatických sil [11]. Přitom však zpravidla nedochází k fragmentaci (nebo jen ve velmi omezené míře), takže z hmotnostního spektra lze získat pouze informaci o molekulové hmotnosti separované sloučeniny; strukturní informaci je nutno získávat jinými postupy (nejčastěji pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie).

Rovněž kombinace dvou separačních mechanismů má poměrně značnou tradici. Do této skupiny lze zařadit například dvourozměrné vyvíjení chromatogramu v papírové chromatografii, poprvé použité již roku 1944 k separaci aminokyselin [12]. Hlavním přínosem této koncepce je významné zvýšení separační účinnosti tohoto systému, zejména v případě významné odlišnosti mechanismů separace v obou subsystémech. V tom případě je separační číslo celého systému (což je zjednodušeně řečeno počet píků, které je systém schopen separovat) rovno součinu separačních čísel obou subsystémů. Tato skutečnost činila tyto tandemy velmi přitažlivými, nicméně problémy s efektivním spojením dvou systémů založených na odlišných mechanismech a zejména zachování separace dosažené v prvním stupni při přenosu do stupně druhého představovaly poměrně vážnou překážku. Některé systémy se příliš neuplatnily, například on-line spojení kapalinové a plynové chromatografie, při kterém byly vybrané píky nebo frakce z kapalinové chromatografie převedeny na plynově chromatografickou kolonu, přičemž bylo nutno odpařit mobilní fázi a vyřešit problémy způsobené značným objemem par takto vzniklých [13].

Velice uspokojujivé výsledky v současnosti poskytuje tandemové spojení dvou plynově chromatografických stupňů za sebou, označované jako GCxGC neboli ortogonální kompletní tandemová plynová chromatografie. V těchto systémech jsou využívány dvě kapilární kolony, spojené modulátorem (obr.1). V nejčastější konfiguraci je první kolona standardních rozměrů s nepolární stacionární fází (např. 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), zatímco druhá kolona je krátká a úzká (např. 1,5 m x 0,1 mm x 0,1 μm). Jak obě kolony, tak modulátor jsou umístěny v samostatných teplotně programovaných termostatech. Sekundární kolona se zpravidla udržuje 15 stupňů nad teplotou primární kolony, modulátor ještě o 5 až 10 stupňů výše. Zatímco na první koloně probíhá plynově chromatografická separace za podmínek v podstatě standardních, nejčastěji s programováním teploty a s optimálním průtokem nosného plynu, na koloně druhé probíhá rychlá chromatografie s průtokem nosného plynu značně nad optimem a v podmínkách v podstatě izotermálních. Modulátor pak zajišťuje převedení analytů separovaných v první dimenzi do dimenze druhé při zachování dosažené separace. Separátorů bylo popsáno povícero, nejčastěji se ale využívá kryogenní modulátor založený na dvou tryskách, které se zvolenou frekvencí zachycují analyty z první kolony

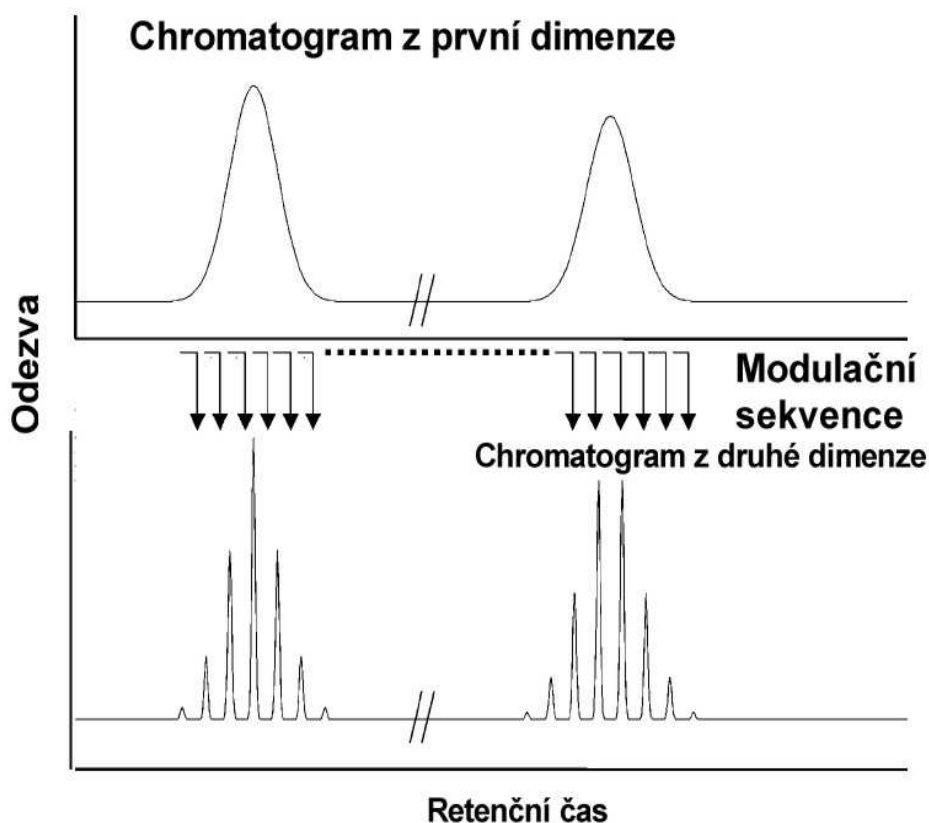
a v úzkých zónách je dávkuje do druhé dimenze. Typický interval modulace se pohybuje v sekundách (nejčastěji 2 – 5 s), a během této doby musí proběhnout kompletní separace v druhé dimenzi. Protože píky eluující ze sekundární kolony jsou velmi ostré (šířka píku je typicky v desetínách sekundy), lze k detekci použít pouze detektorů s rychlou odezvou a minimálním vnitřním objemem; těmto požadavkům vyhovuje plamenový ionizační detektor (FID) a detektor elektronového záchytu (ECD). Při využití hmotnostně spektrometrické detekce pak vyhovují pouze vysokorychlostní analyzátoři doby letu (TOF) [14].



Obr. 1. Schéma systému GCxGC

Výstup z detektoru představuje sekvenci chromatogramů jednotlivých modulací a jako takový je pro uživatele naprosto nerosrozumitelný (obr. 2). Program pro zpracování dat proto tento kontinuální chromatograf převádí do trojrozměrné reprezentace, kde na ose x je vynesena retenční čas v první dimenzi, na ose y retenční čas v druhé dimenzi a na ose z výška píku. Pokud je k detekci použito hmotnostní spektrometrie, představuje pak hmotnostní spektrum čtvrtou dimenzi experimentálních dat.

Systémy GCxGC-TOF MS se vyznačují mimořádnou separační účinností. Vzhledem k tomu, že při modulaci dochází rovněž i ke kryofokusaci analytů eluovaných z první dimenze, dochází k naostření píků a tím se zlepšuje poměr signál/šum, což vede ke zhruba třicetinasobnému zlepšení mezí detekce [14]. Analyzátoři doby letu se dále vyznačují možností dekonvoluce spekter nedokonale rozlišených píků, což dále zvyšuje možnosti těchto systémů. Proto je logické, že jednou z hlavních oblastí využití těchto systémů je analýza environmentálních vzorků, vyznačujících se zpravidla mimořádně komplikovaným složením.



Obr. 2. Modulovaný chromatogram ze systému GCxGC

Kompletní dvojrozměrná plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí byla například úspěšně využita pro analýzu kyslíkatých sloučenin a aromatických uhlovodíků ve vodách po jejich izolaci pomocí SPME se vzorkováním rovnovážné plynné fáze. Hodnoty detekčního limitu metody se pohybovaly okolo 0,5 ppb [15]. Jiní autoři pomocí GCxGC-FID úspěšně separovali a kvantifikovali 80 kontaminantů povrchové vody ze skupiny polyaromátů, chlorovaných alkanů, chlorovaných aromátů, aldehydů, nitrilů, substituovaných heterocyklů, ftalátů, pesticidů a herbicidů [16]. V nedávno publikované práci byla prezentována separace a kvantifikace 97 organických kontaminantů na stopové hladině s využitím GCxGC-TOF MS, opět po jejich izolaci pomocí SPME (13 ze skupiny léčiv, 18 zástupců změkčovadel, 8 prostředků osobní péče, 9 kyselých herbicidů, 8 triazinů, 10 organofosfátů, 5 fenylmočovin, 12 organochlorových biocidů, 9 polycyklických aromatických uhlovodíků, 5 benzothiazolů a benzotriazolů) [17]. Na našem pracovišti byla metoda GCxGC-TOF MS úspěšně využita pro stanovení obsahu vybraných nesteroidních protizánětlivých léčiv ve vodách po jejich izolaci pomocí SPE a nezbytné derivatizaci [18].

Závěrem lze konstatovat, že metoda kompletní ortogonální tandemové plynové chromatografie se osvědčuje jako mimořádně efektivní technika separace velmi složitých směsí látek. Hmotnostně spektrometrická detekce s využitím vysokorychlostního analyzátoru doby letu umožňuje detekovat separované sloučeniny na stopové a ultrastopové úrovni, s vysokou selektivitou, a to i v případě nedokonalého rozdělení sledovaných sloučenin. Je ale třeba uvést, že systémy GCxGC nepatří k jednoduchým zařízením a pro spolehlivou funkci systému je zapotřebí poměrně zkušeného operátora.

Literatura

1. TSWETT, M. S. On a new category of adsorption phenomena and their application to Biochemical analysis. *Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists, Biology Section*. 1905, roč. 14, s. 20-39.
2. TSWETT, M. S. Physikalisch-chemische Studien Über das Chlorophyll. Die Adsorption. *Ber dtsch botan Ges*. 1906, roč. 24, s. 316-323.
3. JAMES, A. T., MARTIN, A. J. P. LIQUID-GAS PARTITION CHROMATOGRAPHY. *Biochemical Journal*. 1951, roč. 48, s. R7-R7.
4. JANÁK, J. Chromatografická semimikroanalýza plynů. *Chemické Listy*. 1952, roč. 46, s. 780-781.
5. GOLAY, M. J. E. Vapor phase chromatography and the telegraphers equation. *Anal Chem*. 1957, roč. 29, s. 928-932.
6. DANDENEAU, R., BENTE, P., ROONEY, T., HISKES, R. Flexible fused-silica columns - advance in high-resolution gas-chromatography. *International Laboratory*. 1979, roč., s. 69-8.
7. FOLEY, W., GILDEA, B., WHEAT, T. E. The missing link between HPLC and UPLC technology. *American Laboratory*. February 2010, roč., s. 42-45.
8. WILSON, I. Envisioning the potential of UPLC. Waters Media Day, 2 December 2004.
9. AGILENT TECHNOLOGIES: 1290 Infinity LC: Infinite capabilities to solve your separation challenges. *Agilent Technologies Technical Information*. 2009.
10. GOHLKE, R. S. Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Anal Chem*. 1959, roč. 31, s. 535-541.
11. FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F., WHITEHOUSE, C. M. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 1989, roč. 246, s. 64-71.
12. COUSDEN, R., GORDON, A. H., MARTIN, A. J. P. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem J*. 1944, roč. 38, s. 224-232.
13. DAVIES, I. L., RAYNOR, M. W., KITHINJI, J. P., BARTLE, K. D., WILLIAMS, P. T., ANDREWS, G. E. LC GC, SFC GC, and SFE GC - interfacing. *Anal Chem*. 1988, roč. 60, s. A683-8.
14. MARRIOTT, P., SHELLIE, R. Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2002, roč. 21, s. 573-583.
15. GAINES, R. B., LEDFORD, E. B., STUART, J. D. Analysis of water samples for trace levels of oxygenate and aromatic compounds using headspace solid-phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Microcolumn Sep*. 1998, roč. 10, s. 597-604.
16. BEENS, J., DALLUGE, J., ADAHCHOUR, M., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. A. T. Moving cryogenic modulator for the comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) of surface water contaminants. *J Microcolumn Sep*. 2001, roč. 13, s. 134-140.
17. MATAMOROS, V., JOVER, E., BAYONA, J. M. Part-per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by Solid-Phase Extraction Followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2010, roč. 82, s. 699-706.
18. LACINA, P. Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009 (96 s).