

VÝUKA CHEMIE

ZELENÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE PRO JEDNODUCHÉ APLIKACE

JOZEF ŠESTÁK^{a,b} a VLADISLAV KAHLE^b

^a Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, ^b Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, 602 00 Brno
xcsestak@fch.vutbr.cz; kahle@iach.cz

Došlo 5.11.13, přijato 19.6.14.

Klíčová slova: zelená chemie, zelená analytická chemie, zelená kapalinová chromatografie, nanokolony

Úvod

V důsledku nových poznatků o vlivech lidských technologií na přírodu vznikla potřeba regulace a snížení jejich dopadů na životní prostředí. Každý člověk by měl minimalizovat svůj podíl na zátěži životního prostředí tříděním odpadu či šetrným využíváním vody a energií. Tento „zelený“ trend je dnes patrný v mnoha oblastech průmyslu. Chemie a její odvětví nejsou výjimkou.

Termín „zelená chemie“ představuje filosofii návrhu chemického procesu a produktu s cílem snížit nebo zcela eliminovat používání a produkci nebezpečných látek¹.

Anastas a Warner shrnuli tuto filosofii do 12 obecných principů². Snaha o uplatnění „zeleného“ přístupu je patrná také v analytické chemii^{3–5}. 12 principů zelené analytické chemie je uvedeno v tab. I.

Velké množství současných analytických postupů je založeno na separačních technikách a mezi nejvýznamnější patří techniky chromatografické. Sandra a spol., rozlišili v kontextu zelené chemie dva pohledy na chromatografii⁶. Za prvé lze na tuto techniku pohlížet jako na nástroj pro hodnocení procesů a produktů. Z druhého pohledu je chromatografie sama o sobě procesem, na který lze aplikovat principy zelené chemie. Vznikl tak pojem „zelená chromatografie“⁷.

Tato práce se dále zaměří na zelenou kapalinovou chromatografii. Vstupy tohoto procesu tvoří mobilní fáze, vzorky a spotřební materiál. Kapalinový chromatograf je poháněn elektrickým proudem, jehož největší část spotřebují kolonový termostat, detektor a vysokotlaké pumpy. Hlavním výstupem pak jsou informace a jako vedlejší „produkt“, odpadní mobilní fáze.

U standardních kapalinových chromatografů je z pohledu zelené analytické chemie nejzávažnější vysoká spotřeba rozpouštědel. K výraznému snížení spotřeby mobilní fáze dochází, je-li použita separační kolona s menším vnitřním průměrem, vyšší účinností a kratší délkou. Na koloně, jejíž vnitřní průměr je x -násobně menší, se průtok mobilní fáze sníží x^2 -krát. Při použití kolony s vyšší účinností, pak postačuje pro dosažení požadovaného počtu teoretických pater kratší kolona s menším vnitřním objemem.

Jako mobilní fáze se běžně používá směs vody s acetonitrilem nebo methanolem. Jelikož je výroba acetonitrilu nákladná a jeho odstranění jakožto odpadu obtížné, je

Tabulka I
12 principů zelené analytické chemie⁵

Princip	Komentář
1	Využití přímých analytických technik bez úpravy vzorků
2	Minimalizace velikosti a počtu vzorků
3	Analýza vzorků „in situ“
4	Integrace analytických procesů a operací snižuje spotřebu energií a rozpouštědel
5	Automatizace a miniaturizace
6	Pokud možno, vyhnout se derivatizaci
7	Snižování tvorby odpadů a pečlivé nakládání se vzniklým odpadem
8	Upřednostňování metod schopných stanovení více parametrů najednou
9	Minimalizace spotřeby energie
10	Přednostní využití materiálů získaných z obnovitelných zdrojů
11	Minimalizace nebo úplná náhrada toxických činidel
12	Zvýšení bezpečnosti operátora

v zelené kapalinové chromatografii upřednostňován zejména methanol. Doporučován je také ethanol a aceton. Vyšší viskozita směsi ethanol-voda a absorpce acetonu v UV oblasti však částečně limitují jejich širší použití.

Většina metod v kapalinové chromatografii využívá výhod separace při zvýšené teplotě⁸. Termostatování kolony je energeticky náročné, ve výsledku ale takto lze urychlit separaci a snížit spotřebu mobilní fáze. Výrazný potenciál pro úsporu energie zde opět představuje použití kolon s malým vnitřním průměrem, díky kterým lze zjednodušit a miniaturizovat potřebnou instrumentaci.

Provozování kapalinové chromatografie často nesouvisí jen s analýzou vzorků. Vývoj a optimalizace metod nebo použití pro vzdělávací účely také představují nezanedbatelný podíl na spotřebě rozpouštědel. Tato práce si proto klade za cíl demonstrovat velmi jednoduchou možnost realizace nanokolony kapalinové chromatografie, která má v souvislosti se zaváděním principů zelené chemie a zelené analytické chemie do praxe výrazný potenciál přispět ke snížení spotřeby rozpouštědel.

Experimentální část

Přístroje

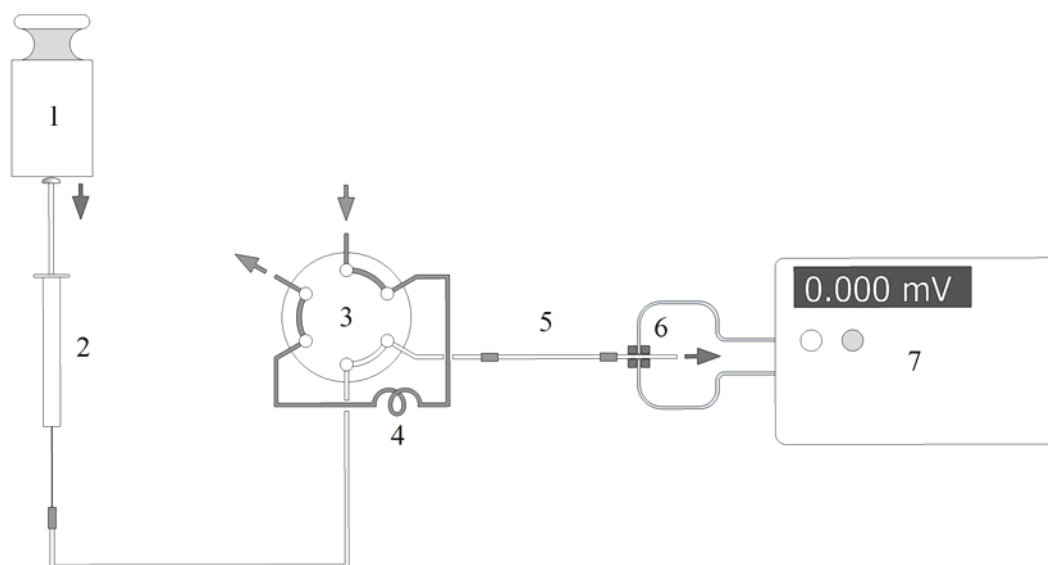
Manuální dávkovací ventil C2-1006 (Vici Valco, USA), spektrofotometrický detektor Spectra 100 (Spectra-Physics, USA), počítač s A/D převodníkem a chromatografickým softwarem Clarity (DataApex), ultrazvuková lázeň Sonorex Digital 10P (Bandelin electronic, Německo), digitální posuvné měřidlo Extol Premium.

Chemikálie a materiál

Deionizovaná voda (připravena přístrojem Mili-Q, Millipore, Německo), methanol pro HPLC (Merck, Německo), aceton pro HPLC (Avantor performance materials B.V., Nizozemsko), EPA 8330 mix A (Sigma-Aldrich, Německo), vysokotlaká stříkačka FMJ-250, průměr pístu 2,28 mm (PennCentury Inc., USA), křemenné kapiláry 360 μm o.d. a 100 μm , 75 μm a 50 μm i.d. (Agilent Technologies, USA), kapilární kolona 100 μm i.d. \times 50 mm s náplní Kinetex 2,6 μm C-18 (naplněna na Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.), šroubovací PEEKové spojky pro 360 μm o. d. kapiláry (IDEX, USA).

Jednoduchá nano-LC platforma

Schéma chromatografického nano-LC systému je na obr. 1. Základními částmi jsou vysokotlaká 250 μl stříkačka, závaží, dávkovací ventil, kapilární kolona a upravený fotometrický detektor. Stříkačka byla umístěna ve svislé poloze a prostřednictvím šroubovací spojky a kapiláry (200 μm i.d. \times 300 mm) spojena s dávkovacím ventilem. Dávkovací ventil byl vybaven vnější dávkovací smyčkou (křemenná kapilára 100 μm i.d. \times 100 mm). Jako filtr byla před kolonu vřazena křemenná kapilára (75 μm i.d. \times 50 mm) obsahující na svém konci fritu, připravenou *in-situ* polymerací z roztoku formamidu a vodného skla⁹. Výstup kolony byl pomocí spojky s nulovým mrtvým objemem spojen s detekční kapilárou.



Obr. 1. Schématické znázornění experimentální nano-LC platformy; 1 – závaží, 2 – vysokotlaká stříkačka, 3 – dávkovací ventil, 4 – dávkovací smyčka, 5 – kapilární kolona, 6 – detekční kapilára a světlovody, 7 – fotometrický detektor

Zelená nano-LC pumpa

Nízké průtoky mobilní fáze v nanokolonové kapalino-
vé chromatografii umožňují použití stříkačky jako zásob-
níku mobilní fáze a pumpy současně. Zatížením pístu stří-
kačky o průměru d závažím o hmotnosti m vznikl jednodu-
chý model pumpy s nulovou spotřebou elektrické energie
udržující v systému konstantní tlak P .

$$P = \frac{4 \cdot m}{\pi \cdot d^2} \quad (1)$$

Použitá vysokotlaká stříkačka je tlakově odolná do
40 MPa a s vhodným závažím lze v systému vytvořit tlak srovn-
atelný s konvenční HPLC. Uvažujeme-li průtok $0,5 \mu\text{l min}^{-1}$
je na jedno naplnění stříkačky ($250 \mu\text{l}$) možné dodávat
mobilní fázi nepřetržitě 8 hodin. Při menším průtoku je
pak tato doba úměrně delší.

Průtok mobilní fáze při konstantním tlaku

Při konstantním složení mobilní fáze a konstantní
okolní teplotě je konstantní i viskozita mobilní fáze a prů-
tok systémem je stabilní. Dle Darcyho rovnice (2) je line-
ární rychlost toku mobilní fáze kolonou u_M při tlaku DP
funkcí chromatografické permeability kolony B_0 , délky
kolony L a dynamické viskozity mobilní fáze h (cit.¹⁰).
Převedením lineární rychlosti u_M na objemový průtok F_M ,
získáme rovnici (3), kde d je vnitřní průměr kolony.

$$u_M = \frac{B_0 \cdot \Delta P}{\eta \cdot L} \quad (2)$$

$$F_M = \frac{B_0 \cdot \Delta P \cdot \pi \cdot d^2}{4 \cdot \eta \cdot L} \quad (3)$$

Kapilární kolony

Náplňové i monolitické kolony o vnitřním průměru
50–200 μm jsou v současnosti běžně dostupné. Jejich ne-
výhodou je jejich křehkost a cena, která je porovnatelná
s cenami „velkých“ kolon. Při správném zacházení však
lze kapilární kolonu používat po srovnatelně dlouhou do-
bu. Pro méně náročné aplikace lze kapilární kolony připra-
vit relativně snadno i v laboratorních podmínkách¹¹. V této
práci byla použita kapilární kolona 100 μm i.d. \times 50 mm
odborně naplněná částicemi Kinetex 2,6 μm C-18.

Detekce

Použití nanokolon vyžaduje speciální detekční cely
velmi malých rozměrů. Komerční nanocely jsou však po-
měrně drahé. Detektory některých konstrukcí lze však
poměrně snadno upravit pro použití kapiláry jako detekční
cely¹². V této práci byl takto upraven fotometrický detek-
tor Spectra 100. K výstupu kolony byla pomocí spojky
s nulovým mrtvým objemem připojena křemenná kapilára
(100 μm i.d.), z jejíž části těsně za výstupem kolony byla
odstraněna polyimidová vrstva. Sem byly v kolmém směru
z obou stran přivedeny světlovodná vlákna, kterými bylo
světlo vedeno ke kapiláře a poté zpět k detektoru.

Evaluace systému

Zkouška těsnosti systému

Místo kolony byl do šroubovací spojky připojen oce-
lový drátek o vnějším průměru 0,4 mm. Stříkačka byla
naplněna vodou a píst byl postupně zatížen závažím
o celkové hmotnosti 8500 g, což dle rovnice (1) odpovídá
tlaku 20,8 MPa. K indikaci unikání kapaliny bylo použito
digitální posuvné měřidlo umístěné rovnoběžně s pístem
stříkačky, s kterým bylo možné s přesností 0,01 mm za-
znamenat změnu polohy pístu.

Měření chromatografické permeability kolony

Stříkačka byla naplněna methanolem (dynamická
viskozita při 25 °C $5,5 \cdot 10^{-4}$ Pa s, cit.¹³). Píst stříkačky byl
zatížen závažím o hmotnosti 3511 g (odpovídající tlak
8,4 MPa). Průtok mobilní fáze byl měřen nepřímo, jako
změna polohy pístu za určitý čas, pomocí digitálního po-
suvného měřidla umístěného rovnoběžně s pístem.

Ověření funkce systému

Mobilní fáze, 30% v/v vodný roztok methanolu, byla
před použitím přefiltrována (PTFE filtr 0,45 μm) a částeč-
ně odplyněna ponořením do ultrazvukové vodní lázně
(10 min). Vysokotlaká stříkačka byla naplněna mobilní
fází a spojena s dávkovacím ventilem. Píst stříkačky byl
zatížen závažím o hmotnosti 6041 g (14,5 MPa). Po
15 min byla do systému pravidelně dávkována testovací
směs standardů.

Výsledky a diskuse

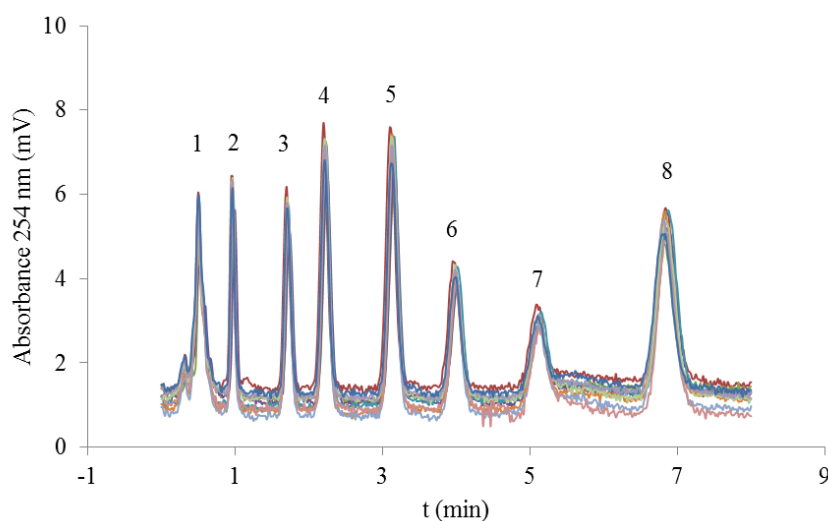
Těsnost systému

Kritickou částí systému je teflonové těsnění pístu
stříkačky, které vlivem opotřebení a zejména při vysokém
tlaku může podtékat. Píst stříkačky sice byl již dlouhodobě
používán, po dobu 8 h však nebyla při tlaku 20,8 MPa
pozorována žádná změna hodnoty na digitálním posuvném
měřidle, která by indikovala únik mobilní fáze.

Chromatografická permeabilita kolony

Údaje o pohybu pístu v čase byly přepočteny na ob-
jem a metodou nejmenších čtverců byly získány parametry
lineární funkce popisující naměřenou závislost. Hodnota
koeficientu determinance $R^2 = 0,9999$ dokazuje rovnoměr-
ný pohyb pístu a směrnice lineární regresní funkce je rovna
průměrnému průtoku methanolu systémem, $0,678 \mu\text{l min}^{-1} =$
 $11,3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Po úpravě rovnice (3) a po dosazení pro-
měnných v základních jednotkách je permeabilita použité
kolony:

$$B_0 = \frac{F_m \cdot 4 \cdot \eta \cdot L}{P \cdot \pi \cdot d^2} = \frac{1,13 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 4 \cdot 5,44 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot 50 \cdot 10^{-3} \text{ m}}{8,4 \cdot 10^6 \text{ Pa} \cdot 3,14 \cdot (100 \cdot 10^{-6} \text{ m})^2} = 4,6 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2$$



Obr. 2. Separace směsi EPA 8330 mix A 10 mg l^{-1} ; 1 – oktogen, 2 – hexogen, 3 – 1,3,5-trinitrobenzen, 4 – 1,3-dinitrobenzen, 5 – nitrobenzen, 6 – 2,4,6-trinitrotoluen, 7 – 2,4-dinitrotoluen, 8 – 2-amino-4,6-dinitrotoluen; 25°C , tlak v systému $14,5 \text{ MPa}$, kolona Kinetex $2,6 \mu\text{m C18 } 100 \mu\text{m i.d.} \times 50 \text{ mm}$, dávkování vzorku 15 s , $30\% \text{ v/v}$ methanol $0,43 \mu\text{l min}^{-1}$, detekce 254 nm

Na základě znalosti permeability lze následně při konstantním tlaku vypočítat odpovídající objemový průtok libovolné mobilní fáze.

Separace testovací směsi

Obr. 2 znázorňuje chromatografický záznam 10 následujících analýz pořízených v průběhu 4 hodin. Navzdory manuálnímu ovládání dávkovacího ventilu bylo dosaženo poměrně dobré opakovatelnosti retenčních časů ($\text{RSD} < 1\%$) a plochy píků ($\text{RSD} < 10\%$). Dobrá opakovatelnost retenčních časů je také potvrzením, že průtok mobilní fáze v průběhu celého experimentu byl stabilní. Doplněním hodnot tlaku ($14,5 \text{ MPa}$), dynamické viskozity mobilní fáze ($1,48 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ při 25°C , cit.¹³) a permeability kolony ($4,7 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2$) do rovnice (3) lze vypočítat průtok mobilní fáze za daných podmínek:

$$F_M = \frac{B_0 \cdot P \cdot \pi \cdot d^2}{4 \cdot \eta \cdot L} = \frac{4,6 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot 14,5 \cdot 10^6 \text{ Pa} \cdot 3,14 \cdot (100 \cdot 10^{-6} \text{ m})^2}{4 \cdot 1,48 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot 50 \cdot 10^{-3} \text{ m}} = 7,1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} = 0,43 \mu\text{l min}^{-1}$$

Vzorek byl do systému dávkován neúplným vypuštěním dávkovací smyčky po dobu 15 s , co při tomto průtoku odpovídá objemu přibližně 100 nl .

Závěr

V této práci byl popsán jednoduchý experimentální systém pro realizaci zelené nanokolonové kapalinové chromatografie. V souladu s principy zelené analytické

chemie se systém vyznačuje velmi nízkou spotřebou rozpouštědel, elektrické energie a minimální tvorbou odpadu. Systém je velmi jednoduchý, jeho sestavení ani provoz nejsou nákladné a výsledky lze získat s dobrou opakovatelností. Je vhodný především pro izokratické separace. Lze jej uvažovat jako doplněk při vývoji metod, kdy velké množství počátečních experimentů lze provést s minimální spotřebou rozpouštědel. Vhodný je také např. pro potřeby praktické výuky kapalinové chromatografie, pro potřeby studentů v oborech analytické chemie a také k demonstraci úspornosti a dalších výhod nanokolonové kapalinové chromatografie.

Práce byla podpořena prostředky specifického výzkumu Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulty chemické, Vysokého učení technického v Brně (FCH-S-15-2869) a Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. (RVO 68081715).

LITERATURA

1. <http://www2.epa.gov/green-chemistry/basics-green-chemistry#definition>, staženo 14. 10. 2013.
2. Anastas P. T., Warner J. C.: *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York 1998.
3. Namiesnik J.: *J. Sep. Sci.* 24, 151 (2001).
4. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M.: *Trends Anal. Chem.* 27, 497 (2008).
5. Gałuszka A., Migaszewski Z., Namiesnik J.: *Trends Anal. Chem.* 50, 78 (2013).
6. Sandra P., Vanhoenacker G., David F., Sandra K.,

- Pereira A.: LC GC Eur. 23, 242 (2010).
- Plotka J., Tobiszewski M., Sulej A. M., Gorecki T., Namiesnik J.: J. Chromatogr. A 1307, 1 (2013).
 - Vanhoenacker G., Sandra P.: J. Sep. Sci. 29, 1822 (2006).
 - Meiring H. D., van der Heeft E., ten Hove G. J., de Jong A. P. J. M.: J. Sep. Sci. 25, 557 (2002).
 - Cramers C. A., Rijks J. A., Schutjes C. P. M.: Chromatographia 14, 439 (1981).
 - Franc M.: Chem. Listy 103, 160 (2009).
 - Kahle V., Janeček M.: Chem. Listy 83, 867 (1989).
 - Thompson J. W., Kaiser T. J., Jorgenson J. W.: J. Chromatogr. A 1134, 201 (2006).

J. Šesták^{a,b} and V. Kahle^b (^a Department of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno; ^b Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno): **Green Liquid Chromatography for Simple Applications**

A simple laboratory setup is described for performing green liquid chromatography in a nanocolumn with a great potential to minimize solvent consumption and waste production as required in green chemistry. The system consists of a high-pressure syringe fixed in vertical position and with weight. This setup acts as a constant-pressure pump. Samples are injected by short switch of a two-way six-port injection valve equipped with an external sample loop. Isocratic separation of EPA 8330 standards was performed. The relative standard deviations of retention times below 1 % demonstrate a constant mobile phase flow for several hours.



67. Zjazd Chemikov 2015

7. 9. až 11. 9. 2015

Grand Hotel Bellevue, Starý Smokovec

<http://www.schems.sk/67zjazd/>
e-mail: zjazd.chemikov@gmail.com

Organizačný výbor:

Predseda: Dušan Velič
Vedecký tajomník: Viktor Milata
Vedecký tajomník: Jan John
Výkonný tajomník: Monika Jerigová
Hospodár: Zuzana Hloušková

Sekcie:

1. Analytická a fyzikálna chémia
2. Anorganická a materiálová chémia
3. Organická chémia a polyméry
4. Vyučovanie a história chémie
5. Životné prostredie, potravinárstvo a biotechnológie
6. Chemprogress
7. Súťaž mladých – posterová sekcia

Termíny:

Registrácia do 1. júna 2015
Platba a abstrakt do 1. júna 2015