

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2009-801**
(22) Přihlášeno: **01.12.2009**
(40) Zveřejněno: **08.06.2011**
(Věstník č. 23/2011)
(47) Uděleno: **07.11.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **19.12.2012**
(Věstník č. 51/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 575

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 30/46 (2006.01)
G01N 30/24 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 4271697 A; US 2005218055 A1.

Chocholous P. et al: An overview of sequential injection chromatography; ANALYTICA CHIMICA ACTA 600 (2007) 129-135.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v
Hradci Králové, Hradec Králové, CZ

(72) Původce:

Solich Petr Prof. RNDr. CSc., Lhota pod Libčany, CZ
Šatinský Dalibor Doc. RNDr. Ph.D., Hradec Králové,
CZ
Chocholouš Petr PharmDr. Ph.D., Vamberk, CZ
Sklenářová Hana PharmDr. Ph.D., Hradec Králové 12,
CZ

(74) Zástupce:

Ing. Květoslava Kubičková, Doubravčická 2201, Praha
10, 10000

(54) Název vynálezu:

**Separace a detekce směsných vzorků sekvenční
injekční chromatografií**

(57) Anotace:

Separace a detekce směsných sériových vzorků sekvenční
injekční chromatografií s vysoce rozdílnými retenčními
vlastnostmi složek vůči nastaveným chromatografickým
podmínkám podle vynálezu spočívá v tom, že se týž směsný
vzorek odděleně separuje nejméně na dvou kolonách s různě
nastavenými chromatografickými podmínkami, přičemž se ze
směsného vzorku na každé koloně přednostně separují složky
s podobnými retenčními vlastnostmi vůči nastaveným, pro ně
optimálním chromatografickým podmínkám, a eluáty
jednotlivých složek ze všech chromatografických kolon
postupně prochází jednou detekční celou
spektrofotometrického detektoru. Chromatografické podmínky
se upravují změnou délky kolony a/nebo změnou stacionární
fáze kolony a/nebo změnou složení mobilní fáze a/nebo
rychlosti průtoku mobilní fáze.

CZ 303575 B6

Separace a detekce směsných vzorků sekvenční injekční chromatografií

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká oblasti analytické chemie, konkrétně chromatografie separace. Používá automatizovanou metodu sekvenční injekční analýzy. Týká se příkladů, kdy se běžně používá pro časově a nákladově efektivní separaci obsahových látek ve směsném vzorku gradientová eluce. Týká se sériové analýzy vzorků u nichž se předpokládá, že obsahuje složky, analyty,

10

s vysoce rozdílným retenčními vlastnostmi vůči nastaveným chromatografickým podmínkám systému mobilní a stacionární fáze.

Dosavadní stav techniky

15

Kapalinová chromatografie na reverzní stacionární fázi běžně využívá izokratické složení mobilní fáze během separace jednotlivých látek vzorku tzv. izokratická eluce. V případě nedostatečné selektivity separačních podmínek pro jednotlivé látky lze tyto jednoduše upravit změnou složení mobilní fáze během separace (nejčastěji plynulou změnou poměru rozpouštědel v mobilní fázi) tzv. gradientová eluce. Sekvenční injekční chromatografie (SIC) je jednou z možností jak provádět kapalinovou chromatografii. SIC využívá nejčastěji monolitickou chromatografickou kolonu (různé délky a průměru) s reverzní stacionární fází C18 pro její nízký odpor vůči protékající mobilní fázi. Nedostupnost jiných druhů stacionárních fází monolitických kolon a omezená možnost využití částicových kolon (díky jejich vyššímu odporu vůči protékající mobilní fázi) omezuje selektivitu separací a tím i využitelnost metody SIC [Chocholouš P., Solich P., Šatínský D.: Analytica Chimica Acta (600) 2007, 129–135., Chocholouš P., Šatínský D., Sladkovský R.,

20

25

Pospíšilová M., Solich P.: Talanta (77) 2008, 566–570].

30

Pro detekci směsných vzorků s předpokládanými, vysoce rozdílným retenčními vlastnostmi analytů vůči nastaveným chromatografickým podmínkám je nutné použít chromatografii s měnícími se chromatografickými podmínkami (gradientová eluce). Při gradientové eluci jsou pro jednotlivé analyty vytvářeny co nejvhodnější chromatografické podmínky plynulou změnou složení mobilní fáze.

35

Při gradientové eluci se pracuje s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem, takže v průběhu separace dochází k plynulé změně poměru rozpouštědel tvořící mobilní fázi a tím k zvyšování eluční síly mobilní fáze a tím i urychlení eluce (vymývání) látek z chromatografické kolony [Lähdesmäki I., Carroll A. D., Wood J., Klein G. D., Scampavia L. D.: FIAlab Instruments, Brochures/Sichrom (2008)]. Změna eluční síly mobilní fáze umožňuje zajistit selektivitu chromatografického systému a zároveň urychlit proces separace. Vzhledem ke zvyšujícímu se zastoupení organického rozpouštědla v mobilní fázi se zvyšuje jeho spotřeba. Po skončení separace gradientovou elucí je třeba upravit podmínky na koloně zpět na počáteční stav, tedy je třeba kolonu dostatečně dlouhou dobu promývat mobilní fází o složení stejném jako na počátku analýzy, tímto dochází k prodlužování času analýzy a stejně tak k další spotřebě mobilní fáze.

45

Při sériovém měření vzorků za podmínek gradientové eluce tvoří významný časový úsek doba, kdy jsou po ukončení měření ustalovány chromatografické podmínky v systému na původní (kolona je promývána mobilní fází o původním složení) před analýzou dalšího vzorku. Tento časový úsek prodlužuje čas celé analýzy a také se spotřebovává mobilní fáze.

50

Spotřeba rozpouštědel mobilní fáze se zvyšuje se zvyšujícím se poměrem jejich zastoupení během gradientové eluce a zároveň během ustalování původních podmínek před analýzou dalšího vzorku.

Převod metody separace gradientovou elucí (zejména gradientového profilu) z jednoho přístroje na druhý může být problematický, protože jejich směšovací systémy (čerpadla) pro vytváření

gradientového profilu ruční síly mobilní fáze mohou být odlišná. Gradientová eluce může být použita jak v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie tak v metodě sekvenční injekční chromatografie (SIC) pro změnu selektivity separace během analýzy [Jandera P., Churáček J.: Gradient Elution in Column Liquid Chromatography. Elsevier, Amsterdam 1985].

Alternativním přístupem pro časové zefektivnění analýzy série podobných vzorků je systém s dvěma a více paralelně zapojenými chromatografickými kolonami, kdy jsou jednotlivé vzorky postupně dávkovány na jednotlivé kolony se stejnou optimální mobilní a stacionární fází pro dané složky ve vzorcích. Výstupy z jednotlivých kolon jsou přepínány do detektoru v závislosti na právě vymývané složce v jednotlivých vzorcích. Sestava vyžaduje dvě (nebo více) jednoduchých čerpadel a ventil pro přepínání výstupu z kolon do detektoru. Bohužel díky trvalému toku mobilních fází je jejich spotřeba vyšší [Linqvist A., Hilke S., Skoglund E.: Journal of Chromatography A (1058) 2004), 121–126, Van Pelt C. K., Corso T. N., Schultz G. A., Lowes S., Henion J.: Anal. Chem. (73) 2001, 582–588].

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody odstraňuje separace a detekce složek v sérii podobných směsných vzorků s vysoce rozdílnými retenčními vlastnostmi složek vůči nastaveným chromatografickým podmínkám sekvenční injekční chromatografií, které podle vynálezu spočívá v to, že se týž směsný vzorek odděleně separuje nejméně na dvou kolonách s různě nastavenými chromatografickými podmínkami, přičemž se ze směsného vzorku na každé koloně přednostně separují složky s podobnými retenčními vlastnostmi vůči nastaveným, pro ně optimálním chromatografickým podmínkám, a eluáty jednotlivých složek ze všech chromatografických kolon postupně prochází jednou detekční celou spektrofotometrického detektoru.

Chromatografické podmínky se upravují změnou délky kolony a/nebo změnou stacionární fáze kolony a/nebo změnou složení mobilní fáze a/nebo rychlostí průtoku mobilní fáze.

Zařízení k provádění separace a detekce podle vynálezu spočívá v tom, že sestává z pístové pumpy 1, propojené se selekčním ventilem 5, který je dále propojen s prvním zásobníkem 2 první mobilní fáze a se druhým zásobníkem 3 druhé mobilní fáze a se třetím zásobníkem 4 vzorku a s první chromatografickou kolonou 6 a s druhou chromatografickou kolonou 7, výtoky obou kolon jsou připojeny přes směšovací T bod 12 k průtokové cele 8 UV–VIS detektoru 10, průtoková cela je připojena k lahvi 11 s odpadem.

Nový analytický přístup využívá nově dvou paralelně umístěných chromatografických kolon pro separaci a stanovení látek a rozšiřuje možnosti chromatografické analýzy složitějších vzorků (zvyšuje selektivitu měření). Dvoukolonová chromatografie je založena na izokratické eluci (neměnných podmínkách analýzy). Každá chromatografická kolona má optimální chromatografické podmínky pro různou skupinu složek obsažených ve vzorku. Látky s menší schopností retence ke stacionární fázi jsou separovány na první koloně a jsou promývány optimální první mobilní fází a látky s větší schopností retence k téže stacionární fázi jsou separovány na druhé koloně, v níž jsou optimální chromatografické podmínky pro tyto složky, které jsou odlišné od první kolony, (s odlišnou délkou, stacionární fází a odpovídající optimální druhou mobilní fází).

Každá kolona je promývána stále stejnou mobilní fází, odpadá nutnost promývání stacionární fáze mobilní fází s původním složením před analýzou dalšího vzorku. Eliminován je problém unášení základní linie při změně složení mobilní fáze za podmínek gradientové eluce, při zachování vysoké reprodukovatelnosti a snadné přenositelnosti metody na jiný přístroj. Pro každou skupinu látek se používá specifická (optimální) kolona a mobilní fáze, optimální průtoková rychlost mobilní fáze, optimální objem vzorku.

Přestože silněji zadržované látky nejsou vymyty z první kolony před dalším nadávkováním vzorku na tuto kolonu, nemají vliv na následnou analýzu. Jsou velmi pomalu vymývány z první kolony ve velmi vysokém retenčním čase a zaznamenány jen jako malé zvýšení základní linie – píky jsou velmi rozmyté. Experimentálně bylo ověřeno, že zadržování těchto látek na koloně
 5 nesnižuje účinnost první kolony vazbou na aktivní místa její stacionární fáze, druhá kolona je použita pro separaci látek silněji zadržovaných na první koloně, zatímco slaběji zadržované látky nejsou zadržovány na druhé koloně vůbec a vymývají se s šumem mrtvého objemu kolony. Takto lze s výhodou použít druhou kratší kolonu, vyšší průtok druhé mobilní fáze nebo druhou mobilní fázi s vyšší eluční silou. Variabilita systému je vysoká díky široké nabídce chromatografických
 10 kolon, směsí mobilní fáze, průtokových rychlostí mobilní fáze a nástřikových objemů vzorku.

Významná je úspora mobilní fáze v porovnání s metodou s gradientovou změnou eluční síly mobilní fáze, vynechán je krok promývání kolony před opakovaným nástřikem jako při metodě s gradientovou změnou eluční síly mobilní fáze, tomu odpovídá i časová úspora.

Výsledný čas analýzy a spotřeba mobilní fáze v případě dvoukolonového systému je nižší nejméně o 30 % v porovnání se shodnou analýzou v módu gradientové eluce. Pro dvoukolonový systém není třeba dvojice pump se směšovačem vytvářejícím gradient mobilní fáze. Systém je vybaven pístovou pumpou a selekčním ventilem.

Sekvenční injekční chromatografie podle vynálezu umožňuje sériové stanovení vzorků o známém složení s předpokládaným rozsahem množství jednotlivých složek. Je časově úspornější a snižuje spotřebu rozpouštědel mobilní fáze v porovnání se sekvenční injekční chromatografií s gradientovou elucí.

Chromatografické podmínky co nejvhodnější pro jednotlivé skupiny složek jsou vytvářeny výběrem co nejvhodnější kolony se stacionární fází a co nejvhodnějším složením mobilní fáze, které se během měření nemění.

Při sériovém měření vzorků díky neměnným chromatografickým podmínkám je čas pro obnovu zařízení pro analýzu nového vzorku nulový.

Složení mobilní fáze způsobem podle vynálezu je ovlivněno i výběrem druhé kolony, což v případě kratší kolony umožňuje použít mobilní fázi s menším množstvím organického rozpouštědla v porovnání s gradientovou elucí.

Dávkování vzorku na více kolon (oddělená separace složek s rozdílnými retenčními vlastnostmi) umožňuje i variabilitu dávkovaného množství vzhledem k předpokládané odezvě detektoru pro předpokládanou koncentraci složek – vyšší nadávkované množství umožní zvýšit odezvu detektoru, tedy snížit nejnižší limit stanovení (limit kvantifikace), tato možnost u gradientové eluce není.

Sekvenční injekční chromatografie podle vynálezu umožňuje analýzu (kvalitativní i kvantitativní) u vzorku se známým složením a s obsahem těchto analytů v kalibrovaném rozsahu, který je předem experimentálně ověřen.

Podmínky měření v sekvenční injekční chromatografii podle vynálezu jsou optimalizovány vzhledem k složení analyzovaného vzorku. Vybrány jsou vhodné kolony pro dané skupiny složek, vybráno je vhodné složení mobilních fází pro jednotlivé kolony, vybráno je vhodné množství vzorku dávkované na jednotlivé kolony, vybráno je vhodné množství mobilní fáze pro jednotlivé kolony a průtoková rychlost mobilních fází pro jednotlivé kolony. Spektrofotometrický detektor je nastaven vzhledem k absorpčním vlastnostem jednotlivých složek. Všechny výše uvedené podmínky jsou nastaveny v programu počítače ovládajícího celý systém a jsou během měření neměnné.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněno schéma zařízení

Příklady provedení vynálezu

Výstupní kontrola při výrobě léčivých přípravků (zejména tablety) s obsahem paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu byla prováděna na zařízení znázorněném na obr. 1.

Zařízení sestává z pístové pumpy 1, propojené se selekčním ventilem 5, který je dále propojen s prvním zásobníkem 2 první mobilní fáze a se druhým zásobníkem 3 druhé mobilní fáze a se třetím zásobníkem 4 vzorku a s první chromatografickou kolonou 6 a s druhou chromatografickou kolonou 7. Výtoky obou kolon jsou připojeny přes směšovací T bod 12 k průtokové cele 8 UV-VIS detektoru 10, průtoková cela připojena k lahvi 11 s odpadem. Průtoková cela 8 je ozařována UV lampou 9. Pístová pumpa 1 a osmicečný selekční ventil 5 a UV-VIS detektor 10 jsou ovládány osobním počítačem 13.

Stanovení obsahových látek v tabletách s paracetamolem, kofeinem, propyfenazonem se provádělo za použití kyseliny salicylové jako vnitřního standardu. V první koloně 6 byla použita mobilní fáze o složení acetonitril : voda = 10 : 90. Jako první kolona 6 byla použita komerčně vyráběná chromatografická monolitická kolona s chemicky modifikovaným silikagelem řetězci C18 (25 + 5 mm x 4,6 mm) – první kolona s chemicky modifikovaným silikagelem řetězci C18 (25 + 5 mm x 4,6 mm) – první kolona byla použita pro separaci a následné spektrofotometrické stanovení při 210 nm paracetamolu, kofeinu a kyseliny salicylové. Jako druhá kolona 7 byla použita komerčně vyráběná chromatografická monolitická kolona s chemicky modifikovaným silikagelem řetězci C18 (10 mm x 4,6 mm). Mobilní fáze v druhé koloně 7 měla složení acetonitril:voda = 30 : 70. Druhá kolona 7 byla použita pro separaci a následné spektrofotometrické stanovení propyfenazonu. Kalibrační rozsah měření je pro paracetamol 1,2 až 150,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ při korelaci 0,999; pro kofein 1,6 až 200,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ při korelaci 0,999 a pro propyfenazon 2,4 až 300,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ při korelaci 0,999.

Sekvence měření TC – SIC:

Na základě počítačového programu bylo přesné množství první mobilní fáze nasáto pohybem pístu peristaltické pumpy 1 z prvního zásobníku 2 přes výstup selekčního ventilu 5 do zásobníku peristaltické pumpy 1, poté vzorek byl nasát pumpou 1 přes selekční ventil 5 z třetího zásobníku 4 do hadičky spojující vstup selekčního ventilu 5 a výstup pumpy 1, otočením směru průtoku pomocí první mobilní fáze byl vzorek vymýván z hadičky přes selekční ventil 5 dále na první chromatografickou kolonu 6 a pak byl vymýván celým objemem první mobilní fáze ze zásobníku pumpy 1 do průtokové cely 8 detektoru a dále z průtokové cely 8 detektoru do lahve 11 pro odpad. UV-VIS detektor zaznamenává absorbanci během celé doby promývání první kolony první mobilní fází. Po separaci všech složek s podobnými vlastnostmi vůči nastaveným chromatografickým podmínkám v první chromatografické koloně 6 nově analýza pokračovala separací na druhé chromatografické koloně 7, kde se separovaly další složky vzorku s podobnými vlastnostmi vůči nastaveným chromatografickým podmínkám na druhé chromatografické koloně 7. Přesné množství druhé mobilní fáze bylo nasáto pohybem pístu peristaltické pumpy 1 z druhého zásobníku druhé mobilní fáze 3 přes výstup selekčního ventilu 5 do zásobníku peristaltické pumpy 1. Vzorek je nasát pumpou 1 přes selekční ventil 5 z třetího zásobníku vzorku 4 do hadičky spojující vstup selekčního ventilu 5 a výstup pumpy 1. Otočením směru průtoku pomocí druhé mobilní fáze je vzorek vymýván z hadičky přes selekční ventil 5 dále na druhou chromatografickou kolonu 7 a pak vymýván celým objemem druhé mobilní fáze ze zásobníku pumpy 1 do průtokové cely 8 detektoru a dále z průtokové cely 8 detektoru do lahve 11 pro odpad. UV-VIS detektor zaznamenává absorbanci během celé doby promývání kolony druhou mobilní fází.

Po vyhodnocení časového záznamu z detektoru se opět do obou chromatografických kolon nastříkne nový vzorek.

5

Průmyslová využitelnost

Separace a detekce směsných vzorků podle vynálezu je využitelná ve farmaceutickém, nebo potravinářském průmyslu při výstupní kontrole výrobků.

10

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Separace a detekce směsných vzorků sekvenční injekční chromatografií s vysoce rozdílnými retenčními vlastnostmi složek vůči nastaveným chromatografickým podmínkám, **vyznačující se tím**, že se týž směsný vzorek odděleně separuje nejméně na dvou kolonách s různě nastavenými chromatografickými podmínkami, přičemž se ze směsného vzorku na každé koloně přednostně separují složky s podobnými retenčními vlastnostmi vůči nastaveným, pro ně optimálním chromatografickým podmínkám, a eluáty jednotlivých složek ze všech chromatografických kolon postupně prochází jednou detekční celou spektrofotometrického detektoru.

20

2. Separace a detekce podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že chromatografické podmínky se upravují změnou délky kolony a/nebo změnou stacionární fáze kolony a/nebo změnou složení mobilní fáze a/nebo rychlostí průtoku mobilní fáze.

25

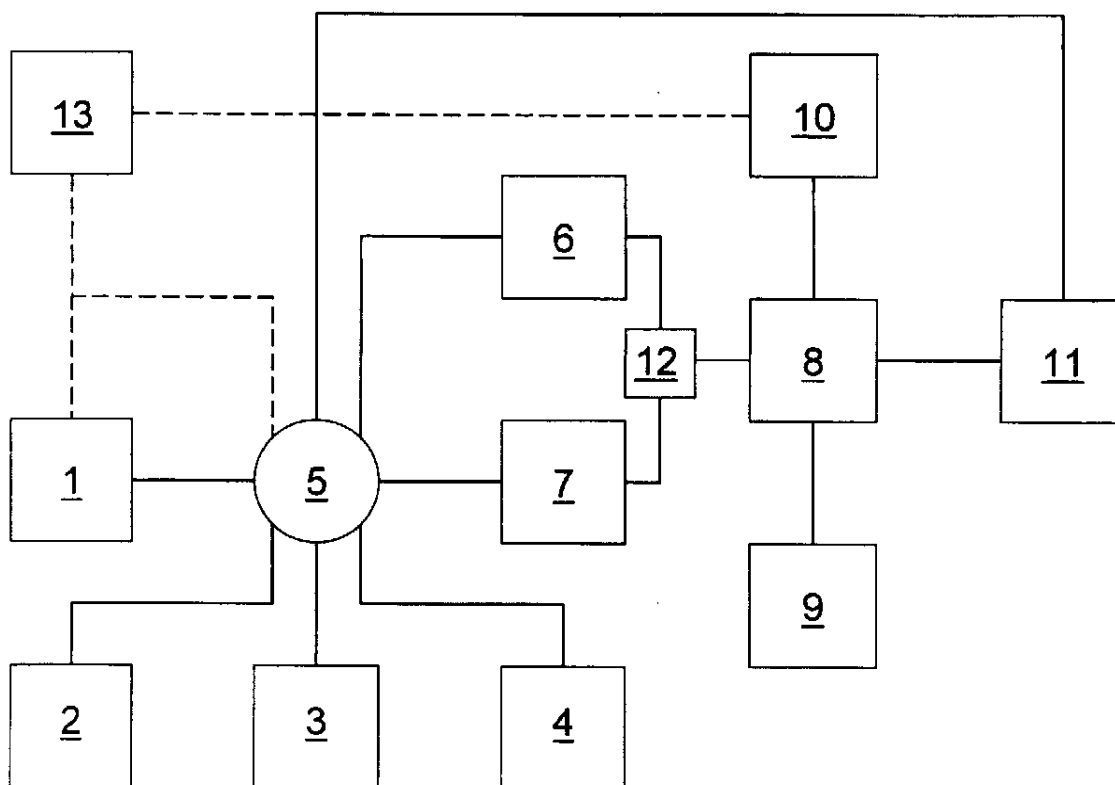
3. Zařízení k provádění separace a detekce podle nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že sestává z pístové pumpy (1), propojené se selekčním ventilem (5), který je dále propojen s prvním zásobníkem (2) první mobilní fáze a se druhým zásobníkem (3) druhé mobilní fáze a se třetím zásobníkem (4) vzorku a s první chromatografickou kolonou (6) a s druhou chromatografickou kolonou (7), výtoky obou kolon jsou připojeny přes směšovací T bod (12) k průtokové cele (8) UV–VIS detektoru (10), průtoková cela je připojena k lahvi (11) s odpadem.

30

35

1 výkres

Obr. 1



Konec dokumentu