

PŘENOSNÝ KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF A JEHO POTENCIÁL PRO STANOVENÍ NEBEZPEČNÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK

PORTABLE LIQUID CHROMATOGRAPH AND ANALYSES OF HAZARDOUS SUBSTANCES

Jozef Šesták^{a*}, Zuzana Gogařová^a, Vladislav Kahle^a, Kamila Lunerová^b

^a Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, 602 00 Brno, Česká republika

^b Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i., Kamenná 71, 262 31 Milín

*Korespondující autor. e-mail: sestak@iach.cz, tel.: +420 532 290 217

Abstrakt

Pokrok v technologiích mikročipů, baterií a LED diod v posledních dvou dekadách již umožňuje vývoj přenosných přístrojů, které dokážou uspokojit náročné požadavky moderní kapalinové chromatografie (HPLC). Postupné rozšíření přenosných HPLC lze očekávat všude tam, kde v místě odběru vzorku postačí jeho rychlá a snadná úprava s následnou krátkou HPLC analýzou. Naše výzkumná skupina vyvinula koncept přenosného HPLC, jehož základem je jednoduché hydraulické schéma a originální optický detektor umožňující současnou detekci absorbujících i fluoreskujících látek po jejich separaci na mikrokoloně. V oblasti analýzy nebezpečných látek v terénních podmínkách může tento typ přístroje rozšířit interval sledovaných látek o ty, které z nejrůznějších fyzikálních/fyzikálně-chemických důvodů nelze detekovat/stanovit pomocí přenosných přístrojů pracujících na jiných principech (např. toxiny bakterií a sinic).

Klíčová slova: přenosný kapalinový chromatograf, optický detektor, toxiny

Abstract

Progress in technology of microchips, batteries and LEDs in the last two decades enable development of portable instruments which can satisfy the requirements of modern liquid chromatography (LC). Application of portable LC is advantageous if simple and rapid sample treatment procedure followed by a short HPLC run can be executed in the point of sampling. Our research group have developed a concept of portable HPLC based on simple hydraulic scheme and a unique optical detector for simultaneous detection of absorbance and fluorescence of compounds eluted off microcolumn. Considering in-field analysis of hazardous substances, this instrument can be advantageous for analysis of compounds which are difficult to detect and quantify by other contemporary portable instruments utilizing different working principles due to incompatibility with their physico-chemical properties (e. g. microbial toxins).

Key words: portable liquid chromatograph, optical detector, toxins

1. ÚVOD

Při řešení mimořádných událostí spojených s přítomností nebezpečných látek je zásadním faktorem, který ovlivňuje efektivitu zvládnutí incidentu, včasná detekce a identifikace nebezpečné látky. Na tyto analýzy lze využívat celou řadu analytických přístrojů, které se liší citlivostí, selektivitou, komplexností, rychlostí analýzy, složitostí přípravy vzorku a dalšími faktory. Nové systémy pro rychlou analýzu přímo v místě zásahu jsou předmětem neustálého vývoje. Pro složitější vzorky je nutné použití separačních metod, z nich nejrozšířenější je plynová (GC) nebo kapalinová chromatografie (LC). Využití GC je však limitováno na látky dostatečně těkavé a termostabilní, mnohé zájmové látky se musí před analýzou derivatizovat (převést na těkavější formu). Pro analýzu přímo v terénu lze využít přenosné formy GC-MS nebo GC-IMS přístrojů, jejichž nevýhodou však jsou časté falešně pozitivní signály a možné zahlcení systému vyžadující zdlouhavé čištění. Separaci pomocí LC lze naopak použít na většinu látek, které jsou rozpustné v běžných rozpouštědlech včetně vody, jsou termolabilní a/nebo mají vyšší molekulovou hmotnost, jako např. toxiny, drogy, výbušniny, prekurzory a degradační produkty nebo metabolity BChL, léčiva, jedy, environmentální polutanty. Systémy LC jsou standardně používány např. ve forenzní, lékařské, farmakologické či environmentální analýze. Přístroje na principu LC jsou však objemné a komplexní, z toho důvodu jsou omezené na laboratorní použití.

Technologický vývoj v oblasti miniaturizace součástí umožnil i miniaturizaci systémů LC a vývoj přenosných zařízení. První snahy o přenosné kapalinové chromatografy lze vysledovat až do začátku 80. let, kdy se ve vědeckých pracích objevili experimentální přístroje pro analýzu pesticidů [1] a aromatických aminů [2]. Od této doby bylo toto téma diskutováno velmi sporadicky a opětovný zájem lze pozorovat až v posledním desetiletí [3–7], společně s nástupem několika prvních komerčních přenosných přístrojů v posledních letech, např. Axcend Focus LC [8,9], Smart LifeLC od f. PolyLC nebo Light Lab 3 od f. Orange Photonics. Uvedená zařízení však mají stále celou řadu nedostatků, které omezují širší použití, a to zejména:

- detekce absorbance pouze při jedné, max. dvou vlnových délkách,
- není možnost měřit absorbanci při kratší vlnové délce než 235 nm,
- absence fluorescenční detekce,
- nemožnost využít běžně dostupné kapilární kolony,
- vysoká spotřeba rozpouštědel díky použitým kolonám a průtokům,
- relativně nízký maximální tlak nedovoluje použití vysokoúčinných náplňových kolon,
- vysoká cena.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přenosný kapalinový chromatograf s UV/VIS/FLD detektorem

V rámci řešení projektu byl vyvinut přenosný kapilární kapalinový chromatograf (miniLC 1) opatřený nově vyvinutým miniaturizovaným fotometrickým detektorem (UV/VIS/FLD) [10], který je schopen současně detekovat absorpci v UV-VIS i fluorescenci při několika striktních vlnových délkách.

Přenosný kapilární kapalinový chromatograf miniLC 1 představuje miniaturizovaný HPLC přístroj kompaktních rozměrů (obr. 1), který umožňuje realizaci HPLC analýz kapalných vzorků v podmínkách mimo stacionární laboratoř. Přenosný kapilární kapalinový chromatograf s miniaturizovaným fotometrickým detektorem je schopen provádět gradientovou HPLC separaci a detekci kapalných látek absorbujících při 265 a/nebo 340 nm a fluoreskujících látek, které lze excitovat vlnovou délkou 356 nm anebo 470 nm. Přenosný kapilární kapalinový chromatograf pracuje s malými objemy rozpouštědel (řádově jednotky mililitrů), díky tomu je i velmi nízký objem odpadních rozpouštědel. Při plném nabití přístroje je schopen fungovat mimo stacionární laboratoř minimálně 8 hodin.

Obrázek 1: Přenosný kapilární kapalinový chromatograf miniLC 1



Specifikace miniLC 1:

Průtok mobilní fáze:	1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$
Maximální tlak:	35 MPa
Dávkovaný objem vzorku:	0,5-5 μL
RSD retenčního času:	< 0.5 %
RSD plochy píku:	< 5 %
Kolonový termostat*:	$\pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}$
Výdrž na akumulátor**:	min. 8 hodin
Rozměry (mm):	430 x 380 x 154
Hmotnost:	9 kg

* min 5 $^{\circ}\text{C}$ nad okolní teplotou

**okolní teplota 25 $^{\circ}\text{C}$, akumulátor 14,8 V/5,2 Ah

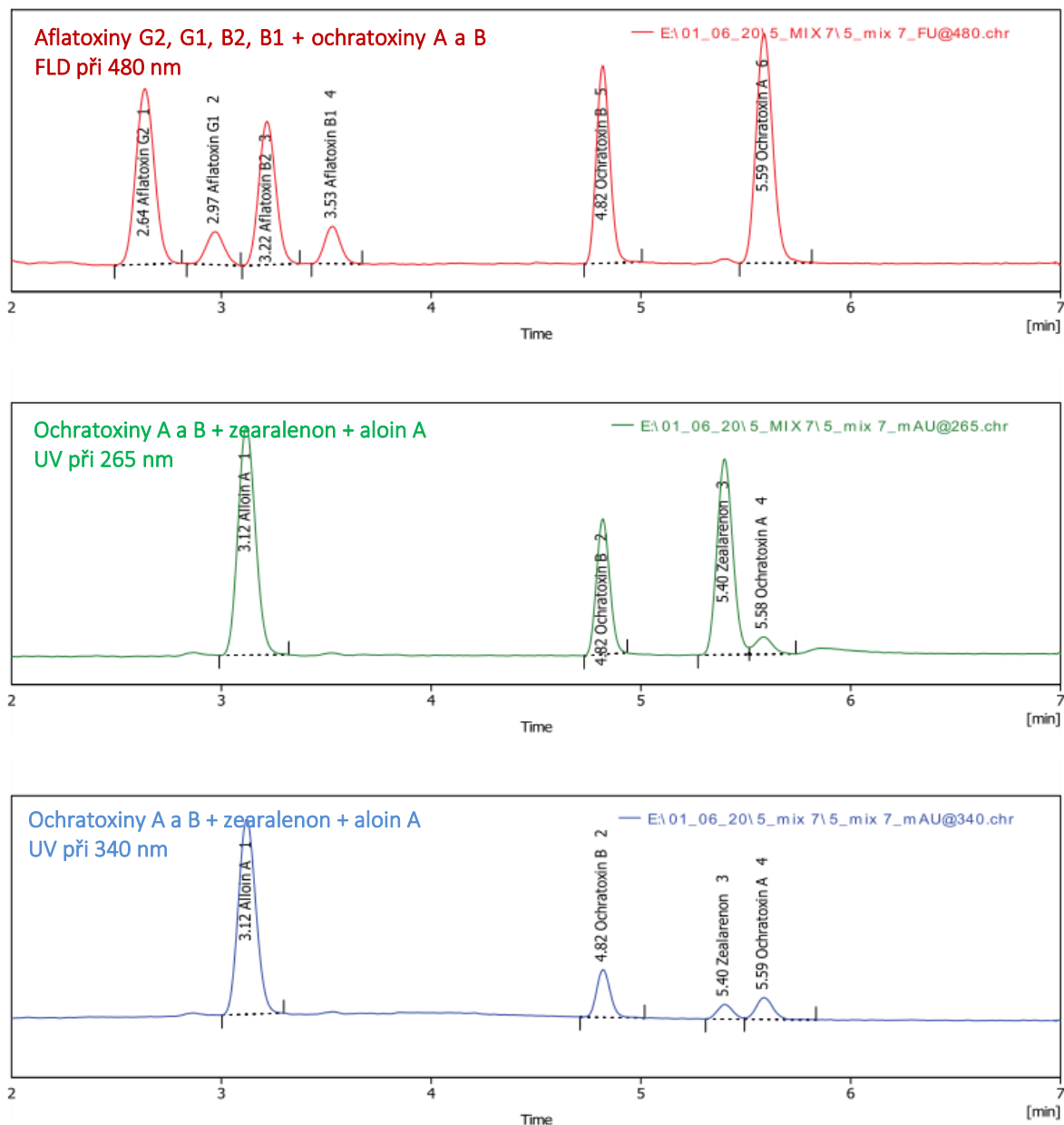
V současné době se pracuje na nové verzi přístroje miniLC 2 s upravenými technickými parametry a UV/VIS detektorem upraveným na širokospektrální verzi s cílem zkrátit dobu analýz, rozšířit skupiny detekovatelných látek a snížit limity detekce.

2.2 Detekce toxinů

Funkčnost přístroje miniLC 1 byla ověřena sérií testů se zaměřením na separaci a detekci aflatoxinů a dalších mykotoxinů (toxinů plísní), a to jak na komerčních standardech, tak na vzorcích izolovaných ze simulovaných přírodních zdrojů. Jedna analýza mykotoxinů trvá přibližně 15 minut včetně proplachu kolony, limit detekce se pohybuje v rozmezí 0,4–6 $\mu\text{g}/\text{l}$ pro jednotlivé aflatoxiny G2, G1, B2 a B1, což řádově odpovídá maximálnímu povolenému limitu pro přítomnost aflatoxinů v potravinách (obilovinách). Záznam analýzy je uveden na obr. 2.

Pro separace byly použity kapilární kolony (0,2 \times 100 mm) s náplní Fortis H₂O 3 μm a mobilní fáze solvent A (methanol : acetonitril 3 : 2) + solvent B (1% H₃PO₄ ve vodě) s gradientem od 5 % do 65 % solventu B v solventu A při průtoku 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ a teplotě 45 $^{\circ}\text{C}$. Směs standardů zahrnovala aflatoxiny G2, G1, B2, B1, ochratoxin B, zearalenon, ochratoxin A a kontrolní standard aloin A [11].

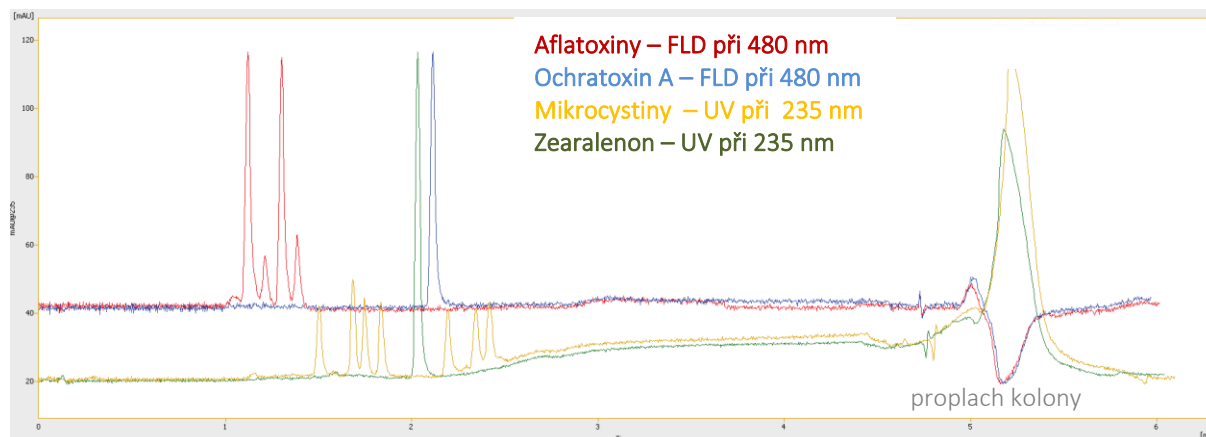
Obrázek 2: Analýza mykotoxinů na miniLC 1 se souběžnou UV detekcí při 265 nm a 340 nm a fluorescenční detekcí (FLD) při 480 nm (excitace při 365 nm).



Nová verze přístroje miniLC 2 umožňuje díky upravené technické konstrukci pumpy a ventilů zkrácení analýz na 6 min (3 minuty analýza + 3 min proplach kolony) se zachováním požadovaných separačních výstupů a se širšími možnostmi pro detekce a identifikace látek (při zohlednění omezení spojených s UV/VIS detekcí). Funkčnost přístroje byla ověřena sérií testů na standardech aflatoxinů a dalších mykotoxinů a mikrocytinů (toxinů sinic), jak dokresluje obr. 3.

Pro separace byla použita mikrokolona (0,3 × 50 mm) s náplní Kinetex s částicemi 2,6 μm a mobilní fáze gradient 15–80 % (v/v) methanol v 1% H₃PO₄ (aq.) při průtoku 25 μL/min a teplotě 45 °C. Standardy zahrnovaly směsi aflatoxinů (G2, G1, B2, B1), ochratoxin A, zearalenon a směsi mikrocytinů (RR, YR, LR, LY, LW, LF) + nodularin.

Obrázek 3: Samostatné analýzy směsí standardů toxinů na miniLC 2 vždy se souběžnou UV detekcí při 235 nm a 260 nm a fluorescenční detekcí (FLD) při 480 nm (excitace při 365 nm). Na záznamu jsou vybrané vlnové délky, při kterých je odezva nejvýraznější.



3. ZÁVĚR

Snaha o provedení rychlé detekce a identifikace nebezpečných látek přímo v místě události je hnacím motorem pro vývoj přenosných analytických přístrojů založených na různých analytických instrumentálních metodách. Technický vývoj konstrukčních součástí v uplynulých letech umožňuje miniaturizaci i takových analytických přístrojů, jejichž použití bylo doposud omezeno na stacionární laboratoře. Prezentované výsledky představují miniaturizovaný kapalinový chromatograf s UV/VIS/FLD detekcí, který je svými výsledky analýz srovnatelný s odpovídajícími robustními laboratorními HPLC přístroji. V budoucnu může přístroj najít uplatnění například při řešení environmentálních nebo průmyslových havárií spojených s únikem nebezpečných látek nebo při průzkumech nelegálních laboratoří či skládek, kde by situace vyžadovala on-site screening kapalných směsných vzorků včetně vodních vzorků obsahujících organické polutanty o nízké koncentraci.

Poděkování

Výzkum byl podpořen z projektu Bezpečnostního výzkumu MV ČR č. VI04000062 *Miniaturizace kapalinového chromatografu – rozšíření aplikačního spektra pro detekci a stanovení nebezpečných látek v podmínkách mobilní laboratoře.*

Použitá literatura

- [1] PETTIT J. J., DAVISSON C. W. Development of a portable liquid chromatograph for the analysis of pesticides. *Abstr Pap Am Chem Soc* 1980;180:4-ASCS.
- [2] OTAGAWA T., STETTER J.R., ZAROMB S. Portable liquid chromatograph for analysis of primary aromatic-amines in coal-derived materials. *J Chromatogr* 1986;360:252–9.
- [3] CHATZIMICHAIL S., RAHIMI F., SAIFUDDIN A., SURMAN A. J., TAYLOR-ROBINSON S. D., SALEHI-REYHANI A. Hand-portable HPLC with broadband spectral detection enables analysis of complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Commun Chem* 2021;4.

- [4] LI D., CHEN H., REN S., ZHANG Y., YANG Y., CHANG H. Portable liquid chromatography for point-of-care testing of glycosylated haemoglobin. *Sensors Actuators, B Chem* 2020;305:127484.
- [5] LAM S. C., COATES L. J., HEMIDA M., GUPTA V., HADDAD P. R., MACKA M., et al. Miniature and fully portable gradient capillary liquid chromatograph. *Anal Chim Acta* 2020;1101:199–210.
- [6] JAMES P. GRINIAS. The Potential for Portable Capillary Liquid Chromatography. *Spec Issues* 2020;6:15–24.
- [7] RAHIMI F., CHATZIMICHAIL S., SAIFUDDIN A., SURMAN A. J., TAYLOR-ROBINSON S. D., SALEHI-REYHANI A. A Review of Portable High-Performance Liquid Chromatography: the Future of the Field? *Chromatographia* 2020;83:1165–95.
- [8] SHARMA S., PLISTIL A., SIMPSON R. S., LIU K., FARNSWORTH P. B., STEARNS S. D., et al. Instrumentation for hand-portable liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2014;1327:80–9.
- [9] SHARMA S., TOLLEY L. T., TOLLEY H. D., PLISTIL A., STEARNS S. D., LEE M. L. Hand-portable liquid chromatographic instrumentation. *J Chromatogr A* 2015;1421:38–47.
- [10] ŠESTÁK J., PLANETA J., KAHLE V. Nanolitre-scale cell based on L-shaped silica capillary and optical fibre for absorption photometric detection in capillary liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 2019; 1073:99-108.
- [11] LUNEROVÁ K., ŠESTÁK J. Detekce a identifikace aflatoxinů pomocí přenosného kapalinového chromatografu pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní, Certifikovaná metodika SÚJCHBO, v. i. B2/AFL-mLC/2020, <https://www.sujb.cz/dokumenty-a-publikace/schvalene-metodiky>, 2020.