

Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod

New Trends in Liquid Chromatography and Their Utilization in Analysis of Beer and Brewery Raw Materials. Part 1. Theoretical Introduction

JANA OLŠOVSKÁ, MARIE JURKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Brewing and Malting PLC, Brewing Institute Prague, Lípová 15, CZ-120 44 Prague 2, Czech Republic*
e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Olšovská, J. – Jurková, M.: Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 2, s. 30–35.

V souvislosti se zvyšujícími se nároky na rychlost analýz v analytických laboratořích dochází k neustálému zlepšování instrumentálních technik. Článek se zabývá pokroky v nejrozšířenější separační technice, a to v kapalinové chromatografii. Její zcela nová modifikace, ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC), využívá principu separace na porézních částicích menších než 2 µm. Výhody UHPLC oproti klasické HPLC jsou až devítinásobné zkrácení doby analýzy, dvojnásobné zlepšení rozlišení a trojnásobné zlepšení citlivosti. To vede nejen k ohromné úspoře času, ale také nákladů na energii a organická rozpouštědla a jejich ekologickou likvidaci. Alternativou k UHPLC technice je použití kolon s povrchově porézními částicemi nebo kolon monolitních. UHPLC již našla své uplatnění také v pivovarské analytice.

Olšovská, J. – Jurková, M.: New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 1. Theoretical introduction. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 2, p. 30–35.

In connection with increasing requirements on high throughput analyses in the laboratories the instrumental techniques undergo continuous improvement. This article is focused on the progress in the most widespread separation technique, the liquid chromatography. Its novel modification, Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), uses the principle of separation on porous “sub-2 µm” particles. The advantages of UHPLC over the traditional HPLC are a nine-fold reduction of analysis time, double improvement of resolution, and triple improvement of sensitivity. It results not only in time saving but also in the cost of energy and organic solvents and their ecological disposal. An alternative to UHPLC is the use of columns with core-shell particles and/or monolithic columns. The UHPLC has already been successfully applied in the analysis of beer and brewery materials.

Olšovská, J. – Jurková, M.: Neue Trends in der Flüssigkeit – Chromatographie und ihre Anwendung in der Braurohstoffen- und in der Analyse des Bieres. Teil I. Die theoretische Einführung. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 2, S. 30–35.

Im Zusammenhang mit den steigenden Anforderungen an Analysengeschwindigkeit im analytischen Labor wird ständig die instrumentale Technik verbessert. Der Artikel befaßt sich mit dem Fortschritt in der am meisten angewandten Technik und zwar in der Flüssigkeit – Chromatographie. Ihre letzte Modifikation, ultra wirkende Flüssigkeit – Chromatographie (UHPLC = Ultra high performance liquid chromatography), die das Prinzip einer Separation auf den kleineren als 2 µm porösen Partikeln ausnützt. Die UHPLC Vorteile gegen die klassische HPLC sind folgende: eine neunmalige Verkürzung der Analysenzeit, zweimalige Verbesserung der Auflösung und dreimalige Verbesserung der Empfindlichkeit. Das führt zur enormen Zeit-, Energieersparnis, und Ersparnis an organische Lösungen, die Kosten auf umweltfreundliche Lösungsliquidation werden damit auch minimales. Zur UHPCL Technik gibt's als eine Alternative die Anwendung von Kolonnen mit oberflächigen porösen Partikeln oder von monolytischen Kolonnen. UHPCL hat ihre Anwendung auch in der Brauanalytik gefunden.

Klíčová slova: UHPLC, ultra účinná kapalinová chromatografie, HPLC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC kolony, kolony s povrchově porézní vrstvou, monolitní kolony, pivovarská analytika

Keywords: UHPLC, Ultra High Performance Liquid chromatography, HPLC, High Performance Liquid Chromatography, UHPLC columns, columns with core-shell particles, monolithic columns, brewing analytics

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejvíce rozšířené separační techniky běžně využívané v oblastech, jako jsou farmakologie, toxikologie, klinická analýza, dále v různých vědních oborech (Stroh et al. 2008, Pratet et al. 2004, Klein et Rivera 2004), a v neposlední řadě při analýze potravin, konkrétně piva a jeho surovin (např. Čulík et al. 2009).

V souvislosti se zvyšujícími se nároky na vysokou průchodnost vzorku laboratoří (jinými slovy počtem analýz za časovou jednotku) dochází k neustálému vývoji analytických technik. Také v oblasti HPLC došlo za poslední desetiletí k vývoji směrem k „rychlejším“ analýzám. Existují v podstatě dva základní přístupy k „rychlé chromatografii“. První vede k vývoji zcela nové generace chromatografických kolon a s tím i spojené instrumentace, operující při maximálních tlacích 100 MPa (15 000 PSI) (Swartz 2005). Pro tuto metodu byl zaveden a přijat název **Ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC)**. Druhý přístup zachovává klasickou HPLC instrumentaci, která pracuje při tlacích 40 MPa (6000 PSI), čemuž ovšem vyhovují jenom novější typy přístrojů. Zrychlení analýzy je v tomto případě zajištěno použitím speciálních kolon, zejména **kolon monolitních** a **kolon s povrchově porézními částicemi**.

1 INTRODUCTION

High performance liquid chromatography represents nowadays the most widespread separation technique applied commonly in pharmacy, toxicology, clinical analysis as well as in various research fields (Stroh et al. 2008, Pratet et al. 2004, Klein et Rivera 2004) and, last but not least, in food chemistry, namely for the analysis of beer and its raw materials (e.g. Čulík et al. 2009).

Increasing requirements on high throughput of samples motivate a continuous improvement of analytical techniques. During the last decade the HPLC technique has also become “faster”. There are two basic approaches to “fast chromatography”. The first one leads to the development of a completely new generation of chromatographic columns and instrumentation operating at 100 MPa (15 000 PSI) (Swartz 2005). This method was established and termed as **Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)**. The second approach maintains the classical HPLC instrumentation that works at a maximal pressure of 40 MPa (6000 PSI). However, only new types of HPLC instruments comply with this pressure limitation. Analysis acceleration is achieved by the use of special columns, namely **monolithic columns** and **columns with core-shell particles**.

2 UHPLC – ULTRA ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

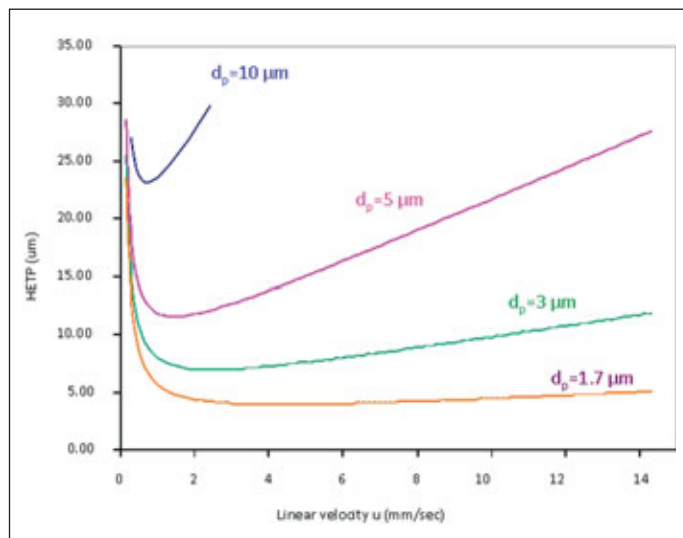
Složitý proces chromatografické separace je dán souborem interakcí analytu mezi mobilní fází (rozpuštědlem) a stacionární fází (zjednodušeně náplní kolony). Při průchodu analytu chromatografickou kolonou je analyt unášen mobilní fází, ke které má specifickou afinitu (je v ní rozpustný) a dále interaguje s fází stacionární (přenos hmoty). Kontakt analytu se stacionární fází je zprostředkován „difuzí“. Tu rozlišujeme u chromatografického procesu trojího druhu, difuzi podélnou (pohyb částic analytu v mobilní fází), vířivou (pohyb částic analytu k povrchu částic stacionární fáze a zpět) a difuzi uvnitř pórů částic v různých směrech (transport hmoty analytu do stacionární fáze a zpět). Matematické vyjádření součtu jednotlivých příspěvků difuze nazýváme jako *van Deemterova rovnice*

$$H = a(dp) + b/u + c(dp)^2u,$$

kteřá udává vztah mezi výškou teoretického patra **H** kolony (v převrácené hodnotě účinnosti kolony) a mezi lineární průtokovou rychlostí **u** mobilní fáze. Příspěvek **a** (podélná difuze) je ovlivněn pouze velikostí částic, příspěvek **b** (vířivá difuze) je nepřímo úměrná lineární průtokové rychlosti **u** a příspěvek **c** (difuze uvnitř pórů částic) je přímo úměrný lineární průtokové rychlosti a druhé mocnině velikosti částic stacionární fáze.

Od 70. let, kdy se v náplňových kolonách používaly částice o průměru 10 µm, došlo k ohromnému pokroku při vývoji technologií pro přípravu stále menších částic, a tudíž ke zlepšování parametrů separace. Na obr. 1 jsou znázorněny van Deemterovy křivky pro čtyři různé velikosti běžně používaných částic 10, 5 a 3 µm a nově 1,7 µm. Z něho vyplývá, že se snižujícím se průměrem částic roste účinnost separace (neboli zmenšuje se výška teoretického patra H). To je dáno skutečností, že při redukci částic zlepšíme převod hmoty, tím potlačíme rozmývání, neboli zvýšíme účinnost. Přitom lze při použití takto malých částic účinnosti dosáhnout při mnohem vyšších průtokových rychlostech, což má za následek rychlejší separaci. Této skutečnosti bylo využito při vývoji zcela nových částic, v angl. literatuře označovaných jako „sub-2 µm“ (Mellors et Jorgenson 2004), a to dalo impuls ke vzniku nové generace kapalinové chromatografie – *Ultra účinné kapalinové chromatografie (UHPLC)*. Díky této technologii lze zkrátit analýzy až devětkrát, citlivost zlepšit třikrát a dvakrát lze zlepšit rozlišení. Takové zrychlení se projeví nejen v úspoře energie a člověkohodiny, ale také v téměř desetinásobné úspoře organických rozpouštědel, a tedy i v nákladech na jejich bezpečnou likvidaci. Tuto bilanci společně s porovnáním obecného HPLC a UHPLC chromatogramu znázorňuje obr. 2. Je nutno zdůraznit, že kolony naplněné sorbentem s tak malým průměrem částic generují mnohonásobně vyšší zpětný tlak, než běžné chromatografické kolony, proto musel být těmto tlakům uzpůsoben zcela nově celý UHPLC instrument, který je schopen při tak vysokých tlacích (100 MPa, 15000 PSI) pracovat.

Obr. 1 Van Deemterova křivka pro částice o průměru 10, 5, 3 a 1,7 µm / Fig. 1 Van Deemter curves for 10, 5, 3, and 1.7 µm particle size



2 UHPLC –ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

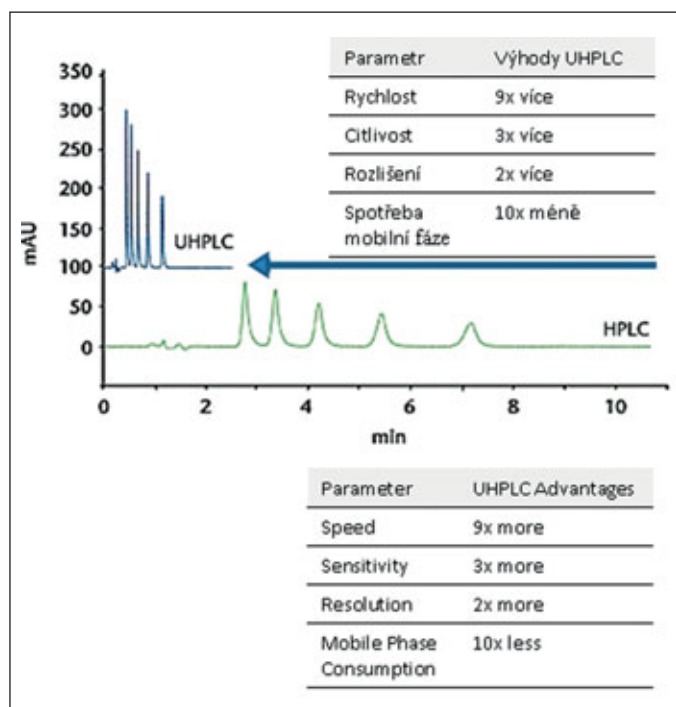
The complex process of chromatographic separation is determined by a set of analyte interactions between mobile (solvent) and stationary phase (in simplified terms column packing). During analyte passage through the chromatographic column the analyte is carried by the mobile phase. The analyte has specific affinity to the mobile phase (it is soluble in it) and simultaneously interacts with the stationary phase (mass transfer). The contact of analyte with the stationary phase is mediated by “diffusion”. There exist three types of diffusion during the chromatographic process - longitudinal diffusion (a movement of the analyte in the mobile phase), turbulent diffusion (a movement of the analyte to the surface of the stationary phase particles and back), and diffusion inside the pores of stationary phase particles in various directions (mass transfer of analyte to the stationary phase and back). The mathematic formulation of the contribution of individual diffusion modes is called *van Deemter equation*

$$H = a(dp) + b/u + c(dp)^2u.$$

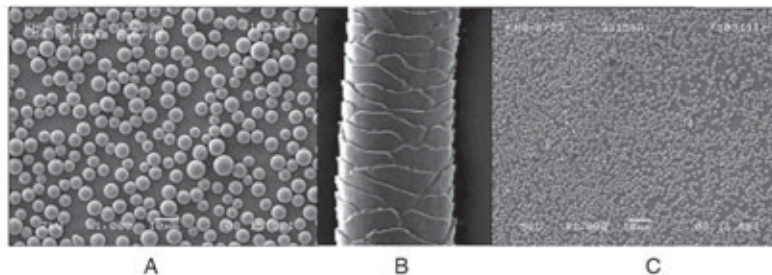
The equation determines the relationship between the height of theoretical plate **H** (inverse value of column efficiency) and linear velocity **u** of the mobile phase. The contribution **a** (longitudinal diffusion) is influenced only by particle size, contribution **b** (turbulent diffusion) is inversely proportional to the linear velocity **u**, and contribution **c** (mass transfer) is directly proportional to a square of particle size of the stationary phase.

Since the seventies, when the particles with 10 µm diameter were used, a huge progress has been achieved in the development of technologies for generation of smaller particles, which led to permanent improvement of separation parameters. Fig. 1 shows four *van Deemter* curves for different size particles that are commonly used (10, 5 a 3 µm and newly 1.7 µm). It follows from the figure that decrease of particle size leads to increase of separation efficiency (in other words to a decrease in plate height). This reflects the fact that the use of the smaller particle size ensures better mass transfer and simultaneously minimizes band broadening. It has impact on increased efficiency and, in addition, makes it possible to work with higher mobile phase flow and achieve thus a faster separation. This consideration led to the development of “sub-2 µm particles” (Mellors

Obr. 2 Porovnání HPLC a UHPLC chromatogramu (v tabulce je uveden výčet vylepšených parametrů UHPLC oproti HPLC) / Fig. 2 Comparison of UHPLC and HPLC chromatograms (The table lists the UHPLC characteristics superior to HPLC)



Obr. 3 Srovnání velikosti hybridní 1,7 μm částice (C) s velikostí běžné 5 μm částice (A) a průměrem lidského vlasu 60 μm (B) / Fig. 3 Size comparison of 1.7 μm hybrid particle (C), common 5 μm particle (A) and diameter of a human hair 60 μm (B)



Obr. 3 pro ilustraci znázorňuje, jak malé jsou nové 1,7 μm částice v porovnání s běžnou částicí 5 μm a s průměrem lidského vlasu (60 μm).

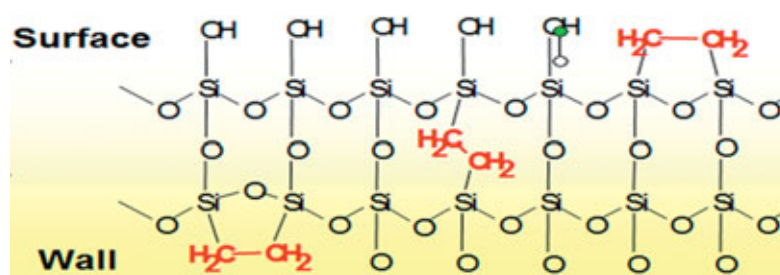
První informace zahrnující princip UHPLC (Schwartz 2005), jeho spojení s UV a MS detektorem (Plumb et al. 2004), popis nového typu „sub-2 μm “ částic a s tím související chemickou podstatou a technologií výroby nových UPLCTM kolon, byly uveřejněny v roce 2004 (Mellors 2004). Tyto kolony, Acquity UPLC BEH C18 (Waters) s průměrem částic 1,7 μm , jsou založeny na BEH technologii (z angl. bridged ethylene hybrid) (Swartz et Murphy 2005). Mezi silanolové skupiny jsou vloženy hybridní ethylenové můstky (viz obr. 4), které fungují jednak jako endkapingové skupiny a navíc zpevňují celkovou strukturu takto připravené silikagelové fáze. To udává kolonám jak vysokou mechanickou odolnost (max. tlak 15 000 PSI), tak i vysokou odolnost chemickou, a proto můžeme na takovýchto kolonách měřit v širokém rozsahu pH. V alkalické oblasti je to až do pH cca 12, v kyselé oblasti mají tyto kolony stabilitu v závislosti na použitém ligandu, a to v oblasti pH 1-2. Navíc jsou odolné vůči jevu zvanému „krvácení kolony“ (angl. bleeding), neboli vymývání ligandu z nosné fáze. V současné době je již na trhu celá škála UHPLC kolon se všemi obvyklými ligandy, např. BEH C18 a C8 (nerozvětvený alkylový řetězec pro klasickou reverzní chromatografii), BEH Shield RP18 (alkylový řetězec s vloženou polární, karbamátovou skupinou, kombinuje hydrofobní a hydrofilní vlastnosti kolony, vhodná pro polyfenolické látky), BEH Phenyl (fenylový ligand ukotvený na C6 alkylový, vhodné pro látky s benzenovým jádrem), BEH Amidová kolona (amidová skupina, dobře zadržuje látky, které jsou pro reverzní chromatografii již moc polární), BEH HILIC (BEH částice bez ligandu, vhodné pro velmi polární látky, pro eluci využívá vodných fází s malými obsahy organického modifikátoru) a mnoho dalších. Délka těchto kolon je 2, 3, 5, 10 a 15 cm, nejčastěji se používají kolony o délce 5 cm. Průměr kolony pro spojení s UV detektorem je nejčastěji 2,1 mm, pro spojení s MS detektorem 1 mm. Tak jako je tomu u klasické chromatografie, je kolona chráněna předkolonkou a navíc speciálním filtrem, který kolonu chrání před případnými nečistotami z mobilní fáze. Malý průměr částic v koloně klade vysoké nároky jak na přípravu mobilní fáze, kterou je nutno předem filtrovat přes membránový filtr 0,2 μm , tak na přípravu vzorku, který je nutno před dávkováním na kolonu filtrovat nebo centrifugovat.

O skutečnosti, že byl nový princip UHPLC všeobecně přijat mezi analytickou veřejností, svědčí nejen stoupající počet výrobců UHPLC kolon s částicemi 1,5–2 μm (např. Waters – Acquity BEH kolony, Restek – Pinnacle® DB kolony, Grace – Vision HT kolony, Thermo Scientific – Hypersil GOLD, Agilent – Eclipse Plus C18 a StableBond SB-C18, Perkin Elmer – Brownlee Analytical DB C18), ale i počet výrobců UHPLC chromatografů. Kromě firmy Waters (chromatograf Acquity), která danou technologii jako první vyvinula, dodávají dnes na trh chromatografy s podobnými vlastnostmi např. firmy Agilent (1200RRLC, Infinity), ThermoElectron (Acella High Speed), Shimadzu (ProminenceUFLC), Dionex (RSLC UltiMate 3000), Perkin Elmer (Flexar) a další. V literatuře lze nalézt dvě označení pro ultraúčinnou chromatografii UPLC a UHPLC, která lze považovat za synonyma. Jelikož technologii UPLC uvedla poprvé na trh firma Waters, která si zkratku UPLCTM ochránila jako „trade mark“, obecně se pro

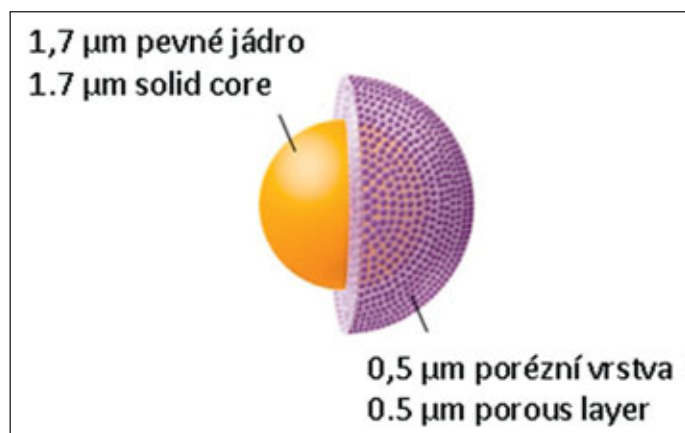
et Jorgenson 2004) providing an impetus for evolving Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). Using this technology, the analysis time can be reduced 9 times, sensitivity can be improved 3 times, and resolution 2 times. Such reduction of the time of analysis results not only in saving of energy and man-hours but also in 10-fold reduced demand for organic solvents and in reduced costs of safe waste disposal. Evaluation of analytic parameters and comparison of general HPLC and UHPLC chromatograms is demonstrated in Fig. 2. It should be noted that columns packed with sorbent with such small particle size generate much higher back pressure than common chromatographic columns. Hence, a new UHPLC instrument had to be developed to be able to work under ultra-high pressures such as 100 Mpa (15 000 PSI). Fig. 3 demonstrates the size of new 1.7 μm particle in comparison with both a common 5 μm particle and the diameter of human hair (60 μm).

The information about the first commercially available Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) (Schwartz 2005) system including subsequently the principle of novel ultra-fast chromatography, description of new sub-2 μm particles and related new column chemistry and technology (Mellors 2004), full-scale hardware, new designed UV detector, and connection with MS detectors (Plumb et al. 2004) was published in 2004. These columns, Acquity UPLC BEH C18 (Waters), packed with 1.7 μm particles are based on BEH (bridged ethylene hybrid) technology (Swartz et Murphy 2005). Between silanol groups are inserted hybrid ethylene bridges (see Fig. 4), which function as end-capping groups. Furthermore, the bridges fix the overall structure of this silica gel-based phase. This endows the columns with excellent mechanical robustness (max. pressure limit 15000 PSI) and chemical stability in a wide pH range. These columns can therefore be used in alkali pH range up to pH 12; acidic range up to pH 1-2, but this value depends on the column ligand used. In addition, these columns are resistant to „column bleeding“. A wide range of columns with various ligands is currently available on the market. They include BEH C18 and C8 (linear alkyl chain for classical reverse chromatography), BEH Shield RP18 (alkyl chain with inserted polar carbamate group, which combines hydrophobic and hydrophilic properties of the column and is convenient for polyphenolic compounds), BEH Phenyl (phenyl ligand on C6 alkyl chain convenient for the compounds with benzene nucleus), BEH Amide column (amidic group that retains well compounds too polar for reverse chromatography), BEH HILIC (BEH particles without a ligand, convenient for extremely polar compounds; elution uses aqueous phases with low organic content), etc. The lengths of these columns are 2, 3, 5, 10, and 15 cm, the most commonly used column has 5 cm. The inner diameter of the columns is mostly 2.1 mm and 1 mm when connected with UV and MS detector, respectively. Like the classical column, the column is protected by a pre-column and additionally by a special filter, which protects the column from potential impurities from the mobile phase. The small particle size poses demands on both the mobile phase and sample preparation. Mobile phase must be filtered through 0.2 μm membrane filter and the sample has to be filtered or centrifuged prior to analysis.

Obr. 4 Znárodnění chemické struktury hybridní BEH částice s hybridními ethylenovými můstky / Fig. 4 Illustration of the chemical structure of the hybrid BEH particle with hybrid ethylene bridges



Obr. 5 Částice s porézní vrstvou tvořená pevným jádrem (1,7 μm) a tenkou porézní vrstvou (0,5 μm) / Fig. 5 The core-shell particle formed by solid core (1.7 μm) and a thin porous layer (0.5 μm)



tuto technologii, přístroje a kolony dalších výrobců přijalo společné označení UHPLC.

Přednosti UHPLC byly využity i při analýzách piva a pivovarských surovin a řada těchto aplikací je výsledkem vědecké práce kolektivu autorů z VÚPS, a.s. Nejnovější aplikací, publikovanou v mezinárodním vědeckém časopisu v roce 2011, je stanovení ochratoxinu A v pivovarských surovinách, pívu (Běláková et al. 2011) a také ve vínu. Převedením původní metodiky HPLC na UHPLC se redukovala doba analýzy z původních 10 min na 2 min. Stejně je tomu tak i v metodě stanovení kyseliny ferulové v ječmeni a sladu (Běláková et al. 2010), kde byla původní doba analýzy 12 min zkrácena na pouhé 2 min. Stejný kolektiv autorů vyvinul řadu dalších UHPLC metodik, které patří do souboru metod VÚPS, a.s. Jsou to kromě stanovení zmíněné kys. ferulové i ostatní fenolické kyseliny (kumarová apod.), dále stanovení vitaminů E a skupiny B v pívu a pivovarských surovinách, stanovení patulinu v pívu a jeho surovinách, v nealko nápojích i víně, anebo silymarinu v extraktu Ostropestřce.

V dalších číslech časopisu uvedeme podrobnější srovnání HPLC a UHPLC na příkladech stanovení α - a β -hořkých kyselin ve chmelu a chmelových preparátech a stanovení cis/transizomerů iso- α -hořkých kyselin v pívu metodami UHPLC, které byly vyvinuty na VÚPS, a.s.

3 KOLONY S POVRCHOVĚ PORÉZNÍMI ČÁSTICEMI

V případě, že uživatel nemá možnost investovat do nového UHPLC přístroje a nechce si pořizovat nový chromatograf, ale použít HPLC přístroj stávající, má alternativní možnost, jak zrychlit chromatografický proces. V takovém případě může pro separaci použít chromatografické kolony s tzv. „povrchově porézními částicemi“, v angličtině označovaných jako „fused-core silica“ nebo „core-shell particles“. Tyto kolony pracují při běžných tlacích (max asi 6000 PSI), a jsou tedy s většinou HPLC instrumentů kompatibilní. Částice, jak je znázorněno na obr. 5, jsou tvořeny pevným jádrem o průměru asi 1,7 μm a porézní silikagelovou slupkou o hloubce asi 0,5 μm (tyto rozměry se liší $\pm 0,1$ μm podle výrobce), v jejichž pórech dochází k difuzi analytu a přenosu hmoty. Jelikož celkový průměr částic je 2,7 μm , negenerují tyto částice v koloně tak veliký odpor jako „sub-2 částice“. Přitom je hloubka porézní slupky srovnatelná s průměrem „sub-2 částic“. To se projevuje ve srovnatelných separačních vlastnostech neboli ve srovnatelné účinnosti a rozlišení v porovnání s UHPLC. To, že analyt nemusí difundovat díky rigidnímu jádru skrz celou částici, zkrátí jeho dráhu a tedy prodlouží v koloně, což má za následek zrychlení analýzy při zachování parametrů separace.

Od roku 2010 bylo vydáno mnoho prací, které potvrzují, že kolony s povrchově porézními částicemi našly v praxi vysoké uplatnění, a že jsou jejich separační schopnosti téměř srovnatelné se „sub-2 částicemi“ (Abraham et al. 2010, Tylová et al. 2011). Tyto kolony, např. Halo (Mac-Mod Analytical), Ascentis Express (Sigma-Aldrich), Kinetex (Phenomenex) a nebo Poroshell (Agilent), jsou již dostupné v široké

An increasing number of UHPLC columns with particle size ranging from 1.5–2 μm (e.g. Waters – Acquity BEH columns, Restek – Pinnacle® DB columns, Grace – Vision HT columns, Thermo Scientific – Hypersil GOLD, Agilent – Eclipse Plus C18 a StableBond SB-C18, Perkin Elmer – Brownlee Analytical DB C18), and the rising number of UHPLC instrument producers give evidence that UHPLC was accepted by analytical public. Apart from the Waters company (Acquity), which was the pioneer of this technology, other producers of UHPLC chromatographs with similar parameters are on the market, e.g. Agilent (1200RRLC, Infinity), ThermoElectron (Acela High Speed), Shimadzu (ProminenceUFLC), Dionex (RSLC Ultimate 3000), Perkin Elmer (Flexar). Two synonymous terms, UPLC and UHPLC, can be found in the literature. Since UPLC™ (Ultra Performance Liquid Chromatography) technology was applied as the first in the world by the Waters Company, the term UPLC can be taken as a trade mark. Hence, UHPLC was accepted as the common term for this technology.

The advantages of UHPLC have been made use of also in the analysis of brewing materials and beer. Many applications were developed by the research team from RIBM (Research Institute of Brewing and Malting). A recent application, which was published in an international scientific journal in 2011, is the determination of ochratoxin A in brewing raw materials and beer (Běláková et al. 2011) and also in wine. The transformation of the original HPLC method to the new UHPLC method brought a reduction of the analysis time from the original 10 min to 2 min. The same result was obtained for the method of ferulic acid determination in barley and malt, in which the original analysis time of 12 min was reduced to 2 min (Běláková et al. 2010). The same authors developed more UHPLC methods, which are used in RIBM in many applications. These include, apart from the determination of ferulic acid, also methods for the determination of other phenolic acids (cumaric acid etc.), vitamin E and vitamins from the B group in beer and brewery raw materials, patulin in beer, brewery raw materials, wine and nonalcoholic beverages, and/or determination of silymarin in an extract of Silybum Marianum.

In the following issues of this journal we shall present a more detailed comparison of HPLC and UHPLC method illustrated on examples of the determination of α - and β -acids in hop and hop products and determination of iso- α -acids in beer developed in RIBM.

3 CORE-SHELL PARTICLE COLUMNS

Even if the user cannot purchase a new UHPLC instrument and is bound to use a current HPLC instrument, he can still speed up the separation process. He can use columns with “fused-core silica” or synonymous “core-shell particles” working at common pressures (max 6000 PSI) that are compatible with the majority of HPLC instruments. The particles (see Fig. 5) are composed of a solid core (about 1.7 μm) surrounded by a thin porous silica layer (about 0.5 μm); their exact dimensions vary depending on the producer. The analyte can diffuse only into the pores of the thin porous ± 0.1 μm layer, where mass transfer takes place. The diameter of these 2.7 μm particles results in the generation of lower back pressure than in the case of “sub-2 particles”. At the same time, the thickness of the porous silica layer is comparable with the diameter of “sub-2 particles”. These characteristics of the “core-shell particles” ensure separation efficiency and resolution similar to UHPLC. Lastly, the analyte does not have to diffuse to the rigid core through the whole particle, which results in a shortening of diffusion path, the delay in the column, and in reduction of analysis time without deterioration of separation parameters.

Many papers published since 2010 have confirmed both the broad utility of core-shell columns in practice and their separation properties comparable with those of “sub-2” particles (Abraham et al. 2010, Tylová et al. 2011). These columns, having a wide spectrum of various ligands, e.g. Halo (Mac-Mod Analytical), Ascentis Express (Sigma-Aldrich), Kinetex (Phenomenex) and/or Poroshell (Agilent) are currently available.

Determination of quinolones in eggs is an example of application of core-shell columns in food analysis. The column Kinetex was used and analysis time was reduced by half (Jiménez et al. 2011). The same column was also used for the first time for beer analysis for determination of iso- α -acids and some reducing forms of tetrahydroiso- α -acids (Koerner et al. 2011).

škále běžných ligandů. Příkladem využití v potravinářské analytice je stanovení chinolonů ve vejcích, metoda byla díky použití kolony Kinetex dvakrát zrychlena (Jiménez et al. 2011). V analýze piva a jeho surovin je první aplikací na koloně Kinetex (2,6 μm) rychlé stanovení iso-alfa-hořkých kyselin a některých redukováných forem tetrahydro-iso-alfa kyselin (Koerner et al. 2011).

4 MONOLITNÍ KOLONY

Dalším a v posledních letech rozšířeným způsobem, jak urychlit chromatografický proces, je použití monolitních kolon. Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které jsou tvořeny jednotlivými částicemi sorbentu o definované velikosti, monolitické HPLC kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Oproti typickým kolonám plněným částicemi, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v kolonách usku- tečňuje značná část průtoku. Proto musí mobilní fáze protékat póry monolitu, které jsou mnohem větší, než běžné póry v kolonách plně- ných částicemi. Monolitické kolony mají dva typy pórů: a) velké póry (makropóry) zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze monolitem a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, b) středně velké póry (mesopóry) poskytují monolitu dostatečně vel- íký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umož- ňuje provozování monolitů při značně vysokých rychlostech mobil- ních fází bez přílišného zvýšení tlaku (McCalley 2002) a zároveň bez ztráty separační účinnosti, a to i pro separované makromolekuly (bí- koviny, syntetické polymery) (Švec 2009).

Monolitické kolony se připravují hydrolytickou polymerací tetrame- thoxysilanu nebo tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octo- vé v přítomnosti polyethylenglykolu. Technologie výroby umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou, kdy vznikají vý- hradně mesopóry a makropóry vhodných a nastavitelných rozměrů. Monolitickou stacionární fází na bázi silikagelu připravil, popsal a aplikoval např. profesor Tanaka se spoluautory (Minakuchi et al. 1996). Řada těchto kolon je již komerčně dostupných, např. Chromo- lith (Merck) nebo Onyx™ (Phenomenex v licenci Merck).

Z reálných aplikací a porovnávacích studií monolitických a kon- venčních reverzních kolon vyplývá, že si také tyto kolony našly své uplatnění při rychlé chromatografii a u řady uživatelů nacházejí stále větší oblibu (Samanidou et al. 2004, Nováková et al. 2004). Také v analýze potravin se tato technologie začíná uplatňovat, autoři (Tzanavaras et Themelis 2007) uveřejnili metodiku simultánního sta- novení kofeinu, theobrominu a theofyllinu v kávě a nealkoholických nápojích. Doba analýzy nepřesáhla 1 min, retenční čas posledně eluujícího kofeinu byl 0,7 min.

5 ZÁVĚR

O tom, že se UHPLC stala v posledním desetiletí oblíbenou a roz- šířenou separační technikou, svědčí ohromné množství vydaných publikací. Z těchto prací vyplývá, že UHPLC se využívá jak k separa- ci malých organických molekul, tak i velkých molekul jako jsou protei- ny a peptidy. Publikované výsledky potvrzují avizované výhody UHPLC jako jsou její rychlost, citlivost a dobré rozlišení. Své uplatně- ní nachází UHPLC také v analýze potravin a začíná též pronikat do oblasti pivovarství a sladovnictví.

Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM6019369701.

Autoři děkují společnosti Waters ČR za zapůjčení přístroje Acquity UPLC.

Literatura / References

- Abraham, A., Al-Sayah, M., Skrdla, P., Bereznitski, Y., Chen Y., Wu N., 2010: Practical comparison of 2.7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separations in pharmaceutical pro- cess development. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 1, 131–137.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2011: De- termination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chem.* **126**, 321–325.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2010: Sle- dování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí. *Kvasny Prum.* **56**, 6, 56–59.

4 MONOLITHIC COLUMNS

Another approach to accelerating chromatographic process is the use of monolithic columns, which are gaining increasing popularity. In contrast to conventional stationary phases, which are formed by individual sorbent particles of defined size, the monolithic columns are formed by a single piece of porous material completely filling the interior of the column. Thus, monolithic columns do not contain any space between particles through which the majority of the flow pro- ceeds in conventional columns. That's why the mobile phase has to pass through the monolith pores that are much bigger than the pores in columns with common particles. Monolithic columns have two types of pores. Macropores facilitate fast convective flow of mobile phase through the monolith and significantly accelerate mass trans- fer between mobile and stationary phase. Mesopores provide suffi- ciently large surface and also a high separation capacity. This struc- ture allows monoliths to operate at considerably high flow of mobile phase without excessive pressure increase (McCalley 2002) and without losses of separation efficiency even for separated macromo- lecules (peptides, synthetic polymers) (Švec 2009).

Monolithic columns are synthesized by hydrolytic polymeration of tetramethoxysilane or tetraethoxysilane in aqueous solution of acetic acid in the presence of polyethylene glycol. Manufacturing technolo- gy enables monolith preparation with accurately defined structure and with macropores and mesopores with convenient and adjusta- ble sizes. The monolithic stationary phase was prepared, described and applied by, e.g., Prof. Tanaka's group (Minakuchi et al. 1996). Many of these columns are already commercially available, e.g. Chromolith (Merck) or Onyx™ (Phenomenex in the licence of Merck).

As follows from the real applications and comparative studies of monolithic and conventional reversed phase columns, these col- umns have also found application in the area of fast chromatography and the number of their users continually increases (Samanidou et al. 2004, Nováková et al. 2004). The technology starts to be used also in food analysis. Tzanavaras et Themelis (2007) published a method of simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in coffee and non-alcoholic beverages. The analysis time did not exceed 1 min and the retention time of the last eluting caffeine was 0.7 min.

5 CONCLUSION

The huge quantity of published articles gives evidence that in the last decade UHPLC has become a favorite and widespread separa- tion technique. It follows from these article that UHPLC is used for the separation of both small and large organic compounds such as proteins and peptides. The published data confirm the presumed ad- vantages of UHPLC such as its high speed, sensitivity and good resolution. UHPLC technique found its use also in food analysis and begins to spread into the area of brewing and malting.

Acknowledgements

The financial support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM6019369701) is gratefully acknowledged.

The Authors thank to Waters CZ for lending of Acquity UPLC equipment.

Čulík, J., Jurková, M., Horák, T., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Karásek, P., Roth, M., 2009: Extraction of bitter acids from hops and hop products using Pressurized Solvent Extraction (PSE). *J. Inst. Brew.* **115**, 3, 220–225.

Jiménez, V., Companyó, R., Guiteras, J., 2011: Validation of a me- thod for the analysis of nine quinolones in eggs by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* **85**, 1, 596–606.

Klein, E. J., Rivera, S. L., 2000: A review of criteria functions and re- sponse surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **23**, 14, 2097–2122.

- Koerner, P. J., Trass, M., Layne, J.: Application list TN-1085, 2011. www.Phenomenex.com.
- McCalley, D. V., 2002: Comparison of conventional microparticulate and a monolithic reversed-phase column for high-efficiency fast liquid chromatography of basic compounds. *J. Chromatogr.*: **A 965**, 1-2, 51-64.
- Mellors, J. S., Jorgenson, J., 2004: Use of 1.5- μ m Porous Ethyl-Bridged Hybrid Particles as a Stationary-Phase Support for Reversed-Phase Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*: **76**, 18, 5441-5450.
- Minakuchi, M., Nakanashi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., 1996: Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **68**, 19, 3498-3501.
- Nováková, L., Matysová, L., Solichová, D., Koupparis, M. A., Solich, P., 2004: Comparison of performance of C18 monolithic rod columns and conventional C18 particle-packed columns in liquid chromatographic determination of Estrogel and Ketoprofen gel. *J. Chromatogr.*: **B 813**, 1-2, 191-197.
- Plumb, R., Castro-Perez, J., Granger, J., Beattie I., Joncour, K., Wright, A., 2004: Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 19, 2331-2337.
- Pratet, F., Herzler, M., Erxleben, B. T., 2004: Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, 11, 1325-1340.
- Samanidou, V. F., Ioannou, A. S., Papadoyannis, I. N., 2004: The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction-a comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. *J. Chromatogr.*: **B 809**, 1, 175-182.
- Stroh, J. G., Petucci, C. J., Brecker, S. J., Nogle, L. M., 2008: Sub-2 μ m HPLC coupled with sub-ppm mass accuracy for analysis of pharmaceutical compound libraries. *J. Sep. Sci.*: **31**, 21, 3698-3703.
- Swartz, M. E., 2005: UPLC™: An Introduction and Review. *J. Liq. Chrom.*: **28**, 7/8, 1253-1263.
- Swartz, M. E., Murphy, B., 2005: New frontiers in chromatography. *American Laboratory*: **37**, 3, 22-27.
- Švec, F., 2009: What Is Going on in Today's Liquid Chromatography? *Chem. Listy*: **103**, 4, 2009, 226-270.
- Tylová, T., Kameník, Z., Flieger, M., Olšovská, J., 2011: Comparison of LC Columns Packed with 2.6 μ m Core-Shell and Sub-2 μ m Porous Particles for Gradient Separation of Antibiotics. *Chromatographia*: **74**, 1-2, 19-27.
- Tzanavaras, P. D., Themelis, D. G., 2007: Development and validation of a high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column. *Anal. Chim. Acta* **581**, 1, 89-94.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 5. 11. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 5. 1. 2012



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Jedním z projektů podpořených v rámci 31. výzvy OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost, která byla zaměřena na oblast podpory 2.4. Partnerství a sítě, je projekt nazvaný PODPORA TRANSFERU INOVACÍ V ZEMĚDĚLSTVÍ, POTRAVINÁŘSTVÍ A OBLASTI BIOENERGIE DO PRAXE. Projekt byl zahájen 1. února 2012, potrvá dva roky a bude realizován partnerskou sítí propojující tři významné moravské univerzity, prestižní zemědělské výzkumné ústavy, Moravskoslezský energetický klastr a jihomoravské Město Velké Pavlovice. Hlavním cílem projektu je podpořit vzájemnou spolupráci při transferu inovací v zemědělství, potravinářství a bioenergetice.

Konzorcium pod vedením Zemědělského výzkumu, spol. s r.o., si klade za cíl vytvořit a propojit organizace špičkového výzkumu s pracovišti aplikačního sektoru a veřejné správy, vytvořit odborné zázemí rozvoje lidských zdrojů pro činnost v klasrech a platformách agrárního výzkumu a bioenergetiky a motivovat mladé vědce a studenty praktickými ukázkami využití výsledků VaV v praxi.

Partnery projektu jsou Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, zastoupená Ústavem technologie a mikrobiologie potravin a Ústavem biochemie a chemie potravin, Fakulty technologické; Mendelova univerzita v Brně zastoupená Ústavem pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství Fakulty Agronomické; VYSOKÁ ŠKOLA BAŇSKÁ-TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA, zastoupená centrem ENET podpořeném v rámci druhé prioritní osy OP Výzkum a vývoj pro inovace; dále Město Velké Pavlovice, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.; Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. zastoupený svým brněnským pracovištěm; dále Agritec Plant Research s.r.o. a Moravskoslezský energetický klastr, občanské sdružení.