

QUO VADIS KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE?

Článek je věnován památce prof. Ing. Rudolfa Zahradníka, Dr.Sc.

FRANTIŠEK ŠVEC

*Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
svecfr@faf.cuni.cz*

Došlo 5.2.21, přijato 15.2.21.

Klíčová slova: chromatografie, historie, přítomnost, budoucnost

Když ruský biolog Michail S. Cvet pracující na univerzitě ve Varšavě na začátku dvacátého století potřeboval rozdělit směs rostlinných pigmentů chlorofylů a karotenoidů, nenašel pro tuto operaci žádný vhodný nástroj. Nezbylo mu tedy, než aby si ho sám vymyslel¹. Svou metodu nazval chromatografií a dodnes není jasné, zda do tohoto názvu, v němž figuruje řecké slovo chroma, tedy barva, a který překonal již dobu delší než jedno století, zakomponoval vlastní příjmení (rusky ЦВЕТ znamená rovněž barva) nebo jestli našel inspiraci v barevných vrstvách rozdělených látek. Jisté však je, že nemohl tušit, jak populární se jím vynalezená metoda stane. Dnes se chromatografie řadí na třetí místo nejčastěji používaných analytických metodik hned za vážení a měření pH. Samozřejmě, dnešní chromatografie má s tou Cvetovou pramálo společného. Nicméně její koncept zůstal nezměněn. Třeba připomenout, že Cvet značně předběhl dobu a rozkvětu se chromatografie dočkala až od čtyřicátých let minulého století.

V té době Archer Martin a Robert Synge zkoumali rozdělovací (partiční) chromatografii, za což se jim po zásluze dostalo v roce 1952 Nobelovy ceny². K dalšímu přelomu došlo ve zhruba polovině šedesátých let, kdy několik skupin začalo podrobně studovat kolonovou kapalinovou chromatografii. Vývoj metody, kterou dnes nazýváme vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií neboli HPLC, je připisován dvojici Csaba Horváth a Seymour Lipsky³. Ve své práci použili kolonu naplněnou stacionární fází s velikostí částic zhruba 50 μm v doma vyrobeném zařízení, které umožnilo docílit vcelku kvalitní separace.

V dalších letech byl vývoj kapalinové chromatografie diktován dvěma požadavky, jimiž byly zvýšení rychlosti separací a jejich účinnosti. Těchto protichůdných požadavků však není snadné dosáhnout zejména proto, že jsou rukojmími přenosu hmoty v separačním systému a ten pak závisí na molekulární difuzi, která je rychlost řídicím dějem. Jak víme, difuze je obecně pomalá a pro větší molekuly to platí o to více. Protože difuzi nelze jednoduše urychlit, cestou ke zrychlení separací je zkrácení vzdálenosti,

po kterou se dělené molekuly musí pohybovat. A tak, ve jménu Martina a Synge, kteří předpovídali, že vysoký tlak a malé částice povedou k účinným separacím, se velikost částic stacionárních fází pozvolna zmenšovala. Ačkoliv kolony plněné 2 μm neporézními částicemi připravenými ze siliky, tedy oxidu křemičitého, opatřené na vnějším povrchu C18 řetězci byly komerčně dostupné od druhé poloviny devadesátých let, vzhledem k malému specifickému povrchu méně než 2 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ nedosáhly velké popularity. Rozmach náplní kolon s částicemi menšími než 2 μm se tedy dostavil až poté, co v tomto století přišly na trh jejich porézní varianty. Kolony plněné sub-2 μm stacionárními fázemi se tak stávají běžným standardem. Jinými slovy, velikost částic stacionární fáze se za padesát let zmenšila více než 25krát. To se samozřejmě neobešlo bez významného vývoje i v oblasti přístrojové, neboť použití kolon běžné délky 10–15 cm plněných takto drobnými částicemi vyžaduje použití tlaků na jejich vstupu převyšujících 100 MPa (1000 bar).

Jinou cestou omezení vlivu difuze bez zabřednutí do oblasti vysokých tlaků, tedy i nákladnějších chromatografických systémů, je aplikace částic o velikosti 5 μm kompatibilních s tlaky běžných zařízení, tedy méně než 40 MPa, které ovšem nejsou kompletně porézní. Jádro takových částic je neporézní a pouze zhruba 1 μm silná povrchová vrstva je porézní. Tím se difuzní vzdálenost zkrátí právě jenom na onen 1 μm . Tyto povrchově porézní částice se staly záhy velice oblíbenými a jimi naplněné kolony nacházejí široké uplatnění.

Zajímavou se stala kombinace obou přístupů, kdy i částice s průměrem pouhých 1,3 μm mají povrchově porézní strukturu. Tyto kolony jsou rovněž komerčně dostupné, umožňují docílit účinností až 400 000 teoretických pater na metr, avšak k jejich použití je zapotřebí vysokotlakých zařízení.

Odpoutat se od vysokých tlaků lze i jinak. Klasická kapalinová chromatografie používá jako mobilní fáze vodu a organická rozpouštědla, která mají poměrně vysokou viskozitu. Naproti tomu kapaliny v superkritickém stavu se vyznačují viskozitou mnohem menší. Příkladem budiž superkritický oxid uhličitý, o jehož použití v chromatografii se uvažovalo již před šedesáti lety. Hlavním nedostatkem těchto časných přístupů byl problém s kontrolou teploty a tlaku v systému. To se podařilo překonat až nedávno po zavedení moderní přístrojové techniky s chlazenou pumpou a elektronické kontroly tlaku, což vedlo k dnešnímu rozkvětu této metodiky.

Nakonec až zavedení úplně nového formátu stacionárních fází, monolitů, na začátku devadesátých let⁴ umožnilo rychlé a účinné separace i velkých polymerních molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny či syntetické polymery. Stalo se tak proto, že difuzní pohyb byl omezen na minimální vzdálenost a přenos chromatografovaných

entit porézní strukturou se děl s použitím konvekce, která je mnohem rychlejší a snáze ovlivnitelnější než difuze. Oproti tradičním kolonám obsahujícím lože složené z jednotlivých částic je monolit reprezentován jedním kontinuálním kusem polymerního materiálu, kterým může být anorganický či organický polymer. Díky specifickému uspořádání porézní morfologie je monolit použitelný i při vysokých průtokových rychlostech kapalin, které však lze docílit při nízkém tlaku.

Tolik tedy zhruba minulost kolonové kapalinové chromatografie. Co nás však může čekat v letech příštích? Především je velice pravděpodobné, že požadavky na separaci čím dále tím více komplexních směsí porostou. Stačí se jenom podívat na rychlý rozvoj proteomiky či metabolomiky, nemluvě o téměř každodenních přírůstcích nových -omik. Tak např. kontrola potravin (foodomika), které představují jiné komplexní směsi, nabývá rovněž rychle na významu v souvislosti s globalizací produkce a transferů potravin. Také monitorování životního prostředí, jehož komplexita postupně roste, bude vyžadovat nové přístupy k separacím a detekcím. Používání složitější dvoudimenzionální chromatografie je již v plném běhu. Bude stačit? Nebude potřeba přidat i třetí dimenzi? Tradiční cestou dalšího separování píků rozdělených v koloně předešlé dimenze na koloně následující to nejspíš z mnoha důvodů nepůjde. Proto Peter Schoenmakers přišel s vizionářským nápadem použít k třídimenzionální separaci krychli⁵. První dvě dimenze separace by proběhly na povrchu stěny této krychle, zatímco třetí paralelně v jejím objemu. Je notoricky známou skutečností, že kolony představují rozhodující část chromatografických přístupů, bez nichž se prostě nelze obejít. Věnujme se tedy zejména tomuto tématu, který jsme diskutovali již výše.

Jakkoliv se neustále vedou diskuse o tom, zda se velikost částic určených k plnění chromatografických kolon bude i nadále zmenšovat, odpověď není jasná. Výroba částic o stále menších velikostech je zcela jistě možná, protože odpovídající technologie byly vyvinuty. Oříškem zůstává jejich plnění do kolon tak, aby se docílilo požadované vysoké účinnosti. Druhým problémem je nutnost používání velmi vysokých tlaků. I tento úkol byl zvládnut např. Jamesem Jorgensonem, ale jenom v akademickém prostředí a s výzkumným zařízením⁶. Širokého uplatnění však použití ultravysokých tlaků sotva dosáhne, nebude-li na trhu k dispozici komerční systém. Zatím se nezdá, že by poptávka po takových zařízeních byla dostatečná k tomu, aby firmy vyrábějící chromatografický hardware měly o takový vývoj zájem. Avšak nikdy neříkejme nikdy. Podobné úvahy probleskovaly i před příchodem sub-2 μm stacionárních fází.

Konec konců, použití neporézních submikrometrových (0,5 μm) částic pro chromatografické separace bílkovin bylo již předvedeno Mary Wirthovou v módu „slip flow“⁷. Tento mód přináší výhodu v použití tlaků nutných pro dosažení průtoku, které jsou nižší, než by odpovídalo podle Kozenyho-Carmanovy rovnice dané velikosti částic. Jistě, příprava kolony pro tuto operaci není úplně jednoduchá, ale možnost dosažení účinnosti více než milionu teoretických pater za 1,5 minuty je zcela jistě lákavá.

Do tohoto vývoje mohou zasáhnout i snahy o použití mobilních fází s menší viskozitou vyžadujících nižších tlaků k docílení dané průtokové rychlosti. Tak např. soudím, že technika chromatografie s použitím superkritického oxidu uhličitého se bude na výsluní objevovat čím dál tím častěji, a to nejenom proto, že umožňuje práci při nižších tlacích. Bude tomu tak proto, že tlaky na „zelenou“ chromatografii i nadále porostou. Kromě toho je jasné, že lze sotva očekávat, že ceny organických rozpouštědel typických v současných mobilních fázích nebudou stoupat, zatímco oxidu uhličitého bude neustále přebytek.

Rostoucí spotřebě mobilní fáze bude možné čelit i tím, že se budou používat kolony s menším průměrem, tedy nejlépe kapiláry. Kolony s malým průměrem si rovněž lépe poradí s disipací frikčního tepla, které se vyvíjí při perkolaci mobilní fáze náplní kolony a jehož rozsah je přímo úměrný použitému tlaku. U větších průměrů tento jev může vyvolat vznik radiálních teplotních gradientů, které jako důsledek snižují účinnost kolony. I přes značný pokrok v oblasti komerčního přístrojového vybavení dovolujícího aplikaci kapilárních kolon na trhu zatím chybí spolehlivá zařízení umožňující docílit reprodukovatelných gradientů při průtokových rychlostech v jednotkách nl min^{-1} .

Nicméně celá řada výsledků z poslední doby mluví v prospěch kapilárních kolon. Do stejné kategorie patří i kapilární kolony, které mají na vnitřním povrchu porézní, většinou monolitickou polymerní vrstvu a o nichž se také píše už delší dobu. Jejich širšímu rozkvětu bránil problém s velice malým množstvím vzorku, jež mohou rozdělit, takže standardní detektory nebyly schopny monitorovat provedenou separaci. To se však mění s masovějším rozšířením velmi citlivých hmotnostně spektrometrických detektorů. Tak např. Shaorong Liu použil kapiláru o vnitřním průměru pouhých 2 μm a efektivní délce 27 mm, která nebyla naplněna žádnou stacionární fází, pouze její vnitřní stěny byly funkcionalizované C18 řetězci⁸. Tato kolona umožnila perfektní separaci šesti aminokyselin za méně než 400 ms při tlakovém spádu pouhých 20 MPa. Trypsinový digest bílkoviny cytochrom C byl separován za méně než 1 minutu. Je zřejmé, že dalšího snížení doby separace by bylo možné docílit zkrácením délky kapilární kolony.

Použití krátkých kolon není ostatně žádnou novinkou. Bylo teoreticky propracováno Borisem Belenkim již v druhé polovině osmdesátých let⁹ a stálo u kolébky tenkých monolitických disků vyvinutých Tatianou Tennikovou na konci osmdesátých let v Praze^{10,11}. Skupina Daniela Armstronga demonstrovala použití 1 cm dlouhých kolon o vnitřním průměru 300 μm naplněných povrchově porézními částicemi pro velice rychlé separace různých směsí látek či enantiomerů¹². Např. směs obsahující 10 komponent byla rozdělena v této koloně naplněné nemodifikovanými silikovými částicemi o velikosti 1,9 μm během pouhé jedné sekundy při průtoku mobilní fáze 8 ml min^{-1} . Tím se chromatografie podle autorů přiblížila rychlosti běžných senzorů. Szabolcz Fekete šel ještě dál a použil kolonu pouhých 5 mm dlouhou pro separace velkých terapeutických bílkovin za méně jak 30 sekund¹³.

Výše uvedené příklady svědčí o potenciálních možnostech dalšího vývoje kapalinové chromatografie využí-

vajících klasických prostředků, tedy kolon plněných částicemi. Nicméně opomenout nelze ani odlišné přístupy, mezi něž bezesporu patří i monolitické kolony. Zatímco například současné polymerní monolity se připravují polymerací přímo v tubusu kolony, je možné vysledovat i jiné přístupy. Mezi těmi nejperspektivnějšími vidím např. ploché chromatografické kolony. S první, vyrobenou mikroobráběním křemíkových destiček, přišel Fred Regnier již v roce 1998 a použil ji pro kapilární elektrochromatografii¹⁴. Podstatně tuto technologii teoreticky i prakticky později rozvinul Gert Desmet¹⁵. Tento plochý, téměř dvoudimenzionální formát, je nyní v jednodušším provedení, v němž k separaci dochází ve vrstvě obsahující sloupky ve tvaru válců, komerčně dostupný pro kapalinovou chromatografii. Leč vývoj směřující k dalšímu zvýšení účinnosti je téměř jistý. Oproti plněným kolonám je zde k dispozici větší počet proměnných, které lze kontrolovat. Mezi ně třeba patří tvar a výška sloupků, které mohou mít prakticky jakýkoliv geometrický tvar, a jejich prostorové uspořádání, což kolony plněné částicemi neumožňují. Za zmínku stojí fakt, že takováto separační zařízení lze navrhovat s použitím počítačových programů, aniž by se muselo rozsáhle experimentovat, a teprve optimalizovaný design pak vyrobit.

Nelze nezpomenout ani zcela nový přístup k získávání zařízení pro chromatografické separace, tedy aditivní výrobu, při níž se materiál přidává až do stavu, kdy je výrobek hotový, což je opak postupů, jako je soustružení či pilování, při nichž se materiál odstraňuje. Ve skutečnosti se však jedná o proces běžně nazývaný třídimenzionálním (3D) tiskem. Ten může v budoucnu vyrobit najednou kompletní separační kolonu včetně tubusu i náplně, jejíž struktura bude opět nejdříve optimalizována v počítači. Takové kolony budou pak moci mít téměř libovolný formát a velikost a budou zcela jistě monolitické. Důležité je, že kolona bude jedna jako druhá, neboť budou všechny vyrobeny podle stejného programu. První 3D tištěná separační zařízení už byla demonstrována^{16,17}. Jejich parametry ještě nedosahují úrovně těch vyráběných klasickými postupy. Je však jenom otázkou nejspíše ne příliš dlouhé doby, kdy se 3D technologie zdokonalí natolik, aby mohly být široce používány v produkci chromatografických kolon. Zatím ještě nejsou k dispozici ani vhodné materiály zcela způsobilé pro samotný tisk tohoto typu. Také běžné tiskárny nemají dosud potřebnou rozlišovací schopnost nutnou k výrobě náplní s dostatečně drobnými vnitřními prvky nutnými k získání kolon s vysokou účinností. Na druhou stranu, jiné metody 3D tisku, které již dostatečné rozlišení umožňují, jsou žel nadmíru pomalé.

Výše uvedené řádky reprezentují můj osobní názor. Vycházejí z pozorování trendů, tak jak jsou publikovány v odborné literatuře a na konferencích a jak také vyplývá i z diskusí, které mívám během osobních setkání s kolegy pracujícími ve stejném oboru. Jako nikdo z nás, ani já nemám křišťálovou kouli či Libušinu věšteckou schopnost, abych mohl s jistotou předpovědět, co se stane v chromatografii za pět, deset či dvacet let. Jistě však bude zajímavé se po letech k tomuto článku vrátit a srovnat jeho obsah se skutečností té doby.

Tento článek vznikl za podpory projektem STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) spolufinancovaného ERDF.

LITERATURA

1. Tswett M. S.: Ber. Deutch. Botan. Ges. 24, 384 (1906).
2. Martin A. J. P., Synge R. L. M.: Biochem. J. 35, 1358 (1941).
3. Horváth C. G., Lipsky S. R.: Nature 211, 748 (1966).
4. Svec F., Tennikova T. B., Deyl Z.: *Monolithic materials: preparation, properties, and applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
5. Davydova E., Schoenmakers P. J., Vivo-Truyols G.: J. Chromatogr. A 1271, 137 (2013).
6. MacNair J. E., Lewis K. C., Jorgenson J. W.: Anal. Chem. 69, 983 (1997).
7. Wei B., Rogers B. J., Wirth M. J.: J. Am. Chem. Soc. 134, 10780 (2012).
8. Xiang P., Yang Y., Zhao Z., Chen M., Liu S.: Anal. Chem. 91, 10738 (2019).
9. Mal'tsev V. G., Nasledov D. G., Trushin S. A., Tennikova T. B., Vinogradova L. V., Volokitina I. N., Zgonnik V. N., Belenkii B. G.: J. High Resolut. Chromatogr. 13, 185 (1990).
10. Tennikova T. B., Svec F., Belenkii B. G.: J. Liquid Chromatogr. 13, 63 (1990).
11. Svec F.: Chem. Listy 98, 232 (2004).
12. Patel D. C., Wahab M. F., O'Haver T. C., Armstrong D. W.: Anal. Chem. 90, 3349 (2018).
13. Fekete S., Murisier A., Nguyen J. M., Bolton M. J., Belanger J., Beck A., Veuthey J.-L., Wyndham K., Lauber M. A., Guilleme D.: Anal. Chem. 93, 1285 (2021).
14. He B., Tait N., Regnier F. E.: Anal. Chem. 70, 3790 (1998).
15. DeMalsche W., Eghbali H., Clicq D., Vangeloooven J., Gardeniers H., Desmet G.: Anal. Chem. 79, 5915 (2007).
16. Broeckhoven K., Desmet G.: Anal. Chem. 93, 257 (2021).
17. Urban J.: J. Sep. Sci. 43, 1628 (2020).

F. Švec (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Quo Vadis Liquid Chromatography**

This paper represents author's opinion concerning developments in liquid chromatography. The focus is on column technologies since these separation devices are at the heart of chromatography. After starting with the early times of chromatography, the current advancements are used as the springboard in the considerations where the chromatography might be heading in the future.

Keywords: chromatography, history, present, future

Acknowledgement

The author gratefully acknowledges the financial support of the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF.