CO DNES HÝBE KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ?

FRANTIŠEK ŠVEC

Department of Chemistry, University of California, Berkeley, CA 94720-1460, USA
fsvec@lbl.gov

Došlo 14.7.08, přijato 23.9.08.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, difuze, Sub-2 μm částice, částice s neporézním jádrem, teplota, monolity

Obsah

1. Výlet do historie
2. Problém zvaný difuze
3. Problém zvaný tlak
4. Porézní částice menší než 2 mikrometry
5. Částice se slinutým jádrem
6. Zvýšená teplota
7. Monolitické stacionární fáze
8. Co nás čeká v budoucnu?

1. Výlet do historie

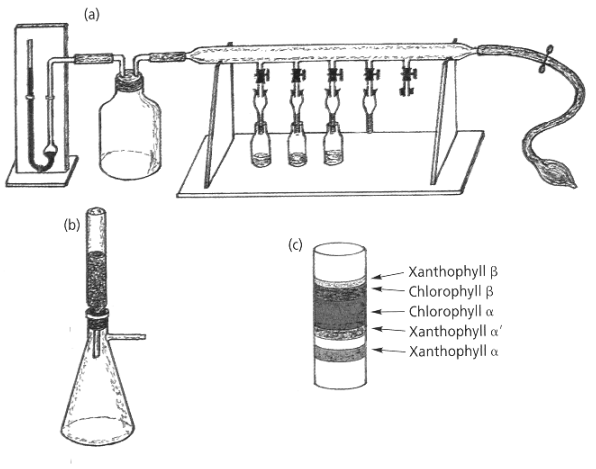
Nedávno uplynulo právě sto let od chvíle, kdy ruský botanik Michail Semjonovič Cvět, vynalezl separační techniku, kterou sám pojmenoval chromatografií. Tento termín vznikl složením dvou řeckých slov: chroma = barva a graphein = psaní. Zlí jazykové tvrdí, ze Cvět do názvu metody zakódoval své jméno, neboť cvět v ruštině znamená barva. Jak ukazuje obr. 1, původní zařízení bylo velmi jednoduché. Sestávalo z několika skleněných nálevek, v nichž byl umístěn uhličitan vápenatý. Po aplikaci biologického vzorku na vrchol sloupce, byl sirouhlík protlačován pod definovaným tlakem vzduchu a jednotlivé typy chlorofylů se oddělily do vrstev lišících se barvou. Odtud pak ona první část názvu metody. Po rozdělení byl sloupec vytlačen z nádobek, nařezán podle barvy a látky adsorbované na pevné fázi vyextrahovány do roztoku. Cvět později napsal, že „... metoda, při níž jsou různé komponenty směsi rozděleny na adsorpční koloně v průtočném systému, je chromatografická metoda.“ Jak tomu bývá tak často, tento vynález předběhl svou dobu a po dlouhá léta zůstával nepovšimnut.

I přes jisté znovuobjevení v 30. letech minulého století, opravdový rozvoj této separační metody se datuje teprve do doby po druhé světové válce. Objevitelské práce Martina a Synge, jež byly v roce 1952 odměněny Nobelovou cenou, započaly éru moderní plynové a kapalinové chromatografie. Další enormní rozvoj pak umožnil, že v dnešní době je chromatografie třetí nejpoužívanější technikou v analytické chemii pouze za vážením a měřením pH, což jasně dokazuje její mimořádný význam.

IUPAC postuloval v roce 1993 tuto definici: „Chromatografie je fyzikální separační metoda, při níž jsou separované složky distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární zatímco druhá se pohybuje v daném směru.“ V dalším se soustředíme na chromatografii, v níž mobilní fází je kapalina. Je charakterizována použitím stacionární fáze umístěné v trubici zvané kolona, kterou protéká ona kapalina. Tato metoda prošla za posledních padesát let řadou významných změn. Na úplném počátku stojí postupy zvané iontově výměnná chromatografie, s iontoměniči a postupy vyvinutými za války pro projekt Manhattan, a gelová permeační chromatografie, v níž byly použity stacionární fáze připravené z přírodních polysacharidů. Tyto fáze však neumožňovaly použití vyššího hydraulického tlaku k dosažení rychlejších průtoků. Za přelomové lze považovat práce Horvátha, Guiochona, a dalších, kteří na počátku 70. let zavedli do kapalinové chromatografie stacionární fáze založené na porézní silice (oxidu křemičitém). Tyto materiály, již tehdy stabilní do tlaků převyšujících 30 MPa, pak stály u kolébky techniky zvané vysoko účinná kapalinová chromatografie či HPLC podle zkráceného anglického termínu „high performance liquid chromatography“. Použití nestlačitelných náplní kolon pak vedlo k nebývalému rozmachu HPLC.

2. Problém zvaný difuze

Účelem chromatografie je co nejlépe rozdělit jednotlivé složky dané směsi. Zjednodušeně se dá popsat takto: Směs se přivede na vrchol kolony a mobilní fáze unáší všechny složky mezerami mezi částicemi porézní náplně.



Obr. 1. **První kapalinový chromatograf sestavený Cvětem v roce 1903 pro dělení chlorofylů.** Stacionární fází v něm byl uhličitan vápenatý a mobilní fází sirouhlík

Mobilní fáze se nachází jak mezi částicemi, tak i v jejich pórech. Zatímco se kapalina v mezičástečkovém prostoru pohybuje, v pórech zůstává nepohyblivá, stagnantní. Jakmile dělená směs míjí částici, její složky díky koncentračnímu gradientu, tedy rozdílu v koncentracích uvnitř a vně částice, difundují do pórů. Zde pak interagují se skupinami navázanými na stěnách. Tyto interakce mají jenom přechodný charakter a jejich síla se liší podle druhu separované složky. Jakmile je vně pórů mobilní fáze s koncentrací složek nižší než v pórech, koncentrační gradient opět napomáhá jejich převodu zpět do kapaliny proudící mezi částicemi. Složky, jež interagují s povrchovými skupinami silněji, se v pórech zdrží déle než ty, které interagují méně či vůbec ne. Tento proces, který je základem tzv. adsorpční chromatografie, se opakuje po celou dobu pobytu složek uvnitř kolony. Rozdíl v síle interakce, a tedy i v délce zdržení v pórech, pak vede k požadovanému rozdělení jednotlivých složek směsi.

V ideálním případě složky směsi vstoupí do pórů všechny ve stejnou dobu a velmi rychle a podobně rychle je zase opustí. Liší se jenom doba, po kterou v póru zůstanou. V tom případě je pak zóna složky v koloně i na výtoku z ní úzká. Šíře této zóny zvané pík definuje účinnost kolony. Požadavkem je, aby zóny byly co nejužší a vzájemně se nepřekrývaly. Přeloženo do normálního jazyka to znamená, že každá složka směsi by měla kolonu opouštět zcela odseparovaná od všech ostatních. Realita je však odlišná. Rychlost vstupu i výstupu z pórů je řízena difuzí jednotlivých komponent v kapalné mobilní fázi a závisí na jejich velikosti. Čím větší složka, tím pomaleji difunduje. Pomalá difuze pak způsobuje, že pásy jsou široké a separace nedokonalá.

Otázku difuzního přenosu hmoty do nepohyblivé čili stagnantní mobilní fáze uvnitř pórů označili za hlavní problém vedoucí k nežádoucímu rozšiřování chromatografických zón již Martin a Synge. Pohled zpět naznačuje, že značná část výzkumu a vývoje v oblasti HPLC se od samého jejího zavedení soustřeďuje na boj s pomalým přenosem hmoty.

Bystrý čtenář již jistě nalezl řešení. Použijme zcela neporézní částice a je po problému. Tento návrh je zcela správný a kolony plněné neporézními částicemi se také objevili v literatuře i na trhu. Vskutku, použití tohoto přístupu umožnilo nebývale rychlé chromatografické separace. Leč, neporézní částice se nestaly obecným řešením daného problému. Jak bylo řečeno výše, důležitou součástí separačního procesu je i interakce složek se skupinami na povrchu pórů, která diktuje selektivitu dělení. Čím větší je povrch dostupný pro interakce, tím větší počet molekul může simultánně interagovat, a tudíž tím více směsi je možné rozdělit. U neporézních částic je k dispozici pouze jejich vnější povrch. Ten lze samozřejmě zvětšit použitím většího počtu menších částic, ale i tak je jejich povrch pouhým zlomkem velikosti povrchu typických porézních kolonových náplní. Výsledkem je, že nástřiková kapacita kolony, a tedy i množství směsi, jež může být rozseparováno, jsou velice malé. To pak klade zvýšené požadavky na citlivost detekce složek opouštějících kolonu. Tento přístup je pak zcela nepoužitelný pro preparativní separace, v nichž je požadavek co největšího nástřiku zásadní.

Vypořádání se s difuzí na úkor porozity se tedy nezdá být dobrým řešením. Naštěstí, chromatografisté v nedávné době přišli s několika zajímavými přístupy, které získávají řady příznivců, a o nichž bude pojednáno.

3. Problém zvaný tlak

První široce používaná náplň kolon pro HPLC – μBondapak měl velikost částic 10 μm a byl uveden na trh v roce 1973. O pět let později přišly na trh kolony plněné silikovými částicemi o velikosti 5 μm. V 90. letech minulého století se pak velikostním standardem staly 3,5 μm částice. Co podmínilo tyto změny? Odpověď není složitá. Vývoj metod přípravy menších částic a současně i instrumentální techniky. Nelze totiž zapomenout, že kolona je jenom jednou součástí chromatografického systému, který se skládá z čerpadla, nastřikovacího zařízení, kolony a detektoru. Snižování velikosti náplně však vyžaduje vyšší tlak, aby se dosáhlo požadovaného průtoku. Je známou inženýrskou skutečností, že tlaková ztráta na plněné koloně ΔP je definována jako

$$\Delta P \sim F.\eta.L/A.d_p^2 \qquad (1)$$

kde F je průtoková rychlost, η viskozita mobilní fáze, L délka kolony, A její průřez a d_p průměr částic náplně. To znamená, že tlak v koloně roste exponenciálně s klesající velikostí částic. Menší velikost částic tedy klade vyšší nároky na použité zařízení. Protože průmyslovým standardem jsou HPLC přístroje pracující do tlaků 40 MPa, řešil se problém rostoucího tlaku zkracováním délky kolony. Protože celková účinnost kolony je přímo úměrná její délce a nepřímo úměrná velikosti částic náplně, současné zkrácení kolony a zmenšení velikosti částic, obojí na polovinu, neposkytuje žádnou výhodu v účinnosti, neboť ta se nezmění. Ovšem, celkový objem kolony je poloviční a při stejném průtoku budou tedy jednotlivé komponenty vymývány za poloviční dobu. Takže zisk je v kratší době nutné k separaci, a tedy i ve zvýšení počtu analýz, které lze na dané koloně vykonat za určitý čas čili v produktivitě. Naneštěstí, v tomto trendu nelze již dále pokračovat, protože určitá délka kolon je nezbytností. Kde je tedy řešení?

4. Porézní částice menší než 2 mikrometry

Porézní i neporézní částice velmi malých rozměrů vzrušují chromatografickou obec po dlouhou dobu. Pionýrské práce L. Colóna, P. Carra, M. Leeho, a J. Jorgensona z počátku tohoto desetiletí naznačily, že „dole je spousta místa“ i v chromatografii. Jejich pokusy však vyžadovaly práci s velmi vysokými tlaky, jež dosahovaly hodnot až 450 MPa a jsou pro rutinní práci v běžné laboratoři zcela nerealistické. Cimrman by řekl: „Tudy cesta nevede“. Nicméně úplné opuštění myšlenky velmi malých částic by

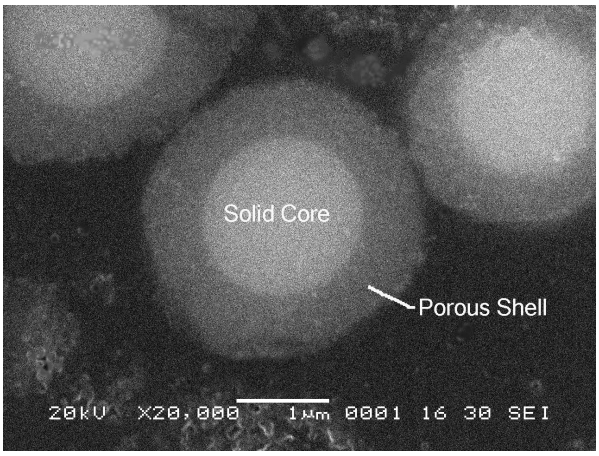
také bylo chybou. Řešení našla firma Waters (Milford, MA, USA) ve vývoji nových stacionárních fází s velikostí 1,7 μm podporovaných novou přístrojovou technikou, která na rozdíl od předešlé generace umožňuje bezpečně a reprodukovatelně pracovat s tlaky přes 80 MPa, tedy více než dvojnásobnými ve srovnání s předchozími přístroji. Obdobné produkty dalších významných producentů chromatografických zařízení pak na sebe nedaly dlouho čekat. Samozřejmě, že každá firma ke svým přístrojům dodává i odpovídající kolony. Jejich společným jmenovatelem je náplň s velikostí částic 2 μm či menší, jakož i celková porozita. Póry těmto fázím dodávají jak požadovaný povrch potřebný pro dosažení potřebné selektivity, tak i nástřikovou kapacitu[1]. Paleta chemicky odlišných skupin je poměrně široká, i když v současné době pokrývá jenom separace v obrácené fázi a hydrofilně interakčním módu.

Tato nová technologie umožnila dosahovat nebývale vysokých účinností běžně převyšujících 200 000 teoretických pater/m, zřídka údajně i téměř 400 000, a byla záhy akceptována v oblastech, jako jsou farmaceutická analýza a monitorování životního prostředí. Za zmínku stojí skutečnost, že snižování velikosti částic kolonové náplně a zvyšování operačního tlaku náplně vedlo i k úvahám o platnosti parametrů běžně užívaných v „klasické“ chromatografii a řada prací se tomuto problému seriozně věnuje.

5. Porézní částice s neporézním jádrem

Jak bylo již několikrát zmíněno, difuze ve stagnantní mobilní fázi uvnitř pórů je důvodem, proč nelze zrychlovat chromatografické separace aniž bychom byli pokutování prudkým poklesem počtu teoretických pater, tedy účinnosti kolony. Použití sub-2 μm částic a vysokého tlaku je jedním z řešení tohoto dilematu. Je i jiné? V počátcích HPLC byly populární tzv. pelikulární stacionární fáze. Původní princip byl jednoduchý. Větší neporézní částice se obalily vrstvou drobných částic, které zvýšily velikost interakčního povrchu a nástřikovou kapacitu. Některé z těchto materiálů přetrvávají dodnes. Např. firma Dionex (Mountain View, CA, USA) má v katalogu fáze sestávající z neporézního polymerního jádra připraveného ze styrenu a divinylbenzenu, jehož povrch je nasulfonován. Tato jádra se pak smíchají s latexovými nanočásticemi nesoucími kvarterní amoniové funkční skupiny. Je zřejmé, že negativně nabité sulfonové skupiny pak přitahují pozitivně nabité nanočástice, které vytvoří na povrchu celistvou vrstvu. Tyto fáze dodnes reprezentují špičku v separacích iontů, cukrů a dalších analytů.

J. Kirkland, jedna z legend HPLC pracující pro firmu Advanced Materials Technology (Wilmington, DE, USA), nedávno „oprášil“ tento dávno známý koncept a dovedl ho do produktu zvaného „fused-core particle“, který nese obchodní název Halo. Neporézní silikové jádro (core) s velikostí 1,7 μm je obaleno 0,5 μm silnou vrstvou slinutých (fused) silikových nanočástic, jak je dobře vidět ze



Obr. 2. **Elektronově mikroskopický snímek „fused-core“ částic** (poskytnuto Dr. J. Kirklandem)

snímku z elektronového mikroskopu na obr. 2 (cit.[2,3]). Povrchová porézní vrstva obsahuje 9 nm póry a její objem reprezentuje cca 87 % celkového objemu částice. Konečná velikost stacionární fáze je tedy 2,7 μm. Kolony plněné částicemi této velikosti mohou být použity ve standardních přístrojích, neboť nevyžadují zvýšený tlak k dosažení požadovaných průtokových rychlostí. Tak např. při poměrně vysoké průtokové rychlosti 4 mm s^{-1} je tlaková ztráta na koloně plněné tzv. „fused-core“ částicemi 24,8 MPa a je blízká hodnotě 13,8 MPa typické pro standardní 3,5 μm částice. Naproti tomu kolona obsahující 1,7 μm částice vykazuje již tlakovou ztrátu 55,8 MPa, což demonstruje, že tlak v koloně se skutečně mění s převrácenou hodnotou čtverce velikosti částic náplně.

Přitažlivost „fused-core“ technologie spočívá v tom, že vzdálenost, jež musí být překonána difuzí ve stagnantní mobilní fázi uvnitř pórů, není nikdy delší než 0,5 μm. Tato vzdálenost je poněkud kratší než např. 0,85 μm pro 1,7 μm totálně porézní sub-2 mikrometrové částice diskutované v předešlé části, avšak významně menší než 1,75 μm charakterizující vzdálenost v 3,5 μm částicích, s nimiž fáze Halo prakticky sdílí velikost tlakové ztráty. To znamená, že rozmývání chromatografických zón je omezené, což se promítá do účinnosti. Kolona naplněná „fused-core“ částicemi může poskytnout více než 210 000 teoretických pater na metr, což je o 50 % více než 3,5 μm fáze a dvojnásobek dostupný pro 5 μm fáze. Většímu rozmachu těchto stacionárních fází zatím brání omezený sortiment dvou typů navázaných skupin C8 a C18 vhodných pouze pro separace v obrácené fázi.

6. Zvýšená teplota

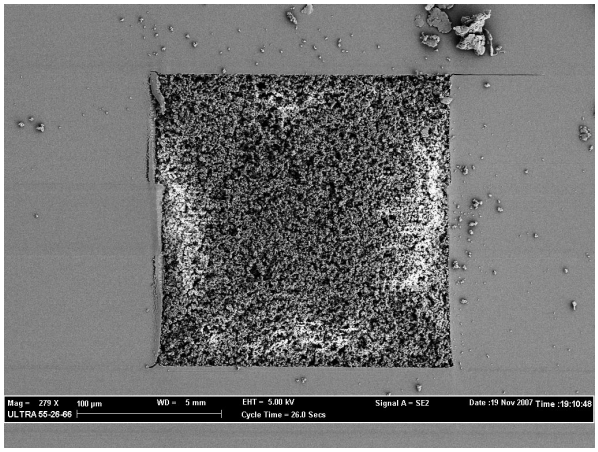
Boj s vysokým tlakem v kolonách plněných malými částicemi lze rovněž vést na frontě viskozity, jak lze vytušit z rovnice (*1*). Čím menší viskozita, tím nižší tlak. To

bylo sice známo od počátků moderní historie chromatografie, ale vážného uplatnění separace při vyšších teplotách až do nedávna nedoznaly. Důvod byl prostý. První generace silikových stacionárních fází se při vysoké teplotě rozpouštěly a kolony ztrácely separační schopnost. Moderní fáze, z nichž některé jsou připravovány i z jiných oxidů, jako např. zirkonu, a porézních polymerů, již vysokým teplotám úspěšně vzdorují. Dalším důvodem byla obava o stabilitu dělených komponent, jež se však ukázala lichou. K úspěchu také vedlo zavedení speciálních termostatů, které udržují konstantní teplotu kolony a předehřívají mobilní fázi na tutéž teplotu, aby se vyloučil vliv teplotní nesrovnalosti.

Jaké výhody je možné od použití teploty očekávat? Snížení viskozity umožňuje použití vyšších průtokových rychlostí aniž by byly překročeny tlakové limity zařízení. Účinnost kolon rovněž profituje, neboť snížená viskozita usnadňuje přenos hmoty a redukuje sekundární interakce, které jsou zdrojem deformace píků. Při vyšší teplotě lze též použít mobilní fáze, jejichž viskozita to za normální teploty neumožňuje. Ačkoliv prvotním cílem použití zvýšené teploty byla viskozita, nelze zapomenout, že chromatografické dělení je proces řízený termodynamikou systému, v němž teplota hraje významnou roli. Tak např. selektivita separací se mění spolu se změnami rovnováhy interakcí. Při vyšší teplotě lze vymývat komponenty s použitím mobilní fáze s nižší koncentrací organických rozpouštědel a v extrémních případech lze použít i samotné vody v separacích, pro něž je za normální teploty požadována přítomnost organického rozpouštědla. Rostoucí teplota vede ke snížení polarity vody. Tento přístup rovněž umožňuje použít teplotní program k docílení požadované selektivity separace, způsob ne nepodobný tomu, který je v plynové chromatografii používán po desetiletí. V neposlední řadě, vyšší procento vody v mobilní fázi zlepšuje detekční limit, ježto voda absorbuje v typicky používané ultrafialové oblasti daleko méně než organická rozpouštědla[4,5].

7. Monolitické stacionární fáze

Detailní popis této technologie pocházející z mého pera Chemické listy přinesly již dříve[6] a není tedy třeba zacházet do detailů. V mém článku jsem napsal, že dnešní monolity, jejichž původní verze byla před dvěma desetiletími vyvinuta v Praze, jsou separační média, jejichž formát může být přirovnán k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Monolitická separační media pro HPLC jsou komerčně dostupná v řadě formátů, které zahrnují porézní disky, kolony a trubice, všechny až na nepatrné výjimky vyrobené ze syntetických polymerů nebo siliky[7]. Oproti typickým kolonám plněným drobnými částicemi monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze nutně protékat póry monolitu, které jsou mnohem větší než ty, s nimiž se setkáváme u částic. Tento konvektivní tok póry významně zrychluje přenos hmoty v koloně. Na rozdíl od difuze, která je, jak bylo zmíněno výše, hlavní hnací silou přenosu hmoty z kapaliny proudící podél částic naplněných v běžné koloně do jejich pórů, konvekce póry umožňuje značné zrychlení dělení, což se projeví zejména u velkých molekul jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, či syntetické polymery, jejichž difuze je zvláště pomalá[8].



Obr. 3. **Elektronově mikroskopický snímek porézního monolitu připraveného polymerizací styrenu a divinylbenzenu v mikrofluidním čipu**

Příprava monolitů se liší od tradičních kolonových technologií. Tak např. silikové kolony se zhotovují z předem připravených porézních tyčinek, které se potahují poly(ether-ether-ketonem) (PEEK) postupem vyvinutým firmou E. Merck. Naproti tomu, specifikem polymerních monolitických kolon všech velikostí a silikových kapilár je, že se připravují z tekuté polymerizační směsi až uvnitř separační kolony. To je řadí do stejné kategorie jako automobily Rolls Royce, tedy každá kolona je vyrobena zvlášť. Nicméně ani to není v chromatografii až tak úplně neobvyklé, neboť plněné kolony jsou rovněž plněny jednotlivě i když s použitím částic připravených ve větším měřítku.

Význam přípravy polymerních monolitů z kapalných prekurzorů se stane markantním, uvážíme-li známé obtíže při účinném plnění kapilár s velmi malým průměrem a mikrofluidních čipů hotovými částicemi. Naproti tomu jejich naplnění tekutou směsí následovanou polymerizací *in situ* je většinou velmi jednoduché.

8. Co nás čeká v budoucnu?

Jelikož je nepravděpodobné, že by klesl zájem o stále rychlejší HPLC separace a o neustálé zvyšovaní počtu analýz, které je třeba provést, naše snahy o vítězství nad difuzí musí pokračovat. Karty jsou rozdány. Všechny výše uvedené cesty mají své přednosti, ale i nedostatky. Jak lze očekávat, hlavními propagátory té které techniky jsou hlavně ti, kdo ji zavedli nebo široce používají. Takže nic

není rozhodnuto. Je možné, že dojde k dalšímu zmenšení velikosti částic stacionárních fází, což ovšem nebude reálné, aniž by byla vyvinuta nová přístrojová základna. Monolitické kolony zase potřebují daleko více proniknout do výzkumných i průmyslových laboratoří. K tomu je nutné, aby byly dostupné z více zdrojů, čemuž v současnosti brání licenční monopol dvou výrobců, firmy Dionex u polymerních a E. Merck u silikových monolitních kolon.

Kromě použití brutální síly neustále rostoucího tlaku či průtokové rychlosti, počet analýz lze rovněž zvýšit paralelismem. Mikrofluidní čip může obsahovat celou řadu paralelních kanálů, v nichž separace probíhají souběžně. Kromě toho, takový čip může obsahovat i celou řadu dalších modulů umožňujících např. extrakci, modifikační reakci, *in situ* detekci, atd. Jejich masové rozšíření závisí na tom, podaří-li se nám dotáhnout koncept laboratoře na čipu do úspěšného konce.

Tato práce byla umožněna díky podpoře grantem Národního ústavu všeobecných zdravotních věd USA č. GM-48364.

LITERATURA

1. Wu N., Clausen A. M.: J. Sep. Sci. *30*, 1667 (2007).
2. Cunliffe J. M., Maloney T. D.: J. Sep. Sci. *30*, 3104 (2007).
3. DeStefano J. J., Langlois T. J., Kirkland, J. J. : J. Chromatogr. Sci. *46*, 254 (2008).
4. Vanhoanacker G., Sandra P.: J. Sep. Sci. *29*, 1822 (2006).
5. Hartonen K., Riekkola M.-L.: Trends Anal. Chem. *27*, 1 (2008).
6. Švec F.: Chem. Listy *98*, 232 (2004).
7. Švec F., Tennikova T. B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
8. Guiochon G.: J. Chromatogr., A *1168*, 101 (2007).

F. Švec *(Department of Chemistry, University of California, Berkeley, CA 94720-1460, USA):* **What Is Going on in Today's Liquid Chromatography?**

In order to win the permanent war with slow mass transport of analytes through the stagnant mobile phase located in pores of typical packings of chromatographic columns, which leads to undesirable peak broadening, both academic and industrial research recently came up with several interesting approaches. The present overview outlines the history of fight with diffusion, problem of the back pressure, and then briefly describes advantages and drawbacks of the applications of sub-2 μm packings, core-shell particles, high temperature, and monolithic stationary phases.