



UNIVERZITA KARLOVA

19. 10. 2021

HPLC (hi)story

Díl první:

Kolonové technologie

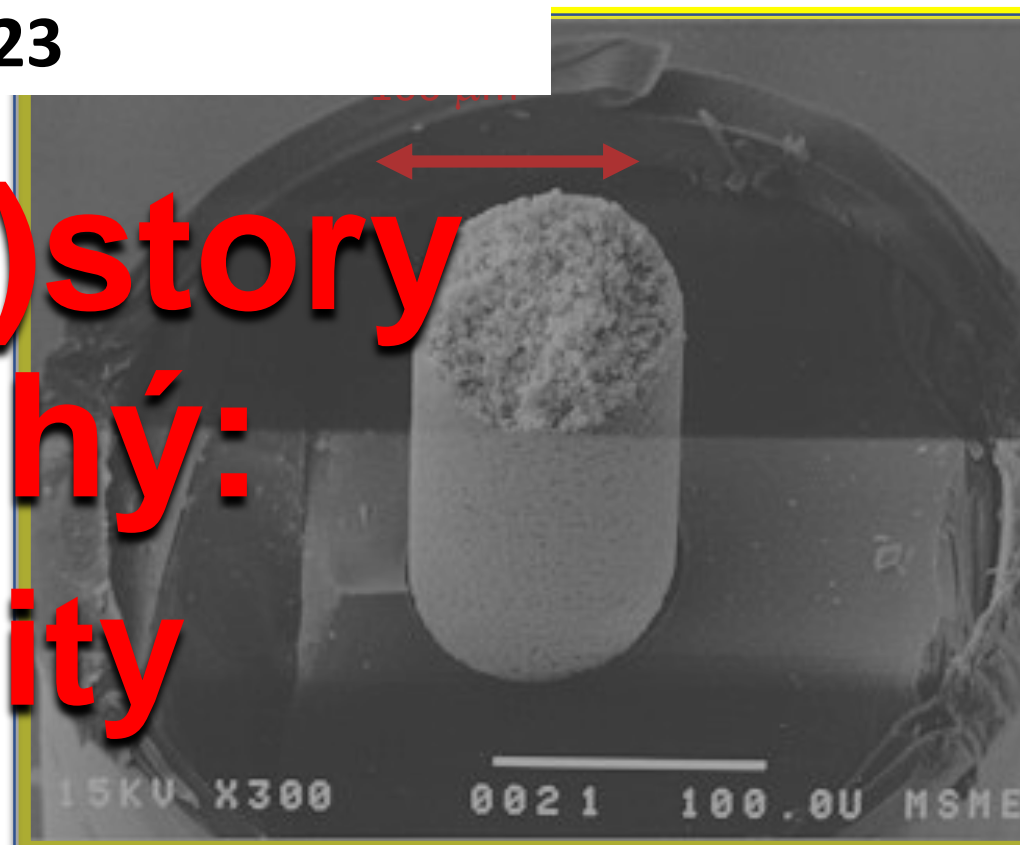
František Švec

Katedra Analytické Chemie
Farmaceutická Fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové



UNIVERZITA KARLOVA

24. 3. 2023



HPLC (hi)story

Díl druhý: Monolithy

František Švec

Katedra Analytické Chemie

Farmaceutická Fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové

Zvláštní dík za podporu:



EUROPEAN UNION
European Structural and Investment Funds
Operational Programme Research,
Development and Education



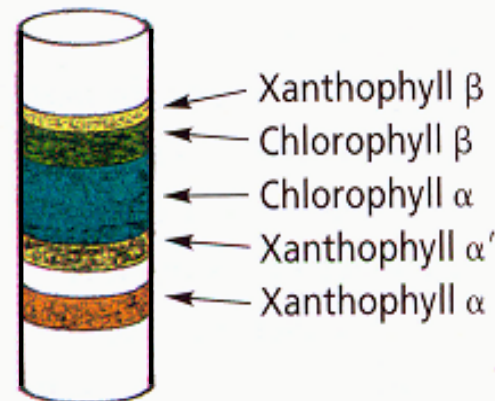
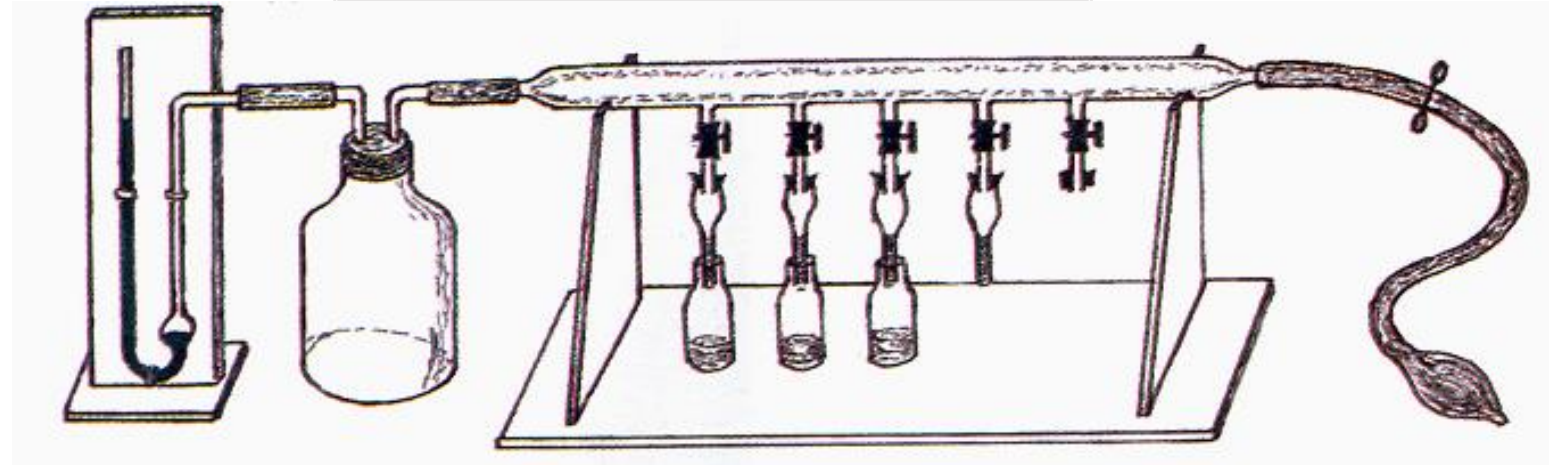
MINISTRY OF EDUCATION,
YOUTH AND SPORTS

První chromatografický systém



Michail S. Cvět (1872-1919)

LC, model 1903



Stacionární fáze: CaCO_3
Mobilní fáze: CS_2
Visualní detekce

Ber. Deut. Botan. Gesell. 24, 316, 1906

Vědecký přístup k chromatografii



Biochem. J. 35, 1358, 1941

Čeho chceme dosáhnout ?

Rychlé separace

Vysokou účinnost a píkovou kapacitu

Významnou selektivitu

Použití malých vzorků

Omezený objem pokud možno

„zelené“ mobilní fáze

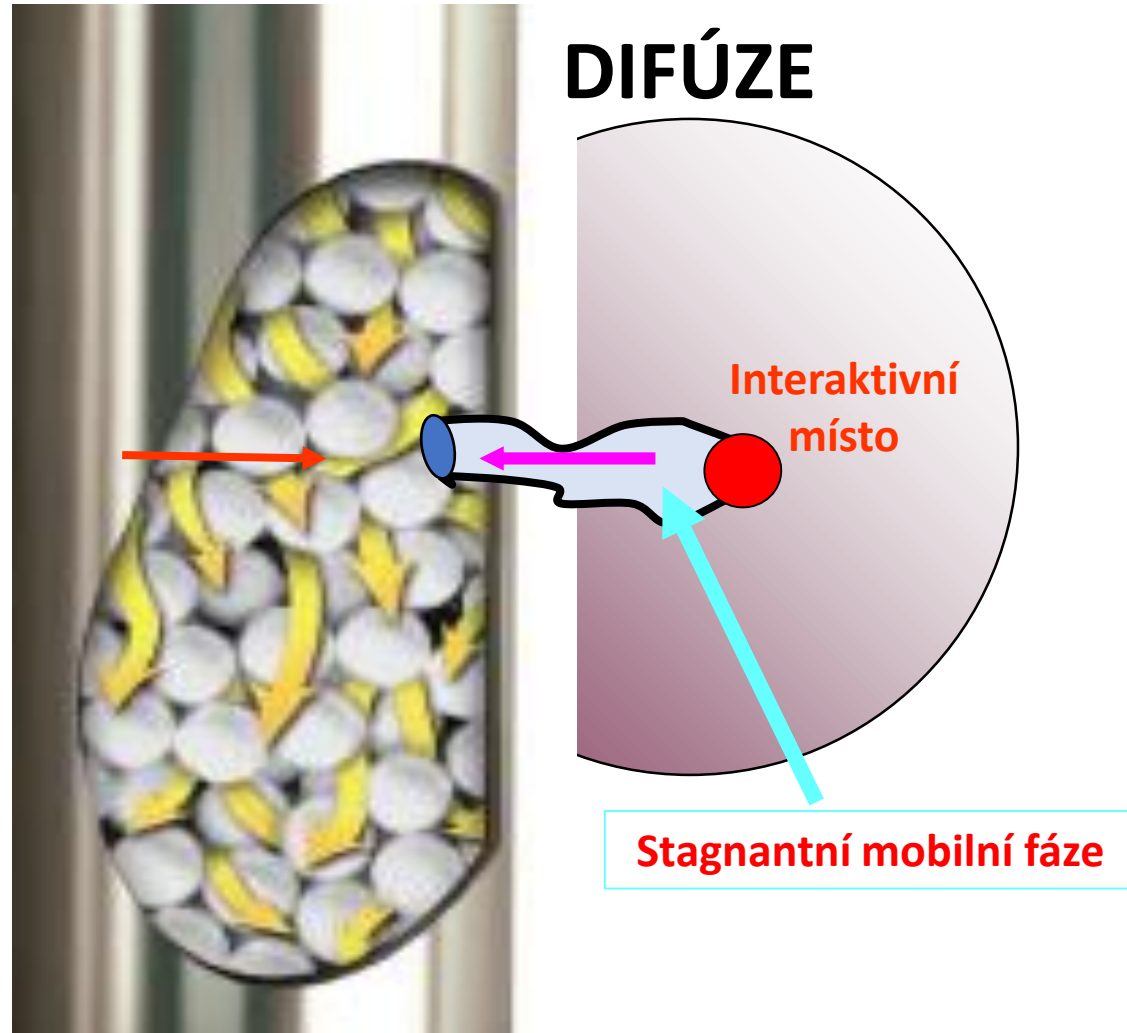
Jak na to?

Tok kolonou plněnou částicemi

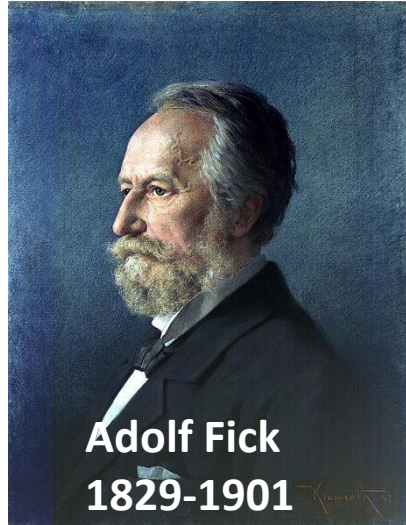


Adaptováno z materiálů
firmy Phenomenex


Přenos hmoty v plněné koloně

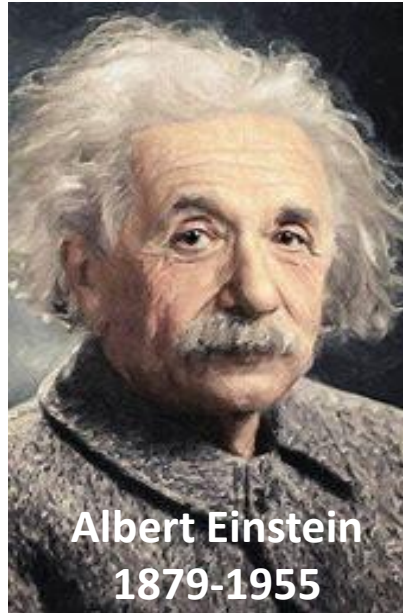


Urychlení přenosu hmoty



Fickův druhý zákon

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2}$$




~~Stokes-Einsteinova rovnice~~

~~$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$~~

Urychlení přenosu hmoty

Neporézní částice

Kolony plněné neporézními částicemi

eichrom
TECHNOLOGIES INC



Eichrom Technologies

Micra NPS částice

C18 silica

Kolona: 30x4.6 mm

Velikost částic 1.5 μm

Vnější měrný povrch 2.9 m²/g

MICRA[®] hplc columns

Co použít malé porézní částice?

Factors influencing the H.E.T.P.

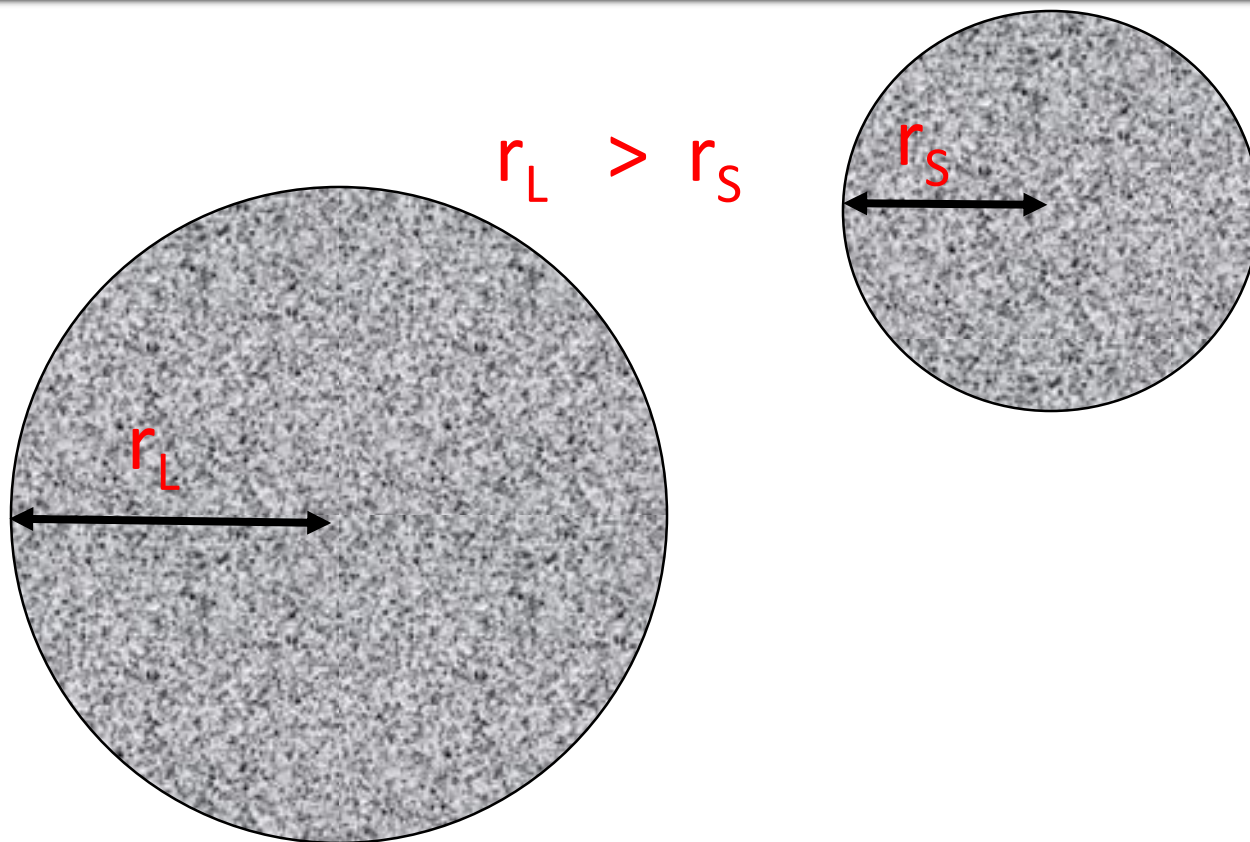
The height equivalent to a theoretical plate depends upon the factors controlling diffusion and upon the rate of flow of the liquid. There is an optimum rate of flow in any given case, since diffusion from plate to plate becomes relatively more important the slower the flow of liquid and tends of course always to increase the H.E.T.P. Apart from this, the H.E.T.P. is proportional to the rate of flow of liquid and to the square of the particle diameter. Thus the smallest H.E.T.P. should be obtainable by using very small particles and a high pressure difference across the length of the column. The H.E.T.P. depends also on the diffusibility of the solute in the solvent employed, and in the case of large molecules, such as proteins, this will result in serious decrease in efficiency as compared with solutes of molecular weights of the order of hundreds.

Urychlení přenosu hmoty

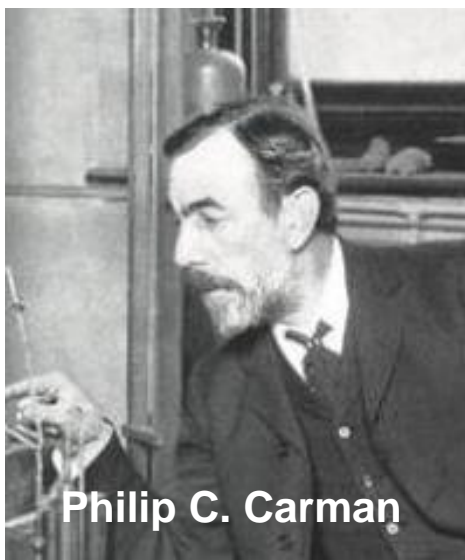
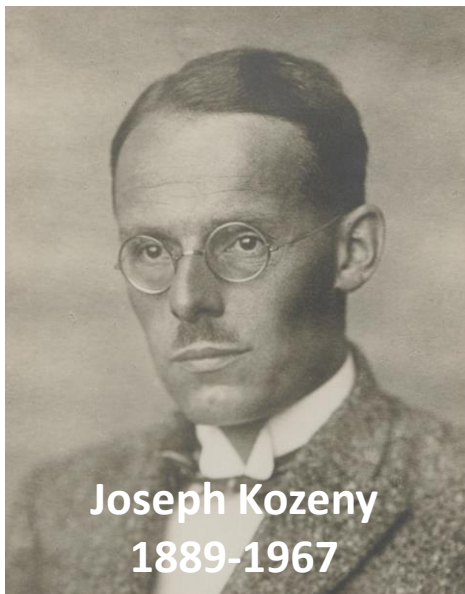
Neporézní částice

Malé částice

Přenos hmoty v plněné koloně



Přenos hmoty v plněné koloně

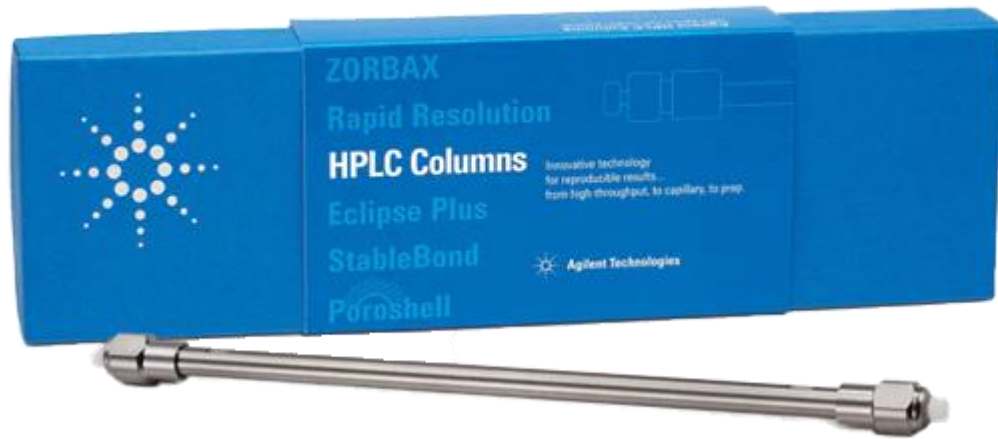


Adaptováno z materiálu
firmy Phenomenex

Kozeny-Carmanova
rovnice:

$$\Delta P = \frac{180\eta LQ}{d_p^2 d_c^2}$$

Průlom v použití malých částic



2003 Agilent Technologies uvedl na trh kolonu Zorbax Rapid Resolution plněnou 1.8- μ m porézními částicemi.



2004 Waters komercializoval Acuity UPLC™ (Ultra Performance LC) systém umožňující separace s použitím tlaků až 100 MPa (15,000 psi).

Problémy malých částic

analytical
chemistry

Advances and Challenges in Extremely High-Pressure Liquid Chromatography in Current and Future Analytical Scale Column Formats

Ken Broeckhoven*^{id} and Gert Desmet



Tlaková ztráta

$$\Delta P = \frac{180\eta LQ}{d_p^2 d_c^2}$$

Frikční teplo:

$$\Delta T = \frac{\Delta P}{\rho c_p}$$

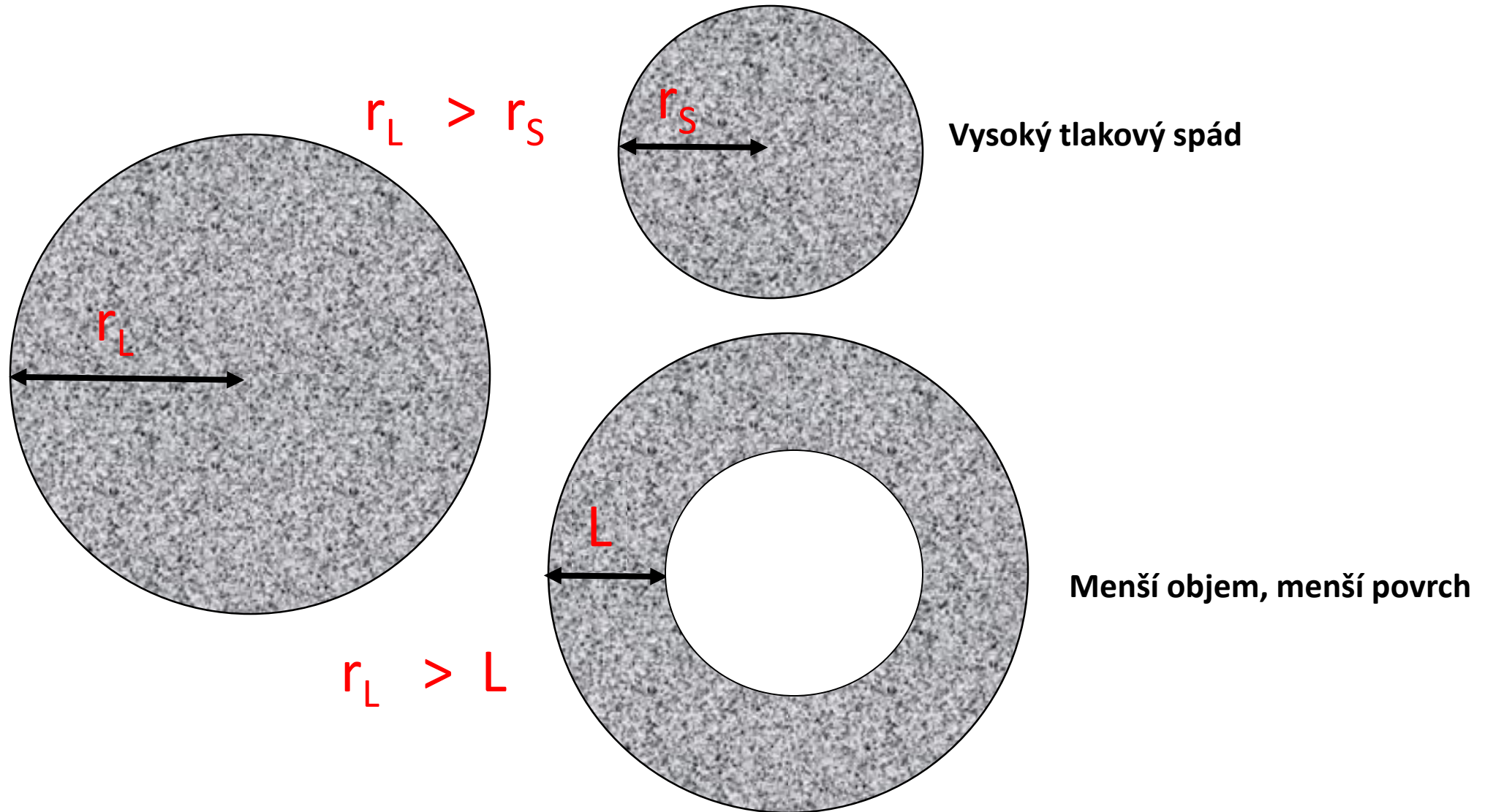
Urychlení přenosu hmoty

Neporézní částice

Malé částice

Povrchově porézní částice

Přenos hmoty v plněné koloně



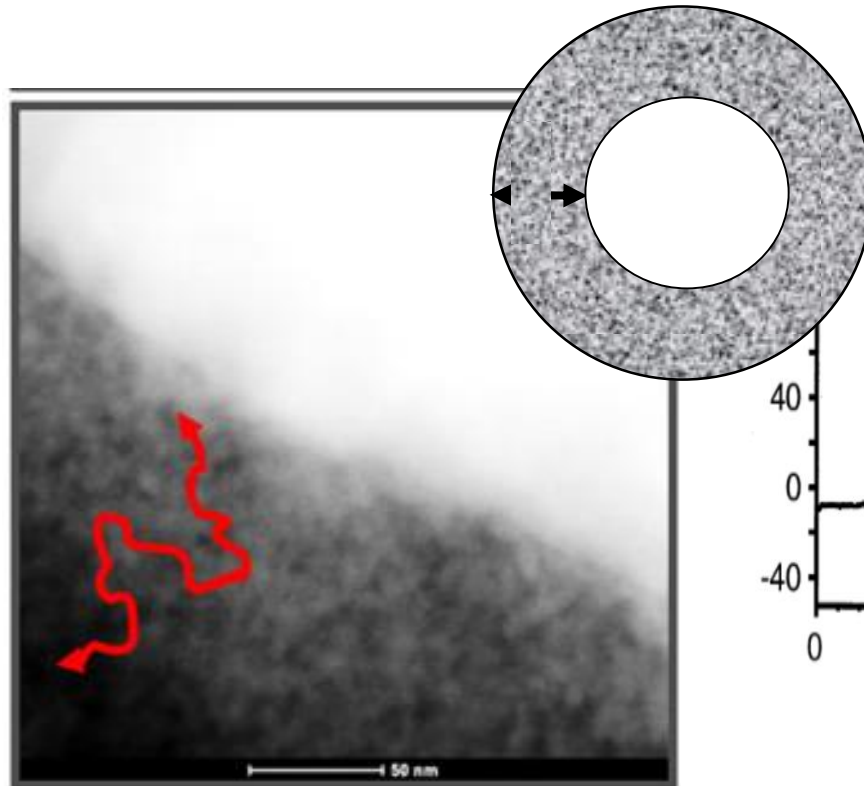
Povrchově porézní částice



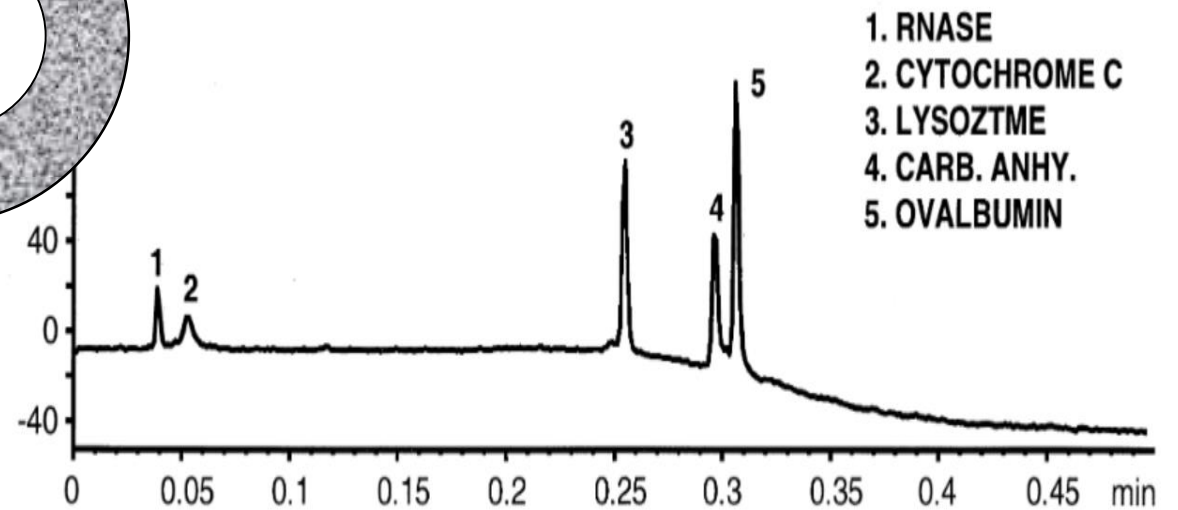
Journal of Chromatography A

Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules

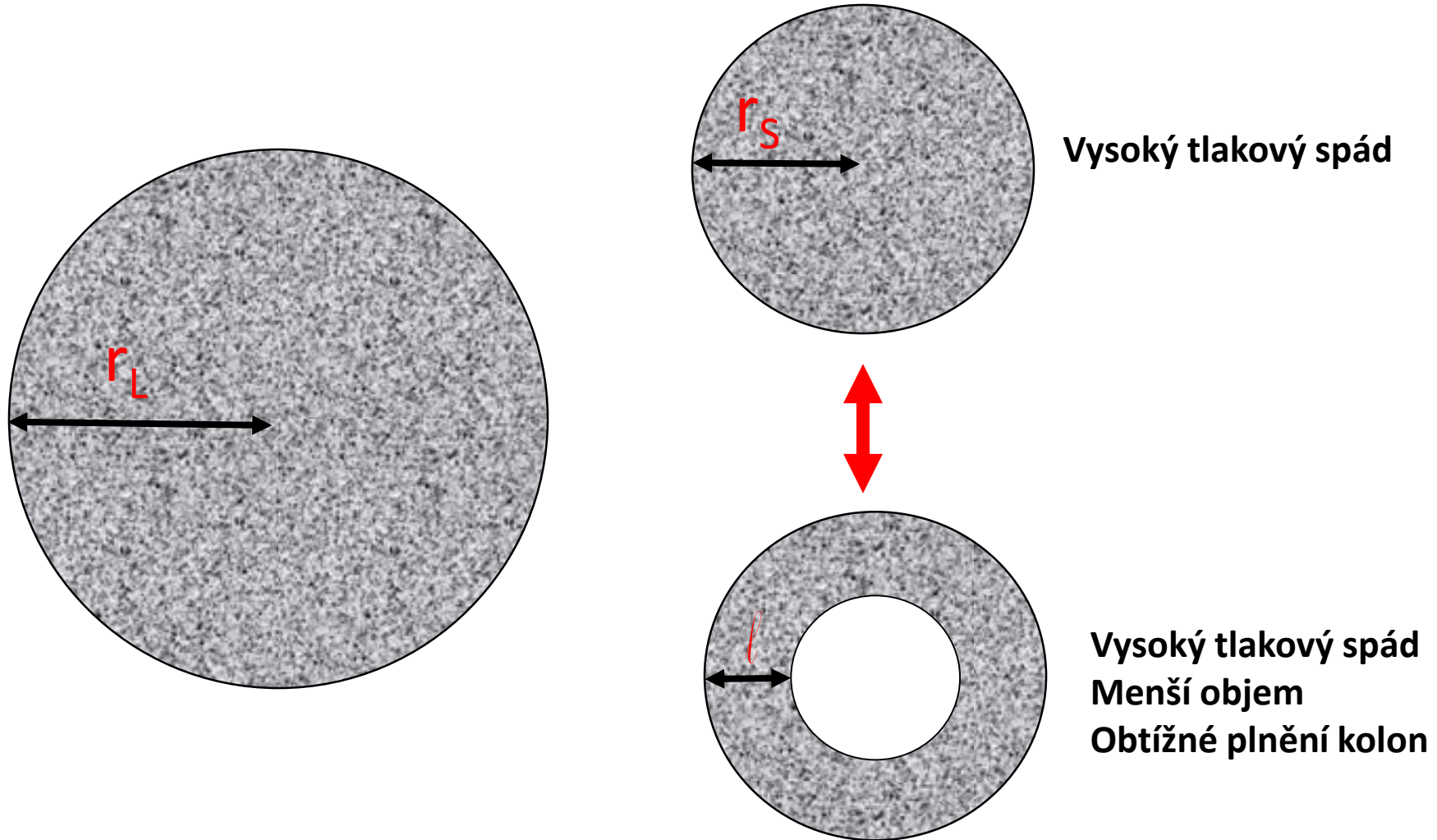
J.J. Kirkland^{a,*}, F.A. Truszkowski^a, C.H. Dilks Jr.^a, G.S. Engel^b



HALO



Přenos hmoty v plněné koloně



Kinetex 1.3 a 1.7 μm core-shell
Phenomenex

Urychlení přenosu hmoty

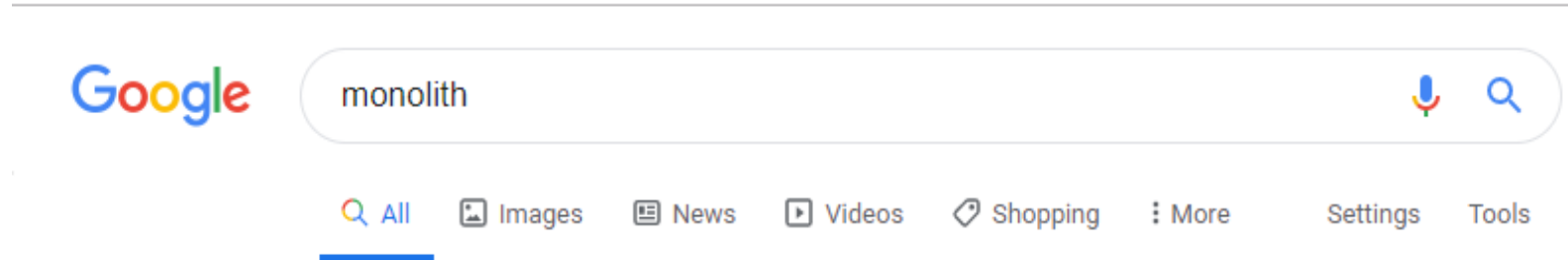
Neporézní částice

Malé částice

Povrchově porézní částice

Monolity

Co jsou monolithy?



2 s per hit = 600 days in total

Monolith - Wikipedia

<https://en.wikipedia.org/wiki/Monolith>

A **monolith** is a geological feature consisting of a single massive stone or rock, such as some mountains, or a single large piece of rock placed as, or within, a monument or building. Erosion usually exposes the geological formations, which are often made of very hard and solid igneous or metamorphic rock.

[Monolith](#) · [Space Odyssey](#) · [Mars monolith](#) · [Pedra da Gávea](#)

Monolith

<https://www.lith.com>

Monolith Plays D&D. Jul 01, 2019 · @MonolithDev Aug 13, 2019. Amazing F.E.A.R. 2 art from the incomparable @DXFromYT! We loved his whole origin story ...

[Careers](#) · [Games](#) · [Studio](#) · [Community](#)

[Monolith | Definition of Monolith by Merriam-Webster](#)

Co jsou monolity?

Monolit je geologický útvar, jako je hora, skládající se z jediného masivního kamene nebo skály, nebo jednoho kusu skály umístěného jako monument nebo v něm.

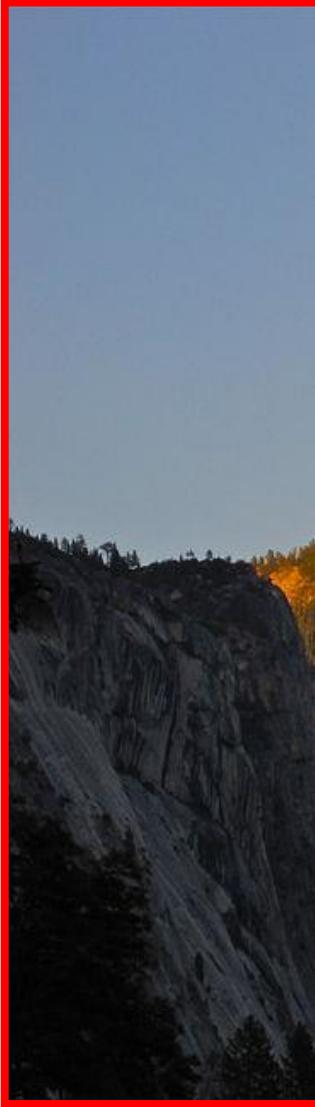
Přeloženo z Wikipedie

Z řeckého *μονολιθηος*, *mono* (jediný) a *lithos* (kámen)

Sigiriya (Lion Rock), Sri Lanka
Výška 200 m



Uluru (Ayers Rock), Australie
Výška 348 m, obvod 9.4 km




Co jsou monolity?

Monolit je porézní pevná látka sestávající s jednoho kusu anorganického materiálu nebo organického polymeru připravená polymerizačními reakcemi vně či uvnitř definované formy, nebo na povrchu pevné podložky.

Vlastní definice

Organický polymerní monolit

 Microsoft Bing

 organic polymer-based monoliths

ALL

SCHOOL

IMAGES

VIDEOS

MAPS

NEWS

CHAT

About 646,000 results

[Advances in organic polymer-based monolithic column ...](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731730...)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731730...>



Author: Sebastiaan Eeltink, Sam Wout... **Publish Year:** 2017

Advances in **organic polymer-based** monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides - ScienceDirect View PDF
Download full issue Journal of Chromatography A Volume 1498, 19 May 2017, Pages 8-21

EXPLORE FURTHER

 (PDF) Quality Aspects of Oligonucleotide Drug Development ...

[researchgate.net](https://www.researchgate.net)

Vlastnosti a výhody polymerních monolitů

- ✓ **Není třeba plnění kolon.**
- ✓ **Jednoduchá *in situ* příprava z kapalných prekurzorů.**
- ✓ **Rozmanitost chemií a formátů**
- ✓ **Tolerance vysokých průtoků bez omezení tlakovou ztrátou.**
- ✓ **Usnadnění rychlého přenosu hmoty díky konvekci.**
- ✓ **Umožnění rychlých separací i velkých molekul (bílkoviny, nukleové kyseliny, polymery)**

Bylo nebylo ...
Pravěké monolity

Arthur C. Clark, kniha

Stanley Kubrick, film

2001: Vesmírná odysea



**Homo erectus
Před 1.6 miliony let**

Historie ?



Neznámý monolit v Utahu.

Autor: Instagram - UtahDPSAeroBureau

Prehistorické nápady 1952-1954



Electrokinetic Ultrafiltration Analysis of Polysaccharides

A New Approach to the Chromatography of Large Molecules

BY D. L. MOULD AND R. L. M. SYNGE

weight, would work in the opposite sense to molecular-sieve effects. An alternative possibility, suggested in discussions between Dr. A. J. P. Martin, Prof. A. Tiselius²⁶ and one of us (R.L.M.S.),²⁷ is to use electro-endosmosis to move a solution through a continuous block of porous gel structure. In this way the equivalent of movement of liquid through a very thick ultrafiltration membrane is attained without the necessity of great hydrostatic pressures, which would destroy the membrane structure. Here adsorption and molecular-sieve or frictional effects would all act in the same sense, tending to retard more the larger molecules.

Analyst 77, 964-969, 1952

Separations of Polysaccharides related to Starch by Electrokinetic Ultrafiltration in Collodion Membranes

BY D. L. MOULD AND R. L. M. SYNGE

The Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeenshire

(Received 15 April 1954)

If for a column consisting of separate pieces of porous material a continuous block of material of rather uniform porosity could be substituted, molecular-sieve and adsorption effects would work together and no longer in opposite senses when liquid containing molecules of different sizes is forced through the block chromatographically. For porous materials at present available, however, the high hydrostatic pressures required to produce reasonable flow through a thick block would cause stresses which would collapse the pore structure.

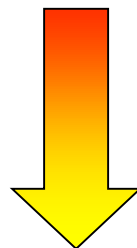
Ranné přístupy k
monolitickým materiálům
1967-1974

Polymery

- **Zbotnalý poly(2-hydroxyethyl-methakrylát-co-ethyléndimethakrylátový gel (HEMA-EDMA)**
M. Kubín et al., *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 3881 (1967).

HEMA-EDMA Gel

**100 mL 22% vodný roztok HEMA + 0.2% EDMA byl polymerizován
v 30 cm dlouhé 25 mm i.d. skleněné trubce**



22 cm dlouhý roubík zbotnalého gelu použit k odsolení bílkoviny

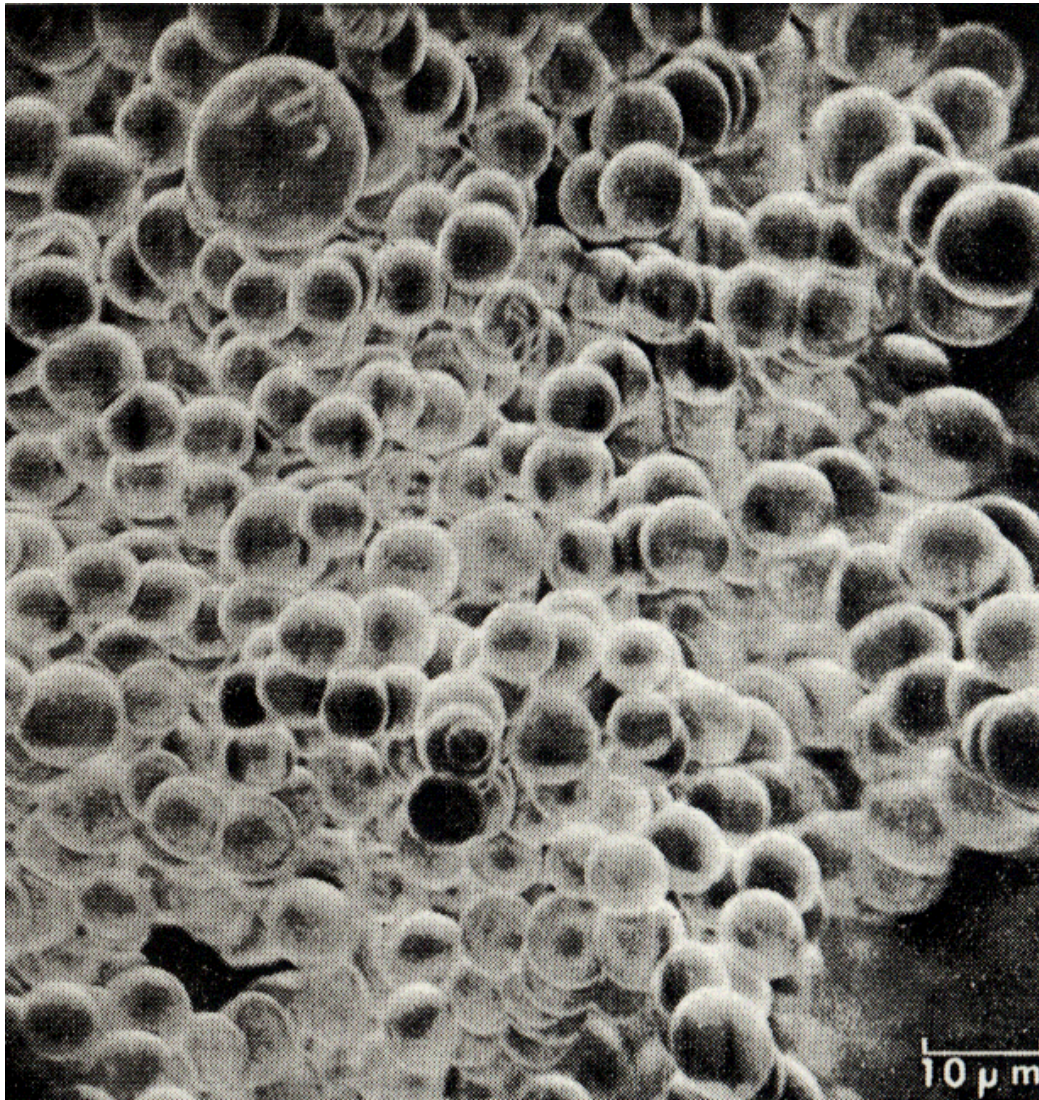
Gravitační tok, průtok 5 mL/h

M. Kubín et al., *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 3881 (1967).

Polymery

- **Zbotnalý poly(2-hydroxyethyl-methakrylát-co-ethyléndimethakrylátový gel (HEMA-EDMA)**
M. Kubín et al., *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 3881 (1967).
- **Polyuretánové pěny s otevřenými póry**
T.R. Lyn et al., *J. Chromatogr. Sci.* 12, 76 (1974).
L.C. Hansen and R.E. Sievers, *J. Chromatogr.* 99, 123 (1974).

Polyuretánové pěny



**Difenylmethandiisokyanát + polyol ve
směsném isodensitím toluen/ CCl_4
rozpouštědle**

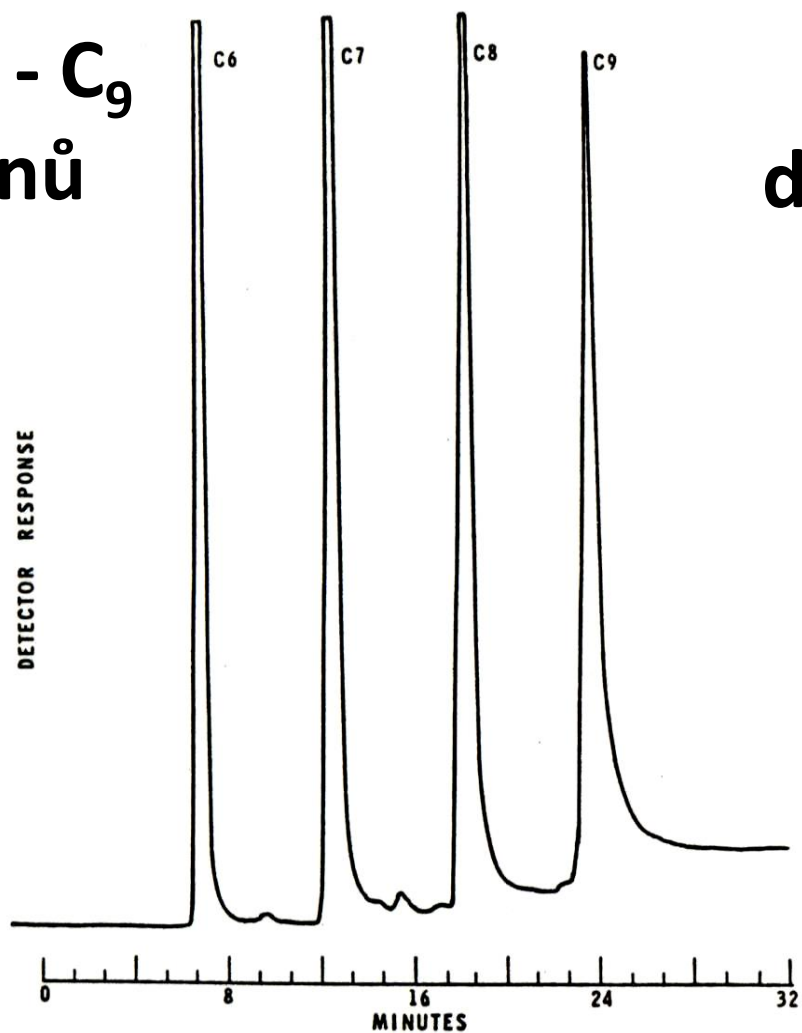
**Komercializovány v
Analabs Inc. North Haven, CT**

T.R. Lyn et al., *J. Chromatogr. Sci.* 12, 76 (1974)

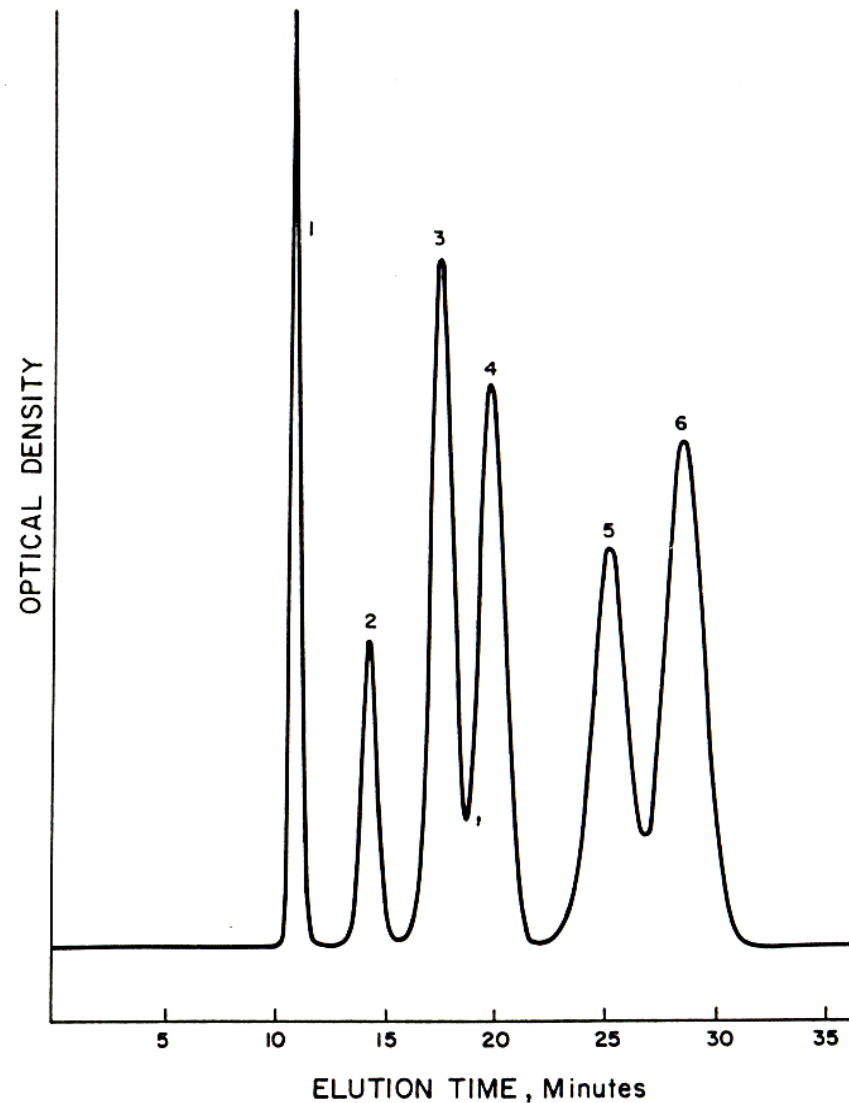
L.C. Hansen, R.E. Sievers, *J. Chromatogr.* 99, 123 (1974)

Separace v polyuretánové pěně

GC C₆ - C₉
alkánů



NP-LC
dichloroanilinů



Novodobé přístupy k monolitickým materiálům 1989-...

Silně stlačené akrylamidové gely



Stellan Hjertén, born 1928

Journal of Chromatography, 473 (1989) 273–275

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 21 522

Note

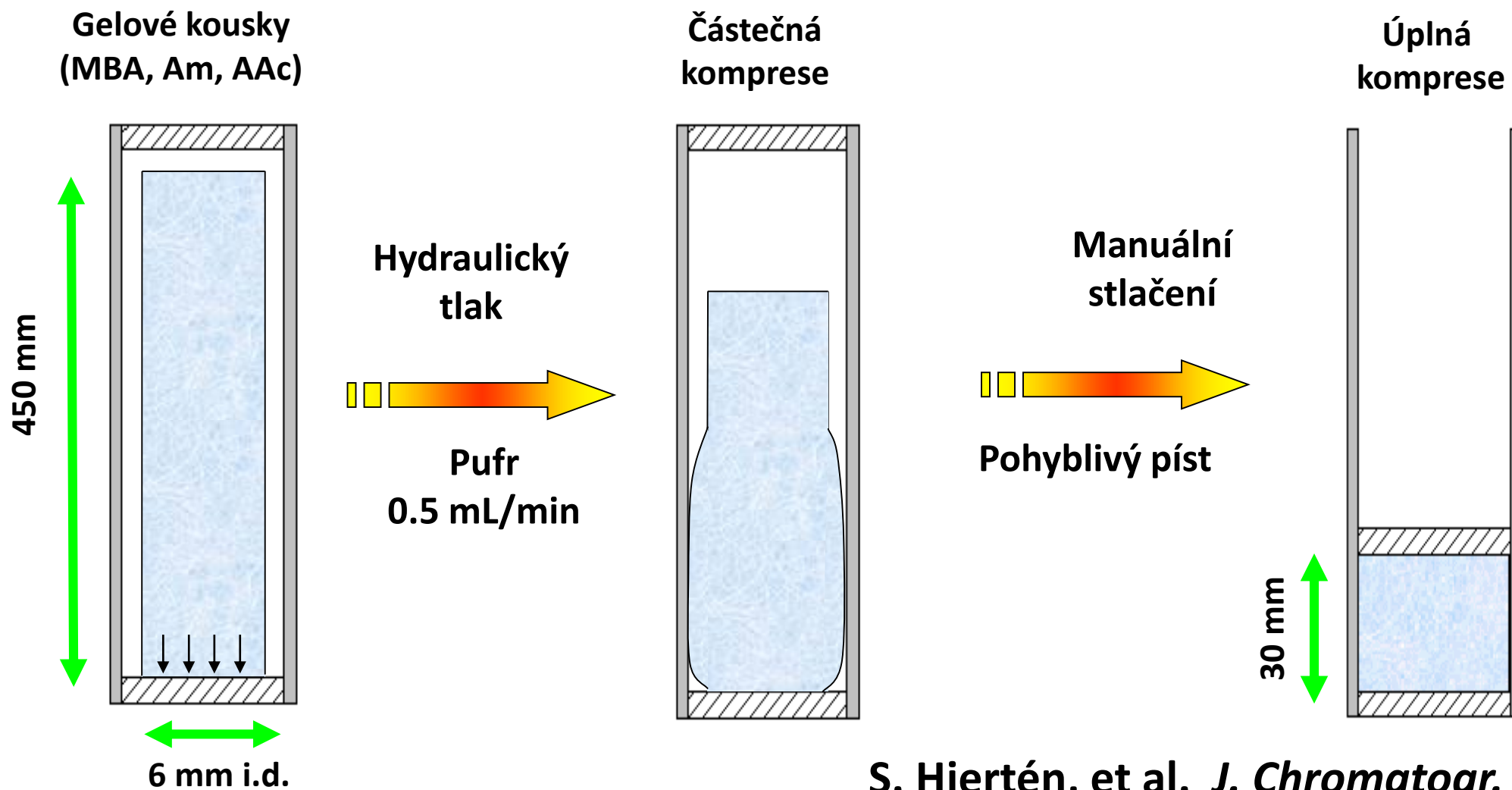
High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds

STELLAN HJERTÉN*, JIA-LI LIAO and RONG ZHANG

Department of Biochemistry, University of Uppsala, Biomedical Center, P.O. Box 576, S-751 23 Uppsala (Sweden)

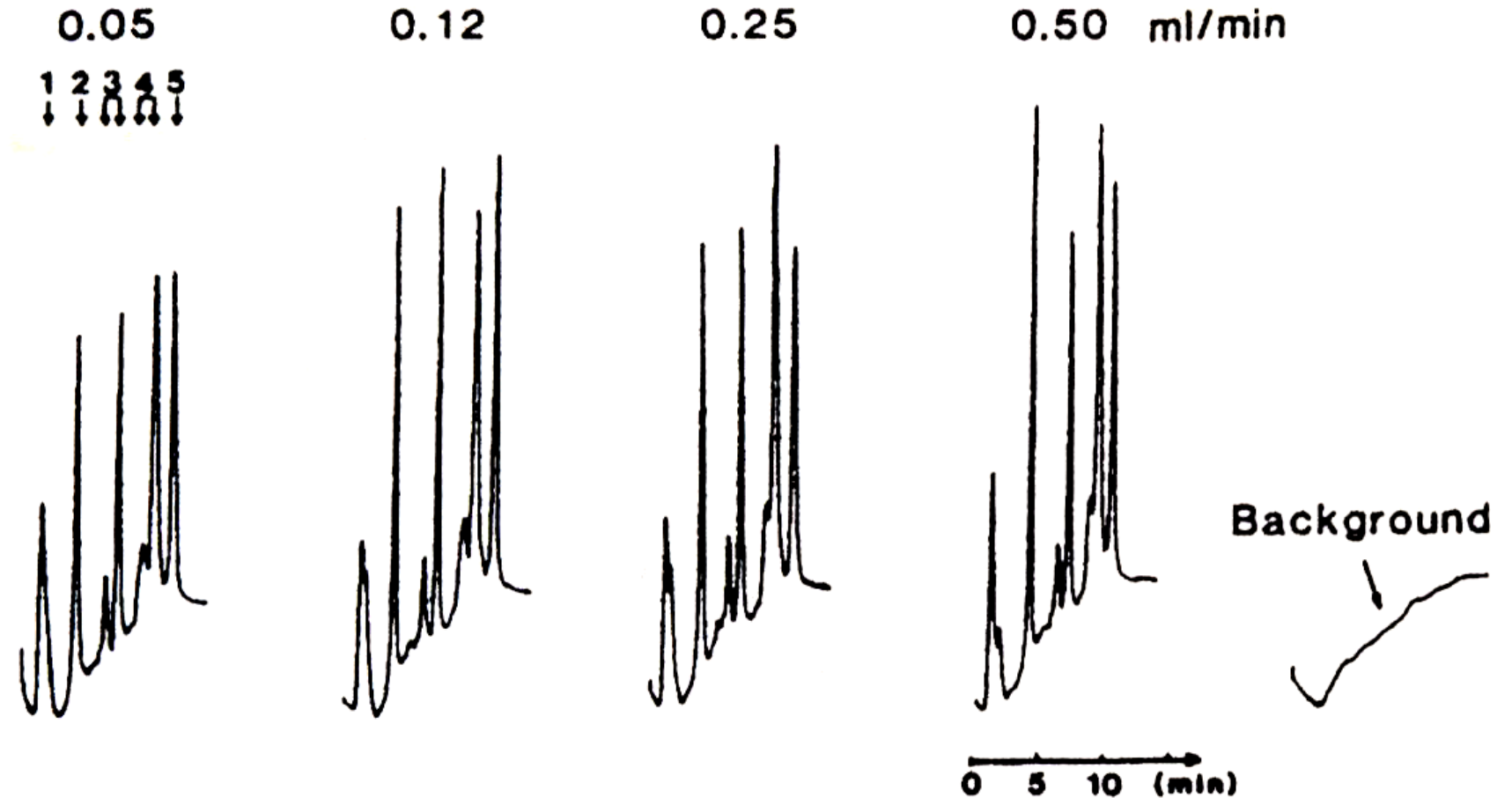
(First received March 14th, 1989; revised manuscript received April 10th, 1989)

Kolona z komprimovaného akrylamidového gelu



WCX separace bílkovin

Komprimovaná
kolona
6 mm i.d.



1. Ovalbumin, 2. equine myoglobin, 3. whale myoglobin, 4. cytochrome c, 5. lysozyme

- **Stacionární fáze nebyla zcela kontinuální.**
- **Kolony pouze pro separace s použitím iontovýměnného mechanismu.**



- **BioRad komercializoval tyto kolony pod názvem UNO. Po několika málo letech je stáhl z prodeje.**

Polymerní monolitické disky

JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY, 13(1), 63-70 (1990)

HIGH-PERFORMANCE MEMBRANE CHROMATOGRAPHY. A NOVEL METHOD OF PROTEIN SEPARATION

**T. B. TENNIKOVA¹, B. G. BELENKII²,
AND F. SVEC¹**

*¹Institute of Macromolecular Chemistry
Czechoslovak Academy of Sciences
162 06 Prague, Czechoslovakia*

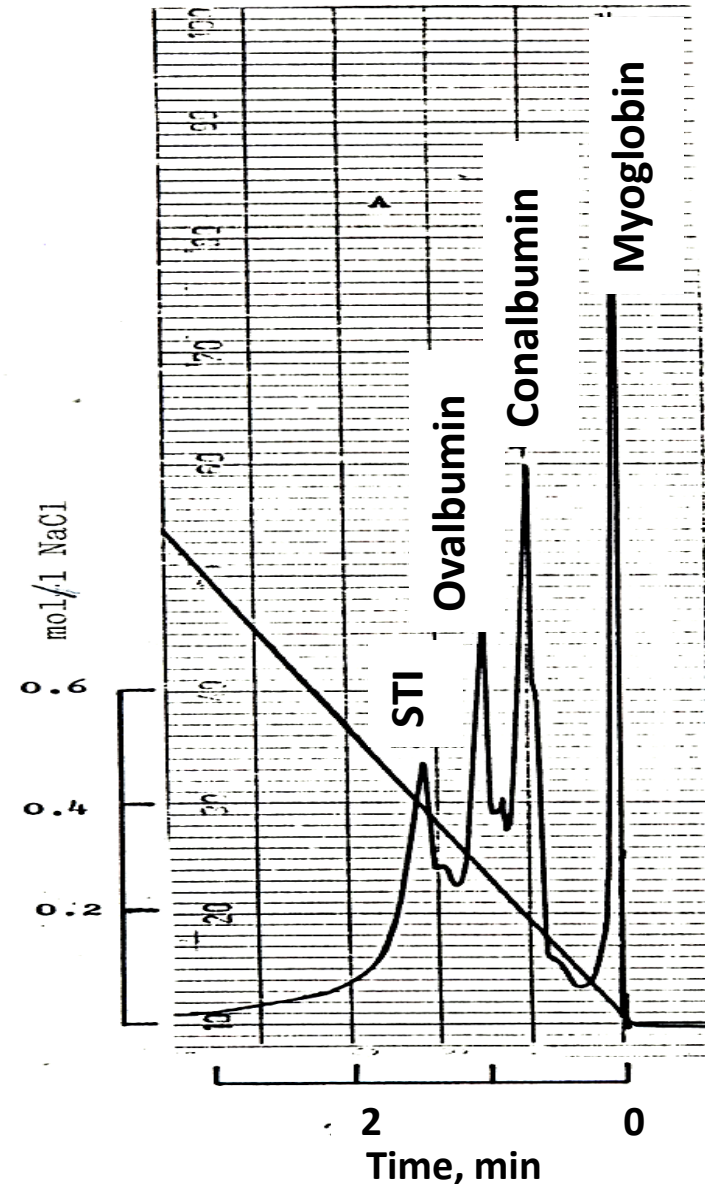
*²Institute of Macromolecular Sciences
Academy of Sciences of the U.S.S.R.
199 004 Leningrad, U.S.S.R.*



Rychlé WAX separace



Monolitický poly(glycidyl methakrylát
-co-ethylene dimethakrylátový) disk
modifikovaný diethylaminem
2 mm tloušťka, 20 mm průměr



Polymerní monolitické kolony



820

Anal. Chem. 1992, 64, 820–822

CORRESPONDENCE

Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media

Frantisek Svec and Jean M. J. Fréchet

Department of Chemistry

Baker Laboratory

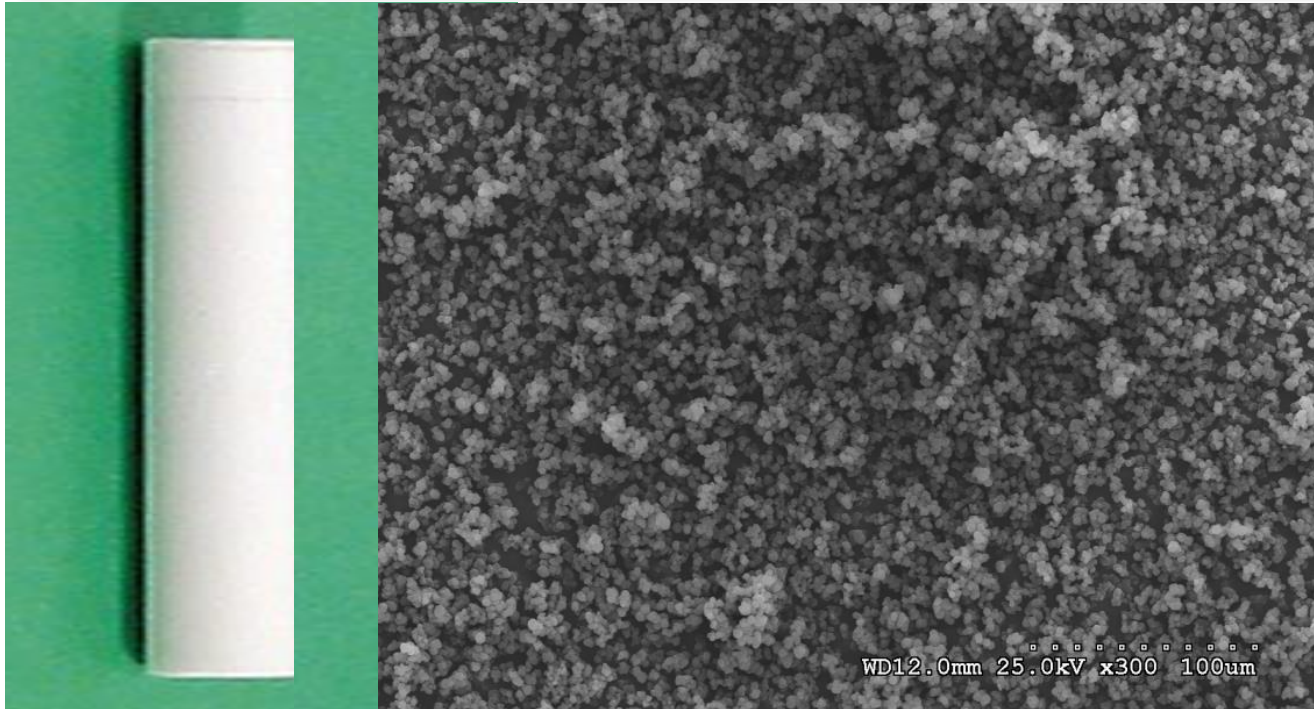
Cornell University

Ithaca, New York 14853-1301

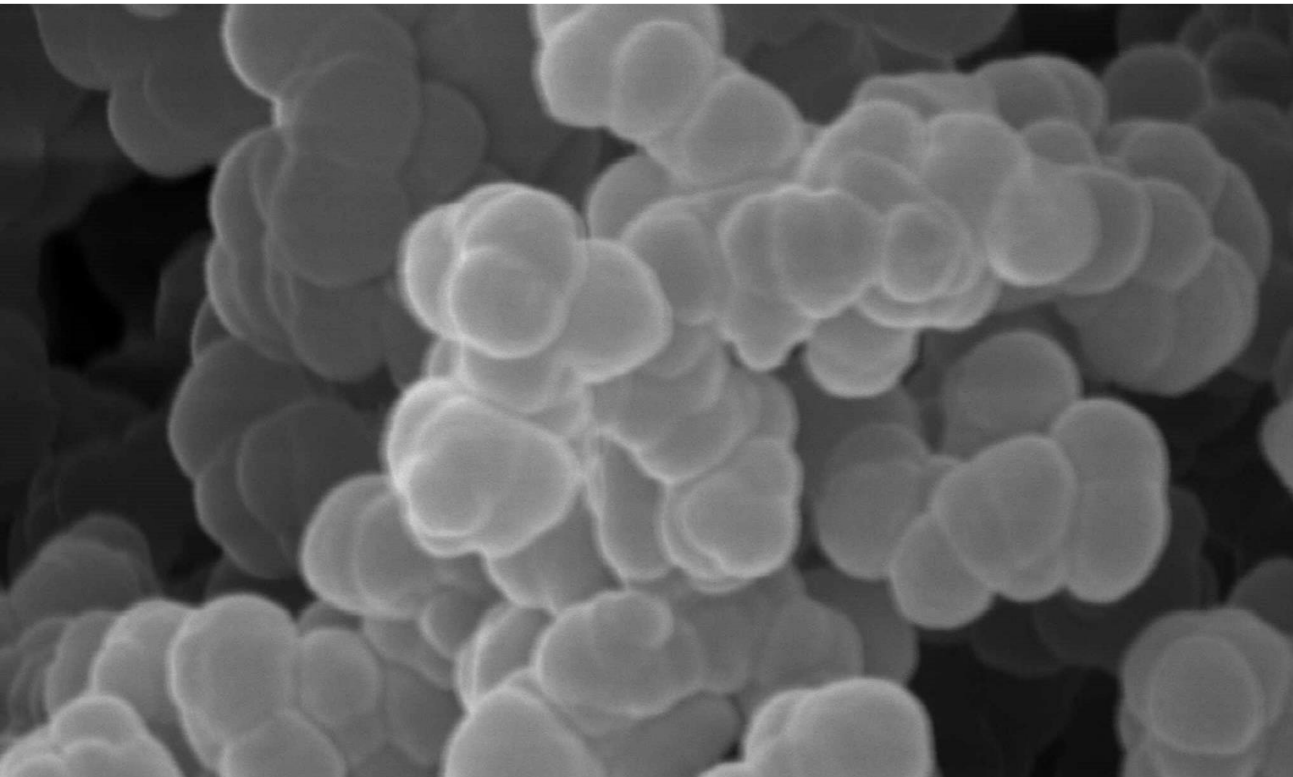
RECEIVED for review November 5, 1991. Accepted January 9, 1992.

1256 citací

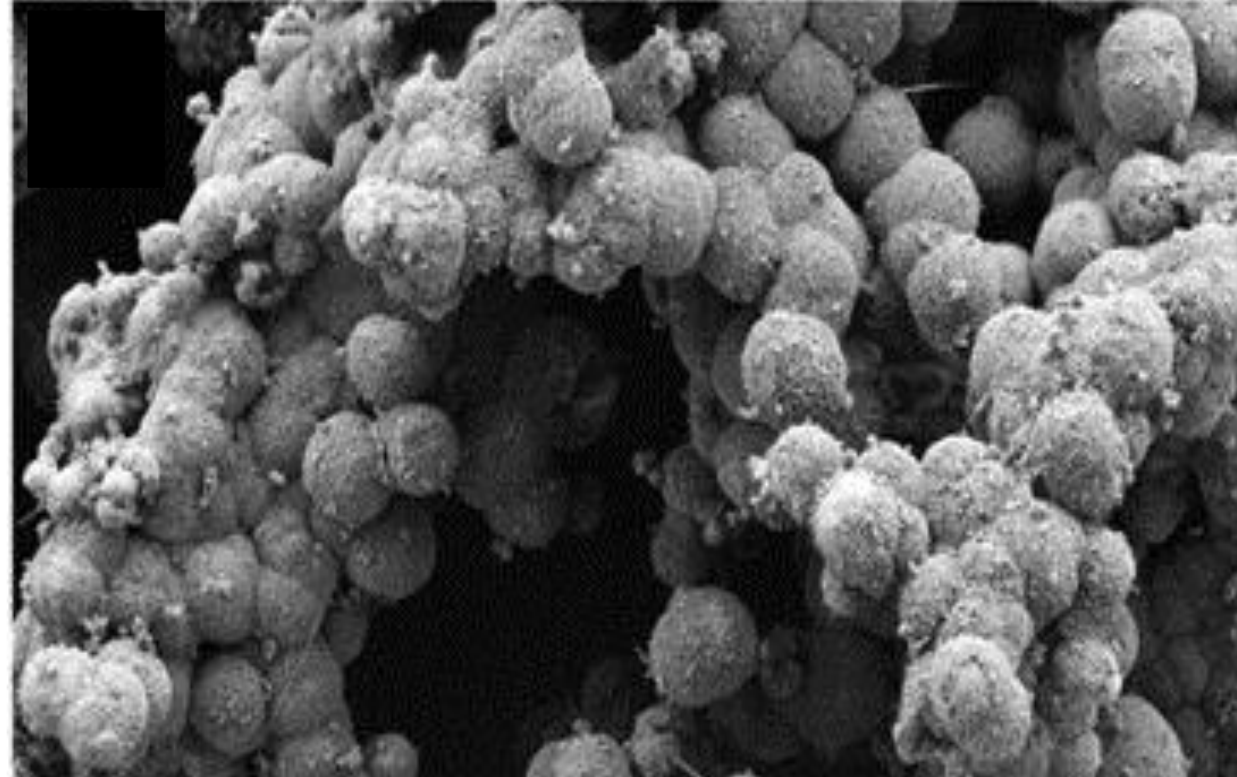
Komerční polymerní monolitická kolona



Morfologie monolitu



Polymerní monolit



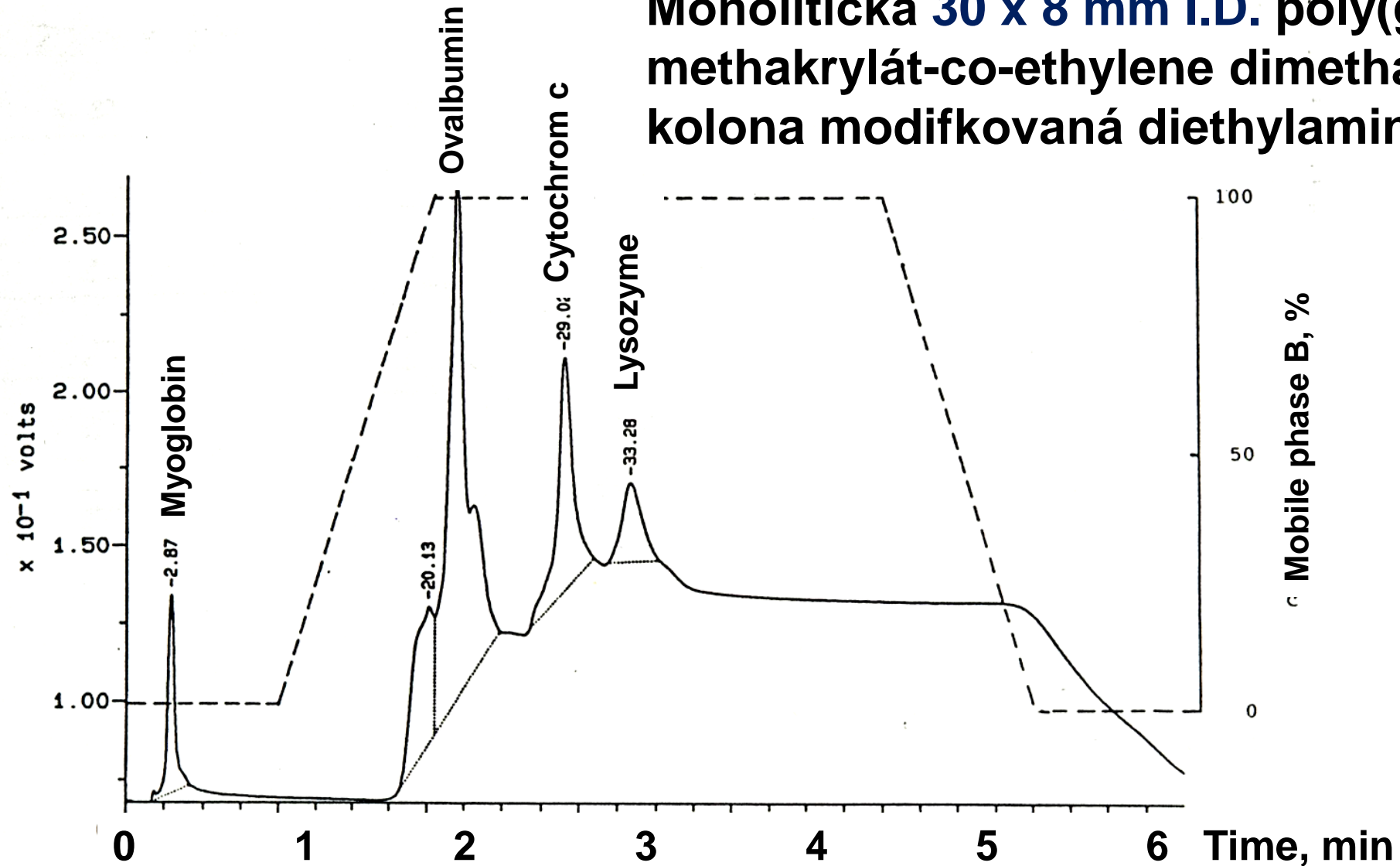
**Rybí exkrementy
12 000 let starý karbonát**

Perry C T et al. PNAS 108, 3865, 2011.

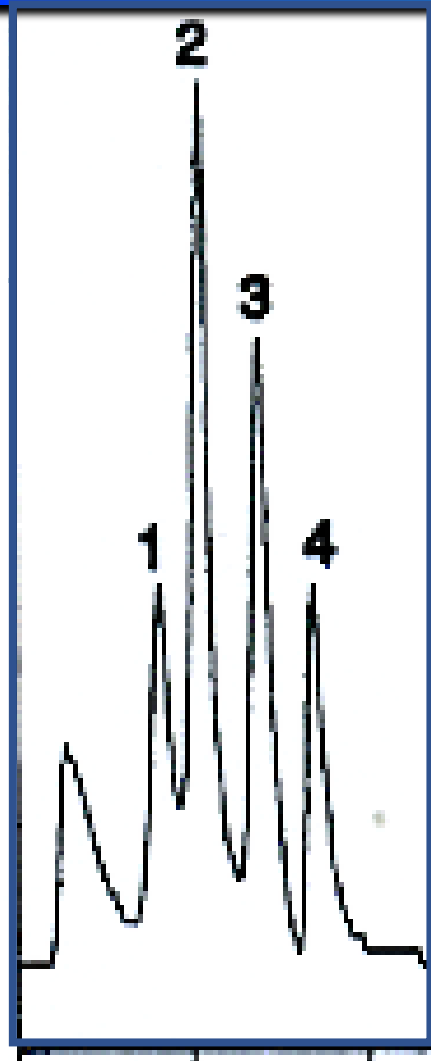
První WAX separace bílkovin

Monolitická 30 x 8 mm I.D. poly(glycidyl methakrylát-co-ethylene dimethakrylátová) kolona modifikovaná diethylaminem

Comments: mixture of myog + lys + ovalb + cytoch; 16 ng/ml; 2 μ l



První rychlá RP separace bílkovin



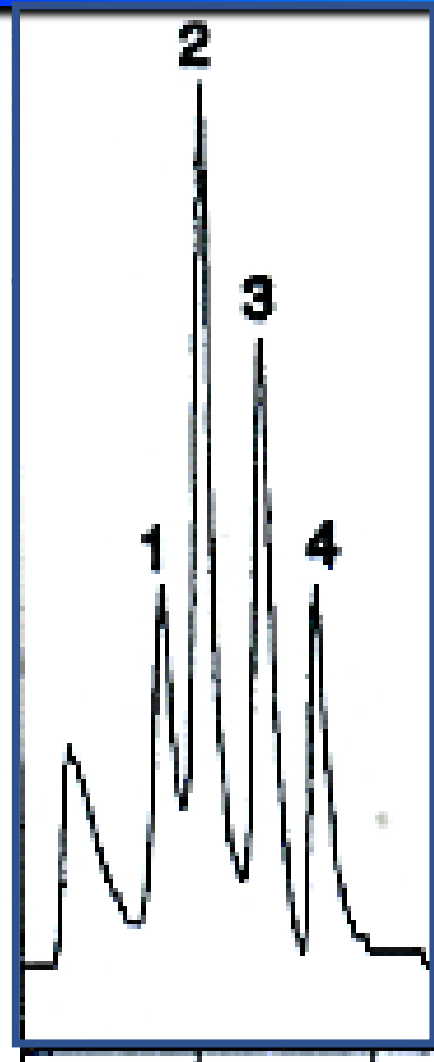
0 15 30
Retention time, s

Monolitická kolona **50 x 8 mm I.D.**
Poly(styren-co-divinylbenzen)
Mobilní fáze: gradient acetonitrilu
Průtok: 25 mL/min

Píky:

- 1 Ribonucleasa A
- 2 Cytochrome c
- 3 Myoglobin
- 4 Ovalbumin

První rychlá RP separace bílkovin



0 15 30
Retention time, s

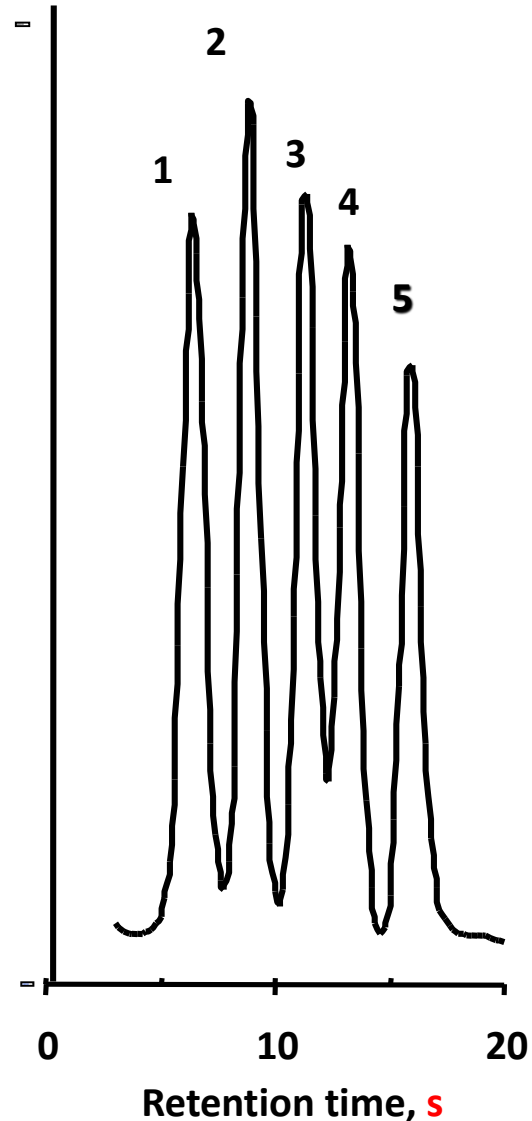
Monolitická kolona **50 x 8 mm I.D.**
Poly(styren – divinylbenzen)
Mobilní fáze: gradient acetonitrilu

Průtok: 25 mL/min = 1.5 L/h = 36 L/den

Píky:

- 1 Ribonucleasa A
- 2 Cytochrome c
- 3 Myoglobin
- 4 Ovalbumin

Ještě rychlejší RP separace bílkovin



ST-DVB monolit

Kolona: 50 x 4.6 mm

Průtok: 10 mL/min (14.6 L/den)

42-90% ACN v H₂O za 0.35 min

Tlaková ztráta 4 MPa !

1- Ribonucleáza

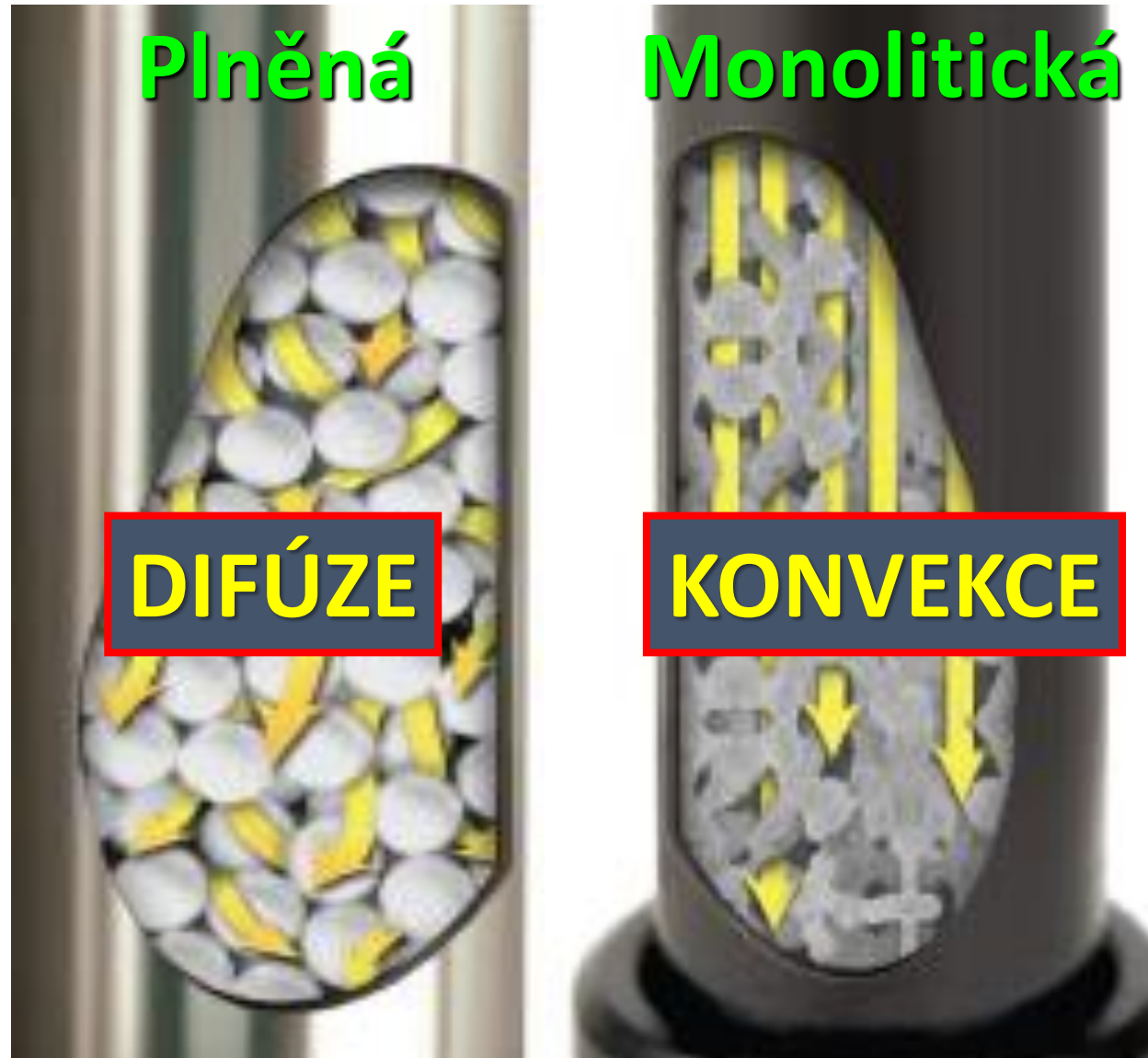
2- Cytochrome C

3- BSA

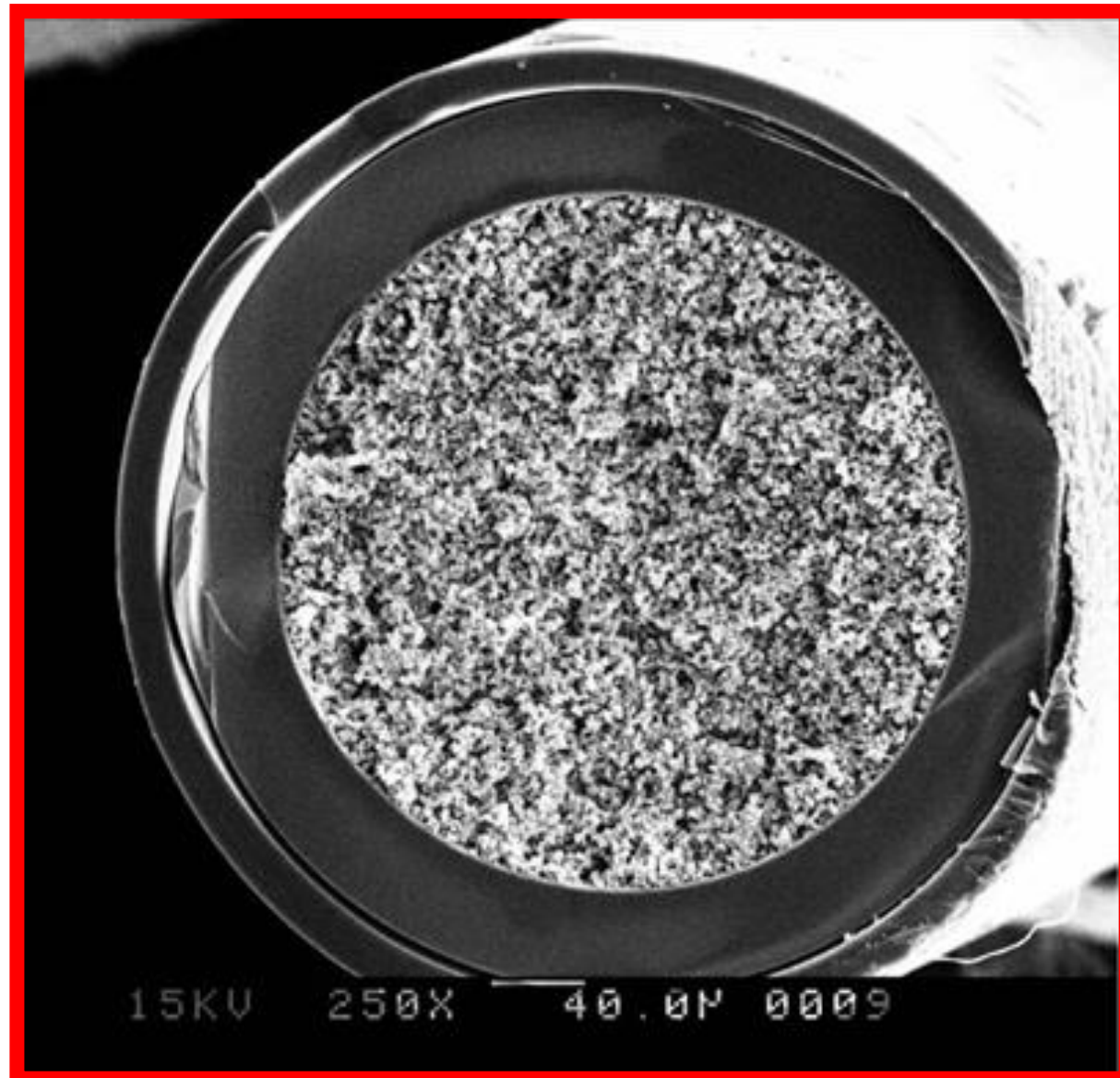
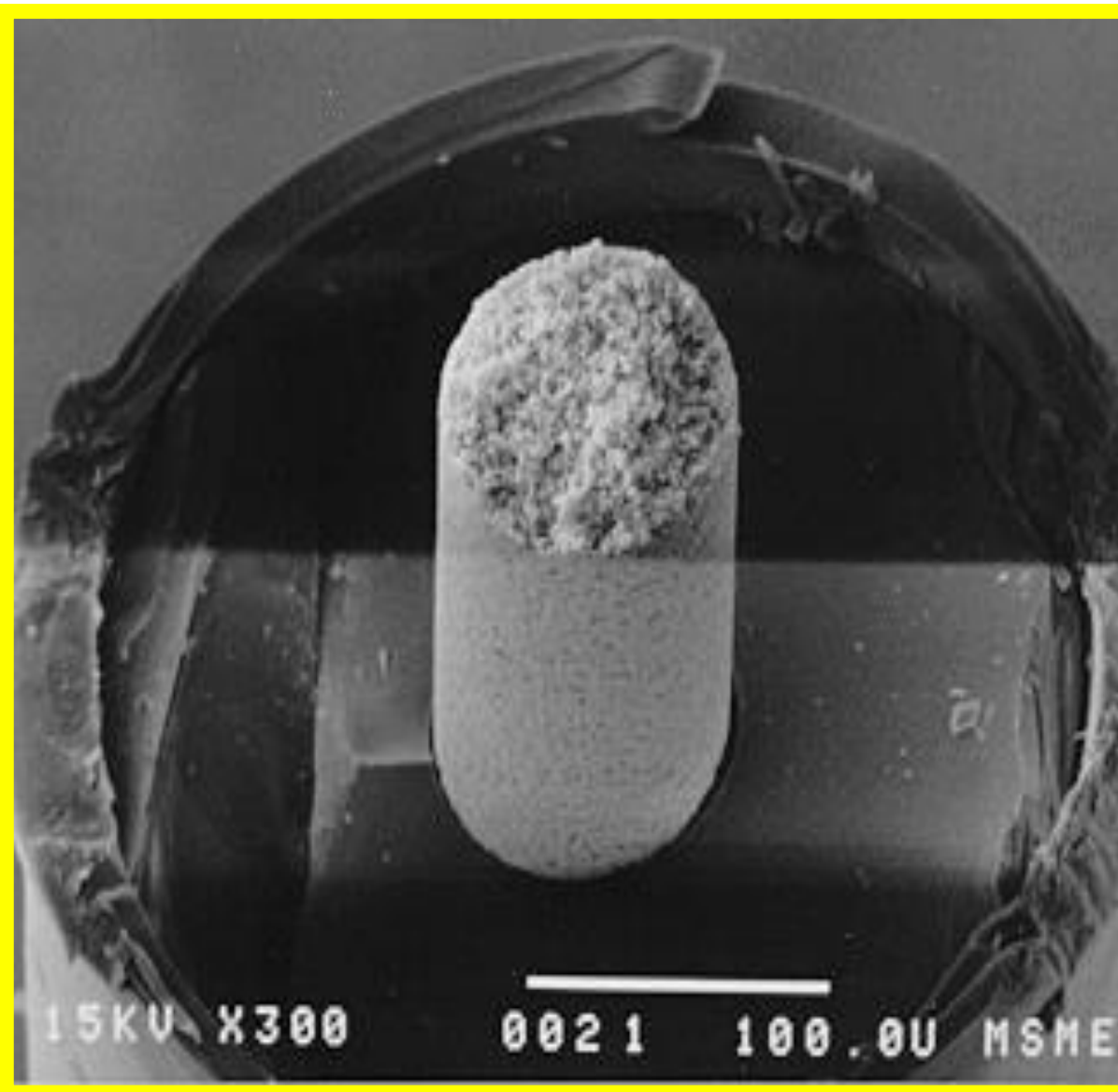
4- Carbonic anhydráza

5- Ovalbumin

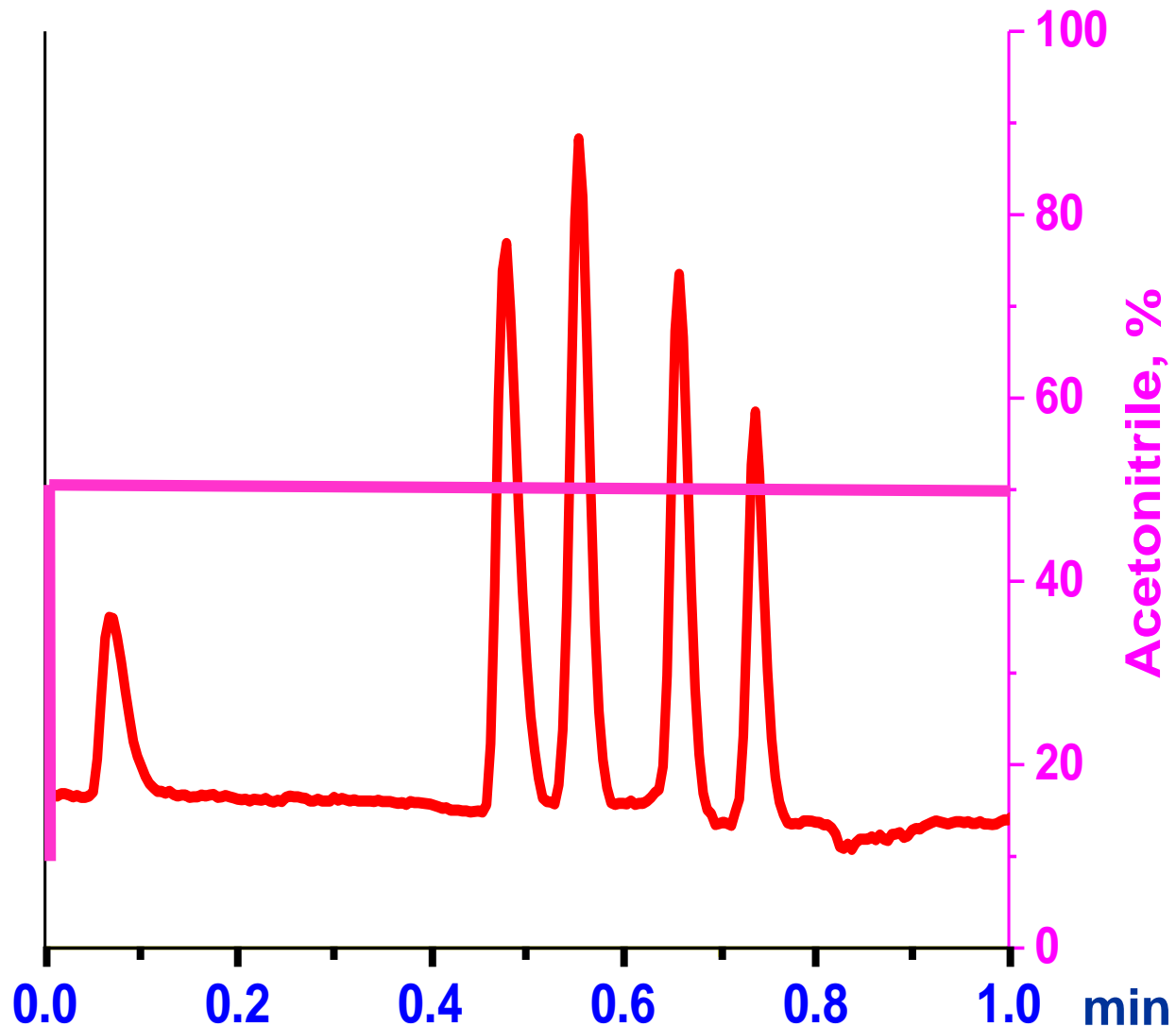
Přenos hmoty v koloně



Kapilární polymerní monolitická kolona



Rychlá separace bílkovin



Monolit: BuMA-EDMA

Kapilární kolona: 75 x 0.2 mm

Průtok: 95 μ L/min (85 mm/s) = 5.7 mL/h

Mobilní fáze:

Inject. 10 % ACN v 0.1% aq.TFA

Eluce 50 % ACN v 0.1% aq.TFA

Píky:

ribonucleasa A

cytochrome c

myoglobin

ovalbumin

Silikové monolitické kolony



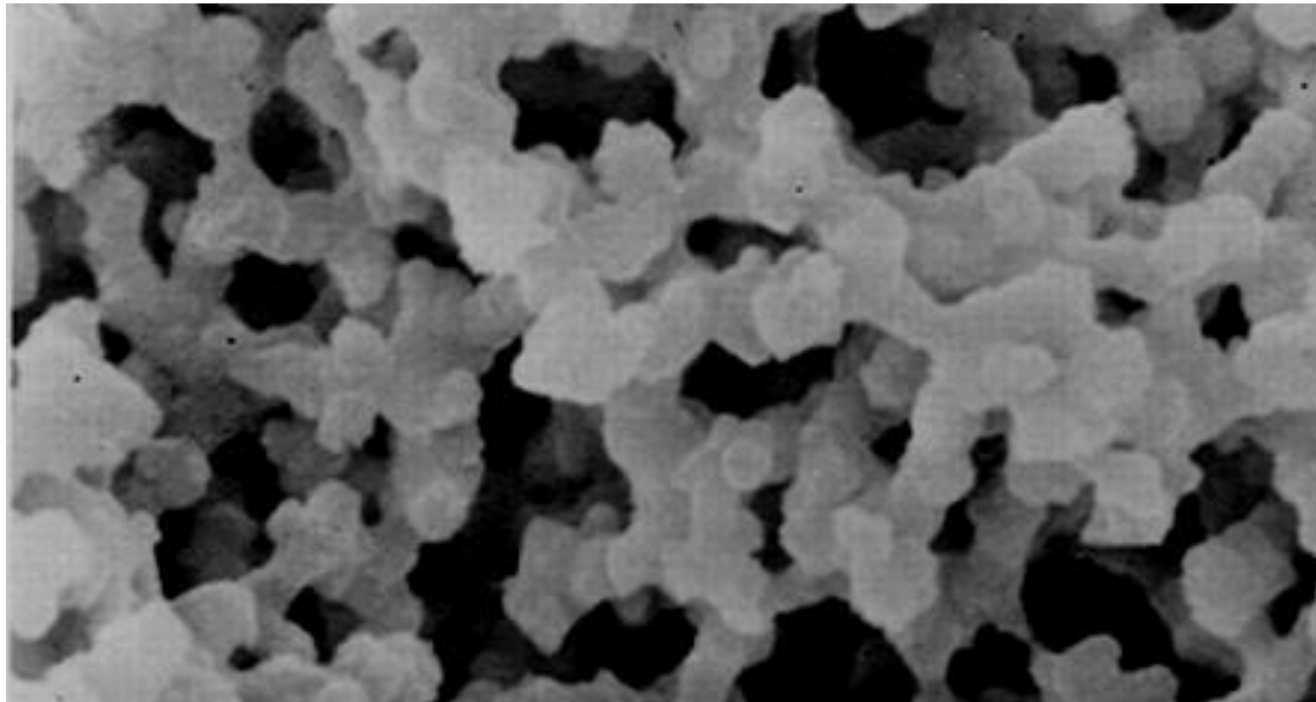
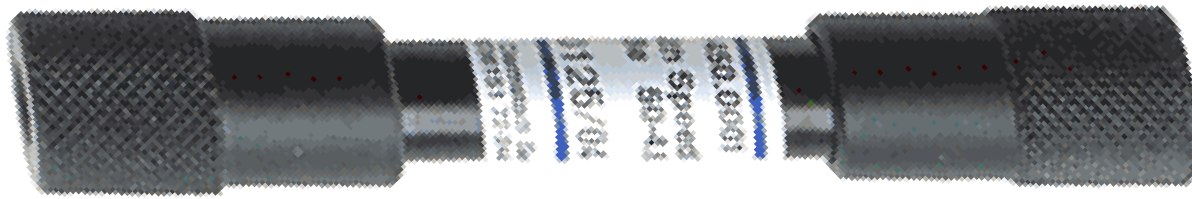
Anal. Chem. 1996, 68, 3498–3501

Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography

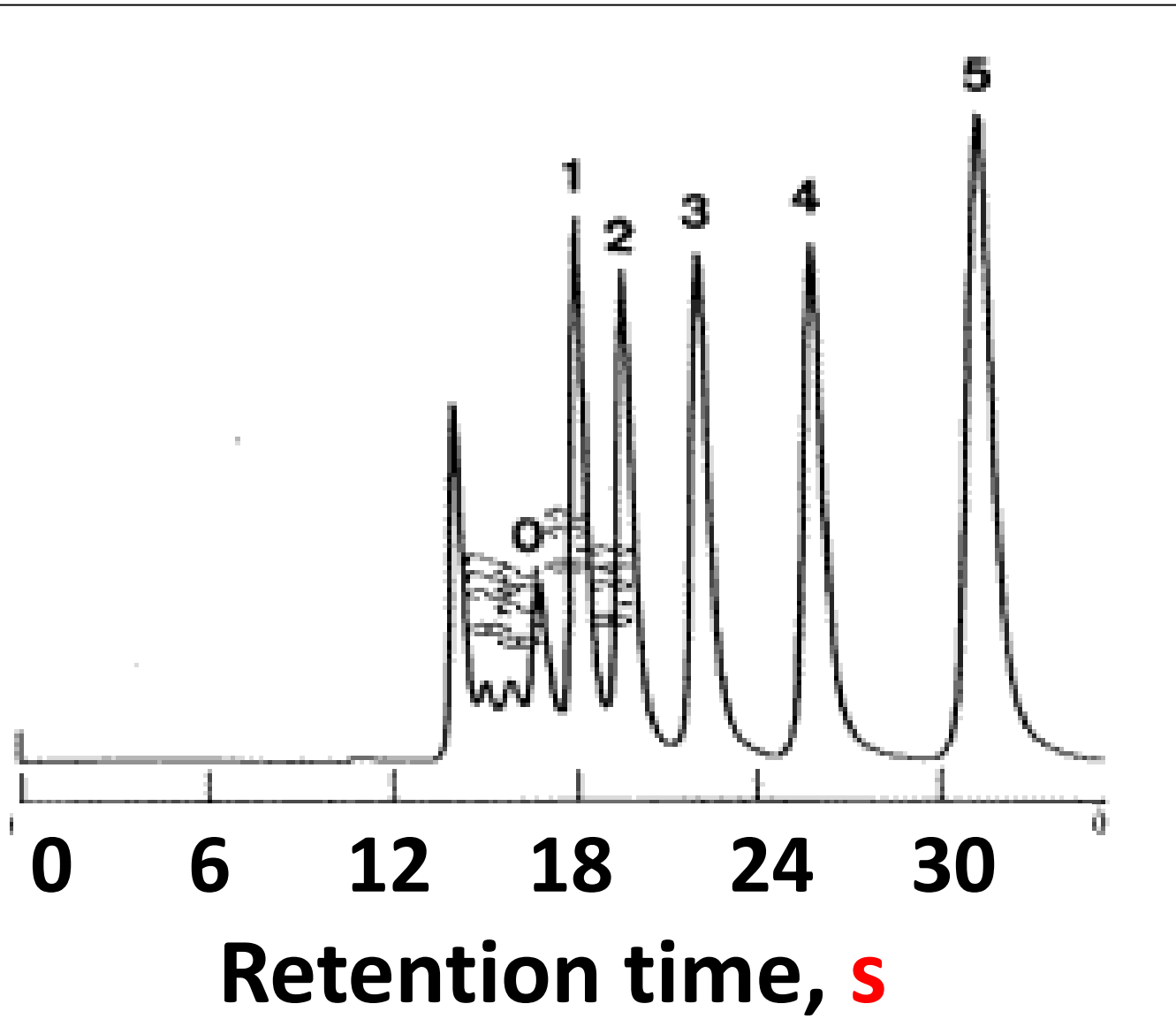
Hiro Yoshi Minakuchi,^{*,†} Kazuki Nakanishi,[†] Naohiro Soga,[†] Norio Ishizuka,[‡] and Nobuo Tanaka^{*,‡}

Division of Material Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan, and Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Siliková monolitická kolona



Silikové monolitické kolony



Kolona **83 x 7 mm I.D.**

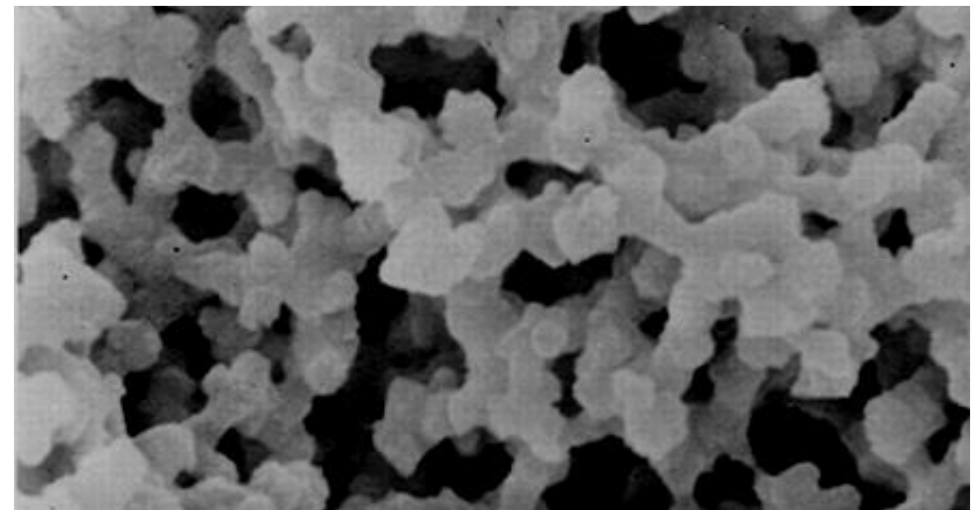
C18 silika

Mobilní fáze: 80% methanol

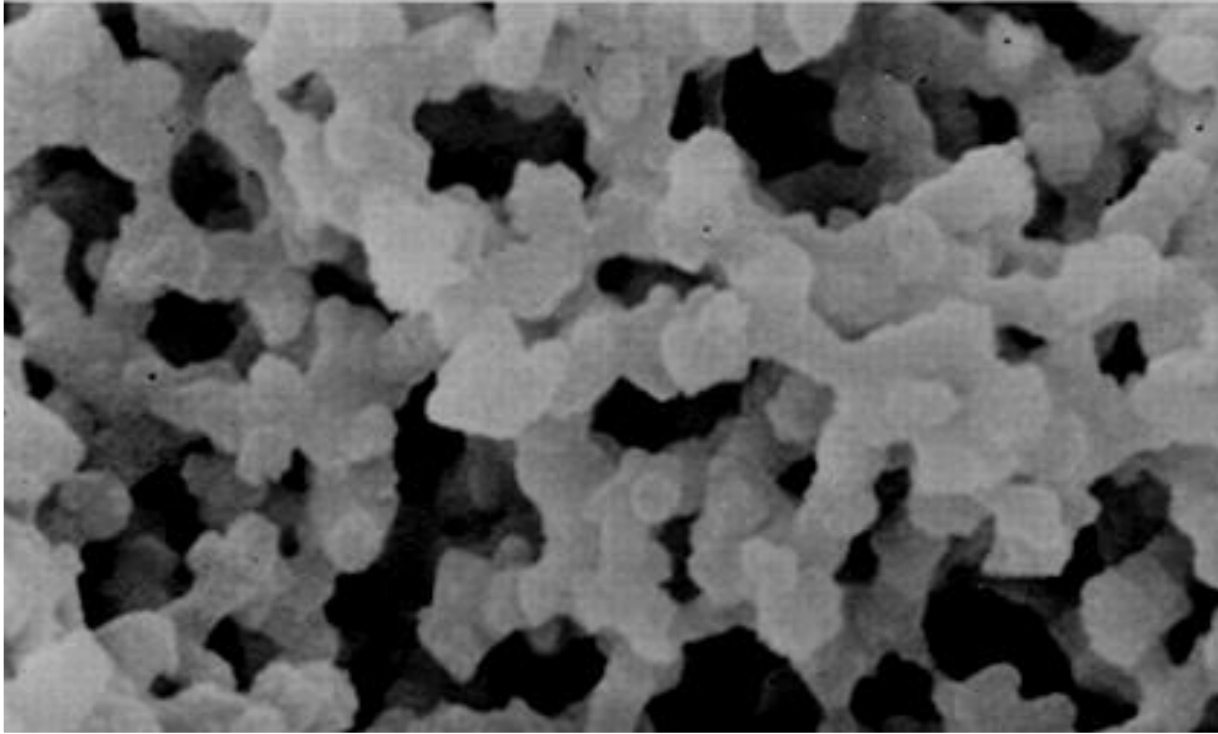
Průtok: 5 mm/min

Píky:

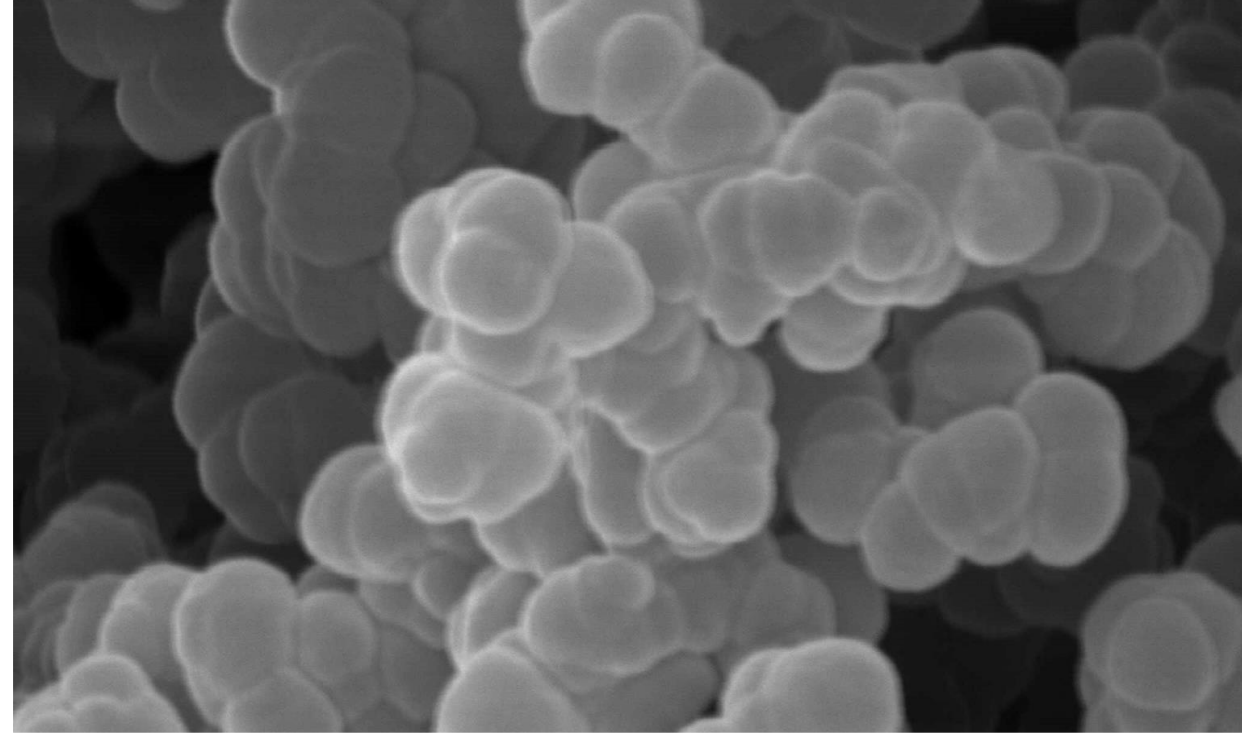
Alkylbenzény $C_6H_6C_nH_{2n+1}$



Srovnání morfologií monolitů



Silikový monolit
300 m²/g



Polymerní monolit
15 m²/g

Polymerní monolitické trubice



Anal. Chem. **2000**, 72, 5693–5699

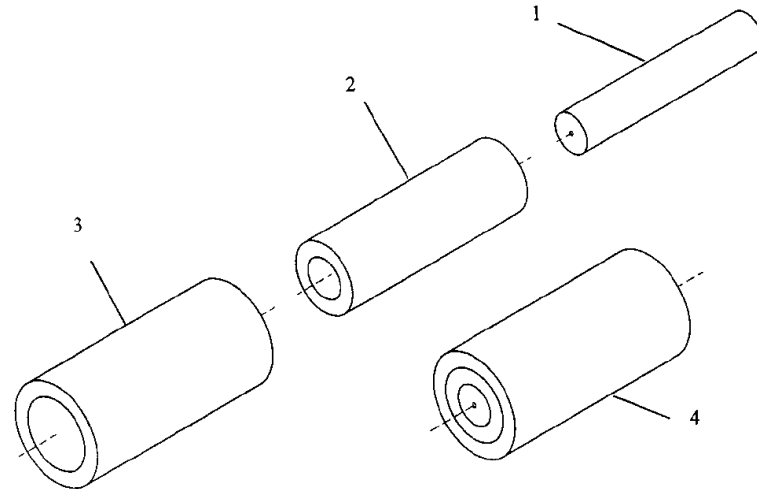
Construction of Large-Volume Monolithic Columns

Aleš Podgornik, Miloš Barut, and Aleš Štrancar

BIA Separations d.o.o., Teslova 30, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Djuro Josić

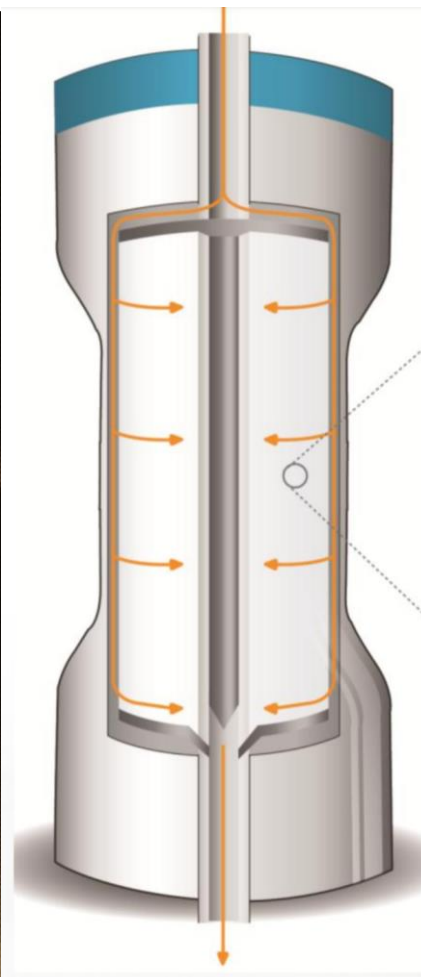
Octapharma Produktionsges, Oberlaaer Strasse 235, A-1100 Wien, Austria



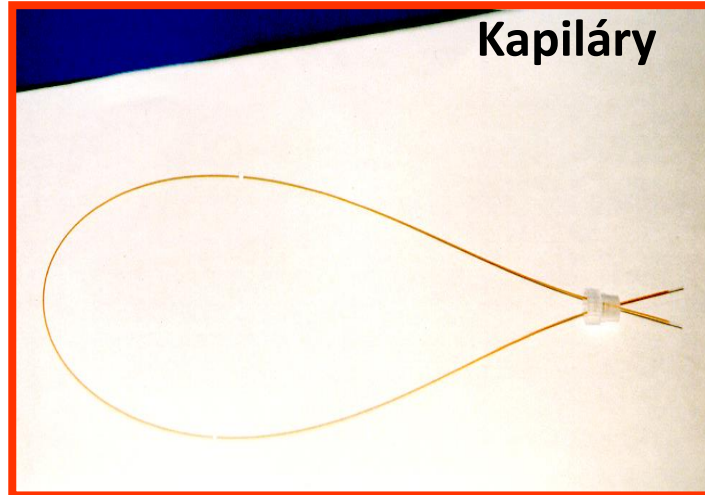
SeparáčnÍ zařÍzení s radiálním průtokem



SARTORIUS



Příklady komerčních monolitických produktů



Thermo Fisher Scientific
Sartorius BIA Separations
Merck
Phenomenex

GL Sciences
Agilent
Protea Biosciences

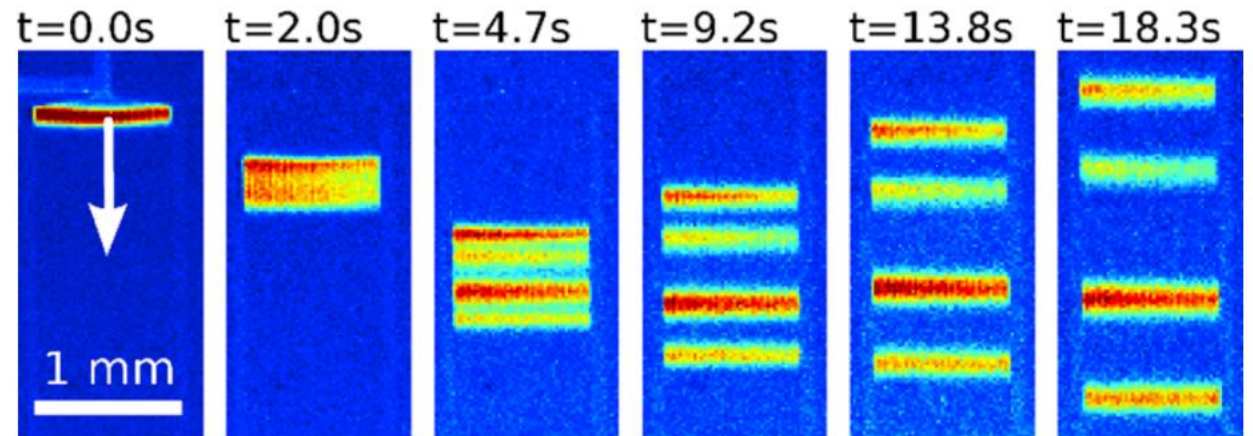
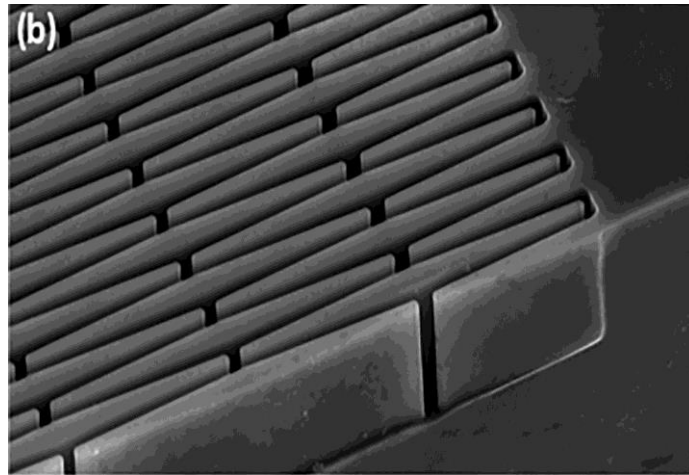
Inovativní přístupy k
monolitickým materiálům
???

Mikroobráběné „monolitické kolony“

analytical
chemistry

Merging Open-Tubular and Packed Bed Liquid Chromatography

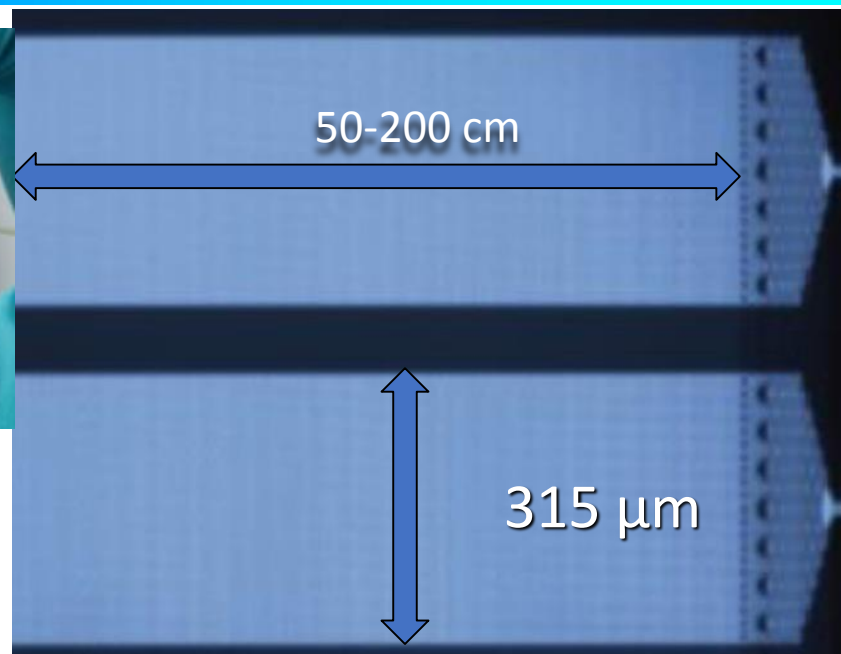
Gert Desmet,[†] Manly Callewaert,^{†,‡} Heidi Ottevaere,[‡] and Wim De Malsche*[†]



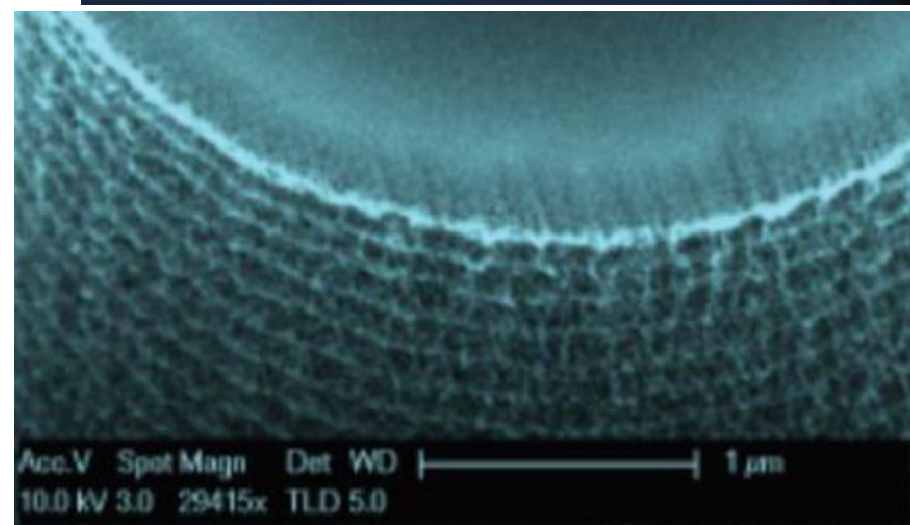
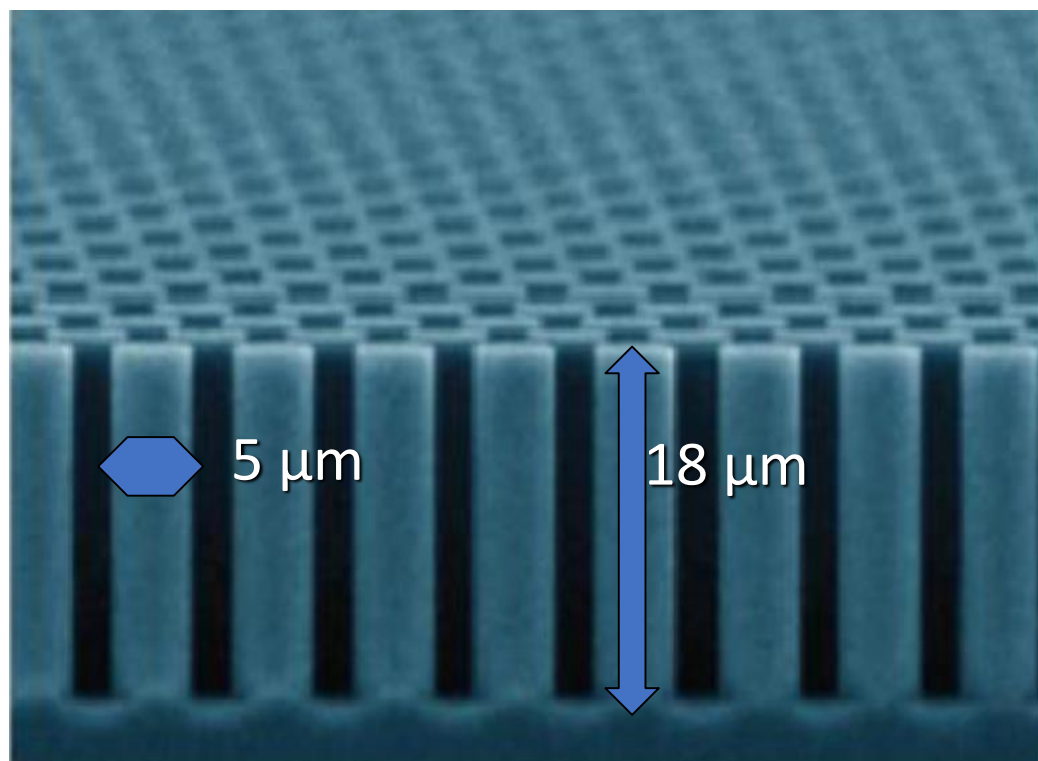
Délka systému: 4 cm
Poměr rozměrů: 20:1
Účinnost: 4,150,000 pater/m

Separace 4 kumarinů
LIF detekce

Mikroobráběná separační zařízení



Max pressure:
3 MPa (435 psi)



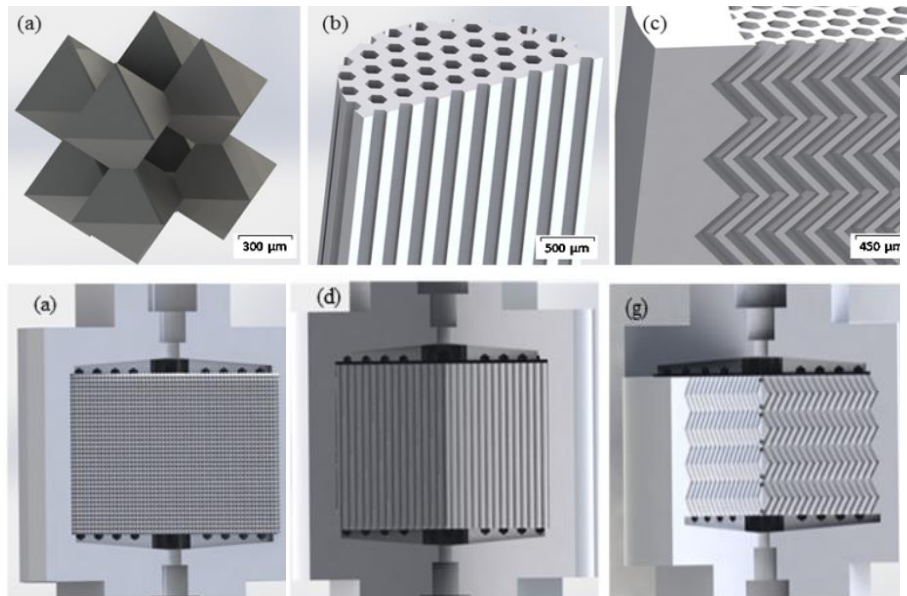
Aditivní výroba (3D tisk)



Journal of Chromatography A

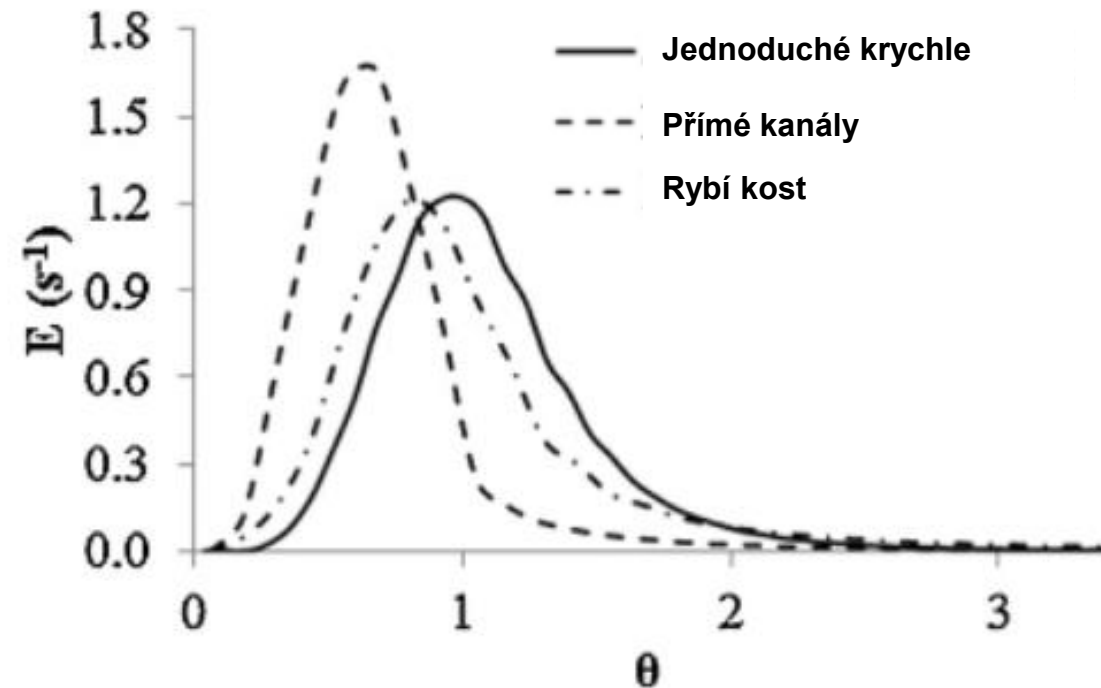
3D printed porous media columns with fine control of column packing morphology

Conan Fee*, Suhas Nawada, Simone Dimartino



Poly(akrylonitril-butadien-styren)
objem monolitů 1, 1.5, a 2 mL, stěny 2
mm, průměr kolon 16 mm.

Rozmývání NaCl píku



J. Chromatogr. A, 1333, 18, 2014

Aditivní výroba stereolitografií (3-D tisk)

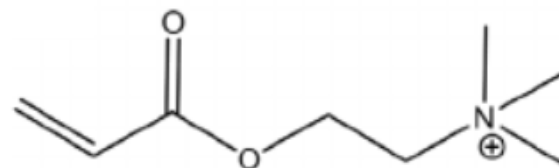
JOURNAL OF
SEPARATION SCIENCE

Demonstration of protein capture and separation using three-dimensional printed anion exchange monoliths fabricated in one-step

Ursula Simon¹ | Livia C T Scorza² | Sarah Teworte¹ | Alistair J McCormick²
Simone Dimartino¹



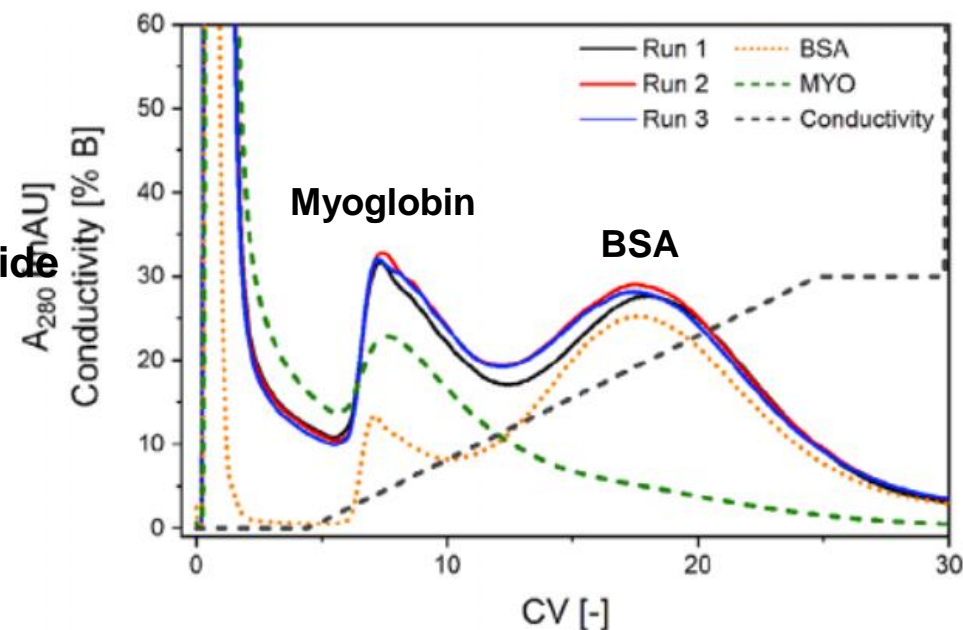
3D tiskárna



3-(acryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride



1.6 mL monolit, 500 μm stěny,
50% porozita, 3 mL objem kolony



J. Sep. Sci. 44, 1078, 2021

Závěrem ...

- ✓ Ačkoliv první nápady pocházejí z počátku padesátých let minulého století, široce použitelné porézní monolitické materiály a produkty se objevily až na konci let osmdesátých.
- ✓ Monolity mohou být připraveny z anorganických i organických polymerů v nejrůznějších formátech (kolony, disky, kapiláry, tenké vrstvy, ...) a velikostech s použitím řady technik včetně polymerizace, sol-gel přeměny, 3D tisku či mikroobrábění.
- ✓ Rozsah jejich aplikací se neustále zvětšuje.
- ✓ Budoucí chromatografické kolony se budou produkovat aditivním způsobem, tedy 3-D tiskem, jako monolity.

A to je konec