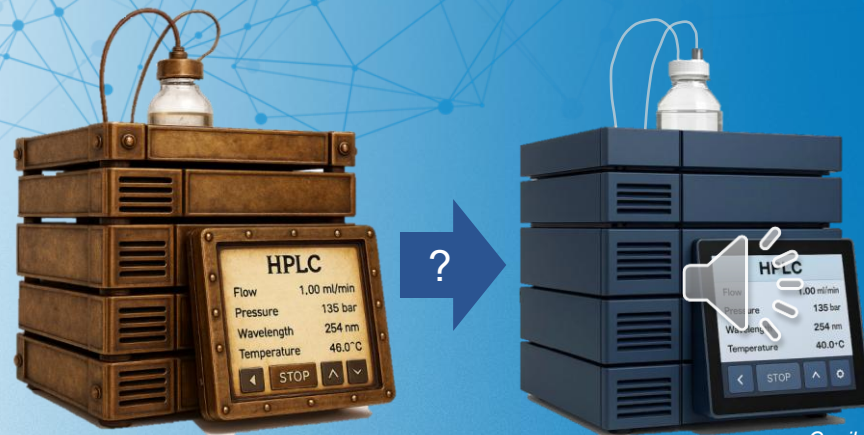


**Dá se vymyslet něco nového v kapalinové chromatografii,
nebo jen vylepšujeme starou technologii?**

Martin Gilar, research fellow

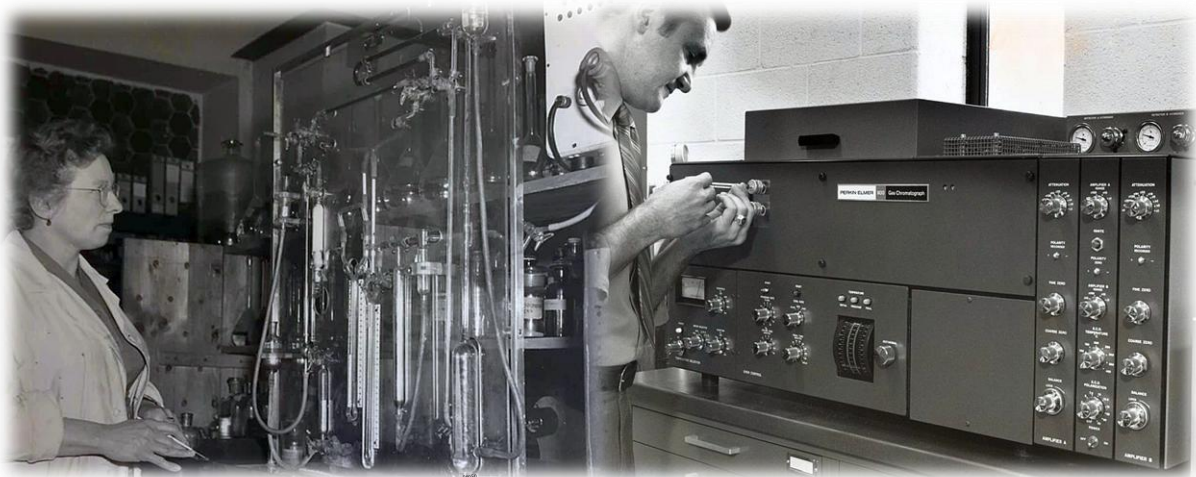
Vize 2025, 25. listopadu, 2025



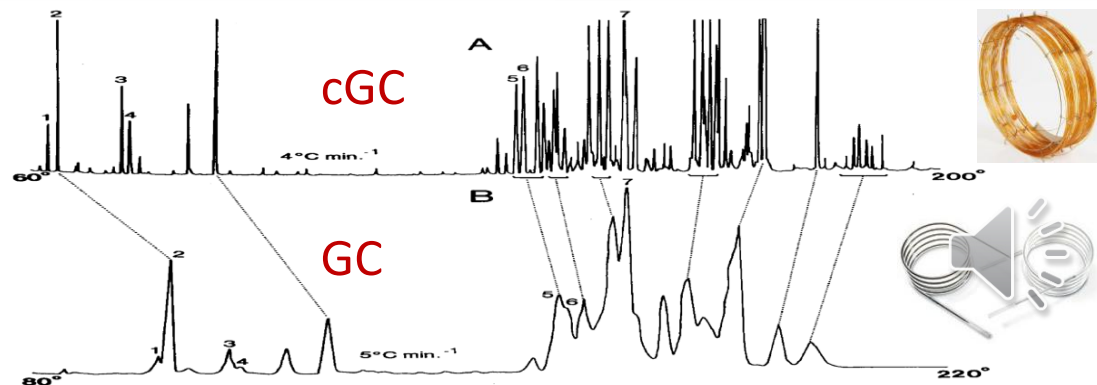
Průmyslové milníky v chromatografii - historie

Waters™

- Vývoj plynové chromatografie
 - 1940's – 1950's
- Komericializace GC
 - 1955 – 1970's
 - Detektory FID, TCD, MS
 - Skleněné kolony, kapilární GC
 - 1980's křemenné kapiláry cGC



- Separační schopnosti
 - Píková kapacita GC ~ 100
 - Píková kapacita cGC ~ 1000



Bartle and Meyer, TrAC, 2002, vol 21, 547-557

Průmyslové milníky v chromatografii - historie

- Vývoj kapalinové chromatografie

- 1900, 1930's – 1960s

- Komericializace LC

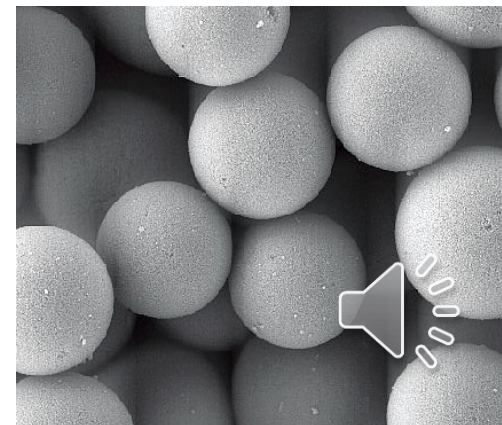
- 1960's – 1970's GPC, RP LC
 - Sorbent, pumpy
 - Detektory RD, UV, FD, MS
 - Silica C18 sorbents

- Separační schopnosti

- Píková kapacita GPC ~ 10
 - Píková kapacita HPLC ~ 150
 - Píková kapacita UPLC ~ 500



Waters™



Průmyslové aplikace v chromatografii - historie

Waters™

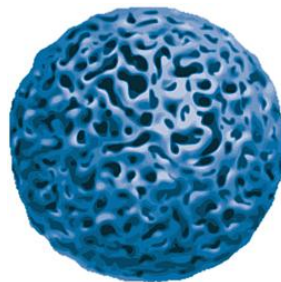
- Přírodní vědy
 - Amino kyseliny
 - Vitamín B₁₂
- Petrochemie
- Farmaceutický průmysl
 - Vývoj léků
 - Kontrola kvality
 - Preparace čistých látek
 - Chirální separace



LC, HPLC, UPLC... příštích 15 – 50 let

Waters™

- Průmyslový výzkum – motivován aplikacemi
- Kuličky, sorbenty, monolity
- Porézní, semi-porézní sorbenty, pokryté kapiláry
- Plnění kolon
- Separační módy, HILIC, SFC, selektivita, elektro-chromatografie
- Instrumenty, detektory
- Kolonový hardware
- Software, vývoj metod (AI)



LC, HPLC, UPLC... předpověď budoucnosti

Waters™

➤ Už se odehrálo



➤ V blízké budoucnosti



➤ Možná v delším časovém horizontu

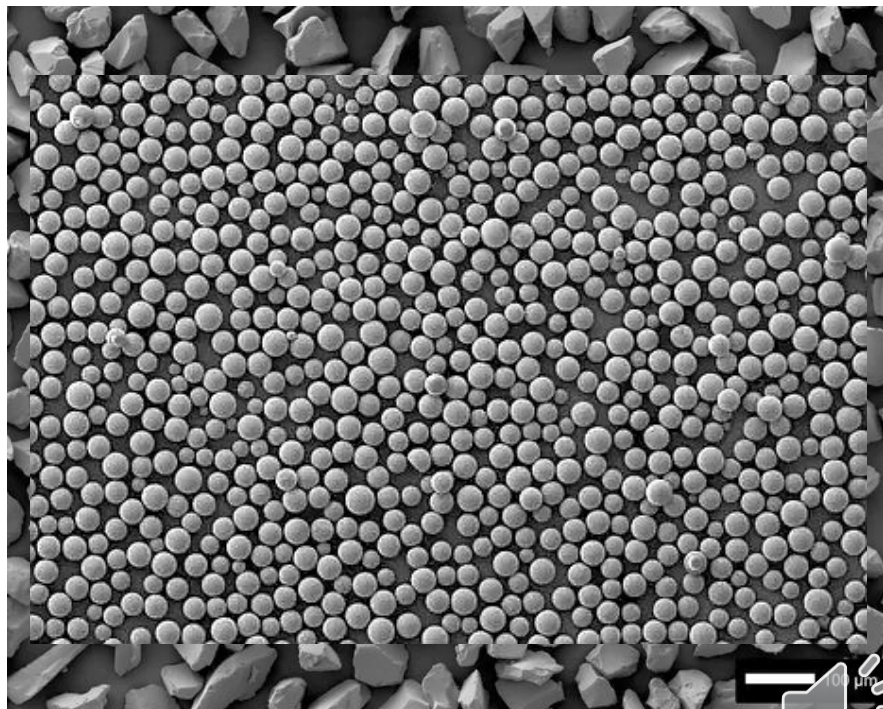


➤ Moc tomu nevěřím, ale co kdyby...



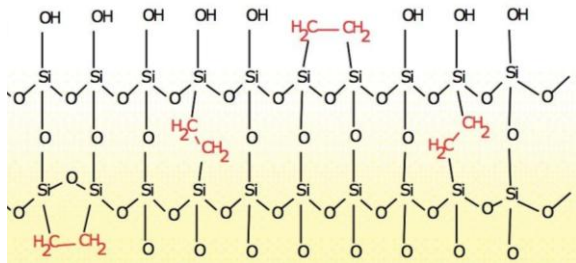
Chromatografické nosiče (sorbenty)

- Nepravidelné částice
- Sférické sorbenty
- Silika typu A vs B
- Hybridní silika
- Polydisperzní vs. Monodisperzní
- Neporézní
- Porézní
- Semi-porézní (core-shell)
- Monolithy



Chromatografický nosič (sorbenty)

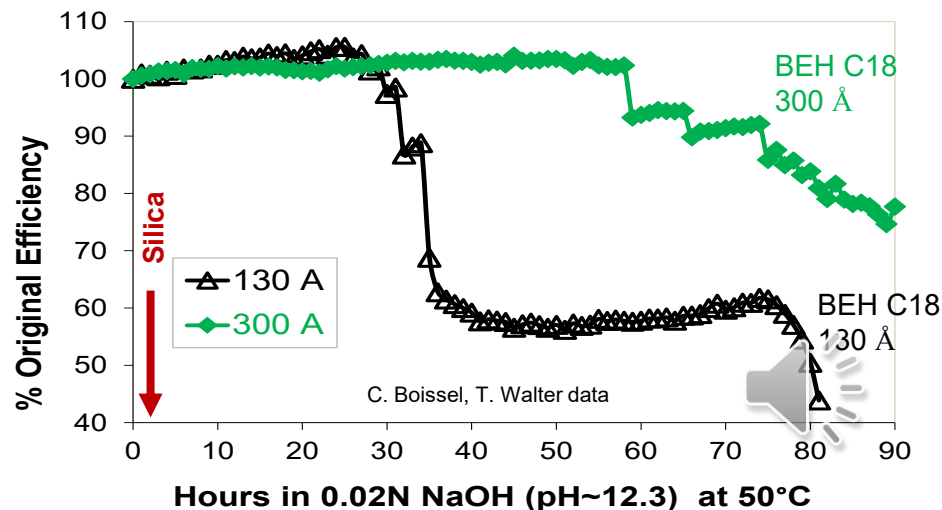
- Nepravidelné částice
- Sférické sorbenty
- Silika typu A vs B
 - Symmetry kolony
- Hybridní silika
 - BEH
 - Další generace



čistá silika B
(Symmetry)

Konvenční silika A

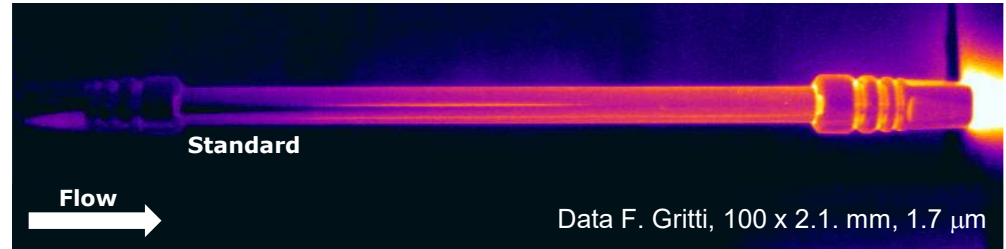
Chvostování bazických
látek (iontové interakce)



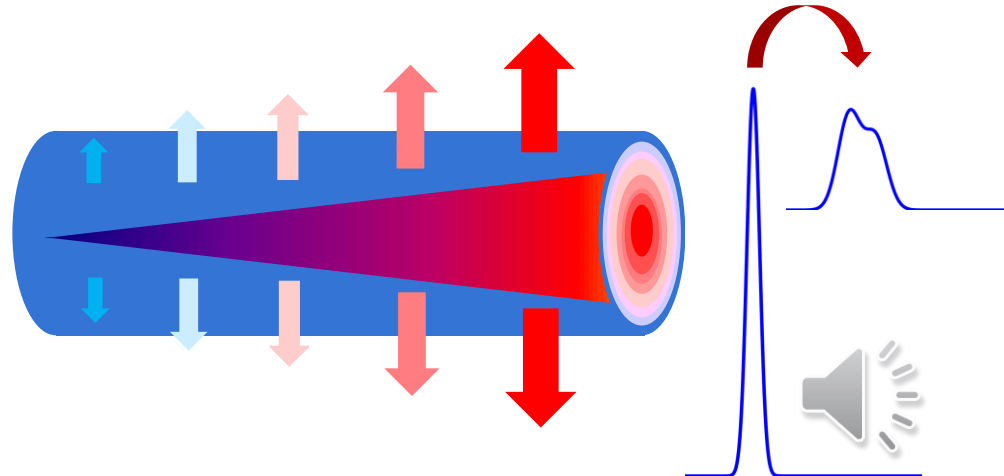
LC, HPLC, UPLC, „UUPLC“

Waters™

- 5 μm $\rightarrow$ 2,5 μm $\rightarrow$ 1,7-1,9 μm
- Co dál? 1-1.5 μm kolony?
- 100 MPa $\rightarrow$ 600 MPa?

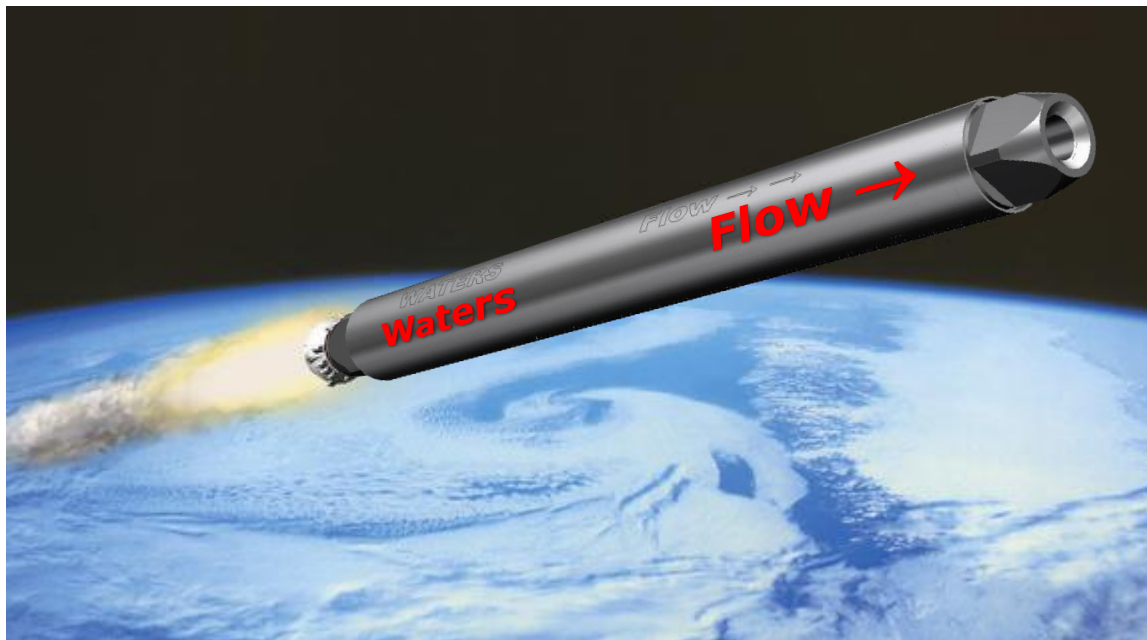


- UPLC 1,7 μm kolony
 - 2,1 - 3 mm i.d.
 - 30 – 150 mm
- „UUPLC“ 1-1.2 μm ?
 - 0,1 – 1,5 mm i.d.?
 - 20 - 50 mm ?



Vakuová termální izolace kolon

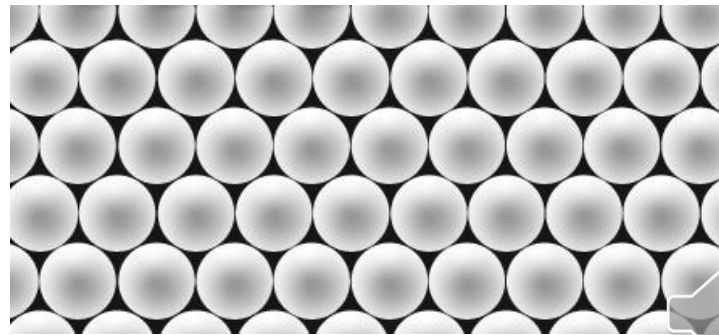
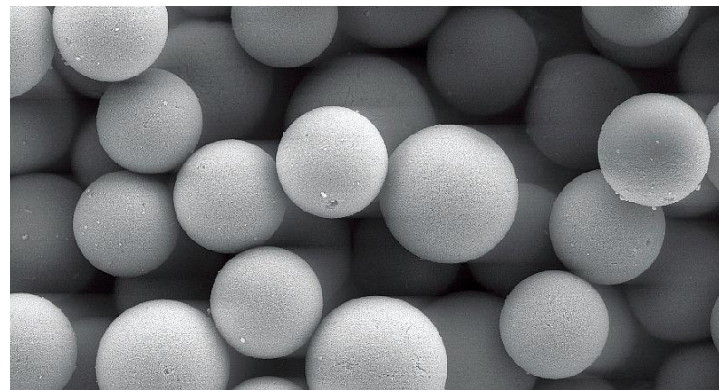
Waters™



Chromatografické nosiče (sorbenty)

Waters™

- Nepravidelné částice
- Sférické sorbenty
- Silika typu A vs B
- Hybridní silika
- Polydisperzní vs. monodisperzní
- Neporézní
- Porézní
- Semi-porézní (core-shell)
- Monolity



Účinnější, pravidelně naplněné kolony?
Ne! Takhle plnění nefunguje!



Chromatografické nosiče (sorbenty)

Waters™

➤ Nepravidelné částice

➤ Sférické sorbenty

➤ Silika typu A vs B

➤ Hybridní silika

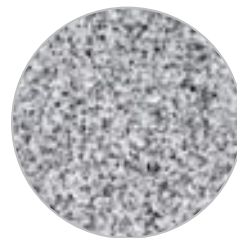
➤ Polydisperzní vs. monodisperzní

➤ **Neporézní**

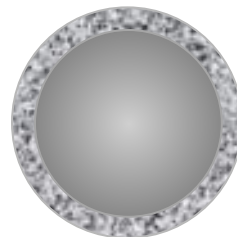
➤ **Porézní**

➤ **Semi-porézní (core-shell)**

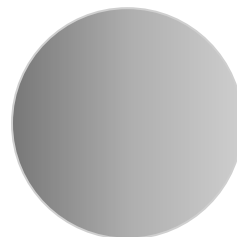
➤ Monolity



100-300 Å ~ 100-300 m²/g
2000 Å ~ 20 m², polymery



300 – 1000 Å ~ 25-100 m²/g
Omezená difuze – polymery



2-4 m²/g
Slabá retence (malé molekuly)
Zahlcení sorbentu – širší píky
OK pro polymery

Chromatografické nosiče a kolony

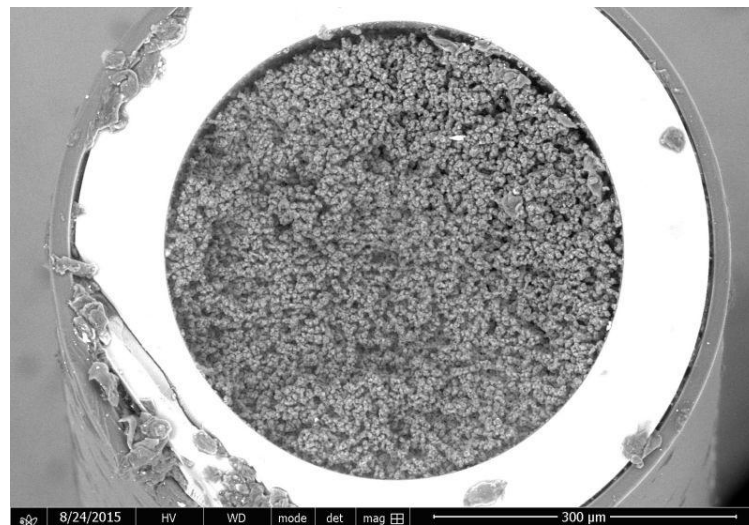
Waters™

➤ Monolithy

- BIA – polymerní monolithy
- MERCK – silika monolithy

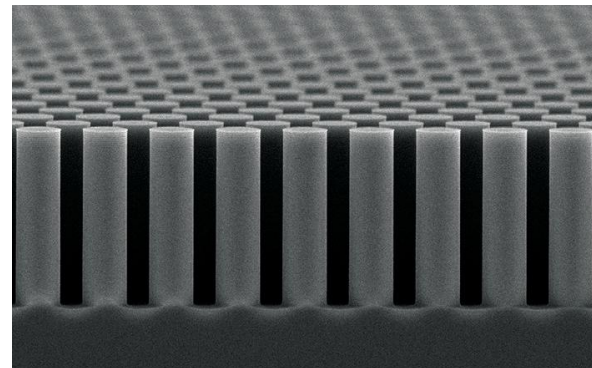
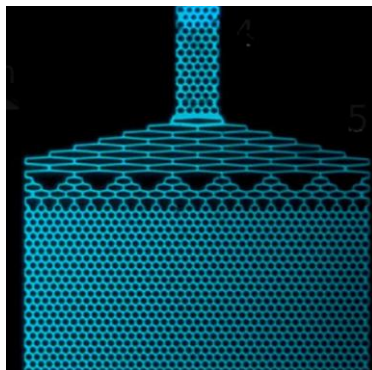
➤ Účinnost

- Nižší tlak než plněné kolony
- Nepotřebují frity
- Nižší účinnost než jsme čekali
- Nižší účinnost než plněné kolony
- Mikropóry (chvostování malých molekul)
- Nehomogenní – širší píky
- Opakovatelnost šarží? ↑ variabilita



➤ Leptání

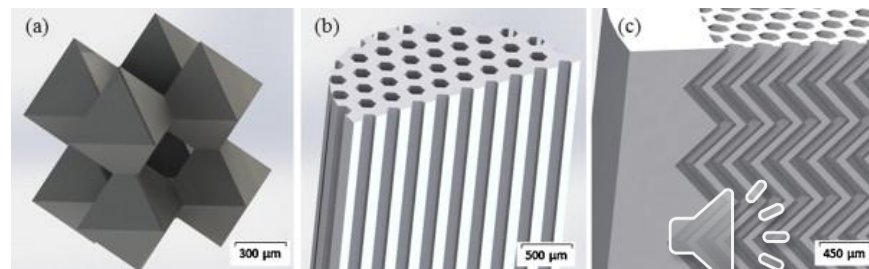
- PharmaFluidic, plochý čip
- Pillars, 5 x 20 μm , i.d. x výška
- 0,5-2 m kolony, 0,5-2 h analýza
- Chemická modifikace (batch-to-batch?)



PharmaFluidic (Thermo Fisher)

➤ 3D tisk LC kolon

- Obtížné vytisknout 5-30 μm struktury dostatečné délky a homogenity
- Omezená chemie materiálů
- Vhodné pro jiné částice než kuličky
- Sample prep, preparativní kolony?



Dimartino et al., JCA, 2014, vol 1333. 18-24

Chromatografické nosiče a kolony

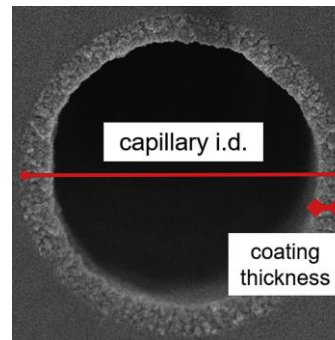
➤ Kapilární LC na čipech

- Citlivá MS, proteomika
- Malá spotřeba vzorku, solventů
- Problém s optickou detekcí, disperzí
- Problém s polárními analyty
- Omezené aplikace

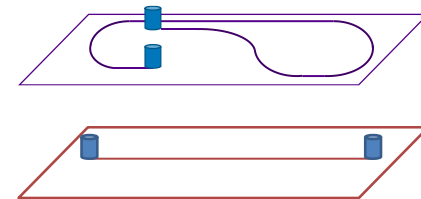


➤ PLOT kolony - + jako výše

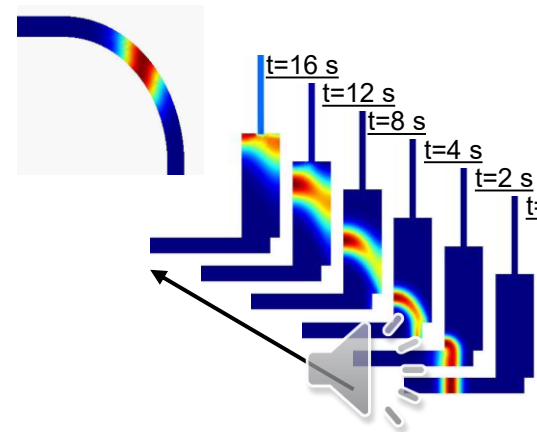
- 5-20 μm kapiláry, 0,5-2 m
- Teoreticky vysoká účinnost
- Velmi nízký průtok (20-200 nL/min)
- Dlouhé kolony $\rightarrow$ 10-30 min t_0



Waters™



Dostihový efekt



Gilar et al., JCA, 2018, vol 1533, 127-135

➤ Selektivita

- Je něco lepšího než C18? Radikálně jiná selektivita?
- Zájem o nové fáze vhodné pro LC MS
- polární interakce (H-můstky)?
- HILIC
- SFC
- Kde je výzkum nové chemie stacionárních fází?



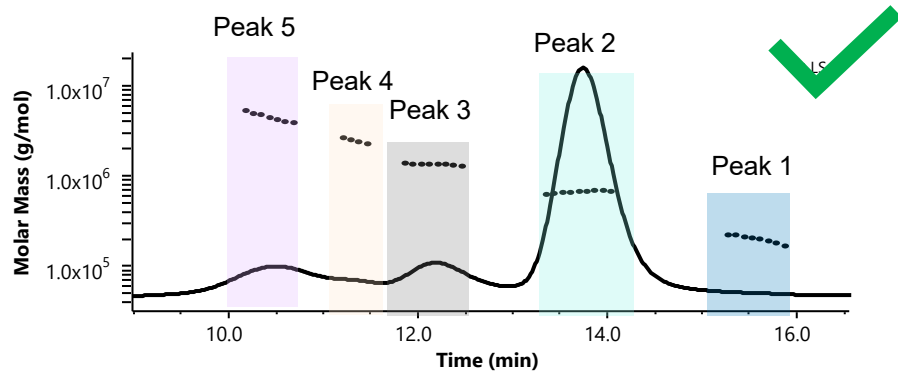
➤ Detektory MS pro rutinní aplikace

- Malé robustní MS, auto kalibrace
- RSD <1%
- rozlišení 5000-10000 Da, software pro integraci/analýzu dat



Nové detektory: *MALS* a *CDMS*

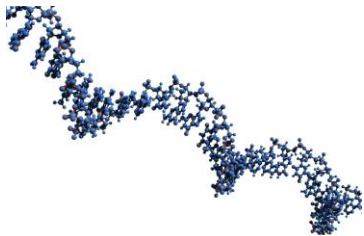
SEC-MALS analýza Fluc mRNA (1929nt, 624 kDa)



SEC-MALS, 4.6x300mm colona, 20 mM fosfátový pufr, 276 mM NaCl, 5.4 mM KCl, pH 7.4, 30°C



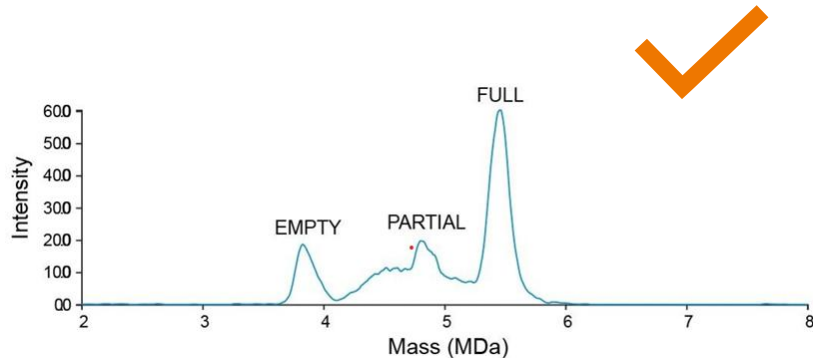
MALS detektor



Fluc mRNA

Waters™

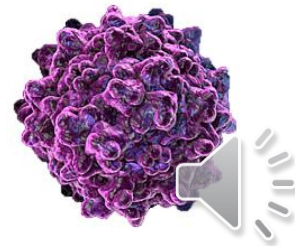
CDMS, AAV8 prázdné ~ 3.7 MDa, AAV8 plné ~ 5.45 MDa



10 min infuse, 1 μ L/min AAV8 1×10^{-12} vg/mL in 200 mM NH_4Ac , 0.001 % Pluronic F68



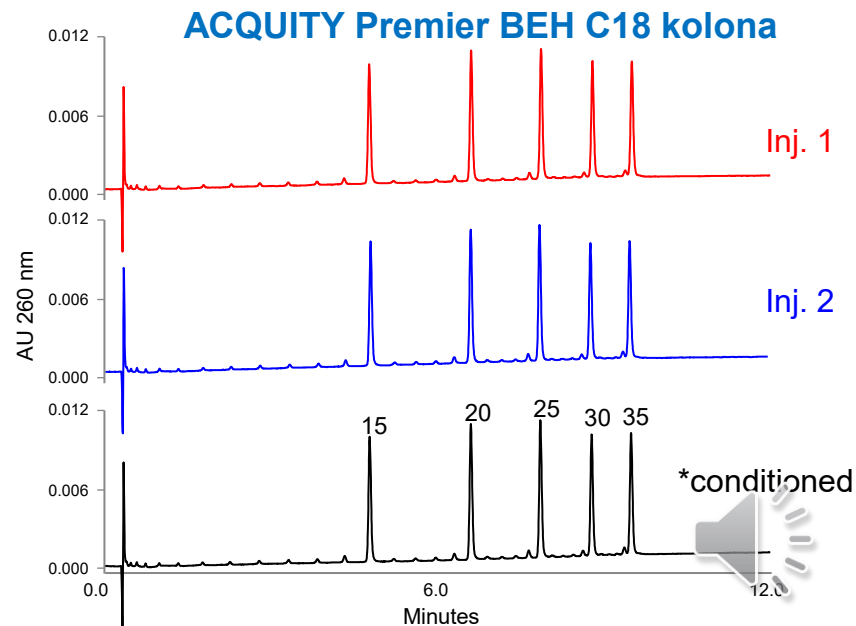
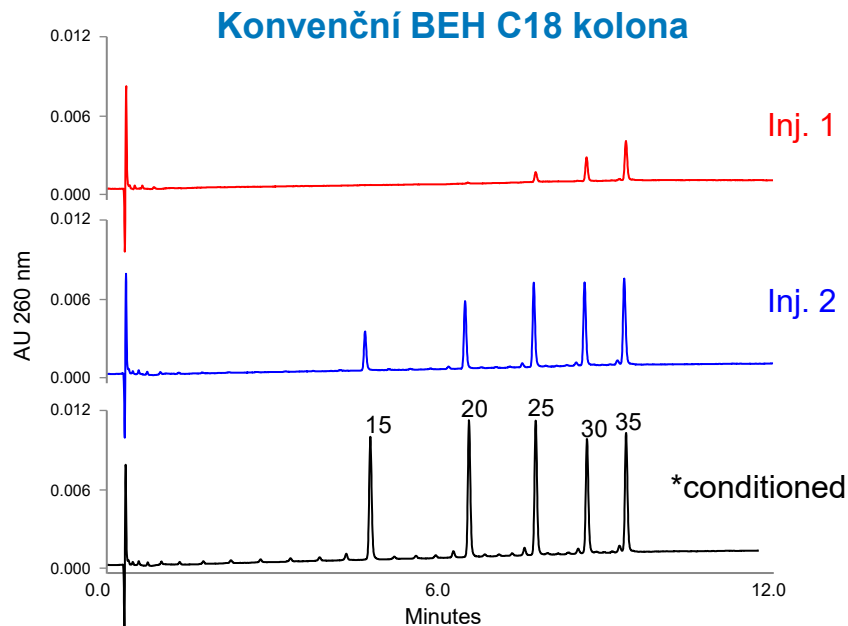
Xevo CDMS



AAV8

Inertní LC hardware – nespecifická adsorpce

- Ztráty proteinů, peptidů, nukleových kyselin na koloně
- Chvostování píků, carryover > 1%



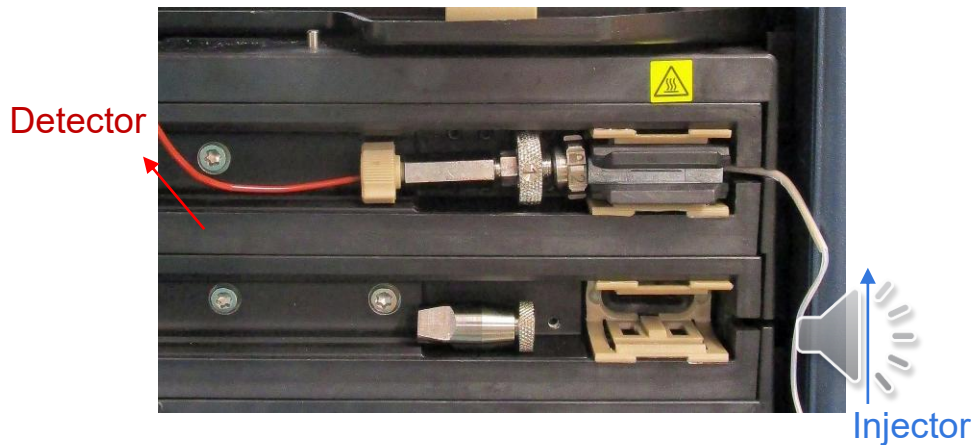
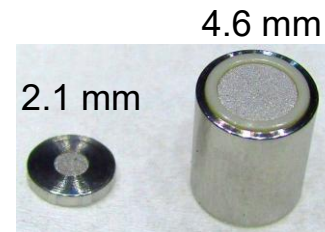
10 pmol injection on column, m.p. 25 mM HAA, pH 6, *conditioning with 500 pmol injection of 35 mer

Ztráty na sorbentu x ztráty na hardwareu?

Frity mají největší povrch! Elektrostatická adsorpce na Me_nO_m povrchu.

Waters™

	LC surface area (mm ²)	Total area (mm ²)	Single frit surface area (mm ²)
ACQUITY UPLC™ (BSM, FTN, CH-A, PDA)	513	1236 (2.1 x 50 mm)	453
Arc™ HPLC (QSM, FTN, CH-A, PDA)	1453	8237 (4.6 x 100 mm)	3396

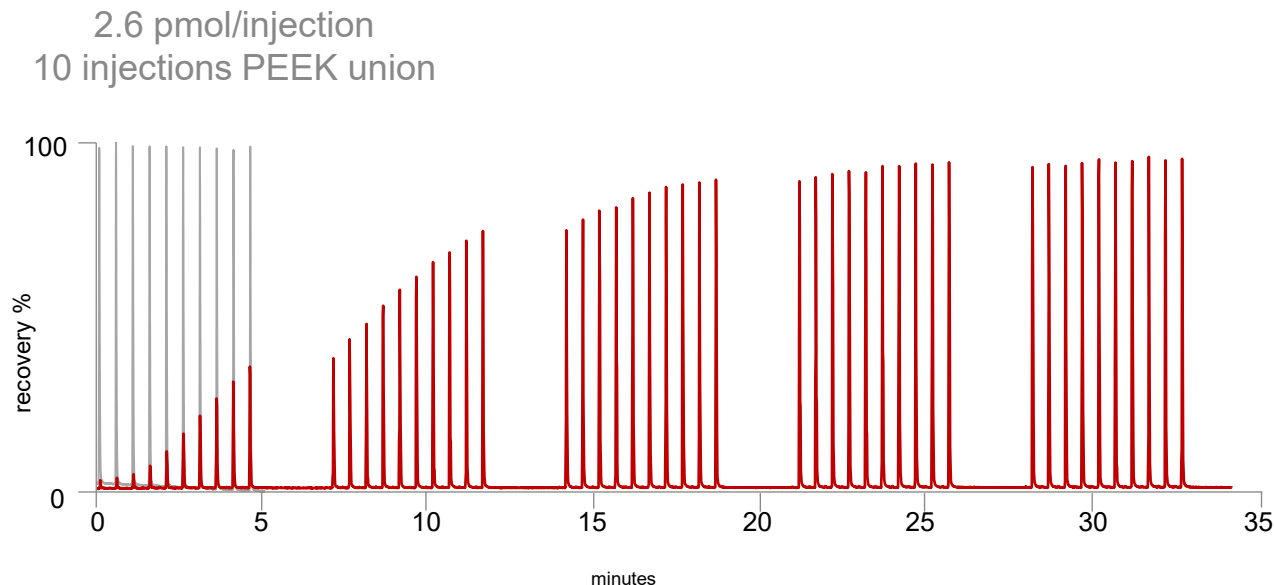


M. Gilar and colleagues, JCA 2021, 1650, 462247

Multiple Injections in a Single Experimental Run (MISER)

2.1 mm Stainless Steel Frit; 25 mer Phosphorothioate

Waters™



2.6 pmol/injection
50 injections

~ 40 pmol NSA na
2.1 mm fritu

50 injections (0.5 min/sample; 10 x 5 injections with 2 min gap between series)
Sample: 25 mer phosphorothioate Trecovirsen (Gem 91)
Mobile phase: 10 mM ammonium acetate pH 6.8, 0.2 mL/min, 25 °C



M. Gilar and colleagues, JCA 2021, 1650, 462247

Waters Premier LC kolony a instrument

A) LC instrument, B) kolony

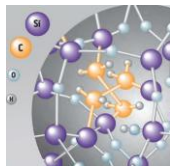
Waters™

A

Acquity™ PREMIER



B



MAXPEAK™
HIGH PERFORMANCE SURFACES

Hybrid
Inorganic/Organic
Silica Technology

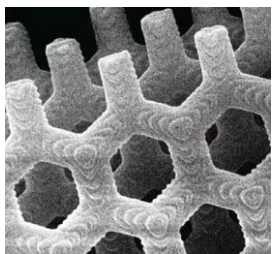
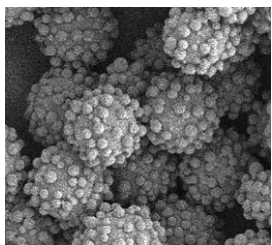
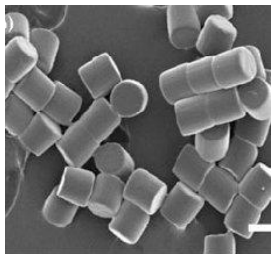


M. DeLano and colleagues, Anal. Chem 2021, 93, 5773-5781

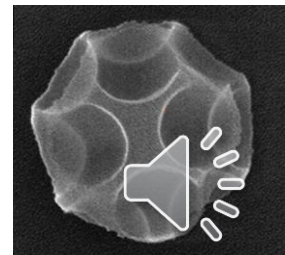
Vzhůru do nekonečna a ještě dál...



Waters™



1. Semi-porézní sorbenty mají 140% účinnost porézních částic stejné velikosti. Proč? Hrubý povrch → homogennější plnění kolon!
2. Kolony plněné SP vs porézními sorbenty stejného d_p mají nižší tlak. vanDeemter A = 1,3x ↓, B 1,1x ↓, C – 1x pro malé molekuly).
3. Lepší plnění kolon pro porézní sorbenty? 2x ↑ účinnost. Morfologie částic.
4. Nové hybridní sorbenty – vyšší pH stabilita (a alternativní selektivita)
5. Jiné separační módy a chemie než C18.
 - SFC, HILIC, fluoro sorbenty, H-můstky, „normální fáze“
6. Selektivní sorbenty (afinitní LC)
7. Bio-inertní LC kolony a instrumenty
8. Uživatelsky přístupné MS “detektory”
9. Software pro analýzu dat, vývoj metod...



Nandyianto et al., APT, 2019, vol 30, 2908-2924