Centrifugal Partition Chromatography, CPC,
Odśrodkowa Chromatografia Podziałowa

Idea, konstrukcja i zasada działania oraz tryby pracy.

Idea

Tradycyjna chromatografia ciecz-ciało stałe posiada szereg ograniczeń. Tymi ograniczeniami w przypadku preparatywnego HPLC (kolumna wielokrotnego użytku) są:

1. Konieczność zakupu kolumny chromatograficznej i jej dostępność na rynku,
2. Konieczność jej ochrony poprzez wstępne przetwarzanie preparatu i kupowanie eluentów o klasie czystości wyższej od analitycznej,
3. Nieodwracalna adsorpcja na powierzchni złoża (utrata preparatu) i konieczność wysycania kolumny do rutynowej pracy,
4. Maksymalne ilości nakładanej próbki (preparatu) nie mogą być zbyt duże, gdyż jesteśmy limitowani powierzchnią złoża (lub objętością ograniczaną jego porami).

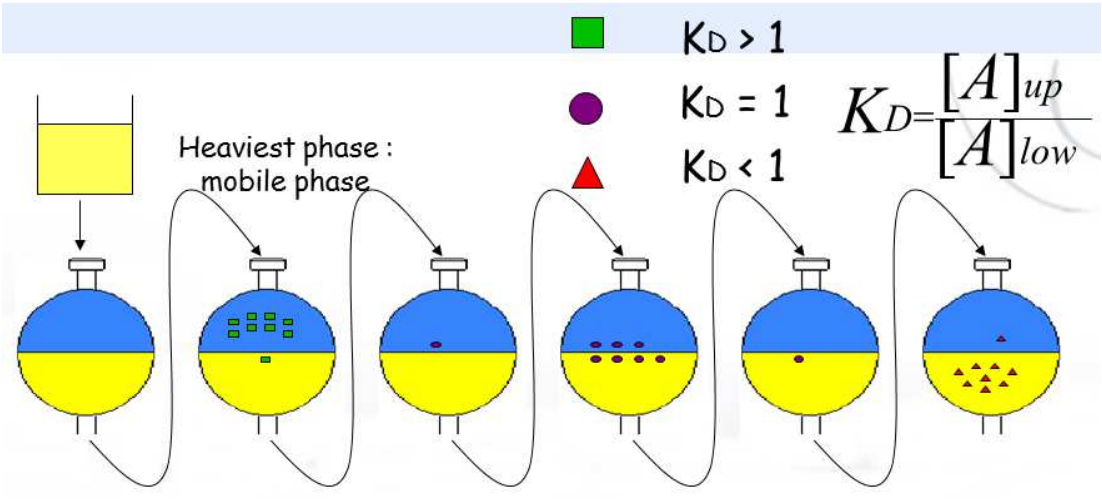
Chromatografia pomiędzy dwiema cieczami pozwala tych problemów uniknąć, chociaż mogą pojawić się i inne: jak unieruchomić jedną ciecz względem drugiej i uzyskać półki (teoretyczne) rozdzielania?

Chromatografia przeciwprądowa (*countercurrent chromatography*, CCC) jest zbiorem technik bazujących na idei chromatografii pomiędzy dwiema cieczami. Ten „przeciwprąd" w nazwie jest tu z pewnych względów historycznych, ale też dlatego, że każda z obu faz może być ruchoma lub stacjonarna – wybór zależy od nas. Sama kolumna chromatograficzna tworzy się w specjalnych urządzeniach, będących dzisiaj na ogół specjalnymi wirówkami przepływowymi, gdzie ciecze są zmuszane do tego, aby dawały proces chromatograficzny (czyli aby uzyskać zjawisko półek teoretycznych). Idea chromatografii przeciwprądowej doczekała się bardzo wielu technologicznych realizacji (czyli konstrukcji urządzeń, w których tworzy się kolumna). Większość z nich jest już historyczna, natomiast na rynku pozostały (i odniosły pewien sukces) dwie konstrukcje urządzeń: HSCCC (*high-speed countercurrent chromatography*), zwana też konstrukcją hydrodynamiczną, oraz CPC (*centrifugal partition chromatography*, odśrodkowa chromatografia podziałowa), zwana też konstrukcją hydrostatyczną.

Niezależnie od samej konstrukcji tworzącej kolumnę, wszystkie te techniki bazują na tych samych fizycznych podstawach. Trzy najważniejsze kryteria, które wskazuje raport IUPAC dotyczący tej techniki, to:

1. Wymagane są dwie odrębne fazy (dwie odrębne, niemieszające się ciecze),
2. Faza wybrana przez użytkownika jako stacjonarna powinna być zatrzymana bądź spowolniona (ang. *retained*) w urządzeniu formującym kolumnę,
3. Interesujące nas substancje w próbce (preparacie) powinny się rozdzielać (dzielić) pomiędzy te dwie wybrane fazy (ciecze).

Jeżeli spełniamy powyższe kryteria, możemy przystąpić do pracy chromatograficznej na urządzeniu. Podstawowe tryby pracy zostaną omówione dalej, natomiast przyjrzyjmy się teraz kryterium trzeciemu. Interesujące nas substancje powinny się dzielić pomiędzy dwie niemieszające się ciecze, ale nie w byle jaki sposób. Idealny współczynnik podziału Nernsta powinien wahać się pomiędzy 0,5 a 3. Jest to związane z tym, że urządzenia tego typu są w stanie najlepiej rozdzielić substancje, które posiadają różne współczynniki podziału Nernsta z tego właśnie przedziału.

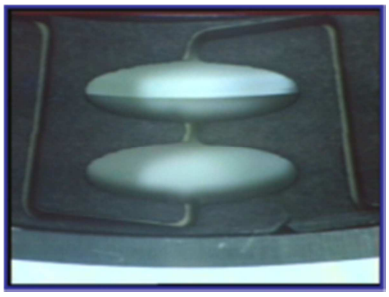


Składniki eluują się w zależności od powinowactwa do faz. Te, które mają wyższe powinowactwo do fazy ruchomej, eluują szybciej. Współczynnik podziału Nernsta jest zatem wyznacznikiem względnego powinowactwa składnika do obu faz. Oznacza to, że znając współczynnik podziału, w niektórych, bardzo stabilnych układach (jak np. w CPC) można obliczyć czas elucji na podstawie prostego równania Martina i Sygnego: Ve=Vm+K*Vs, gdzie Ve to objętość elucji, Vm to objętość fazy ruchomej w kolumnie, Vs objętość fazy stacjonarnej w kolumnie, natomiast K jest współczynnikiem podziału Nernsta lub jego odwrotnością, zależnie od tego, która z faz jest ruchoma (dla cięższej fazy ruchomej stała przyjmuje wartość współczynnika podziału Nernsta). Takie proste obliczenie objętości elucji jest możliwe tylko wtedy jeżeli faza stacjonarna fest faktycznie unieruchomiona na kolumnie, a nie tylko spowolniona oraz jeżeli się nie wypłukuje, przy czym dużo łatwiej te warunki spełnić w konstrukcji hydrostatycznej (CPC).

Konstrukcja i zasada działania

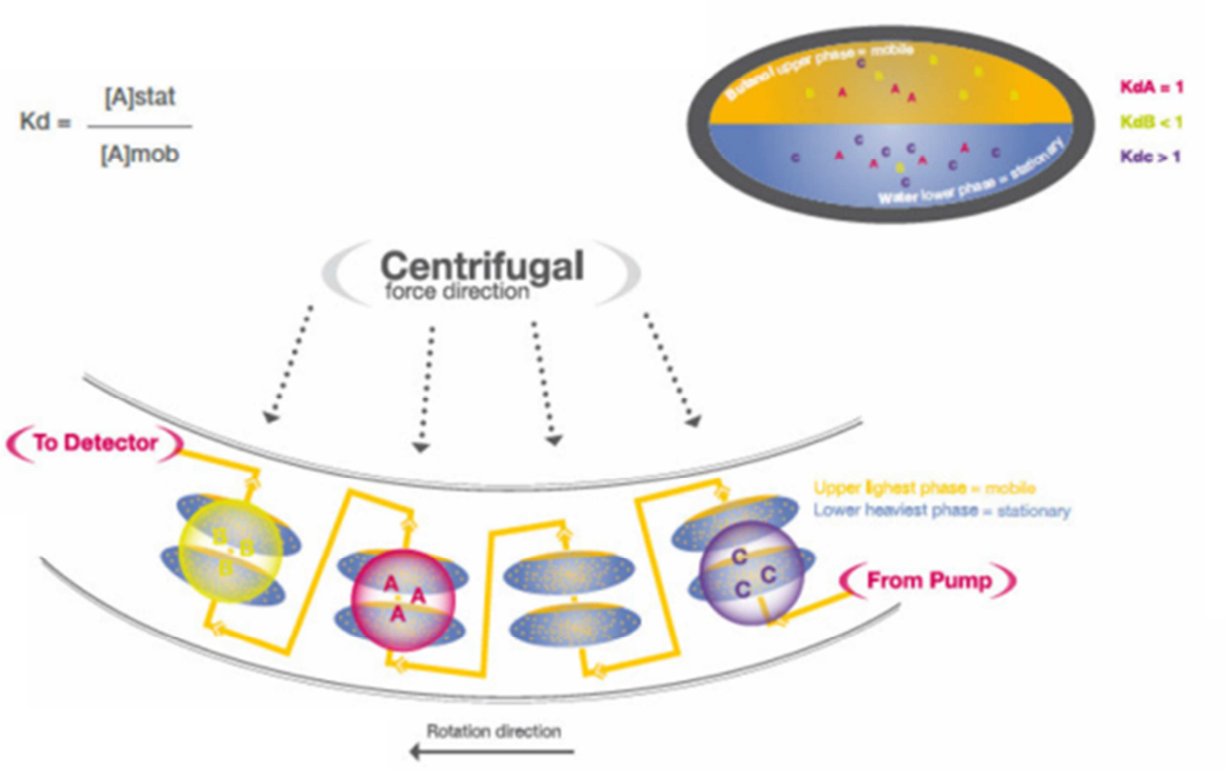
***Centrifugal Partition Chromatography*, CPC** tłumaczy się na język polski jako **odśrodkowa chromatografia podziałowa**. Jest to technologiczny wariant chromatografii przeciwprądowej, czyli chromatografii pomiędzy dwie niemieszające się ciecze.

Kolumna jest tutaj formowana w prostej wirówce (jednoosiowej, czyli zwykłej). Fazy (najpierw złoże, później eluent) są pompowane z nieruchomych elementów do ruchomego rotora poprzez uszczelki rotacyjne. Rotor posiada ukryte w środku elementy rozdzielające – takie małe „rozdzielaczyki” (ang. *cells* – obecnie częściej lub *channels* –dawniej, ale też w uznawanych podręcznikach) oraz elementy doprowadzające fazy do tych „rozdzielaczyków”, które są takimi malutkimi „kanalikami” (ang. *ducts*), tak jak to widać na rysunku poniżej:



Żeby rozdzielanie w tych „rozdzielaczykach” następowało w sensownym czasie, cały proces rozdzielania jest przyspieszony polem odśrodkowym:

Przyspieszenia odśrodkowe rzędu kilkuset g powodują znaczne różnice w ciężarze właściwym tych faz nawet przy niewielkiej różnicy gęstości. Oznacza to, że można tu stosować przepływy od kilku do kilkudziesięciu ml/min (zależnie od modelu), a fazy zostaną należycie odseparowane.



„Rozdzielaczyki” (*cells, channels*) i „kanaliki” (*ducts*) są formowane za pomocą elektrowycinania w metalowych dyskach, a każdy z tych dysków jest oddzielony jeden od drugiego za pomocą teflonowego plastra, w którym w określonym miejscu jest otwór, aby ciecze mogły przepływać z jednego dysku do drugiego. W jednym rotorze jest kilkadziesiąt takich metalowych dysków, co daje około 2000 (zależnie od modelu) „rozdzielaczyków”:

Tak skonstruowany rotor umieszcza się w wirówce, a „kanaliki” i kapilary rotora łączy się uszczelkami rotacyjnymi z pozostającymi nieruchomo pozostałymi kapilarami urządzenia. Tak skonstruowana wirówka, wewnątrz swojego rotora, formuje nam kolumnę chromatograficzną z obu faz. Uznaje się, że całkowita objętość formowanej w ten sposób kolumny chromatograficznej jest równa wewnętrznej objętości rotora i jest wartością charakterystyczną dla modelu (egzemplarza).

Poza samym urządzeniem (wirówką), w którym formowana jest kolumna chromatograficzna, potrzebujemy jeszcze pozostałe elementy, jakie posiada chromatograf cieczowy. Są to mianowicie pompa chromatograficzna, jakiś układ wprowadzający próbkę (preparat) do urządzenia (na ogół zawór pętlowy), detektor, rejestrator (komputer) i układ sterowania, warto też mieć kolektor frakcji. Do tego celu wykorzystuje się tradycyjne aparaty na rynku, zazwyczaj z systemów HPLC (lub MPLC). Bardzo często tego typu wirówki podłączane są do gotowych chromatografów preparatywnych zamiast tradycyjnej kolumny. Jest jednak jeszcze jeden element, który tutaj jest obowiązkowy, a w HPLC jedynie opcjonalny – zawór czteroportowy, do którego podłączone są końce kolumny/rotora. To dzięki niemu wybieramy, czy chcemy unieruchomić fazę lżejszą, czy cięższą, gdyż to pozycja tego zaworu decyduje, którą stroną („górnym”, czy „dolnym” „kanalikiem”) doprowadzimy fazy do „rozdzielaczyka”. Nazywany jest on tutaj zaworem ASC/DSC lub zaworem przerzutowym trybów.

Tryby pracy

Tryby pracy możemy je podzielić na:

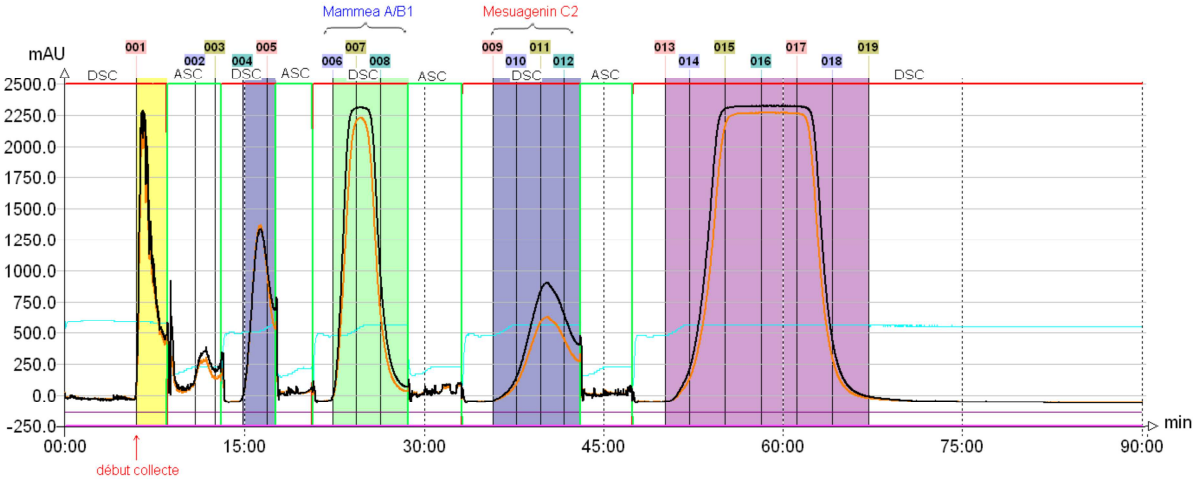
1. Tryby ze względu na wybór fazy ruchomej (cięższa, czy lżejsza),
2. Tryby ze względu na sposób prowadzenia elucji,
3. Tryby ze względu na specyficzne domieszkowanie

Tryby ze względu na wybór fazy ruchomej (cięższa czy lżejsza?)

Dwa podstawowe tryby pracy to tryby zależne od tego, którą fazę chcemy mieć za fazę stacjonarną. Są to tryby wstępujący (ang. *ascending, ASC*), gdy ruchoma jest faza lżejsza i zstępujący (ang. *descending, DSC*), gdy ruchoma jest faza cięższa. Ten wybór trybu pracy powinien być podyktowany tylko wygodą oczyszczania, mianowicie dążymy do tego, aby maksymalnie dużo zanieczyszczeń (które

mogłyby nam „smużyć” z czoła) unieruchomić w kolumnie, aby móc je później usunąć podczas opróżniania rotora. Wybór dokonujemy za pomocą zaworu ASC/DSC (zawór przerzutowy trybów).

Trzeci tryb pracy ze względu na wybór fazy stacjonarnej (cięższej lub lżejszej) jest trybem, który łączy w sobie dwa poprzednie, jest tryb „*dual-mode*”. Polega on na tym, że wybieramy najpierw którąś fazę jako stacjonarną i prowadzimy elucję do początku piku. Następnie „zamieniamy miejscami” fazy ruchomą i stacjonarną, czyli przekręcamy zawór ASC/DSC (zawór przerzutowy trybów) i zaczynamy pompować tę fazę, która do tego momentu była naszą fazą stacjonarną, a od teraz jest naszą fazą ruchomą. I dalej prowadzimy już elucję normalnie. Jeżeli wykonujemy tę operację kilkakrotnie, wówczas nazywa się to trybem „*multi-dual mode*”. Na rysunku poniżej chromatogram uzyskany metodą *multi-dual mode*, gdzie rozdzielane były mesuageniny (będące kumarynami) z surowego ekstraktu *Mesua elegans*.



Uzyskiwane w ten sposób rozdzielczości chromatograficzne (choć przy mniejszej liczbie półek teoretycznych niż preparatywne HPLC) są jak najbardziej porównywalne z preparatywnym HPLC. Ograniczenie jest takie, że objętość próbki do *multi-dual mode* nie może być zbyt duża, aby występował istotny nadmiar objętości równowagowej dostępnej w kolumnie względem oczyszczanego preparatu, co jest też czynnikiem determinującym rozdzielczość chromatograficzną w technikach podziałowych. *Multi-dual mode* może być wykonywany z powodzeniem zarówno na systemach hydrodynamicznych, jak i hydrostatycznych, a bardzo wygodną opcją jest tutaj automatyzacja zaworu ASC/DSC, o którą trzeba zadbać w momencie zamawiania sprzętu. Z racji możliwości wykonania trybu *dual mode* oraz *multi-dual mode* nazwa chromatografii przeciwprądowej

jest jak najbardziej uprawniona. To jest praca w prawdziwym przeciwprądzie cieczy. Tego „triku" nie można wykonać na tradycyjnym HPLC.

Tryby ze względu na sposób prowadzenia elucji

Podstawowym typem elucji jest **elucja izokratyczna**. Ten typ elucji to ok. 90% rozdzielań, przy czym w publikacjach to trochę mniejszy odsetek. Elucji izokratycznej nie trzeba nikomu tłumaczyć, stosuje się ją wszędzie tam, gdzie nastawiamy się na oczyszczanie pojedynczego składnika, dwóch składników od siebie oraz jednej grupy związków. Standardowa procedura, którą się stosuje w przypadku rotora 250 ml wygląda jak w tabeli poniżej:

Etap	Czas w min:sek	Przepływ w ml/min	Faza stacjonarna w %	Faza ruchoma w %	Obroty rotora w RPM
Napełnianie – **w następnym kroku oczyszczania etap ten pomija się ze względu na ekstruzję**	0	30	100	0	500
Koniec etapu napełniania	12:00	30	100	0	500
Równoważenie	12:03	8	0	100	1600
Koniec etapu równoważenia	30:00	8	0	100	1600
Nastrzyk – **można tu zastosować np. „wyzerowanie czasu" na osi odciętych – wygodne**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1600
Elucja	0	8	0	100	1600
Koniec etapu elucji	40:00	8	0	100	1600
Ekstruzja	40:03	30	100	0	500
Koniec etapu ekstruzji	52:00	30	100	0	500

W przypadku tradycyjnej elucji izokratycznej, na początku dokonuje się elucji fazą ruchomą, a po jakimś czasie dokonuje się wypierania zużytej fazy stacjonarnej nową fazą stacjonarną (tzw. ekstruzja, z ang. *extrusion*). Ponieważ ze względu na matrycę stara faza stacjonarna ulega zużyciu, należy ją zastąpić nową fazą stacjonarną (przed następnym nastrzykiem), a starą usunąć. Etap ten, zwany ekstruzją, jest etapem odróżniającym go od HPLC (nie ma go w HPLC). Po zakończeniu ekstruzji rotor jest wypełniony nową, czystą fazą stacjonarną, co oznacza, że etap napełniania następnie można pominąć, jeżeli za chwilę ponownie mamy zamiar oczyszczać w ten sposób.

Elucja typu *elution-extrusion*. Jest to typ elucji izokratycznej, gdzie na początku dokonuje się elucji fazą ruchomą, a po jakimś czasie (jeszcze bez wyeluowania składników preparatu) dokonuje się ekstruzji. Należy przy tym zaznaczyć, że ze względu na konstrukcję aparatu, istnieje ukryty profil stężeniowy (profil chromatograficzny) w fazie stacjonarnej. Dokonując ekstruzji, dokonujemy więc obserwacji chromatogramu i kolekcjonujemy interesujące nas frakcje. Jest to typ elucji, który śmiało można nazwać „oszczędnościowym", gdyż, jeżeli jest możliwość jej stosowania, znakomicie skraca procedurę, dzięki czemu oszczędzamy czas i rozpuszczalniki.

Innymi oszczędnościowymi „trikami" ze względu na elucję jest pomijanie etapu równoważenia, bądź też elucja typu *elution extrusion dual mode*, która wypiera nam zaraz rozseparowane czoło chwilę po nastrzyknięciu. Niepolecane są one jednak dla początkujących użytkowników i możliwe jest takie skrócenie tylko przy sprawdzonych metodykach.

Elucja gradientowa jest prowadzona rzadko. Jest ona stosowana do surowych ekstraktów na tzw. *screening* oraz w badaniach metabolomicznych. Ważną zaletą chromatografii przeciwprądowej w

tego typu badaniach jest fakt, że nie mamy tu nieodwracalnej adsorpcji na złożu, nie niszczymy kolumny, więc można nałożyć próbki o różnym spektrum np. hydrofobowości (najczęściej), co daje dobrze publikowalne wyniki. Należy przy tym zaznaczyć, że z reguły gradienty powinny być nisko pochylone, przebiegi takie powinny trwać kilka godzin, a kończą się znacznym wypłukaniem fazy stacjonarnej, nierzadko całkowitym – jedyny plus to taki, że rotor po procedurze jest wyczyszczony. Niemniej jednak wypłukiwanie fazy stacjonarnej ma duży niekorzystny wpływ na rozdzielczości chromatograficzne. Jednym z takich stabilniejszych układów jest woda-metanol-heptan, który jest jednym z częściej spotykanych układów gradientowych w CCC (CPC). Inne przykłady układów, które mogą się nadawać do pracy w gradiencie można znaleźć w bogatej literaturze, w tym też w podręczniku prof. Alain Berthod „*Countercurrent chromatography*", który posiada całą tabelę w miarę sprawdzonych dla układów gradientowych.

Specyficzne tryby pracy ze względu na domieszkowanie

Większość ze stosowanych układów (właściwie wszystkie) można domieszkować modyfikatorami faz, które mogą zmieniać właściwości układu chromatograficznego. Zazwyczaj są to **układy buforujące i zmieniające siłę jonową, wymieniacze jonowe**, migrujące często do obu faz **oraz tworzące** z oczyszczanymi substancjami **pary jonowe**. Przykładem jest system woda-butanol, który może służyć do oczyszczania peptydów, lecz jednak często wymaga on dostarczenia wymieniacza jonowego do stworzenia pary jonowej. Przykładem jest octan amonu, który najczęściej się stosuje (i to w wysokim, 1 M stężeniu) jako dodatek do oczyszczania krótkich odcinków peptydów. Niekiedy lepsze rezultaty się otrzymuje stosując dodatek taki jak octan trietyloaminy lub chlorek trietyloaminy. Często wymieniacz jonowy ma również na celu utrzymanie pH w pewnej wartości, często przesuwając równowagę jonową oczyszczanego składnika tak, aby ograniczyć poszerzenie piku chromatograficznego związanego z równowagą jonową. W systemie woda – butanol (domieszkowanym właśnie odpowiednio) oczyszczano często nawet duże peptydy o znaczeniu farmaceutycznym, np. insulinę wołową.

Wśród ciekawych separacji z domieszkami są **separacje z tzw. *pH-zone refinement*** (zwany także *pH-zone refining*). Jest to gradientowa procedura z użyciem gradientu pH. Wtedy substancje w pikach chromatograficznych, wykazujące działanie buforujące w swoistych oknach buforowania doprowadzają do powstania tzw. stref pH (ang. *pH-zones*). Przykładem rozdzielania w takich warunkach jest oczyszczanie niektórych alkaloidów także niektórych antybiotyków i innych metabolitów wtórnych.

Systemy wodno-organiczne można wzbogacać domieszkami chiralnymi, jak np. cyklodekstryny. Można też wzbogacać fazę organiczną bardziej hydrofobowymi domieszkami chiralnymi systemy wodno-organiczne i organiczno-organiczne. W innym swoim innym podręczniku, dotyczącym tylko i wyłącznie separacji chiralnych, prof. A. Berthod („Chiral Separations") poświęca cały rozdział pracy w przeciwprądzie cieczy.