

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek
Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija

Kemijski seminar I

NAJNOVIJA DOSTIGNUĆA U DVODIMENZIONALNOJ TEKUĆINSKOJ KROMATOGRFIJI

Seminar na temelju članka: B. W. J. Pirok, D. R. Stoll, P. J. Schoenmakers,

Anal.Chem. **91** (2019) 240-263

Saša Grubešić

srpanj, 2020.

SADRŽAJ

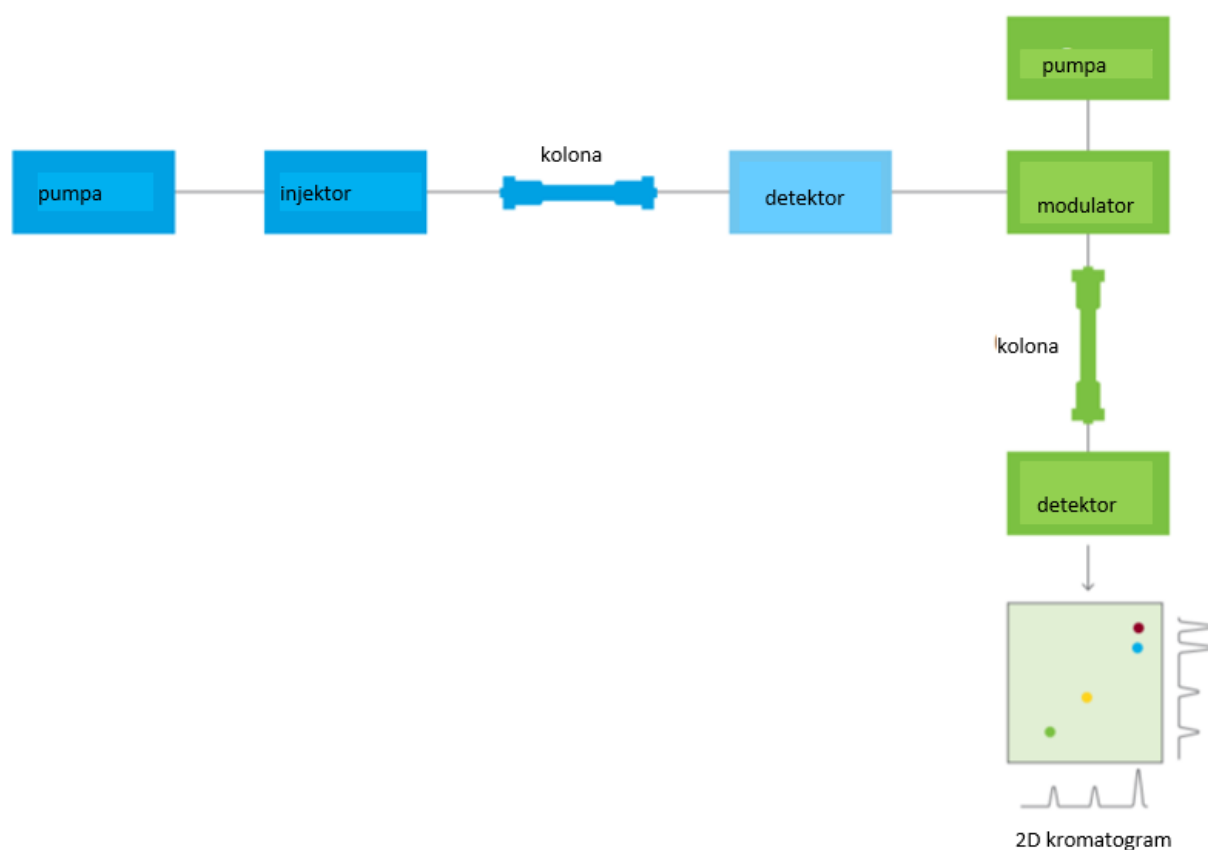
Uvod	3
Povijesni razvoj dvodimenzionalne kromatografije	5
Načini rada dvodimenzionalne kromatografije	7
Modulacija	11
Pasivna modulacija i problem nekompatibilnosti.....	11
Aktivna modulacija (<i>Active Solvent Modulation, ASM</i>)	13
Aktivna modulacija (<i>Stationary-Phase-Assisted Modulation, SPAM</i>)	15
Ostale modulacije.....	17
Zaključak	19
Literatura.....	21

Uvod

Tekućinska kromatografija je izuzetno moćna separacijska tehnika. Zbog mnogo različitih načina zadržavanja analita kao što su kromatografija obrnutih faza, kromatografija normalnih faza, kromatografija ionske izmjene, kromatografija isključenjem, kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama, kiralna kromatografija, tekućinska kromatografija u nekom obliku prisutna je u gotovo svakom analitičkom laboratoriju. Korištenjem različitih stacionarnih i mobilnih faza, različitih aditiva, vrijednosti pH, te različite temperature moguće je razdvojiti gotovo sve parove analita, uključujući enantiomere. Dobru selektivnost prati i visoka efikasnost te kratko vrijeme analize, što je posebno izraženo u suvremenoj tehnici tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti. Međutim, tekućinska kromatografija ne može postići vrlo visoku učinkovitost u kratkom vremenu. Za razliku od drugih kromatografskih tehnika, poput plinske kromatografije ili kapilarne elektroforeze broj teoretskih (izmjena) tavana većih od 100 000 do sada nije postignut¹. Kao rezultat, jednodimenzionalna tekućinska kromatografija (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) nije pogodna za razdvajanje smjesa većih od pedesetak analita. Kapacitet modernih kolona za tekućinsku kromatografiju jednostavno nije dovoljan da bi se sve komponente smjese potpuno razdvojile. Empirijsko pravilo govori da je tekućinskom kromatografijom moguće potpuno razdvojiti do 20 komponenti između jednog do dva sata, odnosno do 50 komponenti unutar deset sati^{2,3}.

Izraz "dvodimenzionalna tekućinska kromatografija" (engl. *Two-Dimensional Liquid Chromatography*, 2D-LC) odnosi se na tehniku u kojoj se na uzorak primjenjuju dva neovisna, u najpovoljnijim uvjetima, dva ortogonalna sustava za odvajanje tekućeg uzorka. Prednost dvodimenzionalne tekućinske kromatografije u odnosu na jednodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju je njezina iznimna moć razdvajanja. To se posebno odnosi na sveobuhvatnu (engl. *comprehensive two-dimensional liquid chromatography*, LC×LC) dvodimenzionalnu kromatografiju pri kojoj je u idealnim uvjetima moguće dobiti da je ukupan broj razdvojenih komponenti jednak umnošku broja razdvojenih komponenti prve i druge dimenzije⁴. Ukupan broj razdvojenih komponenti (engl. *peak capacity*) sveobuhvatne dvodimenzionalne kromatografije kreće se od par tisuća pa sve do 10000⁵. Stoga, dvodimenzionalna kromatografija, posebno je pogodna za odvajanje komponenata vrlo složenih smjesa.

Naravno, postoje određena ograničenja. Naprimjer, sveobuhvatna dvodimenzionalna kromatografija (LC×LC) traje dulje (do nekoliko sati) u odnosu na klasičan HPLC. Uzastopnim razrjeđenjem uzorka (eluens prve dimenzije je uzorak druge dimenzije) može se pojaviti problem sa smanjenom osjetljivošću te nekompatibilnosti mobilnih faza. Također, razvoj metode je puno zahtjevniji te je za interpretaciju i vizualizaciju rezultata neophodan poseban računalni program¹. Shematski princip rada dvodimenzionalnog kromatografa prikazan je na Slici 1.



Slika 1 Shematski prikaz principa rada dvodimenzionalne kromatografije⁶

Povijesni razvoj dvodimenzionalne kromatografije

Već unatrag nekoliko desetaka godina načela dvodimenzionalne kromatografije se intenzivno primjenjuju u dvodimenzionalnoj tankoslojnoj kromatografiji te dvodimenzionalnoj gel elektroforezi. Sveobuhvatna dvodimenzionalna plinska kromatografija se danas smatra ustaljenom tehnikom za razdvajanje izuzetno složenih smjesa ugljikovodika kao što je nafta. Nagli razvoj dvodimenzionalne plinske kromatografije u donosu na dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju bio je moguć primarno zbog puno nižeg radnog tlaka.

Dvodimenzionalna kromatografija prvi puta prikazana je u radu A. Snyge i A. Martin-a jednog od izumitelja tekućinske particijske kromatografije. U njegovom obraćanju prilikom primanja Nobelove nagrade⁷ pokazao je dvodimenzionalnu separaciju na papiru devetnaest amino kiselina, ekstrahiranih iz krumpira⁸.

Unatoč tome, prvi engl. *online* dvodimenzionalni tekućinski kromatograf razvijen je tek 1978.g. (F. Erni i W. Frei)⁹. Prvi instrumenti imali su mnogo ograničenja te je sve do 1990. godine interes za tu tehniku bio neznatan. Te godine, u radu M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, sveobuhvatna dvodimenzionalna tekućinska separacija primijenjena je za odjeljivanje četrnaest komponentne smjese proteina korištenjem kromatografije isključenjem i kromatografije ionske izmjene¹⁰. Potpuno odvajanje trajalo je šest sati.

B.L. Karger, L.R. Snyder i C. Horvath¹¹, a kasnije J.C. Giddings¹² i G. Guiochon¹³ i suradnici istaknuli su važnost sveobuhvatnog dvodimenzionalnog odvajanja u idealnim okolnostima. Ukupni broj razdvojenih komponenti (engl. *peak capacity*, $n_{c,2D}$) trebao bi biti ne zbroj, već umnožak broja razdvojenih komponenti prve (1n_c) i druge dimenzije (2n_c).

$$n_{c,2D} = {}^1n_c \times {}^2n_c$$

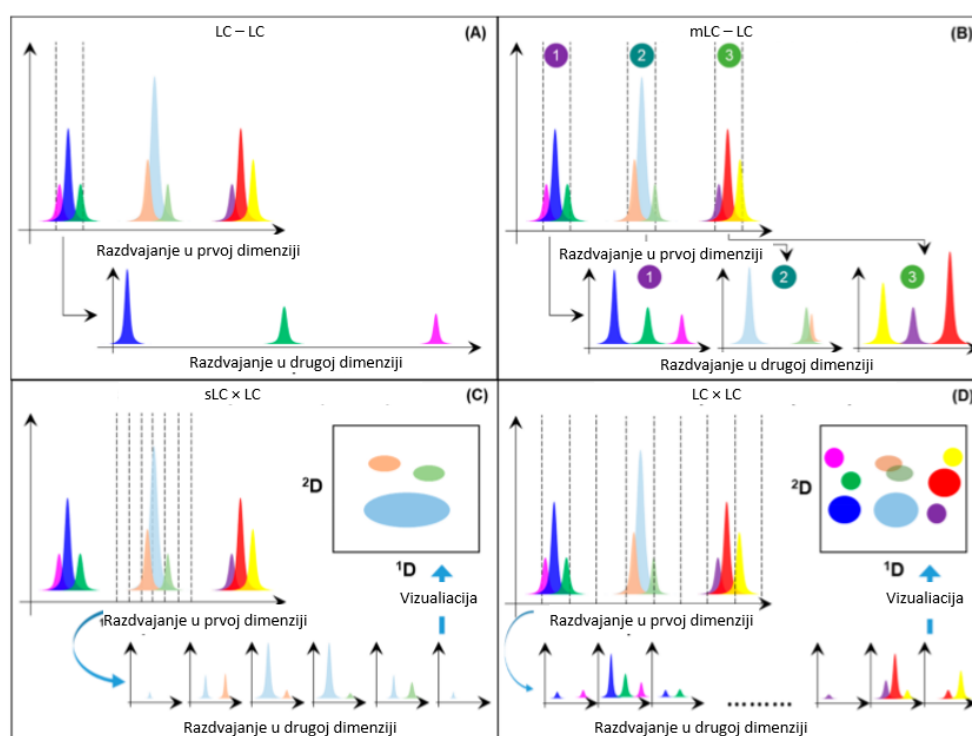
Unatrag petnaestak godina značajan razvoj u području razvoja kolona za tekućinsku kromatografiju te razvoj samih tekućinskih kromatografa ultra visoke djelotvornosti omogućili su razvoj komercijalnih dvodimenzionalnih tekućinskih kromatografa. Razvojem komercijalnih instrumenata dvodimenzionalna tekućinska kromatografija postala je najzastupljenija metoda razdvajanja analita kod proteomskih istraživanja¹⁴⁻¹⁶.

D. R. Stoll i J. D. Carr su 2006. godine koristili povišenu temperature (110 °C) te visoke linearne brzine (> 3 cm/s) na koloni druge dimenzije kako bi ubrzali razdvajanje analita na svega 20 sekundi, a time i znatno skratili sveukupno vrijeme sveobuhvatnog razdvajanja (LC×LC) na otprilike 30 min¹⁷, što je otvorilo novu eru u brznoj rutinskoj upotrebi 2D-LC tehnike. Dok je prvi rad Jorgenson-a¹⁰ postigao maksimalnu brzinu razdvajanja od 0,36 komponenti u minuti, u radu D. R. Stoll-a i suradnika¹⁷ opisano je postignuće razdvajanja od 33 komponente u minuti, što je skoro stotruko poboljšanje.

Načini rada dvodimenzionalne kromatografije

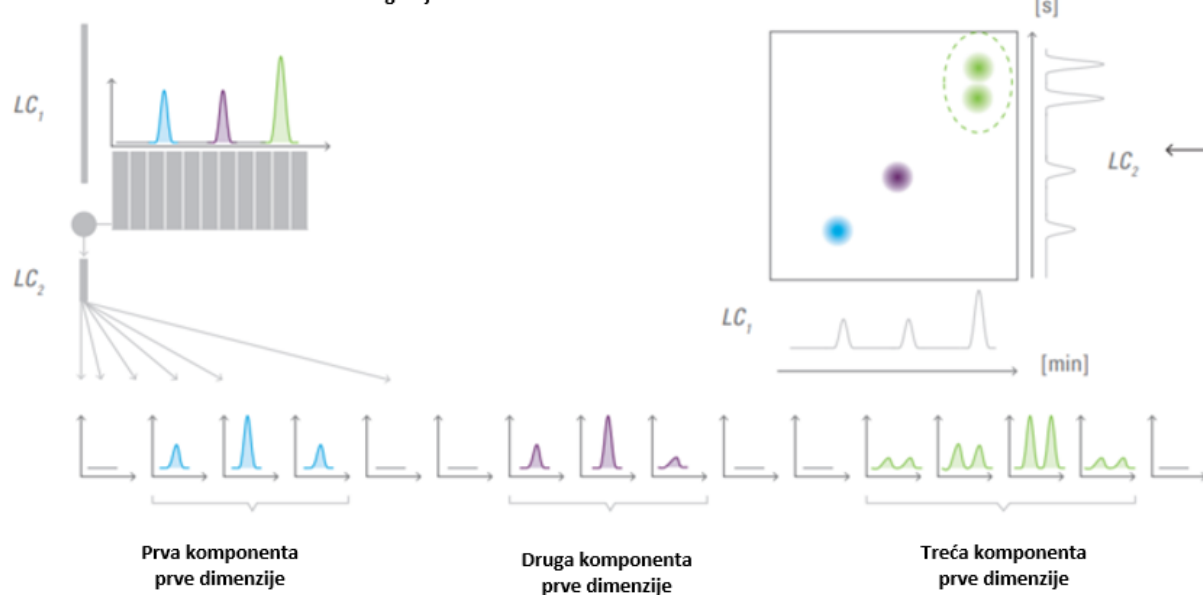
Za odvajanje jednog analita iz složene matrice (smjese), ili za smanjenje nesigurnosti prilikom identifikacije jednog analita, dovoljno je samo jedna frakciju prve dimenzije analizirati u drugoj dimenziji. Takva način rada zovemo *heart-cut* (LC-LC).

Kod sveobuhvatne dvodimenzionalne kromatografije (LC×LC) sve frakcije prve dimenzije analizirane su u drugoj dimenziji. Budući da kromatogram prve dimenzije, osim analita sadrži i komponente koje nije potrebno analizirati u drugoj dimenziji, kao npr. komponente matrice, u dvodimenzionalnoj kromatografiji najčešće korištene tehnike su *multiple-heart-cut* (mLC-LC) i *selective comprehensive* (sLC×LC) kromatografija. Kod tih tehnike odabrane frakcije kromatograma prve dimenzije se analiziraju u drugoj dimenziji. Prednosti i nedostaci sveobuhvatne i *heart-cut* tehnike opisane su u Tablici 1.

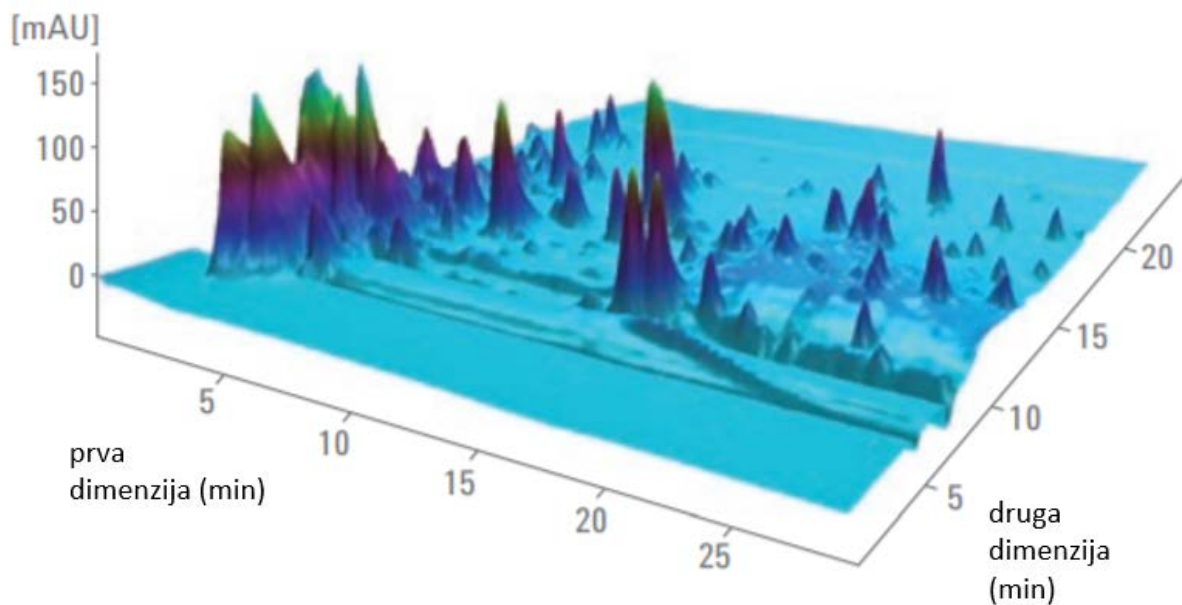


Slika 2. Ilustracija četiri različita načina odvajanja 2D-LC¹

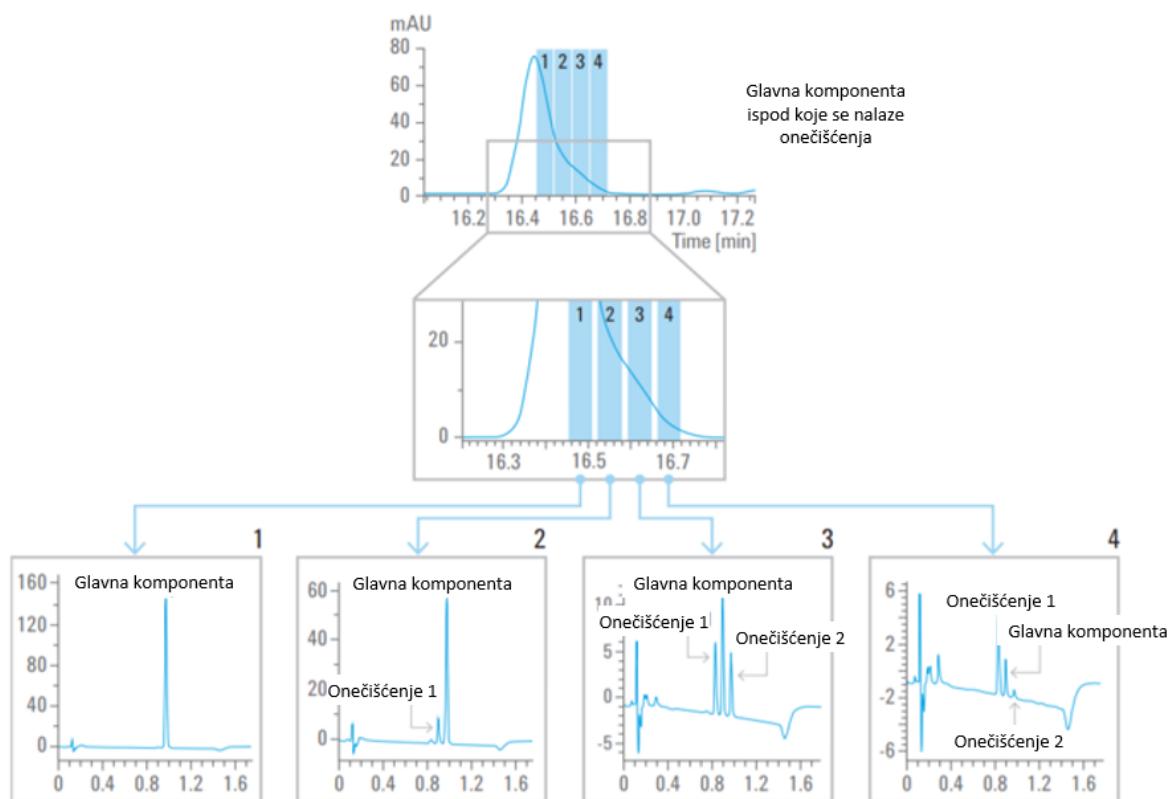
Sveobuhvatna dvodimenzionalna kromatografija



Slika 3. Prikaz razdvajanja komponenti smjese u sveobuhvatnoj dvodimenzionalnoj kromatografiji⁶



Slika 4. Tipičan primjer vizualizacije sveobuhvatnog dvodimenzionalnog kromatograma složenog biološkog uzorka⁶



Slika 5. Prikaz *multiple-heart-cut* tehnike prilikom razdvajanja koeluirajućih analita u prvoj dimenziji te njihovo razdvajanje prije potvrđne analize spektrometrijom masa (MS)⁶

Tablica 1. Prednosti i nedostaci dvodimenzionalne tekućinske kromatografije

Prednosti	Nedostaci
Vrlo visoka moć razdvajanja	Složena instrumentacija
Dodatna selektivnost (ortogonalnost) druge dimenzije	Povećano vrijeme trajanja analize
Smanjena nesigurnost identifikacije komponenti (u usporedbi s HPLC)	Smanjena osjetljivost
Kompatibilnost s MS i MS/MS detekcijom	Nekompatibilnost mobilnih faza
Provjeravanje čistoće pika dodatnom selektivnošću druge dimenzije	Razvoj metode
Izbor različitih mehanizama zadržavanja	Zahtjevna interpretacija rezultata, potreban poseban računalni program
Velik ukupan broj razdvojenih komponenti	

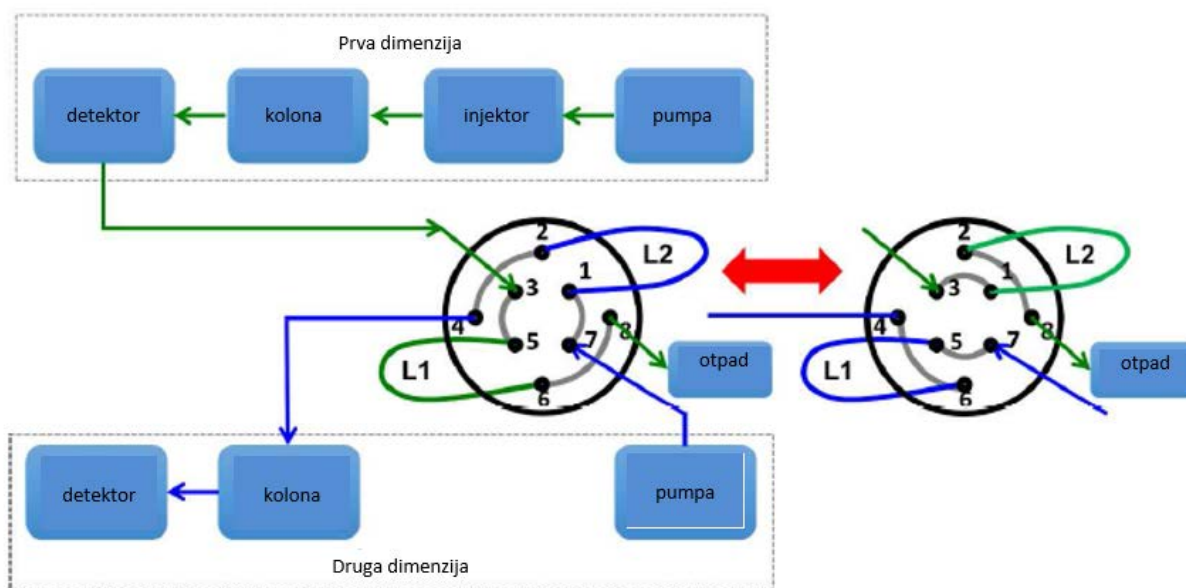
Zapanjujuća moć razdvajanja koju nude LC-LC i LC×LC tehnike dvodimenzionalne kromatografije, sve njezine nedostatke stavlja u drugi plan. Također, zbog svih ostalih prednosti 2D-LC metode se sve više primjenjuju u područjima u kojima je do sada dominirala jednodimenzionalna kromatografija.

Modulacija

Središnji dio svakog 2D-LC sustava je međuspoj prve (¹D) i druge dimenzije (²D). Međuspoj ima funkciju prijenosa frakcije eluata prve dimenzije u drugu dimenziju.

Pasivna modulacija i problem nekompatibilnosti

Najčešći (i najjednostavniji) tip međuspoja je osmero kanalni dvopoložajni ventil. Ventil je opremljen s dvije identične petlje (engl. *storage loops*) za pohranu uzorka. Naizmjenice, dok se jedna petlja puni s eluentom prve dimenzije, druga petlja se injektira na kolonu druge dimenzije.



Slika 6. Shematski prikaz 2D-LC sustava s osmero kanalnim dvopoložajnim ventilom kao međuspojem. L₁, te L₂ su petlje koje se naizmjenice pune uzorkom prve dimenzije i injektiraju na kolonu druge dimenzije promjenom položaja ventila (označeno crvenom strelicom)¹⁸.

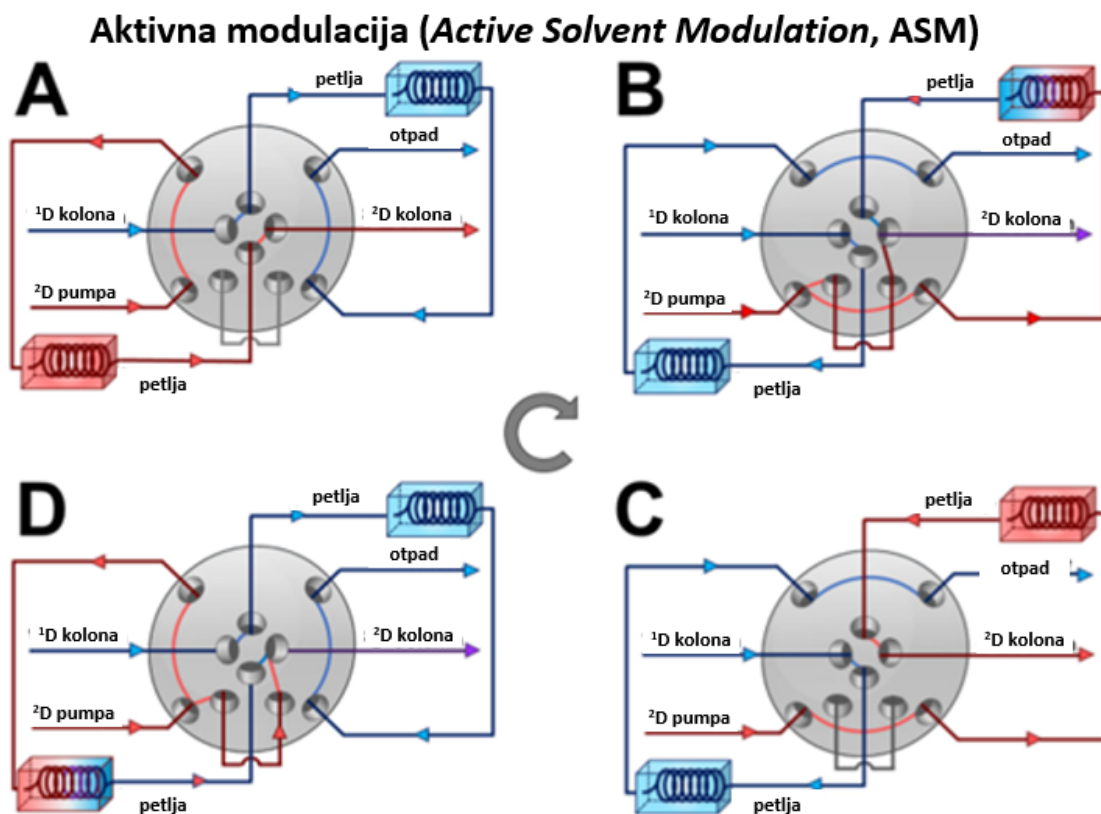
Prikazani sustav podložan je problemu nekompatibilnosti mobilnih faza. Neovisno radi li se o LC-LC ili LC×LC tehnici, redosljed u kojem se kombiniraju dvije metode je od iznimne važnosti. Prilikom razvoja metoda nastojimo da su mehanizmi separacije prve i druge dimenzije što više različiti, tj. ortogonalni. Često nas to dovodi do situacije da je eluent prve dimenzije nekompatibilan s mobilnom fazom druge dimenzije, što nepovoljno utječe na oblik

pikova i odvajanje komponenti u drugoj dimenziji. Dvije potpuno nekompatibilne faze (otopine koje se međusobno ne miješaju) su krajnost. Primjer nekompatibilnih mobilnih faza su kromatografija normalnih faza koja se temelji na separaciji s polarnim stacionarnim fazama i nepolarnim otapalima (npr. heksan) te kromatografija obrnutih faza gdje se separacija temelji na nepolarnim stacionarnim fazama i polarnim otapalima (npr. metanol/voda). Također, značajna razlika u viskoznosti otapala može dovesti do nestabilnog protoka tj. nestabilne putanje protoka kroz kolonu druge dimenzije. Mobilna faza druge dimenzije male viskoznosti može prodrijeti kroz stupac otopine visoke viskoznosti u obliku stošca te uzrokovati deformirane pikove u drugoj dimenziji. Ovaj efekt poznat je kao *viscous fingering*^{19,20}.

Mnogo manja neslaganja mobilnih faza su češća, kao na primjer neslaganje mobilnih faza u njihovoj elucijskoj moći (engl. *solvent strength mismatch*)²¹. Na primjer, ako eluent prve dimenzije sadrži puno acetonitrila (jako elucijsko otapalo), a početni sastav mobilne faze druge dimenzije sadrži mali udio acetonitrila, predviđeni mehanizam zadržavanja na drugoj dimenziji bit će narušen. Primjer ovog problema naročito dolazi do izražaja kod kombinacije kromatografije isključenjem i kromatografije obrnutih faza. Ukoliko unutar injektiranog uzorka na drugu dimenziju prevladava veći udio organskog otapala polarni analiti se neće zadržavati na koloni te će izaći u “mrtvom” volumenu, odnosno na samom početku kromatograma druge dimenzije (engl. *breakthrough effect*)²². Također, ako se u prvoj dimenziji koristi ionska kromatografija s mobilnom fazom koja sadrži natrijevu lužinu, a u drugoj dimenziji kromatografija obrnutih faza, natrijeva lužina uništava kolonu druge dimenzije, ispirući s kolone C₁₈ lance povezane na čestice silicijeva dioksida.

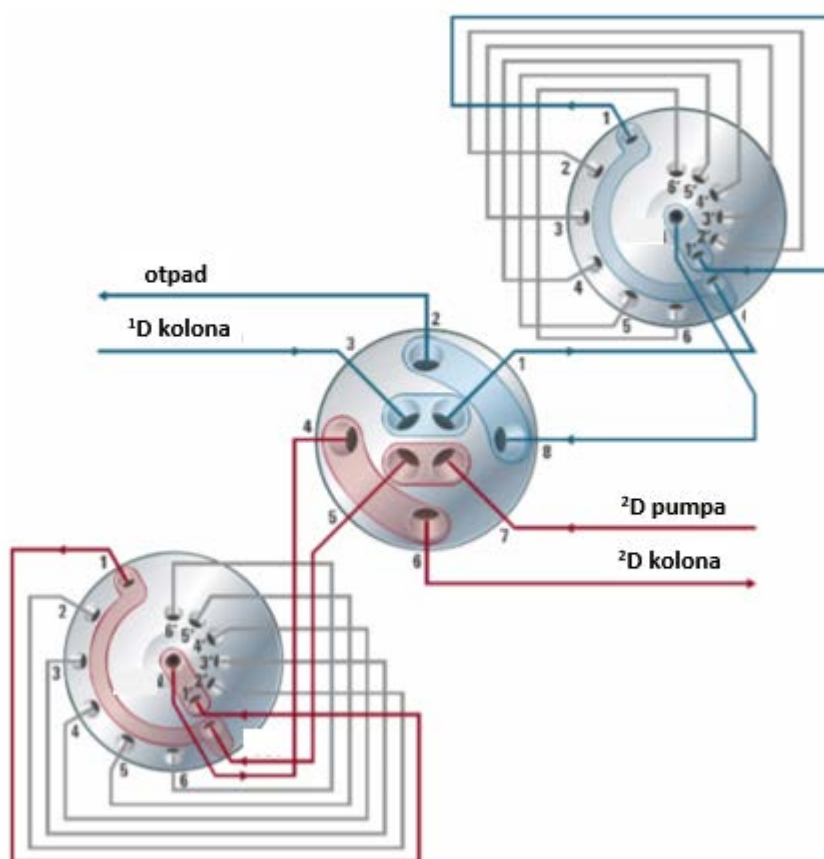
Aktivna modulacija (*Active Solvent Modulation, ASM*)

Stoll i suradnici su 2017. godine uveli aktivni modulacijski pristup kojeg su nazvali aktivna modulacija (engl. *Active Solvent Modulation, ASM*)²³. Shematski prikaz ovoga koncepta prikazan je na slici 7. Korišteni međuspoj je desetero kanalni četveropoložajni ventil. Ventil je opremljen s dvije identične petlje (zamke) za uzorak (engl. *storage loops*). Dodatno, uvedena je i obilazna kapilara (engl. *bypass capillary*). Obilazna kapilara omogućuje da u položajima B i D dio mobilne faze druge dimenzije zaobilazi petlju s uzorkom te ulazi na kolonu druge dimenzije. Simultano, dio toka mobilne faze druge dimenzije ispire petlju s uzorkom na kolonu druge dimenzije. Dodatna kapilara omogućuje razrjeđenje uzorka prije injektiranja na kolonu druge dimenzije.



Slika 7. Shematski prikaz ASM modula. U položaju A petlja se puni s uzorkom prve dimenzije. U položaju B ventil je okrenut te se napunjena petlja ispire s mobilnom fazom druge dimenzije uz simultano razrjeđenje mobilnom fazom (druge dimenzije) kroz obilaznu kapilaru. Razrijeđeni uzorak nanešen na kolonu druge dimenzije se eluira samo s mobilnom fazom druge dimenzije u položaju C. U položaju D i A ponavlja se injektiranje uzorka iz sekundarne petlje¹.

Velika prednost ovog pristupa je omogućavanje korištenja mobilne faze jake elucijske moći u prvoj dimenziji uz uspješno kromatografsko razdvajanje komponenti u drugoj dimenziji. Stoll i suradnici koristili su ASM modul za učinkovito spajanje kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama i kromatografije obrnutih faza prilikom odvajanja proteina u sveobuhvatnom načinu rada (LC×LC) dvodimenzionalnog kromatografa²³. Mobilna faza u kromatografiji temeljenoj na hidrofilnim interakcijama je organsko otapalo (npr. acetonitril) koje ima izuzetno veliku elucijsku snagu kod kromatografije obrnutih faza te se korištenjem ASM modula s razrjeđenjem uzorka prve dimenzije mobilnom fazom druge dimenzije učinkovito riješio ovaj problem nekompatibilnosti mobilnih faza.

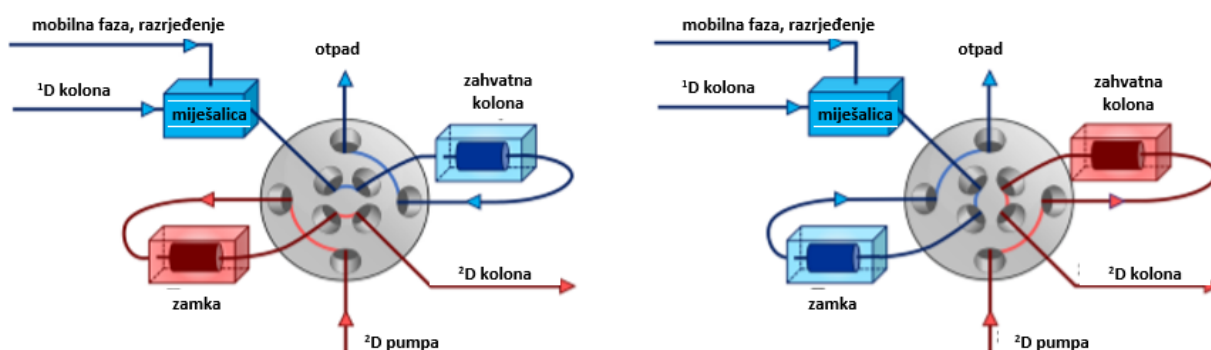


Slika 8 Shematski prikaz modificiranog ASM modula. Umjesto jedne, postavljen je niz od dvanaest petlji za uzorke kako bi se povećala učinkovitost sustava.

Aktivna modulacija (*Stationary-Phase-Assisted Modulation, SPAM*)

Aktivna modulacija (engl. *Stationary-Phase-Assisted Modulation, SPAM*) bazira se na korištenju zahvatnih kolona (engl. *trapping columns*) malog volumena, u odnosu na zamke za uzorak (engl. *storage loops*) koje se koriste u ASM modulu. Vonk i suradnici su 2015. godine demonstrirali ovu modulaciju²⁴. Kao zahvatne kolone koristili su zaštitne kolone (engl. *guard columns*) slične stacionarne faze analitičkoj koloni druge dimenzije. Eluent s uzorkom iz prve dimenzije prolazi kroz modulator te se uzorak zadržava u zahvatnoj koloni. Kako bi se omogućilo dovoljno zadržavanje uzorka na zahvatnoj koloni, eluent prve dimenzije se razrjeđuje u miješalici prije ulaska u modulator. Okretanjem ventila u drugu poziciju uzorak zarobljen u zahvatnoj koloni se eluira na kolonu druge dimenzije. Prednost ovog sustava u odnosu na ASM modul je što se zahvatne kolone mogu višestruko zasićivati s uzorkom prve dimenzije te se tako povećava osjetljivost. Nadalje, materijal zahvatnih kolona se može mijenjati i prilagoditi uzorku, odnosno stacionarnoj fazi druge dimenzije. Budući da se uzorak iz prve dimenzije nakuplja u uskoj vrpici u zahvatnoj koloni, moguće je injektirati manji volumen na kolonu druge dimenzije, što omogućuje upotrebu kraćih analitičkih kolona u drugoj dimenziji te značajno manje sveukupno vrijeme analize. Unatoč tome, korištenje SPAM sustava nije bez nedostataka. Svi analiti iz prve dimenzije moraju biti dovoljno zadržani na zahvatnoj koloni jer bi se u suprotnom isprali te bi analitičko iskorištenje (engl. *recovery*) bilo nedostatno. To može biti izazovno ako analiti imaju različita kemijska svojstva. Dodatno, zahvatne kolone smanjuju robusnost cijelog sustava te je neophodno da su obje zahvatne kolone identične kako bi se omogućile identične performanse sustava, neovisno o poziciji modula²⁵. Razvoj SPAM modula daleko je od optimiziranog, a njegova učinkovitost može se poboljšati smanjenjem zahvatnih kolona²⁴, povećavanjem njihove robusnosti²⁵, te smanjenjem volumena miješalice mobilnih faza (engl. *mixer*)²⁶.

Aktivna modulacija (*Stationary-Phase-Assisted Modulation, SPAM*)



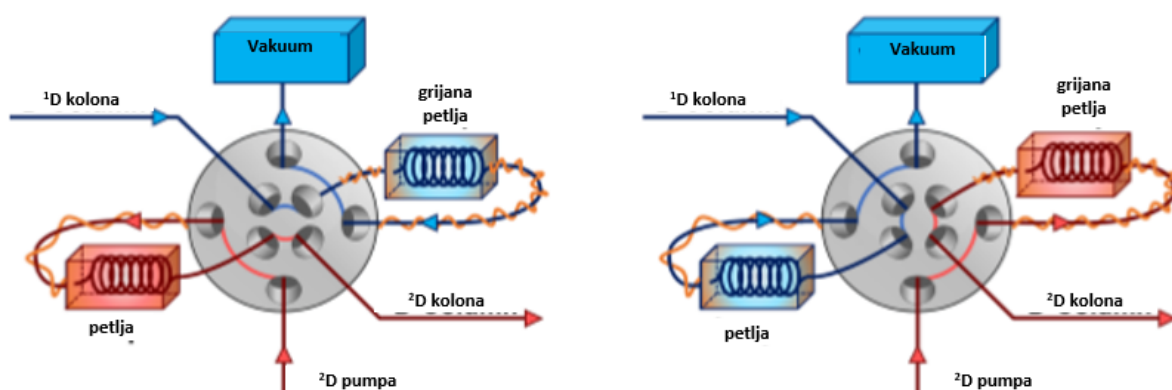
Slika 9. Shematski prikaz dva položaja ventila SPAM modula. Korišteni međuspoj je osmero kanalni dvopoložajni ventil. Umjesto petlje, sustav koristi zahvatne kolone, a problem nekompatibilnosti mobilnih faza zbog jačina elucijske moći riješen je pomoću miješalice mobilnih faza prve dimenzije, prije ulaska u modul¹.

Ostale modulacije

Osim ASM i SPAM modulacija razvijana su i druga rješenja, iako niti jedno nije široko rasprostranjeno. Najnoviji primjeri su *Evaporative Membrane Modulation*²⁷ te *Longitudinal On-Column Thermal Modulation*²⁸. Potpuno drugačiji pristup koji je nedavno predložen je *Fractionized Stacking and Sampling* modulacija²⁹ gdje je eluent prve dimenzije podijeljen u brojne dijelove prije uvođenja u drugu dimenziju.

Najuspješniji alternativni pristup je *Vacuum-Evaporation* modulacija (VEM) koju je razvila grupa Guan-a i suradnika³⁰. Shematski prikaz prikazan je na slici 10. Osmišljen je za prevladavanje problema nekompatibilnosti nepolarnih i polarnih mobilnih faza kao npr. u kombinaciji kromatografije normalnih i kromatografije obrnutih faza. Eluent prve dimenzije prolazi kroz zagrijanu petlju koja je povezana s izlazom spojenim na vakuum. Tipična otapala kod kromatografije normalnih faza (npr. heksan) lagano isparavaju pri povišenoj temperaturi i smanjenom tlaku, dok se analit zadržava na stijenkama petlje. Nakon okretanja ventila mobilna faza, druge dimenzije lagano otapa uzorak zbog povišene temperature i uvodi ga na analitičku kolonu. VEM modul korišten je u brojnim primjerima u analizi bioloških matrica³¹, analizi lipida u ljudskoj plazmi³² te seruma miševa³³. Dok je potencijal VEM modula jasno prikazan, sustav ima ograničenja. S jedne strane potrebno je koristiti dovoljno hlapive mobilne faze, a s druge strane neizbježan je gubitak lako hlapivih analita te toplinski raspad nestabilnih. Otapanje teško topivih analita s mobilnom fazom druge dimenzije je, također, nedostatak.

Aktivna modulacija (*Vacuum-Evaporation* modulacija, VEM)



Slika 10. Shematski prikaz dva položaja ventila VAM modula. Korišteni međuspoj osmero kanalni dvopoložajni ventil. Sustav koristi grijane petlje koje su podvrgnute vakuumu. Mobilna faza prve dimenzije hlapi, a analit zaostaje na stijenkama petlje. Prebacivanjem ventila u drugi položaj mobilna faza druge dimenzije otapa uzorak i nanosi ga na analitičku kolonu¹.

Zaključak

U ovom radu posebna pozornost posvećena je najvažnijem dijelu dvodimenzionalnog kromatografa, međuspoju prve i druge dimenzije. Od nekoliko vrsta međuspojeva, dva su najnovija i najuspješnija, ASM i SPAM. Oba tehnička rješenja imaju prednosti i nedostatke. Razvijeni su unazad nekoliko godina te su približili dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju širem krugu korisnika.

Popularnost dvodimenzionalne tekućinske kromatografije (2D-LC) je također u porastu zbog niza uspješnih primjena. Kada se odaberu dva vrlo različita mehanizma zadržavanja u prvoj i drugoj dimenziji, analiti su temeljito odvojeni od interferencija (matrice ili drugih komponenti smjese), što omogućuje njihovu procjenu čistoće. To je, primjerice, od velikog interesa u biofarmaceutici. LC-LC tehnika pruža dodatnu sigurnost prilikom identifikacije analita, pogotovo u kombinaciji s spektrometrom masa, što je naročito važno u forenzici te farmaceutici. Sveobuhvatna tekućinska kromatografija (LC×LC) daje rezultate od neprocjenjive vrijednosti u analizi nehlapivih analita ili komponenti matrice. Rezolucija takvog sustava je mnogostruko povećana u odnosu na klasični, jednodimenzionalni HPLC, budući da je ukupni kapacitet razdvojenih analita (pikova) u idealnom slučaju jednak umnošku kapaciteta razdvojenih pikova prve i druge dimenzije. Zbog toga je 2D-LC sustav tehnika izbora za odvajanje komponenti najstroženijih uzoraka te je izvrsna tehnika pročišćavanja analita prije detektora spektrometrije masa (MS ili MS/MS). Nadalje, 2D-LC u kombinaciji s MS detekcijom ima mnogo prednosti prilikom analize peptida u odnosu na konvencionalnu LC-MS tehniku. U analizi prirodnih lijekova vizualna usporedba LC×LC kromatograma omogućava brzi preliminarni pregled i njihovu međusobnu usporedbu. Za složene uzorke kao što su sintetski polimeri LC×LC kromatogram pruža strukturirani i lako razumljivi dvodimenzionalni kromatogram.

Dakako, vrijeme analize 2D-LC tehnike je duže nego kod jednodimenzionalne tehnike tekućinske kromatografije te je sama tehnika vrlo složena. Nekompatibilnost mobilnih faza te smanjena osjetljivost su također izazovi. Razvoj metode je značajno duži, kao i interpretacija 2D kromatograma. Unatoč svim nedostacima (neke od njih kao što je smanjena osjetljivost te nekompatibilnost mobilnih faza moguće je ukloniti korištenjem odgovarajućeg međuspoja), njezina fleksibilnost u izboru različitih načina razdvajanja prve i druge dimenzije te višestruko veća moć razdvajanja kao i dodatna sigurnost prilikom identifikacije nepoznatih spojeva je nezamjenjiva.

Razvojem tehnologije pojavljuju se analitičke kolone s česticama manjim od 2 μm , različitih stacionarnih faza, kao i instrumenti sa sve većim radnim tlakom. Manje čestice kolone omogućuju razvoj kraćih kolona iste efikasnosti i samom time brže analize, pri većim protocima i temperaturi. Stoga unatoč svim nedostacima dvodimenzionalna tekućinska kromatografija neupitno ima svijetlu budućnost.

Literatura

1. B. W. J. Pirok, D. R. Stoll, P. J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* **91** (2019) 240-263
2. B. W. J. Pirok, A. F. G. Gargano, P. J. Schoenmakers, *J. Sep. Sci.* **41** (2018), 68–98
3. J. M. Davis, D. R. Stoll, *J. Chromatogr. A* **1360** (2014), 128–142
4. D. R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S. E. G. Porter, S. C. Rutan, *J. Chromatogr. A*, **1168** (2007) 3-43
5. G. Vivó-Truyols, S. van der Wal, P.J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* **82**, (2010), 8525–8536
6. P. W. Carr, D. R. Stoll, Two-Dimensional Liquid Chromatography, Principles, Practical Implementation and Applications, Primer, Agilent Technologies, Germany, 2015. ISBN 5991-2359EN
7. R. Synge, Applications of partition chromatography, Nobel Lecture, 1952
8. C.E. Dent, W. Stepka, F. C. Steaward Determination of the free amino-acids of plant cells by partitioning chromatography, *Nature*, **160** (1947) 682-683
9. F. Erni, R. W. Frei, Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures, *J. Chromatogr. A*, **149** (1978), 561-569
10. M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins, *Anal. Chem.* **62** (1990), 161-167
11. B.L. Karger, L.R. Snyder, C. Horvath, *An Introduction to Separation Science*. John Wiley and Sons; New York: 1973.
12. J.C. Giddings. *Anal. Chem.* **56** (1984) 1258A.
13. G. Guiochon, L.A. Beaver, M.F. Gonnord, A.M. Siouffi, M. Zakari *J. Chromatogr.* **255** (1983) 255-415.
14. D.A. Wolters, M.P. Washburn, J.R. Yates *Anal. Chem.* **73** (2001) 5683.
15. F. Regnier, A. Amini, A. Chakraborty, M. Geng, et al. *LC-GC North Am.* **19** (2001) 200
16. A. W. Jr. Moore, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **67** (1995) 3448
17. D. R. Stoll, J. D. Cohen, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* **1122** (2006) 123
18. D. R. Stoll, P. W. Carr, Two-Dimensional Liquid Chromatography: A State of the Art Tutorial, *Anal. Chem.* **89**, (2017), 519-531
19. K. J. Mayfield, R. A. Shalliker, H. J. Catchpole, A. P. Sweeney, V. Wong, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1080** (2005) 124-131.
20. J. Samuelsson, R. A. Shalliker; T. Fornstedt, *J. Microchem.* **130** (2017) 102–107.
21. D. R. Stoll, R. W. Sajulga, B. N. Voigt, E. J. Larson, L. N. Jeong, S. C. Rutan, *J. Chromatogr. A* **1523** (2017) 162–172.
22. X. Jiang, A. Van Der Horst, P. J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* **982** (2002) 55–68.

23. D. R. Stoll, K. Shoykhet, P. Petersson, S. Buckenmaier, *Anal. Chem.* **89** (2017) 9260–9267
24. R. J. Vonk, A. F. G. Gargano, E. Davydova, H. L Dekker, S. Eeltink, L. J. de Koning, P. J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* **87** (2015) 5387–5394.
25. Pirok, B. W. J.; Abdulhussain, N.; Aalbers, T.; Wouters, B.; Peters, R. A. H.; Schoenmakers, P. J. *Anal. Chem.* 2017, 89 (17), 9167–9174.
26. M. A. Ianovska, P. P. M. F. A. Mulder, E. Verpoorte, *RSC Adv.* **7** (2017) 9090–9099.
27. E. Fornells, B. Barnett, M. Bailey, E.F. Hilder, R. A Shellie, M. C. Breadmore, *Anal. Chim. Acta* **1000** (2018) 303–309.
28. M. E. Creese, M. J. Creese, J. P. Foley, H. J. Cortes, E. F. Hilder, R. A. Shellie, M. C. Breadmore, *Anal. Chem.* **89** (2017), 1123–1130.
29. B. Ji, B. Xia, J. Liu, Y. Gao, L. Ding, Y. Zhou, *J. Chromatogr. A* **1466** (2016), 199–204
30. H. Tian, J. Xu, Y. Xu, Y. Guan, *J. Chromatogr. A* **1137** (2006) 42–48.
31. H. Tian, J. Xu, Y. Guan, *J. Sep. Sci.* **31** (2008) 1677–1685
32. S. Shen, L. Yang, L. Li, Y. Bai, C. Cai, H. Liu, *J. Chromatogr. B* **1068** (2017) 1068–1069
33. R. Weng, S. Shen, C. Burton, L. Yang, H. Nie, Y. Tian, Y. Bai, H. Liu, *Anal. Bioanal. Chem.* **408** (2016) 2963–2973