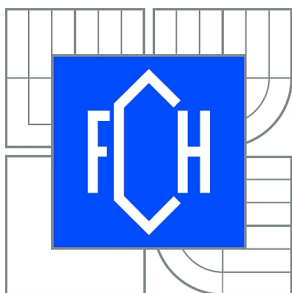




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VÍCEROZMĚRNÉ SEPARACE V KAPALNÉ FÁZI

MULTIDIMENSIONAL LIQUID PHASE SEPARATIONS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. JOZEF ŠESTÁK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. VLADISLAV KAHLE, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0106/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Ing. Jozef Šesták**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2834)
Studijní obor: Chemie životního prostředí (2805V003)
Vedoucí práce **RNDr. Vladislav Kahle, CSc.**
Konzultanti:

Název dizertační práce:

Vícerozměrné separace v kapalně fázi

Zadání dizertační práce:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na problematiku vícerozměrných separací v kapalně fázi.
2. Vývoj konceptu nové konstrukce kapalinového chromatografu s možností gradientové eluce na kapilárních kolonách bez dělení toku.
3. Realizace jednoduché dvourozměrné separační platformy založené na jednoduchém kapalinovém chromatografu.
4. Provedení dvourozměrné separace modelových směsí s využitím navržených experimentálních konfigurací a hodnocení píkovej kapacity.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2015

Dizertační práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Jozef Šesták
Student(ka)

RNDr. Vladislav Kahle, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2014

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Dizertační práce se zabývá problematikou vícerozměrných separací v kapalně fázi. Tyto separační techniky jsou vyvíjeny ve snaze splnit současné požadavky kladené na analýzu velmi složitých vzorků, jejichž komponenty jsou teplotně nestálé, mají nízkou tenzi par nebo vysokou molekulovou hmotnost a nelze je analyzovat s využitím dvourozměrné (2D) plynové chromatografie. V teoretické části práce jsou vysvětleny koncepty píkové kapacity a ortogonalita. Vysokoúčinná kolonová kapalinová chromatografie (HPLC) a vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) jsou zde chápány jako nejvhodnější jednorozměrné kapalinově-separační techniky pro realizaci vícerozměrných separací v kapalně fázi, jelikož s nimi lze realizovat automatizované provedení vícerozměrné separace navíc s možností on-line spojení s hmotnostní spektrometrií. V experimentální části je popsána konstrukce zjednodušeného miniaturizovaného kapalinového chromatografu. Původní koncept byl rozšířen o možnosti přípravy gradientů mobilní fáze. Funkce systému byla demonstrována na gradientové separaci směsi alkylfenolů, peptidů z tryptického digestu BSA a směsí nitroláték. Popsaný LC systém byl použit jako základ několika dvourozměrných separačních platform. Realizována byla HILIC-MALDI-MS analýza glykanů, dvourozměrná separace peptidů z tryptického digestu BSA využívající off-line spojení kapilární izoelektrické fokusace s vyvinutým gradientovým miniaturizovaným LC systémem a platforma umožňující realizaci on-line dvourozměrné kapalinové chromatografie v módech IEC×RPLC, RPLC×RPLC a HILIC×RPLC. Prezentované výsledky podporují správnost uvažovaného konceptu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dvourozměrné separace; Separace v kapalných fázích; Píková kapacita; Ortogonalita; Vysokoúčinná kapalinová chromatografie; Kapilární elektroforéza; Hmotnostní spektrometrie; 2D instrumentace; Složité směsi

ABSTRACT

This dissertation is dedicated to the topic of multidimensional liquid phase separations. This separation techniques are developed for analysis of complex samples containing thermally labile, low volatile or high molecular weight components that can't be analysed by two-dimensional (2D) gas chromatography. Concepts of peak capacity and orthogonality are explained and various methods of their determination are stated in theoretical part of dissertation. High performance column liquid chromatography (HPLC) and high performance capillary electrophoresis (HPCE) are suggested as the most suitable methods for automated multidimensional liquid phase separations on-line coupled to mass spectrometry. Configuration of simplified miniaturized liquid chromatograph is described in experimental part of this thesis. Original concept of the system has been extended by simple mobile phase gradient generation technique. Correct function was demonstrated on repeatable separation of alkylphenones, peptides, nitroaromatics, and nitroesters. This system has been utilized as a base for a couple of simple two-dimensional separation platforms for HILIC-MALDI-MS analysis of glycans, for separation of peptides based on off-line coupling of isoelectric focusing and capillary liquid chromatography, and finally for on-line IEC×RPLC, RPLC×RPLC, and HILIC×RPLC two-dimensional liquid chromatography. Correct operation of submitted platforms has been proved.

KEY WORDS

Liquid phase separations; Two-dimensional separations; Peak capacity; Orthogonality; High performance liquid chromatography; Capillary electrophoresis; Mass spectrometry; 2D instrumentation; Complex mixtures

ŠESTÁK, J. Vícerozměrné separace v kapalně fázi. Brno, 2015. 69 s. Dizertační práce na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně, ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí dizertační práce RNDr. Vladislav Kahle, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému školiteli Dr. Vladislavu Kahlemu za trpělivé vedení a dalším kolegům z Ústavu analytické chemie AV ČR, Dr. Marii Horké, Dr. Daně Moravcové a Dr. Filipu Dušovi za pomoc, cenné rady a vytvoření příjemné atmosféry pro vědeckou práci.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Píková kapacita separačních metod.....	11
3.2	Vysokoučinné jednorozměrné kapalinové separace jako předpoklad vysoké píkové kapacity vícerozměrných separací	12
3.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	12
3.2.2	Vysokoučinná kapilární elektroforéza	14
3.3	Ortogonalita separačních mechanismů.....	16
3.3.1	Hodnocení ortogonality.....	17
3.4	Provedení vícerozměrných separací.....	19
3.4.1	Separace v prostoru vs. separace v čase.....	19
3.4.2	Off-line vs. on-line	19
3.4.3	Heart-cut vs. komprehensivní	20
3.5	Kompatibilita kapalných fází	21
3.6	Dvourozměrné separace v kapalně fázi.....	21
3.6.1	2D-HPLC	21
3.6.2	HPLC-HPCE	23
3.6.3	2D-HPCE	24
3.7	Trojrozměrné separace v kapalně fázi.....	24
3.8	Hmotnostní spektrometrie jako další rozměr	25
3.8.1	Ionizační techniky pro spojení s kapalinovými separacemi.....	26
3.8.2	Tandemová hmotnostní spektrometrie	27
3.9	Aplikace vícerozměrných separací v kapalně fázi	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Miniaturizovaný kapilární kapalinový chromatograf.....	29
4.2	Jednoduché dvourozměrné separační platformy	32
4.2.1	Off-line spojení kapilární LC s MALDI-TOF.....	32
4.2.2	Off-line spojení cIEF s kapilární LC.....	33
4.2.3	On-line 2D-LC platforma.....	35

5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Gradientové separace s miniaturizovaným kapilárním kapalinový chromatografem	38
5.1.1	Vizualizace profilu gradientu mobilní fáze	38
5.1.2	Gradient mobilní fáze v nakloněné stříkačce	39
5.1.3	Tvorba gradientu mobilní fáze v kapiláře	41
5.1.4	Gradientová separace v režimu konstantního tlaku.....	43
5.2	Miniaturizovaný kapilární kapalinový chromatograf jako základ jednoduchých dvourozměrných separačních systémů	46
5.2.1	HILIC-MALDI-MS – nástroj pro analýzu glykanů	46
5.2.2	Dvourozměrná off-line cIEF-cLC separace peptidů	46
5.2.3	2D-LC platforma	49
6	ZÁVĚR.....	52
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
8	SEZNAM VLASTNÍCH PRACÍ	65
9	SEZNAM ZKRATEK	67

1 ÚVOD

S potřebou dělení nejrůznějších směsí se člověk setkává prakticky od počátku civilizace. Procesy, při kterých dochází k určitému dělení neboli separaci, sehrávali takřka vždycky klíčovou roli. Naši předci, například, oddělovali ve větru zrní od plev. Vítr odnášel lehčí plevy a relativně těžké zrní dopadlo zpátky. Tato na pohled velmi primitivní procedura není ve skutečnosti nic jiného než separační proces. Při značném zjednodušení představuje vítr impulz síly, kterým částice získají přibližně stejnou hybnost. Lehčí částice tedy získají vyšší rychlost.

V dnešní moderní industrializované společnosti mají techniky využívající různé separační mechanismy rovněž nezastupitelné místo. Výroba prakticky čehokoliv se bez využití určitého stupně separace neobejde. Například ropa, která je výchozí surovinou pro pohonné hmoty a plasty, je zpracována frakční destilací. Voda je upravována filtrací a sedimentací a to jak při úpravě surové vody na pitnou, tak i při čištění vody odpadní. Řada procesů využívá pro svou kontrolu nejrůznější analytické techniky, z nichž velké množství je založeno na jednom i více separačních mechanismech.

Separace je tedy jakýkoliv proces, jehož cílem je rozdělení směsi komponentů, nebo izolace vybraného komponentu ze směsi. Jinými slovy, cílem je úprava složení směsi dle našich požadavků. Účelem separačních procesů tak může být například odstranění nečistot ze vstupních surovin či produktů, výroba čistých látek nebo také identifikace izolovaných komponentů či stanovení jejich obsahu ve směsi.

Posledně zmíněná oblast je doménou analytické chemie, kde jsou separační metody využívány pro získání informací. Současný význam separačních metod v oboru analytické chemie je nesporný. Hlavním přínosem separačních metod v analytické chemii je možnost získat informace o více látkách současně v rámci jedné zkoušky. V analytickém experimentu jsou tyto látky separovány na základě rozdílu v určité vlastnosti a poté detekovány vhodným detekčním systémem. Pro získání informací o složení vzorku využívá analytická chemie zejména chromatografické metody, elektromigrační metody a hmotnostní spektrometrii.

Každá aplikace požaduje od separační metody ve výsledku dosažení určitého rozlišení v přijatelném čase. Požadavky kladené na separaci proto bývají různé. V případě jednoduchých směsí většinou není velký problém nalézt rozumné podmínky pro rozdělení a stanovení komponent. Pro takové situace zpravidla postačuje jeden separační mechanismus, „jeden rozměr“, s jehož pomocí lze v rozumném čase dosáhnout uspokojivé rozlišení mezi cílovými složkami směsi. S rostoucí složitostí vzorku roste pravděpodobnost (a riziko chyby), že separovaná zóna na výstupu separačního procesu neobsahuje pouze jednu komponentu. Jak již bylo zmíněno výše, látky jsou separovány na základě rozdílu v určité vlastnosti. Čím je rozdíl mezi látkami v dané vlastnosti větší, tím snáz je lze od sebe oddělit. Naopak, čím jsou si dvě látky v dané vlastnosti podobnější, tím je jejich separace náročnější. V případě, že se dvě látky v rozhodující vlastnosti shodují, nelze je danou separační technikou rozlišit. Pro rozlišení složek takové frakce je nutné využít rozdíly v jiných vlastnostech daných látek a použít odlišný separační mechanismus jako „druhý rozměr“.

Situace, kdy nelze dosáhnout požadovaného rozlišení komponentů směsi s využitím jediného separačního stupně nastává zejména v případech, kdy vzorek obsahuje velké množství látek. Jednotlivé frakce takové směsi separované v prvním rozměru, které ještě stále obsahují více komponent lze většinou rozdělit s využitím dalšího rozměru. Pravděpodobnost, že se dvě látky

shodují ve dvou různých vlastnostech, je nízká, ne však nulová. Dvourozměrné separace jsou proto spojovány s dalším separačním stupněm, který velmi často zastupuje hmotnostní spektrometrie, která přináší další možnosti rozlišení komponentů v separované zóně, jejich selektivní detekce a identifikace.

Významný progres na poli hmotnostní spektrometrie v podobě hmotnostních spektrometrů s ultra vysokým rozlišením (Orbitrap, Iontová cyklotronová rezonance) a sofistikovaného softwaru s výkonnými vyhledávacími algoritmy způsobil, že současné špičkové hmotnostní spektrometry jsou teoreticky schopny rozlišit a identifikovat komponenty komplexních směsí i bez předřazeného separačního stupně. V případě přímé MS analýzy značně složitých vzorků však dochází k tzv. iontové supresi (např. [1; 2]), změny účinnosti ionizace v případě většího množství látek přítomných v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Díky předřazené separaci dochází ke zjednodušení směsi látek vstupující do iontového zdroje a tím k významnému snížení intenzity tohoto negativního jevu.

Dle vlastností separovaných látek jako těkavost (příp. možnost derivatizace na těkavější produkty), teplotní stabilita či molekulová hmotnost, lze provádět dvou a vícerozměrné separace v plynné, nebo v kapalně fázi. Oba přístupy jsou si v teoretické oblasti podobné, každý má své výhody a nevýhody. Na základě odlišností v praktické realizaci a zejména z hlediska aplikací se však tyto dva přístupy vyvíjejí převážně samostatně, i když dvourozměrné separace kombinující například plynovou a kapalinovou chromatografii byly také reportovány, např. [3-8]. Tato práce bude dále pojednávat o vícerozměrných separacích ve fázi kapalně.

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- Studium relevantní literatury a shrnutí současného stavu poznání v dané problematice
- Vývoj konceptu nové konstrukce kapalinového chromatografu s možností gradientové eluce na kapilárních kolonách bez dělení toku
- Návrh konceptu jednoduché dvourozměrné separační platformy založené na jednoduchém kapalinovém chromatografu
- Dvourozměrné separace modelových směsí s využitím navržených experimentálních konfigurací; Hodnocení pikové kapacity.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Píková kapacita separačních metod

Pro posouzení potenciálu konkrétní metody separovat velké množství látek lze využít koncept tzv. píkové kapacity (peak capacity), který zavedl Giddings [9]. Píková kapacita představuje teoretický počet látek (píků), které při konstantním rozlišení $R_s=1$ vyplní určitý časový úsek záznamu separace (chromatogram, elektroforogram). V situaci, kdy jsou zaznamenány přibližně stejně široké zóny (píky) separovaných látek, lze píkovou kapacitu P vypočítat na základě šířky píku odpovídající 4σ (šířka naměřena v 13,4 % výšky píku) dle rovnice (1). Hodnota 4σ se však často nahrazuje průměrnou šířkou píků na nulové linii.

$$P = 1 + \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (1)$$

V literatuře bylo popsáno několik přístupů k praktickému výpočtu píkové kapacity. Některé počítají píkovou kapacitu pro celý záznam, jiné pro interval mezi prvním a posledním píkem, v gradientové chromatografii pak dle doby trvání gradientu. Přehled některých přístupů uvažovaných pro chromatografii uvádí Neue [10]. Pro reálnou situaci a konkrétní podmínky, kdy jsou píky v získaném záznamu různě široké, je velmi praktické použití výpočtu píkové kapacity P na základě sumy rozlišení mezi sousedními píky, rovnice (2).

$$P = R_s(1,2) + R_s(2,3) + \dots + R_s(n-1, n) \quad (2)$$

Píková kapacita je velmi často diskutována v souvislosti s gradientovou kapalinovou chromatografií [11; 12], kde ji lze využít při optimalizaci separačních podmínek [13], či pro hodnocení separačních kolon [14; 15]. Píkovou kapacitu lze také využít pro hodnocení separací provedených kapilární elektroforézou [16].

Píková kapacita se stala důležitým parametrem při posuzování, v posledním desetiletí velmi intenzivně se rozvíjející oblasti, dvou a vícerozměrných separací. Gilar a kol. [17] využil k predikci píkové kapacity pro separaci peptidů v 1D a 2D-HPLC matematický model popsany následující rovnicí (3).

$$P = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{B\Delta C}{B\Delta C(t_0/t_g) + 1} \quad (3)$$

Píková kapacita je zde funkcí účinnosti kolony N (počet teoretických pater), rozdílu ve složení mobilní fáze v gradientu ΔC (%), mrtvého retenčního času t_0 (min) a času gradientu t_g (min). Proměnná B reprezentuje vliv velikosti molekuly MW (Da) a lze ji odhadnout s využitím rovnice (4).

$$\ln B = 0,6915 \ln(\text{MW}) - 1,49 \quad (4)$$

Hodnoty píkové kapacity získané z rovnic (1) až (3) jsou charakteristické pro konkrétní podmínky – délku kolony, čas gradientu a dobu analýzy. Zejména pro porovnání různých separačních technik, instrumentů a jednotlivých metod je výhodné vztáhnout píkovou kapacitu

na jednotku času (doba gradientu nebo doba analýzy). Takto lze odhadnout produktivitu (počet píků za minutu) různých přístupů k separaci směsi a provést jejich porovnání.

Pro úspěšnou separaci konkrétní směsi tedy musí mít daná technika a metoda dostatečnou píkovou kapacitu. S rostoucí složitostí vzorku proto rostou i požadavky na vyšší píkovou kapacitu. Jeden separační rozměr má ale píkovou kapacitu prakticky omezenou. Limitujícím faktorem je zde čas. Doba, za kterou je v jednom separačním rozměru dosaženo velmi vysoké píkové kapacity je již příliš dlouhá (až desítky hodin). Další zvýšení píkové kapacity s využitím pouze jednoho separačního rozměru je proto značně omezené. Jak je patrné z rovnice (3), pouze zvýšení počtu teoretických pater (např. použití účinnější kolony) má jen malý efekt. Pokud by byla použita dvakrát účinnější separační kolona, píková kapacita by se teoreticky zvýšila 1,4 krát. Rozsah gradientu mobilní fáze ΔC je omezen na 0-100 % a prodloužení doby gradientu t_g adekvátně prodlouží celou separaci.

3.2 Vysokoúčinné jednorozměrné kapalinové separace jako předpoklad vysoké píkové kapacity vícerozměrných separací

Cílem každé separace je dosažení určitého rozlišení a pro dosažení daného rozlišení musí být separace adekvátně účinná. Účinnost separace se nejčastěji vyjadřuje jako počet teoretických pater a je charakteristická pro konkrétní separační systém a jeho konfiguraci. Koncept teoretického patra [18; 19] byl převzat z teorie chemického inženýrství pro frakční destilaci. Teoretické patro představuje hypotetickou zónu v separačním prostoru, ve které dojde k úplné výměně látek a energie. Jak je patrné z rovnice (5) pro odvození chromatografického rozlišení (kde α je selektivita, k je kapacitní faktor) [20] a z rovnice (6) pro rozlišení v kapilární zónové elektroforéze (kde $\Delta u/\bar{u}$ je relativní rozdíl mobilit dvou analytů) [21], je rozlišení přímo úměrné druhé odmocnině počtu teoretických pater N .

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot \frac{k}{k + 1} \quad (5)$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta u}{\bar{u}} \quad (6)$$

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.1, vysoká účinnost je předpokladem efektivní separace složité směsi látek – dosažení vysoké píkové kapacity. Koncept vícerozměrných separací byl sestaven za účelem realizace vysoké píkové kapacity a rozlišení velkého množství komponentů v komplexních směsích. Základem pro úspěšnou vícerozměrnou separaci je proto spojení vysoce účinných jednorozměrných separačních metod.

Z pohledu současných požadavků na zpracování velkého množství vzorků, roste poptávka po automatizovaných analytických metodách, které navíc dovolují přímé on-line spojení s hmotnostní spektrometrií. Tyto předpoklady nejlépe splňují separační metody využívající separační kolony a separační kapiláry, tedy vysokoúčinná kapalinová chromatografie a vysokoúčinná kapilární elektroforéza.

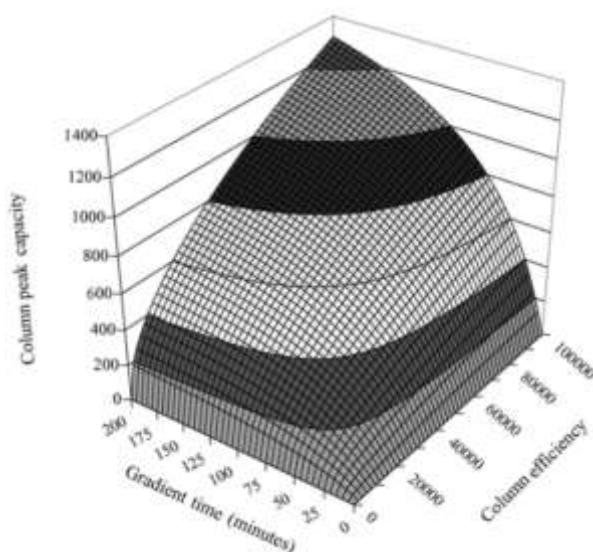
3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) je směs látek rozdělena na základě různé afinity jednotlivých složek ke stacionární a mobilní fázi. Kontinuální tok mobilních fází

zabezpečují vysokotlaké pumpy (HPLC – 40 MPa, UPLC/UHPLC – 120 MPa). Vzorek je standardně dávkován prostřednictvím šesticestného dvoupolohového dávkovacího ventilu s interní, nebo externí dávkovací smyčkou (často plněnou jen částečně). Objem vlastní separační kolony vyplňují nejčastěji sférické kulovité částice nebo porézní monolit, jejichž povrch je často různě modifikován. K detekci separovaných zón bylo vyvinuto široké spektrum detektorů. Mezi relativně univerzální detektory patří fotometrické UV-Vis detektory a refraktometrické detektory. Nabitě látky lze detekovat vodivostním detektorem. Za selektivní detektory lze považovat detektory fluorescenční a chemiluminiscenční. Jasným trendem současnosti je zejména spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS) kdy lze dle nastavených parametrů MS použít jako univerzální i jako selektivní detektor. Novější skupinou univerzálních detektorů pak jsou detektory založené na aerosolové technologii [22; 23]. Patří sem detektor rozptylu světla (ELSD) a detektor nabitého aerosolu (CAD).

Základním prvkem HPLC jsou však vlastní vysokoúčinné separační kolony. Technologie výroby nosičů stacionární fáze zaznamenala obrovský pokrok. V současnosti je k dispozici velmi široká škála monolitických i náplňových kolon. U náplňových kolon je patrný trend povrchově porézních částic [24] a posun od 5 μ m a 3 μ m částic k částicím o průměru menším než 2 μ m, navíc s velmi úzkou distribucí velikosti. U monolitických kolon je patrné úsilí o optimalizaci polymerizačního procesu tak, aby měly kolony co největší účinnost a zachovali si nízký hydraulický odpor. Nejúčinnější kolony současnosti jsou plněny povrchově porézním sorbentem o průměru částic 1,3 μ m a jsou dosahovány hodnoty účinnosti až 300 000 teoretických pater na metr (N/m).

S využitím HPLC lze separovat nejrůznější skupiny látek. Toto je možné díky pestré paletě módů, které lze v HPLC realizovat [20]. Mezi nejvyužívanější patří chromatografie na obrácených fázích [25], chromatografie na normálních fázích, iontově-výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie [26]. V současné době také roste význam chirální chromatografie [27], chromatografie hydrofilních (HILIC) [28] a hydrofobních interakcí a afinitní chromatografie. Velmi účinným nástrojem zvyšujícím píkovou kapacitu HPLC separace je využití gradientové eluce [29], viz **obrázek 1**.



Obrázek 1 – Píková kapacita jako funkce doby gradientu a účinnosti kolony. Použito z Ref. [17] se souhlasem vydavatele.

3.2.1.1 Chromatofokusace

Chromatofokusace je separační technika, která se využívá zejména pro separace proteinů a peptidů na základě rozdílů v izoelektrickém bodu pI. Chromatofokusací lze dosáhnout vysokého rozlišení, až 0,05 pI. V principu se jedná o variantu iontově-výměnné chromatografie [30; 31]. Chromatofokusace nevyužívá působení elektrického pole, nejedná se tedy o elektromigrační techniku. Slabě iontově-výměnná kolona s vhodnou pufrací kapacitou je kondicionována tlumícím roztokem s horní hodnotou intervalu pH, ve kterém mají být látky separovány. Do systému je nadávkován vzorek a pro eluci je použit tlumící roztok ohraničující spodní hranici intervalu pH (fokusující pufr). Gradient pH je vytvořen přímo na koloně pomocí speciálního pufrového systému obsahujícího směs oligopeptidů s velkým počtem amino- a karboxylových skupin v postranních řetězcích, s hodnotami pI, jež pokrývají určitý interval pH. Během eluce se uplatní tzv. fokusační efekt. Navzdory výhodným vlastnostem, není použití chromatofokusace příliš časté (WOS „chromatofocus“ 5-10 publikací ročně).

3.2.2 Vysokoučinná kapilární elektroforéza

Vysokoučinná kapilární elektroforéza (HPCE) je souhrnný název pro skupinu kapilárních elektromigračních metod zahrnujících zejména zónovou elektroforézu, izoelektrickou fokusaci, izotachoforézu, gelovou elektroforézu, micelární elektrokinetickou chromatografii a elektrochromatografii. Tyto separační metody jsou považovány za neúčinnější a stále více se využívají jako alternativa či doplněk různých variant HPLC separací [32]. Separační účinnosti se pohybují v řádech stovek tisíc až milionů N/m [33].

3.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vysokorozlišovací kapalinově-separační metoda založená na separaci látek s různou rychlostí migrace kapalným médiem ve stejnosměrném elektrickém poli orientovaném v podélném směru křemenné kapiláry s možným využitím elektroosmotického toku [34]. Rychlost migrace částice je přímo úměrná celkovému elektrickému náboji částice, intenzitě elektrického pole a nepřímo úměrná viskozitě kapalného média [21].

Elektroosmotický tok, pokud není cíleně eliminován, je v kapilární elektroforéze významným transportním jevem. Příčinou vzniku elektroosmotického toku v křemenné kapiláře je disociace silanolových skupin na povrchu stěny a vznik elektrické dvojvrstvy. Disociované skupiny jsou obklopeny částicemi s opačným elektrickým nábojem a vytváří imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy. V difuzní části, směrem do roztoku, zůstává přebytek volného náboje. Elektroosmotický tok pak vzniká působením stejnosměrného elektrického pole orientovaného v podélném směru kapiláry na nabitě částice v difuzní vrstvě. Kladné ionty migrují ke katodě a prostřednictvím vnitřního tření v kapalině unášejí veškerý roztok (včetně elektricky neutrálních částic) čímž jsou významně ovlivněny výslední migrační rychlosti analytů. Elektroosmotický tok má na rozdíl od parabolického profilu hydraulicky generovaného toku profil plochý (lineární rychlost téměř v celém profilu konstantní). Elektroosmotický tok tedy prakticky nepřispívá k rozšiřování separovaných zón, čehož výsledkem je několikrát vyšší účinnost v porovnání s HPLC.

Tradiční provedení kapilární zónové elektroforézy využívá křemennou kapiláru o vnitřním průměru 20 – 200 μm a délce 30 – 100 cm, jejíž konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolyty

a elektrodami, na něž je přivedeno vysoké napětí (10 – 30 kV). Vzorek je dávkován pneumaticky či elektrokineticky, ponořením konce kapiláry do roztoku vzorku. Nejvyužívanější je fotometrická detekce. Absorbance, nebo intenzita fluorescence je měřena před výstupním koncem kapiláry. Na významu v současnosti nabývá také spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií CE-MS [35].

CZE lze využít k vysokoúčinné separaci velmi široké škály látek od malých anorganických iontů a organických kyselin přes aminokyseliny, nukleotidy, vitamíny až po peptidy a proteiny. Elektroforetickou pohyblivost vykazují dokonce i viry a bakterie [36; 37].

3.2.2.2 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace (cIEF) je považována za kapalinově-separační techniku s velmi vysokou rozlišovací schopností [38-40]. Amfolyty s molekulovou hmotností až 150 000, které při určité hodnotě pH mají celkový elektrický náboj nulový (mají tzv. izoelektrický bod pI, typicky bílkoviny, peptidy), jsou v modifikované kapiláře, ve které je vytvořen gradient pH, po vytvoření elektrického pole (300-700 V/cm) poměrně rychle (15-20 min) fokusovány do velmi úzkých zón. Pro úspěšné provedení cIEF je klíčové stabilní pokrytí stěny křemenné kapiláry, zamezující vzniku elektrické dvojvrstvy a následnému elektroosmotickému toku [41-44], vytvoření gradientu pH [45-47], jeho kalibrace pomocí pI markerů [48; 49] a případná mobilizace zón k pevnému detekčnímu bodu. Mezi výhody cIEF patří již zmiňovaná vysoká rozlišovací schopnost, která při optimálních podmínkách [50] činí až 0,01 pI [51]. Významným rysem izoelektrické fokusace je zakoncentrování analytů (200-300 násobně). cIEF je převážně realizována na komerčních kapilárních elektroforeografech, část autorů se soustředí také na provedení IEF na čipu, např. [52; 53]. Nižší opakovatelnost cIEF separací byla dlouhodobě považována za hlavní nedostatek metody. Zejména díky novým typům pokrytí povrchu a novým směsím amfolytů však byly nedávno reportovány výsledky s výjimečnou opakovatelností (RSD < 0,18 % [54]).

3.2.2.3 Izotachoforéza

Izotachoforéza (ITP) je variantou kapilární elektroforézy realizované v diskontinuálním elektrolytovém systému tvořeném vedoucím a koncovým elektrolytem s různou elektroforetickou pohyblivostí iontů [55]. Složení elektrolytů se volí tak, aby vedoucí a koncový elektrolyt s ohledem na pohyblivost iontů ve vzorku, obsahovaly ionty s nejvyšší resp. nejnižší pohyblivostí. Experimentální uspořádání je podobné jako u CZE. Do separační kapiláry naplněné vedoucím elektrolytem je nadávkována úzká zóna roztoku vzorku následovaná koncovým elektrolytem. Po vložení vysokého stejnosměrného napětí na elektrody se po určitém čase vytvoří rovnováha v podobě na sebe navazujících zón s ostrým rozhraním, tvořených vedoucím elektrolytem, jednotlivými kationty nebo anionty vzorku (dle módu ITP) a koncovým elektrolytem. Všechny zóny migrují stejnou rychlostí. Na jednotlivé kationty nebo anionty (dle módu ITP) v jednotlivých zónách totiž působí různě velká elektrostatická síla daná skokovou změnou potenciálu na rozhraní zón. K detekci zón je nejčastěji využíván vodivostní detektor. Záznam ITP má stupňovitý průběh, ve kterém výška a šířka stupně odpovídá kvalitě resp. kvantitě.

3.2.2.4 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza [56] je mód elektromigrační separace, kdy je elektroforéza realizována v prostředích vykazujících síťový efekt. V kapilární gelové elektroforéze se k vytvoření

takového prostředí využívají roztoky lineárních polymerů (polyakrylamid, dextran, deriváty celulózy atd.). Kapilární gelová elektroforéza je vhodná pro látky s malým rozdílem v elektroforetické pohyblivosti ale různou molekulovou hmotností. Síťový efekt způsobuje zpomalení migrace větších molekul, čímž dochází ke zvětšení rozdílu výsledných mobilit (a ke zvýšení rozlišení). Rozlišení velkých molekul DNA a polysacharidů lze ještě zvýšit při použití invertujícího elektrického pole (tzv. pulsed-field capillary electrophoresis [57]) kdy menší makromolekuly rychleji reagují na změny elektrického pole.

3.2.2.5 Elektrochromatografie

Elektrochromatografie (CEC) je mód provedení kapilární elektroforézy v chromatografické koloně. Díky retenčnímu mechanismu, ve kterém se může uplatnit jak rozdělování mezi mobilní a stacionární fázi, tak i elektroforetická pohyblivost, je možné využít kapilární elektrochromatografii pro simultánní separaci kyselých, bazických i neutrálních látek [58] a pro analýzu velmi široké škály organických i anorganických látek [59] z biochemické (aminokyseliny, peptidy a proteiny [60]), farmaceutické, environmentální (pesticidy, polyaromáty) i průmyslové oblasti (polymery).

Díky elektroforetické mobilizaci mobilní fáze, kdy se neprojevuje hydraulický odpor a plochému profilu elektroosmotického toku, je možné použít dlouhé kolony plněné menšími částicemi a dosáhnout 5-10 násobně vyšších účinností než ve standardní HPLC. Realizovatelným počtem teoretických pater 150 000 – 700 000 [61-63] se kapilární elektrochromatografie dostala na úroveň kapilární plynové chromatografie [64].

Při napětí 10-30 kV, aplikovaném na délku kolony, a vlivem vodivosti elektrolytů, prochází systémem elektrický proud, jehož důsledkem vzniká nezanedbatelné množství Joulova tepla. Pro jeho efektivní odvedení je kapilární provedení separačních kolon (i. d. 50 – 150 μm) nezbytné. Kromě kapilárních náplňových kolon plněných porézními i neporézními křemennými částicemi, se hojně využívají i organopolymerní monolity [65-67]. Poměrně časté je také využití open-tube kolon s různou modifikací povrchu vnitřní stěny kapiláry [68].

3.2.2.6 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie [69] (MEKC) je variantou kapilární elektroforézy, kdy je do pracovního elektrolytu přidána povrchově aktivní látka (například dodecyl síran sodný, SDS). Molekuly tenzidu se shlukují do specifických útvarů, tzv. micel [70], které vytváří tzv. pseudostacionární fázi. Tímto je do systému vnesen další retenční mechanismus, kterým je rozdílná distribuce látek mezi pseudostacionární fázi a vodnou fází elektrolytu. Na micely působí elektrostatická síla v opačném směru než je směr elektroosmotického toku proto je výsledný rozdíl v rychlosti migrace micel a rychlosti elektroosmotického toku dostatečně velký. Výhoda MEKC podobně jako u elektrochromatografie plyne z kombinace vysoké účinnosti kapilární elektroforézy dané plochým profilem elektroosmotického toku a možnosti současné chromatografické separace elektricky neutrálních látek.

3.3 Ortogonalita separačních mechanismů

Ve snaze vyřešit problém s nedostatečnou píkovou kapacitou jednorozměrných separací, byl navržen koncept vícerozměrné separace, na jehož základě byly vyvinuty dvou a vícerozměrné separační techniky, které v případě tzv. ortogonalita separačních mechanismů poskytují

celkovou píkovou kapacitu, která je teoreticky násobkem píkových kapacit jednotlivých separačních rozměrů [71], jak uvádí rovnice (7).

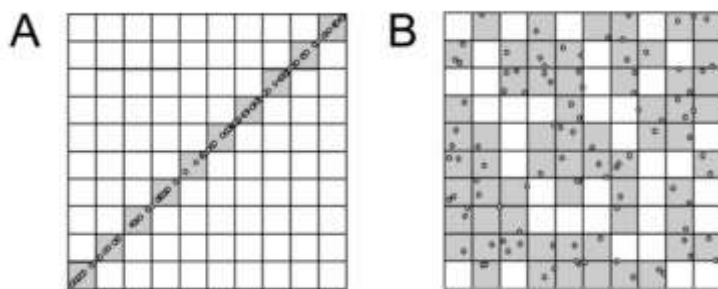
$$P_{nD} = P_1 \times P_2 \times \dots \times P_n \quad (7)$$

Za ortogonální se obecně označuje vícerozměrná separace, jejíž rozměry využívají separační mechanismy, jež jsou na sobě zcela nezávislé. To znamená, že distribuce separovaných zón v jednotlivých rozměrech vzájemně nekorelují. Stupeň ortogonalita ale ovlivňují i další faktory jako vlastnost separovaných látek a konkrétní podmínky vícerozměrné separace.

Dokonalá ortogonalita je pozorována jen výjimečně. I ve vysoce ortogonální vícerozměrné separaci je prakticky realizovaná píkovaná kapacita oproti teoretické hodnotě vypočtené dle rovnice (7) nižší. Tento jev vysvětluje statistická teorie překryvu zón, kterou formuloval Giddings a Davis [72; 73], a podle které je pravděpodobnost určitého překryvu některých separovaných zón poměrně vysoká.

3.3.1 Hodnocení ortogonalita

Pro posouzení ortogonalita a odhad praktické píkové kapacity byly prezentovány různé přístupy. Liu a kol. popsal geometrický přístup pro hodnocení n-rozměrného systém [74]. Ortogonalitu definuje pomocí korelační matice s korelačním koeficientem v intervalu 0 až 1 (dokonale ortogonální systém resp. absolutní korelace). Výpočet je založen na stanovení píkové kapacity v jednotlivých rozměrech a na stanovení úhlu rozevření, po zanesení experimentálních dat do matice nebo do pravoúhlé dvourozměrné souřadné soustavy, kde jednotlivé osy představují píkové kapacity individuálních separačních stupňů. Slonecker [75] využil navíc ještě nástroje teorie informace. K hodnocení normalizovaných dat vynesných do 2D mapy použil informační podobnost [76] a informační entropii. Oba zmíněné přístupy využívají značné množství parametrů k definici ortogonalita a nevyhovují situacím, kdy separované analyty tvoří ve 2D grafu klastry. Gilár a kol. proto navrhl nový geometrický přístup k charakterizaci ortogonalita dvourozměrné kapalínové chromatografie pro separaci peptidů [77]. Normalizovaná retenční data jsou zanesena do 2D grafu, který je následně rozdělen pravoúhlou sítí na konečný počet jednotek („binů“), jejichž množství odpovídá počtu retenčních dat, přičemž osa Y je rozdělena dle píkové kapacity (nebo počtu frakcí) v prvním separačním rozměru, viz **obrázek 2**. Každý „bin“ reprezentuje normalizovanou plochu jednoho píku. Plochy všech jednotek obsahující retenční data jsou následně sečteny, přičemž relativní pokrytí plochy indikuje stupeň ortogonalita (větší pokrytí => více ortogonální systém).



Obrázek 2 – Geometrický koncept ortogonality; A – 10% pokrytí reprezentuje 0% ortogonalitu, B – 63 % pokrytí reprezentuje 100% ortogonalitu. Použito z Ref. [77] se souhlasem vydavatele.

Z teorie překryvu zón [73] plyne, že i při vysokém počtu látek v separované směsi bude plocha 2D záznamu pokryta nejvíce do 63 % (při ortogonalitě 1). Ortogonalitu dvourozměrné separace pak lze spočítat dle rovnice (8), kde $\sum bin$ je počet „binů“ obsahujících retenční data a P_{max} je celková píková kapacita (suma všech „binů“).

$$O = \frac{\sum bin - \sqrt{P_{max}}}{0,63 P_{max}} \quad (8)$$

Watson a Davis [78] identifikovali některé nedostatky rovnice (8), projevující se zejména při nízkých hodnotách P_{max} a pro stejnou píkovou kapacitu P v jednotlivých separačních rozměrech upravili rovnici (8) do podoby rovnice (9).

$$O = \frac{\sum bin - P}{0,63 P^2 - P} \quad (9)$$

Výše popsaný přístup je sice jednoduchý, ale nehodnotí distribuci jednotlivých „binů“ a nepopisuje korelaci mezi dvěma separačními mechanismy. Pourhaghighi a kol. se proto vrátil k teorii informace [79] a ortogonalitu vyjádřil pomocí rovnice (10) jako poměr entropie z druhé dimenze podmíněné první dimenzí $H(Y|X)$ a informační entropie dat z druhé dimenze $H(Y)$.

$$O = \frac{H(Y|X)}{H(Y)} \quad (10)$$

Dle teorie informace je entropie mírou nejistoty náhodné proměnné [80]. Entropie dat z druhé dimenze $H(Y)$ [81] je tedy dána vztahem (9), kde $p(y)$ je pravděpodobnost výskytu hodnoty y v souboru dat z druhé dimenze Y .

$$H(Y) = - \sum_{y \in Y} p(y) \log_2 p(y) \quad (11)$$

Vztah pro výpočet informační entropie dvojice proměnných je analogický

$$H(X, Y) = - \sum_{x \in X} \sum_{y \in Y} p(x, y) \log_2 p(x, y) = H(Y|X) + H(X) \quad (12)$$

V dokonale ortogonálním systému pak platí $H(Y|X) = H(Y)$ zatímco $H(Y|X) = 0$ indikuje totální korelaci.

Na základě znalosti ortogonalit dvou separačních mechanismů pak lze pomocí rovnice (13) odhadnout praktickou píkovou kapacitu dvourozměrné separace P_{2D} .

$$P_{2D} = O(P_1 \cdot P_2) \quad (13)$$

3.4 Provedení vícerozměrných separací

3.4.1 Separace v prostoru vs. separace v čase

Jednorozměrné separace lze realizovat jak v prostoru, tak i v čase. Ve dvourozměrném uspořádání lze tedy uvažovat až čtyři kombinace (prostor – prostor, čas – čas, prostor – čas, čas – prostor) [82].

První vícerozměrné kapalinové separace využívaly planární separační techniky, jako papírová chromatografie [83] či elektroforéza [84], které poskytují možnost provádět separaci látek v definovaném prostoru postupně ve dvou osách (rozměrech). Separace látek je zde realizována v planárním loži. Toto lože představuje například porézní tenká vrstva kolonového sorbentu, monolitu nebo vrstva gelu. Vzorek je nejčastěji nanesen na okraj lože. Poté jsou navozeny vhodné separační podmínky a analyty začínají v loži migrovat. Separace je přerušena dřív, než nejrychleji migrující zóna dosáhne protějšího okraje lože. Po navození jiných podmínek jsou látky separovány s jinou selektivitou ve směru kolmém na směr první migrace. Po ukončení separace je detekována pozice zón (často vizualizovaných pomocí vhodného činidla) v prostoru separačního lože.

V případě že jsou látky postupně detekovány na výstupu separační kolony (kapalinová chromatografie), nebo postupně migrují detekčním úsekem separační kapiláry (kapilární elektroforéza), jedná se o separaci v čase.

Vícerozměrné separace v planárním uspořádání nejsou tak náročné na instrumentální vybavení. Většina úkonů (příprava gelů, aplikace vzorku, detekce) je realizována manuálně. Toto klade zvýšené požadavky na zručnost operátora a celý proces může být časově velmi náročný. Lze ale konstatovat, že oba přístupy mají své výhody. U separací prováděných na kolonách či v separačních kapilárách se uvádí snadnější automatizace, možnost on-line spojení dvou dimenzí a možnost on-line spojení s hmotnostní spektrometrií. Nespornou výhodou dvourozměrné separace v prostoru je ale skutečnost, že všechny zóny vzniklé separací v první dimenzi jsou dále ve druhé dimenzi separovány souběžně a ne postupně jako je tomu u separací na kolonách či v separačních kapilárách. To umožňuje značnou úsporu času a dle některých odborníků (např. P. Schoenmakers a kol. [85]) je toto dokonce jediná reálná cesta pro realizaci vysoko produktivní vícerozměrné separace (např. trojrozměrné kapalinové chromatografie).

3.4.2 Off-line vs. on-line

Vícerozměrná separace může být realizována off-line nebo on-line. V off-line spojení jsou frakce z prvního rozměru manuálně nebo automaticky sbírány, případně uschovány a následně individuálně dávkovány do dalšího separačního stupně. Off-line uspořádání je instrumentálně jednodušší. Spojení totiž nevyžaduje žádné specializované rozhraní (interface). Výhodou tohoto přístupu je možnost danou frakci dodatečně upravit, zakoncentrovat, nebo převést do jiného rozpouštědla v případě nemísitelnosti či jiné nekompatibility rozpouštědel použitých

v jednotlivých rozměrech. Rovněž zde neexistuje teoretické omezení pro dobu separace v druhém rozměru. Za nevýhody off-line přístupu lze považovat obtížnou automatizaci a horší opakovatelnost separačního procesu, riziko kontaminace frakce během manipulace s ní a zejména časovou náročnost.

V on-line spojení není tok média přerušen a frakce jsou z prvního rozměru prostřednictvím spojovacího rozhraní okamžitě dávkovány do rozměru druhého. On-line spojení je tak rychlejší a výsledky vykazují lepší opakovatelnost.

Automatizované uspořádání, ve kterém je tok médií prvním a druhým rozměrem periodicky střídavě přerušován bývá označován jako stop-start [86], nebo také stop-and-go [82]. Část zóny separované v prvním rozměru je zde transportována do druhého rozměru. Tok média prvním rozměrem je zastaven a je vytvořen tok média druhým rozměrem. Tento proces se pak periodicky opakuje.

3.4.3 Heart-cut vs. komprehensivní

Podle toho, jaká část média z prvního rozměru vstupuje do druhého rozměru, se rozlišují dva postupy provedení dvourozměrné separace – heart-cut a komprehensivní.

V heart-cut přístupu pokračuje do druhého rozměru jenom část rozděleného vzorku. Vzorek je zde prvně separován jednorozměrně a dle potřeby jsou zvoleny určité úseky v získaném záznamu. Separace je pak zopakována a vybrané frakce jsou zachyceny, nebo přímo dávkovány do druhé dimenze. Dané frakce na sebe nemusí nutně navazovat a mohou obsahovat i více separovaných zón. Tento přístup je výhodný pro jednodušší směsi. Lze jej využít například pro kontrolu čistoty píku [86] (ověření, že pík reprezentuje pouze jednu komponentu).

V komprehensivní vícerozměrné separaci je první separační rozměr rozdělen na navazující frakce a do druhého rozměru jsou převedeny všechny frakce. Objem frakce dávkované do druhého rozměru je obvykle menší než objem zóny vystupující z prvního rozměru. Pokud je každý pík takto rozdělen na dostatečné množství frakcí, lze pro dvourozměrný systém využít pouze jeden detektor, a záznam separace v prvním rozměru zpětně rekonstruovat. Murphy a kol. [87] uvádí požadavek na alespoň 4 frakce každého píku.

Nový postup provedení rychlé komprehensivní vícerozměrné kapalinové chromatografie založený na dodávání mobilních fází v rychlých pulzech (až 50 Hz) a zpracování signálu Fourierovou transformací teoreticky popsal Trudgett a Guiochon [88]. Autoři uvažují dvě uspořádání. V prvním jsou látky detekovány přímo na druhé separační koloně a mobilní fáze je dodávána v pulzech 30 Hz (střídavě). Vlivem retence látky detektor zaznamenává změnu frekvence, která odpovídá retenčnímu času ve druhém rozměru. Retenční čas látky z prvního rozměru je pak rozdíl mezi celkovým zaznamenaným časem a retenčním časem pro druhý rozměr. Druhé uspořádání předpokládá detekci za druhou kolonou. Mobilní fáze je dodávána v pulzech s měnící se frekvencí. Detekovaná frekvence pak odpovídá retenčnímu času látky v prvním rozměru. Dle autorů lze tuto techniku aplikovat pro n-rozměrné separace a za hlavní výhody považují potenciální rychlost a možnost dodatečného rozlišení látek, které nebyly separovány, na základě studia frekvenčního vzorce signálu (potenciální zvýšení pikové kapacity).

3.5 Kompatibilita kapalných fází

Při vývoji dvourozměrné kapalinové separace je nutno vzít v úvahu vlastnosti kapalných médií v jednotlivých uvažovaných separačních rozměrech. V off-line uspořádání může být nekompatibilní mobilní fáze dostatečně zředěna nebo odpařena a nahrazena jiným rozpouštědlem. V on-line provedení dvourozměrné separace je ale kompatibilita kapalných fází velmi důležitá. V úvahu je nutno brát jejich vzájemnou mísitelnost, rozpustnost analytů a případných aditiv. Velký rozdíl ve viskozitě může také způsobit anomální profil toku mobilní fáze náplní kolony, tzv. viscous fingering [89], vedoucí k rozšíření zóny. Vybrané vlastnosti nejběžnějších rozpouštědel jsou shrnuty v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 – Vybrané vlastnosti nejběžnějších rozpouštědel a jejich vzájemná mísitelnost

Rozpouštědlo	Index polaritý	Index lomu 20 °C	UV (nm) Cutoff	Bod varu (°C)	Viskozita (mPa.s)	Rozpustnost ve vodě, 20 °C (%w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
n-Butanol	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
Butyl Acetate	3.9	1.399	215	118	2.08	7.81
Carbon Tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane ¹	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane ²	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	268	155	0.92	100
Dimethyl Sulfoxide ³	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
Ethyl Acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
Di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0033
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether ⁴	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone ⁵	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.356	200	36	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.384	210	97	2.27	100
iso-Propanol ⁶	3.9	1.377	210	82	2.20	100
Di-iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.051
Tichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018

Nemísitelné
 Mísitelné (alespoň částečně)

3.6 Dvourozměrná separace v kapalných fázích

3.6.1 2D-HPLC

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC) [90] je jednoznačně nejvyžívanější dvourozměrná kolonová kapalinově-separační technika. Jedním z důvodů je robustnost, relativně snadná automatizace a vysoká úroveň současné kapalinově-chromatografické instrumentace. Tato je vyvíjená již poměrně dlouho a v současnosti jsou komerčně dostupné pumpy schopny dodávat mobilní fáze při tlacích až 120 MPa a neúčinnější separační kolony (až 300 000 N/m) jsou plněny celoporézními nebo povrchově porézními kulovitými částicemi o průměru menším než 2 μm.

Hlavním důvodem pro rozšíření 2D-LC je však skutečnost, že kapalinová chromatografie nabízí hned několik módů, jejichž separační mechanismy vykazují určitý stupeň ortogonalit.

Tabulka 2 uvádí ortogonalitu několika párů chromatografických kolon uvažovaných pro

separaci peptidů. Je patrné, že dokonalou ortogonalitu neposkytuje žádná kombinace. Nejvyšší stupeň ortogonalit vykazují dvojice HILIC – reverzní fáze (HILIC×RPLC), iontová výměna – reverzní fáze (IEC×RPLC) a gelová permeace – reverzní fáze (GPC×RPLC). V určitých případech lze spojit i dvě reverzní fáze [91] a využít rozdílnou selektivitu při různém pH [92], různém složení mobilní fáze nebo při spojení dvou různých reverzních fází [93]. Částečnou ortogonalitu vykazuje také kombinace polyethylenglykolová – reverzní stacionární fáze (PEG×RP) [94]. Při použití bezvodé mobilní fáze lze pro separaci esterů mastných kyselin či triacylglycerolů využít ortogonalitu spojení tzv. silver-ion a reverzní fáze (AgNP×RPLC) [95]. Kapalně fáze v těchto kombinacích jsou vzájemně kompatibilní. S výjimkou HILIC×RPLC (příp. RPLC×RPLC) mají mobilní fáze použité v prvním separačním stupni nízkou eluční sílu ve druhém rozměru, díky čemu je možné analyty na koloně zakoncentrovat. Při spojení HILIC×RPLC je pak nutné frakce naředit nebo volit velmi malý objem nástřiku (zředění na koloně).

Tabulka 2 – Ortogonalita různých fází (%) pro separaci peptidů [77].

	Atlantis C18, pH 2,6	XTerra C18, pH 10	Fenylová fáze, pH 2,6	PFP fáze, pH 3,25	HILIC, pH 4,5	Gel. permeace pH 4,5	Katex, pH 3,25
Atlantis C18, pH 2,6	0	53	13	31	69	58	54
XTerra C18, pH 10	53	0	56	49	59	60	55
Fenylová fáze, pH 2,6	13	56	0	32	69	54	55
PFP fáze, pH 3,25	31	49	32	0	65	56	54
HILIC, pH 4,5	69	59	69	65	0	52	54
Gel. permeace, pH 4,5	58	60	54	56	52	0	49
Katex, pH 3,25	54	55	55	54	54	49	0

Dvourozměrná kapalinová chromatografie je realizována zejména on-line, v heart-cut (LC-LC) i komprehensivním módu (LC×LC) [82]. Komprehensivní dvourozměrná kapalinová chromatografie [96; 97] nabývá díky potenciálně nejvyšší píkovej kapacitě na významu a 2D-LC je v tomto módu realizována stále častěji.

Standardním rozhraním pro spojení dvou LC rozměrů je 10, případně 8 cestný dvoupolohový ventil se dvěma identickými dávkovacími smyčkami. Výstupný tok mobilní fáze z prvního rozměru plní první smyčku, zatímco tok mobilní fáze z druhé pumpy vytlačuje objem druhé smyčky na separační kolonu druhého rozměru. V případě 8 cestného ventilu je směr toku plnění a vyprázdnění smyčky shodný zatímco u konfigurace s 10 cestným ventilem jsou smyčky většinou plněné v jednom a vyprázdněné v opačném směru. Dávkovací smyčky zde mohou být nahrazeny také krátkými záchytnými kolonami, kde lze za vhodných podmínek odebranou frakci zakoncentrovat. Poměrně novým přístupem je realizace prostorové 2D-LC separace na specializovaném mikrofluidním čipu [98].

V tradiční 2D-LC se v prvním separačním rozměru využívá převážně delších kolon s malým vnitřním průměrem (< 1 mm) a nízkým průtokem mobilní fáze (<0,1 ml/min). Separace v prvním rozměru je spíše pomalejší (desítky minut až hodiny). V případě gradientové eluce se

pro maximální píkovou kapacitu volí pozvolný gradient mobilní fáze. V druhém rozměru je naopak potřeba provádět velmi rychlé analýzy (< 1 min). Separační kolona má zde proto větší vnitřní průměr (např. 4,6 mm), výrazně kratší délku, mobilní fáze kolonou protéká při značně vyšším průtoku a jsou voleny krátké časy gradientů.

3.6.2 HPLC-HPCE

Spojení vysokoúčinných kapilárních elektromigračních technik s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC-HPCE nebo HPCE-HPLC) představuje možnost realizace dvourozměrné separace s extrémně vysokou píkovou kapacitou, díky vysokému stupni ortogonalita separačních mechanismů. Z povahy obou separačních technik však plynou některá úskalí, zejména při realizaci on-line spojení. Problémem je například odvedení vysokého napětí z elektromigračního stupně, tzv. *decoupling*, a dávkování vzorku do druhého rozměru. Univerzální komerční řešení pro spojení HPCE-HPLC či HPLC-HPCE v současnosti neexistuje. Tyto dvourozměrné separace jsou tedy realizovány převážně off-line (např. [99]), případně s využitím on-line experimentálních konfigurací uzpůsobených ke konkrétním účelům.

První automatizovanou komprehensivní HPLC×CZE separaci realizoval Bushey a Jorgenson [100]. On-line spojení bylo zajištěno pomocí uzemněného šesticestného dávkovacího ventilu umístěného mezi nádobkami s elektrolytem. Využití dávkovacího ventilu jako spojovacího rozhraní pro HPLC-CZE však není zejména z důvodu dodatečného rozmývání zón a potřeby dávkování velmi malých objemů do CZE nejvýhodnější. Velmi efektivní řešení zde představuje opticky řízené dávkování (tzv. *optically gated electrophoresis* [101]), kdy širší zóna vzorku obsahující fluorescenčně značené analyty je elektrokineticky dávkována do separační kapiláry a v malém bodě ozařována laserem. Energie laseru rozkládá fluorofor a fluorescenční detektor nic nezaznamenává. Krátkým vypnutím či zastíněním laseru je pak vytvořena velmi úzká zóna obsahující analyty s aktivním fluoroforem. Jelikož s využitím standardních analytických kolon jsou objemy separovaných zón relativně velké, je pro on-line spojení s CZE výhodné použití kapilárních HPLC kolon [102].

On-line spojení cIEF-HPLC je také nejčastěji realizováno prostřednictvím dávkovacího ventilu [103]. Izelektrická fokusace probíhá ve dvou částech kapiláry spojených dávkovacím ventilem. Po zafokusování jsou separované zóny mobilizovány vytvořením rozdílu tlaku, například rozdílem ve výšce hladin elektrolytů v rezervoárech. Jednotlivé frakce jsou skrze dávkovací ventil postupně zařazovány do toku mobilní fáze a separovány na kapilární mikrokoloně. V pozdější práci [104] byl mezi dávkovací ventil a kapilární nanokolonu zařazen systém záchytných kolon na kterých byl po ukončení fokusace obsah kapiláry rovnoměrně rozdělen a zakoncentrován do 12 frakcí. Konfigurace byla použita pro separaci rozpustné frakce lyzátu kvasinek a s pomocí hmotnostního spektrometru bylo identifikováno téměř 1200 proteinů. Nevýhodou konfigurace, kdy je dávkovací ventil umístěn mezi elektrodami je u cIEF skutečnost, že část analytů může díky nepřítomnosti elektroosmotického toku migrovat přes dávkovací smyčku opačným směrem a nemusí být přenesena do druhého rozměru. Zhou a Johnston proto zkonstruovali celu, ve které je obsah separační kapiláry oddělen od katolytu a katody mikro dialyzační membránou [105]. Jedná se o tzv. dekapler, prvek sloužící pro odvedení elektrického proudu mimo kapiláru, přičemž analyty nemůžou skrze membránu proniknout. Cela byla instalována do T-spojky spojující separační kapiláru a krátkou kapiláru vedoucí k dávkovacímu ventilu. Dávkovací ventil byl již tedy umístěn mimo migrační dráhu a

izolován od vysokého napětí. Mikrodialyzační membránu ve formě trubičky použil také Sun a Wang [106; 107]. Jejich jednoduchý dekapler vznikl naleptáním konců křemenných kapilár 40% kyselinou fluorovodíkovou na požadovaný průměr, a jejich vsunutím do membránové trubičky. Spojení bylo zajištěno lepidlem na bázi epoxydové pryskyřice a celek byl mechanicky zafixován v upravené centrifugační vialce, která plní také funkci rezervoáru elektrolytu. Zajímavou realizaci dekapleru dále popsal Li a kol. [108]. Z křemenné kapiláry byla odstraněna ochranná polyimidová vrstva a obnažené stěna byla jemně naříznuta. Obnažené místo bylo následně z obou konců přilepeno k podložce. Takto fixovaná část kapiláry byla vhodným nástrojem mírně ohnuta, čím vznikla v místě zářezu nepatrná prasklina. Dialyzační membrána pak byla v tomto bodě vytvořena aplikací malého množství 12 % acetonového roztoku acetátu celulózy.

3.6.3 2D-HPCE

Dvojměrné kapalinové separace s velmi vysokou píkovou kapacitou lze uvažovat při vhodném spojení některých módů vysokoúčinné kapilární elektroforézy. Jako výhodu takového spojení lze kromě vysoké píkové kapacity a rychlých separací uvažovat i potenciál pro levnou a miniaturní instrumentaci, jelikož prakticky veškerou manipulaci s kapalnými fázemi lze realizovat elektrokineticky, bez nutnosti použití hydraulických pump.

2D separační systém založený na spojení dvou neúčinnějších kapalinově-separačních technik, kapilární izoelektrické fokusace a tlakované kapilární elektrochromatografie (cIEF-CEC), popsal Wei a kol. [109]. Separační kapilára je zde spojena s kapilární chromatografickou kolonou prostřednictvím šesticestného dávkovacího ventilu a děliče toku. Autoři v případě komprehensivního uspořádání uvažují teoretickou píkovou kapacitu až 24 000.

Ramsey a kol. [110] dále vytvořil na skleněném čipu kanálovou strukturu dovolující komprehensivní separaci vzorku na principu micelární elektrokinetické chromatografie v prvním rozměru a pomocí kapilární zónové elektroforézy v rozměru druhém (MEKC×CZE). Píková kapacita 15 minutové separace peptidů byla téměř 4200. Dvourozměrnou CZE-MEKC separaci kationtových sloučenin s on-line úpravou a zakoncentrováním vzorku pomocí ITP [111; 112] pak realizoval Zhang a kol. [113].

Off-line spojení preparativní izoelektrické fokusace (Off-gel IEF) a elektroforézy na čipu bylo nedávno použito i k posouzení obsahu peptidů v mořské vodě [114].

Dvourozměrná kapilární elektroforéza (2D-HPCE) není ve srovnání například s dvourozměrnou elektroforézou na polyakrylamidových gelech (2D-PAGE) realizována často. V budoucnu však lze předpokládat nárůst relevantních aplikací, zejména z důvodu snahy o automatizaci a vytvoření on-line spojení s hmotnostní spektrometrií.

3.7 Trojrozměrné separace v kapalných fázích

Zejména při zkoumání biochemických pochodů a molekulární biologie jsou analyzované vzorky nesmírně složité. V případě takto složitých směsí, neposkytuje ani dvourozměrná komprehensivní separace dostatek píkové kapacity pro rozlišení složek. Moore a Jorgenson [115] separovali peptidy v komprehensivním 3D systému spojujícím gelovou permeační a reverzní fázovou chromatografii s velmi rychlou (2 vteřinovou) kapilární elektroforetickou separací. Za jediný použitelný přístup, který může v současnosti poskytnout extrémně vysokou

píkovou kapacitu (stovky tisíc) však Guiochon označil trojrozměrnou kapalinovou chromatografií [82], protože poskytuje dostatek kombinací (alespoň částečně) nezávislých separačních mechanismů (GPC, RPLC, NPLC, IEC) a její automatizace je na velmi vysoké úrovni. Optimální parametry pro online komprehensivní trojrozměrnou kapalinovou chromatografií (LC×LC×LC) uvažoval Schoenmakers [116]. Z **tabulky 3** je patrné, že splnění požadavků kladených na separaci ve třetím rozměru (velmi rychlá separace, extrémní spotřeba mobilní fáze) je velkou výzvou i když vysoká spotřeba mobilní fáze by mohla být částečně snížena s využitím kapilárních nano a mikrokolon.

Realizace komprehensivní trojrozměrné separace tedy není jednoduchá. Separace ve třetím rozměru musí být extrémně rychlá. S přidáním rozměrem navíc roste naředění vzorku. Moore uvádí, že vysoká píková kapacita v jeho GPC×RPLC×CZE systému je podmíněna vysokou koncentrací látek v analytickém vzorku, co v případě nedostatku vzorku činí problém. Schoenmakers dále konstatuje, že použití LC×LC-MS se v současnosti zdá být přijatelnějším řešením v porovnání s vynaloženým úsilím nutným pro realizaci LC×LC×LC. V případě potřeby je navíc možné dvourozměrnou separaci podpořit předřazením frakcionace před LC×LC-MS analýzou.

Tabulka 3 – Optimální parametry LC×LC×LC dle [116].

	První dimenze	Druhá dimenze	Třetí dimenze
Doba analýzy	540 min	29 s	0,5 s
Vnitřní průměr kolony (mm)	1	4,6	7,8
Objem nástřiku (μl)	5	25	35
Průtok (ml/min)	0,015	1,33	29,15
Velikost částic (μm)	5	2	2
Délka kolony (mm)	1 200	15	2
Počet teoretických pater	116 000	2 500	170
Píková kapacita	213 (gradient)	18 (izokratika)	6 (izokratika)
Zředovací faktor (k=3)	4,5	1,5	1,5

3.8 Hmotnostní spektrometrie jako další rozměr

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika založena na separaci a detekci iontů dle velikosti poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Látky, které jsou podrobeny hmotnostně spektrometrické analýze, jsou ionizovány v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Vzniklé ionty jsou v hmotnostních analyzátoch různé konstrukce (kvadrupól, sférická či lineární iontová past, orbitrap, cyklotron či sektorové analyzátoy) následně vystaveny účinkům elektrického, či magnetického pole nebo je iontům dodána stejná kinetická energie a je sledována doba jejich letu (TOF). Ionty o různém poměru m/z se v jednotlivých analyzátoch pohybují po různých trajektoriích (kvadrupól, iontové pasti), vykazují různou dobu letu (TOF) nebo odlišnou rezonanční frekvenci (orbitrap, ICR). Výsledkem analýzy je tedy hmotnostní spektrum, které znázorňuje intenzitu signálu detektoru v závislosti na m/z .

Obrovský význam MS spočívá v možnostech selektivní detekce látek poskytujících ionty o určitém m/z nebo naopak možnostech identifikace látek na základě detekovaných m/z .

MS analýza tedy vyžaduje přítomnost studovaných látek ve formě iontů, přirozeně elektricky neutrální molekuly je nutné ionizovat. Aby ionty nezanikli kolizí s jinými molekulami, je vyžadováno vakuum.

Ve snaze spojit kapalinově-separačních techniky s MS museli být vyřešeny dva základní problémy; Nekompatibilita mobilních fází s MS a nekompatibilita některých analytů s tradičními ionizačními technikami MS. On-line spojení muselo být realizováno prostřednictvím vhodného rozhraní a/nebo s využitím nových typů iontových zdrojů. V průběhu vývoje bylo navrženo značné množství řešení [117]. Většího rozšíření však zaznamenaly pouze některé z nich a v současnosti se ve spojení s kapalinovými separačními metodami využívá téměř výhradně elektrosprej, případně chemická či fotoionizace za atmosférického tlaku [118].

3.8.1 Ionizační techniky pro spojení s kapalinovými separacemi

Elektrosprej [119] (ESI) je rozhraní, ve kterém je tok kapalně fáze obsahující ionty za atmosférického tlaku zmlžován v elektrickém poli, generovaném vysokým napětím mezi přívodnou kapilárou a vstupem do hmotnostního analyzátoru. V kapiláře dochází k redistribuci náboje a vlivem elektrostatické síly jsou z kapiláry emitovány malé nabitě kapky. Dále dochází k odpařování kapalně fáze, desolvataci molekul a zahušťování náboje v kapičkách. Když odpudivé elektrostatické síly překonají síly soudržné, dochází k tzv. coulombické explozi, za vzniku velkého množství menších kapek. Proces se opakuje, až dojde k uvolnění molekulových iontů nebo iontů molekulových aduktů (s ionty H^+ , Na^+ , K^+ apod.). ESI je vhodný pro polárnější látky v intervalu molekulových hmotností přibližně 100 – 100 000 (biopolymery, syntetické polymery, iontové organické a organokovové sloučeniny).

Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku [120] (APCI) je kapalná fáze pomocí proudu plynu zmlžována ve vyhřívané části zdroje. Ve zdroji se nachází jehlová elektroda, na kterou je vloženo vysoké napětí a dochází ke koronovému výboji. Ve výboji dochází k ionizaci molekul zmlžovacího a sušícího plynu a molekul kapalně fáze. Vzniká tak na ionty bohaté prostředí, kde je velká pravděpodobnost srážky neutrální molekuly analytu s některou nabitou částicí, při níž dojde k vzniku aduktového molekulového iontu. APCI je vhodná pro méně polární látky s molekulovou hmotností přibližně 30 – 1000. Fotoionizace za atmosférického tlaku [121] (APPI) využívá obdobné uspořádání jako APCI, místo koronového výboje je k ionizaci využito UV záření. Využití je obdobné jako u APCI. S APPI lze navíc ionizovat i nepolární sloučeniny.

Specifickým případem ionizace je desorpce laserem s asistencí matrice, tzv. MALDI [122]. Tok kapalně fáze je deponován na vhodný terčik buď kontinuálně (proužek) nebo v diskretních mikro-fracích (spoty). Vrstvička matrice (převážně jednodušší nenasycené organické kyseliny) je na terčiku vytvořena nanesením jejího roztoku, nebo je roztok matrice míchán přímo s tokem kapalně fáze. Kapalná fáze je odpařena a části terčiku jsou ve vakuové komoře postupně ozařovány laserem. Dochází k laserové ablaci (uvolnění malého množství materiálu z povrchu) a k dalším procesem spojených s přenosem náboje a vedoucím k ionizaci analytů [123]. MALDI je převážně kombinována s TOF analyzátozem a spojení s kapalinovou separací je realizováno nejčastěji off-line. Výhodami jsou nízké detekční limity a možnost archivace terčiků a opakování MS analýzy. MALDI je také méně citlivá na složení mobilní fáze (dobrá tolerance vůči solím). Nevýhodami použití MALDI jsou rozšíření separovaných zón při

depozici na terčik a obtížnější kvantifikace. Aplikace MALDI-TOF MS závisí na použité matici, nejčastěji se využívá pro analýzu peptidů a proteinů. Matrice pro nízkomolekulové látky (oligosacharidy, nukleotidy, aminokyseliny) jsou ale rovněž dostupné.

3.8.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Při využití ESI, APCI, APPI nebo MALDI vznikají převážně stabilní molekulové ionty nebo adukty a nedochází k významné fragmentaci. Získané hmotnostní spektrum látky je obvykle jednoduché a kromě molekulové hmotnosti většinou neposkytuje dostatek informací pro určení struktury (identifikaci). V tandemové hmotnostní spektrometrii [124] (MS/MS) je vybrán některý iont a srážkami s molekulami plynu v kolizní cele získává dodatečnou energii, která vyvolá jeho fragmentaci. Následně je zaznamenáno hmotnostní spektrum fragmentů (jedná se o tzv. sken produktových iontů). MS/MS lze realizovat s využitím trojitého kvadrupólu, kdy prostřední kvadrupól propouští ionty a slouží jako kolizní cela, nebo s využitím jednoho analyzátorů schopného uchovávat ionty (typicky ICR, IT).

3.9 Aplikace vícerozměrných separací v kapalně fázi

Vícerozměrné kapalinové separace našly uplatnění v různých oblastech. Bezpochyby nejvýznamnější je jejich aplikace v oboru biochemických studií.

Biochemické obory, jako proteomika [125] či metabolomika [126], se v současnosti rozvíjejí velmi rychle. Důvodem je snaha o detailní popis mechanismů probíhajících v buňkách, tkáních i celých organizmech, protože jejich pochopení je klíčové pro objasnění nejrůznějších nemocí včetně rakoviny. Rozvoj těchto oborů je ovšem podmíněn právě pokroky, které byli zaznamenány při vývoji dvourozměrných kapalinových separací. Dvourozměrné kapalinové separace ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, představují pro biochemiky velmi účinný nástroj pro separaci extrémně komplexních směsí biomolekul v širokém spektru molekulových hmotností a v širokém intervalu koncentrací. Nejvyužívanější technikou pro separaci proteinů a peptidů byla zpočátku dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE). Současná praxe ale zvyšuje nároky na počet analyzovaných vzorků a na automatizaci procesu. Robustní spojení separace s hmotnostní spektrometrií je pro identifikaci biomolekul rovněž nezbytné. S využitím 2D-PAGE již nelze úplně splnit všechny tyto požadavky a proto byly hledány alternativní postupy. Významným analytickým nástrojem v proteomických studiích se tak v současnosti stává dvourozměrná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií [127-131]. Výrazný potenciál dalších dvojrozměrných kapalinových separací, zejména spojení HPLC-HPCE [127] a cIEF-HPLC [106-108] byl také demonstrován.

Vysoká separační schopnost vícerozměrných kapalinových separací se ukázala být výhodná také pro další oblasti jako farmacie, analýza směsí polymerů, potravin a analýza složek životního prostředí. V těchto oblastech je využívána zejména dvourozměrná kapalinová chromatografie. Komprehensivní 2D-LC našla své uplatnění například v analýze potravin [8]. Analyzovány jsou zejména fenoly, flavonoidy a fenolické antioxidanty v pivě a víně [132-136], triacylglyceroly v rostlinných olejích [95; 137; 138], či karotenoidy v esenciálních olejích a ovocných šťávách [139; 140].

Ve farmaceutické výrobě [96] lze dvourozměrnou kapalinovou chromatografií využít například k hodnocení přítomnosti koeluujících látek v píku [86], jako alternativu k snímání UV-Vis či

hmotnostních spekter. 2D-LC lze také použít pro velmi selektivní stanovení nečistot v produktech farmaceutické výroby [141]. Spojení reverzní fáze s gelovou permeací bylo také využito pro analýzu složité směsi kopolymerů [142]. Pro aplikace v chirálních separacích má velký potenciál achirální-chirální 2D-LC [143].

Kvantitativní stanovení velké části polutantů (polyaromatických uhlovodíků (PAHs), polychlorovaných bifenyků (PCBs), polychlorovaných dioxinů (PCDD), polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF), chlorovaných a organofosforových pesticidů, toxafenů atd.) ve složkách životního prostředí je doménou zejména jednorozměrné a dvourozměrné plynové chromatografie spojené s hmotností spektrometrií [144]. V případě využití kapalinových separací pro stanovení teplotně labilních a málo těkavých polutantů jako jsou hormony, endokrinní disruptory či rezidua léčiv je nejčastěji reportováno zejména využití spojení LC-MS a LC-MS/MS [145-148]. Pro cílenou analýzu je toto spojení často dostačující, oproti dvourozměrné separaci je výhodnější nižší zředovací faktor.

Díky jednoduchému provedení, je ještě stále hojně využívána dvourozměrná tenkovrstvá chromatografie (2D-TLC). Přehled jejího využití při separaci netěkavých pesticidů uvádí Tuzimsky [149]. Motivace k využití dvourozměrné kapalinové separace může plynout například i z požadavku přímého stanovení v případě, že GC×GC analýza vyžaduje derivatizaci analytů. Toto byl důvod, proč Mas a kol. využil k přímému stanovení 8 metabolitů polybromovaných difenyléterů (hydroxylované PBDE) v čistírenském kalu, půdě a rybí svalovině metodu založenou na LC×LC-MS [150].

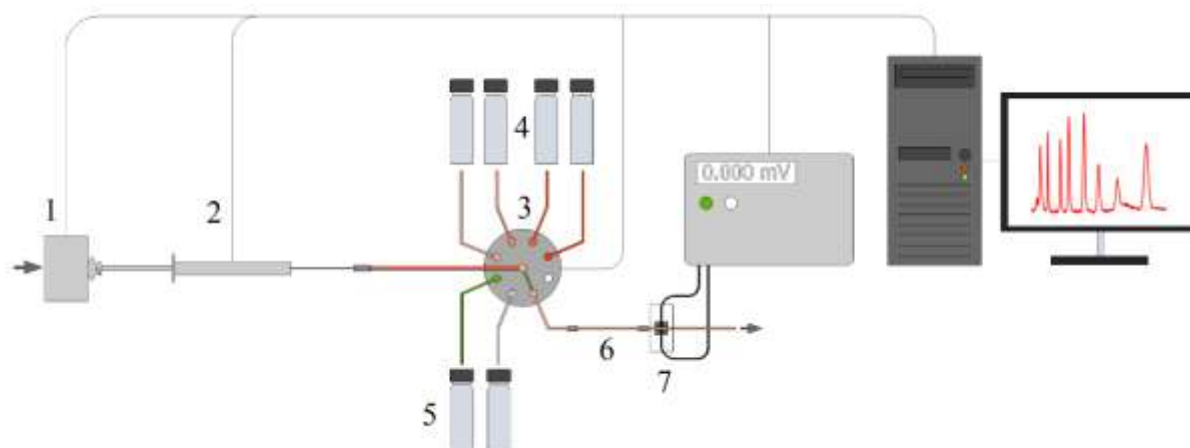
Díky neustálému vývoji lze v oblasti vícerozměrných kapalinových separací v budoucnu očekávat příchod cenově přijatelné instrumentace, která bude rozšířena i do dalších oblastí za účelem zvýšení spolehlivosti a výkonnosti analytických postupů založených na kapalinově-separačních metodách.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

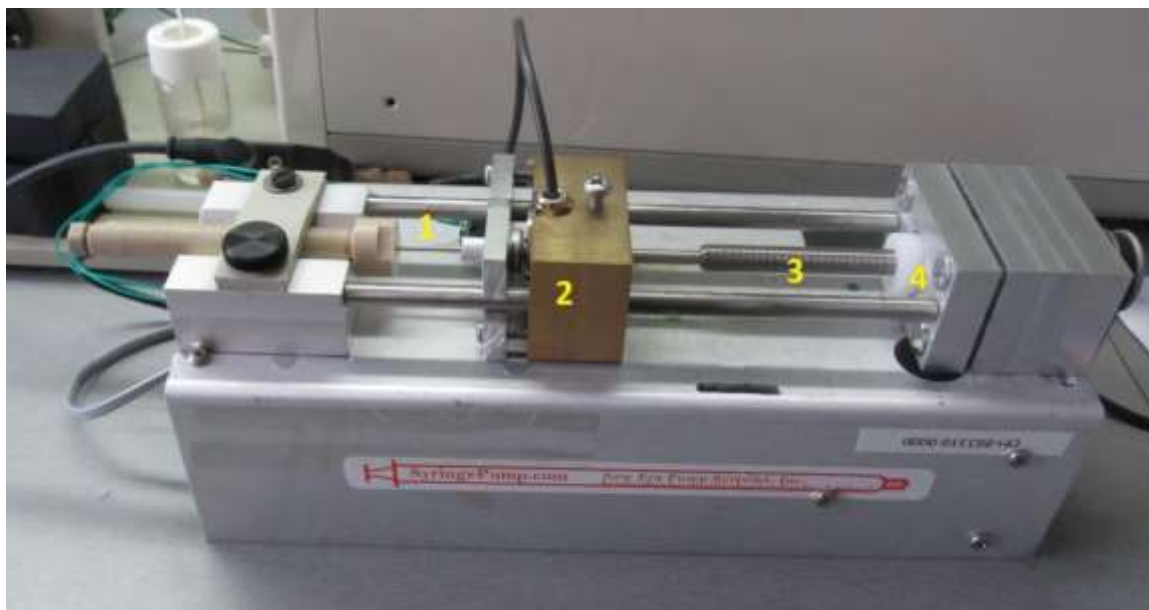
4.1 Miniaturizovaný kapilární kapalinový chromatograf

Konstrukce miniaturizovaného kapalinového chromatografu uvažovaného v této dizertační práci navazuje na diplomovou práci [151], kde byl navržen koncept jednoduchého kapalinově-chromatografického systému, který byl v kombinaci s inovativní chemiluminiscenční detekcí použit pro konstrukci přenosného analyzátoru výbušnin [152]. Základními stavebními prvky tohoto chromatografického systému jsou stříkačková pumpa se stříkačkou, selekční ventil a kapilární kolona. Schéma systému je znázorněno na **obrázku 3**. Systém pracuje na principu postupného nasávání roztoků skrze selekční ventil a jejich následném protlačení kapilární kolonou. Vzorek je do systému rovněž nasát skrze selekční ventil. Malý objem vzorku ($\sim 0,1 \mu\text{l}$) může být nasán do vnitřního objemu ventilu. Větší objem vzorku lze nasát do kapiláry spojující stříkačku se selekčním ventilem (dávkovaný objem dle rozměrů kapiláry). Uvažovat samozřejmě lze i doplnění konfigurace o samostatný dávkovací ventil.

Pro pohyb pístu použité stříkačky byla použita základní verze programovatelné stříkačkové pumpy NE-500 OEM (New Era Pump Systems, Inc., USA). Pro komunikaci s počítačem je pumpa vybavena sériovým portem s rozhraním RS-232. Pro účely této práce byla tato pumpa konstrukčně upravena. Originální plastové díly (držák těla stříkačky a držák pístu) byly nahrazeny díly vyrobenými z hliníkové slitiny. Tyto díly, společně s původním uspořádáním hnacího ústrojí nebyly vhodné pro přenos větších sil, jelikož docházelo k deformaci tlačné části pumpy v důsledku umístění hnacího šroubu mimo osu pístu stříkačky. Pro práci při vysokých tlacích bylo nutné hnací ústrojí modifikovat tak, aby hnací síla byla přenášena axiálně přímo na píst stříkačky, viz **obrázek 4**.



Obrázek 3 – Schéma jednoduchého kapalinového chromatografu; 1 – snímač síly, 2 – stříkačka, 3 – selekční ventil, 4 – roztoky pro přípravu mobilní fáze, 5 – vzorek, 6 – kapilární chromatografická kolona, 7 – detekce.



Obrázek 4 – Mechanická část stříkačkové pumpy po úpravě na axiální přenos hnací síly; 1 – píst stříkačky, 2 – pohyblivá tlačná část se zabudovaným snímačem síly, 3 – broušený šroub, 4 – poháněná matice.

Stříkačková pumpa byla osazena různým typem stříkaček. Byly testovány komerční nízkotlaké skleněné stříkačky (50-250 μ l) i speciální vysokotlaká 250 μ l stříkačka FMJ-250 (PennCentury Inc., USA). Byla také navržena a vyrobena originální 100 μ l PEEKová vysokotlaká stříkačka typu plunžr s kompresním těsněním z UHMWPE. Tělo stříkačky tvoří PEEKový válec o průměru 8 mm. Vrtání pro píst je vedeno osou válce. Na straně vstupu pístu do válce je vrtání rozšířeno a je zde umístěna série kruhových UHMWPE těsnění. Strana vstupu pístu do válce je vybavena vnějším závitem, na který je našroubována matice zajišťující kompresi těsnění. Píst je tvořen leštěnou ocelovou tyčkou, která se zasouvá do vrtání válce.

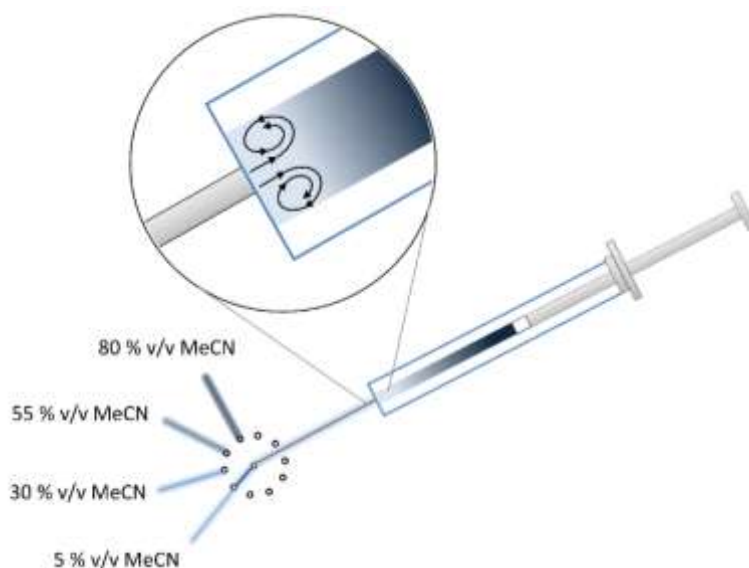
Vícecestný selekční ventil v uvedeném jednoduchém systému umožňuje směřovat tok kapalin tak, že v určité konfiguraci lze do systému kapaliny nasávat, zatímco v jiné konfiguraci lze tyto kapaliny dávkovat na kapilární kolonu. Byla použita OEM verze ventilu C55 s 250 μ m porty (VICI Valco Instruments, USA), která obsahuje integrovanou řídicí jednotku. Ventil je ovládán sepnutím a rozepnutím dvou obvodů – pro krok do další pozice a pro návrat do výchozí pozice. Pro spínání obvodů byly využity 5V relé, které byly spínány pomocí digitálních výstupů jednotky NI USB-6009 (National Instruments, USA).

K detekci byl využíván UV/Vis detektor se specializovanou detekční nanocelou, případně byla využita upravená křemenná kapilára v kombinaci se světlovodnými vlákny pro přívod světla do kapiláry a pro jeho sběr po průchodu kapilárou.

Popsaný systém byl původně vyvinut jako izokratický. Schopnost pracovat v módu gradientové eluce však podstatně rozšiřuje aplikační možnosti chromatografických systémů. Z tohoto důvodu byly studovány možnosti tvorby gradientu mobilní fáze v navrženém jednoduchém kapilárním kapalinovém chromatografu. Díky jednoduchosti systému lze uplatnit několik původních postupů při přípravě nízko-objemových gradientů mobilní fáze pro kapilární kapalinovou chromatografii, např. [153; 154].

Dostatečný počet volných portů vícecestného selekčního ventilu dovoluje k systému připojit několik zásobníků s roztoky o různém složení a následně je možné jejich postupné nasátí do systému. Aby tímto způsobem vznikl kontinuální gradient složení, je nutné rozhraní vzniklé mezi vpravenými roztoky efektivně rozmýt. Zde bylo možné navázat na některé původní práce, kdy byly kapaliny zamíchány vlivem turbulencí v místě skokové změny průřezu potrubí. Takovým místem v popsaném chromatografickém systému je místo vstupu jehly do těla stříkačky (**obrázek 5**). Uvažovány byly gradienty pro chromatografii na reverzních fázích, zejména gradient voda-acetonitril. Z důvodu rozdílné hustoty vody a acetonitrilu a jejich směsí bylo nutné stříkačku udržovat v nakloněné poloze, aby lehčí části sloupce kapaliny s vyšším obsahem acetonitrilu byly ve vyšší poloze než na vodu bohatší části s vyšší hustotou. V opačném případě by docházelo k přelévání vrstev s rozdílnou hustotou, mající za následek vznik náhodně deformovaných profilů gradientu mobilní fáze. Proto byl udržován konstantní sklon stříkačky 20°. Hodnoceny byly profily gradientů vytvořených po postupném nasátí směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v). Byly použity skleněné stříkačky různých objemů a byly zvoleny různé kombinace objemů jednotlivých roztoků nasávaných do systému.

Popsaný chromatografický systém byl také testován při realizaci gradientové separace v režimu konstantního tlaku, kdy je umožněno plného využití maximálního tlaku, při kterém je chromatografický systém schopen pracovat. Pokud při gradientové separaci dochází k výrazné změně viskozity mobilní fáze, může režim konstantního tlaku přispět ke zkrácení doby analýzy o 15-20 % [155; 156]. Měření tlaku v miniaturizovaném chromatografickém systému bylo realizováno pomocí tenzometrického snímače C9B (HBM Messtechnik, GmbH, Německo) umístěného v ose působení tlačné síly na píst stříkačky. Tato síla je tak na píst přenášena právě přes snímač a po přepočtu na plochu pístu stříkačky umožňuje přesné měření tlaku v systému bez nutnosti zásahu do hydraulické části. Ve vývojovém prostředí LabVIEW byl zkompileován program, který je schopen automaticky řídit pohyb stříkačkové pumpy na základě rychlého porovnávání hodnoty aktuálního a požadovaného tlaku. Parametry systému byly testovány při různých tlacích, při gradientové separaci modelové směsi nitroesterů.



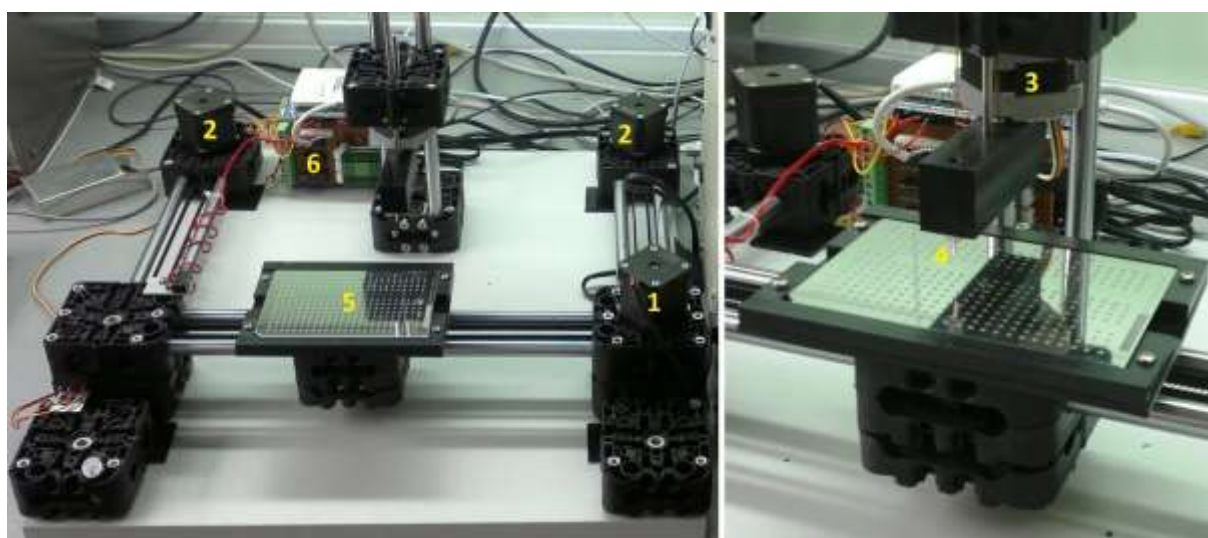
Obrázek 5 – Ilustrace turbulentního míchání roztoků po jejich postupném nasátí do stříkačky. Použito z Ref. [157] se souhlasem vydavatele.

4.2 Jednoduché dvourozměrné separační platformy

4.2.1 Off-line spojení kapilární LC s MALDI-TOF

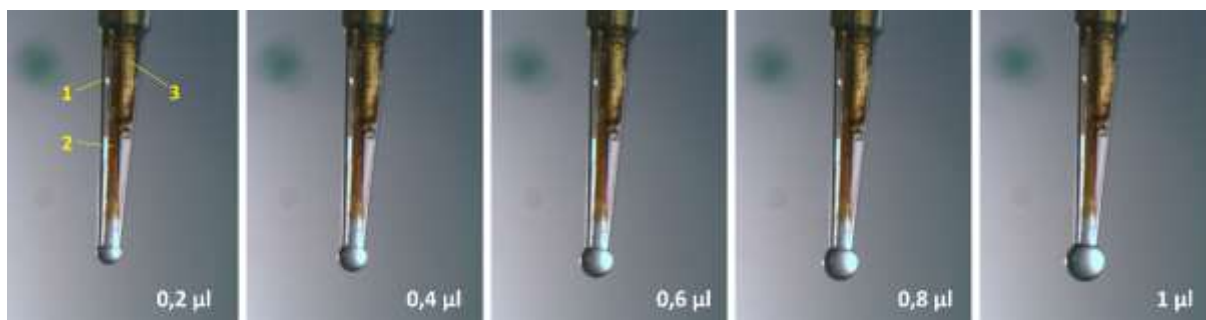
Pro off-line spojení miniaturizovaného kapilárního kapalinového chromatografu s MALDI-MS byla zkonstruována nízkonákladová depoziční jednotka. Základem jednotky je XY pohyblivý stolek, který byl sestaven ze stavebnicového systému C-12 (SinterMask GmbH, Německo). Pohyb stolku v osách X a Y je realizován pomocí sady krokových motorů. Pohyblivý stolek je vybaven plastovou patičí pro umístění MALDI desky (**obrázek 6**).

Pro řízení krokových motorů byl sestaven jednoduchý elektronický obvod na bázi integrovaného obvodu L293D. Pro řízení výstupů obvodu byla využita jednotka NI USB-6009 a softwarová aplikace zkompileována ve vývojovém prostředí LabVIEW (National Instruments, USA).



Obrázek 6 – Zkonstruovaná depoziční jednotka; 1 – krokový motor pro pohyb v ose X, 2 – krokové motory pro pohyb v ose Y, 3 – krokový motor pro pohyb špičky v ose Z, 4 – pipetovací špička upravená pro depozici frakcí, 5 – MALDI deska, 6 – řídicí a napájecí jednotka.

Pro kontaktní depozici frakcí na terčíky MALDI desky byla využita modifikovaná PE pipetovací špička (**obrázek 7**), která byla upravena následujícím způsobem. Pro přívod toku ze separační kolony byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm , která byla špičkou protažena až k jejímu ústí. Do špičky byla navíc zavedena křemenná kapilára o vnitřním průměru 100 μm , kterou lze přivádět pomocný roztok nebo přímo roztok obsahující matici. Větší část objemu špičky byla vyplněna lepidlem na bázi epoxidové pryskyřice. Pipetovací špička byla uchycena kolmo na XY rovinu stolku, v pohyblivém rameni. Pro lineární pohyb ramene s pipetovací špičkou ve směru osy Z byl využit hybridní krokový motor s posunovacím šroubem (SX16-0402LA-120, Microcon, Česká republika).



Obrázek 7 – Detail pipetovací špičky upravené pro depozici sub-mikrolitrových a mikrolitrových frakcí na MALDI desku; 1 – 10µl PE pipetovací špička, 2 – křemenná kapilára přivádějící tok mobilní fáze z kapilární LC, 3 – křemenná kapilára přivádějící roztok matrice, případně podpůrný roztok pro tvorbu kapiček vhodné velikosti.

Experimentální sestava, složená s miniaturizovaného kapalinového chromatografu a depozici jednotky, byla využita pro separaci glykanů enzymaticky odštěpených [158] z vybraných glykoproteinů (IgG a RNáza B) v módu HILIC, na novém typu kapilární křemenné monolitické kolony (0,1×150 mm) modifikované [2-(methacryloyloxy)ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammonium hydroxidem (MEDSA) [159]. Pro separaci byly použity roztoky o následujícím složení acetonitril/voda/100 mM CH₃COO⁻Na⁺ (pH 5): Roztok A – 80/10/10 a roztok B 65/25/10 (v/v/v). Gradient mobilní fáze byl připraven nasátím 30 µl roztoku A do gradientové smyčky (0,45×500 mm) naplněné roztokem B.

Jelikož molární absorpční koeficient glykanů v UV-Vis oblasti je velmi nízký, nelze tyto detekovat fotometricky. V uvedené konfiguraci byl proto výstup separační kolony přímo připojen ke kapiláře vedoucí do depozici špičky. Tok mobilní fáze, 1 µl/min, byl na konci špičky míchán v poměru 1:1 s tokem roztoku super-DHB (směs 2,5-dihydroxybenzoové a 2-hydroxy-5-methoxybenzoové kyseliny v poměru 9:1, Sigma-Aldrich, Německo) o koncentraci 20 g/l ve vodě. Na MALDI desku byly deponovány 30 vteřinové frakce.

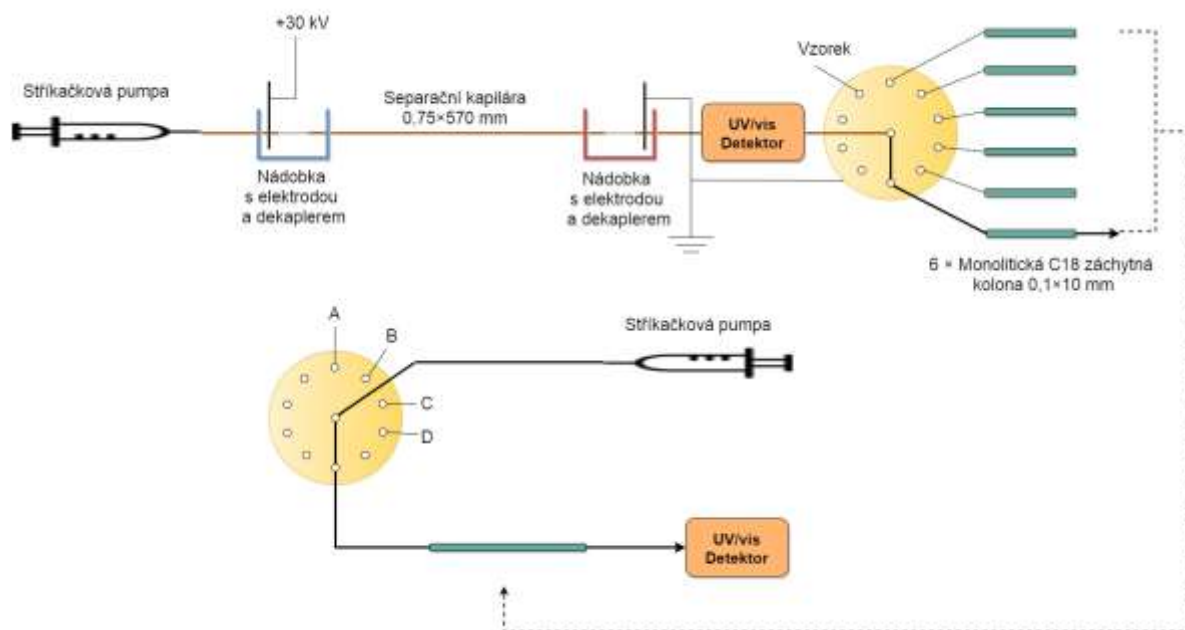
MALDI-MS analýza deponovaných spotů byla provedena na přístroji AB SCIEX TOF/TOF 5800 (SCIEX, USA) v pozitivním refletronovém módu s intenzitou laseru nastavenou na hodnotu 5500.

4.2.2 Off-line spojení cIEF s kapilární LC

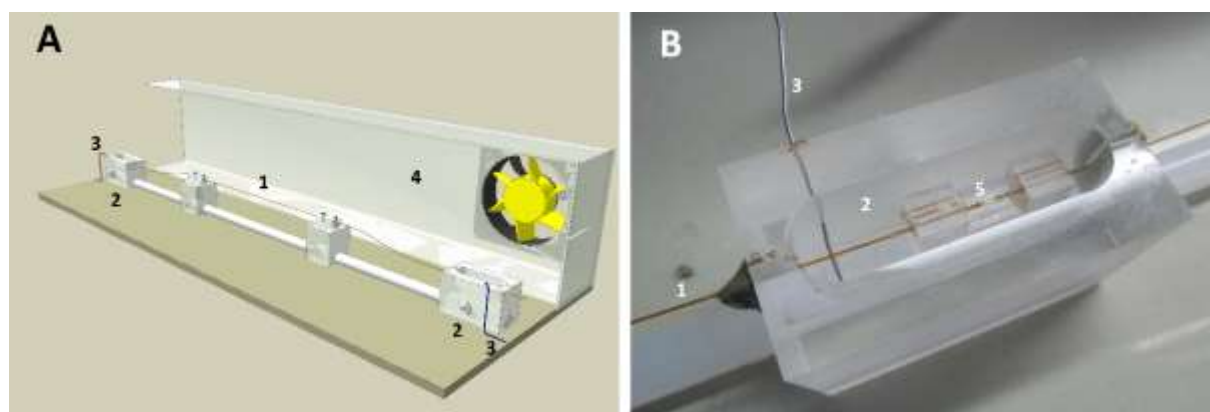
Součástí experimentální části dizertační práce byla také realizace jednoduché polo-automatizované separační platformy pro dvourozměrnou separaci peptidů využívající off-line spojení kapilární izoelektrické fokusace (cIEF) s miniaturizovaným kapilárním kapalinovým chromatografem (**obrázek 8**).

První separační rozměr, kapilární izoelektrická fokusace, byla realizována jako frakcionační stupeň. Pro separaci byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 µm, s permanentním pokrytím vnitřní stěny vrstvou hydroxymethylpropylcelulózy [44]. Pro splnění požadavku na částečnou automatizaci sběru frakcí, byly ve dvou místech separační kapiláry vytvořeny dekaplery. Postup jejich přípravy spočíval v odstranění ochranné polyimidové vrstvy a zafixování kapiláry na pevnou podložku ve dvou bodech kolem zvoleného místa, jemným nařiznutím a opatrným zlomením křemenné kapiláry a vytvořením membrány z acetátu

celulózy na povrchu zlomu [108]. Takto připravené dekaplery byly vloženy do nádobek obsahujících anolyt 0,1% kyselinu mravenčí, katolyt 0,1% hydroxid amonný a elektrody (Pt drátky), viz **obrázek 9b**. Efektivní délka separační kapiláry (vzdálenost mezi dekaplery) činila 570 mm. Konce kapiláry byly připojeny k programovatelné stříkačkové pumpě se 100 μ l stříkačkou a k centrálnímu portu 10 cestného selekčního ventilu. K šesti obvodovým portům selekčního ventilu byly připojeny kapilární monolitické kolony (0,1 \times 10 mm, křemenný monolit, stacionární fáze C18), sloužící pro zachycení peptidů zafokusovaných v objemu dané frakce. Jeden port sloužil pro nadávkování vzorku. Pro rychlý odvod tepla generovaného v separační kapiláře byla tato umístěna ve větraném plastovém pouzdře, viz **obrázek 9a**.



Obrázek 8 – Schématické znázornění off-line dvourozměrné cIEF – RPLC separační platformy; (a) Uspořádání kapilární izoelektrické fokusace s automatizovaným sběrem frakcí a frakcionací na monolitických kolonách. (b) Zapojení monolitické kolony do miniaturizovaného kapilárního kapalinového chromatografu.



Obrázek 9 – (a) Vizualizace sestavy pro cIEF; 1 – separační kapilára, 2 – nádobky s elektrolyty, 3 – elektrody, 4 – sklopný plastový kryt s ventilátorem; (b) Detail rezervoáru s elektrodou a 5 – dekapler;

Vzorek obsahující peptidy (1,5 mg/ml) po tryptickém štěpení albuminu z hovězího séra a směs ampholytů (3,3% Biolyte 3-10, 0,5% TEMED) byl nasán do separační kapiláry. Na anodu bylo ze zdroje (Spellman CZE1000R) přivedeno stejnosměrné vysoké napětí + 30 kV (katoda a ventil uzemněny, skleněná stříkačka elektricky izolována od konstrukce stříkačkové pumpy). Izoelektrická fokusace byla ukončena po 60 minutách. Obsah separační kapiláry byl poté mobilizován pomocí stříkačkové pumpy a při průtoku 10 μ l/h rovnoměrně frakcionován a dávkován na záchytné monolitické kolony postupně změnou konfigurace selekčního ventilu.

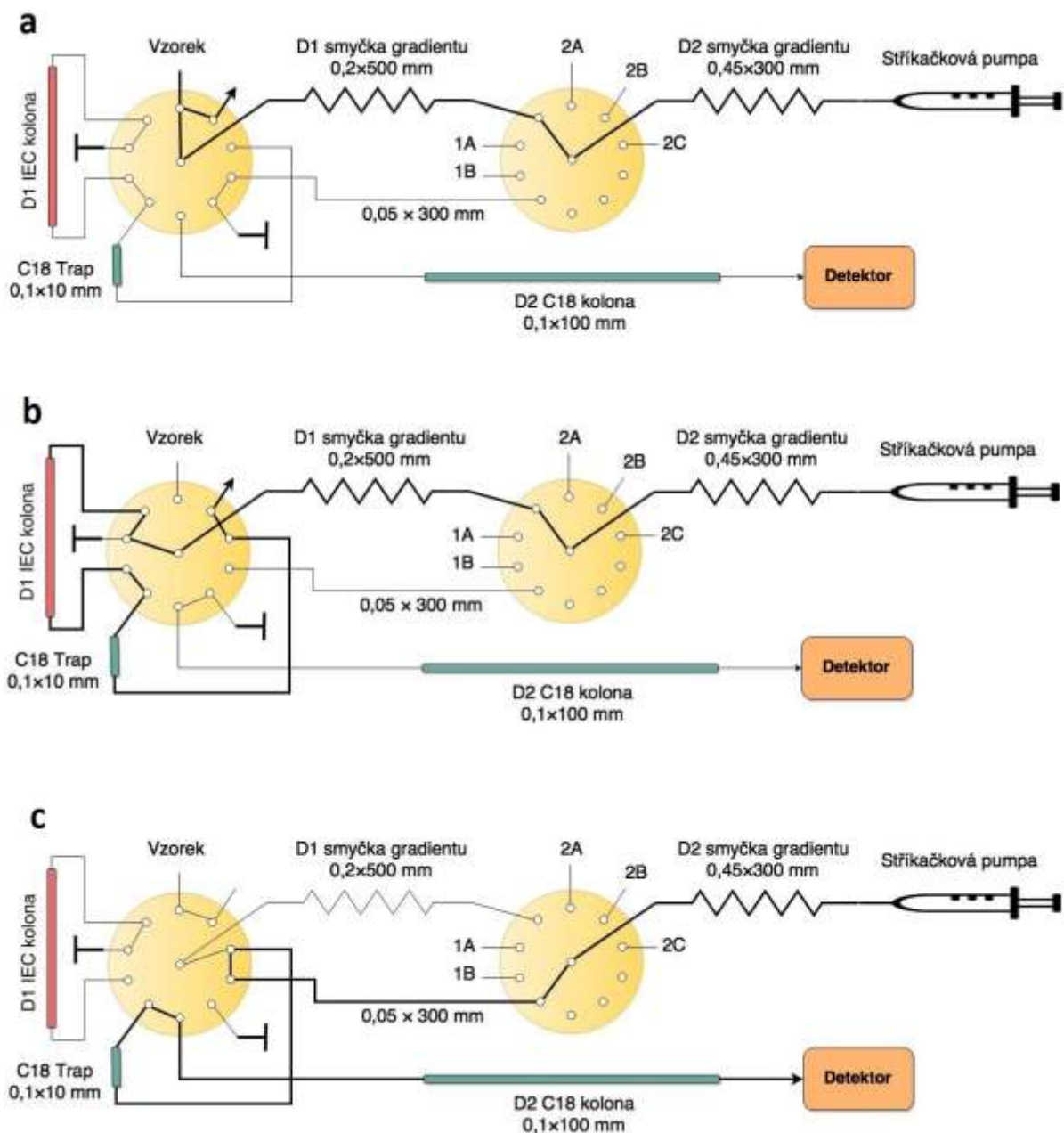
Monolitické kolony byly poté z ventilu demontovány a jednotlivě zapojeny do sestavy miniaturizovaného kapalinového chromatografu (**obrázek 8b**). Peptidy zachycené na počátku kolony byly eluovány gradientem o složení 20/80 – 40/60 (v/v) acetonitril (0.1 % v/v TFA)/voda (0.1 % v/v TFA), vytvořeného a stabilizovaného v nakloněné 100 μ l stříkačce. Absorbance při vlnové délce 214 nm byla měřena fotometrickým detektorem Agilent VWD 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) vybaveným detekční U-celou (SunChrom, Wissenschaftliche Geräte, GmbH, Německo).

4.2.3 On-line 2D-LC platforma

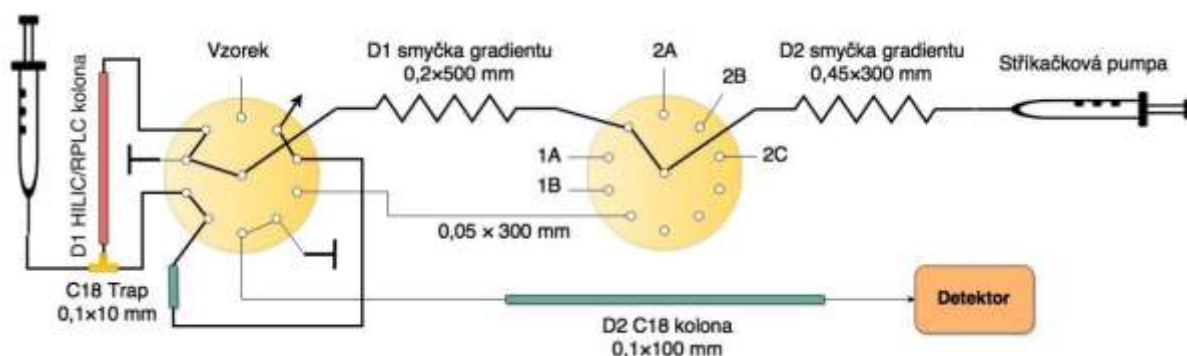
Na základě miniaturizovaného kapilárního kapalinového chromatografu byla navržena konfigurace, která umožňuje realizaci automatizované on-line dvourozměrné kapalinové chromatografie. Základním prvkem navržené 2D-LC platformy je miniaturizovaný kapalinový chromatograf, jehož konfigurace byla popsána výše. Sestava byla doplněna o další selekční ventil, který byl pro tyto účely speciálně upraven. **Obrázek 10** schematicky znázorňuje uvažovanou 2D-LC sestavu v jednotlivých fázích operace. Systém byl navržen tak, že separace v prvním rozměru není kontinuální, ale probíhá přerušovaně. Využit byl princip eluce při konstantním tlaku. Na počátku analýzy je výše popsaným postupem vytvořen gradient mobilní fáze, který je uskladněn v kapiláře spojující selekční ventily. Konfigurace ventilů znázorněna na **obrázku 10a** umožňuje transport gradientu mobilní fáze vytvořeného v D2 smyčce do D1 smyčky a rovněž zpřístupňuje vnitřní dávkovací smyčku ventilu pro vpravení vzorku. Po nastavení konfigurace uvedené na **obrázku 10b** systém vytvoří tlakový pulz, jehož vlivem je část objemu uskladněného gradientu v D1 smyčce protlačena D1 kolonou prvního rozměru a analyty opouštějící kolonu jsou zachyceny na záchytné koloně druhé dimenze. Po skončení tlakového pulzu, je v D2 smyčce vytvořen gradient mobilní fáze a tento je protlačen záchytní kolonou a kolonou druhého rozměru, jak je patrné z **obrázku 10c**. Po skončení separace je do systému nasána slabá mobilní fáze, kterou jsou následně záchytná kolona a kolona druhého rozměru zregenerovány. Systém vytvoří další tlakový pulz a proces se opakuje, až je postupně D1 kolonou protlačen celý objem na počátku vytvořeného gradientu.

Bez dalších úprav lze takto navržený systém uvažovat pro realizaci IEC \times RPLC, kdy je mobilní fáze v IEC slabou mobilní fází pro RPLC. Analyty zde mají přirozeně vysokou retenci na stacionární fázi C18 a můžou být efektivně zachyceny na záchytné koloně.

V případě dvourozměrné separace RPLC \times RPLC, nebo HILIC \times RPLC, má mobilní fáze elující analyty z prvního separačního rozměru většinou již dostatečnou eluční sílu i v podmínkách separace ve druhém rozměru. Pro efektivní zachycení analytů z takové frakce, je možné za D1 kolonu umístit T-spojku a naředit frakci přídavným tokem vhodné kapaliny, viz **obrázek 11**. V testované konfiguraci byl tok přídavné kapaliny realizován pomocí 250 μ l vysokotlaké stříkačky, která byla naplněna vodou, umístěna v horizontální poloze a zatížena 3,5kg závažím.



Obrázek 10 – Schématické znázornění navrženého 2D-LC systému v jednotlivých konfiguracích; (a) Gradient mobilní fáze, vytvořen v D2 smyčce po nasátí kapalin 1A a 1B je vpraven do D1 smyčky. Následně je vnitřní smyčka ventilu naplněna vzorkem. (b) Systém je tlakován na požadovaný tlak; vzorek je nadávkován na kolonu, následován určitým objemem mobilní fáze vytlačené z D1 smyčky. Tok mobilní fáze z kolony směřuje na C18 záchytnou kolonu, eluované analyty jsou zde zachyceny. (c) Z kapalin 2A – 2C je ve smyčce D2 vytvořen gradient mobilní fáze, kterým jsou následně analyty ze záchytné kolony eluovány a separovány na D2 C18 koloně.



Obrázek 11 – Navržený 2D-LC systém v konfiguraci pro realizaci RPLC×RPLC a HILIC×RPLC; Systém je natlakován na požadovaný tlak. Vzorek je nadávkován na kolonu, následován určitým objemem mobilní fáze vytlačené z D1 smyčky. Tok mobilní fáze z kolony, obsahující relativně vysoký podíl organické složky, je několikanásobně zředěn přídatným tokem vody. Eluované analyty jsou poté zachyceny na C18 předkoloně.

V rámci testování této dvourozměrné konfigurace byla hodnocena schopnost systému vytvářet opakovatelné tlakové pulzy. Za D1 kolonu byl zapojen průtokoměr SLG1430-025 (Sensirion AG, Švýcarsko) a byl měřen průtok vyvolaný tlakovým pulzem.

Funkce systému v uspořádání, kdy je mobilní fáze z prvního separačního rozměru slabou mobilní fází pro druhý rozměr (např. 2D-LC spojení IEC-RPLC), byla testována pomocí roztoku nitroglycerínu o koncentraci 0,01 g/l rozpuštěného ve směsi acetonitril/voda 10/90 (v/v). D1 kolona byla nahrazena kapilárou 0,02×500 mm. Místo mobilní fáze byl v prvním rozměru použit roztok nitroglycerínu. Aplikací tlakových pulzů byl pokaždé nadávkován malý objem kapaliny z prvního rozměru na záchytnou kolonu (0,1×10 mm Kinetex EVO C18 5 μm). Pro eluci nitroglycerínu byla ve druhém rozměru použita mobilní fáze o složení acetonitril/voda 50/50 (v/v). D2 kolona 0,1×100 mm obsahovala stejnou stacionární fázi jako záchytní kolona. Nitroglycerin byl detekován při vlnové délce 210 nm.

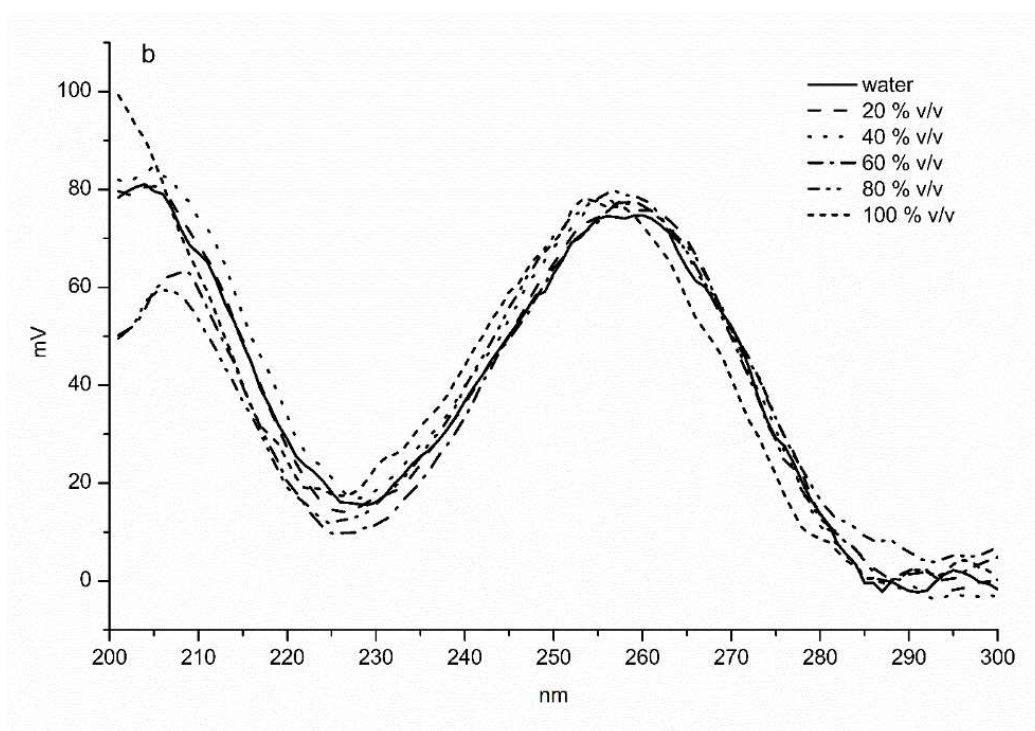
Podmínky, kdy má mobilní fáze prvního rozměru dostatečnou eluční sílu pro eluci analytů ve druhé dimenzi a kdy nelze analyty na záchytné koloně přirozeně zafokusovat (běžně 2D-LC spojení RPLC-RPLC a HILIC-RPLC), byly simulovány roztokem nitroglycerínu o koncentraci 0,01 g/l rozpuštěného ve směsi acetonitril/voda 50/50 (v/v), který byl z prvního rozměru dávkován tlakovými pulzy na záchytnou kolonu. Pro naředění frakce byla do T-spojky za D1 kolonu přiváděna voda o přibližném průtoku 10 μl/min. Tyto podmínky byly následně aplikovány pro separaci testovací směsi peptidů, kdy byl na kolonu prvního rozměru (0,1×100 mm ZIC-HILIC, 3,5 μm) nadávkován malý objem testovací směsi. Po regeneraci záchytné kolony a D2 kolony slabou mobilní fází byly peptidy z prvního rozměru eluovány mobilní fází acetonitril/voda (10 mM CH₃COO-NH₄⁺) 60/40 (v/v). Ve druhém rozměru byl aplikován gradient voda-acetonitril, vytvořený postupným nasátím 30, 10 a 10 μl roztoků o složení acetonitril (0,3 % TFA)/voda (0,3 % TFA) 40/60, 45/155 a 5/95 (v/v) do kapiláry 0,45×300 mm. 10 μl z objemu kapiláry bylo následně vytlačeno do odpadu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Gradientové separace s miniaturizovaným kapilárním kapalinový chromatografem

5.1.1 Vizualizace profilu gradientu mobilní fáze

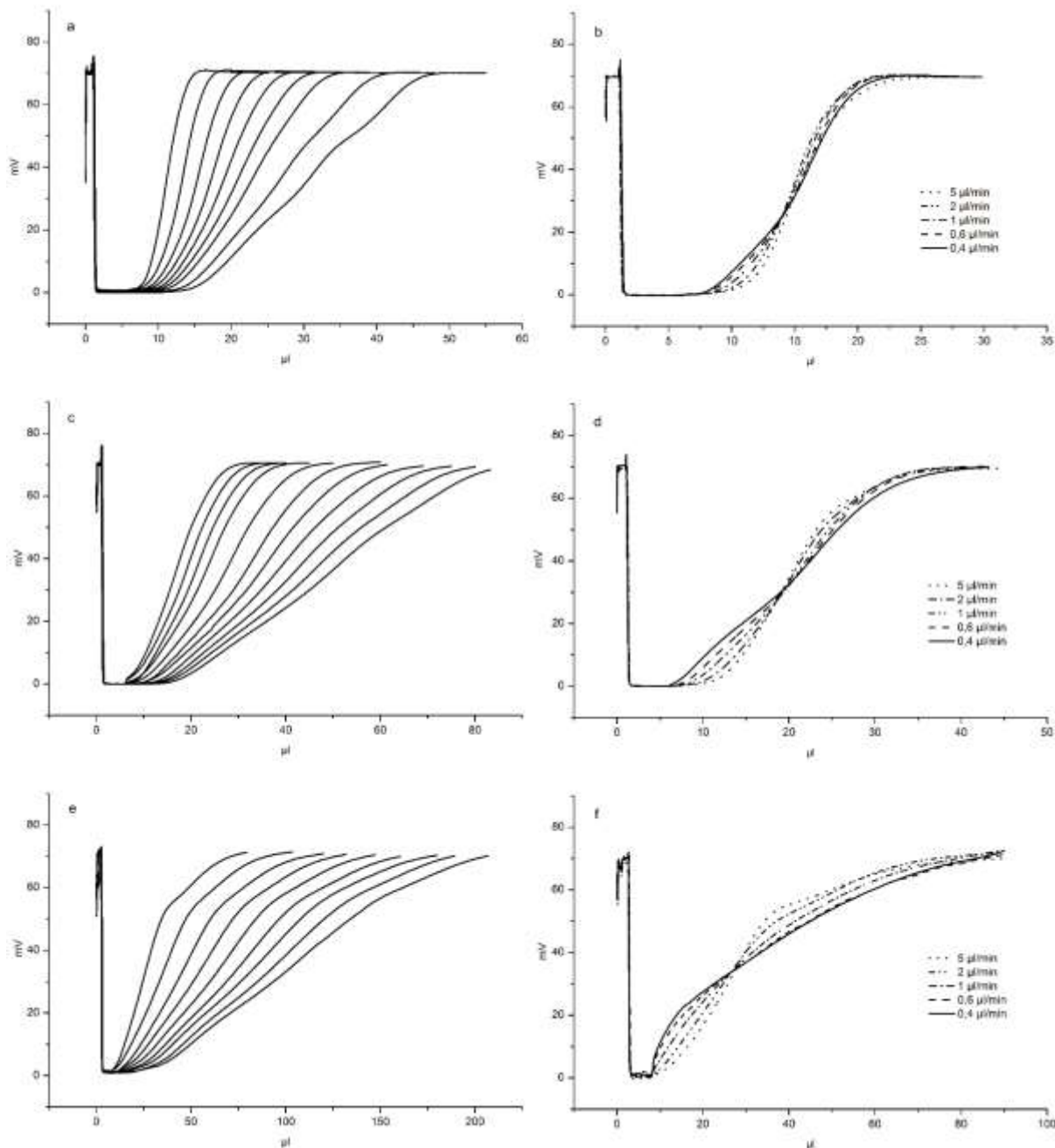
Pro vizualizaci profilu vytvořeného gradientu voda-acetonitril byl acetonitril označen uracilem (výsledná koncentrace 0,02 g/l). Jak je patrné z **obrázku 12**, v absorpčním spektru uracilu nejsou v závislosti na objemovém poměru voda/acetonitril pozorovány žádné významné posuny. Pro další měření absorbance uracilu ve směsi voda/acetonitril byla zvolena vlnová délka 254 nm. Při této vlnové délce roste absorbance kalibrační série roztoků voda/acetonitril (0,2 g/l uracil) lineárně s rostoucím objemovým procentem acetonitrilu ve směsi. Za těchto podmínek tedy bylo možné vizualizovat profily gradientů voda-acetonitril, připravených v experimentálním systému.



Obrázek 12 – Absorpční spektra uracilu ve směsích acetonitril/voda (% v/v); Koncentrace uracilu 1 mg/l, měřeno přístrojem Agilent DAD 1200 series, délka optické dráhy průtočné kyvety 6 mm, průtok kyvetou 10 μ l/min. Použito z Ref. [157] se souhlasem vydavatele.

5.1.2 Gradient mobilní fáze v nakloněné stříkačce

Obrázek 13 znázorňuje pozorované profily gradientů voda-acetonitril, vytvořených nasátím definovaných objemů směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v) do systému, při použití stříkaček různých objemů. Odpovídající objemy jednotlivých roztoků nasátých do systému jsou přehledně uvedeny v **tabulce 4**.



Obrázek 13 – Profily vizualizovaných gradientů (koncentrace uracilu v acetonitrilu 20 mg/l) vytvořených postupným nasátím adekvátních objemů směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v) do (a) 50 μl stříkačky, (c) 100 μl stříkačky, (e) 250 μl stříkačky. Gradient byl ze stříkaček vytlačován při průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (50 a 100 μl stříkačky) a 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (250 μl stříkačka). (b)(d)(f) znázorňují profily vizualizovaných gradientů vytlačovaných ze stříkačky při různých průtocích 0,4 – 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Použito z Ref. [157] se souhlasem vydavatele.

Tabulka 4 – Objemy roztoků postupně nasávaných do stříkačky (25 $\mu\text{l}/\text{min}$) odpovídající gradientům prezentovaným na Obrázku 13.

50μl stříkačka (Fig. 13a)											
%	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
v/v											
80	15	15	15	15	15	15	15	15	15		
55	0	1	2	3	4	5	6	8	10		
30	0	1	2	3	4	5	6	8	10		
5	10	11	12	13	14	15	16	18	20		
100μl stříkačka (Fig. 13c)											
%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
v/v											
80	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
55	3	4	5	6	8	10	12	14	16	18	20
30	3	4	5	6	8	10	12	14	16	18	20
5	13	14	15	16	18	20	22	24	26	28	30
250μl stříkačka (Fig. 13e)											
%	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
v/v											
80	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
55	10	15	20	25	30	35	40	45	50		
30	10	15	20	25	30	35	40	45	50		
5	20	25	30	35	40	45	50	55	60		

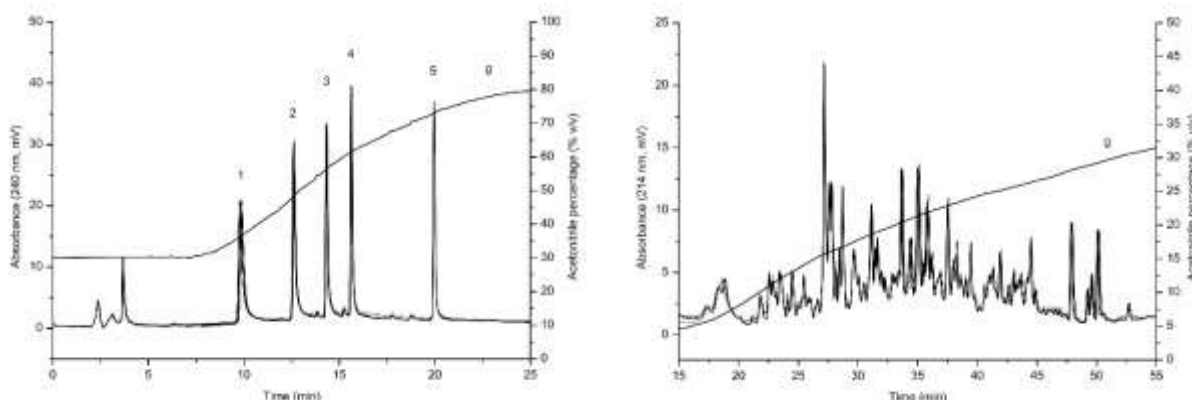
Je patrné, že se zvětšujícími se objemy nasávaných roztoků klesá strmost gradientu, resp. vzrůstá jeho objem. V určitém bodě jsou již nasávané objemy natolik velké, že jejich míchání není dostatečné a v profilu začíná být patrné zvlnění.

Při použití 50 μl stříkačky byly vytvořeny gradienty o objemech v intervalu 5-30 μl (**obrázek 13a**). Z pozorovaných profilů, jsou profily gradientů vytvořených v 50 μl stříkačce nejvíce lineární. Širší interval objemů vytvořeného gradientu, 15-70 μl , je dostupný při použití 100 μl stříkačky, při částečném zachování lineárního profilu (**obrázek 13c**). S 250 μl stříkačkou byly vytvořeny gradienty o objemu do 200 μl , zejména však gradienty menších objemů zde vykazují výrazné porušení lineárního profilu (**obrázek 13e**).

Díky malému vnitřnímu průměru 50 μl stříkačky, byly s touto pozorovány nejmenší změny profilu gradientu v závislosti na průtoku, kterým je gradient ze stříkačky vytlačován (**obrázek 13b**). U 100 μl stříkačky došlo při pomalejším vytlačování k mírnému poklesu strmosti gradientu, lineární profil však zůstal zachován (**obrázek 13d**). Nejvýraznější změny jsou patrné při použití 250 μl stříkačky (**obrázek 13f**).

Opakovatelnost tohoto způsobu tvorby gradientu mobilní fáze byla demonstrována na separaci směsi alkylfenonů (**obrázek 14a**) a směsi peptidů z tryptického štěpení albuminu z hovězího séra (**obrázek 14b**). Relativní směrodatná odchylka retenčních časů ($n=10$) alkylfenonů separovaných při průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla menší než 0,3 %.

Relativní směrodatná odchylka retenčních časů vybraných píků peptidů separovaných při průtoku 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla menší než 0,4 %.



Obrázek 14 – Překrytí chromatogramů opakovaných gradientových separací; Kolona – Chromolith CapRod RP-18e 0,1 \times 150 mm. (a) Deset opakování separace 0,5 μl směsi alkylfenonů, $2 \cdot 10^{-5}$ M v 5/95 acetonitril/voda (v/v); 1 – valerofenon, 2 – hexanofenon, 3 – heptanofenon, 4 – oktanofenon, 5 – dodekanofenon, g – profil gradientu. Gradient mobilní fáze vytvořen nasátím 10, 5 a 10 μl směsí 80/20, 55/45 a 30/70 – acetonitril/voda (v/v) do 100 μl stříkačky. Průtok mobilní fáze 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Teplota 40 $^{\circ}\text{C}$. (b) Tři opakování separace 0,5 μl BSA digestu (1 g/l BSA) v 5/95 acetonitril/voda (v/v). Gradient mobilní fáze vytvořen nasátím 20, 20, 20 a 15 μl směsí 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 – acetonitril/voda (v/v) do 100 μl stříkačky. Průtok mobilní fáze 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Teplota 25 $^{\circ}\text{C}$. Použito z Ref. [157] se souhlasem vydavatele.

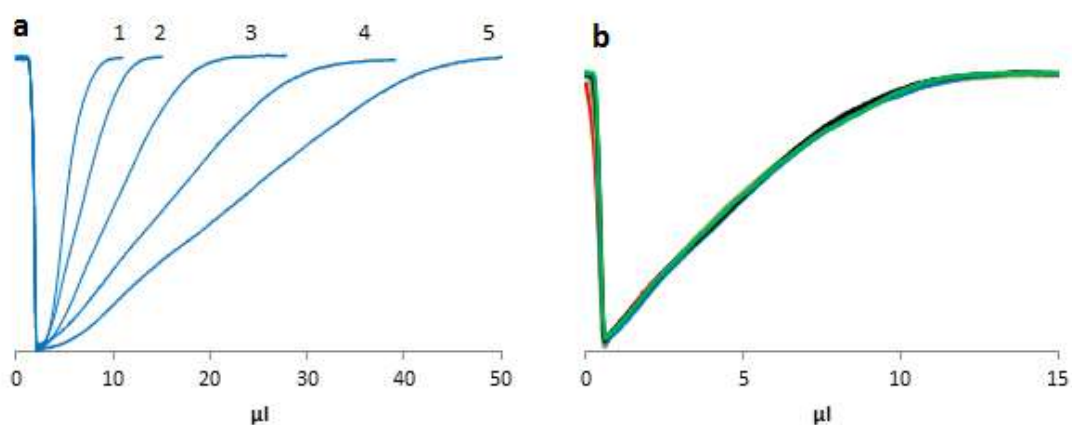
Způsob přípravy gradientu nasátím několika roztoků do nakloněné stříkačky lze tedy označit za velmi jednoduchý, s možností tvorby gradientu v objemech vhodných pro nano- a mikrokolonovou kapalinovou chromatografii s vysokou opakovatelností. Nevýhodami tohoto přístupu jsou nutnost udržovat náklon stříkačky (při realizaci HILIC je nutné orientaci stříkačky obrátit) a závislost výsledného profilu gradientu na průtoku, kterým je ze stříkačky vytlačován. 50 a 100 μl skleněné stříkačky odolávají tlakům 5-6 MPa. Systém vybavený těmito stříkačkami lze nejvhodněji zkombinovat s monolitickými kolonami s vysokou permeabilitou případně s krátkými náplňovými kolonami. Vysokotlaká 250 μl stříkačka, která je komerčně dostupná (FMJ-250, Penn-Century, Inc., USA) není pro tento způsob přípravy gradientu příliš vhodná, jelikož ve 250 μl stříkačce byly pozorovány výrazné deformace profilů gradientu mobilní fáze.

5.1.3 Tvorba gradientu mobilní fáze v kapiláře

Aby byly odstraněny závislosti tvorby gradientů na rozměrech a náklonu použité stříkačky a aby bylo možno použít vysokotlakou 250 μl stříkačku, případně jinou vysokotlakou pumpu, byl navržen způsob míchání kapalin, kdy tyto jsou místo do stříkačky, postupně nasávány do horizontálně umístěné kapiláry spojující selekční ventil a stříkačku. Hlavním efektem podporujícím rozmytí rozhraní mezi různými kapalinami je zde kombinace difuze a parabolického profilu proudění v kapiláře, tzv. Taylorova disperze [160].

Vizualizované profily gradientu, vytvořené nasáváním různých objemů směsí 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 – acetonitril/voda (v/v) do kapiláry 0,38×600 mm při průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ jsou vyobrazeny na **obrázku 15a**. Pro dostatečné míchání je nutné, aby vytvořené rozhraní urazilo v kapiláře dostatečně dlouhou dráhu. Za tímto účelem byl poslední roztok nasáván do systému v přebytku. Přebytečný izokratický úsek před vlastním gradientem byl následně vytlačen do odpadu. Odpovídající objemy jednotlivých roztoků nasátých do systému jsou přehledně uvedeny v **tabulce 5**. Popsaným způsobem bylo možné vytvořit téměř lineární gradienty o objemu v intervalu 4-45 μl , což je pro většinu kapilárních nano- a mikrokolon dostačující. **Obrázek 15b** znázorňuje výsledek experimentu, kdy gradient, který byl připravován za stejných podmínek byl následně vytlačován při různém průtoku v intervalu 0,1-5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Téměř dokonalé překrytí vizualizovaných profilů indikuje dlouhodobou stabilitu připraveného gradientu a nezávislost profilu na rychlosti, kterou je gradient vytlačován.

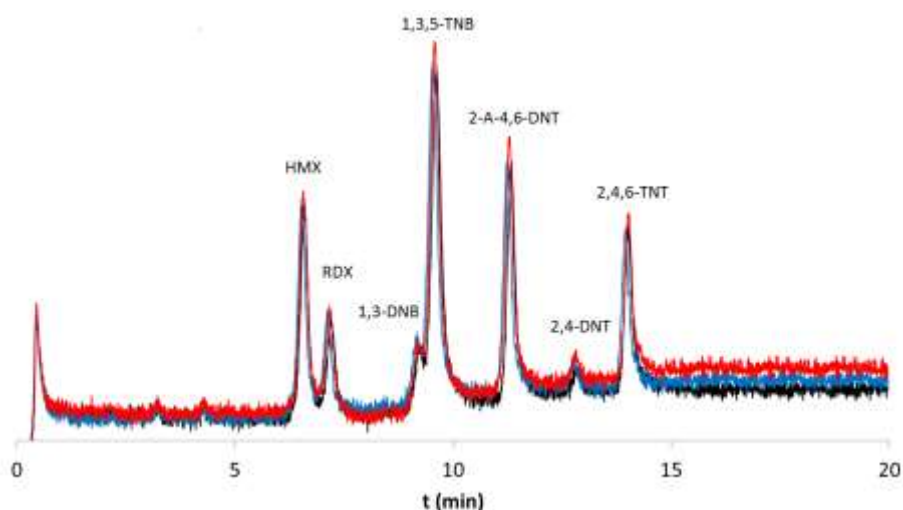
Opakovatelnost tohoto způsobu tvorby gradientu mobilní fáze byla demonstrována na separaci směsi nitrolátek (**obrázek 16**). Relativní směrodatná odchylka retenčních časů při průtoku 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla menší než 0,3 %.



Obrázek 15 – (a) Profily vizualizovaných gradientů (koncentrace uracilu v acetonitrilu 20 mg/l) vytvořených postupným nasátím adekvátních objemů směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v) do 0,38×600 mm kapiláry. Gradient byl vytlačován při průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. (b) Profily vizualizovaných gradientů vytlačených při různých průtocích 0,1 – 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Tabulka 5 – Objemy roztoků postupně nasávaných do 0,38×600 mm kapiláry odpovídající gradientům prezentovaných na Obrázku 15a.

	1	2	3	4	5
% v/v			μl		
80	10	10	15	20	25
55	1	2,5	4,5	8	12
30	1	2,5	4,5	8	12
5	1	2,5	10	20	25
Izokrat. úsek	1	2,5	9	17	20



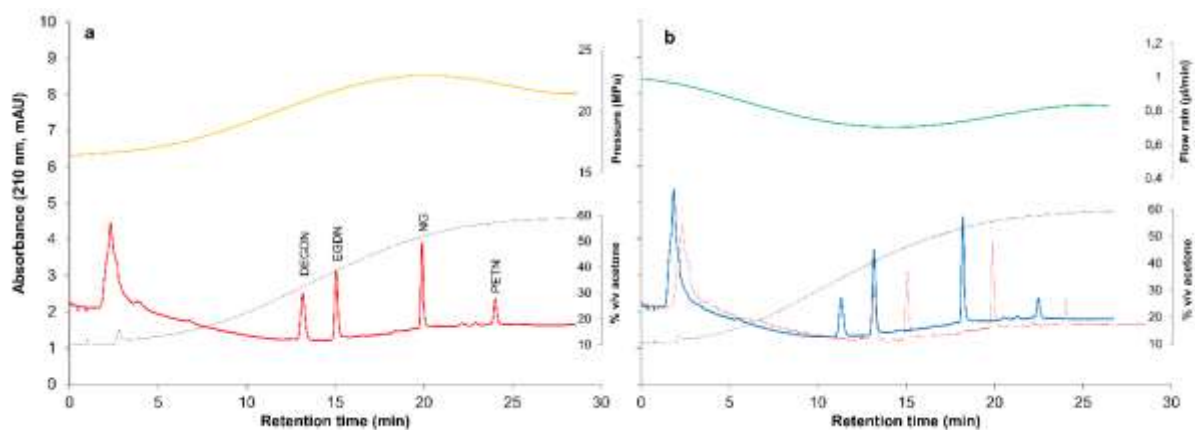
Obrázek 16 – Gradientová separace 0,1 µl směsi nitrolátek (0,01 g/l); Kolona: Kinetex 2.6 µm C18 0,1×150 mm, Gradient mobilní fáze vytvořen postupným nasátím 20, 8 a 20 µl směsí 80/20, 55/45 a 30/70 – acetonitril/voda (v/v) do 0,38×600 mm kapiláry, 15µl izokratický úsek odstraněn. Průtok mobilní fáze 0,5 µl/min, teplota 25 °C, UV detekce 230 nm.

V porovnání s přípravou gradientu v nakloněné stříkačce má míchání gradientu v horizontálně umístěné kapiláře několik nesporných výhod. Použitá kapilára má menší vnitřní průměr a větší délku než tělo stříkačky. Gradient je tak skladován na delší dráze a vliv difuze na profil gradientu je zanedbatelný. Při malém průřezu kapiláry a při jejím umístění v horizontální rovině také ztrácí na významu rozdíl hustoty nasávaných kapalin. Lze tedy snadno připravit gradienty voda-acetonitril nebo acetonitril-voda bez změny konfigurace systému. Na trhu je navíc dostupná široká škála kapilár nejrůznějších rozměrů.

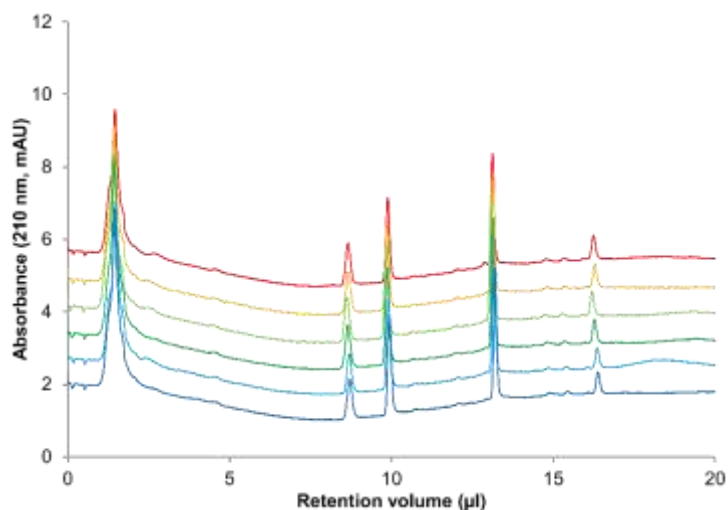
V kombinaci s touto přípravou gradientu bylo možné použít dostupnou komerční vysokotlakou stříkačku FMJ-250 (Penn-Century, Inc, USA). Výrobce udává její tlakovou odolnost až 40 MPa. Při dlouhodobém testování však byla pozorována rychlá degradace PTFE těsnění pístu. Toto těsnění bylo proto nahrazeno těsněním z materiálu UHMWPE, se kterým bylo možné dlouhodobě pracovat při tlacích do přibližně 25 MPa. Vyšší tlakové odolnosti, přibližně 35 MPa, bylo dosaženo s použitím originální PEEKové stříkačky s plunžrovou konstrukcí (UHMWPE těsnění na vstupu plunžru do válce).

5.1.4 Gradientová separace v režimu konstantního tlaku

Schopnost navrženého chromatografického systému realizovat gradientové separace při konstantním tlaku byla demonstrována na gradientové separaci modelové směsi nitroesterů. Směs byla separována gradientem aceton-voda, vytvořeného postupným nasátím 30, 5 a 15 µl směsí o složení 60/40, 35/65 a 10/90 aceton/voda (v/v) do 0,45×400 mm kapiláry při průtoku 50 µl/min. Zkrácení doby analýzy v porovnání s režimem konstantního průtoku dobře ilustruje **obrázek 17**. Čas separace byl v tomto případě zkrácen o 7 %.

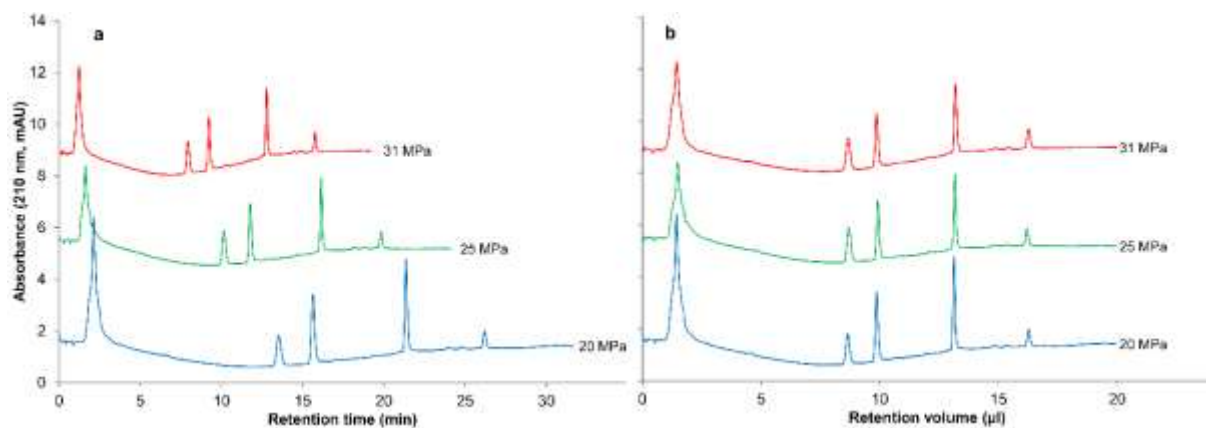


Obrázek 17 – Gradientová separace směsi nitroesterů při (a) konstantním průtoku 0,7 µl/min a při (b) konstantním tlaku 23 MPa; Znáznorněny jsou (a) změny tlaku v režimu konstantního průtoku a (b) změny průtoku v režimu konstantního tlaku. Profil gradientu aceton-voda byl zaznamenán při vlnové délce 230 nm. Použito z Ref. [161] se souhlasem vydavatele.

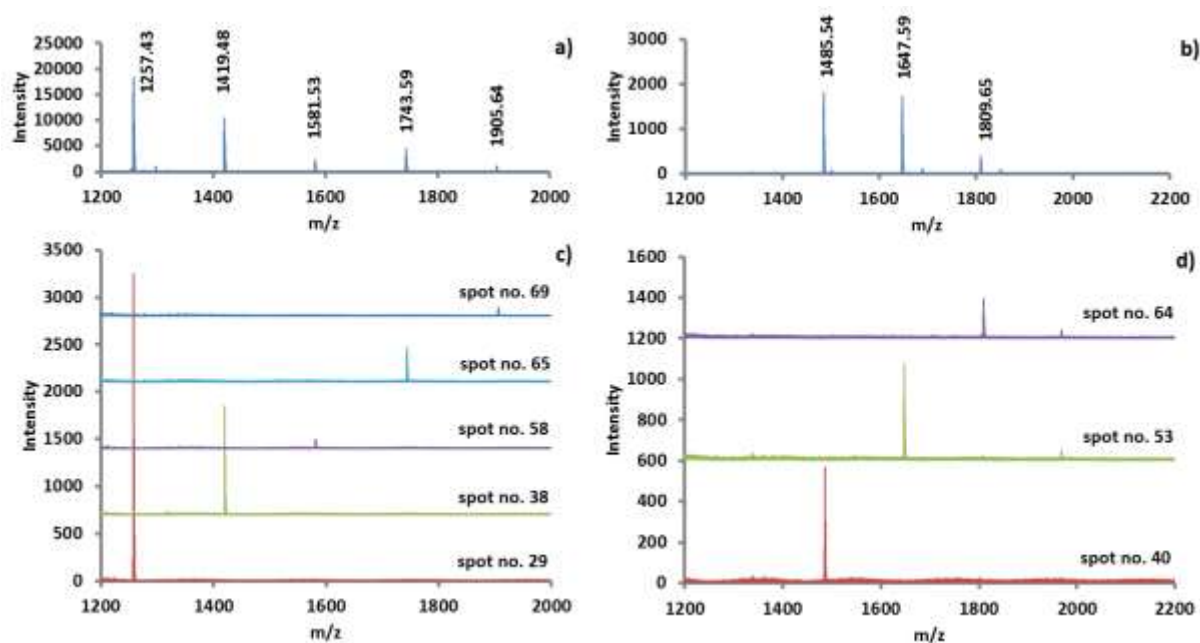


Obrázek 18 – Gradientová separace 0,3 µl směsi nitroesterů (EGDN, DEGDN, NG – 5 mg/l, PETN – 50 mg/l) rozpuštěných ve směsi aceton/voda 10/90 (v/v); Kolona: Kinetex PFP 5 µm 0,1×120 mm, Gradient mobilní fáze vytvořen nasátím 30, 5 a 15 µl směsi o složení 60/40, 35/65 a 10/90 aceton/voda (v/v) do 0,45×400 mm kapiláry, 10µl izokratický úsek odstraněn. Tlak 20 MPa, teplota 27 °C. Použito z Ref. [161] se souhlasem vydavatele.

Dobrou opakovatelnost této separace v módu konstantního tlaku ilustruje **obrázek 18**. Retenční objem byl odvozen od pohybu pístu a relativní směrodatná odchylka byla menší než 0,8 %. Jelikož je v módu konstantního tlaku separace zaznamenána v objemových jednotkách místo jednotek časových, malé změny permeability kolony nemají na opakovatelnost výsledků vliv, jak demonstruje **obrázek 19**, zobrazující separaci při různých hodnotách konstantního tlaku. Uvedené výsledky jednoznačně potvrzují schopnost navrženého chromatografického systému správně a opakovatelně pracovat v režimu dodávání mobilní fáze při konstantním tlaku.



Obrázek 19 – Gradientová separace nitroesterů; Porovnání chromatogramů v (a) časovém a (b) objemovém měřítku. Použito z Ref. [161] se souhlasem vydavatele.



Obrázek 20 – MALDI-MS spektra glykanů odštěpených z (a) RNázy B a (b) hIgG a hmotnostní spektra jednotlivých frakcí HILIC separací glykanů odštěpených z (c) RNázy B a (d) hIgG.

5.2 Miniaturizovaný kapilární kapalinový chromatograf jako základ jednoduchých dvourozměrných separčních systémů

5.2.1 HILIC-MALDI-MS – nástroj pro analýzu glykanů

Glykoproteiny hrají významnou roli v různých biologických funkcích, a proto reprezentují zajímavou skupinu látek pro farmaceutický průmysl. Jejich terapeutická aktivita však závisí na specifické glykoformě. Monitorování glykosylace při produkci relevantních léčiv je proto nezbytnou součástí výrobního procesu a jsou zde vyžadovány efektivní analytické postupy.

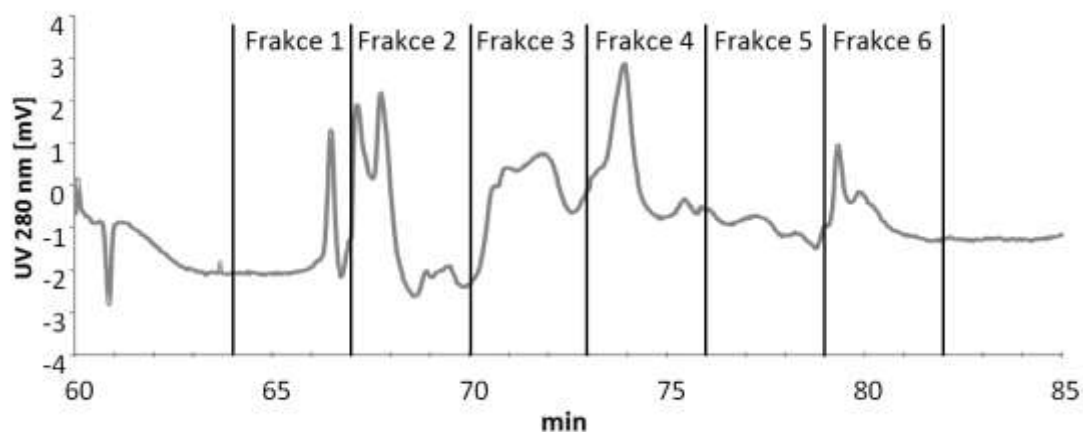
V rámci dizertační práce byla testována metoda pro HILIC-MALDI-MS analýzu glykanů enzymaticky odštěpených z hovězí ribonukleázy B (RNáza B) a lidského imunoglobulinu G (hIgG) využívající miniaturizovaný kapalinový chromatograf ve spojení s nízkonákladovou automatizovanou depoziční jednotkou. Pro eluci glykanů byl připraven gradient 80/20-60/40 acetonitril/voda (v/v) s přídatkem octanu amonného a pro MALDI-MS analýzu byla použita matrice super-DHB, jak bylo popsáno v části 4.2.1.

Obrázek 20 znázorňuje hmotnostní spektra neseparovaných směsí glykanů z RNázy B (**obrázek 20a**) respektive z hIgG (**obrázek 20b**) a hmotnostní spektra získána po analýze spotů deponovaných po HILIC separaci (**obrázek 20c,d**). Chromatografické rozlišení mezi jednotlivými glykany bylo dostatečné (3-10 spotů) a jednotlivé glykany byly detekovány ve 3-5 frakcích. Lze tedy konstatovat, že testovaná kapilární kolona na bázi křemenného monolitu modifikovaného [2-(methacryloyloxy)ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammonium hydroxidem, je vhodná pro vysokou účinnou HILIC separaci glykanů.

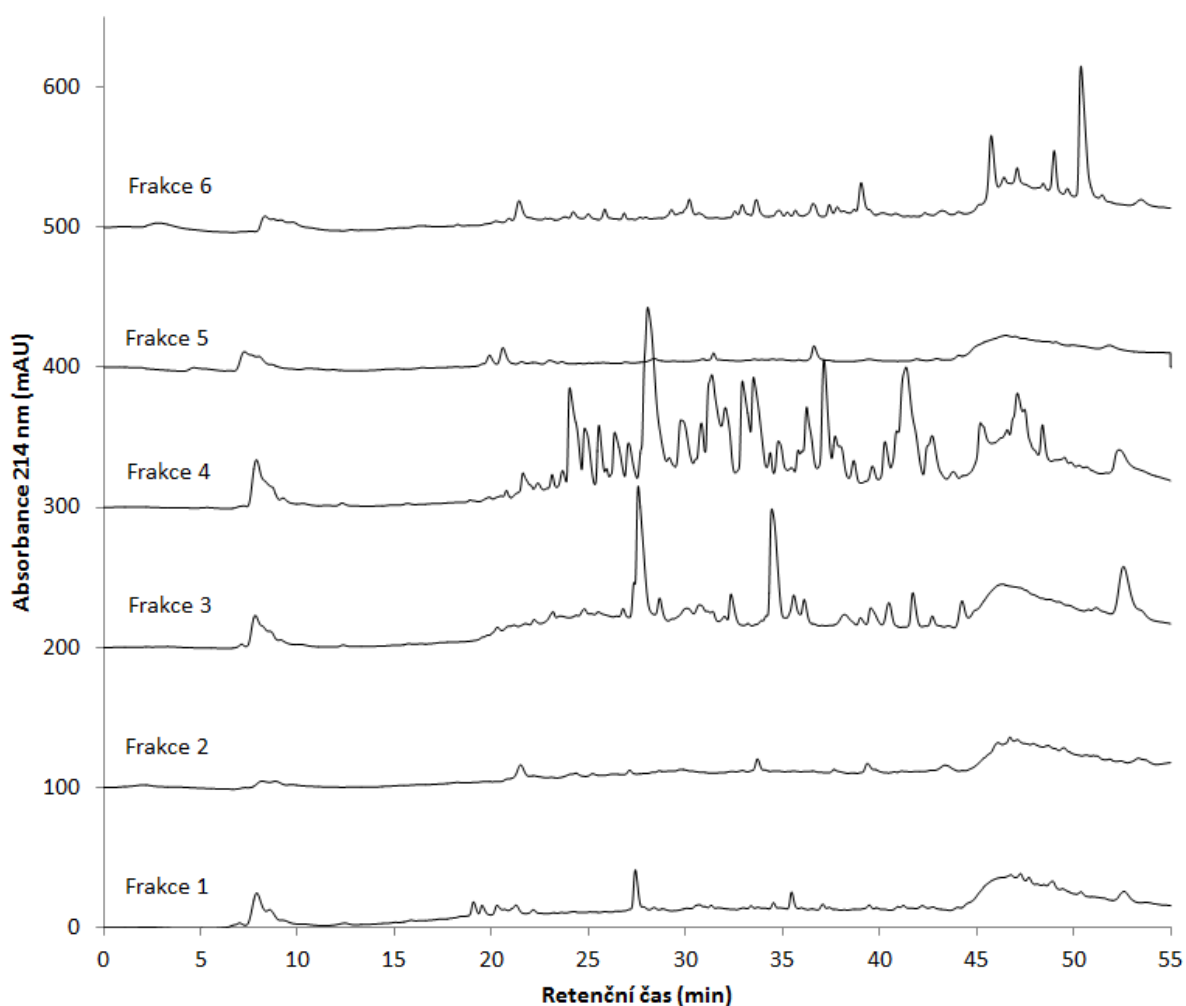
Popularita HILIC chromatografie v posledních letech významně vzrůstá a spojení HILIC s MALDI-MS analýzou představuje nový směr pro studium glykosylace proteinů. Metoda využívající kapilární monolitickou kolonu spojenou s automatizovaným sběrem frakcí na MALDI desku se jeví jako vhodný nástroj pro tuto oblast. Hlavním nedostatkem zde testované metody byl poměrně vysoký detekční limit pro studované glykany, který odpovídal původní koncentraci glykoproteinu přibližně 0,1 g/l. Jako důvod lze uvažovat nízkou rozpustnost glykanů v roztoku s vysokým podílem acetonitrilu a obecně známou nízkou účinnost ionizace těchto látek. V konečném důsledku však toto nemusí být významnou překážkou pro využití navrhované metody ve farmaceutické výrobě, kde lze předpokládat vysoké koncentrace glykoproteinu v monitorovaném vzorku.

5.2.2 Dvourozměrná off-line cIEF-cLC separace peptidů

Směs peptidů získaných tryptickým štěpením BSA byla separována s využitím poloautomatizovaného off-line spojení experimentální cIEF platformy s miniaturizovaným kapalinovým chromatografem. Separace peptidů dle rozdílných izoelektrických bodů v prvním separačním rozměru, cIEF, je znázorněna na **obrázku 21**. Po 60 minutách fokusace byl obsah separační kapiláry mobilizován při průtoku 10 μ l/h a jednotlivé frakce byly dávkovány na monolitické kolony přes selekční ventil. Po ukončení frakcionace byly kolony postupně zapojeny do miniaturizovaného kapalinově-chromatografického systému a byl aplikován gradient mobilní fáze voda-acetonitril. Chromatografická separace peptidů obsažených v jednotlivých frakcích je znázorněna na **obrázku 22**.



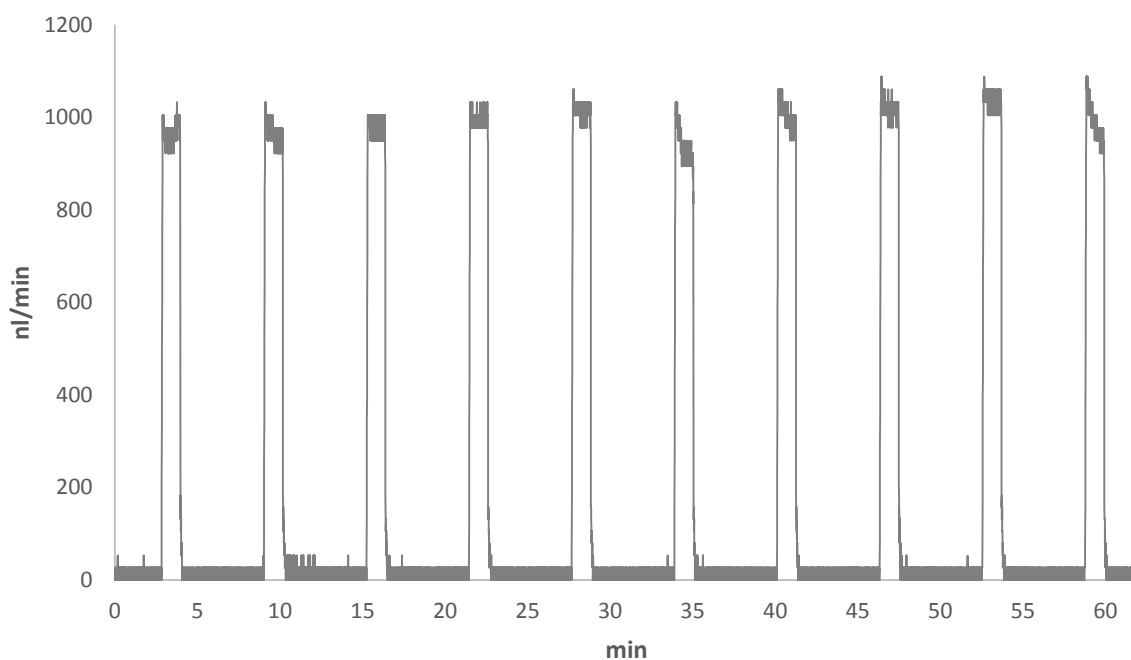
Obrázek 21 – cIEF tryptického digestu BSA; 60 minutová fokusace, 30 kV, separační kapilára – 0,075×570 mm, pokrytí vnitřní stěny hydroxymethylpropylcelulózou; mobilizace 10 μ l/h, frakce dávkovány na záchytné C18 kapilární monolitické kolony 0,1×10 mm.



Obrázek 22 – Separace peptidů frakcionovaných v cIEF v podmínkách RPLC. Separace na kapilární monolitické koloně 0,1×10 mm, 0,2 μ l/min gradient mobilní fáze (20-40 % v/v voda/acetonitril + 0,1 % v/v TFA) vytvořeného a uchovaného v nakloněné 100 μ l stříkačce.

Píková kapacita prvního rozměru je v uvedené konfiguraci dána počtem nasbíraných frakcí, tedy 6. Píková kapacita gradientové RPLC separace ve druhém rozměru byla přibližně 55. Kombinací popsaných podmínek byla realizována off-line 2D separace peptidů s píkovou kapacitou $6 \times 55 = 330$, v čase 7,4 hodin (včetně 60 minut fokusace a 5 minut regenerace kolony před každou analýzou). Produktivita metody tedy byla 45 píků za hodinu.

Je možné uvažovat několik přístupů k dosažení vyšší hodnoty píkové kapacity v popsaném systému. První možností je využití všech 10 portů selekčního ventilu a zvýšení počtu frakcí na 10. Píková kapacita by tedy vzrostla na $10 \times 55 = 550$. Významně by ale také vzrostl čas analýzy, na 11,4 hodin. Produktivita by však zůstala prakticky nezměněna, 48 píků za hodinu. Vhodnějším způsobem je proto zvýšení píkové kapacity separace ve druhé dimenzi při zachování doby separace, například použitím účinnější kolony v kombinaci s vyšším tlakem a teplotou. Pokud budeme uvažovat vysokoúčinnou cLC separaci, kdy pozorujeme píky o průměrné šířce 10 vteřin, bude píková kapacita hodinové analýzy ve druhém rozměru přibližně 360. Celková píková kapacita by tedy vzrostla na $6 \times 360 = 2160$, tedy 6,5 krát vyšší hodnotu dosaženou v nezměněném čase. Při využití kombinace obou přístupů, bude teoretická píková kapacita, dosažitelná v daném off-line spojení cIEF a cLC $10 \times 360 = 3600$, v čase 12,25 hodin (~300 píků za hodinu).



Obrázek 23 – Reakce průtoku měřeného za D1 kolonou $0,1 \times 100$ mm, $3,5 \mu\text{m}$ ZIC-HILIC na 1,5-minutové tlakové pulzy 15 MPa; RSD objemu převedeného do druhé dimenze ($n=10$) 3,3 %.

5.2.3 2D-LC platforma

V této práci byl pro realizaci jednoduché 2D-LC platformy uplatněn přístup, kdy je prostřednictvím tlakového pulzu vytlačen diskretní objem kapaliny z prvního separačního rozměru. Tento je dávkován do druhé dimenze na záchytnou kolonu a zachycené analyty jsou posléze eluovány a separovány ve druhé dimenzi v gradientovém módu.

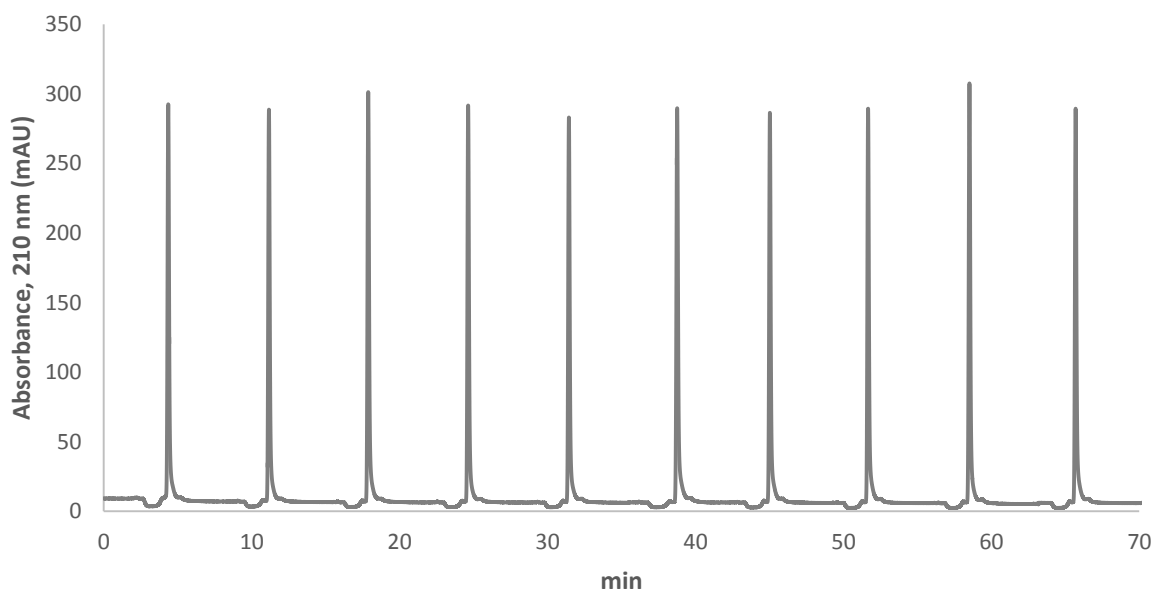
Schopnost navrženého systému opakovatelně vytvářet tlakové pulzy a dávkovat tak frakce z prvního do druhého separačního rozměru je demonstrována na **obrázku 23**, na kterém je zobrazena reakce průtoku roztoku acetonitril/voda 90/10 (v/v) na tlakové pulzy 15 MPa o šířce 1,5 min. Průtok byl měřen za kapilární kolonou (0,1×100 mm, ZIC-HILIC 3,5 μm). Relativní směrodatná odchylka plochy pulzu (dávkovaného objemu) po integraci záznamu byla stanovena na 3,3 %.

Obrázek 24 znázorňuje situaci, kdy má mobilní fáze z první dimenze nízkou eluční sílu ve druhé dimenzi. Nitroglycerin byl z první dimenze eluován roztokem acetonitril/voda 10/90 (v/v) a je patrné, že byl efektivně zakoncentrován (frakce ~1 μl) na C18 záchytné koloně (0,1×10 mm, Kinetex EVO 5 μm) vlivem nízké eluční síly roztoku acetonitril/voda 10/90 (v/v) ve druhé dimenzi. V případě, že je mobilní fáze z první dimenze schopna eluovat analyt i ve druhé dimenzi, nastává situace zobrazená na **obrázku 25a**. Nitroglycerin zde byl z první dimenze eluován roztokem acetonitril/voda 50/50 (v/v). Je patrné, že tento analyt nebyl na záchytné koloně zakoncentrován, ale vznikla relativně široká zóna mající za následek nízkou účinnost ve druhé dimenzi.

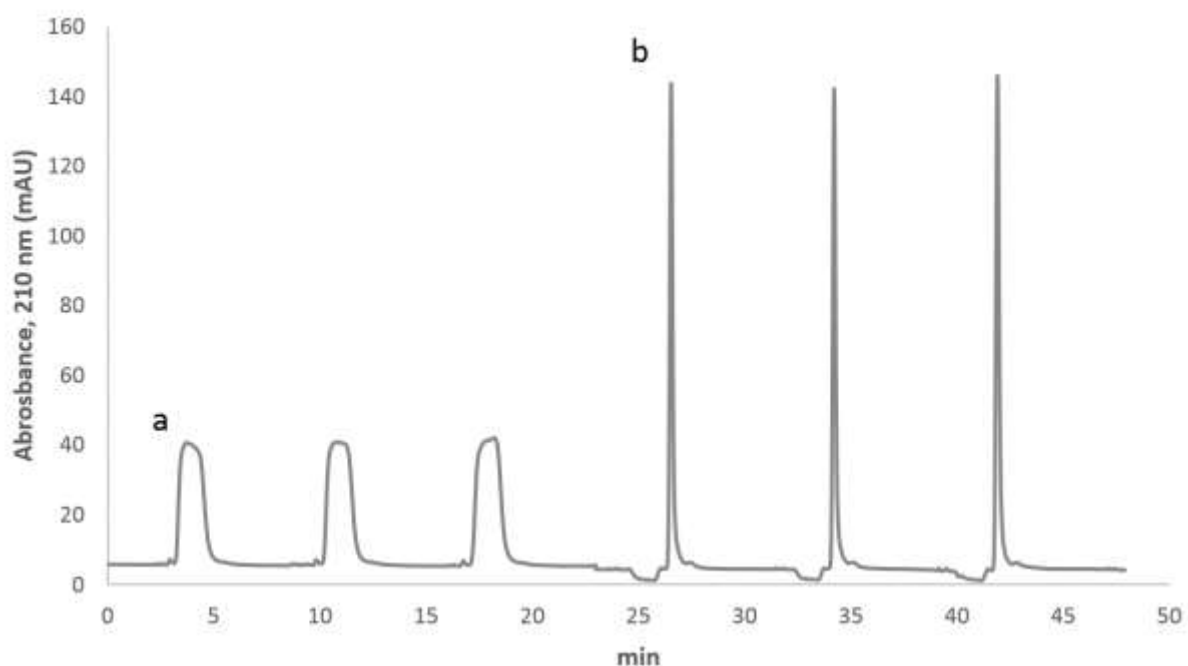
Pro zvýšení retence nitroglycerinu na předkolonce, byl tok mobilní fáze z první dimenze naředěn tokem vody v poměru přibližně 1:10. Úzké píky na **obrázku 25b** indikují dostatečný nárůst retence nitroglycerinu, který tak byl z dávkované frakce efektivně zafokusován na záchytné koloně druhé dimenze. Z obrázku je částečně patrné, že plocha píků po naředění frakce poklesla. Tento pokles indikuje, že na záchytnou kolonu byla z první dimenze nadávkována frakce o menším objemu. Vysvětlení je jednoduché. Vlivem přídavného toku vody totiž částečně vzrostl hydraulický odpor, a jelikož je první dimenze realizována v podmínkách konstantního tlaku, úměrně zde poklesl průtok mobilní fáze. Z celkového pohledu toto nepředstavuje překážku, jelikož v uvedeném systému je klíčová zejména opakovatelnost frakcionace a skutečný objem frakce může být doladěn změnou šířky tlakového pulzu, případně změnou tlaku.

Správnost funkce uvažovaného konceptu 2D-LC systému byla ještě potvrzena dvourozměrnou separací testovací směsi pěti peptidů v systému HILIC-RPLC, která je znázorněna na **obrázku 26**. Dávkování roztoku vzorku peptidů do 2D-LC systému bylo realizováno manuálně, naplněním vnitřního objemu selekčního ventilu, spojujícího sousední porty. Dávkovaný objem činil přibližně 60 nl (RSD plochy píku při dávkování acetonu byla stanovena na 3 %).

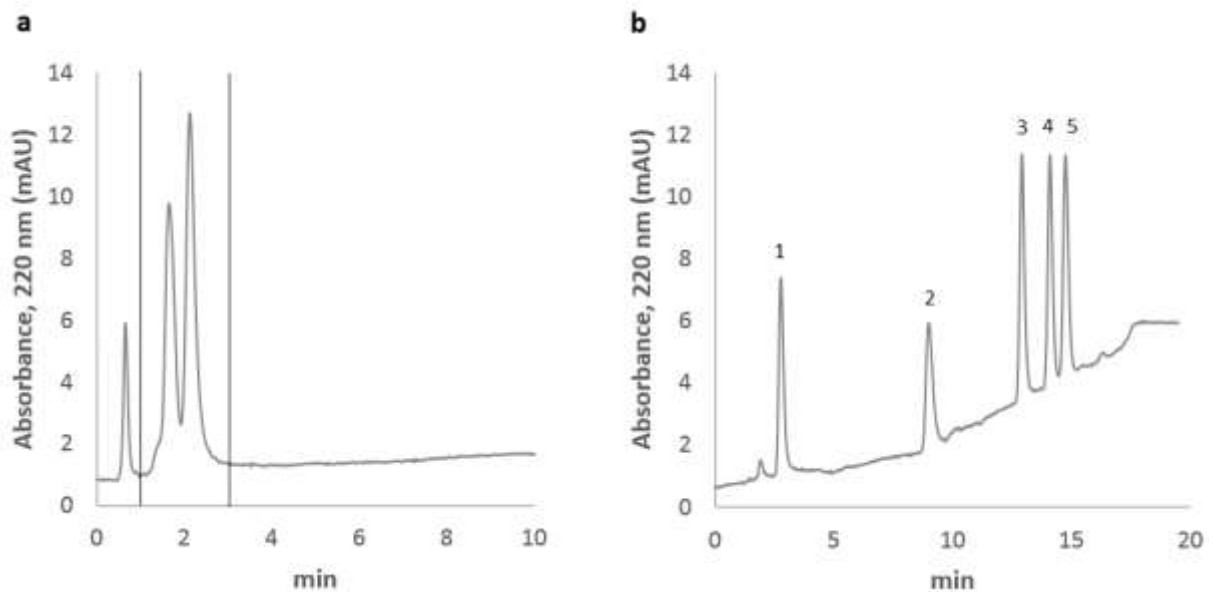
Peptidy byly z D1 kolony (0,1×100 mm ZIC-HILIC 3,5 μm) eluovány roztokem acetonitril/voda/100 mM CH₃COO-NH₄⁺ 60/45/5 (v/v/v). Pro dávkování frakcí do druhé dimenze byly aplikovány dvouminutové 20MPa tlakové pulzy.



Obrázek 24 – Opakované dávkování roztoku acetonitril/voda 10/90 (v/v) s obsahem NG 0,01 g/l z první do druhé dimenze; Aplikace minutových tlakových pulzů 20 MPa. Eluce ve druhé dimenzi roztokem acetonitril/voda 50/50 (v/v), 1 μ l/min. Teplota 27 °C. Detekce 210 nm. RSD plochy píků (n=10) 4 %.



Obrázek 25 – (a) Opakované dávkování roztoku acetonitril/voda 50/50 (v/v) s obsahem NG 0,01 g/l z první do druhé dimenze; (b) On-line ředění frakce vodou v přibližném poměru 1:10; Aplikace minutových tlakových pulzů 20 MPa. Eluce ve druhé dimenzi roztokem acetonitril/voda 50/50 (v/v), 1 μ l/min. Teplota 27 °C. Detekce 210 nm.



Obrázek 26 – (a) HILIC separace směsi peptidů a znázornění frakce dávkované do druhé dimenze; Kolona 0,1×100 mm ZIC-HILIC 3,5 μm, mobilní fáze acetonitril/voda/100 mM CH₃COO·NH₄⁺ 60/35/5 (v/v/v), eluce při konstantním tlaku 20 MPa. (b) RPLC separace frakce nadávkované z první dimenze dvouminutovým tlakovým pulzem 20 MPa; on-line naředění frakce vodou v poměru 1:10, fokusace na předkoloně 0,1×10 mm Kinetex EVO C18 5 μm, separace na koloně 0,1×100 mm Kinetex EVO C18 5 μm gradientem 5/95 – 40/60 acetonitril/voda (v/v), 1 μl/min, teplota 28 °C, detekce 220 nm; 1 – GLY-TYR, 2 – VAL-TYR-VAL, 3 – Methionin-enkefalin acetát, 4 – Leucin-enkefalin, 5 – Angiotenzin II acetát.

Píkovou kapacitu popsaného 2D-LC systému lze odhadnout jako násobek počtu frakcí převedených z první dimenze a píkové kapacity separace ve druhé dimenzi. Rozdělení separace první dimenze na vysoký počet frakcí není příliš výhodné, jelikož se tím značně prodlouží celková doba 2D-LC analýzy. Pokud budeme pro separaci v první dimenzi uvažovat 15 μl gradient, systém je schopen vytvořit např. 10 individuálních 1,5 μl frakcí. V realizovaném experimentu (**obrázek 26b**) byla píková kapacita separace v ~15min gradientu ve druhé dimenzi přibližně 33. Za těchto podmínek by teoretická píková kapacita 2D-LC separace dosáhla hodnoty $10 \times 33 = 330$ v čase přibližně 3,3 hodiny, tedy 100 píků za hodinu. Při realizaci hodinové analýzy ve druhém rozměru s píkovou kapacitou 360, lze pro ortogonální separace uvažovat teoretickou píkovou kapacitu $10 \times 360 = 3600$, v čase 10,9 hodiny (330 píků za hodinu).

Nevýhodou frakcionace aplikované v první dimenzi, kdy objem frakce je větší než objem píku, je skutečnost, že dochází ke ztrátě chromatografického rozlišení dosaženého v první dimenzi a bez využití druhého detektoru, nelze získat záznam separace v prvním rozměru. V porovnání s několikanásobným vzorkováním píku, kdy záznam separace v prvním rozměru lze zpětně zrekonstruovat, je zde použitý přístup výhodnější z hlediska nižších limitů detekce. V navrženém systému je totiž pík rozdělen nanejvýš do dvou frakcí, z nichž jedna vždy zahrnuje minimálně 50 % objemu píku. Nedochozí tedy k tak významnému zředění píku při přenosu mezi dimenzemi.

6 ZÁVĚR

V dizertační práci byla studována problematika vícerozměrných separací v kapalně fázi. Na základě studia relevantních původních prací, byl v teoretické části práce shrnut současný stav poznání v této problematice. Uvedeny byly způsoby hodnocení píkovej kapacity a ortogonalita separačních systémů. Diskutovány byly různé přístupy k realizaci dvourozměrných separací založené na kombinaci různých separačních mechanismů a rovněž význam hmotnostní spektrometrie jako další dimenze.

V experimentální části práce byla řešena konstrukce zjednodušeného miniaturizovaného kapalinového chromatografu. Tento koncept, vyvinutý původně jako izoktratický systém, byl rozšířen o možnosti přípravy gradientů mobilní fáze. Správná a opakovatelná funkce systému byla demonstrována na gradientové separaci směsi alkylfenonů a peptidů z tryptického digestu BSA a směsi nitroláték v režimech konstantního průtoku i konstantního tlaku.

Vyvinutý miniaturizovaný LC systém byl použit jako základ několika dvourozměrných separačních platforem. V kombinaci s nízkonákladovou jednotkou pro depozici na MALDI desky byl systém vyžit při ověřování HILIC-MALDI-MS metody pro analýzu glykanů enzymaticky uvolněných z hovězí RNázy B či lidského imunoglobulinu G. Dále byla provedena dvourozměrná separace peptidů z tryptického digestu BSA na jednoduché platformě využívající off-line spojení kapilární izoelektrické fokusace s vyvinutým gradientovým miniaturizovaným LC systémem. Na základě popsaných vlastností miniaturizovaného LC systému byla navržena a sestavena 2D-LC platforma umožňující realizaci dvourozměrné kapalinové chromatografie v módech IEC×RPLC, RPLC×RPLC a HILIC×RPLC. Byla demonstrována správná funkce systému při převodu frakcí z prvního separačního rozměru do druhé dimenze, efektivní záchyt analytů na záchytné koloně a účinná separace ve druhé dimenzi.

Všechny demonstrováné jednoduché separační platformy lze označit za funkční a relativně levné alternativy k tradičním systémům. Navržené platformy jsou relativně snadno proveditelné a mohou být užitečné všude tam, kde je požadavek na realizaci dvourozměrné separace a kde chybí odpovídající specializovaná instrumentace (např. studenti vysokých škol). Na druhé straně je nutno uvést, že prezentované konfigurace nejsou bez nedostatků. Navržený miniaturizovaný kapalinově-chromatografický systém například není příliš vhodný na dávkování nanolitrových objemů vzorku. Fyzicky je možné takto malé objemy do systému dávkovat, dochází ale k značnému naředění ve vnitřním objemu použitého selekčního ventilu. Je proto lepší dávkovat větší objemy vzorku a využít výhod fokusačního efektu. Jednoduchý princip funkce systému rovněž nedovoluje přípravu jakéhokoliv profilu gradientu mobilní fáze, i když toto je částečně možné vhodnou volbou složení vstupních roztoků. Z principu funkce také vyplývá omezení pro objem gradientu, který lze připravit. I navzdory těmto nedostatkům, představují popsané konfigurace významné zjednodušení kapalinově-chromatografické instrumentace při zachování všech základních funkcí.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANNESLEY, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(7), 1041-1044.
- [2] ANTIGNAC, J. P. – DE WASCH, K. – MONTEAU, F. – DE BRABANDER, H. – ANDRE, F. – LE BIZEC, B. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529(1-2), 129-136.
- [3] DAVIES, I. L. – MARKIDES, K. E. – LEE, M. L. – RAYNOR, M. W. – BARTLE, K. D. APPLICATIONS OF COUPLED LC-GC - A REVIEW. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography*, 1989, 12(4), 193-207.
- [4] DUGO, P. – DUGO, G. – MONDELLO, L. On-line coupled LC-GC: Theory and applications. *Lc Gc Europe*, 2003, 16(12A), 35-43.
- [5] JANSSEN, H. G. – DE KONING, S. – BRINKMAN, U. A. T. On-line LC-GC and comprehensive two-dimensional LCxGC-ToF MS for the analysis of complex samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(8), 1944-1947.
- [6] ESCHE, R. – SCHOLZ, B. – ENGEL, K.-H. Online LC-GC Analysis of Free Sterols/Stanol and Intact Steryl/Stanyl Esters in Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(46), 10932-10939.
- [7] PURCARO, G. – MORET, S. – CONTE, L. Sample pre-fractionation of environmental and food samples using LC-GC multidimensional techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 43, 146-160.
- [8] HERRERO, M. – IBANEZ, E. – CIFUENTES, A. – BERNAL, J. Multidimensional chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(43), 7110-7129.
- [9] GIDDINGS, J. C. MAXIMUM NUMBER OF COMPONENTS RESOLVABLE BY GEL FILTRATION AND OTHER ELUTION CHROMATOGRAPHIC METHODS. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8), 1027-&.
- [10] NEUE, U. D. Peak capacity in unidimensional chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1184(1-2), 107-130.
- [11] NEUE, U. D. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1079(1-2), 153-161.
- [12] WREN, S. A. C. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38(2), 337-343.
- [13] DOLAN, J. W. – SNYDER, L. R. – DJORDJEVIC, N. M. – HILL, D. W. – WAEGHE, T. J. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time I. Peak capacity limitations. *Journal of Chromatography A*, 1999, 857(1-2), 1-20.
- [14] MARCHETTI, N. – CAVAZZINI, A. – GRITTI, F. – GUIOCHON, G. Gradient elution separation and peak capacity of columns packed with porous shell particles. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1163(1-2), 203-211.
- [15] WANG, X. L. – BARBER, W. E. – CARR, P. W. A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1107(1-2), 139-151.

- [16] YAN, X. – GILMAN, S. D. Improved peak capacity for CE separations of enzyme inhibitors with activity-based detection using magnetic bead microreactors. *Electrophoresis*, 2010, 31(2), 346-354.
- [17] GILAR, M. – DALY, A. E. – KELE, M. – NEUE, U. D. – GEBLER, J. C. Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1061(2), 183-192.
- [18] MARTIN, A. J. – SYNGE, R. L. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *The Biochemical journal*, 1941, 35(12), 1358-1368.
- [19] GLUECKAUF, E. THEORY OF CHROMATOGRAPHY .9. THE THEORETICAL PLATE CONCEPT IN COLUMN SEPARATIONS. *Transactions of the Faraday Society*, 1955, 51(1), 34-44.
- [20] SNYDER, L. R. – KIRKLAND, J. J. – DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Edition ed.: Wiley, 2011. ISBN 9781118210390.
- [21] FORET, F. – KRIVANKOVA, L. – BOCEK, P. *Capillary zone electrophoresis*. Edition ed.: VCH, 1993. ISBN 9781560817659.
- [22] MEDVED, A. – DORMAN, F. – KAUFMAN, S. L. – PÖCHER, A. A new corona-based charger for aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 2000, 31, Supplement 1, 616-617.
- [23] DIXON, R. W. – PETERSON, D. S. Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(13), 2930-2937.
- [24] FEKETE, S. – GUILLARME, D. – DONG, M. W. Superficially Porous Particles: Perspectives, Practices, and Trends. *Lc Gc North America*, 2014, 32(6), 420-+.
- [25] SCHURE, M. R. – RAFFERTY, J. L. – ZHANG, L. – SIEPMANN, J. I. How Reversed-Phase Liquid Chromatography Works. *Lc Gc North America*, 2013, 31(8), 630-637.
- [26] MORI, S. – BARTH, H. G. *Size Exclusion Chromatography*. Edition ed.: Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN 9783662039106.
- [27] BEESLEY, T. E. – SCOTT, R. P. W. *Chiral Chromatography*. Edition ed.: Wiley, 1998. ISBN 9780471974277.
- [28] WANG, P. G. – HE, W. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications*. Edition ed.: Taylor & Francis, 2011. ISBN 9781439807538.
- [29] SNYDER, L. R. – DOLAN, J. W. *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. Edition ed.: Wiley, 2007. ISBN 9780470055519.
- [30] SLUYTERMAN, L. A. A. – ELGERSMA, O. CHROMATOFOCUSING - ISOELECTRIC-FOCUSING ON ION-EXCHANGE COLUMNS .1. GENERAL PRINCIPLES. *Journal of Chromatography*, 1978, 150(1), 17-30.
- [31] SLUYTERMAN, L. A. A. – WIJDENES, J. CHROMATOFOCUSING - ISOELECTRIC-FOCUSING ON ION-EXCHANGE COLUMNS .2.

- EXPERIMENTAL-VERIFICATION. *Journal of Chromatography*, 1978, 150(1), 31-44.
- [32] KASICKA, V. Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické Listy*, 1997, 91(5), 320-329.
- [33] ROMAN, G. T. – MCDANIEL, K. – CULBERTSON, C. T. High efficiency micellar electrokinetic chromatography of hydrophobic analytes on poly(dimethylsiloxane) microchips. *Analyst*, 2006, 131(2), 194-201.
- [34] JORGENSON, J. W. – LUKACS, K. D. HIGH-RESOLUTION SEPARATIONS BASED ON ELECTROPHORESIS AND ELECTROOSMOSIS. *Journal of Chromatography*, 1981, 218(1-3), 209-216.
- [35] KLEPARNIK, K. Recent advances in the combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: From element to single-cell analysis. *Electrophoresis*, 2013, 34(1), 70-85.
- [36] KREMSER, L. – BLAAS, D. – KENNDLER, E. Virus analysis using electromigration techniques. *Electrophoresis*, 2009, 30(1), 133-140.
- [37] PETR, J. – MAIER, V. Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 31, 9-22.
- [38] HJERTEN, S. – ZHU, M. D. ADAPTATION OF THE EQUIPMENT FOR HIGH-PERFORMANCE ELECTROPHORESIS TO ISOELECTRIC-FOCUSING. *Journal of Chromatography*, 1985, 346(OCT), 265-270.
- [39] GARFIN, D. E. – AHUJA, S. *Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics*. Edition ed.: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 9780120887521.
- [40] RODRIGUEZ-DIAZ, R. – WEHR, T. – ZHU, M. D. Capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 1997, 18(12-13), 2134-2144.
- [41] MAZZEO, J. R. – KRULL, I. S. COATED CAPILLARIES AND ADDITIVES FOR THE SEPARATION OF PROTEINS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS AND CAPILLARY ISOELECTRIC-FOCUSING. *Biotechniques*, 1991, 10(5), 638-&.
- [42] YAO, X. W. – REGNIER, F. E. POLYMER-COATED AND SURFACTANT-COATED CAPILLARIES FOR ISOELECTRIC-FOCUSING. *Journal of Chromatography*, 1993, 632(1-2), 185-193.
- [43] GAO, L. – LIU, S. R. Cross-linked polyacrylamide coating for capillary isoelectric focusing. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(24), 7179-7186.
- [44] SHEN, Y. F. – SMITH, R. D. High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries. *Journal of Microcolumn Separations*, 2000, 12(3), 135-141.
- [45] KOBAYASHI, H. – AOKI, M. – SUZUKI, M. – YANAGISAWA, A. – ARAI, E. Evaluation of pH gradient formation of carrier ampholytes with synthesized isoelectric point markers in capillary isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A*, 1997, 772(1-2), 137-144.
- [46] YANG, C. – WANG, S. – CHANG, C. – WANG, Y. – HU, X. Capillary Isoelectric Focusing with an Open Tubular Immobilized pH Gradient. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(5), 1580-1583.

- [47] WANG, T. – MA, J. – ZHU, G. – SHAN, Y. – LIANG, Z. – ZHANG, L. – ZHANG, Y. Integration of capillary isoelectric focusing with monolithic immobilized pH gradient, immobilized trypsin microreactor and capillary zone electrophoresis for on-line protein analysis. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(20), 3194-3200.
- [48] SLAIS, K. – FRIEDL, Z. LOW-MOLECULAR-MASS PI MARKERS FOR ISOELECTRIC-FOCUSING. *Journal of Chromatography A*, 1994, 661(1-2), 249-256.
- [49] SLAIS, K. – HORKA, M. – NOVACKOVA, J. – FRIEDL, Z. Fluorescein-based pl markers for capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2002, 23(11), 1682-1688.
- [50] ZHU, M. D. – RODRIGUEZ, R. – WEHR, T. OPTIMIZING SEPARATION PARAMETERS IN CAPILLARY ISOELECTRIC-FOCUSING. *Journal of Chromatography*, 1991, 559(1-2), 479-488.
- [51] SHEN, Y. F. – BERGER, S. J. – ANDERSON, G. A. – SMITH, R. D. High-efficiency capillary isoelectric focusing of peptides. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(9), 2154-2159.
- [52] HOFMANN, O. – CHE, D. P. – CRUICKSHANK, K. A. – MULLER, U. R. Adaptation of capillary isoelectric focusing to microchannels on a glass chip. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(3), 678-686.
- [53] CUI, H. C. – HORIUCHI, K. – DUTTA, P. – IVORY, C. F. Isoelectric focusing in a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(5), 1303-1309.
- [54] CAO, J. – SUN, W. – GONG, F. – LIU, W. Charge profiling and stability testing of biosimilar by capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 2014, 35(10), 1461-1468.
- [55] EVERAERTS, F. M. – BECKERS, J. L. – VERHEGGEN, T. P. E. M. *Isotachopheresis: Theory, Instrumentation and Applications*. Edition ed.: Elsevier Science, 2011. ISBN 9780080858067.
- [56] DUNN, M. J. *Gel Electrophoresis of Proteins*. Edition ed.: Elsevier Science, 2014. ISBN 9781483193540.
- [57] BIRREN, B. – LAI, E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide*. Edition ed.: Elsevier Science, 2012. ISBN 9780323137621.
- [58] LURIE, I. S. – CONVER, T. S. – FORD, V. L. Simultaneous separation of acidic, basic, and neutral organic compounds, including strong and moderate acids and bases, by capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(21), 4563-4569.
- [59] EELTINK, S. – KOK, W. T. Recent applications in capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 2006, 27(1), 84-96.
- [60] MIKSIK, I. – SEDLAKOVA, P. Capillary electrochromatography of proteins and peptides. *Journal of Separation Science*, 2007, 30(11), 1686-1703.
- [61] YAN, C. – DADOO, R. – ZHAO, H. – ZARE, R. N. – RAKESTRAW, D. J. CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY - ANALYSIS OF POLYCYCLIC AROMATIC-HYDROCARBONS. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(13), 2026-2029.
- [62] DITTMANN, M. M. – ROZING, G. P. Capillary electrochromatography - A high-efficiency micro-separation technique. *Journal of Chromatography A*, 1996, 744(1-2), 63-74.

- [63] DADOO, R. – ZARE, R. N. – YAN, C. – ANEX, D. S. Advances in capillary electrochromatography: Rapid and high-efficiency separations of PAHs. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(22), 4787-4792.
- [64] KNOX, J. H. – BOUGHTFLOWER, R. Capillary electrochromatography - the LC analogue of capillary GC. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2000, 19(11), 643-647.
- [65] GUNASENA, D. N. – EL RASSI, Z. Organic monoliths for hydrophilic interaction electrochromatography/chromatography and immunoaffinity chromatography. *Electrophoresis*, 2012, 33(1), 251-261.
- [66] KARENGA, S. – EL RASSI, Z. Trends in nonpolar polymer-based monolithic columns for reversed-phase capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 2011, 32(1), 90-104.
- [67] STULIK, K. – PACAKOVA, V. – SUCHANKOVA, J. – COUFAL, P. Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2006, 841(1-2), 79-87.
- [68] GUIHEN, E. – GLENNON, J. D. Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1044(1-2), 67-81.
- [69] TERABE, S. – OTSUKA, K. – ICHIKAWA, K. – TSUCHIYA, A. – ANDO, T. ELECTROKINETIC SEPARATIONS WITH MICELLAR SOLUTIONS AND OPENTUBULAR CAPILLARIES. *Analytical Chemistry*, 1984, 56(1), 111-113.
- [70] BERTHOD, A. – GARCIA-ALVAREZ-COQUE, C. *Micellar Liquid Chromatography*. Edition ed.: Taylor & Francis, 2000. ISBN 9780824799939.
- [71] GIDDINGS, J. C. CONCEPTS AND COMPARISONS IN MULTIDIMENSIONAL SEPARATION. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 1987, 10(5), 319-323.
- [72] DAVIS, J. M. – GIDDINGS, J. C. STATISTICAL-THEORY OF COMPONENT OVERLAP IN MULTICOMPONENT CHROMATOGRAMS. *Analytical Chemistry*, 1983, 55(3), 418-424.
- [73] DAVIS, J. M. Statistical-overlap theory for elliptical zones of high aspect ratio in comprehensive two-dimensional separations. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(4), 347-359.
- [74] LIU, Z. Y. – PATTERSON, D. G. – LEE, M. L. GEOMETRIC APPROACH TO FACTOR-ANALYSIS FOR THE ESTIMATION OF ORTHOGONALITY AND PRACTICAL PEAK-CAPACITY IN COMPREHENSIVE 2-DIMENSIONAL SEPARATIONS. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(21), 3840-3845.
- [75] SLONECKER, P. J. – LI, X. D. – RIDGWAY, T. H. – DORSEY, J. G. Informational orthogonality of two dimensional chromatographic separations. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(4), 682-689.
- [76] SHANNON, C. E. A MATHEMATICAL THEORY OF COMMUNICATION. *Bell System Technical Journal*, 1948, 27(3), 379-423.
- [77] GILAR, M. – OLIVOVA, P. – DALY, A. E. – GEBLER, J. C. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(19), 6426-6434.

- [78] WATSON, N. E. – DAVIS, J. M. – SYNOVEC, R. E. Observations on "orthogonality" in comprehensive two-dimensional separations. *Analytical chemistry*, 2007, 79(20), 7924-7927.
- [79] POURHAGHIGHI, M. R. – KARZAND, M. – GIRAULT, H. H. Orthogonality of Two-Dimensional Separations Based on Conditional Entropy. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(20), 7676-7681.
- [80] COVER, T. M. – THOMAS, J. A. *Elements of Information Theory*. Edition ed.: Wiley, 2012. ISBN 9781118585771.
- [81] KOEHLING, H. L. – BITTNER, A. – MUELLER, K.-D. – BUER, J. – BECKER, M. – RUEBBEN, H. – RETTENMEIER, A. W. – MOSEL, F. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61(3), 339-344.
- [82] GUIOCHON, G. – MARCHETTI, N. – MRIZIQ, K. – SHALLIKER, R. A. Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1189(1-2), 109-168.
- [83] CONSDEN, R. – GORDON, A. H. – MARTIN, A. J. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *The Biochemical journal*, 1944, 38(3), 224-232.
- [84] DURRUM, E. L. 2-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS AND IONOPHORESIS. *Journal of Colloid Science*, 1951, 6(3), 274-290.
- [85] WOUTERS, B. – SCHOENMAKERS, P. J. – EELTINK, S. 2014. Design of a Microfluidic Chip for Spatial Three Dimensional Liquid Chromatography Separations. In *Proceedings of the 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, San Antonio, Texas, USA2014, 2366-2368.
- [86] LEE, C. – ZANG, J. – CUFF, J. – MCGACHY, N. – NATISHAN, T. K. – WELCH, C. J. – HELMY, R. – BERNARDONI, F. Application of Heart-Cutting 2D-LC for the Determination of Peak Purity for a Chiral Pharmaceutical Compound by HPLC. *Chromatographia*, 2013, 76(1-2), 5-11.
- [87] MURPHY, R. E. – SCHURE, M. R. – FOLEY, J. P. Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(8), 1585-1594.
- [88] TRUDGETT, M. J. E. – GUIOCHON, G. – SHALLIKER, R. A. Theoretical description of a new analytical technique: Comprehensive online multidimensional fast Fourier transform separations. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(22), 3545-3554.
- [89] MAYFIELD, K. J. – SHALLIKER, R. A. – CATCHPOOLE, H. J. – SWEENEY, A. P. – WONG, V. – GUIOCHON, G. Viscous fingering induced flow instability in multidimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1080(2), 124-131.
- [90] COHEN, S. A. – SCHURE, M. R. *Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences*. Edition ed.: Wiley, 2008. ISBN 9780470276259.

- [91] BACZEK, T. Chemometric evaluation of relationships between retention and physicochemical parameters in terms of multidimensional liquid chromatography of peptides. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(4), 547-554.
- [92] YANG, F. – SHEN, Y. – CAMP, D. G., II – SMITH, R. D. High-pH reversed-phase chromatography with fraction concatenation for 2D proteomic analysis. *Expert Review of Proteomics*, 2012, 9(2), 129-134.
- [93] VISSERS, J. P. C. – VAN SOEST, R. E. J. – CHERVET, J. P. – CRAMERS, C. A. Two-dimensional capillary liquid chromatography based on microfractionation. *Journal of Microcolumn Separations*, 1999, 11(4), 277-286.
- [94] BLAHOVA, E. – JANDERA, P. – CACCIOLA, F. – MONDELLO, L. Two-dimensional and serial column reversed-phase separation of phenolic antioxidants on octadecyl-, polyethyleneglycol-, and pentafluorophenylpropyl-silica columns. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(4), 555-566.
- [95] DUGO, P. – KUMM, T. – CRUPI, M. L. – COTRONEO, A. – MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112(1-2), 269-275.
- [96] DIXON, S. P. – PITFIELD, I. D. – PERRETT, D. Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: a review. *Biomedical Chromatography*, 2006, 20(6-7), 508-529.
- [97] DUGO, P. – CACCIOLA, F. – KUMM, T. – DUGO, G. – MONDELLO, L. Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1184(1-2), 353-368.
- [98] WOUTERS, B. – DE VOS, J. – DESMET, G. – TERRY, H. – SCHOENMAKERS, P. J. – EELTINK, S. Design of a microfluidic device for comprehensive spatial two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 2015, 38(7), 1123-1129.
- [99] DAI, L. – LI, C. – SHEDDEN, K. A. – MISEK, D. E. – LUBMAN, D. M. Comparative proteomic study of two closely related ovarian endometrioid adenocarcinoma cell lines using cIEF fractionation and pathway analysis. *Electrophoresis*, 2009, 30(7), 1119-1131.
- [100] BUSHEY, M. M. – JORGENSON, J. W. AUTOMATED INSTRUMENTATION FOR COMPREHENSIVE 2-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS. *Analytical Chemistry*, 1990, 62(2), 161-167.
- [101] MOORE, A. W. – JORGENSON, J. W. RAPID COMPREHENSIVE 2-DIMENSIONAL SEPARATIONS OF PEPTIDES VIA RPLC OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(19), 3448-3455.
- [102] LEMMO, A. V. – JORGENSON, J. W. 2-DIMENSIONAL PROTEIN SEPARATION BY MICROCOLUMN SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS. *Journal of Chromatography*, 1993, 633(1-2), 213-220.
- [103] CHEN, J. Z. – LEE, C. S. – SHEN, Y. F. – SMITH, R. D. – BAEHRECKE, E. H. Integration of capillary isoelectric focusing with capillary reversed-phase liquid chromatography for two-dimensional proteomics separation. *Electrophoresis*, 2002, 23(18), 3143-3148.

- [104] CHEN, J. Z. – BALGLEY, B. M. – DEVOE, D. L. – LEE, C. S. Capillary isoelectric focusing-based multidimensional concentration/separation platform for proteome analysis. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(13), 3145-3152.
- [105] ZHOU, F. – JOHNSTON, M. V. Protein characterization by on-line capillary Isoelectric focusing, reversed-phase liquid chromatography, and mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(10), 2734-2740.
- [106] SUN, L. – DUAN, J. – TAO, D. – LIANG, Z. – ZHANG, W. – ZHANG, L. – ZHANG, Y. A facile microdialysis interface for on-line desalting and identification of proteins by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(15), 2391-2397.
- [107] WANG, T. – MA, J. – WU, S. – YUAN, H. – ZHANG, L. – LIANG, Z. – ZHANG, Y. Integrated platform of capillary isoelectric focusing, trypsin immobilized enzyme microreactor and nanoreversed-phase liquid chromatography with mass spectrometry for online protein profiling. *Electrophoresis*, 2011, 32(20), 2848-2856.
- [108] LI, M. – ZHOU, J. – GU, X. – WANG, Y. – HUANG, X. – YAN, C. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets. *Journal of Separation Science*, 2009, 32(2), 267-274.
- [109] WEI, J. – GU, X. – WANG, Y. – WU, Y. – YAN, C. Two-dimensional separation system by on-line hyphenation of capillary isoelectric focusing with pressurized capillary electrochromatography for peptide and protein mapping. *Electrophoresis*, 2011, 32(2), 230-237.
- [110] RAMSEY, J. D. – JACOBSON, S. C. – CULBERTSON, C. T. – RAMSEY, J. M. High-efficiency, two-dimensional separations of protein digests on microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(15), 3758-3764.
- [111] KANIANSKY, D. – MARAK, J. – MADAJOVA, V. – SIMUNICOVA, E. CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS OF COMPLEX IONIC MIXTURES WITH ONLINE ISOTACHOPHORETIC SAMPLE PRETREATMENT. *Journal of Chromatography*, 1993, 638(2), 137-146.
- [112] MIKUS, P. – MARAKOVA, K. – VEIZEROVA, L. – PIESTANSKY, J. – GALBA, J. – HAVRANEK, E. 2D Capillary Electrophoresis Hyphenated with Spectral Detection for the Determination of Quinine in Human Urine. *Journal of Chromatographic Science*, 2012, 50(10), 849-854.
- [113] ZHANG, Z.-X. – ZHANG, M.-Z. – ZHANG, S.-S. Online preconcentration and two-dimensional separation of cationic compounds via hyphenation of capillary zone electrophoresis with cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 2009, 30(11), 1958-1966.
- [114] GARCIA-OTERO, N. – PENA-VAZQUEZ, E. – CARMEN BARCIELA-ALONSO, M. – BERMEJO-BARRERA, P. – MOREDA-PINEIRO, A. Two-Dimensional Isoelectric Focusing OFFGEL and Microfluidic Lab-on-Chip Electrophoresis for Assessing Dissolved Proteins in Seawater. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(12), 5909-5916.
- [115] MOORE, A. W. – JORGENSON, J. W. COMPREHENSIVE 3-DIMNENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY REVERSED-PHASE LIQUID-CHROMATOGRAPHY OPTICALLY GATED

- CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(19), 3456-3463.
- [116] SCHOENMAKERS, P. J. – VIVO-TRUYOLS, G. – DECROP, W. M. C. A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1120(1-2), 282-290.
- [117] NIESSEN, W. M. A. – TJADEN, U. R. – VANDERGREEF, J. STRATEGIES IN DEVELOPING INTERFACES FOR COUPLING LIQUID-CHROMATOGRAPHY AND MASS-SPECTROMETRY. *Journal of Chromatography*, 1991, 554(1-2), 3-26.
- [118] HOLCAPEK, M. – JIRASKO, R. – LISA, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1259, 3-15.
- [119] YAMASHITA, M. – FENN, J. B. ELECTROSPRAY ION-SOURCE - ANOTHER VARIATION ON THE FREE-JET THEME. *Journal of Physical Chemistry*, 1984, 88(20), 4451-4459.
- [120] HUANG, E. C. – WACHS, T. – CONBOY, J. J. – HENION, J. D. ATMOSPHERIC-PRESSURE IONIZATION MASS-SPECTROMETRY - DETECTION FOR THE SEPARATION SCIENCES. *Analytical Chemistry*, 1990, 62(13), A713-&.
- [121] ROBB, D. B. – COVEY, T. R. – BRUINS, A. P. Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(15), 3653-3659.
- [122] HILLENKAMP, F. – PETER-KATALINIC, J. *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Edition ed.: Wiley, 2013. ISBN 9783527673742.
- [123] ZENOBI, R. – KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 1998, 17(5), 337-366.
- [124] DEHOFFMANN, E. Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, 31(2), 129-137.
- [125] KOVAROVA, H. Proteomics in postgenome era. *Chemické Listy*, 2005, 99(12), 886-889.
- [126] MUSILOVA, J. – GLATZ, Z. Metabolomics - Basic Concepts, Strategies and Methodologies. *Chemické Listy*, 2011, 105(10), 745-751.
- [127] EVANS, C. R. – JORGENSON, J. W. Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(8), 1952-1961.
- [128] SANDRA, K. – MOSHIR, M. – D'HONDT, F. – TUYTTEN, R. – VERLEYSSEN, K. – KAS, K. – FRANCOIS, I. – SANDRA, P. Highly efficient peptide separations in proteomics Part 2: Bi- and multidimensional liquid-based separation techniques. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2009, 877(11-12), 1019-1039.
- [129] DELAHUNTY, C. – YATES, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, 2005, 35(3), 248-255.

- [130] DI PALMA, S. – HENNRICH, M. L. – HECK, A. J. R. – MOHAMMED, S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(13), 3791-3813.
- [131] WU, Q. – YUAN, H. – ZHANG, L. – ZHANG, Y. Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis-A review. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 731, 1-10.
- [132] DUGO, P. – CACCIOLA, F. – HERRERO, M. – DONATO, P. – MONDELLO, L. Use of partially porous column as second dimension in comprehensive two-dimensional system for analysis of polyphenolic antioxidants. *Journal of Separation Science*, 2008, 31(19), 3297-3308.
- [133] CESLA, P. – HAJEK, T. – JANDERA, P. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(16), 3443-3457.
- [134] CACCIOLA, F. – JANDERA, P. – BLAHOVA, E. – MONDELLO, L. Development of different comprehensive two dimensional systems for the separation of phenolic antioxidants. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(16), 2500-2513.
- [135] CACCIOLA, F. – JANDERA, P. – HAJDU, Z. – CESLA, P. – MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1149(1), 73-87.
- [136] KIVILOMPOLO, M. – OBURKA, V. – HYOETYLAEINEN, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the analysis of antioxidant phenolic compounds in wines and juices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(1), 373-380.
- [137] MONDELLO, L. – TRANCHIDA, P. Q. – STANEK, V. – JANDERA, P. – DUGO, G. – DUGO, P. Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1086(1-2), 91-98.
- [138] VAN DER KLIFT, E. J. C. – VIVO-TRUYOLS, G. – CLAASSEN, F. W. – VAN HOLTHOON, F. L. – VAN BEEK, T. A. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet, evaporative light scattering and mass spectrometric detection of triacylglycerols in corn oil. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1178(1-2), 43-55.
- [139] DUGO, P. – HERRERO, M. – GIUFFRIDA, D. – KUMM, T. – DUGO, G. – MONDELLO, L. Application of comprehensive two-dimensional liquid chromatography to elucidate the native carotenoid composition in red orange essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(10), 3478-3485.
- [140] DUGO, P. – SKERIKOVA, V. – KUMM, T. – TROZZI, A. – JANDERA, P. – MONDELLO, L. Elucidation of carotenoid patterns in citrus products by means of comprehensive normal-phase x reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(22), 7743-7750.
- [141] ZHANG, K. – LI, Y. – TSANG, M. – CHETWYN, N. P. Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(18), 2986-2992.
- [142] ULIYANCHENKO, E. – COOLS, P. J. C. H. – VAN DER WAL, S. – SCHOENMAKERS, P. J. Comprehensive Two-Dimensional Ultrahigh-Pressure Liquid

- Chromatography for Separations of Polymers. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(18), 7802-7809.
- [143] EUGENIA LEON-GONZALEZ, M. – ROSALES-CONRADO, N. – VICENTE PEREZ-ARRIBAS, L. – GUILLEN-CASLA, V. Two-dimensional liquid chromatography for direct chiral separations: a review. *Biomedical Chromatography*, 2014, 28(1), 59-83.
- [144] MARRIOTT, P. J. – HAGLUND, P. – ONG, R. C. Y. A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 328(1-2), 1-19.
- [145] BARCELO, D. – PETROVIC, M. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(1), 2-11.
- [146] ZWIENER, C. – FRIMMEL, F. H. LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review - Part I: Instrumentation and general aspects of analysis and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(4), 851-861.
- [147] PETROVIC, M. – HERNANDO, M. D. – DIAZ-CRUZ, M. S. – BARCELO, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067(1-2), 1-14.
- [148] GROS, M. – RODRIGUEZ-MOZAZ, S. – BARCELO, D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1248, 104-121.
- [149] TUZIMSKY, T. Multidimensional Chromatography in Pesticides Analysis. In M. STOYTCHIEVA ed. *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*. InTech, 2011, p. 416.
- [150] MAS, S. – JAUREGUI, O. – RUBIO, F. – DE JUAN, A. – TAULER, R. – LACORTE, S. Comprehensive liquid chromatography-ion-spray tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42(7), 890-899.
- [151] SESTAK, J. *Rychlá separace výbušnin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 63 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Vladislav Kahle, CSc.
- [152] CAPKA, L. – VECERA, Z. – MIKUSKA, P. – SESTAK, J. – KAHLE, V. – BUMBOVA, A. A portable device for fast analysis of explosives in the environment. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1388, 167-173.
- [153] SLAIS, K. – FREI, R. W. OPEN-TUBULAR MIXER FOR GRADIENT PREPARATION IN MICROBORE HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY. *Analytical Chemistry*, 1987, 59(2), 376-379.
- [154] QUE, A. H. – KAHLE, V. – NOVOTNY, M. V. A microgradient elution system for capillary electrochromatography. *Journal of Microcolumn Separations*, 2000, 12(1), 1-5.

- [155] GRITTI, F. – GUIOCHON, G. Theoretical comparison of the performance of gradient elution chromatography at constant pressure and constant flow rate. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1253, 71-82.
- [156] GRITTI, F. – STANKOVICH, J. J. – GUIOCHON, G. Potential advantage of constant pressure versus constant flow gradient chromatography for the analysis of small molecules. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1263, 51-60.
- [157] SESTAK, J. – DUSA, F. – MORAVCOVA, D. – KAHLE, V. Simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1276, 26-32.
- [158] KRENKOVA, J. – LACHER, N. A. – SVEC, F. Multidimensional system enabling deglycosylation of proteins using a capillary reactor with peptide-N-glycosidase F immobilized on a porous polymer monolith and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of glycans. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(15), 3252-3259.
- [159] MORAVCOVA, D. – PLANETA, J. – KAHLE, V. – ROTH, M. Zwitterionic silica-based monolithic capillary columns for isocratic and gradient hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1270, 178-185.
- [160] TAYLOR, G. DISPERSION OF SOLUBLE MATTER IN SOLVENT FLOWING SLOWLY THROUGH A TUBE. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, 1953, 219(1137), 186-203.
- [161] SESTAK, J. – KAHLE, V. Constant pressure mode extended simple gradient liquid chromatography system for micro and nanocolumns. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1350, 68-71.

8 SEZNAM VLASTNÍCH PRACÍ

Články v impaktovaném periodiku

ŠESTÁK, J.; MORAVCOVÁ, D.; KAHLE, V. Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2015, článek v tisku. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.090>

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. Zelená kapalinová chromatografie pro jednoduché aplikace. *Chemické listy*, 2015, roč. 109, č. 6, s. 470-474.

ČAPKA, L.; VEČEŘA, Z.; MIKUŠKA, P.; ŠESTÁK, J.; KAHLE, V.; BUMBOVÁ, A. A portable device for fast analysis of explosives in the environment. *Journal of Chromatography A*, 2015, roč. 1388, s. 167-173.

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. Constant pressure mode extended simple gradient liquid chromatography system for micro and nano columns. *Journal of Chromatography A*, 2014, roč. 1350, č. 6, s. 68-71.

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. High pressure modification of the simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations. *Chemické listy*, 2013, roč. 107, č. s3, s. 438-440.

ŠESTÁK, J.; DUŠA, F.; MORAVCOVÁ, D.; KAHLE, V. Simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations. *Journal of Chromatography A*, 2013, roč. 1276, s. 26-32.

Články v konferenčním sborníku

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. Simple Liquid Chromatography system for Low Flow Rate Gradient Separations. In Studentská odborná konference Chemie je život 2014, Sborník příspěvků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2014. s. 416-421. ISBN: 978-80-214-5078- 3.

ŠESTÁK, J.; KŘENKOVÁ, J.; MORAVCOVÁ, D.; PLANETA, J.; KAHLE, V. ZIC-HILIC Monolithic Capillary Column Coupled with MALDI-MS: A Tool for Glycan Analysis. In CECE 2014 - 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. 2014. s. 384-386. ISBN: 80-904959-2- 3.

ŠESTÁK, J.; VEČEŘA, Z.; KAHLE, V.; MORAVCOVÁ, D.; MIKUŠKA, P.; KELLNER, J.; NAVRÁTIL, J. A novel portable device for fast analysis of energetic materials in the environment. In Proceedings of the 15th seminar on new trends in research of energetic materials. Pardubice: 2012. s. 860-865. ISBN: 978-80-7395-480- 2.

ŠESTÁK, J. a kol. Development of Simple Splitless Gradient Liquid Chromatographic system. In Studentská odborná konference Chemie je život - Sborník příspěvků. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2012. s. 446-449. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

ŠESTÁK, J. a kol. Nano column gradient separations: Implementation of simple splitless gradient generator with integrated sample delivery. In CECE 2012, 9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. 2012. s. 121-124. ISBN: 978-80-904959-1- 3.

Abstrakty v konferenčním sborníku

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. Development of simple platform for two dimensional capillary liquid chromatography. In HPLC 2015 High performance liquid phase separations and related techniques, Abstract book. Ženeva: 2015. s. 317.

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. Capillary Liquid Chromatography: Green Analytical Technique and Some Simple Ways Of Its Realization. Book of Abstracts, The 15th meeting on environmental chemistry, Brno, Czech Republic, December 3 - 6, 2014. Brno, Czech Republic: 2014. s. 41-41. ISBN: 978-80-214-5073- 8.

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V. Constant pressure gradient separation with our simple automated nano- LC platform. 13th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology (HTC-13) and 3rd International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP-3), Book of Abstracts. Bruggy: 2014. s. 143.

DUŠA, F.; ŠESTÁK, J.; MORAVCOVÁ, D.; PLANETA, J.; KAHLE, V. Simple two-dimensional separation platform for peptide analysis. HPLC 2013 Amsterdam, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques 16-20 June 2013, Book of Abstracts. Amsterdam: 2013. s. 830.

ŠESTÁK, J.; KAHLE, V.; DUŠA, F. Latest improvements in development of simple splitless gradient liquid chromatographic system for micro and nano columns. HPLC 2013 Amsterdam, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques 16-20 June 2013, Book of Abstracts. Amsterdam: 2013. s. 563.

DUŠA, F.; ŠESTÁK, J.; MORAVCOVÁ, D.; KAHLE, V.; HORKÁ, M. Splitless Gradient Nanocolumn Liquid Chromatographic System for Proteomic Purposes. 36th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GCxGC Symposium, Abstract Book. Riva del Garda: 2012. s. 265

ŠESTÁK, J. a kol. Fast liquid chromatography as a tool for rapid screening of explosives. CECE 2011. 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. Brno: librix. eu, 2011. s. 65-65. ISBN: 978-80-904959-0- 6.

9 SEZNAM ZKRATEK

APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	<i>atmospheric pressure photo ionization</i> foto ionizace při atmosférickém tlaku
BSA	<i>bovine serum albumine</i> hovězí sérový albumin
CAD	<i>charged aerosol detector</i> detektor nabitého aerosolu
CEC	<i>capillary electrochromatography</i> kapilární elektrochromatografie
cIEF	<i>capillary isoelectric focusing</i> kapilární izoelektrická fokusace
cLC	<i>capillary liquid chromatography</i> kapilární kapalinová chromatografie
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> kapilární zónová elektroforéza
ELSD	<i>evaporative light scattering detector</i> detektor rozptylu světla
GPC	gelová permeační chromatografie
HILIC	<i>hydrophilic interaction chromatography</i> hydrofilní interakční chromatografie
HPCE	<i>high performance capillary electrophoresis</i> vysokoučinná kapilární elektroforéza
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICR	<i>ion cyclotron resonance</i> iontová cyklotrónová rezonance

IEC	<i>ion-exchange chromatography</i> iontově-výměnná chromatografie
IgG	imunoglobulin G
IT	<i>ion trap</i> iontová past
ITP	<i>isotachopheresis</i> izotachoforéza
LC	<i>liquid chromatography</i> kapalinová chromatografie
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i> matričí asistovaná desorpce a ionizace laserem
MEKC	<i>micellar electrokinetic chromatography</i> micelární elektrokinetická chromatografie
MS	<i>mass spectrometry</i> hmotnostní spektrometrie
MW	<i>molecular weight</i> molekulová hmotnost
NPLC	<i>normal-phase liquid chromatography</i> kapalinová chromatografie na normálních fázích
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> polycyklické aromatické uhlovodíky
PCBs	<i>Polychlorinated biphenyl</i> polychlorované bifenyly
PCDDs	<i>Polychlorinated dibenzodioxins</i> polychlorované dibenzodioxiny
PCDFs	<i>Polychlorinated dibenzofurans</i>

	polychlorované dibenzofurany
PEEK	polyether ether keton
PEG	polyethylenglykol
PTFE	polytetrafluoroethylen
RPLC	<i>reversed-phase liquid chromatography</i> kapalinová chromatografie na obrácených fázích
RSD	<i>relative standard deviation</i> relativní směrodatná odchylka
TOF	<i>time of flight</i> doba letu
UHMWPE	<i>ultrahigh molecular weight polyethylene</i>
UHPLC	<i>ultrahigh-pressure liquid chromatography</i>
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
WOS	<i>Web of Science</i>