

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Zuzana LAŠTOVIČKOVÁ

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie

Dvourozměrná kapalinová chromatografie  
Aplikace na stanovení biologicky významných látek

Zuzana Laštovičková

Bakalářská práce

2009

University of Pardubice  
Faculty of chemical technology  
Department of analytical chemistry

## Two-dimensional liquid chromatography

Application for assesment of biologicaly significant substances

Zuzana Laštovičková

Bachelor work

2009

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie  
Akademický rok: 2008/2009

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana LAŠTOVIČKOVÁ**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
  
Název tématu: **Dvourozměrná kapalinová chromatografie**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

- 1) Vyhledejte v dostupné literatuře práce, zabývající se dvourozměrnou kapalinovou chromatografií v celostním (comprehensive ) módu a zpracujte literární rešerši.
- 2) Porovnejte výhody dvourozměrného uspořádání HPLC separací s uspořádáním jednorozměrným.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**  
Seznam odborné literatury:

**P. Jandera: Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography. J. Sep. Sci., 29 (2006) 1763-1783**

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Pavel Jandera, DrSc.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Tomáš Hájek**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 26. 6. 2009

Zuzana Laštovičková

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce prof. Ing. Pavlovi Janderovi, DrSc. za poskytnutí odborné pomoci. Neméně cenné poděkování patří Ing. Tomáši Hájkovi za cenné rady a informace.

Na závěr děkuji svým rodičům za trpělivost a morální podporu.

## **Souhrn:**

Tato práce přináší souhrn experimentů využívající metodu celostní dvourozměrné kapalinové chromatografie aplikované na stanovení biologicky významných látek jako jsou proteiny, peptidy, antioxidanty a lipidy, obsažené v potravinách a biologickém materiálu.

**Klíčová slova:** Vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
Celostní dvourozměrná kapalinová chromatografie  
Biologicky významné látky  
Proteiny  
Peptidy  
Antioxidanty  
Lipidy



## **Summary:**

This work brings the collection of experiments what use comprehensive two-dimensional liquid chromatography metod applicated for biologicaly significant substances as proteins, peptides, antioxidants a lipids included in foods and biologic material are.

**Keywords:** High Performance Liquid Chromatography

Comperhensive two-dimensional liquid chromatography

Biologicaly significant substances

Proteins

Peptides

Antioxidants

Lipids

# Obsah:

1 Úvod .....	11
2 Chromatografie .....	12
2.1 Základy chromatografie .....	12
2.2 Kapalinová chromatografie HPLC .....	13
2.2.1 Princip chromatografického procesu .....	13
2.2.2 Tvorba elučních křivek, eluční data .....	14
2.2.2.1 Chromatogram (eluční křivka) .....	14
2.2.2.2 Retenční charakteristiky (eluční data) .....	15
2.2.3 Účinnost separace v kolonové chromatografii .....	16
2.2.4 Rozlišení .....	17
2.2.5 Instrumentace .....	18
2.3. Dvourozměrná kapalinová chromatografie .....	22
2.3.1 Instrumentace .....	23
3 Stanovení biologicky významných látek .....	25
3.1 Aminokyseliny, peptidy a proteiny .....	25
3.1.1 Stanovení peptidů a proteinů .....	26
3.2 Antioxidanty .....	27
3.2.1 Stanovení antioxidantů .....	28
3.3 Lipidy .....	29
3.3.1 Stanovení lipidů .....	29
4 Závěr .....	31
Seznam použité literatury: .....	32
Příloha 1 .....	35

## Seznam použitých zkratek

<b>AC</b>	Afinitní chromatografie
<b>Ag</b>	Argentační chromatografie
<b>CN</b>	Kyano kolona
<b>C18</b>	Oktadecyl-silikagel kolona
<b>DAD</b>	Detektor diodového pole (Diode Array Detektor)
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<b>IEC</b>	Iontově výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography)
<b>LC</b>	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
<b>LSC</b>	Kapalinová adsorpční chromatografie (Liquid – Solid Chromatography)
<b>MALDI</b>	„Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization“ detektor
<b>NP</b>	Chromatografie s normálními fázemi (Normal – Phase Chromatography)
<b>PEG</b>	Polyetylenglykol kolona
<b>RP</b>	Chromatografie s obrácenými fázemi či reverzní chromatografie (Reversed – Phase Chromatography)
<b>SEC</b>	Gelová permeační chromatografie (Size Exclusion Chromatography)
<b>TAG</b>	Triacylglycerol
<b>TOF</b>	„Time Of Flight“ detekční systém
<b>UV</b>	Ultrafialová oblast záření (Ultraviolet)
<b>VIS</b>	Viditelná oblast záření (Visible)

# 1 Úvod

Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších analytických metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení organických i anorganických látek. Název chromatografie vznikl spojením řeckých slov χρομα (barva) a γραφειν (psát).

Ruský botanik Michail Semjonovič Cvět je považován za objevitele chromatografie. Použil skleněnou kolonu naplněnou uhličitanem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů.

V dnešní době se nejvíce využívá HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Umožňuje analyzovat řadu anorganických a organických látek obsažených v nejrůznějších přírodních nebo technických směsích v obsahu od desítek procent do stotisícin procenta a v rozsahu molekulových hmotností od stovky do několika stovek tisíc.

Vícerozměrná chromatografie poskytuje větší rozlišení než klasická jednorozměrná. Prakticky se používá dvourozměrná chromatografie. Jedna z používaných metod je celostní chromatografie, která poskytuje vysoké rozlišení. „On-line“ sestava se skládá ze dvou chromatografických systémů nejčastěji spojených vícecestným dvoupozičním ventilem. Všechny frakce vycházející z první dimenze jsou podrobeny analýze v dimenzi druhé. První celostní dvourozměrný systém analyzující komplexní rostlinný extrakt představili Erni a Frei.

Práce je rozdělena na dvě části. První se zabývá kapalinovou chromatografií a to jak jednorozměrnou tak i dvourozměrnou. Je zde popsán její princip, dělení a parametry. Druhá část se zaměřuje na analýzu některých biologicky významných látek pomocí celostní dvourozměrné kapalinové chromatografie.

## 2 Chromatografie

### 2.1 Základy chromatografie

Chromatografie je separační technika, která je založena na rozdělování látek mezi 2 fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární [1]. Při separaci dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi mobilní a stacionární fází [2]. Chromatografický systém se přitom může natolik přiblížit rovnováze, že distribuci složky mezi 2 fáze lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou  $K_D$ . Distribuční konstanta složky  $A$  je poměr rovnovážných koncentrací této složky ve stacionární a mobilní fázi:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s} \quad (1)$$

kde  $[A]_s$  a  $[A]_m$  jsou molární koncentrace složky  $A$  ve stacionární a mobilní fázi,  $(n_A)_s$  a  $(n_A)_m$  jsou látková množství složky  $A$  ve stacionární a mobilní fázi,  $V_s$  a  $V_m$  jsou objemy stacionární a mobilní fáze [1].

S rostoucí hodnotou  $K_D$  se bude látka ve stacionární fázi déle zdržovat, pomaleji se pohybovat separačním prostorem a později z tohoto prostoru odejde. Složky vzorku s odlišnými  $K_D$  budou procházet separačním prostorem odlišnými rychlostmi a budou se od sebe oddělovat, oproti tomu vzorky se shodnými  $K_D$  nebudou odděleny. Hodnota  $K_D$  závisí nejen na povaze dané látky, ale také na vlastnostech stacionární a mobilní fáze. Tato látka může být charakterizovaná rozličnými hodnotami  $K_D$  v závislosti na použité stacionární a mobilní fázi [3].

Trvalý pohyb mobilní fáze nicméně zabrání dosažení skutečné termodynamické rovnováhy a posune molekuly složek k další části stacionární fáze, kde se znovu vytvoří přibližně rovnovážný stav. Interakce složky a chromatografických fází jsou hlavním faktorem pro rychlost pohybu složky v chromatografickém systému. Rozdíly v rychlostech pohybu pak umožňují separaci složek [2].

## 2.2 Kapalinová chromatografie HPLC

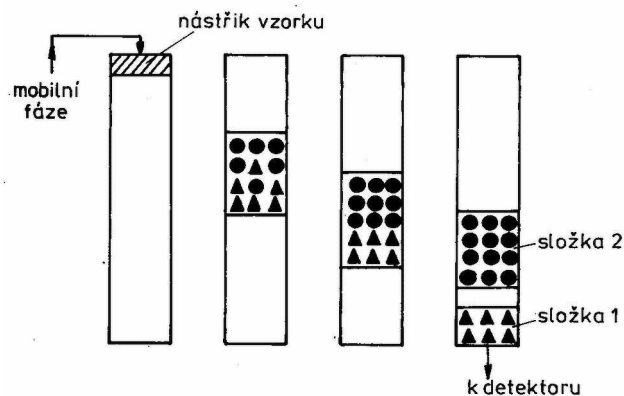
HPLC slouží k dělení směsí látek, které mohou být i složité a má širokou oblast použitelnosti. Touto metodou lze analyzovat ionty, dále pak polární, nepolární, málo těkavé, tepelně stabilní i vysokomolekulární látky. Další výhodou je, že lze separaci ovlivňovat složením mobilní fáze. Mobilní (pohyblivou) fází je kapalina a je též nazývána eluční činidlo či eluent. Stacionární (nepohyblivá) fáze je nepohybující se náplň separačního prostoru a je umístěna v koloně [4]. Stacionární fáze, obecně označována jako sorbent, může být tenká vrstva kapaliny nanesená na tuhých částicích, film kapaliny na vnitřní straně kapiláry, nebo částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek  $\mu\text{m}$  [1].

Schopnost vymývat látky z kolony se nazývá eluční síla. Čím je rychlejší vymývání látky z kolony, tím je vyšší eluční síla mobilní fáze.

Separace je závislá na vlastnostech analyzovaných látek a jejich interakcích s mobilními a stacionárními fázemi. Dále pak na typu a vlastnostech stacionární fáze, na složení mobilní fáze, na geometrických parametrech kolony, na typu dávkovacího zařízení, detektoru a spojovacích cest, na průtoku a na pracovní teplotě [4].

### 2.2.1 Princip chromatografického procesu

Kolonou, která je naplněná sorbentem, prochází určitou rychlostí mobilní fáze. Na začátek kolony se vnáší vzorek, jenž obsahuje složky 1 a 2. Vzorek je unášen mobilní fází ke konci kolony, přičemž složka 2 postupuje pomaleji než složka 1. Při průchodu vzorku kolonou jsou molekuly složek buď v mobilní fázi, pak se pohybují stejnou rychlostí jako mobilní fáze nebo jsou zadržovány sorbetem, potom se nepohybují vůbec. Během průchodu kolonou každá molekula vzorku přechází mnohokrát z mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět. Doba, kterou průměrná molekula určité složky setrvává na povrchu sorbetu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbetem a určuje pořadí, v jakém složka vychází (eluuje) z kolony. Čím silnější interakce, tím později složka eluuje čili má větší retenční čas. Celý průběh je zobrazen na obr. 1 [1].



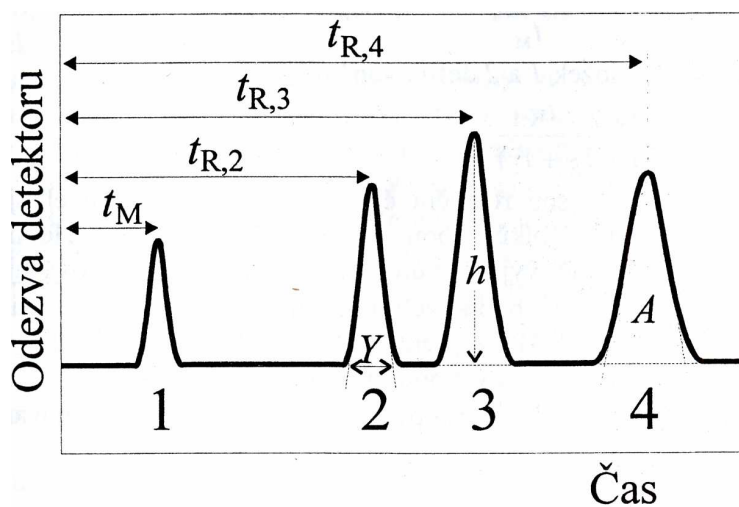
**Obr. 1:** Separace vzorku o dvou složkách; ▲ - složka 1, ● - složka 2

Mechanismy separace chromatografických metod jsou rozmanité. Různé afinity separovaných látek ke dvěma fázím mohou být založeny nejen na rozpustnosti, ale také na adsorpci, chemisorpci, iontové výměně, síťových efektech a na kombinaci těchto mechanismů[4].

## 2.2.2 Tvorba elučních křivek, eluční data

### 2.2.2.1 Chromatogram (eluční křivka)

Záznam závislosti koncentrace separovaných látek na čase nebo objemu proteklé mobilní fáze se nazývá chromatogram (Obr.2) [4]. Je to soubor tzv. chromatografických píků [5]. Z chromatogramu lze určit hodnoty parametrů charakterizující retenční chování separovaných látek a parametry zjišťovaných chromatografických píků [3].



**Obr. 2:** modelový chromatogram separace čtyřsložkové směsi;  $t_M$  – mrtvý čas kolony,  $t_R$  - retenční čas složky vzorku,  $Y$  - šířka píku při základně,  $h$  – výška píku,  $A$  – plocha píku

### 2.2.2.2 Retenční charakteristiky (eluční data)

Charakteristickou veličinou pro každou chromatografickou látku v daném chromatografickém systému je eluční (retenční) čas  $t_R$  resp. eluční (retenční) objem  $V_R$ . Retenční objem je celkový objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku do kolony až po maximum eluční křivky. Retenční čas je pak analogicky doba, která uplyne od nástřiku vzorku po maximum píku. Mezi těmito dvěma veličinami platí vztah:

$$V_R = t_R \cdot F_m \quad (2)$$

kde  $F_m$  je objem mobilní fáze proteklý kolonou za jednu sekundu neboli objemová průtoková rychlost [ $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ]

Redukovaný retenční čas  $t'_R$  složky vzorku je definován vztahem:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3)$$

kde  $t_M$  je mrtvý retenční čas. Jinými slovy je to retenční čas složky, která se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako fáze mobilní (není v koloně zadržována) [1,6]. Obdobně je definovaný redukovaný retenční objem  $V'_R$  označovaný také jako skutečný retenční objem. Výhodou redukovaných hodnot je jejich nezávislost na délce kolony. Platí tedy obecněji než pouhé hodnoty  $t$  a  $V$  [4].

Velice často používanou veličinou k vyjádření retenčních charakteristik v kolonové chromatografii je retenční faktor  $k$  [2] definovaný jako podíl látkového množství složky A ve stacionární fázi ku látkovému množství složky A ve fázi mobilní:

$$k = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} = \frac{(c_A)_s \cdot V_s}{(c_A)_m \cdot V_m} K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (4)$$

kde  $(n_A)_s$  a  $(n_A)_m$  jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi,  $(c_A)_s$  a  $(c_A)_m$  jsou látkové koncentrace složky A v obou fázích,  $K_D$  je distribuční konstanta,  $V_s$  a



$V_m$  jsou objemy stacionární a mobilní fáze v koloně. Rovnice (4) současně říká, jaký je vztah mezi kapacitním poměrem a distribuční konstantou [6].

V praxi se hodnota  $k$ , což je bezrozměrná veličina vypočítává ze vztahu:

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R'}{V_M} = \frac{t_R'}{t_M} \quad (5)$$

kde  $V_M$  je mrtvý retenční objem. Ve většině případů lze ztotožnit s objemem mobilní fáze  $V_m$  [1,2]. Z rovnice (5) je patrné, že kapacitní poměr udává, kolikrát je retenční objem nebo retenční čas separované látky větší než mrtvý objem [7].

### 2.2.3 Účinnost separace v kolonové chromatografii

Mírou účinnosti chromatografického systému je teoretické patro [2]. Účinnost chromatografické kolony klesá s rostoucí rychlostí rozmývání zón separovaných látek. Počet teoretických pater  $n$  z chromatogramu lze vyjádřit vztahem:

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{Y} \right)^2 = 5,54 \cdot \left( \frac{V_R}{Y_{1/2}} \right) \quad (6)$$

kde  $Y$  je šířka píku v základně,  $Y_{1/2}$  je šířka píku v polovině výšky.

K porovnání účinnosti kolon různých délek se používá výškový ekvivalent teoretického patra neboli výška teoretického patra  $H$ . Definujeme ho vztahem:

$$H = \frac{L}{n} \quad (7)$$

kde  $L$  je délka chromatografické kolony. Výškový ekvivalent teoretického patra má rozměr délky.

## 2.2.4 Rozlišení

Hlavním úkolem chromatografie je dosáhnout co nejlepšího rozdělení složek vzorku analyzované látky v přijatelném čase. Rozdělení složek může být úplné, částečné, nedokonalé apod. Je proto vhodné stupeň rozlišení kvantitativně vyjádřit. V praxi se používá míra relativní separace dvou sousedících píků, tzv. rozlišení  $R_s$ . Hodnota rozlišení se pro látky 1 a 2 značí  $R_{1,2}$  a je definovaná vztahem:

$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (Y_{t,2} + Y_{t,1})} \quad (8)$$

kde  $t_{R,1}$  a  $t_{R,2}$  jsou retenční časy látek 1 a 2,  $Y_{t,1}$  a  $Y_{t,2}$  je šířka píků látek 1 a 2 v základně.

Čím větší je hodnota rozlišení, tím jsou látky lépe separovány. Je-li  $R \geq 1,5$ , lze látky považovat za úplně oddělené. Při nižších hodnotách dochází k částečnému překrývání píků. V praxi je u symetrických píků postačující hodnota rozlišení  $R = 1,0$ .

Následující vzorec určuje jak faktory ovlivňují kvalitu rozlišení.

$$R_{1,2} = \frac{1}{4} \cdot \underbrace{\frac{r_{1,2} - 1}{r_{1,2}}}_{F_{sel}} \cdot \underbrace{\frac{k_1}{1 + k_1}}_{F_{kap}} \cdot \underbrace{\sqrt{n}}_{F_{úč}} \quad (9)$$

kde  $r_{1,2}$  je retenční poměr látky 1 vůči látce 2,  $k_1$  je retenční faktor látky 1,  $n$  je počet teoretických pater kolony,  $F_{sel}$  je faktor selektivity,  $F_{kap}$  je faktor kapacity a  $F_{úč}$  je faktor účinnosti. Jedná se o nejdůležitější teoretickou rovnici chromatografie.

Selektivita chromatografického systému je dána volbou stacionární a mobilní fáze. Mírou selektivity je relativní retence  $r_{1,2}$  neboli retenční (eluční) poměr a je dána vztahem:

$$r_{1,2} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{K_{D,1}}{K_{D,2}} = \frac{t'_{R,1}}{t'_{R,2}} = \frac{V'_{R,1}}{V'_{R,2}} \quad (10)$$

kde  $k_1$  a  $k_2$  jsou retenční faktory složky 1 a 2,  $K_{D,1}$  a  $K_{D,2}$  jsou distribuční konstanty složky 1 a 2 [2]. Čím je větší hodnota  $r$ , tím více se od sebe vzdalují težiště elučních křivek a tím je systém selektivnější [4].

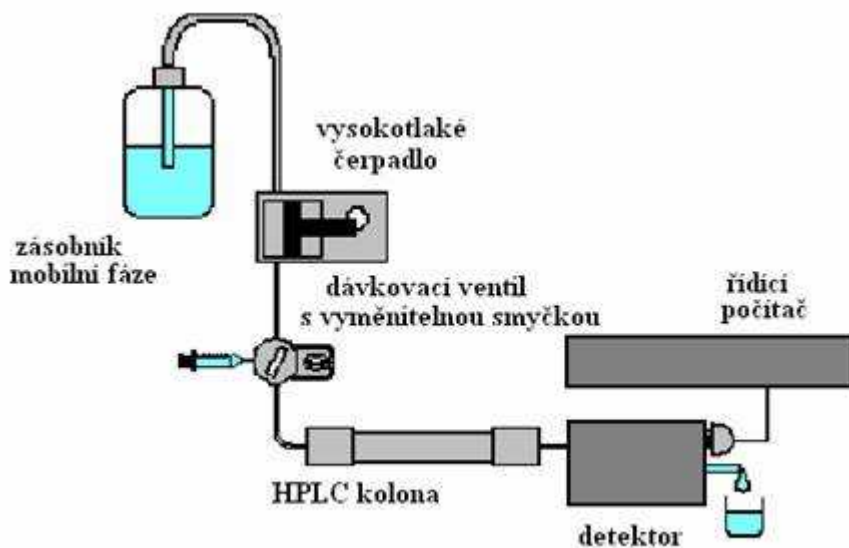
Pro vícesložkové vzorky je kvalita separace dána píkovou kapacitou  $P$ , jenž je definována jako počet separovaných píků s rozlišením  $R_s = 1$  v rozmezí retenčních objemů prvního  $V_{R,1}$  a posledního eluujícího píku  $V_{R,z}$  v daném separačním čase. Giddings odvodil zjednodušený vztah, který slouží k odhadu píkové kapacity,  $P$ .

$$P = \frac{\sqrt{n}}{4} \ln\left(\frac{V_{R,z}}{V_{R,1}}\right) + 1 = \frac{\sqrt{n}}{4} \ln\left(\frac{k_z + 1}{k_1 + 1}\right) + 1 \quad (11)$$

kde  $k_1$  a  $k_z$  jsou retenční faktory první a poslední eluující složky a  $n$  je počet teoretických pater [8].

## 2.2.5 Instrumentace

Kapalinový chromatograf v sobě zahrnuje čerpadlo mobilní fáze, zařízení pro odplynění mobilní fáze, dávkovací zařízení, kolonu se stacionární fází, termostat kolon, detektor s průtočnou celou, vyhodnocovací zařízení [5].



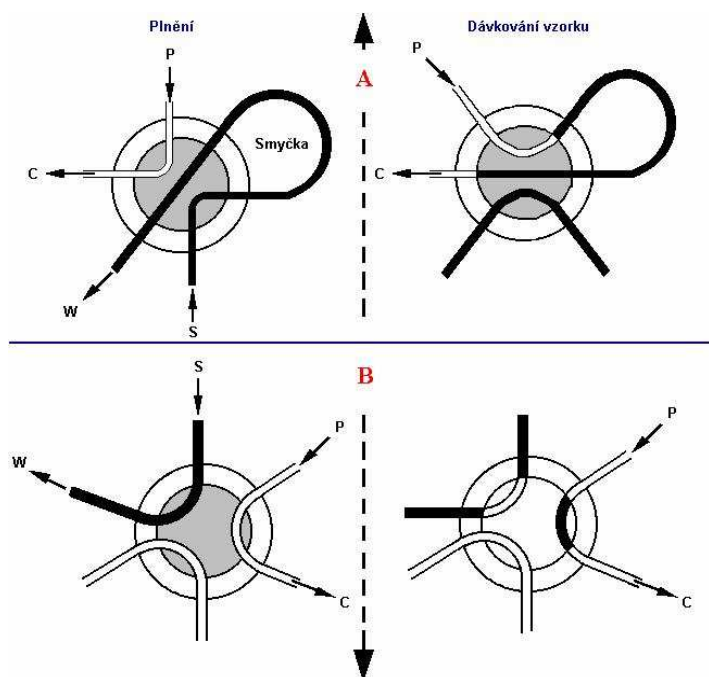
**Obr. 3:** Schéma kapalinového chromatografu

## Čerpadla mobilní fáze

Tok mobilní fáze je zajišťován vysokotlakým čerpadlem. V dnešní době se nejčastěji používají pulzní neboli reciproční čerpadla. Píst ve válci periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi. Mají dva zpětné ventily, které se při pravidelně opakujícím pohybu pístu ve válci otevírají a zavírají. Před vstupem mobilní fáze do pracovního válce je možné měnit její složení [5].

## Dávkovací zařízení

K dávkování lze běžně použít šesticestný ventil s dávkovací smyčkou přesně určeného objemu [3], jehož schématické znázornění je na obr. 4. Dávkovací ventil má šest vstupů kde pokaždé dva vstupy jsou propojeny kanálkem.



**Obr. 4:** šesticestný dávkovací ventil; A – dávkování s využitím dávkovací smyčky,  
B – dávkování s využitím vnitřního objemu ventilu; P – čerpadlo, C – kolona, W –  
odpad, S – vzorek

## Kolony

Separční kolony, které se používají v HPLC musí vydržet vysoký tlak mobilní fáze. Většinou jsou vyrobeny z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru 2 – 5 mm a délce 30 – 300 mm. Náplň kolony tvoří vhodná stacionární fáze jakou bývá obvykle oxid křemičitý vhodné zrnitosti a nejčastěji modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin [3].

**Tabulka 1:** Rozdělení kolon na základě rozměrů [5]

skupina	vnitřní průměr [mm]	délka [mm]
preparativní (technologické)	> 50	500 - 2000
semipreparativní	10 - 50	250 - 1000
klasické (GPC, IEC)	6 - 10	150 - 1000
analytické	2 - 6	30 - 300
mikrokolony	0,5 - 2	50 - 1000
kapilární	$5 \cdot 10^{-4}$ - 0,06	1000 - 10000

## Detektory

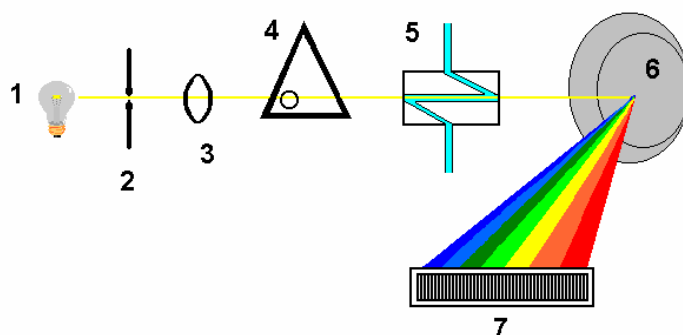
K detekci separovaných látek se obvykle využívá jejich obecných nebo specifických vlastností, kterými se tyto látky odlišují od mobilní fáze. Podle toho se také rozlišují na univerzální a selektivní detektory. Univerzální detektory mají signál úměrný celkové vlastnosti efluentu jako celku, tj. mobilní fázi a zjišťované složky. Oproti tomu je signál selektivních detektorů úměrný pouze koncentraci zjišťované složky v mobilní fázi [2]. V současnosti jsou prakticky všechny typy detektorů používaných v HPLC koncentrační.

Na detektory jsou kladeny speciální nároky:

- okamžitá lineární koncentrační odezva,
- univerzálnost (možnost detekce všech přítomných komponent)
- vysoká citlivost a nízký šum
- minimální vliv změny tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty,
- minimální příspěvek k rozšiřování zóny
- možnost použití gradientové eluce

Je však nutnost kompromisů, protože v praxi neexistuje zcela univerzální detektor [5].

Nejběžněji používaným detektorem je fotometrický detektor, který pracuje v UV oblasti záření nejčastěji při vlnové délce 280 nm. Pro barevné látky se používá obdobný detektor, který pracuje ve VIS oblasti. UV detektor umožňuje sledovat absorbanci látek vystupujících z chromatografické kolony. Patří mezi selektivní detektory, ale i tak lze využít prakticky v 90 % aplikacích. Jeho lineární odezva je široká a je vysoce citlivý. V současnosti se často používá detektor s diodovým polem (DAD), jehož schéma zachycuje obr. 5. Snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace [2].



**Obr. 5:** Schéma detektoru s diodovým polem; (1) záření ze zdroje, (2) štěrbina, (3) čočka, (4) clona, (5) měrná cela detektoru, (6) holografická mřížka, (7) fotodioda

Dále se používá hmotnostní detektor, který umožňuje na základě získaných hmotnostních spekter přímou identifikaci jednotlivých separovaných látek, jež vycházejí z kolony. Skládá se ze zdroje iontů, magnetického analyzátoru, kvadrupólového filtru a TOF detekčního systému[3].

### 2.3. Dvourozměrná kapalinová chromatografie

Jednorozměrná chromatografie se běžně používá pro analýzu vzorků v mnoha oblastech. Separací metody však často nemají dostatečnou rozlišovací schopnost. V málo komplexních vzorcích je obecně náhodná distribuce píku, která vyžaduje velký počet teoretických pater pro celkové píkové rozlišení [9,10]. Jestliže počet složek překračuje 37% píkové kapacity, píkové rozlišení se ve většině případů sníží [10]. Tento problém může být vyřešen použitím vícerozměrných systémů, kde jednotlivé rozměry jsou založené na jiných mechanismech separace.

Vícerozměrné chromatografické techniky mají vyšší rozlišovací schopnost a píkovou kapacitu v porovnání s jednorozměrnými. Tyto techniky se dělí na „heart-cutting“ a „comprehensive“ neboli celostní. Zejména LC techniky mají širokou škálu mechanismů separace, jako je chromatografie s normálními fázemi (NP) a s obrácenými fázemi (RP), gelová permeační (SEC), iontově výměnná (IEC) či afinitní chromatografie (AC), jež jsou charakterizované rozdílnou selektivitou. Slouží ke zvýšení píkové kapacity, selektivity a rozlišení, zvláště v celostním LC režimu. Nicméně kombinace určitých LC režimů může představovat řadu potíží, jako je například nemísitelnost a nesourodost mobilní fáze první dimenze a stacionární fáze druhé dimenze[11].

Dvojrozměrná HPLC může být provedená buď „off-line“ [12,13] nebo „on-line“ [14]. „Off-line“ technika je snadnější, ale může být zdlouhavá a obtížná na automatizaci a opakovatelnost, náchylná ke ztrátě, záměně nebo znečištění vzorku. Sbírají se jednotlivé frakce vystupující z první dimenze a následně dávají do druhé chromatografické kolony. „On-line“ technika je rychlejší a má větší opakovatelnost, ale potřebuje specifické propojení a je obtížnější na obsluhu [11].

Rozdíl mezi „heart-cutting“ vícerozměrnou chromatografickou technikou a celostní je ten, že první z nich umožňuje další separaci určitého počtu vícesložkové frakce efluentu

z první do druhé kolony [15], zatímco ve druhém veškerý vzorek podléhá separaci v obou rozměrech [16].

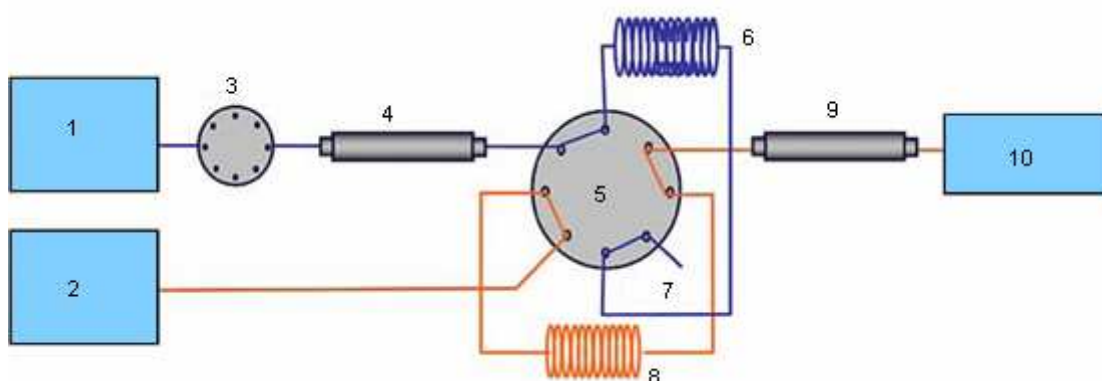
Celostní dvourozměrná chromatografie je na základě Giddingsových definic definována třemi znaky:

- a) každá složka vzorku je podrobena dvěma různým separacím,
- b) stejné procento (buď 100% nebo nižší) všech složek vzorku musí projít oběma kolonami a nakonec se dostat na detektor,
- c) separace (rozlišení) získaná v prvním rozměru musí být zachována před vstupem do druhého rozměru [17,18].

Celostní 2D HPLC je běžně prováděná pomocí jednoho či dvou HPLC systémů vybavenými kolonami spojenými přes přenosové zařízení umístěné mezi nimi. Přenosové zařízení odděluje frakce efluentu první kolony a převádí je na druhou kolonu, kde se obvykle uskutečňuje sekundární rychlá separace. Každá jednotlivá frakce z první kolony musí být před přepnutím ventilu úplně zanalyzována. [19].

### 2.3.1 Instrumentace

Kapalinový chromatograf pro dvourozměrnou analýzu je obvykle sestavený ze dvou čerpadel, dvou kolon, přepínacího ventilu vybaveného dvojicí vzorkovacích smyček a detektoru. Příklad sestavy jednoho z nich je na obr. 6.



**Obr. 6:** Schéma dvourozměrného kapalinového chromatografu; (1) čerpadlový systém 1. dimenze, (2) čerpadlový systém 2. dimenze, (3) dávkovací zařízení, (4) kolona 1. dimenze, (5) ventil, (6) smyčka 1, (7) odpad, (8) smyčka 2, (9) kolona 2. dimenze, (10) detektor



Pro spojení dvou chromatografických systémů se dají použít čtyř- [20] , šesti- [21,22] , osmi- [6,23,24] , deseti- [25,26] nebo dvanácticestné [27] ventily se dvěma pozicemi opatřeny např. dvěma smyčkami nebo dvěma zachytávajícími kolonami.

### 3 Stanovení biologicky významných látek

Tato kapitola popisuje stanovení některých biologicky významných látek v různých směsích nebo biologických materiálech metodou celostní dvourozměrné kapalinové chromatografie. Je zaměřena na stanovení peptidů, proteinů, antioxidantů a lipidů. Přírodní antioxidanty přítomné v potravinách a dalším biologickém materiálu vyvolaly značný zájem kvůli svým potenciálním nutričním a terapeutickým účinkům [28], proto patří mezi často stanovované látky. Mezi další hojně stanovované látky patří peptidy, proteiny a lipidy. Tyto látky jsou významnou součástí většiny potravin [29]. Analýza jejich složení je důležitá zejména ze zdravotního hlediska.

Jednotlivé experimenty jsou shrnuty v příloze 1.

#### 3.1 Aminokyseliny, peptidy a proteiny

Aminokyseliny jsou základním stavebním kamenem peptidů a proteinů. Proteiny mají v organismu strukturní, katalytickou, transportní, pohybovou, obranu, zásobní, senzorickou, regulační a výživovou funkci. Skládají se z dvaceti základních aminokyselin, z nichž některé jsou pro člověka esenciální. Člověk je musí přijímat potravou, protože si je nedokáže sám syntetizovat. Přehled aminokyselin je uveden v tab.2.

**Tabulka 2:** dvacet základních aminokyselin

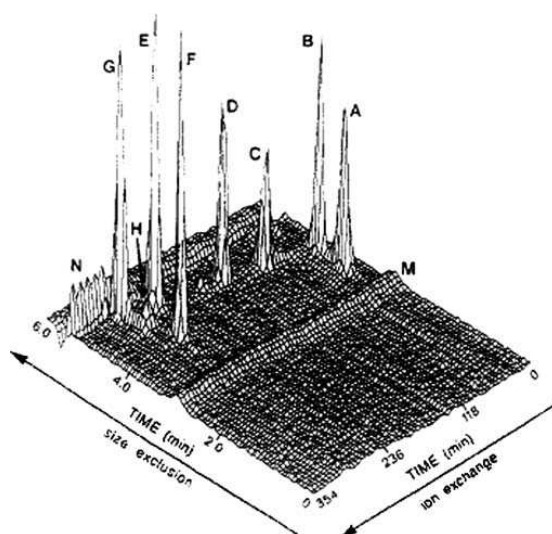
Triviální název	Symboly		Triviální název	symboly	
glycin	Gly	G	kyselina glutamová	Glu	E
alanin	Ala	A	asparagin	Asn	N
valin*	Val	V	glutamin	Gln	Q
leucin*	Leu	L	lysin*	Lys	K
isoleucin*	Ile	I	arginin	Arg	R
serin	Ser	S	histidin	His	H
threonin*	Thr	T	fenylalanin*	Phe	F
cystein	Cys	C	tyrosin	Tyr	Y
methionin*	Met	M	tryptofan*	Trp	W
kyselina asparagová	Asp	D	prolin	Pro	P

\* pro člověka esenciální aminokyseliny

### 3.1.1 Stanovení peptidů a proteinů

Bushey a Jorgenson se ve své práci [30] zabývali analýzou směsi proteinových standardů a proteinového séra (lidského a koňského). V první dimenzi použili iontově výměnou chromatografii (IEC) a ve druhém gelovou permeační chromatografii (SEC). Systémy byly vzájemně propojeny osmicestným ventilem se dvěma smyčkami.

Obr. 7 ukazuje trojrozměrné zobrazení celostního dvojrozměrného kapalinového chromatogramu proteinových standardních vzorků.



**Obr. 7:** celostní dvourozměrný chromatogram proteinového vzorku; A - glukózo-oxidáza, B – ovalbumin, C –  $\beta$ -laktoglobulin, D – trypsinogen, E –  $\alpha$ -chymotrypsinogen A, F – conalbumin, G – ribonukleáza A, H – hemoglobin, M – exkluze, N – totální permeace.

Dvourozměrný kapalinový chromatografický systém, který popisují G. J. Opitck a spol. [31], slouží k separaci směsi proteinů po lýzy buněk *Escherichia coli* a izolaci proteinů které produkují. Tento systém používá gelovou permeační chromatografii (SEC) v prvním rozměru a ve druhém rozměru pak kapalinovou chromatografii s obrácenými fázemi (RP-LC). Systémy jsou propojeny čtyřcestným dvoupolohovým ventilem. Jednotlivé proteiny byly detekovány UV detektorem při vlnové délce 215 nm.

2D-HPLC systém popsáný v práci Wagnera a spol. [32] se skládá z iontově výměnné chromatografie (IEC) v prvním rozměru a chromatografie na obrácených fázích

(RP) ve druhém rozměru. Kolony byly propojeny deseticestným dvoupolohovým ventilem. Systém byl využit pro separaci standardů proteinů a pro analýzu lidských fibroblastů. Celková analýza trvala méně než 20 minut a přitom měla vysokou rozlišovací schopnost .

Ch. Liu a spol. postavili a v článku [33] popsali dvourozměrný kapalinový chromatografický systém sloužící k úplné proteinové analýze komplexních proteinových vzorků. Tento systém se podařilo optimalizovat tak, že analýza více než tisíce peptidů trvala pouhých 150 minut. Z živého rakovinového nádoru jím bylo analyzováno nad 1202 proteinů. Systém byl propojen vícekanálovým propojovacím zařízením vybaveným třisměrným uzávěrem. V první dimenzi byla použita iontově výměnná chromatografie (IEC) a ve druhé dimenzi chromatografie na obrácených fázích (RP). Detekce proteinů byla prováděna za použití UV a MALDI-TOF-TOF detektoru.

## 3.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zpomalují, blokují nebo zabraňují oxidačním změnám látek v lidském těle a buňkách. Podle chemické struktury se antioxidanty mohou dělit na polyfenoly (flavonoidy, anthokyaniny, fenolkarboxylové kyseliny a kumariny), karotenoidy (karoteny . prekursory vitamínu A a xanthofyly) a tokoferoly (vitamin E). Mezi důležité antioxidanty patří i fenolické kyseliny. Výraznou antioxidační aktivitu má také kyselina L-askorbová (vitamin C) a selen. Polyfenolické sloučeniny, zvláště flavonoidy, jsou účinnými antioxidanty díky své schopnosti zachytávat volné radikály mastných kyselin a reaktivních forem kyslíku. Zelenina, ovoce a zemědělské plodiny představují v lidské výživě významný zdroj antioxidantů jak při přímé konzumaci, tak i ve formě zeleninových a ovocných šťáv [28]. Justesen a kol. [34] odhadli denní příjem flavonoidů na 26 mg na osobu.

### 3.2.1 Stanovení antioxidantů

Fenolické sloučeniny jsou široce rozšířené v rostlinách, ovoci, zelenině, listech, oříšcích, semenech, květinách, kůře, nápojích a v potravinových produktech.

F. Cacciola a spol. [29] separovali směs 20-ti fenolických antioxidantů a flavonoidů pomocí celostní 2D-HPLC. V obou dimenzích byla použita reverzní chromatografie. Metodu použili na zjištění fenolických antioxidantů obsažených v pivu. Ve své práci popisují čtyři způsoby „on-line“ sestavení pro separaci těchto látek, kde kombinují PEG kolonu použitou v první dimenzi a C18, Chromolith C18 a ZR-Carbon kolonou ve druhé dimenzi. Místo vzorkujících smyček byly v některých sestaveních použity dvě zachytávající kolony. Ty sloužily ke střídavému zachytávání frakcí. Jednotlivé antioxidanty byly detekovány pomocí UV detektoru při 280 nm.

E. Bláhová a spol. [35] podrobili analýze pивní a chmelové extrakty. Nejdříve separovali směs 17-ti přírodních fenolických antioxidantů a flavonoidů. Systém pro analýzu pивních a chmelových extraktů využíval v obou rozměrech chromatografií s obrácenými fázemi.

F. Cacciola [36] analyzoval fenolické a flavonové antioxidanty ve vzorcích piva a vína. V první dimenzi byla použita C18 mikrokolona a ve druhé dimenzi dvě střídající se ZR-Carbon kolony. V obou případech se jednalo o chromatografie s obrácenými fázemi.

V další publikaci F. Cacciola [37] testoval pomocí celostní dvourozměrné kapalinové chromatografie fenolické a flavonové antioxidanty. Tuto metodu aplikoval na analýzu přírodních antioxidantů z pивních a vínových vzorků. Použil pět různých uspořádání, kde kombinoval PEG-silikagel a fenyl-silikagel kolonu v první dimenzi a Chromolith C18 kolonou v druhé dimenzi. V obou rozměrech opět využili chromatografií s obrácenými fázemi.

M. Kivilompolo a T. Hyötyläinen [38] se zabývali analýzou antioxidantů fenolických kyselin z bylinných extraktů. Nejdříve byly fenolické kyseliny z bazalky, dobromyslu, rozmarýnu, šalvěže, máty a tymiánu extrahovány alkoholem, a poté byl zfiltrovaný extrakt podroben separaci pomocí celostní 2D-HPLC. V první dimenzi byla použita C18 kolona a ve druhé dimenzi CN (kyano) kolona. Oba dva reverzní

chromatografické systémy byly propojeny deseticestným dvoupolohovým vysokotlakým ventilem.

Metodou celostní dvourozměrné HPLC byly analyzovány volné karotenoidy a karotenoidové estery z esenciálního oleje červeného pomeranče [39]. Systém používá v první dimenzi chromatografii s normálními fázemi a ve druhé dimenzi chromatografii s obrácenými fázemi. Použité kolony byly propojeny deseticestným dvoupolohovým přepínacím ventilem se dvěma vzorkovacími smyčkami. Z esenciálního oleje červeného pomeranče bylo identifikováno 40 různých karotenoidů.

P. Dugo a spol. [40] analyzovali karotenoidy z pomerančového esenciálního oleje a šťávy. V první dimenzi byla použita chromatografie s normální fází a ve druhé dimenzi chromatografie s obrácenou fází. Systémy byly navzájem propojeny deseticestným přepínacím ventilem.

V další publikaci [41] P. Dugo a spol. podrobili analýze mandarinky. Na analýzu karotenoidů byla použita sestava složená z chromatografie s normální fází v prvním rozměru a reverzní chromatografie v rozměru druhém. Kolony opět propojoval deseticestný přepínací ventil.

### 3.3 Lipidy

Lipidy jsou látky biologického původu. Nejvýznamnější je triacylglycerol, což je derivát vyšších mastných kyselin s glycerolem. Lipidy patří mezi energeticky nejbohatší sloučeniny. Mohou se vyskytovat jak ve formě tuhé (tuky) tak kapalné (oleje). Jsou to významné složky potravin.

#### 3.3.1 Stanovení lipidů

Triacylglyceroly jsou hlavními složkami tuků a olejů a jsou typickým příkladem přírodních komplexních směsí. Nejlepší technikou separace pro tyto látky je HPLC.

Práce [42] prezentuje celostní LC systém založený na odlišných separačních mechanismech. Využívá argentační (Ag) chromatografie a bezvodé reverzní chromatografie. Tento systém byl aplikován na analýzu rostlinných derivátů přírodních lipidických forem. Konkrétně byl použit na analýzu triacylglycerolů ze sojového a lněného oleje.

Celostní 2D-HPLC systém, který sestavili L. Mondello a spol. [43] slouží ke zjištění triacylglycerolů z lipidických vzorků. Byl mimo jiné vyzkoušen na analýzu rýžového oleje a standardních vzorků.

Celostní dvourozměrný kapalinový systém založený na kombinaci Ag a RP kolony byl použit pro identifikaci frakce triacylglycerolu (TAG) z tuku obsaženého v oslím mléce [44]. V tomto vzorku bylo zjištěno okolo 60 TAG.

P.Dugo a spol. [45] analyzovali triacylglycerol z kukuřičného oleje. Celostní dvourozměrný LC systém využíval argentační (Ag) chromatografii v první dimenzi a reverzní chromatografii v dimenzi druhé. Oba chromatografické systémy byly propojeny deseticestným ventilem. V kukuřičném oleji bylo zjištěno celkem 44 triacylglycerolů.

## 4 Závěr

Předností chromatografických metod v dvourozměrném uspořádání je poskytnutí kvalitního rozlišení i pro velmi komplexní vzorky. Jejich nevýhodou je, že jsou náročnější na konstrukci než systémy jednorozměrných metod.

Cílem této práce je shrnutí významných aplikací celostní dvourozměrné kapalinové chromatografie, které stanovují biologicky významné látky. Práce byla zaměřena na určení proteinů, peptidů, antioxidantů a lipidů v různých potravinových vzorcích a biologickém materiálu. Hlavním důvodem, proč se tyto látky stanovují, je jejich nutriční význam.

Popisovanými metodami byly analyzovány různorodé vzorky. Zabývaly se analýzou proteinů nebo peptidů v rakovinném nádoru, v bakterii *Escherichia coli*, v lidském nebo koňském séru a v lidských fibroblastech. Ve vzorcích piva, vína, extraktech z bylin a citrusových plodů byly stanovovány antioxidanty. Dále bylo zjišťováno složení lipidů obsažených v rýžovém, sojovém, lněném a kukuřičném oleji a v oslím mléku.

Nejčastěji používaným systémem pro analýzu peptidů a proteinů je kombinace iontově výměnné chromatografie a chromatografie s obrácenými fázemi. Pro analýzu antioxidantů je vhodná chromatografie s obrácenými fázemi použitá v obou rozměrech nebo kombinace chromatografie s normálními a s obrácenými fázemi. Pro analýzu lipidů pak kombinace argentační chromatografie a chromatografie s obrácenými fázemi.



## Seznam použité literatury:

- [1] Churáček J. a spol. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990. 384 s.
- [2] Holbecher Z., Churáček J. a spol. *Analytická chemie*. Praha: SNTL, 1987. 663 s. ISBN 80-03-00569-8
- [3] Opekar F. a spol. *Základní analytická chemie*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2003. 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [4] Štuhlík K. a spol. *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [5] Sommer L. a spol. *Základy analytické chemie II*. Brno: Nakladatelství VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- [6] Volka K. a spol. *Analytická chemie II*. Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [7] Churáček J., Jandera, P. *Separace látek – Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Praha: SNTL. 1986. 140 s.
- [8] Jandera P. *J. Sep. Sci* 29 (2006) 1763.
- [9] Guiochon G. *J. Chromatogr. A*, 1126 (2006) 6.
- [10] Davis J. M., Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 55 (1983) 418.
- [11] Dugo P., Cacciola F., Kumm T., Dugo G., Mondello L. *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 353.
- [12] Horváth K., Fairchild J.; Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2511.
- [13] Eeltink S., Dolman S., Swart R., Ursem M., Schoenmakers P. J. *J. Chromatogr. A*, xxx (2009) xxx.
- [14] Geng X., Ke C., Chen G., Liu P., Wang F.; Zhang H., Sun X. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3553.
- [15] Cortes, H. J. *J. Chromatogr. A*, 626 (1992) 3.
- [16] Giddings J.C. *Anal. Chem.* 56 (1984) 1258 A.
- [17] Shellie R. A., Haddad P. R. *Anal. and bioanal. Chemistry* 386 (2006) 405.
- [18] Pól J., Hyötyläinen T. *Anal. and bioanal. Chemistry*, 391 (2008) 21.
- [19] Murphy R. E., Schure M. R., Foley J. P. *Anal. Chem.* 70 (1998) 1585.
- [20] Opiteck G. J., Jorgenson J. W., Anderegg R. J. *Anal. Chem.* 69 (1997) 2283.
- [21] Bedani F., Kok W.Th., Janssen H.-G. *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 126

- [22] Gray M. J., Denis G. R. , Slonecker P. J., Shalliker R. A *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 101.
- [23] Knecht D., Rittig F., Lange R. F. M., Pasch H. *J. Chromatogr. A*, 1130 (2006) 43.
- [24] Erni F., Frei R.W. *J. Chromatogr.* 149 (1978) 561.
- [25] van der Horst A., Schoenmakers P. J. *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 693.
- [26] Popovici S. T., van der Horst A., Schoenmakers P. J. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1457.
- [27] Venkatramani G. J., Patel A. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 510.
- [28] Lachman J., Hamoun K., Orsák M. *Chem. Listy* 99 (2005) 474.
- [29] Dugo P., Kumm T., Crupi M. L., Cotroneo A., Mondello L. *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 269.
- [30] Bushey M., Jorgenson J. W. *Anal. Chem.* 62 (1990) 161.
- [31] Optieck G. J., Ramirez S.M., Jorgenson J.W., Mosley III M. A. *Anal. Biochem.* 258 (1998) 349.
- [32] Wagner K., Racaityte K., Unger K. K., Miliotis T., Edholm L. E., Bischoff R., Marko-Varga G. *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 293.
- [33] Liu C., Zhang X. *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 191.
- [34] Justesen U., Knuthsen P., Leth T. *Canc. Lett.* 114 (1997) 165.
- [35] Cacciola F., Jandera P., Bláhová E., Mondello L. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2500.
- [36] Bláhová E., Jandera P., Cacciola F., Mondello L. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 55.
- [37] Cacciola F., Jandera P., Mondello L. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 462.
- [38] Cacciola F., Jandera P., Hajdú Z., Česla P., Mondello L. *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 73.
- [39] Dugo P., Herrero M., Giuffrida D., Kumm T., Dugo P., Mondello L. *J. Agric. Food. Chem.* 56 (2008) 3478.
- [40] Dugo P., Škeříková V., Kumm T., Trozzi A., Jandera P., Mondello L. *Anal. Chem.* 78 (2006) 7743.
- [41] Duggo P., Herrero M., Kumm T., Giuffrida D., Dugo G., Mondello L. *J. Chrom. A* 1189 (2008) 196.
- [42] Kvilompolo M. Myötyläinen T. *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 155.
- [43] Mondello L., Tranchida P.Q., Staněk V., Jandera P., Dugo G., Dugo P. *J. Chromatogr. A* 1086 (2005) 91.

- [44] Dugo P., Kumm T., Chiofalo B., Cotroneo A., Mondello L. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1146.
- [45] van der Klift E. J. C., Nivó-Truyols G., Classen F. W., van Molthoon F. L., van Beek T. A. *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 43.

## Příloha 1: Souhrn hlavních parametrů jednotlivých analýz

Lit.	Ventil	Sběr frakcí	Přepínací perioda	Kolona v prvním rozměru (L x i.d. ,mm); objemový průtok	Kolona ve druhém rozměru (L x i.d. ,mm); objemový průtok	celkový čas analýzy	detekce	aplikace / vzorky
[30]	8-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky (30 µl)	6 min	IEC (250 x 1); 5 µl/min	SEC (250 x 9,4); 2,1 ml/min	150- 360 min	UV (215 nm)	proteinové standardy a proteinové sérum
[31]	4-cestný ventil	2 zachytávající druhé kolony	4 min	SEC 8x (300 x 7,8); 250 µl/min	polystyren divinylbenzen (33 x 2,1); 1,5 ml/min	30 min	UV (215 nm), MALDI-TOF/MS	proteinové standardy a buňečný lyzát <i>Escherichia coli</i> .
[32]	10-cestný ventil	2 zachytávající druhé kolony		IEC (35 x 4,6); 1 ml/min	C18 (14 x 4,6); 2,5 ml/min	20 min	UV (215 nm)	proteinové standardy a lidské fibroblasty
[33]	vícekanálové propojovací zařízení vybavené třísměrným mikroseparátorovým uzávěrem			IEC (70 x 0,32); 5 µl/min	C18 10 x (250 x 0,25) ; 8 µl/min	150 min	UV (); MALDI-TOF-TOF	peptidy a proteiny; rakovinový nádor
[29]	10-cestný ventil	a) 2 vzorkovací smyčky (100 µl)	1 min	PEG (150 x 4,6); 0,1 ml/min	C18 (10 x 2,1); 1,0 ml/min	200 min	UV (280 nm)	fenolické a flavonové antioxidanty, pivo
		b) 2 C18 zachytávající kolony	9 min	PEG (150 x 4,6); 0,3 ml/min	C18 Chromolith (50 x 4,6); 2,0 ml/min	100 min		
		c) 2 zachytávající ZR-Carbon kolony	6 min	PEG (150 x 4,6); 0,2 ml/min	ZR-Carbon (50 x 2,1); 1,0 ml/min	135 min		
		d) 2 zachytávající ZR-Carbon kolony	5 min	PEG (150 x 2,1) + C18 (125 x 4,6); 0,2 ml/min	ZR-Carbon (50 x 2,1); 1,0 ml/min	140 min		pouze směs fenolických a flavonových antioxidantů
[35]	6-cestný ventil;	zastavením toku první kolony během separace v druhé dimenzi	4 min	PEG (50 x 2,1); 0,4 ml/min	C18 (125 x 2,0); 0,4 ml/min	16 - 40 min	UV (280 nm)	standardy antioxidantů a pivo
[36]	10-cestný ventil	2 zachytávající ZR-Carbon kolony	3 min	C18 (150 x 0,5); 10 µl/min	ZR-Carbon (50 x 2,1); 1,0 ml/min	15 min	UV (280 nm)	směs fenolických antioxidantů, pivo a víno
[37]	10-cestný ventil	a) 2 vzorkovací smyčky (100 µl)	1 min	PEG (150 x 4,6); 0,1 ml/min	C18 Chromolith (50 x 4,6); 2,0 ml/min	neurčeno	UV (280 nm)	standardy fenolických antioxidantů; pivo a víno
		b) 2 zachytávající C18 kolony	8 min	PEG (150 x 4,6); 0,3 ml/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 2,0 ml/min	neurčeno		
			3 min	PEG (50 x 2,1) + C18 (250 x 3,0); 0,3 ml/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 2,0 ml/min	neurčeno		
			7 min	PEG (150 x 4,6) + C18 (50 x 4,6); 0,3 ml/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 2,0 ml/min	neurčeno		
			6 min	fenyl (50 x 3,9); 0,3 ml/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 2,0 ml/min	neurčeno		
[38]	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky (130 µl)	35 s	C18 (150 x 2,1); 0,1 ml/min	CN (75 x 4,6); 1,9 µl/min	45 min	ESI-TOF-MS	antioxidanty (fenolické kyseliny)- byliny
[39]	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky (20 µl)	2 min	CN (250 x 1,0); 10 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 5,0 ml/min	100 min	UV (450 nm), APCI-MS	karotenoidy, karotenoidové estery - červený pomeranč
	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky (20 µl)	2 min	microbore silica (300 x 1,0); 10 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 4,7 ml/min	160 min	UV (450 nm)	karotenoidy - pomerančový esenciální olej a šťáva
[41]	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky (20 µl)	2 min	microbore silica (300 x 1,0); 10 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 4,7 ml/min	110 - 150 min	UV (450 nm)	karotenoidové standarty; volné karotenoidy - mandarinky
				CN (250 x 1,0); 10 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 4,7 ml/min	110 - 150 min	UV (450 nm)	karatenoidové estery - mandarinky
[42]	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky	2 min	Ag (150 x 1,0); 11 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 4 ml/min	140 - 190 min	APCI-MS	triacylglycerol - sojový a lněný olej
[43]	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky	1,5 min	Ag (150 x 1,0); 13 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 4 ml/min	70 - 140 min	UV (210 nm); APCI-MS	triacylglycerové standardy a rýžový olej
[44]	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky	2 min	Ag (150 x 1,0); 11 µl/min	C18 Chromolith (100 x 4,6); 4 ml/min	160 min	APCI-MS	triacylglycerol - oslí mléko
	10-cestný ventil	2 vzorkovací smyčky	1 min	Ag (I) (250 x 2,1); 20 µl/min	C18 (30 x 4,6); 3 ml/min	25 min	UV (210 nm); APCI-MS	triacylglycerol - kukuřičný olej