

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie s využitím rozhraní umožňující
fokusaci sloučenin v převáděných frakcích

Bc. Tereza Rubešová

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Rubešová**
Osobní číslo: **C19489**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie s využitím rozhraní umožňující fokusaci sloučenin v převáděných frakcích**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma druhy rozhraní pro dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii. Zaměřte se především na úplnou (comprehensive) dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii.
2. V experimentální části vyzkoušejte a optimalizujte nové rozhraní, které slouží k přenosu frakcí mezi první a druhou dimenzí dvoudimenzionálního systému. Toto rozhraní se skládá ze tří vícecestných ventilů a tří zachytávacích smyček a bude umožňovat fokusaci frakcí v elektrickém poli před nadávkováním do druhé dimenze. Účinnost nového rozhraní porovnejte s běžným rozhraním používaných v dvoudimenzionální kapalinové chromatografii.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie s využitím rozhraní umožňující fokusaci sloučenin v převáděných frakcích jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 této 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16. 7. 2021

Bc. Tereza Rubešová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytnul během zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za pomoc při tvorbě 2D chromatogramů.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá rozhraními používaných ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii (2D-LC). V rámci teoretické části byla vypracována rešerše na téma dvoudimenzionální kapalinové chromatografie se zaměřením na instrumentaci, gradienty mobilních fází a zejména pak na používaná rozhraní. V experimentální části pak byla provedena série 2D analýz s cílem otestovat nové rozhraní s třemi smyčkami, které bude umožňovat zařazení izoelektrické fokusace sloučenin ve frakcích v průběhu analýzy mezi první a druhou dimenzí 2D systému. Toto rozhraní bylo porovnáváno s běžně používaným rozhraním Agilent-2-port-8-duo a na něm založeného rozhraní s aktivní modulací rozpouštědla (ASM).

KLÍČOVÁ SLOVA

kapalinová chromatografie, úplná dvoudimenzionální kapalinová chromatografie, rozhraní,

TITLE

Two-dimensional liquid chromatography with interfaces enabling the focustion of transfered compounds

ANNOTATION

This thesis focuses on interfaces used in two-dimensional liquid chromatography. The principle of two-dimensional liquid chromatography, instrumentation, gradient of mobile phase in the first and in the second dimension, and interface types are described in the theoretical part of this thesis. In the experimental part, a series of analyses were performed to test the new interface with three loops which allows the inclusion efficient focusing of analytes into narrower zones in fractions during the analysis between the first and second dimensions of the 2D system. This interface was compared to a commonly used interface Agilent-2-port-8-duo and with active solvent modulation (ASM) interface.

KEYWORDS

liquid chromatography, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, interface

OBSAH

Obsah	7
Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	11
Seznam zkratk	12
Úvod	14
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1 Chromatografie	15
1.1.1 Píková kapacita	18
1.2 Instrumentace v 2D kapalinové chromatografii.....	18
1.2.1 Čerpadlo	18
1.2.1.1 Isokratická a gradientová eluce.....	19
1.2.1.2 Typy gradientové eluce ve druhé dimenzi	19
1.2.2 Dávkování vzorku.....	21
1.2.3 Kolony	21
1.2.3.1 Ortogonalita separačních systémů	22
1.2.4 Rozhraní.....	23
1.2.4.1 Funkce rozhraní	23
1.2.4.2 Pasivní modulace smyčkové rozhraní.....	25
1.2.4.3 Rozhraní s použitím stop-flow.....	26
1.2.4.4 Aktivní modulace rozpouštědlem	26
1.2.4.5 Modulace za asistence stacionární fáze	27
1.2.4.6 Rozhraní s paralelní druhou dimenzí	28
1.2.4.7 Rozhraní s vakuovým odpaření	30
1.2.5 Detektor	30
1.2.5.1 Spektrofotometrický detektor	31
1.2.5.2 Fluorescenční detektor	31
1.2.5.3 Elektrochemický detektor	31
1.2.5.4 Hmotností detektor	31
1.2.6 Vyhodnocení	32
1.3 Režimy 2D-LC.....	33

1.3.1	Off-line režim	33
1.3.2	On-line režim	34
1.3.3	Heart-cutting režim	36
1.3.4	Úplný režim	37
1.4	Rostlinné antioxidanty	39
1.5	Fenolové sloučeniny	39
1.5.1	Fenolové kyseliny	40
1.5.2	Flavonoidy	42
1.6	Stanovení antioxidantů	42
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
2.1	Přístroje a zařízení	43
2.1.1	Dvoudimenzionální kapalinový chromatograf	43
2.1.2	Další použité přístroje a zařízení	43
2.2	Chemikálie	44
2.3	Pracovní postupy	48
2.3.1	Příprava mobilních fází	48
2.3.2	Příprava standardu	48
2.4	Podmínky měření	49
2.5	Zpracování naměřených dat	50
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
3.1	2D chromatogramy	58
3.1	Píková kapacita v první dimenzi	62
3.2	Píková kapacita ve druhé dimenzi	64
3.3	Teoretická celková píková kapacita	66
3.4	Ortogonalita	67
3.5	Reálná píková kapacita	69
4	ZÁVĚR	71
5	POUŽITÁ LITERATURA	73
	PŘÍLOHY	78

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Průběh separaci dvousložkové směsi v chromatografické koloně	16
Obrázek 2 Schéma zařízení jednodimenzionální kapalinové chromatografie	17
Obrázek 3 Schéma dvoudimenzionální kapalinové chromatografie.....	17
Obrázek 4 Pístové čerpadlo.....	19
Obrázek 5 Typy gradientů ve druhé dimenzi LC×LC	20
Obrázek 6 Geometrické znázornění ortogonality	22
Obrázek 7 Zapojení dvou poloh osmicestného ventilu	23
Obrázek 8 Zapojení deseticestného/dvoupolohového ventilu.....	24
Obrázek 9 Zapojení symetrického dvoupolohového / čtyřcestného duo ventilu	25
Obrázek 10 Obecné schéma pasivní modulace smyčkového rozhraní	25
Obrázek 11 Schéma rozhraní stop – flow	26
Obrázek 12 Schéma principu aktivní modulace rozpouštědlem (ASM).....	27
Obrázek 13 Schéma modulace za asistence stacionární fáze.....	28
Obrázek 14 Schéma modulace s paralelní druhou dimenzí za použití dvoupolohového osmicestného ventilu s vyměňnými smyčkami za sekundární kolony.....	29
Obrázek 15 Schéma rozhraní s paralelní druhou dimenzí za použití dvou dvoupolohových deseticestných ventilů	29
Obrázek 16 Schéma rozhraní s vakuovým odpařením.....	30
Obrázek 17 Ukázka vzniku 2D chromatogramu	32
Obrázek 18 Znázornění heart-cutting metody 2D-LC	36
Obrázek 19 Znázornění principu úplné 2D-LC	37
Obrázek 20 Fotografie chromatografické soustavy	44
Obrázek 21 Ukázka SG (SG-AG-4).....	50
Obrázek 22 Ukázka FIF gradientu (SG-TS-4).....	50
Obrázek 23 Schéma třísmyčkové rozhraní umožňující elektrickou fokusaci sloučenin.....	54
Obrázek 24 Nové třísmyčkové rozhraní umožňující elektrickou fokusaci sloučenin	55
Obrázek 25 Časové schéma převodu frakce pomocí ventilu se třemi smyčkami	56
Obrázek 26 Ukázka ortogonality a korelačního faktoru	58
Obrázek 27 2D chromatogram FIF-AG-4.....	59
Obrázek 28 2D chromatogram SH-AG-4	59
Obrázek 29 2D chromatogram SH-ASM-4	61
Obrázek 30 2D chromatogram SH-TS-4	61

Obrázek 31 Grafická vizualizace píkových kapacit v první dimenzi	63
Obrázek 32 Grafická vizualizace píkových kapacit ve druhé dimenzi	65
Obrázek 33 Grafická vizualizace teoretických celkových píkových kapacit.....	67
Obrázek 34 Grafická vizualizace korelačního faktoru.....	69
Obrázek 35 Grafická vizualizace reálných píkových kapacit	70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Základní rozdělení chromatografických metod	15
Tabulka 2 Výhody a nevýhody off-line režimu	34
Tabulka 3 Výhody a nevýhody on-line režimu.....	35
Tabulka 4 Výhody a nevýhody heart-cutting režimu 2D-LC	37
Tabulka 5 Výhody a nevýhody úplného režimu 2D-LC.....	38
Tabulka 6 Rozdělení fenolových sloučenin podle počtu a uspořádání atomů uhlíku.....	40
Tabulka 7 Deriváty kyseliny benzoové.....	41
Tabulka 8 Deriváty kyseliny skořicové	41
Tabulka 9 Přehled použitých standartních látek	45
Tabulka 10 Podmínky měření při SG a použití Agilent-2-port-8-duo ventilu a třísmýčkového ventilu umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin.....	51
Tabulka 11 Podmínky měření při SG a použití ASM.....	52
Tabulka 12 Podmínky měření při FIF gradientu a použití Agilent-2-port-8-duo ventilu a třísmýčkového ventilu umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin	53
Tabulka 13 Podmínky měření při FIF gradientu a použití ASM.....	53
Tabulka 14 Přehled vypočítaných píkových kapacit pro první dimenzi.....	62
Tabulka 15 Přehled vypočítaných píkových kapacit pro druhou dimenzi.....	64
Tabulka 16 Přehled vypočítaných teoretických celkových píkových kapacit 2D-LC.....	66
Tabulka 17 Přehled naměřených a vypočítaných hodnot korelačního faktoru a koeficientu ortogonality	68
Tabulka 18 Přehled vypočítaných reálných píkových kapacit 2D-LC	70

SEZNAM ZKRATEK

1D-LC	Jednodimenzionální kapalinový chromatografie
2D	Dvoudimenzionální chromatografie
2D-LC	Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AG	Rozhraní Agilent-2-port-8-duo
ASM	Aktivní modulace rozpouštědlem (Active Solvent Modulation)
BiGDMA	Bisfenol A dimethakrylát
D1	První dimenze
D2	Druhá dimenze
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DPPH	Difenylpikrylhydrazyl
FIF	„Full in fraction“ gradient
FIFO	„First-in-first-out“ (první dovnitř, první ven)
FILO	„First-in-last-out“ (první dovnitř, poslední ven)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (Gas Liquid Chromatography)
GPC	Gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography)
GSC	Plynová chromatografie na molekulových sítích (Gas-Solid Chromatography)
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion-Exchange Chromatography)
LC×LC	Úplná dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (Comprehensive Two Dimensional Liquid Chromatography)

LC-LC	„Heart-cutting“ režim
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie (Liquid-Liquid Chromatography)
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie (Liquid-Solid Chromatography)
MEDSA	N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) amonium betain
NPLC	Systém s normální fází (Normal-Phase Liquid Chromatography)
RPLC	Systém s obrácenými fázemi (Reversed-Phase Liquid Chromatography)
SFC	Chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu (Supercritical Fluid Chromatography)
SG	„Shifted“ gradient
SIF	„Segment in fraction“ gradient
TS	Tří smyčkový ventil umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin

ÚVOD

Kapalinová chromatografie je hojně používaná separační technika, která se používá pro analýzy složitějších vzorků a směsí analytů. Je to metoda, díky které lze separovat a stanovit široké spektrum látek. Běžně se využívá v potravinářském, zemědělském, biochemickém průmyslu, ve farmacii a medicíně. V poslední době vzrostl zájem o vícedimenzionální chromatografie, kde je vzorek vystaven více různým separačním procesům. V případě dvoudimenzionální kapalinové chromatografie (2D-LC) tak, že vzorek během analýzy projde dvěma různými separačními systémy, tzv. dimenzemi, které jsou ve dvou různých kolonách. Analyzované látky se tedy separují dvakrát, většinou na základně rozdílných vlastností, a celková separace je účinnější. Tato technika tak umožňuje získat vyšší rozlišení, selektivitu a píkovou kapacitu v jedné separaci než při klasické jednorozměrné kapalinové chromatografii (1D-LC) s využitím jen jedné chromatografické kolony.

Jednou s klíčovými součástmi vícerozměrných kapalinových chromatografií je rozhraní, které umožňuje přenos frakcí, částí vzorku, mezi první a druhou kolonu. Cílem této práce bylo vyzkoušet nové třísmýčkové rozhraní, umožňující fokusaci sloučenin před nadávkováním na druhou kolonu, a porovnat ho s běžně používanými rozhraními.

1 TEORETICKÁ ČÁST

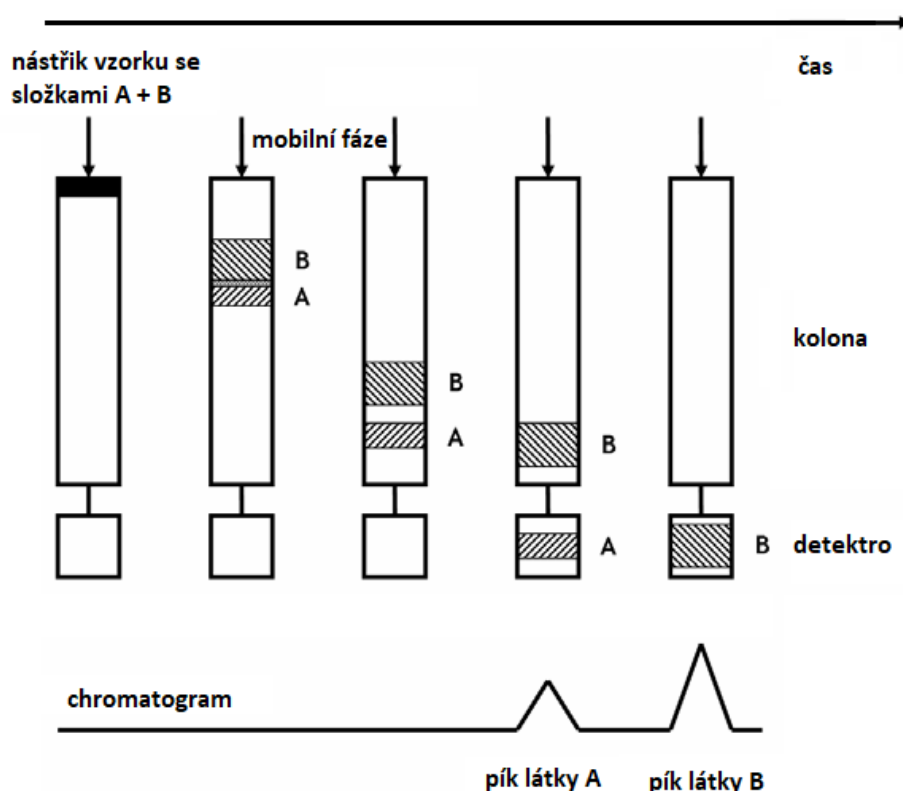
1.1 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, která se využívá k dělení směsí obsahujících velké množství látek. Technika je založena na mnohonásobně se opakujícím ustavování rovnováhy separované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (mobilní a stacionární fázi). Vzorek se nadávkuje do mobilní fáze, kterou může tvořit plyn, kapalina případně nadkritická tekutina a prochází stacionární fází, které je nepohyblivá a tvoří jí pevná látka nebo kapalina upevněná na nosiči. Vlivem tohoto procesu dochází k separaci jednotlivých látek, což se nakonec projeví rozdílnými elučními časy. Mobilní a stacionární fáze by měly být zvoleny tak, aby se složky vzorku na nich dobře dělily [1–3]. V Tabulce 1 je uvedeno základní rozdělení chromatografických metod podle použití mobilní fáze, stacionární fáze a dle separačního mechanismu.

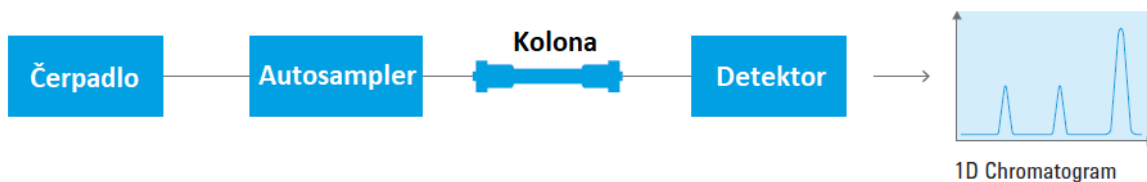
Tabulka 1 Základní rozdělení chromatografických metod [3; 4]

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Separační mechanismus	Chromatografická metoda
Kapalina	Kapalina	Rozdělování	Kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)
		Sítový efekt	Gelová permeační chromatografie (GPC)
	Pevná látka	Adsorpce	Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)
		Iontová výměna	Iontově výměnná chromatografie (IEC)
Plyn	Kapalina	Rozdělovací rovnováha	Plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
	Pevná látka	Adsorpce	Plynová adsorpční chromatografie (GSC)
		Sítový efekt	Plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)
Nadkritická tekutina	Kapalina		Chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu (SFC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti jednou z nejpoužívanějších technik pro analýzu širokého spektra látek. Lze ji využít jak pro analýzu nízkomolekulárních organických látek, tak i látek vysokomolekulárních, jakými jsou např. bílkoviny. HPLC se často používá v potravinářském, zemědělském, biochemickém průmyslu, ve farmacii a medicíně. V kapalinové chromatografii se jako mobilní fáze používá kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie vzorek nemusí být těkavý a stabilní při zvýšené teplotě, pouze musí být rozpustný ve vhodném rozpouštědle či směsi rozpouštědel. Ve standardním, tzv. jednodimenzionálním uspořádání se vzorek nadávákuje do proudu mobilní fáze, která je pomocí čerpadel vháněna do kolony naplněné stacionární fází. Složky vzorku se na základě rozdílných afinit ke stacionární a mobilní fáze rozdělí. Na Obrázku 1 je zobrazen průchod vzorku chromatografickou kolonou. Vzorek se skládá ze dvou složek, které se během průchodu kolonou oddělí. Nakonec mobilní fáze se složkami vzorku putuje do detektoru, který sleduje změnu koncentrace analytu [1; 3; 5]. Schéma klasického HPLC systému, tedy jednodimenzionální kapalinové chromatografie, je uvedeno na Obrázku 2.

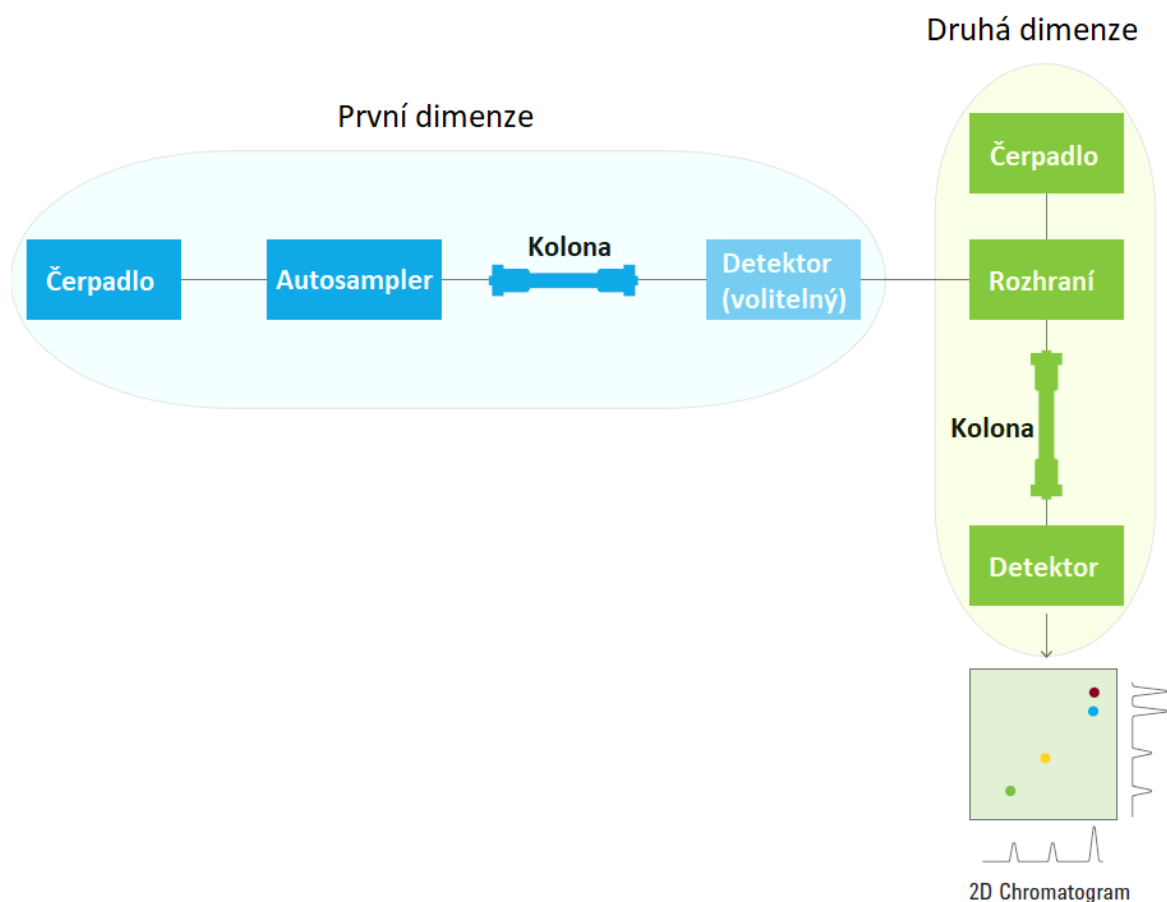


Obrázek 1 Průběh separaci dvousložkové směsi v chromatografické koloně [6]



Obrázek 2 Schéma zařízení jednodimenzionální kapalinové chromatografie [7]

Na mnoho vzorků účinnost jednodimenzionální kapalinové chromatografie nestačí. Vzorky jsou buď příliš složité nebo obsahují mnoho velmi podobných sloučenin, které nejdou dobře separovat. Na tyto vzorky je vhodnější použít dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii (2D-LC). 2D-LC označuje techniku, ve které je vzorek vystaven dvěma různými separačním procesům, které jsou v rámci této techniky označovány jako první a druhá dimenze (Obrázek 3).



Obrázek 3 Schéma dvoudimenzionální kapalinové chromatografie [7]

V první dimenzi je vzorek, obdobně jako u 1D-LC, nadávkován do proudu mobilní fáze, která je pomocí čerpadel vháněna do první kolony naplněné stacionární fází. Zde se složky vzorku rozdělí a následně putují do detektoru (volitelně) nebo rovnou do rozhraní. Rozhraní je systém jednoho nebo několika vícecestných ventilů, které umožňují přenos frakcí z první

dimenze na kolonu druhé dimenze. Přenos frakcí je nejčastěji zajištěn pomocí dvou dávkovacích smyček. Přepínáním mezi těmito smyčkami dochází k jejich střídavému plnění eluentem z první dimenze a vymýváním mobilní fáze druhé dimenze, čímž se složky vzorku postupně dostávají do kolony druhé dimenze. V koloně druhé dimenze dochází k další separaci, a nakonec složky vzorku putují do detektoru. Celý 2D-LC systém se obecně skládá ze dvou čerpadel, dále z dávkovače vzorků, dvou kolon, rozhraní a detektoru. Schéma je uvedeno na Obrázku 3. Tato metoda má vyšší rozlišení, selektivitu a píkovou kapacitu oproti jednodimenzionální separaci [8–12].

1.1.1 Píková kapacita

Píková kapacita, n_c , udává maximální počet píků, které lze rozdělit v rámci jedné analýzy. Píkovou kapacitu jedné separace lze vyjádřit pomocí následující rovnice:

$$n_{c,1D} = \frac{t_z - t_a}{W} \quad (1)$$

kde t_z je retenční čas posledního píku separace, t_a je retenční čas prvního píku separace a W je průměrná šířka píků v základní linii [13; 14].

Píková kapacita v první dimenzi dosahuje 50–100 píků. Pomocí dvoudimenzionálních technik lze zvýšit píkovou kapacitu až o několik řádů. Celková píková kapacita 2D-LC ($n_{c,2D-LC}$) systému je rovna součinu píkových kapacit první ($n_{c,D1}$) a druhé dimenze ($n_{c,D2}$) [15; 16]:

$$n_{c,2D-LC} = n_{D1} \cdot n_{D2} \quad (2)$$

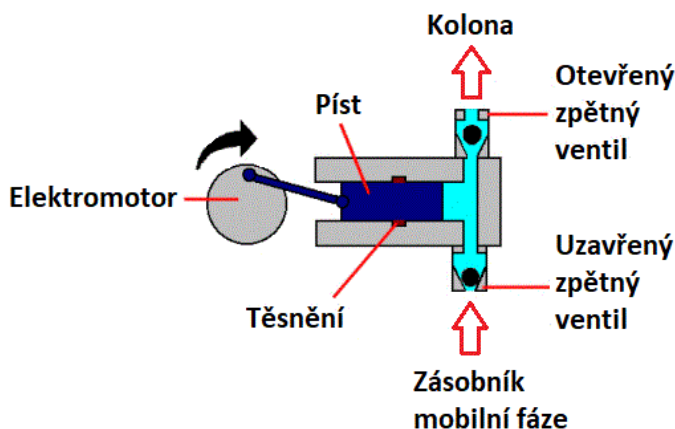
1.2 Instrumentace v 2D kapalinové chromatografii

V této kapitole jsou uvedeny jednotlivé součásti kapalinového chromatografu. Jsou zde popsány základní informace o čerpadlech, dávkování vzorku, kolonách a detektorech. Toto zařízení se používá jak pro HPLC, tak pro 2D-LC. Dále jsou zde uvedeny informace a typy rozhraní, které se využívají ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii.

1.2.1 Čerpadlo

Čerpadla zajišťují za vysokých tlaků průtok mobilní fáze kolonou. Měla by zajistit konstantní průtok bez pulzů, který je důležitý pro správnou kvantifikaci a reprodukovatelnost. Části čerpadel, které jsou ve styku s mobilní fází, by měly být odolné proti korozi. Nejčastěji se používají pístová čerpadla (Obrázek 4). Tato čerpadla se skládají z válce s pístem, který se

periodicky pohybuje a tím nasává a vypouští mobilní fázi. Mezi nevýhody toho čerpadla patří pulzace, která se dá zmírnit použitím dvoučinných čerpadel nebo několika za sebou sériově zapojených čerpadel. Mezi výhody pístových čerpadel patří snadná změna složení mobilních fází [1; 3; 5].



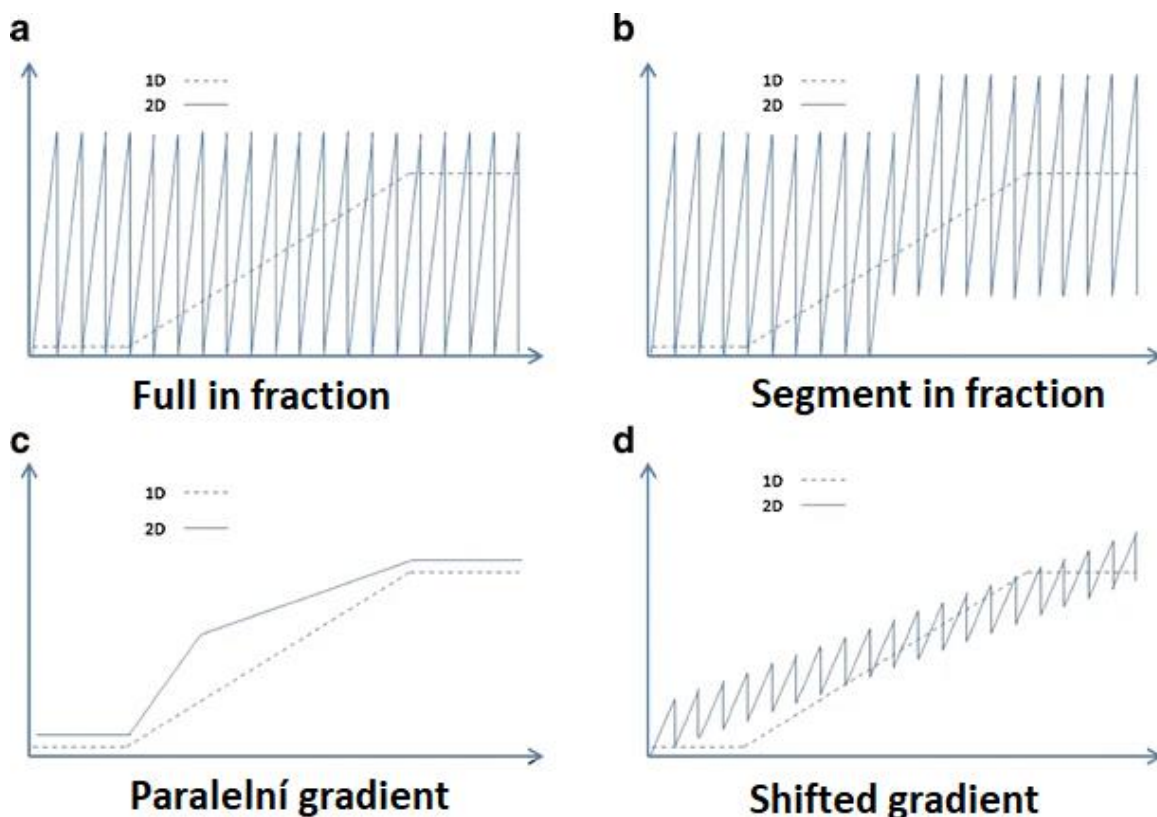
Obrázek 4 Pístové čerpadlo [17]

1.2.1.1 Isokratická a gradientová eluce

K eluci složek z kolony lze používat isokratickou nebo gradientovou eluci. Při isokratické eluci je složení mobilní fáze stále stejné. Na rozdíl od gradientové eluce, kdy se složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění. Ta je vhodná pro separace, kde jsou eluční rozdíly látek velké. Díky tomu lze dosáhnout lepší a rychlejší separaci. Mimo to gradientová eluce v určitých případech snižuje rozmývání píků, a tedy zlepšuje rozlišení píků [1].

1.2.1.2 Typy gradientové eluce ve druhé dimenzi

V druhé dimenzi systému úplné kapalinové chromatografii (LC×LC) se využívá několik typů gradientů, konkrétně se jedná o tzv. „full in fraction“ gradient (FIF), „segment in fraction“ gradient (SIF), paralelní gradient a „shifted“ gradient (SG) (Obrázek 5). Při FIF gradientu (Obrázek 5a) dochází v rámci každého cyklu druhé dimenze k úplné změně složení mobilní fáze a tento proces se opakuje po celou dobu analýzy. Velmi strmá změna složení mobilní fáze, ke které dochází ve velmi krátkém čase, silně potlačuje výskyt rozšířených píků. Zároveň ale zvyšuje pravděpodobnost tzv. „wrap-around“ chování. Tedy situace, kdy se složky se silnější afinitou k stacionární fázi nestíhají vyloučit z kolony druhé dimenze v jednom cyklu a dostávají se tak do cyklů následujících [18].



Obrázek 5 Typy gradientů ve druhé dimenzi LC×LC [18]

SIF gradient (Obrázek 5b) je obdobou FIF gradientu. V tomto případě je gradient ve druhé dimenzi rozdělen na několik segmentů (dva a více) a v každém segmentu se používá jiný koncentrační rozsah. Díky tomu složení mobilní fáze lépe odpovídá děleným frakcím. Ačkoli změna koncentrace nebývá tak strmá jako u FIF gradientu, i tak velmi dobře potlačuje vznik rozšířených píků [18].

V případě paralelního gradientu (Obrázek 5c) je změna složení mobilní fáze zcela nezávislá na průběhu cyklů druhé dimenze. V rámci jednoho cyklu působí gradient jako kvazi-izokratický a v rámci celé analýzy je změna složení vcelku pozvolná. Tento gradient umožňuje prodloužení času separace v druhé dimenzi, jelikož není nutné mezi jednotlivými cykly měnit složení mobilní fáze, není nutné podmínky na koloně ekvilibrovat před dalším gradientem. Pozvolný charakter gradientu ovšem způsobuje vznik rozšířených píků [18].

SG (Obrázek 5d) je kombinací FIF a paralelního gradientu. V rámci každého cyklu druhé dimenze u něj dochází ke strmé změně složení mobilní fáze v určitém, ne příliš širokém, koncentračním rozsahu, který se v průběhu analýzy kontinuálně mění v závislosti na retenci separovaných látek. Tyto podmínky umožňují současně potlačovat „wrap-around“ chování stejně jako vznik rozšířených píků [18].

1.2.2 Dávkování vzorku

Dávkování vzorku do kapalinové chromatografie se provádí pomocí dvoupolohového šesticestného ventilu. V první poloze se vzorek pomocí mikrostríkačky nadávkuje do smyčky o určitém objemu, zatímco mobilní fáze ventilem prochází rovnou do kolony. Díky tomu lze nadávkovat vzorek za atmosférického tlaku ze stríkačky do smyčky. Po přepnutí ventilu mobilní fáze proudí skrz tuto smyčku a vymývá vzorek do kolony [1; 5]. U moderních přístrojů se často nachází automatický dávkovač (autosampler). V tomto případě jsou vzorky automaticky dávkovány do smyčky. Vzorky jsou uloženy ve vialkách ve stojanu, kde se může dle potřeby nastavit teplota vyhřívání nebo chlazení (4–40 °C). U některých přístrojů se dá naprogramovat i předkolonová derivatizace [12].

1.2.3 Kolony

Kolona je hlavní částí chromatografu a dochází v ní k dělení složek vzorku. V HPLC se používají nejčastěji kolony vyrobené z oceli o délce 3–30 cm a šířce 2–10 mm, které jsou naplněny stacionární fází. Před samotnou kolonou se často používají předkolony, které zachycují nečistoty z mobilní fáze a vzorku a tím prodlužují životnost kolony. Kolony jsou běžně uzavřeny v termostatu, který udržuje konstantní teplotu po celou dobu analýzy. Teploty se mohou běžně nastavovat od 4–100 °C a nedodržení konstantní teploty může ovlivnit retenční chování [3; 5; 12].

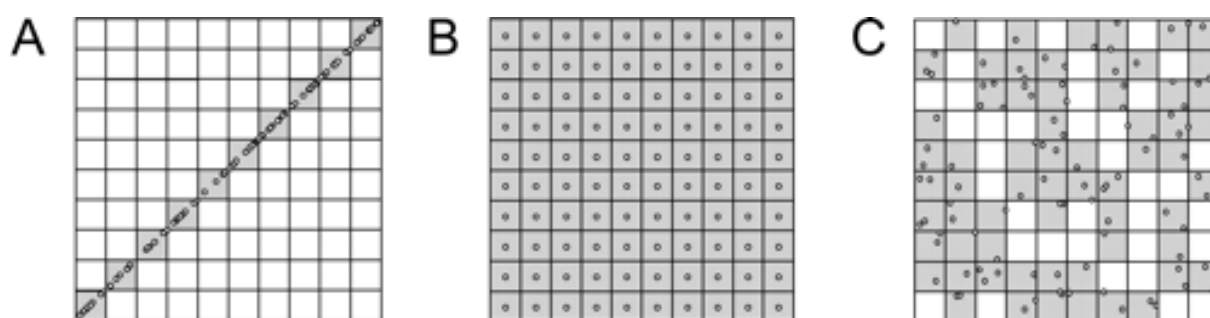
Stacionární fáze v kolonách může být různá. Chromatografické kolony lze rozdělit podle toho, na jakém principu dochází k separaci. Mezi nejběžnější patří systém s normální fází (NPLC), systém s obrácenými fázemi (RPLC) a chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC). Systém s normálními fázemi se skládá z nepolární mobilní fáze a polární stacionární fáze. Mezi příklady nepolárních mobilních fází patří hexan, cyklohexan, chloroform, benzen a toluen. Jako polární stacionární fáze se používá buď samotný oxid křemičitý nebo oxid křemičitý, na kterém je navázána další funkční skupina. Tou bývá nejčastěji kyanoskupina (-CN), aminoskupina (-NH₂) nebo diolová skupina (-CHOH-CH₂OH). U systému s reverzními fázemi je to přesně naopak. Jako nepolární stacionární fáze se běžně používají dlouhé uhlovodíkové řetězce typu oktyl (C8), oktadecyl (C18) atd. navázané na nosiči (silikagel). Kapaliny používané jako polární mobilní fáze jsou např. voda, methanol, acetonitril a pufrované roztoky kyseliny octové [1]. Chromatografie hydrofilních interakcí využívá kolony s polární stacionární fází a vodně-organickou mobilní fází (např. acetonitril s vodou či pufrem), přičemž organická složka je v

nadbytku. Tento systém se využívá pro silně polární látky, jako jsou například aminokyseliny, peptidy či sacharidy. [19].

U 2D-LC se používá kombinace dvou různých chromatografických systémů s rozdílnou selektivitou retence. Co se týče rozměrů kolon, tak v první dimenzi se běžně používají delší kolony s malým vnitřním průměrem a s malými průtoky v řádech jednotek až desítek mikrolitrů za minutu. Naproti tomu ve druhé dimenzi se používají velice krátké kolony s 4–8× větším vnitřním průměrem oproti první dimenzi, čímž je dosaženo průtoku mobilní fáze v řádech jednotek mililitrů za minutu. Díky tomu lze zajistit vymytí celého obsahu smyčky z kolony, před nadávkováním další frakce [8; 20].

1.2.3.1 Ortogonalita separačních systémů

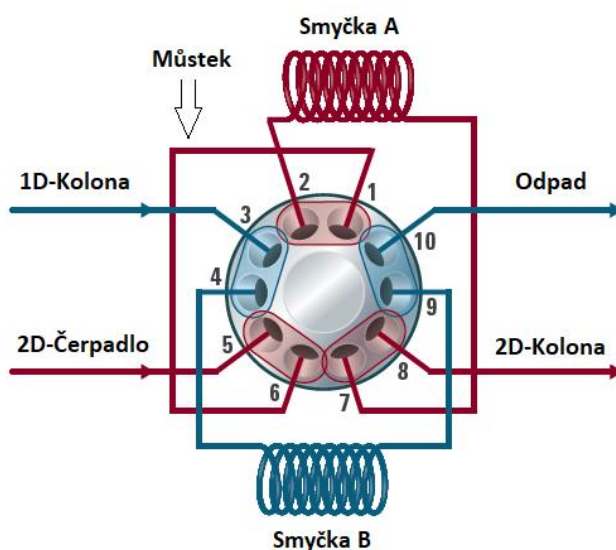
Ortogonalní 2D systém je systém s naprosto odlišnými mechanismy zadržování látek poskytující nekorelovaná retenční data. Na Obrázku 6 jsou znázorněny hypotetické systémy s maximální celkovou píkovou kapacitou 100 (v každé dimenzi je píková kapacita 10). Na Obrázku 6A je zobrazen zcela neortogonální systém, kde jsou látky seřazeny podél úhlopříčky a celkově pokrývají pouze 10 % plochy chromatogramu. Retence látek na obou kolonách tohoto systému je prakticky stejná. Na obrázku 6B je naopak zobrazen zcela ortogonální systém, kde látky pokrývají plochu chromatogramu ze 100 %. Tento systém je ideální, ale zcela nereálný na rozdíl od Obrázku 6C. Zde látky pokrývají 63 % plochy a tento systém je reálně ortogonální [16]. Cílem při výběru kolon do 2D-LC systému je dosažení reálné ortogonality.



Obrázek 6 Geometrické znázornění ortogonality, A – zcela neortogonální systém, B – plně ortogonální systém, C – reálně ortogonální systém [16]

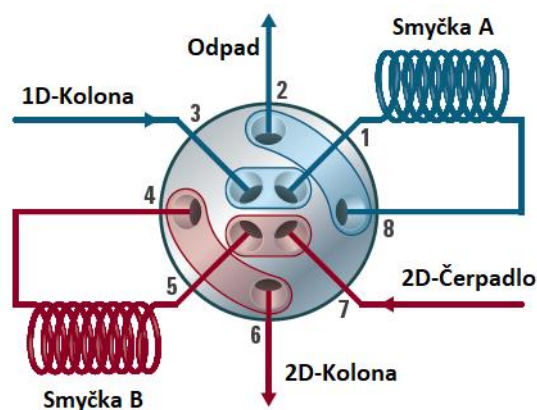
může vést k rozdílům v retenčních časech, tvarech a šířce píků, v závislosti na použité smyčce [7].

Tento problém asimetrie byl odstraněn použitím deseticestného/dvoupolohového přepínacího ventilu, který je uveden na Obrázku 8. Tento ventil obsahuje opět dvě smyčky, ale tentokrát jsou obě v uspořádání FIFO. Z tohoto pohledu jsou tedy obě smyčky symetrické. Nevýhodou tohoto zapojení je, že před a za smyčkou „A“ je potřeba můstek, který přidává malé množství objemu na obou stranách smyčky. Tato asymetrie může vést opět k rozdílným retenčním časům podle použité smyčky [7].



Obrázek 8 Zapojení deseticestného/dvoupolohového ventilu [7]

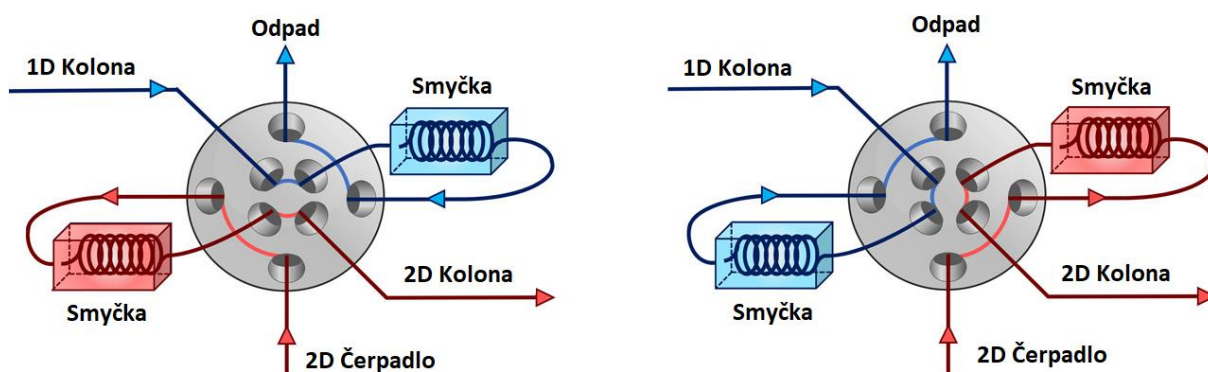
Výše zmíněné problémy s nesymetrickým plněním a vymýváním vyřešila firma Agilent, která vyvinula naprosto symetrický ventil. Tento dvoupolohový/čtyřcestný duo ventil (Obrázek 9) opět obsahuje dvě smyčky, které mohou být obě jak v uspořádání FIFO, tak FILO, a zároveň není nutné použití můstku. Odbouráním můstku a možností plnit a promývat stejným směrem poskytuje tento ventil nejlepší reprodukovatelnost, tvary píku v druhé dimenzi [7].



Obrázek 9 Zapojení symetrického dvoupolohového / čtyřcestného duo ventilu [7]

1.2.4.2 Pasivní modulace smyčkové rozhraní

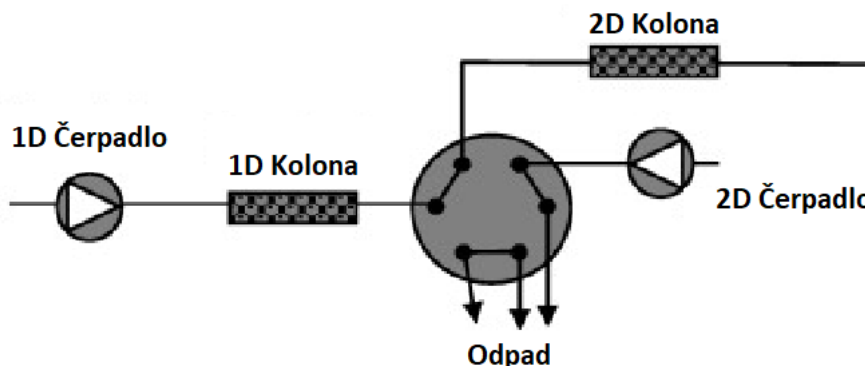
Smyčkové rozhraní (Obrázek 10) je základním typem rozhraní. Nejčastěji se skládá z dvoupolohového osmi nebo deseticestného ventilu se dvěma smyčkami se stejnými objemy. Velikost smyčky závisí na délce vzorkovací periody (tzv. modulace) a rychlosti průtoku mobilní fáze v první dimenzi. Mezi nevýhody smyčkového rozhraní patří možné problémy s neslučitelností mobilních fází, které mohou negativně ovlivňovat separaci ve druhé dimenzi. Rozdílná síla mobilních fází může také vést k rozdělení nebo deformaci píku. Při použití silné mobilní fáze v první dimenzi může způsobit nezadržování analytů na stacionární fázi druhé dimenze. Dále mobilní fáze z první dimenze může znehodnotit kolonu ve druhé dimenzi nebo může zhoršovat detekci analytů [21; 22].



Obrázek 10 Obecné schéma pasivní modulace smyčkového rozhraní [22]

1.2.4.3 Rozhraní s použitím stop-flow

U rozhraní s metodou stop-flow jsou nejčastěji dimenze spojené přes ventil bez použití smyček (Obrázek 11).

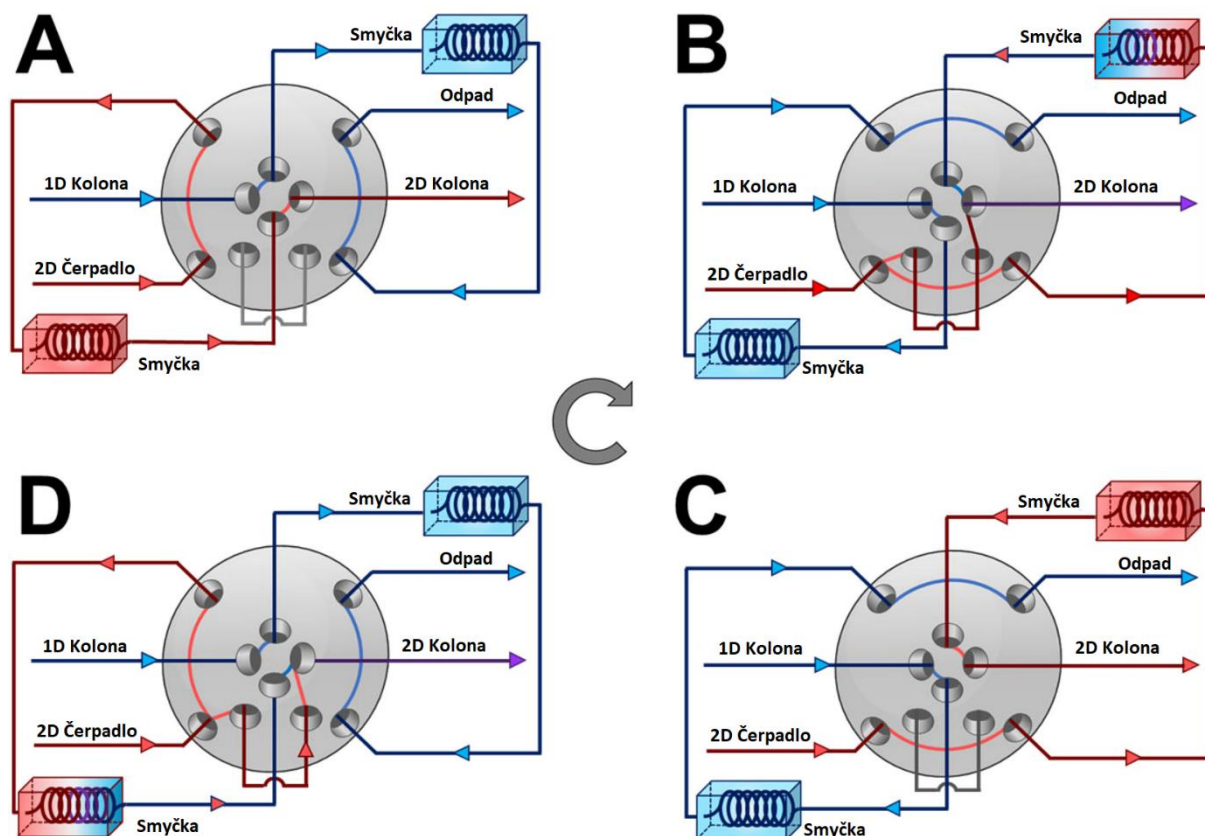


Obrázek 11 Schéma rozhraní stop – flow [21]

Klasické smyčkové rozhraní (Obrázek 10) se při tomto přístupu dá také využít, ale může to mít negativní vliv na výsledky. Ventil v jedné poloze přesouvá eluent z první kolony do druhé a po přenosu frakce dojde k jeho přepnutí, kdy se tok v první dimenzi zastaví a do druhé kolony se čerpá mobilní fáze. Čas této fáze není nijak omezen a může dojít ke zlepšení píkovej kapacity. Zde je velice důležitá správná volba mobilních fází, jejich nekompatibilita může zhoršovat tvar píku a píkovou kapacitu. Mezi nevýhody této metody patří délka analýzy, která může být velice dlouhá, ale při použití vyšších teplot ve druhé dimenzi lze docílit jejího zrychlení. Naproti tomu tato metoda umožňuje použití delších kolon ve druhé dimenzi [20; 21; 23].

1.2.4.4 Aktivní modulace rozpouštědlem

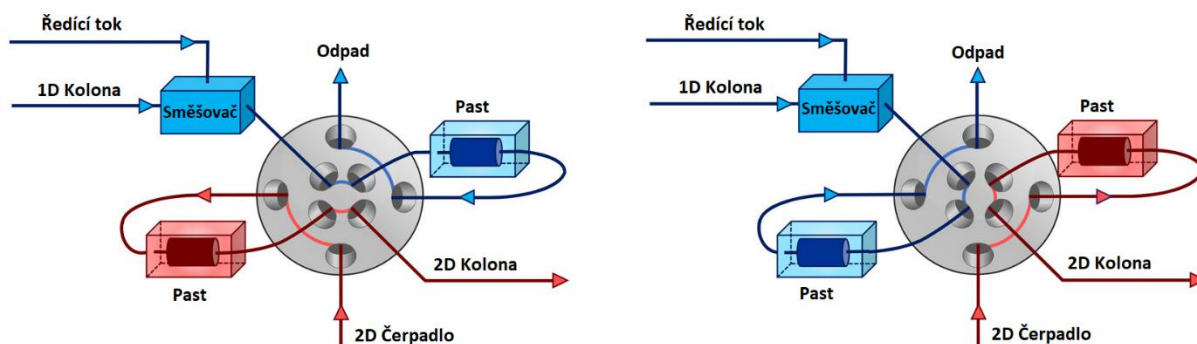
Při aktivní modulaci rozpouštědlem (ASM) se nepoužívá klasický dvoupolohový ventil, ale využívá se speciální čtyřpolohový ventil s kapilárou. Na Obrázku 12 jsou znázorněny dvě pozice (A a C), které odpovídají pasivní modulaci. Zde se do jedné ze smyček vhání eluent z první dimenze a druhou smyčkou prochází mobilní fáze, která eluent posouvá do sekundární kolony. Při polohách B a D dochází k rozdělení toku mobilní fáze (pro druhou dimenzi) na dvě části. Jedna část prochází smyčkou a druhá smyčku obchází pomocí kapiláry a ředí tok před vstupem do sekundární kolony bez potřeby dalšího čerpadla. Ředění toku způsobí zvětšení objemu a zároveň snížení síly mobilní fáze z první dimenze, což se projeví na zlepšení citlivosti a tvaru píku. Podle použité kapiláry lze měnit poměr mobilní fáze, tedy té, která prochází smyčkou a té která obsah smyčky ředí [22; 24–26].



Obrázek 12 Schéma principu aktivní modulace rozpouštědlem (ASM). Osmicestný čtyřpolohový ventil se dvěma smyčkami a kapilárou. V pozici A a C je funkce totožná jako v pasivní modulaci a v pozici B a D je tok sekundární mobilní fáze rozdělen pomocí kapiláry a opět spojen za smyčkou [22].

1.2.4.5 Modulace za asistence stacionární fáze

Modulace za asistence stacionární fáze (Obrázek 13) funguje na principu maloobjemových pastí neboli smyček se stacionární fází, ve kterých je většinou podobná stacionární fáze jako v koloně druhé dimenze. Rozhraní u této metody je upraveno nahrazením prázdných smyček smyčkami naplněnými stacionární fází nebo se používají krátké chromatografické kolony a předkolony. Touto smyčkou prochází eluent z první dimenze a na stacionární fázi se zadržují analyty, zatímco zbytek eluentu putuje do odpadu. Před vstupem do smyčky bývá tok první dimenze zředěn pomocí vložených směšovačů, aby se analyty na stacionární fázi lépe zadržovaly. Po přepnutí ventilu prochází smyčkou se stacionární fází mobilní fáze druhé dimenze a eluuje zachycené analyty na kolonu druhé dimenze, kde dojde k separaci [21; 22].



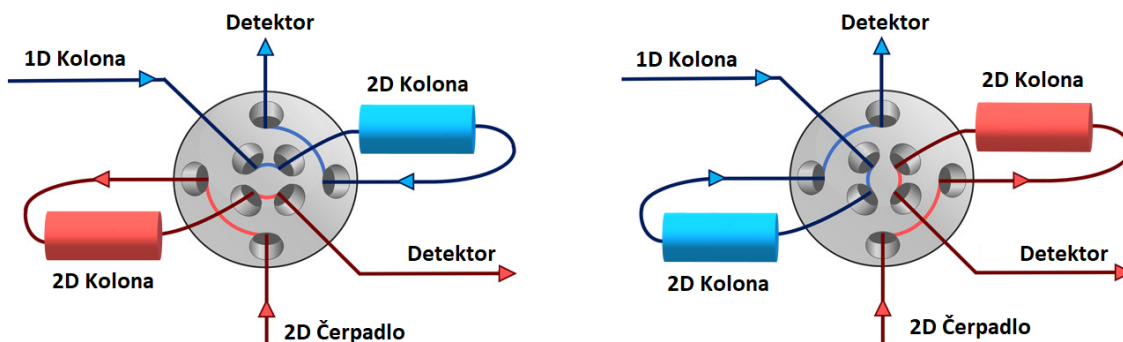
Obrázek 13 Schéma modulace za asistence stacionární fáze, kde se místo klasických smyček používá zachytávací kolonky (past) se stacionární fází. Eluent z první dimenze lze nejprve zředit pomocí řídícího toku a směšovače, aby došlo k lepšímu zachycení analytů v pasti [22].

Modulace za asistence stacionární fáze má několik výhod. Například se ztrácí problém s nekompatibilitou rozpouštědel, v důsledku odstranění většiny mobilní fáze z první dimenze. Dále dochází ke zlepšení citlivosti detekce, díky zachycování analytu na stacionární fázi. V neposlední řadě dochází ke snížení objemů vstřikovaných do druhé dimenze, díky čemuž lze použít i krátké kolony bez ztráty účinnosti a celkově to vede ke snížení doby analýzy. Tato modulace obsahuje i několik nevýhod. Například je důležité, aby všechny analyty z první dimenze byly dostatečně zachyceny a tím pádem se zabránilo jejich ztrátě. Toto je obzvláště těžké, když mají jednotlivé analyty různé chemické vlastnosti, protože vlastnosti stacionární fáze ve smyčkách jsou závislé na vlastnostech složek vzorku a rozpouštědlech použitých v jednotlivých dimenzích. Mobilní fáze první dimenze by měla ideálně mít slabou eluční sílu v zachytávacích kolonkách, aby došlo k zachycení a zaostření analytů. Naproti tomu mobilní fáze ve druhé dimenzi, by měla být silným rozpouštědlem, aby docházelo k rychlé desorpci. Dále je nezbytně nutné, aby obě smyčky se stacionární fází byly naprosto identické a měly stejnou historii provedených analýz, a tím pádem nedocházelo k nestejnorodému průběhu při střídání smyček. Samotné smyčky nám mohou snižovat celkovou robustnost systému a přispívají k nárůstu tlaku na kolonu v druhé dimenzi [21; 22].

1.2.4.6 Rozhraní s paralelní druhou dimenzí

Rozhraní s paralelní druhou dimenzí používá dvě kolony ve druhé dimenzi na rozdíl od klasické LC×LC, kde pro každou dimenzi je pouze jedna kolona. Tyto dvě kolony jsou používány paralelně, což umožňuje zvětšení separační plochy ve druhé dimenzi a tím pádem snížení požadavků na rychlost toku. Z důvodů kombinování výsledných chromatografů z obou sekundárních kolon za účelem získání celkového chromatografu je velice důležité, aby obě

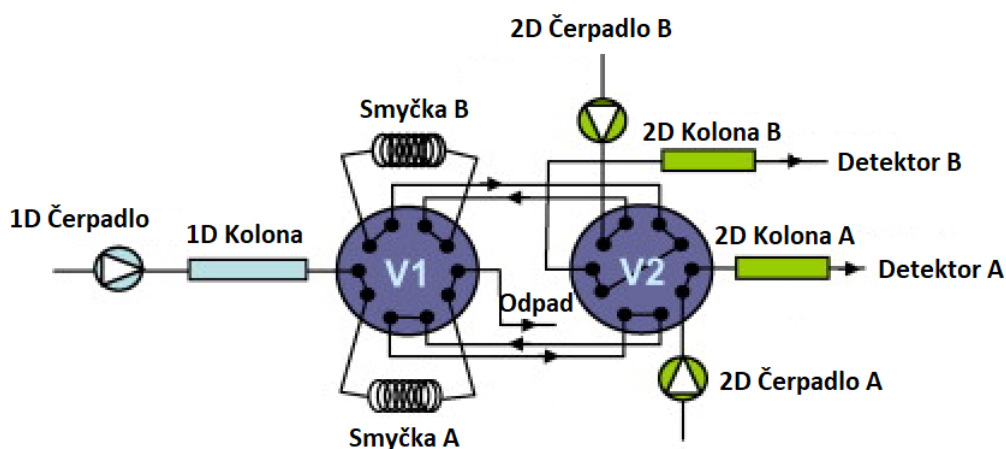
kolony poskytovaly stejnou selektivitu, účinnost i retenční časy. Kolony by měly být naprosto totožné a také je důležité mít stejnou délku kapilár, kterými eluent prochází. Tohoto nastavení lze dosáhnout výměnou smyček na klasickém dvou polohovém deseticetném ventilu za chromatografické kolony (Obrázek 14).



Obrázek 14 Schéma modulace s paralelní druhou dimenzí za použití dvupolohového osmicestného ventilu s vyměňenými smyčkami za sekundární kolony [22]

Část eluentu z první dimenze putuje do první sekundární kolony, kde dochází k separaci a po přepnutí ventilu opět další část putuje do druhé sekundární kolony. Tento krok se neustále opakuje. Dále tohoto nastavení lze taktéž dosáhnout za použití dvou dvupolohových deseticestných ventilů (Obrázek 15), kde první ventil převádí eluent z první dimenze do smyček a druhý ventil rozvádí mobilní fázi druhé dimenze do smyček a do sekundárních kolon [20; 21].

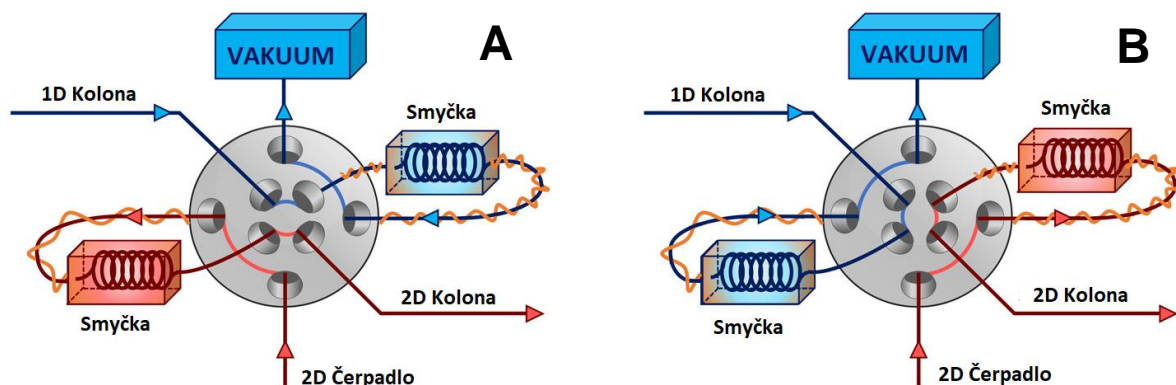
Mezi nevýhody tohoto rozhraní patří vyšší náročnost na vybavení, z důvodu potřeby dalších přístrojů jako je detektor, čerpadlo, druhá paralelně zapojená kolona a případně druhý přepínací ventil oproti pasivní modulaci. Na druhou stranu díky tomuto rozhraní získáme dvakrát delší čas na separaci ve druhé dimenzi oproti klasickému uspořádání s jednou kolonou ve druhé dimenzi a tím můžeme dosáhnout lepšího rozlišení a píkových kapacit [20].



Obrázek 15 Schéma rozhraní s paralelní druhou dimenzí za použití dvou dvupolohových deseticestných ventilů [20]

1.2.4.7 Rozhraní s vakuovým odpařením

Rozhraní s vakuovým odpařením (Obrázek 16) bylo navrženo speciálně kvůli problémům se slučitelností mobilních fází, ke kterým docházelo při spojení chromatografických systémů s normálními (NPLC) a obrácenými fázemi (RPLC).



Obrázek 16 Schéma rozhraní s vakuovým odpařením [22]

Eluent z první dimenze prochází zahřátou smyčkou (Obrázek 16A, modrá smyčka), která je připojená k vakuu a díky zvýšené teplotě a sníženému tlaku se rozpouštědlo snadno a rychle odpaří, na rozdíl od netěkavých analytů. Po přepnutí ventilů do druhé polohy se do smyčky (Obrázek 16B, červená smyčka) pustí mobilní fáze druhé dimenze a při zvýšené teplotě by mělo dojít k rychlému rozpuštění analytů a jejich zavedení do druhé dimenze. Mezi nevýhody této metody patří požadavek na těkavost odpařovaného rozpouštědla a dále i riziko, kdy může docházet k částečné ztrátě analytů s nízkým bodem varu. Další potenciální problém může představovat nízká rychlost opětovného rozpouštění špatně rozpustných analytů [21; 22].

1.2.5 Detektor

Detektor má za úkol sledovat a zapisovat změnu koncentrace analytu. Detektory používané v 2D-LC jsou stejné jako se používají v HPLC. Limitací je pouze velká rychlost průtoku mobilní fáze, která bývá 2–4 ml/min. Jejich volba závisí na vlastnostech analyzovaném vzorku [8]. Mezi ideální vlastnosti detektorů patří vysoká citlivost, nedestruktivnost, rychlá odezva, snadné použití, široký rozsah linearity, dobrá stabilita a nízký šum [5; 12]. Detektor by měl mít co nejmenší měrnou celou, aby se zamezilo rozmývání zón [3]. Mezi nejběžnější detektory patří spektrofotometrický, fluorescenční, refraktometrický, elektrochemický a hmotnostní.

1.2.5.1 Spektrofotometrický detektor

Spektrofotometrický detektor (UV-VIS) patří mezi nejpoužívanější detektory v kapalinové chromatografii. Je citlivý, selektivní a nedestruktivní a dokáže analyzovat širokou škálu analytů obsahující chromofor [8]. Tento detektor funguje na principu měření absorbance látek vystupujících z chromatografické kolony. U spektrofotometrických detektorů mobilní fáze prochází malou křemennou měrnou celou, kterou zároveň prochází paprsek s UV-VIS zářením. Látka při správné vlnové délce toto záření absorbuje. Spektrofotometry mohou být s pevnou vlnovou délkou, volitelnou vlnovou délkou nebo s diodovým polem (DAD). Přístroje s diodovým polem proměřují celé spektrum v určité oblasti vlnových délek [1].

1.2.5.2 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence. Fluorescence je sekundární záření, které jsou některé látky schopny vydávat po absorbování elektromagnetického záření, které trvá zhruba 10^{-8} až 10^{-5} sekundy. Vyzářované světlo je detekováno pod pravým úhlem k původnímu paprsku. Látek, které přirozeně fluoreskují je poměrně málo, a proto se často musí provádět derivatizace. Tento detektor je nedestruktivní, velmi selektivní a má vysokou citlivost [1; 5; 12].

1.2.5.3 Elektrochemický detektor

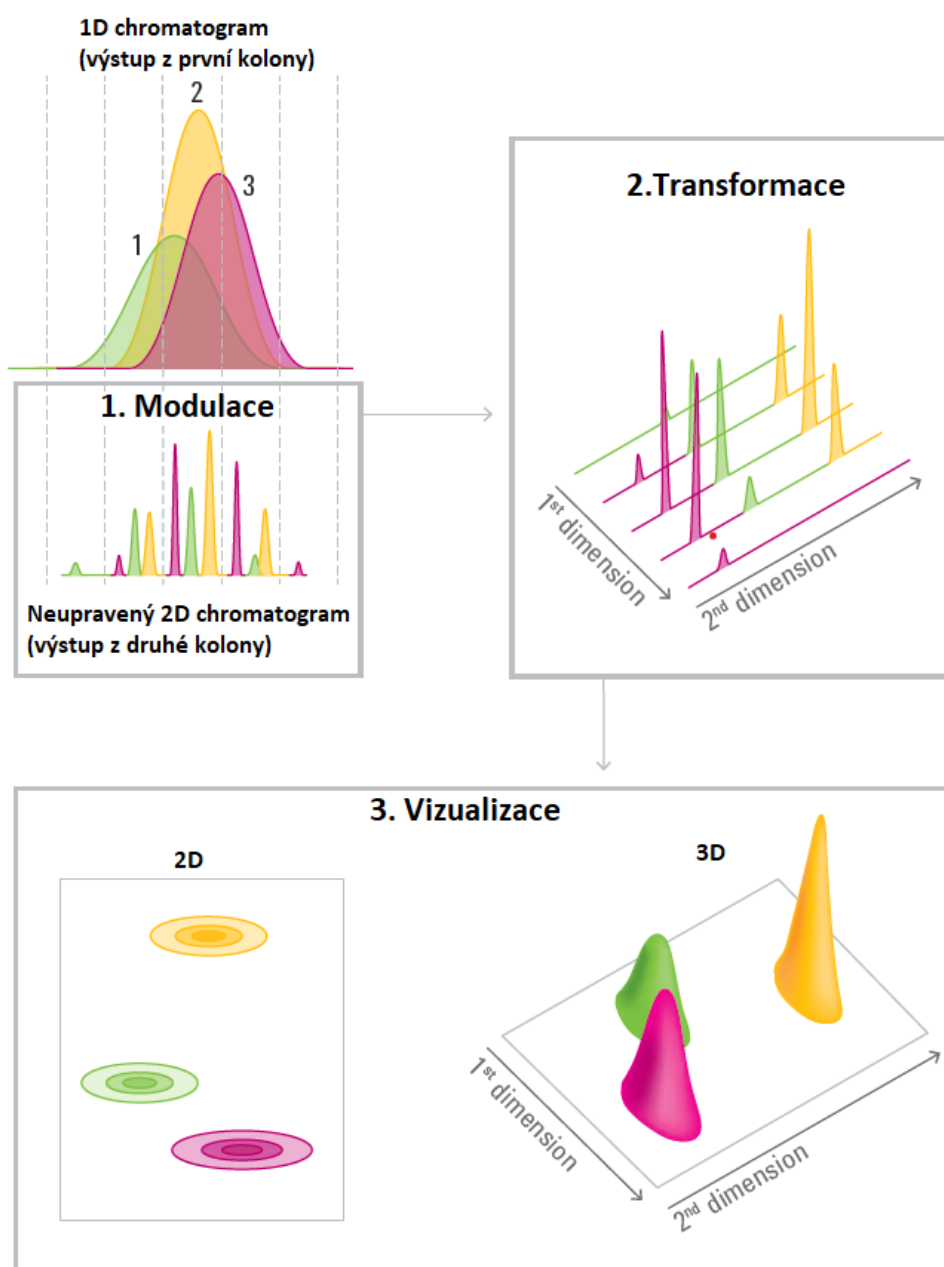
Elektrochemické detektory jsou v kapalinové chromatografii dobrou alternativou k optickým metodám detekce. Voltametrický (ampérometrický) detektor se používá pro látky které lze oxidovat nebo redukovat na polarizovatelné elektrodě. Konduktrometrický detektor měří vodivost a nejčastěji se používá při analýze iontů. Tyto detektory mají vysokou citlivost, jsou selektivní, ale také jsou citlivý na změny teplot [1; 5; 12].

1.2.5.4 Hmotností detektor

Hmotnostní detektor patří mezi čím dál oblíbenější metodu. Jednotlivé složky vzorku jsou nejprve ionizovány a rozštěpeny na soubor fragmentů lišících se dle poměru hmotnosti ku náboje (m/z). Druhy a zastoupení vzniklých fragmentů jsou pro danou látku typické a díky tomu lze látku identifikovat. Mezi nevýhody tohoto detektoru patří vysoká pořizovací cena a fakt, že se jedná o destruktivní metodu [1; 3; 12].

1.2.6 Vyhodnocení

Výstupem 2D-LC je chromatogram, jehož vznik je zobrazena na Obrázku 17. V první části tohoto schématu je vyobrazen proces vzorkování. Eluent vystupující z první dimenze, v tomto případě tři navzájem se překrývající píky, je rozdělen na několik částí, které jsou postupně zachytávány do smyček rozhraní a následně děleny v druhé dimenzi. Výsledkem tohoto dělení je surový chromatografický záznam, který je následně pomocí speciálního programu transformován do konečného 2D chromatogramu, který může být dvou nebo třírozměrný [7].



Obrázek 17 Ukázka vzniku 2D chromatogramu [7]

1.3 Režimy 2D-LC

Dvourozměrnou kapalinovou chromatografii lze provádět ve dvou uspořádání: on-line nebo off-line režimu. V off-line režimu se frakce eluované z první kolony shromažďují a následně se vstříkují do druhé kolony. Při online módu jsou frakce kontinuálně přenášeny přes rozhraní do druhé dimenze [7; 10; 27].

Dále jde 2D-LC rozdělit na dva hlavní typy, které mají mezi sebou významné rozdíly. První typ je úplná dvourozměrná kapalinová chromatografie, kde dochází ke kontinuálnímu přenášení celého eluentu z první dimenze do druhé. Naproti tomu je režim „heart-cutting“, kde je druhé separaci podrobena pouze určitá část vzorku [7; 9–11].

1.3.1 Off-line režim

V off-line 2D kapalinové chromatografii se jednotlivé frakce z první dimenze jímají a po dokončení separace jsou postupně podrobeny druhé separaci na koloně s rozdílnou selektivitou. Jímání frakcí může být prováděno manuálně nebo automaticky s využitím sběrače frakcí. Pro obě dimenze lze použít stejný přístroj (čerpadlo, dávkovač vzorku a detektor), pouze se změnou stacionární a/nebo mobilní fáze. Tento režim je poměrně snadný na provedení, protože jednotlivé dimenze lze považovat, a tedy i optimalizovat, jako dvě nezávislé metody. Zároveň je tento režim poměrně nenáročný na instrumentaci, jelikož na rozdíl od on-line režimu nevyžaduje žádné speciální rozhraní, které by umožňovalo přenos frakcí z první dimenze do druhé. Mezi další výhody patří možnost úpravy analyzovaných látek nebo jejich zakoncentrování. Na druhou stranu se off-line režim vyznačuje výrazně delší dobou analýzy než on-line režim, protože se obvykle druhá separace provádí až po dokončení první. Nevýhodou je, že může docházet ke ztrátám některých stopových látek, případně i ke kontaminaci nebo rozkladu analyzovaných látek. Tato technika se používá hlavně v případě, pokud je sekundární separace vyžadována jen u některých frakcí eluentu z první dimenze. Díky tomu, že jsou dimenze na sobě nezávislé, může být čas druhé separace výrazně delší (nezávisí na rychlosti eluce z první dimenze), v důsledku čehož je možné dosáhnout vyšší rozlišovací schopnosti v druhé dimenzi, a tedy i vyšší rozlišovací schopnosti celé analýzy [7; 8; 10; 27; 28]. V Tabulce 2 jsou shrnuty výhody a nevýhody off-line režimu.

Tabulka 2 Výhody a nevýhody off-line režimu [8; 10; 27]

	Výhody	Nevýhody
Off-line režim	Snadné provedení, protože není potřeba speciální rozhraní	Časová náročnost
	K provedení obou separací může postačit pouze jeden systém HPLC, a to díky změně mobilní fáze nebo kolony	Během manipulace může dojít ke ztrátě či znehodnocení vzorku
	Možnost spojit veliké množství režimů, protože zde nemůže dojít k nekompatibilitě rozpouštědel	Obtížná automatizace
	Snadno můžeme regulovat koncentraci vzorku v obou dimenzích	Možná kontaminace vzorku
	Obě separace mohou být zcela na sobě nezávislé, nemusí se přizpůsobit průtok ani doba analýzy	Nutnost zapojit sběrač frakcí
	Lze dosáhnout vyšší rozlišovací schopnosti celé analýzy	

1.3.2 On-line režim

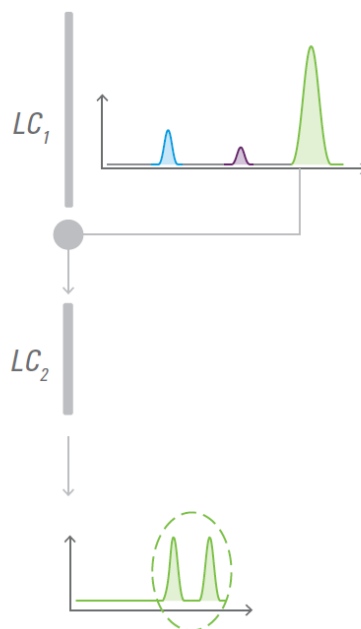
V on-line 2D kapalinové chromatografii jsou frakce z první dimenze kontinuálně přenášeny přes rozhraní do druhé dimenze, kde dochází k jejich dalšímu dělení. Na rozdíl od off-line 2D-LC je přístrojové vybavení mnohem složitější, kdy je kromě vhodného rozhraní zapotřebí použití dvou různých chromatografických systémů. Tato forma 2D kapalinové chromatografie je oproti off-line režimu výrazně rychlejší a zároveň může být i plně automatizována a nevyžaduje tak žádný zásah operátora po celou dobu analýzy. Největším omezením on-line režimu je jeho teoretická maximální rozlišovací schopnost, která není tak vysoká, jako v mnohem pomalejším off-line režimu. To je dáno tím, že doba separace v druhé dimenzi je omezena, a to v závislosti na rychlosti vzorkování eluentu z první dimenze. Vzorkováním (někdy modulací) je myšlena rychlost, jakou je smyčka plněná, respektive časový úsek mezi přepnutím pozic ventilu [7; 10; 27]. V Tabulce 3 jsou shrnuty výhody a nevýhody on-line režimu.

Tabulka 3 Výhody a nevýhody on-line režimu [10; 27]

	Výhody	Nevýhody
On-line režim	Plně automatizované	Obtížnější provoz – jsou zapotřebí automatizované systémy
	Rychlejší analýzy	Zapotřebí je více přístrojového vybavení (např. Použití více čerpadel)
	Minimalizována ztráta vzorku	Je potřeba vhodné rozhraní
	Minimalizovaná kontaminace vzorku	Omezení při volbě mobilních fází, kdy musí být obě fáze kompatibilní. Tedy dobře mísitelné, nesmí se navzájem srážet a zároveň musí vykazovat dobrou rozpustnost analytů. Volba mobilní fáze v první dimenzi je zároveň omezena typem stacionární fáze ve druhé dimenzi.
	Reprodukovatelnost	Separace získaná v první koloně může být částečně snížena ve druhé koloně
	Kratší doba zpracování vzorku (důležité při analýzách nestabilních sloučenin)	Separací režimy (módy) může být obtížné spojit dohromady

1.3.3 Heart-cutting režim

Dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii lze v základě provést pomocí dvou režimů. První režim se nazývá „heart-cutting“ (Obrázek 18) a označuje se jako LC-LC.



Obrázek 18 Znárodnění heart-cutting metody 2D-LC [7]

Tento režim se zaměřuje na jednu nebo několik samostatných zón první dimenze. Tato vybraná část se následně odebere a vstříkují se do druhé kolony. Chromatografické kolony musí mít rozdílné vlastnosti, aby mohly látky dobře separovat. Při zaměření pouze na jednu část separace první dimenze (jeden pík) se analýza nejčastěji provádí pomocí ventilu, který je vybavený smyčkou o dostatečném objemu pro uložení celé této eluční zóny z první dimenze.

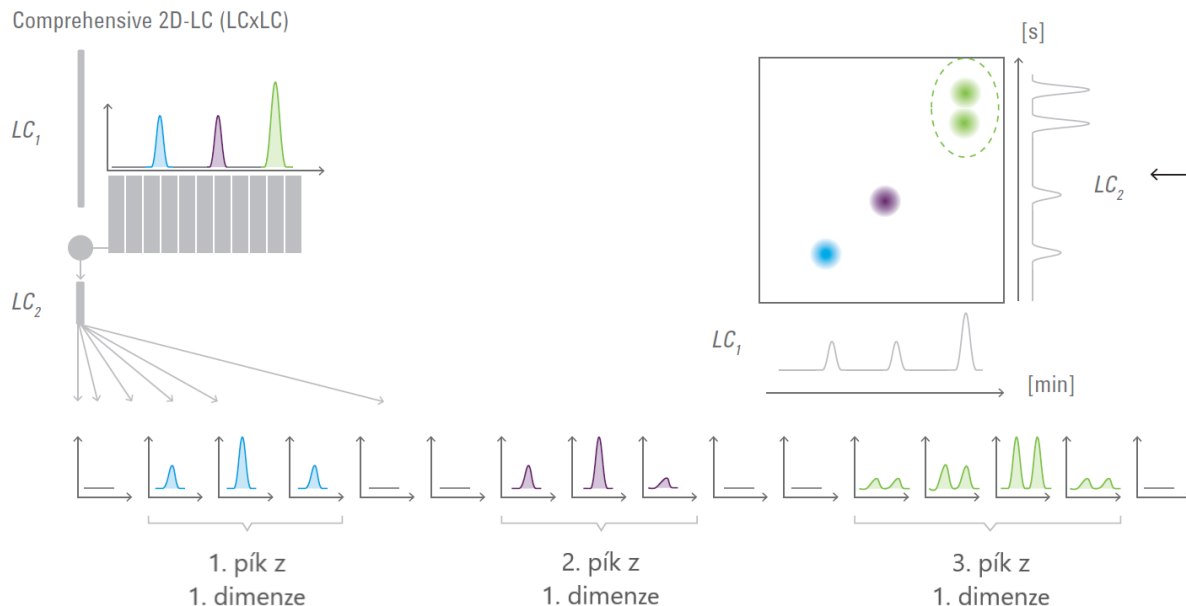
Jedná se o jednoduché a poměrně snadné provedení 2D-LC. Při zaměření se na více samostatných zón se používá nastavení vícenásobný „heart-cutting“. V tomto nastavení bývá do systému zařazeno více vzorkovacích smyček. Tyto techniky se používají nejčastěji pro kvantifikaci malého počtu cílových sloučenin v poměrně složité matrici nebo pro nepříliš složité vzorky, které obsahují sloučeniny s velmi podobnými retenčními charakteristikami na jedné koloně. V Tabulce 4 jsou uvedeny výhody a nevýhody tohoto režimu [7; 8; 10; 11].

Tabulka 4 Výhody a nevýhody heart-cutting režimu 2D-LC [11; 22]

	Výhody	Nevýhody
Jednoduchý heart-cutting	Jednoduchý	Omezeno na jednu cílovou sloučeninu
Vícenásobný heart-cutting	Lze použít pro více cílových sloučenin	Složitější přístrojové vybavení oproti singlet heart-cutting
		Kvantifikace může být obtížná
		Delší doba analýzy (podle počtu vybraných částí pro analýzu ve druhé dimenzi)

1.3.4 Úplný režim

Druhý režim se nazývá úplný neboli „comprehensive“ a běžně se označuje jako LC×LC (Obrázek 19). Tento režim funguje na postupném přenášení celého eluentu z první dimenze do druhé. Přenos probíhá přes rozhraní v krátkých intervalech a po mnoha malých částech.



Obrázek 19 Znázornění principu úplné 2D-LC (LC×LC) [7]

Aby mohlo dojít k separaci, musí se separační systémy v obou dimenzích dostatečně lišit [7; 9; 11].

Pravidla pro úplnou kapalinovou chromatografii jsou následující:

- Každá složka vzorku je vystavena dvěma separacím s různou selektivitou.
- Oběma sloupci prochází stejné procento všech složek vzorku (100 %) a nakonec musí dosáhnout detektoru.
- Separace (rozlišení) získaná v prvním rozměru musí být zachována před vstupem do druhého rozměru [8; 10; 27].

V Tabulce 5 jsou shrnuty výhody a nevýhody úplného režimu.

Tabulka 5 Výhody a nevýhody úplného režimu 2D-LC (LC×LC) [10; 11]

	Výhody	Nevýhody
Úplný režim	Vyšší rozlišení (z důvodu nepravděpodobnosti dvou složek se stejnými retenčními časy v obou rozměrech)	Potřeba speciálních rozhraní a softwaru (pro ovládání přístroje a vizualizaci dat)
	Pomocí jedné analýzy lze získat větší množství informací o vzorku než při heart-cutting	Obě dimenze jsou na sobě závislé, a proto musí být optimalizovány současně.
	LC × LC může být vhodná i pro analýzu složitých vzorků	

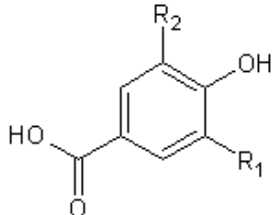
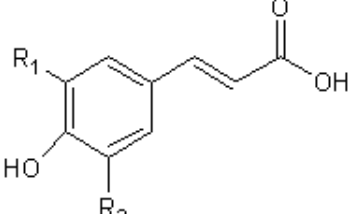
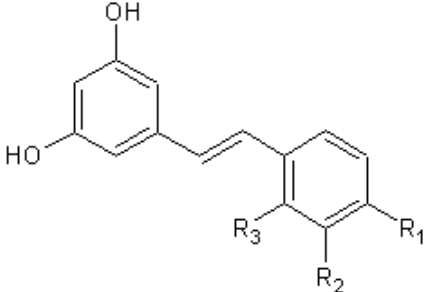
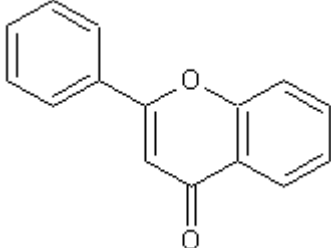
1.4 Rostlinné antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zabráňují oxidaci látek tím, že se samy oxidují. Reakcí s reaktivními metabolity tvoří relativně stabilní a netoxické produkty, čímž chrání buňky, tkáň a celý organismus před oxidačním poškozením volnými radikály. Nejúčinnější antioxidanty jsou ty, které přerušují řetězovou reakci volných radikálů. Antioxidanty působí preventivně proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění, neurologickým poruchám a proti stárnutí. Dále jsou významné v potravinářském průmyslu, kde zvyšují stabilitu potravin např. tuků. Antioxidanty je možné rozdělit do dvou základních skupin podle původu na rostlinné a syntetické. Rostliny představují důležitý zdroj přírodních produktů, které jsou biologicky aktivní, jsou klasifikovány jako sekundární metabolity a označovány jako přírodní antioxidanty. Rostlinné antioxidanty se vyskytují v ovoci, zelenině, čaji, v obilovinách, v červeném víně atd. Používají se mnohem více na rozdíl od syntetických antioxidantů. Rostlinné antioxidanty se skládají z široké škály látek. Mezi tyto látky je možné zařadit kyselinu askorbovou a tokoferoly, fenolové a polyfenolové sloučeniny nebo terpenoidy. Látky plní u rostlin i lidí několik důležitých funkcí (např. karotenoidy poskytují rostlinám ochranu a pigmentaci). Fenolové sloučeniny jsou jednou z nejrozšířenějších skupin sekundárních metabolitů [29–31].

1.5 Fenolové sloučeniny

Termín fenol nebo polyfenol je charakterizován přítomností jednoho nebo více aromatických jader obsahujících jednu nebo více funkčních hydroxylových skupin a/nebo funkční deriváty, jako jsou estery, ethery a glykosidy. Tyto sloučeniny lze rozdělit podle počtu a uspořádání atomů uhlíku přítomných v hlavní struktuře molekuly do dvou velkých skupin: flavonoidy a neflavonoidy, jak je ukázáno v Tabulce 6 [29; 30].

Tabulka 6 Rozdělení fenolových sloučenin podle počtu a uspořádání atomů uhlíku [29]

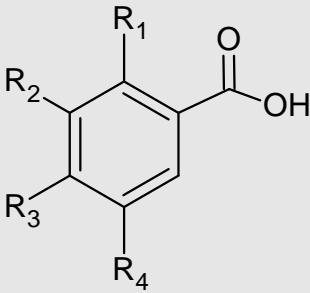
Základní struktura	Třída fenolických sloučenin	Chemická struktura
C6 – C1	Deriváty kyseliny benzoové	
C6 – C3	Deriváty kyseliny skořicové	
C6 – C2 – C6	Stilbeny	
C6 – C3 – C6	Flavonoidy	

1.5.1 Fenolové kyseliny

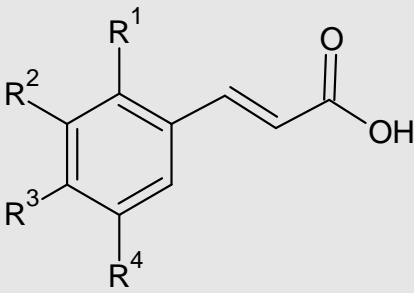
Fenolové kyseliny jsou fenoly, které obsahují ve své struktuře karboxylovou skupinu. Tyto sloučeniny se dělí podle základní struktury na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Kyselina benzoová se vykytuje v ovoci, zelenině, a i v některých potravinářských výrobcích jako je např. jogurt. Mezi deriváty kyseliny benzoové patří kyselina galová, gentisová, p-hydroxybenzoová, protocatechová, syringová, salicylová a vanilová. Tyto kyseliny se vyskytují většinou v malých koncentracích s výjimkou červeného ovoce (např. brusinky), černých ředkviček a cibule. V Tabulce 7 jsou uvedené jejich vzorce. Mezi

deriváty kyseliny skořicové patří kyselina kávová, ferulová, sinapová a různé izomery kyseliny kumarové. Tyto kyseliny se vyskytují téměř ve všech rostlinách, ale pouze ojediněle se vyskytují ve volné formě [31]. Vzorce těchto kyselin jsou uvedené v Tabulce 8.

Tabulka 7 Deriváty kyseliny benzoové [31]

Všeobecný vzorec	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Kyselina
	H	H	H	H	benzoová
	H	OH	OH	OH	galová
	OH	H	H	OH	gentisová
	H	H	OH	H	p-hydroxybenzoová
	H	H	OH	OH	protokatechová
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	syringová
	OH	H	H	H	salicylová
	H	OCH ₃	OH	H	vanilová

Tabulka 8 Deriváty kyseliny skořicové [31]

Všeobecný vzorec	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Kyselina
	H	H	H	H	skořicová
	OH	H	H	H	o-kumárová
	H	OH	H	H	m-kumárová
	H	H	OH	H	p-kumárová
	H	OH	OH	H	kávová
	H	OCH ₃	OH	H	ferulová
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	sinapová

1.5.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejrozšířenější skupinou fenolických sloučenin. Obsahují přes 8 000 sloučeniny. Tyto sloučeniny mají nízkou molekulovou hmotnost, která se skládá z 15 uhlíků uspořádaných do konfigurace C6-C3-C6. Mezi flavonoidy se řadí několik základních struktur: flavony, flavonoly, flavonony, flavononoly, katechiny, anthokyanidy, isoflavonoidy, naoflavonoidy a chalkony [31; 32].

1.6 Stanovení antioxidantů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie představuje v současnosti nejpoužívanější techniku pro běžný screening a identifikaci jednotlivých antioxidantů ve složitých vzorcích. Tuto metodu je také možné využít ve spojení s testy stanovujícími antioxidační aktivity látek (DPPH a ABTS), které usnadňují identifikaci aktivních sloučenin ve složitých směsích po jejich chromatografické separaci. Jednorozměrná metoda HPLC ale často poskytuje neúplnou separaci vysoce komplexních přírodních produktů. Z tohoto důvodu se také využívá spojení více LC separací ve dvourozměrnou kapalinovou separaci, při které kombinace různých selektivit zvyšuje šance na získání čistých sloučenin. Maximální zvýšení výkonu jednorozměrné HPLC představuje metoda LC×LC, při které je vzorek podroben dvěma odlišným separačním mechanismům. Separace LC×LC kombinující hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) a kapalinovou chromatografii v systému s obrácenými fázemi (RPLC) byla prokázána jako účinná metoda k lepšímu rozlišení fenolických sloučenin v komplexních extraktech přírodních produktů [33].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

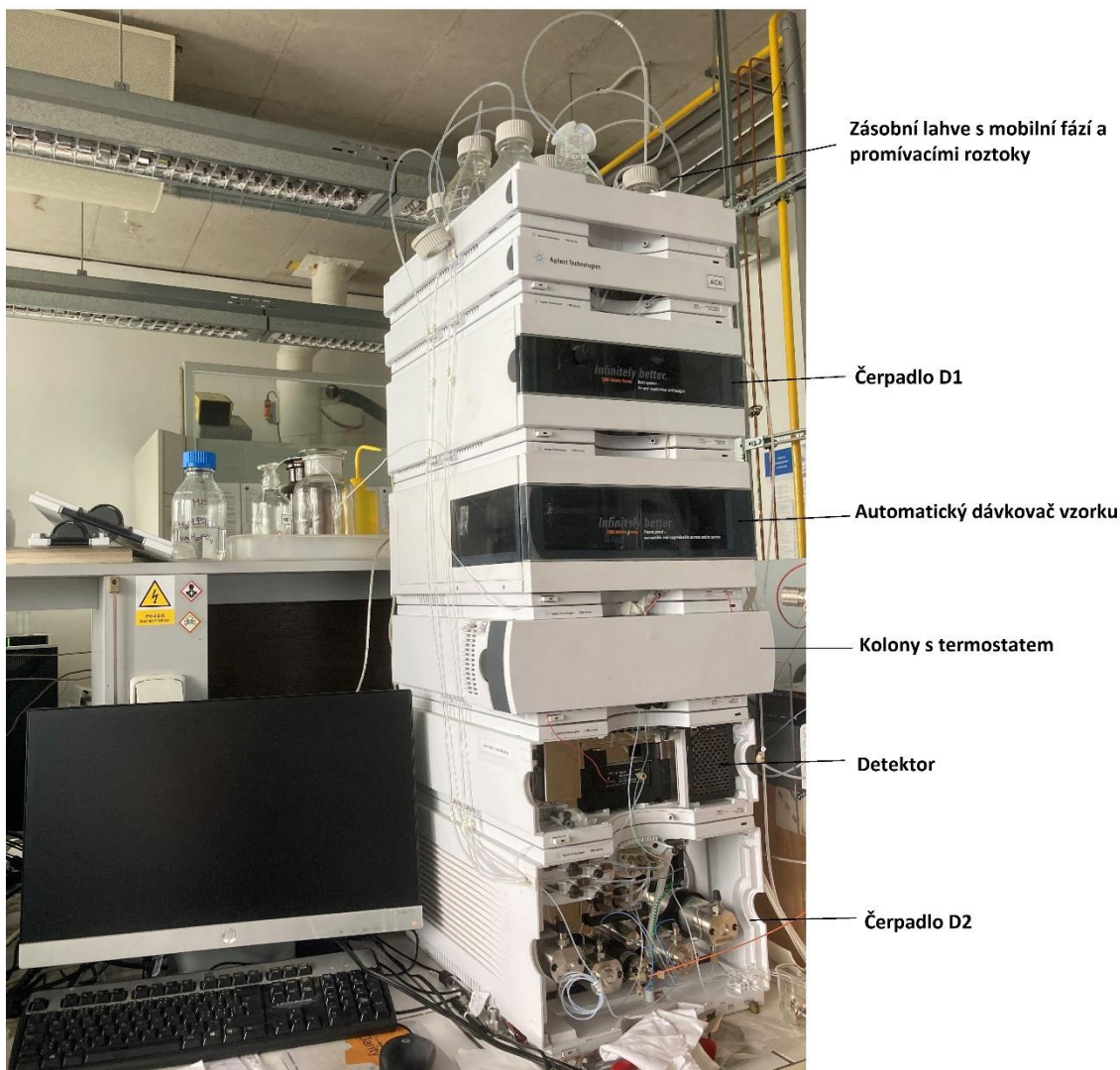
2.1.1 Dvoudimenzionální kapalinový chromatograf

Měření byla provedena na dvoudimenzionálním kapalinovém chromatografu (Obrázek 20) se systémem Agilent 1290 Infinity (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Tento systém se skládal z odplynovače mobilní fáze, čerpadel mobilních fází, automatického dávkovače vzorků, termostatu a UV/VIS detektoru s diodovým polem. Na separaci v první dimenzi byla použita kapilární polymethakrylátová (bisfenol-a-dimethakrylát – BiGDMA) kolona připravená in-situ ve skleněné kapiláře se zwitteriontovým funkčním monomere MEDSA (N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) amonium betain)) BiGDMA-MEDSA 0,53×263 mm (Univerzita Pardubice) a na separaci v druhé dimenzi byla použita kolona Chromolith High Resolution RP-18e 50×4,6 mm (Merk, Darmstadt, Německo). Měřeny byly vlnové délky 254, 280 a 360 nm. Celkem bylo zkoumány tři druhy rozhraní:

- Agilent-2-port-8-duo (Rozhraní 1)
- ASM zapojení, který byl vytvořen pomocí přídavné třetí pumpy a T-spojky (Rozhraní 2)
- Třísmýčkový ventil umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin (Rozhraní 3)

2.1.2 Další použité přístroje a zařízení

- Analytické váhy Keern ATB 22D-4M (Fischer Scientific)
- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Filtr mobilní fáze 0,45 µm (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Bandelin sonorex TK 52)
- Minicentrifuga MiniStar silverline (VWR International)
- Aparatura na výrobu ultra čisté vody Milli-Q (Merck Millipore, Německo)
- Běžné laboratorní nádobí

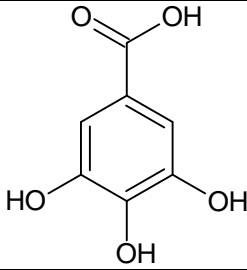
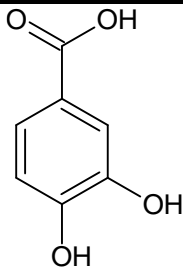
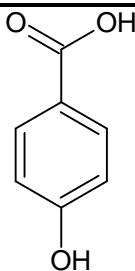
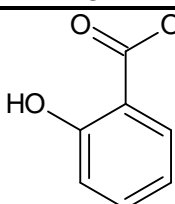
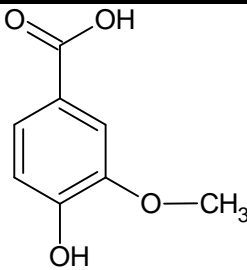
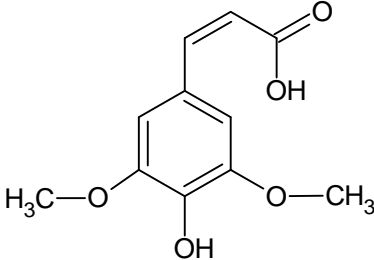


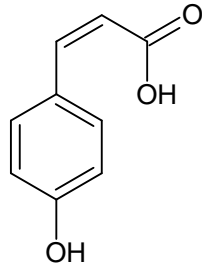
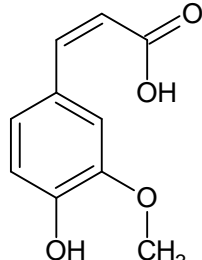
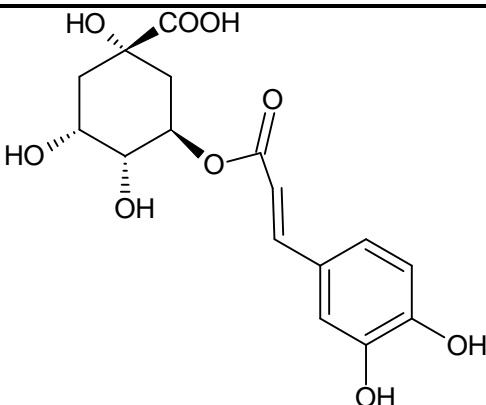
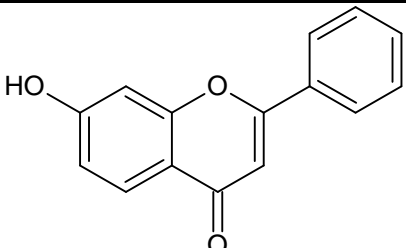
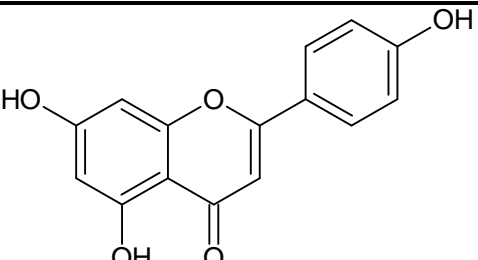
Obrázek 20 Fotografie chromatografické soustavy, na které bylo měření prováděno

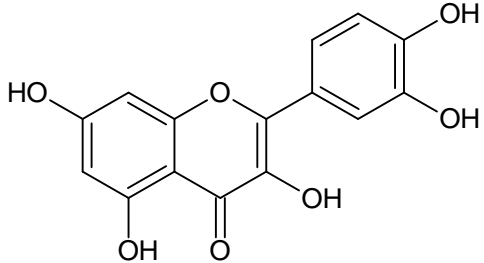
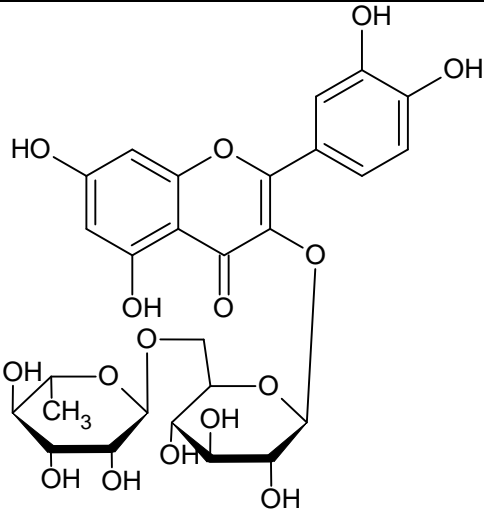
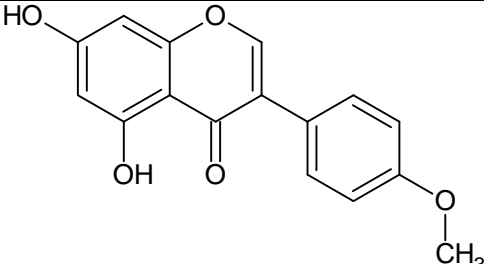
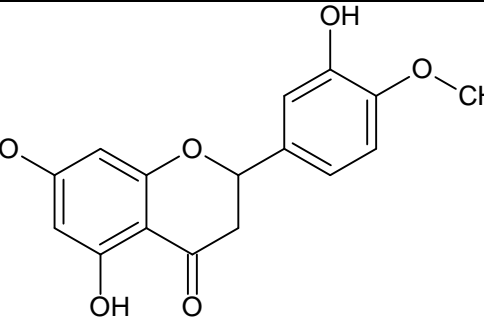
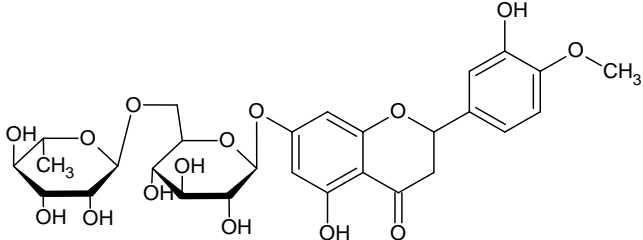
2.2 Chemikálie

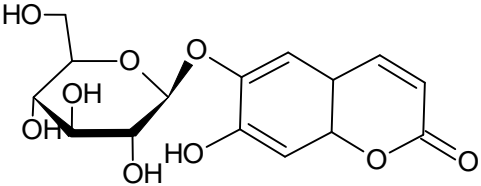
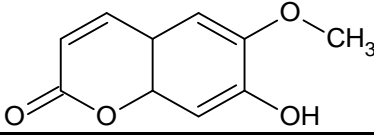
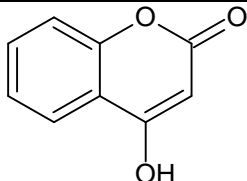
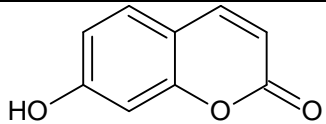
- Methanol (Honeywell, Německo)
- Acetonitril (Honeywell, Německo)
- Octan amonný (Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Kyselina mravenčí
- Redestilovaná voda připravená pomocí zařízení Milli-Q
- Standardy (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) jsou uvedené v Tabulce 9

Tabulka 9 Přehled použitých standartních látek

Označení	Název	Absorpční maxima [nm]	Chemická struktura
1	Kyselina galová	218,272	
2	Kyselina protokatechová	220, 260, 292	
3	Kyselina p-hydroxybenzoová	198, 256	
4	Kyselina salicylová	203, 235, 300	
5	Kyselina vanilová	220, 260, 292	
9	Kyselina sinapová	236, 322	

Označení	Název	Absorpční maxima [nm]	Chemická struktura
10	Kyselina p-kumarová	228, 310	
11	Kyselina ferulová	218, 323	
12	Kyselina chlorgenová	217, 325	
16	7-hydroxyflavon	200, 252, 310	
17	Apigenin	212, 267, 330	

Označení	Název	Absorpční maxima [nm]	Chemická struktura
19	Quercetin	203, 256, 371	
20	Rutin	205, 256, 354	
22	Biochanin A	196, 261	
24	Hesperetin	200, 288	
25	Hesperidin	200, 284	

Označení	Název	Absorpční maxima [nm]	Chemická struktura
28	Esculin	226, 298, 345	
30	Scopoletin	204, 228, 297, 344	
31	4-hydroxycoumarin	200, 280, 302	
32	7-hydroxycoumarin	199, 324	

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava mobilních fází

Vodný roztok octanu amonného o koncentraci 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním vypočítaného množství (0,7708 g) octanu amonného v 1000 ml redestilované vody. Do takto připraveného roztoku bylo přidáno 2,1 ml kyseliny mravenčí (pH = 3,1) a celý roztok byl přefiltrován přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μ l.

Octanu amonný v acetonitrilu o koncentraci 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním vypočítaného množství (0,3854 g) octanu amonného v 500 ml acetonitrilu. Acetonitril s octanem amonným byl umístěn do ultrazvukové lázně a ponechán v ní až do úplného rozpuštění.

2.3.2 Příprava standardu

Směs použitých standartních látek (viz Tabulka 9) byla připravena rozpuštěním 5 mg směsi v 0,5 ml methanolu. Směs byla vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně a následně pomocí

centrifugy byly odstředěny nečistoty. Supernatant byl přepipetován do vialky, která byla uchovávána v chladu a temnu.

2.4 Podmínky měření

Pro jednotlivá měření bylo zvoleno označení skládající se ze tří částí, kdy první část označuje použitý gradient (SG - shifted gradient, FIF - full in fraction), druhá část použité rozhraní (AG - Agilent-2-port-8-duo, ASM - ASM zapojení, TS - Třísmýčkový ventil) a třetí část označuje použitý průtok v první dimenzi (4 $\mu\text{l}/\text{min}$, 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebo 8 $\mu\text{l}/\text{min}$).

První dimenze:

- Mobilní fáze A: Octan amonný ve vodě (10 mmol/l), pH 3,1
- Mobilní fáze B: Octan amonný v acetonitrilu (10 mmol/l)
- Průtok mobilní fáze: 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebo 8 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Dávkování vzorku: 0,2 μl
- Teplota: 50 °C

Druhá dimenze:

- Mobilní fáze A: Octan amonný ve vodě (10 mmol/l), pH 3,1
- Mobilní fáze B: Acetonitril
- Průtok mobilní fáze: 2,8 ml/min
- Teplota: 50 °C

Použité gradienty:

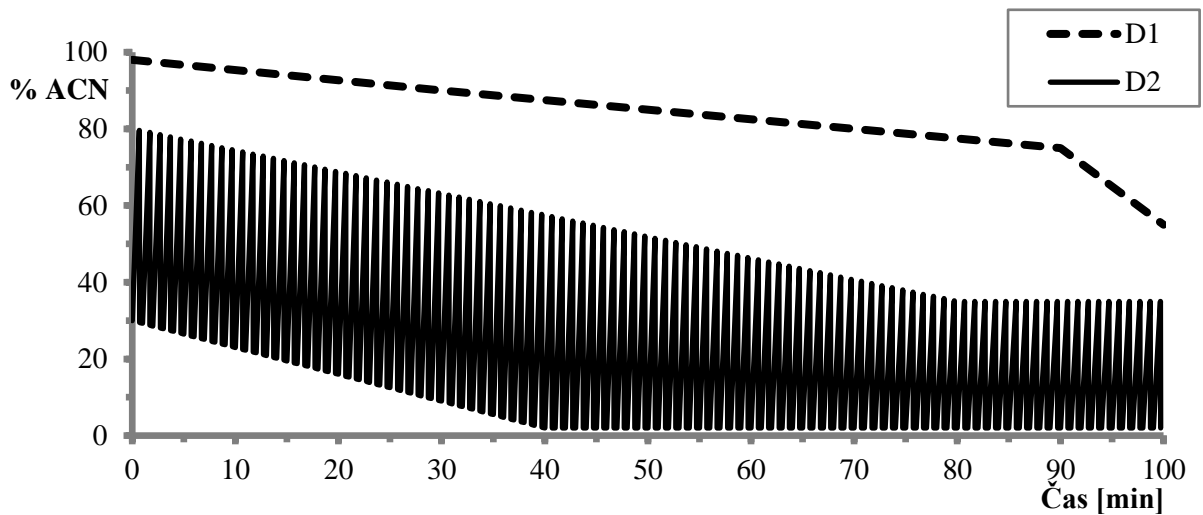
Pro měření byly použity dva gradienty: shifted gradient a full in fraction. Jejich ukázky jsou zobrazeny na Obrázku 21 a Obrázku 22. Přesné hodnoty použitých gradientů jsou uvedeny v Tabulce 10 – Tabulce 13. Čas přepnutí mezi pozicemi ventilu byl u všech analýz nastaven na 60 vteřin.

Zapojení rozhraní ASM:

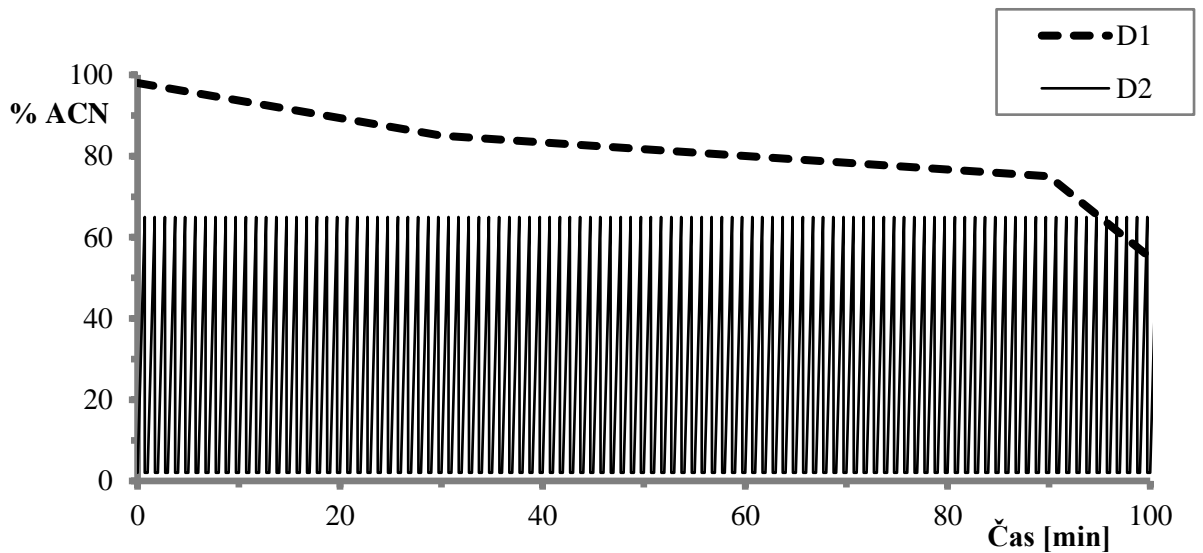
ASM zapojení bylo vytvořeno pomocí rozhraní Agilent-2-port-8-duo, za nějž byla zapojena T-spojka, kterou byl přiváděn ředící tok mobilní fáze. Ředícím rozpouštědlem byla mobilní fáze A druhé dimenze a její průtok byl nastaven na konstantních 0,5 ml/min během celé separace. V souvislosti s tím byla síla mobilní fáze vedená skrz ventil upravena tak, aby při každé analýze byla výsledná eluční síla stejná.

2.5 Zpracování naměřených dat

Všechna data byla naměřená pomocí programu Agilent OpenLab ChemStation (Agilen, USA), 2D chromatogramy byly vytvořeny za použití programu Eval2D, který vytvořil Ing. Petr Česla Ph.D. na Univerzitě Pardubice. Dále byl použit program Microsoft Office 365.



Obrázek 21 Ukázka SG (SG-AG-4)



Obrázek 22 Ukázka FIF gradientu (SG-TS-4)

Tabulka 10 Podmínky měření při SG a použití Agilent-2-port-8-duo ventilu a třismyčkového ventilu umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin

Agilent ventil / Třismyčkový ventil											
Shifted gradient											
SG-AG-4 / SG-TS-4				SG-AG-6 / SG-TS-6				SG-AG-8 / SG-TS-8			
D1		D2		D1		D2		D1		D2	
Průtok μl/min	4	Průtok ml/min	2,8	Průtok μl/min	6	Průtok ml/min	2,8	Průtok μl/min	8	Průtok ml/min	2,8
Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B
0	98	0	30	0	98	0	30	0	98	0	30
30	85	Shifted gradient		20	85	Shifted gradient		15	85	Shifted gradient	
90	75	Čas min	%B	60	75	Čas min	%B	45	75	Čas min	%B
100	55	0	30	67	55	0	30	50	55	0	30
		40	2			27	2			20	2
		0,7	80			0,7	80			0,7	80
		Čas min	%B			Čas min	%B			Čas min	%B
		0	80			0	80			0	80
		80	35			53	35			40	35
		0,72	2			0,72	2			0,72	2
		Čas min	%B			Čas min	%B			Čas min	%B
		0	20			0	20			0	20
		30	2			20	2			15	2

Tabulka 11 Podmínky měření při SG a použití aktivní modulace rozpouštědlem

ASM											
Shifted gradient											
SG-ASM-4				SG-ASM-6				SG-ASM-8			
D1		D2		D1		D2		D1		D2	
Průtok μl/min	4	Průtok ml/min	2,3 + 0,5	Průtok μl/min	6	Průtok ml/min	2,3 + 0,5	Průtok μl/min	8	Průtok ml/min	2,3 + 0,5
Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B
0	98	0	37	0	98	0	37	0	98	0	37
30	85	Shifted gradient		20	85	Shifted gradient		15	85	Shifted gradient	
90	75	Čas	%B	60	75	Čas	%B	45	75	Čas	%B
100	55	0	37	67	55	0	37	50	55	0	37
		40	2			27	2			20	2
		0,08	37			0,08	37			0,08	37
		Čas min	%B			Čas min	%B			Čas min	%B
		0	37			0	37			0	37
		40	2			27	2			20	2
		0,7	97			0,7	97			0,7	97
		Čas min	%B			Čas min	%B			Čas min	%B
		0	97			0	97			0	97
		80	43			53	43			40	43
		0,72	2			0,72	2			0,72	2
		Čas min	%B			Čas min	%B			Čas min	%B
		0	24			0	24			0	24
		30	2			20	2			15	2

Tabulka 12 Podmínky měření při FIF gradientu a použití Agilent-2-port-8-duo ventilu a třísmýčkového ventilu umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin

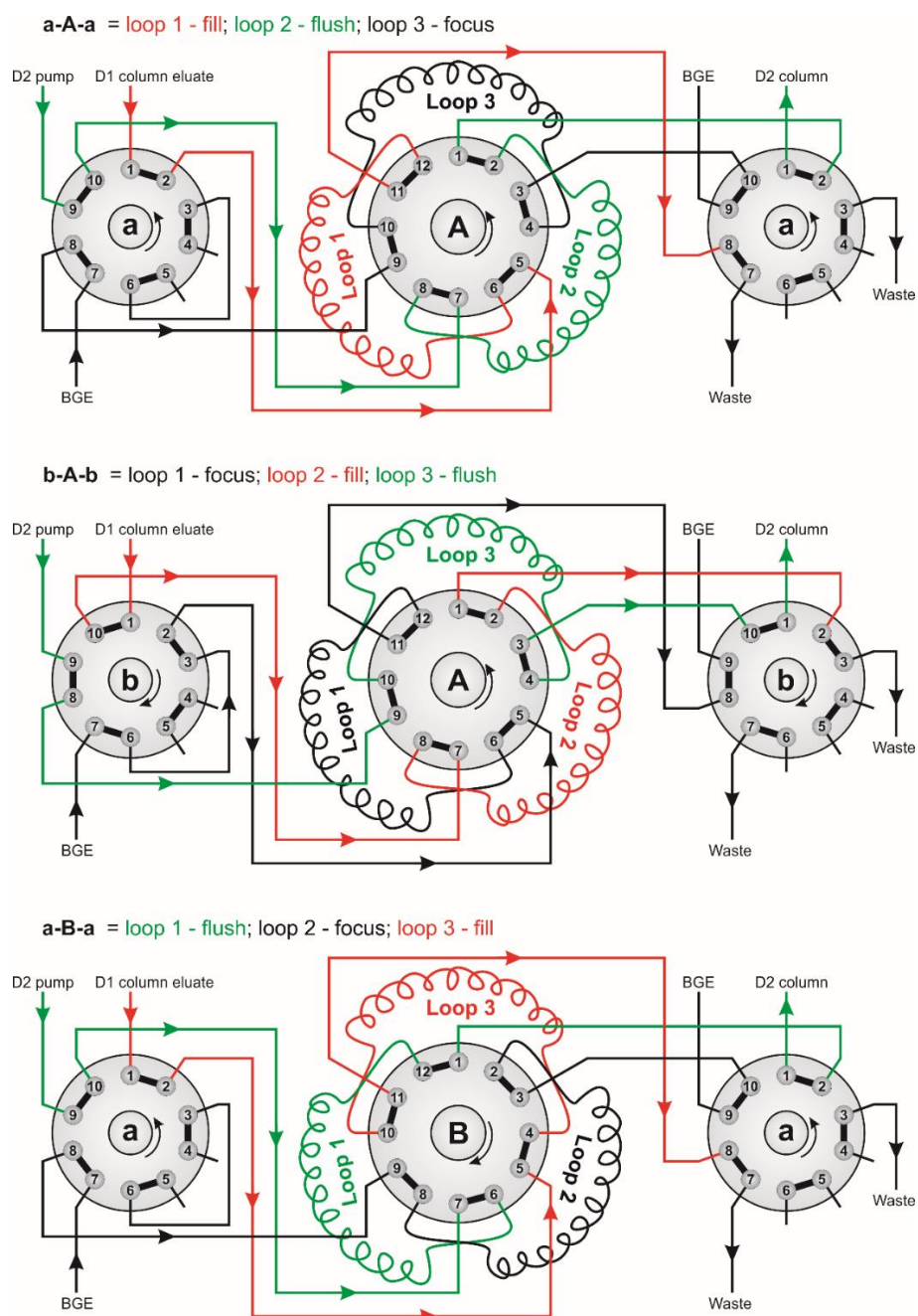
Agilent ventil / Třísmýčkový ventil											
Full in fraction gradient											
FIF-AG-4 / FIF-TS-4				FIF-AG-6 / FIF-TS-6				FIF-AG-8 / FIF-TS-8			
D1		D2		D1		D2		D1		D2	
Průtok μl/min	4	Průtok ml/min	2,8	Průtok μl/min	6	Průtok ml/min	2,8	Průtok μl/min	8	Průtok ml/min	2,8
Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B
0	98	0	2	0	98	0	2	0	98	0	2
30	85	0,7	65	20	85	0,7	65	15	85	0,7	65
90	75	0,72	2	60	75	0,72	2	45	75	0,72	2
100	55			67	55			50	55		

Tabulka 13 Podmínky měření při FIF gradientu a použití aktivní modulace rozpouštědlem

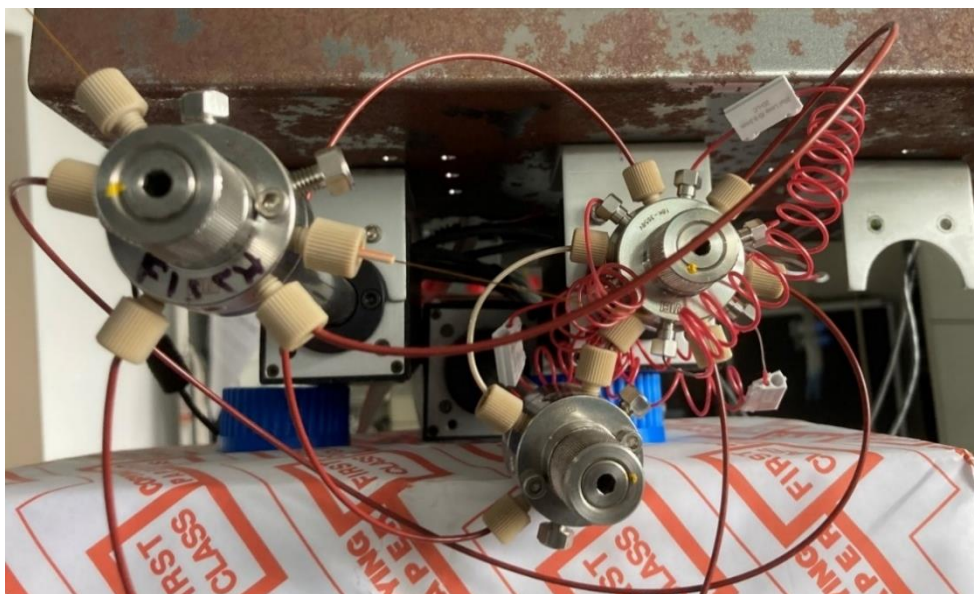
ASM											
Full in fraction gradient											
FIF-ASM-4				FIF-ASM-6				FIF-ASM-8			
D1		D2		D1		D2		D1		D2	
Průtok μl/min	4	Průtok ml/min	2,3 + 0,5	Průtok μl/min	6	Průtok ml/min	2,3 + 0,5	Průtok μl/min	8	Průtok ml/min	2,3 + 0,5
Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B	Čas min	%B
0	98	0	2	0	98	0	2	0	98	0	2
30	85	0,7	73	20	85	0,7	73	15	85	0,7	73
90	75	0,72	2	60	75	0,72	2	45	75	0,72	2
100	55			67	55			50	55		

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo otestovat nové třísmyčkové rozhraní, které by mělo umožňovat zařazení fokusace látek v elektrickém poli mezi první a druhou dimenzi. Toto nové rozhraní se skládá ze dvou deseticestných dvupolohových ventilů a jednoho dvanácticestného dvupolohového ventilu opatřeného třemi identickými zachytávacími smyčkami. Schéma zapojení je zobrazeno na Obrázku 23 a reálné provedení na Obrázku 24.



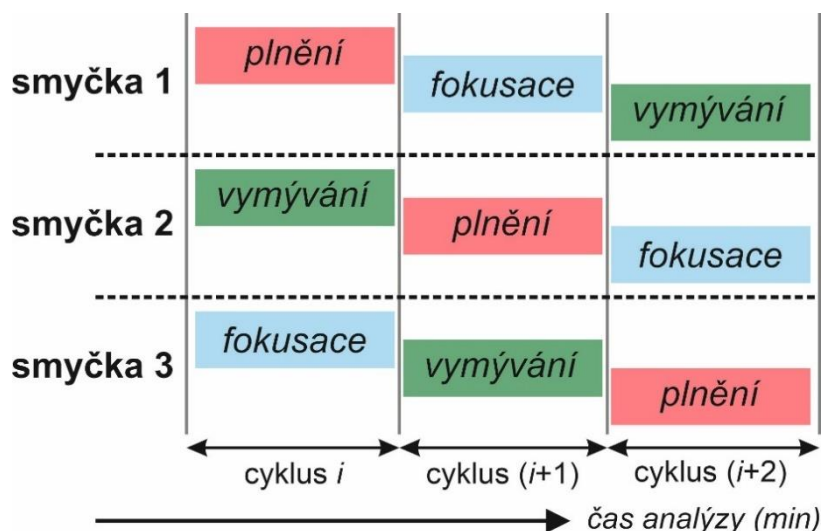
Obrázek 23 Schéma třísmyčkové rozhraní umožňující elektrickou fokusaci sloučenin



Obrázek 24 Nové třísmyčkové rozhraní umožňující elektrickou fokusaci sloučenin

Červeně je ve schématu označena smyčka, u které právě dochází k jejímu plnění eluentem z kolony první dimenze. Černě je označena smyčka, která je v daný okamžik odpojována od obou dimenzí a v budoucnu by její součástí mělo být zařízení pro izoelektrickou fokusaci. A nakonec zeleně je označena smyčka, která je právě připojena k čerpadlu, které vhání mobilní fázi s eluentem do kolony druhé dimenze.

Celé rozhraní má tři fáze a funguje následovně: v první fázi jsou všechny ventily otočeny do polohy **A** (respektive **a**) a dochází k plnění smyčky 1 (Loop 1) eluátem z první dimenze. Následně se přepnou oba deseticečné ventily do polohy **b** a nasbíraný eluát zůstává ve smyčce po dobu přepnutí ventilu. Právě tento čas je vhodný na provedení izoelektrické focusace. Ve třetí fázi se oba deseticečné ventily přepnou zpět do polohy **a** a dvanácticečný ventil se přepne do polohy **B**. V tento okamžik eluent smyčku 1 opouští a je mobilní fází druhé dimenze vymýván do kolony v druhé dimenzi. K těmto fázím dochází i v ostatních dvou smyčkách, jen vždy o jeden krok později (Obrázek 25).



Obrázek 25 Časové schéma převodu frakce pomocí ventilu se třemi smyčkami

Úkolem měření bylo porovnat, zda bude třísmyčkové rozhraní v úplné dvoudimenzionální kapalinové chromatografii plnit stejnou funkci jako běžně používaná rozhraní. Bylo testováno, jestli nebude docházet k rozmývání píků při převodu frakcí z první do druhé dimenze a tím i ke snižování píkové kapacity separace. K tomuto účelu bylo pro porovnání vybráno rozhraní Agilent-2-port-8-duo, které je zobrazeno na Obrázku 9 (kapitola 1.2.4.1) a rozhraní umožňující aktivní modulaci rozpouštědlem (ASM), jehož princip je uveden v kapitole 1.2.4.4.

Na testování byla použita směs standardů fenolických a flavonových antioxidantů v čele s deriváty kyseliny benzoové a skořicové. Všechny analýzy byly prováděny v úplném 2D-LC systému HILIC×RP. Jako vhodná kolona do první dimenze byla vybrána kapilární kolona polymethakrylátového typu (Bisfenol a dimethakrylát – BiGDMA) se zwitteriontovým funkčním monomere MEDSA (N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl amonium betain)) (BiGDMA-MEDSA) o rozměrech 0,53×263 mm. Tato kolona účinně zadržuje testované látky v módu chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC). Do druhé dimenze byla zvolena kolona Chromolith High Resolution RP-18e o rozměrech 50×4,6 mm, v níž dochází k separaci sloučeniny v módu obrácených fází (RP). Jako mobilní fáze pro první dimenzi byla použita kombinace 0,01M roztoků octanu amonného ve vodě a v acetonitrilu. Pro druhou dimenzi pak byla zvolena kombinace 0,01M roztoku octanu amonného ve vodě a čistého acetonitrilu.

Před samotným testováním jednotlivých rozhraní byly hledány optimální parametry pro měření ve zvoleném systému, a to zejména z hlediska průtoků mobilní fáze v druhé dimenzi a vhodného nastavení gradientů. Průtok mobilní fáze v druhé dimenzi byl použit maximálně možný a byl zvolen tak, aby nedocházelo během analýzy k překročení tlakového limitu kolony (200 bar) nebo čerpadla mobilní fáze (1 200 bar). U každého z testovaných rozhraní byl zjištěn

jiný možný maximální průtok. Nejnižší průtok (2,8 ml/min) byl zjištěn u třísmýčkového rozhraní, jelikož mobilní fáze musí procházet přes tři ventily a několik kapilár. Tento průtok byl následně použit u všech dalších měření, aby nebyly výsledky zkresleny použitím jiného průtoku mobilní fáze.

Na tomto základě bylo pro každé rozhraní provedeno šest analýz při dvou různých gradientech („full in fraction“ FIF a shifted SG gradient) a třech odlišných průtocích v první dimenzi (4, 6 a 8 $\mu\text{l}/\text{min}$). Díky změně průtoků mobilní fáze v první dimenzi a zachování času modulace (přepnutí ventilu) docházelo ke změně pouze velikosti frakcí převáděné do druhé dimenze. Jelikož byl čas modulace 1 minutu, tak převáděné frakce odpovídaly objemům 4, 6 a 8 μl . Pro porovnání jednotlivých ventilů bylo tedy celkově změřeno 18 analýz.

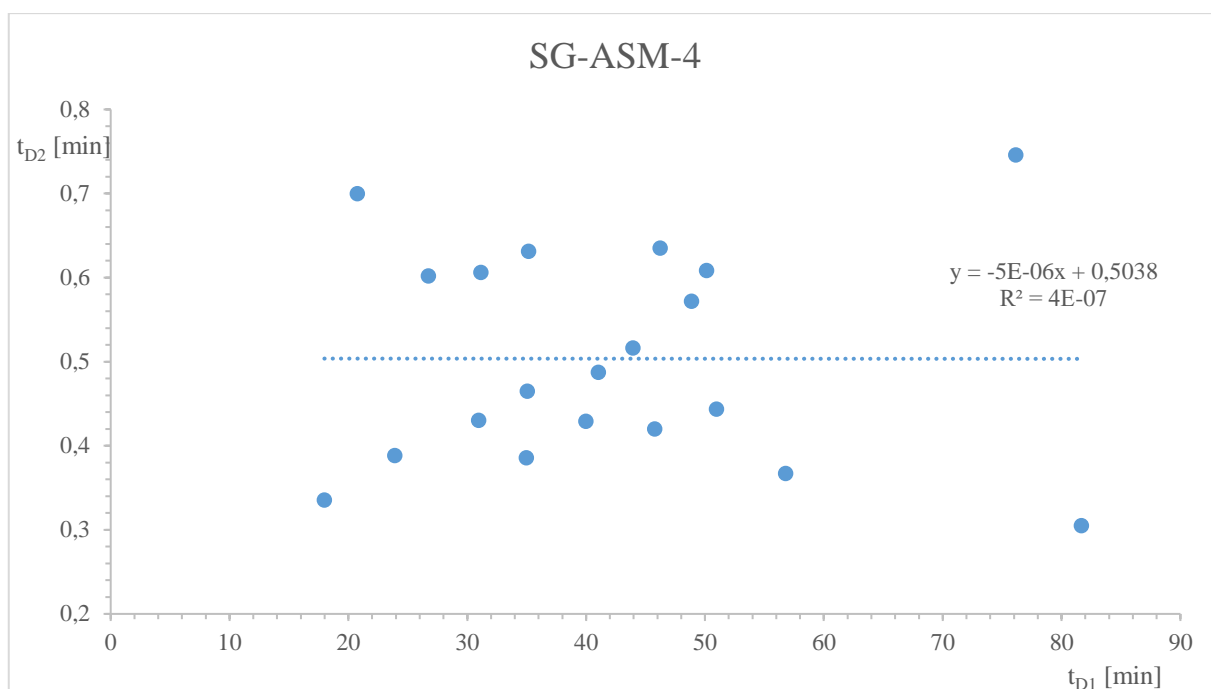
Na základě naměřených dat bylo testované třísmýčkové rozhraní porovnáváno se zbylými dvěma rozhraními. Za tímto účelem byly pro jednotlivá rozhraní zjištěny průměrné šířky píků a vypočítány píkové kapacity v první a druhé dimenzi $n_{c,D1}$ a $n_{c,D2}$, celková teoretická píková kapacita 2D systému $n_{c,2D-LC}$, reálná píková kapacita $n_{c,2D-LC}^*$ a parametry popisující ortogonalitu systému, korelační faktor R^2 a koeficient selektivity (ortogonalita) s^2 . Píkové kapacity pro jednotlivé dimenze byly počítána podle následujícího vzorce:

$$n = \frac{t}{W} \quad (3)$$

kde t je poslední časový bod v gradientu u první dimenze (50, 67 nebo 100 min) či doba gradientu jednoho separačního cyklu pro druhou dimenzi (0,7 min) a W je průměrná šířka píků při základně. Celková píková kapacita 2D-LC ($n_{c,2D-LC}$) systému byla počítána podle rovnice (2) v kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

Korelační faktor R^2 byl získán tak, že byla vyhodnocena závislost retenčního času látek v první dimenzi na retenčním času v druhé dimenzi. Následně byla proložena lineární spojnice trendu, u níž byl tento korelační faktor odečten (Obrázek 26). Z takto získaného korelačního faktoru byl poté dle následujícího vzorce vypočítán koeficient selektivity s^2 [34]:

$$s^2 = 1 - R^2 \quad (4)$$



Obrázek 26 Ukázka ortogonalita a korelačního faktoru

Reálná píkova kapacita představuje celkovou píkovou kapacitu při zohlednění parametrů ortogonalita systému. Značí se n_{2D-LC}^* a byla vypočítána dle následujícího vzorce [34]:

$$n_{c,2D-LC}^* = n_{c,D1} \cdot n_{c,D2} \cdot s^2 + \sqrt{n_{c,D1}^2 + n_{c,D2}^2} \cdot (1 - s^2)$$

kde $n_{c,D1}$ je píkova kapacita první dimenze, $n_{c,D2}$ je píkova kapacita druhé dimenze a s^2 koeficient selektivity.

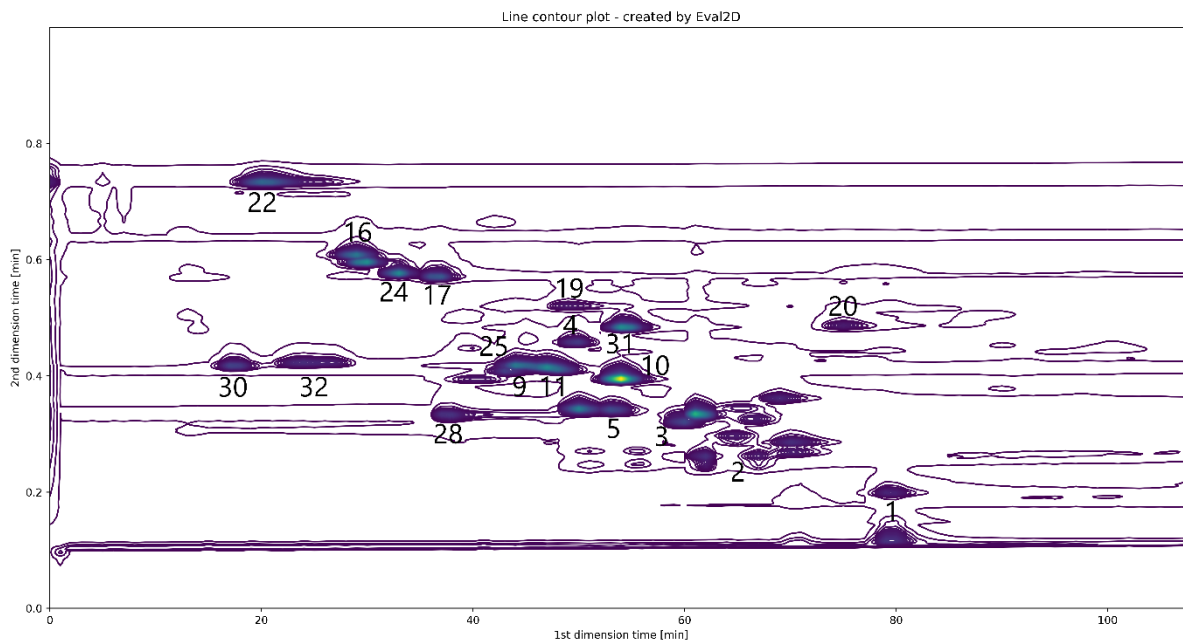
3.1 2D chromatogramy

Všechny 2D chromatogramy byly vytvořeny v programu Eval2D. Na ose x je uveden retenční čas v první dimenzi, na ose y retenční čas ve druhé dimenzi. Skupina vrstevnic představuje většinou jeden pík, který je označen barevně na škále od modré do žluté. Čím je pík více zabarvený do žluta, tím má vyšší intenzitu.

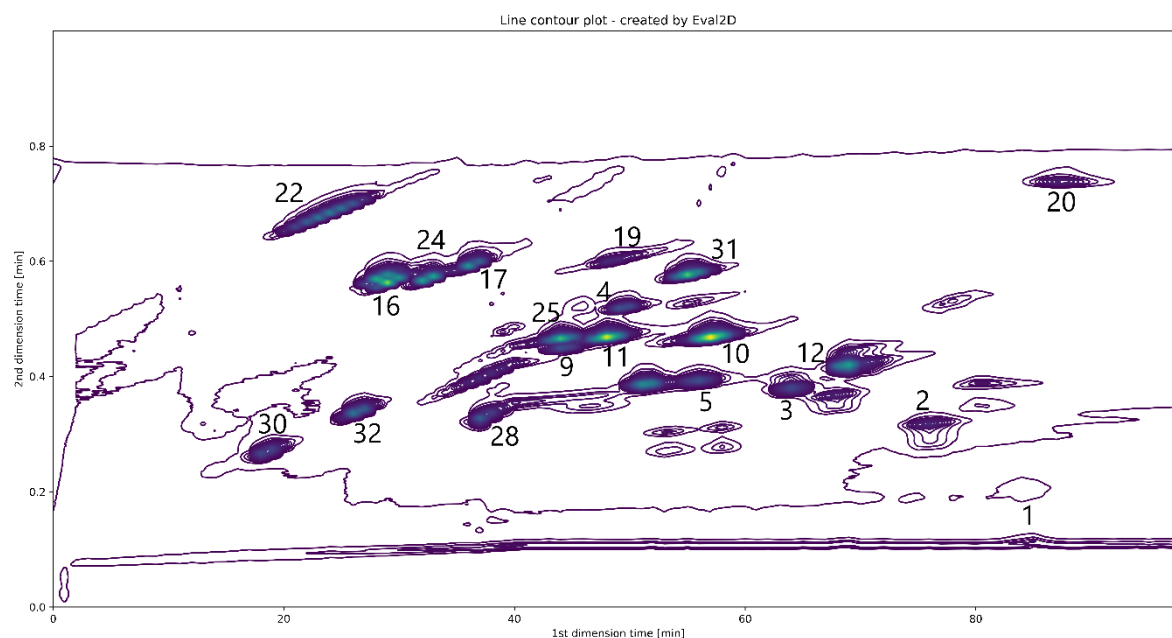
Na Obrázku 27 a 28 jsou zobrazeny chromatogramy separovaných standardů fenolických kyselin a flavonů za použití stejných podmínek analýzy pouze se změnou gradientu. Konkrétní podmínky analýz FIF-AG-4 a SH-AG-4 jsou uvedené v Tabulce 10 a 12. Seznam látek s číselným označením je uvedený v Tabulce 9.

Na Obrázku 27 je zobrazen chromatogram, který byl měřen za podmínek FIF gradientu. Píky na tomto chromatogramu jsou více celistvé a oproti SG (Obrázek 28) jsou více rozprostřeny po celém separačním prostoru. U SG jsou píky většinou větší a píky jsou umístěny šikmo k osám.

Tento jev je způsoben SG gradientem, kdy na každou frakci je ve druhé dimenzi použit jiný gradient s mírně odlišným rozsahem acetonitrilu (viz Obrázek 21). Díky rozdílnému gradientu dochází k posunu retenčních časů jedné a té samé látky, která se vyskytuje ve více frakcích. Rozdíly mezi FIF a SG gradienty jsou uvedeny v kapitole 1.2.1.2.



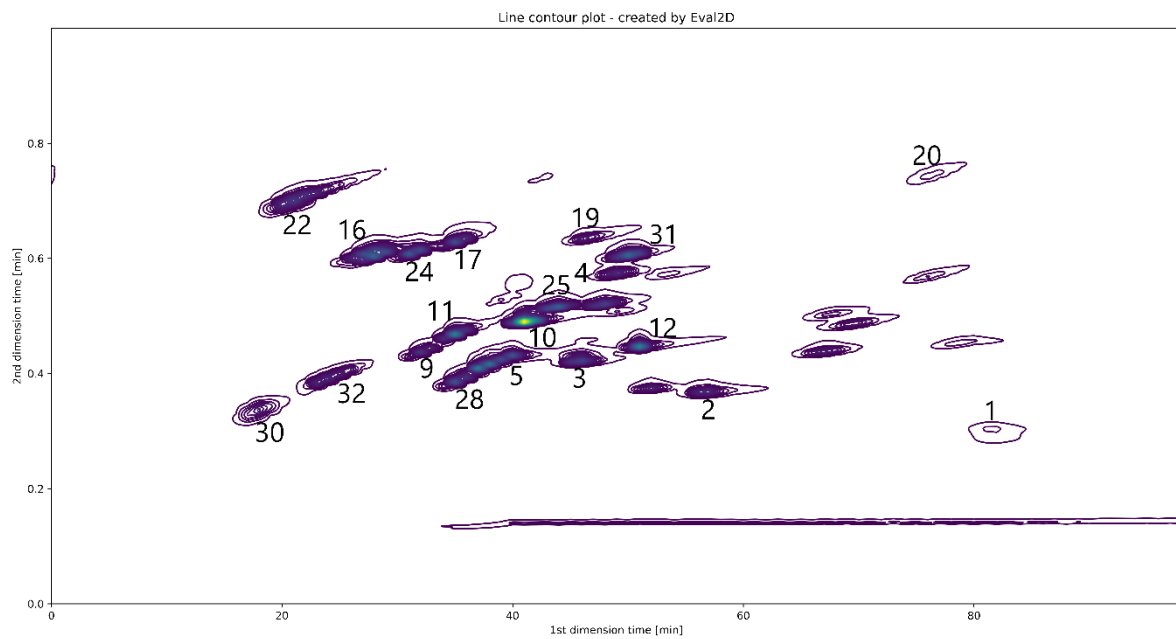
Obrázek 27 2D chromatogram FIF-AG-4



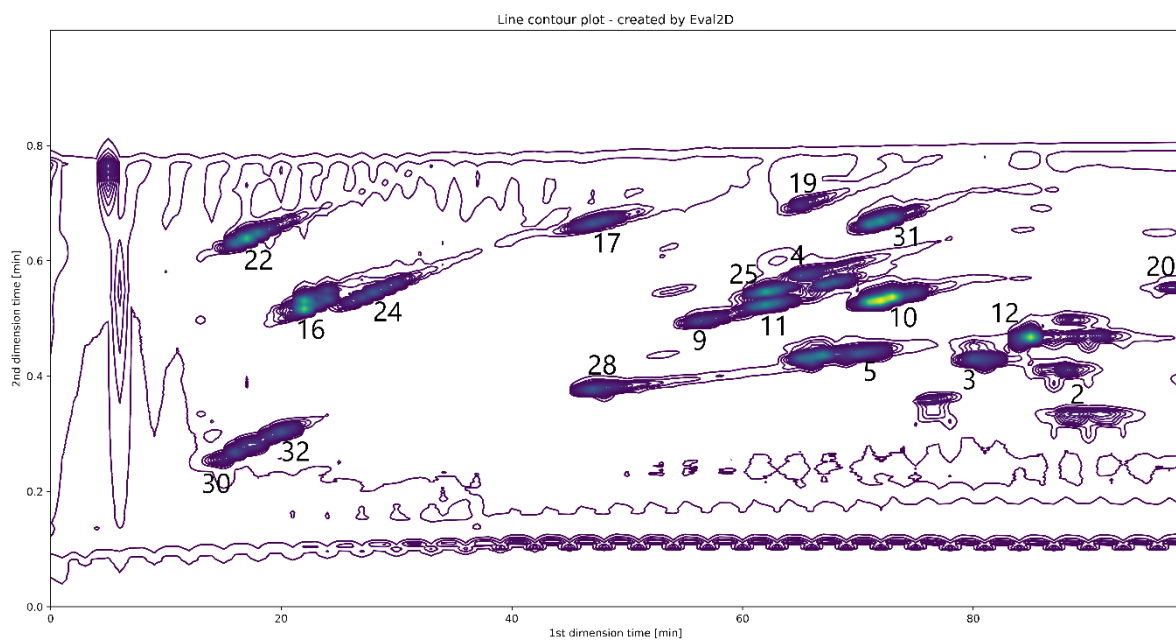
Obrázek 28 2D chromatogram SH-AG-4

Na Obrázku 28, 29 a 30 jsou zobrazeny chromatogramy pro jednotlivá rozhraní, které byly měřeny při stejném průtoku (4 $\mu\text{l}/\text{min}$) a stejném gradientu (SG). Konkrétní podmínky analýz SG-AG-4, SG-ASM-4 a SG-TS-4 jsou uvedené v Tabulce 10 a 11. Seznam látek s číselným označením je uvedený v Tabulce 9. Na Obrázku 28 je zobrazeno chromatogram pro rozhraní Agilent-2-port-8-duo (AG) a na Obrázku 29 je zobrazen chromatogram pro ASM zapojení.

Chromatogramy obou rozhraní jsou si v celku podobné, což se dá vysvětlit tím, že zapojení ASM je v základě založeno na Agilent ventilu. V případě Agilent rozhraní jsou píky obecně větší a v centrální oblasti chromatogramu jsou píky lépe odděleny. Látka s označením 28 u chromatogramu s Agilent rozhraní chvostuje v D1 na rozdíl od chromatogramu s ASM zapojení. Čas separace je při použití ASM zapojení kratší, což můžeme pozorovat např. na píku s označením 20 (rutin), který má v případě ASM zapojení retenční čas pouze 76 min ve srovnání s Agilent rozhraním, kde je retenční čas 87 min. Na Obrázku 30 je zobrazen chromatogram pro třísmýčkový ventil umožňující izoelektrickou fokusaci sloučenin. Ten se oproti dvěma předchozím rozhraním poměrně liší. Veliký rozdíl je v retenčních časech, které jsou s výjimkou prvních pěti látek v první dimenzi mnohem vyšší. Na rozdíl od ostatních rozhraní, kde jsou chromatogramy více ucelené, je v tomto případě prvních pět látek odděleno od zbytku a v oblasti přibližně 35–45 minuty analýzy se nenacházejí žádné píky. Tento jev lze pozorovat u tohoto rozhraní i při vyšším průtoku mobilní fáze v první dimenzi. Nicméně s rostoucím průtokem se tato mezera zmenšuje viz. Příloha 19 a 20. Na rozdíl od ostatních rozhraní, kde jsou píky látek 30 a 32 dobře oddělené, jsou v při použití třísmýčkového rozhraní tyto píky slité a tvoří poměrně široký pás. Ve všech případech je nejvýraznějším píkem v chromatogramu pík látky 10 (kyselina *p*-kumarová).



Obrázek 29 2D chromatogram SH-ASM-4



Obrázek 30 2D chromatogram SH-TS-4

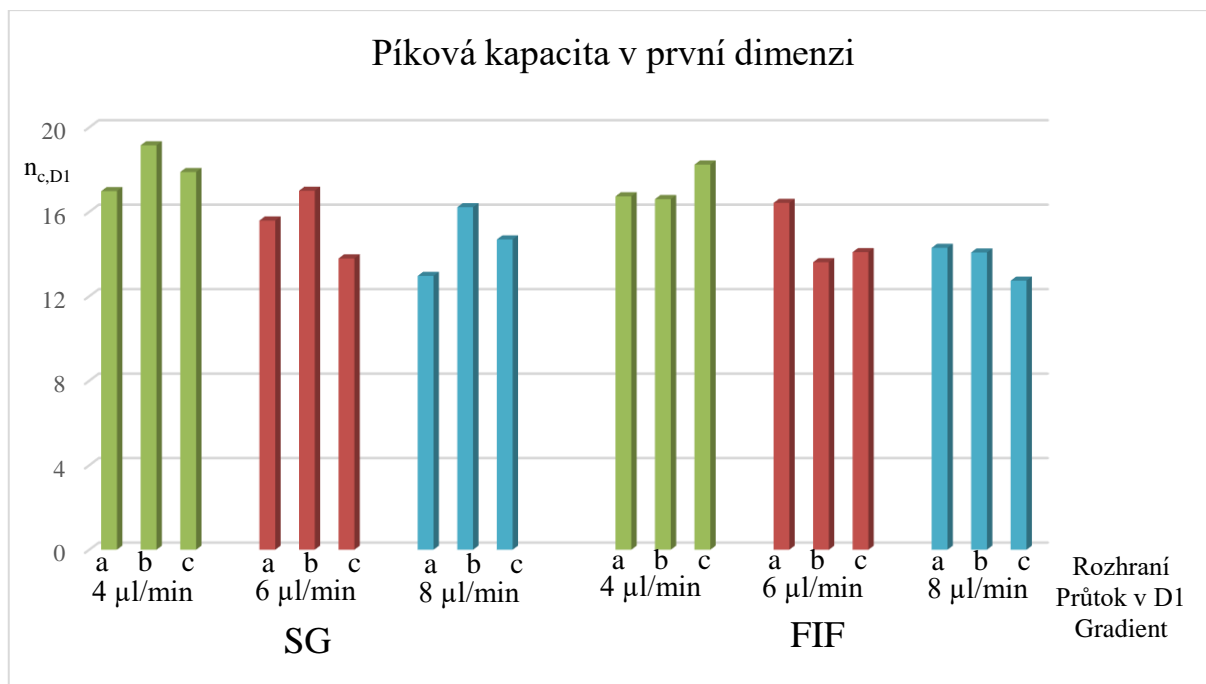
3.1 Píková kapacita v první dimenzi

Píková kapacita je významným parametrem pro porovnávání kvality separace různých chromatografických analýz a je často využívána při optimalizaci měřicích podmínek. Reprezentuje množství složek vzorku, které je možné při konkrétním nastavení separačních podmínek rozdělit tak, aby bylo rozlišení výsledného chromatogramu $R = 1$. Rozlišení je parametr popisující kvalitu separace na základě porovnávání retenčních časů s šířkami sousedících píků.

Při vyhodnocování naměřených chromatogramů byla z celkové směsi vybrána vždy série zhruba dvaceti píků (látek), u které byla zjištěna píková kapacita. Šířky píků byly za tímto účelem odečítány z výsledných 2D chromatogramů pomocí programu Eval2D, neboť detektor za první dimenzi nebyl použit. Píkové kapacity v první dimenzi při použití SG a FIF gradientů jsou pro jednotlivá rozhraní a rozdílné průtoky v první dimenzi uvedena v Tabulce 14 a pro lepší přehlednost vyobrazeny na Obrázku 31. Časy trvání gradientu v první dimenzi byly přepočítány úměrně k použitým průtokům mobilní fáze tak, aby byl průběh analýzy v první dimenzi zachován.

Tabulka 14 Přehled vypočítaných píkových kapacit pro první dimenzi

Gradient	Průtok v 1D [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Rozhraní	Označení	Píková kapacita
Shifted gradient	4	Agilent	SG-AG-4	17
		ASM	SG-ASM-4	19
		Tři smyčky	SG-TS-4	18
	6	Agilent	SG-AG-6	16
		ASM	SG-ASM-6	17
		Tři smyčky	SG-TS-6	14
	8	Agilent	SG-AG-8	13
		ASM	SG-ASM-8	16
		Tři smyčky	SG-TS-8	15
Full in fraction gradient	4	Agilent	FIF-AG-4	17
		ASM	FIF-ASM-4	17
		Tři smyčky	FIF-TS-4	18
	6	Agilent	FIF-AG-6	16
		ASM	FIF-ASM-6	14
		Tři smyčky	FIF-TS-6	14
	8	Agilent	FIF-AG-8	14
		ASM	FIF-ASM-8	14
		Tři smyčky	FIF-TS-8	13



Obrázek 31 Grafická vizualizace píkových kapacit v první dimenzi uvedený v Tabulce 14
a – Agilent, b – ASM, c – Tří smyčkový ventil

Naměřené píkové kapacity jsou obecně v celku malé a pohybují se v rozmezí od 12,7 do 18,2. U všech rozhraní píkové kapacity klesají v závislosti na zvyšujícím se průtoku mobilní fáze. Pro SG vykazuje nejvyšší píkové kapacity rozhraní ASM, a to nezávisle na rychlosti průtoku mobilní fáze. Píkové kapacity pro testované třísmyčkové rozhraní se pohybují v rozmezí 13,8 až 17,9 a jsou v průměru vyšší, než je tomu u rozhraní Agilent. Rozdíly mezi jednotlivými rozhraními jsou však poměrně malé a pro jednotlivé průtoky se píkové kapacity neliší o více než 3,2. V případě FIF gradientu se píkové kapacity pohybují v užším rozmezí hodnot, než je tomu u SG a jsou obecně o něco málo nižší. Rozhraní ASM vykazuje při tomto gradientu nižší píkové kapacity než rozhraní Agilent a na rozdíl od ostatních rozhraní u něj píková kapacita nenásleduje jednoznačný trend související s průtokem mobilní fáze a její hodnota dosahuje minima při průtoku 6 µl/min, kdy je dokonce nižší než u třísmyčkového rozhraní. S výjimkou průtoku 4 µl/min, kde dosahuje nejvyšších píkových kapacity třísmyčkové rozhraní byla nejvyšší píková kapacita při FIF gradientu naměřena u rozhraní Agilent. Rozdíl píkových kapacit v závislosti na velikosti průtoku je při použití FIF gradientu o něco vyšší a v případě třísmyčkového rozhraní se píková kapacita liší až o 5,5. I přes zmíněné rozdíly jsou však píkové kapacity pro oba gradientech velmi podobné a ani mezi jednotlivými rozhraními se příliš neliší.

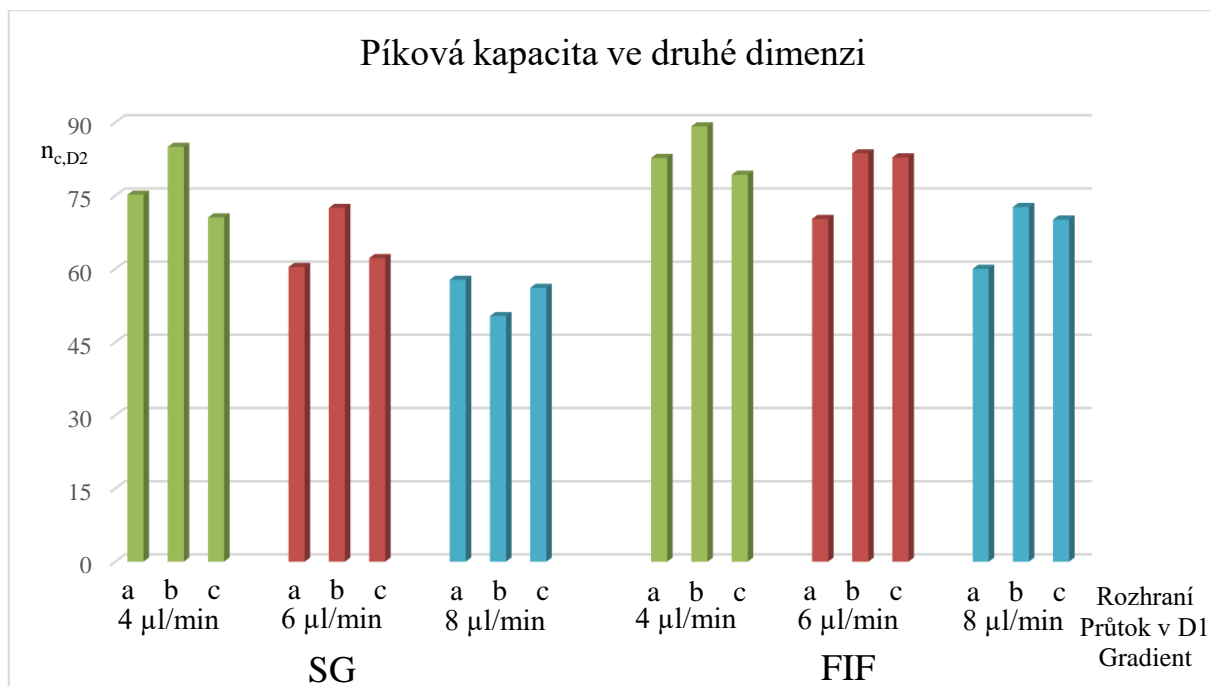
3.2 Píková kapacita ve druhé dimenze

Druhá dimenze je z hlediska celkové separace látek v 2D-LC nejvýznamnější a největší měrou přispívá do celkové píkové kapacity 2D separace, neboť v první dimenzi dochází jen k základnímu rozdělení složek vzorku. Druh a průběh modulace, stejně jako typ použitého rozhraní, má klíčový vliv na tvar a šířky píků v druhé dimenzi, a tedy i ve výsledném 2D chromatogramu. Mimoto je šířka píků také ovlivněna použitým gradientem.

Stejně jako v případě píkové kapacity pro první dimenzi byla i zde pro každou analýzu zvolena stejná série píků, pro kterou byla píková kapacita v druhé dimenzi vypočítána. Šířky píků byly v tomto případě odečítány za pomoci programu Agilent OpenLab ChemStation. V Tabulce 15 a na Obrázku 32 jsou uvedeny a znázorněny vypočítané píkové kapacity pro druhou dimenzi při použití SG a FIF gradientu.

Tabulka 15 Přehled vypočítaných píkových kapacit pro druhou dimenzi

Gradient	Průtok v 1D [μl/min]	Rozhraní	Označení	Píková kapacita
Shifted gradient	4	Agilent	SG-AG-4	75
		ASM	SG-ASM-4	85
		Tři smyčky	SG-TS-4	71
	6	Agilent	SG-AG-6	60
		ASM	SG-ASM-6	72
		Tři smyčky	SG-TS-6	62
	8	Agilent	SG-AG-8	58
		ASM	SG-ASM-8	50
		Tři smyčky	SG-TS-8	56
Full in fraction gradient	4	Agilent	FIF-AG-4	83
		ASM	FIF-ASM-4	89
		Tři smyčky	FIF-TS-4	79
	6	Agilent	FIF-AG-6	70
		ASM	FIF-ASM-6	84
		Tři smyčky	FIF-TS-6	83
	8	Agilent	FIF-AG-8	60
		ASM	FIF-ASM-8	73
		Tři smyčky	FIF-TS-8	70



Obrázek 32 Grafická vizualizace píkových kapacit ve druhé dimenzi uvedený v Tabulce 15
a – Agilent, b – ASM, c – Tří smyčkový ventil

Píkové kapacity ve druhé dimenzi jsou oproti první dimenzi výrazně vyšší a pohybují se v rozmezí od 50 do 89. Píkové kapacity pro FIF gradient jsou jednoznačně vyšší oproti SG. Při použití SG dosahuje nejvyšší píkové kapacity rozhraní ASM při průtoku 4 a 6 μl/min. Při průtoku 8 μl/min je ovšem jeho hodnota nejnižší, což může být způsobeno chvostujícími píky. Naopak nejvyšší píkové kapacity v tomto případě dosahuje rozhraní Agilent. Třísmyčkové rozhraní se ve všech třech případech drží mezi hodnotami zbylých dvou rozhraní. Při použití FIF gradientu dosahuje nejvyšších píkových kapacit rozhraní ASM. Třísmyčkové rozhraní má nejvyšší píkovou kapacitu při průtoku 6 μl/min a velmi podobné hodnoty nabývá také při průtoku 4 μl/min. Při průtoku 8 μl/min nabývá toto rozhraní nižší píkové kapacity, a to až o 13. Obecně jsou píkové kapacity pro FIF vyšší a pohybují se v rozmezí od 60 do 89. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena vyšším rozsahem koncentrace acetonitrilu (silné eluční činidlo) v každé frakci než v případě SG gradientu. Při použití větší strmost gradientu dochází k zaostření elučních zón látek v koloně, a tedy zúžení píků.

3.3 Teoretická celková píková kapacita

Pro porovnání separací v systému 2D-LC je významným parametrem celková píková kapacita, která charakterizuje celkovou kapacitu separace za použití konkrétních podmínek, jelikož v sobě zahrnuje informaci o šířce píků v první i druhé dimenzi. Teoretické celkové píkové kapacity byly vypočítány na základě zjištěných píkových kapacit pro první a druhou dimenzi.

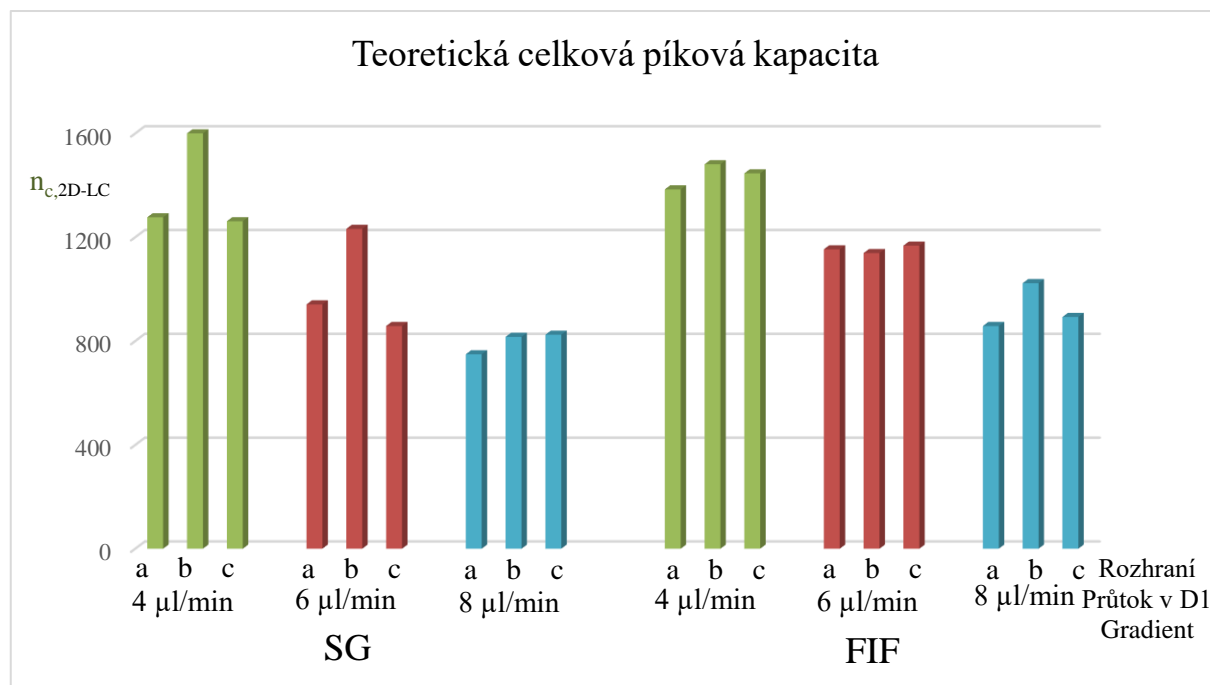
Teoretická celková píková kapacita se napříč měřeními pohybovala v rozmezí od 749 do 1628 a pro třísmýčkový ventil nabývala od 824 do 1446. V Tabulce 16 a na Obrázku 33 jsou uvedeny výsledné celkové píkové kapacity pro 2D separace s použitím SG a FIF gradientu.

Tabulka 16 Přehled vypočítaných teoretických celkových píkových kapacit 2D-LC

Gradient	Průtok v 1D [μl/min]	Rozhraní	Označení	Píková kapacita
Shifted gradient	4	Agilent	SG-AG-4	1 277
		ASM	SG-ASM-4	1 628
		Tři smyčky	SG-TS-4	1 261
	6	Agilent	SG-AG-6	941
		ASM	SG-ASM-6	1 232
		Tři smyčky	SG-TS-6	858
	8	Agilent	SG-AG-8	749
		ASM	SG-ASM-8	816
		Tři smyčky	SG-TS-8	824
Full in fraction gradient	4	Agilent	FIF-AG-4	1 384
		ASM	FIF-ASM-4	1 481
		Tři smyčky	FIF-TS-4	1 446
	6	Agilent	FIF-AG-6	1 153
		ASM	FIF-ASM-6	1 139
		Tři smyčky	FIF-TS-6	1 167
	8	Agilent	FIF-AG-8	858
		ASM	FIF-ASM-8	1 023
		Tři smyčky	FIF-TS-8	893

Vyšší celkové píkové kapacity dosahovala v průměru měření, u nichž byl použit FIF gradient. Mezi těmito daty zlehka vyčnívají celkové píkové kapacity pro rozhraní ASM, která jsou v při průtoku 4 a 6 μl/min zhruba o 360 vyšší než u zbylých rozhraní. Teoretická celková píková kapacita se snižuje se zvyšujícím se průtokem mobilní fáze v první dimenzi a rozdíly mezi jednotlivými průtoky se pohybují v řádu stovek jednotek. K určité odchylce z tohoto trendu dochází v případě třísmýčkového rozhraní při změně průtoku mobilní fáze z 6 na

8 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dochází zde totiž k poklesu celkové píkové kapacity pouze o 34, což je oproti zbytku poměrně malá změna. V případě FIF gradientu se celkové píkové kapacity pro jednotlivá rozhraní při stejných průtocích příliš neliší a nejvyšších hodnot dosahuje ve většině případů rozhraní ASM.



Obrázek 33 Grafická vizualizace teoretických celkových píkových kapacit uvedených v Tabulce 16
a – Agilent, b – ASM, c – Tří smyčkový ventil

3.4 Ortogonalita

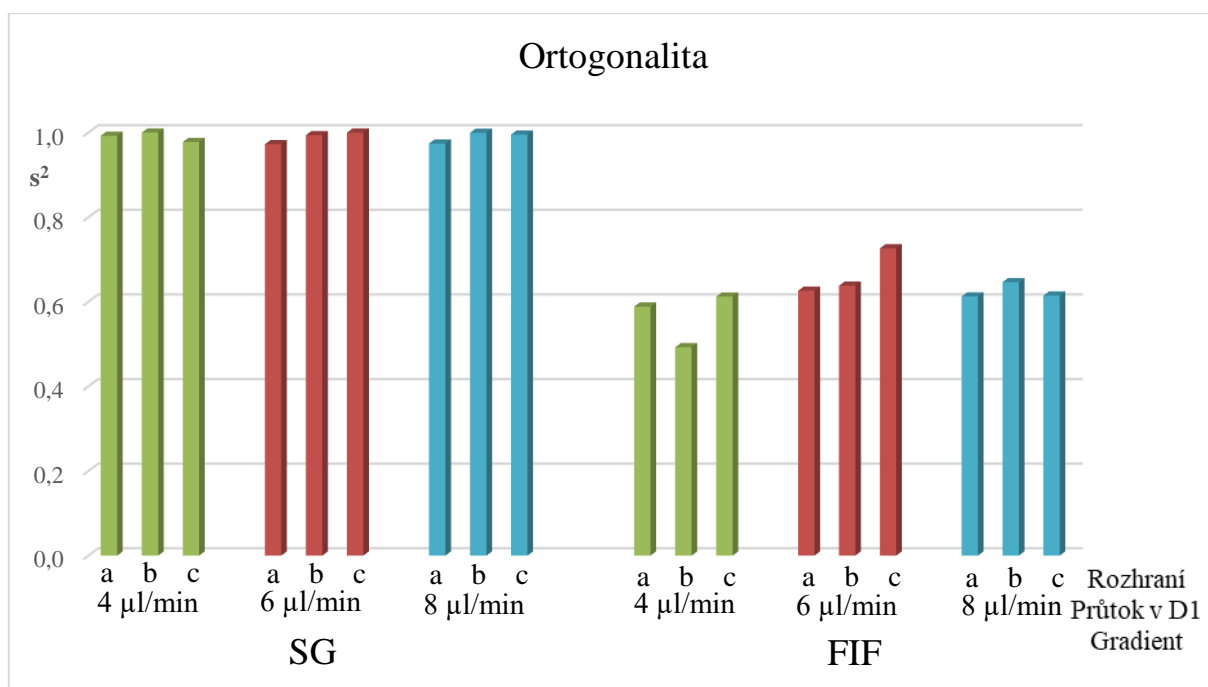
Ačkoli je celková píková kapacita významným parametrem pro nalezení vhodných podmínek dělení látek v 2D-LC, neposkytuje nám žádnou informaci o vhodnosti zvolené kombinace technik D1 a D2. Za tímto účelem byla pro jednotlivé chromatogramy určována ortogonalita, která popisuje kvalitu výsledného chromatogramu na základě rozložení píků na jeho ploše. Míra ortogonalit je vyjadřována pomocí korelačního faktoru a koeficientu selektivity.

Naměřené a vypočtené korelační faktory (Příloha 1–18) a koeficienty selektivity jsou vypsány v Tabulce 17 a pro srovnání jsou koeficienty selektivity vyobrazeny v Obrázku 34. Z naměřených dat vyplývá, že systémy, u nichž byl použit SG vykazují výrazně větší ortogonalitu než systémy, u nichž byl použit FIF. To se dalo očekávat, jelikož SG byl optimalizován na danou testovací směs s cílem maximalizovat pokrytí separační plochy. HILIC a RP zároveň vykazují obrácenou selektivitu retence, tedy chování, kdy se látky silně zadržované v HILIC

v RP téměř nezadržují. Z toho důvodu nemůže FIF gradient v tomto uspořádání nikdy dosáhnout tak vysoké ortogonalitě jako SG. Všechny analýzy provedené v režimu SG vykazují podobné hodnoty parametrů ortogonalitě, kdy se koeficient selektivity pohybuje v rozmezí od 0,97 do 1,00. Všechny systémy naměřené při SG jsou tedy téměř plně ortogonální. Při FIF se koeficient selektivity pohybuje v rozmezí od 0,49 do 0,73, a nejvyšší hodnoty nabývá u třísmyčkového rozhraní při průtoku 6 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nejnižší hodnoty naopak dosahuje u rozhraní ASM při průtoku 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ve většině ostatních případů osciluje koeficient selektivity okolo 0,61.

Tabulka 17 Přehled naměřených a vypočítaných hodnot korelačního faktoru a koeficientu ortogonalitě

Gradient	Průtok v D1 [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Rozhraní	Označení	R ²	S ²
Shifted gradient	4	Agilent	SG-AG-4	0,0076	0,9924
		ASM	SG-ASM-4	0,0000	1,0000
		Tři smyčky	SG-TS-4	0,0223	0,9777
	6	Agilent	SG-AG-6	0,0274	0,9726
		ASM	SG-ASM-6	0,0061	0,9939
		Tři smyčky	SG-TS-6	0,0001	0,9999
	8	Agilent	SG-AG-8	0,0260	0,9740
		ASM	SG-ASM-8	0,0005	0,9995
		Tři smyčky	SG-TS-8	0,0048	0,9952
Full in fraction gradient	4	Agilent	FIF-AG-4	0,4114	0,5886
		ASM	FIF-ASM-4	0,5075	0,4925
		Tři smyčky	FIF-TS-4	0,3877	0,6123
	6	Agilent	FIF-AG-6	0,3738	0,6262
		ASM	FIF-ASM-6	0,3620	0,6380
		Tři smyčky	FIF-TS-6	0,2736	0,7264
	8	Agilent	FIF-AG-8	0,3874	0,6126
		ASM	FIF-ASM-8	0,3537	0,6463
		Tři smyčky	FIF-TS-8	0,3853	0,6147



Obrázek 34 Grafická vizualizace korelačního faktoru uvedený v Tabulce 17

a – Agilent, b – ASM, c – Trismyčkový ventil

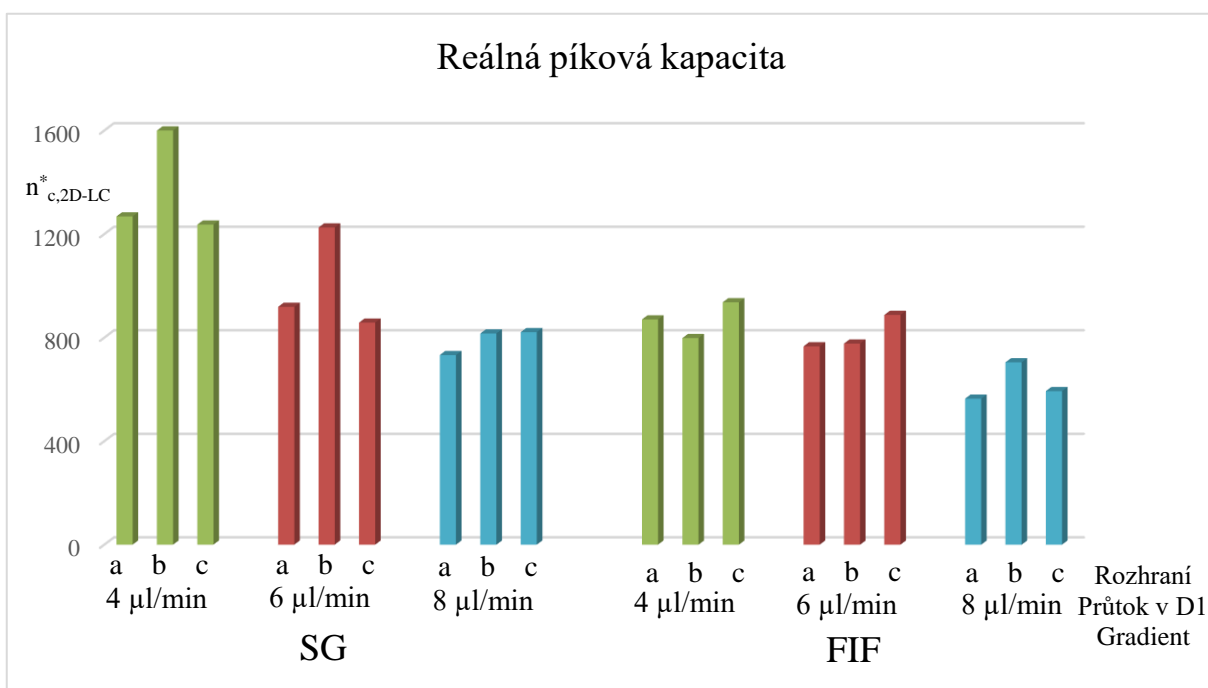
3.5 Reálná píkovaná kapacita

Pro přesnější popis 2D chromatogramů byla použita reálná píkovaná kapacita. Ta na rozdíl od celkové píkované kapacity zohledňuje také parametry ortogonality a lépe tak vypovídá o kvalitě separace v obou dimenzích a vzájemné kompatibilitě použitých separačních technik.

Vypočtené reálné píkované kapacity jsou uvedené v Tabulce 18 a znázorněné na Obrázku 35. Analýzy prováděné při SG dosahují výrazně vyšších píkových kapacit, až 1 200–1 600. To je dáno zejména jejich ortogonalitou, jelikož se jejich koeficient selektivity pohybuje okolo hodnoty 1,0. Oproti tomu separace s použitím FIF gradientu měly koeficienty selektivity téměř poloviční a reálná píkovaná kapacita je tedy o cca 300–400 menší. Při porovnání celkových píkových kapacit a reálných píkových kapacit tak můžeme vidět výrazný vliv, který má na reálnou píkovanou kapacitu ortogonalita systému. V případě SG reálné píkované kapacity výrazně klesají se vzrůstajícím průtokem mobilní fáze, a to až v rozsahu 812 píků, což je dáno původní celkovou píkovou kapacitou. U FIF gradientu je tento trend rovněž klesající, ale rozdíly mezi jednotlivými průtoky nejsou ani z daleka tak velké. Způsob, jakým se od sebe liší reálné píkované kapacity jednotlivých rozhraní vychází z jejich celkových píkových kapacit a vzhled výsledného grafu při jejich vyobrazení je tak velmi podobný. Pro SG opět dosahuje nejvyšších hodnot rozhraní ASM a pro FIF gradient trismyčkové rozhraní.

Tabulka 18 Přehled vypočítaných reálných píkových kapacit 2D-LC

Gradient	Průtok v 1D [μl/min]	Rozhraní	Označení	Píková kapacita
Shifted gradient	4	Agilent	SG-AG-4	1 268
		ASM	SG-ASM-4	1 628
		Tři smyčky	SG-TS-4	1 237
	6	Agilent	SG-AG-6	919
		ASM	SG-ASM-6	1 226
		Tři smyčky	SG-TS-6	858
	8	Agilent	SG-AG-8	732
		ASM	SG-ASM-8	816
		Tři smyčky	SG-TS-8	821
Full in fraction gradient	4	Agilent	FIF-AG-4	870
		ASM	FIF-ASM-4	798
		Tři smyčky	FIF-TS-4	936
	6	Agilent	FIF-AG-6	766
		ASM	FIF-ASM-6	777
		Tři smyčky	FIF-TS-6	888
	8	Agilent	FIF-AG-8	564
		ASM	FIF-ASM-8	704
		Tři smyčky	FIF-TS-8	593



Obrázek 35 Grafická vizualizace reálných píkových kapacit uvedených v Tabulce 18

a – Agilent, b – ASM, c – Tři smyčkový ventil

4 ZÁVĚR

První část diplomové práce je věnována chromatografii, kde je nejprve vysvětlen rozdíl mezi jednorozměrnou a dvourozměrnou kapalinovou chromatografií. Následuje popis instrumentace použité pro dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii, kde největší část je věnována popisu různých druhů rozhraní. Dále jsou popisovány druhy režimů, které se mohou používat při měření v 2D-LC. Další část diplomové práce se zabývá přírodními antioxidanty, konkrétněji fenolovými sloučeninami a jejich možnosti stanovení.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat a optimalizovat měřicí podmínky pro použití nového třismyčkového rozhraní, které by v budoucnu mohlo umožňovat zařazení izoelektrické fokusace mezi separace v D1 a D2 a porovnat ho s běžně používanými rozhraními pro 2D-LC. Porovnání bylo prováděno na směsi standardů fenolických kyselin a flavonů a jako referenční rozhraní byl zvolen ventil Agilent-2-port-8-duo a rozhraní ASM, umožňující aktivní modulaci mobilní fáze. Do první dimenze byla použita kapilární monolitická kolona separující látky v HILIC módu a do druhé dimenze komerční monolitická kolona s C18 stacionární fází (RP podmínky). Celý 2D-LC HILIC×RP systém byl v úplném (comprehensive) zapojení, kdy byl veškerý eluent z první dimenze převáděn na kolonu v druhé dimenzi. Pro hlubší porovnání chování třismyčkového rozhraní při různých podmínkách byly analýzy prováděny pro dva různé gradienty druhé dimenze: FIF a SG.

Při srovnání na základě naměřených píkových kapacit a ortogonalit separace vykazovalo třismyčkové rozhraní spíše průměrné výsledky a oproti referenčním rozhraním nijak nevyčnívalo. Na druhou stranu ale vykazovalo velmi podobné hodnoty jako tyto dvě v praxi používaná rozhraní a lze tedy předpokládat, že by za těchto podmínek mohlo být rovněž použito. Nejvyšší reálné píkové kapacity 1 237 dosahoval třismyčkové rozhraní při gradientu SG za průtoku 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Celkově nejvyšší reálné píkové kapacity 1 628 dosahovalo zapojení ASM při SG za průtoku 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ve většině případů se s rostoucím průtokem snižovala píková kapacita. Ortogonalita při SG byla u všech rozhraní podobná a koeficient selektivity se pohyboval v rozmezí od 0,97 do 1,00. Při použití gradientu FIF se koeficient selektivity pohyboval od 0,49 do 0,73 a nejvyšší hodnoty dosahoval u třismyčkového rozhraní při průtoku 6 $\mu\text{l}/\text{min}$. Obdobně jak ASM a Agilent vykazovalo třismyčkové rozhraní lepší vlastnosti při měření v režimu SG, ačkoli z hlediska reálné píkové kapacity dosahovalo i v režimu FIF obdobných hodnot jako při vyšších průtocích v režimu SG.

Z chromatogramů pro třísmýčkové rozhraní bylo evidentní, že jeho použití vede u separovaných látek k prodloužení jejich retenčních časů v první dimenzi. Tento parametr by však ventil neměl nějak ovlivnit. Potencionálním důvodem může být delším zadržováním frakcí ve smyčkách rozhraní, během kterého by po sléze mělo docházet k izoelektrické fokusaci. Tento čas by tak měl být do budoucna kompenzován lepším rozlišením díky zavedení tohoto kroku. Píky v chromatogramech s třísmýčkovým rozhráním vykazují větší tendenci tvořit široké píky, zejména u látek s nižšími retenčními časy v D1, což také může být dáno delším zadržováním frakcí ve smyčkách rozhraní, kde může docházet k většímu rozmývání. Odstranění těchto vad bude do budoucna vyžadovat další optimalizaci, a to zejména po zařazení izoelektrické fokusace.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KENKEL, John. *Analytical chemistry for technicians*. 3. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. ISBN 15-667-0519-3.
- [2] GUIOCHON, Georges a Oliver TRAPP. Basic principles of chromatography. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Heidelberg, 2012, 1-27. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1002/14356007.b05_155.pub2
- [3] SKOOG, Douglas a James LEARY. *Principles of instrumental analysis*. 4. Fort Worth: Saunders College, 1992. ISBN 00-307-5398-8.
- [4] OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, Petr RYCHLOVSKÝ a Zbyněk PLZÁK. *Základní analytická chemie*. 1. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0553-8.
- [5] JANDERA, Pavel a Günter HENZE. Liquid chromatography 1. Fundamentals, history, instrumentation, materials. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 2. Wiley, 2012, s. 85-138. ISBN 9783527306732. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/14356007.b05_237.pub2
- [6] Eluční metoda. In: *Chromatografie*. Dostupné z: <http://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=kzm>
- [7] CARR, Peter a Dwight STOLL. *Two-dimensional liquid chromatography: Principles, practical implementation and applications*. Germany: Agilent technologies, 2015. ISBN 5991-2359EN. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-2359EN.pdf>
- [8] COHEN, Steven a Mark SCHURE. *Multidimensional liquid chromatography: Theory and applications in industrial chemistry and the life sciences*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2008. ISBN 04-702-7625-8.
- [9] STOLL, Dwight, Xiaoping LI, Xiaoli WANG, Peter CARR a Sarah PORTER. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 2007, 1-2(1168), 3-43. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.054>
- [10] DUGO, Paola, Tiina KUMM, Francesco CACCIOLA, Giovanni DUGO a Luigi MONDELLO. Multidimensional liquid chromatographic separations applied to the analysis of food samples. *Journal of liquid chromatography & Related*

- technologies*. 2010, 31(11-12), 1758-1807. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10826070802128888>
- [11] STOLL, Dwight a Peter CARR. Two-dimensional liquid chromatography: A state of the art tutorial. *Analytical chemistry*. 2017, 89(1), 519-531. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03506](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03506)
- [12] FANALI, Salvatore, Paul HADDAD, Colin POOLE a Marja-Liisa RIEKKOLA. *Liquid chromatography - Fundamentals and instrumentation: Volume 1. 2*. Amstrdam: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-805393-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpLCFIVE01/liquid-chromatography/liquid-chromatography>
- [13] DOLAN, John, Lloyd SNYDER, Nebojsa DJORDJEVIC, David HILL a Thomas WAEGHE. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time: I. Peak capacity limitations. *Journal of chromatography A*. 1999, 1-2(857), 1-20. ISSN 0021-9673. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00765-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00765-7)
- [14] NEUE, Uwe D. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of chromatography A*. 2005, 1-2(1079), 153-161. ISSN 0021-9673. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.008](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.008)
- [15] LI, Xiaoping, Dwight STOLL a Peter CARR. Equation for peak capacity estimation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical chemistry*. 2009, 2(81), 845-850. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1021/ac801772u](https://doi.org/10.1021/ac801772u)
- [16] GILAR, Martin, Petra OLIVOVA, Amy DALY a John GEBLER. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical chemistry*. 2005, 19(77), 6426-6434. ISSN 0003-2700. Dostupné z: [doi: https://doi.org/10.1021/ac050923i](https://doi.org/10.1021/ac050923i)
- [17] Popis částí klasického pístového čerpadla a jeho funkce. In: *Automatizace.hw.cz*. Dostupné z: <https://automatizace.hw.cz/files/images/image/smallpump.gif>
- [18] LI, Duxin a Oliver SCHMITZ. Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013, (405), 6511–6517. ISSN 1618-2650. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1007/s00216-013-7089-5](https://doi.org/10.1007/s00216-013-7089-5)

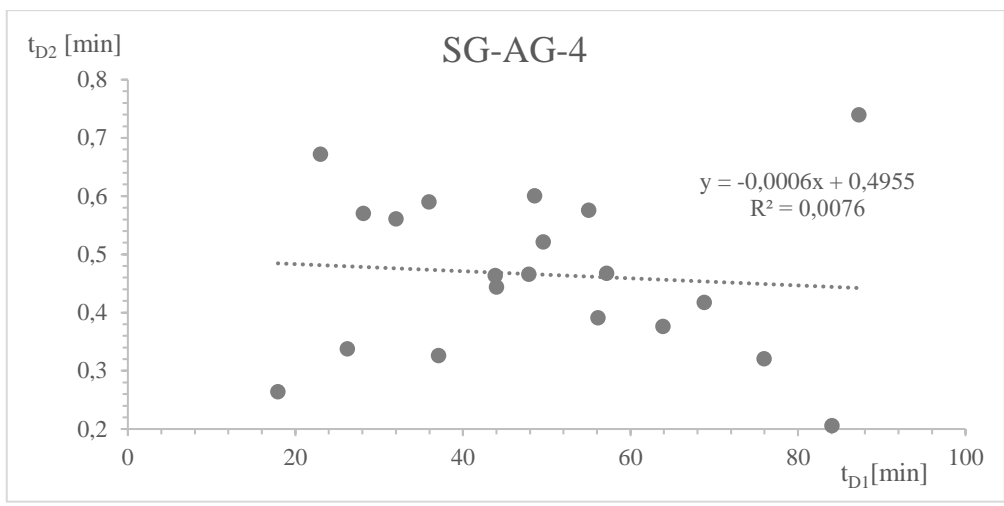
- [19] JANDERA, Pavel. HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemmagazín*. 2011, 21(2), 8-9.
- [20] FRANÇOIS, Isabelle, André VILLIERS, Bart TIENPONT, Frank DAVID a Pat SANDRA. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography applying two parallel columns in the second dimension. *Journal of chromatography A*. 2008, 1-2(1178), 33-42. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.032>
- [21] FRANÇOIS, Isabelle, Koen SANDRA a Pat SANDRA. Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review. *Analytica chimica acta*. 2009, 1-2(641), 14-31. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.041>
- [22] PIROK, Bob, Dwight STOLL a Peter SCHOENMAKERS. Recent developments in two-dimensional liquid chromatography: Fundamental improvements for practical applications. *Analytical chemistry*. 2019, 91(1), 240-263. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04841>
- [23] WANG, Shuangyuan, Jia LI a Xianzhe SHI. A novel stop-flow two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry method for lipid analysis. *Journal of chromatography A*. 2013, 1321, 65-72. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.069>
- [24] YANG, Peilin, Wei GAO a Tianlan ZHANG. Two-dimensional liquid chromatography with active solvent modulation for studying monomer incorporation in copolymer dispersants. *Journal of separation science*. 2019, 42(17), 2805–2815. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jssc.201900283>
- [25] PURSCH, Matthias, Stephan BUCKENMAIER a Antje WEGENER. Evaluation of active solvent modulation to enhance two-dimensional liquid chromatography for target analysis in polymeric matrices. *Journal of chromatography A*. 2018, (1562), 78-86. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.059>

- [26] STOLL, Dwight, Konstantin SHOYKHET, Patrik PETERSSON a Stephan BUCKENMAIER. Active solvent modulation: A valve-based approach to improve separation compatibility in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical chemistry*. 2017, 89(17), 9260–9267. ISSN 1520-6882. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02046>
- [27] SARRUT, Morgan, Nicola MARCHETTI a Sabine HEINISCH. 6. Two-dimensional liquid chromatography. *Analytical separation science: 5 Volume set*. John Wiley & Sons, 2015, s. 1357-1384. ISBN 978-1-5231-1058-2. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011CCKDB/analytical-separation/two-dimens-introduction>
- [28] JANDERA, Pavel a Peter LEMBKE. Liquid chromatography, 2. Methods, programmed and coupling techniques. *Ullmann's encyclopedia of industrial Chemistry*. 7. Hamburg: Wiley-VCH, 2011, s. 139-194. ISBN 9783527306732. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/14356007.o15_o01
- [29] DE LIMA CHERUBIM, Débora, Cleide BUZANELLO MARTINS, Luciana OLIVEIRA FARIÑA a Rosemeire DA SILVA DE LUCCA. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetis Dermatology*. 2020, (19), 33-37. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/jocd.13093>
- [30] GRAßMANN, Johanna. Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitamins and Hormones*. 2005, (72), 505-535. ISSN 0083-6729. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72015-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72015-X)
- [31] VOLLMANNOVÁ, Alena, Janette MUSILOVÁ a Dana URMINSKÁ. *Chémia potravín*. 1. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2018. ISBN 978-80-552-1814-4.

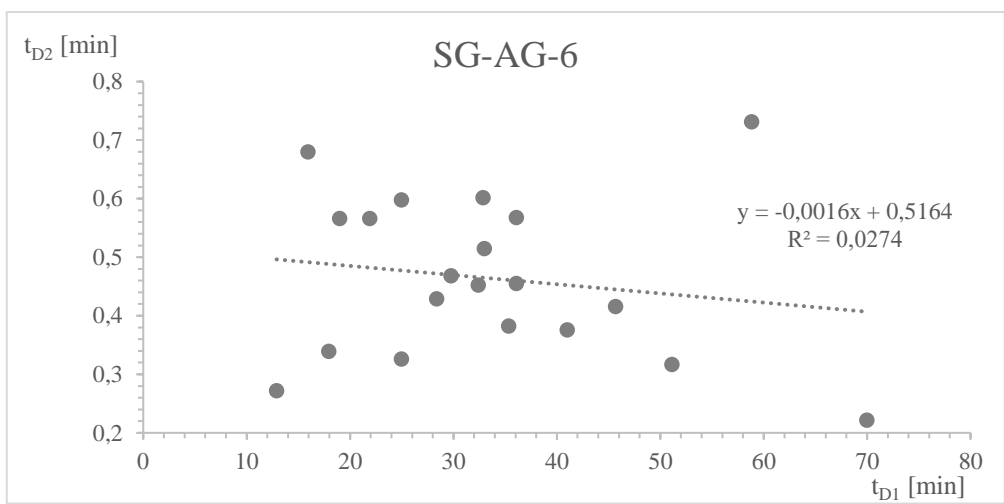
- [32] REIS GIADA, Maria de L. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants*. InTech, 2013, 87-112. ISBN 978-953-51-1123-8. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.5772/51687>
- [33] KALILI, Kathithileni, Seppe DE SMET, Tim VAN HOEYLANDT, Frédéric LYNNEN a André DE VILLIERS. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to the ABTS radical scavenging assay: a powerful method for the analysis of phenolic antioxidants. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014, (406), 4233–4242. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-014-7847-z>
- [34] HÁJEK, Tomáš, Pavel JANDERA, Magda STAŇKOVÁ a Petr ČESLA. Automated dual two-dimensional liquid chromatography approach for fast acquisition of three-dimensional data using combinations of zwitterionic polymethacrylate and silica-based monolithic columns. *Journal of chromatography A*. 2016, (1446), 91-102. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.007>

PŘÍLOHY

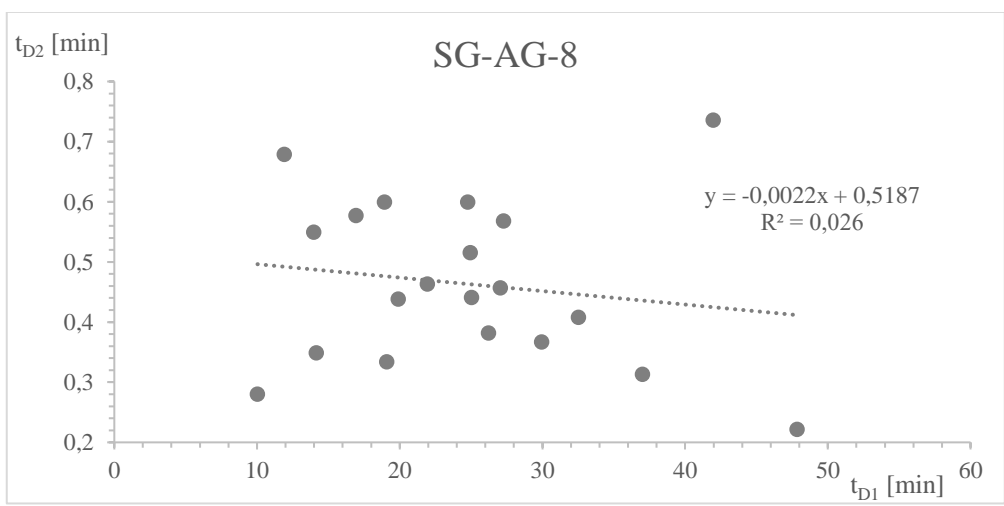
Příloha 1 Ortogonalita a korelační faktor SG-AG-4	79
Příloha 2 Ortogonalita a korelační faktor SG-AG-6	79
Příloha 3 Ortogonalita a korelační faktor SG-AG-8	79
Příloha 4 Ortogonalita a korelační faktor FIF-AG-4.....	80
Příloha 5 Ortogonalita a korelační faktor FIF-AG-6.....	80
Příloha 6 Ortogonalita a korelační faktor FIF-AG-8.....	80
Příloha 7 Ortogonalita a korelační faktor SG-ASM-4	81
Příloha 8 Ortogonalita a korelační faktor SG-ASM-6	81
Příloha 9 Ortogonalita a korelační faktor SG-ASM-8	81
Příloha 10 Ortogonalita a korelační faktor FIF-ASM-4.....	82
Příloha 11 Ortogonalita a korelační faktor FIF-ASM-6.....	82
Příloha 12 Ortogonalita a korelační faktor FIF-ASM-8.....	82
Příloha 13 Ortogonalita a korelační faktor SG-TS-4	83
Příloha 14 Ortogonalita a korelační faktor SG-TS-6	83
Příloha 15 Ortogonalita a korelační faktor SG-TS-8	83
Příloha 16 Ortogonalita a korelační faktor FIF-TS-4.....	84
Příloha 17 Ortogonalita a korelační faktor FIF-TS-6.....	84
Příloha 18 Ortogonalita a korelační faktor FIF-TS-8.....	84
Příloha 19 Ukázka 2D chromatogramu SG-TS-6	85
Příloha 20 Ukázka 2D chromatogramu SG-TS-8	85



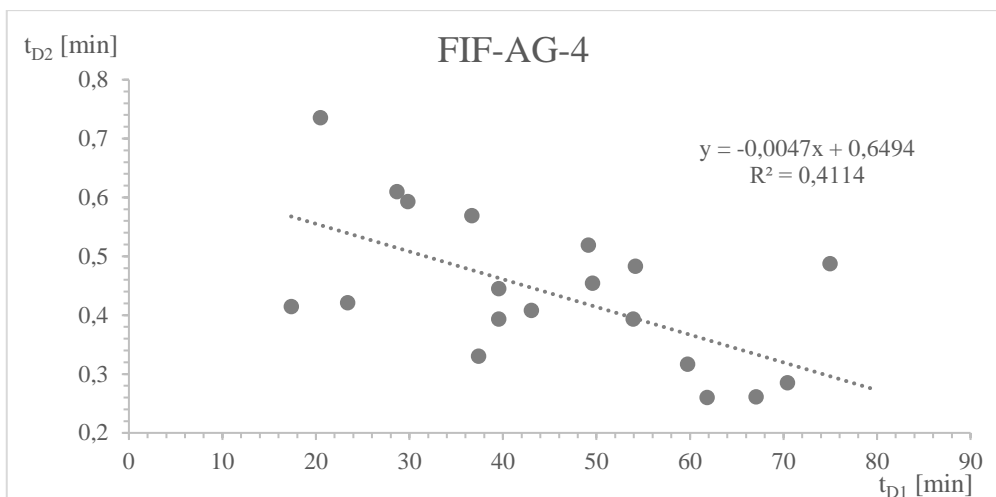
Příloha 1 Ortogonalita a korelační faktor SG-AG-4



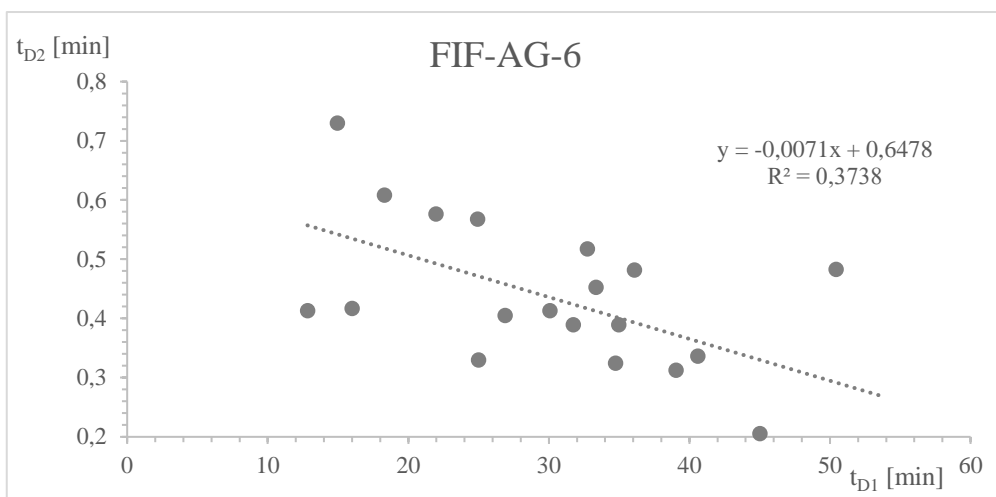
Příloha 2 Ortogonalita a korelační faktor SG-AG-6



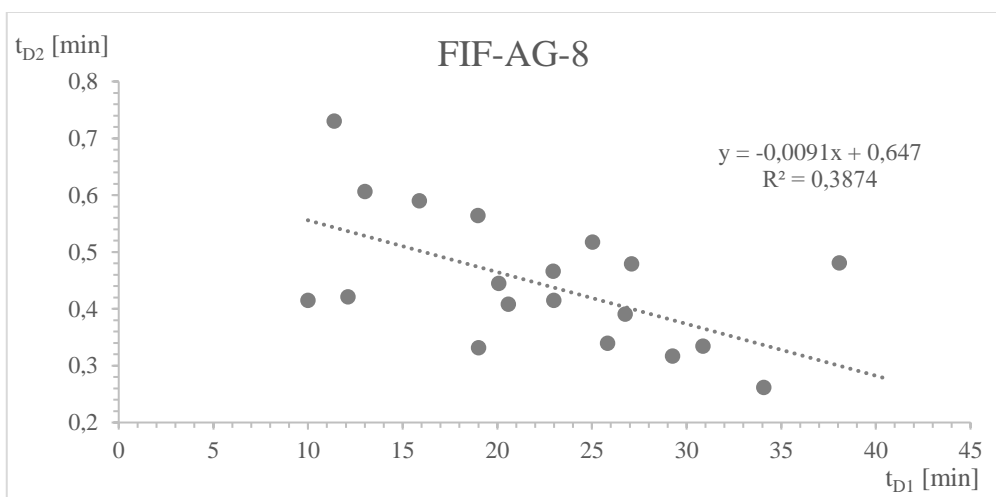
Příloha 3 Ortogonalita a korelační faktor SG-AG-8



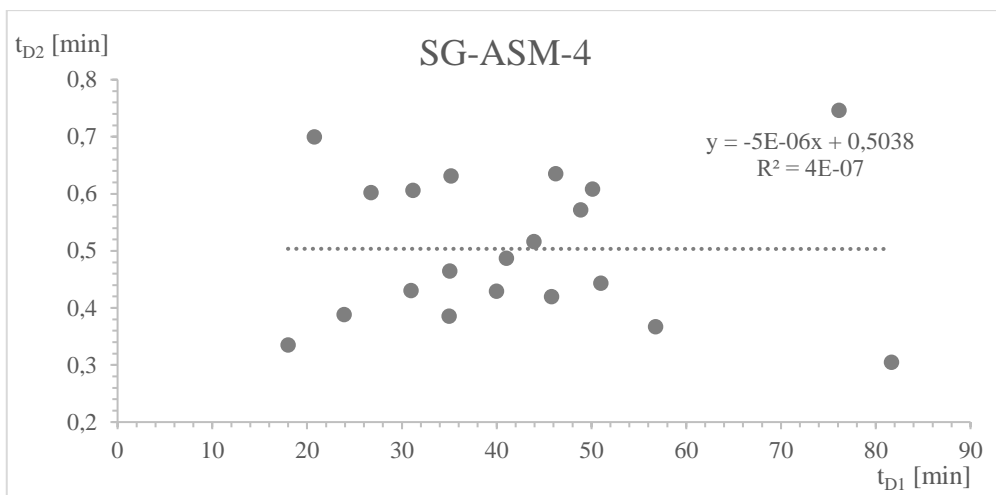
Příloha 4 Ortogonalita a korelační faktor FIF-AG-4



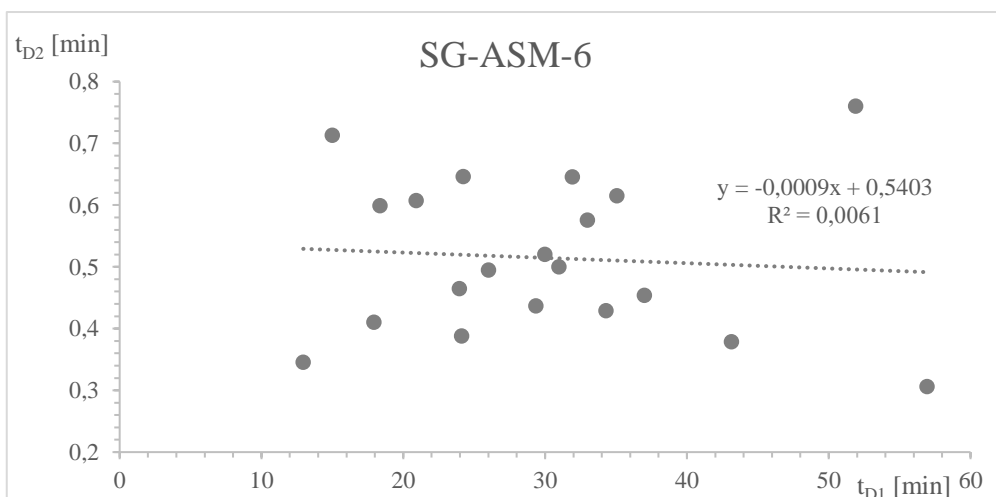
Příloha 5 Ortogonalita a korelační faktor FIF-AG-6



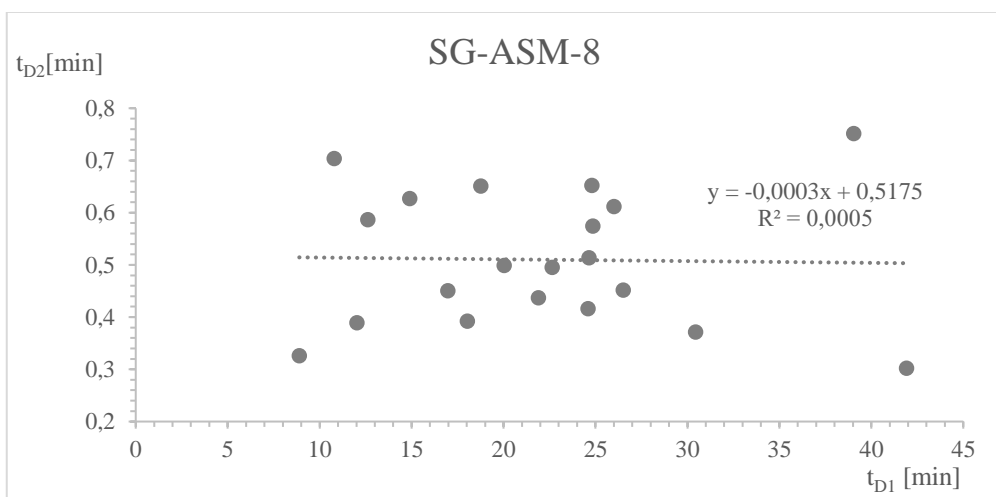
Příloha 6 Ortogonalita a korelační faktor FIF-AG-8



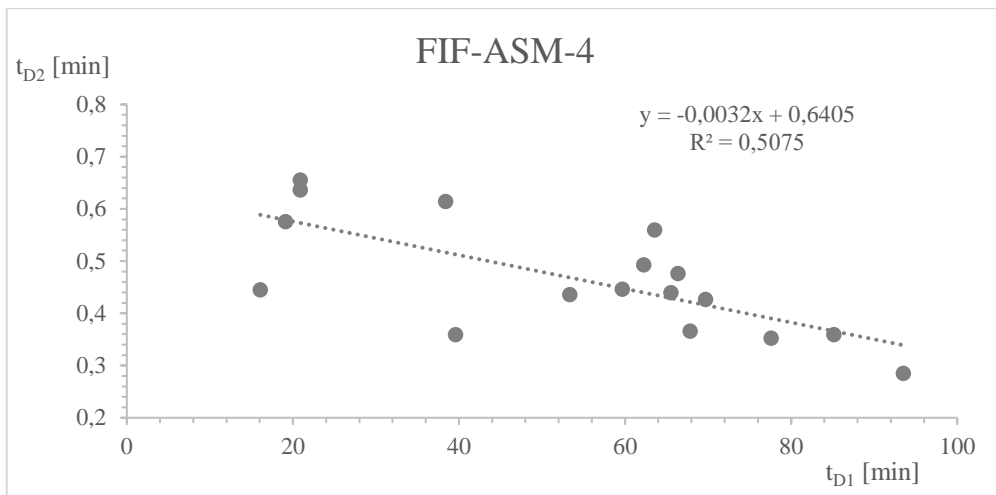
Příloha 7 Ortogonalita a korelační faktor SG-ASM-4



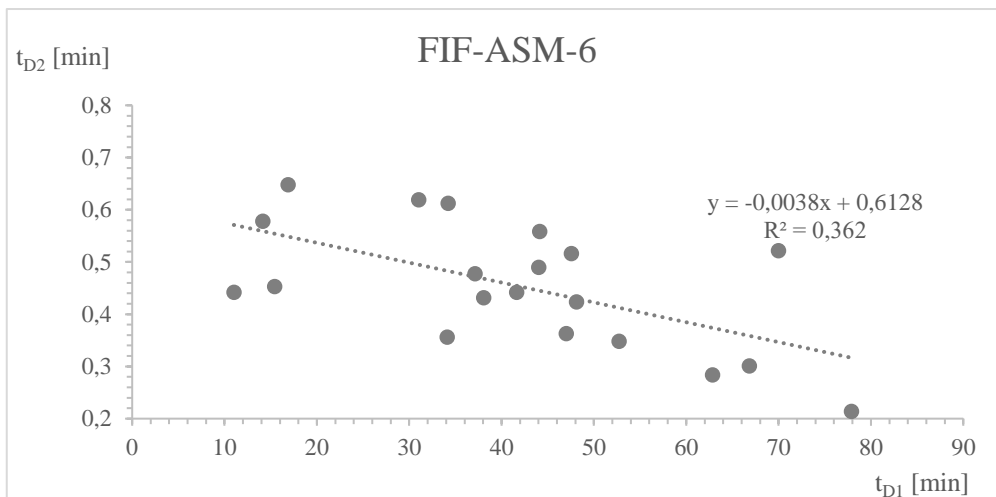
Příloha 8 Ortogonalita a korelační faktor SG-ASM-6



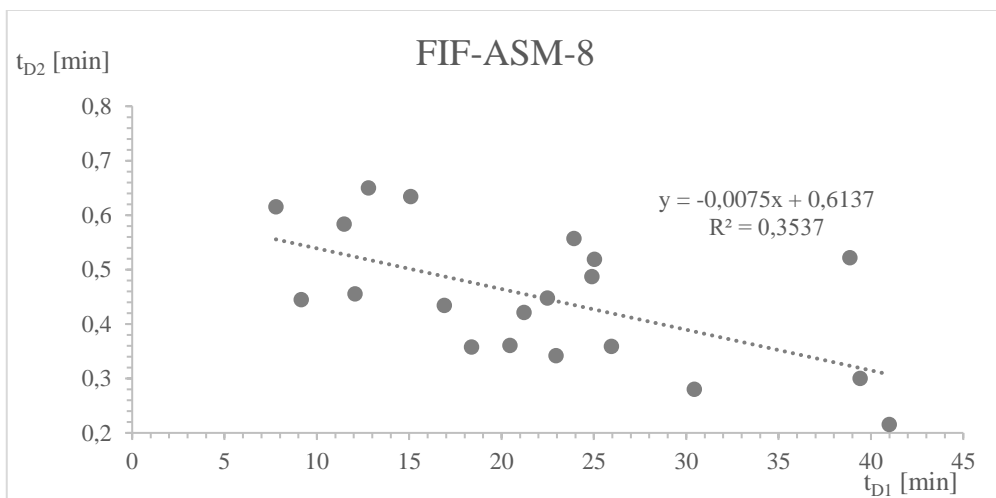
Příloha 9 Ortogonalita a korelační faktor SG-ASM-8



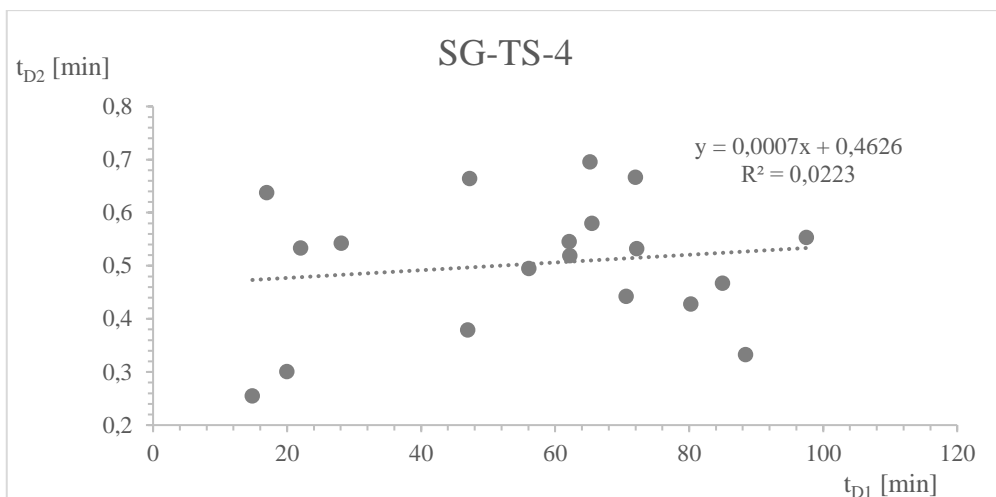
Příloha 10 Ortogonalita a korelační faktor FIF-ASM-4



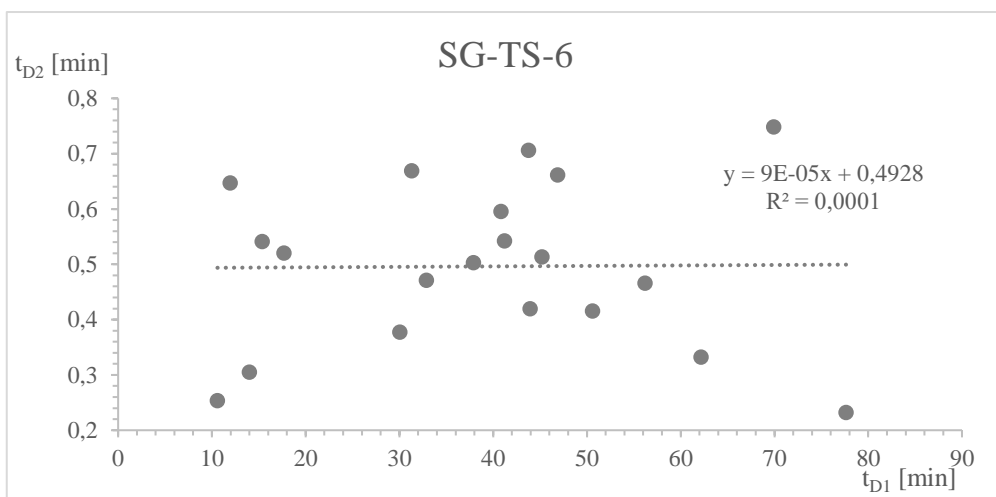
Příloha 11 Ortogonalita a korelační faktor FIF-ASM-6



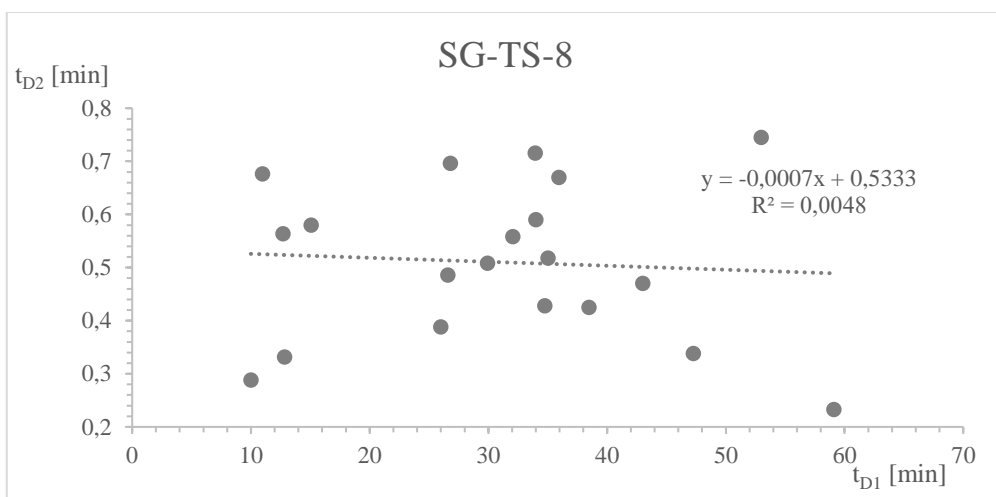
Příloha 12 Ortogonalita a korelační faktor FIF-ASM-8



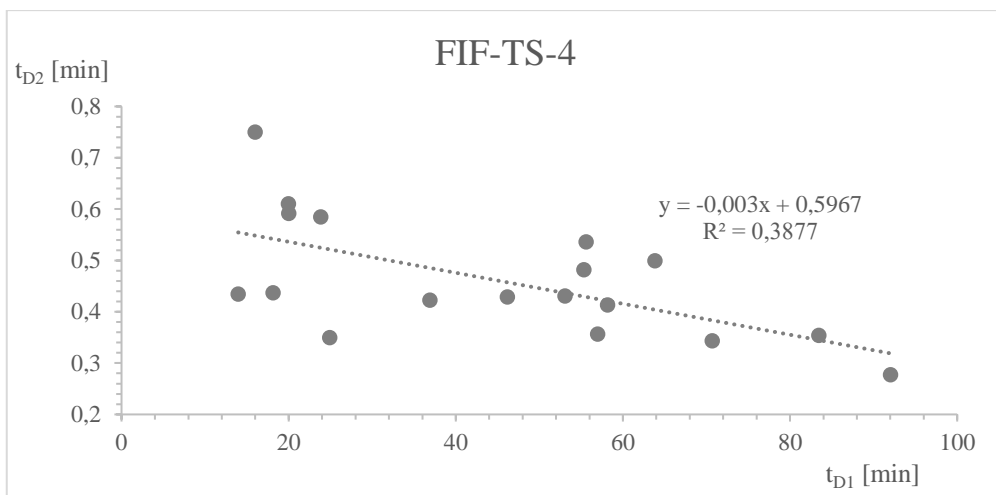
Příloha 13 Ortogonalita a korelační faktor SG-TS-4



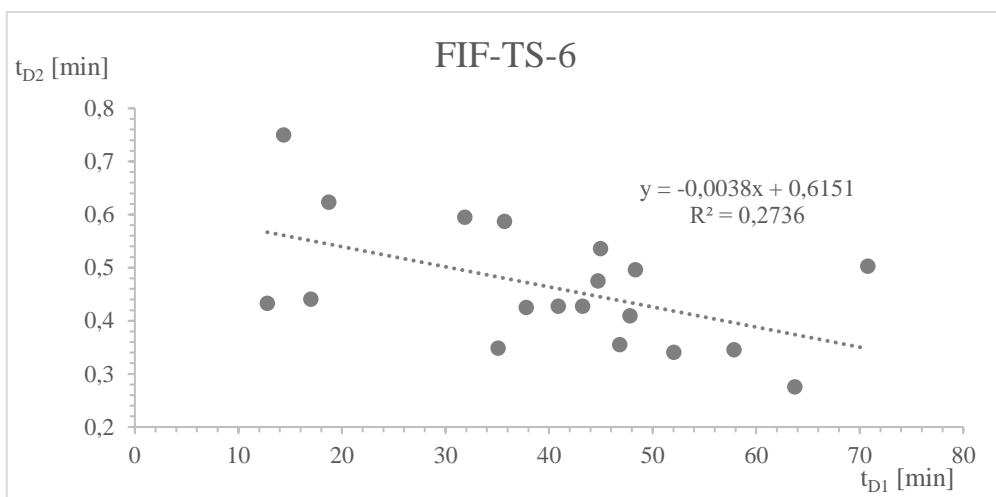
Příloha 14 Ortogonalita a korelační faktor SG-TS-6



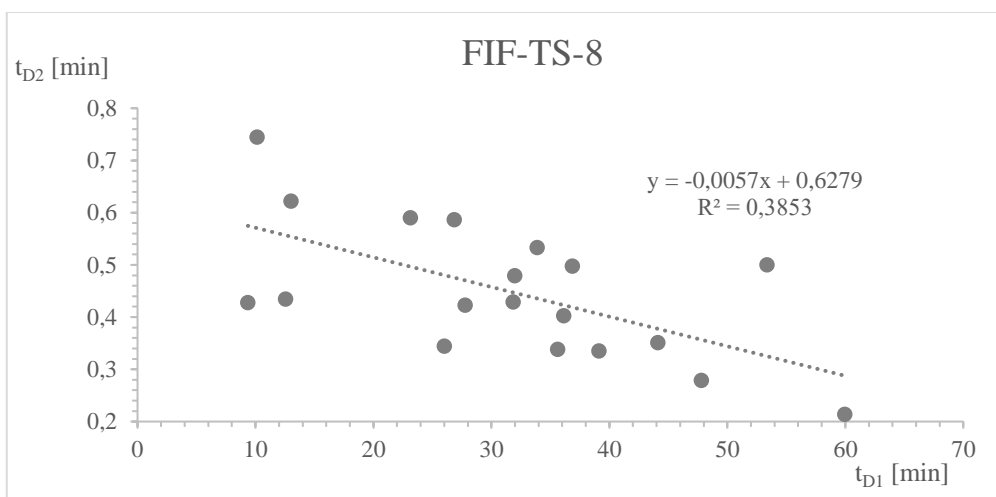
Příloha 15 Ortogonalita a korelační faktor SG-TS-8



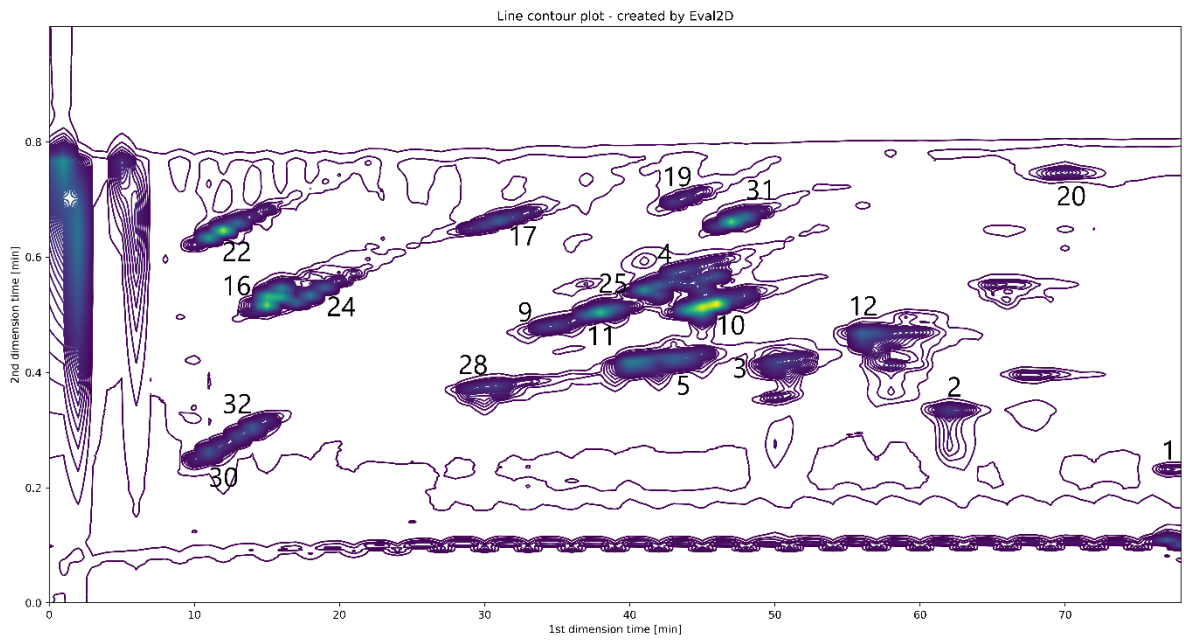
Příloha 16 Ortogonalita a korelační faktor FIF-TS-4



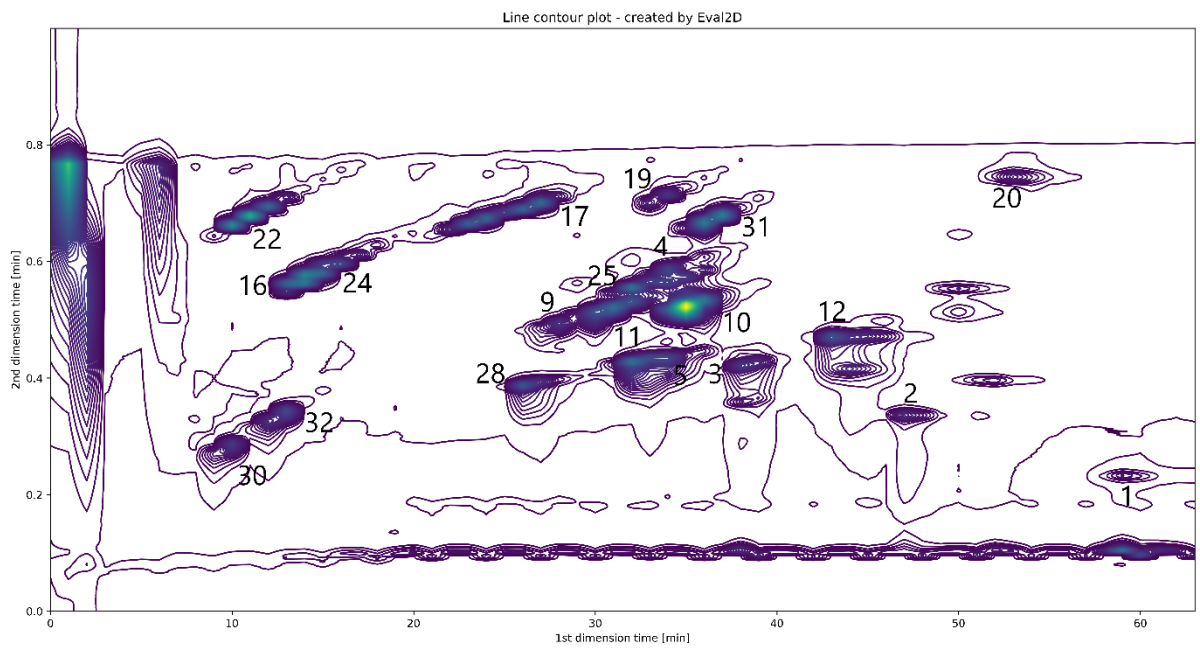
Příloha 17 Ortogonalita a korelační faktor FIF-TS-6



Příloha 18 Ortogonalita a korelační faktor FIF-TS-8



Příloha 19 Ukázka 2D chromatogramu SG-TS-6



Příloha 20 Ukázka 2D chromatogramu SG-TS-8