

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Třísmýčkový modulátor pro přenos frakcí ve dvourozměrné kapalinové
chromatografii

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Nela Adámková**
Osobní číslo: **C22332**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Třísmýčkový modulátor pro přenos frakcí ve dvourozměrné kapalinové chromatografii**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma způsoby přenosu frakcí mezi první a druhou dimenzí ve dvourozměrné kapalinové chromatografii. Zaměřte se na ředění vzorku při převodu a možnostem, jak ředění zmenšit a tím snížit mez detekce 2D-LC metody. Dále popište, jakými způsoby lze zakoncentrovat sloučeniny v elektrickém poli.
2. V experimentální části otestujte a optimalizujte použití třísmýčkového ventilu pro přenos frakcí mezi dimenzemi v 2D-LC. Vyzkoušejte zakoncentrování látek v elektrickém poli a jeho vliv na píky v druhé dimenzi.
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: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Třismyčkový modulátor pro přenos frakcí ve dvourozměrné kapalinové chromatografii jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 7.5.2025

Nela Adámková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych srdečně poděkovala svému vedoucímu práce, panu Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D., za jeho odborné konzultace, cenné rady, připomínky, velkou dávku vstřícnosti a trpělivosti. Velké poděkování patří také mé rodině, partnerovi a přátelům za jejich podporu a pomoc během celého mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá využitím dvourozměrné kapalinové chromatografie jako pokročilé separační techniky pro analýzu komplexních směsí. Práce se věnuje 2D-LC instrumentaci, metodám zakoncentrování frakcí a minimalizaci problémů při převodu frakcí mezi dimenzemi. Popsána je také fokusace pomocí elektrického proudu jako koncentrační technika pro zvýšení rozlišení a meze detekce látek. Experimentální část se zaměřuje na optimalizaci podmínek pro použití třísmyčkového modulátoru pro přenos a fokusaci frakcí z první do druhé dimenze a hodnotí vliv této fokusace na separaci ve druhé dimenzi.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dvourozměrná kapalinová chromatografie, třísmyčkový modulátor, fokusace látek v elektrickém poli

TITLE

Three loop modulator for transfer fractions in two dimensional liquid chromatography

ANNOTATION

The diploma thesis focuses on the use of two-dimensional liquid chromatography as an advanced separation technique for the analysis of complex mixtures. The 2D-LC instrumentation, methods of fraction concentration, and strategies to minimize issues during the transfer of fractions between dimensions are described in the theoretical part of the thesis. Additionally, the use of electric current-based focusing is described as a concentration technique to enhance resolution and detection limits. The experimental part is dedicated to optimizing the conditions for the use of a three-loop modulator for the transfer and focusing of fractions from the first to the second dimension and assesses the effect of focusing on the separation performance in the second dimension.

KEYWORDS

Two dimensional liquid chromatography, three-loop modulator, focousation of analytes in electric field

OBSAH

Seznam obrázků, tabulek a rovnic	9
Seznam zkratk a značek	13
ÚVOD.....	16
1 Teoretická část	17
1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
1.1.1 Píková kapacita 1D-LC.....	18
1.1.2 Typy HPLC.....	19
1.1.3 Instrumentace 1D-LC	23
1.2 Dvourozměrná kapalinová chromatografie	26
1.2.1 Typy 2D-LC.....	27
1.2.2 Píková kapacita 2D-LC.....	28
1.2.3 Ortogonalita 2D-LC.....	29
1.2.4 Kombinace chromatografických módů v 2D-LC	30
1.2.5 Problémy spojené s comprehensive 2D-LC.....	32
1.2.5.1 Nekompatibilita mobilních fází	32
1.2.5.2 Ředění analytů a podvzorkování.....	34
1.2.6 Instrumentace 2D-LC	36
1.2.6.1 Modulátory.....	38
1.2.7 Pokročilé modulační techniky	42
1.2.7.1 Aktivní modulace pomocí stacionární fáze	43
1.2.7.2 Modulace rozpouštědlem.....	44
1.2.8 Využití 2D-LC	46
1.3 Separační techniky v kapilární elektroforéze.....	47
1.3.1 Izoelektrická fokusace	50
1.3.1.1 Kapilární izoelektrická fokusace	50
<i>Pufry</i>	53

1.4	Fokusace pomocí gradientu elektrického pole.....	53
2	Experimentální část.....	56
2.1	Přístroje a zařízení	56
2.2	Chemikálie	57
2.3	Software	57
2.4	Podmínky ² D separace	57
2.5	Podmínky fokusace pomocí kapilární elektroforézy	58
2.6	Pracovní postupy.....	58
2.6.1	Příprava vzorku.....	58
2.6.2	Příprava pufrů	59
3	Výsledky a diskuse	60
3.1	Třísmýčkový modulátor.....	60
3.2	Zapojení TSM a kapilární elektroforézy.....	62
3.3	Přesun frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy	64
3.4	Vrácení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky.....	65
3.4.1	Ověření průtoku dle použitého tlaku dusíku.....	68
3.4.1.1	Čas potřebný k vrácení frakce zpět do smyčky	69
3.4.1.2	Vliv použitého rozpouštědla ve vzorku na průtok při použití tlaku dusíku..	71
3.4.2	Propojení TSM, kapilární elektroforézy a kolony druhé dimenze.....	73
3.5	Fokusace frakce pomocí kapilární elektroforézy	77
3.6	Přesunutí frakce do druhé dimenze.....	81
3.7	Změna velikosti smyčky 2	84
3.8	Nahrazení tlaku dusíku injekční pumpou	88
4	Závěr	92
5	Seznam literatury	93
6	Seznam příloh	102

Seznam obrázků, tabulek a rovnic

Obrázek 1: Instrumentace HPLC [2]	17
Obrázek 2: Vysokotlaké a nízkotlaké směšování mobilní fáze [17]	24
Obrázek 3: Schéma zapojení 2D-LC [4].....	26
Obrázek 4: Online zapojení osmicestného ventilu u 2D-LC [21]	27
Obrázek 5: Grafické znázornění typů 2D-LC [22]	28
Obrázek 6: Grafické znázornění píkové kapacity ve 2D-LC (rovnice 4) [23]	29
Obrázek 7: Ortogonalita v závislosti na typu separace v D^1 a D^2 [24].....	30
Obrázek 8: Graf kombinací HPLC módů pro 2D-LC [22].....	31
Obrázek 9: Vliv složení mobilní fáze a objem frakce z 1D na píky v 2D [27].....	33
Obrázek 10: Píky kofeinu v gradientu acetonitril:voda - 1) 5:95; 2) 10:90; 3) 15:85; 4) 25:75; 5) 35:65 [30]	35
Obrázek 11: Rozlišení v závislosti na četnosti vzorkování[33].....	36
Obrázek 12: Schéma comprehensive 2D-LC [29].....	36
Obrázek 13: Přehled použitých detekčních technik pro 2D-LC [22]	38
Obrázek 14: Osmicestný ventil jako rozhraní v 2D-LC [22].....	40
Obrázek 15: Deseticestný ventil jako rozhraní v 2D-LC v symetrickém (A) a asymetrickém (B) zapojení [38]	40
Obrázek 16: Osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma šestipolohovými ventily s 12 smyčkami [39]	41
Obrázek 17: Instrumentace se záchytnými kolonami [40]	42
Obrázek 18: Graf nejvíce používaných modulačních technik pro 2D-LC [22].....	43
Obrázek 19: Schéma modulace pomocí stacionární fáze [22].....	43
Obrázek 20: Pevná modulace rozpouštědlem [28]	44
Obrázek 21: Aktivní modulace rozpouštědlem [28].....	45
Obrázek 22: Využití ASM a jeho vliv na analýzu v 2D [28]	46
Obrázek 23: Využití 2D-LC [45].....	47
Obrázek 24: Elektroosmotický proud v kapiláře	48
Obrázek 25: Nákres kapilární elektroforézy [49]	49
Obrázek 26: Isoelektrická fokusace v kapiláře[56]	51
Obrázek 27: Kapilární isoelektrická fokusace hemoglobinu [62]	52
Obrázek 28: Princip fokusace gradientem elektrického pole	54
Obrázek 29: Schéma přístroje pro fokusaci gradientu elektrického proudu [73].....	55

Obrázek 30: Střídání jednotlivých cyklů třísmýčkového modulátoru [74]	60
Obrázek 31: Schéma TSM v pozicích 1, 2 a 3 s rozměry jednotlivých kapilár.....	61
Obrázek 32: Schéma TSM se zapojením kapilární elektroforézy a ventilem 4 (PEEK), 1: deseticestý dvoupolohový ventil, 2: dvanácticestý dvoupolohový ventil, 3: deseticestý dvoupolohový ventil, 4: osmicestý dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu (PEEK) D2: druhá dimenze	63
Obrázek 33: Fotografie reálného zapojení třísmýčkového modulátoru, 1: deseticestý dvoupolohový ventil, 2: dvanácticestý dvoupolohový ventil, 3: deseticestý dvoupolohový ventil, 4: osmicestý dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu (PEEK)	63
Obrázek 34: Závislost použitého průtoku na objemu, který přesunul frakci k okénku detektoru CE	64
Obrázek 35: Průtok čerpadla kapilární elektroforézy při tlaku 100mbar	66
Obrázek 36: Graf průtoků při tlaku 2 bar a délce kapiláry 91,04 cm (4,02 μ l)	66
Obrázek 37: Průměry průtoků při použitém tlaku 2; 3,5 a 5 bar	67
Obrázek 38: Průměrný průtok při tlaku 2 a 5 bar a objemu 1,06 a 4,04 μ l	68
Obrázek 39: Průměrné průtoky za ventilem 4 při tlaku 2 a 5 bar	69
Obrázek 40: Graf závislosti průměrného času na tlaku dusíku a vzdálenosti od zdroje tlaku dusíku	70
Obrázek 41: Graf závislosti průměrného průtoku na tlaku dusíku a vzdálenosti od zdroje tlaku dusíku	70
Obrázek 42: Měření průtoku pomocí Hamiltonovy stříkačky před detektorem HPLC.....	71
Obrázek 43: Průtok v detektoru CE a HPLC při tlaku 2 bar vzorek 10 \times ředěný ve vodě.....	72
Obrázek 44: Průtok v detektoru CE a HPLC při tlaku 2 bar vzorek 10 \times ředěný v metanolu ..	72
Obrázek 45: Chromatogram signálu fenolických kyselin v poloze TSM 3, 1 a 2 A: kyselina protokatechová, B: kyselina syringová.....	74
Obrázek 46: Plochy fenolických kyselin v poloze 1 TSM bez přesunu frakce	74
Obrázek 47: Procentuální obsah analytů v závislosti na čase působení tlaku dusíku (2 bar) v poloze 1 TSM	76
Obrázek 48: Procentuální obsah analytů v závislosti na čase působení tlaku dusíku (2 bar) v poloze 2 TSM	76
Obrázek 49: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV v čase 240 s, se zapnutým průtokem v 2 D.....	78

Obrázek 50: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV v čase 240 s	79
Obrázek 51: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV v různých časech	79
Obrázek 52: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV a čase 240 s, fokusace byla provedena v pufru o koncentraci kyseliny borité 175 mM a pH 9	80
Obrázek 53: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové 2× zředěné v pufru kyseliny borité o koncentraci 75 mM a pH 9, při aplikaci napětí -20 kV a čase 240 s	80
Obrázek 54: Přesunutí fokusované frakce do ² D, zapnutý průtok v ² D.....	81
Obrázek 55: Chromatogram odezvy detektoru pro vzorek fenolických kyselin bez kolony a bez fokusace v polohách TSM 1 a 2	82
Obrázek 56: Plochy odezvy fenolických kyselin v ² D v poloze 1 a 2 TSM bez provedení fokusace	83
Obrázek 57: Plochy odezvy fenolických kyselin v ² D v poloze 1 a 2 TSM s fokusací.....	83
Obrázek 58: Procentuální obsah fenolických kyselin v závislosti na čase působení tlaku dusíku (2 bar) v poloze 1 a 2 TSM.....	85
Obrázek 59: Fokusace frakce při použití menší smyčky 2 (3,85 μl), čas fokusace 240 s. napětí -20 Kv.....	86
Obrázek 60: Plocha odezvy frakce v ² D bez aplikace napětí, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μl, čas 60 s aplikace tlaku dusíku 2 bar	87
Obrázek 61: Plocha odezvy frakce v ² D s fokusací na ose x je proud během fokusace, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μl, čas 60 s aplikace tlaku dusíku 2 bar.....	87
Obrázek 62: Plocha odezvy frakce v ² D s fokusací na ose x je proud během fokusace, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μl, čas 50 s aplikace tlaku dusíku 2 bar.....	88
Obrázek 63: Schéma zapojení TSM s dvěma injekčními pumpami.....	89
Obrázek 64: Reálné zapojení TSM s dvěma injekčními pumpami, 1: deseticestný dvoupolohový ventil, 2: dvanácticestný dvoupolohový ventil, 3: deseticestný dvoupolohový ventil, 4: osmicestný dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu (PEEK).....	89
Obrázek 65: Plocha odezvy fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 8 μl	90
Obrázek 66: Plocha odezvy fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 7,5 μl	91

Tabulka 1: Přehled typů HPLC [10]	23
Tabulka 2: Přehled detektorů HPLC [14]	25
Tabulka 3: Srovnání rozdílný módů pro LC×LC [3]	32
Tabulka 4: Parametry pro separaci v první a druhé dimenzi [3]	37
Tabulka 5: Přehled modulačních časů LCxLC [3]	39
Tabulka 6: Podmínky při fokusaci v kapilární elektroforéze	58
Rovnice 1: Výpočet píkové kapacity pro izokratickou eluci	18
Rovnice 2: Výpočet píkové kapacity pro gradientovou eluci 1	18
Rovnice 3: Výpočet píkové kapacity pro gradientovou eluci 2	18
Rovnice 4: Výpočet celkové píkové kapacity pro 2D-LC	29
Rovnice 5: Výpočet času působení dusíku při tlaku 2 bar	77
Rovnice 6: Výpočet času působení tlaku dusíku pro menší smyčku o objemu 3,85 μ l	86

Seznam zkratek a značek

- ¹D první dimenze
- 1D-LC jednodimenzionální kapalinová chromatografie (One Dimensional Liquid Chromatography)
- ²D druhá dimenze
- 2D-LC dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (Two Dimensional Liquid Chromatography)
- AgC argentační chromatografie (Argentation Chromatography)
- CE kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
- CEC kapilární elektrochromatografie (Capillary Electrochromatography)
- CGE kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis)
- CIEF kapilární isoelektrická fokusace (Capillary Isoelectric Focusing)
- CITP kapilární izotachoforéza (Capillary Isotachophoresis)
- CZE kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
- DAD detektor diodového pole (Diode Array Detector)
- EFGF fokusace gradientem elektrického pole (Electric Field Gradient Focusing)
- EOF elektroosmotický tok (Electroosmotic Flow)
- HIC chromatografie hydrofobních interakcí (Hydrophobic Interaction Chromatography)
- HILIC chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
- HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
- I* elektrický proud
- IEC iontově výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography)
- IEF isoelektrická fokusace (Isoelectric Focusing)

k_f retenční faktor prvního píku (retention Factor of First peak)

k_l retenční faktor posledního píku (retention Factor of Last peak)

l délka

LC-LC dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (single heartcutting)

LC×LC dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (comprehensive)

LCCC kapalinová chromatografie za kritických podmínek (Liquid Chromatography at Critical Conditions)

MEKC micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar Electrokinetic Chromatography)

mLC-LC dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (multiple heartcutting)

MS hmotnostní spektrometr (Mass Spectrometry)

n počet měření

N počet pater

n_c píková kapacita

NP chromatografie na normálních fázích (Mass Spectrometry)

P tlak dusíku

PEEK polyetheretherketon

PEG polyethylene glykol

pI isoelektrický bod

protokat. kyselina protokatechová

Q průtok

RID refraktometrický detektor (Refractive Index Detector)

RP chromatografie na reverzních fázích (Reversed Phase Chromatography)

SAX aniont-výměnná chromatografie (Strong Anion Exchange)

SCX kationt-výměnná chromatografie (Strong Cation Exchange)

SEC velikostně vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography)

sLC×LC dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (selective comprehensive)

syring. kyselina syringová

t čas

t_f retenční čas prvního píku (retention Time of First peak)

$t_{fok.}$ čas fokusace

t_g čas gradientu (gradient time)

t_l retenční čas posledního píku (retention Time of Last peak)

t_{N_2} čas aplikace dusíku

TSM Třismyčkový modulátor

UV-VIS detektor ultrafialového a viditelného spektra (Ultraviolet–Visible Detector)

V objem

\bar{w} průměrná šířka píku

WAX slabá aniontová výměna (Weak Anion Exchange)

WCX slabá kationtová výměna (Weak Cation Exchange)

ΔQ rozdíl průtoků

ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nepostradatelnou součástí moderních analytických metod. V současné době se neustále snižují meze detekce metod a je proto nedostačující k rozdělení složitých směsí obsahující stovky sloučenin. Z tohoto důvodu se dostává do popředí dvourozměrná kapalinová chromatografie, která využívá k rozdělení dva rozdílné separační mechanismy. Díky tomuto uspořádání je možné dosáhnout mnohem vyšší píkové kapacity než v jednorozměrné kapalinové chromatografii, což nám umožňuje získat komplexnější obraz o složení vzorku.

Ve dvourozměrné kapalinové chromatografii se používají stejné základní prvky jako v jednorozměrné kapalinové chromatografii, s výjimkou modulátoru. Modulátor plní funkci převodu frakcí z první do druhé dimenze. Existuje celá řada modulátorů, které se používají pouze pro přenos frakcí tzv. pasivní modulace. Mimo to jsou známé také modulační techniky, které umožňují upravovat frakce během přenosu mezi dimenzemi. Tyto modulační techniky se snaží především vyřešit problémy spojené s použitím dvou rozdílných separačních mechanismů. Mezi tyto problémy patří například nekompatibilita mobilních fází v první a druhé dimenzi, nadměrné ředění frakce při převodu mezi dimenzemi nebo nedostatečné vzorkování frakce druhou dimenzí, což vede ke ztrátě rozlišení. Tyto problémy lze většinou vyřešit pomocí aktivní modulace. Nadměrné ředění frakce je možné vyřešit pomocí zakoncetrování frakce před nadávkováním do druhé dimenze. Možnost zakoncetrování frakce nabízí tzv. třismyčkový modulátor. Tento typ modulátoru umožňuje díky třem smyčkám současně plnění první smyčky frakcí z první dimenze, zakoncetrování frakce v druhé smyčce a dávkování zakoncetrované frakce do druhé dimenze.

Velmi slibný způsob, jak zakoncetrovat látky nabízí fokusace pomocí elektrického proudu. Fokusace rozdělí jednotlivé látky do vysokých a úzkých zón, což zvrátí ředění frakce a umožní detekovat i takové látky, které by bez použití fokusace nebylo možné detekovat. Fokusaci lze provést pomocí metod jako je isoelektrická fokusace, kapilární elektroforéza nebo fokusace gradientem elektrického pole.

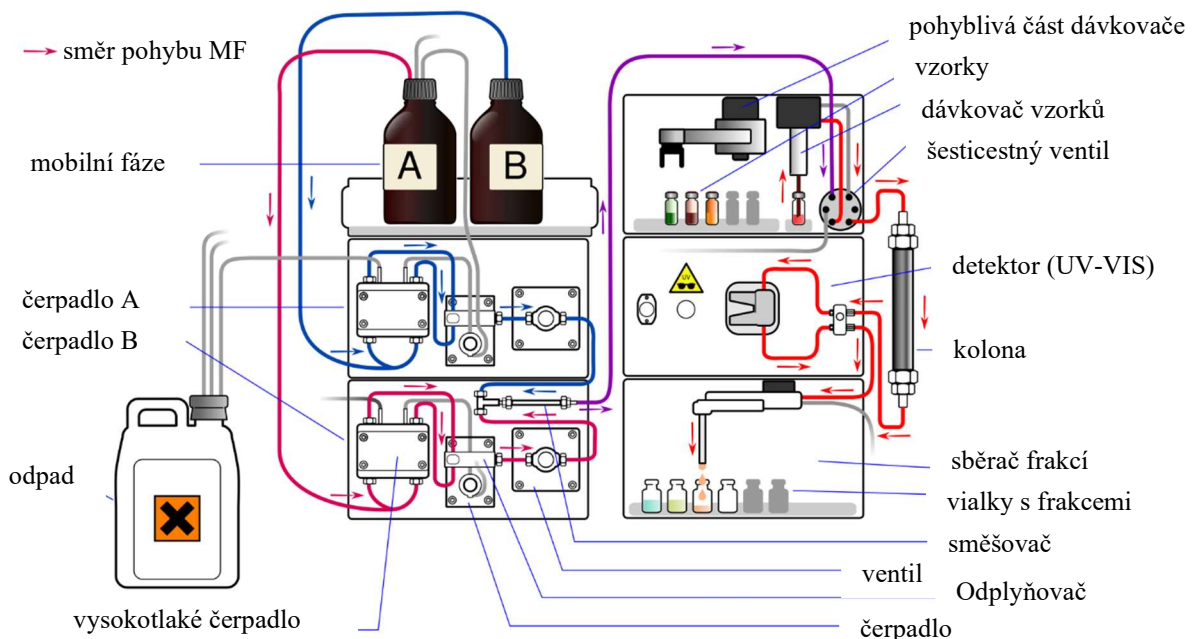
Tato práce se zabývá optimalizací parametrů pro fokusaci frakce a její přesun do druhé dimenze pomocí třismyčkového modulátoru. Dále je zde snaha o porovnání přínosu fokusace pro analýzu v druhé dimenzi.

1 Teoretická část

1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nepostradatelnou součástí moderních analytických metod, a jelikož separace látek probíhá pouze na jedné chromatografické koloně, bude v této práci nazývána jako jednodimenzionální (jednorozměrná) kapalinová chromatografie (1D-LC). HPLC je vhodná pro analýzy léčiv, potravin, látek z těžkého průmyslu a dalších [1].

Obrázek 1 znázorňuje schéma vysokoučinné kapalinové chromatografie. Schéma začíná u mobilní fáze, kterou tvoří dvě různé láhve označené jako A a B obsahující různá rozpouštědla. Před vstupem do čerpadla dochází k odplynění mobilní fáze v odplyňovači, což zabraňuje tvorbě bublinek a zlepšuje přesnost měření. Rozpouštědla (A, B) se poté smíchají ve směšovači v požadovaném poměru dle použité metody. Tato rozpouštědla jsou pomocí čerpadel přečerpávána do systému při vysokém tlaku, který zajišťuje vysokotlaká pumpa, umožňující stabilní a konzistentní tok mobilní fáze [2].



Obrázek 1: Instrumentace HPLC [2]

Dávkovač vzorků, také známý jako „autosampler“, umožňuje umístit přesně definovaný objemu vzorku do toku mobilní fáze. Vzorek je veden přes šesticestný ventil, který dávkuje vzorek do mobilní fáze a je tak unášen do separační kolony. V koloně dochází k separaci jednotlivých složek vzorku na základě jejich rozdílných interakcí se stacionární fází. Oddělené složky jsou následně detekovány detektorem a signál z detektoru je zaznamenán v počítači.

Ze signálu se vytvoří chromatogram, který nám poskytne informace o složení vzorku. V případě preparativní HPLC mohou být složky zachyceny pomocí sběrače frakcí. Nevyužité složky mobilní fáze jsou odváděny do odpadu [2].

1.1.1 Píková kapacita 1D-LC

Píková kapacita je parametr pomocí kterého lze určit efektivitu separace. Píkovou kapacitu, n_c , definujeme jako největší počet rovnoměrně rozdělených píků, které je možné rozdělit v průběhu jedné chromatografické separace, jež se bere jako časový rozdíl mezi posledním a prvním píkem [3—4]. Píková kapacita pro izokratickou eluci (analýza během které se nemění složení mobilní fáze) lze vypočítat dle rovnice 1 [5].

Rovnice 1: Výpočet píkové kapacity pro izokratickou eluci

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{k_l + 1}{k_f + 1} \right)$$

Kde N je počet pater kolony, k_f a k_l jsou retenční faktory prvního a posledního eluujícího píku. Izokratická eluce má poměrně nízkou píkovou kapacitu, neboť s rostoucím časem separace dochází k rozmývání elučních zón tedy rozšiřování píků [5]. Z tohoto důvodu je výhodnější používat gradientovou eluci (zvyšování eluční síly s časem), při které rozšiřování píků není tak markantní. Gradient může být teplotní nebo pomocí postupné změny složení mobilní fáze. Píkovou kapacitu pro gradientovou eluci vypočteme dle následujících rovnic 2 a 3 [6].

Rovnice 2: Výpočet píkové kapacity pro gradientovou eluci 1

$$n_c = \frac{t_l - t_f}{\bar{w}}$$

Rovnice 3: Výpočet píkové kapacity pro gradientovou eluci 2

$$n_c = 1 + \frac{t_g}{\bar{w}}$$

V rovnicích 2 a 3 znamená \bar{w} průměrnou šířku píku (definuje se také jako čtyřnásobek standardní směrodatné odchylky píku), t_g je čas gradientu, t_l a t_f jsou retenční časy posledního a prvního píku chromatogramu. Píkovou kapacitu, tedy ovlivňuje hlavně čas gradientu a šířka píku. Pro zlepšení píkové kapacity je možné zvýšit čas gradientu, zvýšit účinnost kolony nebo se pokusit zamezit rozmývání píků pomocí vhodnější kolony a podmínek separace [6].

David Giddings v roce 1967 představil statistický model překrývání píků (Statistical Model of Overlap – SMO), který poskytuje teoretický základ pro nedostačující schopnost rozdělit

vícesložkové směsi při jednorozměrné separaci. Z této teorie vyplývá, že jednorozměrná chromatografie často není dostatečně účinná k rozdělení většího množství sloučenin, protože píková kapacita bývá příliš nízká. Ze statistického modelu překrývání vyplývá, že při separaci 100 látek pomocí jednorozměrné separace s píkovou kapacitou 100 a časem separace 30 minut bude průměrně pozorováno pouze 37 píků. Z těchto 37 pozorovaných píků bude odpovídat jedné látce jen 18 píků. Ostatní sloučeniny budou různě koeluovat [7].

Pokud je počet separovaných složek vyšší než 10-20 dochází častěji k překrývání píků, což zhoršuje schopnost rozlišit a identifikovat složky směsi. Také velké rozdíly v koncentracích jednotlivých složek směsi zhoršují rozlišení, z tohoto důvodu je lepší analyzovat složky o podobné koncentraci nebo zvýšit píkovou kapacitu analýzy [7].

Teorie SMO ukazuje, že k účinné separaci složitých směsí je nutná vysoká píková kapacita. V jednorozměrné kapalinové chromatografii (1D-LC) s tlakem do 600 bar je obtížné dosáhnout píkové kapacity vyšší než 500 u peptidových směsí a 200–300 u menších molekul s běžnou dobou analýzy (30–60 minut) [7].

Statistický model překrývání podporuje použití dvourozměrných separací ke zvýšení píkové kapacity, protože umožňují dosáhnout mnohem vyšších hodnot potřebných pro efektivní rozlišení složitých směsí [7].

1.1.2 Typy HPLC

Kapalinovou chromatografii můžeme rozdělit dle principu separace. Nejčastěji se rozlišuje chromatografie na normální fázi a na reverzní fázi, další dělení dle principu separace je popsáno níže. Chromatografie na normální fázi (NP) používá polární stacionární fáze, nejčastěji silikagel nebo oxid hlinitý, s nepolární nevodnou mobilní fází (toluen, hexan). Je vhodná pro látky nepolární, a tedy nerozpustné ve vodě, nejméně polární látky budou eluovat nejrychleji, zatímco polárnější látky opustí kolonu mnohem později [7–9].

Chromatografie na reverzní fázi (RP) je pravým opakem normální fáze. Stacionární fáze je nepolární (modifikovaný silikagel např. oktadecylem) a mobilní fáze je polární (ultra čistá voda, acetonitril, metanol). Chromatografie na reverzní fázi se stala velmi používanou pro schopnost rozdělit sloučeniny rozpustné ve vodě a polárních rozpouštědlech, také pro dostupnost velkého množství kolon a mobilních fází [7–9].

Dalším typem HPLC je hydrofobní interakční chromatografie (HIC). Jedná se o chromatografickou techniku používanou k purifikaci biomolekul, zejména proteinů.

Funguje na principu snižování rozpustnosti hydrofobních oblastí proteinů ve vodném prostředí při vysoké koncentraci solí, což vede k jejich vazbě na hydrofobní stacionární fázi. Eluce probíhá postupným snižováním koncentrace solí, což umožňuje šetrnou separaci biomolekul při zachování jejich nativní struktury. Její selektivita je oproti RP-LC rozdílná, což činí tuto techniku atraktivní pro 2D-LC. Nicméně HIC není moc vhodná pro 2D-LC, protože vyžaduje pomalé gradienty solí [10—11].

HILIC chromatografie neboli chromatografie hydrofilních interakcí je typ chromatografie, kde se používá polární stacionární fáze (např. silikagel) v kombinaci s mobilní fází obsahující organickou složku (nejčastěji více než 50 % acetonitrilu) a vodu. Velmi často se využívá gradient, který začíná na 95 % acetonitrilu a 5 % vody a postupně se zvyšuje obsah vody v mobilní fází, což umožňuje rozdělení i silně zadržovaných látek. HILIC chromatografie umožňuje vyplnit mezeru mezi nevodnou chromatografií na normálních fázích a vodnou chromatografií s reverzní fází [12].

Iontově-výměnná chromatografie představuje separační techniku využívající elektrostatické interakce mezi ionty analyzované látky a nabitými funkčními skupinami navázanými na stacionární fázi. Kationt-výměnná chromatografie (SCX) zachytává kationty na negativně nabitých místech stacionární fáze, zatímco aniont-výměnná chromatografie (SAX) váže anionty na kladně nabitě funkční skupiny. Účinnost separace je ovlivněna nábojem a velikostí iontů. Čím vyšší je náboj a menší poloměr, tím silnější je vazba. K uvolnění zachycených iontů dochází změnou parametrů mobilní fáze, například úpravou pH, zvýšením koncentrace konkurenčních iontů nebo změnou teploty. Tato metoda se nejčastěji uplatňuje v analýze vody, farmaceutickém průmyslu, biochemii či potravinářství, kde se využívá k separaci sacharidů, proteinů a dalších iontových složek, také je vhodná pro analýzu aminokyselin a biologických vzorků [9].

Ve vylučovací chromatografii (SEC) je stacionární fáze tvořena sférickými, porézními částicemi, které umožňují oddělování molekul dle jejich velikosti. Aby se minimalizovaly možné interakce mezi analytem a kolonou, jsou všechny komponenty inertní. Často se používají povrchové modifikace, například derivatizace s hydrofilními silany nebo funkčními skupinami (dioly). V běžné SEC se používají velké kolony (např. 300×8 mm) naplněné částicemi o velikosti 5 μm při nízkých průtocích a tlacích, z těchto důvodů analýza trvá 25—40 minut. Jako mobilní fáze se používají pufrы s pH mezi 6,2 a 7,5, přičemž nejběžněji se používá fosfátový pufr (50—200 mM).

Dále se často přidává značné množství solí, jako KCl nebo NaCl (200—400 mM), aby se omezily nežádoucí elektrostatické interakce mezi analytem a materiálem kolony [13].

Chirální chromatografie se zaměřuje na separaci enantiomerů na základě jejich odlišné afinity k chirální stacionární fázi nebo využívá chromatografii na normální či reverzní fázi s mobilní fází obsahující chirálně selektivní aditiva. Chromatografie využívající stacionární fázi obsahující jeden enantiomer chirální sloučeniny, umožňuje selektivní zachycení a oddělení enantiomerů. Chirální stacionární fáze je obvykle připravena navázáním chirální sloučeniny na povrch achirální látky jako silikagel, čímž vzniká chirální stacionární fáze. Tato metoda je vhodná pro separaci optických izomerů. [8, 14]

Argentační chromatografie (Ag-LC), představuje specifickou formu normální fázové chromatografie. Její princip spočívá v použití silikagelu, který slouží jako stacionární fáze a je chemicky modifikována vodným roztokem dusičnanu stříbrného. Pro eluci analytů se používá organická mobilní fáze, obvykle s přidavkem malého množství polárního rozpouštědla. Klíčem k selektivní retenci látek je vznik π - π interakcí mezi dvojnými vazbami v nenasycených molekulách analyzovaných sloučenin a přítomnými ionty stříbra na stacionární fázi. Díky této interakci je separace primárně založena na rozdílech v počtu a poloze dvojných vazeb v molekulách, což činí z Ag-LC účinnou metodu hlavně pro analýzu lipidů [10].

Iontová párová chromatografie (IPC) je analytická metoda, která využívá lipofilní ionty (iontová párová činidla) k separaci rozpuštěných organických a anorganických iontových látek na kolonách s reverzní fází. Tato metoda funguje na principu dynamické modifikace povrchu stacionární fáze s reverzní fází adsorpcí hydrofobních iontů z mobilní fáze. Zásadní pro kontrolu náboje analyzovaných látek a selektivity je pH mobilní fáze spolu s koncentrací iontového párového činidla. IPC se využívá pro mnoho aplikací s organickými a anorganickými ionty, neutrálními látkami nebo amfionty. K separaci se používají různé typy stacionárních fází v závislosti na povaze separovaných složek, převážně se jedná o alkyly navázané na silikagelu (C18, C8), ale i specializované fáze jako C30, fenyl-hexyl, C12 s polární skupinou nebo grafitizované uhlíkové stacionární fáze k analýze aminoalkoholů [15].

Afinitní chromatografie je separační technika, která využívá vysoce specifické chemické interakce mezi chromatografickým selektorem a složkami vzorku. Nejčastěji se jako imobilizované vazebné látky používají proteiny, například protilátky rozpoznávající specifické peptidové sekvence nebo receptory v biologických systémech. Afinitní chromatografie může být zaměřena buď na izolaci specifických složek vzorku (např. zachycení protilátek pomocí

proteinů) nebo na studium síly vazebné interakce mezi imobilizovaným ligandem a analytem. Tato metoda se běžně provádí v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí, avšak pro hmotnostní spektrometrii (MS) mohou být použity i alternativní pufrы. Přestože afinitní chromatografie je pomalá a nejčastěji se používá jako první separační rozměr, pokroky v monolitické afinitní chromatografii naznačují její budoucí potenciál pro rychlejší analýzy i v rámci dvourozměrné chromatografie (LC×LC) [10].

V následující tabulce 1 jsou shrnuty typy HPLC zmíněné v této kapitole. Je zde popsáno, pro jaké látky jsou jednotlivé typy selektivní a jaké se používají stacionární fáze.

Tabulka 1: Přehled typů HPLC [10]

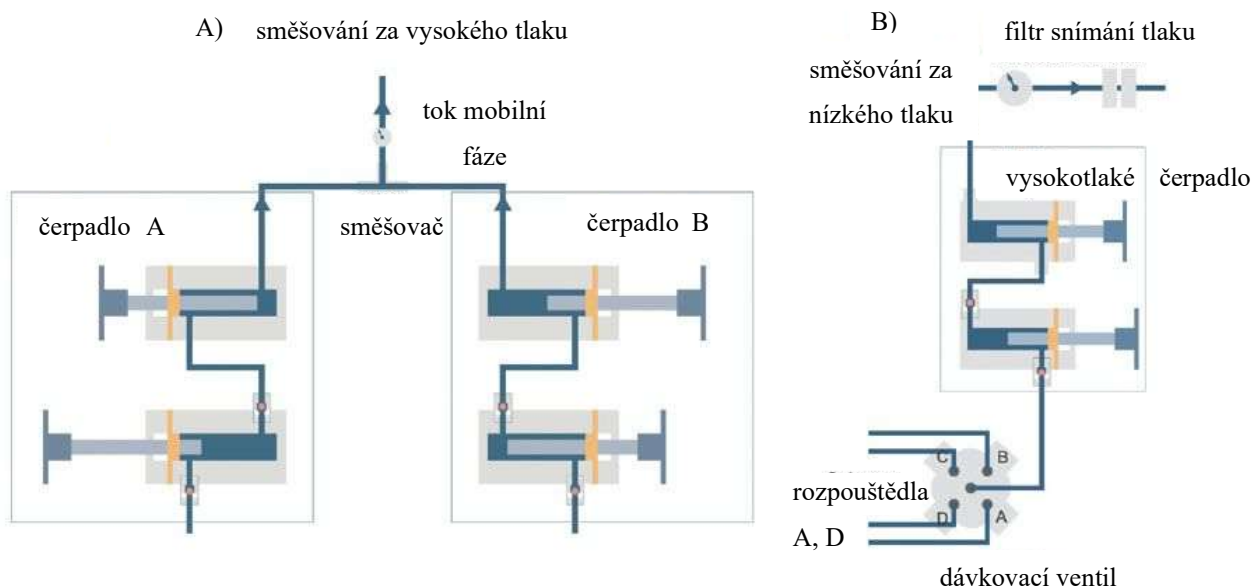
Mechanismus	Zkratka	Selektivita	Stacionární fáze
Normální fáze	NP	Polarita, funkční skupiny	oxid křemičitý (silika), amino propyl, dioly
Reverzní fáze	RP	Hydrofobní, délka řetězce, uhlíkový řetězec	alkyl (uhlovodík: C1 až C30; nejčastěji C18), uhlíkem potažený zirkon (nebo grafitovaný uhlík), PEG.
Hydrofobní interakce	HIC	Hydrofobní	krátké řetězce alkylových uhlovodíků (C4 až C8)
Hydrofilní interakce	HILIC	Hydrofilní, polární charakter	zwitteriontové: sulfobetain, fosfokolin; Základní: amino propyl; neutrální: diol, amid
Iontově výměnná	IEC	Náboj, iontové interakce	SCX: sulfonová kyselina; WCX: karboxylová kyselina; WAX: triethylamin; a SAX: kvartérní amoniová sůl
Vylučovací	SEC	Molekulová velikost a hmotnost	porézní kuličky (styren – divinylbenzen) či metakrylát (organická rozpouštědla); Polární porézní oxid křemičitý (vodné prostředí)
Chirální	Chirální	Selektivita na základě chiraloty	polysacharidové deriváty (chirální karbamát/benzoátové polymery celulózy a amylozy)
Argentační	AgLC	Stupeň nasycení, cis-trans izomery	IEC kolony (např. sulfonová kyselina) nebo oxid křemičitý (silika) nasycený ionty stříbra
Iontová párová	IP	Hydrofobní, potlačení ionizace analytu	alkyl (uhlovodík)
Afinitní		Selektivita na základě specifické afinity	stacionární fáze s chemicky vázanými antigeny nebo proteiny

1.1.3 Instrumentace 1D-LC

Instrumentace HPLC obsahuje základní prvky, které se objevují i ve dvourozměrné kapalinové chromatografii. Systém se skládá z čerpadla, automatického dávkovače, termostatu, kolony a detektoru. Před pumpou bývá ještě zařízení pro úpravu mobilní fáze (odplyňovač mobilní fáze, toto zařízení má za úkol zbavit mobilní fázi plynů) [16].

Klíčovým článkem chromatografu je čerpadlo mobilní fáze. Pro zajištění optimálního výkonu v kapalinové chromatografii by vhodné čerpadlo mělo splňovat několik důležitých parametrů,

a to stabilní průtok, nízkou úroveň pulzace, vysokou odolnost vůči chemikáliím (složení mobilní fáze) a odolnost vůči tlaku (až 1300 bar). V současnosti se nejčastěji používají dvě pístová vysokotlaká čerpadla, která mohou být uspořádána paralelně nebo sériově. Tato čerpadla poskytují konstantní průtok, vysoký tlak a minimální pulzaci, což je zásadní pro dosažení přesných a stabilních výsledků v HPLC. Zapojení čerpadel lze rozdělit na směšování za vysokého tlaku (obrázek 2 A) a směšování za nízkého tlaku (obrázek 2 B) [17].



Obrázek 2: Vysokotlaké a nízkotlaké směšování mobilní fáze [17]

Dalším nezbytným prvkem chromatografu je automatický dávkovač neboli „autosampler“. V současnosti jsou k dispozici různé typy, které zajišťují automatizované a přesné dávkování vzorků do systému. Mezi nejběžnější patří dávkovače s mechanismem „push-to-fill“ a „needle-in-loop“. Typ „push-to-fill“ se dále dělí na „pushed-loop“ kdy se odebere vzorek pomocí jehly spojené s kapilárou, poté se naplní vzorkovací smyčka a otočí se ventil který umožní nadávkovat vzorek na kolonu. Druhý typ „push-to-fill“ se konkrétně nazývá „pulled-loop“ v tomto případě jehla nasaje vzorek přímo do vzorkovací smyčky a poté se přepne ventil a přenesou se vzorek na kolonu. Naproti tomu typ „needle-in-loop“ má jehlu spojenou přímo se vzorkovací smyčkou a na jedné straně smyčky je jehla a na druhé dávkovací zařízení pomocí něj je vzorek nadávkován na kolonu. Moderní dávkovače musí splňovat včetně vysoké přesnosti a reprodukovatelnosti objemu dávkovaného vzorku, také schopnost dávkovat malé objemy a zajistit minimalizaci kontaminace mezi vzorky. Dalším důležitým aspektem je kompatibilita s různými typy vzorků, stejně jako schopnost pracovat s velkým počtem vzorků v rámci jedné analýzy. Tyto vlastnosti významně zvyšují efektivitu analýz [18].

Vzorek je nadávkován na kolonu umístěnou v termostatu, jež pomáhá udržovat během separace danou teplotu, případně teplotní gradient. Teplota hraje během separace velmi důležitou roli, neboť ovlivňuje rychlost a efektivitu separace a také rozlišení a tvar píků. Používání příliš vysokých teplot může vést k rozpadu analytů, kolony a přetěžování instrumentace, proto je důležité volit teplotu v závislosti na použitém vybavení a analyzovaném vzorku [19].

Hlavním prvkem chromatografu je kolona, na níž separace vzorků probíhá. Kolony jsou trubice většinou z nerezové oceli s délkou 3–30 cm s vnitřním průměrem 2–10 mm. Kolony obsahují částice, které jsou většinou velikostně v rozmezí 1,5–5 μm , dále se uvádí velikost pórů částic (100–1000 \AA).

Eluát z kolony je dále veden do detektoru, který zaznamenává změny signálu. Díky detektoru jsme schopni určit o jaké látce se jedná (kvalitu) a jejich obsah ve vzorku (kvantitu). Detektor by měl mít stabilní signál, široký lineární rozsah a neměl by reagovat na složky mobilní fáze či její gradient. V tabulce 2 je přehled nejčastěji používaných detektorů v HPLC a jejich lineární rozsah, maximální citlivost a další. Některé detektory jsou selektivní, což znamená, že poskytují odezvu jen pro specifickou vlastnost analytů. Například UV-VIS (detektor pro Ultrafialovou a viditelnou oblast) poskytuje odezvu pro látky, které absorbují při konkrétní vlnové délce [8–9, 14].

Tabulka 2: Přehled detektorů HPLC [14]

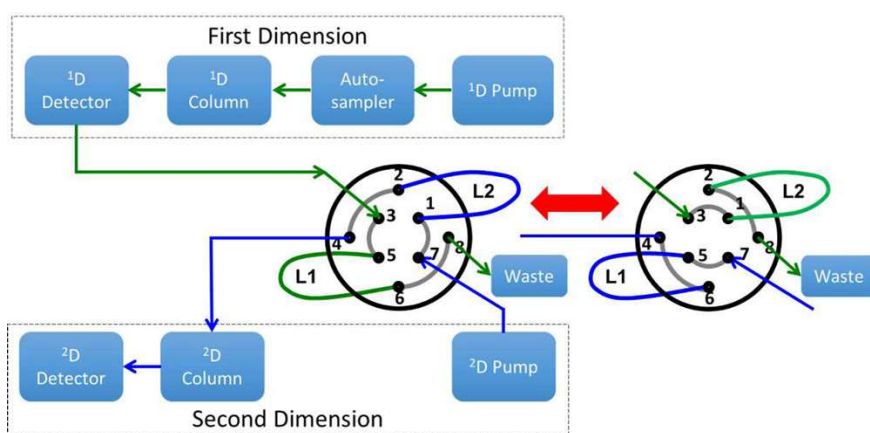
Detektor	Typ	Gradient	Lineární rozsah	Max. citlivost [g/ml]	Citlivost na změny
UV-VIS	selektivní	ano	$10^3\text{--}10^5$	$10^{-9}\text{--}10^{-10}$	tlak (teplota)
Detektor s diodovou mřížkou (DAD)	selektivní	ano	$10^3\text{--}10^4$	$<2 \times 10^{-5}$	průtok, tlak
Refraktometrický detektor (RI)	univerzální	ne	$10^3\text{--}10^4$	10^{-7}	teplota, tlak
Fluorescenční a fosforescenční detektor	selektivní	ano	$10^2\text{--}10^4$	$<10^{-9}$	průtok (teplota)
Detektor s odpařovacím rozptylem světla (ELSD)	univerzální*	afno	$10^2\text{--}10^4$	10^{-8}	průtok
Amperometrický detektor	selektivní	ne	10^6	10^{-12}	průtok, teplota
Coulometrický detektor	selektivní	ne	10^6	10^{-12}	průtok, teplota
Hmotnostně selektivní detektor (MS)	univerzální	ano	$10^2\text{--}10^4$	$<10^{-9**}$	průtok

*...univerzální pouze pro netěkavé látky, **...[g/s]

1.2 Dvourozměrná kapalinová chromatografie

Standardně používaná jednorozměrná kapalinová chromatografie (1D-LC) může dosahovat píkovej kapacity až 500, ale jedná se o výjimečné případy [6]. Nicméně k separaci vzorků obsahující stovky sloučenin je nutná mnohem vyšší píkovej kapacita a tedy 1D-LC není schopná dostatečně separovat většinu těchto látek [6]. Dvourozměrná kapalinová chromatografie poskytuje vhodnou alternativu pro významné zvýšení píkovej kapacity, a tedy zlepšení kvality separace [20].

Princip dvoudimenzionální kapalinové chromatografie (2D-LC) spočívá ve využití dvou chromatografických kolon, kdy nejprve dochází k separaci na jedné koloně a již částečně separovaný vzorek je následně převeden a analyzován na druhé koloně. Hlavním cílem druhé kolony (druhé dimenze) je efektivně separovat nerozlišené analyty v jednotlivých frakcích mobilní fáze z první kolony. Důležitou podmínkou je použití odlišné selektivity separace v obou chromatografických dimenzích. Schéma zapojení 2D-LC pomocí osmicestného ventilu je znázorněno na obrázku 3 [4].



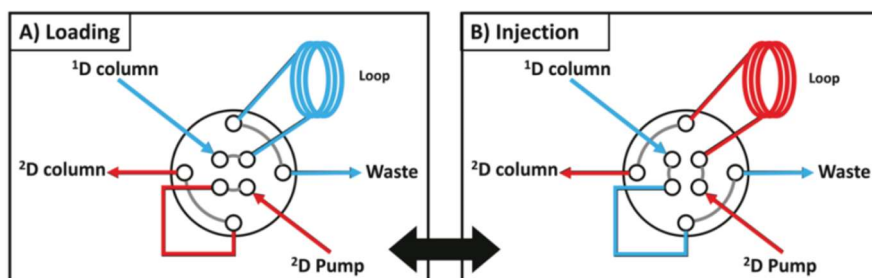
Obrázek 3: Schéma zapojení 2D-LC [4]

Jak bylo popsáno v kapitole 1.1.3 Instrumentace 1D-LC, se skládá z čerpadla, automatického dávkovače, separační kolony a detektoru. 2D-LC rozšiřuje tento systém o modulátor, který spojuje první a druhou dimenzi. Instrumentace 2D-LC zahrnuje dvě pumpy, dvě separační kolony a potenciálně dva detektory, přičemž každá pumpa řídí průtok mobilní fáze v jedné z kolon. Tato konfigurace umožňuje použití odlišných mobilních fází a průtoků pro každou dimenzi [3].

1.2.1 Typy 2D-LC

Existují dva typy 2D-LC a to off-line a on-line. Off-line separace jsou jednodušší na provedení. Během off-line separace se frakce eluátu z první dimenze manuálně nebo automaticky sbírají. Frakce obsahují částečně rozdělený vzorek a obsah všech nebo pouze vybraných frakcí je následně analyzován na koloně druhé dimenze. Toto uspořádání nám poskytuje řadu výhod, protože první separace není závislá na druhé. Frakce je možné derivatizovat nebo třeba vyměnit rozpouštědlo z důvodu kompatibility obou separačních mechanismů (odpaření a opětovné rozpouštění v jiném rozpouštědle). Frakce z první dimenze lze analyzovat v druhé dimenzi okamžitě nebo je uschovat a provést analýzu později [6, 21].

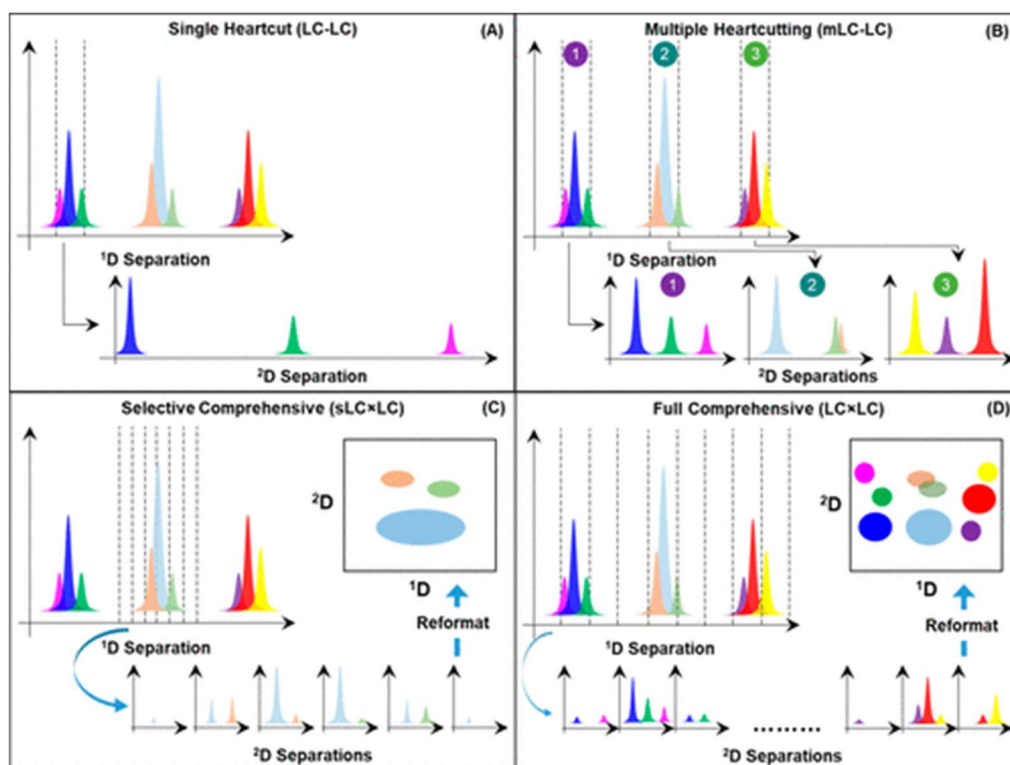
Druhým typem 2D-LC je on-line mód. Při on-line módu jsou frakce z první dimenze zachyceny ve smyčce, v dalším kroku jsou nadávkovány do druhé dimenze [5]. Oba rozměry jsou přímo propojeny a separace pokračují bez přerušení. Schéma online zapojení můžeme vidět níže na obrázku 4, kde jsou znázorněny dva kroky, a to za A) naplnění smyčky a za B) krok kdy je smyčka nadávkována do druhé dimenze [6, 21].



Obrázek 4: Online zapojení osmicestného ventilu u 2D-LC [21]

Online zapojení můžeme dále dělit na tzv. heart cutting mód (LC-LC) a comprehensive mód (LC×LC). Hlavním rozdílem mezi těmito typy je množství eluátu, které je převedeno z první do druhé dimenze [4, 6, 21].

U Heart cutting módu jsou do druhé dimenze převedeny jen části separace obsahující píky, jež chceme v druhé dimenzi analyzovat. Pokud chceme pomocí druhé dimenze rozdělit jen jednu frakci obsahující analyzované sloučeniny (např. metabolit léku v séru), jedná se o single Heartcut (LC-LC) viz obrázek 5 (A). Když sloučeniny, které chceme převést do druhé dimenze jsou v rozdílných frakcích odebereme více frakcí (obvykle 3–10), tento typ se nazývá Multiple Heartcutting (mLC-LC) viz obrázek 5 (B). Odebrané frakce nemusí být těsně za sebou. Používá se například pro rozdělení molekul na základě chiralita [4, 6, 21].



Obrázek 5: Grafické znázornění typů 2D-LC [22]

Během comprehensive 2D-LC je převeden do druhé dimenze celý eluát, tedy všechny frakce. Comprehensive lze dále rozdělit na selective comprehensive (sLC×LC) obrázek 5 (C) a full comprehensive (LC×LC) obrázek 5 (D). Selective comprehensive je typ při kterém je vybrána část chromatogramu obsahující analyty, které chceme rozdělit v druhé dimenzi. Tato část je pomocí následných frakcí převedena do druhé dimenze a frakce jsou ihned analyzovány. Při Full comprehensive módu je celý eluát z první dimenze rozdělen na frakce a převeden do druhé dimenze. Používá se pro profilování vzorků (např. metabolomika) [4, 6, 21].

Na obrázku 5 jsou čerchovanými čarami znázorněny jednotlivé frakce eluátu z první dimenze, které mohou být následně převedeny do druhé dimenze k analýze. U jednotlivých typů separace je použit rozdílný počet těchto frakcí [22].

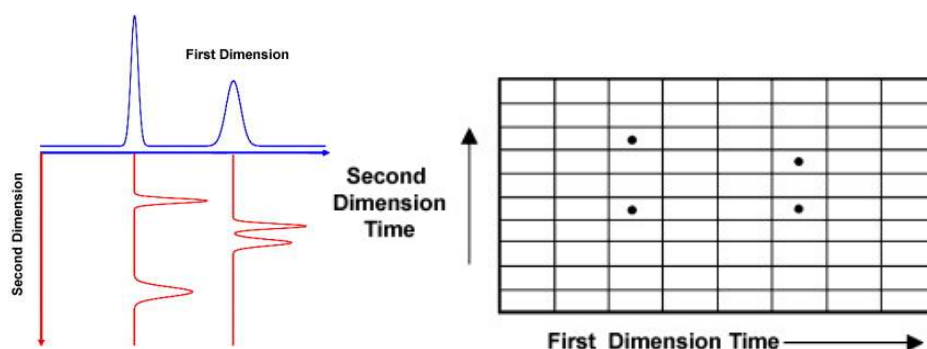
1.2.2 Píková kapacita 2D-LC

Jak bylo zmíněno v kapitole 1.1.1, píková kapacita je klíčovým ukazatelem schopnosti systému rozlišit jednotlivé složky vzorku. V případě dvourozměrné chromatografie je celková píková kapacita dána součinem píkových kapacit prvního $n_{c,1}$ a druhého rozměru $n_{c,2}$ (rovnice (4)) [20, 23].

Rovnice 4: Výpočet celkové píkové kapacity pro 2D-LC

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

Tento vztah předpokládá, že separace v obou rozměrech jsou naprosto ortogonální (1.2.3). Na obrázku 6 je znázorněn vztah píkové kapacity pro dvourozměrnou kapalinovou chromatografii. V první dimenzi jsou pozorovány dva píky, pokud analyzujeme vzorek v druhé dimenzi zjistíme, že každý pík z první dimenze obsahuje celkem dvě sloučeniny. V chromatogramu druhé dimenze tedy vidíme čtyři píky, což ukazuje, že směs obsahuje čtyři různé látky. Je tedy možné předpokládat, že za ideálních podmínek se píková kapacita obou rozměrů násobí [23].

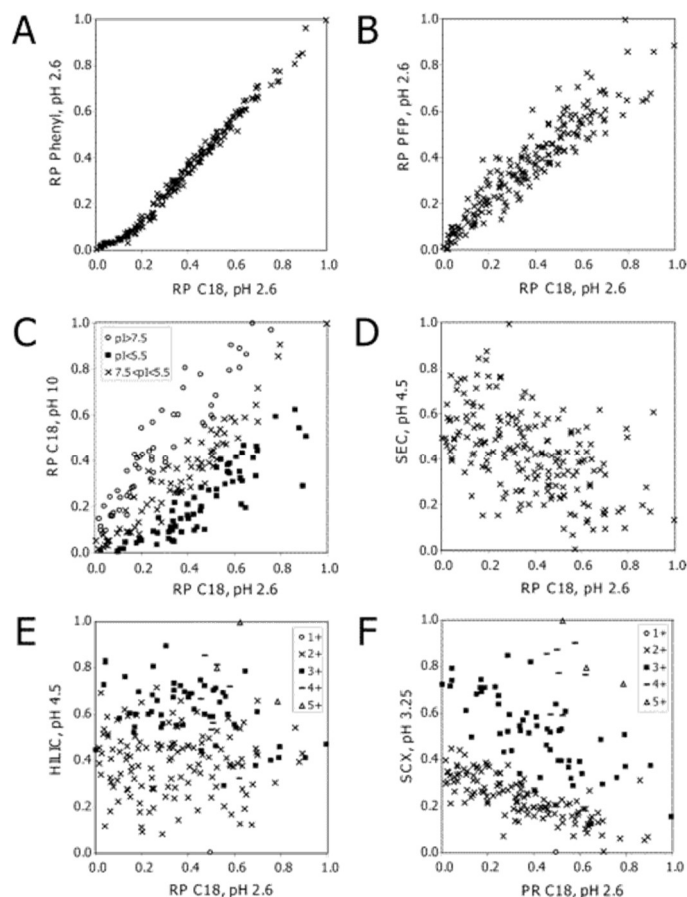


Obrázek 6: Grafické znázornění píkové kapacity ve 2D-LC (rovnice 4) [23]

1.2.3 Ortogonalita 2D-LC

Úspěšnost a účinnost 2D separace závisí na píkové kapacitě v obou dimenzích a na ortogonalitě celého 2D systému. Ortogonalita vyjadřuje odlišnost separací v první a druhé dimenzi. Pokud separace nejsou zcela ortogonální píková kapacita bude nižší než lze očekávat výpočtem dle rovnice 4. Ortogonalitu si můžeme představit jako pokrytí separačního prostoru, viz obrázek 7, kde jsou různé HPLC módy na ose x a y. Pokud jsou data srovnány v diagonále znamená to, že separace v obou dimenzích jsou identické tudíž je ortogonalita nízká (obrázek 7 A), pokud je zaplnění separačního prostoru vysoké (obrázek 7 E, F) separace je ortogonální[24].

Z obrázku 7 je patrné, že 2D-LC založená na použití dvou separací s reverzní fází s použitím odlišného pH v obou rozměrech má vysoké pokrytí separačního prostoru a je srovnatelná s kombinací kationtově výměnná chromatografie a reverzní fáze. Další 2D-LC kombinace HILIC-RP (obrázek 7 E) poskytuje vyšší stupeň ortogonalit v porovnání s ostatními kombinacemi. Jeho využití je však vykoupeno špatnou rozpustností peptidů v rozpouštědlech s vysokým obsahem organických látek [24].



Obrázek 7: Ortogonalita v závislosti na typu separace v D^1 a D^2 [24]

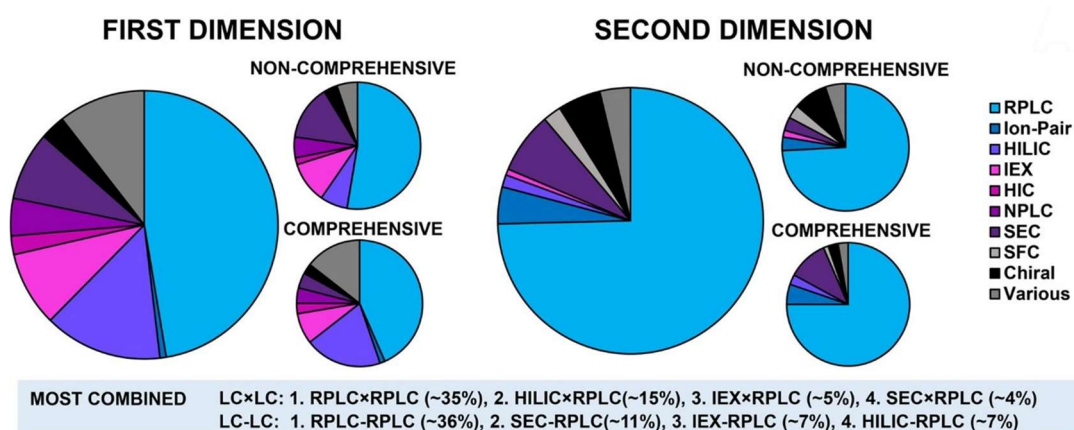
1.2.4 Kombinace chromatografických módů v 2D-LC

V 2D-LC se pro analýzu komplexních vzorků nejčastěji využívají kombinace různých separačních mechanismů, což je důležité pro dosažení vysoké rozlišovací schopnosti. Ve farmaceutickém odvětví, zejména při analýze protilátek a jejich konjugátů, se využívá online metod založených na vylučovací chromatografii (SEC) nebo iontově výměnné chromatografii (IEC), jako je například silná kationtová výměnná chromatografie (SCX) nebo HILIC, s reverzní fází (RP) v druhé dimenzi. Podobné ortogonální kombinace, jako je SCX s RP, jsou často využívány i pro analýzu peptidů. Pro analýzu metabolitů a lipidů se také často kombinuje HILIC×RP nebo NP×RP, což umožňuje efektivní separaci širokého spektra polárních a nepolárních sloučenin [22].

Volba separačních mechanismů je klíčovým aspektem pro 2D-LC metody a je silně ovlivněna typem analyzovaných látek a kompatibilitou mobilních fází. Zatímco kombinace RP×RP se jeví jako velmi univerzální, díky široké aplikovatelnosti a vysoké píkove kapacitě, dosažení optimální ortogonalit vyžaduje pečlivý výběr kolon a mobilních fází. Na druhou stranu,

kombinace využívající odlišné mechanismy separace, jako je iontová výměna, vylučovací chromatografie nebo NP×RP, nabízejí výhodu vysoké ortogonalitě, avšak často za cenu nižší píkové kapacity nebo omezení spojených s kompatibilitou rozpouštědel [25].

Z obrázku 8 je patrné, že převládá kombinace RP v první i druhé dimenzi, a to díky široké dostupnosti kolon, kompatibilitě s hmotnostní spektrometrií a rychlému ustálení systému. Například použití rozdílných gradientů od vysokého po nízký podíl vody umožňuje eluci analytů s rozličnou polaritou. NP, HIC, IEC, a HILIC jsou téměř vždy použity pouze v první dimenzi (1^D) a to díky pomalému ustálení rovnováhy systému [25].



Obrázek 8: Graf kombinací HPLC módů pro 2D-LC [22]

Tabulka 3 srovnává kombinace separačních módů v 2D-LC dle ortogonalitě, píkové kapacity, efektivity, kompatibility mobilních fází a použitelnosti (hodnoceno relativně, skóre = celková vhodnost). Nejvyšší skóre dosahuje RP×RP, a to díky velkému množství dostupných kolon a mobilních fází, navzdory potenciálně nižší ortogonalitě. Naopak kombinace s vysokou ortogonalitou (IEC×RP, SEC×RP) jsou náročné na rychlost separace (čas separace). Nízké skóre u NP×RP, SEC×NP, SEC×IEC a LCCC×RP ukazují na menší využitelnost v praxi a nízkou kompatibilitu mobilních fází. Tabulka slouží k posouzení vhodnosti módů pro 2D-LC aplikace.

Tabulka 3: Srovnání rozdílných módů pro LC×LC [3]

Mód	Ortogonalita	Píková kapacita	Píková kapacita / čas	Kompatibilita rozpouštědel	Použitelnost	Skóre
IEC×RP	++	+	-	+	+	4
SEC×RP	++	+	--	+	+	3
NP×RP	++	+	+	--	-	1
RP×RP	+	++	++	++	++	9
HILIC×RP	+	+	+	+	+	5
HILIC×HILIC	+	+	-	++	-	2
AgC×RP	++	-	-	+	+	2
SEC×NP	+	-	--	+	-	-2
SEC×IEC	+	--	--	+	-	-3
LCCC×RP	++	+	+	-	-	2

1.2.5 Problémy spojené s comprehensive 2D-LC

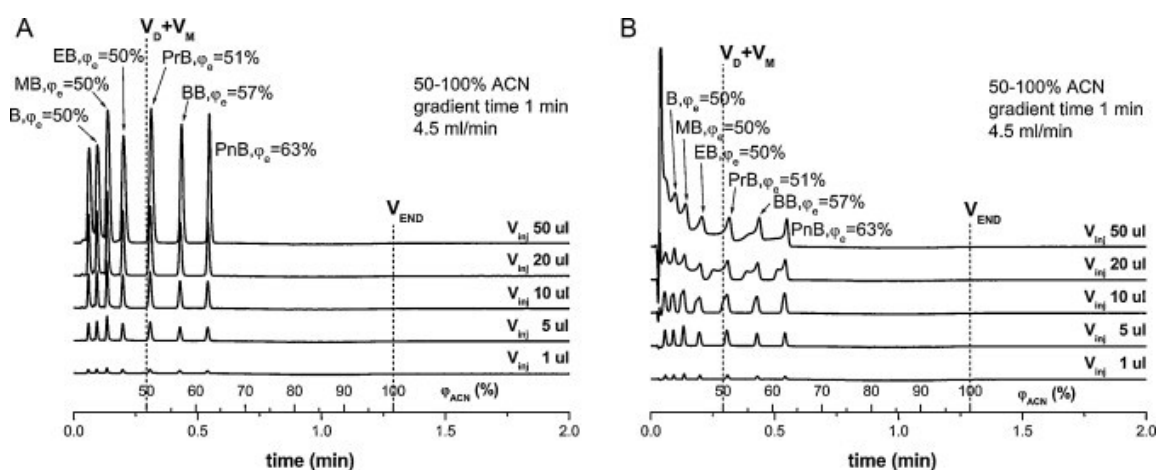
2D-LC přináší oproti 1D-LC řadu komplikací, které se týkají instrumentace, vývoje metod, analýzy dat a praktické implementace. Mezi hlavní problémy, které je nutné vzít v potaz, patří nekompatibilita mobilních fází, složitá kvantifikace (jedna sloučenina je rozdělena do více frakcí), nedostatečné vzorkování druhou dimenzí (tzv. undersampling), velké ředění analytů v závislosti na citlivosti detekce, a v neposlední řadě také otázky nákladů či spolehlivosti metody jako takové [3, 4, 22].

Pro dosažení optimální separace v 2D-LC je nutné se vyhnout tzv. efektu překrytí („wrap-around“). Ten v 2D-LC separaci nastává, když jsou retenční časy některých složek ve druhé dimenzi (²D) delší než doba modulace. Aby se tomuto efektu zabránilo je nutné upravit eluci tak, aby všechny sloučeniny byly eluovány z kolony v druhé dimenzi před nadávkováním další frakce. Čas na separaci v druhé dimenzi je dán časem sběru frakce z první dimenze [25].

1.2.5.1 Nekompatibilita mobilních fází

Nekompatibilita mobilních fází je jedním nejvíce limitujících problémů, které mohou nastat při vývoji LC×LC metody. Nekompatibilita se týká příliš rozdílných typů chromatografických módů v první a druhé dimenzi. Například HILIC v ¹D a RP v ²D nebo NP×RP. Kvůli odlišným

separačním mechanismům a mobilní fázi dochází k problému při převádění vzorku z první do druhé dimenze [26]. Nekompatibilita mobilních fází v důsledku rozdílné eluční síly lze demonstrovat na kombinaci HILIC×RP. V HILIC se používá mobilní fáze s vysokým obsahem acetonitrilu (70–90 %), což je ale silné eluční činidlo pro RP. Velké objemy převáděných frakcí z první do druhé dimenze obsahující acetonitril by způsobily rozmývání, štěpení píků a část analytu by se eluovala již v mrtvém objemu kolony. Tento efekt je patrný na Obrázku 9 B, vzorek je rozpuštěný v čistém acetonitrilu, zatímco na obrázku 9 A je vzorek rozpuštěn pouze v 50% acetonitrilu a k rozmývání a štěpení píků nedochází. Objemy od 10 ul a výš v případě použití čistého acetonitrilu způsobují výše zmíněné účinky. Při spojení HILIC×RP je tedy nutné převádět pouze frakce v jednotkách μl , nebo je nutné použít pokročilé modulační techniky, které tyto jevy potlačí. Typy aktivní modulace jsou rozebrány v dalších kapitolách [27].



Obrázek 9: Vliv složení mobilní fáze a objem frakce z 1D na píky v 2D [27]

Další možností, jak zabránit zkreslení píků je zmenšení dávkovaného objemu, který omezuje vliv přeneseného rozpouštědla z první dimenze do druhé. Pokud je dávkovaný objem dostatečně malý, složení rozpouštědla přestává významně ovlivňovat separaci. Tato strategie obvykle vyžaduje použití velmi úzkých kolon v prvním rozměru nebo výrazné rozdělení toku, případně obě možnosti. Hlavní nevýhodou je snížení citlivosti detekce, protože menší kolony umožňují dávkovat jen omezené množství vzorku, a při rozdělení toku dochází ke ztrátě části analytů před detekcí [3].

Pro zlepšení separace s nekompatibilními mobilními fázemi je také možné použít kolony s vyšší retenční silou ve druhé dimenzi. Díky vyšší retenční síle kolony v druhé dimenzi lze použít v první dimenzi mobilní fázi s nižším obsahem organického rozpouštědla. Tento přístup minimalizuje riziko nadměrné eluční síly rozpouštědla při přenosu do druhé dimenze a pomáhá

zachovat účinnost separace. Výběr vhodného řešení závisí na konkrétních podmínkách analýzy, vlastnostech vzorku a požadavcích na citlivost a rozlišení [3].

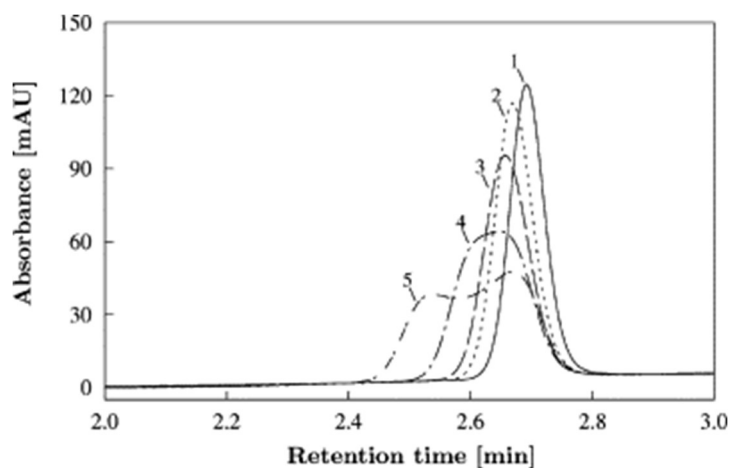
Použití modulačních technik představuje jeden ze způsobů řešení nekompatibility mobilních fází v ²D separaci. Mezi tyto techniky patří aktivní modulace rozpouštědlem a zachytávací kolony. Aktivní modulace rozpouštědlem umožňuje řízenou úpravu složení mobilní fáze, čímž eliminuje negativní vliv rozdílných rozpouštědel. Zachytávací kolony naopak dočasně zadržují analyty, dokud nejsou převedeny do druhé dimenze za podmínek optimalizovaných pro jejich separaci [22, 28]. Více jsou tyto techniky popsány v kapitole 1.2.7 Pokročilé modulační techniky.

1.2.5.2 Ředění analytů a podvzorkování

V LC×LC může docházet k zhoršené detekci látek, tedy snížení meze detekce oproti jednorozměrné chromatografii. Při průchodu vzorku 2D systémem dochází k násobnému ředění vzorku, a tedy snižování koncentrace analytů. Toto se děje při převodu frakcí z první dimenze do druhé. V zachytávací smyčce je spolu s analytem také mobilní fáze první dimenze a celá tato směs je nadávkována na kolonu druhé dimenze. Také je jeden pík (sloučenina) rozdělena do více frakcí, čímž se opět sníží původní koncentrace analytu [3].

Ke zmenšení ředění se využívají různé metody fokusace nebo koncentrace mezi sběrem a dávkováním frakcí. Výběr vhodné techniky však není jednoduchý. Je nutné zohlednit změny ve složení vzorků, zejména pokud se v první dimenzi používá gradient [3]. Pro optimalizaci separace je výhodné, aby mobilní fáze v první dimenzi měla nižší eluční sílu než v druhé dimenzi. Tím se umožní re-koncentrace vzorku na začátku ²D kolony (tzv. zakoncentrování na ²D koloně), což zlepšuje citlivost a rozlišení [29].

Příklad zakoncentrování píku na začátku kolony v druhé dimenzi je na obrázku 10, na kterém jsou píky kofeinu rozpuštěného v mobilní fázi acetonitril:voda a to v různém poměru. Jedná se RP a z obrázku je patrné, že čím větší poměr vody je v mobilní fázi, tím užší je eluovaný pík do ²D. [30].

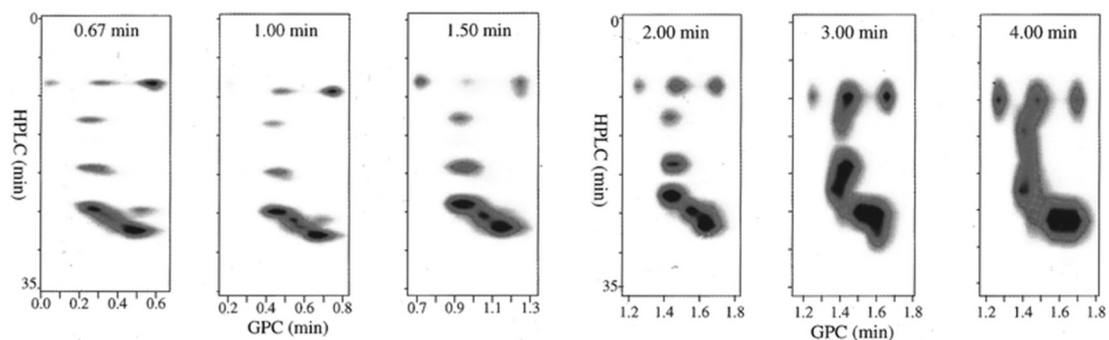


Obrázek 10: Píky kofeinu v gradientu acetonitril:voda - 1) 5:95; 2) 10:90; 3) 15:85; 4) 25:75; 5) 35:65 [30]

Mimo zakoncentrování vzorku na koloně v 2^D existuje mnoho dalších řešení nadměrného ředění analytů. Jednou z možností je částečné odpaření rozpouštědla, které využívá rozdílnou těkavost mobilní fáze a analytů. Odpařením rozpouštědla lze zvýšit koncentraci analytů, avšak hrozí riziko ztráty analytů, což může negativně ovlivnit přesnost analýzy [3].

Alternativní metodou přenosu frakcí je použití dvou zachytávacích kolonek místo smyček. Frakce se střídavě zachytávají na kolonky a následně se zpětným proplachem uvolňují na kolonu v druhé dimenzi, čímž se minimalizuje rozšiřování píků a zvýší účinnost separace [3], [29]. Aby byla metoda použití zachytávacích kolonek účinná, je nutný správný výběr stacionární fáze a zvolit vhodné rozměry kolonek [29].

Při snaze omezit ředění při převodu frakcí tím, že se jedna látka (pík) rozdělí do menšího počtu frakcí, je důležité zabránit tzv. podvzorkování. K podvzorkování ve 2D-LC dochází tehdy, když analyty první dimenze nejsou dostatečně často vzorkovány druhou dimenzí, což vede ke ztrátě rozlišení a píkové kapacity [31]. Tento efekt může výrazně snížit celkový separační výkon 2D-LC systémů [32]. Pro zachování vysokého dvojrozměrného rozlišení by měl být každý pík první dimenze vzorkován alespoň ve 3 až 4 frakcích [27, 33]. Příklad podvzorkování je uveden na obrázku 11, kde je v první dimenzi kapalínová chromatografie s reverzní fází (RP) a v druhé dimenzi gelová permeační chromatografie (GPC). Je zde patrný pokles rozlišení s prodlužující se dobou vzorkování. První tři doby vzorkování (0,67, 1,00 a 1,50 minut) vykazují mírný pokles rozlišení s dobou vzorkování a rozšíření píků v rozměru s RP. Druhá sada tří časů (2,00, 3,00 a 4,00 min) ukazuje velký úbytek rozlišení s rostoucí dobou vzorkování v prvním rozměru RP bez zjevného úbytku v druhém rozměru GPC [33].

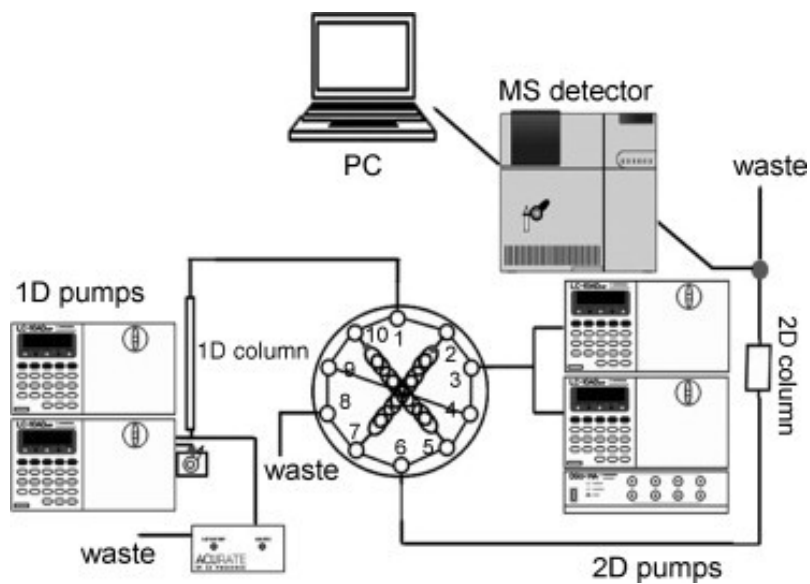


Obrázek 11: Rozlišení v závislosti na četnosti vzorkování [33]

Správná volba doby vzorkování je klíčová pro minimalizaci podvzorkování a zachování maximálního rozlišení v 2D-LC separacích [31, 33].

1.2.6 Instrumentace 2D-LC

V comprehensive 2D-LC je zásadním prvkem instrumentace modulátor, který sbírá frakce z ¹D a dávkuje je do ²D. Schéma takového přístroje na obrázku 12, kde je jako modulátor použit deseticestný ventil [29].



Obrázek 12: Schéma comprehensive 2D-LC [29]

Konkrétní parametry vhodné pro separaci v první a druhé dimenzi jsou pospány v tabulce 4. Jedná se o doporučené podmínky zvolené tak, aby se předešlo nejčastějším komplikacím v 2D-LC (dostatečné vzorkování, zabránění „wrap-around efektu“, ...) [3, 25].

Tabulka 4: Parametry pro separaci v první a druhé dimenzi [3]

Parametr	První dimenze		Druhá dimenze	
	Obecně	Konkrétně	Obecně	Konkrétně
Rozměry kolony	Delší; podobný nebo menší průměr	2,1 × 150 mm	Kratší; podobný nebo větší průměr	2,1 × 30 mm
Zpoždění gradientu	Měl by být menší než 200 µL	100 µL	Musí být menší než 200 µL	100 µL
Průtok mobilní fáze	Nízký průtok (menší objem vzorku ve frakci)	20–200 µl/min	Vyšší průtok než v ¹ D	1–3 ml/min
maximální tlak čerpadla MF	Bežný tlak	<600 bar	Vyšší tlak než v ¹ D	<1200 bar

Kolona v první dimenzi by měla poskytovat dobré rozlišení a vyšší píkovou kapacitu než kolona ve druhé dimenzi. Obvykle se jedná o úzkou, relativně dlouhou kolonu (10–25 cm) s nízkým průtokem, což sníží koeluci látek a rozšiřování píků. Nízký průtok také umožňuje převádění frakcí o malém objemu do kolony ²D [25].

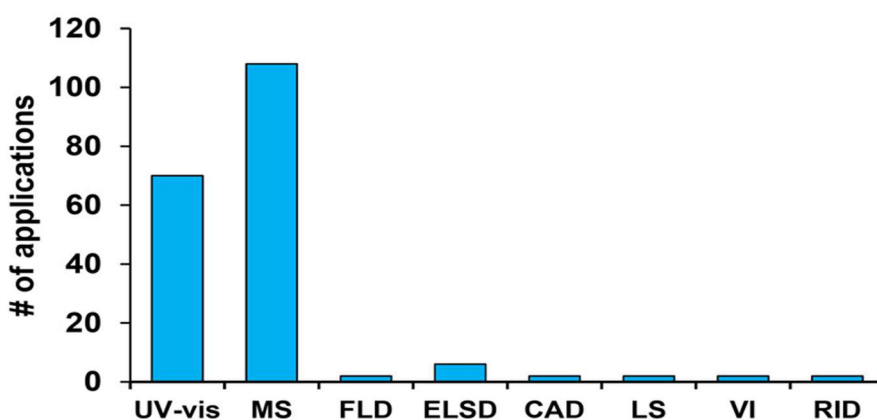
Druhá dimenze 2D-LC je klíčová z hlediska rychlosti separace a dosažení celkové píkové kapacity. Pro efektivní separaci se často používají krátké kolony o délce 3–5 cm naplněné částicemi o velikosti < 2 µm, které vyžadují použití vyšších tlaků [34].

Důležitým aspektem 2D systému je kompatibilita mobilních fází mezi dimenzemi. Tato kompatibilita je zásadní pro minimalizaci rozšíření píků a zachování separace dosažené v první dimenzi. Efektivním řešením může být použití kombinace různých typů kolon, například nanoprůtokové kolony v první dimenzi a běžné kolony ve druhé dimenzi, spolu s vhodnými mobilními fázemi [35]. Zvolení vhodné mobilní fáze 2D-LC, významně přispívá ke zlepšení celkového výkonu separace [34].

Za kolonou druhé dimenze je zapojen detektor, který hraje klíčovou roli v analýze vzorků. V případě potřeby může být mezi první dimenzí a modulátor přidán druhý detektor, který snímá elutát z první dimenze. Kapalinová chromatografie nabízí široké spektrum detektorů, jež lze rozdělit dle typu analyzovaných vzorků.

Nejvíce se pro 2D-LC využívá hmotnostní spektrometr (MS) poskytující vysokou citlivost a selektivitu, který se primárně používá pro analýzu peptidů, lipidů, povrchově aktivní látek, polymerů nebo léčiv [4]. Pro sloučeniny obsahující chromofory, jako jsou aromatické látky, jsou vhodné UV-VIS detektor nebo DAD. Fluorescenční detektory najdou uplatnění při analýze přirozeně fluorescenčních látek nebo těch, které byly derivatizovány, například u proteinů. Refraktometrické detektory (RID) jsou naopak vhodné pro látky bez chromoforů, například v 2D-LC analýza syntetických polymerů SEC×NP. Elektrochemické detektory se používají k analýze elektroaktivních sloučenin, jako jsou neurotransmitery. Správný výběr detektoru zajišťuje vhodnou citlivost a selektivitu pro konkrétní typ vzorku [22].

Na obrázku 13 je přehled používaných detektorů pro 2D-LC, je zcela zřejmé, že nejvíce byl používán hmotnostní spektrometr (MS), na druhém místě je UV-VIS (detektor pro Ultrafialovou a viditelnou oblast). Mimo to se ve spojení 2D-LC používají i další typy detektorů, a to detektor nabitých aerosolů (CAD), detektor rozptylu světla s odpařováním mobilní fáze (ELSD), fluorescenční detektor (FLD), detektor rozptylu světla (LS), detektor indexu lomu (RID) a viskozimetrický detektor (VI) [22].



Obrázek 13: Přehled použitých detekčních technik pro 2D-LC [22]

1.2.6.1 Modulátory

Klíčovým prvkem celého 2D systému je modulátor, který zajišťuje propojení mezi první a druhou kolonou [4]. V 2D-LC se nejčastěji jako modulátor používá dvoupolohový osmicestný nebo deseticestný ventil, lze ale použít i dvanácticestný ventil nebo 2 šesticestné ventily. Modulátory mají obvykle dvě identické zachytávací smyčky, které jsou střídavě plněny frakcí z první dimenze, zatímco obsah druhé smyčky je dávkována a analyzována v druhé dimenzi. Toto uspořádání se nazývá comprehensive (nepřetržitě) 2D-LC [22, 36].

Velikost smyček, do nichž jsou frakce dávkovány v modulátorech 2D-LC, představuje zásadní parametr ovlivňující objem frakcí a dobu trvání modulace. Objem vzorkovacích smyček se v 2D-LC systémech značně liší v závislosti na konkrétní metodě a instrumentaci. Objem modulačních smyček určuje objem eluentu 1D, který bude následně dávkován do ²D. Obecně by dávkovaný objem neměl překročit 15 % mrtvého objemu kolony, aby se omezilo rozšíření píku způsobené dávkováním frakce [10]. V aplikacích vyžadujících vysokou citlivost, typicky v proteomice a specializovaných analýzách, se často využívají malé smyčky s objemy v rozmezí 1–10 µl. Pro analýzy RP × RP se používají velikosti smyček 10–100 µl, pokud se jedná o kombinaci módů, která mají méně kompatibilní mobilní fáze používají se větší smyčky, aby bylo možné nekompatibilní mobilní fáze upravit. Také při analýze větších objemů vzorků, například v polymerní chemii, se vyžaduje použití smyček o větším objemu, a to 250–500 µl. Většinou se v 2D-LC setkáváme se smyčkami o objemu do 100 µl, přičemž konkrétní volba závisí na kombinaci módů HPLC, průtoku a rozměrech kolon použitého systému [37].

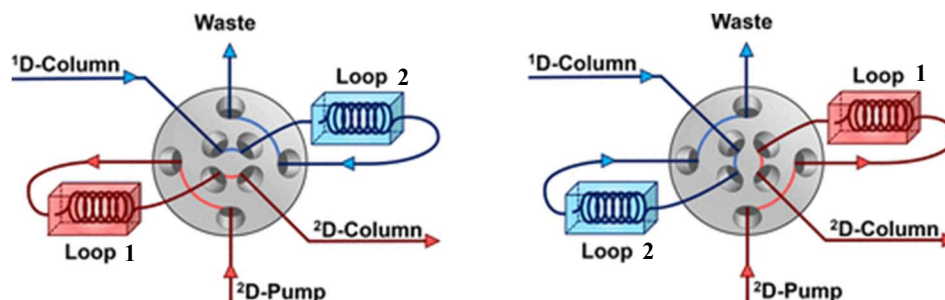
Mimo velikost zachytávací smyčky je také zásadní čas modulace neboli čas přepínání ventilů. V tabulce 5 je přehled modulačních časů u různých aplikací, a to jak pro kombinace módů, tak typy vzorků. Modulační čas se většinou pohybuje okolo 1 minuty nebo méně a použité průtoky mobilní fáze v ²D jsou mnohonásobně větší než v ¹D [3].

Tabulka 5: Přehled modulačních časů LCxLC [3]

Mód	Průtok ¹ D [µl/min]	Průtok ² D [ml/min]	Velikost smyčky [µl]	Čas modulace [s]	Vzorek
RP×HILIC	60	4	40	24	Analýza taxanů
NPLC×RP	35	2,2	20	30	Analýza citrusových olejových extraktů
SCX×RP	60	3,5	40	30	Analýza monoklonálních protilátek I
HILIC×RP	50	4	40	27	Analýza monoklonálních protilátek II
HILIC×RP	25	3	40	60	Stanovení homologních technických detergentů
RP×RP	100	3	80	39	Polyfenoly v nápojích
RP×RP	50	3	60	30	Kontrola kvality extra panenského olivového oleje
SEC×RP	100	2	40	39	Analýza piva

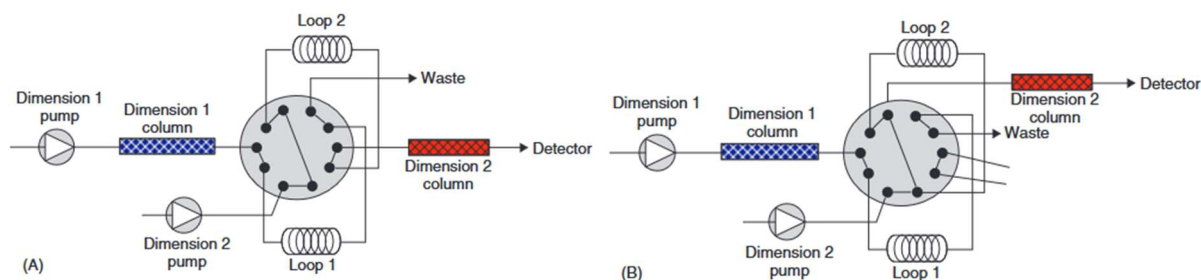
V letech 2006—2016, byly využívány různé typy ventilů jako rozhraní mezi dimenzemi. Nejčastěji používaným řešením byl deseticestný ventil, který se používal nejvíce ve většině let. Po roce 2010 však došlo k nárůstu využití osmicestných a šesticestných ventilů, přičemž nejvýraznější vrchol v počtu publikací s osmicestným ventilem nastal v roce 2015. Naopak dvanácticestné ventily byly využívány jen minimálně. Když se podíváme na využití modulátorů, je patrné postupné rozšiřování alternativních modulačních strategií v průběhu let [36].

Jak bylo zmíněno výše jedním z hojně používaných modulátorů je osmicestný ventil. Schéma tohoto ventilu je na obrázku 14, kde jsou obě polohy a je zde znázorněno, jak se jednotlivé smyčky střídají. V levé části obrázku je eluátem z první dimenze plněna smyčka 2 (plnění smyčky je znázorněno modře), zatímco smyčka 1 je pomocí pumpy dávkována do druhé dimenze (znázorněno červeně). V pravé části obrázku je to naopak [22].



Obrázek 14: Osmicestný ventil jako rozhraní v 2D-LC [22]

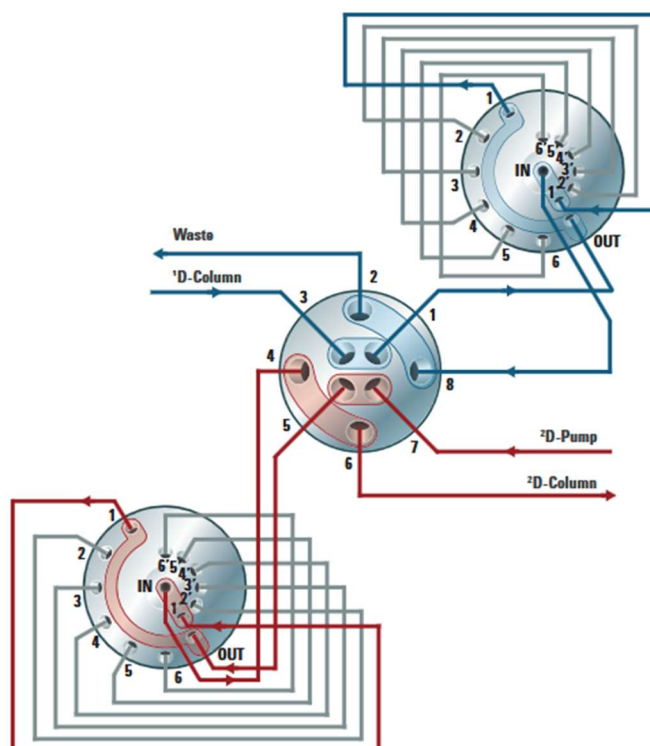
Na stejném principu funguje i deseticestný ventil se dvěma smyčkami. Díky vyššímu počtu cest jsou dvě možnosti zapojení. Smyčky mohou být zapojeny symetricky 15 A a asymetricky 15 B. V případě asymetrického zapojení byly zjištěny rozdíly retenčních časů analytů v druhé dimenzi [38]. Důvodem je rozdílné použití obou smyček. Během dávkování frakce do druhé kolony se jedna ze smyček vyprazdňuje v režimu dopředného proplachu, druhá smyčka v režimu zpětného proplachu. Aby bylo nedošlo ke ztrátě části frakce, velikost smyček musí být minimálně stejně velká jako objem odebrané frakce [39].



Obrázek 15: Deseticestný ventil jako rozhraní v 2D-LC v symetrickém (A) a asymetrickém (B) zapojení [38]

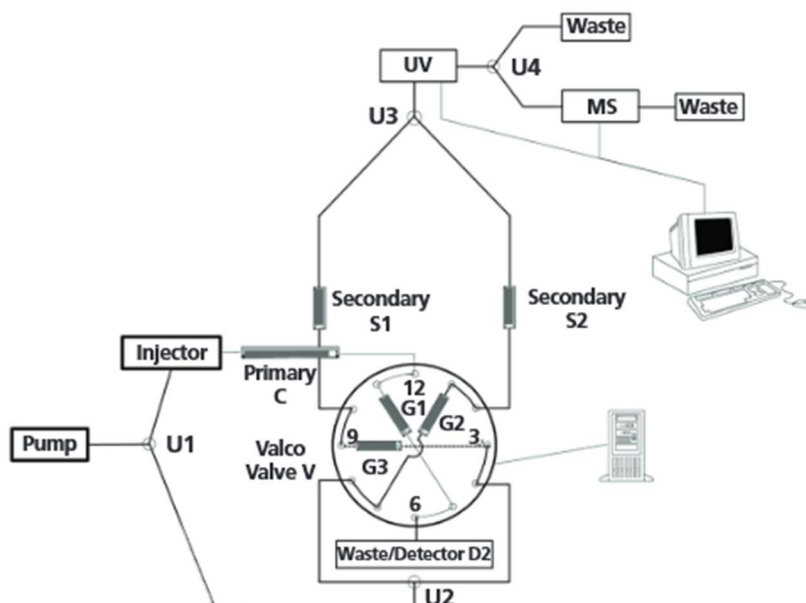
Mimo osmicestného a deseticestného ventilu se používají jako modulátor i dva šesticestné ventily [38].

Modulátor pro heartcutting 2D-LC se může od comprehensive modulátoru lišit. Při heartcutting 2D-LC se sbírá většinou málo frakcí, a tyto frakce je možné před analýzou ve druhé dimenzi uchovávat ve zvláštních tzv. dokovacích smyčkách nebo záchytných kolonkách [37, 40]. Díky tomu je možné separaci v druhé dimenzi libovolně prodloužit. Na obrázku 16 je zobrazen osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma šestipolohovými ventily s 12 smyčkami [41—42].



Obrázek 16: Osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma šestipolohovými ventily s 12 smyčkami [39]

Mimo klasický modulátor se smyčkami lze použít také záchytné kolonky. Na obrázku 17 je dvanácticestný ventil, ke kterému byly připojeny tři záchytné kolonky. Systém je založen na kombinaci LC×LC s reverzními fázemi. Pro efektivnější využití kapacity kolon jsou zde dvě paralelní kolony ve druhé dimenzi, což umožňuje prodloužení času analýzy v ²D. Modulace probíhala 30 sekund, aby bylo zajištěno dostatečné vzorkování z první dimenze, přičemž každá z paralelních kolon měla k dispozici 60 sekund na provedení separace v druhé dimenzi [40].



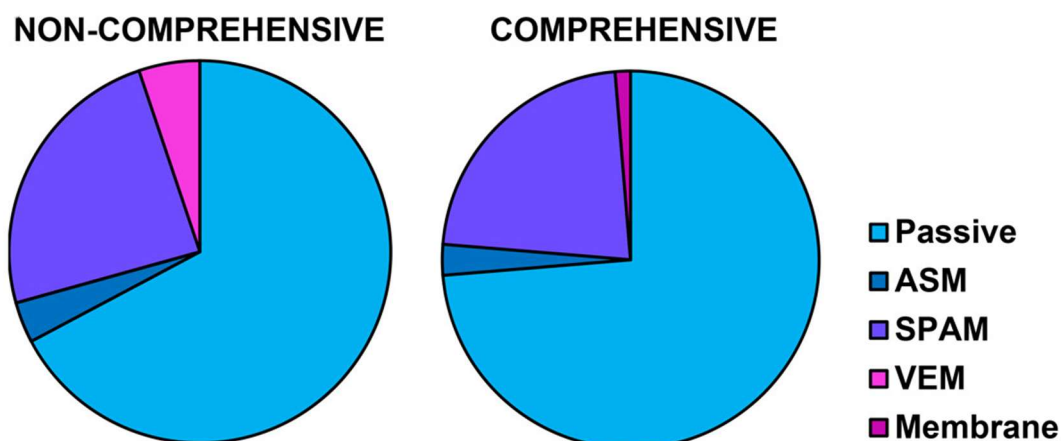
Obrázek 17: Instrumentace se záchytnými kolonami [40]

Výše zmíněné způsoby převodu frakcí se označují jako pasivní modulace. Představuje nejjednodušší přístup, při němž je frakce z první dimenze přesunuta do druhé dimenze bez jakékoli další modifikace. Pro zvýšení separační účinnosti ve druhé dimenzi však existují pokročilejší modulační techniky, které umožňují lepší rozlišení analytů nebo zlepšují mez detekce metody [38, 43].

1.2.7 Pokročilé modulační techniky

Pokročilé modulační techniky byly vyvinuty s cílem eliminovat nekompatibilitu obou dimenzí a/nebo zvýšit celkovou píkovou kapacitu a tím zlepšit rozlišení píků [22].

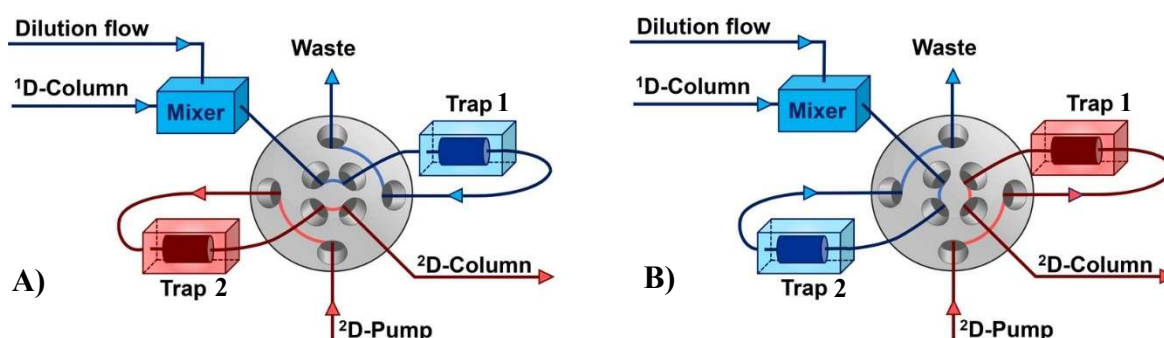
V současnosti jsou nejvíce používanými alternativními technikami především aktivní modulace rozpouštědlem (ASM – active solvent modulation) a modulace pomocí stacionární fáze (SPAM – stationary phase-assited modulation). Také byla vyvinuta vakuová odpařovací modulace (VEM – vacuum evaporation modulation), odpařovací membránová modulace, podélná tepelná modulace na koloně, nebo se používá čistě tepelná modulace. Na obrázku 18 je koláčový graf nejvíce používaných modulačních technik, a to jak pro comprehensive, tak pro ostatní typy 2D-LC. Téměř v 75 % všech případů se používá pasivní modulace a druhou nejvíce používanou technikou je modulace pomocí stacionární fáze. Ostatní typy modulace se používají výrazně méně [22].



Obrázek 18: Graf nejvíce používaných modulačních technik pro 2D-LC [22]

1.2.7.1 Aktivní modulace pomocí stacionární fáze

Modulace pomocí stacionární fáze (SPAM) je technika využívaná v 2D-LC, která nahrazuje smyčky malými zachytávacími kolonkami. Tyto kolonky selektivně zachytávají analyty po separaci v ¹D. Pro získání dostatečné retence v zachytávací kolonce může být tok z první dimenze zředěn, aby se snížila eluční síla eluátu ¹D před vstupem na zachytávací kolonku. Zředění se provádí zapojením směšovače za první dimenzi a modulátor. Na ředění se používá rozpouštědlo s nízkou eluční silou v druhé dimenzi. Při přepnutí ventilu se analyty uvolní do druhé dimenze ve formě ostrých, koncentrovaných píků, což výrazně zvyšuje mez detekce a umožňuje použití kratších ²D kolon, protože analyty jsou již rozděleny z ¹D, čímž se zkracuje celkový čas analýzy [22, 44]. Nicméně, důležité je zajištění dostatečného zachycení všech analytů na kolonkách, jinak může dojít k jejich ztrátě [44].



Obrázek 19: Schéma modulace pomocí stacionární fáze [22]

Obrázek 19 schematicky znázorňuje techniku SPAM, ilustrující dva stavy modulátoru 20 A) a 20 B). Na 20 A) je znázorněna ¹D kolona, směšovač a zachytávací kolonka (Trap 1), kde dochází k selektivnímu zachycení analytů ze separace ¹D a odvodu zbytkové mobilní fáze

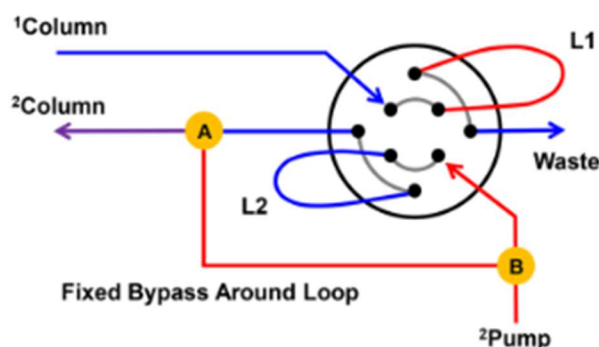
do odpadu. Na 20 B) je zachytávací kolonka (Trap 1) znázorněna červeně, což signalizuje uvolňování zachycených analytů do ²D kolony, kam je mobilní fáze dodávána ²D pumpou [22].

SPAM bylo úspěšně využito pro LC×LC-MS separaci peptidů, proteinů, polyfenolů a steroidů, kde prokázalo vyšší rozlišovací schopnost a až sedminásobné zvýšení poměru signálu k šumu oproti pasivní modulaci [22].

1.2.7.2 Modulace rozpouštědlem

Modulace rozpouštědlem umožňuje použití větších vzorkovacích objemů v poměru k mrtvému objemu ²D kolony, čímž poskytuje vyšší flexibilitu při vývoji metod a zlepšuje citlivost detekce [22].

Nejprve byla vyvinuta pevná modulace rozpouštědlem (FSM). Tento typ modulace používá osmicestný dvoupolohový ventil s obtokovou kapilárou na obrázku 20. Frakce z první dimenze jsou plněny do smyček L1 a L2 a objem obtokové kapiláry určuje, do jaké míry jsou frakce ¹D zředěny s eluentem ²D v bodě A před vstupem do kolony ²D [28].

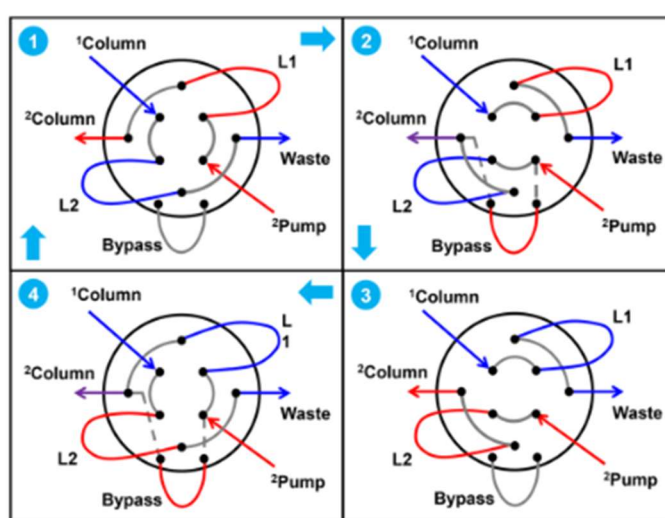


Obrázek 20: Pevná modulace rozpouštědlem [28]

Pevná modulace rozpouštědlem (FSM – fixed solvent modulation) má několik nedostatků. Mezi tyto nedostatky patří například, že tok pumpy druhé dimenze je dělen skrz smyčku a přítokovou kapiláru. Celkový průtok z čerpadla ²D je tak rozdělen do dvou cest a skutečný průtok je tedy nižší. Celkový průtok závisí na poměru, ve kterém je rozdělena smyčka a obtoková kapilára. Toto snížení průtoku má za následek kolísání nulové linie a pomalé ustálení toku před další analýzou. Tyto problémy lze vyřešit použitím aktivní modulace rozpouštědlem (ASM) [28].

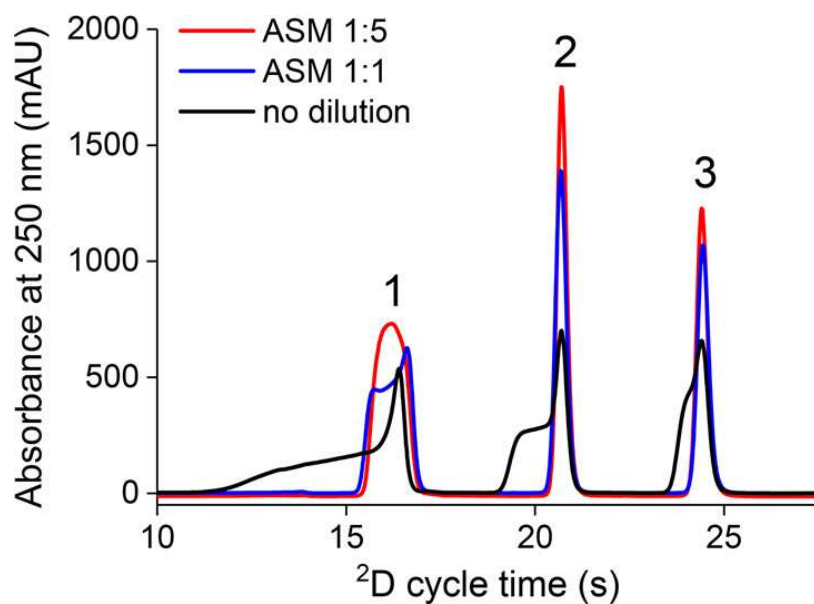
Aktivní modulace rozpouštědlem je metoda využívající osmicestný dvoupolohový ventil, který umožňuje ředit mobilní fázi z první dimenze rozpouštědlem ještě před nadávkováním do druhé dimenze. Výsledkem je přesnější a spolehlivější metoda, která pomáhá dosáhnout lepší separace látek [28].

Obrázek 21 znázorňuje ventil pro aktivní modulaci rozpouštědlem v systému 2D-LC, jedná se o upravený osmicestný ventil, který má čtyři polohy. Polohy 1 a 3 jsou funkčně shodné s polohami běžného osmicestného dvoupolohového ventilu. V polohách 2 a 4 je však část průtoku z ²D čerpadla rozdělena a prochází obtokovou kapilárou (bypass). Tato část toku se připojí k proudu kapaliny vystupující ze smyčky předtím, než směs opustí ventil a vstoupí do ²D kolony. Tímto způsobem tato rozdělená část ²D toku umožňuje zředit ¹D frakci dávkovanou do ²D kolony. Poté se modulátor přepne do pozice 1 nebo 3, tudíž nedochází k dělení průtoku jako u pevné modulace rozpouštědlem. Tento mechanismus umožňuje řídit přenos frakcí mezi dimenzemi a optimalizovat separaci [22, 28].



Obrázek 21: Aktivní modulace rozpouštědlem [28]

Na obrázku 23 jsou výsledky analýzy vzorku, který obsahuje 50 % acetonitrilu, dávkovaný objem je 80 μ l (odpovídající objemu vzorkovací smyčky) bez použití ASM (černá křivka) s ASM při ředění vzorku v poměru 1:1 (modrá křivka) a ředěním vzorku 1:5 (červená křivka). Vzorek je ředěn mobilní fází ²D obsahující 2 % ACN. Výsledky jasně ukazují, jak ASM zlepšuje detekční citlivost i rozlišovací schopnost separací ²D, zejména pokud dávkovaná frakce ¹D obsahuje více organické fáze než mobilní fáze ²D. Bez ASM jsou píky široké a nízké, zatímco s ASM jsou více symetrické, užší a výrazně vyšší [28]. Praktickým omezením ASM je čas potřebný k přemístění frakcí z ¹D kolony do ²D kolony, který u krátkých ²D časů může tvořit významnou část modulace, zatímco u delších modulačních časů to nepředstavuje problém. Vývoj aktivní modulace rozpouštědlem lze považovat za zásadní pokrok v detekční citlivosti pro 2D-LC techniky [22].



Obrázek 22: Využití ASM a jeho vliv na analýzu v 2D [28]

1.2.8 Využití 2D-LC

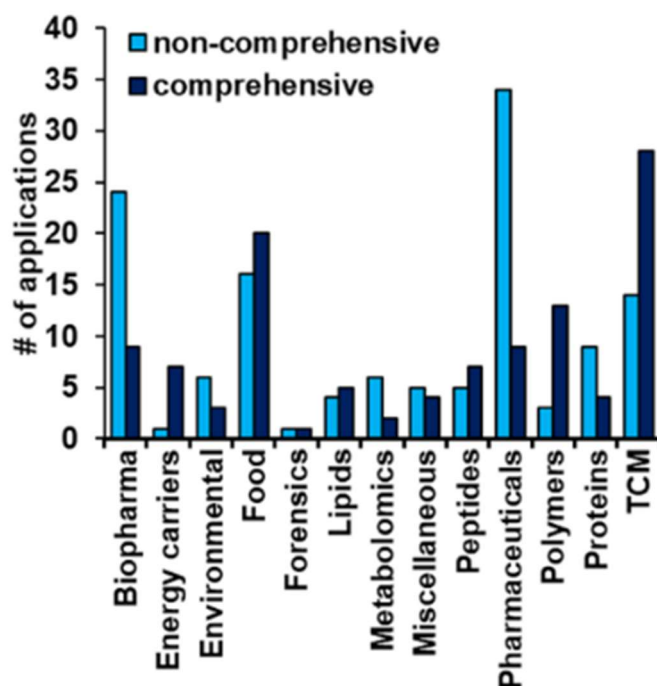
Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC) představuje pokročilou analytickou metodu nacházející uplatnění především v analýze vzorků s velkým počtem analytů s rozdílnými vlastnostmi. 2D-LC poskytuje bezkonkurenční píkovou kapacitu, umožňující rozlišení složek, které by v jednorozměrné analýze nebylo možné rozdělit [45].

2D-LC nabízí široké využití v různých oblastech. V biochemii tato technika umožňuje charakterizaci proteinů, peptidů a dalších biomolekul s vysokou citlivostí a rozlišením. Při analýze peptidů, proteinů a dalších látek s podobnými vlastnostmi se nejčastěji používá RP×RP, IEC×RP, případně chirální chromatografie nebo afinitní chromatografie v kombinaci s RP [22, 23].

Pomocí 2D-LC lze analyzovat řada látek, které spadají do tradiční čínské medicíny, a to konkrétně Ginkgo biloba nebo bufadienolidy v kůži ropuchy, které mají působit protinádorově [46—47]. V environmentální analýze se využívá výhod této metody k detekci stopových koncentrací polutantů v environmentálních maticích. V potravinářství slouží 2D-LC k podrobnému profilování složek potravin (např. karotenoidy a flavonoidy), identifikaci alergenů či detekci kontaminantů [22, 48]. V oblasti farmacie slouží k analýze léčiv, jejich nečistot a metabolitů [45]. U všech těchto aplikací se využívá nejčastěji RP×RP nebo RP×HILIC (HILIC×RP), a to díky vysoké píkové kapacitě, kompatibilitě mobilních fází a širokému výběru aplikací [23].

V neposlední řadě nachází 2D-LC uplatnění v analýze polymerů, kde se využívá SEC v kombinaci s RP i NP. Kombinace těchto separačních mechanismů poskytuje velkou ortogonalitu 2D systému, vykoupeno nižší píkovou kapacitou [22—23]. Díky své všestrannosti a separační síle se 2D-LC stala nepostradatelným nástrojem moderní analytické chemie napříč obory [45].

Graf na obrázku 23 znázorňuje využití dvourozměrné kapalinové chromatografie. Světle modrá barva označuje uspořádání, kde jsou do druhé dimenze převedeny pouze části první dimenze, zatímco tmavě modrá barva reprezentuje comprehensive 2D-LC. Comprehensive chromatografie nachází největší uplatnění v oblastech, jako je tradiční čínská medicína (TCM), analýza potravin či polymerů. Menší zastoupení má analýza léčiv (biofarmacie a farmacie) a výzkum bílkovin a peptidů (proteomika) [45].



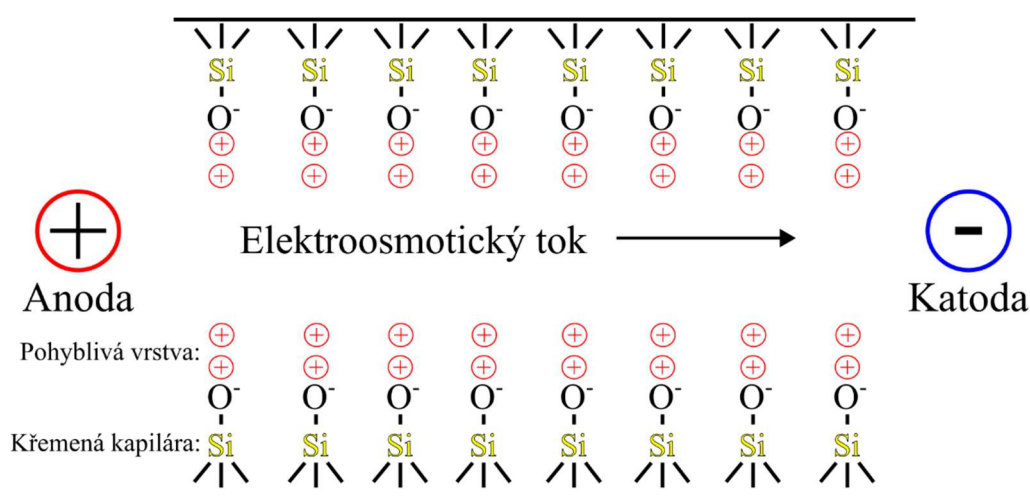
Obrázek 23: Využití 2D-LC [45]

1.3 Separační techniky v kapilární elektroforéze

Kapilární elektroforéza (CE) zahrnuje několik analytických metod využívajících různé fyzikálně-chemické principy k separaci látek při použití stejného zařízení s modifikací separačního pufru či parametrů kapiláry [49].

Mezi základní pojmy, které souvisí s elektromigračními metodami patří elektroforetická mobilita a elektroosmotický tok. K separaci látek během elektroforézy dochází díky různé rychlosti pohybu iontů v elektrickém poli. Tato rychlost závisí na elektroforetické mobilitě iontů a síle elektrického pole. Rychlost migrace analytu při kapilární elektroforéze závisí také na rychlosti elektroosmotického toku (EOF) [50—53].

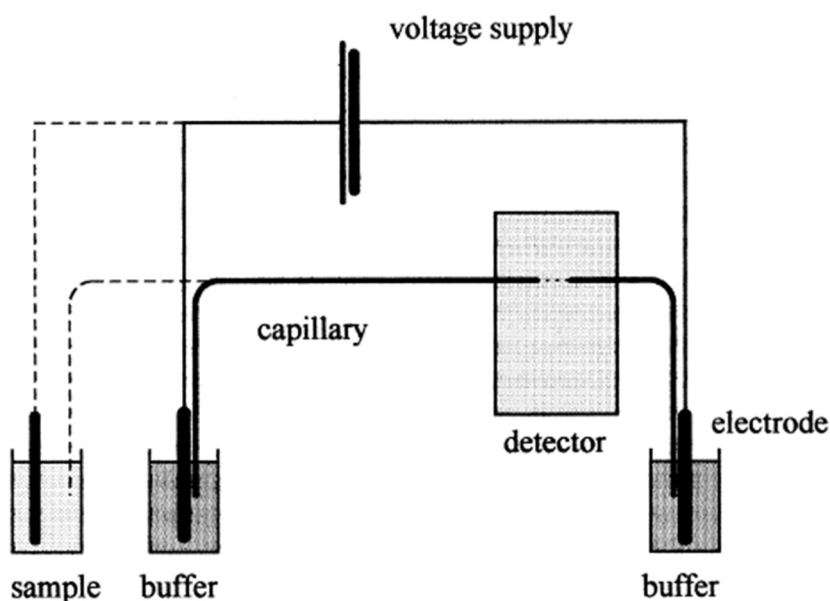
Elektroosmotický tok je klíčovým jevem v kapilární elektroforéze, při kterém dochází k pohybu celého roztoku kapilárou směrem ke katodě. EOF vzniká díky interakci mezi vnitřní stěnou křemenné kapiláry a roztokem s vhodným pH. Při pH vyšším než 3 dochází k ionizaci silanolových skupin ($-\text{SiOH}$) na stěně kapiláry na negativně nabitě silanoátové skupiny ($-\text{SiO}^-$) (obrázek 24). Tyto záporné náboje přitahují kationty z pufru, které vytvářejí tzv. elektrickou dvojrivrstvu. Po aplikaci elektrického pole se mobilní vrstva těchto kationtů začne pohybovat směrem ke katodě a strhává s sebou celý roztok. Tomuto jevu se říká elektroosmotický tok. Rychlost EOF je ovlivněna intenzitou elektrického pole, zeta potenciálem stěny kapiláry, viskozitou a permitivitou pufru [50—53].



Obrázek 24: Elektroosmotický proud v kapiláře

EOF významně ovlivňuje migraci analytů. Kationty se pohybují rychleji, protože EOF podporuje jejich pohyb, zatímco anionty EOF zpomaluje, a často je stále unáší ke katodě. V případech, kdy je nežádoucí silný EOF (např. při separaci aniontů nebo citlivých biomolekul), lze EOF potlačit pomocí úprav vnitřního povrchu kapiláry. Toho lze dosáhnout chemickou modifikací stěny, například vytvořením vrstvy polyakrylamidu, nebo dynamickými potahy pomocí polymerů či detergentů, které snižují nebo úplně eliminují tok pufru [50—53]. Na obrázku 25 je znázorněn velmi jednoduchý náčrt kapilární elektroforézy, tento obrázek slouží pro lepší představu o tom, jaký je princip elektroforézy a jak tento přístroj funguje.

Plné čáry vyjadřují separační podmínky, zatímco čerchované znázorňují dávkování vzorku. Tuto instrumentaci lze s mírnou obměnou (změna pufru nebo kapiláry) použít i pro další techniky využívající elektromigraci. Konkrétně lze na kapilárním elektroforetickém přístroji provádět kapilární zónovou elektroforézu (CZE), micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), kapilární elektrochromatografii (CEC), kapilární isoelektrické fokusování (CIEF), kapilární gelovou elektroforézu (CGE) a kapilární izotachoforézu (CITP) [49].



Obrázek 25: Nákres kapilární elektroforézy [49]

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je základní technikou, kde separace probíhá díky rozdílné elektroforetické mobilitě analytů v elektrolytu za vysokého napětí, přičemž efektivní odvod tepla umožňuje vysokou separační účinnost. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) umožňuje separaci i neutrálních látek pomocí micelárního činidla, které vytváří pseudostacionární fázi kombinující elektroforetickou mobilitu s chromatografickým rozdělováním. Kapilární elektrochromatografie (CEC) kombinuje principy CE a chromatografie použitím stacionární fáze v kapiláře s pohybem mobilní fáze zajištěným elektroosmotickým tokem. Kapilární izotachoforéza (CITP) využívá dva elektrolyty s odlišnou mobilitou, mezi nimiž analyty migrují v diskretních zónách, a slouží také jako prekoncentrační metoda [49].

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) se zaměřuje na separaci molekul dle velikosti využitím polymeru v kapiláře, což je vhodné pro analýzu biopolymerů. Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) separuje amfoterní látky podle isoelektrického bodu pomocí pH gradientu vytvořeného

v kapiláře[49]. Při používání dvou dimenzí se použití gelu většinou nekombinuje s jinými separačními technikami, na rozdíl od použití kapilár, kde je možné využít kapalinovou chromatografii v první dimenzi a kapilární elektroforézu v dimenzi druhé [54].

1.3.1 Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) je pokročilá technika v biochemii, která umožňuje separaci biomolekul na základě jejich izoelektrického bodu (pI). Tato metoda je založena na rozdílném izoelektrickém bodu látek. Nabité látky migrují v pH gradientu skrz kapiláru, dokud nedosáhnou svého isoelektrického bodu, při kterém je jejich celkový náboj nulový. IEF lze provádět v gelové matrici nebo kapiláře. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) je vhodnější pro kvantitativní analýzu díky automatizaci a citlivosti, zatímco gelová metoda se více využívá pro vizualizaci a přípravu vzorků pro další analýzy. Tato technika se běžně používá k analýze proteinů, peptidů a nukleových kyselin, čímž přispívá k porozumění jejich strukturním a funkčním vlastnostem. Tato metoda se nepoužívá pouze k separaci, ale také k fokusaci, používá se například v klinické diagnostice, proteomice či vývoji biofarmak [55—56].

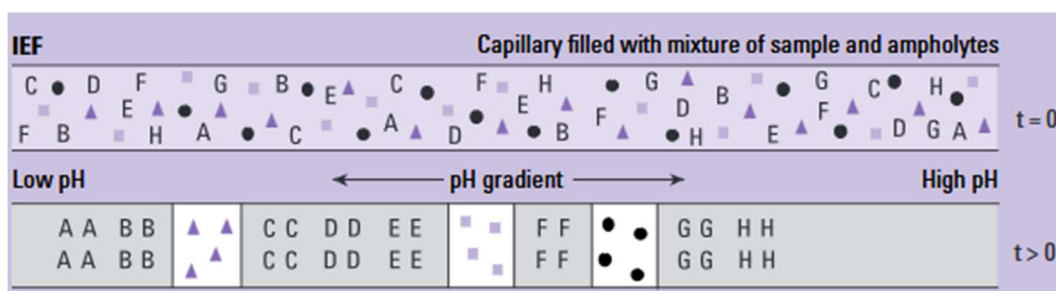
Izoelektrické fokusace je možné dosáhnout pomocí gelové matrice nebo kapiláry, jak už bylo zmíněno výše. V minulosti se poměrně hodně používala gelová matrice pro separaci proteinů, ale najdeme její využití i v současnosti. Nejčastěji se využívá polyakrylamidový gel nebo agarosové gely s přidavkem povrchově aktivního dodecylsírany sodného [57—59]. Gelová elektroforéza se používá jak v jednorozměrné separaci, tak ve dvoudimenzionálním uspořádání, což poskytuje velmi dobré rozlišení. Migrace proteinů poskytuje informaci o molekulové hmotnosti a izoelektrické bodu látky. Další výhodou gelu je, že látky lze vyjmout a použít k další analýze, případně je skladovat. Použití gelu má ovšem i řadu nevýhod jako je dlouhá doba separace a příprava gelu, také je poměrně náročná izolace a detekce jednotlivých analytů [57, 59—61].

1.3.1.1 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace je technika s velmi vysokou rozlišovací schopností, jak už bylo zmíněno a používá se především pro separaci proteinů, peptidů a dalších látek na základě isoelektrických bodů.

V této technice se využívá gradient pH, který je vytvořen v kapiláře pomocí pufrů za aplikace elektrického potenciálu. Jako pufrů se často používají amfolyty [62—63].

Amfolyty jsou molekuly, které obsahují jak kyselou i zásaditou část a mohou mít hodnoty pI v požadovaném rozmezí pH (například pH 3—9). Poté co je kapilára naplněna směsí vzorku a pufru se vytvoří pH gradient. Zásaditý roztok na katodě a kyselý roztok na anodě způsobí, že po aplikaci elektrického pole začnou látky migrovat skrz kapiláru, dokud nedosáhnou svého isoelektrického bodu, kde je jejich náboj nulový. Tomuto procesu se říká fokusace (látky se rozdělí do úzkých zón), který můžeme vidět na obrázku 26 [56].



Obrázek 26: Isoelektrická fokusace v kapiláře[56]

Po dokončení fokusace je nutné přesunout rozdělené zóny analyzovaných látek směrem k detektoru, tento proces se nazývá mobilizace. K mobilizaci lze využít tři různé přístupy: elektroforetickou (chemickou) mobilizaci, mobilizaci založenou na elektroosmotickém jevu a mobilizaci pomocí tlaku [62—63]. Jednotlivé způsoby přesunutí analytů významně ovlivňují separační účinnost a kvalitu získaných výsledků.

Chemická mobilizace se osvědčila jako účinná metoda zvyšující separační výkonnost především díky své schopnosti udržovat stabilní chemické prostředí, což je zásadní při analýze proteinů a podobných látek. Funguje na principu změny složení elektrolytů, což naruší původní pH gradient a způsobí elektroforetický pohyb proteinů směrem k jedné elektrodě. Pro většinu běžných aplikací postačí katodická mobilizace pomocí NaCl, ale pro přesné analýzy nebo kyselé proteiny se používá zwitterionová mobilizace [64].

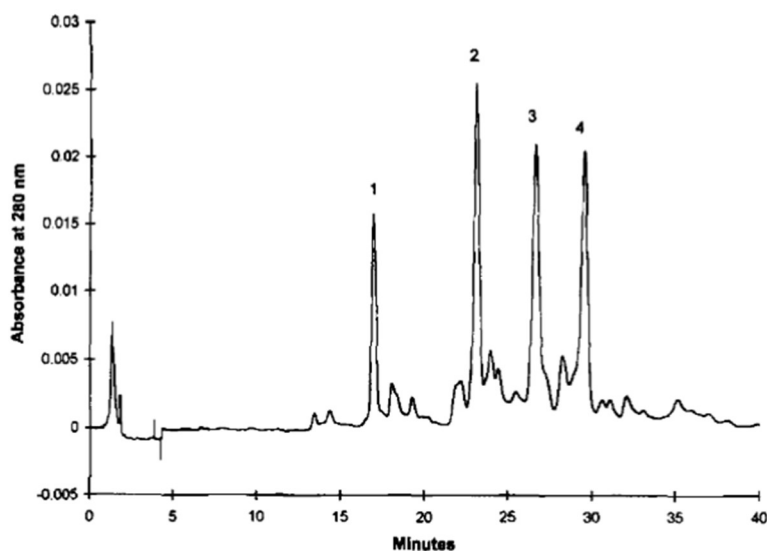
Alternativní přístup představuje hydrodynamická mobilizace založená na působení tlaku. Ačkoliv lze parametry této metody upravovat pomocí změn tlaku, vyžaduje pečlivou kontrolu, neboť nedostatečná regulace může vést k nežádoucímu rozšiřování píků [55]. Další možností mobilizace je využití elektroforetického toku k pohybu analytů. Tato technika vykazuje vysokou účinnost zejména v kombinaci s chemickou mobilizací, což vede k minimalizaci nežádoucí disperze vzorku [65].

Kapilární izoelektrickou fokusaci můžeme rozdělit na dva základní typy, a to jednokrokovou CIEF a dvou krokovou CIEF. Jednokroková CIEF kombinuje fokusaci i mobilizaci do jednoho kroku. Vzorek se zavede do kapiláry, kde se pod elektrickým polem složky soustředí do úzkých zón dle jejich izoelektrického bodu. Poté jsou mobilizovány k detektoru pomocí elektroosmotického toku. Výhodou je rychlost a jednoduchost, nevýhodou možné rozšíření píků vlivem difuze, což snižuje rozlišení [62—63].

Při použití dvou krokové CIEF je fokusace a mobilizace oddělena. Nejprve probíhá fokusace, kdy se složky ustálí na svých *pI*. Následně je vzorek mobilizován (např. tlakem či chemicky) k detektoru. Tato metoda poskytuje vyšší rozlišení a lepší opakovatelnost, ale je složitější a časově náročnější [62—63].

Použití jednotlivých metod závisí na požadavcích analýzy, přičemž dvou kroková CIEF je preferována v případech, kdy je zásadní vysoká separační účinnost a přesnost výsledků [62—63].

Během analýz je možné využít vysokého napětí, které bývá 10—30 kV, tedy hodnota elektrického pole v kapiláře je 100—700 V/cm [56, 62]. Čas migrace analytů je povětšinou v řádu desítek minut. Na obrázku 27 je příklad analýzy, můžeme vidět rozdělení 4 typů hemoglobinu, byla použita jednokroková CIEF, napětí 15 kV a separace trvala 240 sekund [62].



Obrázek 27: Kapilární isoelektrická fokusace hemoglobinu [62]

Pufry

Pro účinnou separaci a vysoké rozlišení je volba pufru v kapilární isoelektrické fokusaci naprosto zásadní. Bez pufru by nebylo možné dosáhnout izoelektrické fokusace. Často se používají amfolytické pufry a tzv. Goodovy pufry, poté pufry s nízkým pH, syntetické pufry a makromolekulární pufry. Mezi společné vlastnosti těchto látek patří schopnost ovlivňovat pH gradient a zlepšení celkového rozlišení proteinů a peptidů během separace [66—70].

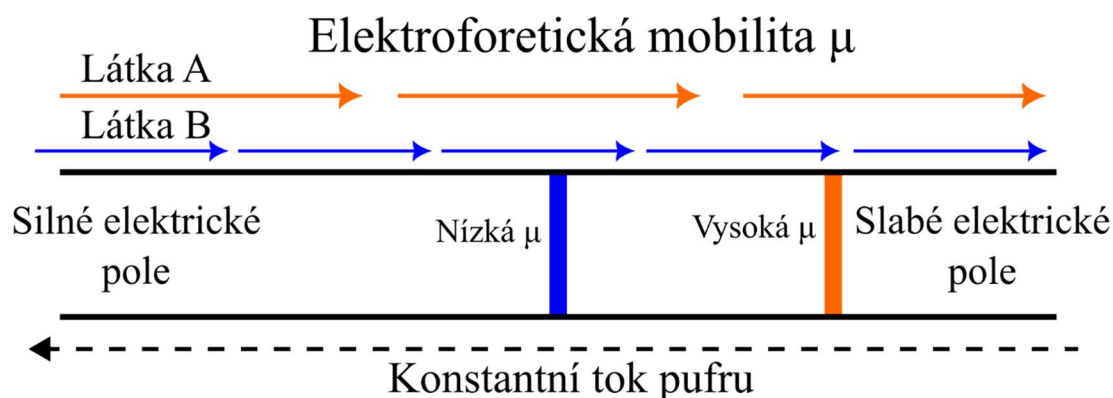
Amfolytické pufry se běžně používají v CIEF díky své schopnosti udržovat stabilní pH gradient. Příkladem je mravenčan amonný, hydroxid amonný, histidin a arginin, které se používají pro své iontové a amfoterní vlastnosti [68].

Goodovy pufry, mezi které patří CAPS (3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonová kyselina), představují skupinu látek ceněných pro jejich schopnost rozpouštět biomolekuly, podporovat enzymovou aktivitu a zachovávat stabilitu bílkovin [67, 70—71].

Další skupinou jsou pufry s nízkým pH převážně kyseliny, které poltačují silanolovou ionizaci a snižují interakci makromolekul se stěnami kapilár, což umožňuje gradienty vysokého napětí pro rychlou analýzu. Mezi tyto pufry patří kyselina cysteová, kyselina iminodioxová, kyselina asparagová a kyselina glutamová [66].

1.4 Fokusace pomocí gradientu elektrického pole

Fokusace gradientem elektrického pole (EFGF) je účinná analytická technika pro separaci a koncentraci nabitých analytů, zejména proteinů. Na obrázku 28 je princip metody, který využívá gradient elektrického pole. Nabité látky migrují proti hydrodynamickému toku pufru. Pokud elektroforetická pohyblivost látek má stejnou sílu jako proud pufru dojde k zakoncetrování analytů do úzkých pásů. Pomocí této metody lze nabité látky zakoncetrovat a rozdělit dle jejich elektroforetické mobility [72].



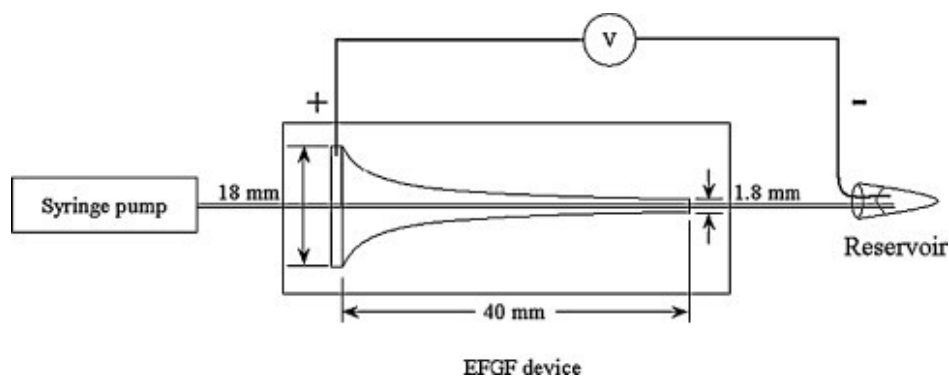
Obrázek 28: Princip fokusace gradientem elektrického pole

EFGF nabízí několik potenciálních výhod oproti tradičním separačním technikám. Hlavním přínosem je schopnost simultánní separace a koncentrace analytů, přičemž byly experimentálně dosaženy koncentrační faktory až 14 000 [73]. EFGF lze použít na jakékoliv nabitě molekuly, nikoliv pouze na amfoterní, jak je tomu u izoelektrické fokusace (IEF). Umožňuje tak analýzu proteinů s vysokými hodnotami izoelektrického bodu, které jsou pro IEF obtížně separovatelné [72].

Další výhodou je, že objem vzorku není limitován vnitřním objemem zařízení, protože je možné kontinuální zavádění vzorku, což způsobuje vyšší zakoncentrování látek [72].

Nevýhody EFGF souvisejí především instrumentací přístroje. Jednou z hlavních komplikací je dosažení stabilního a lineárního gradientu elektrického pole, které je pro účinnou fokusaci zcela zásadní. Bylo zjištěno, že nahrazení Tris-HCl pufru fosfátovým pufrem obsahujícím KCl v hydrogelu vedlo ke zlepšení stability proudu a tvaru gradientu [73]. Dalším omezením je složitá konstrukce zařízení, zejména pokud je nutné přidat iontově propustné membrány nebo hydrogelové vrstvy, což ztěžuje reprodukovatelnost výroby [72].

Na obrázku 29 je schéma přístroje pro fokusaci pomocí gradientu elektrického pole [73].



Obrázek 29: Schéma přístroje pro fokusaci gradientu elektrického proudu [73]

Gradient elektrického pole lze vytvářet několika způsoby. Nejstarší metodou je změna průřezu separačního kanálu, často kombinovaná s polopropustnou membránou, která zajišťuje iontovou výměnu, ale omezuje pohyb proteinů [72]. Alternativně lze využít gradient vodivosti vytvořený difuzí mezi pufrů s různou iontovou silou. Dále je možné vytvořit gradient pomocí elektrod umožňující digitální řízení gradientu. Elektrody jsou umístěny podél kanálu a vytvářejí kontrolované elektrické pole. Každá elektroda je individuálně řízena počítačem, což umožňuje vytvářet specifické gradienty napětí, které ovlivňují separaci analytů. Elektrody nejsou v přímém kontaktu s analyty, což zajišťuje použitím membrány, která je odděluje od separačního prostoru. Tato metoda je flexibilní, protože umožňuje dynamicky měnit gradient během analýzy, což zlepšuje rozlišení mezi zónami analytů. Poslední způsob vytvoření gradientu je pomocí teploty, který využívá závislost vodivosti pufru na teplotě k vytvoření elektrického gradientu bez potřeby membrán [72—73].

Využití EFGF je poměrně široké, zejména v oblasti bioanalytické chemie. Kromě extrémního obohacování proteinových vzorků lze touto metodou efektivně separovat druhy látek s velmi podobnou elektroforetickou pohyblivostí. EFGF, především s použitím gradientu vytvořeného pomocí teploty, byla úspěšně použita při DNA hybridizačních testech, kde umožnila detekci hybridizace DNA i peptidové nukleové kyseliny a identifikaci jednobázových záměn. Zajímavou aplikací je také separace enantiomerů, což naznačuje potenciál této metody pro chirální analýzu [72].

EFGF představuje perspektivní separační a koncentrační techniku s potenciálem pro širokou aplikaci. Další vývoj by měl směřovat k zjednodušení konstrukce a zlepšení reprodukovatelnosti, aby bylo možné plně využít teoretický potenciál této metody v chemické a bioanalytické praxi [72—73].

2 Experimentální část

2.1 Přístroje a zařízení

Během experimentu byly používány tyto pomůcky a zařízení:

- **dvoudimenzionální kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity** (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), části přístroje: automatický dávkovač vzorku, kapilární čerpadlo pro první dimenzi, ultra-vysokotlaké čerpadlo pro druhou dimenzi, termostat kolon, UV/VIS detektor diodového pole, osmicestný dvoupolohový ventil
- **kolona:** Chromolith High Resolution, RP 18e (50x4,6 mm); U18438/107, (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- **kapilární elektroforéza Agilent 7100** (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), části přístroje: tlakové čerpadlo, 2 platinové elektrody, křemenné kapiláry potažené polyimidem o vnitřním průměru 75 μm a délce 120 cm (25 cm k detekčnímu okénku), detektor diodového pole
- **třísmýčkový modulátor** obsahující jeden dvanácticestný dvoupolohový ventil, dva deseticestné dvoupolohové ventily a tři smyčky o objemu 4,5 μl s vnitřním průměrem 0,12 mm (Valco Instruments Co. Inc., Houston, USA)
- počítač s programem Python na přepínání ventilů
- **osmicestný dvoupolohový ventil** vyrobený z nevodivého materiálu PEEK (polyetheretherketon) pro propojení kapilární elektroforézy s třísmýčkovým modulátorem (Valco Instruments Co. Inc., Houston, USA)
- **2×Injekční pumpa NE-1000X** (Labicom s.r.o., Praha, Česká republika)
- **Hamilton stříkačky 1725 RNR** o objemu 250 μl , 100 μl a 25 μl (Chromservis, Praha 10 – Petrovice, Česká republika)
- **analytické váhy Kern ABT 220-4M** (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika)
- **ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex TK 52** (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlín, Německo)
- **automatické pipety Eppendorf Research** (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- **IKA® Vortex 1** (VWR International, Stříbrná Skalice, Česká republika)
- **zařízení na výrobu ultračisté vody Milli-Q® Direct** (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- **pH-metr CG 842** (Schott Geräte GmbH, Hofheim, Německo)

- magnetické míchadlo IKA Big Squid White (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Německo)
- laboratorní nádobí a pomůcky

2.2 Chemikálie

- ultračistá voda pro HPLC připravená zařízením Milli-Q® Direct
- acetonitril o čistotě $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina mravenčí o čistotě $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- plynný dusík o čistotě 4.6 (Linde Gas a.s., Praha 9 – Kyje, Česká republika)
- kyselina boritá o koncentraci 0,075 mol/l jejíž pH bylo 1 M NaOH upraveno na hodnotu pH 9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- standardy fenolických kyselin: kyselina protokatechová, kyselina syringová, kyselina *p*-kumarová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2.3 Software

Experimentální data z kapalinového chromatografu byla získána za použití softwaru Agilent OpenLab ChemStation od společnosti Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Ovládání kapilární elektroforézy bylo realizováno prostřednictvím stejného softwaru Agilent. Ovládání kapilární elektroforézy bylo realizováno prostřednictvím softwaru Agilent OpenLab ChemStation. Třismyčkový modulátor byl řízen pomocí kódu napsaného v jazyce Python, jehož autorem je doc. Česla (Python Software Foundation License). Výpočty byly provedeny v programu Microsoft Excel 365 (Microsoft, Redmond, USA). Text diplomové práce byl sepsán v aplikaci Microsoft Word 365 (Microsoft, Redmond, USA).

2.4 Podmínky ²D separace

Během analýzy v ²D byla použita mobilní fáze, která obsahovala 15 % acetonitrilu a 85 % ultračisté vody. Nejprve byla analýza v druhé dimenzi testována za použití kolony (Chromolith High Resolution) při průtoku 1,6 ml/min, následně bez kolony za průtoku 0,2 ml/min. Vlnové délky pro DAD (256, 280, 300 nm) byly vybrány dle absorpčních spekter analyzovaných fenolických kyselin v příloze 1 (kyselina protokatechová, kyselina syringová, kyselina *p*-kumarová).

2.5 Podmínky fokusace pomocí kapilární elektroforézy

Fokusace v kapiláře elektroforézy probíhala v několika krocích. Prvním krokem bylo přesunutí frakce do kapiláry. Následně byl otočen deseticestný dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu PEEK do polohy 1-8, aby mohlo dojít k propojení systému. V plastové vialce s pufrem byla umístěna křemenná kapilára a platinový drátek, aby mohl být spojen obvod. Když byla kapilára naplněna pufrem a obsahovala frakci, mohla být provedena fokusace. Fokusace byla prováděna za podmínek popsanych v tabulce 7. Celková délka použité kapiláry byla 120 cm a délka kapiláry k okénku detektoru byla 25 cm.

Tabulka 6: Podmínky při fokusaci v kapilární elektroforéze

Sledované vlnové délky DAD detektoru [nm]	254, 280
Napětí [kV]	-20
Čas aplikace napětí [s]	240
Pufr H₃BO₃ [mM]	75
Max. Proud [μA]	50
Max. Výkon [W]	6

2.6 Pracovní postupy

2.6.1 Příprava vzorku

Během celého měření byl používán roztok standardů fenolických kyselin (kyselina protokatechová, kyselina syringová, kyselina *p*-kumarová) o různé koncentraci. Nejprve byla použita kyselina protokatechová a kyselina *p*-kumarová, ale bylo zjištěno, že kyselina *p*-kumarová se rozkládá (výskyt dvou píků v chromatogramu místo jednoho), tudíž tato kyselina byla nahrazena standardem kyseliny syringové.

Roztok kyseliny protokatechové a kyseliny syringové byl připraven navážením cca 5 mg od každé kyseliny do tmavé vialky. Navážka byla rozpuštěna ve směsi 6 ml vody a 4 ml methanolu. Pro lepší rozpuštění byl roztok ponořen na 2 minuty do ultrazvukové lázně. Roztok byl poté uchováván v chladničce.

Pro měření, která byla prováděna pomocí kapilární elektroforézy byl použit neředěný roztok, pro měření na kapalinovém chromatografu byl tento roztok 10× zředěn.

2.6.2 Příprava pufrů

Pro fokusaci frakce v kapilární elektroforéze bylo nutné připravit pufr kyseliny borité o koncentraci 75 mM o pH 9 [74].

Na přípravu 100 ml roztoku 75 mM kyseliny borité bylo naváženo 0,4637 g kyseliny borité. Poté byla kyselina kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku. Následně byla odměrná baňka umístěna na 2 minuty do ultrazvuku. Roztok kyseliny borité byl přelit do kádinky s magnetickým míchadlem a pomocí pH metru bylo měřeno pH roztoku. Do roztoku byl pomocí pipety přidáván 1M hydroxid sodný až do dosažení pH 9. Roztok byl přelit do odměrné nádoby a uzavřený uchováván v chladničce.

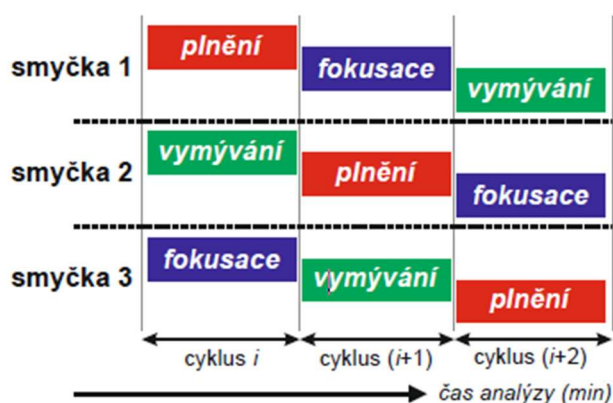
Fokusace byla prováděna i v silnějším pufru a to konkrétně 175 mM roztoku kyseliny borité o pH 9. Na přípravu 100 ml roztoku 175 mM kyseliny borité bylo naváženo 1,0820 g kyseliny borité. Zbytek pracovního postupu je totožný jako při přípravě 100 ml 75 mM roztoku kyseliny borité o pH 9.

3 Výsledky a diskuse

Celá experimentální část byla prováděna pomocí třísmyčkového modulátoru (TSM). Tento modulátor byl vyvinut pro dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii s cílem zlepšení procesu převodu frakcí z první do druhé dimenze.

3.1 Třísmyčkový modulátor

Třísmyčkový modulátor je rozhraní mezi první a druhou dimenzí, které se skládá z jednoho dvanácticestného dvoupolohového ventilu a dvou deseticestných dvoupolohových ventilů se třemi identickými zachytávacími smyčkami. Modulátor lze přepínat mezi třemi polohami, kde postupně dochází k plnění, fokusaci a vymývání do 2D každé ze smyček. Střídání smyček je zobrazeno na obrázku 30, kde jednotlivé sloupce odpovídají pozicím TSM. První sloupec (obrázek 30) odpovídá pozici 1 (obrázek 31). V pozici 1 TSM je tedy smyčka 1 plněna frakcí z 1D , smyčka 2 vymývána do 2D a smyčka 3 fokusována v kapilární elektroforéze.



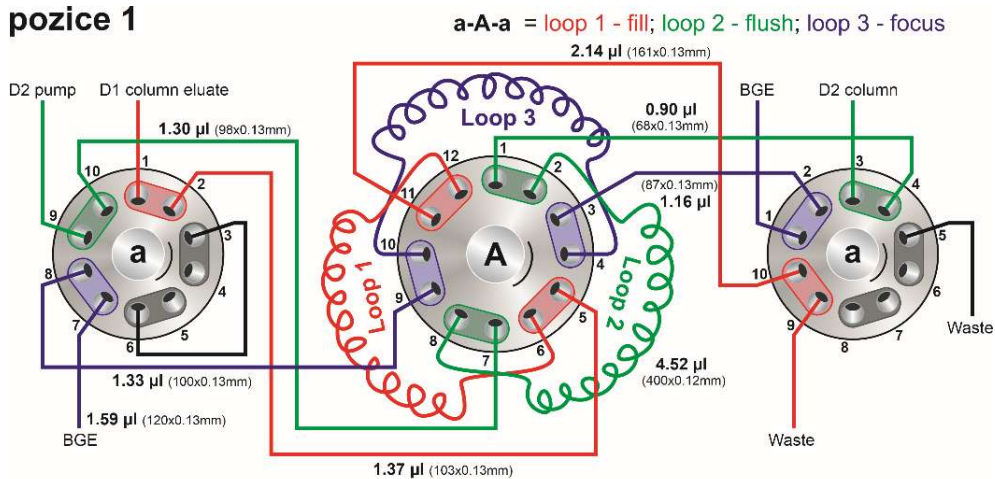
Obrázek 30: Střídání jednotlivých cyklů třísmyčkového modulátoru [74]

Vzhledem ke konstrukci TSM je možné využít jednu ze smyček k fokusaci frakce. Tato úprava frakce (fokusace) má potenciál zlepšit analýzu v 2D . Během fokusace se látky zakoncentrují do úzké zóny a je možné očekávat toto zúžení i v 2D . Fokusace funguje na principu pohybu nabitých analytů migrujících vlivem elektrického pole a elektroosmózy.

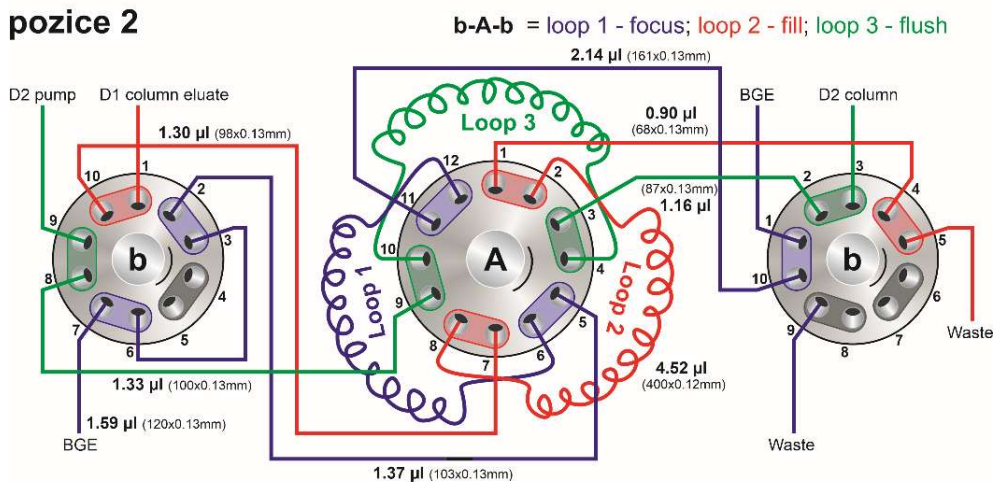
Funkci TSM lépe popisuje obrázek 31 na kterém je schematicky znázorněno, které spojovací kapiláry se používají, v jaké pozici. Písmeny A, B je naznačeno střídání poloh ventilů. V pozici 1 (Obrázek 31) je plněna smyčka 1 eluátem z první dimenze, zatímco smyčka 2 je vymývána do druhé dimenze a smyčka 3 je přesunuta do kapilární elektroforézy, kde probíhá fokusace a následně je přemístěna zpět do smyčky 3. Poté je modulátor otočen do pozice 2 (Obrázek 31), kde dochází k plnění smyčky 2 eluátem z první dimenze, zatímco je smyčka 3 fokusována a smyčka 1 je analyzována v druhé dimenzi.

Poté je modulátor otočen do pozice 3 (Obrázek 31). V této pozici je plněna eluátem ¹D smyčka 3, smyčka 1 je analyzována v ²D a smyčka 2 je fokusována. Tyto 3 pozice se střídají po celou dobu analýzy za předpokladu, že se jedná o comprehensive 2D-LC.

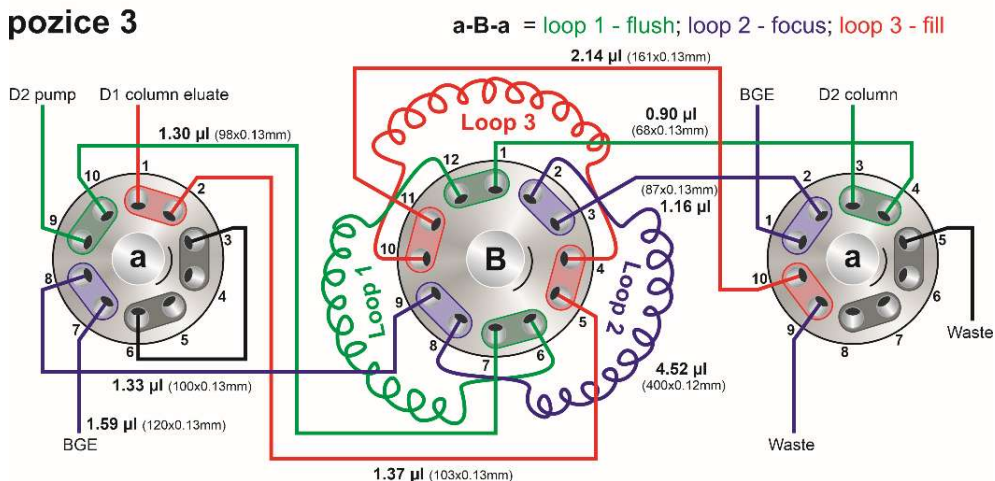
pozice 1



pozice 2



pozice 3



Obrázek 31: Schéma TSM v pozicích 1, 2 a 3 s rozměry jednotlivých kapilár

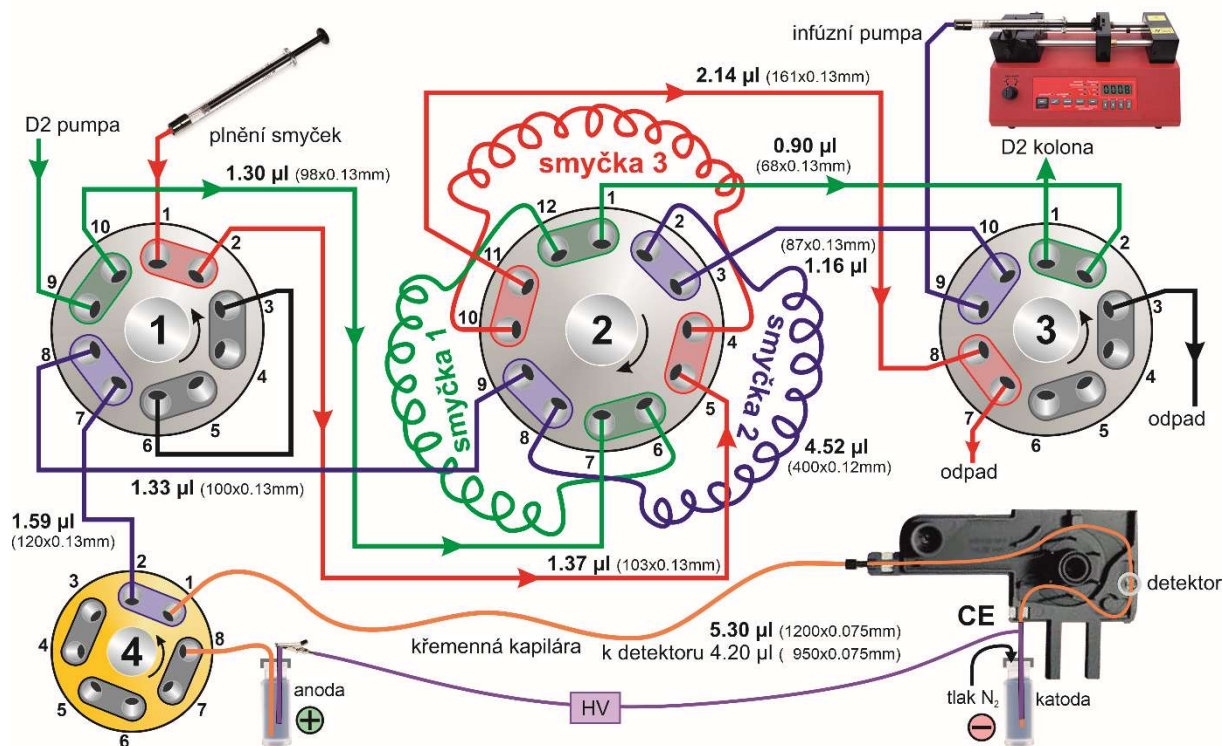
V experimentální části práce byl optimalizován přenos frakce z první dimenze kapalinové chromatografie do kapilární elektroforézy, poté provedení fokusace, přenesení frakce zpět do smyčky modulátoru a analyzování frakce v druhé dimenzi. Konkrétně se jednalo o tyto kroky:

1. Nalézt vhodný objem a průtok pro přesunutí frakce ze smyčky modulátoru do kapiláry elektroforézy, aby mohlo proběhnout zafokusování celé frakce.
2. Provedení fokusace v kapiláře elektroforézy.
3. Nalézt vhodný způsob přesunutí zafokusované frakce zpět do smyčky modulátoru. Velmi důležité je vybrat stabilní opakovatelný a reprodukovatelný způsob s optimálním časem přesunu frakce. Také je zásadní pokusit se zpět do smyčky přesunout co největší část frakce a prověřit množství frakce ve smyčce. Posledním krokem je nadávkovat zafokusovanou frakci pomocí nalezených parametrů do druhé dimenze a pokusit se zhodnotit přínos fokusace pro analýzu v druhé dimenzi.

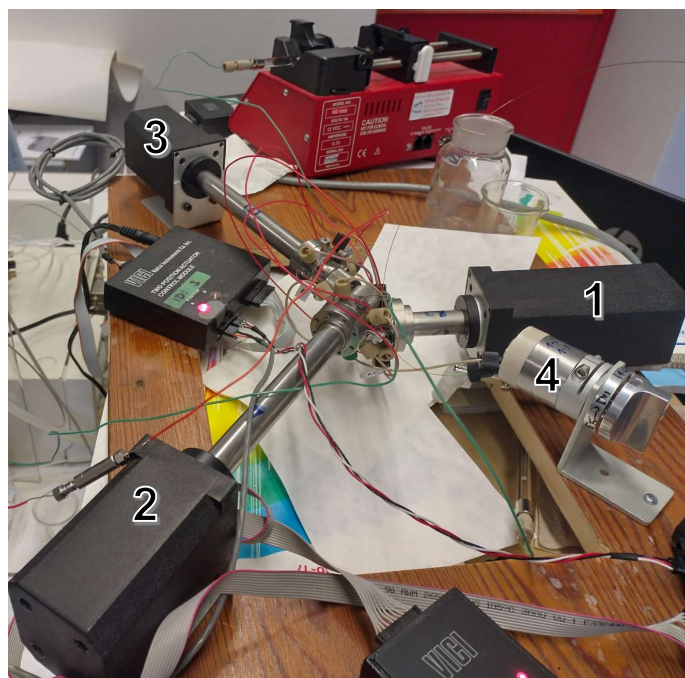
3.2 Zapojení TSM a kapilární elektroforézy

Nejprve bylo nutné optimalizovat jednotlivé kroky, které se budou v budoucnu provádět automaticky. K testování jednoho cyklu modulátoru byla vybrána smyčka 2, na simulaci plnění smyčky z ¹D byla použita stříkačka se vzorkem standardů fenolických kyselin viz kapitola 2.6.1. Po naplnění smyčky 2 vzorkem byl modulátor otočen do pozice 3, kdy pomocí injekční pumpy byla frakce přesunuta do kapilární elektroforézy. Poté byl otočen osmicestý dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu PEEK, aby vzniklo vodivé propojení mezi elektrodami. Ty jsou napájené pomocí zdroje vysokého napětí v kapilární elektroforéze. Dalším krokem byla samotná fokusace. Podmínky fokusace jsou sepsány v kapitole 2.5. Po provedení fokusace byla frakce převedena zpět do smyčky 2 a nadávkována do ²D. Podmínky analýzy v ²D jsou uvedeny v kapitole 2.4. V ²D byla vrácená frakce rozdělena pomocí kolony případně pouze přesunuta k detektoru. Jednotlivé kroky bylo nutné optimalizovat postupně a budou vysvětleny v následujících kapitolách.

Uspořádání celkového zapojení je na obrázku 32, modulátor je v pozici 3, tudíž frakce ze smyčky 2 je fokusována v kapilární elektroforéze. Na obrázku 33 je fotografie reálného zapojení TSM s popisky ventilů stejnými jako na obrázku 32.



Obrázek 32: Schéma TSM se zapojením kapilární elektroforézy a ventilem 4 (PEEK), 1: desetistupňový dvoupolohový ventil, 2: dvanáctistupňový dvoupolohový ventil, 3: desetistupňový dvoupolohový ventil, 4: osmicestný dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu (PEEK) D2: druhá dimenze

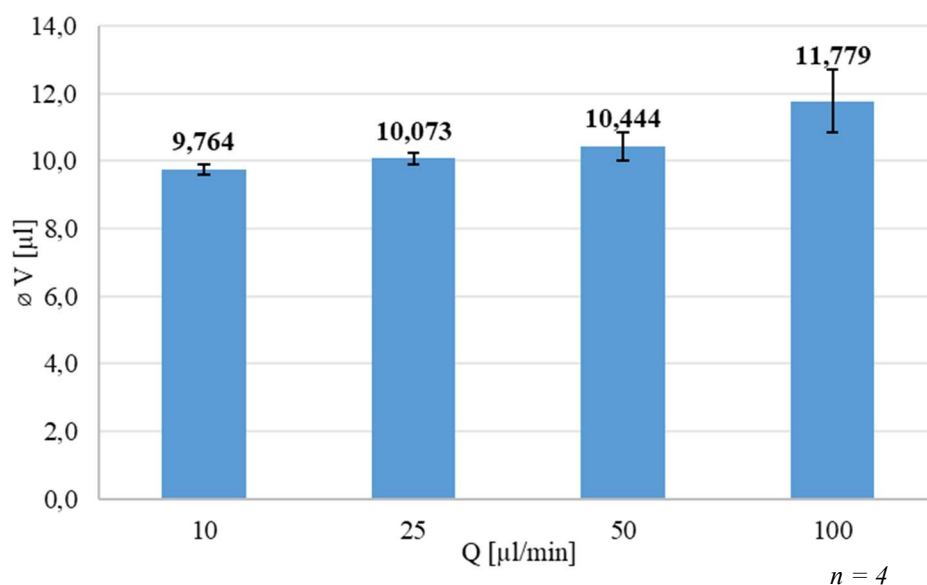


Obrázek 33: Fotografie reálného zapojení třísmyčkového modulátoru, 1: desetistupňový dvoupolohový ventil, 2: dvanáctistupňový dvoupolohový ventil, 3: desetistupňový dvoupolohový ventil, 4: osmicestný dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu (PEEK)

3.3 Přesun frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy

Prvním krokem bylo najít vhodnou metodu a podmínky pro přesun frakce ze smyčky 2 do kapiláry elektroforézy. K vytlačení frakce ze smyčky 2 do kapiláry elektroforézy byla použita injekční pumpa, na které lze nastavit libovolný průtok a objem, který bude tímto průtokem a objemem vytlačen. Přesunutí frakce by nemělo trvat příliš dlouho, aby bylo možné frakci zafokusovat než dojde k přepnutí pozice TSM. Nejprve byl hledán vhodný průtok pro vytlačení frakce ze smyčky 2 do kapiláry elektroforézy. Pro správnou fokusaci je zásadní, aby v kapiláře elektroforézy byla přesunuta celá frakce. Proto dalším krokem bylo nalézt vhodný objem, který přesune frakci, a to pomocí detektoru kapilární elektroforézy. Celková délka křemenné kapiláry byla 115,4 cm, délka kapiláry k okénku detektoru CE byla 24 cm.

Měření probíhalo tak, že TSM byl přepnut do pozice 2, kde byla smyčka 2 naplněna neředěným vzorkem standardů fenolických kyselin. Dalším krokem bylo přepnutí TSM do pozice 3, tedy stejně jako na obrázku 32. Následně byl zapnut průtok injekční pumpy a stopky. Vždy, když se v detektoru kapilární elektroforézy (CE) objevil signál, byly stopky zastaveny. Naměřené časy byly přepočteny na objemy kvůli nastavení správného objemu na injekční pumpě pro přesun frakce ze smyčky 2 do kapiláry elektroforézy. Na obrázku 34 je graf, kde byl sledován signál v detektoru CE při použití různých průtoků (Q). Na ose y jsou objemy spočtené z naměřeného času. Tyto objemy bylo použito pro přesun frakce k okénku detektoru. Všechna naměřená data pro tuto kapitolu jsou v příloze 2.



Obrázek 34: Závislost použitého průtoku na objemu, který přesunul frakci k okénku detektoru CE

Objem potřebný pro přesunutí vzorku k detektoru kapilární elektroforézy se pohyboval okolo hodnoty 9,764 μl , protože při vyšších průtocích byl do kapiláry za kratší čas natlačen větší objem, než je nutné k zobrazení signálu v detektoru. U každého průměru je chybovou úsečkou vyjádřena směrodatná odchylka, s vyšším průtokem se zvyšovala i směrodatná odchylka. Nestabilita byla výrazná hlavně u průtoků 50 a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pro další měření byl vybrán průtok 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, protože čas přesunutí frakce se pohybuje okolo 30 s. Při průtoku 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ přesunutí frakce do kapiláry elektroforézy trvalo skoro minutu.

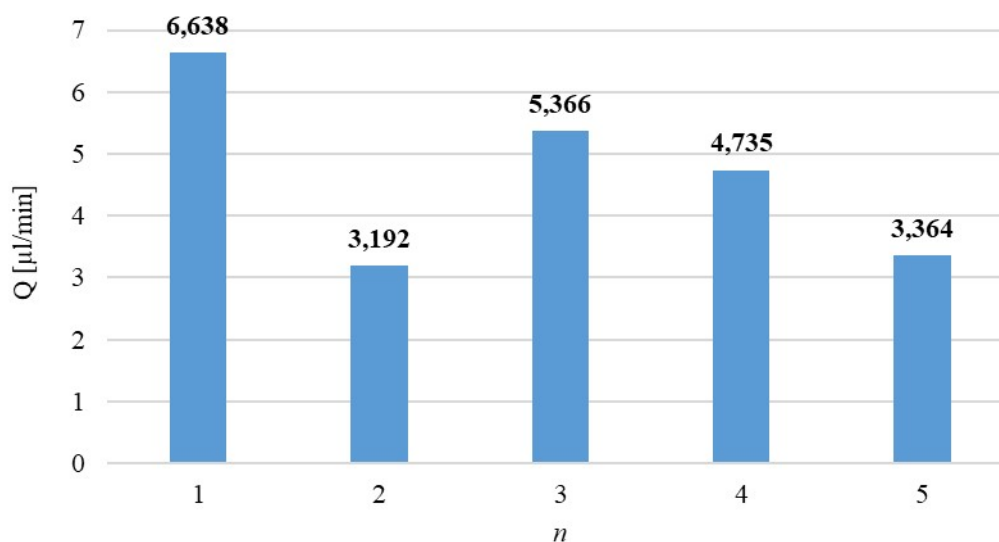
Dalším krokem bylo nalézt vhodný objem, který by přesunul frakci ze smyčky 2 do kapiláry elektroforézy. Frakce musí být v kapiláře celá a nesmí dojít k vytlačení frakce do odpadu, proto byl opět použit detektor CE pro určení správného objemu. Za okénkem detektoru je ještě 24 cm (1,06 μl), než je vzorek vytlačen do odpadu. Při průtoku 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ byly na injekční pumpě nastaveny různé objemy k vytlačení (8,25–10 μl). Objem byl snižován, dokud byl detekován signál v okénku detektoru. Odezva detektoru se neobjevila až při objemu 8,25 μl , protože frakce nebyla přemístěna až k okénku detektoru CE. Pro vytlačení frakce do kapiláry elektroforézy byl vybrán objem 8,5 μl . Tento objem byl nejvhodnější, protože v detektoru byl vidět signál frakce, tedy zde bylo potvrzení, že frakce byla přesunuta celá do kapiláry elektroforézy. Výsledky tohoto měření jsou shrnuty v příloze 2.

3.4 Vrácení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky

Po úpravě (fokusaci) frakce musí být vrácena zpět do smyčky 2, a to pokud možno tak, aby se celá nacházela opět ve smyčce 2. Frakce musí být vrácena do smyčky 2, aby mohla být nadávkována do ^2D . Pro vrácení frakce z kapiláry elektroforézy byla použita vzduchová pumpa, která je součástí kapilární elektroforézy a tlak dusíku připojený k elektroforéze. Obě možnosti generují tlak na vialku v CE, ve které je umístěn jeden konec kapiláry. Díky aplikaci tlaku dochází k posunu kapaliny kapilárou.

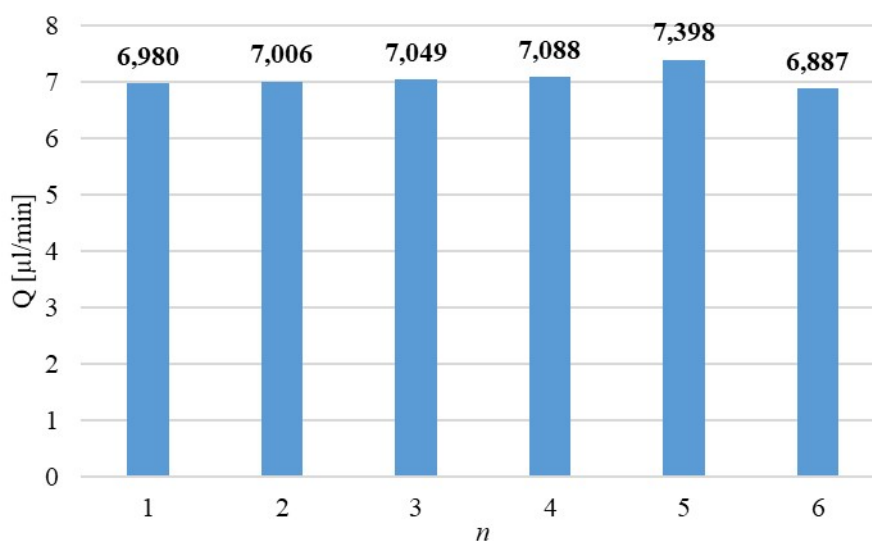
Neřaděný vzorek fenolických kyselin byl umístěn do plastové vialky a pomocí kapilární elektroforézy byl dávkován do křemenné kapiláry. Následně byl stopkami měřen čas, dokud se signál vzorku neobjevil v detektoru CE. Tento čas byl přepočten na průtok pro lepší představu o rychlosti průtoku, který je vzduchová pumpa schopna generovat. Délka kapiláry k detektoru byla v tomto případě 91,4 cm (4,04 μl) a celková délka kapiláry byla 115,4 cm (5,1 μl). Standardní délka kapiláry k okénku detektoru byla 24 cm pro toto měření byla kapilára otočena.

Nejprve byla pro vrácení vzorku použita vzduchová pumpa. Maximální tlak pro pumpu bylo možné nastavit na 100 mbar. Pomocí tohoto tlaku byl vzorek tlačěn křemennou kapilárou a měřen čas přesunutí vzorku k okénku detektoru. Tento čas byl následně přepočten na průtok. Průtoky vzduchové pumpy jsou na obrázku 35.



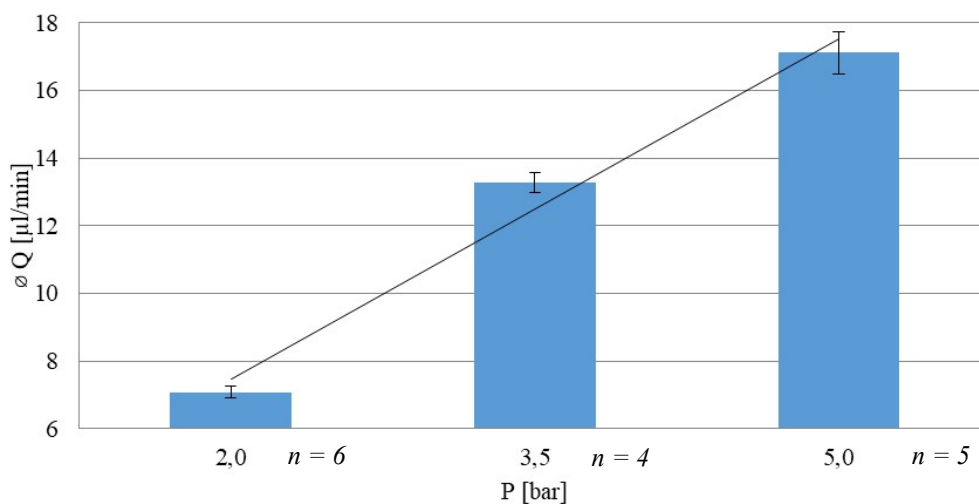
Obrázek 35: Průtok čerpadla kapilární elektroforézy při tlaku 100mbar

U vzduchové pumpy trvá i přes minutu, než se vzorek dostane do detektoru. Průtok generovaný vzduchovou pumpou je velmi nestabilní a nelze jej použít pro vytlačení vzorku z kapiláry, protože tento proces trvá pokaždé jinak dlouho. Pravděpodobně je tlak vytvářený pumpou CE pokaždé jiný. Další možností bylo připojit ke kapilární elektroforéze externí tlak dusíku, který kapilární elektroforéza aplikuje na vialku. Tlak dusíku lze nastavit v rozmezí 2—5 bar. Měření bylo stejné jako při použití vzduchové pumpy. Na obrázku 36 je graf průtoků při tlaku 2 bar.



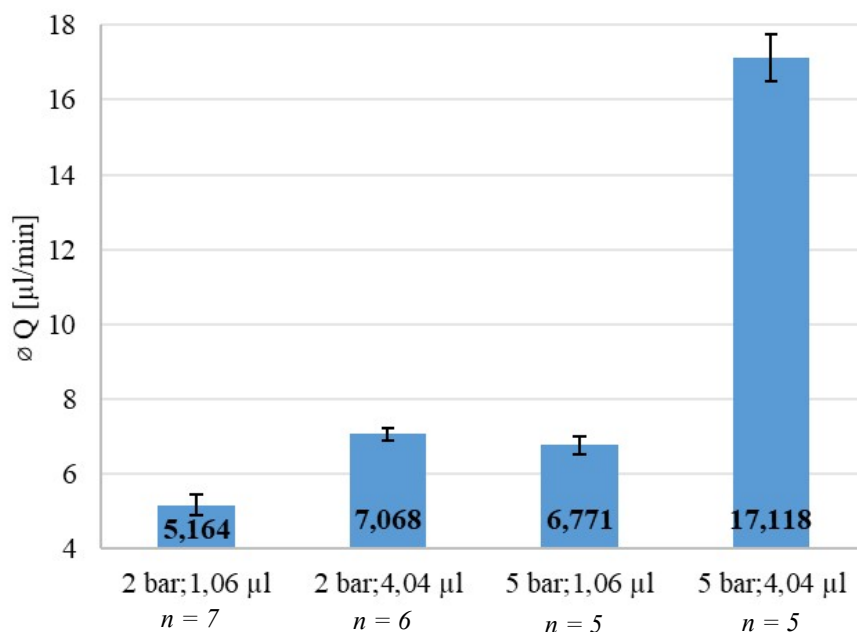
Obrázek 36: Graf průtoků při tlaku 2 bar a délce kapiláry 91,04 cm (4,02 µl)

Je patrné, že při použití tlaku dusíku je měření opakovatelné, tudíž pro přesunutí frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky TSM bude nadále používán tlak dusíku. Dalším krokem bylo najít optimální tlak dusíku. Vzhledem k malým rozdílům mezi průtoky při stejném tlaku dusíku byly použity průměry pro graf na obrázku 37. U každého průměru byla také spočtena směrodatná odchylka, která je na grafu patrná v podobě chybových úseček. Hodnoty dalších statistických parametrů a data pro grafy v této kapitole jsou v příloze 3.



Obrázek 37: Průměry průtoků při použitím tlaku 2; 3,5 a 5 bar

Se vzrůstajícím tlakem dusíku roste rychlost průtoku. Také to vypadá, že tato rychlost průtoku roste lineárně. Pro další měření byla otočena kapilára a tím změněna délka kapiláry k detektoru. Délka kapiláry k detektoru byla nyní 24 cm (1,06 µl). Tato úprava délky kapiláry byla provedena za účelem ověření průtoku při stejném tlaku dusíku. Na obrázku 38 je graf průměrných průtoků při tlaku 2 a 5 bar a objemu 1,06 a 4,04 µl, chybovými úsečkami je vyznačena směrodatná odchylka. Tlak 2 a 5 bar, byl vybrán jako minimální a maximální tlak dusíku, který lze použít. V obou případech je použita stejná kapilára pouze okénko detektoru na kapiláře je při objemu 1,06 µl umístěno 24 cm od zdroje tlaku dusíku a při objemu 4,04 µl 91,4 cm od zdroje tlaku dusíku.



Obrázek 38: Průměrný průtok při tlaku 2 a 5 bar a objemu 1,06 a 4,04 µl

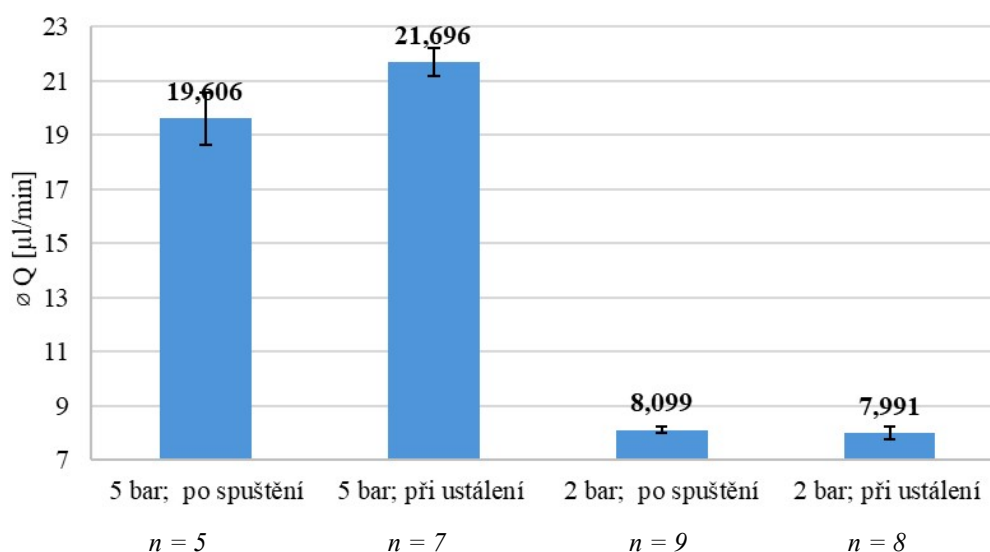
Když porovnáme průtoky při objemu kapiláry 1,06 a 4,02 µl, a to jak při tlaku 2 bar tak tlaku 5 bar, rychlost průtoku v kapiláře se mění se vzdáleností od zdroje tlaku dusíku. Protože se průtoky mění a nejsou konstantní, je tlak dusíku je nestabilní. Pro přesunutí frakce z kapiláry do smyčky je nejvhodnější vybrat, průtok, který se bude se vzdáleností od zdroje tlaku dusíku nejméně měnit. Je to z důvodů odhadu působení tlaku dusíku. Pokud by byl změněn objem kapilár, bude nutné opět vybrat takový tlak, při kterém se průtok mění co nejméně a je co nejstabilnější.

3.4.1 Ověření průtoku dle použitého tlaku dusíku

Díky zjištění, že průtok není stabilní, bylo nutné ověřit průtok jiným způsobem než pomocí detektoru CE. Celková délka kapiláry byla nyní 120 cm, kapilára musela být vyměněna, protože během předchozího měření došlo při manipulaci ke zlomení v místě okénka (část bez polyimidu). Délka nové kapiláry k okénku detektoru byla 95 cm.

Průtok byl měřen pomocí Hamiltonovy stříkačky o objemu 25 µl připojené na konci kapiláry. Na stopkách byl měřen čas, za který na přiteče objem 2,5 nebo 5 µl. Nejprve byl průtok měřen přímo za ventilem 4 (PEEK) u kapilární elektroforézy (schéma zapojení TSM: obrázek 35). Na obrázku 39 jsou průměrné průtoky naměřené při tlaku 2 a 5 bar, a to jak hned při spuštění tlaku dusíku, tak při ustálení tlaku (2 minuty po spuštění). U průměrných hodnot průtoků jsou

také chybovými úsečkami vyjádřeny směrodatné odchylky, ty jsou největší u tlaku 5 bar. Ostatní statistické parametry a naměřená data jsou sepsány v příloze 4.



Obrázek 39: Průměrné průtoky za ventilem 4 při tlaku 2 a 5 bar

S vyšším tlakem dusíku byl mnohem větší rozdíl průtoku ihned po spuštění tlaku a při ustálení tlaku. Tlak 5 bar je nestabilní, velmi se mění průtok. Tlak dusíku 2 bar je stabilnější a mezi průtokem naměřeným ihned po spuštění tlaku a při ustálení tlaku dusíku je menší rozdíl než při tlaku 5 bar.

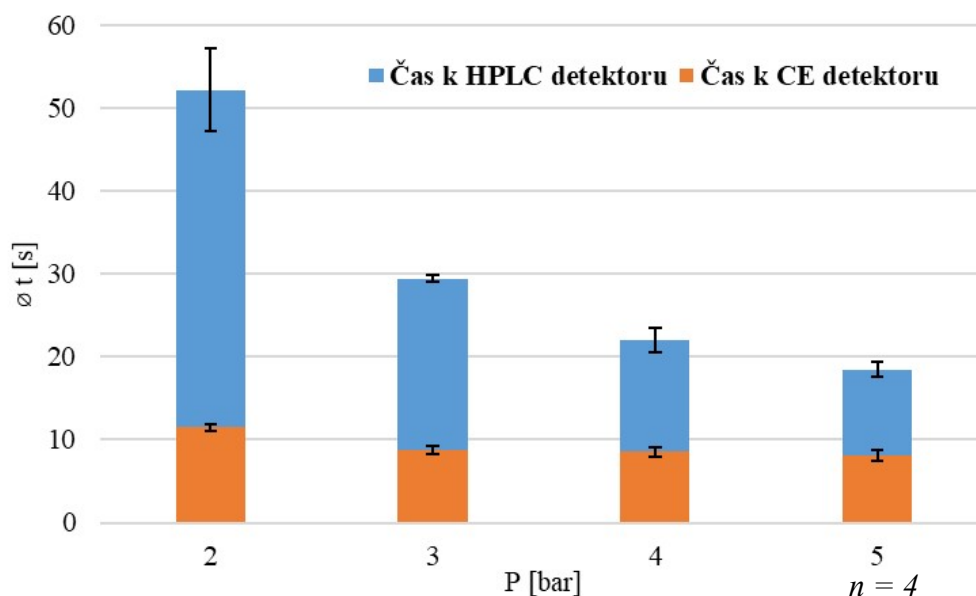
3.4.1.1 Čas potřebný k vrácení frakce zpět do smyčky

Důležitým parametrem pro přesun frakce z CE zpět do smyčky je také čas potřebný k vrácení frakce zpět do smyčky 2. Způsob vrácení frakce musí být rychlý, reprodukovatelný a stabilní. Pro zjištění času potřebného k vrácení frakce zpět do smyčky 2 byl použit HPLC detektor, který byl zapojen přímo za smyčku 2. Měření bylo prováděno následovně:

- (1) V plastové vialce byl umístěn 10× zředěný vzorek fenolických kyselin ve vodě.
- (2) Byla zapnuta analýza na HPLC detektoru.
- (3) Byl aplikován tlak dusíku na vialku se vzorkem, a vzorek byl přesunut z křemenné kapiláry do detektoru HPLC.
- (4) Byl měřen čas, za který se vzorek přesune do detektoru CE a čas za který dorazí do HPLC detektoru.

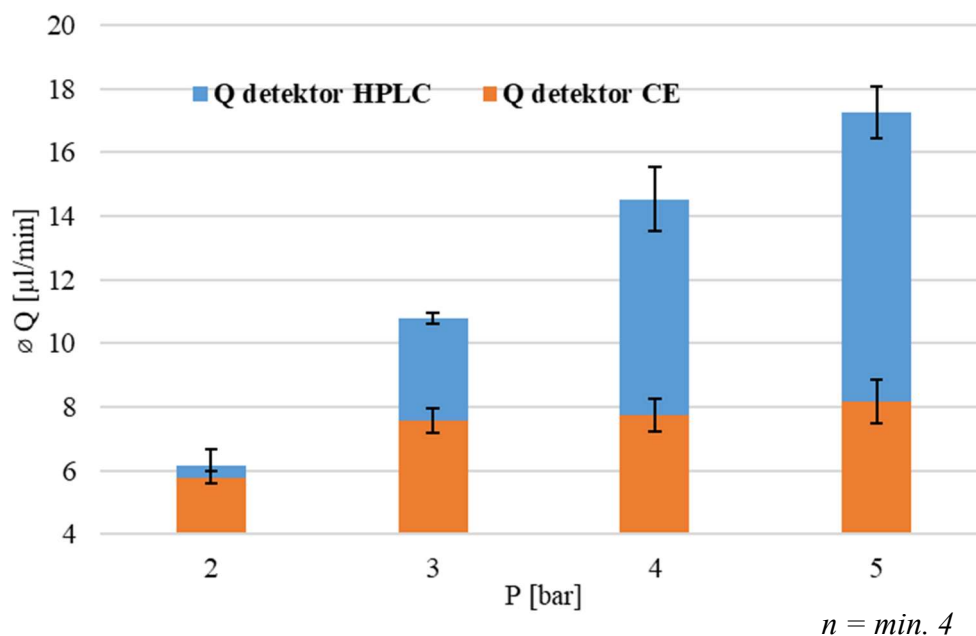
Výsledky tohoto měření jsou shrnuty na obrázku 40, kde je sloupcový graf průměrných časů při různých tlacích dusíku. Oranžové sloupce znázorňují čas přesunu frakce k CE detektoru

a modré sloupce znázorňují čas přesunu frakce k detektoru HPLC. Směrodatné odchylky jsou vyjádřena chybovými úsečkami.



Obrázek 40: Graf závislosti průměrného času na tlaku dusíku a vzdálenosti od zdroje tlaku dusíku

Z grafu je patrný sestupný trend hodnot času v závislosti na použitém tlaku. S vzrůstajícím tlakem se zvyšuje průtok kapilárou a klesá čas potřebný k přesunu frakce. Časy potřebné k přesunu frakce byly přepočteny na průtoky a graf těchto průtoků je na obrázku 41.

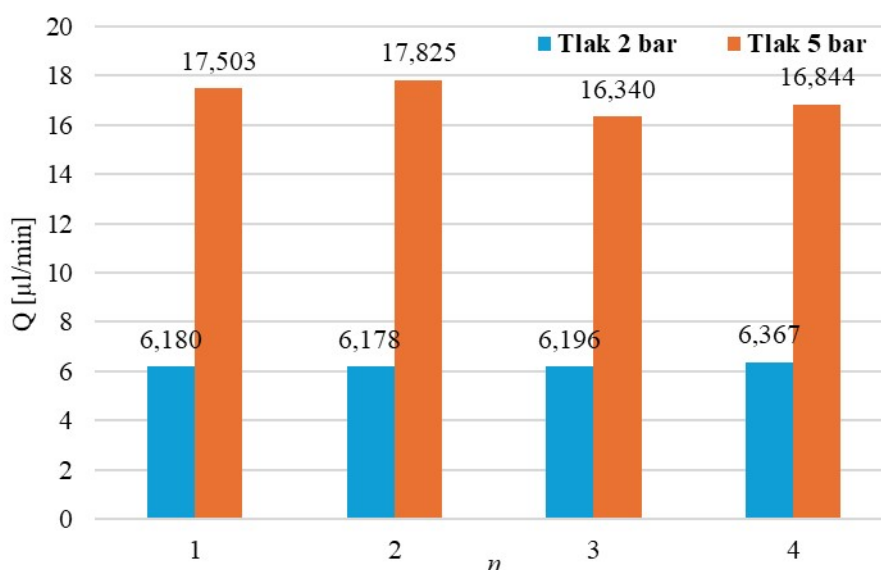


Obrázek 41: Graf závislosti průměrného průtoku na tlaku dusíku a vzdálenosti od zdroje tlaku dusíku

Při tlaku 2 bar trvá přesun frakce téměř minutu, ale průtok při tomto tlaku je nejstabilnější (rozdíl průtoku v detektoru CE a HPLC je nejmenší). S vyšším tlakem se mnohem více mění průtok v systému.

Například už při tlaku 3 bar je průtok v detektoru HPLC téměř dvojnásobný než v detektoru CE. Při tlaku 5 bar je tento rozdíl průtoku nejvíce zřetelný, kdy v detektoru CE je průtok 8,17 $\mu\text{l}/\text{min}$ a v detektoru HPLC 17,27 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Rozdíly mezi průtoky byly poměrně vysoké, proto byla ověřena správnost průtoků opět pomocí Hamiltonovy stříkačky. Ta byla zapojena místo HPLC detektoru byl změřen průtok při tlaku 2 a 5 bar. Výsledky tohoto měření jsou zobrazeny na obrázku 42, kde modré sloupce znázorňují tlak 2 bar a oranžové sloupce tlak 5 bar.

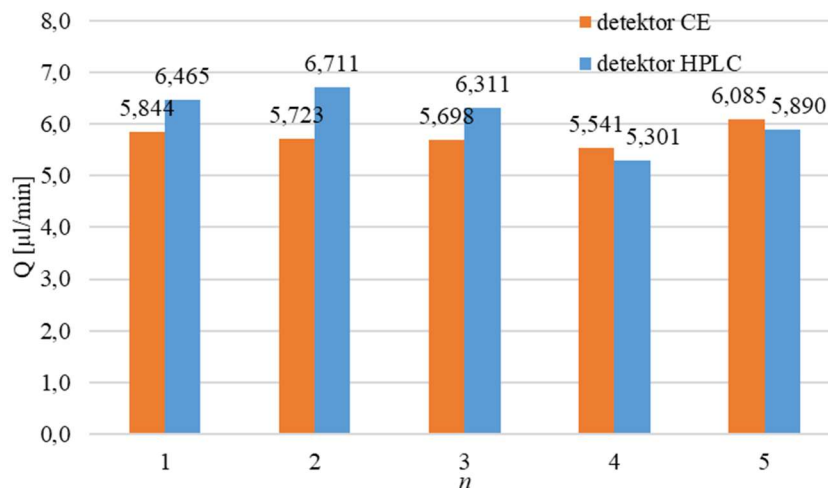


Obrázek 42: Měření průtoku pomocí Hamiltonovy stříkačky před detektorem HPLC

Z naměřených dat je patrné, že průtoky spočtené z odezvy detektorů jsou velmi podobné jako naměřené pomocí Hamiltonovy stříkačky. Když se porovnáme, jak se měnil průtok v systému při jednotlivých tlacích, nestabilnější průtok byl při tlaku 2 bar. Z tohoto důvodu byl pro následující měření vybrán tento tlak pro vrácení frakce z kapiláry elektroforézy do smyčky 2.

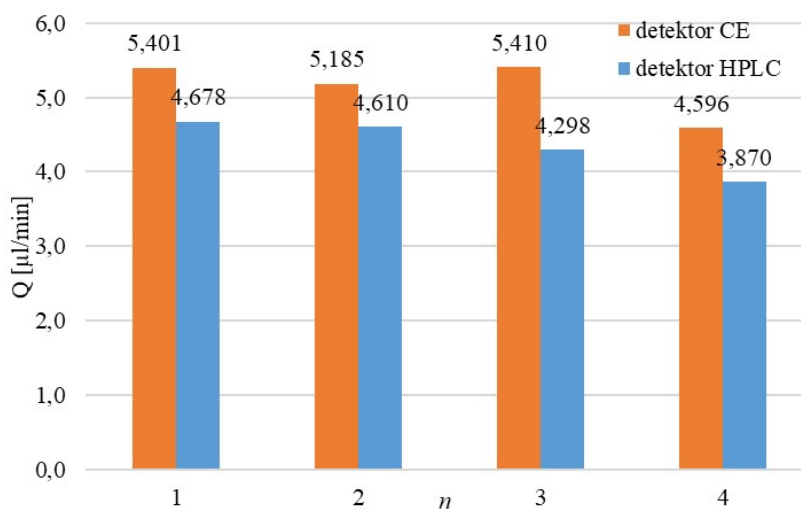
3.4.1.2 Vliv použitého rozpouštědla ve vzorku na průtok při použití tlaku dusíku

Ve dvourozměrné kapalinové chromatografii se používají různá rozpouštědla, která mohou mít vliv na průtok. U měření průtoku dle použitého tlaku dusíku byl použit 10 \times ředěný vzorek fenolických kyselin ve vodě. Dalším testovaným rozpouštědlem byl metanol, vzorek fenolických kyselin byl také 10 \times naředěn v čistém metanolu a byl aplikován tlak 2 bar a měřen čas. Čas přesunu frakce k detektoru byl následně přepočten na průtok. Měření probíhalo totožně jako v kapitole 3.4.1.1. Na obrázku 43 jsou průtoky měřeny při tlaku 2 bar a vzorek je 10 \times ředěn ve vodě.



Obrázek 43: Průtok v detektoru CE a HPLC při tlaku 2 bar vzorek 10× ředěný ve vodě

Z grafu je patrné, že průtok na začátku systému v detektoru CE je mnohem nižší než průtok v detektoru HPLC. Tento rozdíl je způsoben nestabilitou tlaku dusíku nebo tím, že ustálení průtoku trvá nějaký čas. Na obrázku 44 je průtok v detektoru CE a HPLC při tlaku 2 bar, vzorek byl tentokrát zředěn 10× ředěn v metanolu.



Obrázek 44: Průtok v detektoru CE a HPLC při tlaku 2 bar vzorek 10× ředěný v metanolu

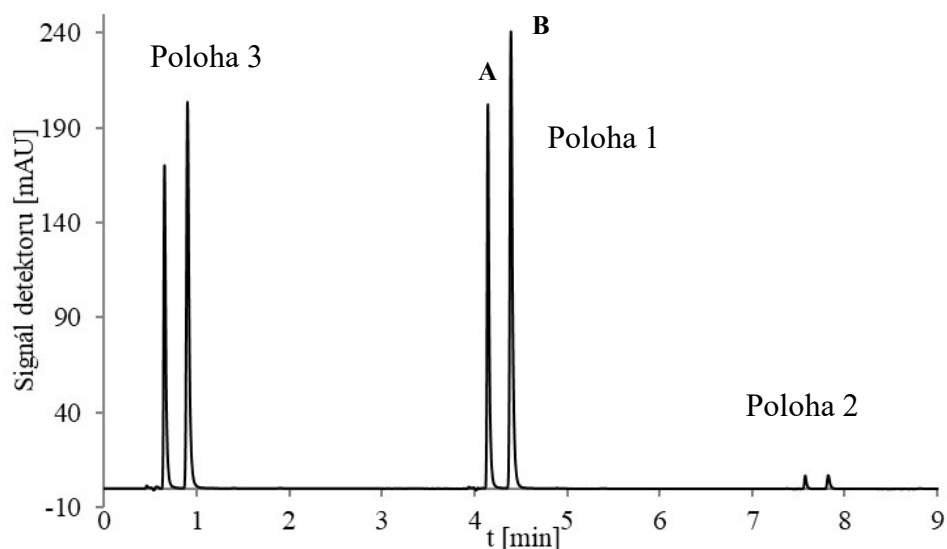
V případě vzorku zředěného 10× v metanolu jsou velikosti průtoku na začátku systému mnohem vyšší (modrý sloupec) než průtok v detektoru HPLC (oranžový sloupec). To způsobuje, směs metanolu s vodou, která má větší hustotu než voda a zpomaluje průtok frakce kapilárou. Nadále byl vzorek ředěn pouze ve vodě, protože by přesunutí vzorku trvalo příliš dlouho kvůli zpomalování průtoku. Také rozdíly mezi průtoky v detektoru CE a HPLC při použití vzorku ředěného ve vodě jsou menší než v případě vzorku ředěného v metanolu. Průměrný rozdíl mezi průtoky v CE a HPLC detektoru v případě ředění vzorku ve vodě je 0,358 µl/min a v případě ředění v metanolu 0,784 µl/min.

3.4.2 Propojení TSM, kapilární elektroforézy a kolony druhé dimenze

Když byl vybrán vhodný tlak dusíku (2 bar) pro vrácení frakce z kapiláry elektroforézy do smyčky 2, dalším krokem bylo optimalizovat čas působení tlaku dusíku. Pro toto měření byla připojena kolona v druhé dimenzi. Prvním krokem bylo zjistit jakou plochu, výšku a šířku měli píky standardů fenolických kyselin, když smyčka 2 byla naplněna ze 100 %. Z tohoto důvodu bylo nejprve provedeno měření bez přesunu frakce do kapiláry elektroforézy a zpět. Byl použit vzorek fenolických kyselin, který byl 10× zředěn ve vodě. Postup byl následující:

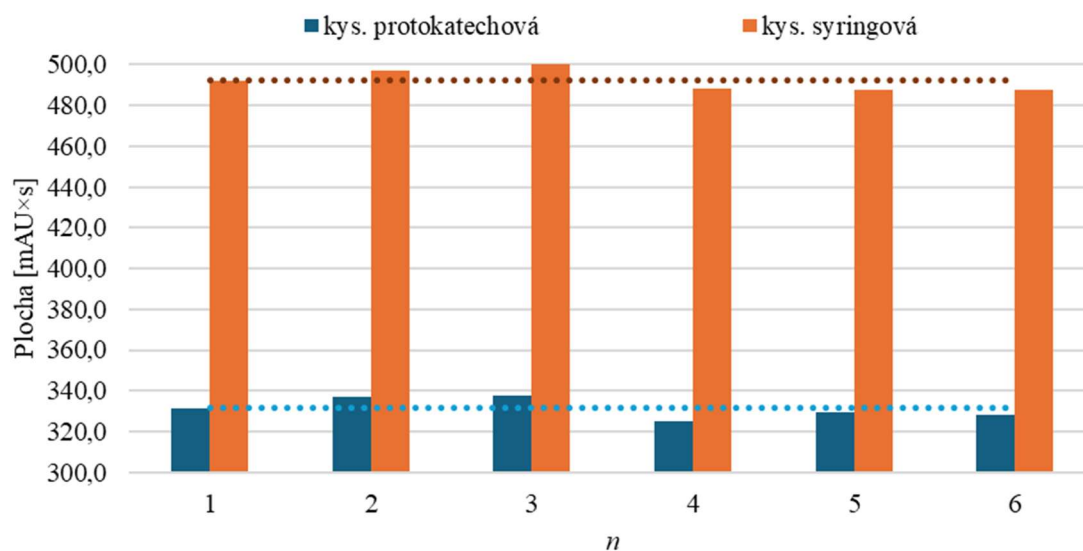
- 1) TSM byl přepnut do polohy 2 a v této poloze byl nadávkován pomocí Hamiltonovy stříkačky 10× zředěný vzorek fenolických kyselin ve vodě.
- 2) Byla zapnuta analýza HPLC v druhé dimenzi a zapnut průtok 1,6 ml/min (viz 2.4).
- 3) TSM modulátor byl přepnut do polohy 3.
- 4) TSM byl přepnut do polohy 1 a v analýze HPLC byl vidět signál vzorku fenolických kyselin.
- 5) TSM byl přepnut do polohy 2 a v analýze HPLC nebyl vidět téměř žádný signál.

Chromatogram signálu vzorku fenolických kyselin je na obrázku 45. Postupně jsou zde zaznamenány všechny pozice TSM: poloha 3, kdy je do druhé dimenze přenesen zbytek vzorku ze spojovacích kapilár mezi ventily, poté poloha 1, kdy je do 2D nadávkován obsah smyčky 2 a následně poloha 2, kde by v tomto případě neměl být téměř žádný signál, protože se frakce nepřesouvá. Při přesunu frakce do kapiláry elektroforézy a zpět je v poloze 2 signál, protože se do 2D dostává vzorek ze spojovacích kapilár mezi ventily, jedná se o zbytek vzorku, který se nepodařilo vrátit zpět do smyčky 2.



Obrázek 45: Chromatogram signálu fenolických kyselin v poloze TSM 3, 1 a 2, A: kyselina protokatechová, B: kyselina syringová

Na obrázku 46 je graf zobrazující měření bez přesunu frakce. Tečkované linky značí průměry naměřených hodnot, tyto průměry byly použity jako 100 % frakce (takové hodnoty by měl vzorek v poloze 1, pokud by zpět do smyčky 2 bylo přesunuto 100 % frakce). Průměr ploch kyseliny protokatechové byl 331,42 mAU×s s relativní směrodatnou odchylkou 1,48 % a průměr ploch kyseliny syringové byl 492,25 mAU×s s relativní směrodatnou odchylkou 1,1 %.



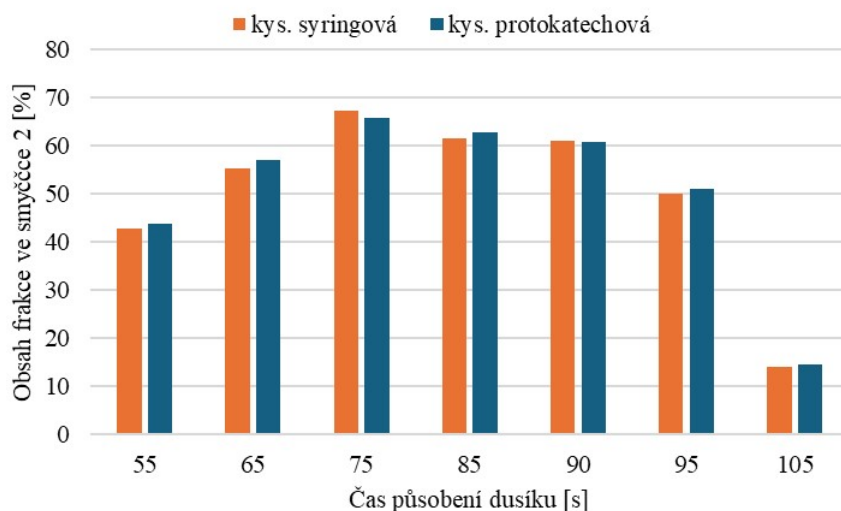
Obrázek 46: Plochy fenolických kyselin v poloze 1 TSM bez přesunu frakce

Následovala optimalizace času působení dusíku na vialku v CE. Cílem je najít takový čas, aby došlo k vrácení frakce do smyčky 2 v plné výši.

Měření probíhalo následujícím způsobem:

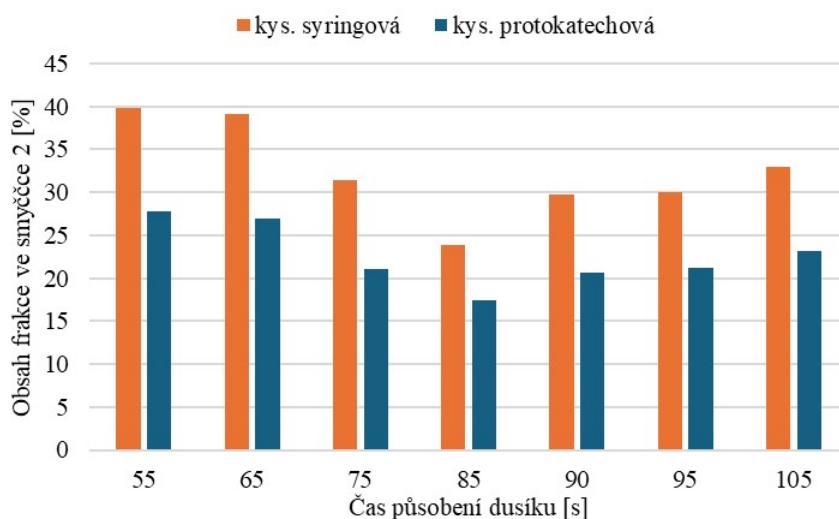
- 1) TSM byl přepnut do polohy 2 a v této poloze byl nadávkován pomocí Hamiltonovy stříkačky 10× zředěný vzorek fenolických kyselin ve vodě.
- 2) Byla zapnuta analýza HPLC v druhé dimenzi a zapnut průtok 1,6 ml/min (viz 2.4).
- 3) TSM modulátor byl přepnut do polohy 3. V této poloze se do HPLC analýzy vymývá část kapilár, spojující ventily a ve kterých zůstává část vzorku z ¹D.
- 4) Pomocí injekční pumpy byla frakce ze smyčky 2 přesunuta objemem 8,5 µl při průtoku 25 µl/min do kapiláry elektroforézy.
- 5) Následovalo odpojení injekční pumpy, aby při spuštění tlaku dusíku bylo možné frakci vytlačit z kapiláry elektroforézy.
- 6) Frakce byla vrácena z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky 2 pomocí tlaku dusíku 2 bar za různých časových intervalů 55–105 s.
- 7) TSM byl přepnut do polohy 1 a v analýze HPLC byl vidět signál vzorku fenolických kyselin ve smyčce 2.
- 8) TSM byl přepnut do polohy 2 a v analýze HPLC byl vidět signál zbytku vzorku fenolických kyselin, který se nepovedlo vrátit do smyčky 2, ale zůstal v kapilárách před a za smyčkou 2.

Výsledky tohoto měření jsou shrnuty na obrázcích 47–49. Na obrázku 47 jsou plochy fenolických kyselin přepočteny na procentuální obsah vzorku ve smyčce 2, 100 % každé látky vychází z průměru ploch fenolických kyselin bez přesunu frakce viz tečkované čáry na obrázku 46. Z grafu s procenty jasně vyplývá, že největší obsah, který je možný vrátit do smyčky 2 pomocí tlaku dusíku je při čase působení tlaku dusíku 75 s. Konkrétně se jedná o 65,72 % pro kyselinu protokatechovou a 67,32 % pro kyselinu syringovou. Do smyčky 2 se nepodařilo přesunout větší část vzorku pravděpodobně kvůli rozmývání vzorku v kapilárách modulátoru.



Obrázek 47: Procentuální obsah analytů v závislosti na čase působení tlaku dusíku (2 bar) v poloze 1 TSM

Pro potvrzení této teorie je zde graf na obrázku 48, kde je procentuální obsah ploch fenolických kyselin v poloze 2 TSM (zbytek vzorku ze spojovacích kapilár před a za smyčkou 2). Z dat vyplývá, že nejmenší obsah frakce vzorku fenolických kyselin v poloze 2 je při čase působení dusíku 85 s. Data a grafy ploch jsou v příloze 5.



Obrázek 48: Procentuální obsah analytů v závislosti na čase působení tlaku dusíku (2 bar) v poloze 2 TSM

Když zanedbáme změnu průtoku v závislosti na objemu neboli mění se průtok při pohybu TSM, lze pomocí průměrné hodnoty průtoku vypočítat vhodný čas působení dusíku. V kapitole 3.4.1.1 byl změřen průtok při tlaku dusíku 2 bar před detektorem HPLC. Pro výpočet bude použita průměrná hodnota změřeného průtoku při tlaku 2 bar 6,23 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Příloha 4, tabulka P4.10). V kapitole 3.3 byl nalezen objem 8,5 μl , kterým byla frakce natlačena do kapiláry elektroforézy. Pokud budeme předpokládat, že stejným objem je potřeba použít pro natlačení frakce zpět do smyčky 2. Lze vypočítat čas působení dusíku při tlaku 2 bar dle rovnice 5:

Rovnice 5: Výpočet času působení dusíku při tlaku 2 bar

$$t_{N_2} = \frac{V}{Q} \times 60 = \frac{8,5}{6,23} \times 60 = 81,86 \text{ s}$$

Kde V je objem a Q je průtok. Jak jsme se přesvědčili na obrázcích 47 a 48 je možné pro nalezení optimálního času působení dusíku použít i tento výpočet. Pro další měření tedy bude používán tlak 2 bar a čas působení dusíku bude 80 s, protože se jedná o hodnotu mezi 75—85 s, kdy při použití 75 s jako čas působení laku dusíku 2 bar byla největší část frakce zpět ve smyčce, ale v čase 85 s byla nejmenší část frakce v kapilárách spojující ventily. Výpočtem vyšel čas působení tlaku dusíku 2 bar 80 s, proto bude nadále používán tento čas pro působení tlaku dusíku.

3.5 Fokusace frakce pomocí kapilární elektroforézy

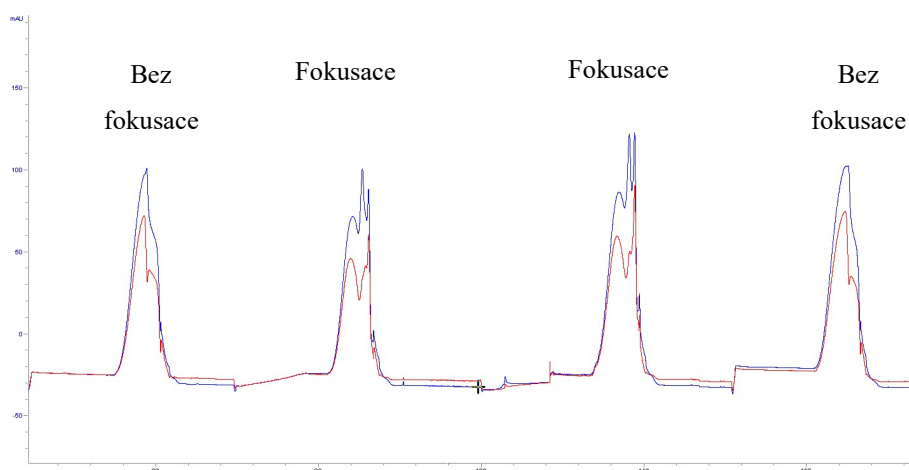
Po nalezení vhodných parametrů pro přesunutí frakce pomocí injekční pumpy do kapiláry elektroforézy (8,5 μ l při průtoku 25 μ l/min) a vrácení zpět do smyčky 2 (tlak dusíku 2 bar, čas 80 s) bylo dalším krokem ověřit funkčnost fokusace. Aby bylo možné provést fokusaci musel být vyroben osmicestný ventil z nevodivého materiálu (PEEK) a zapojen mezi TSM a elektroforézu. Ventily TSM jsou kovové a docházelo by k přenosu proudu na ventily. PEEK ventil slouží k propojení obou elektrod. V CE je umístěna vialka s pufrem a katodou a na opačném konci křemenné kapiláry je ventil (PEEK) a za ním je vyvedena křemenná kapilára s anodou do vialky s pufrem.

Kyselina protokatechová a kyselina syringová byly rozpuštěny ve 4 ml čistého metanolu a 6 ml vody, čímž došlo k jejich disociaci a vytvoření záporně nabitých molekul. Na katodu v kapilární elektroforéze bylo přiváděno napětí -20kV. Vzorek fenolických kyselin migroval kapilárou ke kladně nabitě elektrodě, a tím došlo k jeho fokusaci neboli zakoncetrování do úzké zóny. Podmínky pro fokusaci jsou sepsány v kapitole 2.5. Ověření fokusace probíhalo následovně:

- 1) Kapilára v elektroforéze byla pomocí tlaku dusíku 5 bar a časem působení 60 s naplněna pufrem kyselin borité o koncentraci 75 mM a pH 9.
- 2) TSM byl otočen do polohy 2 a smyčka 2 byla naplněna neředěným vzorkem fenolických kyselin.
- 3) Byla zapnuta analýza HPLC v druhé dimenzi a zapnut průtok 1,6 ml/min (viz 2.4).
- 4) TSM byl otočen do polohy 3 a pomocí objemu 8,5 μ l a průtoku 25 μ l/min byla frakce ze smyčky 2 přesunuta do kapiláry elektroforézy.

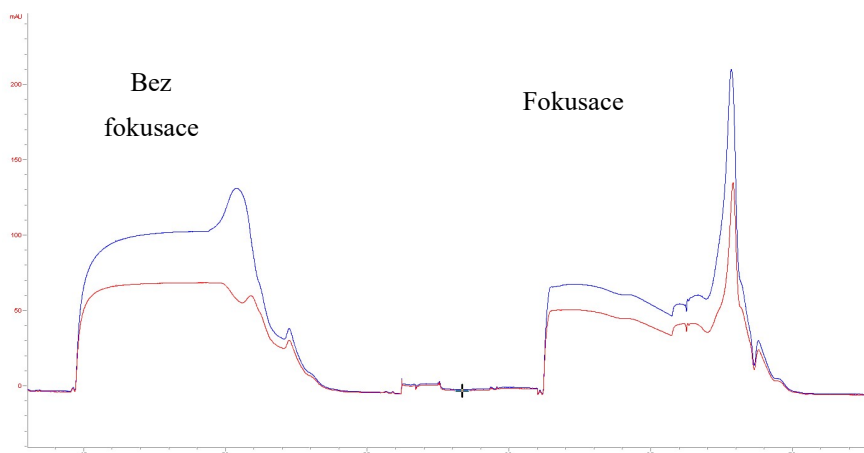
- 5) Ventil 4 (PEEK) byl otočen, aby vzniklo vodivé propojení mezi elektrodami. Následně se aplikovalo napětí -20 kV a čas působení byl 240 s více viz kapitola 2.5.
- 6) Po fokusaci byl ventil 4 otočen, aby vzniklo propojení s TSM. Pomocí průtoku 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla fokusovaná frakce protlačena do detektoru CE.

Na obrázku 50 je záznam fenolických kyselin z detektoru CE. Pro porovnání vliv fokusace na vzorek fenolických kyselin bylo také prováděno měření bez aplikace napětí. I bez aplikace napětí se vzorek ponechal v křemenné kapiláře 240 s, aby byly dodrženy stejné podmínky. Záznam s fokusací se příliš neliší od záznamu bez fokusace. Z tohoto záznamu vyplývá, že fokusace neprobíhá. Následně byl přezkoumán postup fokusace a vymývání kapilár v důsledku změn pozic (obrázek 31), z čehož jsme usoudili, že příčina nedostatečné fokusace by mohla být v zapnutém průtoku v ^2D .



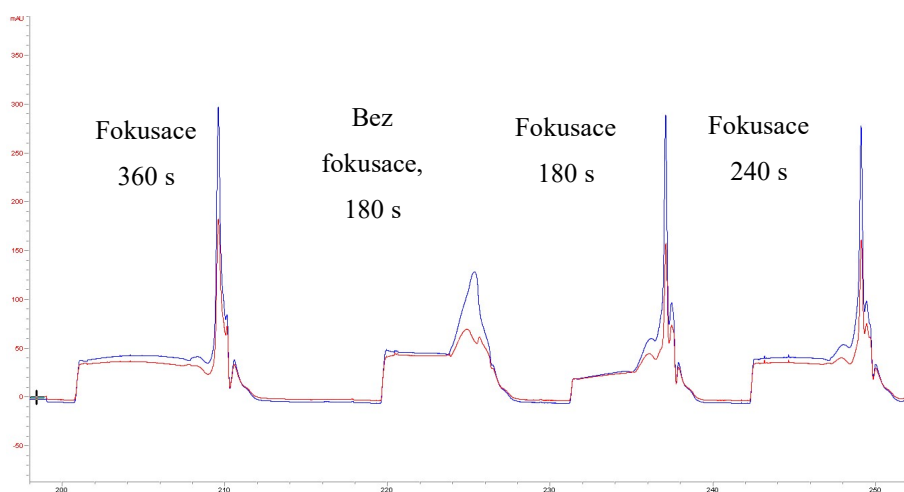
Obrázek 49: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV v čase 240 s, se zapnutým průtokem v ^2D

Pro ověření této teorie, byl vypnut průtok druhé dimenze, který měl za následek nedostatečné množství pufru v kapiláře elektroforézy. Z tohoto důvodu v křemenné kapiláře nebylo plně vodivé prostředí a frakce nemohla být zcela zafokusována. Experiment byl znovu proveden bez průtoku v ^2D . Výsledky fokusace jsou na obrázku 50, ze záznamu je jasně patrné, že při naplnění spojovacích kapilár pufrem proběhla fokusace a je patrný rozdíl mezi odezvou bez fokusace a s fokusací analytů.



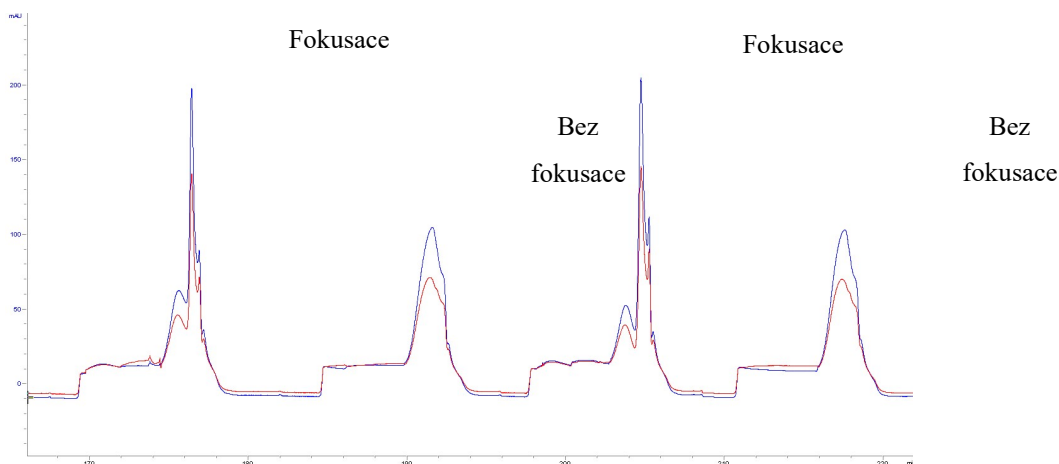
Obrázek 50: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV v čase 240 s

Dále bylo testováno, zda delší čas fokusace zlepší zakoncentrování fenolických kyselin a ovlivní výšku signálu v detektoru CE. Fokusace byla provedena při čase 180, 240 a 360 s (obrázek 51). Delším časem nedojde již ke zvýšení odezvy ani se signál více nezúží. Čas fokusace 240 s je dostačující pro zafokusování frakce.



Obrázek 51: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV v různých časech

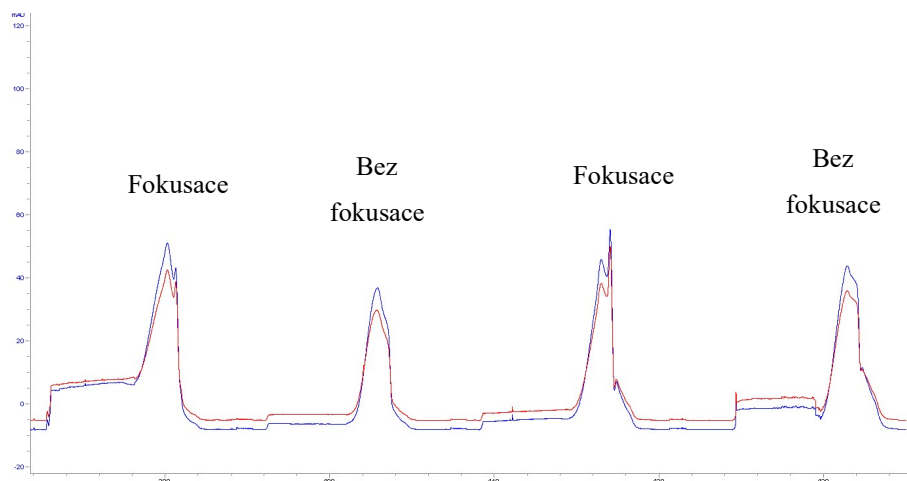
Fokusaci by také mohlo potenciálně zlepšit použití pufru o silnější koncentraci kyseliny borité 175 mM a pH 9. Na obrázku 52 je záznam signálu při fokusaci vzorku fenolických kyselin při napětí -20kV, čase 240 s a použití silnějšího pufru kyseliny borité 175 mM a pH 9.



Obrázek 52: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové při aplikaci napětí -20 kV a čase 240 s, fokusace byla provedena v pufru o koncentraci kyseliny borité 175 mM a pH 9

Použití silnějšího pufru nemá na fokusaci velký vliv. Pokud porovnáme výšku záznamu při fokusaci s pufrům o koncentraci kyseliny borité 75 mM s výškou záznamu při použití pufru o koncentraci kyseliny borité 175 mM. Při použití pufru s koncentrací 75 mM dosahuje fokusovaná frakce asi 300 mAU, zatímco při koncentraci 175 mM dosahuje fokusovaná frakce pouze 200 mAU. Z tohoto důvodu byl nadále používán pufr o koncentraci kyseliny borité o koncentraci 75 mM.

Zlepšení fokusace by se také potenciálně dalo dosáhnout větším množstvím pufru v kapiláře, proto bylo testováno, zda by mohlo zlepšit fokusaci zředění vzorku v pufru. Vzorek byl 2× zředěn v 75 mM pufru kyseliny borité o pH 9. Měření probíhalo stále stejně.



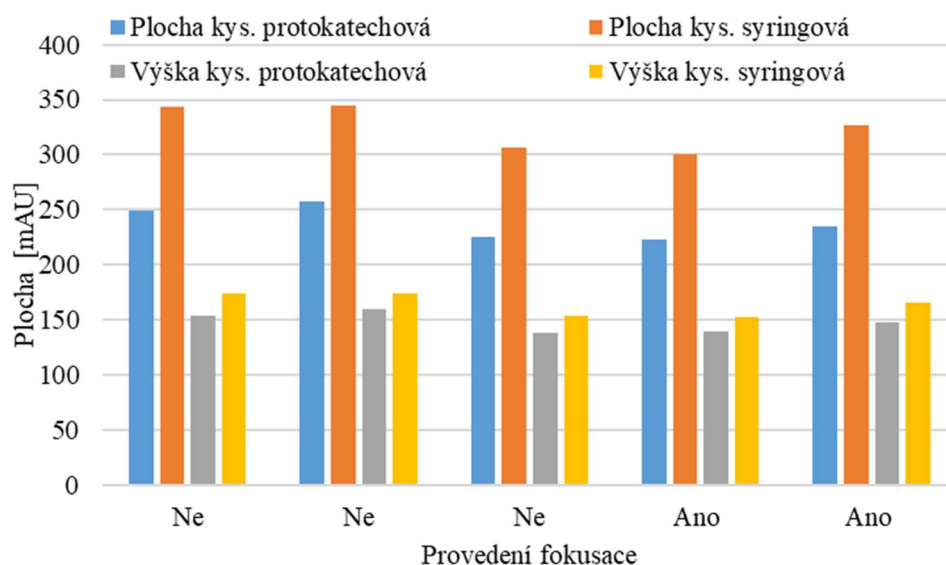
Obrázek 53: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny syringové 2× zředěné v pufru kyseliny borité o koncentraci 75 mM a pH 9, při aplikaci napětí -20 kV a čase 240 s

Zředění vzorku v pufru kyseliny borité zhoršilo fokusaci (obrázek 53), přestože proud během fokusace dosahoval až 13 μ A. Pro další měření byl použit vzorek ředěný pouze ve vodě, používaný pufr kyseliny borité měl koncentraci 75 Mm a pH 9 a čas aplikace napětí byl 240 s.

3.6 Přesunutí frakce do druhé dimenze

Když došlo k optimalizaci všech parametrů pro přesun frakce do kapiláry elektroforézy, zafokusování frakce a její následné nadávkování do ²D, byl testován vliv fokusace na analýzu v ²D. Postup měření byl následující: Frakce byla nadávkována do smyčky 2 v pozici 2 TSM, následně byla přesunuta do křemenné kapiláry elektroforézy (8,5 μ l, průtok 25 μ l/min) a po otočení ventilu 4 provedena fokusace (75 mM kys. Boritá, -20 kV, 240 s). Poté byla zafokovaná frakce vrácena zpět do smyčky 2 TSM (tlak dusíku 2 bar, čas 80 s) a nadávkována do druhé dimenze. Nejprve byla v druhé dimenzi připojena kolona a byl testován vliv fokusace se zapnutým průtokem v ²D.

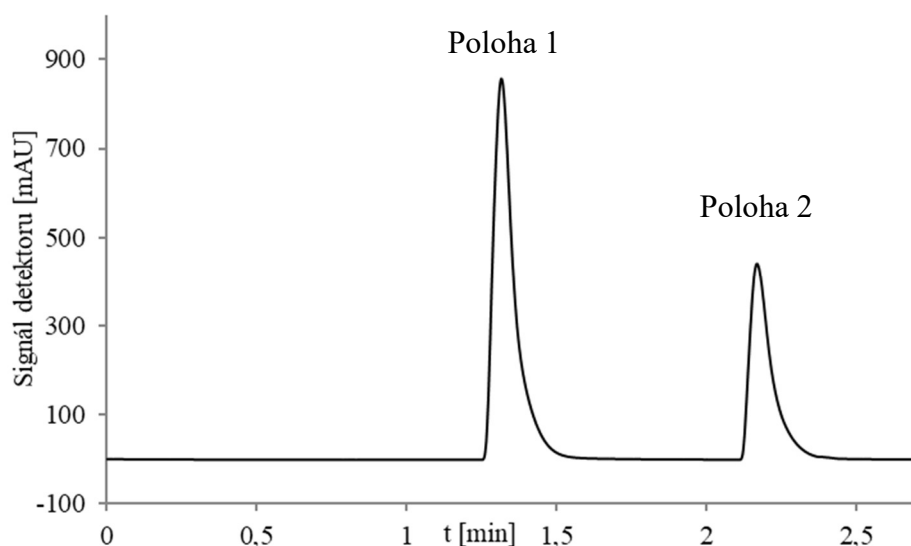
Výsledky měření shrnuje obrázek 54, který srovnává plochy a výšky píků fenolických kyselin s fokusací a bez fokusace v poloze 1. Při měření bez fokusace nebylo v kapilární elektroforéze dodávané napětí, ale frakce byla v kapiláře elektroforézy ponechána stejný čas jako kdyby fokusace probíhala (240 s). Šířky píků byly téměř totožné, a to jak při měření s provedením fokusace tak bez fokusace, konkrétně hodnoty šířky píků byly v rozmezí 0,0289–0,0296 min.



Obrázek 54: Přesunutí fokusované frakce do ²D, zapnutý průtok v ²D

Fokusace neměla na zlepšení separace v 2D žádný vliv. Téměř minimální rozdíl mezi měřením s použitím fokusace a bez způsobil zapnutý průtok při dávkování frakce do kapiláry elektroforézy. Z tohoto důvodu nebylo v kapiláře vodivé prostředí a frakce nemohla být zcela zafokusována. Výsledky fokusace se zapnutým průtokem jsou na obrázku 48 v kapitole 3.5.

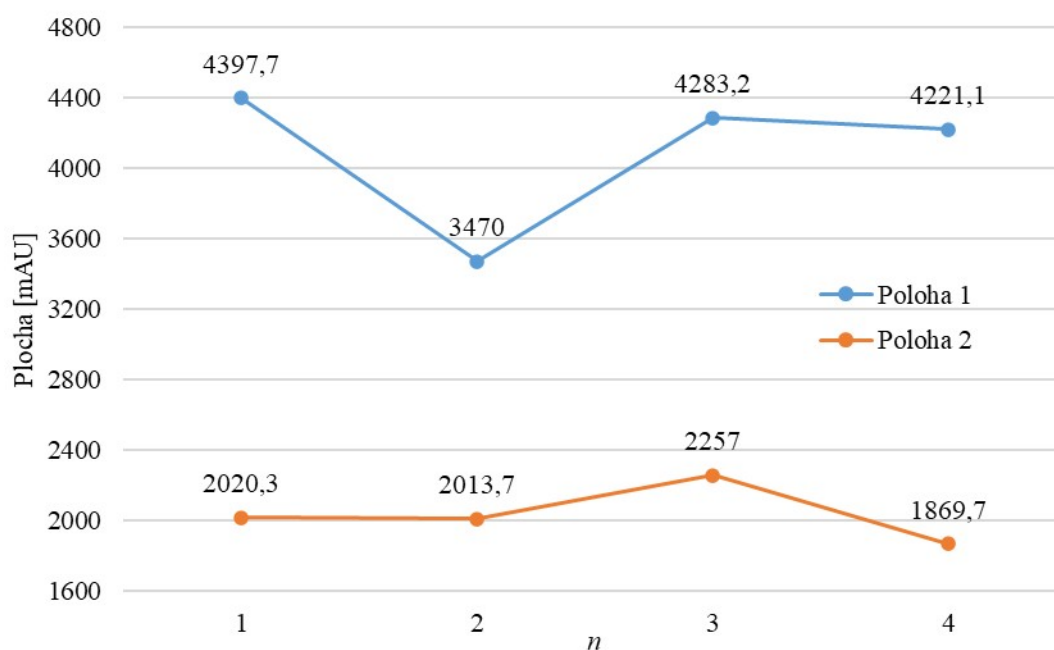
Další měření bylo prováděno bez kolony, aby byl lépe viditelný vliv fokusace na analyty v 2D neovlivněný chromatografickou kolonou, a také pro kratší čas analýzy. Dále byl průtok v 2D spuštěn až po fokusaci. Pro dostatečné množství pufru v kapiláře byla kapilára a celý systém před každým měřením propláchnut pufrům. Záznam bez kolony měl pouze jeden signál, protože fokusace nerozdělila fenolické kyseliny. Chromatogram záznamu odezvy detektoru bez kolony je na obrázku 55, v poloze 1 je do detektoru dávkován obsah smyčky 2, a v poloze 2 je do detektoru přesunut obsah spojovacích kapilár mezi ventily, jedná se o zbytek frakce, kterou se nepodařilo vrátit do smyčky 2 kvůli rozmývání vzorku ve spojovacích kapilárách při působení tlaku dusíku 2 bar a čase 80 s.



Obrázek 55: Chromatogram odezvy detektoru pro vzorek fenolických kyselin bez kolony a bez fokusace v polohách TSM 1 a 2

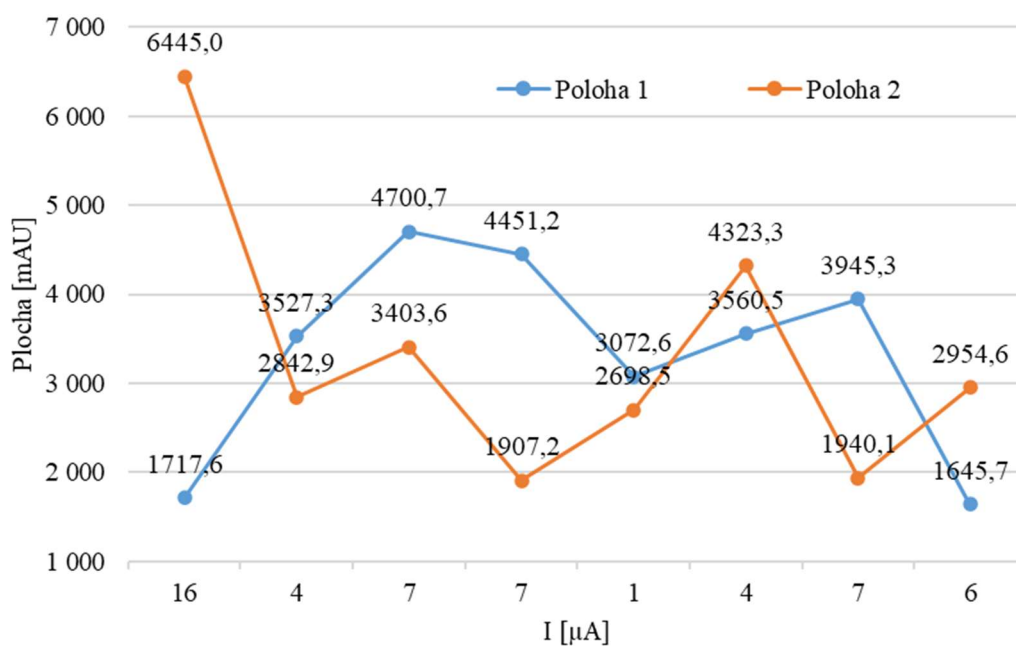
Nejprve bylo provedeno měření bez fokusace, aby bylo možné zhodnotit přínos fokusace (slepý pokus) a následně bylo provedeno měření s fokusací. Byla sledována výška a plocha odezvy detektoru v poloze 1 (obsah smyčky 2 TSM) a v poloze 2 (obsah spojovacích kapilár před a za smyčkou 2). Šířka píku v tomto případě nebyla sledována, protože zůstávala téměř stejná, a to jak s fokusací, tak bez. Na obrázku 56 jsou plochy odezvy detektoru fenolických kyselin v poloze 1 a v poloze 2 TSM, výšky odezvy detektoru fenolických kyselin v poloze 1 a v poloze 2 TSM jsou v příloze 6. Relativní směrodatná odchylka mezi jednotlivými měřeními pro plochy v poloze 1 byla 10,3 %, v případě výšky 9,47 %. V poloze 2 byla relativní směrodatná odchylka

mezi měřeními pro plochy 7,86 % a v případě výšky 7,85 %. Ostatní statistické parametry včetně dat jsou uvedeny v příloze 6.



Obrázek 56: Plochy odezvy fenolických kyselin v ²D v poloze 1 a 2 TSM bez provedení fokusace

Následně byla provedena fokusace a frakce byla nadávkována do ²D. Výsledky měření s fokusací jsou na obrázku 57 pro plochy odezvy detektoru fenolických kyselin a v příloze 6 pro výšky odezvy detektoru fenolických kyselin.



Obrázek 57: Plochy odezvy fenolických kyselin v ²D v poloze 1 a 2 TSM s fokusací

Relativní směrodatná odchylka pro plochy odezvy fenolických kyselin byla 37,52 % pro polohu 1 a 53,79 % pro polohu 2. Takto vysoká relativní směrodatná odchylka není přijatelná. V případě výšky odezvy fenolických kyselin byla relativní směrodatná odchylka v poloze 1 37,22 % a v poloze 2 61,40 %. Z obrázků je patrné, že není možné měření zopakovat alespoň s podobnými výsledky. Vzhledem k tomu, že bez fokusace je možné dosáhnout podobných výsledků měření, rozdílné výsledky pravděpodobně způsobuje fokusace. Během fokusace byl sledován proud, který je uveden na ose x na obrázku 57. Proud během fokusace při jednotlivých měření se výrazně měnil. Je možné, že rozdílné výsledky způsobil právě rozdílný proud během fokusace. Zlepšit opakovatelnost metody by mohlo dosažení stejného proudu během fokusace. Když bude během fokusace elektrický proud stabilní dojde pokaždé ke stejnému zakoncetrování, a také analyty budou migrovat pokaždé do stejného místa v křemenné kapiláře.

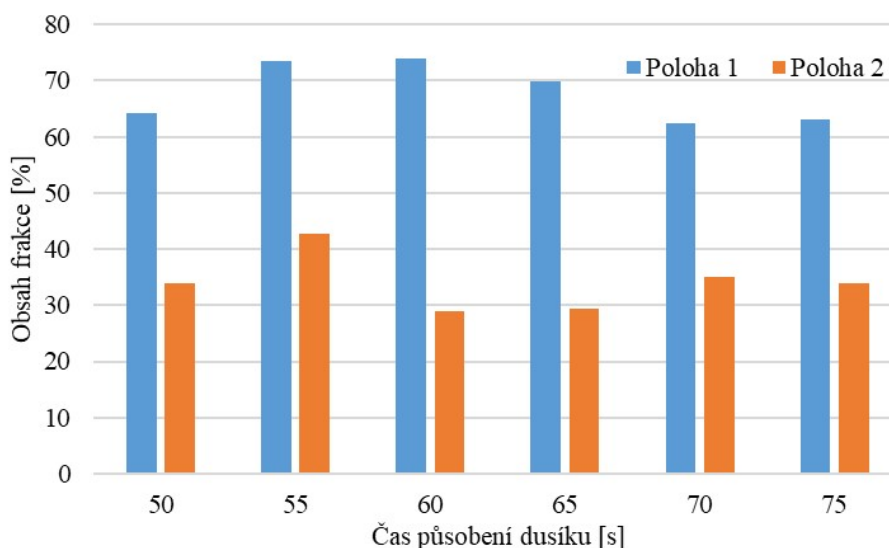
Aby se vyloučil vliv náhodné změny průtoků při přesunu frakce (například ucpání kapilár) bylo provedeno opětovné měření rychlosti průtoků injekční pumpy a aplikace tlaku dusíku. Oba tyto parametry byly ověřeny měřením průtoku pomocí Hamiltonovy stříkačky. V případě injekční pumpy byla ověřena správnost průtoků s maximální relativní směrodatnou odchylkou mezi měřeními 1,24 % při průtoku 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. V případě průtoků při tlaku dusíku 2 bar byla relativní směrodatná odchylka měření 1,18 %, průměrná hodnota průtoku byla 7,2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tato hodnota průtoku je vyšší než při přechodím měření, kdy průměrný průtok při tlaku 2 bar byl 6,34 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vzhledem k podobným výsledkům měření je tlak dusíku opakovatelný ve stejný den, ale zřejmě není reprodukovatelný. Průtok injekční pumpy je opakovatelný. Chyba měření je pravděpodobně v nesprávné fokusaci frakce. Data pro kontrolu průtoků injekční pumpy a průtoků při tlaku dusíku 2 bar jsou uvedeny v příloze 6.

3.7 Změna velikosti smyčky 2

Za předpokladu, že za nízkou opakovatelností stojí nesprávná fokusace frakce, mohlo by zlepšit opakovatelnost dosažení stabilního proudu během fokusace. K stabilnímu proudu by mohlo přispět zlepšení průchodu proudu, a to díky zvětšení objemu pufru na obou koncích křemenné kapiláry. Malý obsah pufru v kapiláře způsobuje velký objem frakce ve smyčce 2 (4,52 μl) celkový objem kapiláry je 5,3 μl a v kapiláře zbývá pouze 0,78 μl pro pufr. Řešením by bylo použít křemennou kapiláru s větším vnitřním průměrem, a tedy s větším vnitřním objemem (při zachování délky), ale bohužel nebyla v době měření k dispozici. Místo toho jsme se rozhodli zmenšit smyčku 2. Díky tomu bude na koncích kapiláry CE více elektrolytu

a analyty by mohly lépe migrovat, čímž potenciálně bude možné fokusaci a celý proces zakoncentrování frakce opakovat se stejným výsledkem.

Smyčka 2 (4,52 μl) byla nahrazena menší smyčkou o objemu 3,85 μl . Kvůli zmenšení objemu smyčky 2 bylo nutné znovu optimalizovat parametry pro přesunutí frakce do kapiláry elektroforézy a vrácení zpět do smyčky 2. Objem pro přesunutí frakce do kapiláry elektroforézy byl zmenšen na 8 μl , průtok byl ponechán na 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pomocí detektoru CE bylo ověřeno, že při objemu 8 μl je frakce přesunuta do křemenné kapiláry a v detektoru CE je vidět signál vzorku. Také bylo nutné znovu optimalizovat čas působení dusíku při tlaku 2 bar, optimalizace byla provedena stejným způsobem jako v kapitole 3.4.2. Čas působení dusíku při tlaku 2 bar vychází z obrázku 58, kde je závislost času působení tlaku dusíku na obsahu frakce ve smyčce 2 (poloha 1) a obsahu frakce ve spojovacích kapilárách (poloha 2).



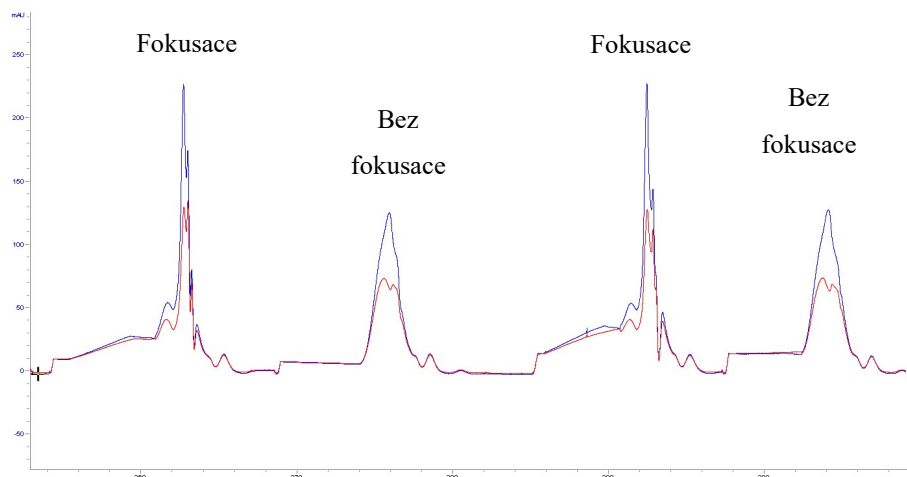
Obrázek 58: Procentuální obsah fenolických kyselin v závislosti na čase působení tlaku dusíku (2 bar) v poloze 1 a 2 TSM

Vhodný čas působení dusíku při tlaku 2 bar byl 60 s. Při použití tohoto času by mělo ve smyčce 2 TSM v poloze 1 být 74 % frakce, což je dokonce více než při použití větší smyčky (4,52 μl) kdy bylo maximálně ve smyčce 65,72 % pro kyselinu protokatechovou a 67,32 % pro kyselinu syringovou. Naopak v poloze 2 je v čase 60 s nejmenší procento (28,95 %) frakce. Čas působení dusíku je možné určit i výpočtem viz rovnice 5, za Q byla dosazena poslední měřená průměrná hodnota průtoku. Výsledky měření kontroly průtoku při tlaku 2 bar na konci systému za HPLC detektorem jsou uvedené v příloze 6 v tabulce P6.10.

Rovnice 6: Výpočet času působení tlaku dusíku pro menší smyčku o objemu 3,85 μl

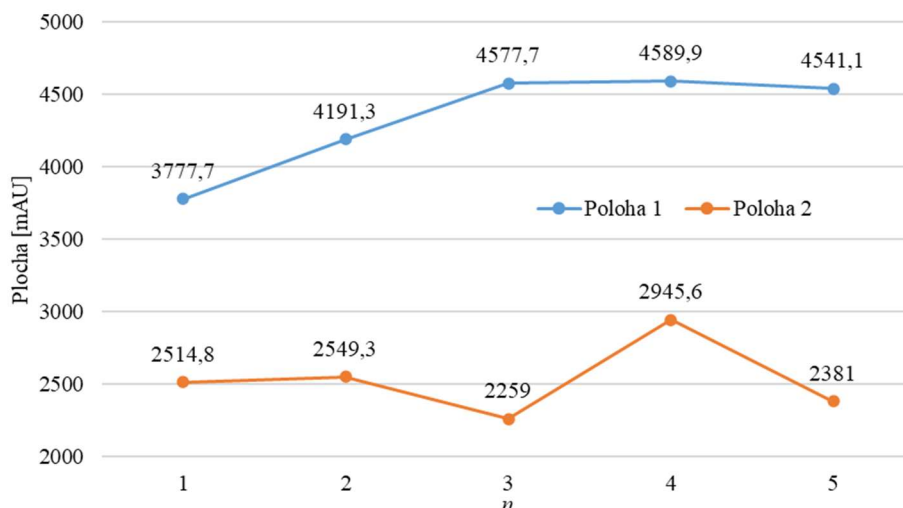
$$t_{N_2} = \frac{8}{7,2} \times 60 = 66,67 \text{ s}$$

Také bylo nutné ověřit fokusaci frakce pomocí detektoru CE. Výsledky měření jsou na obrázku 59.



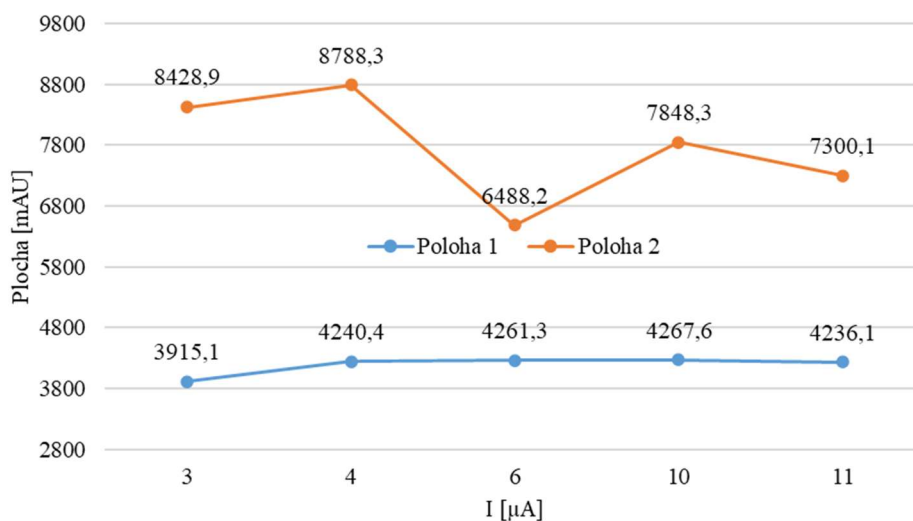
Obrázek 59: Fokusace frakce při použití menší smyčky 2 (3,85 μl), čas fokusace 240 s. napětí -20 Kv

Proud během fokusace byl 4–5 μA , což naznačuje, že by se proud díky zmenšení smyčky 2 mohl ustálit. Po optimalizaci všech parametrů byla frakce nadávkována do smyčky v poloze 2, TSM přepnut do polohy 3 a frakce natlačena do kapiláry elektroforézy objemem 8 μl při průtoku 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Následně proběhla fokusace, poté byla frakce přesunuta zpět do smyčky 2 tlakem 2 bar a časem působením tlaku 60 s. Pro porovnání vlivu fokusace na frakci v ^2D bylo nejprve provedeno měření bez aplikace napětí při fokusaci. Výsledky měření bez fokusace jsou na obrázku 60. Jedná se o plochu odezvy detektoru v poloze 1 a 2 TSM. Grafy výšek odezvy frakce jsou v příloze 7.



Obrázek 60: Plocha odezvy frakce v 2D bez aplikace napětí, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μ l, čas 60 s aplikace tlaku dusíku 2 bar

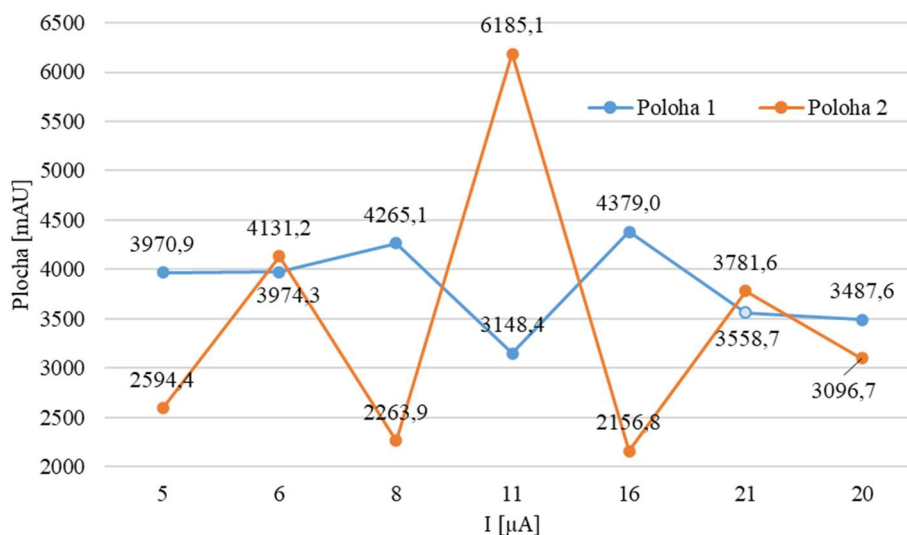
Data mají relativní směrodatnou odchylku pro polohu 1 je 4,25 % a pro polohu 2 je to 11,81 %. Tyto odchylky jsou velmi podobné jako při měření s větší smyčkou. Na obrázku 61 jsou data ploch při provedení fokusace, na ose x je proud během fokusace, grafy s výškou odezev detektoru při provedení fokusace jsou v příloze 7.



Obrázek 61: Plocha odezvy frakce v 2D s fokusací na ose x je proud během fokusace, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μ l, čas 60 s aplikace tlaku dusíku 2 bar

Měření bylo provedeno 5 \times z grafu je patrné, že pokud proud během fokusace je podobný mezi jednotlivými měřeními, tak jsou podobné i plochy v poloze 1 a 2. V poloze 1 je relativní směrodatná odchylka pouze 3,61 %, ale v poloze 2 už je 11,76 %. Měření bylo opakováno

s kratším časem působení tlaku dusíku (50 s) pro přesun zafokusované frakce zpět do smyčky 2. Čas tlaku dusíku byl zkrácen protože, nabitě kyseliny migrují skrz kapiláru k anodě a přesunují se blíže k ventilu 4, tudíž pro přesun zafokusované frakce byl měl stačit kratší čas působení tlaku dusíku. Výsledky tohoto měření jsou na obrázku 62.



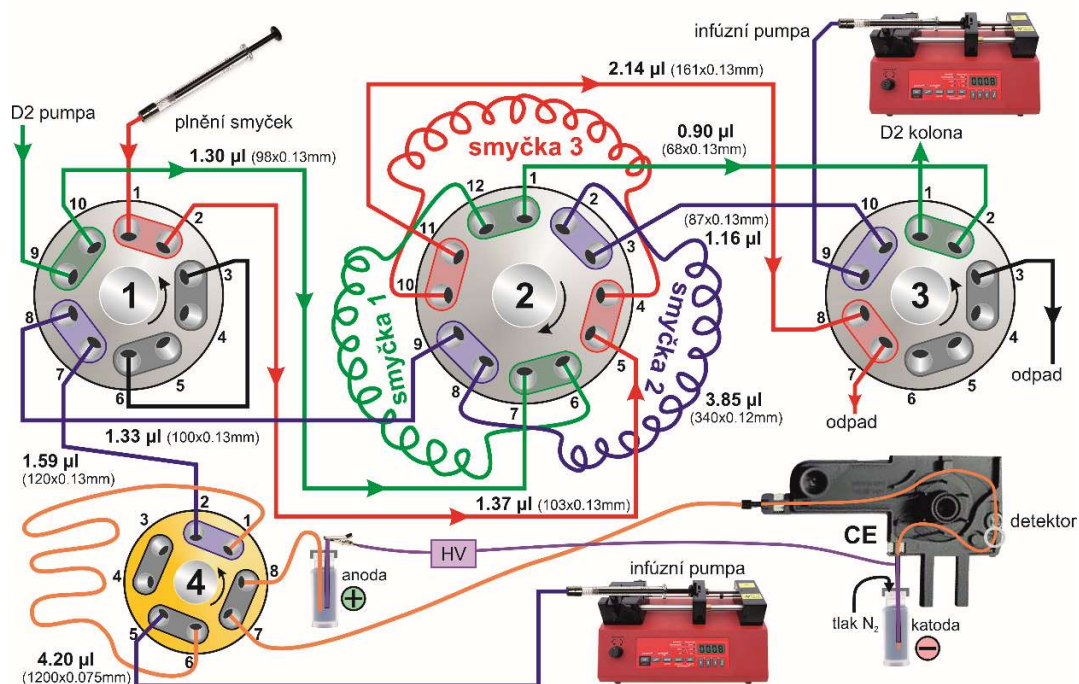
Obrázek 62: Plocha odezvy frakce v 2D s fokusací na ose x je proud během fokusace, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μ l, čas 50 s aplikace tlaku dusíku 2 bar

Z dat je jasně patrné, že měření má velmi nízkou opakovatelnost, v poloze 1 je relativní směrodatná odchylka 11,62 %, což je podobná hodnota jako při měřeních bez fokusace, ale pro polohu 2 je relativní směrodatná odchylka 40,87 %. Tato hodnota značí problém v samotném měření. Z těchto dat není patrné, že by hodnota elektrického proudu ovlivňovala plochu či množství frakce v poloze 1 nebo 2 TSM. Hodnoty ploch v poloze 2 jsou velmi rozdílné. Pro zlepšení opakovatelnosti by mohlo pomoci nahrazení tlaku dusíku pro vytlačení frakce zpět do smyčky druhou injekční pumpou, která by měla mít stabilnější průtok než tlak dusíku.

3.8 Nahrazení tlaku dusíku injekční pumpou

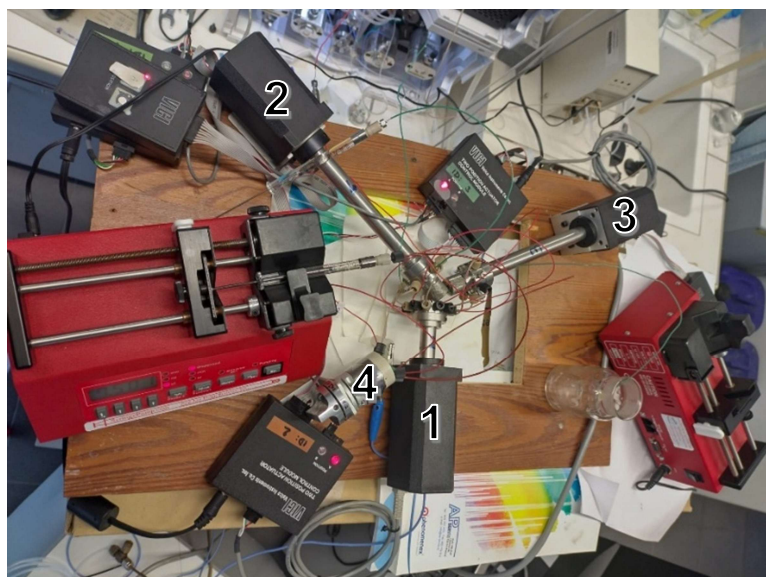
Vzhledem k problémům s opakovatelností měření byl nahrazen tlak dusíku pro vytlačení frakce zpět do smyčky další injekční pumpou. Tlak dusíku používaný pro návrat frakce vykazoval nestabilitu, protože tlak kolísal mezi dvěma hodnotami, což vedlo ke střídavému spínání a vypínání přívodu dusíku. Proto byla pro natlačení i vytlačení frakce používána stejná injekční pumpa se stejným objemem a průtokem. Toto uspořádání by mohlo pomoci dosáhnout podobných výsledků mezi měřeními. Také křemenná kapilára byla nahrazena smyčkou

o objemu 4,52 μl , aby mohlo být ověřena reprodukovatelnost bez fokusace. Na obrázku 63 je schéma aktuálního zapojení TSM s dvěma injekčními pumpami.



Obrázek 63: Schéma zapojení TSM s dvěma injekčními pumpami

Fotografie reálného zapojení s dvěma injekčními pumpami je na obrázku 64.

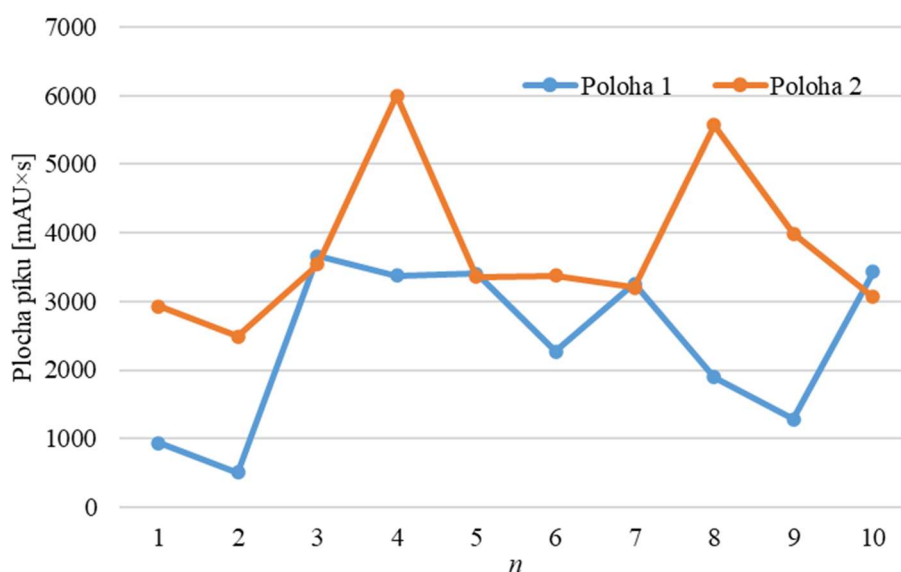


Obrázek 64: Reálné zapojení TSM s dvěma injekčními pumpami, 1: deseticestý dvoupolohový ventil, 2: dvanácticestý dvoupolohový ventil, 3: deseticestý dvoupolohový ventil, 4: osmicestý dvoupolohový ventil z nevodivého materiálu (PEEK)

Měření probíhalo následovně:

- 1) V poloze 2 TSM byla naplněna smyčka 2 (3,85 μ l) 10 \times ředěným vzorkem fenolických kyselin.
- 2) TSM byl otočen do polohy 3 a frakce byla přesunuta do smyčky pomocí 8 μ l při průtoku 25 μ l/min první injekční pumpou.
- 3) Pomocí druhé injekční pumpy byla frakce natlačena zpět do smyčky 2 a to za stejných podmínek jako v bodě 2).
- 4) Byl zapnut průtok HPLC (0,2 ml/min) a TSM byl přepnut do polohy 1.
- 5) Po zachycení signálu detektorem byl TSM přepnut do polohy 2. Mezi každým měřením byl celý systém propláchnut.

Výsledky měření pro použitý objem 8 μ l na přesunutí a vrácení frakce jsou na obrázku 65, kde jsou znázorněny plochy odezvy vzorku fenolických kyselin v poloze 1 a v poloze 2 TSM, také byly sledovány výšky odezvy detektoru, graf výšek odezev fenolických kyselin v poloze 1 a 2 TSM je v příloze 8.

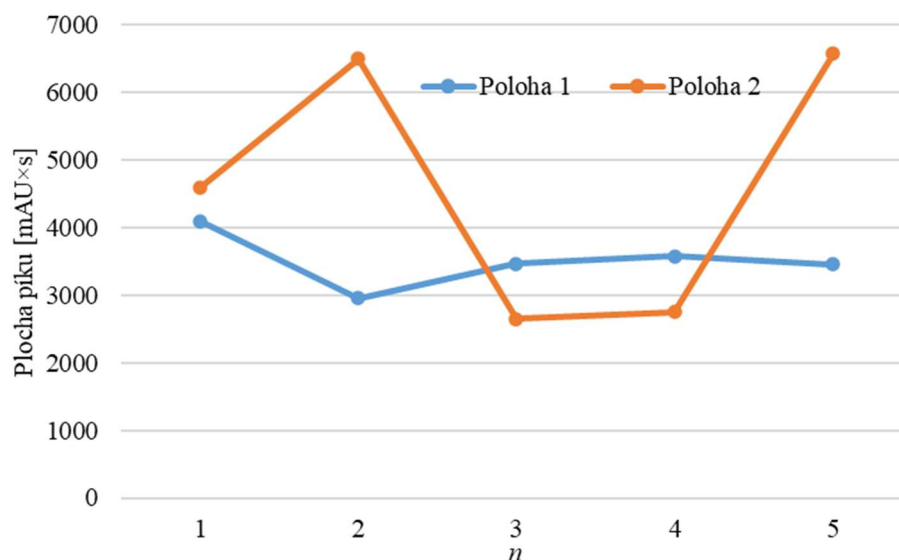


Obrázek 65: Plocha odezvy fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 8 μ l

Měření bylo opakováno desetkrát a bylo dosaženo pouze čtyř podobných výsledků v poloze 1 i v poloze 2, a to měření číslo 3, 5, 7 a 10. Měření bylo prováděno stále stejně, ale nepodařilo se do zpět do smyčky vrátit stejné množství vzorku. Relativní směrodatná odchylka mezi měřeními v poloze 1 je 49,27 % a v poloze 2 30,52 %. Z toho lze usuzovat, že měření není

opakovatelné a injekční pumpa pro vrácení frakce do smyčky nepomohla zlepšit opakovatelnost.

Měření bylo vyzkoušeno i s menším objemem pro přesun a vrácení frakce a to 7,5 μ l. Výsledky měření pro plochy odezvy fenolických kyselin jsou na obrázku 65. Také byly sledovány výšky píků odezvy fenolických kyselin graf pro výšky píků je v příloze 8.



Obrázek 66: Plocha odezvy fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 7,5 μ l

Na obrázku 66 jsou podobné pouze měření 3 a 4, relativní směrodatná odchylka pro polohu 1 je 55,42 % a pro polohu 2 je dokonce 73,12 %. Z těchto dat vyplývá, že měření je prakticky nemožné reprodukovat. Problém s opakovatelností je pravděpodobně způsoben rozmývání vzorku v kapilárách systému, bohužel zkrácení kapilár již není možné, protože by nebylo možné ventily spojit. Pro vyloučení chyby v injekční pumpě byla provedena kontrola průtoku nové injekční pumpy. Kontrola byla provedena měřením průtoku pomocí Hamiltonovy stříkačky. Data z měření jsou v příloze 8. Relativní směrodatná odchylka průtoku při měření byla 2,38 %. Z toho lze usoudit, že chyba měření nespočívá v nereprodukovatelném průtoku injekční pumpy.

Další testování již nebylo možné z časových důvodů provést. Bude každopádně nutné zjistit, proč nedochází ke stabilnímu průchodu proudu při opakovatelných měření a v jakém místě kapiláry k fokusaci dochází.

4 Závěr

Práce se zabývala přenosem frakcí pomocí třísmýčkového modulátoru ve dvourozměrné kapalinové chromatografii. Konstrukce modulátoru umožňuje úpravu smyčky před dávkováním do druhé dimenze, konkrétně pomocí fokusace v elektrickém poli. Fokusace zakoncentruje analyty do úzkých zón, což by mohlo pozitivně ovlivnit separaci v druhé dimenzi, především zúžením píků a zlepšení meze detekce celé dvourozměrné metody.

V experimentální části se podařilo optimalizovat podmínky přenosu frakce ze smyčky modulátoru do kapiláry elektroforézy a zpět. Byl stanoven vhodný průtok injekční pumpy 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, přičemž k přesunu frakce se použily objemy 8,5 μl (větší smyčka o objemu 4,52 μl) nebo 8 μl (menší smyčka o objemu 3,85 μl). Dále byl vyvinut efektivní způsob návratu fokusované frakce zpět do smyčky, nejprve pomocí tlaku dusíku (2 bar, 80 s pro větší smyčku a 60 s pro menší smyčku), později kvůli nestabilitě tlaku dusíku byla použita injekční pumpa. Fokusace byla ověřena za podmínek -20 kV, 240 s, pufr 75 mM H_3BO_3 , pH 9, což vedlo k nejlepšímu zúžení zón látek.

Výsledky potvrdily, že přenos, fokusace i návrat vzorku jsou technicky možné, ale kvůli nízké opakovatelnosti je nutné zohlednit větší množství faktorů a optimalizace systému zabere více času než se počítalo. Opakovatelnost snižovala zejména technická omezení třísmýčkového modulátoru, především nereprodukovatelné nadávkování fokusované frakce do druhé dimenze, nezlepšené ani při vynechání fokusace a použití dvou injekčních pump. Také poměrně velký objem spojovacích kapilár mezi třemi ventily modulátoru způsoboval rozmývání frakce a zůstává v nich příliš velké množství vzorku a rozpouštědel. Jejich délku již nebylo možné zkrátit. Tento problém by vyřešilo, kdyby místo tří dvupolohových ventilů byl použit jeden vícepohový speciální ventil. Docházelo také ke ztrátám vzorku při plnění smyčky. Tlak dusíku používaný pro návrat frakce vykazoval nestabilitu, tlak kolísal mezi dvěma hodnotami, což vedlo ke střídavému spínání a vypínání přívodu dusíku. V neposlední řadě zapnutý průtok v druhé dimenzi odplavoval pufr ze spojovacích kapilár, což narušovalo obsah pufru v křemenné kapiláře a stabilitu elektrického proudu během fokusace.

Tyto problémy omezily spolehlivost systému a znemožnily jednoznačně vyhodnotit přínos fokusace pro separaci v druhé dimenzi. Otázka, zda fokusace frakce ve vhodnějším uspořádání zlepší kvalitu separace, zůstává otevřená pro další výzkum. Úprava frakce pomocí fokusace má však potenciál pro praktické využití při zpracování komplexních vzorků a detailní profilování vzorků. Dvourozměrná chromatografie s úpravou frakce fokusací by mohla výrazně přispět ke zvýšení rozlišovací schopnosti a meze detekce složek.

5 Seznam literatury

- [1] P. A. Hamilton R. J. and Sewell, 'Introduction to high performance liquid chromatography', in *Introduction to high performance liquid chromatography*, P. A. Hamilton R. J. and Sewell, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, 1982, pp. 1–12. doi: 10.1007/978-94-009-5938-5_1.
- [2] Wikipedie, 'HPLC — Wikipedie: Otevřená encyklopedie', 2024. [Online]. Available: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=HPLC&oldid=23946053>
- [3] P. W. Carr and D. R. Stoll, *Two-Dimensional liquid chromatography principles, practical implementation and applications*. Německo: Agilent Technologies, Inc., 2015. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-2359EN.pdf>
- [4] D. R. Stoll and P. W. Carr, 'Two-Dimensional Liquid Chromatography: A State of the Art Tutorial', *Anal Chem*, vol. 89, no. 1, pp. 519–531, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b03506.
- [5] S. Pous-Torres, J. J. Baeza-Baeza, J. R. Torres-Lapasió, and M. C. García-Álvarez-Coque, 'Peak capacity estimation in isocratic elution', *J Chromatogr A*, vol. 1205, no. 1, pp. 78–89, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.088>.
- [6] I. François, K. Sandra, and P. Sandra, 'Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review', *Anal Chim Acta*, vol. 641, no. 1, pp. 14–31, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.041>.
- [7] Fiorelia Natashya Evangeline, Wibowo Anthony Dharma, Lae Natanael Leonard, Krisbianto Oki, and others, 'Types of high-performance liquid chromatography (HPLC) columns: A review', 2022, doi: <http://dx.doi.org/10.26418/jft.v5i1.57334>.
- [8] R. Bachhav, P. Bachhav, M. Bhamare, R. Bachhav, G. Sonawane, and others, 'A Concise Review on High-Per-formance Liquid Chromatography', *J Pharmaceut Res*, vol. 8, no. 2, pp. 340–351, 2023.
- [9] A. H. Ali, 'High-performance liquid chromatography (HPLC): A review', *Annals of advances in chemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 10–20, 2022, doi: 10.29328/journal.aac.1001026.

- [10] B. W. J. Pirok, A. F. G. Gargano, and P. J. Schoenmakers, ‘Optimizing separations in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography’, *J Sep Sci*, vol. 41, no. 1, pp. 68–98, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201700863>.
- [11] K. O. Eriksson, ‘Chapter 19 - Hydrophobic Interaction Chromatography’, in *Biopharmaceutical Processing*, G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łacki, and P. Galliher, Eds., Elsevier, 2018, pp. 401–408. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00019-0>.
- [12] P. Jandera, ‘Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review’, *Anal Chim Acta*, vol. 692, no. 1, pp. 1–25, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [13] V. D’Atri *et al.*, ‘Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles’, *J Chromatogr A*, vol. 1722, p. 464862, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464862>.
- [14] P. Jandera and G. Henze, ‘Liquid Chromatography, 1. Fundamentals, History, Instrumentation, Materials’, in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2011. doi: https://doi.org/10.1002/14356007.b05_237.pub2.
- [15] T. Cecchi, ‘Ion Pairing Chromatography’, *Crit Rev Anal Chem*, vol. 38, no. 3, pp. 161–213, 2008, doi: [10.1080/10408340802038882](https://doi.org/10.1080/10408340802038882).
- [16] L. Nováková and M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 1. vydání. Hradec Králové; Klatovy: Lucie Nováková ;, 2013.
- [17] K. Broeckhoven, K. Shoykhet, and M. Dong, ‘Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices’, *LCGC North America*, vol. 37, 2019, Accessed: Feb. 13, 2025. [Online]. Available: <https://www.chromatographyonline.com/view/modern-hplc-pumps-perspectives-principles-and-practices>
- [18] F. Steiner, C. Paul, and M. Dong, ‘HPLC autosamplers: perspectives, principles, and practices’, *LCGC North America*, vol. 37, 2019, Accessed: Jan. 23, 2025. [Online]. Available: <https://www.chromatographyonline.com/view/hplc-autosamplers-perspectives-principles-and-practices>

- [19] G. Vanhoenacker and P. Sandra, 'High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations', *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 1, pp. 245–248, 2008, doi: 10.1007/s00216-007-1671-7.
- [20] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, and R. A. Shalliker, 'Implementations of two-dimensional liquid chromatography', *J Chromatogr A*, vol. 1189, no. 1, pp. 109–168, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.086>.
- [21] D. R. Stoll and P. W. Carr, *Multi-Dimensional Liquid Chromatography: Principles, Practice, and Applications*, Ilustrované vydání., vol. 182. CRC Press, 2015. Accessed: Jan. 23, 2025. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-2359EN.pdf>
- [22] B. W. J. Pirok, D. R. Stoll, and P. J. Schoenmakers, 'Recent Developments in Two-Dimensional Liquid Chromatography: Fundamental Improvements for Practical Applications', *Anal Chem*, vol. 91, no. 1, pp. 240–263, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b04841.
- [23] D. R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S. E. G. Porter, and S. C. Rutan, 'Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography', *J Chromatogr A*, vol. 1168, no. 1, pp. 3–43, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.054>.
- [24] M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, and J. C. Gebler, 'Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography', *Anal Chem*, vol. 77, no. 19, pp. 6426–6434, 2005, doi: 10.1021/ac050923i.
- [25] A. A. Aly and T. Górecki, 'Two-dimensional liquid chromatography with reversed phase in both dimensions: A review', *J Chromatogr A*, vol. 1721, p. 464824, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464824>.
- [26] P. Donato, F. Cacciola, M. Beccaria, P. Dugo, and L. Mondello, 'Combining orthogonal comprehensive two-dimensional liquid chromatography methods in food analysis', 2014.
- [27] P. Jandera, T. Hájek, and P. Česla, 'Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography', *J Chromatogr A*, vol. 1218, no. 15, pp. 1995–2006, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.095>.

- [28] D. R. Stoll, K. Shoykhet, P. Petersson, and S. Buckenmaier, 'Active Solvent Modulation: A Valve-Based Approach To Improve Separation Compatibility in Two-Dimensional Liquid Chromatography', *Anal Chem*, vol. 89, no. 17, pp. 9260–9267, Sep. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02046.
- [29] P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo, and L. Mondello, 'Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications', *J Chromatogr A*, vol. 1184, no. 1, pp. 353–368, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.074>.
- [30] K. Horváth, J. N. Fairchild, and G. Guiochon, 'Detection issues in two-dimensional on-line chromatography', *J Chromatogr A*, vol. 1216, no. 45, pp. 7785–7792, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.016>.
- [31] J. M. Davis, D. R. Stoll, and P. W. Carr, 'Effect of First-Dimension Undersampling on Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations', *Anal Chem*, vol. 80, no. 2, pp. 461–473, Jan. 2008, doi: 10.1021/ac071504j.
- [32] X. Li, D. R. Stoll, and P. W. Carr, 'Equation for Peak Capacity Estimation in Two-Dimensional Liquid Chromatography', *Anal Chem*, vol. 81, no. 2, pp. 845–850, Jan. 2009, doi: 10.1021/ac801772u.
- [33] R. E. Murphy, M. R. Schure, and J. P. Foley, 'Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography', *Anal Chem*, vol. 70, no. 8, pp. 1585–1594, Apr. 1998, doi: 10.1021/ac971184b.
- [34] P. Jandera, T. Hájek, and M. Staňková, 'Monolithic and core-shell columns in comprehensive two-dimensional HPLC: a review', *Anal Bioanal Chem*, vol. 407, no. 1, pp. 139–151, 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8147-3.
- [35] H. Malerod, E. Lundanes, and T. Greibrokk, 'Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography', *Analytical Methods*, vol. 2, no. 2, pp. 110–122, 2010, doi: <https://doi.org/10.1039/B9AY00194H>.
- [36] P. Česla and J. Křenková, 'Fraction transfer process in on-line comprehensive two-dimensional liquid-phase separations', *J Sep Sci*, vol. 40, no. 1, pp. 109–123, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201600921>.

- [37] Y. Chen, L. Montero, and O. J. Schmitz, ‘Advance in on-line two-dimensional liquid chromatography modulation technology’, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 120, p. 115647, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115647>.
- [38] I. François, K. Sandra, and P. Sandra, ‘History, Evolution, and Optimization Aspects of Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography’, in *Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2011, ch. 8, pp. 281–330. doi: <https://doi.org/10.1002/9781118003466.ch8>.
- [39] A. van der Horst and P. J. Schoenmakers, ‘Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers’, *J Chromatogr A*, vol. 1000, no. 1, pp. 693–709, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00495-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00495-3).
- [40] M. Creese, M. Breadmore, E. Hilder, and R. Shellie, ‘The Modulator in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography’, *LC GC Eur*, vol. 5, pp. 268–276, Mar. 2016.
- [41] B. R. Dsouza, A. Joseph, S. Das, and A. T. Alex, ‘Multiple Heart-Cutting Two-Dimensional Liquid Chromatography: Recent Developments and Applications’, *Curr Anal Chem*, vol. 17, no. 3, pp. 339–354, 2021, doi: <https://doi.org/10.2174/1573411016666200630114826>.
- [42] S. Schneider, ‘2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography’, 2024. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6673EN.pdf>
- [43] B. Winther and J. L. E. Reubsæet, ‘Application of supplementary flow in comprehensive 2D liquid chromatography combining SEC and RPC’, *J Sep Sci*, vol. 28, no. 5, pp. 477–482, 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.200400004>.
- [44] M. J. den Uijl, T. Roeland, T. S. Bos, P. J. Schoenmakers, M. R. van Bommel, and B. W. J. Pirok, ‘Assessing the feasibility of stationary-phase-assisted modulation for two-dimensional liquid-chromatography separations’, *J Chromatogr A*, vol. 1679, p. 463388, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463388>.
- [45] R. S. van den Hurk, M. Pursch, D. R. Stoll, and B. W. J. Pirok, ‘Recent trends in two-dimensional liquid chromatography’, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 166, p. 117166, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117166>.

- [46] S. Ji *et al.*, ‘Separation and characterization of chemical constituents in Ginkgo biloba extract by off-line hydrophilic interaction×reversed-phase two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry’, *J Pharm Biomed Anal*, vol. 146, pp. 68–78, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.057>.
- [47] Y. Zhang *et al.*, ‘Separation and characterization of bufadienolides in toad skin using two-dimensional normal-phase liquid chromatography×reversed-phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry’, *Journal of Chromatography B*, vol. 1026, pp. 67–74, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.015>.
- [48] P. Donato *et al.*, ‘Analysis of the carotenoid composition and stability in various overripe fruits by comprehensive two-dimensional liquid chromatography’, 2016.
- [49] F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, and F. P. Smith, ‘A brief introduction to capillary electrophoresis’, *Forensic Sci Int*, vol. 92, no. 2, pp. 75–88, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00010-3).
- [50] A. Shallan, R. Guijt, and M. Breadmore, ‘Capillary Electrophoresis: Basic Principles’, in *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*, Second Edition., J. A. Siegel, P. J. Saukko, and M. M. Houck, Eds., Waltham: Academic Press, 2013, pp. 549–559. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00241-5>.
- [51] R. S. Mandabhusi, ‘Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions’, *Electrophoresis*, vol. 19, no. 2, pp. 224–230, 1998, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.1150190215>.
- [52] E. A. S. Doherty, R. J. Meagher, M. N. Albarghouthi, and A. E. Barron, ‘Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis’, *Electrophoresis*, vol. 24, no. 1–2, pp. 34–54, 2003, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200390029>.
- [53] S. Hjertén, ‘High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption’, *J Chromatogr A*, vol. 347, pp. 191–198, 1985, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)95485-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)95485-8).
- [54] C. R. Evans and J. W. Jorgenson, ‘Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules’, *Anal Bioanal Chem*, vol. 378, no. 8, pp. 1952–1961, 2004, doi: [10.1007/s00216-004-2516-2](https://doi.org/10.1007/s00216-004-2516-2).

- [55] R. Rodriguez-Diaz, M. Zhu, and T. Wehr, 'Strategies to improve performance of capillary isoelectric focusing', *J Chromatogr A*, vol. 772, pp. 145–160, 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00104-0.
- [56] D. Heiger, 'High performance capillary electrophoresis', in *Www.agilent.com/chem*, Německo: Agilent Technologies, 2000, pp. 1–136. doi: 5968-9963E.
- [57] S. A. Cohen and M. R. Schure, *Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences*, První. USA, Canada: John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- [58] P. G. Righetti and J. W. Drysdale, 'Isoelectric focusing in gels', *J Chromatogr A*, vol. 98, no. 2, pp. 271–321, 1974, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92076-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92076-4).
- [59] O. Vesterberg, 'Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, vol. 257, no. 1, pp. 11–19, 1972, doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90248-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(72)90248-6).
- [60] D. B. Friedman, S. Hoving, and R. Westermeier, 'Chapter 30 Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis', in *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, vol. 463, R. R. Burgess and M. P. Deutscher, Eds., in *Methods in Enzymology*, vol. 463, Academic Press, 2009, pp. 515–540. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63030-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63030-5).
- [61] K. Shimura, 'Chapter 7 - Capillary Isoelectric Focusing', in *Capillary Electromigration Separation Methods*, C. F. Poole, Ed., in *Handbooks in Separation Science*, Elsevier, 2018, pp. 167–187. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809375-7.00007-1>.
- [62] R. Rodriguez-Diaz, T. Wehr, and M. Zhu, 'Capillary isoelectric focusing', *Electrophoresis*, vol. 18, no. 12–13, pp. 2134–2144, 1997, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.1150181204>.
- [63] F. Kilár, 'Recent applications of capillary isoelectric focusing', *Electrophoresis*, vol. 24, no. 22–23, pp. 3908–3916, 2003, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200305650>.
- [64] E. Naghdi, M. E. Reinau, T. N. Krogh, and C. Neusüß, 'Chemical Mobilization-Based Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry Using the nanoCEasy Interface for Pharmaceutical Protein Analysis.', *Anal Chem*, 2024, doi: 10.1021/acs.analchem.4c02441.

- [65] G. Zhu, L. Sun, and N. Dovichi, 'Simplified capillary isoelectric focusing with chemical mobilization for intact protein analysis.', *J Sep Sci*, vol. 40 4, pp. 948–953, 2017, doi: 10.1002/jssc.201601051.
- [66] P. G. Righetti *et al.*, 'Capillary electrophoresis of peptides and proteins in isoelectric buffers: An update', *Electrophoresis*, vol. 21, no. 18, pp. 4046–4053, 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200012\)21:18<4046::AID-ELPS4046>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200012)21:18<4046::AID-ELPS4046>3.0.CO;2-5).
- [67] G. J. Pielak, 'Buffers, Especially the Good Kind', *Biochemistry*, vol. 60, no. 46, pp. 3436–3440, Nov. 2021, doi: 10.1021/acs.biochem.1c00200.
- [68] K. Chingin, J. Astorga-Wells, M. Pirmoradian Najafabadi, T. Lavold, and R. A. Zubarev, 'Separation of Polypeptides by Isoelectric Point Focusing in Electrospray-Friendly Solution Using a Multiple-Junction Capillary Fractionator', *Anal Chem*, vol. 84, no. 15, pp. 6856–6862, Aug. 2012, doi: 10.1021/ac3013016.
- [69] P. G. Righetti and A. Bossi, 'Isoelectric focusing of proteins and peptides in gel slabs and in capillaries1This humble review is dedicated to the memory of our Maestro, Prof. Harry Svensson-Rilbe, who died on July 10, 1997 at the age of 84 years.1', *Anal Chim Acta*, vol. 372, no. 1, pp. 1–19, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00329-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00329-8).
- [70] P. G. Righetti, A. M. Bossi, and C. Gelfi, 'Capillary isoelectric focusing and isoelectric buffers: an evolving scenario.', *J Capillary Electrophor*, vol. 4 2, pp. 47–59, 1997, [Online]. Available: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:22221243>
- [71] L. M. Ramsay, N. Cermak, O. O. Dada, and N. J. Dovichi, 'Capillary isoelectric focusing with pH 9.7 cathode for the analysis of gastric biopsies', *Anal Bioanal Chem*, vol. 400, no. 7, pp. 2025–2030, 2011, doi: 10.1007/s00216-011-4926-2.
- [72] R. T. Kelly and A. T. Woolley, 'Electric field gradient focusing', *J Sep Sci*, vol. 28, no. 15, pp. 1985–1993, 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.200500228>.
- [73] X. Sun, P. B. Farnsworth, H. D. Tolley, K. F. Warnick, A. T. Woolley, and M. L. Lee, 'Performance optimization in electric field gradient focusing', *J Chromatogr A*, vol. 1216, no. 1, pp. 159–164, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.031>.

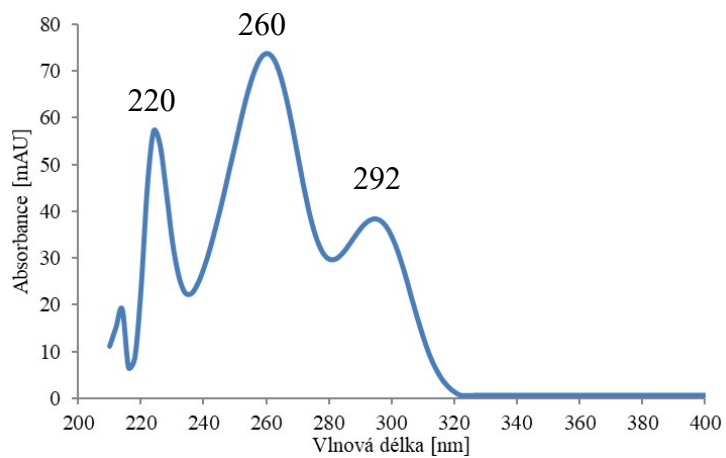
- [74] I. Harnachová, 'Redukce nadměrného ředění vzorku při převodu frakcí ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii', 2023, *Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice*.

6 Seznam příloh

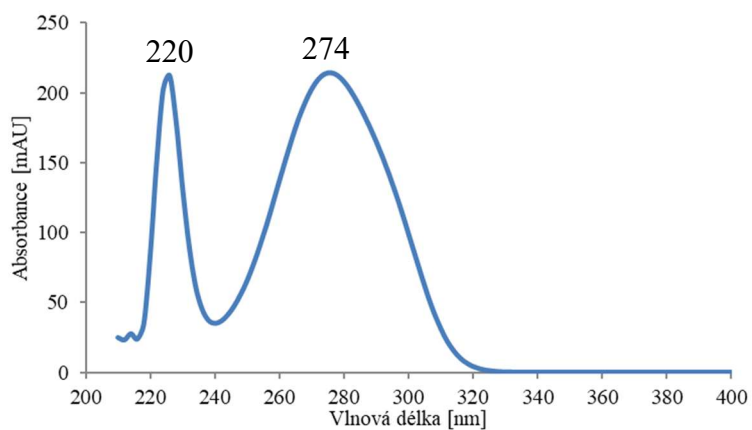
Příloha 1: Absorpční spektra fenolických kyselin.....	103
Příloha 2: Přesun frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy	104
Příloha 3: Vrácení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky	105
Příloha 4: Měření průtoku dle použitého tlaku dusíku.....	107
Příloha 5: Propojení TSM, kapilární elektroforézy a kolony druhé dimenze	110
Příloha 6: Přesunutí frakce do druhé dimenze.....	112
Příloha 7: Změna velikosti smyčky 2	116
Příloha 8: Nahrazení tlaku dusíku injekční pumpou	120

Příloha 1: Absorpční spektra fenolických kyselin

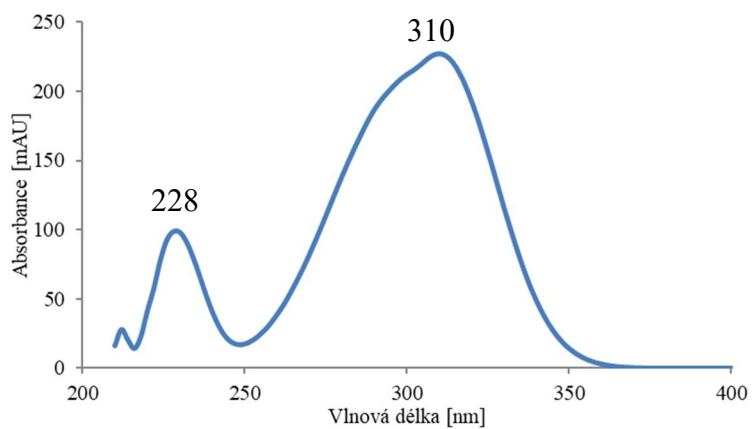
Pl. 1: Absorpční spektrum kyseliny protocatechové



Pl. 2: Absorpční spektrum kyseliny syringové



Pl. 3: Absorpční spektrum kyseliny p-kumarové



Příloha 2: Přesun frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy

P2. 1: Ověření průtoku pumpy pomocí detektoru CE

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	t ₁ [s]	l _{kap.celkem} [cm]	V [μl]
1	10	57,49	120	9,582
2	10	58,61	120	9,768
3	10	58,53	120	9,755
4	10	59,71	120	9,952
průměr:				9,764
směrodatná odchylka:				0,151
relativní směrodatná odchylka [%]:				1,548

P2. 2: Ověření průtoku pumpy pomocí detektoru CE

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	t ₁ [s]	l _{kap.celkem} [cm]	V [μl]
1	25	24,68	120	10,283
2	25	24,09	120	10,038
3	25	23,66	120	9,858
4	25	24,27	120	10,113
průměr:				10,073
směrodatná odchylka:				0,176
relativní směrodatná odchylka [%]:				1,749

P2. 3: Ověření průtoku pumpy pomocí detektoru CE

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	t ₁ [s]	l _{kap.celkem} [cm]	V [μl]
1	50	13,24	120	11,033
2	50	12,07	120	10,058
3	50	12,51	120	10,425
4	50	12,31	120	10,258
průměr:				10,444
směrodatná odchylka:				0,421
relativní směrodatná odchylka [%]:				4,028

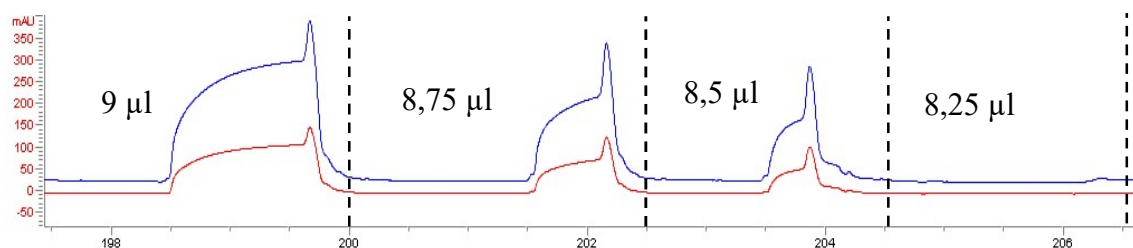
P2. 4: Ověření průtoku pumpy pomocí detektoru CE

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	t ₁ [s]	l _{kap.celkem} [cm]	V [μl]
1	100	6,87	120	11,450
2	100	7,19	120	11,983
3	100	6,44	120	10,733
4	100	7,77	120	12,950
průměr:				11,779
směrodatná odchylka:				0,934
relativní směrodatná odchylka [%]:				7,926

P2. 5: Vytlačený objem v závislosti na zobrazení signálu v detektoru CE

Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	V [μl]	Signál detektoru CE
25	10	ANO
25	9,75	ANO
25	9,5	ANO
25	9,25	ANO
25	9	ANO
25	8,75	ANO
25	8,5	ANO
25	8,25	NE

P2. 6: Neřaděný vzorek fenolických kyselin, signál při objemu 9 μl ; 8,75 μl ; 8,5 μl a 8,25 μl a průtoku 25 $\mu\text{l}/\text{min}$



Příloha 3: Vracení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky

P3. 1: Průtoky měřené v detektoru CE pomocí čerpadla CE a tlaku 100 mbar

n	P [bar]	t [s]	Zdroj tlaku:	$l_{\text{kap. k detektoru}}$ [mm]	$l_{\text{kap. celkem}}$ [mm]	V [μl]	Q [$\mu\text{l}/\text{s}$]	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	100	36,5	pumpa	914	1154	4,038	0,110	6,609
2	100	75,89	pumpa	914	1154	4,038	0,053	3,179
3	100	45,15	pumpa	914	1154	4,038	0,089	5,343
4	100	51,17	pumpa	914	1154	4,038	0,079	4,714
5	100	72,01	pumpa	914	1154	4,038	0,056	3,350
průměr:								4,639
směrodatná odchylka:								1,430
relativní směrodatná odchylka [%]:								30,820

P3. 2: Průtoky měřené v detektoru CE pomocí tlaku dusíku 2 bar

n	P [bar]	t [s]	Zdroj tlaku:	$l_{\text{kap. k detektoru}}$ [mm]	$l_{\text{kap. celkem}}$ [mm]	V [μl]	Q [$\mu\text{l}/\text{s}$]	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	2	34,71	N ₂	914	1154	4,038	0,116	6,980
2	2	34,58	N ₂	914	1154	4,038	0,117	7,006
3	2	34,37	N ₂	914	1154	4,038	0,117	7,049
4	2	34,18	N ₂	914	1154	4,038	0,118	7,088
5	2	32,75	N ₂	914	1154	4,038	0,123	7,398
6	2	35,18	N ₂	914	1154	4,038	0,115	6,887
průměr:								7,068
směrodatná odchylka:								0,175
relativní směrodatná odchylka [%]:								2,482

P3. 3: Průtoky měřené v detektoru CE pomocí tlaku dusíku 3,5 bar

n	P [bar]	t [s]	Zdroj tlaku:	l _{kap. k detektoru} [mm]	l _{kap.celkem} [mm]	V [μl]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
1	3,5	18,86	N ₂	914	1150,4	4,038	0,214	12,846
2	3,5	17,93	N ₂	914	1150,4	4,038	0,225	13,512
3	3,5	18,00	N ₂	914	1150,4	4,038	0,224	13,460
4	3,5	18,25	N ₂	914	1150,4	4,038	0,221	13,275
průměr:								13,273
směrodatná odchylka:								0,302
relativní směrodatná odchylka [%]:								2,279

P3. 4: Průtoky měřené v detektoru CE pomocí tlaku dusíku 5 bar

n	P [bar]	t [s]	typ	l _{k detektoru} [mm]	l _{kap.celkem} [mm]	V [μl]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
1	5	14,59	N ₂	914	1154	4,038	0,277	16,606
2	5	14,47	N ₂	914	1154	4,038	0,279	16,743
3	5	14,51	N ₂	914	1154	4,038	0,278	16,697
4	5	13,45	N ₂	914	1154	4,038	0,300	18,013
5	5	13,82	N ₂	914	1154	4,038	0,292	17,531
průměr:								17,118
směrodatná odchylka:								0,623
relativní směrodatná odchylka [%]:								3,638

P3. 5: Průtoky měřené v detektoru CE pomocí tlaku dusíku 2 bar, otočení kapiláry (V=1,06 μl)

n	P [bar]	t [s]	typ	l _{k detektoru} [mm]	l _{kap.celkem} [mm]	V [μl]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
1	2	13,44	N ₂	240	1154	1,060	0,079	4,733
2	2	12,46	N ₂	240	1154	1,060	0,085	5,106
3	2	11,77	N ₂	240	1154	1,060	0,090	5,405
4	2	11,7	N ₂	240	1154	1,060	0,091	5,437
5	2	11,65	N ₂	240	1154	1,060	0,091	5,461
6	2	12,67	N ₂	240	1154	1,060	0,084	5,021
7	2	12,77	N ₂	240	1154	1,060	0,083	4,982
průměr:								5,164
směrodatná odchylka:								0,278
relativní směrodatná odchylka [%]:								5,381

P3. 6: Průtoky měřené v detektoru CE pomocí tlaku dusíku 5 bar, otočení kapiláry (V=1,06 μl)

n	P [bar]	t [s]	typ	l _{k detektoru} [mm]	l _{kap.celkem} [mm]	V [μl]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
1	5	9,87	N ₂	240	1150,4	1,060	0,107	6,444
2	5	9,11	N ₂	240	1150,4	1,060	0,116	6,981
3	5	9,34	N ₂	240	1150,4	1,060	0,113	6,809
4	5	9,59	N ₂	240	1150,4	1,060	0,111	6,632
5	5	9,10	N ₂	240	1150,4	1,060	0,116	6,989
průměr:								6,771
směrodatná odchylka:								0,234
relativní směrodatná odchylka [%]:								3,461

Příloha 4: Měření průtoku dle použitého tlaku dusíku

P4. 1: Průtok měřený za ventilem 4 (PEEK) ihned po spuštění tlaku 5 bar

V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
2,5	5	7,61	0,329	19,711
2,5	5	7,3	0,342	20,548
2,5	5	8,23	0,304	18,226
5	5	15,73	0,318	19,072
7,5	5	21,98	0,341	20,473
průměr:				19,606
směrodatná odchylka:				0,980
relativní směrodatná odchylka [%]:				4,997

P4. 2: Průtok měřený za ventilem 4 (PEEK) při ustálení tlaku 5 bar

V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
2,5	5	6,89	0,363	21,771
5	5	13,36	0,374	22,455
7,5	5	20,36	0,368	22,102
2,5	5	6,86	0,364	21,866
5	5	13,91	0,359	21,567
7,5	5	21,38	0,351	21,048
10	5	28,49	0,351	21,060
průměr:				21,696
směrodatná odchylka:				0,519
relativní směrodatná odchylka [%]:				2,393

P4. 3: Průtok měřený za ventilem 4 (PEEK) ihned po spuštění tlaku 2 bar

V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
10	2	75,95	0,132	7,900
2,5	2	18,28	0,137	8,206
5	2	37,62	0,133	7,974
7,5	2	55,17	0,136	8,157
10	2	73,79	0,136	8,131
2,5	2	18,88	0,132	7,945
5	2	36,69	0,136	8,177
7,5	2	55,25	0,136	8,145
10	2	72,69	0,138	8,254
průměr:				8,099
směrodatná odchylka:				0,126
relativní směrodatná odchylka [%]:				1,555

P4. 4: Průtok měřený za ventilem 4 (PEEK) při ustálení tlaku 2 bar

V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
2,5	2	18,46	0,135	8,126
5	2	38,89	0,129	7,714
7,5	2	56,21	0,133	8,006
10	2	72,41	0,138	8,286
2,5	2	19,98	0,125	7,508
5	2	37,48	0,133	8,004
7,5	2	55,24	0,136	8,146
10	2	73,75	0,136	8,136
průměr:				7,991
směrodatná odchylka:				0,257
relativní směrodatná odchylka [%]:				3,212

P4. 5: Časy měřené v detektoru CE a HPLC pomocí tlaku dusíku 2 bar, vzorek 10× ředěný metanolem

P [bar]	Vzorek	V ₁ [μl]	V ₂ [μl]	t ₁ [s]	t ₂ [s]	Q ₁ [μl/min]	Q ₂ [μl/min]	ΔQ [μl/min]
2	metanol 10x ř.	1,10	5,30	12,27	68,0	5,401	4,678	0,723
2	metanol 10x ř.	1,10	5,30	12,78	69,0	5,185	4,610	0,575
2	metanol 10x ř.	1,10	5,30	12,25	74,0	5,410	4,298	1,111
2	metanol 10x ř.	1,10	5,30	14,42	82,2	4,596	3,870	0,726
průměr:				12,93	73,3	5,148	4,364	0,784
směrodatná odchylka:				1,02	6,49	0,383	0,369	0,229
relativní směrodatná odchylka [%]:				7,91	8,85	7,431	8,446	29,246

P4. 6: Časy měřené v detektoru CE a HPLC pomocí tlaku dusíku 2 bar, vzorek 10× ředěný vodou

P [bar]	Vzorek	V ₁ [μl]	V ₂ [μl]	t ₁ [s]	t ₂ [s]	Q ₁ [μl/min]	Q ₂ [μl/min]	ΔQ [μl/min]
2	voda 10x ř.	1,10	5,30	11,34	49,2	5,844	6,465	0,621
2	voda 10x ř.	1,10	5,30	11,58	47,4	5,723	6,711	0,988
2	voda 10x ř.	1,10	5,30	11,63	50,4	5,698	6,311	0,613
2	voda 10x ř.	1,10	5,30	11,96	60,0	5,541	5,301	-0,239
2	voda 10x ř.	1,10	5,30	10,89	54,0	6,085	5,890	-0,195
průměr:				11,48	52,2	5,778	6,136	0,358
směrodatná odchylka:				0,40	4,98	0,203	0,554	0,546
relativní směrodatná odchylka [%]:				3,46	9,55	3,509	9,023	152,721

P4. 7: Časy měřené v detektoru CE a HPLC pomocí tlaku dusíku 3 bar, vzorek 10× ředěný vodou

P [bar]	V ₁ [μl]	V ₂ [μl]	t ₁ [s]	t ₂ [s]	Q ₁ [μl/min]	Q ₂ [μl/min]	ΔQ [μl/min]
3	1,10	5,30	9,51	30,0	6,968	10,603	3,635
3	1,10	5,30	8,94	29,4	7,413	10,819	3,407
3	1,10	5,30	8,53	28,8	7,769	11,045	3,276
3	1,10	5,30	8,40	29,7	7,889	10,710	2,821
3	1,10	5,30	8,45	29,4	7,842	10,819	2,977
průměr:			8,77	29,46	7,576	10,799	3,223
směrodatná odchylka:			0,47	0,44	0,388	0,164	0,327
relativní směrodatná odchylka [%]:			5,33	1,51	5,121	1,518	10,152

P4. 8: Časy měřené v detektoru CE a HPLC pomocí tlaku dusíku 4 bar, vzorek 10× ředěný vodou

P [bar]	V ₁ [μl]	V ₂ [μl]	t ₁ [s]	t ₂ [s]	Q ₁ [μl/min]	Q ₂ [μl/min]	ΔQ [μl/min]
4	1,10	5,30	8,12	19,8	8,161	16,065	-7,904
4	1,10	5,30	8,10	22,8	8,181	13,951	-5,770
4	1,10	5,30	9,32	21,9	7,110	14,524	-7,414
4	1,10	5,30	9,11	23,7	7,274	13,421	-6,147
4	1,10	5,30	8,27	21,6	8,013	14,726	-6,713
průměr:			8,58	22,0	7,748	14,538	-6,790
směrodatná odchylka:			0,58	1,46	0,515	0,995	0,879
relativní směrodatná odchylka [%]:			6,81	6,65	6,643	6,843	-12,945

P4. 9: Časy měřené v detektoru CE a HPLC pomocí tlaku dusíku 5 bar, vzorek 10× ředěný vodou

P [bar]	V ₁ [μl]	V ₂ [μl]	t ₁ [s]	t ₂ [s]	Q ₁ [μl/min]	Q ₂ [μl/min]
5	1,104	5,301	8,0	18,0	8,283	17,671
5	1,104	5,301	8,7	18,0	7,617	17,671
5	1,104	5,301	8,6	19,8	7,706	16,065
5	1,104	5,301	7,3	18,0	9,078	17,671
průměr:			8,2	18,5	8,171	17,270
směrodatná odchylka:			0,6	0,9	0,673	0,803
relativní směrodatná odchylka [%]:			7,9	4,9	8,236	4,651

P4. 10: Průtok měřený před detektorem HPLC pomocí Hamiltonovy stříkačky při tlaku 2 bar

V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
2,5	2	24,27	0,103	6,180
5	2	48,56	0,103	6,178
2,5	2	24,21	0,103	6,196
5	2	47,12	0,106	6,367
průměr:				6,230
směrodatná odchylka:				0,091
relativní směrodatná odchylka [%]:				1,466

P4. 11: Průtok měřený před detektorem HPLC pomocí Hamiltonovy stříkačky při tlaku 5 bar

V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
2,5	5	8,57	0,292	17,503
5	5	16,83	0,297	17,825
2,5	5	9,18	0,272	16,340
5	5	17,81	0,281	16,844
průměr:				17,128
směrodatná odchylka:				0,665
relativní směrodatná odchylka [%]:				3,885

Příloha 5: Propojení TSM, kapilární elektroforézy a kolony druhé dimenze

P5. 1: Plochy kyseliny protokatechové pro optimalizaci času dusíku při tlaku 2 bar pro vytlačení frakce z kapiláry elektroforézy do smyčky 2 v poloze 1 TSM

Kyselina protokatechová	Plocha [mAU×s]	vlnová délka [nm]	poloha TSM
1	331,2	280	1
2	337,0	280	1
3	337,5	280	1
4	325,2	280	1
5	329,3	280	1
6	328,3	280	1
průměr	331,42	100%	
směrodatná odchylka	4,921		
relativní směrodatná odchylka [%]:	1,48		

P5. 2: elektroforPlochy kyseliny syringové pro optimalizaci času dusíku při tlaku 2 bar pro vytlačení frakce z kapiláry ézy do smyčky 2 v poloze 1 TSM

Kyselina syringová	Plocha [mAU×s]	vlnová délka [nm]	poloha TSM
1	492,2	280	1
2	497,2	280	1
3	500,3	280	1
4	488,6	280	1
5	487,5	280	1
6	487,7	280	1
průměr	492,25	100%	
směrodatná odchylka	5,402		
relativní směrodatná odchylka [%]:	1,10		

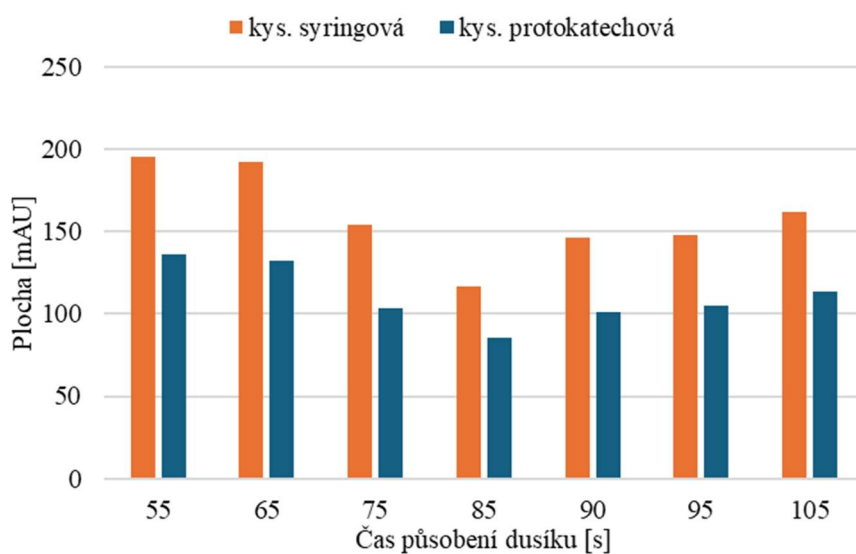
P5. 3: Optimalizace času dusíku pro vytlačení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky 2 v poloze 1 TSM

t [s]	ø plocha kys. protokatechová [mAU×s]	%	ø plocha kys. syringová [mAU×s]	%
55	145,35	43,86	210,80	42,82
65	189,03	57,04	272,03	55,26
75	226,63	65,72	331,37	67,32
85	208,13	62,80	303,23	61,60
90	206,33	60,74	301,20	61,19
95	169,55	51,16	246,05	49,98
105	48,15	14,529	69,45	14,11

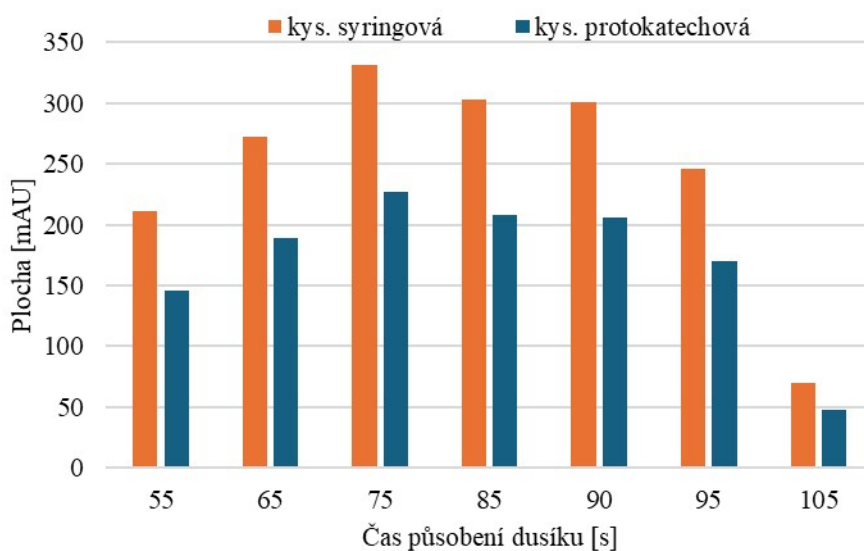
P5. 4: Optimalizace času dusíku pro vytlačení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky 2 v poloze 2 TSM

t [s]	ø plocha kys. protokatechová [mAU×s]	%	ø plocha kys. syringová [mAU×s]	%
55	136,55	27,74	195,65	39,75
65	132,50	26,92	192,43	39,09
75	103,37	21,00	154,43	31,37
85	85,70	17,41	117,13	23,80
90	101,00	20,60	146,70	29,80
95	104,70	21,27	148,00	30,07
105	113,70	23,10	162,05	32,92

P5. 5: Plocha fenolických kyselin v závislosti na čase působení tlaku dusíku 2 bar v poloze 1 TSM



P5. 6: Plocha fenolických kyselin v závislosti na působení tlaku dusíku 2 bar v poloze 2 TSM



P5. 7: Optimalizace času dusíku při tlaku 2 bar pro vytlačení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky 2

n	t [s]	P [bar]	signál v poloze 1		% p.1		signál v poloze 2		% p. 2		celkem plocha int.		% celkem	
			protokat.	syring.	protokat.	syring.	protokat.	syring.	protokat.	syring.	protokat.	syring.	protokat.	syring.
1	55	2	147,9	215,0	63,2	43,7	134,2	194,1	27,3	39,4	282,1	409,1	90,4	83,1
2	55	2	142,8	206,6	71,2	42,0	138,9	197,2	28,2	40,1	281,7	403,8	99,4	82,0
	průměr		145,4	210,8	67,2	42,8	136,6	195,7	27,7	39,8	281,9	406,5	94,9	82,6
1	65	2	194,9	280,0	68,0	56,9	152,0	217,6	30,9	44,2	346,9	497,6	98,9	101,1
2	65	2	188,7	268,8	68,4	54,6	130,2	189,3	26,5	38,5	318,9	458,1	94,8	93,1
3	65	2	183,5	267,3	55,4	54,3	115,3	170,4	23,4	34,6	298,8	437,7	78,8	88,9
	průměr		189,0	272,0	63,9	55,3	132,5	192,4	26,9	39,1	321,5	464,5	90,8	94,4
1	75	2	234,8	344,9	70,9	70,1	88,0	131,2	17,9	26,7	322,8	476,1	88,7	96,7
2	75	2	209,3	306,4	63,2	62,2	100,1	147,1	20,3	29,9	309,4	453,5	83,5	92,1
3	75	2	235,8	342,8	63,2	69,6	122,0	185,0	24,8	37,6	331,3	527,8	87,9	107,2
4	75	2	225,3	323,7	68,0	65,8	106,5	154,0	21,6	31,3	331,8	477,7	89,6	97,0
	průměr		226,3	329,5	66,3	66,9	104,2	154,3	21,2	31,4	323,8	483,8	87,4	98,3
1	85	2	211,9	309,2	63,9	62,8	84,2	112,8	17,1	22,9	296,1	422,0	81,0	85,7
2	85	2	207,6	303,0	62,6	61,6	86,5	117,0	17,6	23,8	294,1	420,0	80,2	85,3
3	85	2	204,9	297,5	61,8	60,4	86,4	121,6	17,6	24,7	291,3	419,1	79,4	85,1
	průměr		208,1	303,2	62,8	61,6	85,7	117,1	17,4	23,8	293,8	420,4	80,2	85,4
1	90	2	230,2	334,5	69,5	68,0	106,6	158,3	21,7	32,2	336,8	492,8	91,1	100,1
2	90	2	188,8	276,4	57,0	56,2	95,9	134,5	19,5	27,3	284,7	410,9	76,5	83,5
3	90	2	200,0	292,7	60,4	59,5	101,7	147,3	20,7	29,9	301,7	440,0	81,0	89,4
	průměr		206,3	301,2	62,3	61,2	101,4	146,7	20,6	29,8	307,7	447,9	82,9	91,0
1	95	2	162,2	233,6	48,9	47,5	108,8	154,9	22,1	31,5	271,0	388,5	71,0	78,9
2	95	2	176,9	258,5	53,4	52,5	100,6	141,1	20,4	28,7	277,5	399,6	73,8	81,2
	průměr		169,6	246,1	51,2	50,0	104,7	148,0	21,3	30,1	274,3	394,1	72,4	80,1
1	105	2	47,0	67,5	14,2	13,7	102,0	146,0	20,7	29,7	149,0	213,5	34,9	43,4
2	105	2	49,3	71,4	14,9	14,5	125,4	178,1	25,5	36,2	174,7	249,5	40,4	50,7
3	105	2	34,7	49,9	10,5	10,1	164,9	239,2	33,5	48,6	199,6	289,1	44,0	58,7
	průměr		43,67	62,9	13,2	12,8	130,8	187,8	26,6	38,1	174,4	250,7	39,7	50,9

Příloha 6: Přesunutí frakce do druhé dimenze

P6. 1: Přesunutí fokusované frakce do 2D , zapnutý průtok v 2D

fokusace	t_{N_2} [s]	Plocha [mAU×s]		Výška [mAU]		šířka píku [min]	
		kys. protokat. *	kys. syring. *	kys. protokat. *	kys. syring. *	kys. protokat. *	kys. syring. *
Ne	80	249,0	343,3	153,7	173,8	0,0234	0,0290
Ne	80	257,5	344,9	159,1	174,1	0,0234	0,0296
Ne	80	225,1	306,3	138,4	153,9	0,0240	0,0292
Ano	80	223,3	300,1	139,8	152,8	0,0231	0,0289
Ano	80	235,1	327,2	148,1	165,4	0,0235	0,0296
průměr:		238,0	324,4	147,8	164,0	0,0235	0,0293
směrodatná odchylka:		14,93	20,64	8,87	10,34	0,0003	0,0003
relativní směrodatná odchylka [%]:		6,28	6,36	6,00	6,30	1,39	1,1231

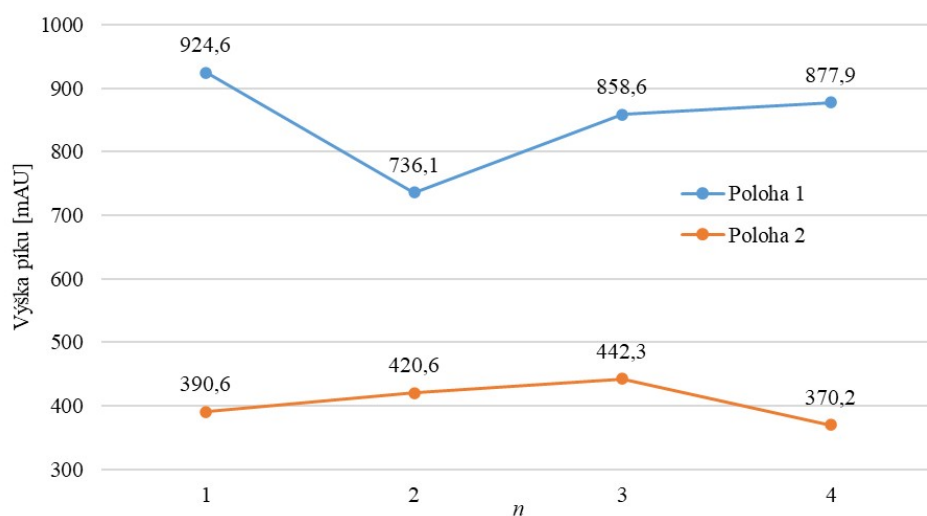
P6. 2: Plochy a výšky odezvy fenolických kyselin v 2D v poloze 1 a 2 TSM bez provedení fokusace

fokusace	t_r [s]	t_{N_2} [s]	V [μl]	poloha 1*		poloha 2*	
				výška [mAU]	plocha [mAU×s]	výška [mAU]	plocha [mAU×s]
ne	240	80	8,5	924,6	4397,7	390,6	2020,3
ne	240	80	8,5	736,1	3470,0	420,6	2013,7
ne	240	80	8,5	858,6	4283,2	442,3	2257,0
ne	240	80	8,5	877,9	4221,1	370,2	1869,7
průměr				849,3	4093,0	405,9	2040,2
směrodatná odchylka				80,39	421,73	31,88	160,39
relativní směrodatná odchylka [%]:				9,47	10,30	7,85	7,86

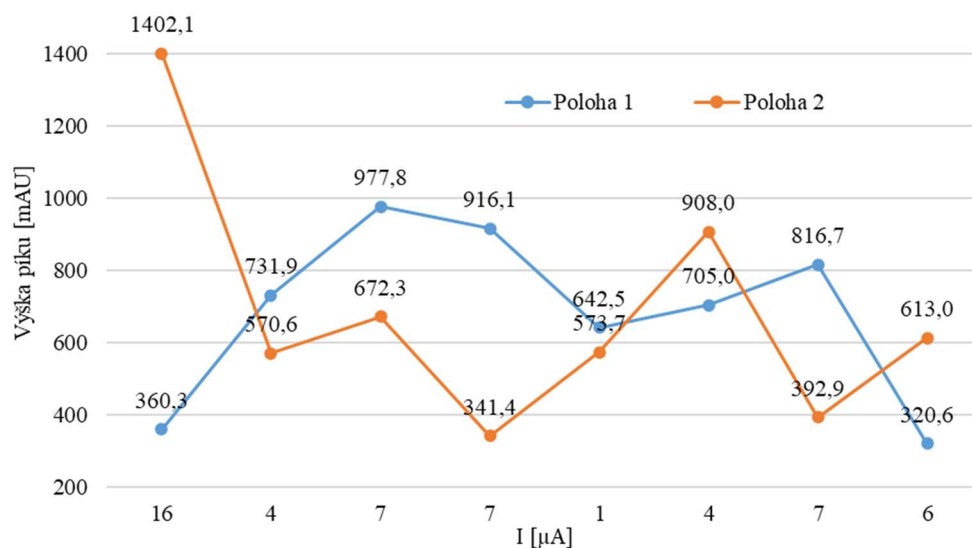
P6. 3: Plochy a výšky odezvy fenolických kyselin v 2D v poloze 1 a 2 TSM s provedení fokusace

fokusace	t_r [s]	t_{N_2} [s]	V [μl]	I [μA]	poloha 1		poloha 2	
					výška [mAU]	plocha [mAU×s]	výška [mAU]	plocha [mAU×s]
ano	240	80	8,5	1	360,3	1717,6	1402,1	6445,0
ano	240	80	8,5	4	731,9	3527,3	570,6	2842,9
ano	240	80	8,5	4	977,8	4700,7	672,3	3403,6
ano	240	80	8,5	6	916,1	4451,2	341,4	1907,2
ano	240	80	8,5	7	642,5	3072,6	573,7	2698,5
ano	240	80	8,5	7	705,0	3560,5	908,0	4323,3
ano	240	80	8,5	7	816,7	3945,3	392,9	1940,1
ano	240	80	8,5	16	320,6	1645,7	613,0	2954,6
průměr					746,5	3599,2	746,6	3649,7
směrodatná odchylka					277,87	1352,13	458,39	1963,12
relativní směrodatná odchylka [%]:					37,22	37,57	61,40	53,79

P6. 4: Výšky odezvy fenolických kyselin v 2D v poloze 1 a 2 TSM bez provedení fokusace (bez kolony)



P6. 5: Výšky odezvy fenolických kyselin v 2D v poloze 1 a 2 TSM s fokusací (bez kolony)



P6. 6: Ověření průtoku injekční pumpy při průtoku 5 µl/min

n	Q [µl/min]	V [µl]	t [s]	Q [µl/s]	Q [µl/min]
1	5	5	60,00	0,0833	5,00
2	5	5	60,21	0,0830	4,98
3	5	5	59,42	0,0841	5,05
4	5	5	59,64	0,0838	5,03
průměr			59,82	0,0836	5,02
směrodatná odchylka			0,7550	0,0010	0,0620
relativní směrodatná odchylka [%]:			1,26	1,24	1,24

P6. 7: Ověření průtoku injekční pumpy při průtoku 10 $\mu\text{l}/\text{min}$

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	V [μl]	t [s]	Q [$\mu\text{l}/\text{s}$]	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	10	10	58,92	0,1697	10,18
2	10	10	58,01	0,1724	10,34
3	10	10	59,6	0,1678	10,07
4	10	5	29,34	0,1704	10,22
průměr			51,47	0,17	10,20
směrodatná odchylka			14,766	0,002	0,114
relativní směrodatná odchylka [%]:			28,69	1,12	1,12

P6. 8: Ověření průtoku injekční pumpy při průtoku 25 $\mu\text{l}/\text{min}$

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	V [μl]	t [s]	Q [$\mu\text{l}/\text{s}$]	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	25	20	48,03	0,4164	24,98
2	25	20	48,18	0,4151	24,91
3	25	20	47,13	0,4244	25,46
4	25	20	47,96	0,4170	25,02
průměr			47,83	0,42	25,09
směrodatná odchylka			0,472	0,004	0,250
relativní směrodatná odchylka [%]:			0,99	1,00	1,00

P6. 9: Ověření průtoku injekční pumpy při průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

n	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]	V [μl]	t [s]	Q [$\mu\text{l}/\text{s}$]	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	50	20	24,29	0,8234	49,40
2	50	20	24,44	0,8183	49,10
3	50	20	23,84	0,8389	50,34
4	50	20	24,08	0,8306	49,83
průměr			24,16	0,83	49,67
směrodatná odchylka			0,2608	0,0090	0,5373
relativní směrodatná odchylka [%]:			1,08	1,08	1,08

P6. 10: Ověření průtoku dusíků tlaku 2 bar na konci systému za detektorem HPLC

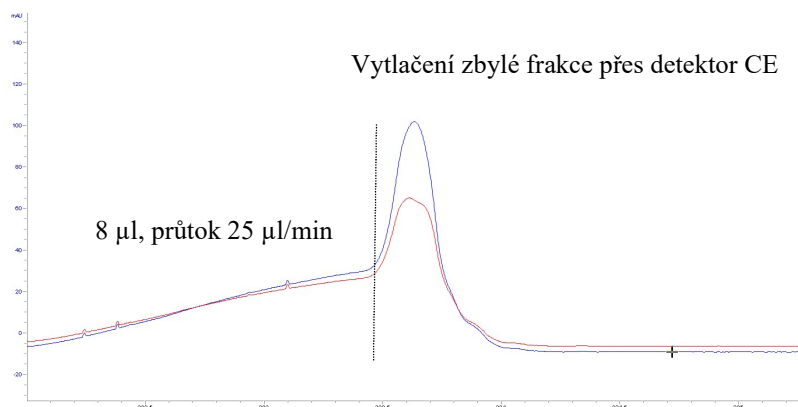
n	V [μl]	P [bar]	t [s]	Q [$\mu\text{l}/\text{s}$]	Q [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	5	2	42,32	0,1181	7,089
2	5	2	41,61	0,1202	7,210
3	5	2	41,9	0,1193	7,160
4	5	2	41,55	0,1203	7,220
průměr				0,120	7,2
směrodatná odchylka				1,02E-03	5,99E-02
relativní směrodatná odchylka [%]:				1,18	1,18

P6. 11: Ověření průtoku dusíku tlaku 2 bar za ventilem 4 PEEK

n	V [μl]	P[bar]	t [s]	Q [μl/s]	Q [μl/min]
1	2,5	2	18,46	0,1354	8,126
2	7,5	2	56,21	0,1334	8,006
3	5	2	37,48	0,1334	8,004
4	7,5	2	55,24	0,1358	8,146
5	10	2	73,75	0,1356	8,136
průměr				0,13	8,08
směrodatná odchylka				0,00120	0,07205
34 směrodatná odchylka [%]:				0,89	0,89

Příloha 7: Změna velikosti smyčky 2

P7. 1: Optimalizace objemu pro přesunutí frakce ze smyčky 2 do kapiláry elektroforézy, menší smyčka (3,85 μl)



P7. 2: Odezva fenolických kyselin pro optimalizaci času dusíku při tlaku 2 bar pro vytlačení frakce z kapiláry elektroforézy do smyčky 2 v poloze 1 TSM, menší smyčka (3,85 μl)

n	výška [mAU]	plocha [mAU×s]	vlnová délka [nm]	poloha
1	1339,6	6541,0	280	1
2	1263,1	6371,3	280	1
3	1347,3	6502,0	280	1
4	1349,8	6505,1	280	1
5	1339,6	6484,6	280	1
průměr		1327,9	6480,8	100%
směrodatná odchylka		36,50	64,55	
relativní směrodatná odchylka [%]:		2,7	1,0	

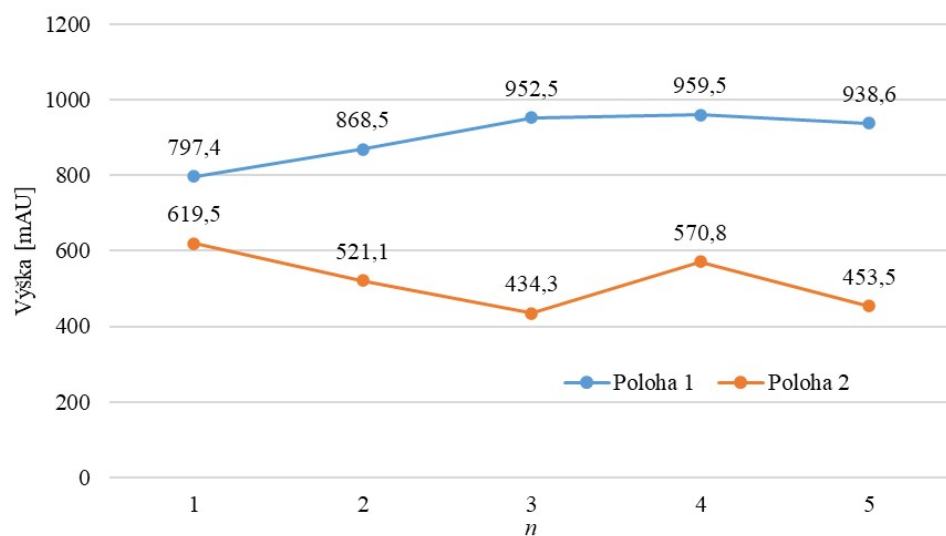
P7. 3: Optimalizace času působení dusíku při tlaku 2 bar, menší smyčka (3,85 μ l)

n	t [s]	P[bar]	poloha 1		poloha 2		celkem	
			Plocha [mAU×s]	%	Plocha [mAU×s]	%	Plocha [mAU×s]	%
1	75	2	3957,5	61,06	2324,0	35,86	6281,5	96,92
2	75	2	4227,1	65,22	2168,3	33,46	6395,4	98,68
3	75	2	4071,9	62,83	2089,9	32,25	6161,8	95,08
průměr:			4085,50	63,04	2194,07	33,85	6279,57	96,89
1	70	2	4193,5	64,71	2217,8	34,22	6411,3	98,93
2	70	2	3898,6	60,16	2289,4	35,33	6188,0	95,48
3	70	2	4060,4	62,65	2293,2	35,38	6353,6	98,04
průměr:			4050,83	62,51	2266,80	34,98	6317,63	97,48
1	65	2	4535,4	69,98	1975,1	30,48	6510,5	100,46
2	65	2	4532,6	69,94	1837,1	28,35	6369,7	98,29
průměr:			4534,00	69,96	1906,10	29,41	6440,10	99,37
1	60	2	4766,3	73,54	1885,4	29,09	6651,7	102,64
2	60	2	4825,0	74,45	1867,4	28,81	6692,4	103,27
průměr:			4795,65	74,00	1876,40	28,95	6672,05	102,95
1	55	2	4793,5	73,96	2606,5	40,22	7400,0	114,18
2	55	2	4708,3	72,65	2900,0	44,75	7608,3	117,40
3	55	2	4793,5	73,96	2784,4	42,96	7577,9	116,93
průměr:			4765,10	73,53	2763,63	42,64	7528,73	116,17
1	50	2	4185,9	64,59	2202,9	33,99	6388,8	98,58
2	50	2	4132,6	63,77	2207,0	34,05	6339,6	97,82
průměr:			4159,25	64,18	2204,95	34,02	6364,20	98,20

P7. 4: Přesunutí frakce do ²D bez fokusace, menší smyčka (3,85 μ l)

t _{fok.} [s]	t _{N₂} [s]	V [μ l]	poloha 1			poloha 2 [mAU]	
			Plocha [mAU×s]	Výška [mAU]	šířka píku [min]	Plocha [mAU×s]	Výška [mAU]
240	60	8	3777,7	797,4	0,0703	2514,8	619,5
240	60	8	4191,3	868,5	0,0723	2549,3	521,1
240	60	8	4577,7	952,5	0,0726	2259	434,3
240	60	8	4589,9	959,5	0,0718	2945,6	570,8
240	60	8	4541,1	938,6	0,0724	2381	453,5
průměr			4475,00	929,78	0,0723	2533,73	519,84
směrodatná odchylka			190,267	41,763	0,00093	299,267	77,860
relativní směrodatná odchylka [%]:			4,25	4,49	1,29	11,81	14,98

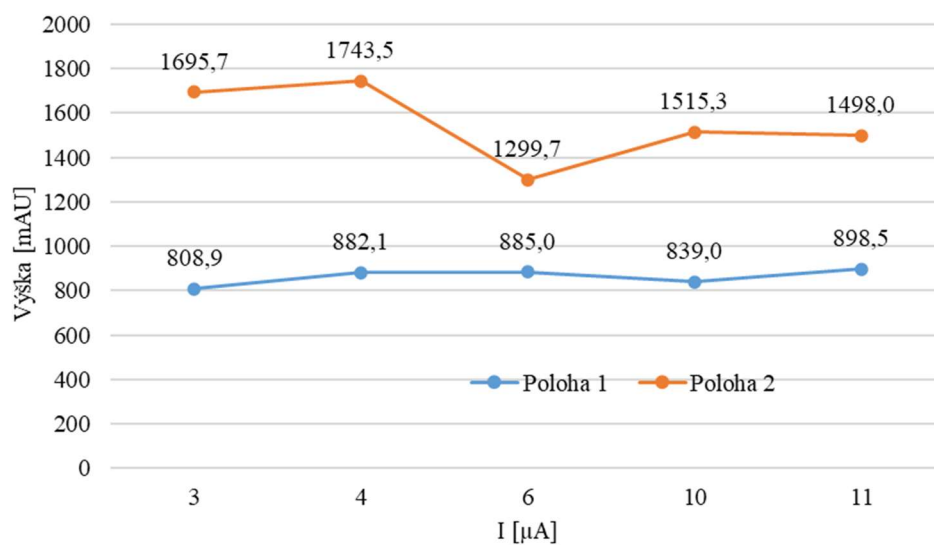
P7. 5: Výška odezvy frakce v 2D bez aplikace napětí, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μ l, čas 60 s aplikace tlaku dusíku 2 bar



P7. 6: Přesunutí frakce do 2D s fokusací (240 s), menší smyčka (3,85 μ l)

t_{N_2} [s]	V [μ l]	I [μ A]	poloha 1			poloha 2		
			Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]	šířka píku [min]	Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]	šířka píku [min]
60	8	3	3915,1	808,9	0,0730	8428,9	1695,7	0,0745
60	8	4	4240,4	882,1	0,0731	8788,3	1743,5	0,0768
60	8	6	4261,3	885,0	0,0732	6488,2	1299,7	0,0762
60	8	10	4267,6	839,0	0,0763	7848,3	1515,3	0,0779
60	8	11	4236,1	898,5	0,0705	7300,1	1498	0,0709
průměr			4184,1	862,7	0,0732	7770,8	1550,4	0,0753
směrodatná odchylka			150,97	37,45	0,0021	913,9	176,9	0,0027
relativní směrodatná odchylka [%]			3,61	4,34	2,81	11,76	11,41	3,63

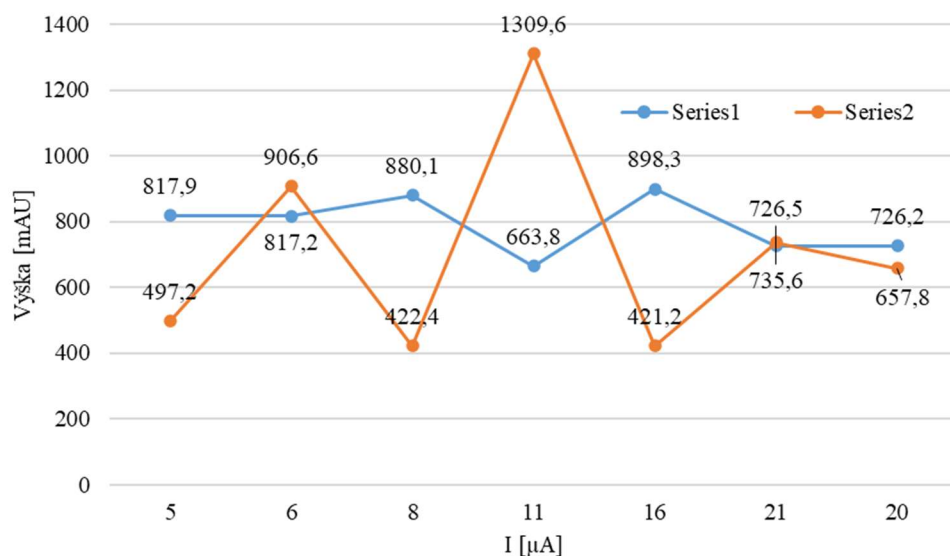
P7. 7: Výška odezvy frakce v 2D s fokusací, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μl , čas 60 s aplikace tlaku dusíku 2 bar



P7. 8: Přesunutí frakce do 2D s fokusací (240 s), menší smyčka (3,85 μl), menší čas působení dusíku

t_{N_2} [s]	V [μl]	I [μA]	poloha 1			poloha 2		
			Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]	šířka píku [min]	Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]	šířka píku [min]
50	8	5	3970,9	817,9	0,0736	2594,4	497,2	0,0770
50	8	6	3974,3	817,2	0,0712	4131,2	906,6	0,0680
50	8	8	4265,1	880,1	0,0730	2263,9	422,4	0,0810
50	8	11	3148,4	663,8	0,0708	6185,1	1309,6	0,0710
50	8	16	4379	898,3	0,0734	2156,8	421,2	0,0770
50	8	21	3558,7	726,5	0,0736	3781,6	735,6	0,0730
50	8	20	3487,6	726,2	0,0725	3096,7	657,8	0,0700
průměr			3826,29	790,00	0,0726	3458,53	707,20	0,0739
směrodatná odchylka			444,73	86,98	0,0012	1413,64	319,61	0,0046
relativní směrodatná odchylka [%]			11,62	11,01	1,59	40,87	45,19	6,27

P7. 9: Výška odezvy frakce v 2D s fokusací, objem pro přesunutí frakce do kapiláry 8 μl , čas 50 s aplikace tlaku dusíku 2 bar

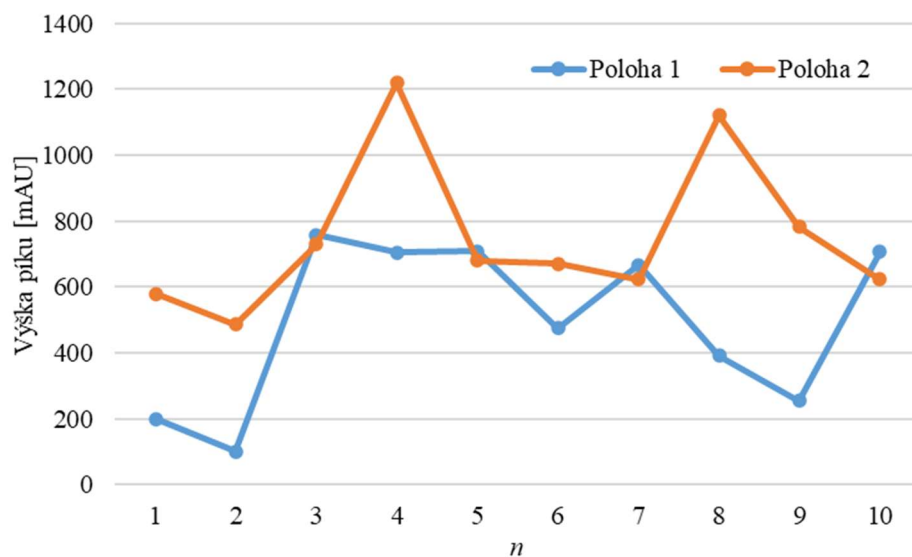


Příloha 8: Nahrazení tlaku dusíku injekční pumpou

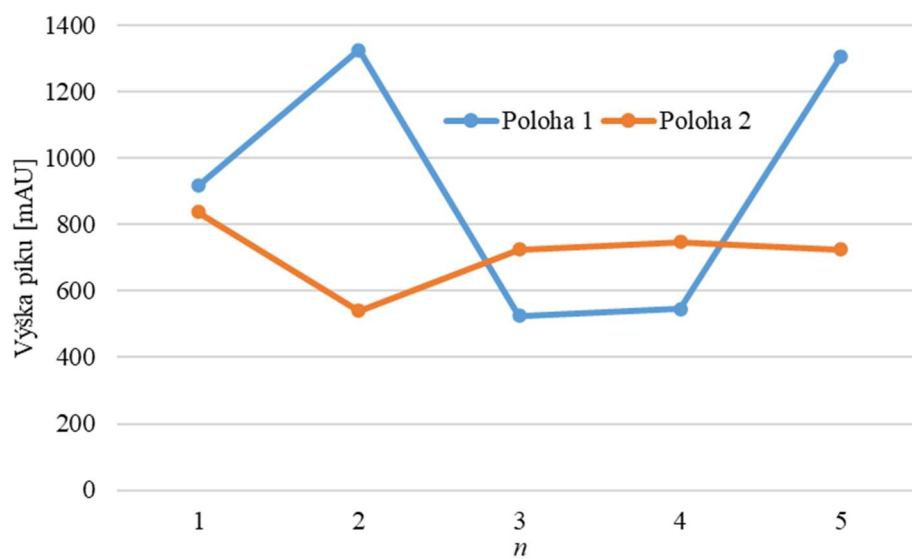
P8. 1: Plocha a výška fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 8 μl

n	V ₁ [μl]	V ₂ [μl]	poloha 1		poloha 2	
			Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]	Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]
1	8	8	938,5	200,5	2927,6	578,7
2	8	8	503,3	101,5	2491,3	486,0
3	8	8	3660,7	758,3	3536,6	729,6
4	8	8	3378,9	704,9	5998,4	1220,1
5	8	8	3406,4	709,2	3359,1	680,1
6	8	8	2271,1	475,1	3372,2	670,2
7	8	8	3253,4	665,8	3206,9	622,8
8	8	8	1893,7	390,6	5574,2	1120,9
9	8	8	1281,8	255,4	3989,6	783,5
10	8	8	3427,5	706,2	3069,0	622,6
průměr			2401,53	496,75	3752,49	751,45
směrodatná odchylka			1183,27	245,69	1145,08	236,36
relativní směrodatná odchylka [%]			49,27	49,46	30,52	31,45

P8. 2: Výška odezvy fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 8 μl



P8. 3: Výška odezvy fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 7,5 μl



P8. 4: Plocha a výška fenolický kyselin při použití dvou injekčních pump a objemu na přesun frakce 7,5 μ l

n	V ₁ [μ l]	V ₂ [μ l]	poloha 1		poloha 2	
			Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]	Plocha [mAU \times s]	Výška [mAU]
1	7,5	7,5	4097	839,3	4586	918,2
2	7,5	7,5	2952,4	540,4	6495,2	1327,2
3	7,5	7,5	3463,4	726,1	2647,6	524,7
4	7,5	7,5	3575	748,5	2755,4	546,8
5	7,5	7,5	3452,3	724,9	6570,8	1308,3
průměr			2681,8	553,5	3461,5	699,0
směrodatná odchylka			1486,28	296,61	2530,94	504,50
relativní směrodatná odchylka [%]			55,42	53,59	73,12	72,17

P8. 5: Ověření průtoku druhé injekční pumpy

n	Q [μ l/min]	V [μ l]	t [s]	Q [μ l/s]	Q [μ l/min]
1	25	5	11,82	0,4230	25,38
2	25	5	11,85	0,4219	25,32
3	25	5	12,14	0,4119	24,71
4	25	5	12,43	0,4023	24,14
5	25	5	12,22	0,4092	24,55
6	25	5	11,67	0,4284	25,71
průměr			12,06	0,4189	25,14
směrodatná odchylka			0,2877	0,0099	0,5953
relativní směrodatná odchylka [%]:			2,39	2,37	2,37