



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VÍCEROZMĚRNÉ SEPARACE V KAPALNÉ FÁZI MULTIDIMENSIONAL LIQUID PHASE SEPARATIONS

TEZE DIZERTAČNÍ PRÁCE
SUMMARY OF THE DISSERTATION

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. JOZEF ŠESTÁK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. VLADISLAV KAHLE, CSc.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

KEY WORDS

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

Rukopis dizertační práce uložen na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno.

OBSAH

1 ÚVOD.....	5
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	5
2.1 Píková kapacita separačních metod.....	5
2.2 Vysokoúčinné jednorozměrné kapalinové separace jako předpoklad vysoké píkové kapacity vícerozměrných separací	6
2.3 Ortogonalita separačních mechanismů.....	7
2.4 Provedení vícerozměrných separací	7
2.5 Kompatibilita kapalných fází	8
2.6 Dvourozměrné separace v kapalně fázi.....	8
2.7 Trojrozměrné separace v kapalně fázi.....	10
2.8 Hmotnostní spektrometrie jako další rozměr	10
2.9 Aplikace vícerozměrných separací v kapalně fázi	10
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
3.1 Miniaturizovaný kapilární kapalinový chromatograf.....	11
3.2 Jednoduché dvourozměrné separační platformy	12
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	16
4.1 Gradientové separace s miniaturizovaným kapilárním kapalinový chromatografem.....	16
4.2 Miniaturizovaný kapilární kapalinový chromatograf jako základ jednoduchých dvourozměrných separačních systémů	21
5 ZÁVĚR.....	25
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	26
CV AUTORA	30
ABSTRACT	31

1 ÚVOD

V dnešní moderní industrializované společnosti mají techniky využívající různé separační mechanismy nezastupitelné místo. Výroba prakticky čehokoliv se bez využití určitého stupně separace neobejde. Řada procesů navíc využívá pro svou kontrolu nejrůznější analytické techniky, z nichž velké množství je založeno na jednom i více separačních mechanismech.

Hlavním přínosem separačních metod v analytické chemii je možnost získat informace o více látkách současně, v rámci jedné zkoušky. V analytickém experimentu jsou tyto látky separovány na základě rozdílu v určité vlastnosti a poté detekovány vhodným detekčním systémem. Analytická chemie využívá zejména chromatografické a elektromigrační metody a hmotnostní spektrometrii.

Každá aplikace požaduje od separační metody dosažení určitého rozlišení v přijatelném čase. S rostoucí složitostí vzorku roste pravděpodobnost, že separovaná zóna na výstupu separačního procesu neobsahuje pouze jednu komponentu. Pro rozlišení složek takové frakce je pak nutné použít odlišný separační mechanismus jako „druhý rozměr“.

Pravděpodobnost, že se dvě látky shodují ve dvou různých vlastnostech, je nízká, ne však nulová. Dvourozměrné separace jsou proto spojovány s dalším separačním stupněm, který velmi často zastupuje hmotnostní spektrometrie.

Dle vlastností separovaných látek jako těkavost (příp. možnost derivatizace na těkavější produkty), teplotní stabilita či molekulová hmotnost, lze provádět dvou a vícerozměrné separace v plynné, nebo v kapalně fázi. Tato práce bude dále pojednávat o vícerozměrných separacích ve fázi kapalně.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 PÍKOVÁ KAPACITA SEPARAČNÍCH METOD

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

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

Pro reálnou situaci a konkrétní podmínky, kdy jsou píky v získaném záznamu různě široké, je velmi praktické použití výpočtu píkové kapacity P na základě sumy rozlišení mezi sousedními píky, rovnice (2).

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

Gilar a kol. [2] využil k predikci píkovej kapacity pro separaci peptidů v 1D a 2D-HPLC matematický model popsany rovnicí (3). Píkova kapacita je zde funkcí účinnosti kolony N (počet teoretických pater), rozdílu ve složení mobilní fáze v gradientu ΔC (%), mrtvého retenčního času t_0 (min) a času gradientu t_g (min). Proměnná B reprezentuje vliv velikosti molekuly MW (Da) a lze ji odhadnout s využitím rovnice (4).

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

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

Zejména pro porovnání různých separačních technik, instrumentů a jednotlivých metod je výhodné vztáhnout píkovou kapacitu na jednotku času (doba gradientu nebo doba analýzy). Takto lze odhadnout produktivitu (počet píků za minutu) různých přístupů k separaci směsi a provést jejich porovnání.

2.2 VYSOKOÚČINNÉ JEDNOROZMĚRNÉ KAPALINOVÉ SEPARACE JAKO PŘEDPOKLAD VYSOKÉ PÍKOVÉ KAPACITY VÍCEROZMĚRNÝCH SEPARACÍ

Účinnost separace se nejčastěji vyjadřuje jako počet teoretických pater (N) a je charakteristická pro konkrétní separační systém a jeho konfiguraci. Teoretické patro představuje hypotetickou zónu v separačním prostoru, ve které dojde k úplné výměně látek a energie.

Jak je patrné z rovnice (5) pro odvození chromatografického rozlišení (kde α je selektivita, k je kapacitní faktor) a z rovnice (6) pro rozlišení v kapilární zónové elektroforéze (kde $\Delta u/\bar{u}$ je relativní rozdíl mobilit dvou analytů), je rozlišení přímo úměrné druhé odmocnině počtu teoretických pater N .

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

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

Vysoká účinnost je tedy předpokladem efektivní separace složité směsi látek – dosažení vysoké píkovej kapacity. Mezi kapalinově-separační metody s vysokou účinností, vhodné pro realizaci dvourozměrných separací lze zařadit vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a vysokoúčinnou kapilární elektroforézu.

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) je směs látek rozdělena na základě různé afinity jednotlivých složek ke stacionární a mobilní fázi. Jasným trendem současnosti je spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). U náplňových kolon je patrný trend povrchově porézních částic a posun k částicím o průměru menším než 2 μm , vykazujícím nejvyšší účinnosti. U monolitických kolon je patrné úsilí o optimalizaci polymerizačního procesu tak, aby měly kolony co největší účinnost a zachovaly si nízký hydraulický odpor. Díky pestré paletě dostupných

separačních módů lze s HPLC separovat nejrůznější skupiny látek. Velmi účinným nástrojem zvyšujícím píkovou kapacitu HPLC separace je využití gradientové eluce.

Vysokoučinná kapilární elektroforéza (HPCE) je souhrnný název pro širší skupinu vysokoúčinných kapilárních elektromigračních metod. V kapilární izoelektrické fokusaci (cIEF) lze například s velmi vysokou rozlišovací schopností, až 0,01 pI, separovat amfolyty. V elektrochromatografii (CEC) pak lze dosáhnout až 5-10 násobně vyšších účinností než ve standardní HPLC. Kapilární gelová elektroforéza, využívající síťový efekt, umožňuje účinně separovat látky s malým rozdílem v elektroforetické pohyblivosti ale různou velikostí a v micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC) lze současně separovat neutrální látky.

2.3 ORTOGONALITA SEPARAČNÍCH MECHANISMŮ

Dvou a vícerozměrné separační techniky poskytují v případě tzv. ortogonalit separačních mechanismů celkovou píkovou kapacitu, která je teoreticky násobkem píkových kapacit jednotlivých separačních rozměrů, viz rovnice (7).

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

Za ortogonální se obecně označují separační mechanismy, jež jsou na sobě zcela nezávislé. Dokonalá ortogonalita je však pozorována jen výjimečně. I ve vysoce ortogonální vícerozměrné separaci je prakticky realizovaná píková kapacita oproti teoretické hodnotě vypočtené dle rovnice (7) nižší (< 63 %). Tento jev vysvětluje statistická teorie překryvu zón, kterou formuloval Giddings a Davis [3; 4].

Na základě znalosti ortogonalit dvou separačních mechanismů pak lze pomocí rovnice (8) odhadnout praktickou píkovou kapacitu dvourozměrné separace P_{2D} .

$$P_{2D} = O(P_1 \cdot P_2) \quad (8)$$

2.4 PROVEDENÍ VÍCEROZMĚRNÝCH SEPARACÍ

2.4.1 Separace v prostoru vs. separace v čase

Jednorozměrné separace lze realizovat jak v prostoru, tak v čase. První vícerozměrné kapalinové separace využívaly planární separační techniky, jako papírová chromatografie či elektroforéza, které poskytují možnost provádět separaci látek v definovaném prostoru postupně ve dvou osách (rozměrech). Po ukončení separace je detekována pozice zón v prostoru separačního lože.

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

2.4.2 Off-line vs. on-line

V off-line spojení jsou frakce z prvního separačního rozměru manuálně nebo automaticky sbírány, případně uschovány a následně individuálně dávkovány do dalšího separačního stupně. Off-line spojení nevyžaduje žádné specializované rozhraní (interface). Výhodou je také možnost danou frakci dodatečně upravit

(zakoncentrovat, nebo převést do jiného rozpouštědla). Za nevýhody off-line přístupu lze považovat horší opakovatelnost, riziko kontaminace frakce během manipulace s ní a zejména časovou náročnost.

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

Automatizované uspořádání, ve kterém je tok médií prvním a druhým rozměrem periodicky střídavě přerušován bývá označován jako stop-start, nebo také stop-and-go.

2.4.3 Heart-cut vs. komprehensivní

V heart-cut přístupu je vzorek prvně separován jednorozměrně a dle potřeby jsou zvoleny určité úseky v získaném záznamu. Separace je pak zopakována a vybrané frakce jsou zachyceny, nebo přímo dávkovány do druhé dimenze. Dané frakce na sebe nemusí nutně navazovat a mohou obsahovat i více separovaných zón.

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

2.5 KOMPATIBILITA KAPALNÝCH FÁZÍ

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

2.6 DVOUROZMĚRNÉ SEPARACE V KAPALNÉ FÁZI

2.6.1 2D-HPLC

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC) je jednoznačně nejvyužívanější dvourozměrná kolonová kapalinově-separační technika. Nejvyšší stupeň ortogonalita vykazují dvojice HILIC – reverzní fáze (HILIC×RPLC), iontová výměna – reverzní fáze (IEC×RPLC) a gelová permeace – reverzní fáze (GPC×RPLC). V určitých případech lze spojit i dvě reverzní fáze a využít rozdílnou selektivitu při různém pH či různém složení mobilní fáze. Dvourozměrná kapalinová chromatografie je realizována zejména on-line, v heart-cut (LC-LC) i komprehensivním módu (LC×LC).

Standardním rozhraním pro spojení dvou LC rozměrů je 10, případně 8 cestný dvoupolohový ventil se dvěma identickými dávkovacími smyčkami. Výstupný tok

mobilní fáze z prvního rozměru plní první smyčku, zatímco tok mobilní fáze z druhé pumpy vytlačuje objem druhé smyčky na separační kolonu druhého rozměru.

V prvním separačním rozměru se využívá převážně delších kolon s malým vnitřním průměrem (< 1 mm) a pomalejší separace (desítky minut až hodiny). V druhém rozměru je naopak potřeba provádět velmi rychlé analýzy (< 1 min). Proto se používá kratší kolona s větším vnitřním průměrem (např. 4,6 mm) a jsou voleny krátké časy gradientů.

2.6.2 HPLC-HPCE

Spojení vysokoúčinných kapilárních elektromigračních technik s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC-HPCE nebo HPCE-HPLC) představuje díky vysokému stupni ortogonalit separačních mechanismů možnost realizace dvourozměrné separace s extrémně vysokou píkovou kapacitou. Z povahy obou separačních technik však plynou některá úskalí, zejména při realizaci on-line spojení. Problémem je například odvedení vysokého napětí z elektromigračního stupně, tzv. *decoupling*, a dávkování frakcí do druhého rozměru. Univerzální komerční řešení pro spojení HPCE-HPLC či HPLC-HPCE v současnosti neexistuje.

První automatizovanou komprehensivní HPLC×CZE separaci realizoval Bushey a Jorgenson [5]. On-line spojení bylo zajištěno pomocí uzemněného šesticestného dávkovacího ventilu umístěného mezi nádobkami s elektrolytem. Velmi efektivní řešení představuje opticky řízené dávkování (tzv. *optically gated electrophoresis*) [6].

On-line spojení cIEF-HPLC je také nejčastěji realizováno prostřednictvím dávkovacího ventilu. Nevýhodou konfigurace, kdy je dávkovací ventil umístěn mezi elektrodami je u cIEF skutečnost, že část analytů může díky nepřítomnosti elektroosmotického toku migrovat přes dávkovací smyčku opačným směrem a nemusí být přenesena do druhého rozměru. Tento problém byl vyřešen pomocí tzv. dekaplerů [7-9], ve kterých je obsah separační kapiláry oddělen od elektrolytu a elektrody mikrodialyzační membránou.

2.6.3 2D-HPCE

Dvourozměrné kapalinové separace s velmi vysokou píkovou kapacitou lze uvažovat při vhodném spojení některých módů vysokoúčinné kapilární elektroforézy.

2D separační systém založený na spojení kapilární izoelektrické fokusace a tlakované kapilární elektrochromatografie (cIEF-CEC), popsal Wei a kol. [10]. Autoři v případě komprehensivního uspořádání uvažují teoretickou píkovou kapacitu až 24 000.

Ramsey a kol. [11] dále vytvořil na skleněném čipu kanálovou strukturu dovolující komprehensivní MEKC×CZE separaci peptidů. Píková kapacita 15 minutové separace peptidů byla téměř 4200. Dvourozměrnou CZE-MEKC separaci kationtových sloučenin s on-line úpravou a zakoncentrováním vzorku pomocí ITP pak realizoval Zhang a kol. [12].

2.7 TROJROZMĚRNÉ SEPARACE V KAPALNÉ FÁZI

V případě extrémně složitých směsí neposkytuje ani dvojrozměrná komprehensivní separace dostatek píkovej kapacity pro rozlišení složek. Moore a Jorgenson [13] separovali peptidy v komprehensivním 3D systému spojujícím gelovou permeační a reverzně fázovou chromatografii s velmi rychlou (dvouvteřinovou) kapilární elektroforetickou separací. Za jediný použitelný přístup, který může v současnosti poskytnout extrémně vysokou píkovou kapacitu (stovky tisíc) však Guiochon označil trojrozměrnou kapalinovou chromatografii [14], protože poskytuje dostatek kombinací (alespoň částečně) nezávislých separačních mechanismů (GPC, RPLC, NPLC, IEC) a její automatizace je na velmi vysoké úrovni. Optimální parametry pro online komprehensivní trojrozměrnou kapalinovou chromatografii (LC×LC×LC) uvažoval Schoenmakers [15] avšak vzhledem k extrémním nárokům na třetí separační rozměr (doby analýzy < 1 s, průtok > 20 ml/min) se použití LC×LC-MS v současnosti zdá být přijatelnějším řešením.

2.8 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE JAKO DALŠÍ ROZMĚR

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika založena na separaci a detekci iontů dle velikosti poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Látky, které jsou podrobeny hmotnostně spektrometrické analýze, jsou ionizovány v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Vzniklé ionty o různém poměru m/z se v jednotlivých analyzátoch pohybují po různých trajektoriích (kvadrupól, iontové pasti), vykazují různou dobu letu (TOF) nebo odlišnou rezonanční frekvenci (orbitrap, ICR).

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

V současnosti se ve spojení s kapalinovými separačními metodami využívá téměř výhradně elektrosprej (ESI), případně chemická (APCI) či fotoionizace (APPI) za atmosférického tlaku. Specifickým případem ionizace je desorpce laserem s asistencí matrice (MALDI).

Při využití těchto ionizačních technik je získané hmotnostní spektrum obvykle jednoduché a kromě molekulové hmotnosti většinou neposkytuje dostatek informací pro určení struktury (identifikaci). Dále je proto realizována tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), kdy je vybrán cílový iont a srážkami s molekulami plynu v kolizní cele získává dodatečnou energii, která vyvolá jeho fragmentaci.

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

2.9 APLIKACE VÍCEROZMĚRNÝCH SEPARACÍ V KAPALNÉ FÁZI

Současný rozvoj biochemických oborů, jako proteomika či metabolomika, je podmíněn pokroky, které byli zaznamenány při vývoji dvourozměrných kapalinových separací a jejich spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Nejvyužívanější

technikou pro separaci proteinů a peptidů byla zpočátku dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE). Stále častěji se však pro tyto účely v současnosti využívá dvourozměrná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií [16-20]. Výrazný potenciál dalších dvojrozměrných kapalinových separací, zejména spojení HPLC-HPCE [16] a cIEF-HPLC [7-9] byl také demonstrován.

Vysoká separační schopnost vícerozměrných kapalinových separací se ukázala být výhodná také pro další oblasti. Komprehensivní 2D-LC našla uplatnění v analýze potravin [21-30]. 2D-LC lze také použít pro velmi selektivní stanovení nečistot v produktech farmaceutické výroby [31]. Spojení reverzní fáze s gelovou permeací bylo také využito pro analýzu složité směsi kopolymerů [32]. Pro aplikace v chirálních separacích má velký potenciál achirální-chirální 2D-LC [33]. Při separaci netěkavých pesticidů lze efektivně využít i dvourozměrnou tenkovrstvou chromatografii (2D-TLC) [34].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MINIATURIZOVANÝ KAPILÁRNÍ KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF

Základními stavebními prvky navrženého chromatografického systému jsou stříkačková pumpa se stříkačkou, selekční ventil a kapilární kolona. Systém pracuje na principu postupného nasávání roztoků skrze selekční ventil a jejich následném protlačení kapilární kolonou. Vzorek je do systému rovněž nasát skrze selekční ventil. Malý objem vzorku (~0,1 μ l) může být nasán do vnitřního objemu ventilu. Větší objem vzorku lze nasát do kapiláry spojující stříkačku se selekčním ventilem.

Pro pohyb pístu stříkačky byla použita základní verze programovatelné stříkačkové pumpy NE-500 OEM (New Era Pump Systems, Inc., USA). Pro účely této práce byla tato pumpa konstrukčně upravena. Hnací ústrojí bylo modifikováno tak, aby hnací síla byla přenášena axiálně přímo na píst stříkačky.

Stříkačková pumpa byla osazena různým typem stříkaček. Byly testovány komerční nízkotlaké skleněné stříkačky (50-250 μ l) i speciální vysokotlaká 250 μ l stříkačka FMJ-250 (PennCentury Inc., USA). Byla také navržena a vyrobena originální 100 μ l PEEKová vysokotlaká stříkačka typu plunžr s kompresním těsněním z UHMWPE.

Vícecestný selekční ventil v uvedeném jednoduchém systému umožňuje směřovat tok kapalin tak, že v určité konfiguraci lze do systému kapaliny nasávat, zatímco v jiné konfiguraci lze tyto kapaliny dávkovat na kapilární kolonu. Byla použita OEM verze ventilu C55 s 250 μ m porty (VICI Valco Instruments, USA).

K detekci byl využíván UV/Vis detektor se specializovanou detekční nanocelou, případně byla využita upravená křemenná kapilára.

Popsaný systém byl původně vyvinut jako izokratický. Schopnost pracovat v módu gradientové eluce však podstatně rozšiřuje aplikační možnosti chromatografických systémů.

Dostatečný počet volných portů vícecestného selekčního ventilu dovoluje k systému připojit několik zásobníků s roztoky o různém složení a následně je možné jejich postupně nasátí do systému. Dále je možné navázat na některé původní práce, a využít míchání kapalin vlivem turbulencí v místě skokové změny průřezu potrubí. Takovým místem v popsaném chromatografickém systému je místo vstupu jehly do těla stříkačky. Z důvodu rozdílné hustoty vody a acetonitrilu a jejich směsí byl udržován konstantní sklon stříkačky 20°. Hodnoceny byly profily gradientů vytvořených po postupném nasátí směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v). Byly použity skleněné stříkačky různých objemů a byly zvoleny různé kombinace objemů jednotlivých roztoků nasávaných do systému.

Popsaný chromatografický systém byl také testován při realizaci gradientové separace v režimu konstantního tlaku, který může přispět ke zkrácení doby analýzy o 15-20 %. Měření tlaku bylo realizováno pomocí tenzometrického snímače C9B (HBM Messtechnik, GmbH, Německo) umístěného v ose působení tlačné síly na píst stříkačky. Parametry systému byly testovány při různých tlacích, při gradientové separaci modelové směsi nitroesterů.

3.2 JEDNODUCHÉ DVOUROZMĚRNÉ SEPARAČNÍ PLATFORMY

3.2.1 Off-line spojení kapilární LC s MALDI-TOF

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

Pro kontaktní depozici frakcí na terčíky MALDI desky byla využita modifikovaná PE pipetovací špička, která byla upravena následujícím způsobem. Pro přívod toku ze separační kolony byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm , která byla špičkou protažena až k jejímu ústí. Do špičky byla navíc zavedena křemenná kapilára o vnitřním průměru 100 μm , kterou lze přivádět pomocný roztok nebo přímo roztok obsahující matici. Větší část objemu špičky byla vyplněna lepidlem na bázi epoxidové pryskyřice. Pipetovací špička byla uchycena kolmo na XY rovinou stolku, v pohyblivém rameni.

Experimentální sestava, složená s miniaturizovaného kapalinového chromatografu a depoziční jednotky, byla využita pro separaci glykanů enzymaticky odštěpených z vybraných glykoproteinů (IgG a RNáza B) v módu HILIC, na novém typu kapilární křemenné monolitické kolony (0,1×150 mm) modifikované [2-(methacryloyloxy)ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammonium hydroxidem (MEDSA) [35].

Pro separaci byly použity roztoky: Roztok A – 80/10/10 a roztok B 65/25/10 (v/v/v) acetonitril/voda/100 mM $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ (pH 5). Gradient mobilní fáze byl připraven nasátím 30 μl roztoku A do gradientové smyčky (0,45×500 mm) naplněné roztokem

B. Tok mobilní fáze, 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, byl na konci špičky míchán v poměru 1:1 s tokem roztoku super-DHB o koncentraci 20 g/l ve vodě

3.2.2 Off-line spojení cIEF s kapilární LC

Jednoduchá polo-automatizovaná separační platforma pro dvourozměrnou separaci peptidů byla založena na off-line spojení kapilární izoelektrické fokusace (cIEF) s miniaturizovaným kapilárním kapalinovým chromatografem.

cIEF byla realizována jako frakcionační stupeň. Pro separaci byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 μm , s permanentním pokrytím vnitřní stěny vrstvou hydroxymethylpropylcelulózy. Pro splnění požadavku na částečnou automatizaci sběru frakcí, byly ve dvou místech separační kapiláry vytvořeny dekaplery. Postup jejich přípravy spočíval v odstranění ochranné polyimidové vrstvy a zafixování kapiláry na pevnou podložku ve dvou bodech kolem zvoleného místa, jemným naříznutím a opatrným zlomením křemenné kapiláry a vytvořením membrány z acetátu celulózy na povrchu zlomu. Dekaplery byly vloženy do nádobek obsahujících anolyt 0,1% kyselinu mravenčí, katolyt 0,1% hydroxid amonový a elektrody. Efektivní délka separační kapiláry činila 570 mm. Konce kapiláry byly připojeny k programovatelné stříkačkové pumpě se 100 μl stříkačkou a k centrálnímu portu 10 cestného selekčního ventilu. K šesti obvodomým portům selekčního ventilu byly připojeny záchytné kapilární monolitické kolony (0,1 \times 10 mm, křemenný monolit, stacionární fáze C18).

Vzorek obsahující peptidy (1,5 mg/ml) po tryptickém štěpení albuminu z hovězího séra a směs ampholytů (3,3% Biolyte 3-10, 0,5% TEMED) byl nasán do separační kapiláry. Na anodu bylo přivedeno stejnosměrné vysoké napětí + 30 kV (katoda uzemněna). Izoelektrická fokusace byla ukončena po 60 minutách. Obsah separační kapiláry byl poté při průtoku 10 $\mu\text{l}/\text{h}$ rovnoměrně frakcionován na záchytných kolonách.

Monolitické kolony byly poté z ventilu demontovány a jednotlivě zapojeny do sestavy miniaturizovaného kapalinového chromatografu. Peptidy zachycené na počátku kolony byly eluovány gradientem o složení 20/80 – 40/60 (v/v) acetonitril (0.1 % v/v TFA)/voda (0.1 % v/v TFA), vytvořeného a stabilizovaného v nakloněné 100 μl stříkačce.

3.2.3 On-line 2D-LC platforma

Konfigurace pro realizaci automatizované on-line dvourozměrné kapalinové chromatografie byla navržena tak, že separace v prvním rozměru není kontinuální, ale probíhá přerušovaně. Využit byl princip eluce při konstantním tlaku. Na počátku analýzy je výše popsaným postupem vytvořen gradient mobilní fáze, který je uskladněn v kapiláře spojující selekční ventily. Konfigurace ventilů znázorněna na **obrázku 1a** umožňuje transport gradientu mobilní fáze vytvořeného v D2 smyčce do D1 smyčky a rovněž zpřístupňuje vnitřní dávkovací smyčku ventilu pro vpravení vzorku. Po nastavení konfigurace uvedené na **obrázku 1b** systém vytvoří tlakový pulz, jehož vlivem je část objemu uskladněného gradientu v D1 smyčce protlačena D1 kolonou prvního rozměru a analyty opouštějící kolonu jsou zachyceny na záchytné

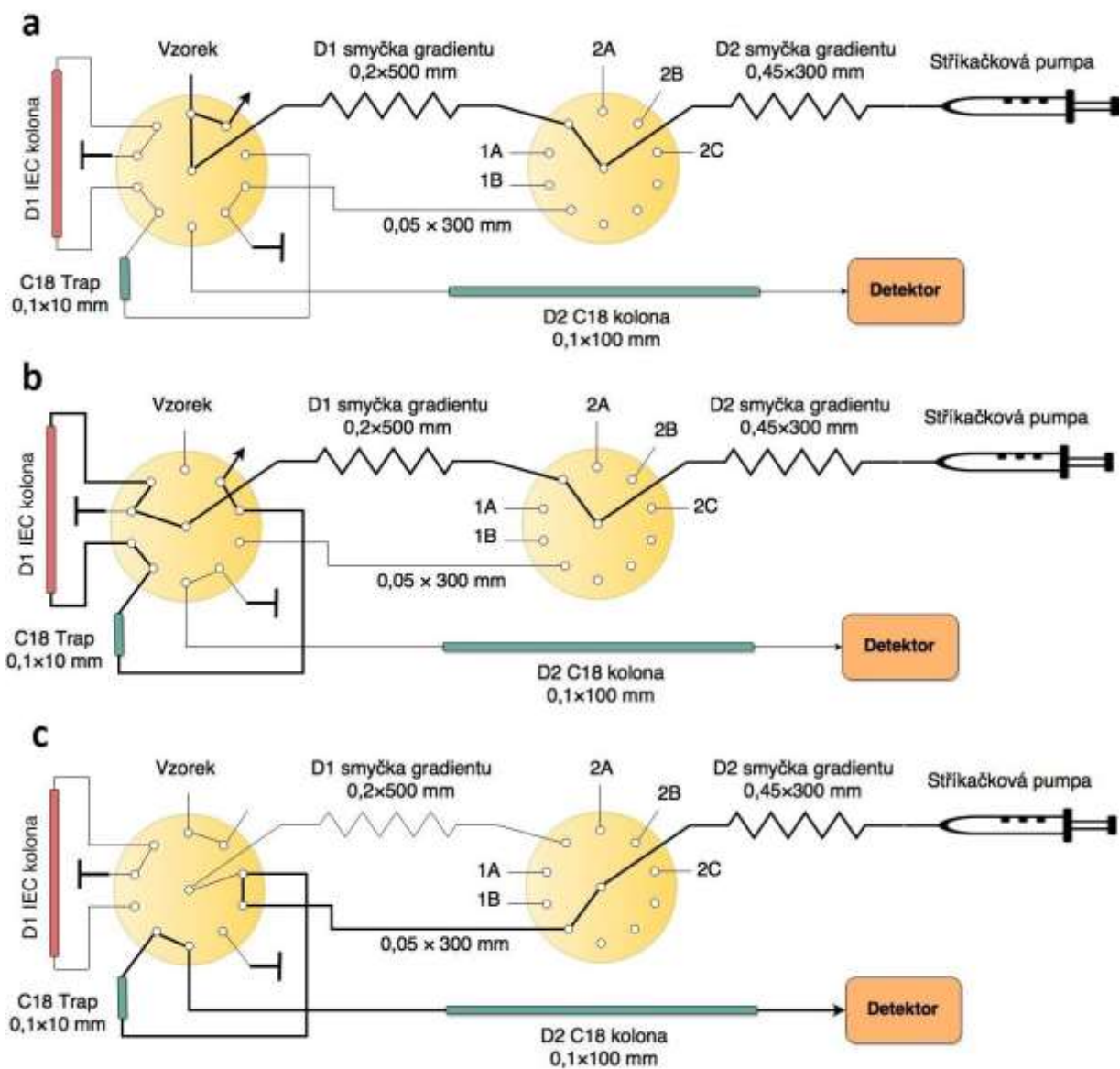
koloně druhé dimenze. Poté je v D2 smyčce vytvořen gradient mobilní fáze a tento je protlačen záchytní kolonou a kolonou druhého rozměru, jak je patrné z **obrázku 1c**. Po skončení separace je do systému nasána slabá mobilní fáze, kterou jsou následně záchytná kolona a kolona druhého rozměru zregenerovány. Systém vytvoří další tlakový pulz a proces se opakuje, až je postupně D1 kolonou protlačen celý objem na počátku vytvořeného gradientu.

Bez dalších úprav lze takto navržený systém uvažovat pro realizaci IEC×RPLC, kdy je mobilní fáze v IEC slabou mobilní fází pro RPLC. V případě RPLC×RPLC, nebo HILIC×RPLC, kdy má mobilní fáze z prvního separačního rozměru dostatečnou eluční sílu i v podmínkách druhého rozměru, je možné za D1 kolonu umístit T-spojku a naředit frakci přídatným tokem vhodné kapaliny.

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

Funkce systému v uspořádání, kdy je mobilní fáze z prvního separačního rozměru slabou mobilní fází pro druhý rozměr, byla testována pomocí roztoku nitroglycerínu o koncentraci 0,01 g/l rozpuštěného ve směsi acetonitril/voda 10/90 (v/v), který byl aplikací tlakových pulzů dávkován z prvního rozměru na záchytnou kolonu (0,1×10 mm Kinetex EVO C18 5 μm). Pro eluci nitroglycerínu byla ve druhém rozměru použita mobilní fáze acetonitril/voda 50/50 (v/v). Použita byla D2 kolona 0,1×100 mm Kinetex EVO C18 5 μm.

Podmínky, kdy má mobilní fáze prvního rozměru dostatečnou eluční sílu pro eluci analytů ve druhé dimenzi a kdy nelze analyty na záchytné koloně přirozeně zafokusovat, byly simulovány roztokem nitroglycerínu o koncentraci 0,01 g/l rozpuštěného ve směsi acetonitril/voda 50/50 (v/v), který byl z prvního rozměru dávkován tlakovými pulzy na záchytnou kolonu. Pro naředění frakce byla do T-spojky za D1 kolonu přiváděna voda o přibližném průtoku 10 μl/min. Tyto podmínky byly následně aplikovány pro separaci testovací směsi peptidů, kdy byl na kolonu prvního rozměru (0,1×100 mm ZIC-HILIC, 3,5 μm) nadávkován malý objem testovací směsi.



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

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 GRADIENTOVÉ SEPARACE S MINIATURIZOVANÝM KAPILÁRNÍM KAPALINOVÝ CHROMATOGRAFEM

4.1.1 Gradient mobilní fáze v nakloněné stříkačce

Pozorované profily gradientů voda-acetonitril, vytvořených nasátím definovaných objemů směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v) do systému, při použití stříkaček různých objemů znázorňuje **obrázek 2**.

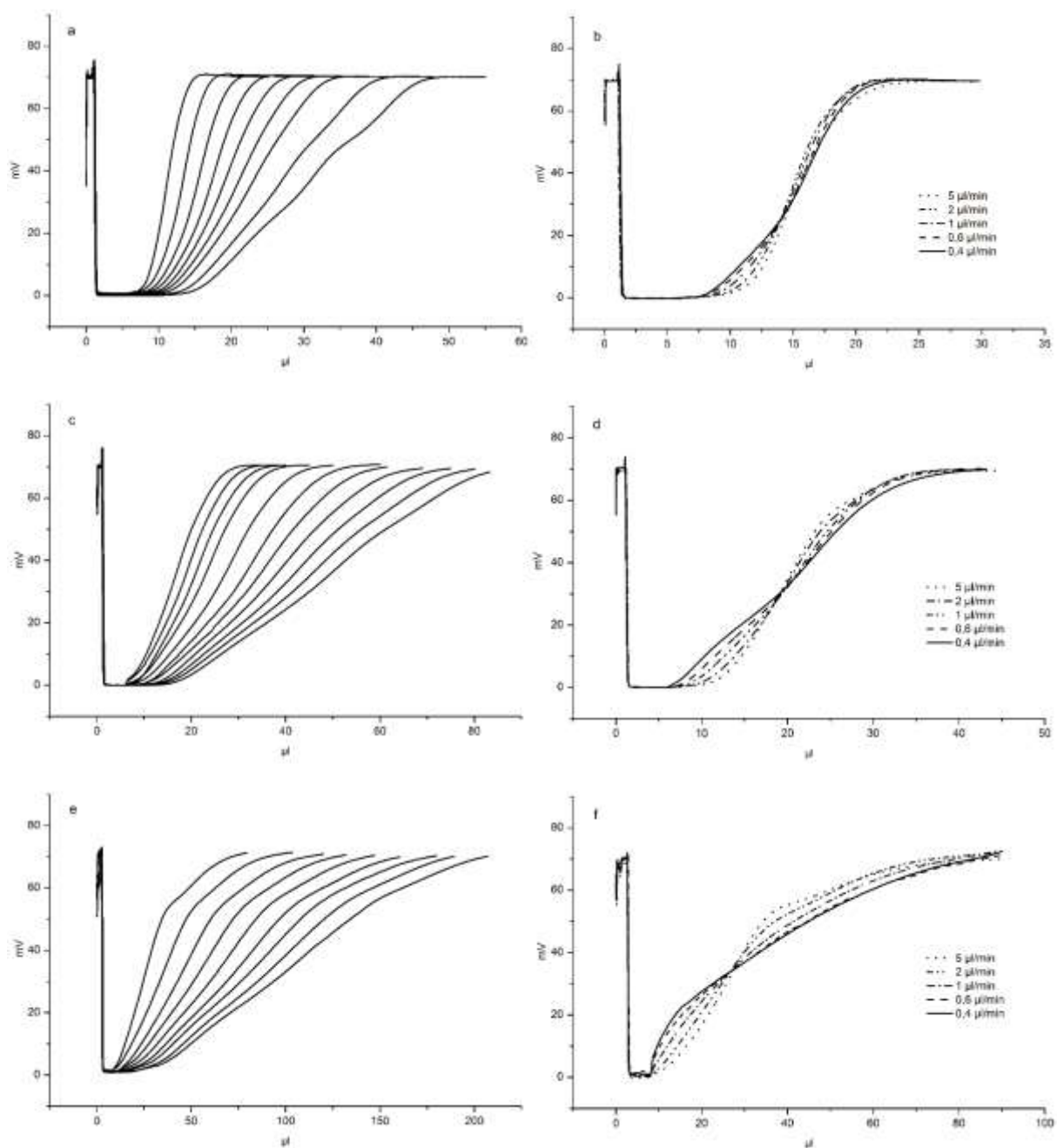
Je patrné, že se zvětšujícími se objemy nasávaných roztoků klesá strmost gradientu, resp. vzrůstá jeho objem. V určitém bodě jsou již nasávané objemy natolik velké, že jejich míchání není dostatečné a v profilu začíná být patrné zvlnění.

Při použití 50 μ l stříkačky byly vytvořeny gradienty o objemech v intervalu 5-30 μ l (**obrázek 2a**). Z pozorovaných profilů, jsou profily gradientů vytvořených v 50 μ l stříkačce nejvíce lineární. Širší interval objemů vytvořeného gradientu, 15-70 μ l, je dostupný při použití 100 μ l stříkačky, při částečném zachování lineárního profilu (**obrázek 2c**). S 250 μ l stříkačkou byly vytvořeny gradienty o objemu do 200 μ l. Zejména však gradienty menších objemů zde vykazují výrazné porušení lineárního profilu (**obrázek 2e**).

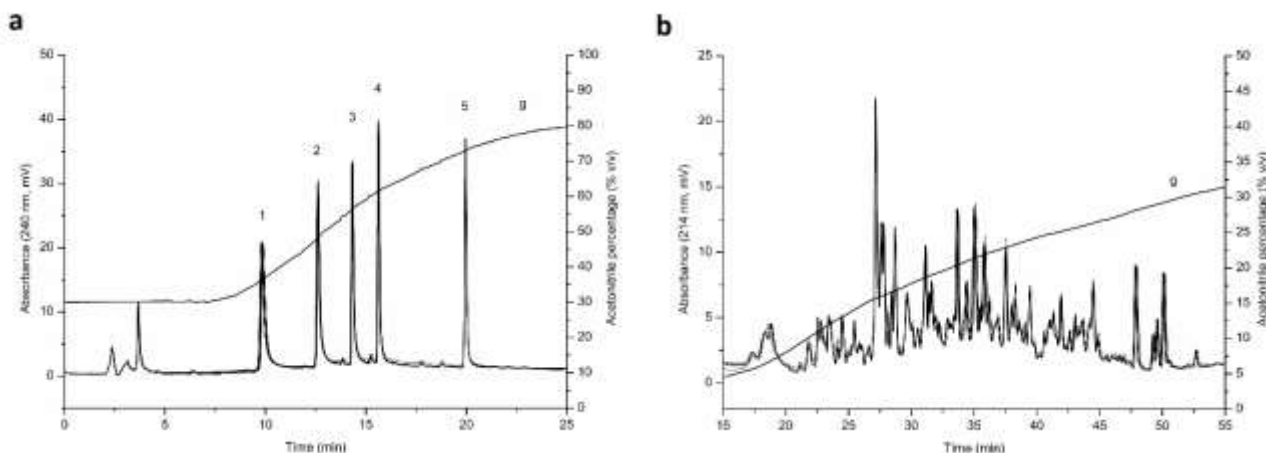
Díky malému vnitřnímu průměru 50 μ l stříkačky, byly s touto také pozorovány nejmenší změny profilu gradientu v závislosti na průtoku, kterým je gradient ze stříkačky vytlačován (**obrázek 2b**). U 100 μ l stříkačky došlo při pomalejším vytlačování k mírnému poklesu strmosti gradientu, lineární profil však zůstal zachován (**obrázek 2d**). Nejvýraznější změny jsou patrné při použití 250 μ l stříkačky (**obrázek 2f**).

Opakovatelnost tohoto způsobu tvorby gradientu mobilní fáze byla demonstrována na separaci směsi alkylfenonů (**obrázek 3a**) a směsi peptidů z tryptického štěpení albuminu z hovězího séra (**obrázek 3b**). Relativní směrodatná odchylka retenčních časů alkylfenonů separovaných při průtoku 1 μ l/min byla menší než 0,3 % (n=10). Relativní směrodatná odchylka retenčních časů vybraných píků peptidů separovaných při průtoku 0,5 μ l/min byla menší než 0,4 %.

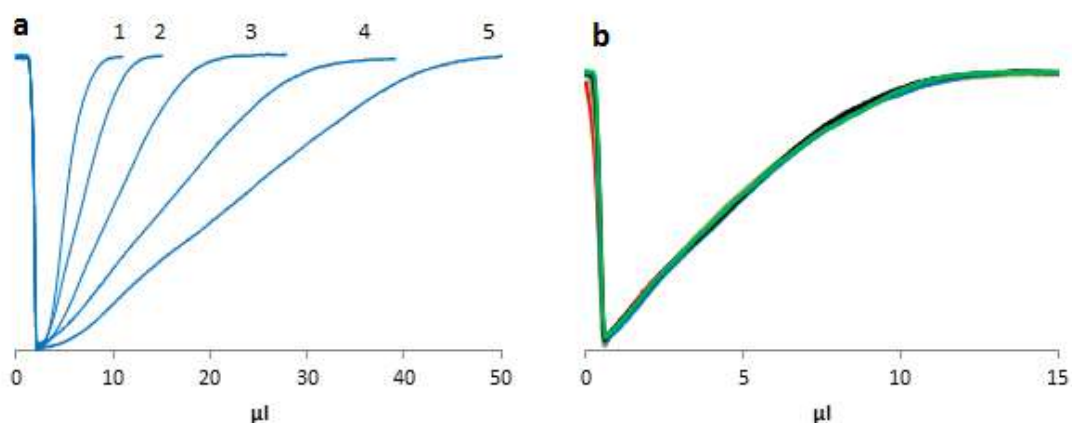
Způsob přípravy gradientu nasátím několika roztoků do nakloněné stříkačky lze tedy označit za velmi jednoduchý, s možností tvorby gradientu v objemech vhodných pro nano- a mikrokolonovou kapalinovou chromatografii s vysokou opakovatelností. Nevýhodami tohoto přístupu jsou nutnost udržovat náklon stříkačky (při realizaci HILIC je nutné orientaci stříkačky obrátit) a závislost výsledného profilu gradientu na průtoku, kterým je ze stříkačky vytlačován. 50 a 100 μ l skleněné stříkačky odolají tlakům 5-6 MPa. Systém vybavený těmito stříkačkami lze nejvhodněji zkombinovat s monolitickými kolonami s vysokou permeabilitou případně s krátkými náplňovými kolonami.



Obrázek 2 – Profily vizualizovaných gradientů (koncentrace uracilu v acetonitrilu 20 mg/l) vytvořených postupným nasátím adekvátních objemů směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v) do (a) 50 μ l stříkačky, (c) 100 μ l stříkačky, (e) 250 μ l stříkačky. Gradient byl ze stříkaček vytlačován při průtoku 1 μ l/min (50 a 100 μ l stříkačky) a 3 μ l/min (250 μ l stříkačka). (b)(d)(f) znázorňují profily vizualizovaných gradientů vytlačovaných ze stříkačky při různých průtocích 0,4 – 5 μ l/min. Použito z Ref. [36] se souhlasem vydavatele.



Obrázek 3 – Překrytí chromatogramů opakovaných gradientových separací; Kolona – Chromolith CapRod RP-18e 0,1×150 mm. (a) Deset opakování separace 0,5 μ l směsi alkylfenonů, $2 \cdot 10^{-5}$ M v 5/95 acetonitril/voda (v/v); 1 – valerofenon, 2 – hexanofenon, 3 – heptanofenon, 4 – oktanofenon, 5 – dodekanofenon, g – profil gradientu. Gradient mobilní fáze vytvořen nasátím 10, 5 a 10 μ l směsí 80/20, 55/45 a 30/70 – acetonitril/voda (v/v) do 100 μ l stříkačky. Průtok mobilní fáze 1 μ l/min. Teplota 40 °C. (b) Tři opakování separace 0,5 μ l BSA digestu (1 g/l BSA) v 5/95 acetonitril/voda (v/v). Gradient mobilní fáze vytvořen nasátím 20, 20, 20 a 15 μ l směsí 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 – acetonitril/voda (v/v) do 100 μ l stříkačky. Průtok mobilní fáze 0,5 μ l/min. Teplota 25 °C. Použito z Ref. [36] se souhlasem vydavatele.



Obrázek 4 – (a) Profily vizualizovaných gradientů (koncentrace uracilu v acetonitrilu 20 mg/l) vytvořených postupným nasátím adekvátních objemů směsí o složení acetonitril/voda 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 (v/v) do 0,38×600 mm kapiláry. Gradient byl vytlačován při průtoku 1 μ l/min. (b) Profily vizualizovaných gradientů vytlačených při různých průtocích 0,1 – 5 μ l/min.

4.1.1 Tvorba gradientu mobilní fáze v kapiláře

Aby byly odstraněny závislosti tvorby gradientů na rozměrech a náklonu použité stříkačky, byl navržen způsob míchání kapalin, kdy tyto jsou místo do stříkačky, postupně nasávány do horizontálně umístěné kapiláry spojující selekční ventil a stříkačku. Hlavním efektem podporujícím rozmytí rozhraní mezi různými kapalinami je zde tzv. Taylorova disperze [37].

Vizualizované profily gradientu, vytvořené nasáváním různých objemů směsí 80/20, 55/45, 30/70 a 5/95 – acetonitril/voda (v/v) do kapiláry 0,38×600 mm při průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ jsou vyobrazeny na **obrázku 4a**. **Obrázek 4b** znázorňuje výsledek experimentu, kdy gradient, který byl připravován za stejných podmínek byl následně vytlačován při různém průtoku v intervalu 0,1-5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Téměř dokonalé překrytí vizualizovaných profilů indikuje dlouhodobou stabilitu připraveného gradientu a nezávislost profilu na rychlosti, kterou je gradient vytlačován. Popsaným způsobem bylo možné vytvořit téměř lineární gradienty o objemu v intervalu 4-45 μl .

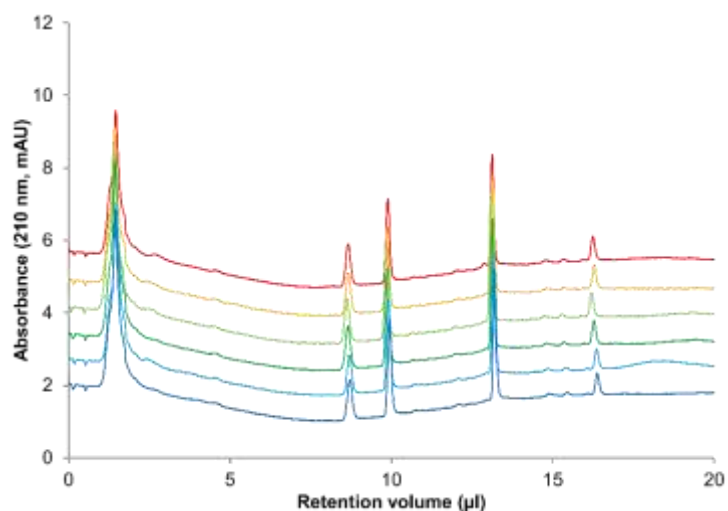
Opakovatelnost tohoto způsobu tvorby gradientu mobilní fáze byla demonstrována na separaci směsi nitrolátek kdy relativní směrodatná odchylka retenčních časů při průtoku 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla menší než 0,3 %.

V porovnání s přípravou gradientu v nakloněné stříkačce má míchání gradientu v horizontálně umístěné kapiláře několik nesporných výhod. Použitá kapilára má menší vnitřní průměr a větší délku než tělo stříkačky. Gradient je tak skladován na delší dráze a vliv difuze na profil gradientu je zanedbatelný. Při malém průřezu kapiláry a při jejím umístění v horizontální rovině také ztrácí na významu rozdíl hustoty nasávaných kapalin.

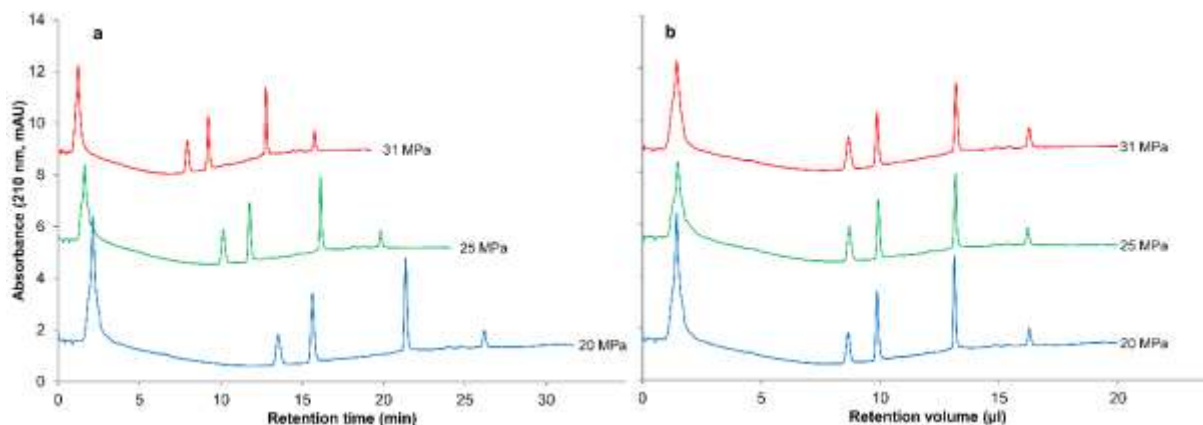
4.1.2 Gradientová separace v režimu konstantního tlaku

Schopnost navrženého chromatografického systému realizovat gradientové separace při konstantním tlaku byla demonstrována na gradientové separaci modelové směsi nitroesterů. Směs byla separována gradientem aceton-voda, vytvořené postupným nasátím 30, 5 a 15 μl směsí o složení 60/40, 35/65 a 10/90 aceton/voda (v/v) do 0,45×400 mm kapiláry při průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Separace byla zaznamenána v objemových jednotkách místo jednotek časových. Retenční objem byl odvozen od pohybu pístu a relativní směrodatná odchylka byla menší než 0,8 %. Dobrou opakovatelnost separace v módu konstantního tlaku ilustruje **obrázek 5**. Malé změny permeability kolony nemají na opakovatelnost výsledků vliv, jak demonstruje **obrázek 6**, zobrazující separaci při různých hodnotách konstantního tlaku. Uvedené výsledky jednoznačně potvrzují schopnost navrženého chromatografického systému správně a opakovatelně pracovat v režimu dodávání mobilní fáze při konstantním tlaku.



Obrázek 5 – Gradientová separace 0,3 µl směsi nitroesterů (EGDN, DEGDN, NG – 5 mg/l, PETN – 50 mg/l) rozpuštěných ve směsi aceton/voda 10/90 (v/v); Kolona: Kinetex PFP 5 µm 0,1×120 mm, Gradient mobilní fáze vytvořen nasátím 30, 5 a 15 µl směsí o složení 60/40, 35/65 a 10/90 aceton/voda (v/v) do 0,45×400 mm kapiláry, 10µl izokratický úsek odstraněn. Tlak 20 MPa, teplota 27 °C. Použito z Ref. [38] se souhlasem vydavatele.



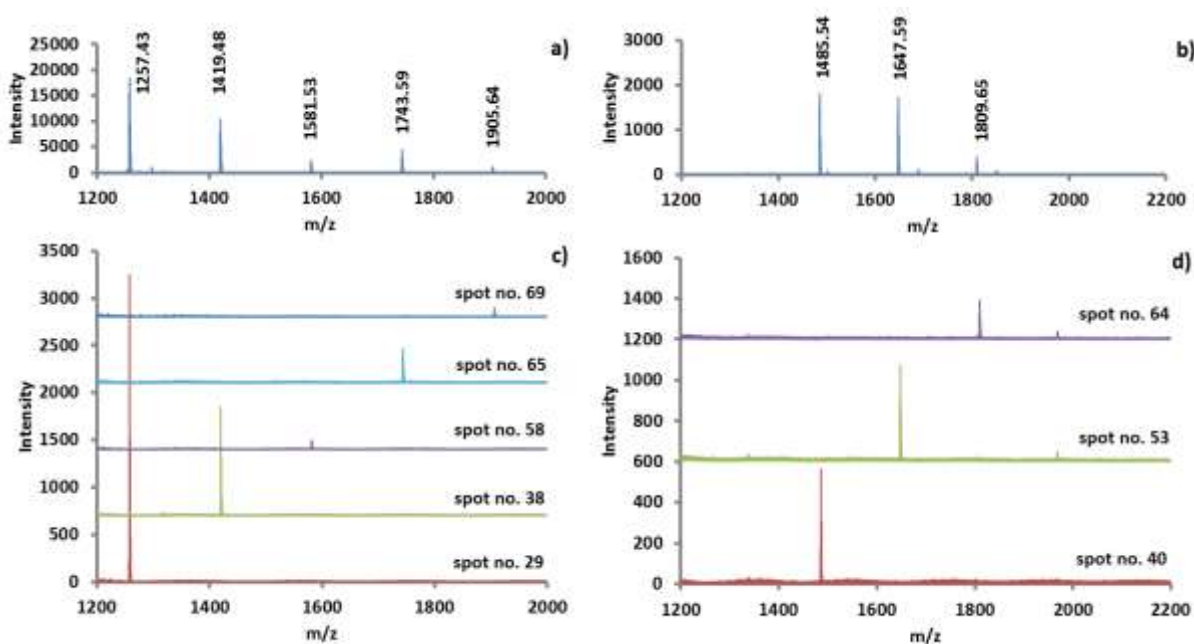
Obrázek 6 – Gradientová separace nitroesterů; Porovnání chromatogramů v (a) časovém a (b) objemovém měřítku. Použito z Ref. [38] se souhlasem vydavatele.

4.2 MINIATURIZOVANÝ KAPILÁRNÍ KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF JAKO ZÁKLAD JEDNODUCHÝCH DVOUROZMĚRNÝCH SEPARČNÍCH SYSTÉMŮ

4.2.1 HILIC-MALDI-MS – nástroj pro analýzu glykanů

V rámci dizertační práce byla testována metoda pro HILIC-MALDI-MS analýzu glykanů enzymaticky odštěpených z hovězí ribonukleázy B (RNáza B) a lidského imunoglobulinu G (hIgG) využívající miniaturizovaný kapalinový chromatograf ve spojení s nízkonákladovou automatizovanou depoziční jednotkou.

Obrázek 7 znázorňuje hmotnostní spektra neseparovaných směsí glykanů z RNázy B (**obrázek 7a**) respektive z hIgG (**obrázek 7b**) a hmotnostní spektra získána po analýze spotů deponovaných po HILIC separaci (**obrázek 7c,d**). Chromatografické rozlišení mezi jednotlivými glykany bylo dostatečné (3-10 spotů) a jednotlivé glykany byly detekovány ve 3-5 frakcích. Lze tedy konstatovat, že testovaná kapilární kolona na bázi křemenného monolitu modifikovaného [2-(methacryloyloxy)ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-ammonium hydroxidem, je vhodná pro vysokoúčinnou HILIC separaci glykanů.

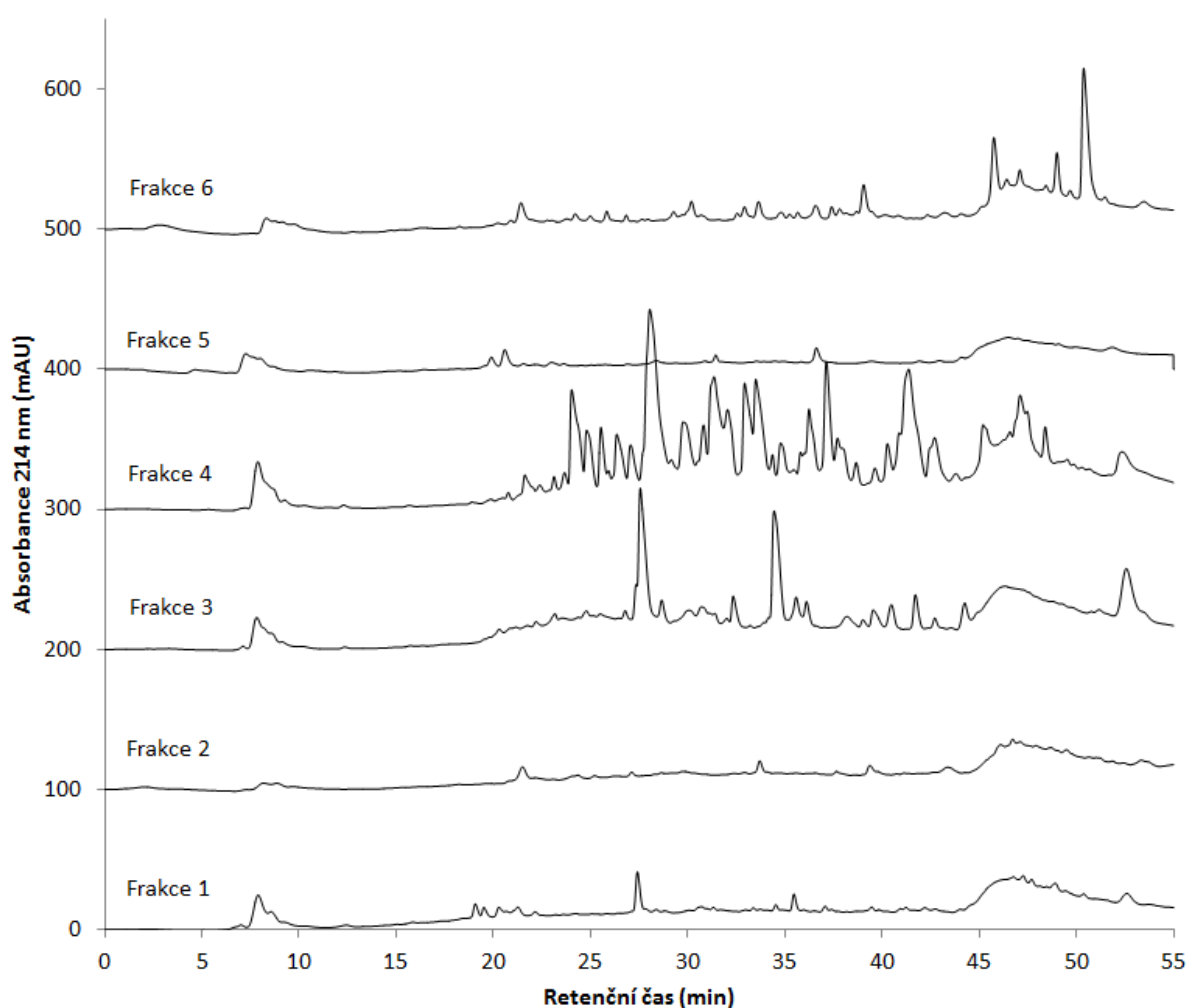


Obrázek 7 – MALDI-MS spektra glykanů odštěpených z (a) RNázy B a (b) hIgG a hmotnostní spektra jednotlivých frakcí HILIC separací glykanů odštěpených z (c) RNázy B a (d) hIgG; Gradient mobilní fáze byl připraven nasátím 30 μ l roztoku A do gradientové smyčky (0,45 \times 500 mm) naplněné roztokem B. Tok mobilní fáze, 1 μ l/min, míchán v poměru 1:1 s tokem roztoku super-DHB 20 g/l.

4.2.2 Dvourozměrná off-line cIEF-cLC separace peptidů

Směs peptidů získaných tryptickým štěpením BSA byla separována s využitím polo-automatizovaného off-line spojení experimentální cIEF platformy s miniaturizovaným kapalinovým chromatografem. Po 60 minutách fokusace byl obsah separační kapiláry mobilizován při průtoku 10 $\mu\text{l/h}$ a jednotlivé frakce byly dávkovány na monolitické kolony přes selekční ventil. Poté byly tyto kolony postupně eluovány gradientem mobilní fáze voda-acetonitril. Chromatografická separace peptidů obsažených v jednotlivých frakcích je znázorněna na **obrázku 8**.

Kombinací popsaných podmínek byla realizována off-line 2D separace peptidů s píkovou kapacitou $6 \times 55 = 330$, v čase 7,4 hodin (včetně 60 minut fokusace a 5 minut regenerace kolony před každou analýzou). Produktivita metody tedy byla 45 píků za hodinu.



Obrázek 8 – Separace peptidů frakcionovaných v cIEF v podmínkách RPLC. Separace na kapilární monolitické koloně $0,1 \times 10$ mm, $0,2 \mu\text{l/min}$ gradient mobilní fáze (20-40 % v/v voda/acetonitril + 0.1 % v/v TFA) vytvořeného a uchovaného v nakloněné $100 \mu\text{l}$ stříkačce.

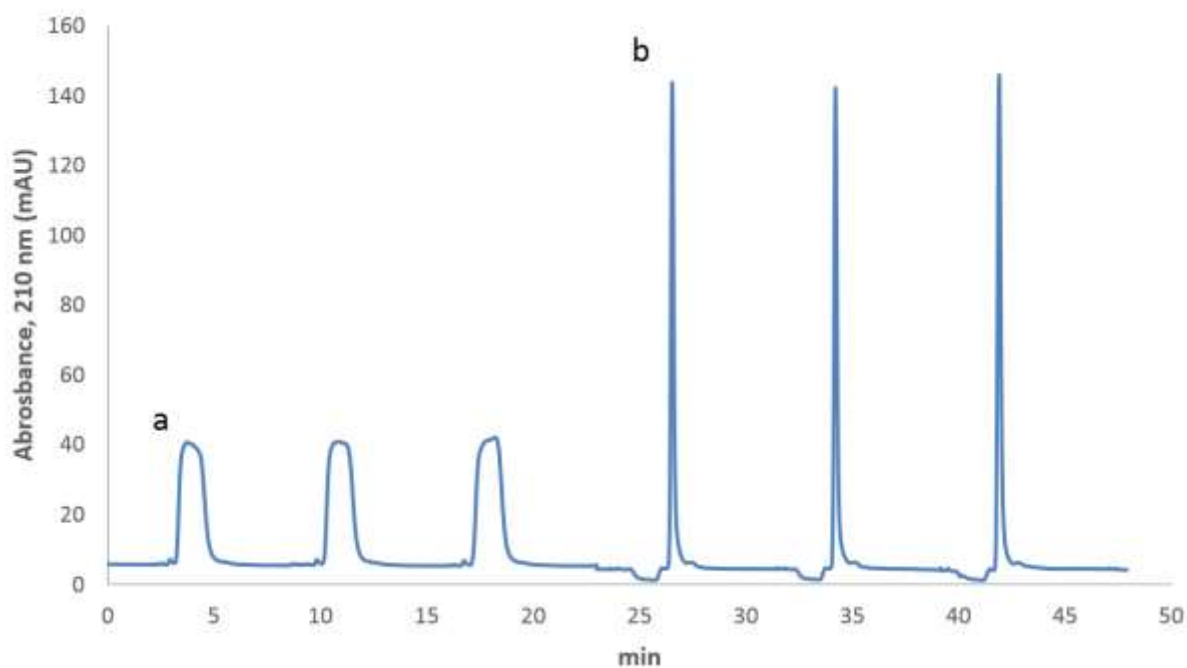
4.2.3 2D-LC platforma

Navržený systém opakovaně vytváří tlakové pulzy a dávkuje tak frakce z prvního do druhého separačního rozměru. Relativní směrodatná odchylka takto dávkovaného objemu byla stanovena na 3,3 % (n=10).

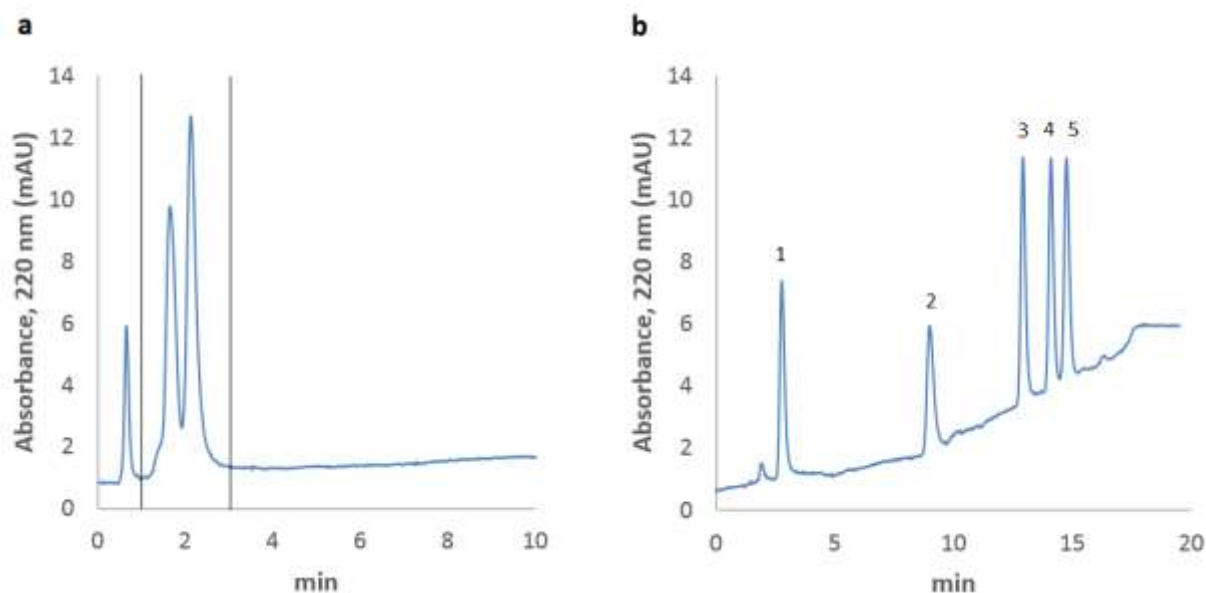
Na **obrázku 9a** je zobrazena situace kdy nitroglycerin byl z první dimenze eluován roztokem acetonitril/voda 50/50 (v/v) a je patrné, že tento analyt nebyl na záchytné koloně účinně zakoncentrován.

Pro zvýšení retence nitroglycerinu na předkolonce, byl tok mobilní fáze z první dimenze naředěn tokem vody v poměru přibližně 1:10. Úzké píky na **obrázku 9b** indikují dostatečný nárůst retence nitroglycerinu, který tak byl z dávkované frakce efektivně zafokusován na záchytné koloně druhé dimenze.

Správnost funkce uvažovaného konceptu 2D-LC systému byla ještě potvrzena dvourozměrnou separací testovací směsi pěti peptidů v systému HILIC-RPLC, která je znázorněna na **obrázku 10**.



Obrázek 9 – (a) Opakované dávkování roztoku acetonitril/voda 50/50 (v/v) s obsahem NG 0,01 g/l z první do druhé dimenze; (b) On-line ředění frakce vodou v přibližném poměru 1:10; Aplikace minutových tlakových pulzů 20 MPa. Záchytná kolona 0,1×10 mm, Kinetex C18 EVO 5 μm, D2 kolona 0,1×100 mm, Kinetex C18 EVO 5 μm. Eluce ve druhé dimenzi roztokem acetonitril/voda 50/50 (v/v), 1 μl/min. Teplota 27 °C. Detekce 210 nm.



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

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

5 ZÁVĚR

V dizertační práci byla studována problematika vícerozměrných separací v kapalně fázi. Na základě studia relevantních původních prací, byl v teoretické části práce shrnut současný stav poznání v této problematice.

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

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

Všechny demonstrované jednoduché separační platformy lze označit za funkční a relativně levné alternativy k tradičním systémům. Navržené platformy jsou relativně snadno proveditelné a představují významné zjednodušení kapalinově-chromatografické instrumentace při zachování všech základních funkcí.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GIDDINGS, J. C. MAXIMUM NUMBER OF COMPONENTS RESOLVABLE BY GEL FILTRATION AND OTHER ELUTION CHROMATOGRAPHIC METHODS. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8), 1027-&.
- [2] GILAR, M. – DALY, A. E. – KELE, M. – NEUE, U. D. – GEBLER, J. C. Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1061(2), 183-192.
- [3] DAVIS, J. M. – GIDDINGS, J. C. STATISTICAL-THEORY OF COMPONENT OVERLAP IN MULTICOMPONENT CHROMATOGRAMS. *Analytical Chemistry*, 1983, 55(3), 418-424.
- [4] DAVIS, J. M. Statistical-overlap theory for elliptical zones of high aspect ratio in comprehensive two-dimensional separations. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(4), 347-359.
- [5] BUSHEY, M. M. – JORGENSEN, J. W. AUTOMATED INSTRUMENTATION FOR COMPREHENSIVE 2-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS. *Analytical Chemistry*, 1990, 62(2), 161-167.
- [6] MOORE, A. W. – JORGENSEN, J. W. RAPID COMPREHENSIVE 2-DIMENSIONAL SEPARATIONS OF PEPTIDES VIA RPLC OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(19), 3448-3455.
- [7] SUN, L. – DUAN, J. – TAO, D. – LIANG, Z. – ZHANG, W. – ZHANG, L. – ZHANG, Y. A facile microdialysis interface for on-line desalting and identification of proteins by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(15), 2391-2397.
- [8] WANG, T. – MA, J. – WU, S. – YUAN, H. – ZHANG, L. – LIANG, Z. – ZHANG, Y. Integrated platform of capillary isoelectric focusing, trypsin immobilized enzyme microreactor and nanoreversed-phase liquid chromatography with mass spectrometry for online protein profiling. *Electrophoresis*, 2011, 32(20), 2848-2856.
- [9] LI, M. – ZHOU, J. – GU, X. – WANG, Y. – HUANG, X. – YAN, C. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets. *Journal of Separation Science*, 2009, 32(2), 267-274.
- [10] WEI, J. – GU, X. – WANG, Y. – WU, Y. – YAN, C. Two-dimensional separation system by on-line hyphenation of capillary isoelectric focusing with

- pressurized capillary electrochromatography for peptide and protein mapping. *Electrophoresis*, 2011, 32(2), 230-237.
- [11] RAMSEY, J. D. – JACOBSON, S. C. – CULBERTSON, C. T. – RAMSEY, J. M. High-efficiency, two-dimensional separations of protein digests on microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(15), 3758-3764.
- [12] ZHANG, Z.-X. – ZHANG, M.-Z. – ZHANG, S.-S. Online preconcentration and two-dimensional separation of cationic compounds via hyphenation of capillary zone electrophoresis with cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 2009, 30(11), 1958-1966.
- [13] MOORE, A. W. – JORGENSON, J. W. COMPREHENSIVE 3-DIMENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY REVERSED-PHASE LIQUID-CHROMATOGRAPHY OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(19), 3456-3463.
- [14] GUIOCHON, G. – MARCHETTI, N. – MRIZIQ, K. – SHALLIKER, R. A. Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1189(1-2), 109-168.
- [15] SCHOENMAKERS, P. J. – VIVO-TRUYOLS, G. – DECROP, W. M. C. A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1120(1-2), 282-290.
- [16] EVANS, C. R. – JORGENSON, J. W. Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(8), 1952-1961.
- [17] SANDRA, K. – MOSHIR, M. – D'HONDT, F. – TUYTTEN, R. – VERLEYSEN, K. – KAS, K. – FRANCOIS, I. – SANDRA, P. Highly efficient peptide separations in proteomics Part 2: Bi- and multidimensional liquid-based separation techniques. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2009, 877(11-12), 1019-1039.
- [18] DELAHUNTY, C. – YATES, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, 2005, 35(3), 248-255.
- [19] DI PALMA, S. – HENNRICH, M. L. – HECK, A. J. R. – MOHAMMED, S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(13), 3791-3813.
- [20] WU, Q. – YUAN, H. – ZHANG, L. – ZHANG, Y. Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis-A review. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 731, 1-10.

- [21] DUGO, P. – CACCIOLA, F. – HERRERO, M. – DONATO, P. – MONDELLO, L. Use of partially porous column as second dimension in comprehensive two-dimensional system for analysis of polyphenolic antioxidants. *Journal of Separation Science*, 2008, 31(19), 3297-3308.
- [22] CESLA, P. – HAJEK, T. – JANDERA, P. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(16), 3443-3457.
- [23] CACCIOLA, F. – JANDERA, P. – BLAHOVA, E. – MONDELLO, L. Development of different comprehensive two dimensional systems for the separation of phenolic antioxidants. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(16), 2500-2513.
- [24] CACCIOLA, F. – JANDERA, P. – HAJDU, Z. – CESLA, P. – MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1149(1), 73-87.
- [25] KIVILOMPOLO, M. – OBURKA, V. – HYOETYLAEINEN, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the analysis of antioxidant phenolic compounds in wines and juices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(1), 373-380.
- [26] MONDELLO, L. – TRANCHIDA, P. Q. – STANEK, V. – JANDERA, P. – DUGO, G. – DUGO, P. Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1086(1-2), 91-98.
- [27] VAN DER KLIFT, E. J. C. – VIVO-TRUYOLS, G. – CLAASSEN, F. W. – VAN HOLTHOON, F. L. – VAN BEEK, T. A. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet, evaporative light scattering and mass spectrometric detection of triacylglycerols in corn oil. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1178(1-2), 43-55.
- [28] DUGO, P. – KUMM, T. – CRUPI, M. L. – COTRONEO, A. – MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112(1-2), 269-275.
- [29] DUGO, P. – HERRERO, M. – GIUFFRIDA, D. – KUMM, T. – DUGO, G. – MONDELLO, L. Application of comprehensive two-dimensional liquid chromatography to elucidate the native carotenoid composition in red orange essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(10), 3478-3485.
- [30] DUGO, P. – SKERIKOVA, V. – KUMM, T. – TROZZI, A. – JANDERA, P. – MONDELLO, L. Elucidation of carotenoid patterns in citrus products by means

- of comprehensive normal-phase x reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(22), 7743-7750.
- [31] ZHANG, K. – LI, Y. – TSANG, M. – CHETWYN, N. P. Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(18), 2986-2992.
- [32] ULIYANCHENKO, E. – COOLS, P. J. C. H. – VAN DER WAL, S. – SCHOENMAKERS, P. J. Comprehensive Two-Dimensional Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography for Separations of Polymers. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(18), 7802-7809.
- [33] EUGENIA LEON-GONZALEZ, M. – ROSALES-CONRADO, N. – VICENTE PEREZ-ARRIBAS, L. – GUILLEN-CASLA, V. Two-dimensional liquid chromatography for direct chiral separations: a review. *Biomedical Chromatography*, 2014, 28(1), 59-83.
- [34] TUZIMSKY, T. Multidimensional Chromatography in Pesticides Analysis. In M. STOYTCHIEVA ed. *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*. InTech, 2011, p. 416.
- [35] MORAVCOVA, D. – PLANETA, J. – KAHLE, V. – ROTH, M. Zwitterionic silica-based monolithic capillary columns for isocratic and gradient hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1270, 178-185.
- [36] SESTAK, J. – DUSA, F. – MORAVCOVA, D. – KAHLE, V. Simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1276, 26-32.
- [37] TAYLOR, G. DISPERSION OF SOLUBLE MATTER IN SOLVENT FLOWING SLOWLY THROUGH A TUBE. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, 1953, 219(1137), 186-203.
- [38] SESTAK, J. – KAHLE, V. Constant pressure mode extended simple gradient liquid chromatography system for micro and nanocolumns. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1350, 68-71.

CV AUTORA

Ing. Jozef Šesták

Adresa Jezerůvky 511/2, 621 00 Brno
Telefon +420 774 832 851
e-mail jozo.sestak@gmail.com
Datum narození 3. 4. 1987

Vzdělání

6/2009 – 6/2011
Kvalifikace Inženýr
Magisterský studijní program Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Diplomová práce Rychlá separace výbušnin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
Vysoká škola Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

6/2006 – 6/2009
Kvalifikace Bakalář
Bakalářský studijní program Chemie a chemické technologie
Bakalářská práce Moderní metody detekce energetických materiálů
Vysoká škola Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Pracovní zkušenosti

3/2013 – současnost
Zaměstnavatel Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.
Oddělení separací v tekutých fázích
Pozice Doktorand V2
Náplň práce HPLC separace, evaluace kapilárních kolon, automatizace, vývoj miniaturizovaného kapalinového chromatografu

Ostatní znalosti

Jazykové znalosti Angličtina – pokročilý
Němčina – mírně pokročilý
Ovládání specializovaných přístrojů HPLC (Agilent 1200, Dionex 3000), MALDI-MS (AB-Sciex TOF/TOF 5800)
Specializovaný software Agilent ChemStation LC/MS, Chromeleon, Clarity, LabVIEW development environment, Advanced Linux user, MS Office suite

Publikace v impaktovaném periodiku

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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