UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

MULTIDIMENZIONÁLNÍ SEPARACE V ANALYTICKÉ CHEMII

REŠERŠNÍ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ 2006 **HOLEŠINSKÁ IRENA**

Ráda bych poděkovala PharmDr. Radkovi Sladkovskému, Ph. D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracovávání bakalářské práce.

1.OBSAH

1. OBSAH……..……4

2. ÚVOD……7

2.1. Multimediální separace v analytické chemii…….……8

3. VLASTNÍ REŠERŠNÍ ČÁST…….……10

3.1. Separační metody……11

3.2. Rozdělění separačních metod……..11

3.3. Druhy separací……12

3.4. Co je to chromatografie?.....12

3.4.1. Rozdělení chromatografických metod…….……12

3.5. Multidimenzionální analýza……13

3.5.1. Kapalinová chromatografie……13

3.5.1.1. Adsorpční kapalinová chromatografie…….14

3.5.1.2. Rozdělovací kapalinová chromatografie……15

3.5.1.3. Iontově – výměnná chromatografie……..…15

3.5.1.4. Gelová permeační chromatografie……...…16

3.5.2. On – line multidimenzionální kapalinová chromatografie……16

3.5.2.1. Heart – cutting multidimenzionální kapalinová chromatografie……...…….16

3.5.2.2. Přímo spojené kolony multidimenzionální kapalinové chromatografie…...……..……...16

3.5.3. Plynová chromatografie……..……...18

3.5.4. Nadkritická fluidní extrakce……..…….……...……19

3.5.5. Perspektivy on – line spojení kapalinové chromatografie – plynové chromatografie…….19

3.5.5.1. Jak spojit LC a GC…….……...……..20

3.5.5.2. Aplikace spojení LC – GC…….…...……..21

3.5.6. Hmotnostní spektrometry TOF MS (Time of flight)…...…..…22

3.5.7. On – line LC – GC a úplná 2D LC X GC TOF MS pro analýzu komplexních vzorků…….…….……...…24

3.5.7.1. Úplná LC X GC……24

3.5.8. Elektromigrační separační metody……..…..……24

3.5.8.1. Princip elektroforézy……...……..……25

3.5.8.2. Kapilární elektroforéza……..……..…25
3.5.8.3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie...
……...…… ..… 26
3.5.8.4. Kapilární gelová elektroforéza……...……26
3.5.8.5. Kapilární izoelektrická fokusace……26
3.5.8.6. Kapilární elektrochromatografie……..…27
3.5.9. Multidimenzionální LC – LC a LC – CE pro řešitelnou
separaci biologických molekul……..……...……27
3.5.9.1. Úvod do problematiky multidimenzionální
LC –LC a LC – CE……..27
3.5.9.2. Multidimenzionální separační teorie……28
3.5.9.3. Multidimenzionální kapalinová chromatografie kapilární
elektroforéza (LC – CE)……..……...…30
3.5.9.4. LC – CE instrumentace……..……..……31
3.6. Úplná 2D plynová chromatografie – silná a široce aplikovatelná
technika……...…….32
3.6.1. Separace úplné 2D plynové chromatografie……33
3.6.2. Detekce v systému úplné 2D plynové chromatografie…33
3.6.3. Struktura spojení úplné 2D plynové chromatografie…...33
3.6.4. Příklady GC X GX separací…….……34
3.6.5. Provedení GC X GC separace…….….35
3.7. Trendy v chemometrické analýze základních 2D separacích……..…….……35
3.7.1. Chemometrie……...36
3.7.2. Techniky dekonvulace píků……37
3.7.3. Multivariantní kalibrace……..38
3.7.4. Rozpoznávání vzorků……..38
4. ZÁVĚRY A CÍL PRÁCE……40
4.1. Závěr pro on – line multidimenzionální kapalinovou chromatografii
(LC – LC)……...41
4.2. Závěr vyplývající ze spojení LC – GC……..43
4.3 Závěr úplné LC X GC…….……43
4.4. 2D gelová elektroforéza versus LC – LC a LC – CE…….43
4.5. Budoucí rozvoj multidimenzionálních separací……44
4.6. Závěry pro spojení GC X GC…….……...46

4.7. Rozsah a budoucnost směrů……..……...……46
4.8. Cíl práce……..48

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK……..49
6. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA…….……..54
7. POUŽITÁ LITERATURA…….……..63

2. ÚVOD

2.1 Multimediální separace v analytické chemii

Od konce padesátých let stoupající nároky na stanovení látek v komplexní matricích, zejména při stanovení biologicky aktivních látek, především bílkovin, vyvolaly potřebu a rozvoj multidimenzionálních separací. Jedná se v podstatě o použití několika metod, z nichž každá využívá jiné vlastnosti purifikované či analyzované látky, za účelem lepšího a nezbytného rozlišení separovaných látek.

Před více než 20 lety, kdy J.C. Giddings uvedl dvě základní kriteria pro ideální multidimenzionální separace:

- separační mechanismy musí být orthogonální, mechanismy musí být úplně nezávislé v každé dimenzi
- žádné rozlišení separace nesmí být provedeno v první dimenzi tak, aby některá složka tohoto rozlišení byla následně ztracena v některé následné dimenzi.

Multidimenzionální separace jsou cenné tehdy,jestliže je potřeba vedlejšího rozlišení vzorku malých segmentů píků v chromatografických technikách. Hlavní znalost složení vzorku je vždycky užitečná.

V úplných multidimenzionálních separačních technikách je celý vzorek, ne jenom část z něho, předmětem rozdílných separací. Pokud je rozlišení vzorku vysoké, lze použít pro rychlé zpracování takového vzorku buď **HC** techniky, neboli hyphenated, označovány pomlčkou nebo takzvané úplné multidimenzionální techniky,které jsou indikovány znamínkem krát.

Multidimenzionální techniky pro svoji vysokou píkovou kapacitu jsou výhodné pro analýzy komplexních směsí i pro jednotlivé látky, neboť mají mnohokrát zvýšenou citlivost. Pro vzorek je nejlepší předúprava vzorku s kombinováním analytických metod. On - line spojení více či méně orthogonálních technik, jako jsou extrakce s chromatografickými metodami, vede k vysoké citlivosti systému bez vedlejší kontaminace a snadné automatizaci.

V tomto systému se neprovádí průběžná eluce (vymývání), neboť by došlo k vymytí požadovaného analytu během první dimenze a tuto metodu lze považovat také za **2D** separační systém. Spojení doplňkových, ortogonálních, separačních způsobů představuje n - dimenzionální separace vedoucí k dalšímu zvyšování kapacity píku. Neexistuje žádný teoretický limit na množství nebo typů separací, které mohou být spojeny on - line, což sebou nese nárůst v síle analyzování složité matrice. Přední uplatnění našla tato strategie v analýze a purifikaci bílkovin.

Z metod, jejichž kombinace jsou využívány k izolaci a analytickému stanovení bílkovin, jsou nejpopulárnější: precipitace dusičnanem amonným nebo organickými rozpouštědly spolu s chromatografií na molekulárních sítech, iontově výměnnou chromatografií, chromatografií založenou na hydrofobních interakcích, chromatografií v systému obrácených fází, chromatografií na nosičích se zakotveným kovem nebo barvivem, imunoafinitní chromatografií, izoelektrickou fokusací a elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Všechny známé bílkoviny byly získány a analyzovány kombinací těchto metod.

Charakteristické pro multidimenzionální uspořádání je, že poskytuje více prostoru pro separaci analyzovaných komponent, tj. celková kapacita systému se rovná sumě kapacit jednotlivých separačních soustav neboli dimenzí. Rovněž tak, při posuzování účinnosti separační soustavy podle počtu pater, vykazují multidimenzionální systémy podstatně větší počet teoretických pater než systémy jednoduché. Počet pater v multidimenzionálním chromatografickém systému se rovná součinu počtu teoretických pater dosažených v jednotlivých dimenzích.

Úskalím při aplikaci multidimenzionální separace je tzv. dimenzionalita vzorku. Každý typ molekuly má řadu různých vlastností, které mohou být využity k separaci. Pokud se podaří z těchto vlastností vytvořit kombinaci, kterou se složka výrazně odliší od dalších doprovodných látek, dosáhne se maximální separační účinnosti soustavy. Dimenzionalita komplexních vzorků je však málokdy známa a jedinou cestou, jak určit vhodnou kombinaci separačních postupů, je cesta experimentální.

Multidimenzionální separace zahrnují jednak postupy profilovací, jednak postupy cílené. Profilovací metody slouží k rozlišení všech komponent v dané směsi a jsou to: dvourozměrná tenkovrstvá chromatografie, dvourozměrná elektroforéza a v poslední době kombinace kapilární elektroforézy s chromatografií v systému obrácených fází či iontově výměnná chromatografie na obrácených fázích. Metody cílené multidimenzionální separace slouží k izolaci jediné nebo několika málo komponent. Patří sem např. preparativní izolace enzymů z přirozeného materiálu. Ve všech případech jsou multidimenzionální separace složité, pomalé a obtížně automatizovatelné.

3. VLASTNÍ REŠERŠNÍ ČÁST

3.1 Separační metody

Separace jsou operace, při kterých se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení.

V řešení analytických problémů při práci s odebraným vzorkem je nejdůležitější právě separace a na jejím úspěšném zvládnutí závisí správnost a přesnost celé analýzy.

Separační metody můžeme charakterizovat z několika hledisek:

a) selektivita metody

Selektivita vyjadřuje schopnost separovat látky na základě jejich jedné nebo více specifických vlastností.Mohou se využívat specifické vlastnosti fyzikální (separace na základě různé velikosti molekuly, separace na základě různé teploty varu) nebo chemické (například využití odlišné polarity molekul látek při extrakci). Selektivnější metodou lze oddělit i látky, které se od sebe jen málo liší vlastnostmi (oddělení optických izomerů na opticky aktivních stacionárních fázích v chromatografii).

b) rozsah použitelnosti

Charakterizuje, jaké typy vzorků mohou být určitou metodou separovány.Určité metody se hodí pro separaci iontů, jiné pro separaci makromolekul, další pro separaci plynů.

c) frakcionační kapacita

Frakcionační kapacita udává maximální počet složek, které mohou být separovány v jediné operaci. Metody, jakými jsou sublimace, jednoduchá extrakce a krystalizace, mohou rozdělit vzorek pouze na dvě části a mají frakcionační kapacitu až několik set.

3.2 Rozdělení separačních metod

Metody založené na rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze. Složka má tendenci pronikat do fáze, ve které dojde ke snížení jejího chemického potenciálu.

Fáze	**Metoda**
plyn-kapalina	plynová chromatografie (GLC)
plyn-pevná látka	plynová chromatografie (GSC)
	použití molekulových sít
kapalina-kapalina	extrakce
	kapalinová chromatografie (LLC, GPC)
kapalina-pevná látka	kapalinová chromatografie (LSC, IEC)
	extrakce pevnou fází, použití molekulových sít

3.3 Druhy separací

a) **Membránové separace**

Využívají rozdílů v rychlosti pohybu jednotlivých složek. Složky jsou transportovány přes omezující rozhraní, kterým je obvykle selektivně propustná membrána. Hnací silou je gradient chemických nebo elektrochemických potenciálů. Do této skupiny patří ultrafiltrace, obrácená osmóza, dialýza a elektrolýza.

b) **Separace polem**

Využívá rozdílů v pohyblivosti částic v silovém poli. Mezi tyto metody patří:

- **elektroforéza**
- **izotachoforéza**
- **termodifuze**
- **frakcionalizace tokem v silovém poli**
- **hmotnostní spektrometrie**
- **ultracentrifugace**

Mnohé metody se používají hojněji v preparativní chemii nebo v technologii (destilace, rektifikace, sublimace). Blíže se budeme zabývat těmi metodami, které mají pro analytickou chemii největší význam, zejména chromatografickými metodami, různými typy extrakcí a elektromigračními separačními metodami.

3.4 Co je to chromatografie?

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku.V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze.

Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji.

3.4.1 Rozdělení chromatografických metod

- **Podle skupenství mobilní fáze**

a) kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography - **LC**) - mobilní fází je kapalina

b) plynová chromatografie (Gas Chromatography - **GC**) - mobilní fází je plyn

- **Podle uspořádání stacionární fáze**

a) kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)

b) plošné techniky

- **papírová chromatografie** (Paper Chromatography - **PC**) - stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
- **tenkovrstvá chromatografie** (Thin Layer Chromatography - **TLC**) - stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii)

- **Podle povahy děje, který převládá při separaci rozdělovací chromatografie**

Separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).

a) adsorpční chromatografie - separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka)

b) iontově-výměnná chromatografie - separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku

c) gelová chromatografie - složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu): menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt)

d) afinitní chromatografie - stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu).

3.5 Multidimenzionální analýza

3.5.1 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi.

Čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace - adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii.

Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii. Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin.

Pracujeme obvykle eluční metodou. Srovnáme - li kapalinovou a plynovou chromatografii z hlediska účinnosti, je v kapalinové chromatografii nižší příspěvek molekulární difúze složky, protože kapalina má o hodně vyšší viskozitu než plyn.

3.5.1.1 Adsorpční kapalinová chromatografie

Adsorpční kapalinová chromatografie **LSC** využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem. Jako adsorbenty v **LSC** se používají zrnité materiály na bázi silikagelu, který jeví kyselé vlastnosti, a méně často na bázi oxidu hlinitého, který má zásadité vlastnosti a někdy uplatňuje nevhodné katalytické účinky. Pro dobrou adsorpci je nutný velký povrch těchto adsorbentů. Kulovité částice adsorbentu v sobě obsahují póry.

Částicí adsorbentu může být kulička zhotovená z toho materiálu, kterou prostupují póry v celém objemu, nebo může jít o adsorbent s povrchovou pórovitostí, který obsahuje kulovité inertní jádro, na jehož povrchu je adsorbent. Využívány jsou také jiné materiály (aktivní uhlí, celulosa, uhličitan vápenatý). Adsorpční aktivita adsorbentu je dána jeho polaritou a počtem adsorpčních míst.

Přítomnost vody v systému snižuje jeho aktivitu, neboť se váže na adsorpční místa. Rozpouštědlo i rozpuštěné látky soutěží o místa na povrchu stacionární fáze. Proto je vhodná volba rozpouštědla důležitá pro eluci analytu.

Adsorpční chromatografie je užitečná pro separaci nízko a středně polárních vzorků

relativní molekulové hmotnosti do 1000. Nevýhodou této techniky jsou zkreslené píky. Obecně platí, že nepolární analyty jsou eluovány nepolárními rozpouštědly a polární polárními. Mobilní fáze by neměla mít příliš velkou viskozitu, aby nekladla velký odpor proti převodu hmoty a neprotékala kolonou při určitém tlaku s nedostatečnou rychlostí. Neměla by chemicky narušovat nebo vymývat stacionární fázi.

Mobilní fáze v **LSC** se charakterizuje svou eluční silou. Čím má rozpouštědlo větší eluční sílu, tím více se adsorbuje na stacionární fázi, a tím rychleji eluuje složky, neboť s nimi úspěšněji soutěží o místo na povrchu adsorbentu. Eluční síla roste v pořadí pentan, toluen, benzen, etylbromid, propanol, etylacetát, isopropylalkohol, dioxan, ethanol, aceton. Velikost adsorpce dané složky roste s klesající hodnotou eluční síly rozpouštědla a rostoucí polaritou vlastních funkčních skupin.

Nejkratší retenční časy proto budou mít nepolární alifatické uhlovodíky, po nich následují aromatické uhlovodíky, halogensloučeniny, ethery, terciální aminy, nitrosloučeniny, ketony, aldehydy, primární aminy, fenoly a nejdelší retenční časy mají velmi polární karboxylové a sulfonové kyseliny.

3.5.1.2 Rozdělovací kapalinová chromatografie

V rozdělovací kapalinové chromatografii **LLC** se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalné fáze. Mobilní fáze unáší analyty, stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči. Retenční čas analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v každé z obou fází rozdílné polarity. V počátcích rozdělovací chromatografie byla používána polární stacionární fáze, zatímco mobilní fáze byla nepolární. Zvýšení polarity mobilní fáze snižuje retenční čas analytů. Jde o chromatografii na normálních fázích (normal - Phase Chromatography - **NPC**). Normální je proto, že byla používána nejdříve.

Separace v **NPC** závisí na interakci složek s polární stacionární fází. Nejméně polární analyt je eluován jako první, protože je nejméně mísitelný se stacionární fází. Středně polární analyt eluuje později a polární analyt nakonec. **NPC** je vhodná separace polárních vzorků, ale interakce polárních molekul se stacionární fází mohou být tak, silné že v rozumném čase neprojde z kolony. Proto byla vyvinuta metoda, ve které jsou polarity mobilní a stacionární fáze proti **NPC** naopak. Je to chromatografie na obrácených fázích (Reversed - Phase Chromatography - **RPC**).

Stacionární fáze je nepolární (uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagel) a mobilní fáze polární (voda, acenonitril).

Růst polarity mobilní fáze v **RPC** (stává se méně podobnou stacionární fází) vede k růstu retenčních časů analytů. Retence složek roste s jejich klesající polaritou a zvětšující se nepolární částí molekul.

Separace na obrácených fázích se hodí pro látky jakékoliv polarity. Je univerzální technikou pro separaci nepolárních, polárních a disociovatelných vzorků. Rozhodující podmínkou v **LLC** je vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze. Nejčastěji se používají jako stacionární fáze kapaliny, které jsou chemicky vázány na nosič. Nosičem je silikagel nebo sklo. Póry prostupují celý objem kuličky nosiče nebo mohou být povrchové.

3.5.1.3 Iontově-výměnná chromatografie

Stacionární fází v iontově - výměnné chromatografii (Ion Exchange Chromatography - **IEC**) je měnič iontů. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celulosa, dextran) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy.

Každá funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem.

Ten je vyměňován iontem obsaženým v mobilní fázi. Při tom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje (Coulombovy síly).

Iontoměniče (ionexy) se dělí na:

a) Anexy, jejichž funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů.

b) Katexy, jejichž funkční skupiny jsou kyselé a slouží k výměně kationtů.

3.5.1.4 Gelová permeační chromatografie

V gelové permeační chromatografii (Gel Permeation Chromatography - **GPC** neboli Size Exclusion Chromatography - **SEC**) jsou molekuly separovány podle své velikosti. Dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř pórů gelu.

Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji, a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly **(1).**

3.5.2 On - line multidimenzionální kapalinová chromatografie (LC - LC)

3.5.2.1 Heart - cutting multidimenzionální kapalinová chromatografie (HC MDLC)

Jedna z multidimenzionálních metod, která může být také využita běžně on – line

spojení , je **2D** v čase a tato technika je nazývána **heart - cutting (H - C) 2D** kapalinová chromatografie **.**V této technice je v **1D** separaci prováděna jako standardní **1D** analýza na chromatografické koloně. Požadovaný segment, který protekl přes první kolonu, je pak typicky přenesen cestou přepínání ventilu do druhé kolony **(OBR.1).** V druhé koloně dochází k další separaci různými metodami. **Heart - cutting** je užitečná, pokud je potřeba většího rozlišení k již vyzkoušenému malému segmentu píků v komplexním chromatogramu, ale předem jsou také požadovány znalosti o složení vzorku. Úplná multidimenzionální separace jsou více účinné než **heart - cutting** separace, protože dosahují většího vrcholu kapacity.

3.5.2.2 Přímo spojené kolony multidimenzionální kapalinové chromatografie (MD LC)

Nejjednodušší myšlenka představující základní **2D** separace je přímo spojit dvě nebo více kolon s orthogonálními separačními mechanismy do série, jak je ukázáno na **OBR. 1.** Pokud by byl takový systém aplikován s využitím izokratické eluce, pak by toto uspořádání mohlo narušovat Giddingovo druhé kriterium pro multidimenzionální separace, protože by materiály separované na první koloně mohly být rekombinovány na druhé dimenzy **(2).**

Víceméně je nepravděpodobné, že by stejná mobilní fáze mohla připravit vhodné podmínky pro efektivní separace na obou kolonách. Pokud mohou být užitečné **2D** separace provedeny v určitých uspořádáních např. při přímo spojených kolonách, pak jsou obě dimenze zajištěny pomocí pečlivě kontrolovaného gradientového elučního módu **(3).** Specificky jsou pak frakce z první kolony převedeny do druhé kolony užitím krokově rozumného gradientu při vzrůstající síle eluentu s ohledem na první kolonu. Po frakci, která je eluována z první kolony, dochází pomocí pokračujícího gradientu vhodného i pro druhou dimenzy k další separaci a eluci požadovaných komponentů frakce na druhé koloně. Následuje změna stávajícího gradientu za jiný, krokový gradient, a proces je zopakován. Většina nových metod, které následují schéma přímo spojených kolon multidimenzionální kapalinové chromatografie jsou techniky známé jako multidimenzionální protein identifikační technologie **(Mud PIT)** vyvinuta Yatsem a kolegy **(4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Mud PIT** byla vyvinuta pro proteomický výzkum jako alternativní separace k **2D - PAGE.**

Tato technika následuje obecné schéma **2D** analýz přímým spojením separačních kolon, jak bylo právě popsáno. Ačkoliv místo dvou separačních kolon seřazených v tandemu je užívána jednoduchá mikrokapilární kolona naplněná dvěma různými

stacionárními fázemi. Mikrokapilární kolona je naplněná rozpuštěným silikagelem a konec kapiláry slouží pro přímé spojení s instrumentací hmotnostní spektrometrie.

Konec kapiláry je naplněn několika centimetry materiálu reverzní fáze následovaného několika centimetry silného kationtového měniče **(SCX).** Mikrokapilární kolona je spojena s tzv. PEEK mikrokross částí, která štěpí proud z konvenční kvarterní pumpy kapalinové chromatografie, redukuje ho na 0,15-0,25 μl / min a také je aplikována pro spojení s napětím elektrospreje, jak ukazuje **OBR.2.**

Průběh **2D** separace je zajištěn užitím vícekrokového elučního gradientového profilu, jak je ukázáno např. na **OBR.3**. Pro eluování frakce vzorku z iontovýměnné části kolony na materiál reverzní fáze je užíván krokový gradient pufru se vzrůstající iontovou silou. V každém z těchto inkriminovaných kroků vzrůstá lineární gradient acetonitrilového obsahu a tohoto lineárního vzrůstu je užíváno k separaci eluované frakce na segmentu reverzní fáze kolony.

Vývod kolony je spojen s elektrosprejem hmotnostního spektrometru. Při spojení hmotnostního spektrometru s **Mud PIT** je typicky užíváno tandemového řazení hmotnostního spektrometru. Díky takovémuto spojení jsme schopni identifikovat peptidy cestou sekvenční analýzy.

Při identifikaci peptidů je užívána databáze, která pomocí vhodného algoritmu určuje proteiny přítomné ve vzorku. Určení je založeno na sekvenčních partiích peptidů detekovaných pomocí hmotnostního spektrometru.

Kapacita píku **2D** separace při provedení 15-frakční **Mud PIT** analýzy byla ohodnocena přibližně 3.200 **(6).** Pokud je zahrnuta základní kapacita píku hmotnostního spektrometru, ohodnocení celé kapacity píku vzrostlo na 23.000, což lze již docela dobře porovnat s **2D-PAGE** technikami.

V praxi, **Mud PIT** je schopna identifikovat dobře přes 1.000 proteinů v jednom vzorku. Washburn a kolegové aplikovali **Mud PIT** na analýzu chromozomu kvasinky **S.cerevisiae** a identifikovali 5.440 peptidů s využitím hmotnostního spektrometru, peptidy byly stanoveny cestou hledání v databázi s 1 484 unikátními proteiny **(5).**

Mezi těmito peptidy bylo podstatné množství nízkomolekulárních a transmembránových proteinů, které se vyznačují tím, že technika, která je dokáže zachytit je vysoce selektivní a dává reprezentativní vzorky (viz. analýza chromozomu kvasinky **S.cerevisiae**) .

Nedostatek jednostrannosti dané techniky znamená značné nevýhody oproti např. **2D-PAGE**, které je limitováno dynamickým rozmezím, tento limit typicky představují např.chudé transmembránové proteiny, které jsou hydrofobní a nejsou snadno vstupitelné do gelu.

Jiný článek poukazuje na to, že množství identifikovaných proteinů může být dále zvýšeno užitím třífazové **Mud PIT** kolony, ve které je prováděn navíc i výběr materiálu na reverzní fázi při vstupu kolony.

Třífazové **Mud PIT** kolony je používáno také k on-line přípravě při odstraňování solí ze vzorku. **Mud PIT** bývá také používána ke kvantitativním studiím proteomických vzorků užitím značení izotopu ^{15}**N (7).** Pomocí kvantitativního odhadu při **Mud PIT** analýze je navrhnuto, aby technika, obstarávající užitečná data o stupni relativní expresi proteinů, byla zlepšena zvýšením rozpustnosti z důvodů experimentální reprodukovatelnosti v případě
např. zvýšeného množství peptidových srážek na protein **(10).** Jedna z největších výhod **Mud PIT** ve srovnání s **2D** technikami je relativní jednoduchost instrumentace potřebné k propojení s **2D** separacemi.

3.5.3 Plynová chromatografie

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá nosný plyn. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn.V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor.

Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek. Pro nutnost přeměny analytů v plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí. Častým postupem je chemická změna analytů nevyhovujících vlastností na deriváty, které mohou být v analýze plynovou chromatografií použitelné **(11).**

3.5.4 Nadkritická fluidní extrakce

V nadkritické fluidní extrakci (Supercritical Fluid Extraktion – **SFE**) používáme

k extrakci pevného vzorku nadkritickou (superkritickou) tekutinu, běžně oxid uhličitý. Oxid uhličitý má kritickou teplotu 31 ^{0}C a kritický tlak 7149 kPa.
Prakticky pracujeme s tlaky 40 až 70 MPa a teplotami 60 až 150 ^{0}C. Nadkritický oxid uhličitý je ideálním rozpouštědlem pro analyty dále analyzované instrumentálními metodami. Je nepolární, a proto rozpouští nepolární a málo polární sloučeniny **(12).**

3.5.5 Perspektivy on - line spojení kapalinové chromatografie - plynové chromatografie

Multidimenzionální separační techniky poutají pozornost pro svoji schopnost řešit mnoho problémů souvisejících s předúpravou vzorku, separací a identifikací analytů v komplexních vzorcích. On - line spojení kapalinové chromatografie s plynovou chromatografií **(LC - GC)** je výborným příkladem potencionálních multidimenzionálních technik.

Kombinuje nejlepší znaky kapalinové chromatografie a plynové chromatografie a také nabízí další výhody oproti tradičním metodám. Výhody kapalinové chromatografie jsou rozsáhlá kapacita vzorků, flexibilita, selektivita analýz. Podmínky mohou být snadno upraveny na základě typu vzorku. Plynová chromatografie **(GC)** je více účinná při separaci než kapalinová chromatografie a navíc má citlivější detektory.

Další výhoda při spojení **LC - GC** je, že při **LC** je účinné čištění při kterém jedna frakce obsahuje pouze vybrané analyty, které mohou být převedeny do **GC.** Pokud je účelně využit materiál vzorku a rozložení sloučenin je efektivní, je citlivost této metody vysoká.On - line **LC - GC** systémy jsou více komplikované než samotné chromatografické metody, což vede k úvaze, že by tyto systémy neměly být využívány pro jednotlivé analytické problémy **(viz OBR.4),** jež se dají vyřešit jednodušeji pomocí tradičních metod.

Vzorky, které jsou složité nebo nemožné analyzovat jednoduchými technikami, lze analyzovat pomocí **LC - GC** technik především jejich on - line spojením.
Vhodný výběr on - line techniky se pojí s množstvím vzorku, které má být analyzováno. Při některých studiích je množství vzorku silně omezeno jako např. při studiích expozicí lidí různými vlivy, při kterých je požadována velká senzitivita metody.

LC - GC je vhodnou metodou k analyzování sloučenin, pokud má být analyzována jedna nebo několik frakcí ve velmi komplexní matrici, nebo je také možné provést analýzu celého vzorku užitého při **LC X GC** technice.

Cílové analyty vhodné pro **GC** analýzu by měly být dostatečně těkavé, nepolární nebo schopné derivatizace před analýzou. Hlavní výhodou **LC - GC** před **GC - GC** je to, že toleruje i velmi špinavou matrici vzorku, což jsou vzorky obsahující polární, neprchavé součásti jako nečistoty. Kapalné vzorky mohou být často uvedeny do **LC - GC** systému prakticky bez předchozího předběžného zpracování pomocí některé z metod, zatímco pevné vzorky budou vyžadovat extrakci k uvolnění analytů z matrice.

3.5.5.1 Jak spojit LC a GC

Úkolem **LC** ve spojení **LC - GC** je selektivní začištění a zkoncentrování nebo frakcionalizace vzorku. Eluent použitý pro **LC** analýzu by měl být zároveň vhodný i pro **GC** analýzu. Eluční činidla musí být pečlivě vybírána s ohledem na organická rozpouštědla užívána v systému normálních fází **(NP) LC.** Promývací roztoky reverzní fáze **(RP),** na druhé straně vyžadují komplexnější rozpouštědla.

Z části je to proto, že organické promývací roztoky užívané v **NPLC** jsou typicky slučitelná s **GC** a činí slučování jednodušším. Další důvod je, že mnoho vzorků analyzovaných pomocí **GC** vyžaduje většinou extrakci do organického rozpouštědla před vlastní analýzou či separací v systému. Speciální rozhraní je nutné ke spojení **LC** a **GC** z důvodů relativně velkého objemu **LC** frakce (stovky mikrolitrů) na rozdíl od konvenčního **GC** systému, do kterého se přenese pouze několik mikrolitrů na rozdíl od systému s reverzními fázemi, který představuje problematičtější, složitější řešení, především z důvodů kompatibility tj. lepší slučitelnosti organických rozpouštědel běžně používaných v **GC.**

Bylo vyvinuto několik typů rozhraní rozhraní:

- **„on column“ rozhraní** – přímé vedení vzorku
- **smyčkový typ rozhraní**
- **odpařovací rozhraní**

V prvních dvou rozhraních se využívá techniky „**retenčního gapu“** a detailního popisu charakteristik a účinnosti rozhranní či adsorpčních technik viz **(13, 14, 15, 16, 17, 18)**. Tyto rozhraní jsou obvykle aplikovány s odpařovacími technikami, které jsou využívány především pro odpaření rozpouštědla.

Počet rozhraní se projeví při **(NP) LC – GC** spojení, toto spojení je uskutečněno pomocí smyčky a odparky. Výběr rozhraní a odpařovacích technik závisí na aplikaci, hlavních požadovaných parametrech těkavosti analytů a objemu vzorku **(3).** Technika **„retenčního gapu“** je nejčastěji doporučována pro analyty ve spojení s technikou **„on column“** rozhraním.

Pro těkavé analyty v případě **„on column“** rozhraní je zřejmé využití technik pracujících na jednoduchém principu převedením do nosného plynu. Pro méně těkavé analyty je aplikováno smyčkové rozhraní či vypařovací interakce a lze také užít i odparkového rozhraní. **RPLC** s **GC** vyžaduje značnější dovednost a speciální techniky, dále záleží i na použitém eluentu. Vodné eluenty **RPLC** jsou nevhodné pro přímý transfer do **GC** a techniky rozhraní používané v **NPLC - GC** nepracují dobře pro **RPLC - GC.** Existují dva způsoby, jak řešit problém spjatý s **RPLC - GC** spojením **(16, 18).** Nejpoužívanějším je převod do organického rozpouštědla před vlastním uvedením do **GC** systému. Za zmínku stojí, že on-line spojení **LC** a **GC** není jednoduchým spojením dvou dobře fungujících technik, jsou obecně požadovány některé úpravy a optimalizace stejně jako znalosti základních principů. Při vývoji **LC - GC** metody se vyskytlo několik rozdílných názorů na to, jak spojit tento systém, jež je potřeba optimalizovat, ačkoliv optimalizace není vždy jednoduchým úkolem.

Pokud analyty našeho zájmu jsou velmi prchavé, což znamená eluční teplotu do 120 ^{0}C, optimalizace musí být prováděna opatrně, lze nalézt obecné doporučení pro výběr vhodných podmínek pro adekvátní **LC - GC** metody **(13,15).**

3.5.5.2 Aplikace spojení LC - GC

Většina **LC - GC** aplikací zahrnuje klíčové analyty, skupiny sloučenin v celkové matrici vzorku, kterými mohou být potraviny, fosilní palivo, zemědělské, biologické materiály, matrice z životního prostředí. Přehledy pokrývající odlišné typy **LC - GC** spojení a jednotlivých aplikací mohou být nalezeny **(viz. 13, 14, 15, 16, 17, 18)** a jsou široce aplikovány např. při analýze potravin.

Matrice potravin obsahujícího tuky běžně vyžadují dlouhou saponifikaci a přečištění před tradiční **(GC)** analýzou. Provedení metody je velmi obtížné a časově náročné. Hlavní částí úpravy vzorku může být nahrazena **NPLC - GC** tam, kde je **LC** užívána pro separaci triacylglyceridů - hlavních analytů zájmu.

Příkladem separační síly **NPLC - GC** je analýza panenského olivového oleje **(19).** V tomto případě zanalyzované množství vzorků je vysoké ve srovnání při použití tradiční metody, kde je analýza velmi pracná a množství vzorku musí být mnohem větší.

Tato metoda dovoluje analýzu sterolů, triterpenických alkoholů a vosků v rámci kontinuální **„on - line“** analýzy při využití tradičních metod. **LC - GC** metoda eliminuje většinu manuálních připravovaných prací a přináší více informací o vzorku a excelentní přesnost a správnost metody společně s podstatně menší spotřebou času pro analýzu.

LC - GC je velmi užitečná, neboť i omezené množství vzorku je dostatečné pro analýzu. Jak bylo zmíněno, tato technika je velmi používaná, jestliže omezené množství vzorku je dostupné u biologického materiálu, např. vzorky z tkání, kde množství analytu je vysoce omezené a citlivost metody by měla být extrémně vysoká. Metoda by měla být automatizovatelná.

Další z možností tohoto systému je on - line spojení **SFE – NPLC – GC - MS**, které bylo vyvinuto pro analýzu např. organických sloučenin v částicích aerosolu zachycených na filtrech **(OBR.5)**. V tomto případě systém nebyl zamýšlen pro rutinní analýzu, ale pro detailní charakterizaci organických sloučenin v částicích. Aerosoli obsahují velmi komplexní směs sloučenin s velmi nízkou koncentrací a obsahují také velké množství analytů, které je těžké nebo téměř nemožné separovat samostatně v jednoduchém analytickém systému.

Myšlenka **SFE – LC – GC – MS** systému byla využita pro extrakci organických sloučenin z filtrů metodou **SFE,** frakcionalizaci extraktů pomocí **NPLC** a analyzováním frakcí v systému **GC - MS.** Lze sem zahrnout i derivatizační krok s extrakcí, a to extrakci dovolující pozdější analýzu více polárních analytů jako jsou karboxylové kyseliny. Výhodou on - line systému oproti tradičnímu **GC - MS** je účinná frakcionalizace a vysoká citlivost on - line systému.

3.5.6 Hmotnostní spektrometry TOF MS (Time of flight)

Jsou nejjednodušší a nejrychlejší hmotnostní spektrometry. Celý vzorek iontů je akcelerován najednou. Všem iontům se dodává stejná energie. Ionty vstupují do evakuované letové trubice 1 – 2 metry dlouhé. Má – li ion s nižší hmotností stejnou kinetickou energii ($W = 0,5\ mv^2$) jako ion s vyšší hmotností, musí mít vyšší rychlost. Na konci letové trubice je detektor. Na detektor dopadají postupně ionty od nejlehčích po nejtěžší. Zařízení má velký rozsah měřených hmotností, vysokou citlivost, za okamžik změří ionty všech hmotností **(20).**

3.5.7 Úplná 2D LC X GC - TOF MS pro analýzu komplexních vzorků

V rámci kombinování výhod **LC** a **GC** ve spojeném systému, lze uskutečnit podle konceptu tzv. úplnou 2D chromatografii **(21).** První úplná chromatografie byla provedena Jorgensonem a spol. v **LC - LC** módu **(22),** dále pak Phillipsem v **GC - GC (23)** módu.

Oba, jak Jorgenson tak Phillips dospěli k závěru, že závaznou délku retenčního času

při 1D separaci lze přemístit do druhé kolony s rozdílnou separační charakteristikou, čímž získáme 3D chromatogram, který má na jedné ose (x) separaci vzorku na 1D koloně, na druhé ose (y), která představuje druhou kolonu hodnoty z této druhé kolony a na třetí ose (z) je analytický signál vztažený ke koncentraci vzorku.

Signál na ose z je kalibrován. Při úplné **LC X GC** dojde k vytvoření frakcí, tvorba těchto frakcí je poměrně rychlá a na časové ose zabere pouze úzkou část, frakce jsou převedeny přes **1D LC** systému do druhé **GC** kolony. Na rozdíl od úplné **LC X GC**, kterou znamenáme pomocí znaménka krát nebo hvězdičky kvůli rozlišení metod obsahujících pomlčku. Příkladem může být srovnání **LC - GC** a **LC X GC. LC - GC** je obecně představována jako metoda schopná detekce cílových analytů, frakcí našeho zájmu v komplexním vzorku. **LC X GC** ovšem řeší daný problém více komplexně, proto je aplikována k charakterizování celého komplexního vzorku.

Vybavení požadované pro úplnou **LC X GC** je standardní **LC** a **GC** instrumentace. Automatizované rozhraní je možné užitím buď v řadě spojených rozhraní nebo aplikováním plně on-line spojením **(23,24)** . Automatizace úplného **LC X GC** je možná ve spojení např.s **TOF MS**. Toto spojení je možné díky použití standardních rozhraní, která jsou komerčně dostupná. Spojení dvou rozhraní je velmi cenným prvkem při analýze vzorku, tohoto spojení lze dosáhnout pomocí šesticestného ventilu nebo tzv**.“right – dual port ventilem“.** Oba způsoby jsou plně akceptovatelné, standardní odchylka absolutní plochy píku je pod 7 %**.**

Tyto systémy je možno zavádět i do rutinní praxe, jejich aplikace je především v oblasti vysoce detailní separace olejů, vzorků tuku ve kterých je potřeba zjistit tri-(acyl)glyceroly **(TAGs)** a methylester mastných kyselin **(FAMEs)** .V přírodě se vyskytující mastné kyseliny a methylester mastných kyselin existují pouze ve formě složitých komplexních směsí lišících se pouze v několika ohledech jako jsou např. délka řetězce, množství a pozice dvojných vazeb, cis-trans orientace dvojné vazby. Úplná **LC X GC** je ideální pro separace sloučenin podle dvou rozdílných vlastností, kombinací s **TOF MS** dovoluje použití i třetí veličiny.

Jednoduchým příkladem může být separace stolního oleje na dva nezávislé parametry s využitím **FID** detekce **(OBR.6).** Stříbrná fáze **LC** užívaná k separování **TAGs** ve vzorku se opírá o množství dvojných vazeb ve vzorku a na základě počtu těchto vazeb probíhá separace. Při **2D GC** separaci je nutné znát počet uhlíkových atomů ve vzorku, neboť princip **2D GC** separace je založen na této znalosti. V chromatogramu tedy velikost tečky reprezentuje hmotnost analytu.

Při použití jednoduchých chromatografických metod je nemožné získat informace obsažené v **3D** chromatogramu.

3.5.7.1 Otisk palce

Základní spojení **LC X LC** může být užíváno k získání rychlého a vysoce detailního pohledu na celý vzorek, např. olivového oleje. Užitím normální fáze **LC** může být vzorek separován do skupin sloučenin. Další možností je využití **2D GC** při které dojde k nezávislé přídatné separaci na základě bodu varu, velikosti molekuly. Výsledkem správného rozvržení separačního plánu je identifikace velkého množství sloučenin, skupin sloučenin a také detailní informace o složení každé skupiny.

LC X GC lze rozložit na horní a dolní část, horní rozlišení je zřejmé ze základního **1D LC** nebo **GC** chromatogramu především na osách x a y. Hydroxy-**TAGs (OH – TAGs),** diglyceridů **(DAGs),** desmetylsterolů, například může být velmi obtížné rozlišit při **LC** separaci. Estery sterolů, vosky a **TAGs** mohou tvořit rozsáhlé kontinuum při LC separaci.

Vzniklé kontinuum píků, které nemůže být vyřešeno při samotné **GC** separaci, bývá řešeno aplikací **LC-GC**, která je následována detailní analýzou dělených skupin analytů v základním módu operace **(41),** což ovšem probíhá právě v jediném kroku. V základní **LC X GC** mají komplexní směsi sklon dávat stupňovité skupiny píků spíš než náhodné rozdělení píků. K identifikaci těchto skupin, eluovaných struktur je naprosto nezbytné použití hmotnostní spektrometrie, neboť cílem je získat jednoduché píky jednotlivých látek ve směsi.

3.5.8 Elektromigrační separační metody

Elektromigrační separační metody využívají dvou elektrokinetických jevů - elektroforézy a elektroosmózy. V prostředí obsahujícím roztok s nabitými částicemi a pevné povrchy stýkající se s roztokem, které mohou nést elektrické náboje (stěny kapiláry, povrchy přítomných částic) se vytvářejí elektrické dvojvrstvy. Časem vzniká určité rovnovážné rozdělení nábojů.

V elektromigračních separačních metodách je na toto prostředí připojeno stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb.

a) **elektroforéza** - po aplikaci napětí se nabité částečky pohybují k opačně nabité elektrodě

b) **elektroosmóza** - po aplikaci napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda k záporné elektrodě.

Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabité částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

3.5.8.1 Princip elektroforézy

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. V zónové elektroforéze je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému.

Vzorek je dávkován do určitého místa tohoto systému. Kationty migrují k zápornému pólu, anionty ke kladnému a neutrální molekuly či částice se nepohybují. Vlivem odlišné rychlosti migrace složek vzorku se v průběhu separace vytvářejí oddělené zóny jednotlivých složek

3.5.8.2 Kapilární elektroforéza

Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí. Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor, obvykle fotometrický. Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu.

Druhy kapilární elektroforézy jsou:

- **Kapilární zónová elektroforéza** (Capillary Zone Electrophoresis - **CZE**) neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku (Free Solution Capillary Electrophoresis - **FSCE**) je separace založená na rozdílech v náboji analytu a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře.
- **Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie** (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography - **MECC**) se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.

- **Kapilární gelová elektroforéza** (Capillary Gel Electrophoresis - **CGE**) využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.
- **Kapilární isoelektrická fokusace** (Capillary IsoElectric Focusing - **CIEF**) slouží k separaci amfolytů v gradientu pH.
- **Kapilární elektrochromatografie** (Capillary ElectroChromatography - **CEC**) využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu jako stacionární fázi. Separační selektivita v **CEC** je kombinací elektroforetického a chromatografického procesu.

3.5.8.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie **MECC** byla původně vyvinuta pro separaci nenabitých sloučenin, které se nedělí užitím kapilární elektroforézy ve volném roztoku. Separace se provádí za použití základního elektrolytu s vysokým pH, který obsahuje relativně vysokou hladinu povrchově aktivních látek (surfaktantů) např.dodecylsíranu sodného (Sodium Dodecyl Sulphate - **SDS**).

Nad určitou mezní koncentrací povrchově aktivní látky (tzv. kritická micelární koncentrace) začnou spolu molekuly povrchově aktivní látky agregovat a vytvářejí micely. V micelách jsou hydrofilní hlavičky umístěny ve vnější vrstvě a hydrofobní řetězce tvoří nepolární jádro, které může rozpouštět složky vzorku. Nepolární jádra vytvářejí tzv. pseudostacionární fázi.

3.5.8.4 Kapilární gelová elektroforéza

Velké biomolekuly mohou mít podobné elektroforetické pohyblivosti, protože mají velmi blízký poměr náboje k hmotnosti. Elektroforéza ve volné kapiláře často pro dobré rozlišení nedostačuje. V tomto případě se separace provádí v kapilárách naplněných roztokem gelu. V kapilární gelové elektroforéze **CGE** se uplatňuje molekulově síťový efekt, který rozděluje molekuly unášené přes gel k detektoru podobně jako v gelové permeační chromatografii.

Aplikují se roztoky s gelem, kterými se plní kapilára až před separací. Tyto plnitelné gely používají derivatizovatelné celulosy rozpuštěné v pufru. Užití kapalných gelů dovoluje jejich výměnu v kapiláře mezi jednotlivými dávkováními vzorků.

3.5.8.5 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace **CIEF** je užívána pro separaci amfolytů. Při separaci se uplatňuje kromě elektrické pohyblivosti iontů i gradient **pH** prostředí elektrického pole.

Amfolyty obsahují kladnou i zápornou skupinu. Jejich molekula může existovat ve formě kladné, záporné i neutrální částice.

Na to, v jaké podobě se nachází, má zásadní vliv **pH** prostředí. Typickými amfolyty jsou aminokyseliny, peptidy, proteiny. Prostředí, ve kterém je amfolyt v elektricky neutrální formě, má právě určité **pH.** Toto **pH** se rovná izoelektrickému bodu **pI** příslušného amfolytu. Jestliže je **pH** prostředí vyšší než izoelektrický bod, převládá záporná forma amfolytu, jestliže je nižší, převládá jeho kladná forma.

3.5.8.6 Kapilární elektrochromatografie

Kapilární eletrochromatografie (Capillary ElectroChromatography - **CEC**) je rychle se rozvíjející technika, která kombinuje principy kapilární elektroforézy a **HPLC**. Jako kolony jsou používány kapiláry plněné mikročásticemi stacionární fáze.

K plnění kolon se používá rozličných technik. Jsou používány náplňové kolony, které jsou rozměry samy o sobě kapilárami, i kapilární kolony, u nichž je stacionární fáze na vnitřním povrchu kapiláry.

Pro posun mobilní fáze kolonou je používána aplikace stejnosměrného napětí a vyvolání elektroosmotického toku. V koloně nastává separace složek na stejných principech jako v **HPLC. CEC** je nová separační metoda využitelná pro neutrální, ale i nabité látky nejrůznější chemické povahy od jednoduchých molekul po makromolekuly **(25).**

3.5.9 Multidimenzionální LC - LC a LC - CE pro řešitelnou separaci biologických molekul

V multidimenzionálních separacích jsou dvě nebo i více nezávislých separačních metod spojeno ve snaze řešit analýzu komplexních směsí. Představení mechanismů každé metody by mělo být orthogonální také proto, že existují malé korelace mezi retencí sloučenin v každé dimenzi. Jestliže mnohonásobné orthogonální, separační metody jsou spojovány tak, pak proto, že všechny komponenty ve vzorku jsou vystaveny kompletním analýzám ve všech dimenzích, metoda je považována za „úplnou“.

Primární výhoda úplných multidimenzionálních separací v porovnáním s jejich **1D** protějšky spočívá v potenciálu pro dramatické zlepšení v rozlišení složek.Vysoká síla rozlišení může být dosažena tehdy, jestliže kapacita píků úplných multidimenzionílních separací je zhruba rovna výsledku individuální kapacity píků každé dimenze.

V tomto ohledu jsou diskutovány teorie a instrumentace **2D** separace pomocí **2D** kapalinové chromatografie **(LC-LC)** a kapalinové chromatografie s kapilární elektroforézou **(LC-CE).**

3.5.9.1 Úvod do problematiky multidimenzionální LC - LC a LC - CE

Multidimenzionální separace zahrnují spojení dvou nebo více separačních mechanismů při provedení jednoduché analýzy. Potřeba multidimenzionálních separací vzrůstá s neschopností **1D** separačních metod adekvátně řešit vysoce komplexní směsi. Na poli výzkumu těchto metod zabývajících se řešením komplexních směsí je potřeba pro zvýšení separační síly využít multidimenzionálních technik v oblastech jako je proteomika, neboť tato disciplína zahrnuje kromě jiného také charakterizaci všech proteinů exprimovaných organismem.

Např. jednoduchý, jednobuněčný organismus **E.coli** produkuje celkově přes 4.000 proteinů **(26).** I ta nejsilnější **1D** kolona u chromatografických technik má typický kapacitní vrchol jenom v několika stovkách **(27),** kde píková kapacita je definována jako maximální počet píků, které je možno rozdělit v daném separačním prostoru s rozlišením 1,0 od každého sousedícího píku **(28).**

Mimoto, obvykle díky náhodnému výběru distribuce píků a statistické pravděpodobnosti překryvu píků je možno považovat analýzu za plně vyřešenou. Stejná kritéria lze uplatňovat i pro aktuální množství detekovatelných sloučenin, které může být považováno za plně vyřešené, pokud jsou hodnoty podstatně menší než je kapacita píku **(29,30,31).** Multidimenzionální separace nabízí díky obrovsky zvyšující se rozlišovací síle možnost řešit komplexní reálné vzorky, jež pomocí **1D** tradičních separací nelze.

3.5.9.2 Multidimenzionální separační teorie

V multidimenzionálních separacích je vzorek nejprve podřízen separaci cestou jedné metody a potom jsou separované komponenty dále separovány nejméně jednou doplňkovou nezávislou metodou. Ačkoliv neexistuje podstatná limitace množství nezávislých separačních metod, které mohou být spojeny, praktické zábrany limitují širokou většinou multidimenzionálních separací vydaných k datu **2D. 2D** separace poskytují zvýšení výsledku a vrchol kapacity v porovnáním s **1D** systémy. V ideálním případě celkový vrchol kapacity **2D** separačního systému je přibližně roven produktu píku kapacit obou dimenzí **(29).** Hypoteticky, když dvě techniky s vrcholem kapacity 100 každého píku bylo kombinováno, výsledný **2D** systém by měl mít maximum kapacity teoretického píku 10.000.

Vytvořit spojení metod tak, aby píky dosahovaly kapacity této výšky v **2D** separacích, není obyčejným úkolem díky základním obtížím při spojování dvou nestejných technik. Díky velkému množství různých typů **2D** separací uváděných v literatuře je důležité vytvořit jasné rozlišení mezi různými třídami **2D** separací.

Zajímavým konceptem jasného rozlišení je např. rozdíl mezi separacemi, které jsou **2D** separacemi v prostoru, výsledky analytů separace získáme přes **2D** planární povrch jako je např. gel. Techniky, které jsou **2D** v čase jsou provedeny jako první **1D** separace, často na kapalinové chromatografické koloně a částečně jsou podřízeny individuálním frakcím z této **1D** separace do druhé **1D** separace. Techniky, které jsou **2D** v čase, lze rozlišit podle způsobu provedení na off - line nebo on – line multidimenzionální separace. Off - line metody zahrnují sbírání frakcí z první dimenze. Frakce z první dimenze jsou později podřízené separacím probíhajícím v druhé dimenzi. Při spojení on -line techniky dochází k zaměstnávání ventilů nebo jiných instrumentů k převádění frakcí první dimenze.

Díky těmto ventilům nebo jiným instrumentům je umožněno frakcím z první dimenze přemístit se přímo do druhé dimenze za podmínek, že **1D** separace pokračuje simultánně. Obojí off - line a on - line metody mají pozoruhodné výhody ale i nevýhody. Off - line soubor frakcí dovoluje snažší optimalizaci separace v obou dimenzích a dovolí manipulaci se vzorkem jako je úprava koncentrace nebo přestavění mezi dimenzemi. Schopnost optimalizace každého kroku separace je nezbytná pokud požadujeme nezávislost každého kroku separace. Takové optimalizace lze dosáhnout, jestliže v průběhu celé analýzy dochází ke zkracování podstatných period času. Časové periody se mohou stát prohibičními, pokud během analýzy dochází ke sbírání obrovských množství frakcí.

Ke sbírání obrovského množství frakcí dochází, jestliže nejsou užívány automatické metody pro zacházení se vzorkem. On - line techniky mají sklon být podstatně rychlejší, protože všechny **2D** separace probíhají v čase, který kompletuje **1D** separaci. Čas separace utíká a složení mobilní fáze má sklon být více limitováno než off - line **2D** separace a kompromisy vznikající spojením obou dimenzí musí být spjaty s úspěšným on-line spojením.

Ačkoliv obojí on - line i off - line techniky jsou velmi cenné, většina dalšího úsilí na vývoj **2D** separací bývá zaostřena na on - line metody. Existuje jisté teoretické přesvědčení aplikovat všechny multidimenzionální separace bez ohledu na to, zda - li technika je **2D** v prostoru, čase, off - line nebo on - line.

Giddings uvedl dva základní požadavky pro ideální multidimenzionální separace **(29, 32)**. První z nich je, že separační mechanismus musí být orthogonální. Požadavek orthogonality lze zjistit na základě chemických a fyzikálních vlastností.

Díky těmto vlastnostem jsou analyty separovány a je zajištěna jejich různost pro každou dimenzi. Např. **RPLC** (kapalinová chromatografie na reverzní fázi) separuje na základě hydrofobicity, je orthogonální k **IEC** (iontově výměnné chromatografii).
IEC separuje na základě coulombových interakcí. Pokud **2D** systém je opravdu orthogonální, rozlišení komponent (píků) v jedné dimenzi nemusí korelovat s distribucí komponent v jiné dimenzi **(33).** Hypotetický příklad ortogonální a neortogonální **2D** separace je ukázán na **OBR.7.** Giddingovo druhé kriterium je takové, že výsledek získaný v **1D** separaci nesmí být ztracen v jiné pododdílové dimenzy. Pro on-line techniky zahrnující **2D** separace v čase je tento požadavek uspokojen navržením vhodné instrumentace, která přenese frakce z **1D** do **2D** v poměru uspokojivém k zajištění výsledku z první dimenze.

Druhá dimenze musí být schopná kompletování, velmi rychlého porovnávání s první dimenzí. V případě dosažení optimálního výsledku může být každý pík v první dimenzi rozdělen nejméně do třech dalších píků (vzorků) v druhé dimenzy **(34).**

Výsledek z první dimenze potřebujeme znát pro vysokorychlostní analýzu, která proběhne v druhé dimenzy a je představována experimentální výzvou k provedení těchto **2D** separací. Problémem zůstávají výsledky z první dimenze, ale jsou zde i jiné obtíže při **2D** separaci. Pokud dojde k překlenutí těchto obtíží a výsledky zůstanou v souladu s Giddingovými kriterii, 2D separace zůstávají nadále dobrými separacemi komplexních směsí.

3.5.9.3 Multidimenzionální kapalinová chromatografie - kapilární elektroforéza (LC - CE)

Jako již bylo zdůrazňováno, nejlepší multidimenzionální separace jsou dosaženy, jestliže jsou spojovány techniky s velmi rozdílnými separačními mechanismy. Spojení kapalinové chromatografie s kapilární elektroforézou **(LC - CE)** je proto logickým kandidátem na **2D** separační metodu, pokud jsou separace probíhající v kapilární elektroforéze založeny na elektroforetické pohyblivosti, mechanismus těchto technik je téměř ortogonální, jejich spojení pomocí rozhraní je poněkud komplikované,neboť je potřeba zajistit, aby toto rozhraní spojilo systém s vysokým napětím se systémem bez vysokého napětí.

Ačkoliv kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza jsou srovnatelnými separačními technikami, jejich rozdílnost se projeví při jejich spojování, které lze považovat za komplikované.

Eluční objemy konvenčních kolon kapalinové chromatografie jsou mnohem větší než objemy vzorku kapilár při kapilární elektroforéze. Proto jenom malé frakce odpadu kapalinové chromatografie mohou být přeneseny do dimenze kapilární elektroforézy. Alternativně pak i průtok z dimenze kapalinové chromatografie může být redukován užitím kapilárních kolon kapalinové chromatografie.

Přenos frakce z kolony kapalinové chromatografie do kapiláry kapilární elektroforézy je obvykle více komplikovanější a instrumentálně náročnější než **LC - LC** metody. Jak v **LC - LC,** off - line spojení je i u této metody jednoduché, proto bývá často užíváno.

Je ale pomalejší než on-line metody a obvykle je obětován výsledek z první dimenze. V případě spojení všech výhod obou dimenzí, musí být využity on-line rozlišovací techniky. Přesto obtíže při on-line **LC - CE** separaci bývají úspěšně zdolány a technika je publikována pak jako silná multidimenzionální separační metoda. **LC - CE** není ještě běžně užívána, množství variant pomocí různých technik a rozhraní při jejich aplikacích jsou někdy limitovány ve srovnání s **LC - LC**. V současnosti většina prácí se základními využívajícími **LC - CE** systémy je zaměřena na separaci komplexních biologických směsí, především peptidů a proteinů, ačkoliv některé práce s menšími neutrálními molekulami jsou také publikovány **(35).**

Nejčastěji dva módy kapalinové chromatografie, které bývají spojeny nejčastěji s kapilární elektroforézou, jsou chromatografie na reverzní fázi a gelové chromatografie **(36,37,38).** Některé další varianty kapilární elektroforézy bývají také užity v **2D LC - CE** separacích, jako je např. tlaková kapilární elektrochromatografie **(pCEC).** Díky rychlosti a vysokému výsledku kapilární elektroforézy spojení **LC - CE** nabízí významný příslib ve smyslu zvýšení separační síly. Kapacita píku jedné **RPLC - CE** byla ustanovena na 20.000 pro pětihodinovou separaci **(39).**

3.5.9.4 LC - CE instrumentace

První automatizovaný základní **LC - CE** systém byl vyvinut Busheyem a Jorgensonem v 1990 **(40).** Tento systém byl založen na spojení komerční **„mikrobore“** kolony s reverzní fází spojenou s křemičitou kapilárou systému kapilární elektroforézy, která je spojena šesticestným ventilem s externí smyčkou.

Tento systém byl využit k separaci směsí standardů peptidu a trypsinu z vaječného albuminu s fluorescenční detekcí. Kapacita píku tohoto systému byla kolem 420. Mnoho zlepšení v **LC - CE** instrumentaci bylo vytvořeno během 90. let **(41).** Zlepšení separační účinnosti bylo dosaženo použitím plněných kapilár, tyto kapiláry jsou již v 1. dimenzi kapalinového systému na rozdíl od konvenčních kolon kapalinové chromatografie **(38).**

Toto uspořádání také usnadňuje spojení těchto dvou dimenzí, protože průtoky v kapilárách u kapalinové chromatografie jsou si více bližší než průtoky typicky používané v kapilární elektroforéze.

Jiná zlepšení v instrumentaci se soustřeďují např. na spojení kolon kapalinové chromatografie s kapilárou kapilární elektroforézy. Tzv**. "transverse flow - gated"** rozhraní, první zmínka v 1993 **(37)** a vylepšení v 1997 **(42),** eliminuje potřebu externích smyček, které se podílejí na **„extra column broadening"** neboli rozšíření zón. V **LC - CE** systému použitím tohoto rozhraní je výstup kolony kapalinové chromatografie a vstup do kapiláry kapilární elektroforézy pozičně přímo proti sobě a jsou odděleny úzkým kanálem jak ukazuje **OBR. 8.**

Během většiny času analýzy je elektroforetický pufr vymýván proudem skrz kanál, který odnáší kolonové eluční činidlo z kapalinové chromatografie. K dávkování je potřeba zastavit průtok a tedy vymývání pufru a požadovanou frakci kapalinové chromatografie převést do kapiláry kapilární elektroforézy elektromigrací. Rychlé a reprodukovatelné nástřiky na kolonu mohou být využity pro přepínací ventily, které pro zaostření zón v části kapalinové chromatografie používají vzduch, který slouží zároveň i ke kontrole průtoku pufru.

2D chromatoelektroforeogram s fluorescenčně značenou lidskou močí, která byla separována použitím výše zmíněného rozhraní **LC - CE** instrumentace, je ukázáno na **OBR.9**. V tomto **CEPG** (chromatoelektroforeogram) je rozlišemo více jak 400 píků, což jasně ukazuje na výhodnost orthogonálního zapojení dvou dimenzí a jejich citlivost. Tento systém má pak celkovou vysokou kapacitu píku. Podobnou, ale poněkud rychlejší metodou je použití převodu z kolony kapalinové chromatografie na kapiláru kapilární elektroforézy, což je prováděno technikou **„optical gating"**, v této tzv. inverzní injekční technice se kolona kapilární kapalinové chromatografie a kapilára kapilární elektroforézy spojuje jednoduchým spojovacím T rozhraním, jak ukazuje **OBR.10**. Díky tomuto T rozhraní každá část z první dimenze je převedena do kapiláry kapilární elektroforézy elektromigrací **(43).**

On - line párování **LC - CE** s hmotnostní spektrometrií představuje nové zlepšení v **LC - CE** instrumentaci **(44,45).** Jedna z výzev pro další rozvoj a vývoj je výběr pufru pro kapilární elektroforézu, který by udával vhodné separační podmínky a také by měl být vhodný ke spojení s ionizačním elektrosprejem. Jednou z dalších těžkostí spojení rozhraní kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií spočívá v tom, že většina hmotnostních spektrometrů není schopna rozdělení vzorku do menších částí **(44).** Aby tento problém mohl být zlepšen, je zapotřebí rychlejších hmotnostních spektrometrů, které jsou už v současnosti vyráběny. Přes těžkosti při použití on-line spojení hmotnostní spektrometrie s **LC - CE** je stále poskytováno mnoho pomocných informací v porovnání s ostatními detekčními metodami.

3.6 Úplná 2D plynová chromatografie - silná a široce aplikovatelná technika

V roce 2003 Ryan a Marriot představili úplnou **2D** plynovou chromatografii a představili principy techniky založené na umění instrumentace a perspektiv **(11).** S technikou **GC X GC** bylo možné se seznámit v 90. letech a už při zevrubném seznámení bylo zřejmé, že se jedná o všestrannou techniku, která může být aplikována na všech komplexních vzorcích a analytech, které lze analyzovat **GC.**

Hlavní výhody spojení **GC X GC** jsou:

- velmi vysoká separační kapacita
- vylepšená detekce analytu
- generace chromatografických struktur.

3.6.1 Separace úplné 2D plynové chromatografie

Jako výsledek orthogonality (např. nezávislé separační mechanismy - viz **(46)**) dvou separačních dimenzí - obvykle 20 - 30 metrů dlouhé nepolární první kolony a krátké 0,5 - 1 m polární, selektivní druhé kolony, které jsou všechny komponenty vzorku podřízeny, je separační síla systému **GC X GC,** která je zhruba rovna výsledku separačních sil individuálních kolon.

Jinými slovy, v **2D** separační rovině může být většina komponent vyřešena dřív než v konvenční **1D** chromatografické stopové analýze. Toto je přesvědčivě dokumentováno v literatuře zabývající se různými druhy komplexních vzorků. Jinou hlavní výhodou při separaci analytů z odstanění velké části interferovaná prostředím. Tyto hlavní výhody **GC X GC** jsou diskutovány v výše zmíněných odkazech **(46).**

V odkazu **(46)** jsou také zmiňovány oblasti aplikace, jako je např. ropný průmysl **(47,48)**, potravinářském průmyslu **(49,50)**, zjišťování polyhalogenových mikro - kontaminant v rybách **(51)**, určení množství pesticidů v ovoci a zelenině **(52)**, při výzkumu geochemických vzorků, vzorků vzduchu, průmyslových vzorků, vzorků biologického materiálu. Vybraná čísla příkladů jsou prezentována v **Tab. 1.** Nejzajímavějším příkladem může být například analýza cigaretového kouře **(53)**, která vykazuje 30 i více píků.

3.6.2 Detekce v systému úplné 2D plynové chromatografie

Druhá výhoda, zlepšení analytické detekovatelnosti, je díky zaostřovacímu efektu (kryogenetického) modulátoru. Pokud separace každé modulované frakce v druhé krátké koloně byla dokončena před vstříknutím následující frakce, **2D** separace zabere jen několik málo sekund. Předejít rozšíření píku lze použitím modulátoru se zaostřením na eluovanou frakci z první kolony ve velmi úzkých pulsech (typická šířka zhruba 10 ms) předešlým vstříknutím na druhou kolonu.

3.6.3 Struktura spojení úplné 2D plynové chromatografie

Tvorba tzv. stupňovitých nebo strukturovaných separací je skutečně orthogonální **GC X GC** a nápomocná při identifikaci cílených analytů, obzvláště u komplexních vzorků ve spojení s **GC X GC** technikou.

Látky stejné chemické třídy, např. mající stejnou základní strukturu nebo obsahují stejné funkční skupiny, projevují příbuznost **2D** retenčních časů. Taková třída sloučenin vykazuje pruhy nebo klastry, které mohou být snadno identifikovány za **2D GC X GC.**

3.6.4 Příklady GC X GC separací

Mezi aplikacemi, které byly zdokumentovány dříve, byly vybrány tři typické příklady pro další ilustraci. Petrochemické produkty byly cílem většiny dřívějších **GC X GC** analýz, protože obsahují velké množství jednotlivých sloučenin, jež jsou ovšem členy jedné chemické rodiny. Tato chemická rodina je relativně malá, proto tyto produkty byly vybrány pro první demonstraci síly techniky. Pro názornost a pochopení problematiky **GC X GC** separací byla vždy ukazována separace a formace klastrů různých alifatických a aromatických tříd uhlovodíků v naftě s plaměnově iontovou detekcí **(FID) (OBR. 11).** Postupem dál se ukázalo **(OBR. 12)** využití kyseliny sírové při chemiluminiscenční detekci, která se používá pro selektivní monitorování všech podtříd sloučenin obsahujících síru v naftě **(54).**

Všechny sloučeniny stejné chemické rodiny - merkaptáty, sulfidy, thiofeny, benzothiofeny, dibenzothiofeny tvoří klastry nebo pruhy v **2D** barevném plotu.

Benzothiofeny by měly vykazovat oddělené klastry, pokud jsou ve vzorku přítomny. Každá skupina, sloučenina je distribuována, jak podle množství uhlíkových atomů, tak i množství a délky alkylového řetězce přivázaného k funkčním skupinám.

Sloučeniny a podskupiny sloučenin s vyšším bodem varu mají odpovídající vyšší 1D retenční čas, více polární, polarizovatelné sloučeniny vykazují vyšší 2D retenční čas. Tato informace je zásadní pro prozatímní identifikaci neznámých sloučenin. Zajímavým příkladem také může být sledovat strukturu metylesteru mastných kyselin **(FAMEs)** v rybím oleji **(OBR.13).**

Aplikace takového vzorku se skládá ze separace rozdělené do dvou částí - parní tlaková 1D separace, rychlá a selektivně interakční 2D separace. Takovouto separací získáme homolog **FAMEs,** který převedeme z nasycené formy do nenasycené, což se projeví v obrysovém

GC X GC plotu přechodem do paralelní linie. Druhá, polární kolona dlouhá 30 cm ukáže, že došlo k účinné separaci na základě množství násobných vazeb. Mezi skupinami **FAMEs** majícími stejné množství uhlíkových atomů (polygony) patří i **FAMEs** s lichým počtem uhlíků, kterých ovšem ve vzorku bývá pouze stopové množství.

Příklady ukazují, že i problémové množství vzorku pro identifikaci může být řešeno zkombinováním retenčního času a **FID, ECD** signálu v případě polyhalogenovaných aromátů. Většina reálných problémů vyžaduje rychlé a přesné měření, čehož lze dosáhnout použitím hmotnostního spektrometru **(MS).** Identifikace konformace, prozatímní identifikace neznámého vzorku jsou další způsoby využití **MS.** Nevýhodou **GC X GC** analýzy jsou poměrně široké píky, jež lze odstranit využitím **TOF MS -** hmotnostního spektrometru měřícího čas letu částice.

Příkladem takovéhoto spojení může být rozluštění složení cigaretového kouře, určení klíčových chutí, vůní v jídle **(50, 53).**

3.6.5 Provedení GC X GC separace

Za data týkající se analytického provedení jsou považována ta, jež byla ukázána v několika studiích a která dokazují, že opakovatelnost retenčních časů je v obou dimenzích. Vzorek je potřeba nejprve profilovat v oblasti opakovatelnosti retenčních časů a dokázat, že opakovatelnost je plně úspěšná v obou dimenzích, což bylo prokázáno v několika studiích operujících s analytickými daty, neboť pouze na profilovém vzorku lze porovnávat vzájemné rozdíly a podobnosti s ostatními vzorky a případné shody indikovat s velkou spolehlivostí.

Dříve nebylo **GC X GC** separaci věnována taková pozornost z důvodu zdánlivé komplikovanosti metody a byla dána přednost metodám zaměřeným spíše na jednoduché použití v praxi. Při **GC X GC** systému bylo potřeba zlepšit modulátory a dokázat užitečnost a praktičnost této metody. Hlavním problémem je, že se stále velmi mnoho času stráví manipulací a průběhem velmi rozsáhlých souborů dat. Ta jsou produkována **GC X GC** softwarem hlavně použitím **TOF MS** detekce. Při pohledu instrumentace na **GC X GC** je situace úplně jasná.

Při spojení **GC X GC** se využívá několik typů detektorů: **FID, mikro-ECD, AED, TOF MS.** Všechny tyto typy bývají využívány pro reálné aplikace. Další možnost je použití modulátorů, jak komerčně dostupných, tak i „podomácku" vyrobených. Kromě **GC X GC** existují i jiné možnosti separace, při kterých lze využít i konvenční **1D GC** separace, tyto ovšem většinou slouží pouze k předběžnému určení vzorku. Separace prováděné s použitím výše jmenovaných detektorů nejsou tolik závislé na polaritě, prchavosti vzorku, čímž se významně liší od obdobných separací prováděných v **1D GC.**

Instrumentaci používanou při **GC X GC** lze využít také při **1D GC** separaci. Týká se to především modulátoru, protože není - li užit, je vliv **1D GC** separace na plášť krátké a rychlé kolony zanedbatelný.

3.7 Trendy v chemometrické analýze základních 2D separacích

Skoro před dvěma desetiletími Giddings vyložil základní koncepty a teorii základních **2D** separací **(55, 56).** Vzorek, který nás zajímá lze separovat nejenom chemickou **2D** cestou, ale je možno využít také dvou separačních mechanismů jež se vzájemně doplňují.

2D separace mají různé obměny, které zahrnují spojení **TLC X TLC (57)** (spojení dvou tenkovrstvých kapalinových chromatografií) ; **LC X LC (58)** (spojení dvou kapalinových chromatografií); **LC X CE (59)** (spojení kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy); **CE X CE (60)** (spojení dvou kapilárních elektroforéz); **LC X GC (61)**; **GC X GC (62, 63)** a **2D PAGE (64)** (elektroforéza probíhající v polyakrylamidovém gelu).

Termín „základní“ je užíván ve spojení s **2D** separacemi, pokud každá komponenta vzorku je typicky přístupna k obojím separačním mechanismům, díky nimž je získané rozlišení v první dimenzi udrženo i v druhé dimenzy **(65).** Separování ve dvou dimenzích současně může významně zkrátit časový průběh v porovnáním s **1D** separacemi a poskytnout selektivitu, kterou **1D** separace neposkytuje. Při **2D** separacích může být píková kapacita stejně vysoká jako píková kapacita v každé dimenzy. Tyto techniky nalézají místo v analýze komplexních směsí.

Kombinací **2D** separací a chemometrie může být čas potřebný pro analýzu redukován, chemická selektivita může být lépe využita. Chemometrie podstatně obohacuje analýzu o informace a data spojené s **2D** separací.

3.7.1 Chemometrie

Chemometrie bývá popisována jako umění vytahovat chemicky relevantní informace z dat produkovaných chemickými experimenty **(66).** Chemometrie je poměrně novou vědní disciplínou, existuje od roku 1972 a seznámení této vědy s dostupnými a rychlými počítači umožnilo její mohutný rozmach v oblasti zpracování analytických dat.

Důležitým nápomocným faktorem pro rozšíření chemometrie byla její aplikace při rutinní praxi. Chemometrie **2D** separací má tři základní kategorie: dekonvulace píku, multivariační kalibrace, rozpoznání vzorku. Chemometrie je aplikována na data **2D** separace, pokud dojde k realizování sběru a shromáždění více dat. Získání základů je důležité pro lepší porozumnění situace a potenciální zlepšení. Je důležité porozumnět kombinování **2D** separací s chemometrickými metodami, umět aplikovat užitečné vzorce, aby mohly být oceněny **2D** separace, které jsou později předmětem chemometrických analýz. Měřítko může také sloužit k ocenění získaných dat, které byly získány z chemometrické analýzy, které předcházela **2D** separace.

Chromatografické rozlišení **(Rs)** je dobré pro posouzení separace dvou píků, často ale tento způsob řešení nepostačuje v případě **2D** separací s nízkým rozlišením. Rozlišení popisuje separaci píku překrývajícího se s jedním interferujícím píkem, avšak u mnohonásobných interferujících píků rozlišení nemůže plně popsat danou situaci. Parametr **Rs** je schopen dávat smysluplné výsledky pouze tehdy může - li danou informaci plně popsat. Neschopnost **Rs** popsat a vysvětlit je dále komplikována separací v mnoha dimenzích, kde výsledné rozlišení píků je spojením rozlišení v každé dimenzi. Užitečné měřítko adresované nedostatkům chromatografických rozlišení je tzv. “**multivariantní selektivita**“ **(67, 68, 69).** Multivariantní selektivita měří stupeň překrytí signálů různých chemických komponent.

Pro **2D** separační analýzu může být multivariantní selektivita popsána informací o daných látkách, které se překrývají a může být rozšířen popisem dat **2D** separací spojených se spektrometrickou instrumentací.

Výsledky a data moderních, experimentálních metod ukazují, že multivariantní selektivita je silně korelována kvalitativními, kvalitativní výsledky, jestliže chemometrické dekonvulační techniky jsou používáné ke kvantifikaci píků, které spadají do skupiny tzv. mnohonásobných interferujících píků.

Vztah mezi **2D** chromatografickým rozlišením **(2D - Rs)** a multivariantní selektivitou je ukázán na **OBR. 14. 2D - Rs** bývá definováno jako druhá odmocnina sumy druhé mocniny **Rs (58).** Např. máme - li rozlišení v každé dimenzy (**Rs** - 0,7), je výsledné rozlišení ve **2D** systému (**Rs** - 1,0).

Multivariantní selektivita má rozmezí mezi 0 až 1,0, kde 0 znamená kompletní překrytí a 1 znamená, že k překrytí nedošlo. Multivariantní selektivita vzrůstá rychle s rozlišením, jestliže **2D - Rs** je přibližně 0,75 a dané dva píky jsou skoro rozlišeny **(OBR. 14).** Multivariantní selektivita se přibližuje optimálnímu hodnotě, jestliže další analytická informace o vzorku jsou připojeny k řešení dané problematiky.

Pokud tomu tak je, lze této informace využít ve prospěch řešení dalších problémů a užití rozsáhlejšího **2D - Rs** by bylo nadbytečné. Realizace **2D** separace s vhodnou detekcí spolu s chemometrickými metodami pro dekonvulaci a kvantifikaci píku nám poskytují dobré výsledky u píků s **2D - Rs** přibližně 0,3, tyto hodnoty korespondují s multivariantní selektivitou okolo 0,35 **(70).**

3.7.2 Techniky dekonvulace píků

Jednou z aplikací chemometrických metod je dekonvulace matematické rozlišení překrývajících se píků. Vyhlazovací metoda **(GRAM)** je chemometrická technika, která se používá k **2D** separaci při výskytu dvou překrývajících se píků a při srovnání magnitudy píků, která bývá použita jako standard pro kvantifikaci.

GRAM bývá úspěšně aplikován na spojení **GC X GC** ke kvantifikaci částečně rozlišených píků, např. u analýzy vybraných překrývajících komponent v modifikovaném benzínu **(60)** a tryskovém pohonu **(71).** Aplikovatelnost metody **GRAM** je zřejmá u základních **2D** metod především při použití simulace Monte Carlo. Tato simulace bývá aplikována k určení podmínek tam, kde společně s užitím metody **GRAM** lze poskytnout úspěšnou analýzu a to i u nerozlišených píků **(70).**

Široké rozmezí experimentálních podmínek a kritéria účinnosti typických pro **2D** separační metody jsou modelovány: poměrem výšky píku analytu ku interferenci, rozlišením v první a druhé dimenzi **Rs,** poměrem signálu k šumu, reprodukovatelností nástřikového objemu, a reprodukovatelností retenčního času v jednotlivých analýzách.

Podle výsledků těchto simulací techniky dekonvulace píku jako **GRAM** by měly velkolepě rozšířit množství analyzovatelných píků pro všechny typy základních **2D** separací **(70).** Pro aplikaci chemometrie je rozhodující dostatečná reprodukovatelnost retenčních časů v jednotlivých analýzách. V tomto ohledu, objektivní retenční čas standardizované techniky u **2D** separace významně zlepšuje kvantitu při **GRAM** analýze **(72).**

3.7.3 Multivariantní kalibrace

Tri-PLS je rozšířená populární chemometrická technika, která využívá částečnou nejmenší druhou mocninu **(PLS)** k **2D** datům.**Tri - PLS** i jiné multivariantní kalibrační techniky nepožadují identifikaci píku, což je samozřejmě značná výhoda. Díky této výhodě lze odbourat nadbytečná měření každého analytu a to především při **2D** separaci **(73).**

Kombinací vysokorychlostní **GC X GC** s krátkou kolonou a **tri - PLS** analýzou byly demonstrovány výhody spojení **2D** technik s chemometrickými metodami a byly také názorně předvedeny na vzorcích nafty, jejichž částečným chromatografickým řešením společně s **tri - PLS** analýzou můžeme separovat vzorek nafty až šestnáctkrát rychleji než při tradiční **1D GC** metodě. **Tri - PLS** byla užita k předpovězení aromatických, naftalenových a cykloalkanových částí ve vzorkách nafty a bylo dosaženo přijatelné kvantitativní přesnosti, což je důkaz, že obrovský nárůst v analytické rychlosti může být realizován v kombinaci s **2D** chromatografickými metodami ve spolupráci s chemometrií, která může zvýšit výkonnost i produktivitu.

3.7.4 Rozpoznávání vzorků

Trojcestná principiální komponentová analýza **(PCA)** byla užita k analýze **2D PAGE** datům z proteomických vzorků k identifikaci tříd přítomných ve vzorku **(3).**

Byly identifikovány dvě různé sady vzorků: sada krysího séra, kde šlo o rozlišení vzorku s nikotinem a vzorku bez nikotinu, sada lidského séra, kde šlo o rozlišení zdravých a patologicky změněných lymfatických uzlíků. U patologicky změněných lymfatických uzlíků bylo podezření na non - Hodgkinův lymfom. Trojcestná **PCA** úspěšně rozlišila mezi dvěma třídami v každém případu a byla schopná objasnit místa v **2D** mapách zodpovědné za rozdělení třídy.

Schopnost rozpoznání vzorku byla také demonstrována pomocí **GC X GC** dat. **ANOVA**, založená na znaku selektivity, byla užívána předně před **PCA** k objasnění a vybrání znaků týkajících se třídního rozlišení pro směsi tryskových pohonů **(75).**

Po výběru znaků upřesňujících třídní rozdíly ve směsi tryskových pohonů byla **PCA** schopna rozlišit 1 % objemového rozdílu z této směsi a určit složení ve směsi dvou typů tryskových pohonů.

4. ZÁVĚRY A CÍL PRÁCE

4.1 Závěr pro on - line multidimenzionální kapalinovou chromatografii (LC - LC)

Na rozdíl od přímo spojených **LC - LC** systémů kolon, kolonová přepínací multidimenzionální kapalinová chromatografie využívá ventily ke spojení první kolony s druhou, jinou pododdílovou kolonou. Toto uspořádání dovoluje větší flexibilitu než přímo spojené **2D** systémy, protože mohou být kombinovány v principu dva libovolné separační módy. S větší flexibilitou je spojena i větší instrumentální náročnost **(76).** Základní **2D** techniky vyžadují použití několika pump kapalinové chromatografie, automatické přepínací ventily a instrumentaci kontrolovanou počítačem. Hlavní podíl všech prací dosud publikovaných využívá přepínacích ventilů.

Při kolonově přepínací **2D LC** separacích je využíváno široké rozmanitosti módu **LC** a jejich možnosti navzájem tyto módy kombinovat jako jsou kombinace např. iontově výměnného módu s módem reverzní fázi **(IEC - RPLC) (77, 78, 79, 80, 81, 82, 83),** módu gelové chromatografie s módem reverzní fáze **(SEC - RPLC) (84, 85, 86, 87, 88),** mód reverzní fáze s gelovou chromatografií, iontově výměnnou **(RPLC – SEC)**, **(IEC – SEC)**
a normálního módu s reverzní fázi **(NPC - RPLC) (102).** Ačkoliv bylo navrženo mnoho různých instrumentálních sestav pro **2D** kapalinovou chromatografii, většina z použitých komponent jsou podobné, zahrnují dávkovač (injector), dvě isokratické nebo gradientové pumpy kapalinové chromatografie, jedna kolona pro první dimenzi, jedna nebo více kolon pro druhou dimenzy, jeden nebo více přepínacích ventilů kontrolovaných počítačem a vhodný detekční systém.

První článek o **2D** separaci provedené užitím uvedené metody pomocí kolonově přepínacího systému byl publikován v 1978 Ernim a Freiem **(84).** Navržený systém, byl použit k separaci rostlinných extraktů, skládal se z gelové kolony v první dimenzy spojené s reverzní fází kolony druhé dimenze. Osmicestný přepínací ventil byl použit k propojení těchto dvou dimenzí. Tato konfigurace je velmi podobná těm nynějším v současnosti používaných **2D** separačních systémů.

První systém pro **2D** separace kapalinové chromatografie byl publikován v 1990 Busheyem a Jorgensonem **(89).** Tento systém byl využit k analýze směsi proteinových standardů a vzorku lidského séra. Kationtově výměnná kolona, operující v gradientovém elučním módu pro první dimenzi, byla spojena s kolonou separující podle velikosti molekul (velikostně separační kolona) druhé dimenze. Jak již bylo uvedeno ve článku od Erniho a Freie, k spojení dvou kolon je používán přepínací osmicestný ventil, který dovoluje on - line přenos frakce z první kolony do druhé.

Diagram instrumentálního souboru tohoto **2D** kapalinově chromatografického systému je uveden na **OBR. 15.** Odpad z kationtově výměnné kolony je usměrněn do skladovací smyčky. Po přepnutí ventilu isokratická pumpa kapalinové chromatografie vymyje obsah smyčky na velikostně výměnnou kolonu, kde jsou analyty dále separovány. Mezitím je odpad z první dimenze směřováno do druhé skladovací smyčky.

Poměry toku na obou kolonách jsou vybrány tak, aby se doba analýzy druhé dimenze přesně rovnala množství času potřebného k naplnění skladovací smyčky první dimenze. Ke kontrole přepínání ventily, je použit počítač stejně tak i pro získávání dat z **UV** absorpčního detektoru na konci druhé kolony. Při tomto způsobu uspořádání může **SEC** kolona analyzovat velké množství frakcí z iontově výměnné kolony. Chromatografická data jsou prezentována jako **3D** pohled **2D** chromatogramu jak ukazuje **OBR. 16.** Systém byl vyvinut pro celkovou kapacitu píku přibližně 130. Pro každou dimenzi je kapacita píku vyvinuta tak, aby byl produkt jasně viditelný. Jiné příklady separací pomocí kolonově přepínací **2D** kapalinové chromatografie užívají dvojité skladovací smyčky, jak je bylo v literatuře publikováno.

Celková píková kapacita těchto systémů byla vyvinuta na hodnotu okolo 500. Jiné **2D LC - LC** techniky užívající paralelních kolon v druhé dimenzi a mnohé z nich nahrazují dva čtyřcestné přepínací ventily jedním deseticestným ventilem, tím se dosáhlo stejného účelu **(79, 80, 83, 87, 90).** Wagner a kolegové publikovali nový **2D** aniontově výměnný mód s módem reverzní fáze zaměřeným na analýzu peptidů a proteinů s molekulovou hmotností pod 20 kDa **(82).**

Nejvýznamnějším novým rysem jejich systému je užití čtyř paralelních kolon s reverzní fází v druhé dimenzi.V případě rozhraní všech čtyř **2D** kolon od jedné **1D** kolony je využito sady třech deseticestných ventilů.V čase během jakékoliv analýzy je odpad z první dimenze převeden v jedné z kolon kapalinové chromatografie s reverzní fází, dvě kolony kapalinové chromatografie s reverzní fází jsou eluovány a jedna kolona je regenerována.

Tento systém také využívá nové materiály s omezeným přístupem **RAM** umístěné přednostně v první dimenzi. Systém je výhodný pro on - line zařazení vzorku a velikostně selektivní frakcionalizaci. Teoretická píková kapacita celého systému je zhruba okolo 3.000.

Tato metoda je jasným příkladem, že lze plně automatizovat techniky pro proteomické separace, ačkoliv musíme brát na zřetel, že zahrnuje i komplexní instrumentaci s mnoha přepínacími ventily a pumpami kapalinové chromatografie. Nevýhodou je, že párování on - line **2D** kolon kapalinové chromatografie s reverzní fází s jedním hmotnostním detektorem není možné, pokud odpad ze dvou kolon musí být monitorován simultánně.

4.2 Závěr vyplývající ze spojení LC - GC

On - line **LC - GC** je velmi účinná technika, která během několika let byla úspěšně užívána s mnoha komplexními vzorky matrice. Citlivost této aplikace je mnohokrát vyšší než u tradičních metod, **LC - GC** metody jsou proto dobře využívány k aplikacím, které vyžadují malé množství vzorků. Před vlastní analýzou je požadováno předběžné určení vzorku.

On - line **LC - GC** je stále považována za náročnou metodu pro rutinní užití, avšak po optimalizaci může být systém automatizován a čas investovaný do optimalizace podmínek se rychle vrátí v podobě kratšího času analýzy, lepší opakovatelnosti a zlepšení detekčních limit.

4.3 Závěr úplné LC X GC

LC X GC je logické navýšení **LC-GC. LC-GC** dovoluje jenom detailní analýzu jedné skupiny analytů z komplexního vzorku,kdežto **LC X GC** je schopno detailně mapovat celý vzorek.

Vysoký stupeň orthogonality poskytuje velmi vysokou rozlišovací schopnost**. LC X GC** chromatogramy často ukazují stupňovité struktury, dovolují detailní cílenu analýzu sloučenin. Spojení s hmotnostní spektrometrií je snadné a rozšiřuje aplikační možnosti techniky.

4.4 2D gelová elektroforéza versus LC - LC a LC - CE

2D LC - LC a **LC - CE** jsou techniky **2D** v čase a stojí za to uvažovat také o technice **2D** v prostoru. Z **2D** technik v prostoru je známá např. **2D** polyakrylamidová elektroforéza **(2D-PAGE).** V současnosti, většina separací komplexních směsí proteinů bývá provedena užitím **2D - PAGE,** která byla jako první uveřejněna v roce 1975 O´Farrelem **(91).**

Při **2D - PAGE** jsou proteiny rozlišeny do jednotlivých bodů na gelovém sorbentu, tuto metodu lze také využít při dvou různých separačních mechanismech. Způsob separace je takový, že proteiny jsou separovány nejprve podle náboje cestou isoelektrické fokusace **(IEF)** a pak podle molekulové hmotnosti cestou dodecylsulfátu polyakrilamidové gelové elektroforézy **(SDS - PAGE).**

Díky vysokému rozlišení a orthogonální přirozenosti obou separačních mechanismů může být rozlišeno nejméně 2.000 proteinů v jednom vzorku **(92). 2D - PAGE** uspokojuje kriteria pro multidimenzionální separace. Přes tuto separační sílu má **2D - PAGE** určirá základní omezení. Je použitečná jenom pro proteiny a je laboratorně velmi intenzivně využívanou analýzou, ale obvykle požaduje alespoň dva dny na dokončení. Systémy nemusí být spojeny in nebo on-line módem k hmotnostnímu spektrometru **(MS),** ale je nutný další manuální zásah nebo komplexní robotické systémy v případě instrumentace **MS** analýzy.

Nevýhodou **2D - PAGE** je, že nemůže separovat všechny komponenty přítomné v daném vzorku např.proteiny, které jsou extrémně velké nebo hydrofobní nemusí vstupovat do gelu a také velmi kyselé nebo zásadité proteiny, které mohou být slabě rozpuštěny mohou dělat problémy při separaci a v neposlední řadě nedostatečné množství proteinů (analytů) našeho zájmu, způsobuje problémy při detekci. Pokud jsou proteiny pod detekčním limitem, užívá se techniky stříbrného barvení v **2D-PAGE (76).** Mnoho z omezení **2D - PAGE** nejsou sdíleny **2D** separačními metodami založenými na kapalinové chromatografii **(LC)** nebo kapilární elektroforéze **(CE).** Pokud je vybrán přiměřený separační mód, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza mohou separovat širší rozmezí biomolekul než **2D - PAGE** a zahrnují i biomolekuly velké, hydrofobní, kyselé nebo zásadité. V závislosti na užité detekční technice, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza může mít větší citlivost k analytům přítomným v malém množství než **2D - PAGE.**

Snad nejdůležitější je, že separační metody jako jsou kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza jsou instrumentálními technikami, které jsou schopné plné automatizace už při dávkování vzorku a rozlišení mezi dimenzemi, mohou být spojeny s různými detekčními metodami jako s **UV** absorbancí, laserově indukovanou fluorescencí nebo hmotnostní spektrometrií **(MS) (76).**

Na základě těchto výhod není překvapující, že se všeobecně pohlíží na **2D** kapalinovou chromatografii a příbuzné techniky jako na vysoce vhodnou alternativu k **2D - PAGE.** Výchozí výzvou pro separaci zůstává navrhnout **2D** separační metody a instrumentaci takovou, která může být srovnatelná či převyšující nevýhody **2D - PAGE** v rozlišovací síle, rychlosti a spolehlivosti.

4.5 Budoucí rozvoj multidimenzionálních separací

Nejen pro oblast výzkumu, ale i pro rozmanité a širokosáhlé multidimenzionální separace, je těžké předpovědět budoucí rozvoj v této oblasti pro delší období. Přesto jsou určité trendy evidentní a to i bez nových publikací. Většina nových publikací se totiž zaměřuje na otázku, kam bude hlavní úsilí výzkumu v tomto oboru soustředěno v bezprostřední budoucnosti.

Jednou z možností je vývoj separačních metod, které spojují více než dvě dimenze. Ačkoliv výzkum v této oblasti bývá velmi omezen díky komplexnosti požadované instrumentace, **3D** separace užívající **SEC – RPLC - CZE** systém již byl publikován **(93).**

Díky tomu, že jsou **2D** separace rychlejší a instrumentace více robustní, tak i spojení přídavných orthogonálních separačních metod má své výhody. Jejich spojením lze dosáhnout n -dimenzionálních separací a výsledkem n - dimenzionálních separací je další zvýšení píkové kapacity.

Spojení multidimenzionálních separací on - line s hmotnostní spektrometrií bude pravděpodobně v budoucnu samozřejmostí.

Hmotnostní spektrometrie poskytuje více informací než jakákoliv jiná detekční metoda schopná **LC - LC** nebo **LC - CE** separací. Schopnost reálně získat hmotnostní spektra separovaných částí je předpoklad hlavně pro každý **2D** systém, který je určený pro proteomický výzkum. Pokud je užito tandemového zapojení hmotnostního spektrometru **(MS - MS),** peptidy mohou být fragmentovany a informace o jejich sekvencích lze získat. Spojení **LC - LC** dává výhodu ve smyslu dramatického zrychlení oproti technikám jako je **2D – PAGE.**

Byl navržen i jiný trend, a to miniaturizace multidimenzionálních separačních metod. Nedávno, mnoho pozornosti bylo dáváno konceptu, který navrhoval převedení chemických analýz na velmi malé plochy užívané pro mikrofluidní zařízení tzv. laboratoře na čipu **(94).** Byly publikovány různé separační metody, které užívají mikročipy včetně kapilární electrochromatografie **(CEC) (95, 96, 97),** gelové elektroforézy **(98, 99, 100)** a micelární eletrokinetické chromatografie **(MEKC)**

2D separace užívající mikročipy jsou také známy. V jednom systému byla spojena kolona s reverzní fází kapilární kapalinové chromatografie s kapilární elektroforézou na čipu.Výsledkem tohoto spojení byla produkce hybridního off –čip / on - čip **2D s**eparační metody. Ramsey a kolegové publikovali jiný systém, ve kterém **MEKC** byla spojena s elektroforézou na jednom mikrofluidním zařízení pro **2D** separace na čipu.

Tyto laboratoře na čipu mají jednoznačné výhody ve srovnání s konvenčními **2D** metodami.Výhody jsou v malých rozměrech a také v rychlosti analýz. Multidimenzionální separace na čipu budou zřejmě hrát významnou roli v určitých separačních otázkách. Bez ohledu na specifický vývoj, který klade jasné požadavky na multidimenzionální separace, výzkum na poli multidimenzionálních zabírá značný prostor a separace jsou připraveny na podstatný další rozvoj. Nejsou zatím známa žádná základní omezení týkající se množství nebo typu separačních metod, které by nemohly být spojeny.

Stejně tak je možný i podstatný nárůst v separační síle. Ačkoliv mnoho **2D** separačních technik bývá vyvíjeno, v současnosti jsou tyto separační **2D** techniky zaměřeny na využití na poli proteomiky, neboť tento obor poskytuje mnoho různých typů vzorků.

V praxi je známo mnoho oblastí ve kterých je potřeba zlepšení instrumentace a tedy multidimenzionální separace se mohou stát rutinní spolehlivou technikou pro analýzu reálného vzorku.

4.6 Závěry pro spojení GC X GC

Dnes jsou principy a strategie **GC X GC** dobře srozumitelné. Vlastní instrumentace je komerčně dostupná, i když většinou vyžaduje zahrnutí hmotnostního spektrometru jako jednu ze základních součástí.

Využití je nesmírně široké, aplikace této metody je vyjádřena ve stovkách článků. Jasným závěrem je, že metoda **GC X GC** je hojně využívaná především ve výzkumu

4.7 Rozsah a budoucnost směrů

Existuje stále více výzkumů zabývajících se přemostěním mezer mezi **2D** separacemi a chemometrií. Hlavní oblastí zájmu takových přemostění bývá většinou potenciální setkání některých těchto výzev s posuny na chemometrickém poli. Výsledkem těchto spojení je vývoj nových algoritmů. Nejnovější, nejzajímavější nový vývoj dokázal, že lze dosáhnout významného kvalitativního i kvantitativního poznání vzorku pomocí **2D** separací s **MS** detekcí. Množství informací vycházejících z těchto **2D** separací je obrovské a realizování těchto analýz ve spojení s chemometrickými metodami bude přinášet komplexní informace s žádoucí efektivitou.

4.8 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo na základě studia literatury vytvořit přehled multidimenzionalnich metod používaných v analýzách biologicky aktivních látek obsazených v komplexních matricích.

5.SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(NP) LC – GC - spojení kapalinové chromatografie s normální fází s plynovou chromatografií

(NP)LC – kapalinová chromatografie s normální fází

„off – line“ – nepřímé spojení

„on – line“ – přímé spojení

^{15}N – izotop dusíku

1D – jednodimenzionální – reprezentovaná pouze jednou veličinou

1D GC – jednodimenzionální plynová chromatografie

1D LC – jednodimenzionální kapalinová chromatografie

2D – dvoudimenzionální – reprezentované dvěma veličinami

2D – PAGE – dvojdimenzionální polyakrylamidová gelová elektroforéza

2D GC X GC – dvojdimenzionální metoda spojující dvě plynové chromatografie

2D-PAGE – dvoudimenzionální polyakrylamidová gelová elektroforéza

2D-Rs – dvojdimenzionální chromatografické řešení

AED – atomic emission detection – atomově emisní detekce

ANOVA – analýza rozptylu

CEC - Capillary ElectroChromatography - kapilární elektrochromatografie

CEPG - chromatoelektroforeogram

CGE - Capillary Gel Electrophoresis - kapilární gelová elektroforéza

CIEF - Capillary IsoElectric Focusing - kapilární isoelektrická fokusace

CZE - Capillary Zone Electrophoresis - kapilární zónová elektroforéza

CZE - Capillary Zone Electrophoresis – kapilární zónová elektroforéza

DAGs – diglyceridy

E.coli – Escherichia coli

ECD - elektron – capture detection – detektor elektronového záchytu

FAMEs – methylester mastných kyselin

FID – flame ion detection – plamenově iontová detekce

FSCE - Free Solution Capillary Electrophoresis - kapilární elektroforéza ve volném roztoku

GC - Gas Chromatography - plynová chromatografie

GC – MS – spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem

GC X GC – multidimenzionální metoda spojující dvě plynové chromatografie

GLC – Gas- Liquid Chromatography – chromatografie, ve které jsou dvě fáze: plynná, kapalná

GPC – Gel Permeation Chromatography – gelově permeační chromatografie

GRAM - vyhlazovací metoda

GSC – Gas – Solid Chromatography – chromatografie, ve které jsou dvě fáze: plynná, pevná

H – C - heart – cutting -multidimenzionální metoda, ve které dochází k výběru různých frakcí z původního vzorku

HC techniky – Hyphenated – oddělené, zkrácené pomlčkou

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography – vysokotlaká kapalinová chromatografie

IEC – Ion – Exchange Chromatography – iontově výměnná chromatografie

IEC-RPLC - iontově výměnný mód s módem reverzní fáze

LC – CE – spojení kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy

LC – GC - spojení kapalinové chromatografie s plynovou chromatografií

LC – LC – spojení dvou kapalinových chromatografií

LC - Liquid Chromatography - kapalinová chromatografie

LC X CE - úplná (multidimenzionální) metoda spojující kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu

LC X GC – úplná (multidimenzionální) metoda spojující kapalinovou chromatografii a plynovou chromatografii

LLC – Liquid – Liquid Chromatography – rozdělovací kapalinová chromatografie

LODs – limit of detection - zlepšení mezí detekce

LSC – Liquid – Solid Chromatography – adsorpční kapalinová chromatografie

MECC - Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography - micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

Mikro - ECD – mikro – elektron – capture detection – mikrodektor elektronového záchytu

MS – MS – spojení dvou hmotnostních spektrometrů

Mud PIT - multidimenzionální protein identifikační technologie

NPC - Normal - Phase Chromatography - chromatografii na normálních fázích

NPC-RPLC - normálního módu s reverzní fázi

OCEC - open chanel electrochromatografy – otevření elektrochromatografického kanálu

OH – TAGs – hydroxytri – (acyl) glyceroly

PAHs – polyaromatické hydroxy kyseliny

PC - Paper Chromatography - papírová chromatografie

PCA - trojcestná principiální komponentová analýza

PCBs – polychlorované bifenyly

pH – záporný log koncentrace vodíkových iontů

pI – izoelektrický bod

PLS – metoda využívající nejmenší druhou mocninu

RAM – materiál s omezeným přístupem

RPC - chromatografie na obrácených fázích - Reversed - Phase Chromatography

RPLC – CE - spojení kapalinové chromatografie s reverzní fází a kapilární elektroforézy

RPLC – GC – spojení kapalinové chromatografie s reverzní fází a plynové chromatografie

RPLC – SEC - mód reverzní fáze s gelovou chromatografií, iontově výměnnou

Rs - chromatografické rozlišení

S. cerevisiae – Saccharomyces cerevisiae – kvasinka pivní

SCX - silný kationtový měnič

SDS - Sodium Dodecyl Sulphate - dodecylsíranu sodného

SEC – RPLC – CZE – spojení gelové chromatografie, kapalinové chromatografie s reverzní fází a kapilární zónovou elektroforézou

SEC - Size Exclusion Chromatography – gelová chromatografie

SEC - RPLC - mód gelové chromatografie s módem reverzní fáze

SFE – LC – GC – MS - spojení nadkritické fluidní extrakce, kapalinové chromatografie, plynové chromatografie a hmotnostního spektrometru

SFE – NPLC – GC – MS – spojení nadkritické fluidní extrakce, kapalinové chromatografie s normální fází, plynové chromatografie a hmotnostního spektrometru

TAGs – tri - (acyl) glyceroly

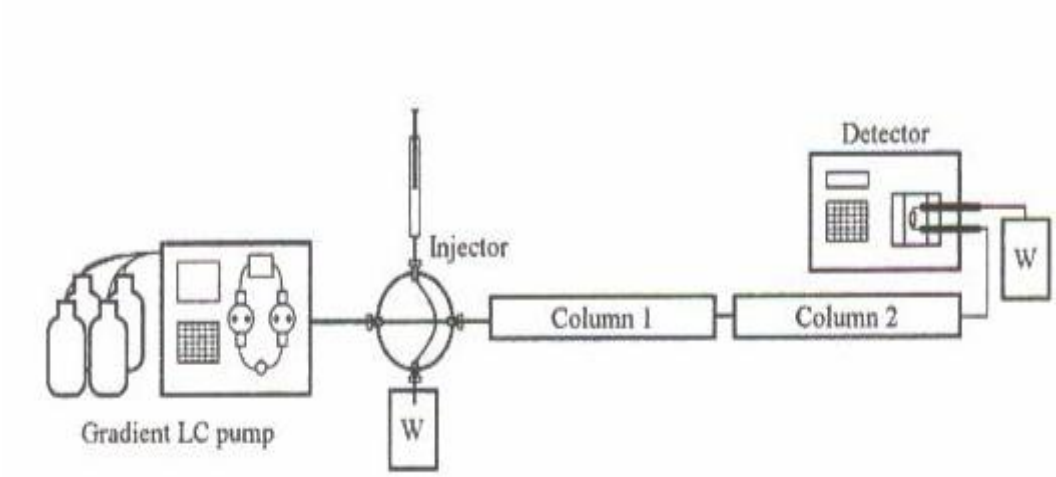
TLC - Thin Layer Chromatography - tenkovrstvá chromatografie

TLC X TLC - úplná (multidimenzionální) metoda spojující dvě kapalinové chromatografie na tenké vrstvě

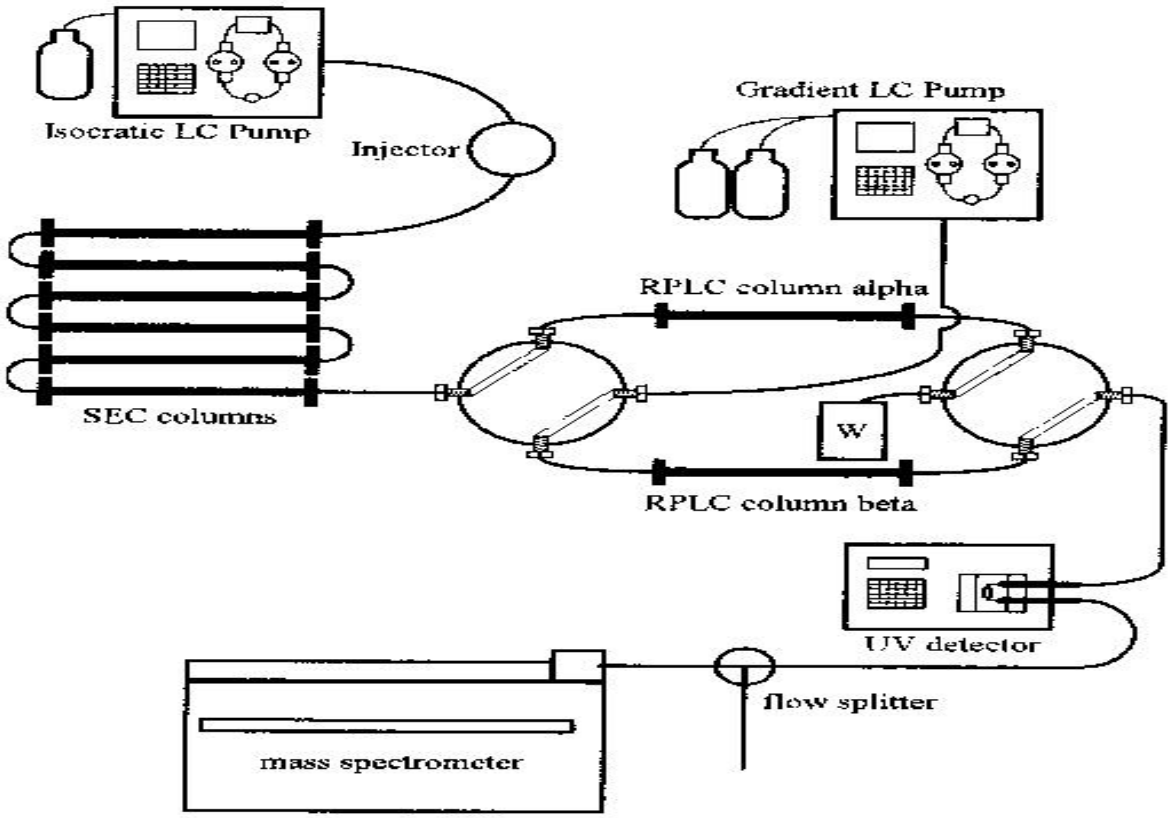
TOF MS - Time of flight – MS detektor

UV – ultra violet - ultrafialový

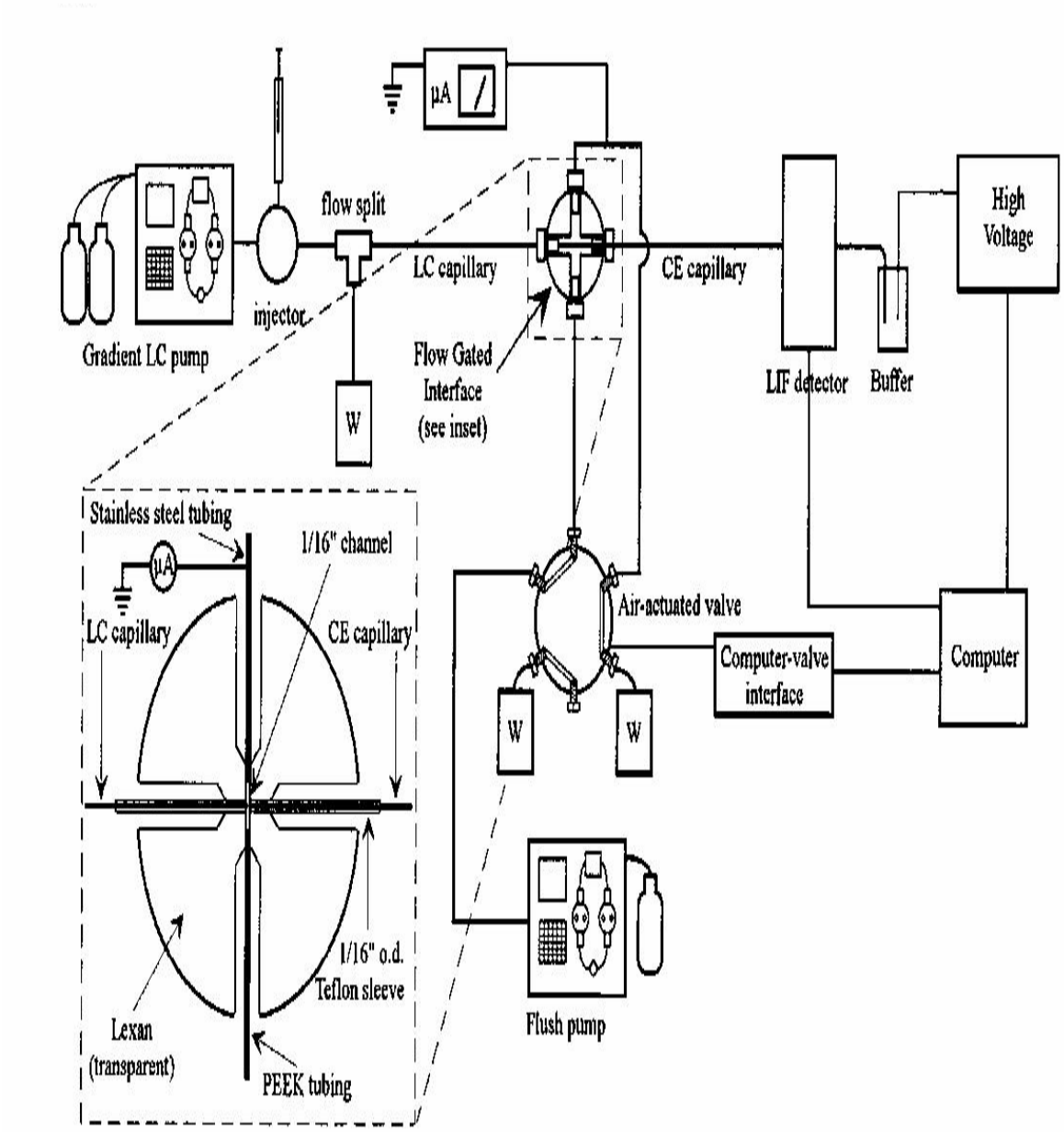
6. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA



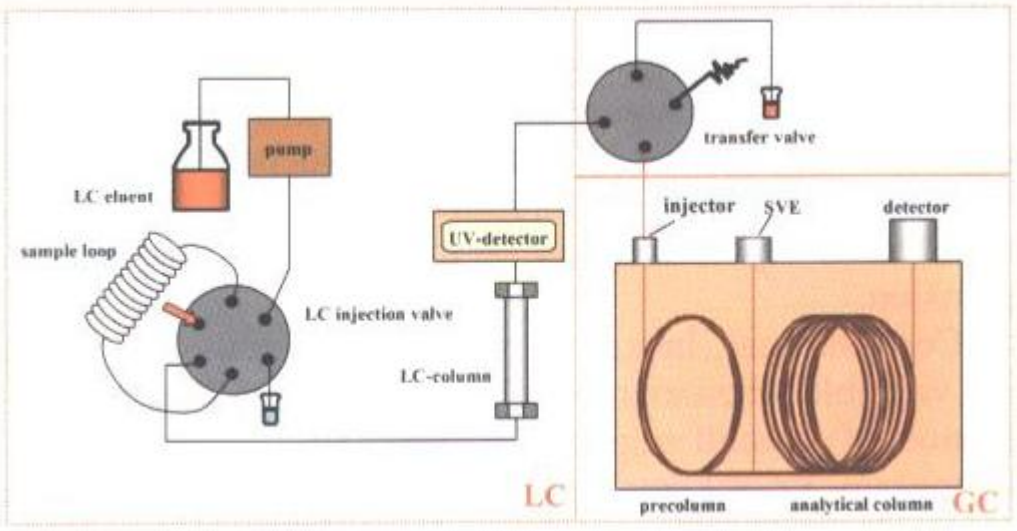
OBR. 1 Schématické znázornění přímo spojených kolon **2D – LC** zapojení. Kolona 1 a 2 představují dvě rozdílné, orthogonální separační módy.



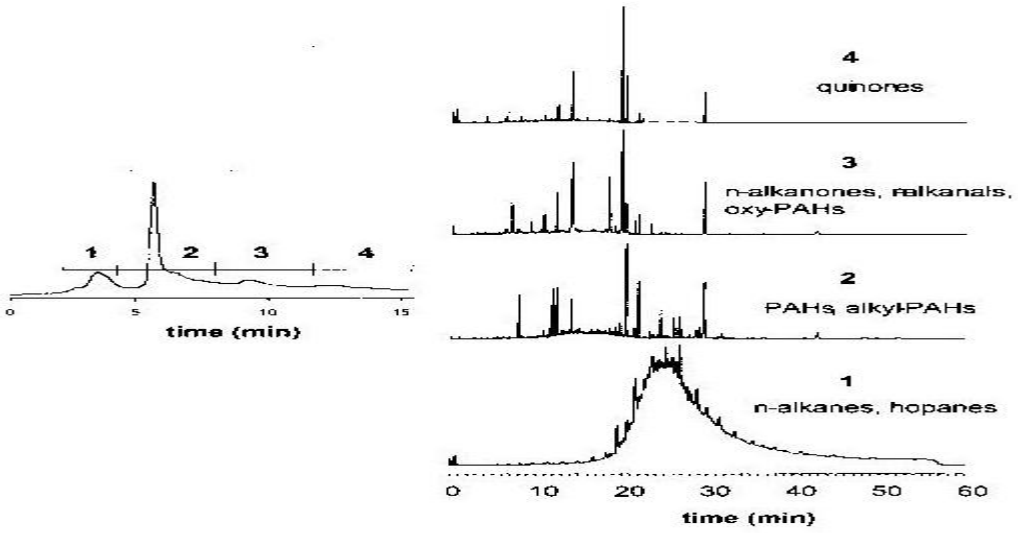
OBR. 2 Schematické znázornění **2D SEC – RPLC** zažízení s on – line **MS** detekcí. Dva čtyřcestné ventily jsou souběžně přepínány.



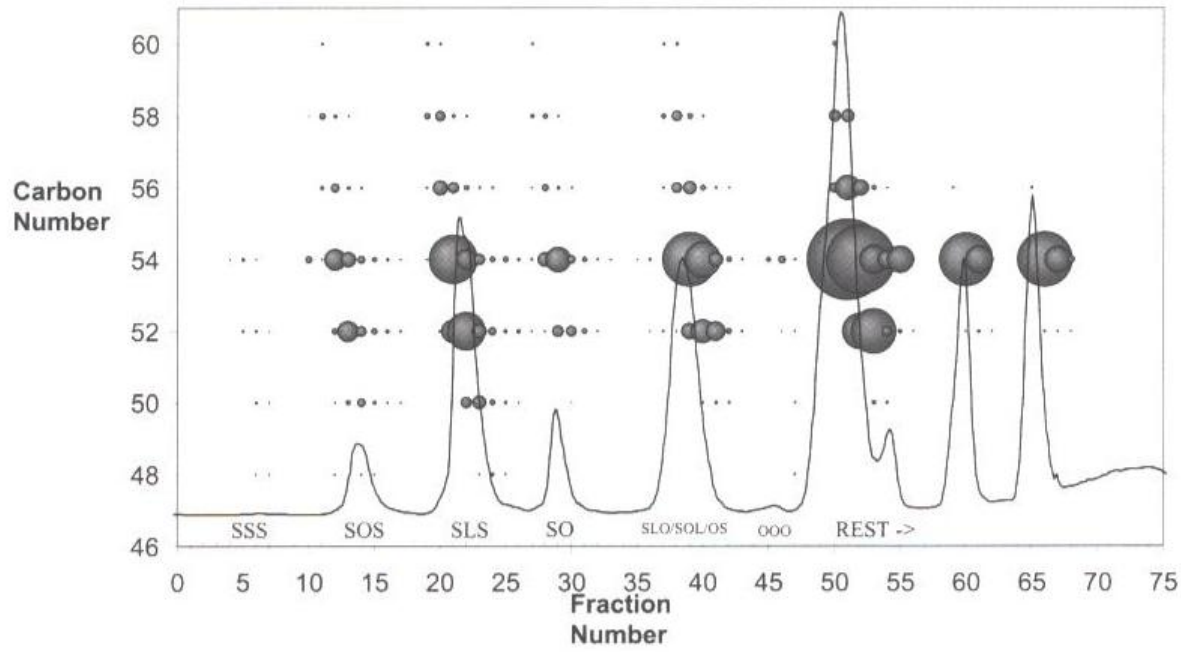
OBR. 3 Schématické znázornění **LC – CE** zařízení založené na „transverse flow – gated“ rozhraní.



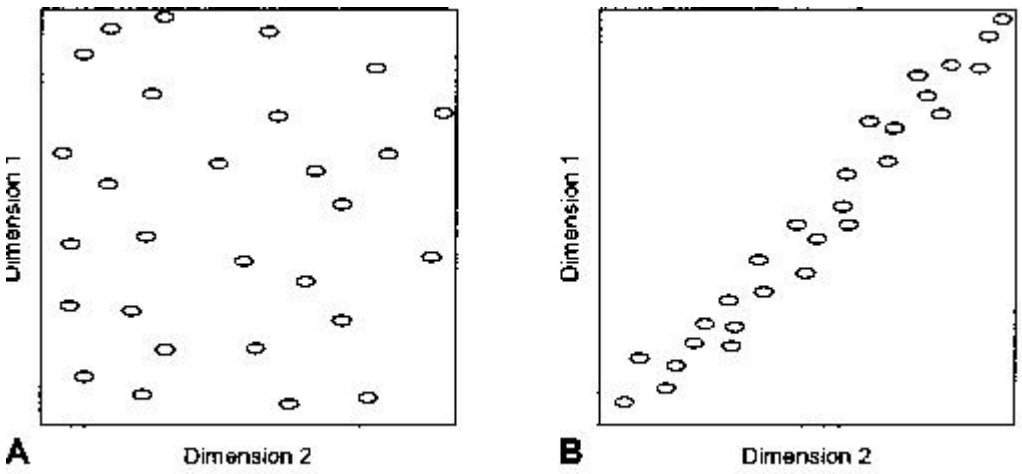
OBR. 4 Typické **LC – GC** zapojení



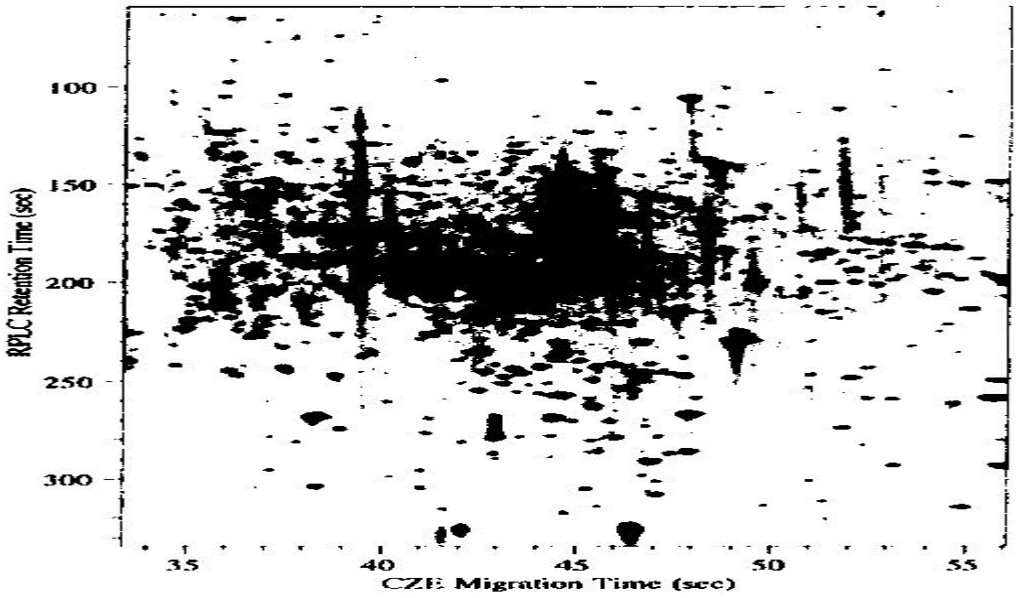
OBR. 5 On – line spojení **SFE – LC – GC – MS** analyzující částice aerosolu. Vlevo, **SFE** extrakce a **LC** rozdělení extraktů. Vpravo, **GC – MS** separace čtyř **LC** frakcí. Pozn. **GC – MS** chromatogramy nejsou ve stejném měřítku, měřítko v chromatogramu n – alkanů je desetkrát menší než v ostatních chromatogramech.



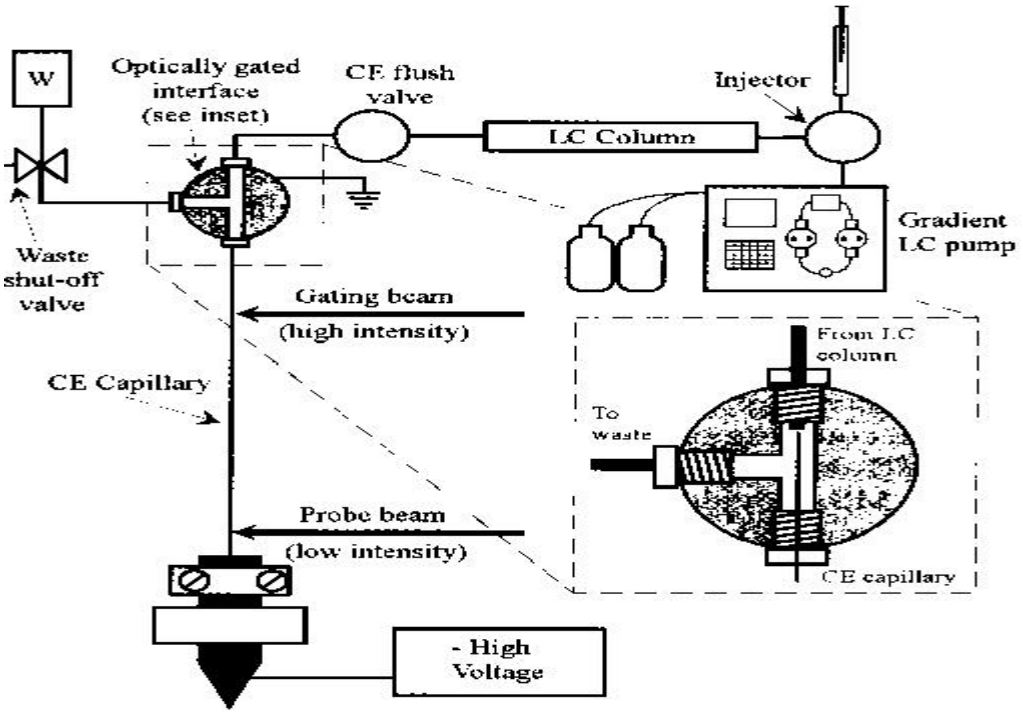
OBR. 6 Off – line úplná stříbrná fáze **LC X GC – FID** separace směsi stolního oleje.



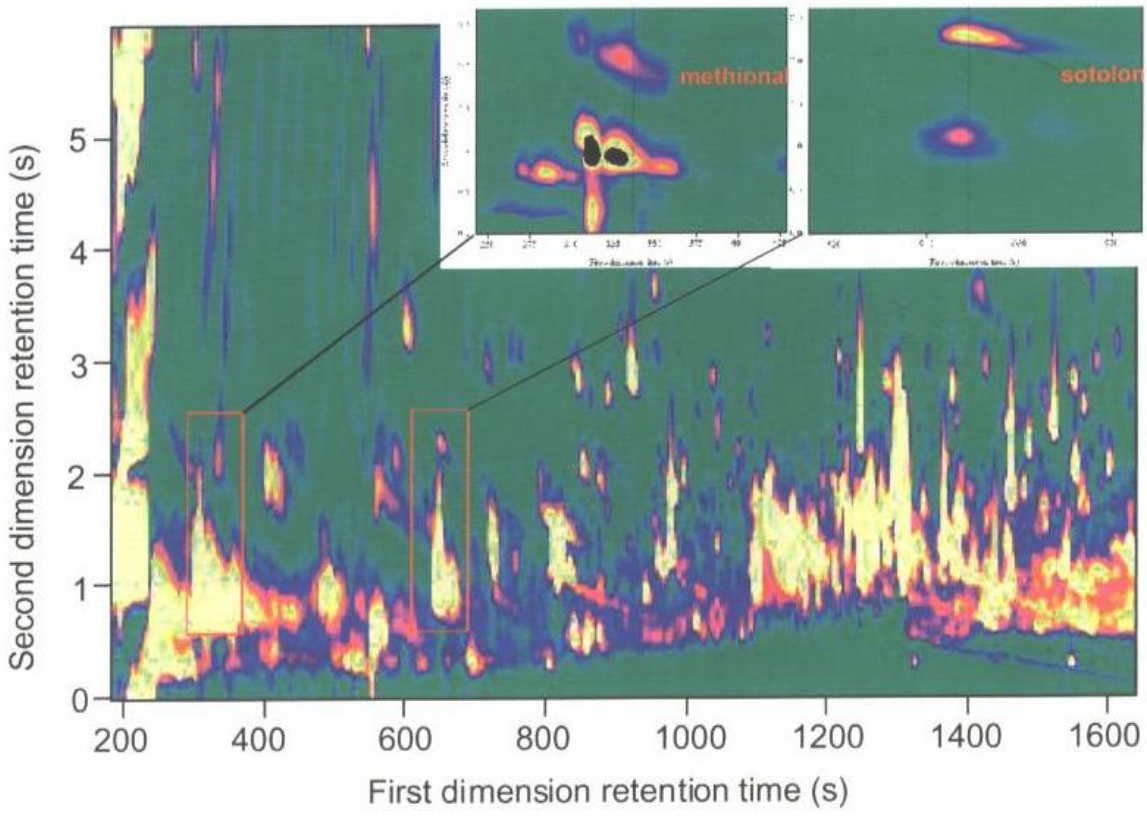
OBR. 7 Hypotetická orthogonální (A) a neorhtogonální (B) 2D separace



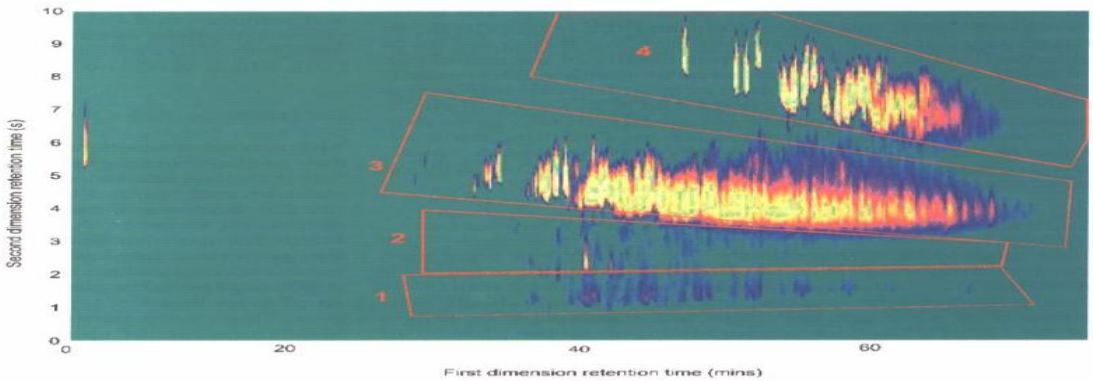
OBR. 8 2D chromatoelektroforeogram z mikro – **RPLC – CZE** separace **FITC –** značené lidské moče.



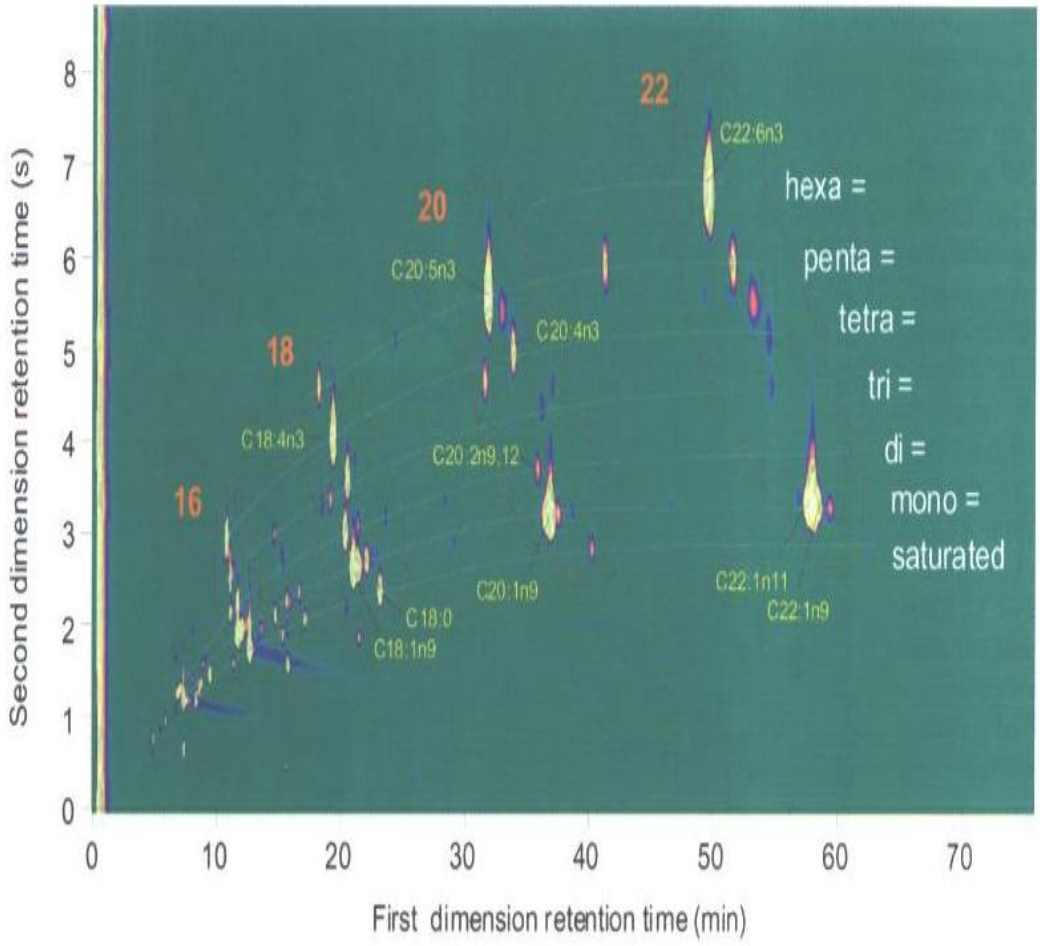
OBR. 9 Schématické znázornění „optical gated“ **2D – RPLC** – rychlého **CZE** systému.



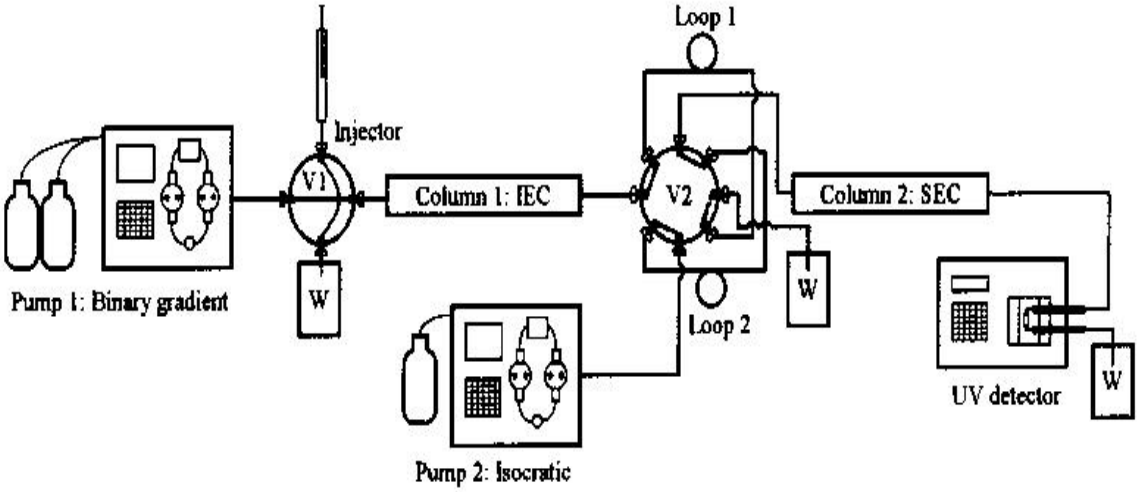
OBR. 10 Aktuální úplný iontový plot GC X GC – TOF MS extraktu.



OBR.11 Barevný plot **GC X GC – SCD** separace sloučenin obsahujících síru ve vzorku nafty. Skupiny obsahující polygony jsou: merkaptány (**1**), sulfidy, thiofeny (**2**), benzothiofeny (**3**), dibenzothiofeny (**4**). Podmínky pro **GC**: první kolona: 30 cm, 0,25 mm **I. D**.,1 μm **SBP5,** druhá kolona: 3m, 0,25 mm **I. D.,** 0,25 μm **BPX 50.** Teplotní program: 60 ^{0}C, 3 ^{0}C / min do 300 ^{0}C. Dávkování 0,2 μL při 300 ^{0}C, rozdělení 1:100. Modulátor: duální - kryogenetický, duální – vstřikování za horka, modulační čas 10 s. **SCD** detekce. Rozlišení dat při 100 Hz.



OBR. 12 Barevný plot **GC X GC – FID** separace tuku ze sleďe. Plot jasně ukazuje klastry sloučenin se stejným počtem atomů uhlíku (červené polygony) – **C_{16}** až **C_{22}** a seřazení klastrů sloučenin se stejným počtem dvojných vazeb (bílé polygony) od nasycených sloučenin po sloučeniny, které mají šest dvojných vazeb. Podmínky pro **GC**: první kolona:9,0 m, 0,2 mm **I. D.,** 0,33 μm **HP – 1,** druhá kolona: 0,3 m, 0,1 mm **I. D.,** 0,2 mm **CP – WAX – 52** (polyethylenglycol), modulace kapiláry 8,2 cm, 0,1 mm, 0,5 μm dimethylpolysiloxan. Teplota: hlavní pec, 100 ^{0}C, 2 min., 30 ^{0}C / min po 160 ^{0}C, 0,5 ^{0}C / min po 250 ^{0}C, druhá pec, 180 ^{0}C, 2 min. 0,75 ^{0}C / min po 280 ^{0}C. Dávkování: 1,0 μL při 300 ^{0}C, rozdělení 1:50. „Sweeper“ modulátor, teplota pece +100 ^{0}C, rychlost 0,15 rev / s, 0,5 s pauza na konci, modulační čas 5,0 s.Rychlost přenosu dat 100 Hz.



OBR. 13 Schématické znázornění **2D IEC – SEC** zařízení.

Analyte	Sample
Petrochemical products	
Hydrocarbon (group) type	Gasoline, kerosene, diesel, fire debris, C_9 olefins
Biomarkers	Crude oil
Oxygenates	Gasoline
S-containing compounds	Diesel, gas oil, kerosene
Alkylphenols	Industrial phenol additive
Flavours and fragrances	Tea, lavender, oregano, bergamot, ginger, ginseng, tea tree, peppermint, brunch extract, sour creams, garlic
PCBs, toxaphene	Standards, enantiomers, cod liver, technical mixtures
Pesticides	Surface water, fruits and vegetables
FAMEs	Fish, vegetable oils, mussels
PAHs	Soil, sediment, fly ash
VOCs, aromatics, oxygenates	Air
Biological samples	
Racing drugs	Horse/dog urine
Sterols	Faeces
PCBs, dioxins, pesticides	Serum, urine
Wound-induced plant volatiles	Leaves
Constituents	Cigarette smoke
Polyphenols	Wine

Tab. 1 Vybrané aplikace **GC X GC**

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Pavel Klouda (2003) Moderní analytické metody :25 – 30

2. Giddings JC (1987) J High Res Chromatogr 10:319 - 323

3. Wehr T (2002) LC GC N Am 20:954 - 957

4. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morfia DR, Barvil BM, Electrophoresis 14:439 – 447, Electrophoresis 23: 2949 - 2962

5. Washburn MP, Wolters DA, Yates JR III (2001) Nat Biotechnik 19:242 - 247

6. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR III (2001) Anal Chem 73:5683 - 5690

7. Washburn MP, Ulaszek R, Deciu C, Schieltz DM, Yates JR III (2002) Anal Biochem 258:349 - 361

8. McDonald WH, Ohi R,Miyamoto DT, Mitchison TJ, Yates JR III (2002) Science 261:895 - 897

9. Wu CC, Mac Coss MJ, Howell KE, Yates JR III (2003) Nat Biotechnik 21:

10. Washburn MP, Ulaszek R, Yates JR III (2003) Anal Chem 75:5054 - 5061

11. Pavel Klouda (2003) Moderní analytické metody :10

12. Pavel Klouda (2003) Moderní analytické metody :45

13. Mondello L, Dugo P, Dugo G,Lewis AC, Bartle KD (1999) J Chromatogr A 842: 373 – 39

14. Wang S, Zhang X (2001) LC GC N Am 19:200 - 213

15. Grob K (1991) On - line coupled LC - GC, Hűthig, Heidelberg J Chromatogr A 965:207 – 21, 970:225 – 234

16. Yates JR III (1999) Nat Biotechnik 17:676 – 682

17. Hyötyläinen T, Riekkola M-L (1998) J Chromatogr A 819:13 - 24

18. Grob K, Lanfranci M, Mariani C (1989) J Chromatogr A 471:397 – 405

19. Grob K (2000) J Chromatogr 892:407 – 420, Marko - Varga G (2000) J Chromatogr A 893:293-305

20. Hyőtyläinen T, Riekkola M-L (2003) J Chromatogr A 1000:357 – 384

21. de Geus H - J, Aidos I, de Boer J, Luten JB, Brinkman UATh (2001) Anal Chem Acta 444:193 - 203

22. Beens J, Blomberg J, Schoenmakers PJ (2000) J High Res Chromatogr 22:514

23. Frysinger GS, Gaines RB (2001) J Sep Sci 24:87 – 96, Marko - Varga G (2000) J High Res Chromatogr 23:259 – 265

24. Pavel Klouda (2003) Moderní analytické metody :51

25. Janssen H-G, Boers W, Steenbergen H, Horsten R, Flöter E (2003) Chromatogr A 910:95 - 103

26. Bushey MM, Jorgenson JW (1990) Anal Chem 62:161

27. Dallüge J, Beens J, Brinkman UATh (2003) J Chromatogr A 1000:69 - 108

28. Wang FC-Y, Robbins WK, Di Hanzo FP, McElroy FC (2003) J Chromatogr A 965:207 - 217

29. Shellie R, Mondello L, Marriott PJ, Dugo G (2002) J Chromatogr A 970:225 - 234

30. Korytár P, Leonards PE, de Boer J, Brinkman UATh (2002) J Chromatogr A 958:203 – 218

31. Dallüge J, van Rijn M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UATh (2002) J Chromatogr A 1000:385

32. Davis JM, Giddings JC (1985) Anal Chem 57:2168 - 2177

33. Davis JM, Giddings JC (1985) Anal Chem 57:2178 – 2182

34. Giddings JC (1984) Anal Chem 56:1258A - 1270A

35. Liu Z, Lee ML (2000) J Microcolumn Sep 12:241 - 254

36. Grob K (2000) J Chromatogr A 892:407

37. Zhang X, Hu H-1, Xu S, Yang X,Zhang J (2001) Sep Sci 24:385 - 391

38. Larmann JP Jr, Lemmo AV, Moore AW Jr, Jorgenson JW (1993)

39. Lemmo AV, Jorgenson JW (1993) Anal Chem 65:1576 - 1581

40. Lemmo AV, Jorgenson JW (1993) J Chromatogr 633:213 – 220

41. Jeffery DJ, Hooker TF, Jorgenson JW (1997) J Chromatogr A 1000:385

42. Bushey MM, Jorgenson JW (1990) Anal Chem 62:978 - 984

43. Bushey MM, Jorgenson JW (1990) J Microcolumn Sep2:293 - 299

44. Quigley WWC, Fraga CG, Synovec RE (2000) J Microcolumn Sep 12:160

45. Reiter B, Lechner M, Lorbeer E, Aichholz R (1999)

46. Lewis KC, Opiteck GJ, Jorgenson JW, Sheeley DM (1997)

47. Stahl M, Jakob A, von Brocke A, Nicholson G, Bayer E (2002)

48. Beens J, Blomberg J, Schoenmakers PJ (2000) J High Resolu Chromatogr 23:

49. Frysinger GS, Gaines RB (2001) J Sep Sci 24:87- 96

50. Shellie R, Mondello L, Marriott PJ, Dugo G (2002) J Chromatogr A

51. Adahchour M, van Stee LLP, Beens J, Vreuls RJJ, Batanberg MA, Brinkman UATh (2003) J Chromatogr A 1019 (1 – 2):157 – 172

52. Korytár P, Leonards PE, de Boer J, Brinkman UATh (2002) J Chromatogr

53. Dallüge J, van Rijn M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UATh (2002)

54. de Geus H-J, Aidos I, de Boer J, Luten JB, Brinkman UATh (2001)

55. Brinkman UATh (2002) J Chromatogr A 974:169 - 184

56. Wang FC - Y, Robbins WK, Di Hanzo FP, McElroy FC (2003) J Chromatogr

57. Giddings JC (1984) Anal Chem 56:1258A - 1270A

58. Giddings JC (1987) J High Resolut Chromatogr 10:319 - 323

59. Guiochon G, Gonnord MF, Siouffi A, Zakaria M (1982) J Chromatogr 250:1 – 20

60. Holland LA, Jorgenson JW (2000) J Microcolumn Sep 12:371 - 377

61. Moore AW Jr, Jorgenson JW (1995) Anal Chem 67:3448 - 3455

62. Michels DA, Hu S, Schoenherr RM, Eggertson MJ, Dovichi NJ (2002)

63. Quigley WWC, Fraga CG, Synovec RE (2000) J Microcolumn Sep 12:160 - 166

64. Ledford EB Jr, Phillips JB, Xu J, Gaines RB, Blomberg J (1996) Am Lab 28 : 22 – 25

65. Dallüge J, Beens J, Brinkman UATh (2003) J Chromatogr A 1000:69 - 108

66. Harris RA,Yang A, Stein RC,Lucy K, Brusten L, Herath A, Parekh R, Anal Chem 74:809 – 820, Anal Chem 74:1650 - 1657

67. Shoenmakers P, Marriott PJ, Beens J (2003) LC-GC Eur 16:335 – 338

68. Wold S (1995) Chemom Intell Lab Syst 30:109 - 115

69. Faber K, Lober A, Kowalski BR (1997) J Chemom 11:419 - 461

70. Books KS, Kowalski BR (1994) Anal Chem 66:782A - 791A

71. Lorber A, Faber K, Kowalski BR (1996) J Chemom 10:215 - 220

72. Fraga CG, Bruckner CA, Synovec RE (2001) Anal Chem 73:675 - 683

73. Sinha AE, Fraga CG, Prazen BJ, Synovec RE (2004) J Chromatogr A 1027:

74. Prazen BJ, Bruckner CA, Synovec RE, Kowalski BR (1999)

75. Prazen BJ, Johnson KJ, Weber A, Synovec RE (2001) Anal Chem 73:5677 - 5682

76. Marengo E, Leardi R, Robotti E, Righetti Pg, Antonucci F, Cecconi D (2003)

77. Johnson KJ, Synovec RE (2002) Chemom Intell Lab Syst 60:225 – 237 techniques and applications, Marcel Dekker, New York

78. Holland LA, Jorgenson JW (1995) Anal Chem 67:3275 – 3283

79. Opiteck GJ, Lewis KC, Jorgenson JW, Anderegg RJ (1997) Anal Chem 69

80. Wagner K, Racaityte K, Unger KK, Miliotis T, Edholm LE, Bischoff R,

81. Unger KK, Racaityte K, Wagner K, Miliotis T, Edholm LE, Bischoff R,

82. Holland LA, Jorgenson JW (2000) J Microcolumn Sep 12:371 - 377

83. Wagner K, Miliotis T, Marko-Varga G, Bischoff R, Unger KK (2002)
Two - dimensional liquid chromatography-capillary electrophoresis

84. Haefliger OP (2003) Anal Chem 75:371 - 378

85. Cortes HJ (1990) Multidimensional chromatography

86. Opiteck GJ, Jorgenson JW, Anderegg RJ (1997) Anal Chem 69:2283 - 2291

87. Opiteck GJ, Jorgenson JW, Moseley MA III, Anderegg RJ (1998)

88. Opiteck GJ, Ramirez SM, Jorgenson JW, Moseley MA III (1998)

89. Stroink T, Wiese G, Lingeman H, Bult A, Underberg WJM (2001)

90. Bushey MM, Jorgenson JW (1990) Anal Chem 62:161 - 167

91. Murahashi T (2003) Analyst 128:611 - 615

92. O´Farrell PH (1975) J Biol Chem 250:4007 - 4021

93. Wehr T (2001) LC GC N AM 19:702 - 711

94. Moore AW, Jorgenson JW (1995) Anal Chem 67:3456 - 3463

95. de Mello AJ (2002) Anal Bioanal Chem 372:12 - 13

96. Effenhauser CS, Manz A, Widmer HM (1993) Anal Chem 65:2637 – 3642
(2002) Proteomics 2:212 – 223

97. Harrison DJ, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effenhauser CS, Manz A (1993)

98. Jacobson SC, Hergenroder R, Koutny LB, Warmack RJ, Ramsey JM (1994)
182 – 18 Int J Mass Spectrom 219:245 - 251

99. Effenhauser CS, Paulus A, Manz A, Widmer HM (1994) Anal Chem 66

100. Jacobson SC, Ramsey JM (1996) Anal Chem 68:720 - 723