

HISTORIE, SOUČASNOST A PERSPEKTIVY ANALYTICKÝCH SEPARAČNÍCH METOD NA KATEDŘE ANALYTICKÉ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

JANA SOBOTNÍKOVÁ, ZUZANA BOSÁKOVÁ,
RADOMÍR ČABALA, PAVEL COUFAL, VĚRA
PACÁKOVÁ a KAREL ŠTULÍK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, <http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/o-katedre>; suchan@natur.cuni.cz

Došlo 5.8.10, přijato 8.9.10.

Klíčová slova: separační metody, analytická chemie, separační potenciál, aplikační možnosti

Obsah

1. Úvod
2. Historie a současnost separačních metod na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze
 - 2.1. Plynová chromatografie
 - 2.2. Kapalinová chromatografie
 - 2.3. Elektromigrační metody a miniaturizované separační metody
3. Závěr

1. Úvod

Separční metody mají své nezastupitelné místo v analytické chemii, kde slouží především k oddělení složky našeho zájmu od doprovodných látek a k její následné identifikaci. Separční metody lze také využít pro kvantifikaci, tedy určení množství studované látky ve vzorku, a v neposlední řadě pro studium fyzikálně-chemických, někdy i biologických, vlastností látek. Se separačními metodami se zdaleka nesetkáváme jen v oblasti analytické chemie, o čemž svědčí moderní a prudce se rozvíjející oblast bioanalytického a biomedicínského výzkumu, ale i tradiční oblasti využití separačních metod, jako je např. farmaceutický či potravinářský průmysl. Separční metody nacházejí uplatnění i v oblasti tak specifické, jakou je forenzní věda – analýza pro kriminalistické účely.

Mezi separační (dělicí) metody můžeme zařadit procesy jako filtrace, dekantace či srážení, ale především do separačních metod řadíme metody chromatografické, jejichž objev je připisován ruskému botanikovi M. S. Cvětovi, který v roce 1903 provedl dělení listových barviv, chlorofylů a karotenoidů, na sloupci sorbentu uhlí-

čitanu vápenatého a jako mobilní fázi použil směs organických rozpouštědel^{1,2}. V téže době rozdělil D. T. Day^{3–5} také na sloupci sorbentu některé složky ropy. V roce 1952 získali Nobelovu cenu za práci v oboru chromatografie A. J. P. Martin a R. L. M. Synge. Principem chromatografických metod je dělení analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž jedna je nepohyblivá, tedy stacionární, a druhá proudí, je tedy mobilní. Dělení je založeno na rozdílné afinitě složek ve směsi k mobilní a stacionární fázi. Chromatografii rozdělujeme podle uložení stacionární fáze na sloupcovou, papírovou a tenkovrstvou chromatografii. Podle použité mobilní fáze dělíme chromatografii na plynovou, kapalinovou a fluidní. V chromatografické praxi je nejčastěji využíváno kolonové neboli sloupcové uspořádání a pokud je mobilní fázi plyn, hovoříme o plynové chromatografii, v případě kapalně mobilní fáze hovoříme o kapalinové chromatografii. Ačkoli byla plynová chromatografie navržena podstatně později a lze ji využít k dělení užšího okruhu látek, její rozvoj byl velmi bouřlivý oproti chromatografii kapalinové. Plynovou chromatografii lze separovat látky plynné nebo ty, které lze definovaně převést v plyn. Po objevení rozdělovací chromatografie (stacionární fáze je kapalina) na počátku čtyřicátých let 20. století se kolonová kapalinová chromatografie začala rozvíjet do své dnešní podoby. Mezi důvody pomalejšího rozvoje kapalinové chromatografie patří mnohem složitější mechanismus separačního děje v kapalně mobilní fázi oproti fázi plynné, a především nutnost vhodné aparatury, která by zaručila dostatečně rychlou a účinnou analýzu. V počátcích kapalinové chromatografie byl pohyb mobilní fáze zprostředkován pouze gravitační silou a používané stacionární fáze nebyly dostatečně účinné. Se zmenšením částic stacionární fáze a použitím bezpulzních vysokotlakých čerpadel pro pohyb mobilní fáze kolonou, se vyvinula současná podoba kapalinové chromatografie nazývaná HPLC (vysokotlaká neboli high pressure, vysokoúčinná či-li high performance nebo v nadsázce velmi drahá – high-priced liquid chromatography).

2. Historie a současnost separačních metod na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (PřF UK) je nejstarší katedrou analytické chemie v České republice, vznikla v roce 1925, ale její počátky sahají až do roku 1842. Z historického hlediska je Katedra analytické chemie pracovištěm s dlouholetou a světoznámou elektrochemickou tradicí. Toto jednoznačně zaměření Katedry analytické chemie se začalo měnit v 50. letech minulého století, kdy se začaly

objevovat publikace z tehdy nově vznikajícího oboru plynové chromatografie, kterou na katedře začali rozvíjet E. Smolková-Keulemansová a L. Feltl. Od tohoto okamžiku se Katedra analytické chemie PĚF UK dostala do povědomí naší i světové odborné veřejnosti i jako pracoviště s dobrou chromatografickou pověstí. E. Smolková a L. Feltl, společně se svými nejbližšími spolupracovníky postupem času rozšířili své pole působnosti z oblasti plynové chromatografie i na chromatografii kapalinovou a později i na oblast elektromigračních metod. V laboratoři E. Smolkové vznikl nápad na využití tvorby inkluzních sloučenin při separaci plynovou chromatografií. Jednalo se o využití především cyklodextrinů, a to jak v chromatografii plynové, tak později v chromatografii kapalinové a i v elektromigračních metodách, které byly v té době v začátcích vývoje. V současné době patří cyklodextrinové stacionární fáze k nejprodávanejším komerčně dostupným fázím a poskytují velice účinné separace enantiomerů chirálních látek.

Následovnici E. Smolkové a L. Feltla se intenzivně věnovali a věnují nejen pedagogické činnosti, ale samozřejmě také činnosti vědecké v oblasti separačních metod. V současnosti je na Katedře analytické chemie PĚF UK početný pracovní tým separačních metod čítající profesory, docenty, odborné asistenty, vědecké pracovníky a především posluchače doktorských, magisterských a bakalářských studijních programů. Tým separačních metod spolupracuje při řešení projektů také s jinými pracovišti v rámci Přírodovědecké fakulty, s pracovišti Akademie věd České republiky, ale také s mnoha zahraničními pracovišti. V nedávné době byl tým separačních metod úspěšný v rámci grantového projektu EAA grants „Innovation of Laboratories of Advanced Separation Methods for Purposes of Whole-Life Education“ (tzv. Norské finanční mechanismy), který umožnil zakoupení tří špičkových přístrojů z oblasti plynové chromatografie, kapalinové chromatografie, kapilární elektroforézy a spojení těchto separačních technik s hmotnostní spektrometrií. Výzkumné zaměření separačního týmu je značně široké, od plynové chromatografie přes chromatografii kapalinovou a mikrokapalinovou až po elektromigrační metody. Zmiňované metody jsou na Katedře analytické chemie intenzivně rozvíjeny a využívány k analýze biologicky a farmaceuticky významných sloučenin, k analýze a monitorování vzorků a stavu životního prostředí, ale také ke studiu separačních mechanismů, popisu vlastností komerčně dostupných stacionárních fází či přímo k vývoji a testování nových typů a materiálů stacionárních fází, jakými jsou monolitické kolony nebo čipy pro miniaturizované separační metody. Pozornost je také věnována spojení vysokoúčinných separačních metod s metodami elektrochemickými a jejich aplikaci na stanovení látek v životním prostředí či využití ke studiu vztahu mezi strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek.

2.1. Plynová chromatografie

Skupina plynové chromatografie (GC) se zabývá vývojem nových a zdokonalováním stávajících metod úpravy vzorků pro plynovou chromatografii, hmotnostní spektrometrii (MS) a jejím spojením s GC, multidimenzionální plynovou chromatografií, chirálními separacemi, stanovením cizorodých látek v biologickém materiálu a v životním prostředí. Tato pracovní skupina je v současnosti pro řešení svých projektů vybavena špičkovým přístrojem GCxGC-MS, zakoupeným z podpory EAA grantu (Projekt FM EHP/Norsko CZ0116: Inovace laboratoří pokročilých separačních metod pro celoživotní vzdělávání).

V oblasti derivatizací pro účely GC analýz se zabývá výzkumem a použitím alkylchlormravenčanů, které reagují velmi rychle a téměř kvantitativně s látkami obsahujícími aktivní vodíkový atom (např. karboxylové kyseliny, aminokyseliny, některé aminy a alkoholy) jak v nevodném, tak i ve vodném prostředí. Příkladem jejich použití je velmi rychlá metoda stanovení perfluorovaných organických kyselin, představující skupinu perzistentních polutantů životního prostředí, metodami GC-ECD (ECD, detektor elektronového zachytu) a GC-MS (cit.⁶). Dalším příkladem nového přístupu pro rychlou úpravu vzorku je stanovení celkové zátěže ftalátů v potravinách s vysokým obsahem tuků⁷. V neposlední řadě je velmi aktuálním směrem výzkum a zdokonalování nových mikroextrakčních technik pro účely analýzy složek životního prostředí. Příkladem vývoje chirálních separačních metod a spolupráce s 1. Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Praze v oblasti forenzní chemie je metoda určení věku osob na základě chirální GC separace kyseliny asparagové ze zubního centimtu⁸. Pracovní skupina GC se rovněž aktivně zapojuje do prudce se rozvíjející techniky multidimenzionální komprehenzivní GC (GCxGC) a z tohoto důvodu uspořádala v únoru 2010 první český workshop „Albertov Comprehensive Days 2010“, kterého se zúčastnilo přes 30 specialistů z akademické, vědecké a komerční oblasti a ze státní správy.

2.2. Kapalinová chromatografie

Skupina vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se zabývá vývojem nových metod a jejich aplikací v biochemickém a lékařském výzkumu a v environmentální analýze, analýzou biologicky aktivních látek, jako např. peptidů a proteinů s využitím chromatografických kolon standardních i kolon nové generace (např. Discovery HS F5, Purospher STAR nebo ZIC-HILIC), sledováním biologicky významných látek v životním prostředí (např. steroidní hormony v povrchových a odpadních vodách), chirálními separacemi látek v HPLC i v kapilární kapalinové chromatografii (CLC) a spojením kapalinové/mikrokolonové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Separace chirálních látek je velmi zajímavou aplikační oblastí separačních metod, na jejímž řešení Katedra

analytické chemie úzce spolupracuje s Katedrou fyzikální a makromolekulární chemie PĚF UK, konkrétně s E. Tesařovou. Významná část přírodních látek je chirálních, vyskytují se ve formě enantiomerů, případně diastereoisomerů. Enantiomery si jsou navzájem svým zrcadlovým obrazem, případně si je lze představit jako svou pravou a levou ruku. Jedná se tedy z hlediska chemického o stejnou sloučeninu, ale liší se uspořádáním své molekuly v prostoru. V nechirálním prostředí mají enantiomery prakticky stejné fyzikálně-chemické vlastnosti jako např. bod tání a varu nebo rozpustnost, a proto nelze jednotlivé enantiomery v takovémto prostředí odlišit. V chirálním prostředí mají jednotlivé enantiomery odlišné účinky, chovají se jinak, a lze je tedy od sebe vzájemně rozlišit. Nejběžnějším chirálním prostředím jsou živé organismy, pro které je důležité, s jakým enantiomerem se dostanou do kontaktu, neboť na úrovni molekulového rozpoznávání se jednotlivé enantiomery liší svými biologickými a fyziologickými funkcemi. Odlišnému chování přírodních i synteticky připravených enantiomerů je třeba věnovat náležitou pozornost především u léčiv, ale také u agrochemikálií a při kontrole složek potravin. V případě léčiv se může jednat o rozdílné farmakodynamické a farmakokinetické vlastnosti, projevující se například rozdílnou sorpcí, distribucí nebo biotransformací jednotlivých enantiomerů v živočišných tkáních⁹. Běžně má jeden enantiomer požadované vlastnosti a ten druhý je neaktivní, má nižší, vyšší nebo až opačné účinky a nezdědká bývá zdraví nebezpečný, například teratogenní. Poměr enantiomerů jednotlivých složek potravin významně ovlivňuje nejenom chuť a vůni výrobku, ale také jeho výživovou hodnotu¹⁰.

Pro separace opticky aktivních látek se nejčastěji využívá metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie, kdy k enantioseparaci dochází na stacionární fázi s navázanou opticky čistou látkou, tzv. chirálním selektorem. Jako příklad výzkumu prováděného na obou spolupracujících katedrách lze uvést využití stacionárních fází s navázanými chirálními selektory na bázi cyklodextrinů nebo makrocyclických antibiotik (teikoplaninu a vankomycinu) pro úspěšnou enantioseparaci strukturně odlišných chirálních sloučenin, např. aminoalkoholů, které fungují jako beta-blokátory (látky používané k léčbě vysokého krevního tlaku a nepravidelného srdečního rytmu), derivátů 2-arylpropionové kyseliny (nesteroidních protizánětlivých profenů), herbicidů na bázi chlorfenoxypionových kyselin a aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Jednotlivé enantiomery studovaných beta-blokátorů mají odlišné terapeutické účinky, enantiomery chlorfenoxypionových kyselin mají rozdílnou herbicidní aktivitu a D-enantiomery studovaných esenciálních aminokyselin jsou považovány za nežádoucí součást potravinových doplňků^{11,12}. Výzkum v oblasti chirálních sloučenin je zaměřen nejen na hledání vhodných separačních podmínek, umožňujících dostatečné enantiorozlišení, ale i na studium stability jednotlivých enantiomerů, možnosti aplikace semipreparativního módu nebo sledování vlivu obsahu a způsobu navázání chirálního selektoru k nosiči na stereoselektivní vlastnosti chirálních stacionárních fází. Pozornost je věno-

vána i testování miniaturizovaných systémů, umožňujících porovnat enantioseparaci s chirálním selektorem vázaným ve formě chirální stacionární fáze nebo volně přidaným do fáze mobilní, což je důležité pro objasnění stereointerakčních mechanismů¹³.

Další zajímavou oblastí výzkumu prováděného separačním týmem Katedry analytické chemie PĚF UK je analýza a separace ligandů pro biomedicínské aplikace derivátů cykluenu. Polykarboxylátové deriváty cykluenu (1,4,7,10-tetraazacyklododekan) jsou schopné koordinovat gadolinový ion a vytvořit tak velmi stabilní komplex. Tento komplex lze následně použít u pacienta s podezřením na nádorové onemocnění jako kontrastní látku pro neinvazivní vyšetření magnetickou rezonancí. Polykarboxylátové deriváty cykluenu jsou připravovány složitou několikastupňovou syntézou, proto je nezbytné vyvinout vhodnou metodu separace syntetizovaných derivátů, která by poskytla rychlou kontrolu čistoty jednotlivých derivátů a případně byla použitelná i v preparativním měřítku. Takovou metodu se podařilo vyvinout. Jedná se o reverzní kapalinovou chromatografii ve spojení s bezkontaktním vodivostním detektorem¹⁴. Vyvinutá metoda reverzní kapalinové chromatografie byla dále optimalizována a porovnána s nově vypracovanou metodou kapilární elektroforézy v nevodném prostředí. Obě metody poskytly účinné a rychlé analýzy s celkovým časem separace do 12 min, umožnily provést kvantitativní stanovení vybraných derivátů cykluenu na koncentrační úrovni 10^{-5} až 10^{-6} mol l^{-1} a byly úspěšně použity pro stanovení reálných vzorků derivátů cykluenu bez jakékoliv předchozí úpravy¹⁵.

Analýze biologicky aktivních látek je na našem pracovišti věnována značná pozornost. Pro tuto skupinu analytů využíváme nejen metody kapalinové chromatografie, ale také metody elektromigrační a miniaturizované separační metody, jak bude zmíněno později. Významnou skupinu studovaných biologicky aktivních látek tvoří bioaktivní peptidové hormony, které vykonávají v lidském organismu, nebo obecně v organismu savců, důležité biologické funkce. Pro analýzu skupiny bioaktivních nonapeptidů (tvořeny devíti aminokyselinami, analogy vasopresinu) jsme úspěšně využili kromě standardních chromatografických stacionárních fází na bázi silikagelu také moderní reverzní stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého. Tyto moderní stacionární fáze nabízejí lepší možnosti optimalizace separačního procesu v porovnání se silikagelovými materiály. Při separaci peptidů lze s úspěchem využít smíšený separační mód, který zirkoniové kolony nabízejí. Při úspěšné separaci analogů vasopresinu na zirkoniových kolonách byla použita mobilní fáze obsahující pouze 5 % acetonitrilu jako organického modifikátoru. Tyto vyvinuté podmínky separace jsou šetrné a umožňují zachování biologické aktivity analytů, zároveň přinášejí výhody v podobě finanční úspory za organická rozpouštědla. Optimalizované pracovní podmínky zaručily kompletní separaci studovaných vasopresinů v celkovém čase do 6 min a dosažení meze detekce v řádu jednotek mikrogramů na mililitr¹⁶.

Znečištění životního prostředí v důsledku lidské činnosti neustále narůstá. Novým typem polutantů životního

prostředí jsou látky, které ovlivňují endokrinní systém velkého množství organismů, včetně nás lidí. Příkladem tohoto typu polutantů jsou estrogenní hormony. Ačkoliv se přírodní i synteticky připravené estrogény vyskytují v životním prostředí ve velmi malých koncentracích (řádově jednotky až stovky nanogramů na litr), byl zaznamenán jejich vliv na reprodukci volně žijících zvířat a i lidí. Tento problém difúzního znečištění hormony je v naší pracovní skupině intenzivně studován¹⁷. Jde o složitou problematiku, která vyžaduje využití vysoce citlivých separačních metod v kombinaci s účinnými technikami úpravy a zakoncentrování vzorků.

2.3. Elektromigrační metody a miniaturizované separační metody

Tým elektromigračních a miniaturizovaných separačních metod se zaměřuje na vývoj a využití elektromigračních metod v analýze malých i velkých molekul s výraznou biologickou aktivitou. Neméně významnou oblastí zájmu této pracovní skupiny jsou miniaturizované chromatografické metody, především kapilární kapalinová chromatografie (CLC) a čipová nanokapalinová chromatografie (chip-HPLC), a jejich následné spojení s hmotnostní detekcí. Velká pozornost je také věnována vývoji a charakterizaci kapilárních monolitických a náplňových kolon a možnosti jejich aplikace ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Elektromigrační metody lze využít pro dělení nabitých látek. K procesu dělení dochází v elektrickém poli o velikosti řádově jednotek až desítek kilovoltů, které je vytvořeno mezi dvěma elektrodami. Rychlost pohybu dělených látek (v iontové formě) ve vytvořeném elektrickém poli závisí především na poměru velikosti jejich náboje a hmotnosti, na tzv. elektroforetické pohyblivosti. Na našem pracovišti využíváme z elektromigračních metod nejčastěji kapilární zónovou elektroforézu, a v současné době také kapilární gelovou elektroforézu. Separačním prostorem u obou zmíněných metod je křemenná kapilára o vnitřním průměru desítek až stovek mikrometrů, která je u kapilární zónové elektroforézy vyplněna základním elektrolytem, tj. více či méně složitou směsí vodných roztoků pufrů, nebo v případě gelové elektroforézy vhodně zvoleným chemickým nebo fyzikálním gelem. Kapilární zónová elektroforéza byla na našem pracovišti úspěšně využita pro dělení 20 nederivatizovaných proteogenních aminokyselin. Základní elektrolyt, který umožnil separaci těchto esenciálních aminokyselin v různých přírodních matricích jako pivo, kvasnice, rostlinné extrakty, ale i moč nebo sliny, byl tvořen pouze kyselinou octovou o koncentraci 2,3 mol l⁻¹ a hydroxyethylcelulosou (0,1 hm.%). Přídavek hydroxyethylcelulosy do základního elektrolytu potlačil dva jevy, často negativně ovlivňující separační proces v kapilární zónové elektroforéze, a to adsorpci analytu na stěnu křemenné kapiláry a elektroosmotický tok. Elektroosmotický tok vzniká v důsledku ionizace silanolových skupin ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) přítomných na vnitřní stěně křemenné kapiláry. Po aplikaci elektrického pole dochází k pohybu nabitých

částic, vzniklých disociací silanolových skupin a tyto nabitě částice při svém pohybu strhávají celý obsah separační kapiláry (základní elektrolyt a i separované nabitě analyty) k příslušné elektrodě. Při tomto výzkumu byl navíc využit typ detektoru, který je na naší katedře intenzivně vyvíjen a optimalizován nejen pro kapilární elektroforézu, ale také pro kapalinovou chromatografii, a to bezkontaktní vodivostní detektor. Tento typ detektoru je výhodně použit pro vizualizaci malých anorganických a organických iontů, které vykazují nízkou absorpci v ultrafialové (UV) a viditelné oblasti spektra, anebo pro detekci analytů při použití vysoce absorbujícího základního elektrolytu v UV oblasti¹⁸. Kapilární zónová elektroforéza také umožňuje určení fyzikálně-chemických charakteristik biologicky aktivních látek, jakými je např. disociační konstanta ropinirolu, potenciálního léčiva Parkinsonovy nemoci, a doprovodných, strukturně podobných nečistot pocházejících ze syntézy a jejich následnou účinnou separaci a spolehlivou kvantifikaci v relativně krátkém čase (do 15 min) za minimální spotřeby vzorku a ostatních potřebných chemikálií¹⁹.

Nově se naše pracovní skupina zaměřuje na metodu kapilární gelové elektroforézy a možnosti jejího využití v analýze bílkovin²⁰. Metoda kapilární gelové elektroforézy je velmi perspektivní v oblasti proteomiky, do níž samozřejmě analýza bílkovin patří. Tato metoda umožňuje vhodně měnit podmínky, aby co nejlépe vyhovovaly konkrétní problematice. Jako separační gely lze použít chemické gely, jejichž polymerní řetězce jsou navzájem propojeny chemickými vazbami (tj. trojrozměrné sesíťované gely), nebo gely fyzikální, jejichž struktura je dána fyzikálními interakcemi typu vodíkové můstky nebo hydrofobní interakce (tzv. propletené lineární gely). Aplikace fyzikálních gelů při kapilární gelové elektroforéze přináší řadu výhod, především možnost výměny separačního média po každé analýze. Tento krok prodlužuje životnost použité separační kapiláry a významně zvyšuje reprodukovatelnost analýzy.

Metoda kapilární kapalinové chromatografie a její výběr pro řešení rozličných analytických problémů je plně v souladu se současným trendem v mnoha vědeckých a průmyslových oblastech, s trendem miniaturizace, a proto i náš pracovní tým věnuje miniaturizovaným separačním technikám náležitou pozornost. Separační mechanismus CLC je zcela totožný s mechanismem uplatňovaným v klasické kapalinové chromatografii, ovšem CLC vykazuje řadu výhod jako je nízká spotřeba vzorku a všech ostatních chemikálií včetně organických rozpouštědel a drahých aditiv přidávaných do mobilní fáze při současném zachování vysoké separační účinnosti, vyšší kompatibilita s hmotnostní spektrometrií jako detekční technikou a respektování ochrany životního prostředí. Zmiňované výhody kapilární kapalinové chromatografie se projeví zejména při analýzách vzorků v biologických tekutinách, jejichž množství je často značně omezené a analýzy je nutno vícekrát opakovat, aby byla zaručena požadovaná spolehlivost analytických výsledků. Na našem pracovišti byla vyvinuta metoda kapilární kapalinové chromatografie aplikovatelná např. pro separaci a kvantifikaci nově syntetizovaných

thioderivátů akridinů, které jsou odvozeny od struktury dibenzopyridinu. Akridiny patří do skupiny významných chemoterapeutik s prokázáním antibakteriálním, antimykotickým a především antimalarickým účinkem. Optimalizované experimentální podmínky zaručily dobrou separaci 5 studovaných akridinů i doprovodných nečistot a umožnily určení meze detekce a meze stanovení jednotlivých akridinů, které se pohybovaly v jednotkách až desítkách mikromolů na litr²¹. Vypracovaná metoda kapilární kapalinové chromatografie byla dále optimalizována a dovolila separaci a kvantifikaci dokonce deseti derivátů 9-(alkylthio)akridinů v biologické matici tvořené lidskou močí bez jakékoliv předchozí úpravy vzorku²².

Miniaturizace separačních kolon ve vysokoučinné kapalinové chromatografii je jedním z nejdůležitějších současných úkolů v oblasti analytických separačních technik. Dochází k postupnému zmenšování vnitřního průměru kolon až na hodnoty 10 až 150 μm v nanochromatografii. Hlavní důraz je při přípravě miniaturizovaných separačních kolon kladen na jednoduchost jejich přípravy při současném zachování vysoké separační účinnosti, které dosahují kolony klasických rozměrů. Chromatografické kolony na bázi monolitů se zdají být vhodným řešením tohoto úkolu. Celý tým separačních metod na naší katedře se výzkumu v této oblasti intenzivně věnuje už více než 10 let (cit.²³). Monolitické kolony se připravují zapolymerováním vhodných monomerních jednotek do bloku porézního polymeru, který vyplní vnitřek separační kolony, a plní tak v koloně funkci stacionární fáze. Monolitické kolony lze, na rozdíl od kolon náplňových, připravit poměrně snadno i v kapilárách o průměru několika desítek mikrometrů a navíc není třeba monolitické kolony na koncích opatřovat fritami, které udržují zrna stacionární fáze v náplňové koloně. Pro přípravu monolitických kolon se používají různé polymery a kopolymery. Z našeho pohledu se jako velmi perspektivní jeví monolity na bázi methakrylátu. Jako první jsme optimalizovali přípravu methakrylátových monolitických kolon v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 320 μm pro jejich použití v kapilární kapalinové chromatografii²⁴. Systematickou experimentální práci se podařilo výrazně zjednodušit složením polymerizační směsi pro přípravu butylmethakrylátových monolitických kolon v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 320 μm a připravit tak monolitické kolony s dostatečnou permeabilitou, značnou tlakovou odolností (až do 30 MPa) a výbornou účinností pro separace malých organických molekul. Účinnost takto připravených butylmethakrylátových monolitů byla jen zhruba dvakrát nižší než u konvenčních náplňových kolon a také reprodukovatelnost přípravy monolitů byla uspokojivá²⁵. Pro separaci větších organických molekul, konkrétně oligonukleotidů složených z 19 či 20 deoxyribonukleosidových bází, kapilární kapalinovou chromatografií byla optimalizována příprava hydroxymethylmethakrylátových monolitických kolon v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 320 μm . Připravené hydroxymethylmethakrylátové monolitické kolony byly používány v kapilárním HILIC chromatografickém módu (HILIC, chromatografie hydrofilních interakcí). Jedná se

v podstatě o metodu normální chromatografie, kdy voda slouží jako nejsilnější eluční činidlo. Připravené monolitické kolony umožnily separaci oligonukleotidů o rozdílné délce i o rozdílné sekvenci, lišící se často jen v jedné nukleosidové bázi, v přijatelném čase do 35 min. Značná jednoduchost přípravy těchto monolitů, společně s její dobrou reprodukovatelností, předurčují tyto monolitické kolony k zavedení do analytických, klinických a farmaceutických laboratoří, kde je třeba spolehlivě analyzovat větší množství složitých směsí biologicky významných látek²⁶.

3. Závěr

Z výše uvedeného přehledu principů a aplikací analytických separačních metod používaných v jednom týmu a na jednom pracovišti je patrné, že současné analytické separační metody skýtají obrovský separační potenciál a široké aplikační možnosti. Vývoj separačních metod jdoucích cestou miniaturizace a spojení těchto metod s moderními citlivými detekčními technikami není zdaleka ukončen. Přestože jsou dnešní analytické separační metody již velmi citlivé, selektivní, účinné a tolerantní k životnímu prostředí, analytická praxe stále volá po jejich větší citlivosti, selektivitě, účinnosti a kompatibilitě se životním prostředím. Všem analytickým chemikům zbývá ujit ještě kus krkolomné cesty a přesto požadavky odborníků z analytické praxe nebudou nikdy plně a bezezbytku uspokojeny. Neustálé zdokonalování analytických separačních metod musí být vnímáno jako nepřetržitý, nikdy nekončící proces.

Autoři děkují za finanční podporu norským finančním mechanismům, grantový projekt FM EHP/Norsko CZ0116, a MŠMT České republiky, výzkumný záměr MSM 0021620857.

LITERATURA

1. Cvet M.: Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sec. 1903, 14.
2. Cvet M.: Ber. Deut. Botan. Ges. 24, 316 (1906).
3. Day D. T.: Proc. Am. Phil. Soc. 36, 112 (1897).
4. Day D. T.: Congr. Intern. Petrole Paris 1, 53 (1900).
5. Day D. T.: Science 17, 1007 (1903).
6. Dufková V., Čabala R., Maradová D., Štícha M.: J. Chromatogr., A 1216, 8659 (2009).
7. Ostrovský I., Čabala R., Kubinec R., Górová R., Blaško J., Kubincová J., Římnáčová L., Lorenz W.: Food Chem. 124, 392 (2011), doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.045.
8. Pilin A., Čabala R., Pudil F., Bencko V.: J. Forensic Sci. 46, 1228 (2001).
9. Řičicová V., Rousová Z., Beneš L.: Čes. Slov. Farm. 51, 17 (2002).
10. Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: Chem. Listy 102, 480 (2008).
11. Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P.,

- Messina A., Sinibaldi M.: *Chirality* 18, 531 (2006).
12. Honetschlagerov-Vadinsk M., Srkalov S., Boskov Z., Coufal P., Tesařov E.: *J. Sep. Sci.* 32, 1704 (2009).
 13. Kafkov B., Boskov Z., Tesařov E., Coufal P.: *J. Chromatogr., A* 1088, 82 (2005).
 14. Hamplov A., Coufal P., Boskov Z., Opekar F., Kubiřek V.: *Chem. Listy* 102, 194 (2008).
 15. Hamplov A., Křiřek T., Kubiřek V., Boskov Z., Coufal P.: *J. Sep. Sci.* 33, 658 (2010).
 16. Janeřkov L., Sobotnkov J., Tesařov E., Boskov Z.: *Chem. Listy* 104, 334 (2010).
 17. Packov V., Loukotkov L., Boskov Z., řtulk K.: *J. Sep. Sci.* 32, 867 (2009).
 18. Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Gař B.: *Electrophoresis* 24, 671 (2003).
 19. Coufal P., řtulk K., Claessens H. A., Hardy M. J., Webb M.: *J. Chromatogr., B* 720, 197 (1998).
 20. Křiřek T., Coufal P., Boskov Z., Tesařov E., Sobotnkov-Suchnkov J.: *Chem. Listy* 103, 130 (2009).
 21. Boskov Z., Tesařov E., Coufal P., Kafkov B., Barbe J.: *Chem. Listy* 95, 569 (2001).
 22. Srbek J., Boskov Z., Tesařov E., Suchnkov J., Coufal P., Nmcov I.: *Chromatographia* 60, S37 (2004).
 23. řtulk K., Packov V., Suchnkov J., Coufal P.: *J. Chromatogr., B* 841, 79 (2006).
 24. Coufal P., řihk M., Suchnkov J., Tesařov E.: *Chem. Listy* 95, 509 (2001).
 25. Grafnetter J., Coufal P., Tesařov E., Suchnkov J., Boskov Z., řevřk J.: *J. Chromatogr., A* 1094, 43 (2004).
 26. Holdřvendov P., Suchnkov J., Bunřek M., Bařkovsk V., Coufal P.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 23 (2007).

J. Sobotnkov, Z. Boskov, R. řabala, P. Coufal, V. Packov, and K. řtulk (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **The History, Present and Prospects of Analytical Separation Methods at Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague**

An overview of principles and applications of analytical separation methods used by a research team in analytical laboratory is given. The immense separation potential and wide applications of current separation methods in analytical chemistry are shown and discussed. The present development in the separation methods is characterized by miniaturization and hyphenation with modern sensitive detection techniques. Although current analytical separation techniques are generally considered as sensitive, selective, efficient and tolerant of the environment, their progress will never end.