

**Univerzita Karlova v Praze**  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra analytické chemie

Bakalářská práce

Zelená chromatografie - trendy ve vývoji  
ekologicky šetrných metod

(rešeršní práce)

Klára Kozáková

Hradec Králové, 2015

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli panu Doc. RNDr Daliboru Šatínskému, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost, cenné rady a připomínky při psaní této bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Dalibora Šatínského, Ph.D. a veškerá literatura a internetové zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou řádně citovány.

Souhlasím, aby tato práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

V Hradci Králové dne 7. 5. 2015

.....

podpis

# Obsah

Seznam zkratk .....	7
Úvod a cíl práce .....	9
Teoretická část .....	10
1 Definice zelené chemie .....	10
1.1 Zelená analytická chemie .....	10
1.2 Zelená chromatografie .....	12
2 Příprava vzorku .....	13
2.1 Miniaturizace extrakce .....	14
2.1.1 SPME .....	14
2.1.2 SBSE .....	16
2.1.3 SDME .....	16
2.1.4 DLLME .....	17
2.1.5 Membránová extrakce .....	18
2.1.5.1 SLM .....	19
2.1.5.2 MMLLE .....	19
2.1.5.3 MESI .....	19
2.1.5.4 MASE .....	20
2.1.6 Plynná extrakce .....	20
2.1.6.1 Statický headspace .....	20
2.1.6.2 Dynamický headspace .....	21
2.1.6.3 Headspace extrakce na tenké vrstvě .....	21
2.2 Rozpouštědla .....	22
2.2.1 Iontové kapaliny .....	22
2.2.2 Superkritická fluidní extrakce .....	22
2.2.3 Subkritická extrakce vodou .....	23

2.2.4	Fluorovaná rozpouštědla .....	23
2.3	Modifikované extrakce.....	23
2.3.1	Extrakce pomocí mikrovln .....	24
2.3.2	Extrakce pomocí ultrazvuku.....	24
2.3.3	Extrakce za zvýšené teploty a tlaku .....	24
3	Zelená chromatografie .....	25
3.1	Kapalinová chromatografie.....	25
3.1.1	Instrumentace .....	26
3.1.1.1	Microbore LC .....	27
3.1.1.2	Kapilární LC .....	28
3.1.1.3	Nano LC.....	28
3.1.2	Rozpouštědla .....	29
3.1.2.1	Ethanol.....	29
3.1.2.2	Aceton.....	30
3.1.2.3	Voda.....	30
3.1.3	Monolitické kolony .....	30
3.1.4	Plně porézní sub-2 µm částice a UHPLC.....	31
3.1.5	Povrchově porézní částice .....	32
3.1.6	Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (HTLC).....	33
4	Metody využívající principu zelené chromatografie.....	34
4.1	Stanovení umělých sladidel v nápojích pomocí vysokoteplotní kapalinové chromatografie spojené s MS s použitím zelené mobilní fáze.....	34
4.2	Vývoj a validace zelené vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení kofeinu a některých umělých sladidel v nealkoholických nápojích.....	34
4.3	Vývoj zelené chromatografické metody pro souběžné stanovení potravinových barviv .....	34

4.4 Stanovení oktopaminu, synefrinu a tyraminu v citrusích pomocí iontových kapalin pro zlepšení „zelené“ chromatografie .....	35
4.5 Ekologicky šetrná („zelená“) RP-LC metoda pro stanovení UV filtrů v kosmetice.....	35
4.6 Vývoj zelené analytické metody pro analýzu statinů.....	35
4.7 Separace přírodních cytostatik pomocí povrchově porézní stacionární fáze	36
4.8 Průmyslové použití zelené chromatografie - I. Separace a analýza niacinamidu v pleťových krémech za použití čisté vody jako mobilní fáze.....	36
4.9 Průmyslové použití zelené chromatografie - II. separace a analýza konzervantů v pleťových krémech pomocí SBWC .....	36
4.10 Separace ochranných opalovacích faktorů obsažených v pleťové kosmetice pomocí HLTC a SBWC .....	37
4.11 Hodnocení MEPS extrakce a micro-LC/MS jako zelený přístup v bioanalýze .....	37
4.12 Zelená chromatografická separace analytů různé polariry s použitím polyethylenglykolové stacionární fáze a málo toxické mobilní fáze na bázi vody.....	37
Závěr .....	40
Seznam použité literatury .....	42

## Seznam zkratek

ACS GCI	American Chemical Society – Green Chemistry Institute
DI-SDME	přímé vstřikování-mikroextrakce na jedné kapce
DLLME	mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému
EPA	Environmental Protection Agency
FS	ploché membránové archy
GC	plynová chromatografie
HF	dutá membránová vlákna
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTLC	vysokoteplotní kapalinová chromatografie
HTLC/MS	vysokoteplotní kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
HS-SDME	headspace- mikroextrakce na jedné kapce
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	limit kvantifikace
LTM	ultra rychlá chromatografie
MALDI/MS	ionizace laserem za přítomnosti matrice spojená s hmotnostní spektrometrií
MASE	Membrane Assisted Solvent Extraction
MESI	Membrane Extraction with Sorbent Interface
MEPS	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu
MIPs	molekulárně vtištěné polymery
MMLLE	mikroporézní membránová extrakce kapalina-kapalina
MS	hmotnostní spektrometrie
NEMI	National Environmental Methods Index
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBDE	polybromované difenylethery

PBT	polybutylen tereftalát
PCB	polychlorované bifenyly
PDA	detektor diodového pole
PDSM	polydimethylsiloxan
PEEK	polyether ketony
PLE	extrakce za zvýšené teploty a tlaku
PT	Purge and Trap
P/WCC	Purging with Whole Column Cryotrapping
RCRA's	Resource Conservation and Recovery Act
RP	reverzní fáze
RP-LC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SBSE	sorbční extrakce na míchadélku
SBWC	subkritická vodní chromatografie
SDME	mikroextrakce na jedné kapce
SFO	tuhnutí plovoucí organické kapky
SHWC	Superheated Water Chromatography
SLM	zakotvená kapalinová membrána
SPE	extrakce na tuhé fázi
SPME	mikroextrakce na tuhé fázi
THLS	headspace extrakce na tenké vrstvě
TRI	Toxic Release Inventory
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
UHPLC/UV	ultra účinná kapalinová chromatografie spojená s UV detekcí
UV	ultrafialové záření



# Úvod a cíl práce

Chromatografie je separační metoda, která se v dnešní době velmi hojně využívá ve všech oblastech analytické chemie. Při separaci se používá velké množství toxických organických rozpouštědel, která znečišťují životní prostředí a mají negativní vliv na zdraví analytiků. Z těchto důvodů vznikl koncept zelené chromatografie, kterým se zabývá předkládaná bakalářská práce.

Příprava vzorků patří mezi nejvíce znečišťující proces celého chromatografického postupu, proto je tomuto tématu věnována první část této práce. Jsou zde uvedeny extrakce, které redukuje spotřebu rozpouštědel nebo využívají jiná ekologicky šetrná rozpouštědla. Nové trendy se ubírají k miniaturizaci extrakce, používání nových materiálů, automatizaci systému, aplikaci „zelených“ postupů a změně parametrů extrakce jako je teplota nebo tlak. V další kapitole je rozebrána kapalinová chromatografie a její způsoby modifikací dělající tuto metodu ekologicky šetrnou. Celý chromatografický proces probíhá na analytické koloně, proto se pozornost upíná na zmenšení parametrů kolony jako je délka, vnitřní průměr a velikost částic. Další způsob navrhuje použití čisté vody jako mobilní fáze nebo různých druhů vhodnějších stacionárních fází. Na závěr jsou uvedeny vědecké články za uplynulých 10 let, ve kterých autoři popisují zelené postupy použité pro separaci různých látek. Články byly vyhledávány se zaměřením na ekologicky šetrné metody za použití kapalinové chromatografie.

Většina informací byla čerpaná z anglicky psaných článků dostupných z vědeckých databází (PubMed.gov., WebofScience.com a Chromatographyonline.com), z anglické knihy Handbook of Green Analytical Chemistry a část práce byla sepsána z českých článků uvedených v časopise Chemické listy.

Cílem této bakalářské práce bylo shromáždit informace o zelené chromatografii, uvést nové trendy týkající ekologicky šetrných postupů a uvést články, ve kterých autoři popisují nové metody využití ekologicky šetrných metod v praxi.

# Teoretická část

## 1 Definice zelené chemie

Zelená chemie zahrnuje chemické produkty a procesy, které redukují nebo úplně eliminují používání a výrobu nebezpečných látek. Aplikuje se na navrhování a výrobu chemických produktů, jejich používání a samotnou likvidaci, tak aby byly ekologicky šetrné a zdraví nezávadné. Realizuje postupné zlepšování ve všech stupních chemického postupu, které zahrnují syntézu, katalýzu, reakční podmínky, analýzu a monitorování. Zlepšení postupů se může dosáhnout pomocí použití „zelenějších“ surovin, činidel, katalyzátorů a rozpouštědel. V ideálních případech zelená chemie zasahuje do nejranějších fází návrhu nového produktu nebo procesu. Zelené chemie tedy redukuje znečištění prostředí a dopad na lidské zdraví, eliminuje existenci nebezpečných produktů a procesů, aplikuje nová řešení na existující problémy životního prostředí, vynalézá ekologicky šetrné postupy nebo produkty a snaží se tyto body aplikovat na všechny oblasti chemie (1) (2).

### 1.1 Zelená analytická chemie

V minulosti se používaly analytické postupy, které vyžadovaly používání velkého množství nebezpečných rozpouštědel pro přípravu a analýzu vzorku. Rozpouštědla byla odpařována v digestořích a tak se dostávaly do ovzduší nebezpečné látky. Rozvojem zelené chemie se ekologicky šetrné postupy aplikovaly do oboru analytické chemie.

Idea zelené chemie byla shrnuta Paulem Anastasem do 12 pravidel, která se zaměřují na 3 hlavní témata: odpad, nebezpečí a energie. Ne všechny tyto pravidla se dají přímo aplikovat na analytickou chemii, ale některá z nich jsou uvedena (Tabulka 1).

**Tabulka 1** 12 pravidel zelené chemie (1) (3) (4)

	<b>Pravidlo</b>	<b>Popis</b>	<b>Realizace do analytické chemie</b>
<b>1</b>	Prevence vzniku odpadu	Lepší odpad neprodukovat vůbec, než se ho zbavovat.	Použití malého množství rozpouštědel při extrakci, použití přímé analýzy, miniaturizace.
<b>2</b>	Atomová ekonomie	Navrhnout syntézu tak, aby konečný produkt obsahoval co největší množství výchozí látky.	-

3	Méně nebezpečné chemické syntézy	Navrhnout syntézu, tak aby používané látky byly minimálně nebezpečné pro zdraví člověka a životní prostředí.	Online detoxikace analytického odpadu.
4	Navrhnout bezpečnější chemikálie a produkty	Navrhnout chemické produkty, tak aby byly efektivní a minimálně toxické.	-
5	Použití bezpečnějších rozpouštědel a pomocných látek	Minimalizovat použití rozpouštědel, pomocných látek a separačních prostředků. Používat méně toxické.	Vyměnit nebezpečná rozpouštědla za méně toxická, používání malého množství rozpouštědel při extrakci, používání přímé analýzy.
6	Zvýšit efektivitu energie	Spustit chemické reakce při pokojové teplotě a tlaku a snížit tím energetické náklady.	Extrakce za použití mikrovln, ultrazvuku nebo tlaku. Snížit dobu extrakce a tím minimalizovat spotřebu energie.
7	Použití obnovitelných zdrojů energie	Upřednostňovat obnovitelné zdroje nad neobnovitelnými.	-
8	Redukovat vznik derivátů	Minimalizovat vznik derivátů pokud je to možné, neboť vyžadují činidla a jsou zdrojem odpadu.	Derivatizace by měla být omezena, pokud je to možné.
9	Katalyzátory	Použití katalyzátorů místo reagentů ve stechiometrickém množství.	-
10	Navrhování odbouratelných produktů	Navrhnout chemické produkty, které neznečišťují prostředí.	-
11	Analýza v reálném čase	Zahrnuje monitorování a kontrolu během syntézy tak, aby se minimalizovalo či zabránilo vzniku vedlejších produktů.	Vývoj postupů, které umožňují získání analytického výsledku s krátkou dobou odezvy.
12	Bezpečnější chemikálie	Vybrat takové chemikálie, aby se minimalizoval vznik havárií, požárů a exploze.	Aplikace technik, které vyžadují co nejmenší spotřebu rozpouštědel, tak aby se minimalizovala pracovní expozice; monitorování v reálném čase; miniaturizace.

Při vývoji nových analytických metod musíme brát v úvahu řadu faktorů. Mezi nejdůležitější kritéria patří citlivost, linearita, správnost, selektivita, přesnost, mez detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ) a rychlost analýzy. Důležitou roli také hraje povaha analytu, vliv matrice a způsob generování signálu, který je úměrný koncentraci analytu. Vývoj nových metod by tedy neměl být v souladu pouze se zelenou chemií, ale měl by se posuzovat komplexně i s uvedenými kritérii. V ideálním případě by se měla preferovat metoda, která vyžaduje minimální přípravu vzorku, minimální spotřebu chemických činidel a jednotlivé kroky by mohly být prováděny v čistě vodném prostředí

nad metodami, které vyžadují přečištění pomocí kyselin, extrakci, odpaření nebo derivatizaci. Otázka tedy zní, můžeme stupeň „zeleně“ analytických metod mezi sebou posoudit?

Americká společnost ACS GCI vynalezla spolu se skupinou odborníků na životní prostředí zelená kritéria týkající se životního prostředí. Kritéria jsou volně dostupná v internetové databázi National Environmental Methods Index (NEMI). Databáze obsahuje základní popis metod a k nim přiřazené hodnocení stupně „zeleně“. V dnešní době existuje přes 1000 metod popsaných v NEMI. Kritéria popsaná v NEMI jsou založena na čtyřech klíčových slovech: PBT (perzistentní, biokumulativní a toxické), žíravé, nebezpečné a odpad. Dvanáct pravidel zelené chemie bylo použito jako vodítko při vytváření těchto kritérií. Pro snadné zhodnocení různých metod byl vytvořen profil s uvedenými čtyřmi kritérii (Tabulka 2). Každý kvadrant je buď "zelený" nebo "prázdný" v závislosti na způsobu dodržení konkrétního kritéria. Analytik tedy může zhodnotit posouzením celého profilu, zda jeden způsob je méně zelený nebo více zelený než jiné metody. Tento přístup je zvláště užitečný, když existuje celá řada osvědčených metod a je potřeba najít nejekologičtější způsob (2).

**Tabulka 2** profil zelených kritérií (2)

Zelené kritérium	Definice
<b>PBT</b>	chemikálie použité v metodě jsou evidovány jako PBT a definovány EPA Toxic Release Inventory (TRI)- online dostupná databáze (5)
<b>Nebezpečné</b>	chemikálie použité v metodě jsou uvedeny na TRI nebo RCRA's – online dostupná databáze (6), pod kódy D, F, P a U
<b>Žíravé</b>	pH je během analýzy <2 nebo >12
<b>Odpad</b>	množství generovaného odpadu je >50g

## 1.2 Zelená chromatografie

Drtivá většina chemických látek, zejména organických, se stanovuje pomocí chromatografických metod. Při samotném zpracování a separaci se používá velká množství rozpouštědel a měl by být kladen velký důraz na to, aby tyto látky měly co nejmenší dopad na životní prostředí. Nejlepším řešením toho problému je nahradit toxická

rozpouštědla jako je acetonitril, tetrahydrofuran, isopropanol, a methanol šetrnými rozpouštědly jako je ethanol, voda za vysoké teploty nebo oxid uhličitý. Dalším krokem k omezení množství použitých rozpouštědel vede směrem ke koloně – zmenšení její délky, vnitřního průměru a velikosti částic (3) (7).

Zelené techniky se zabývají i dalšími problematikami chromatografie jako je samotná příprava vzorku, extrakce, separace a následné stanovení. Problematika samotné přípravy vzorku se může vyřešit úplným vynecháním tohoto kroku, ale není vždy výhodná. Upřednostňuje se použití extrakce s malou spotřebou rozpouštědel nebo miniaturizací samotné přípravy vzorku. Klade se tedy důraz na co nejmenší spotřebu rozpouštědel při přípravě vzorku. Separace se dá ovlivnit již zmíněným nahrazením toxických rozpouštědel za ekologicky šetrná anebo omezením spotřeby rozpouštědel. Tyto dvě kritéria se tykají hlavně kapalinové chromatografie, ale existují i alternativy k omezení škodlivého vlivu plynové chromatografie. Upouští se od používání helia jako nosného plynu, protože je to neobnovitelný zdroj energie. Dalším krokem je použití LTM techniky neboli ultra rychlé chromatografie, aby se zkrátila doba analýzy a tím se zmenšily náklady na energii. Posledním krokem k „ozelenění“ LC a GC může být použití multidimenzionálních separačních technik (3) (8).

## **2 Příprava vzorku**

Úprava vzorku je většinou nejvíce znečišťujícím krokem celého chromatografického postupu, nehledě na to, že stálá expozice toxickými látkami, může ovlivnit zdraví analytiků. Proto se od samotné přípravy vzorku upouští kdykoliv je to možné. Hlavním klíčem je čistá matrice, která neobsahuje nadbytečné částice. Tyto částice způsobí ucpávání kolony a zkracují její životnost. Čisté matrice se většinou dávkuje přímo do chromatografických kolon bez přečistění, příkladem může být voda, lihoviny nebo ropné frakce.

U plynové chromatografie se používá technika přímé chromatografické metody, která se vyznačuje přímým dávkováním na kolonu s následnou detekcí. Vzorek se nemusí upravovat a může se přímo stanovovat z vodných vzorků. Vyhneme se tedy použití rozpouštědel a celková doba analýzy je zkrácena. Technika přímé chromatografické metody splňuje 11. princip zelené chemie, který se týká minimalizování dopadu chemických procesů na životní prostředí prostřednictvím monitorování v reálném čase (3).

Existují tedy různé způsoby přispívající k „ozelenění“ přípravy vzorku:

- eliminace nebo alespoň redukce organických rozpouštědel a činidel
- miniaturizace přístrojů a redukce rozsahu analytického postupu
- integrace různých postupů a automatizace nebo robotizace přípravy vzorku
- správné utěsnění všech nádob používaných během přípravy vzorku
- recyklace rozpouštědel
- aplikace zelených médií jako jsou např.: iontové kapaliny, superkritické kapaliny nebo přehřátá voda
- zvýšení účinnosti přípravy vzorku pomocí např.: zvýšené teploty či tlaku, použití mikrovln nebo ultrazvuku jako zdroj energie

Zelenější postupy nejenže zmírňují dopad na životní prostředí, ale jsou zároveň levnější a obvykle i účinnější (3) (4).

## 2.1 Miniaturizace extrakce

Miniaturizace samotné extrakce vedla nejen ke sníženému ekologickému dopadu na životní prostředí, ale je to i metoda, která extrakci zrychlila a zlevnila. Řadíme sem mikroextrakci na tuhé fázi (SPME), sorbční extrakci na míchadélku (SBSE), mikroextrakce na jedné kapce (SDME) a mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému (DLLME) (4).

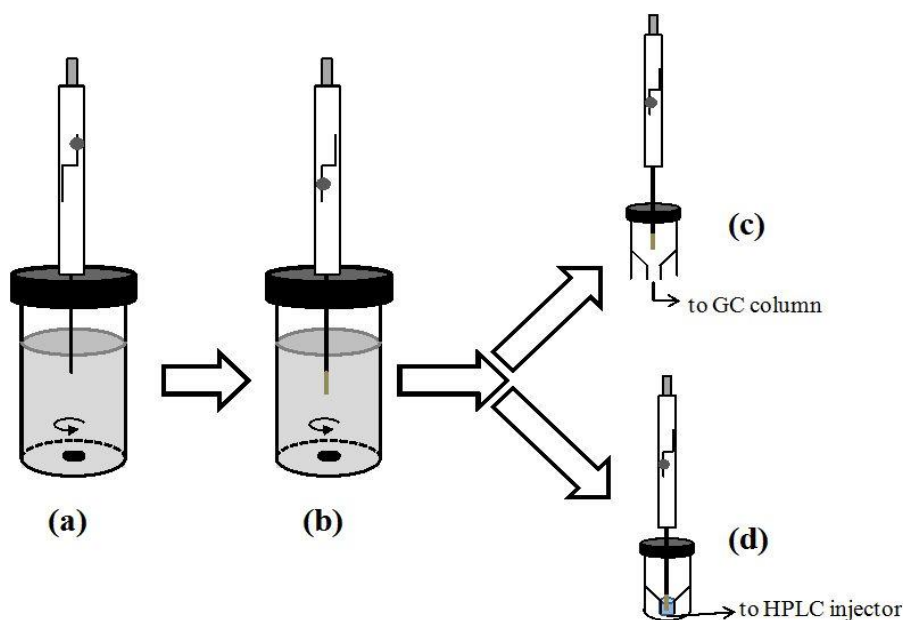
### 2.1.1 SPME

Mikroextrakce byla poprvé představena v roce 1989 jako nová metoda, která se vyznačuje unikátními vlastnostmi. Používá se velmi malé množství rozpouštědel oproti SPE extrakci. Samotná extrakce probíhá na tenkém křemenném vlákne pokrytém vhodným sorbentem. Metoda je levná, jednoduchá a dá se snadno automatizovat. Největší výhodou SPME spočívá ve schopnosti oddělit vzorek od rušivého efektu matrice, který může zkreslit složení vzorku anebo může narušit chromatografickou separaci.

Technika SPME se skládá z absorpce či adsorpce rozpuštěné látky z matrice na tenkou vrstvu silikonu nebo adsorpčního materiálu (a, b) a z následné tepelné (c) nebo kapalně (d) desorpce analytu v dávkovacím zařízení chromatografu. SPME se dá aplikovat jak na plynovou, tak i kapalinou chromatografii. Velké využití má hlavně

v analýze životního prostředí, potravin, těkavých látek a farmaceutických či forenzních vzorků (4) (9) (10).

Hlavním trendem v oblasti SPME je automatizace, in situ odběr vzorku, vývoj aplikací in vivo a vývoj nových povlaků. Tradičně se používá polydimethylsiloxan (PDMS) jako povlak SPME vláken, ale pro extrakci polárních analytů jsou nyní k dispozici polymerní vlákna na bázi polyethylenglykolu a polyakrylátu. Také byly vyvinuty vlákna na bázi kovu, která zlepšují odolnost a mechanické vlastnosti vláken. Další vývoj se ubírá k zvýšení tloušťky povlaku vlákna, které má větší kapacitu a citlivost ale zároveň tento krok může prodloužit extrakční čas potřebný k ustálení rovnováhy. Dalším trendem SPME je použití iontových kapalin jako povlaků, které otevírají možnost navrhnout a upravit povlaky vláken a tím i zvýšit selektivnost metody. Nové aplikace SPME zahrnují stanovení kontaminujících nebo bioaktivních látek přímo v tkáních živých organismů nebo jejího okolí. Zlepšení selektivity extrakce lze také dosáhnout použitím molekulárně vtištěných polymerů (MIPs) jako SPME povlaků, které výrazně zjednodušují analýzu z biologických matric a ze vzorků životního prostředí (10) (11).



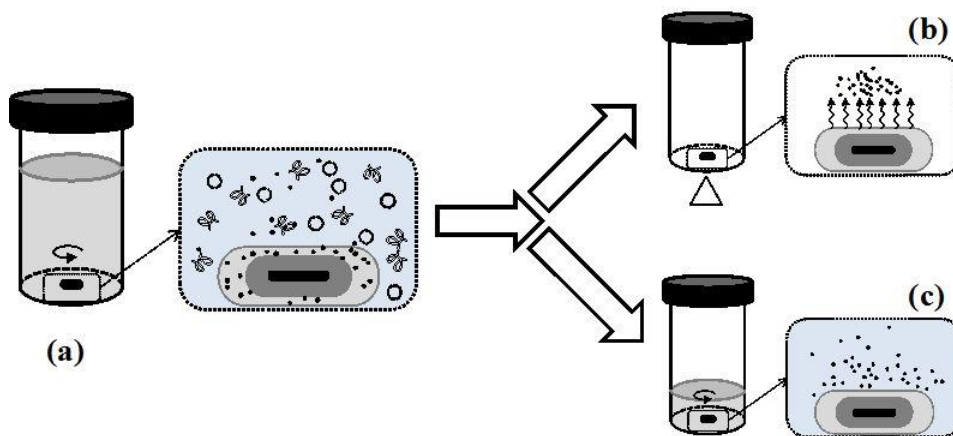
**Obrázek 1** Mikroextrakce na tuhé fázi (12)

### 2.1.2 SBSE

Sorbční extrakce na míchadélku byla představena o deset let později než SPME extrakce. Stejně jako u SPME extrakce se používá i při SBSE malé množství rozpouštědel. Sorbce probíhá na magnetickou tyčinku pokrytou polymerním povlakem (a). Nejvíce používaným polymerním materiálem je PDMS. Extrakce se řídí rozdělovacím koeficientem mezi kapalnou fází a PDMS fází. Po extrakci následuje desorpce analytu pomocí tepelné desorpce (b) nebo zpětné desorpce (c) (4).

V poslední době byly zavedeny i jiné alternativní polární povlaky jako polyakryláty, polyethylenglykoly, kopolymery ethylenglykolu a silikonu, kopolymery divinylbenzenu a methylakrylová kyselina. Uvedené povlaky poskytují mnohem větší výtěžnost (okolo 100%) pro polární léčiva nežli komerčně vyráběné PDMS povlaky (méně než 20%) (10).

SBSE extrakce se nejběžněji používá k extrakci těkavých organických látek, polycyklických aromatických uhlovodíků, pesticidů, polychlorovaných bifenyly a kontaminujících složek z pitných vod (4).



**Obrázek 2** Sorbční extrakce na míchadélku (12)

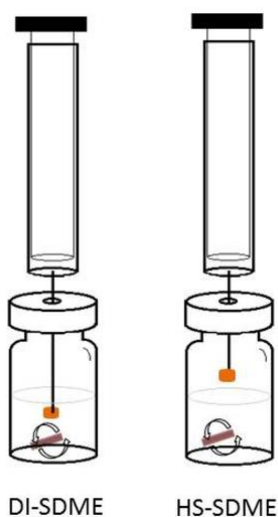
### 2.1.3 SDME

Technika mikroextrakce na jedné kapce se rozvinula díky snaze miniaturizovat extrakci kapalina-kapalina. Organická rozpouštědla jsou vstříknuta ke vzorku pomocí



mikrostríkačky a jejich objem se pohybuje v řádech mikrolitrů. Samotný extrakt je vstříknut do chromatografické kolony přímo bez nutnosti desorpce.

SDME extrakce existuje ve dvou modifikacích (Obrázek 3): přímé vstřikování (DI-SDME) a headspace (HS-SDME). Při DI-SDME extrakci se mikrostríkačka s kapkou rozpouštědla ponoří přímo do vzorku. Zatímco HS-SDME extrakce se provádí v uzavřené nádobě a mikrostríkačka s rozpouštědlem se umístí nad kapalnou fází vzorku. HS-SDME se používá pro extrakci těkavých a méně těkavých látek. Výhodou HS-SDME oproti DI-SDME je lepší stabilita rozpouštědla a rychlejší extrakce. Některá organická rozpouštědla se rychle vypařují a to by mohlo znemožnit extrakci, proto je výhodnější nahradit organická rozpouštědla iontovými kapalinami (4) (13).



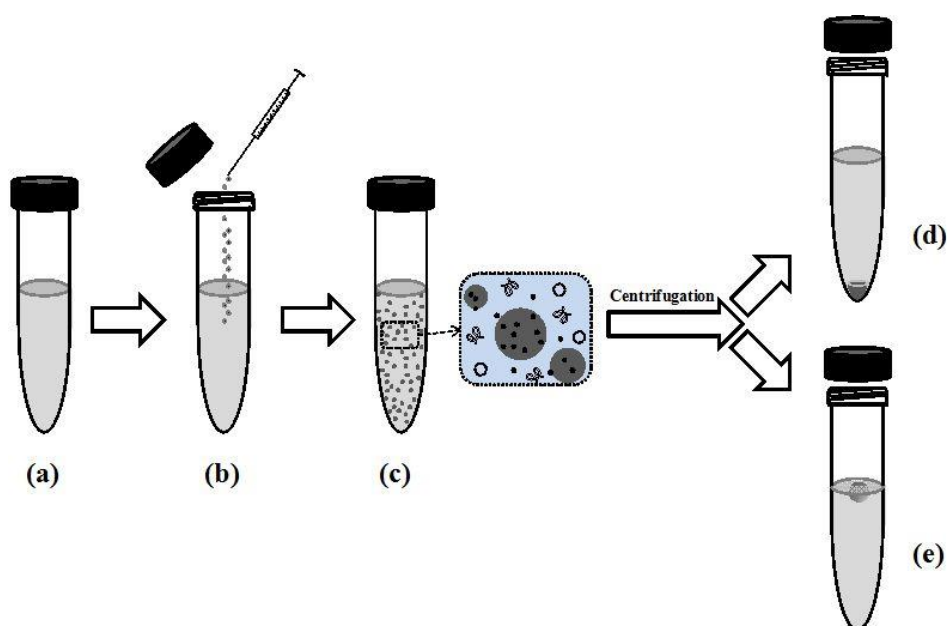
**Obrázek 3** Mikroextrakce na jedné kapce (14)

#### 2.1.4 DLLME

Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému byla poprvé představena v roce 2006. Skládá se ze tří fází: vzorek, extrakční rozpouštědlo o vysoké hustotě nemísitelné se vzorkem a disperzní rozpouštědlo mísitelné s oběma fázemi. Do vzorku (a) se dává předem určený poměr přibližně 1 ml disperzního rozpouštědla s několika  $\mu\text{l}$  extrakčního rozpouštědla (b). Extrakční rozpouštědlo se po nadávkování rozptýlí do vodného roztoku vzorku ve formě kapiček (c) a analyt se v nich rozpustí. Zbylá organická fáze je oddělena centrifugací (d, e). Spotřeba organického rozpouštědla se může více

snížit použitím ultrazvuku nebo náhradou organického rozpouštědla iontovými kapalinami. Další alternativou je použití tuhnutí kapky (SFO) při extrakci. Při této metodě se používají vyšší alkoholy – nonanol, dekanol nebo undekanol jako organická rozpouštědla. Vzorek se extrahuje při nižší teplotě a tím dojde ke ztuhnutí organické fáze, která může být pak mechanicky odstraněna. Mezi hlavní výhody DLLME patří jednoduchost, rychlost, nízká cena a vysoká výtěžnost.

DLLME byly úspěšně použity ve spojení s LC, GC a atomově absorpční spektroskopií k analýze antimikrobiálních látek, organofosforových, organocínitých pesticidů, triazinových a amidových herbicidů, fungicidů, PAU, organofosforových retardérů hoření, PCB, PBDE, trichlormethanů, chlorbenzenů, ftalátových esterů, léčiv a těžkých kovů v životním prostředí (10) (11).



**Obrázek 4** Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému (12)

### 2.1.5 Membránová extrakce

Membránová extrakce je metoda, která používá širokou škálu membrán a používá se na extrakci organických i anorganických látek různých polarit. Metoda se může velice snadno miniaturizovat a tím dosáhnout zmenšení spotřeby jak rozpouštědel, tak i energie. Další výhodou je snadná automatizovatelnost a přímé napojení na chromatografickou

kolonu. Používají se dva typy membrán, jedna je vyrobena z polymeru (polyethylen, polypropylen nebo polydimethyl siloxan) a druhý typ membrány je kapalný. Kapalná membrána se skládá z polypropylenu nebo polytetrafluoroethylenu a v pórech membrány je zakotveno rozpouštědlo. Existují dvě formy membránových extrakcí: dutá vlákna (HF) a ploché archy (FS). Příkladem membránových extrakcí je zakotvená kapalinová membrána (SLM), mikroporézní membránová extrakce kapalina-kapalina (MMLLE), „Membrane Extraction with Sorbent Interface“ (MESI) a „Membrane Assisted Solvent Extraction“ (MASE) (4) (15).

#### **2.1.5.1 SLM**

Membrána je obklopena z obou stran vodným rozpouštědlem a obsahuje póry, ve kterých je zakotveno organické rozpouštědlo-nejčastěji undekan nebo petrolej. Organické rozpouštědlo nesmí být mísitelné s vodou. Separace probíhá na základě difúze analytu mezi zásobním a vymývacím roztokem a řídí se změnou pH. Zásobní roztok obsahuje neionizované formy analytu a přechodem do vymývacího roztoku ionty získávají náboj. SLM se používá k extrakci iontových sloučenin.

#### **2.1.5.2 MMLLE**

Membrána je obklopena z jedné strany organickou fází a z druhé strany vodnou fází. Analyty přecházejí přes membránu díky rozdělovacímu koeficientu voda/organická fáze. Membrána obsahuje mikropóry s organickým rozpouštědlem a je její spojení je kompatibilní s plynovou a kapalinovou chromatografií. Technika se používá především k extrakci organických sloučenin.

#### **2.1.5.3 MESI**

MESI extrakce používá polymerní membránu bez pórů u obou technik – FS nebo HF. Vzorek může být kapalný nebo plynný a je umístěn na jedné straně membrány. Druhou stranu membrány vyplňuje plynná fáze. Analyt je unášen proudem plynu a je sbírán na sorpční kolonu, která je spojena s GC kolonou. Metoda MESI se používá pro extrakci těkavých a méně těkavých látek.

#### **2.1.5.4 MASE**

Membrána u MASE extrakce netvoří póry a rozděluje organickou a vodnou fázi. Používají se zde organická rozpouštědla jako heptan, hexan nebo cyklohexan. Spotřeba rozpouštědel se pohybuje okolo 1ml na analýzu. Používá se hlavně pro extrakci hydrofobních látek (4).

Značnou výhodou membránové extrakce je snížená spotřeba rozpouštědel oproti alternativním extrakčním technikám. Podle americké společnosti EPA SPE extrakce vyžaduje spotřebu 85 ml rozpouštědla na litr vody a LLE extrakce spotřebu 180 ml na extrakci. Zatímco SLM extrakce používá 300  $\mu$ l rozpouštědla zakotveného v membráně a MMLLE extrakce používá méně než 1 ml rozpouštědla na vzorek (15).

#### **2.1.6 Plynná extrakce**

Plynná extrakce se používá pro extrakci těkavých, méně těkavých, nepolárních a slabě polárních látek. Analýza je založena na rozdělení vzorku mezi kapalnou a plynnou fází, přičemž plynná fáze se dále analyzuje na koloně. Plynná extrakce eliminuje kontaminaci kolony nežádoucími složkami matrice. Plynnou extrakci můžeme rozdělit na headspace metody ve statickém nebo dynamickém modu a headspace extrakci na tenké vrstvě (THLS).

##### **2.1.6.1 Statický headspace**

Při statickém headspace je kapalná fáze (vzorek) a plynná fáze statická. Vzorek se umísťuje do vialky a následně je temperován do té doby, než se ustanoví rovnováha mezi kapalnou a plynnou fází. Následně je plynná fáze sbírána ručně pomocí stříkačky nebo automaticky a převedena na chromatografickou kolonu. Zlepšení opakovatelnosti metody lze snadno dosáhnout pomocí automatického dávkování vzorku. Detekční limit statického headspace je ovlivněn následujícími faktory: citlivostí detektoru, bodem varu analytu a rozdělovacím koeficientem mezi plynnou a kapalnou fází. Rozdělovací koeficient se dá snadno ovlivnit změnou teploty, pH nebo přidáním soli, nejčastěji NaCl. Další velmi používanou technikou, která využívá headspace modu je HS-SPME. Obě techniky zkracují dobu extrakce a eliminují matricový efekt. Statická headspace extrakce

se uplatňuje v oblasti izolace těkavých látek z životního prostředí, farmaceutických, biologických a klinických analýzy.

### **2.1.6.2 Dynamický headspace**

Na rozdíl od statického modu, kdy je odebírána plynná fáze nad hladinou vzorku, je dynamický headspace charakterizován přívodem inertního plynu nad vzorek. Inertní plyn unáší těkavé látky a ty jsou následně zachycovány na sorpční trubici. Existují dvě techniky dynamického headspace: první z nich promývá plynnou fázi proudem inertního plynu a při druhé z těchto technik inertní plyn probublává skrz kapalnou vzorek. Jako promývací plyn se používá helium, argon, tekutý dusík a vzduch, která je přečištěný nebo uměle vyrobený.

Používají se různé modifikace dynamického headspace z důvodu zrychlení promývacího procesu extrakce. Použitím kryofokusace, kdy je analyt v kapiláře nejdříve prudce zchlazen tekutým dusíkem a následně je prudce zahříván a převeden na chromatografickou kolonu, se vyřeší problém rozdílného průtoku nosného plynu. Další metoda, kdy je analyt zchlazen přímo na chromatografické koloně se nazývá „Purging with Whole Column Cryotrapping“ (P/WCC). Po sorpci analytu je kolona následně znova zahřívána na počáteční teplotu. Samotná „Purge and Trap“ analýza (PT) může fungovat v otevřeném a uzavřeném systému. Při otevřeném systému jsou analyty pomocí promývacího plynu přivedeny na sorpční kolonu naplněnou pevným sorbentem. Náplň sorpční kolony může být Tenax, Carbopack, Carbosieve, silikagel nebo aktivní uhlí. Analyty jsou následně uvolněny z kolony pomocí vhodného rozpouštědla nebo pomocí tepelné desorpce. U uzavřeného modu plynná fáze cirkuluje v systému a přináší novou dávku vzorku (4) (16).

### **2.1.6.3 Headspace extrakce na tenké vrstvě**

Při této technice se používá speciální TLHS kolona. Tekutý vzorek je přiváděn pomocí pumpy na kolonu a díky gravitaci klesá do spirální temperované skleněné trubice, v protisměru k proudu promývacího plynu. Těkavé sloučeniny spolu s vodou tak přecházejí z kapalnou fáze do plynnou fáze a jsou přiváděny na další kolonu, kde dochází k jejich zkondenzování. Vzorek se izoluje z vodné fáze a dále je analyzován pomocí

plynového chromatografu. Mohou se analyzovat i látky, které nejsou tolik těkavé nebo které jsou částečně mísitelné s vodou (4).

## **2.2 Rozpouštědla**

Extrakce využívá značné množství rozpouštědel, proto by se nebezpečná organická rozpouštědla měla zaprvé omezit nebo nahradit. Vědci se nejvíce zaměřují na nové postupy, které minimalizují spotřebu rozpouštědel anebo dovolují jejich samotnou recyklaci. Těmito všemi kroky se zmírňuje dopad na životní prostředí. V posledních letech se pozornost zaměřila na alternativní rozpouštědla, jako jsou iontové kapaliny, oxid uhličitý, superkritická voda a fluorovaná rozpouštědla.

### **2.2.1 Iontové kapaliny**

Iontové kapaliny jsou organické soli skládající se z organického kationtu a anorganického nebo organického aniontu s teplotou tání od  $-81^{\circ}\text{C}$  do  $125^{\circ}\text{C}$ . Vyznačují se řadou unikátních vlastností: nízká těkavost, termostabilita, nehořlavost, nízká toxicita, mísitelnost s vodou i organickými rozpouštědly, dobrá extrahovatelnost a vodivost. Oproti organickým rozpouštědlům jsou stabilní i do  $300^{\circ}\text{C}$  a nevypařují se do ovzduší, proto jsou častou alternativou těkavých organických rozpouštědel. Používají se pro extrakci různých analytů, od škodlivých látek obsažených v životním prostředí po nanomateriály a biomakromolekuly. Iontové kapaliny se také používají mimo jiné k separaci látek v plynové nebo kapalinové chromatografii. Mají velký potenciál k použití v SLM extrakci, chirální separaci, jako matrice pro MALDI-MS anebo jako sensory v elektrochemické analýze (4) (17).

### **2.2.2 Superkritická fluidní extrakce**

Extrakce probíhá do rozpouštědla, které je v nadkritické teplotě a tlaku. Nejčastěji se používá jako extrakční činidlo oxid uhličitý, ale může se použít i oxid dusný, ethan, propan, n-pentan, amoniak, fluoroform, fluorid sírový nebo voda. Oxid uhličitý vyniká různými vlastnostmi, jako je bezpečnost, snadná dostupnost, levnost a nízká toxicita. Další výhodou oxidu uhličitého přináší použití relativně nízké teploty ( $32^{\circ}\text{C}$ ) a tlaku ( $7,3\text{ MPa}$ ) k uvedení do superkritického stavu. Oxid uhličitý extrahuje pouze nepolární nebo méně polární látky, přidavkem methanolu při extrakci se můžou extrahovat i více polární

látky. Při superkritické fluidní extrakci se minimalizuje spotřeba organických rozpouštědel nebo se nepoužívají vůbec. Umožňuje specifickou extrakci, i když dochází k malé změně tlaku nebo teploty. Nevýhoda superkritické fluidní extrakce je instrumentální náročnost na teplotu i tlak a omezená extrakce polárních látek (4) (16).

### **2.2.3 Subkritická extrakce vodou**

Pro subkritickou extrakci se používá přehřátá voda (100 - 374 °C) při podkritickém tlaku (1-6 MPa) v kapalném skupenství. Subkritická voda dokáže rozpustit i nepolární látky, protože zvýšená teplota narušuje vodíkové můstky a tím i snižuje její polaritu. Zvýšená teplota také zapříčiňuje nižší permitivitu, viskozitu a povrchové napětí. Naopak rychlost difúze je přímo úměrná teplotním změnám. Subkritická voda je zcela netoxická, velmi účinná a levná alternativa organických rozpouštědel. Používá se pro extrakci široké řady analytů z různých druhů matric. Může se použít i pro extrakci středně těkavých nebo málo těkavých látek, protože se v subkritickém stavu chová stejně jako organické rozpouštědlo (4) (18).

### **2.2.4 Fluorovaná rozpouštědla**

Nový směr zelené chemie se ubírá k používání třífázové extrakce kapalina-kapalina, která se skládá z fáze vodné, organické a fluorované. Fluorovaná fáze snadno separuje analyty, je recyklovatelná, neměla by být mísitelná s vodnou ani s organickou fází a analyty by se měli rozpustit pouze v této fázi. Může omezit spotřebu toxických rozpouštědel jako je diethyl-ether, dichlormethan, chloroform nebo aceton.

Fluorované fáze jsou charakteristické následujícími vlastnostmi: mají podobnou teplotu varu, při zvýšené teplotě tvoří homogenní roztok s organickou fází a dobře se v nich rozpouští plynné látky. Fluorovaných rozpouštědel se hlavně aplikují na odseparování produktů organických syntéz (4).

## **2.3 Modifikované extrakce**

Klasické extrakce kapalina-kapalina nebo kapalina-tuhá fáze mohou být modifikovatelné pomocí zvýšeného tlaku a teploty anebo použitím mikrovln či ultrazvuku. Metody jsou více účinné a mají menší dopad na životní prostředí. Do této

skupiny zahrnujeme extrakci pomocí mikrovln nebo ultrazvuku a extrakci za zvýšené teploty a tlaku.

### **2.3.1 Extrakce pomocí mikrovln**

Mikrovlny nabízejí alternativní zdroj energie pro extrakci analytů z matric, zahřívají celý objem vzorku najednou anebo mohou vzorek „rozmělnit“ nebo homogenizovat. Expozicí mikrovln mohou být těkavé látky nebo voda odstraněny ze vzorků a jejich obsah může být dále stanoven. Spotřeba rozpouštědel se pohybuje okolo 25-50 ml na vzorek a doba extrakce jedné dávky je snížena o 10-20 minut. Využití mikrovln pro extrakci se využilo hlavně u organochloridových pesticidů, středně těkavých látek, PAU, PCB, fenolů, dioxinů, furanů a růstových herbicidů. Dále se používají pro extrakci drog ze séra nebo proteinů z krve, protože celková doba extrakce je zkrácena oproti jiným metodám (4) (19).

### **2.3.2 Extrakce pomocí ultrazvuku**

Působením ultrazvuku na vzorek se zlepšuje extrakce v několika směrech: zvýšená teplota zlepšuje rozpustnost a vodivost vzorku, zvýšený tlak způsobuje účinnější extrakci do pevné nebo kapalné fáze, výtěžnost je vyšší, čas extrakce se zkracuje a extrakční podmínky jsou mírnější. Ultrazvuk se také používá k různé úpravě vzorků: homogenizaci potravinových vzorků, derivatizaci organických i anorganických látek nebo digesci minerálů a potravin. Ultrazvukové vlny také zlepšují rychlost rozpouštění pevných vzorků a toho se hlavně využívá při analýze potravin. Další výhodou ultrazvuku je jeho schopnost odplyňovat kapalné vzorky.

### **2.3.3 Extrakce za zvýšené teploty a tlaku**

Extrakce za zvýšené teploty a tlaku (PLE) je běžně používaná metoda pro extrakci organických složek z biologických materiálů, potravin a životního prostředí. Díky této metodě se můžou stanovovat i stopové prvky z potravinových složek. Většinou se používají ekologicky šetrná rozpouštědla jako je voda, methanol a ethanol, ale neupouští se ani od využití organických rozpouštědel. Spotřeba rozpouštědel je snížena na 1-20 ml na vzorek oproti klasickým metodám, kdy spotřeba rozpouštědel činí až 200 ml. Zkrátila se také doba extrakce z 24 h (Soxhletova extrakce) na pouhou půl hodinu. Další výhodou



PLE je, že zvýšený tlak extrakce způsobuje rychlejší penetraci vzorku a zvýšená teplota zvyšuje rozpustnost a difúzní rychlost analytu a naopak snižuje viskozitu a povrchové napětí rozpouštědla (4).

### 3 Zelená chromatografie

Chromatografie je separační metoda, která se velmi hojně používá ve všech oblastech analytické chemie. Separace je založena na rovnovážné distribuci analytů mezi stacionární a mobilní fází. Při kapalinové chromatografii se používají v hojném množství jako mobilní fáze organická rozpouštědla, která znečišťují životní prostředí, přičemž jeden kapalinový chromatograf může vygenerovat více než 1 litr organického odpadu za den. U plynové chromatografie se používají plynné mobilní fáze, které jsou sice neškodné, ale jejich zdroje jsou omezené. Proto vznikl koncept zelené chromatografie, který se řídí 12 pravidly zelené chemie, a tyto pravidla výrazně omezují negativní dopad chromatografie na životní prostředí (4) (8) (10) (20).

#### 3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se obecně považuje za méně zelenou metodu, protože separační krok vyžaduje použití organických rozpouštědel. Teoreticky jeden kapalinový chromatograf vybaven běžnou kolonou (délka 15-25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm a velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ) vygeneruje při průtoku 1 ml/min 1500 ml odpadu za den, což znamená 500 l odpadu za rok. Jenže některé velké společnosti používají až stovky chromatografů ve svých provozech, což má za následek generaci tisíce litrů odpadu za den. Přímým způsobem, jak omezit spotřebu rozpouštědel, je zkrátit dobu analýzy, aniž by se tím zvýšil průtok mobilní fáze. Pro každou separaci může být vypočtena spotřeba objemu organických rozpouštědel ( $V$ ) s danou průtokovou rychlostí ( $F$ ) za jednotku času analýzy ( $t$ ) podle následující rovnice:

$$V = F \times t$$

Rychlá separace může být dosažena pomocí monolitických kolon, zvýšením teploty mobilní fáze, použitím plně porézních částic menších než 2  $\mu\text{m}$  (sub-2 $\mu\text{m}$  částice) s UHPLC systémy nebo použitím povrchově porézních částic. Další metody jak zmírnit spotřebu organických rozpouštědel souvisí se změnou kolony, a to zmenšením jejího průměru nebo délky. Zmenšením vnitřního průměru kolony také přispělo k snížení

průtoku mobilní fáze, což významně přispívá k „ozelenění“ této metody. V posledních letech nabyla na významu také miniaturizace HPLC systému nebo využití kapilárních nebo „microbore“ kolon. Kromě omezení spotřeby rozpouštědel je vhodné nahradit toxická organická rozpouštědla těmi více zelenými (ethanol, voda, oxid uhličitý). Další možnost spočívá v nahrazení normální fáze reverzní fází, kde slouží jako mobilní fáze i čistá voda. Zmenším retenčního času a snížením spotřeby rozpouštědel se dosáhne také používáním C8 nebo C4 stacionárních fází namísto C18 fází při separaci alifatických analytů. Další alternativa nabízí vyhnout se gradientové eluci separace, pokud je to výhodné, protože generuje více organického odpadu než isokratická eluce. Poslední možností může být nahrazení HPLC metody, jinou chromatografickou metodou jako je GC nebo SFC (3) (4) (8).

### 3.1.1 Instrumentace

Snížením délky a průměru kolony, zmenšením částic, miniaturizací celého HPLC systému a použitím speciálních čerpadel můžeme dosáhnout „zelenější“ instrumentace, i když se zachová separační schopnost a citlivost metody.

Redukcí délky kolony se zkrátí doba analýzy i spotřeba rozpouštědel, jenže nevýhoda spočívá ve snížení separační účinnosti metody. Proto se snížením délky kolony se musí snížit i velikost částic, aby se zachovala efektivnost analýzy. Pro 15 cm kolonu musíme použít částice velikosti 5 $\mu$ m a pro kolonu dlouhou 5 cm použijeme částice 2 $\mu$ m, abychom zachovali přibližně stejný počet teoretických pater. Dalším přístupem ke snížení objemu kolony je redukce vnitřního průměru kolony ze 4,6 mm na 2 mm a méně. Kolony s vnitřním průměrem pod 2 mm zvyšují citlivost metody a používají se často ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). V porovnání s kolonami o průměru 4,6 mm, 2 mm kolony spotřebují 1/5 rozpouštědel a microbore kolony s průměrem 1 mm pouze 1/20 rozpouštědel při stejné lineární rychlosti. Další miniaturizací průměru kolon vznikly mikro a nanolitrová čerpadla, která se vyrovnávají s extra vysokým tlakem způsobeným právě miniaturizací kolon a pracují při nižší průtokové rychlosti. Využitím uvedených čerpadel můžeme zvýšit citlivost a účinnost metody zejména pokud jsou k dispozici pouze malé objemy vzorků. Spolu s těmito čerpadly vznikli nové modifikace kapalinové chromatografie: microbore, narrowbore, nano a kapilární LC. Pro porovnání typy LC i s hodnotami průměru kolon a průtokovou rychlostí jsou uvedeny (Tabulka 3) (2) (4) (8) (21).

Miniaturizací HPLC systému vnikli LC na čípech (HPLC-chip) kam řadíme nano LC techniku, která je přímo spojená s nanosprej LC/MS systémem. Čipy minimalizují nezbytný počet spojů na minimum a tím zvyšují přesnost analýzy a snižují mrtvý objem. Ozelenění této metody také spočívá v používání nízkoprútokových čerpadel, která spotřebují méně rozpouštědel než klasická čerpadla. Při použití nanosystémů se spotřebuje pouze nepatrné množství rozpouštědla (v rozmezí několik desítek litrů rozpouštědla za měsíc) a navíc může být použito pouze velmi malé množství vzorku (10-60nl) (8) (21).

**Tabulka 3** Rozdělení LC technik podle vnitřního průměru kolony a průtokové rychlosti (8)

LC technika	vnitřní průměr (mm)	průtoková rychlost (μl/min)
<b>Konvenční LC</b>	4,6	1000
	4,0	750
	3,0	430
<b>Narowbore LC</b>	2,1	210
	2,0	100
<b>Microbore LC</b>	1,0	47
<b>Kapilární LC</b>	0,5	11
<b>Nano LC</b>	0,1	0,5

### 3.1.1.1 Microbore LC

Microbore technika výrazně omezuje spotřebu rozpouštědel, protože používá kolony s průměrem v rozmezí 1- 0,500 mm a průtoková rychlost činí 100-500μl/min. Kolona s průměrem 1mm a průtokovou rychlostí 70 μl/min spotřebuje 1,1 ml za analýzu. Navíc užší kapilární systém a nižší průtoková rychlost zvyšuje citlivost metody a snižuje rozšíření píků na koloně v porovnání s klasickými kapilárními systémy.

Micro LC kolony sice umožňují snížit spotřebu rozpouštědel, ale jejich použití v rutinní analýze je velmi omezené vzhledem k instrumentálním požadavkům, obtížnosti naplnění kolony a sníženému počtu teoretických pater v porovnání s kolonami se stejnou

délkou a velikostí částic. Microbore LC se používá pro analýzu drog, proteinů, peptidů, anorganických sloučenin, hormonů, neurotransmiterů a toxinů (4) (8).

### **3.1.1.2 Kapilární LC**

Kapilární LC používá ještě menší průtokovou rychlost a užší kapilární systém, než microbore technika. Používá se kolona s průměrem 100-500  $\mu\text{m}$  a průtoková rychlost činí 1-25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Pro srovnání klasická kolona s průměrem 4.6 mm spotřebuje 12 ml rozpouštědla na analýzu, zatímco kolona s průměrem 300  $\mu\text{m}$  spotřebuje pouze 39  $\mu\text{l}$  rozpouštědla na stejnou analýzu. Kapilární LC používá dva typy čerpadel: kapilární a klasické čerpadlo spojené s rozdělovačem. Klasické čerpadlo generuje rychlost průtoku v mikrolitrech pomocí regulátoru průtoku, rozdělovače nebo pomocí obojího, zatímco kapilární čerpadlo generuje rychlost průtoku v mikrolitrech přímo a je také dražší. Kapilární LC mají nízký detekční limit a proto se používají detektory jako UV, detektory diodového pole (PDA) a MS.

Stejně jako u kapilární elektroforézy se mohou používat i při kapilární LC kapiláry pokryté oxidem křemičitým. Dalším ochranným materiálem může být polyimid, nebo polyether ketony (PEEK). PEEK nahradily stávající křemičité kapiláry a jsou to materiály chemicky stabilní, robustní a flexibilní. Byly vyvinuty také křemičité kapiláry pokryté tenkým filmem PEEK označené jako PEEKsil kapiláry.

Kapilární LC není ještě tak široce používaná k separaci analytů, ale byly popsány případy jejího využití k analýze proteinů, peptidů, drog, metabolitů, neurotransmiterů, pesticidů, flavonoidů, nukleotidů a složek životního prostředí. Kapilární LC byla také vyvinuta Plotkou A. pro stanovení vitaminů E v kosmetickém průmyslu (4) (8) (10).

### **3.1.1.3 Nano LC**

Nano LC používá čerpadla, která generují průtokovou rychlost pouze 200  $\text{nl}/\text{min}$  a existují obdobně jako u kapilární LC dva typy čerpadel: nano a klasická s rozdělovačem. Díky velmi nízké průtokové rychlosti a detekčnímu objemu se používají hmotnostní detektory ve spojení s nanosprej technikou. Nano kolony s vnitřním průměrem 75,65,50,25 nebo 20  $\mu\text{m}$  jsou pokryté oxidem křemičitým, PEEK nebo PEEKsil materiálem.

Oproti klasickému LC systému je nano LC systém náročný na obsluhu i provoz. Problémem je příliš úzký kapilární systém, který může být ucpán částicemi a tím se ovlivní tlak v koloně. Ucpání systému může také způsobit problémy v průtoku a ty se velice špatně řeší, protože průtoková rychlost mobilní fáze je příliš nízká. Navíc je instrumentace velice drahá a proto se v praxi moc nepoužívá. Nano LC kolony se nejvíce používají k identifikaci a kvantifikaci proteinů. Své uplatnění našly i v analýze biologických vzorků a potravin (4) (8).

### **3.1.2 Rozpouštědla**

Nejvíce běžně používaným rozpouštědlem v LC separaci je acetonitril. Díky jeho unikátním vlastnostem jako je nízká acidita, minimální chemická reaktivita, nízký UV cut-off, nízká viskozita a schopnost rozpustit širokou škálu látek, se acetonitril nejvíce používá při RP-LC separacích. Na druhou stranu je to rozpouštědlo toxické, hořlavé a těkavé a navíc jeho likvidace je nákladná a má negativní dopad na životní prostředí. Další typicky používaná mobilní fáze při RP-LC je methanol, který je také toxický ale na rozdíl od acetonitrilu jsou náklady na jeho likvidaci nižší. Proto je snaha nahradit acetonitril ekologicky šetrnějšími rozpouštědly (methanol, ethanol, voda, aceton) kdykoliv je to možné (3) (8).

#### **3.1.2.1 Ethanol**

Etanol je zařazen mezi zelená rozpouštědla díky jeho nízké toxicitě, nízkému nákladu na likvidaci a možnosti syntézy z obnovitelných zdrojů energie. Má ale i některé nevýhody jako je vysoká viskozita ve směsi ethanol/voda. Avšak s rozvojem UHPLC systému, který poskytuje tlaky okolo 100 MPa, vyšší viskozita nehraje tak velkou roli. Tendence nahrazení acetonitrilu nebo methanolu směsí ethanol/voda v LC separaci je doložena zvyšujícím se počtem publikací zabývajícím se tímto postupem. Nahrazení acetonitrilu může být také pomocí směsi propylen uhličitan/ethanol, která je také více ekologicky šetrná. Propylen uhličitanu je velmi často používán jako aprotické rozpouštědlo v analytické chemii a organické syntéze. I přes nahrazení acetonitrilu ethanolem a směsí propylen uhličitan/ethanol je stále zachováno eluční pořadí analytů, retenční časy, účinnost a symetrie píků. Avšak i přes tyto výhody, ethanol stále patří mezi nebezpečná a hořlavá rozpouštědla (7) (8).

### 3.1.2.2 Aceton

Aceton je také dobrou alternativou, protože má dobré solubilizační vlastnosti a je dokonale mísitelný s jinými rozpouštědly jako je např. voda. Nicméně se nepoužívá jako běžné rozpouštědlo, protože je velmi těkavý a důsledkem toho vznikají komplikace při čerpání LC pumpou. Navíc absorbuje UV v oblasti do 340 nm a tudíž je nemožné aceton použít pro UV detekci (3).

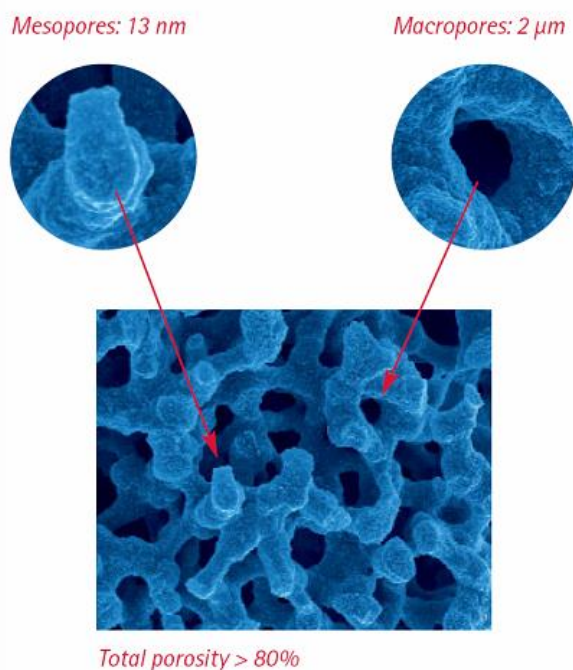
### 3.1.2.3 Voda

„Ozelenění“ mobilní fáze lze také dosáhnout nahrazením organických rozpouštědel čistou horkou vodou. V posledních letech používání vody jako eluentu nabylo na velké pozornosti a zájmu vědců. Voda snižuje nejen náklady ale i expozici potenciálně toxických rozpouštědel. Existují tři specifické důvody, proč by měla být voda používaná jako mobilní fáze při RP-LC analýze: redukce opadu a znečištění, zvýšení rozsahu použití a výkonnosti detekce a možnost vyvinutí LC techniky tak, aby byly uzpůsobené a aplikovatelné pro on-line chemickou analýzu. Metoda je známá jako „Superheated Water Chromatography“ (SHWC), „Subcritical Water Chromatography“ (SBWC) nebo „Chromatography in Very Hot Water“, kde jako mobilní fáze je použita čistá voda za zvýšené teploty (7) (8).

### 3.1.3 Monolitické kolony

Monolitické kolony se vyznačují unikátními vlastnostmi z hlediska propustnosti a efektivity a skládají se z jediného kusu porézního materiálu, který vyplňuje celý vnitřek kolony. Skládají se ze dvou typů pórů (Obrázek 5): velké póry (makropóry) zajišťují rychlý tok mobilní fáze skrz monolit a rychlou výměnu hmoty mezi stacionární a mobilní fází a středně velké póry (mesopóry) poskytují monolitu dostatečně veliký povrch, a tím i vysokou separační kapacitu. Existují různé typy monolitu, jak anorganické (na bázi oxidu křemičitého, zirkoničitého a titaničitého) tak i organické (z polymethakrylátu, polystyren-divinyl benzenu a polyakrylamidu), z nichž nejvíce používané jsou na bázi oxidu křemičitého. Pórovitost monolitických kolon zajišťuje vysokou propustnost a nižší zpětný tlak v koloně než konvenční kolony naplněné plně porézními částicemi. Nižší zpětný tlak v koloně umožňuje použít vyšší průtokovou rychlost (až 10 ml/min) za účelem zrychlení separace. Monolitické kolony se sice používají pro zrychlení doby analýzy, ale

kvůli komerčně nedostupným průměrům kolon (2 mm nebo 3 mm) v běžných délkách, se nepovažují za nejsilnější „zelenou“ volbu v chromatografické separaci. Kromě toho široké využití těchto kolon v analýze životního prostředí není běžná díky omezené komerční dostupnosti různých stacionárních fází. Další nevýhoda pórovitého materiálu je jeho nestejnorodá pórovitost ve středu a na kraji kolony a omezená chemická stabilita monolitu na bázi oxidu křemičitého. Všechny tyto nedostatky omezují jejich aplikaci v analýze životního prostředí. Nicméně zelená kapalinová chromatografie může někdy těžit z použití monolitické stacionární fáze, protože tyto kolony nabízí možnost využít mobilní fáze o vyšší viskozitě, například směs ethanol/voda. Monolitické kolony také umožňují použít rychlejší průtoky mobilní fáze, ale jen v případě zmenšení vnitřního průměru kolony se sníží spotřeba rozpouštědel (8) (22).



**Obrázek 5** Monolitická kolona -průřez (22)

### 3.1.4 Plně porézní sub-2 $\mu$ m částice a UHPLC

Klasické kolony plněné plně porézními sub-2  $\mu$ m částicemi zvyšují efektivnost, rychlost i přenos hmoty oproti kolonám s klasickými částicemi 5  $\mu$ m nebo 3,5  $\mu$ m. Tyto

částice snižují dobu analýzy, protože optimální průtok ( $\mu$ ) je nepřímo úměrný velikosti částic ( $d_p$ ) podle vzorce:

$$\mu = vD_m/d_p$$

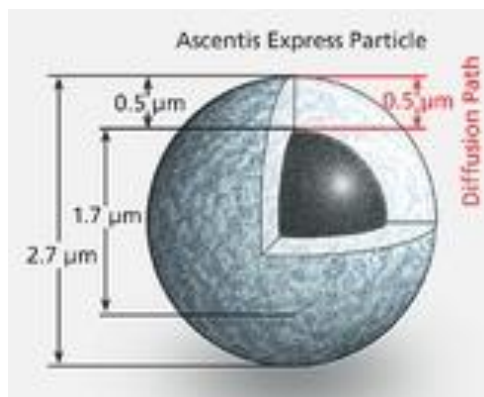
kde  $v$  je průtok mobilní fáze a  $D_m$  je difúzní koeficient analytu v mobilní fázi. Sub-2  $\mu\text{m}$  plně porézní částice dovolují použít vyšší průtokovou rychlost za účelem zkrácení doby analýzy, aniž by došlo ke ztrátě účinnosti a rozlišení. Nicméně hlavním omezením používání těchto částic je vznik vysokého zpětného tlaku v koloně, který brání používání klasických HPLC metod. Proto se tento problém musel vyřešit zlepšením chromatografických metod v podobě ultra účinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Termín UHPLC se používá k definici metody, kdy se používají plně porézní sub-2  $\mu\text{m}$  částice s tlaky přesahujícími 40 MPa. Avšak běžně komerčně dostupné UHPLC systémy vydrží tlak v rozmezí 60-120 MPa. Navíc tyto systémy mohou urychlit separaci analytů z 10 min (HPLC) až na 1 min (UHPLC) při zachování stejné výkonnosti systému. Urychlením analýzy se snižuje spotřeba rozpouštědel při použití těchto malých částic současně s kratšími a užšími kolonami. Pro srovnání 5 cm kolona naplněná sub-2  $\mu\text{m}$  částicemi je dostačující k získání přibližně stejných teoretických pater jako 15 cm kolona naplněná 5 $\mu\text{m}$  částicemi. UHPLC metoda již byla použita k analýze drog, metabolitů, proteinů a biomarkerů (4) (8).

### 3.1.5 Povrchově porézní částice

Povrchově porézní částice se sub-3  $\mu\text{m}$  velikostí představují alternativní možnost pro vysoce rychlou analýzu látek při použití tradičních LC systémů. Použití kolon naplněných těmito částicemi je další způsob, jak zkrátit dobu analýzy a přitom zachovat účinnost kolony za relativně nízkých tlaků. Typické sub-3  $\mu\text{m}$  povrchově porézní částice se skládají ze 1,7  $\mu\text{m}$  pevného jádra obklopeného 0,5  $\mu\text{m}$  vrstvou porézního silikagelu o celkové tloušťce 2,7  $\mu\text{m}$  (Obrázek 6). Existují také sub-3  $\mu\text{m}$  povrchově porézní částice s průměrem jádra 1,9  $\mu\text{m}$  a 0,35  $\mu\text{m}$  vrstvou porézního silikagelu nebo sub-2 $\mu\text{m}$  povrchově porézní částice. V porovnání s plně porézními částicemi, povrchově porézní částice zlepšují účinnost chromatografické kolony a snižují zpětný tlak na koloně. Tenká vrstva porézního silikagelu umožňuje rychlejší difúzi analytu ze/do stacionární fáze (rychlejší přenos hmoty) a umožňuje provoz při vyšších průtocích bez ztráty efektivity.



Povrchově porézní částice tedy snižují dobu analýzy, průtokovou rychlost a tím i spotřebu rozpouštědel. Používají se pro analýzu léčiv, potravin, biologických a environmentálních vzorků (8).



**Obrázek 6** Povrchově porézní částice (23)

### 3.1.6 Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (HTLC)

Dalším diskutovaným parametrem kapalinové chromatografie je teplota a její vliv na separaci analytů. Zvýšená teplota může výrazně snížit retenční časy v kapalinové chromatografii a tím i vytíženost a provozní náklady LC instrumentace. Snížená viskozita mobilní fáze při zvyšujících se teplotách umožňuje použít kolony s velmi malými částicemi a s vyššími průtokovými rychlostmi. Například byla provedena UHPLC-UV metoda pro analýzu devíti sulfonamidů v povrchových a odpadních vodách za zvýšené teploty. V této studii byly sulfonamidy separované Zorbax SB C18 kolonou (150 mm×4,6 mm; 1,8 μm velikost částic) za teploty 60 °C pouze 3 minuty s použitím průtokové rychlosti 1,5 ml/min.

Díky zvýšené teplotě, procento acetonitrilu jako organického modifikátoru mohlo být sníženo až o 20%, což vede ke snížení spotřeby rozpouštědel a dělá tuto analýzu zelenější. Moderní RP kolony jsou stabilní většinou jen do 90 °C. Kolony tvořené oxidem kovu (oxid zirkoničitý, oxid titaničitý, oxid hlinitý) a kolony plněné polymerem jsou teplotně stabilní až do 200 °C. Spotřeba organických rozpouštědel při použití těchto kolon za vysoké teploty může být tedy významně snížena a tím i její náklady na likvidaci (8) (24).

## **4 Metody využívající principu zelené chromatografie**

Následující kapitola obsahuje stručnou rešerši článků, ve kterých byly použity zelené postupy se zaměřením na LC instrumentaci. Jsou zde popsány informace o použitých mobilních fázích, kolonách, LC instrumentaci a dalších postupech, které pomohly uvedené metody označit za „zelené“. Kapitola nemá za cíl uvést všechny typy zelených postupů používaných k stanovení různých typů látek za posledních deset let, ale jen nastínit pár vybraných.

### **4.1 Stanovení umělých sladidel v nápojích pomocí vysokoteplotní kapalinové chromatografie spojené s MS s použitím zelené mobilní fáze**

Nový analytický postup zahrnuje použití vody a nízkého procenta ethanolu v kombinaci s HTLC/MS k analýze devíti sladidel z různých druhů nápojů. Metoda umožnila analýzu za 23 min a spotřeba ethanolu činila 0,85 ml. Separace byla provedena na RP koloně (150 mm × 3,0 mm; 4 μm velikost částic) s průtokovou rychlostí 0,4 ml/min. Nejčastěji byly detekovány sladidla typu sukralóza a acesulfam (25).

### **4.2 Vývoj a validace zelené vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení kofeinu a některých umělých sladidel v nealkoholických nápojích**

Metoda byla vyvinuta pro stanovení acesulfamu K, sacharinu, aspartamu a obsahu kofeinu v nealkoholických nápojích bez použití toxických organických rozpouštědel. Separace byla provedena na koloně C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μm velikost částic) za použití směsi ethanol-fosfátového pufru (80:20, v/v) jako mobilní fáze. Průtoková rychlost činila 0,8 ml/min a optimální separace bylo dosaženo za 15 minut (26).

### **4.3 Vývoj zelené chromatografické metody pro souběžné stanovení potravinových barviv**

Metoda byla použita pro separaci a stanovení osmi syntetických potravinových barviv (Tartrazine E 102, Quinoline Yellow E 104, Sunset Yellow E 110, Carmoisine E 122, Ponceau 4R E 124, Allura Red E 129, Indigo Carmine E 132 and Brilliant Blue E 133) bez použití organických rozpouštědel. Barviva byla separována pomocí HPLC

systemu a jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr s příměsí Triton X-100 (0,25% v/v). Samotná separace proběhla na koloně C18 (250 mm×4,6 mm; 5 μm velikost částic) s průtokovou rychlostí 1-1,5 ml/min (27).

#### **4.4 Stanovení oktopaminu, synefrinu a tyraminu v citrusech pomocí iontových kapalin pro zlepšení „zelené“ chromatografie**

Pro stanovení oktopaminu, synefrinu a tyraminu byly použity jako mobilní fáze iontové kapaliny bez přídavku těkavých organických rozpouštědel. Separace proběhla pomocí klasického HPLC systému na C18 koloně (250 mm×4,6 mm; 5 μm velikost částic) s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min. Iontové kapaliny zlepšily rozlišení, zvýšily retenci a zamezily chvostování separovaných píků (28).

#### **4.5 Ekologicky šetrná („zelená“) RP-LC metoda pro stanovení UV filtrů v kosmetice**

Zelený postup založený na RP-LC s gradientovou elucí používající ekologicky šetrná rozpouštědla byl vyvinut pro stanovení 18 UV filtrů obsažených v opalovacích krémech. Mobilní fáze byly založeny na směsi ethanolu a kyseliny octové (1%) nebo octanu sodného (1%). Separace byla provedena na C18 koloně (125 mm×4 mm; 5 μm velikost částic) s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Metoda byla validována pro analýzu UV filtrů z různých druhů matric (krém, make-up, rtěnka, tělové mléko, tělová voda) (29).

#### **4.6 Vývoj zelené analytické metody pro analýzu statinů**

Byla vyvinuta zelená analytická metoda pro stanovení pravastatinu, fluvastatinu a atorvastatinu pomocí HPLC/DAD. Metoda využívá mobilní fázi na bázi ethanolu s přídavkem kyseliny mravenčí (50:50, v/v). Byly studovány různé druhy náplní stacionární fáze (různé velikosti částic, monolitické kolony, povrchově porézní částice), ale jako nejlepší kompromis mezi časem analýzy, separací a efektivitou se ukázala C18 kolona (50 mm×4,6 mm; 3 μm velikost částic) s průtokovou rychlostí 1 ml/min (30).

#### **4.7 Separace přírodních cytostatik pomocí povrchově porézní stacionární fáze**

V tomto článku porovnávali chromatografické chování 6 různých stacionárních fází (5  $\mu\text{m}$  plně porézní částice, 2,6  $\mu\text{m}$  povrchově porézní částice, s různou délkou alkylového řetězce) pro separaci camptothecinu a skupiny blízké přírodních léků proti rakovině (luotonin A) za různých experimentálních podmínek. Pro rychlé kvantitativní stanovení protinádorových látek z buněčných kultur byly vybrány následující HPLC podmínky: C 18 kolona s povrchově porézními částicemi (50 mm $\times$ 3 mm; 2,6  $\mu\text{m}$  velikost částic), směs vody a acetonitrilu jako mobilní fáze a průtoková rychlost 0,7 ml/min. Tato nová metoda zredukovala požadovanou spotřebu acetonitrilu o 71 % a zkrátila dobu separace pod 8,5 minut (31).

#### **4.8 Průmyslové použití zelené chromatografie - I. Separace a analýza niacinamidu v pleťových krémech za použití čisté vody jako mobilní fáze**

V této práci byla zkoumána separace niacinu a niacinamidu za použití čisté vody jako elučního činidla a tří druhů stacionárních fází při různých teplotách a průtocích. Byly použity dvě C18 kolony (100 mm $\times$ 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$  velikost částic) a (100 mm $\times$ 4,6 mm; 3,5  $\mu\text{m}$  velikost částic) při 60 °C a jedna C18 kolona (150 mm $\times$ 4,1 mm; 3  $\mu\text{m}$ ) při 80°C. Průtokové rychlosti se pohybovaly podle druhu kolony mezi 1-2 ml/min. Hlavní výhodou této nově vyvinuté zelené metody je eliminace organických rozpouštědel potřebných v mobilní fázi a přímá aplikace v průmyslovém odvětví bez jakýkoliv úprav stávajícího HPLC systému (32).

#### **4.9 Průmyslové použití zelené chromatografie - II. separace a analýza konzervantů v pleťových krémech pomocí SBWC**

V této studii bylo vyvinuto několik HTLC a SBWC (Subcritical Water Chromatography) metod pro separaci a analýzu konzervantů v Olay pleťových krémech. Efektivní separace a kvantitativní analýza konzervačních látek byla dosažena na čtyřech komerčně dostupných kolonách: C18 (100 mm $\times$ 4,6 mm; 3  $\mu\text{m}$  velikost částic), C18 (100 mm  $\times$  4,6 mm; 3  $\mu\text{m}$  velikost částic), phenyl (100 mm $\times$ 4,6 mm; 3,5  $\mu\text{m}$  velikost částic) a PS (100  $\times$ 4,6 mm; 3  $\mu\text{m}$  velikost částic) při teplotách 100-200 °C. Průtokové rychlosti se pohybovaly okolo 1-2 ml/min. Jako mobilní fáze byla použita směs voda/methanol,

přičemž HLTC technika zredukovala spotřebu o 90% než stávající HPLC metoda. U SBWC byla použita jako mobilní fáze čistá voda (33).

#### **4.10 Separace ochranných opalovacích faktorů obsažených v pleťové kosmetice pomocí HLTC a SBWC**

Separace ochranných opalovacích faktorů byla dosažena pomocí vysokoteplotní kapalinové chromatografie a subkritické vodné chromatografie při teplotách 90-250 °C. V této práci byly použity C18 kolony o rozměrech (100 mm×4,6 mm; 3 μm velikost částic) a (100 mm×2,1 mm; 3,5 μm velikost částic). Průtoková rychlost u HTLC činila 0,7 ml/min a u SBWC byla 1 ml/min. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol/voda a v případě SBWC čistá voda. Je třeba zdůraznit, že uvedené techniky snížily nebo zcela eliminovaly (SBWC) spotřebu methanolu, ale zato vykazují horší separační účinnost a rozlišení než tradiční HPLC systém (34).

#### **4.11 Hodnocení MEPS extrakce a micro-LC/MS jako zelený přístup v bioanalýze**

V tomto článku bylo zkoumáno použití micro-LC/MS pro separaci a kvantifikaci proléčiva AZD6319 vyvinutého pro léčení Alzheimerovy choroby. Pro extrakci byla použita metoda mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS). Studie byla zaměřena na použitelnosti menších průměrů kolon, jako je 1 mm a 0,3 mm s délkou kolon 5 cm a velikostí částic 1,7 μm; 2,7 μm a 3 μm. Průtoková rychlost u (50 mm×1 mm) byla 70 μl/min a u (50 mm×0,3 mm) byla 10 μl/min. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a mravenčanu amonného, přičemž spotřeba rozpouštědla klesla o 80% v porovnání s průměrem kolony 2,1 mm (35).

#### **4.12 Zelená chromatografická separace analytů různé polaritě s použitím polyethylenglykolové stacionární fáze a málo toxické mobilní fáze na bázi vody**

Jednoduchá, levná a ekologicky šetrná HPLC metoda byla vyvinuta a validována pro separaci čtyř sloučenin s různými chemickými vlastnostmi: 4-aminofenol, kofein,

paracetamol a propyfenazon. Jako hlavní eluční činidlo byla použita voda s přidavkem triethylaminu 0,04% (v / v). Separace byla provedena na RP polyethylenglykolové koloně (15 mm×4 mm; 3 µm velikost částic) s průtokovou rychlostí 1ml/min. Použitá polyethylenglykolová stacionární fáze poskytla specifickou selektivitu, která vyřešila problém se separací látek různých polarit (7).

Souhrnné informace o jednotlivých popisovaných metodách jsou uvedeny v následující tabulce:

**Tabulka 4** Přehled zelených metod používaných v praxi

Stanovované látky	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtoková rychlost	Typ LC instrumentace	Citace
umělá sladidla	RP (150×3,0 mm; 4 µm velikost částic)	ethanol	0,4 ml/min	HTLC	(25)
kofein a umělá sladidla	C18 (250×4,6 mm; 5 µm velikost částic)	ethanol/fosfátový pufr	0,8 ml/min	HPLC	(26)
potravinová barviva	C18 (250×4,6 mm; 5 µm velikost částic)	fosfátový pufr, příměs Triton X-100	1-1,5 ml/min	HPLC	(27)
adrenergní aminy	C18 (250×4,6 mm; 5µm velikost částic)	iontové kapaliny	1 ml/min	HPLC	(28)
UV filtry	C18 (125×4 mm; 5 µm velikost částic)	ethanol/kyselina octová nebo octan sodný	0,5 ml/min	LC	(29)
statiny	C18 (50×4,6 mm; 3µm velikost částic)	ethanol, přidavek kyseliny mravenčí	1 ml/min	HPLC	(30)

léky proti rakovině	C18 core-shell (50×3 mm; 2,6 µm velikost částic)	voda/acetonitril	0,7 ml/min	HPLC	(31)
niacinamid	C18 (100×2,1 mm; 3,5 µm velikost částic) C18 (100×4,6 mm; 3,5 µm velikost částic) C18 (150×4,1 mm; 3 µm velikost částic)	voda	1-2 ml/min	HPLC	(32)
konzervanty	C18 (100×4,6 mm; 3 µm velikost částic) C18 (100×4,6 mm; 3 µm velikost částic), phenyl (100×4,6 mm; 3,5 µm velikost částic) PS (100×4,6 mm; 3 µm velikost částic)	voda/methanol	1-2 ml/min	HTLC SBWC	(33)
ochranné opalovací faktory	C18 (100 ×4,6 mm; 3 µm velikost částic) C18 (100×2,1 mm; 3,5 µm velikost částic)	voda/methanol	0,7-1 ml/min	HTLC SBWC	(34)
proléčivo AZD6319	C18 (50×0,3 mm; 1,7 µm velikost částic) C18(50×1,0 mm; 1,7 µm velikost částic) C18 (50×1,0 mm; 3,0 µm velikost částic) C18 (50×0,3 mm; 2,7 µm velikost částic)	acetonitril/mra- venčan amonný	10-70 µml/min	micro- LC	(35)
4-aminofenol, kofein, paracetamol, propyfenazon	RP polyethylenglykolová (15 ×4 mm; 3 µm velikost částic)	voda, s přídavek triethylaminu a kyseliny octové	1 ml/min	HPLC	(7)

## Závěr

Koncept zelené chemie vynalézá nové postupy a procesy, které redukuje nebo úplně eliminují škodlivý vliv nebezpečných látek. Tato myšlenka se aplikovala do všech oblastí chemie a tím i do chromatografických procesů, kterým se zabývá předkládaná bakalářská práce. Hlavním problémem práce v laboratoři jsou toxická organická rozpouštědla, která mají negativní dopad jak na životní prostředí, tak i na samotné zdraví personálu. Rozpouštědla se hojně používají k extrakci analytů z matrice nebo jako eluční činidla v chromatografické separaci. Řešení spočívá v nahrazení organických rozpouštědel ekologicky šetrnými médii nebo ve snížení jejich spotřeby především pomocí miniaturizace laboratorní instrumentace a i dalším zmenšováním objemů rozpouštědel při přípravě vzorků. Při vývoji nového systému je nutné brát v úvahu nejen jeho nezávadnost, ale i analytické vlastnosti metody. Pro porovnání ekologicky šetrných metod vznikla databáze NEMI, kde jsou analytické postupy hodnoceny podle daných kritérií. Analytikové tak mohou posoudit stupeň „zeleně“ dané metody.

První část bakalářské práce je věnována přípravě vzorku a stručnému přehledu ekologicky šetrných metod. Snížení spotřeby rozpouštědel je dosaženo miniaturizací samotné extrakce, aplikací „zelených“ kapalin nebo zvýšením účinnosti extrakce pomocí zvýšené teploty a tlaku, ultrazvuku či mikrovln. Miniaturizace v tomto ohledu proběhla v podobě nových forem extrakce pomocí tuhé fáze a extrakce kapalina-kapalina. Nové trendy se dále ubírají k vývoji nových materiálů, jako jsou např. polyethylenglykoly, polyakryláty, kovy, kopolymery nebo MIPs. Další vývoj přinesl membránové extrakce, které používají minimální množství rozpouštědel nebo plynné extrakce. Nový směr zelených medií se ubírá směrem k iontovým kapalinám, které mohou nahradit stávající organická rozpouštědla, díky jejich vysoké termostabilitě. Mezi další zelené modifikace patří extrakce pomocí superkritické kapaliny jako je např. oxid uhličitý, subkritická extrakce vodou nebo extrakce pomocí fluorovaných rozpouštědel. Uvedené alternativní metody extrakce jsou nejen ekologicky šetrné, ale často i levnější a účinnější.

Druhá část práce popisuje nové postupy týkající se samotné zelené kapalinové chromatografie. Přímý způsob, jak snížit spotřebu rozpouštědel, se našel v podobě zkrácení doby analýzy. Například monolitické kolony umožňují používat vyšší průtokové rychlosti, ale jen při použití užších kolon se sníží spotřeba rozpouštědel. Problémem je komerční nedostupnost užších kolon, a proto monolitické kolony nejsou první volbou



zelené separace. Plně porézní částice jsou také velmi efektivní volbou rychlé separace. Nejenže zrychlují dobu analýzy, ale snižují i zpětný tlak v koloně a tak se mohou používat i s klasickými LC systémy. Další volbou mohou být plně porézní částice s velikostí do 2  $\mu\text{m}$ , jenže ty zvyšují zpětný tlak v koloně. Proto se musejí používat s UHPLC systémy, které jsou tomuto tlaku přizpůsobeny. Jiný způsob, jak snížit spotřebu rozpouštědel, se nachází v miniaturizaci kolonového systému v podobě micro-LC, kapilární-LC a nano LC techniky. Jenže tyto techniky se zatím příliš nepoužívají díky vysoké ceně a složitější instrumentaci. Své uplatnění našly i zelené rozpouštědla jako je především ethanol a voda. Ethanol je poměrně málo toxický a jeho náklady na likvidaci jsou o poznání nižší než u běžně používaného organického rozpouštědla acetonitrilu. Dalším parametrem, který snižuje dobu analýzy a tím i spotřebu rozpouštědel, je zvýšená teplota mobilní fáze, která přispívá k používání vyšších průtokových rychlostí a menších částic. Spolu se zvýšením teploty mobilní fáze se začaly používat kolony tvořené oxidem kovu (Zr) nebo polymerem, které umožňují využívat teploty až do 200 °C.

V poslední části práce jsou rozebrány nově vyvinuté techniky využívající zelenou chromatografii k separaci analytů. Skoro ve všech článcích jsou použita ekologická rozpouštědla, jako je ethanol nebo voda. V ostatních článcích se můžeme setkat s iontovými kapalinami nebo fosfátovým pufrem. V jedné studii byla použita i směs acetonitrilu k stanovení proléčiva na Alzheimerovu nemoc, ale jeho spotřeba nebyla tak vysoká, protože byla použita micro-LC technika s průtokovou rychlostí 10-70  $\mu\text{l}/\text{min}$ . V další studii byla použita také směs acetonitrilu a vody, jenže spotřeba acetonitrilu byla snížena o 71 %. Jako stacionární fáze byly použity převážně C18 kolony s klasickými velikostmi částic a pro analýzu léků proti rakovině byly použity i povrchově porézní částice, které zkrátily dobu analýzy. Ve většině studií byla použita klasická HPLC instrumentace, ale někteří autoři využívali i HTLC a SBWC techniky.

## Seznam použité literatury

1. *Basics of Green Chemistry*. [Online] 16. 10 2014. [Citace: 23. 2 2015.]  
<http://www2.epa.gov/green-chemistry/basics-green-chemistry#ppa>.
2. Majors R. E., Raynie D. The Greening of the Chromatography laboratory. *LCGC North America*. 11. 2 2011, str. 29.
3. Plotka A., Tobieszewski M., Sulej A. M., Kupaska M., Górecki T., Namieśnik J. Green chromatography. *Journal of chromatography A*. 2013, 1307.
4. Garda de la M., Garrigues S. *Handbook of green analytical chemistry*. Pondicherry : Publisher Services, 2012. ISBN:9780470972014.
5. RCRA online. [Online] 19. 10 2012. [Citace: 9. 3. 2015.]  
<http://www.epa.gov/epawaste/inforesources/online/index.htm>.
6. *TRI program*. [Online] 15. 1 2015. [Citace: 9. 3. 2015.] <http://www2.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/tri-data-uses>.
7. Šatínský D., Brabcová I., Maroušková A., Chocholouš P., Solich P. Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and low-toxic water-based mobile phase. *Analytical and Bioanalytical chemistry*. 2013, DOI:10.1007/s00216-013-7003-1.
8. Shaaban H., Górecki T. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. *Talanta*. 2015, 132, stránky 739-752.
9. Hinshaw J. Solid-phase extraction. *LCGC Asia Pacific*. 2012.
10. Tobieszewski M., Namiesnik J. Developments in green chromatography. *LCGC Europe*. 2014.
11. Farré M., Pérez S., Goncalves C., Alpendurada D. B. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, 29, str. 11.
12. José A., Rodríguez J. A., Aguilar-Arteaga K., Díez Ch., Barrado E. Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples. *Agricultural and Biological Sciences*. 2013, 13, DOI:10.5772/54962.
13. Čížková A., Adam M., Pavlíková P., Ventura K. Analýza složek silic v bylinných nápojích s využitím metody mikroextrakce jednou kapkou. *Chemické listy*. 2011, 105, stránky 13-15.

14. Padrón E. T., Afonso-Olivares CH., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J. J. Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples. *Molecules*. 2014, 19.
15. Jönsson J. Ä., Mathiasson L. Membrane extraction for sample preparation. *LCGC Europe*. 2003.
16. Štěbra K., Dostálek P., Karabín M. Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chemické listy*. 2011, 105, stránky 603-610.
17. Hanusek J. Iontové kapaliny-nový směr v "zelené" chemii. *Chemické listy*. 2005, 99.
18. Zychová M., Růžičková M., Macák J., Janda V. Vlastnosti použití superkritické vody. *Chemické listy*. 2013, 107, stránky 126-135.
19. Rhodes L. Microwave-assisted extraction using U.S. EPA Method 3546. *The application notebook*. 2002.
20. Základní charakteristiky chromatografického procesu. [Online] 4. 4 2013. [Citace: 21. 3 2015.] <http://www.hplc.cz/>.
21. Smejkal P., Foret F. Mikrofluidika v bioanalytické instrumentaci. *Chemické listy*. 2012, 106, stránky 104-112.
22. Monolitické kolony. [Online] 3. 6 2010. [Citace: 12. 4 2015.] <http://www.hplc.cz/>.
23. Ascentis® Express Columns for Fast HPLC. [Online] [Citace: 15. 4 2015.] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841436>.
24. Wenclawiaka W. B., Giegoldab S., Thorsten T. High-Temperature Liquid Chromatography. *Analytical Letters*. 2010, 41, stránky 1097-1105.
25. Ordoñez E. Y., Rodil R., Quintana J. B., Cela R. Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*. 2014.
26. Sik B. Development and Validation of a Green High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Some Artificial Sweeteners and Caffeine in Soft Drinks. *Food Analytical Methods*. 2012, 5, stránky 1443-1452, DOI: 10.1007/s12161-012-9385-7.
27. Khanavi M., Hajimahmoodi M., Ranjbar M. A., Oveisi M. R., Ardekani M. R. S., Mogaddam G. Development of a Green Chromatographic Method for Simultaneous

- Determination of Food Colorants. *Food Analytical Methods*. 2011, 5, stránky 408-415.
28. Tang F., Tao L., Luo X., Ding L., Guo M., Nie L., Yao S. Determination of octopamine, synephrine and tyramine in Citrus herbs by ionic liquid improved 'green' chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1125, stránky 182-188, DOI:10.1016/j.chroma.2006.05.049.
29. Salvador A., Chisvert A. An environmentally friendly ("green") reversed-phase liquid. *Analytica Chimica Acta*. 2005, 537, stránky 15-24.
30. Assassi A. L., Roy C., Perovitch P., Auzeerie J., Hamon T., Gaudin K. Green analytical method development for statin analysis. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1380, stránky 104-111.
31. González-Ruiz V., Ana I. Olives, M. Antonia Martín\*. Challenging core-shell stationary phases with the separation of closely related anti-cancer compounds: performance studies and application to drug quantitation in cell cultures with multi-well plate clean-up. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1364, stránky 83-95.
32. Yang Y., Strickland Z., Kapalavavi B., Marple R., Gamsky Ch. Industrial application of green chromatography—I. I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase. *Talanta*. 2011, 84, stránky 196-174, DOI:10.1016/j.talanta.2010.12.044.
33. Yang Y., Kapalavavi B., Gujjar L., Hadrous S., Marple R., Gamsky C. Industrial application of green chromatography – II. Separation and analysis of preservatives in skincare products using subcritical water chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*. 2012, 34, stránky 466-476, DOI:10.1111/j.1468-2494.2012.00738.x.
34. Kapalavavi B., Marple R., Gamsky C., Yang Y. Separation of sunscreens in skincare creams using greener high-temperature liquid chromatography and subcritical water chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*. 2011, 34, stránky 169-175, DOI:10.1111/j.1468-2494.2011.00697.x.
35. Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M. Evaluation of microextraction by packed sorbent and micro-liquid chromatography– tandem mass spectrometry as a green approach in bioanalysis. *Biomedical Chromatography*. 2012, 27, stránky 1225-1233, DOI:10.1002/bmc.2839.