

Dostáváte do ruky další, v pořadí druhý, svazek edice Historie instrumentálních technik, která si vzala za úkol uchovat písemné svědectví o zavádění důležitých technik instrumentální analytické chemie v bývalém Československu. Druhý díl vychází díky úsilí autorů vzpomínek, firmy Thermo Fisher Scientific a celé řady dobrovolných editorů. Zatímco první díl byl zaměřen na hmotnostní spektrometrii, aktuální svazek vypráví o kapalinové chromatografii, tedy technice, která se ze skromných začátků vyvinula v zásadní nástroj analytické chemie používaný téměř v každé dnešní laboratoři. Není náhodou, že kapalinová chromatografie přichází v naší edici hned po hmotnostní spektrometrii, protože právě úspěšné spojení těchto dvou metod zásadním způsobem přispělo k rozvoji moderní analytické chemie.

Ze stránek knihy na čtenáře znovu promluví poutavé vyprávění československých pamětníků. Tentokrát je jich 13 a jsou to: Pavel Jandera, Dušan Berek, Jaroslav Franc, Václav Ineman, Jozef Lehotay, Miroslav Flieger, Miroslav Macka, Zbyněk Plzák, Milan Popl, Karel Šlajz, František Švec, Stanislav Vozka a Milan Minárik.

Věříme, že si publikace opět nalezne své čtenáře a stejně jako v případě předchozího dílu podpoří zájem o historii oboru. Příjemné čtení.

ISBN 9788090504554



9 788090 504554

Vydáno Českou společností
pro hmotnostní spektrometrii
www.czechms.org

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého
17. listopadu 1192/12
771 46 Olomouc

POČÁTKY A HISTORIE ČESKOSLOVENSKÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE



POČÁTKY A HISTORIE ČESKOSLOVENSKÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

Thermo
SCIENTIFIC

pragolab



Chromatografie je jako v medicíně antibiotika
Jaroslav Franc

Dostáváte do ruky druhý díl knižní edice, která si vzala za úkol popsat skrze vyprávění pamětníků vývoj instrumentálních metod analytické chemie v bývalém Československu. Po prvním díle zaměřeném na hmotnostní spektrometrii následuje nyní kapalinová chromatografie. Pořadí v naší edici je tedy opačné, než v experimentálním uspořádání LC-MS, které dnes představuje dominantní analytickou techniku pro celou řadu aplikací. Považujte to prosím z naší strany za jemný „cimrmanovský vtíp“.

První chromatografické experimenty prováděl Cvět jen pár let před tím, než Thomson a Aston vypracovali metodu hmotnostní spektrometrie. Další vývoj byl ale už časově poměrně odlišný. Zatímco na instrumentaci náročná a nákladná vakuová technika hmotnostní spektrometrie se v prvních letech rozvíjela pomalu a na oddělených specializovaných pracovištích, což platí jak pro svět, tak i pro Československo, chromatografické metody se postupně staly standardním vybavením chemických laboratoří. Hmotnostní spektrometrie se až teprve nyní stává součástí běžných laboratoří a až v současné generaci se setkáváme s kompaktními hmotnostními spektrometry na obyčejných laboratorních stolech, na kterých pracují specialisté z jiných oborů, než je sama hmotnostní spektrometrie. V (nejen) kapalinové chromatografii nastala podobná situace mnohem dříve, což je dobře vidět i na vzpomínkách třinácti pamětníků zahrnutých v této publikaci. Oproti prvnímu dílu jsou pamětníci kapalinové chromatografie více rozeseti po větším počtu odlišných pracovišť a jejich aplikační působení je pestřejší. Také v této knize máme možnost ochutnat z dobové atmosféry laboratoří, kdy badatelé pracovali mnohdy na přístrojích

vyrobených ve vlastních dílnách, anebo ve Vývojových dílnách ČSAV. Může to být právě tato skutečnost, která činila dobu pionýrskou, a o to vzácnější jsou tyto vzpomínky v dnešní době, kdy prakticky všechna přístrojová technika je komerčně dostupná a bádání se posunulo více do oblastí aplikací.

Více než v prvním díle se vzpomíná na dobové problémy politické, společenské vztahy a dokonce i na českou a slovenskou národnostní otázku. To je ale pochopitelné. Vědecký pracovník nepůsobí ve vakuu či uzavřený v koloně (ani tehdy když s vakuem a kolonou pracuje) a okolní prostředí je nedílnou součástí vzpomínek na vědecký vývoj v kapalinové chromatografii.

Byl to T.S. Elliot, který pravil „*Sometimes things become possible if we want them bad enough*” a na životě pamětníků v této knize je vidět, že v souladu s tímto citátem dokázali i přes nezanedbatelné okolní obtíže vydobýt ve svém poli působení značný pokrok. Za to jim patří velký dík a zaslouží si, abychom se do jejich vzpomínkového vyprávění ponořili s velkou a ničím nerušenou pozorností.

Příjemné čtení.

Jaroslav Pól (ThermoFisher Scientific, Praha)

Michael Volný (MassInsight, San Diego)

**POČÁTKY A HISTORIE
ČESKOSLOVENSKÉ KAPALINOVÉ
CHROMATOGRAFIE**



EDICE HISTORIE
INSTRUMENTÁLNÍCH TECHNIK

**PRAHA
2015**

Foto na úvodní obálce: Karel Šlajz měří svoji diplomovu práci na drátáku (drátový transportní detektor), rok 1973.

POČÁTKY A HISTORIE ČESKOSLOVENSKÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRFIE

Copyright © 2015 Česká společnost pro hmotnostní
spektrometrii
All rights reserved.

Vydala Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii,
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého
17. listopadu 1192/12, Olomouc 771 46, IČ: 22858938.

Vydání první

Editoři edice: Jaroslav Pól a Michael Volný

Editoři knihy: Lucie Nováková, Michal Douša, Jan Havliš, Petr
Bednář, Jaroslav Pól

Autorům zůstávají práva k jednotlivým kapitolám.

Předmluva © 2015 Jaroslav Pól a Michael Volný

Logo edice © 2012 Martin Strohalm

Logo společnosti © 2012 Martin Strohalm

Loga publikována se svolením.

ISBN 978-80-905045-5-4

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii

PRAHA 2015

Redakce

Editoři edice:

Jaroslav Pól (Thermo Fisher Scientific, Praha)

Michael Volný (MassInsight, USA)

Editoři knihy:

Lucie Nováková (Univerzita Karlova, Hradec Králové)

Michal Douša (Zentiva, Praha)

Jan Havliš (Masarykova Univerzita, Brno)

Petr Bednář (Univerzita Palackého Olomouc)

Jaroslav Pól (Thermo Fisher Scientific, Praha)

Odborní konzultanti:

Pavel Jandera (Univerzita Pardubice)

Tato kniha vznikla za vzájemné spolupráce České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, české pobočky firmy Thermo Fisher Scientific a firmy Pragolab. Vydání bylo realizováno za sponzorského přispění firem Thermo Fisher Scientific a Pragolab.



Thermo
S C I E N T I F I C

pragolab

Obsah

1.	ÚVOD.....	8
2.	DUŠAN BEREK.....	10
3.	MIROSLAV FLIEGER.....	39
4.	JAROSLAV FRANČ.....	51
5.	VÁCLAV INEMAN.....	68
6.	PAVEL JANDERA.....	70
7.	JOZEF LEHOTAY.....	135
8.	MIREK MACKA.....	143
9.	MILAN MINÁRIK.....	177
10.	MILAN POPL.....	190
11.	ZBYNĚK PLZÁK.....	208
12.	KAREL ŠLAIS.....	214
13.	FRANTIŠEK ŠVEC.....	238
14.	STANISLAV VOZKA.....	256

1. ÚVOD

2. DUŠAN BEREK



Narodil se 6. júla 1938 v Zlatých Moravciach, vzdelanie získal na v r. 1960 na Chemicko-technologické fakulte SVŠT v Bratislave. Od roku 1960 pôsobí na Ústave polymérov na Slovenskej akadémii vied v Bratislave. Vedecké zameranie: Kvantitatívny popis termodynamických vlastností ternárnych systémov polymér - polymér - rozpúšťadlo, gélová permeačná

chromatografia – koncentračné efekty, úloha entalpických interakcií, vplyv prímiesí v eluentoch. Návrh série originálnych kvapalinovo-chromatografických metód separácie a molekulovej charakterizácie komplexných polymérových systémov (zmesí polymérov, kopolymérov, funkcionalizovaných oligomérov a stereošpecifických polymérov), vypracovanie patentovaných postupov prípravy a modifikácie silikagelových náplní kolón pre kvapalinovú chromatografiu, štúdium prípravy a aplikácií pórovitých uhlíkových častíc a vlákien. Získal tyto ocenenia: 2004 zvolený za člena Učenej spoločnosti pri SAV, 2002 Technológ roka SR, 1999 Vedec roka v SR, Čestná medaila Polskiego towarzystwa chemicznego, Pamätná medaila Univerzity v Lubline, Zlatá plaketa D. Ilkoviča, SAV, Hanušova medaila Spoločnosti českých chemikov, Zlatá medaila a čestné členstvo Slovenskej chemickej spoločnosti. Publikoval 260 článkov a 60 patentov.

SPOMIENKY

Ospravedlňujem sa čitateľovi za nasledujúce veľmi osobné spomienky, pán editor ich vybral z môjho nesúvislého rozprávania. Je to moja čiastková reminiscencia na neopakovateľné špatno-krásne časy a aj dôkaz toho, ako spoločenská situácia ovplyvní myslenie, a tým aj osud človeka.

RANÁ MLADOSŤ

Môj starý otec bol „pansláv“ – príslušník inteligencie, ohrozenej maďarizačným tlakom. Ako mladý učiteľ musel odísť zo Slovenska do Srbska. V jeho rodisku slovenské školy prakticky neexistovali. V srbskej Báčke sa narodila moja mama a jej traja súrodenci. Po vzniku Československa sa rodina vrátila na Slovensko. Starý otec pracoval ako krajský školský inšpektor v Leviciach. Tam mal dom a rodinu. Po príchode Maďarov po Viedenskej arbitráži v roku 1939 bol pod hrozbami donútený behom 48 hodín a bez majetku z Levíc odísť.

Otec bol sudca. Po zmene politického systému v Československu v r. 1948 bol prenasledovaný komunistami. Štyrikrát ho prepustili zo zamestnania a skončil ako referent v stavebnej organizácii. Matka bola učiteľka. Pre svoje náboženské vyznanie bola perzekvovaná tak za Slovenského štátu, ako aj po nástupe komunistov. Dvakrát musela odísť zo zamestnania. Ťažká situácia rodiny spôsobená politicky motivovanými stratami zamestnania rodičov výrazne ovplyvnila moje zmýšľanie. Na strednej škole sme si založili kapelu a chodili sme po dedinách hrať na svadby. To nám riaditeľ školy zakázal, ale neskôr od nás chcel, aby sme šli hrať na podujatí okresnej straníckej organizácie. Odmietli sme s tým, že ja – hoci som

bol v kapele najmenej dôležitý - mám tesne pred maturitou. Bola z toho dvojka z mravov a maturita bez vyznamenania.

ŠTÚDIUM NA VYSOKEJ ŠKOLE A VEDECKÁ AŠPIRANTÚRA

Zámerne neuvádzam tituly osôb, na ktoré si spomínam. Viaceré sa v priebehu času zmenili a niektoré si už ani nepamätám. Rád by som týmto vyslovil oneskorenú vďaku viacerým mojim dobrodincom a tiež potvrdil, že som svojim anti-dobrodincom dávno odpustil.

História našej rodiny sa samozrejme premietla i do kádrových profilov detí. Moja staršia sestra Milota nesmela študovať na univerzite. Ja som bol mladší a mal to šťastie, že ma zastihol politický odmäk: Na vysokoškolské štúdium som si vybral Chemicko-technologickú fakultu SVŠT v Bratislave, dnes je to Fakulta chemickej a potravinárskej chémie STU. Po prvýkrát prijímacie pohovory nahradili skúšky. Skúšobná komisia bola ku mne veľmi ústretová. Boli v nej tri aktívne straničky, vedeli o mojich kádrových problémoch a napriek tomu odporučili moje aspoň podmienené prijatie na školu. Podmienka znela: "Žiadna skúška dvakrát". Ako uvádzam v ďalšom, jedna z nečleniek komisie, D. Mikulášová výrazne ovplyvnila aj môj ďalší profesionálny život. Štúdium bolo celkom veselé. Veľa závodného športu, inštruktorský kurz a potom každú zimu práca lyžiarskeho cvičiteľa. Neprijemná bola vojenská príprava, zaberala jeden deň v týždni a zahrnovala dve prázdninové sústredenia. Môj prospech zo skúšok „vojenskej prípravy“ bol úbohý a napriek tomu ma vybrali za dôstojníka: Všetkých zo začiatku abecedy. Zato viacerí spolužiaci, ktorí vojenskú prípravu „milovali“ ostali poddôstojníkmi. Ich mená boli na konci abecedy.

Po treťom roku štúdia som sa s prospechom blízko 1,0 (dvojka z marxistickej filozofie) prihlásil na špecializáciu Fyzikálna chémia (tá na SVŠT v Bratislave nebola) na pražskú Karlovu univerzitu. Voľné miesta mali, ale zrejme zavážil môj kádrový posudok. Ostal som v Bratislave. Rozhodujúcu úlohu pri výbere „náhradnej“ špecializácie a potom aj vedeckej orientácie mala D. Mikulášová. Tá si ma zapamätala z prijímacej skúšky na fakultu a stala sa mojím „anjelom strážnym“. Prehovorila ma, aby som šiel na „jej“ Katedru kaučuku a plastov (vedúci J. Gašperík a neskôr J. Beniska), vzala si ma za diplomanta a napriek môjmu kádrovému nedostatku ma odporučila do zamestnania v Slovenskej akadémii vied. Znovu ma podržala, keď ma neskôr z ústavu SAV – tentokrát už z mojich vlastných kádrových dôvodov chceli prepustiť. Po štvrtom ročníku štúdia sme mali predpísanú prázdninovú prax. Mal som priateľov v bývalom NDR a zorganizoval som výmenný študentský pobyt - my do Merseburgu, oni do Bratislavy. Krátko pred odchodom si ma zavolať fakultný „kádrovník“ a oznámil mi, že zájazd je schválený ale vedúci krúžku z kádrových dôvodov nebude môcť ísť. Vtedy ešte nebol postavený berlínsky múr. Tak som namiesto do NDR šiel na prax na Moravu, do Zlína (ako vieme, vtedy sa to mesto volalo inak), do Výzkumného ústavu gumárenské a plastikařské technologie. Bol to pekný, zaujímavý a vydarený mesiac. Ovplynul môj profesionálny život a nechýbalo veľa, aby ovplyvnil aj môj život osobný. Môj vedúci bol Z. Zámorský, výborný chlapík, ktorý svojou mierou prispel k môjmu umiestneniu na budúcom pracovisku, lebo aj on sa za mňa prihovril môjmu budúcomu kolegovi v Akadémii, Z. Maňáskovi. Poučil ma, že závisť v kolektíve ľahko prerastie do nenávisti, ktorú si jej nositeľ ľahko vnútorne odôvodní a tiež to, že nesmiem príliš vytŕčať hlavu. Môžem po nej dostať, prípadne o ňu prísť. V rámci diplomovej práce u D. Mikulášovej som sa venoval očkovaniu

vinylacétátu na ozonizovaný polypropylén. Ozonizátor sa mi podarilo získať za fľašu tvrdého od premietača z bratislavského kina Hviezda, kde ho prestali používať na osviežovanie vzduchu.

Po štúdiách sa mi na fakulte nepodarilo zostať. Šťastie som skúšal na štyroch rôznych katedrách, na ktorých som predtým pracoval ako pomocná vedecká sila alebo viedol cvičenia. Všade mali voľné miesta a aj záujem o mladíka s „červeným diplomom“. Vedúci katedier boli v štátostrane dobre zapísaní, ale v mojom prípade nepochodili. Po štvrtom pokuse si ma na koberec zavolať stranický výbor a oznámil mi, aby som prestal provokovať. Vo výbore sedeli aj bývalí spolužiaci, dvom sme spolu s kolegom D. Bellušom pomáhali pri písomkách. V bufete sme mali „výpočtové stredisko“ vybavené štyrmi „počítadlami“, spolužiakmi s logaritmickými pravítkami. Každý z nás mal k dispozícii dve „počítadlá“. Spolužiak vybavený lekárskej potvrdením, že musí ísť často na WC, vyniesol príklady. S Danielom sme sa rýchlo dohodli, ktoré z nich budeme počítať (na písomkách boli vždy dve skupiny príkladov, bolo treba vypočítať aspoň jeden príklad pre každú skupinu). Výsledky štvormo nezávisle vypočítaných príkladov sme porovnali, ak sedeli, zanesol ich náš kolega pri ďalšej návšteve WC do posluchárne, kde sa písali písomky. Na konci štúdia sme obaja s Danielom dostali posudky podpísané členmi výboru Zväzu mládeže, práve tými, ktorých na škole udržalo naše „výpočtové stredisko“. Stálo v nich, že sme nepomáhali slabším študentom. Ani jedného z nás za asistentov na fakultu neodporučili. Viacerí z nich ostali ako dobrí zväzáci pracovať na fakulte ako asistenti. Daniel mal „umiestnenku“ do Novák a ja do CHZJD Bratislava, závod Duslo v Šali. Nakoniec mi zase pomohla D. Mikulášová, ktorá síce nedokázala presvedčiť fakultnú organizáciu štátostrany, aby som mohol nastúpiť k nej do zamestnania, ale

prehovorila M. Lazára, s ktorým spolupracovala, aby ma vzal do svojho tímu v Slovenskej akadémii vied.

Po nástupe do SAV, do bývalého Ústavu dreva, celulózy a chemických vlákien, som absolvoval šesťmesačnú základnú vojenskú službu v bojovom útvare v Olomouci. Prijímač som pretrpel v Šumperku, bol tvrdý. V Olomouci som dostal čatu, v ktorej boli za trest dvaja farári. Boli to dobrí chlapci, vzájomne sme si pomáhali prežiť vojnu s čo najmenšími problémami. Problémov bolo pravda dosť, v čate som mal aj dvoch straníkov, tí boli najmenej disciplinovaní. Okrem toho bolo v čate 14 cigánov - všetci prišli z väzenia, zväčša z Jáchymova. Jeden z nich bol dvojnásobný vrah, stále pri seba nosil dýku. Menoval sa podobne ako ja, Berky a chlapci ma varovali: „Na toho si dajte pozor, máva amok. Vtedy sa mu oči skryjú pod belmom. Keď dostane záchvat, môže zabíjať.“ Raz som to zažil, po zdanlivo nevinnej hádke, keď mu iný cigán povedal niečo urážlivé. Bol to otrasný zážitok. Štyria na Berkym sedeli a sotva ho udržali. O štvrt hodiny sa upokojil a potom sa na nič nepamätal. Vojnu mi pomohol prežiť basketbal, vtedajší olomoucký tím po Morave dosť cestoval.

Po vojenskej službe som sa vrátil do SAV. Pracoval som pod vedením M. Lazára, ktorý viedol Oddelenie polymérov v Ústave dreva celulózy a chemických vlákien. Mali sme tri miestnosti na Chemickej fakulte SVŠT. Kvôli Slovnaftu Bratislava - márne sme očakávali, že nás bohatý podnik finančne podporí - sme spolu so Z. Maňáskom a J. Pavlincom študovali oxidáciu polypropylénu (PP). Slovnaft práve začal vyrábať polypropylén a amorfný, ataktický stereoizomér (aPP) bol nežiadany vedľajší produkt. Hľadalo sa jeho uplatnenie. Odhadovali sme, že naočkovaním poly(vinyl acetátu) na naoxidovaný aPP a nasledujúcim zmydelnením PVAC dostaneme

materiál so zaujímavými hydrofilno-hydrofóbnymi vlastnosťami. aPP je pri izbovej teplote rozpustný v organických rozpúšťadlách, čo bola veľká výhoda. Mojou prvou úlohou bolo vypracovať metódu na stanovenie hydroperoxidov, ktoré vznikajú na reťazci aPP pri oxidácii. Nemali sme k dispozícii IČ spektrofotometer, a bolo potrebné navrhnuť jednoduchý postup analýzy „na kolene“. Podarilo sa to pomocou jodometrickej titrácie v heterogénnom systéme - chloroform (dobré rozpúšťadlo aPP) / voda (do ktorej sa reakčné produkty vytrepávali, a v ktorej sa odohrávala titrácia). Denne bolo potrebné analyzovať značný počet vzoriek a práca mi dala zabráť. Metóda sa osvedčila a čoskoro sme napísali dve publikácie do ruských Vysokomolekuljarných sojedinenii. S prekladom do ruštiny pomohol aj knihovník J. Bartoš, ktorý krátko predtým nastúpil do ústavu. Publikácie vyšli neskôr aj v anglickom preklade v časopise Rubber Chemistry and Technology a boli slušne citované. To bol pomerne veľký úspech. Jodometrickú metódu používali ešte niekoľko rokov na Katedre polymérov a na Katedre vlákien CHTF aj pre v chloroforme nerozpustný izotaktický PP, bez citácií pôvodných prác. Na fakulte sme mali veľké priestorové problémy. V jednom laboratóriu sme študovali (hlavne ruskú, vtedy prakticky jedine voľne dostupnú literatúru) i experimentovali ôsmi. Každé ráno sa na pracoviskách konal prehľad tlače. Ako nováčikovi mi prischlo niekoľkomesačné organizovanie týchto podivných schôdzí a ak sa referujúci nedostavil, musel som ho zaskočiť. Vtedy som si vypestoval odpor k dennej tlači.

Začal som sa pripravovať na vedeckú prípravu, ašpirantúru. M. Lazár mi oznámil, že v oddelení musí niekto začať s fyzikálnou chémiou polymérov, a že moja dizertácia sa bude venovať práve tomu. Bránil som sa, pretože boli dobre rozbehnuté oxidačné a očkovacie štúdie, ale môj odpor a diskusie a ani podpora Z. Maňáska nepomohli. M.

Lazár mi vybral tému dizertácie: „Zmesi polymérov“, ale ja som si to modifikoval na „Zmesi polymérov v roztoku a roztokové vlastnosti polymérov“ a nakoniec na „Fázové rovnováhy v ternárnych systémoch ataktický polypropylén – polystyrén (PS) – toluén“. Nemali sme prakticky žiadne prístrojové vybavenie, spočiatku som mal k dispozícii len sušiareň a staručké váhy. Až neskôr sme s veľkou slávou kúpili termostat z NDR. Fázové rovnováhy som sledoval v trubičkách s presným vnútorným priemerom z českého sklárskeho podniku v Sázavě. Pomocou magnetu som premiešaval roztoky oboch neznášateľných polymérov a katetometrom, ktorý zhotovili v dielňach SAV som meral objemy fáz. Paralelne som miešané roztoky dvoch polymérov titroval rozpúšťadlom do zániku zákalu. Kolega V. Ďurďovič zostavil plynový chromatograf s pyrolyzérrom. Pomocou neho sme po vysušení analyzovali zloženie zmesí aPP/PS v kvapalných, oddelených fázach. Vznikla na tú dobu neobyčajne vysoko, viac ako 50x, citovaná práca.

Našu experimentálnu prácu sprevádzali zápasy s okolitými pracoviskami o každý meter štvorcový pracovnej plochy. Po presťahovaní sa z fakulty do práve dostavanej budovy Chemického ústavu SAV na Patrónke sme síce dočasne priestorovo expandovali, ale už po niekoľkých mesiacoch sme znovu boli temer dvaja na každú stoličku. Naše oddelenie totiž pomerne rýchlo rástlo a mojou organizačnou úlohou bolo vyhľadávanie posíl. Lietali telegramy, zvonil telefón, naháňal som spolužiakov. Keďže sme boli v študijných skupinách zadelení podľa abecedy, začali do oddelenia pribúdať „béčka“: D. Belluš, B. Böhmer a E. Borsig. Prvých dvoch ich pracoviská uvoľnili bez problémov, ale posledne menovanému „Ebovi“ robili v bývalých Považských chemických závodoch v Žiline problém, odmietli poslať na neho posudok. Počas spoločnej vojenskej služby sa mi podarilo pre neho „vyrobiť“ odporúčenie

vojenského útvaru. Stálo to bagatel', niekoľko pohárov piva... Orazítkované odporúčenie postačilo, aby Eba mohli do SAV prijať. M. Lazár sa o veci dozvedel až po desiatich rokoch. Štyri "béčka" boli na tom politicky pomerne slabšie alebo až slabo a nechceli sa politicky angažovať. Prejavilo sa to neskôr, keď všetci štyria postupne odmietli opakované ponuky na vstup do štátost strany, čo sa v tom čase považovalo za nevídané "bohorúhačstvo". Rady nestraníkov v ústave postupne posilnili F. Szöcs, J. Tiňo, P. Hrdlovič, Š. Florián a D. Lath. Stranícku skupinu vytvorili M. Lazár, A. Romanov, J. Pavlinec, J. Bartoň, M. Čapla, P. Ambrovič, P. Drienovský, O. Kyseľ a M. Šeliga. Poslední traja študovali v bývalom Sovietskom zväze a hlavne P. Drienovský mal rozsiahle politické kontakty. Straníci mali pomôcť na troskách Ústavu dreva, celulózy a chemických vlákien založiť Ústav polymérov. Do vtedajších bojov som ako nestraník nevidel, ale bola to pre mňa osobitá situácia - chcel som, aby vznikol samostatný Ústav polymérov, ale nechcel som zánik Ústavu dreva - v ktorom som mal veľa priateľov. Rozhodnutie nakoniec padlo v pracovni akademika Šorma, predsedu ČSAV. V rámci nesymetrického usporiadania štátu, SAV bola jedným z oddelení ČSAV a zásadné rozhodnutia o jej existencii sa robili v Prahe. Po štyroch rokoch chceli niektorí kolegovia likvidovať Ústav polymérov a založiť Ústav rádiochémie, či Ústav teoretickej chémie. Kvôli zložitej hospodárskej situácii krajiny ich snaženie akademik Šorm nepodporil.

Po zániku Ústavu dreva, celulózy a chemických vlákien SAV, vzniklo samostatné Laboratórium polymérov, neskôr Ústav polymérov SAV. Jeho riaditeľ M. Lazár nové pracovisko rozdelil na dve časti - oddelenie chémie a oddelenie fyziky. Za vedúceho oddelenia chémie ustanovil J. Pavlinca a zo mňa, vtedy ešte interného vedeckého aspiranta sa stal vedúci oddelenia fyziky. Možno to bolo

„bolestné“ za vynútenú zmenu problematiky. Z mojej funkcie vznikali problémy, lebo niektorí starší kolegovia, straníci nechceli akceptovať ako vedúceho „mladé ucho“ a ešte k tomu nestraníka. Pre mňa tá funkcia znamenala hlavne značnú stratu času, vynakladaného na organizačné a rýdzo papierové práce.

Oddelenie polymérov v rámci Ústavu dreva, celulózy a chemických vlákien a neskôr mladé Laboratórium polymérov bolo veľmi aktívne. Externe sme učili na bratislavskej technike i univerzite, usporiadali ČSSR - ZSSR konferenciu o oxidácii polymérov (1961) i prvú bratislavskú medzinárodnú konferenciu o makromolekulách v Smoleniciach (1962). Organizovali sme školenia o aplikáciách polymérov pre technickú verejnosť, napríklad o využití plastov v poľnohospodárstve a podobné akcie. Rozsiahle aktivity pokračovali aj v novom Ústave polymérov (občas nás poštári považovali za Ústav plynomerov).

Vtedajší nedostatok prístrojov je v dnešnej dobe nepredstaviteľný. Československých korún bolo pomerne dosť, ale za ne bolo možné kúpiť len výrobky „krajín socialistického tábora“. Ťažiskom práce v ústave bolo štúdium voľných radikálov v polymérových systémoch. Pracovisko postupne nadobudlo ESR prístroj zo ZSSR a neskôr ďalší z NDR. Rôzne drobné zariadenia vlastnej konštrukcie nám vyrábali sklári a mechanické dielne SAV. Keď sme sa po tvrdom zápase s ostatnými akademickými pracoviskami dočkali menšieho prídeltu devíz, objavili sa ďalšie problémy. Prístroje z USA boli embargované a potrebovali sme potvrdenie tamojších profesorov o tom, že nerobíme vojenský výskum. Tieto a mnohé iné veci z rokov šesťdesiatych sa z dnešného pohľadu zdajú až neuveriteľné. Napríklad, každý list do cudziny (vrátane cudziny „socialistickej“!) musel pred jeho odoslaním na kópii šifrovať priamy vedúci autora,

potom riaditeľ pracoviska a naostatok predseda ústavnej organizácie KSS. Posledný vyžadoval slovenský preklad listu, overený odborníkom na jazyky. Prísť v priebehu mesiaca na „stranu“ so štyrmi listami hraničilo s drzosťou. A predseda sa kontakty so zahraničím rozvíjali, zorganizovali sme nielen spomínané medzinárodné vedecké podujatia, ale dokonca aj výmenný zájazd s kolegami z Lipska. Tento raz mohol vycestovať aj organizátor. Pravda, každý výjazd za hranice bol dlhotrvajúcim zápasom, hrou nervov. Ešte aj začiatkom šesťdesiatych rokov bolo treba mať dokonca aj na cestu do „socialistického zahraničia“ osobitné jednorazové povolenie. Postupnú liberalizáciu sme si vlastne uvedomili až vtedy, keď sme sa museli o kus vrátiť, keď v sedemdesiatych rokoch nastúpilo obdobie „reálneho socializmu“.

ZAČIATKY KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE, OSOBITNE GÉLOVEJ PERMEAČNEJ CHROMATOGRAFIE

V anglosaskej literatúre sa často používa termín „size exclusion chromatography“, ktorý sa v slovenčine neujal. Ostatne, v súčasnosti sa v svetovej literatúre stále častejšie objavuje pôvodný termín „gel permeation chromatography“, GPC.

Už pred obhajobou dizertácie, dostal som na starosť dvoch ďalších aspirantov, po novom doktorandov, B. Böhmera a P. Ambroviča. B. Böhmer sa v rámci svojej dizertačnej práce venoval viskozimetrii ternárnych systémov polymér – polymér – rozpúšťadlo. Publikácia, ktorá vznikla z jeho experimentálnej práce dostala viac ako 50 citácií, čo bolo na tú dobu neobvyklé. Braňo neskôr emigroval do Nemecka. P. Ambrovič študoval znášateľnosť kryštalinických polymérov so stabilizátormi pomocou diferenčnej termickej analýzy.

Ja som postupne opustil termodynamiku zmesových polymérových systémov a ešte pred obhajobou dizertácie na Ústave makromolekulárnej chemie ČSAV v Prahe, som sa dal na gélovú permeačnú chromatografiu. Bol to vlastne začiatok tej metódy na Slovensku. Motivoval ma článok J. Moore v Journal of Polymer Science z roku 1965. Začínali sme – ako inak – bez prístrojov. S kolegom I. Zvarom sme používali sklenené kolóny, v ktorých bola gravitácia hnacou silou prietoku eluenta, umiestneného v Mariottovej fľaši. Koncentráciu separovaných látok v eluáte, zväčša oligomérových polyéterov, sme merali interferometrom z NDR. Každých päť minút sme eluát premerali a keďže vymývanie vzoriek trvalo 16 až 20 hodín, pracovali sme na dve zmeny. Získanie zberača frakcií nám prácu veľmi uľahčilo. Po dvoch dlhých rokoch sme dostali devízy na zakúpenie prietokového UV analyzátora a o ďalší rok sme sa dostali k diferenčnému refraktometru Waters R4. V pražskej Mikrotechne začali vyrábať slušné dvojčinné čerpadlá. Skonštruovali a patentovali sme tlmiče ich pulzov. Princíp prevzala malá US firma, ale na výzvy, aby nám zaplatili za know-how, nereagovali. Eluenty sme odplyňovali varom v sklenenom prietokovom zariadení. Neskôr sme začali využívať elektromotorom poháňané dávkovacie ventily z Vývojových dílen ČSAV. To všetko bol pre nás veľký pokrok, výrazne sme zvýšili produkciu chromatogramov bez ponocovania v laboratóriu. Do kolón sme plnili práškovú celulózu, alumosilikáty a neskôr komerčný dextranský gél Sephadex LH-20. Mobilnou fázou boli metanol, benzén (!), toluén, tetrahydrofurán a acetón, neskôr cadoxén, ako rozpúšťadlo celulózy. Nadviazali sme spoluprácu so Závodným výskumom Nováckych chemických závodov, vtedy pomenovaných po významnom politikovi NDR. Separovali sme produkty nováckeho závodu, poly(etylénoxid)y, etoxylované nonylfenoly a poly(propylén

oxidy, PPO. Stanovovali sme – dnes by som povedal - odhadovali ich priemerné mólové hmotnosti a aj ich disperzity. Pomohli sme im vyriešiť závažný technologický problém, dôvod vzniku chybných várok PPO pre závod v Břeclavi: Obsluha reaktora „pomáhala“ nábehu polyadície pridaním vody do násady, a tým výrazne znižovala mólovú hmotnosť výsledného produktu. Keď sme zistili príčinu problémov pri výrobe polyuretánovej peny, nastúpili závodní „detektívi“ a problém sa vyriešil. Vedúci tamojšieho výskumu L. Novák sa nám za to kráľovsky odplatil, zakúpil pre ústav devízový DSC prístroj. Na ňom si spravil P. Ambrovič dizertáciu. Žiaľ, autohavária prekazila L. Novákovi splniť jeho ďalší sľub, zaobstarat' nám komerčný kvapalinový chromatograf. GPC merania sme v rámci hospodárskych zmlúv robili aj pre niektorých ďalších záujemcov, hlavne pre Považské chemické závody. V tom období sa totiž rozbehol „hospodársky experiment“ a peniaze, ktoré ústavy SAV získali z kontraktov a za poradenskú činnosť, mohli sa využiť na chod ústavov a sčasti aj pre zamestnancov. Ostatne, tak ústav získal prostriedky na výstavbu chaty na Pezinskej Babe. Celú akciu „Baba“ a potrebné brigády nadšene organizovali M. Čapla a J. Tiňo. V zime sme na Babe učili lyžovať naše deti a aj deti kolegov.

V ďalšej etape sme prešli na kovové kolóny, dlhé 1220 mm. Bolo ich v sérii päť až sedem. Plnili sme do nich pórovité sklá CPG z USA, tie sa z neznámych dôvodov dali kúpiť za koruny. Veľkosť ich nepravidelných častíc bola 37 – 71 μm . Pri všetkej našej „automatizácii“ sme pri nepretržitej prevádzke na takom „kolónovom kombajne“ dokázali zmerať len tri vzorky za 24 hodín, prvú dávkovala technička ráno, druhú som nadávkoval podvečer a tretia šla do kolóny v noci, pomocou automatického dávkovacieho ventilu. Pri pohľade späť mi tuhne krv v žilách - je až neuveriteľné, že sme nevyhoreli.

Neskôr prišla okupácia ČSSR, vznik federácie i jej postupná demontáž a roky „normalizácie“. Namiesto M. Lazára sa riaditeľom ústavu stal A. Romanov a jeho zástupcom bol O. Kyseľ. Pre mňa to bolo osobitne náročné obdobie, pretože informácia o mojej naivnej a neuváženej kritike invázie spojeneckých vojsk a politicky motivovanej zmene vedenia Ústavu polymérov sa cez francúzskych kolegov dostala do našej straníckej organizácie. To znamenalo návrh na moje vylúčenie z radov pracovníkov ústavu. Pomohli „silnejší“ ako boli A. Romanov s O. Kyseľom - samozrejme D. Mikulášová a jej manžel, V. Kellö, J. Rosík, A. Blažej, J. Bína a ďalší. Viacerým z nich som sa žiaľ nestihol osobne poďakovať. Pravda, dostával som zmluvu vždy len na jeden rok a pred jej obnovením som sa musel podrobiť osobitnej previerke straníckym výborom, hlavne hodnoteniu výsledkov. Sedem rokov som nesmel vycestovať. Bolo by na mieste poďakovať sa A. Romanovovi a O. Kyseľovi za to, že ma takto dohnali k maximálnej aktivite? Šancu udržať sa v ústave som sa snažil zvýšiť aj materiálovým výskumom, osobitne vývojom nedostatkových náplní kolón pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu nielen polymérov ale aj nízkomolekulových látok. Spolu s Ivanom („Ivošom“) Novákom, ktorého som prehovoril na prestup k „polymerákovi“ sa nám niektoré veci podarili. Patentovali sme ich aj na Západe vrátane USA a pokúšali sme sa do zahraničia odstúpiť licenciu na know-how prípravy sorbentov. Postupne sme rokovali s piatimi firmami z USA a SRN, ktoré mali o materiály veľmi vážny záujem. Zástupcovia štyroch firiem kvôli tomu pricestovali do Bratislavy. Rokovania „pod bdelým dozorom“ boli neobyčajné. Jeden zo záujemcov o licenciu bol H. Knauer, zakladateľ pomerne úspešnej berlínskej HPLC firmy. Hoci nakoniec licenciu kúpiť nemohol, zo stretnutia s nim sa vyvinuli dlhodobé priateľské vzťahy. Na odstúpenie licencie bolo potrebné povolenie, ktoré mala zo

zákona vydať pražská Polytechna. Táto organizácia nikdy našu žiadosť o povolenie neodmietla, ale vždy s jeho udelením otáľala 9 až 13 mesiacov, presne dovtedy, kým zahraničný záujemca nestratil trpezlivosť: Potom a vždy až potom sme (už zbytočné) povolenie dostali. Naše licenčné aktivity vzbudili značnú pozornosť ŠtB, ktorej „pomáhali“ dvaja kolegovia „Stolár“ a „Čekirda“. Nakoniec sa nám podarilo prvú licenciu predať až po dvanástich rokoch, a to malej francúzskej firme SFCC. Povolenie zariadila novovzniknutá bratislavská pobočka Polytechny, vedená p. D. Hauskrechtom. Pravda, vtedy už naše materiály neboli na trhu zďaleka jediné a pri predaji know-how sme museli ísť hlboko pod cenu. Spolu s „Ivošom“ a L. Šoltésom z Ústavu experimentálnej farmakológie, jedným z mojich diplomantov, sme vyvinuli a patentovali zariadenie na extrakciu analytov tuhou fázou, SPE. Nazvali sme ho SEPARCOL. V našom ústave sme zaviedli výrobu SEPARCOL-ov, a do plastových injekčných striekačiek sme plnili viac ako 30 rôznych – zväčša komerčných sorbentov. Výnos z predaja počas vyše desiatich rokov bol viac ako dva milióny korún. Neskôr licenciu na výrobu niektorých druhov SEPARCOL-ov od ústavu prevzala malá bratislavská firma Anapron. Výroba SEPARCOL-ov sa prakticky zastavila, keď sa náš trh otvoril pre zahraničných výrobcov SPE systémov. Nám načas ostal len jeden zákazník – v západnom Nemecku. Nebolo ho treba podplácať... Zaujímavé bolo, že sami sme SEPARCOL-y nikdy nepoužili, len sme zbierali informácie o tom, na čo ich použili naši zákazníci a pripravovali sme „application sheets“. Niektorí zákazníci, napríklad policajti, nám odmietali informácie poskytnúť a diskusie na tú tému mali osobitný tón. Vyvinuli sme tiež postup na regeneráciu použitého silikagélu pre slúpcovú chromatografiu a postupne sme vyčistili stovky kilogramov materiálu. Mohli by sme hovoriť o pomoci prírode, o ekológii, ale priznávam sa, že nám šlo

hlavne o finančnú stránku veci. Povedľa vývoja materiálov pre HPLC sme spolu s Ivošom vyvinuli aj silikagél vhodný na plnenie špeciálnych gumárenských zmesí. Pôvodne ho mali vyrábať v bratislavskej „Dimitrovke“, potom v Dusle Šaľa a nakoniec závod Tonaso Neštětice. V Neštěticiach dokonca vykonali aj úspešné prevádzkové pokusy, prevzali licenciu na know-how, ale nikdy ju nezaplatili, pretože sa výroba nezačala: Po zjednotení Nemecka sa už ďalšie odpady do Labe nesmeli vypúšťať.

Pri návšteve v Štrasburgu – tesne pred začiatkom mojej cestovateľskej „odmlky“ som mal možnosť obdivovať prvý komerčný GPC prístroj, Waters Model 200. Ten mal veľký oceľový zásobník na eluent v tvare bomby. Ako mobilná fáza sa používal hlavne tetrahydrofurán, THF. Eluent do zásobníka dopĺňali vždy v pondelok – a po každom doplnení sa im zmenili retenčné objemy na kalibračnej krivke získanej pomocou polystyrénových štandardov. Moje vysvetlenie, že to môže byť spôsobené rôznym obsahom vody v hygroskopickom THF môj hostiteľ a neskorší dobrý priateľ H. Benoit síce akceptoval, ale študovať vplyv vody v eluente komerčný prístroj nedovoľoval. Naše primitívne GPC zariadenia mali výhodu vysokej flexibiity, eluenty sme ľahko mohli v sklenených zásobníkoch vymieňať. Zmerali sme si vplyv vody v THF na retenčné objemy polymérov – po niekoľkých rokoch sme výsledky overili a publikovali. Tak sa stala „z núdze ctnosť“: V nasledujúcej etape našich GPC výskumov sme sa venovali hlavne práci so zmesovými eluentami a zo známych dôvodov sme boli dlho na svete jediní. Ukázali sme, ako sa menia retenčné objemy s dávkovanou koncentráciou a s termodynamickou kvalitou eluenta pre polymér. Preferenčnou solvatáciou makromolekúl v zmesových eluentoch sme vysvetlili vznik systémových pík na chromatogramoch nasnímaných nešpecifickým detektorom. Navrhli sme GPC metódu

na určenie rozsahu preferenčnej solvatácie, ktorú prevzalo a citovalo šesť zahraničných pracovísk. O prípadných ďalších sme sa nikdy nedozvedeli. Celkovo tak vznikla séria na danú dobu dobre citovaných prác.

V ďalšej etape sme sa venovali rozvoju nekonvenčných metód kvapalinovej chromatografie syntetických polymérov. Ide o postupy, ktoré riadeným spôsobom kombinujú vplyv entropie a entalpie na vymývanie makromolekúl z kolóny. Najprv to bola *chromatografia pri kritických podmienkach entalpických interakcií*, LC CC, vynájdená v Skt. Petersburgu skupinou B.G. Belenkého. Metóda je založená na vzájomnej kompenzácii entropie a entalpie, v dôsledku čoho retenčné objemy makromolekúl prestávajú byť závislé od ich mólovej hmotnosti. To umožňuje vykonať separácie makromolekúl podľa ich chemickej štruktúry alebo fyzikálnej architektúry bez interferencie s mólovou hmotnosťou, čo v samotnej GPC nie je možné. Naše práce odhalili viaceré obmedzenia tejto – inak geniálnej – metódy.

Pri pokusoch zjednodušiť identifikáciu mobilných fáz pre LC CC sme dostali neočakávané výsledky. Ich vysvetlenie viedlo k originálnej metóde *kvapalinovej chromatografie pri limitných podmienkach entalpických interakcií*, LC LC. Metóda je založená na selektívnom spomaľovaní vymývania makromolekúl s rôznou chemickou štruktúrou alebo fyzikálnou architektúrou z pórovitej náplne LC LC kolóny „bariérou“ vhodného rozpúšťadla. Malé molekuly rozpúšťadla vstupujú do pórov náplne LC LC kolóny a transportujú sa pomaly, zatiaľ čo makromolekuly, ktoré sú čiastočne alebo úplne vylúčené z pórov, majú tendenciu z kolóny sa vymývať rýchlo. Ak pred zmesou polymérov kolónou transportujeme rozpúšťadlo, ktoré selektívne podporuje interakciu, napríklad

adsorpciu jedného druhu makromolekúl ale iný druh alebo iné druhy makromolekúl prítomných vo vzorke sa v kolóne neadsorbujú, dosiahneme ich vysoko selektívne, účinné a rýchle vzájomné oddelenie, neovplyvnené mólovou hmotnosťou zložiek zmesi. LC LC metóda dokáže identifikovať veľmi malé množstvá prímiesí (menej ako 1%) v majoritnej matrici a zrejme sa bude v priemyslovom výskume využívať pri deformuláciách polymérových zmesí. Možno sa už využíva, ale takéto práce sú prísne utajované. „Deformulácia“ je pekný krycí názov pre medzipodnikovú špionáž. Dosať totiž nebola k dispozícii metóda, ktorá by podobnú deformulačnú analýzu umožňovala. Firma Xerox prejavila záujem o spoluprácu pri využití LC LC a poslala nám dar 20.000 USD. Bola to podivná spolupráca, aj keď ma peniaze potešili. Nikdy sme sa nedozvedeli, čo presne chcú naši partneri separovať. Všetko bolo utajené, žiadali od nás len všeobecné informácie. V súčasnosti, hlavné využitie LC LC, publikovateľné v otvorenej vedeckej literatúre, predstavuje separácia a identifikácia prítomnosti materských homopolymérov v blokových kopolyméroch. Prekvapuje nielen to, že mnohé, drahé komerčné blokované kopolyméry sú významne znečistené homopolyméromi ale aj to, že zo syntetikov, ktorým sme v tomto smere ponúkli spoluprácu, pozitívne zareagovalo sotva desať percent. Viacerých z nich sme „spravili nešťastnými“. Ukázalo sa totiž, že ich blokované kopolyméry sú značne znečistené homopolyméromi. Na LC LC separáciu môže online nadviazať GPC: Celé frakcie získané LC LC separáciou sa transportujú do GPC kolóny, v ktorej sa stanoví ich mólová hmotnosť. Výslednú metódu sme nazvali „sekvenčnou dvojdimenziálnou kvapalinovou chromatografiou polymérov“, S2D-LC. LC LC i S2D-LC čakajú na svoje širšie využitie. Nedávno do oboch metód zainvestovali značné prostriedky naši partneri v Marseille a vznikla veľmi zaujímavá a aj

publikačne plodná spolupráca. Ostáva mi dúfať, že si práce syntetikov z Marseille prečítajú iní syntetici a rozhodnú sa zaviesť naše metódy na svojich pracoviskách. Skúsenosť ukazuje, že syntetici nečítajú práce analytikov... Očakávam tiež, že po uzavretí vývojových prác v oblasti kvapalinovej chromatografie v Ústave polymérov SAV bude práve skupina z Marseille pokračovať aj v ďalšom zdokonaľovaní metód LC LC.

Vyvíjali sme aj uhlíkové pórovité materiály pre HPLC. Pri vysokoteplotnej karbonizácii sa väčšina uhlíkových prekursorov stekutí, častice sa zlepia a nevzniká pórovitá štruktúra. Napadlo nás napustiť častice silikagélu prekursorom uhlíka – roztokom karamelizovanej sacharózy alebo tekutou fenol-formaldehydovou živinou, následne prekursor karbonizovať a potom silikagél rozpustiť zásadou. „Lešenie“ silikagélu sa osvedčilo, výsledný postup umožňoval kontrolu nielen tvaru a veľkosti vznikajúcich uhlíkových častíc, ale aj efektívnych priemerov pórov. V Topolčanoch naše pórovité uhlíkové častice pokusne grafitizovali pri 3.000°C. Pritom sa v systéme objavovali okrem pôvodných guľovitých častíc podivné závitnicové útvary. Napriek tomu sme sa rozhodli myšlienku prípravy „replikových“ uhlíkových sorbentov patentovať. Vznikla osobitá situácia. Od r. 1975 sme skoro tri roky čakali na povolenie patentovania v zahraničí. Prišlo neskoro. Našu prihlášku vynálezu vo V. Británii zamietli, lebo tam si niekoľko týždňov pred nami obdobnú myšlienku prihlásil na patentovanie J. Knox, veľká hviezda HPLC, neskôr dobrý priateľ. Jeho materiál sa dosiaľ predáva pod názvom HyperCarb. Z toho dôvodu sme grafitizáciu opustili, ostali sme pri pórovitých časticiach na báze pyrolytického uhlíku, ktoré boli v Československu „bez priedahov“ patentované. Pórovité častice pórovitého replikového pórovitého uhlíka sme niekoľko rokov v ústave vyrábali. Plnili sme ich do vyššie spomínaných SEPARCOL-ov,

a to nielen do plastových injekčných striekačiek, ale aj do skla - tak aby sa adsorbované analyty mohli termicky desorbovať do plynového chromatografu. K pórovitým uhlíkovým materiálom sme sa s Ivošom vrátili po viac ako dvadsiatich rokoch. Tento raz karbonizujeme celulóзовé prekurzory a vznikajúce nanopórovité vlákna („nano“ je predsa v móde...) začínajú nachádzať zaujímavé aplikácie. Sorbenty, v ktorých sú uhlíkové vlákna nosičom aktívnych látok ukázali výnimočnú účinnosť pri odstraňovaní škodlivých kovov ako As, Sb, Pb, Se, Cd a aj prírodných i syntetických rádionuklidov z (pitnej) vody. Čakáme ako dopadne ich patentovanie doma i v zahraničí a hľadáme pre ne potenciálnych výrobcov.

Ďalším našim materiálom boli guľovité častice silikagélu s priemerom okolo 0,5 mm. Tie mali nahradiť nepravidelné silikagélové náplne trubičiek vyrábaných v Sklárnach Votice, známych Alkotestov polície a výbavy armádnych chemických oddielov i banských prevádzok. P. Ambrovič prišiel s myšlienkou získať financie na stavbu Overovacej jednotky Ústavu polymérov od bývalého slovenského Ministerstva priemyslu. V jednotke mali bežať pokusné výroby, založené na výsledkoch výskumu ústavu. Z ústavu sa prihlásili štyri skupiny, ale keď prišlo na podpis rozhodujúceho dokumentu, v ktorom sa objavili aj zodpovedajúce záväzky a riziká, dve skupiny dokument podpísali len podmienene a jedna ho nepodpísala vôbec. A tak sa akcia v podstate zúžila na výrobu nášho sférického silikagélu ako náplne do detekčných trubičiek na alkohol, bojové látky a banské plyny. Ministerstvu priemyslu nakoniec jeden vydokladovaný projekt postačil na prefinancovanie stavby. Pre výrobcu detekčných trubičiek vo Voticiach sme mali vyrábať spočiatku dve a neskôr štyri tony materiálu ročne. Prostriedky poskytnuté ministerstvom na výstavbu Overovacej jednotky zahrňovali aj devízy na nákupy unikátnych prístrojov. Tam sa, žiaľ vopred dohodnuté poradie

nákupu prístrojov obrátilo. Z prvého miesta sme sa ocitli na beznádejne poslednom. Zariadenie na výrobu sférického silikagélu, ktoré Ivoš zostavil, bolo technicky zaujímavé. Zo sklenených rúr na transport mlieka vznikla kolóna cez dve poschodia budovy. Takýto reaktor sme naplnili PPO olejom z Novák. Jeho nevysoká hydrofobicita bola pre úspech procesu rozhodujúca. Nad kolónou boli umiestnené dve čerpadlá - jedno dávkovalo zriedené vodné sklo a druhé zriedenú H_2SO_4 . Tesne nad kolónou sa vodné sklo zmiešalo s kyselinou a zmes tenkým prúdom tiekla do oleja. Pomocou malého miešadla vznikali v oleji kvapky, ich veľkosť sa kontrolovala aj rýchlosťou čerpania a viskozitou, t.j. mólovou hmotnosťou oleja. Koncentračné pomery boli tak vypočítané, že kvapky prešli cez kolónu počas dvoch minút. To bol práve čas potrebný na polykondenzáciu okysleného vodného skla. Na výstupe z kolóny boli kvapky už dostatočne tuhé, nelepili sa. Vznikajúca suspenzia sa diskontinuálne odoberala a miešala s alkoholom aby klesla jej viskozita, prefiltrovala sa a na filtri premyla vodou. Filtrát sa rozdestiloval, alkohol a aj strhnutý olej sa recyklovali. Nasledovalo sušenie guľôčiek silikagélu pri 110-120°C a ich žihanie pri 480°C. Výsledný guľovitý silikagél sa veľkostne frakcionoval prefukovaním vzduchom v 4 m dlhom kanáli. Celý ten engineering bol pre amatéra náročný, ale výsledok bol prekvapujúco dobrý a testy vo Voticiach dopadli veľmi pozitívne. Guľovitého silikagélu sme žiaľ vyrobili len niekoľko sto kg. Po „nežnej“ sa vo Voticiach vymenilo vedenie podniku a to nové promptne podpísalo so švédskym výrobcom silikagélu zmluvu platnú desať rokov o dodávkach, drahého materiálu s nepravidelnými časticami (a preto s výrazne horšími vlastnosťami). Na moje šťastie investor projektu, slovenské Ministerstvo priemyslu zaniklo a tým, aj môj záväzok a riziko osobných sankcií. Aspoň takto získaná budova dodnes slúži...

Preskočme dvadsať rokov od okupácie. Počas nich tvrdú "normalizáciu" vystriedala postupná, opatrná liberalizácia. V jej rámci v r.1988 už riaditeľov ústavov nemali menovať orgány SAV na odporúčenie KSS, ale konali sa voľby. V dvadsaťčlennej volebnej komisii malo okrem štátostrany zastúpenie aj druhé oddelenie vied SAV (bol som jeho vedecký tajomník), ako aj odbory. O post riaditeľa sa uchádzali štyria kandidáti: T. Bleha (toho vyradili v predkole, lebo ešte nebol vedúci vedecký pracovník), A. Romanov, O. Kyseľ a J. Bartoň. O. Kyseľ svojou kandidatúrou neprozreteľne konkuroval svojmu inak spojencovi A. Romanovovi a v dôsledku toho sa riaditeľom ústavu stal J. Bartoň. Ja som mu robil zástupcu. Akousi zhodou okolností ústav dostal devízy na kúpu gélového chromatografu. Vyšli sme naprázdno, namiesto chromatografu sa za zvláštnych okolností zakúpil ďalší lis a CHN analyzátor, ktorý nikdy nebol uvedený do chodu.

Po "zamatovej" sa na riaditeľský post vrátil M. Lazár. Porevolučné obdobie som len sčasti trávil v ústave. Bol som naďalej vedeckým tajomníkom druhého oddelenia vied SAV, mal som na starosti dve Komisie Predsedníctva SAV a pracoval v jeho Edičnej rade. Neskôr som bol zvolený do Predsedníctva SAV. Bolo to náročné obdobie, lebo som sa nechcel vzdať rozpracovaných výskumných projektov. Samotná práca v Predsedníctve bola plná osobitných výziev. Rozpočet SAV bol znížený na polovicu, bolo treba prepúšťať. V ústavoch sa robila hĺbková evalvácia jednotlivcov (tá v niektorých ústavoch v niekoľkoročných intervaloch pokračuje dodnes) a na jej základe prebehla akreditácia ústavov. Šesť ústavov bolo zrušených. Ústav polymérov dopadol pri akreditácii dobre.

Po návrate do ústavu pokračovali naše aktivity nasmerované na zaobstaranie prístrojov. Naše Laboratórium kvapalinovej

chromatografie naďalej nemalo šťastie na získanie potrebných rozpočtových prostriedkov. Zorganizovali sme niekoľko medzinárodných konferencií a ich výnos, spolu s licenčnými a kontraktovými zdrojmi, viac ako 1,5 mil. korún šiel namiesto na odmeny na nákup prístrojov. Dnes sa divím sám sebe. Vtedy nám pomohli viacerí zahraniční partneri, ktorí nám darovali svoje použité zariadenia. Podstatná bola pomoc od D. Belluša. Patril medzi tých kolegov, ktorí emigrovali na Západ. Daniel, "Muco", ostal po študijnom pobyte vo Švajčiarsku, vo firme Geigy, neskôr Ciba-Geigy, potom Ciba a nakoniec Ciba Specialty Chemicals. Urobil rozprávkovú kariéru, stal sa zástupcom šéfa firemného výskumu. Umožnil nám vybrať si zariadenia priamo v skladoch firmy s použitými prístrojmi a zariadil ich darovanie. Niektoré slúžia dodnes. Vďaka, Muco! Po Ivošovom odchode do dôchodku sme pokračovali vo vývoji silikagélov pre HPLC. Výsledkom bol postup kontrolovaného rozširovanie pórov na 30 nm, ktorého know-how prevzala vo forme licencie švédska firma Eka Chemicals, Kromasil. Poznatky z chovania sa náplní kolón pre chromatografiu a z prípravy uhlíkových časticových sorbentov sme využili pri návrhu štúdia vybratých molekúl v stiesnenom stave, v póroch matrice silikagélu alebo pórovitého skla. Kapilárové sily umožňujú naplniť póry matrice kvapalinou tak, že vonkajší povrch častíc je „suchý“. Na štúdium stiesnených systémov sa podarilo nahovoriť kolegov z Fyzikálneho ústavu SAV (J. Krištiak a O. Šauša) ako aj z nášho ústavu (J. Bartoš). Ukázalo sa, že molekuly stiesnené v póroch tuhej matrice sa chovajú výrazne inak ako vo voľnom systéme.

Preskočme približne ďalších pätnásť rokov. Ústav sa rozrástol, dozreli jednotlivci a aj výskumné metódy. Postupne sa do niektorých pracovných skupín podarilo zaobstarať dobré a pomocou štruktúrnych fondov EU aj vynikajúce prístroje. Nás šťastie naďalej

obchádzalo. Ústav pokračoval v organizovaní medzinárodných vedeckých konferencií, vrátane konferencií mladých nazvaných BYPOS. Od pravidelných hodnotení výsledkov sa prešlo na kritérium veku a užitočnosti pre ústav. Napodiv, do ostatných dvoch kritérií sa málo premietali výsledky vedeckých aktivít - publikácie a ich ohlas, patenty, licencie a edukačná činnosť.

Na záver sa chcem poďakovať svojim vedeckým i vedecko-technickým spolupracovníkom, ktorí sa významnou mierou podieľali na získaných výsledkoch: I. Novák, D. Lath, T. Bleha, B. Bohmer, V. Ďurďovič, I. Zvara a E. Macová. Výborné boli techničky T. Sanyová a J. Tarbajovská. Doktorandi z Poľska T. Spychaj a B. Buszewski i Slováci T. Macko, M. Šnauko, M. Petro, M. Jančo, A. Russ, M. Šimeková a A. Šišková odvedli kus experimentálnej práce. Vopred sa ospravedlňujem, ak som na niekoho zabudol.

VZŤAH KU KOLEGOM Z ČIECH

Dohodobo sme mali výborné vzťahy s viacerými českými priateľmi. Spomeniem hlavne Ústav makromolekulárnej chemie ČSAV, teraz AV ČR, svetoznáme MAKRO. Silnú a výkonnú chromatografickú skupinu tam mal M. Kubín. Pozval som ho napísať kapitolu do knihy „Gélová chromatografia“, vydala ju v r. 1983 VEDA, Bratislava. V preklade do poľštiny neskôr vyšla vo Varšave. Do nej prispel aj M. Dressler z Ústavu prístrojovej analytické chemie ČSAV v Brne a K. Marcinka z Virologického ústavu SAV. M. Kubín bol hodne na teóriu a to knihe veľmi prospelo. Treba tiež povedať, že M. Kubín, aktívny v porevolučných odboroch ústavu, ma pozval do MAKRA na diskusiu v rámci témy „Slovenská otázka“. Proti tomu názvu som márne protestoval. Diskusia bola veľmi otvorená a z mojej strany hodne

kritická. S istým zadostúčením ale aj so smútkom priznávam, že skoro všetky moje pesimistické predpovede sa naplnili. Ďalší priateľ z MAKRA bol J. Čoupek. Bol do istej miery našim konkurentom, pretože pracoval v oblasti vývoja silikagélov pre HPLC. Ešte pred „zamatovou“ začal podnikať. Založil firmu Tessek, ktorá dodnes dodáva silikagély a chromatografické kolony. Tessek bol druhou firmou v Československu, ktorá začala podnikať kvázi kapitalistickým spôsobom. Dobré vzťahy vznikli aj s P. Janderom z Pardubické techniky a s J. Vohlídalom z pražskej UK.

ZÁVER

Napriek mnohým negatívam obdobia, na ktoré spomínam, nájdu sa viaceré veci, za ktorými je mi ľúto. Je to hlavne „nadšenie pre veci ústavné“, ktoré väčšinu spolupracovníkov hlavne začiatkom šesťdesiatych rokov držalo pohromade vo veľmi dobrom kolektíve. A hoci nemálo ľudí v SAV kritizovalo „polymerákov“, že si napr. chodia cez obed zaplávať do bazéna v neďalekom zariadení „u mrzáčkov“ a súčasne, že ktovie z akých dôvodov ostávajú do večera a cez víkendy v práci - zväčša boli nakoniec ochotní uznať náš argument, že rozhodujúce sú vedecké výsledky. Nezabudnuteľné boli spoločné posedenia pracovníkov Ústavu polymérov (napr. u Lazárov v ich dači pri Bratislave, či pri burčiaku, husacine a posúchoch v okolitých dedinách). Neskôr prišli spoločné ústavné letné výlety do hôr a kúpeľov, i zimné lyžiarske zájazdy za snehom. Hlavným organizátorom bol M. Čapla a aktivity tohto druhu zastrešovali odbory. Žiaľ, molekulová charakterizácia v ústave pripravovaných polymérov nebola „v móde“ a prevládal názor, že produkty polymerizácie sa majú charakterizovať podmienkami ich prípravy. To bol – vedľa chronického nedostatku devízových

prostriedkov – jeden z dôvodov, prečo sa dlhé roky nepodarilo zakúpiť vhodný GPC prístroj a boli sme odkázaní na trvalé improvizácie. Podobne, aj počet pracovníkov na tejto téme, vrátane študentov, bol veľmi obmedzený.

Stará múdrosť hovorí: “Získané je mŕtve, pôvab je v získavaní.” Ak túto pravdu pretransformujeme na vedu, môžeme povedať: “Spoznané napĺňa zadostúčením a prináša motiváciu. Ale to skutočné “vzrúšo” spočíva v kráse poznávania samotného.” Práve vzrušujúce poznávanie dá zabudnúť na to, že vedecká práca je slabo honorovaná, príliš často zápasí s nedostatkom prístrojov i materiálov - a tiež umožní preniest sa cez občasný neúspech.

GÉLOVÁ CHROMATOGRAFIA - MINULOSŤ A SÚČASNOSŤ

Dovolím si krátky komentár k princípu metódy a jej súčasnému stavu. Gélová permeačná chromatografia je úžasná metóda, ktorá v súčasnosti dominuje pri určovaní priemerných hodnôt i disperzít („disperzita“ je nový termín, podľa IUPAC-u by mal nahradiť termín „distribúcia“) mólových hmotností syntetických polymérov. GPC v podstate nahradila väčšinu klasických metód molekulevej charakterizácie syntetických polymérov – zrážaciu i rozpúšťaciu frakcionáciu, membránovú osmometriu, osmometriu v parnej fáze, ebulliometriu i kryometriu, ultracentrifugáciu, viskozimetriu a statický i dynamický rozptyl svetla. Viskozimetria i rozptyl svetla spolu s infračervenou spektrometriou a NMR našli svoje nové využitie pri detekcii eluátu, ktorý opúšťa GPC kolónu. Prvé dve metódy s určitým obmedzením umožňujú priame určenie mólových hmotností homopolymérov bez kalibrácie a NMR s infračervenou spektrometriou poskytujú cenné informácie o chemickej i fyzikálnej štruktúre makromolekúl vymývaných z GPC kolóny. Dôležitým príspevkom k detekcii makromolekúl v eluáte sú odparovacie

detektory s rozptylom svetla. Zdokonalené detektory spolu s presnejšími čerpadlami, ako aj s lepšími náplnami kolón a flexibilným programovým vybavením na spracovanie dát predstavujú významný metodický pokrok. Avšak GPC metóda má viaceré úskalia, ktoré sú pri jej bežných aplikáciách často ignorované. Vlastné meranie i spracovanie výsledkov je zdanlivo jednoduché, a to výrazne ovplyvňuje názory na presné a správne použitie metódy. Séria kruhových testov, ktoré sme koncom minulého storočia organizovali pod egidou IUPAC-u ukázala alarmujúce výsledky: Vysokú intra-laboratórnu opakovateľnosť metódy, ktorá môže viesť k záveru, že získané výsledky sú nielen presné ale aj správne – a hrozivo nízku inter-laboratórnu reprodukovateľnosť: Pri mólových hmotnostiach polymérov získaných na jednotlivých pracoviskách šlo o rozdiely v stovkách a dokonca v tisíckach percent! Najlepšie výsledky prišli z priemyslového výskumu a najhoršie z univerzít, kde zrejme študenti merali spôsobom – „zapni prístroj, nadávkuj - a čakaj, čo ti dá počítač“. Kontrola prietoku, rekalibrácia kolón, čistenie eluenta, vplyv koncentrácie dávkovaného polyméru, systémové píky pri (často nevedomelom) použití viaczložkových mobilných fáz a v dôsledku odplyňovania eluentov sú často neznáme pojmy. Niekedy sa stretáme s „presnými“ výpočtami založenými na málo správnych výsledkoch GPC analýz. V svetle zovšeobecnených skúseností možno GPC považovať nielen za požehnanie ale pri nesprávnej aplikácii aj za preklatie vedy a technológie syntetických polymérov. Prehľadová práca a tutoriálne prednášky na túto tému vyvolali a vyvolávajú mnohé diskusie.

GPC má aj svoje objektívne limity. Na rozdiel od HPLC nízkomolekulových látok, retenčné objemy makromolekúl sú limitované objemom pórov náplne kolóny. To výrazne obmedzuje

selektivitu separácie. Metóda separuje makromolekuly na základe rozdielov ich veľkostí v roztoku – a tá je súčasne ovplyvnená všetkými molekulovými charakteristikami makromolekul, teda nielen ich mólovou hmotnosťou, ale aj chemickou štruktúrou a fyzikálnou architektúrou. Preto GPC len celkom výnimočne dokáže správne súčasne zmerať viac ako jednu molekulovú charakteristiku daného polyméru. Syntetické polyméry bez rozdielu vykazujú disperzitu svojich molekulových charakteristík. Ak daný polymér vykazuje súčasne viac ako jednu disperzitu – disperzita mólových hmotností je prítomná vždy – hovoríme o *komplexných polyméroch*. Ide o rôzne typy kopolymérov a funkcionalizovaných makromolekúl, ako sú oligoméry. Ak je polymér tvorený dvoma a viacerými typmi makromolekúl s rôznou chemickou štruktúrou a/alebo fyzikálnou architektúrou, ide o *komplexný polymérový systém*. Patria sem najrôznejšie zmesové systémy pripravené zámerne, alebo vznikajúce pri degradačných alebo výstavbových reakciách makromolekúl. Typický, posledne spomenutý prípad predstavujú pokročilé a čoraz častejšie v praxi používané blokové a očkované kopolyméry, ktoré sú prakticky vždy sprevádzané svojimi materskými homopolymérami. Je prirodzené, že GPC nemôže kvantitatívne charakterizovať komplexné polyméry a obvykle ani komplexné polymérové systémy. V druhom prípade na separáciu zložiek systému obvykle nepostačuje spomínaná obmedzená selektivita metódy a aj ak sa zložky systému navzájom oddelia, nízka látková kapacita metódy a nedostatočná citlivosť detektorov neumožní úplnú analýzu systému ak minoritná zložka predstavuje menej ako päť prípadne menej ako desať percent vzorky. Nedostatočne oddelená minoritná prímes sa na GPC chromatograme prezradí ako malé vykľutie, malá vypuklina, ktorú väčšina syntetikov jednoducho ignoruje. Pritom analyzovaný produkt môže obsahovať aj viac ako desať percent

neželanej prímеси. Ak sa niekto pokúsi publikovanú „úspešnú“ syntézu zopakovať, môže byť nemilo prekvapený.

Východiskom z obmedzení GPC pri molekulovej charakterizácii komplexných polymérov a komplexných polymérových systémov je kombinácia GPC založenej na entropickej kontrole vymývania s entalpickými interakciami v kolóne. Vyššie spomenuté metódy založené na kontrolovanom, spoločnom využití entropie a entalpie sa nazývajú kombinované metódy HPLC polymérov (coupled methods of polymer HPLC). Umožňujú zvýšiť selektivitu separácie, čo sa využíva hlavne pri oligoméroch. Dôležitá je možnosť pridaním entalpie dosiahnuť kritické alebo limitné podmienky entalpickej interakcie a potlačiť vplyv mólovej hmotnosti polymérov na ich retenciu v kolóne a separovať makromolekuly výlučne podľa chemickej štruktúry alebo fyzikálnej architektúry. Problémom je to, že experimentálne hľadanie vhodných systémov a experimentálnych podmienok je pomerne náročné a teoretické spracovanie problému, ktoré by viedlo k predikciám, ostáva otvorené. Pokusy o prenesenie poznatkov z HPLC nízkomolekulových látok do kvapalinovej chromatografie makromolekúl neboli úspešné. Pri separácii polymérov hrajú významnú – pri GPC dokonca rozhodujúcu – úlohu zmeny konformačnej entropie makromolekúl. Tie sú zodpovedné za ich separáciu založenú na exklúzii, selektívnom vylúčení z pórov náplne kolóny a sprevádzajú všetky entalpické procesy v systéme. Vzájomný vzťah entropie a entalpie je zložitý a dosiaľ sa ho nepodarilo kvantitatívne opísať. Toto je jedna z výziev kvapalinovej chromatografie syntetických polymérov. Žiaľ v systéme vedy založenej na prístupe „publish or perish“, syntetici zväčša nie sú ochotní strácať čas, veď predsa majú GPC.

3. MIROSLAV FLIEGER



Narodil se v r. 1948 v Dolních Mokropsech. V letech 1963-1966 se vyučil v n. p. KAUČUK v Kralupech nad Vltavou jako chemik – gumař. Po té při zaměstnání vystudoval střední všeobecně vzdělávací školu zakončenou maturitní zkouškou. Tenýž rok se stal studentem Přírodovědecké fakulty UK v Praze, kde studoval obor organická chemie. V roce 1973 studium ukončil státní závěrečnou

zkouškou. Od roku 1974 byl zaměstnán v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, kde v roce 1981 získal titul CSc. v oboru mikrobiologie. Jeho vědecká práce byla směřována především do oblastí fyziologie producentů sekundárních metabolitů, vývoje analytických metod, mykotoxikologie, in vitro produkce sekundárních metabolitů. Absolvoval stáže v německu, Itálii, USA a Mexiku. V Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. zastával funkci vedoucího laboratoře „Genetiky a metabolismu hub“ (1993-2013). Členem Akademické rady byl v letech 2005-2013. Je, anebo byl členem redakčních rad časopisů Journal of Antibiotics (1999-2013), Applied and Environmental Microbiology (2000-2005). Na PŘF Univerzity Karlovy od roku 2001 přednáší základní a výběrovou přednášku oboru Analytická chemie „Analýza mikrobiálních toxinů“. Publikoval více jak 100 článků v odborných časopisech, je autorem nebo spoluautorem 30 patentů a patentových přihlášek.

40 LET U KAPALIŇÁKU, ANEB JAK TO NA MBÚ ZAČALO

Rozvoj kapalinové chromatografie (HPLC) byl spojen se založením chromatografické laboratoře pod vedením Ing. Milana Wursta na oddělení půdní mikrobiologie (později přejmenovaného na oddělení experimentální mykologie), na počátku roku 1972. Úkolem této laboratoře bylo zavádění moderních instrumentálních separačních analytických metod, plynové a kapalinové chromatografie do mikrobiologického výzkumu. Vyvinuté metody pak měly být aplikovány při analýze mikrobiálních metabolitů nejrůznějších mikroorganismů (bakterií, kvasinek, vláknitých hub a řas). V prvních letech, ještě před nástupem instrumentace pro kapalinovou chromatografii, byly vypracovávány především metody plynové chromatografie pro analýzu složení extracelulárních polysacharidů u řady půdních bakterií (např. *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, atd.). Dále byl analyzován obsah vyšších mastných kyselin v lipidech některých řas (např. *Chlorella*) a konečně obsah kyselin citrátového cyklu u kvasinek rodu *Sacharomyces*. V letech 1972-1973, tedy v době, kdy jsem byl ještě studentem organické chemie na Přírodovědecké fakultě UK, uspořádala chromatografická laboratoř MBÚ ČSAV řadu přednášek a seminářů o chromatografických instrumentálních metodách s důrazem na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii na všech odděleních MBÚ, včetně detašovaných pracovišť v Třeboni a v Novém Hrádku. Díky tomuto velkému úsilí Ing. Milana Wursta byl již v roce 1974 na MBÚ ČSAV zakoupen jeden z prvních kapalinových chromatografů v ČSAV, Varian 8500, s variabilním UV detektorem (Variscan LC), integrátorem a liniovým zapisovačem. Pumpy u tohoto chromatografu byly pístové, řízené krokovým motorem. Částečným omezením byl jen obsah válců (myslím, že to bylo 250 ml, ale možná

i 500 ml). Po jejich vyprázdnění bylo nutné vše zastavit, naplnit pumpy mobilní fází a znovu pokračovat.

Současně s rozvojem instrumentace pro kapalinovou chromatografii došlo k významnému pokroku i v oblasti chromatografických stacionárních fází. Sice jsme ještě pracovali s fázemi o velikosti částic 10 μm , ale začaly se objevovat i první modifikované stacionární fáze, a to především reverzní fáze. Své první analytické pokusy na tomto stroji jsem začal koncem roku 1976, a to analýzou sekundárních metabolitů *Claviceps sp.*, které jsem do této chvíle dělal pouze tenkovrstevnou chromatografií. Vybral jsem si k tomu stacionární fázi modifikovanou propylaminem a jako mobilní fázi jsem používal směs diethyletheru a ethylalkoholu. Nevím už přesně, jak dlouho to trvalo, ale vím, jak obrovskou radost jsem měl, když zapisovač poprvé ukázal dva, téměř rozdělené píky standardů klavinových námelových alkaloidů, agroklovinu a elymoklovinu.

A tak to celé začalo. Během následujících tří let se podařilo vyvinout metody pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení námelových alkaloidů ve fermentačních tekutinách *Claviceps*. Metody byly dále aplikovány pro dělení a stanovení nových alkaloidů, především ve spolupráci s n. p. Galena, který byl v té době jedním z velkých producentů námelových alkaloidů, a tak získávání minoritních látek ze směsí byl přece jen menší problém než provádění fermentací ve velkých objemech. Z téže doby pochází také první patent na plničku chromatografických kolon. Její konstrukce byla vynucena tehdejší politikou přidělování deviz jednotlivým pracovníkům výzkumných institucí. Kdybych jen krátce zmínil, vypadalo to tak, že jste si jeden rok objednali materiál z kapitalistických států, pak rok čekali, a když šlo všechno úplně skvěle, za rok jste možná něco dostali, třeba i nesmyslný popisovač na sklo. Tak jsme se snažili vymyslet, jak

získat nové kolony, aniž bychom museli čekat rok či dva, až budou devizové prostředky. S kolegou Václavem Inemanem, který tenkrát pracoval na VŠChT, jsme vyvinuli plničku chromatografických kolon a velmi hojně ji využívali. První plničku vyrobili pracovníci dílen Mikrobiologického ústavu z nerezové oceli, do které byla zavařena vysokotlaká nerezová kapilára a umístěna tak, aby byl zajištěn tangenciální vstup mobilní fáze. Tím došlo k dokonalému promíchání silikagelové směsi a velmi dobrému naplnění chromatografických kolon. Jejich účinnost byla v té době srovnatelná s originálními kolonami od výrobců. Přeplnili jsme desítky kolon, a tak mohl vývoj chromatografických metod dále pokračovat. Kromě již zmíněné problematiky, tedy studia sekundárních metabolitů *Claviceps sp.*, byly dále vypracovávány metody pro studium látkové přeměny (metabolismu) mikroorganismů, aromatických aminokyselin (tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu) u dalších hub a půdních mikroorganismů. V relativně krátké době tak požadavků na kapalinově chromatografické analýzy začalo výrazně přibývat a strojového času bylo jen velmi málo. Koncem sedmdesátých let jsme požádali jako Laboratoř fyziologie vláknitých hub o zakoupení dalšího kapalinového chromatografu. Vzhledem k nedostatku devizových prostředků nám však bylo doporučeno zakoupit místo plánovaného HPLC nově vyvíjený automatický systém z RVHP. A tak se také stalo. Jednoho dne dorazilo nákladní auto se čtyřmi bednami, každá asi o velikosti jednoho kubického metru, což vzbudilo oprávněný zájem všech kolegů v okolních laboratořích. Trochu překvapení, ale přece jen plni očekávání, jsme začali jednotlivé bedny rozebírat a postupně vybírat jednotlivé díly automatizovaného systému. Vybalili jsme několik nanášečů silikagelu na skleněné desky, sušáren, skel nejrůznějších rozměrů, podstavců s vodováhou i bez, a nakonec

jedno nerezové vejce s uříznutým dnem, ze kterého trčely teflonové kapiláry takříkajíc odnikud nikam, nejspíš jakýsi zárodek rodícího se automatu, který se ale, bohužel, ještě nenarodil. Bylo to obrovské zklamání, ale na druhou stranu je nutno říci, že nanášedce fungovaly velmi dobře a používány byly ještě minimálně jedno desetiletí. Zbytek z krabic jsme několik dnů cpali pod všechny laboratorní stoly tak, aby se laboratoří dalo alespoň procházet.

Počátkem 80. let jsme se nakonec rozhodli vyrobit kapalinový chromatograf z dostupných součástí. Vývojové dílny Akademie věd tehdy vyráběly jednopístové vysokotlaké čerpadlo s označením VCM 300. To samo o sobě nebylo možné využít, protože při jeho využití vznikaly obrovské tlakové pulsy. S kolegou Josefem Holíkem z Isotopové laboratoře ČSAV, jsme tedy spojili dvě čerpadla tak, že byla vůči sobě pootočena o 180 stupňů. Tím jsme dosáhli únosného pulsování, které se už tolik neprojevovalo na základní linii UV detektoru vyrobeného ve stejných vývojových dílnách. Z nich pocházel i jednolíniový zapisovač, který jsme využívali k záznamu chromatogramu. Prosté, jednoduché, ale bohužel bez integrátoru. Tak jsme se opět vrátili ke klasickému trojúhelníku a tužce a takto počítali koncentrace jednotlivých látek, i když už ne na logaritmickém pravítku, ale naprosto skvělou první programovatelnou kalkulačkou. Tento podomácku vyrobený přístroj jsme používali především k semipreparativním účelům, tedy v případech, kdy bylo nutné získat větší množství látky např. pro určení struktury nebo pro analýzu mastných kyselin ve sklerociích Paličkovice nachové (Obr. 1). Strukturu nově izolovaných látek jsme stanovovali pomocí hmotnostní (Varian MAT 311) a NMR (JEOL FX-60) spektrometrie. Během následujících deseti let se nám díky tomuto přístroji podařilo identifikovat více jak deset nových látek. Z té doby také pochází jedna velká chyba, která se mně stala kvůli

používání propylaminem modifikované kolony. Kolegyně Sylvie Pažoutová totiž objevila kmen *Claviceps*, který produkoval dosud neznámý „azurový“ alkaloid. Azurový proto, že při prohlížení TLC desky pod UV lampou azurově zářil. Jakkoliv jsem analyzoval její izoláty na mnou vyvinutém systému, žádný nový alkaloid jsem nepozoroval. Žádný neidentifikovaný pík prostě nebyl (Obr. 2). Pochopili jsme oba až o několik let později. Myslím, že to bylo v roce 1988, kdy kolegové z NDR tento alkaloid identifikovali jako chanoklavin aldehyd. Ano, teď už bylo jasné, proč jsem žádný takový alkaloid nemohl vidět, zreagoval s náplní kolony.

Psal se rok 1984, kdy se nám podařilo získat finanční prostředky k nákupu nového chromatografu, tentokrát od firmy Perkin-Elmer Serie 3b, s UV detektorem LC 85 a navíc s chromatografickou data stanicí Sigma 15. Ještě stále to sice nebyl počítač, ale tužku a trojúhelník jsem odložil už navěky. Navíc byl vybaven i automatickým dávkovačem, takže mohl pracovat v podstatě neomezeně dlouho. Z této doby pochází asi nejvíce studií zabývajících se izolací minoritních alkaloidů a jejich biotransformačních produktů, fyziologických studií, atd. Ještě je třeba podotknout, že v této době už na MBÚ ČSAV pracovalo několik HPLC systémů, využívaných k nejrůznějším studiím, ať už transformačních reakcí, metabolismu vyšších hub, produkce antibiotik a dalších biologicky významných látek.

Konec 80. let lze charakterizovat z hlediska vědeckého bádání za zcela přelomový. Objevují se první české osobní počítače (vyráběné v JZD Slušovice), jejichž cena se pohybuje někde na úrovni 250 000 Kč. Poprvé odkládáme psací stroje a používáme jednoduché textové editory pro psaní publikací. Rozvíjí se emailová komunikace a pomalu přestáváme psát dopisy ručně. Nakupované přístroje už jsou

vybaveny programy, které velmi usnadňují práci. Významně se zvyšuje frekvence pro měření NMR spekter, skokem se dostáváme na 400 MHz, čímž se významně snižuje množství materiálu požadovaného pro určení struktury. A nakonec přichází revoluce, „sametová“. Potom už vše nabírá velmi rychlý spád. Rozvíjí se především informační technologie a hlavně máme svobodu a můžeme volně cestovat.

Poslední dekáda dvacátého století je charakterizována rychlým rozvojem všech instrumentálních technik. V kapalinové chromatografii to znamená především automatizaci a počítačové řízení všech chromatografů běžně vybavených i automatickými dávkovači, které nám umožnily zpracovávat velké množství vzorků v téměř nepřetržitém provozu. Navíc, kapalinové chromatografy se staly základním vybavením velkého počtu laboratoří, což se projevilo především v rychlém nárůstu nově izolovaných látek. V této poslední dekádě bylo v Mikrobiologickém ústavu izolováno a identifikováno více jak 300 nových látek, ať už přírodních (námelové alkaloidy, antibiotika, cyklické oligopeptidy, mastné kyseliny, atd.), polysyntetických (cukerné látky) nebo syntetických. Snad jen pro zajímavost bych rád upozornil na fakt, že za téměř 30 předcházejících let tedy od roku 1963 do roku 1990 bylo v Mikrobiologickém ústavu izolováno a identifikováno přibližně 250 nových látek.

V této době se také začíná velmi rychle rozvíjet i mezinárodní spolupráce naší (a nejen naší) laboratoře a tak kromě „standardních“ metod, tedy metod využívaných především k analýze sekundárních metabolitů nejrozličnějších mikroorganismů, se zaměřujeme na novou oblast kapalinové chromatografie. Tou je syntéza chirálních stacionárních fází a hledání jejich využití k analýze

některých farmaceutických preparátů, aminokyselin, pesticidů a herbicidů. Tato problematika byla více jak dvacet let úspěšně řešena ve spolupráci s Chromatografickým ústavem v Římě (Istituto di Cromatografia del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Area della Ricerca di Roma, Italia). Chirální fáze byly založeny na derivátech námelových alkaloidů, které se díky své struktuře (aromatickému charakteru, rigidnímu skeletu se třemi chirálními centry) ukázaly být vynikajícími selektory pro analýzu chirálních organických kyselin (např. nesteroidních protizánětlivých látek - profenů a některých herbicidů).

Další novou oblastí, která se téměř na dvacet let stala nedílnou součástí výzkumu v laboratoři, byla analýza produkce sekundárních metabolitů travních endofytních hub. Tato oblast byla rozvíjena ve spolupráci s Oddělením rostlinné patologie v Auburn University, Alabama, USA. Byly to znovu námelové alkaloidy, které jako produkty travních endofytních hub rodu *Neotyphodium* způsobovaly toxikózy u pasoucího se dobytka. V roce 1995 jsme k analýze poprvé využili spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

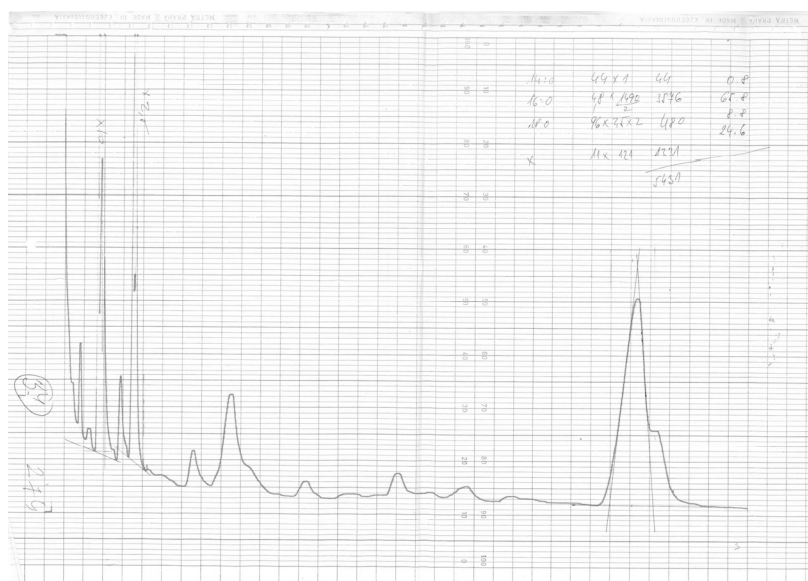
Jednadvacáté století přináší další významný rozmach v celém vědeckém bádání, a to především v oblasti informačních technologií. Celý svět se propojuje na internetu, rozbíhají se databázová úložiště, která umožňují s neuvěřitelnou rychlostí získávat vědecké informace z celého světa. Nevím, jestli je na tomto místě vhodné připomínat dobu dávno minulou, tedy počátek devadesátých let, ale možná jen pro informaci těch později narozených bych rád připomněl, jak jsme získávali literaturu, tedy separáty vědeckých prací před dvaceti lety. Existovaly, vlastně ještě existují, Current Contents, přehledná knížečka formátu A5, ve které

byly uvedeny tisíce citací článků, které vyšly za jediný týden. Na konci byl adresář, kde byly uvedeny adresy korespondujících autorů. Po několika týdnech čekání na výtisk (rozdělovník přísně dodržoval hierarchii ústavu), jsme měli několik hodin na prostudování, vypsání citací článků, které nás zajímaly a dohledání adres korespondenčních autorů. Pak už zbývalo jen poslat žádanku o separát a doufat, že vám požadovaný dokument někdo zašle. Trvalo to tak měsíc, někdy i dva, a úspěšnost se pohybovala někde na úrovni padesáti procent. Ty články, které nepřišly, jsme pak dlouho a trpělivě sháněli po nejrůznějších knihovnách. Tak vzato dohromady, tři, čtyři měsíce a byla literatura jakž takž pohromadě. Neumím si už ani představit, že bych dnes tak dlouho čekal, dva, tři dny a téměř vše potřebné je uloženo v mém počítači.

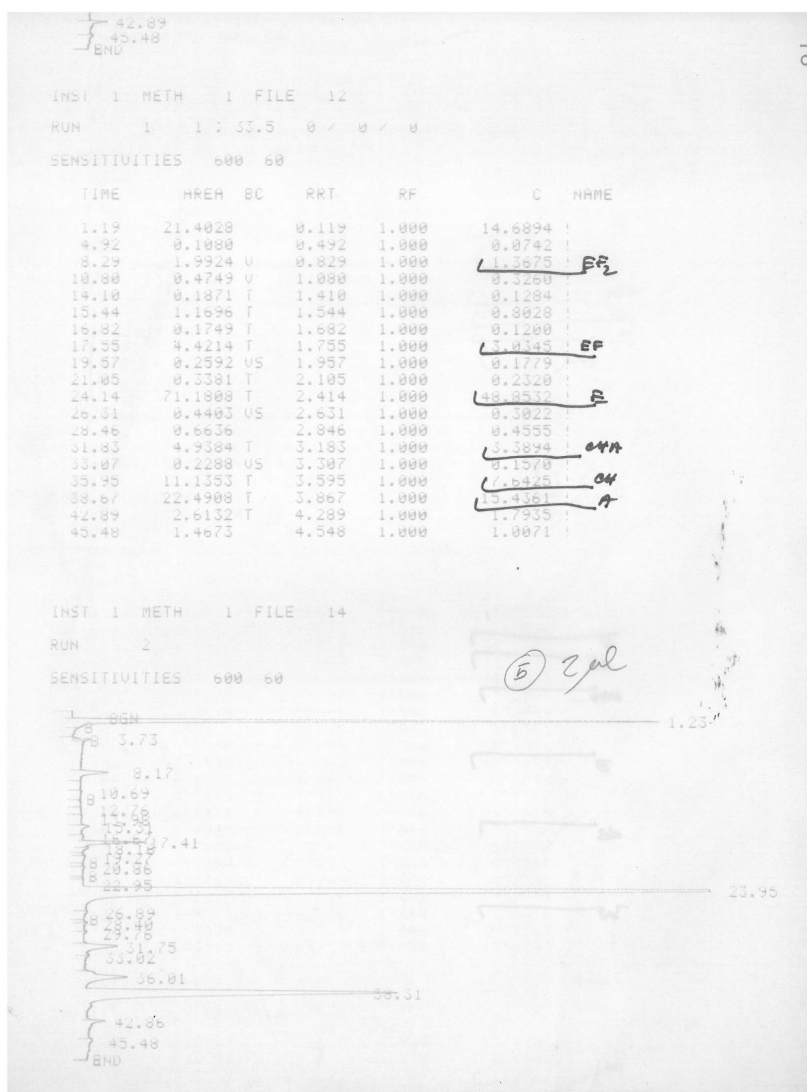
Informační boom je ovšem provázen i technologickým pokrokem. V kapalinové chromatografii jde především o vývoj nových stacionárních fází s velikostí částic menších než dva mikrometry. Tak se rychle rozvíjí oblast ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Rychlé analýzy a skutečně vysoká účinnost jsou dnes standardem. Stejně rychlý vývoj prodělaly i detekční techniky, a to především propojení HPLC s hmotnostní spektrometrií, ale i s nukleární magnetickou resonancí. Tato propojení umožnila rozvoj nových oblastí výzkumu např. metabolomiky, proteomiky, fenogenomiky atd. A co to přináší v oblasti sekundárních metabolitů? Bohužel jen mírné zlepšení. Stále totiž musíme nové mikroorganismy a jimi produkované neznámé metabolity izolovat z litrů fermentačních tekutin, zjišťovat jejich antimikrobiální a biologické aktivity, frakcionovat, analyzovat, testovat, a tak stále dokolečka, až se třeba po roce podaří identifikovat možná novou látku. A tak i přes nesmírný pokrok ve všech technikách, patří analýza sekundárních metabolitů nových mikroorganismů k těm

časově velmi náročným a vyžaduje velkou trpělivost a zručného analytického chemika. Tak ať je takových stále dostatek.

Poděkování: Rád bych na tomto místě poděkoval panu Ing. Milanu Wurstovi, DrSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., za jeho velkou pomoc při přípravě této kapitoly, především jejích historických částí z počátků HPLC. Dále bych rád poděkoval doc. Lucii Novákové za trpělivost a ediční úpravy textu.



Obr. 1: HPLC analýza obsahu mastných kyselin ve sklerociích Paličkovice nachové. Jedná se o jednu z prvních aplikací měřených na vlastnoručně sestaveném kapalinovém chromatografu.



Obr. 2: HPLC analýza extracelulárních námellových alkaloidů produkovaných houbou *Claviceps fusiformis*. Chromatografické podmínky: kolona Separon SGX C18 (25 x 0,8 cm I.D., velikost částic

7 μm), mobilní fáze MeOH-H₂O-koncentrovaný čpavek (30:70:0,4).
UV detekce 224 nm. EF2 – elymoklavin difruktosid, EF1- elymoklavin
fruktosid, E – elymoklavin, CHA – chanoklavin aldehyd, CH –
chanoklavin, A – agrokclavin

4. JAROSLAV FRANC

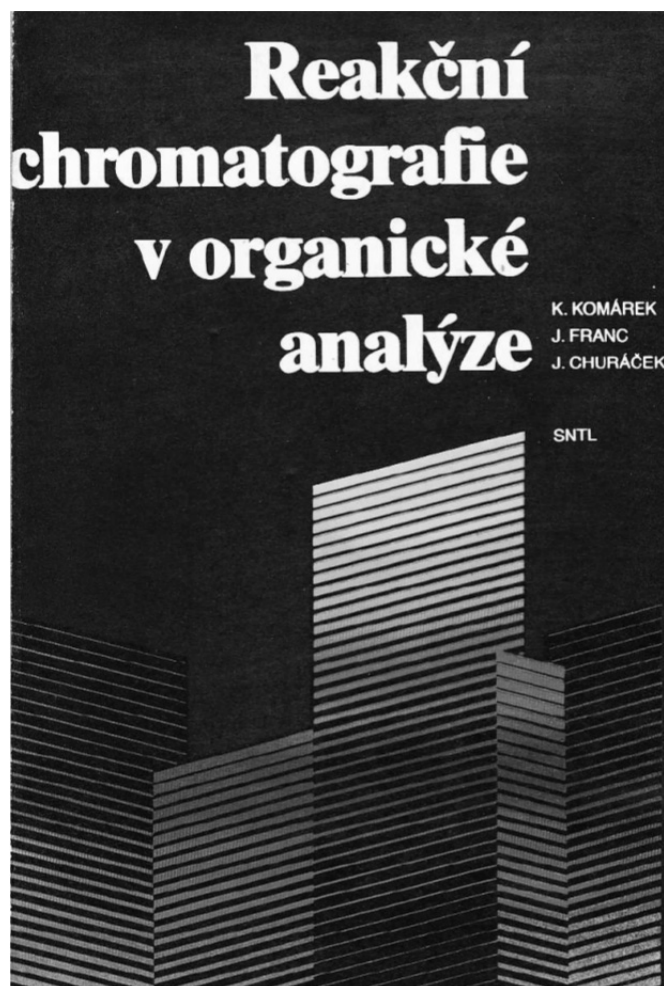


Ing. Jaroslav Franc, CSc. se narodil 10. září 1919 v Pardubicích. Vystudoval chemii na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Jeho studium a následně celý život poznamenala druhá světová válka a jeho pobyt v koncentračním táboře Sachsenhausen. Dokončení studia se mohl věnovat až po válce a po té pracoval ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Pardubicích – Rybitví, kde strávil celý svůj profesní život. Publikoval na 160 odborných prací - v oblasti chromatografie a elektroforézy. Jeho první publikace, která pojednávala o chromatografii na silikagelu, byla publikována 9. února roku 1954, tedy přesně před 60 lety. (Pana France jsme shodou okolností navštívily 7. února 2014, právě v době oslavy tohoto výročí.) Je také autorem 59 patentů. Ing. Jaroslav Franc, CSc. byl členem Názvoslovné komise IUPAC a je také držitelem plakety za přínos a rozvoj chromatografie, kterou mu roku 1978 udělila Akademie věd SSSR. Jeho žáky a spolupracovníky byli významné osobnosti české chromatografické komunity, jako prof. Churáček, prof. Stránský, prof. Pacáková či prof. Smolková.



Obr. 1: Ing. Jaroslav Franc, CSc. s manželkou na dobové fotografii [1].

Význam moderních separačních technik jak samotných, tak i ve spojení s fyzikálními anebo chemickými metodami, je nesmírný a stále ještě vzrůstá. Laboratoře z výrobní a nevýrobní sféry žádají pro svoji činnost stále dokonalejší analytické metody, které by jim umožňovaly zabezpečit jejich rostoucí úkoly a poslání.“ Takto zní úvodní slova knihy Reakční chromatografie v organické analýze vydané v roce 1989 (Obrázek 3), jejímž spoluautorem je pan Ing. Jaroslav Franc, CSc., jeden z průkopníků nejen chromatografie u nás.



Obr. 2: Přebal knihy Reakční chromatografie v organické analýze, jejímž spoluautorem je Jaroslav Franc. Kniha vyšla v roce 1989 a shrnuje základní poznatky v této oblasti chromatografie [2].

Pan Jaroslav Franc se narodil 10. září roku 1919 v Pardubicích do rodiny válečného invalidy z první světové války. Jeho tatínek pracoval jako listonoš a maminka byla dělnice. Jaroslav Franc vychodil obecnou školu a státní reálku ve svém rodném městě a potom odešel na vysokou školu do Prahy. Ač ho v reálce bavila matematika, literatura a chemie, jeho jasnou volbou byla chemie. Nedovedl si totiž představit, že by vyučoval, jeho snem byla práce v laboratoři. Výběr oboru byl pro něho tedy jednoznačný. Na studia nastoupil na sklonku let třicátých, je tedy jasné, že do jeho studia zasáhla druhá světová válka. Jako jeden z mnoha studentů se Jaroslav Franc zúčastnil 28. října 1939 demonstrace, kde byl nacisty postřelen student Jan Opletal. Opletal na následky poranění 11. listopadu zemřel. O čtyři dny později se konalo veřejné rozloučení, na které přišli všichni pražští vysokoškoláci a na Albertově zazněla česká hymna i se zakázanou hymnou slovenskou. Ještě 16. listopadu byl Jaroslav Franc v laboratoři a večer se připravoval na zkoušku, kterou měl skládat druhý den ráno. Následující ráno však studenty na kolejích probudilo bouchání pažeb pušek na dveře. Všichni studenti byli nahnáni do haly, naloženi do nákladáků a převezeni do věznice v Ruzyni. Devět studentů zde bylo zastřeleno, důvod byl jednoduchý, byli to členové studentského spolku. Ostatní studenti byli zavřeni do konírny bez jídla a byli 18. listopadu roku 1939 převezeni vlakem do koncentračního tábora v německém Sachsenhausenu. Tak začal nacistický boj namířený proti české inteligenci.

V koncentračním táboře pan Jaroslav Franc strávil téměř tři roky života. Jeho každodenní náplní byla těžká práce v továrně na výrobu cihel. Po celé tři roky snídal kávu ze žaludů, k obědu měl polévku z tuřínu občas s kouskem brambory a na večeři dostával 20 deka vojenského chleba komisárku, který byl z poloviny z pilin. Jak sám

říká, základem přežití byla dobrá psychika. Spolu s ním byl v koncentráku uvězněn i jeho kamarád z Pardubic. Když mu přišel od rodičů dopis, že se jeho milá vdala, psychicky se zhroutil a byl do pár týdnů mrtvý. To, že tyto podmínky vydržel, považuje za zázrak. 20. dubna 1942 (v den Hitlerových narozenin) byl totiž spolu s dalšími studentskými vězni propuštěn. Na jejich propuštění má pravděpodobně zásluhu španělský Červený kříž. Měly se opět otevřít vysoké školy, ale ve skutečnosti zůstaly zavřené až do konce druhé světové války. Během války se tedy Jaroslav Franc na studia nevrátil. Místo toho vykonával dělnickou profesi a nastoupil do pardubické mlékárny. Na chemii však nezapomněl, ve volných chvílích se věnoval jejímu studiu, aby po otevření vysokých škol mohl co nejdříve složit zkoušky a pokračovat ve své vědecké práci. To se mu splnilo až v červnu 1945, kdy po kapitulaci Německa byly vysoké školy konečně znovu otevřeny. „Profesoři ihned začali zkoušet, jako by bylo po prázdninách. Jediné, v čem vyšlo vedení vstříc, bylo zrušení prerekvizit. Mohli jsme tedy zkoušky dělat v libovolném pořadí.“

Po dostudování vysoké školy nastoupil v roce 1946 do Výzkumného ústavu organických syntéz (dřívější Spolek pro chemickou a hutní výrobu) v Pardubicích, kde působil až do důchodu. Jeho vedoucím byl dr. Wanka, zakladatel pardubické univerzity.



Obr. 3: Pracovní skupina z Výzkumného ústavu organických syntéz [1].

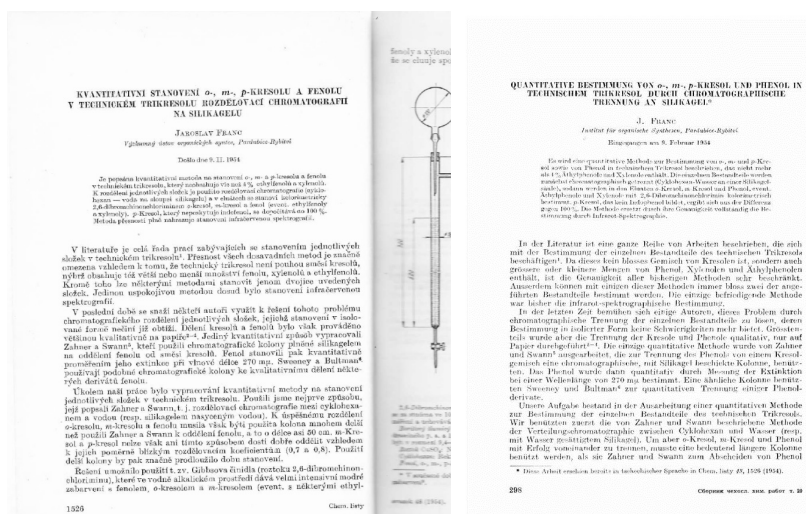
Společně s doktorem Wankou je spojovala i idea o podniku, který by vyráběl chemikálie se zaručenou čistotou nejen pro Československo, ale pro celý svět. Jediným výrobcem byl v poválečné Evropě německý MERCK, který však byl za války zničen, a proto se svůj nápad rozhodli uskutečnit. V roce 1953 tak společně založili podnik Lachema, který adjustoval čisté, speciální a laboratorní chemikálie a v padesátých letech minulého století se stal předním výrobcem analytických činidel a indikátorů, cukrů, aminokyselin, barviv pro mikroskopii a dalších chemikálií a biochemikálií. Ač oba působili v pardubickém Výzkumném ústavu, rozhodli se Lachemu založit v Brně. „Hodila se tam, v Pardubicích byly v té době tři výzkumné ústavy a Lachema měla být komerčním podnikem, proto jsme se ji rozhodli umístit do Brna.“ Sám Jaroslav Franc se zabýval čistotou chemikálií, soustředil okolo sebe kolektiv asi 12 lidí, kteří analyzovali

čisté chemikálie podle předpisů MERCKu. Tyto postupy se jim však zdály těžkopádné a zdlouhavé, proto je napadlo zkusit využít v tu dobu novou separační techniku – papírovou chromatografii a chromatografii na tenké vrstvě. V roce 1947 tak byli schopní rychle a jednoduše prokázat čistotu používaných chemikálií a rovnou tak dokázat případné nečistoty. Bohužel kvůli nemoci se spoustu představ a plánů nepodařilo panu Francovi uskutečnit, navíc v roce 1954 zemřel doktor Wanka. „Všechno po jeho smrti tak nějak vyšumělo, ale já už jsem zůstal u chromatografie“, potvrzuje pan Franc.

Mimo chromatografie, ať už papírové, na tenké vrstvě, plynové nebo kapalinové, se zajímal také o elektroforézu, což dokazuje i celkový počet jeho publikací a patentů. Publikoval na 160 odborných prací, převážně v oblasti chromatografie (Chemické listy, Collection of Czechoslovak Chemical Communications, Journal of Gas Chromatography, Journal of Chromatography, Microchimica Acta, Analytica Chimica Acta), patentů má 59. Podle jeho slov se není čemu divit, neboť „vše začínalo velmi primitivně, tak jsem dělal všechno“.

Jeho první publikace z roku 1954 popisuje kvantitativní metodu pro stanovení o-, m-, p-kresolu a fenolu v technickém trikresolu (Obrázek 5). K rozdělení jednotlivých složek byla použita chromatografie, kde mobilní fáze tvořená cyklohexanem a vodou protékala skrz chromatografický silikagelový sloupec ze zásobní baňky umístěné nad kolonou. Pod kolonou byl umístěn jímač frakcí, hliníkové kolo s otvory pro zkumavky, do kterých byly jímány analyzované látky, nebo samotná mobilní fáze. K eluovaným látkám bylo přidáno činidlo za vzniku charakteristického zbarvení, díky kterému mohly být látky identifikovány. V tomto případě bylo pro

kolorimetrické stanovení využito 2,6-dibromchinonchloriminu (o-kresol, m-kresol a fenol). p-Kresol neposkytuje s tímto činidlem specifickou reakci, proto bylo jeho množství dopočítáváno ručně do hodnoty 100 %. Tato nově vyvinutá metoda tak mohla plně nahradit stanovení infračervenou spektrografií, která byla používána dříve.



Obr. 4: První odborná publikace Jaroslava France: Kvantitativní hodnocení o-, m-, p-kresolu a fenolu v technickém trikresolu rozdělovací chromatografií na silikagelu. Na obrázku české a německé znění publikace, v českém znění je v pravé části také náčrt separační aparatury pro chromatografii [2].

Ve druhé polovině šedesátých let byl do pardubického Výzkumného ústavu organických syntéz pořízen první kapalinový chromatograf značky Hewlett-Packard s fotometrickou detekcí. Pro vyhodnocování byly místo softwarového automatického zpracování

používány jednoduché planimetry a veškeré výpočty byly prováděny pouze pomocí logaritmického pravítka.

Další práce Jaroslava France se ubírala směrem plynové chromatografie. Sám sestavil plynový chromatograf, který pak vyráběla firma Meopta. Přístroj sestavil v době, kdy byl do Pardubic přivezen první plynový chromatograf z Anglie. Ten byl jednoduchý, s tepelně vodivostním čidlem pro detekci, ale velmi drahý. Jeho cena se pohybovala okolo čtvrt milionu korun. Proto Jaroslav Franc sestavil chromatograf vlastní, který byl asi desetkrát lacinější, avšak stejně účinný. K tomuto přístroji si také vyráběl vlastní nosič z hlinky pro filtrační materiál a z cihlářské hlíny dovážené do Pardubic z nedalekého Hrochova Týnce. Tyto dvě suroviny se smíchaly, vypálily se při 1100 °C, vzniklé valounky pak byly rozemlety, drť proseta na sítích a takto byla získána náplň pro kolony místo substancí dovážených z Ameriky. Pro plynovou chromatografii také sestrojil vlastní detekční zařízení pomocí fotonásobiče. V něm neustále hořel vodík, který se rozsvítil pokaždé, když k němu doputovala jiná látka. Povedlo se mu také sestavit chromatograf, kterému pro svůj tvar říkal „PIANO“. Piano vzniklo spojením kapalinové a plynové chromatografie, sdružovalo dohromady oba dva přístroje.



Obr. 5: Plynový chromatograf, jehož autorem je Jaroslav Franc [2].



Obr. 6: Přístrojové vybavení laboratoře Jaroslav France[2].

V průběhu práce s chromatografickými metodami ho neustále dráždila jedna otázka: „PROČ?“. Proč se to tak děje, proč se látky separují tak, jak se separují, nebo se neseperují. Z tohoto důvodu se také velmi podrobně zabýval separací isomerů. V té době se totiž tvrdilo, že isomery od sebe nelze oddělit. Jaroslav Franc však svojí prací dokázal, že toto tvrzení je nepravdivé. Odvodil rovnici, ze které je patrné, že oddělení isomerů je možné na základě velikosti dipólového momentu. Veškeré chromatografické dělení je založeno na energii vodíkových můstků, energie je odlišná podle typu vazby a vázaného atomu, proto je možné isomery od sebe oddělit. Tomuto

tématu se velmi obsáhle věnuje v mnoha svých publikacích (Obrázek 8). Jeho práci pak završilo vydání knihy „Reakční chromatografie v organické analýze“, jejímž cílem je seznámit čtenáře s možnostmi analytického a preparativního dělení kapalných i plynných látek, které se používá při identifikaci či stanovení funkčních organických skupin.

**CHROMATOGRAPHIE AROMATISCHER ISOMEREN III.*
ÜBER DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN DIPOLMOMENT UND R_F -WERT
VON NAPHTHALINDERIVATEN****

J. FRANČ und J. LATINÁK

*Forschungsinstitut für organische Synthesen und VEB Ostböhmische chemische Werke,
Pardubice-Rybitví*

Eingegangen am 22. Oktober 1954

Es wurde der Zusammenhang von Dipolmoment und R_F -Wert in der Naphthalinreihe bestätigt. Als Beispiele wurden einige in der Farbstoffchemie wichtige Naphthalinderivate ausgewählt.

In den vorangehenden Mitteilungen dieser Reihe¹⁻² diskutierten wir die Beziehung zwischen R_F -Wert und Grösse des Dipolmoments bei aromatischen Isomeren der Benzolreihe. Es wurde für die Abhängigkeit folgende empirische Formel¹ abgeleitet

$$R_F = K \pm 0,1\mu.$$

In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob diese Beziehung auch für isomere Derivate der Naphthalinreihe gilt.

Hoyer³ stellte fest, dass sich bei der Chromatographie der Nitronaphthylamine an Aluminiumoxyd (nach Brockmann) bei Verwendung von Benzol als Lösungsmittel die einzelnen Isomere in der aus Tab. I ersichtlichen Reihenfolge trennen lassen. Nach Hoyer, der behauptet, dass Isomere mit intramolekularer Wasserstoffbrücke schneller wandern als solche ohne Wasserstoffbrücke, sollten 1-Nitro-2-amino- und 2-Nitro-1-aminonaphthalin am schnellsten wandern.

Tabelle I

Reihenfolge der Nitroaminonaphthaline bei Chromatographie an Aluminiumoxyd³

Nitroaminonaphthaline	Reihenfolge auf der Säule	Gemessene Dipolmomente ^{4,5}
1-Nitro-4-aminonaphthalin	am langsamsten	6,97
1-Nitro-2-aminonaphthalin	trennen sich nicht	4,47
2-Nitro-1-aminonaphthalin		4,89
1-Nitro-8-aminonaphthalin	am schnellsten	3,12

In Wirklichkeit wandert jedoch am schnellsten 1-Nitro-8-aminonaphthalin, bei dem bestenfalls eine nur sehr schwache Wasserstoffbrücke entstehen kann⁶. Deshalb gibt auch Hoyer zu, dass noch eine andere Gesetzmässigkeit existiert, die die Reihenfolge der getrennten Isomeren beeinflusst. Aus Tab. I, in der wir auch die gemessenen Werte der Dipolmomente^{4,5} anführen, ersieht man, dass die Reihenfolge der Dipolmomentwerte der Reihenfolge der einzelnen Isomeren entspricht.

* II. Mitteilung: Chem. listy 49, 325 (1955); diese Zeitschrift 20, 826 (1955).

** Diese Arbeit erschien bereits in tschechischer Sprache in Chem. listy 49, 328 (1955).

Obr. 7: Jedna z mnoha publikací pojednávajících o chromatografickém dělení isomerů [4].

Ing. Franc, CSc. byl také jedním z prvních průkopníků analýz v oblasti tzv. silikonové chemie. V Kolíně se ve druhé polovině minulého století vyráběly organické produkty na bázi křemíku. Nevýhodou používaného materiálu však bylo to, že byly nerozpustné ve všech dostupných rozpouštědlech, a proto nebylo možné chromatografickou analýzu provádět. K rozložení silikonů se tedy používala pyrolýza, po které mohlo dojít k analýze látek. Velkým problémem ale bylo udržení konstantní teploty v průběhu celé pyrolýzy, aby byla zajištěna dobrá reprodukovatelnost této procedury. Jaroslava France ale napadlo, že by se místo pyrolýzy a neproveditelného rozpouštění dalo využít rozložení chemického. Zjistil, že silikonky se dají reprodukovatelně rozštěpit pomocí fluoridu boritého a získané složky už je možné jednoduše analyzovat. Analýzu prováděl pomocí plynové chromatografie, ve které využil jako nosného plynu dusíku, analyzované látky převedl na plyný vodík a mohl tak detekovat i velmi malá množství analytů na základě vysoké citlivosti této metody dané rozdílem tepelné vodivosti mezi dusíkem a vodíkem.

Celoživotním mottem Ing. France bylo heslo „Work. Finish. Publish.“. Podle jeho slov jde všechno vysvětlit, pokud je dostatek času a peněz. „Oproti svým kolegům jsem měl ohromnou výhodu, a to, že jsem byl trpělivý. Asi jsem si to odnesl z koncentráku. Každý den, třikrát denně nás přepočítávali, počet vězňů musel souhlasit. Stačilo, aby jeden chyběl, a stálo se tak dlouho, dokud se nezjistilo, co se děje. Spoustu lidí umíralo, někam zalezl a už ho nenašli. Tak dlouho stojíte, bez jídla, bez vody, v mrazu, v dešti, v horku, v noci, ani vyčůrat se nemůžete. To vás naučí trpělivosti. Kolegové trpěliví nebyli, něco rozpracovali, ono to nešlo, tak přešli k něčemu jinému a tamto nechali být.“ Sám se tedy snažil veškerou práci nejprve dokončit, než začal něco jiného. Práci si vždy rozplánoval, a protože

už měl za sebou nějakou praxi, věděl, že naplánovaný čas je potřeba znásobit asi dvakrát, aby odpovídal realitě („U každé práce se vyskytnou problémy, které řešení protáhnou“). Podle pana France je chromatografie něco jako v medicíně antibiotika. „Ukažte mi dnes obor, kde by se neuplatnila“, říká nadšeně pan Franc.

V rámci svého povolání Jaroslav Franc navštěvoval zahraniční konference a laboratoře. Z počátku s ním jezdili příslušníci StB, ale protože pan Franc nade vše miloval svoji rodinu a Pardubice, začali ho později pouštět samotného, bez dozoru. Věděli totiž, že se vrátí. Mohl se tak podívat na pracoviště v Německu, Rusku, Holandsku i v Americe. Oproti ruským laboratořím jsme dle jeho slov měli lépe vybavené laboratoře. Ač v Rusku měli spoustu přístrojů pro plynovou i kapalinovou chromatografii a v Čechách převládala chromatografie na tenké vrstvě, českoslovenští vědci na tom byli o mnoho lépe. Dokázali si totiž sami sestavit vlastní přístroje a nebyli odkázáni pouze na velké výrobce a dodavatele. V porovnání s laboratořemi v USA na tom Českoslovesko také nebylo špatně. „V Americe jsme se mezi budovami výzkumného ústavu dopravovali autobusem. Navíc tu měli jiný systém. Vysokoškolský pracovník měl k ruce spoustu „dones, podrž, podej“ pomocníků, ale žádné středoškoláky. U nás to bylo jinak. Byli jsme my vysokoškolští pracovníci, středoškolští a pak už skoro nic. Ale Američané nám přesto říkali, že my, Čechoslováci, jsme v chromatografii o mnoho lepší než oni“, porovnává Jaroslav Franc. Nejenom, že mohl navštívit zahraniční laboratoře, byl také členem Anglické královské chemické společnosti, či Názvoslovné komise IUPAC, díky čemuž se dostal i na recepci k americkému prezidentovi. Za největší ocenění však nepovažuje tato členství, ale pozvání do Tallinnu, kde v roce 1978 obdržel při příležitosti 75. výročí od objevení chromatografie ruským vědcem M. S. Cvětem medaili za rozvoj chromatografie.



Obr. 8: Plaketa za rozvoj chromatografie udělená Akademií věd SSSR v roce 1978 v Tallinnu při příležitosti 75. výročí od objevení chromatografie botanikem M. S. Cvetem [5].

Po skončení práce ve Výzkumném ústavu organických syntéz se Jaroslav Franc ještě 20 let věnoval výuce jazyků společně se svojí ženou. I po odchodu do penze se pan Franc nadále věnuje psaní publikací a do nedávna byl také členem komise pro státní závěrečnou zkoušku z analytické chemie na Univerzitě Pardubice. Mimo jiné také navštěvuje střední a základní školy, kde studentům vypráví o životě za války.

Zdroje fotografií:

1. <http://www.pametnaroda.cz/witness/photo/id/1714>;
online 10. května 2014.
2. Archiv Jaroslava France.
3. <http://cccc.uochb.cas.cz/20/2/0298/>; online 10. května
2014.
4. <http://cccc.uochb.cas.cz/20/4/0830/>; online 10. května
2014.
5. E. Smolková – Keulemansová, Chem. Listy 97 (2003)
134 - 139.

Kapitolu zpracovaly Mgr. Veronika Pilařová a doc. Lucie Nováková na základě materiálů poskytnutých Ing. Jaroslavem Francem, CSc. ve formě rozhovoru i elektronických dat, za což jim patří srdečný dík.

5. VÁCLAV INEMAN



Do servisu HP jsem nastoupil v roce 1985 a cca rok jsem provozoval něco jako příštipkaření. Servis tehdy fungoval pod hlavičkou n. p. Kancelářské stroje a tyto měly striktní pravidlo, že do kapitalistické ciziny smí zaměstnanec až po roční zkušební lhůtě. HP mělo také striktní pravidlo - jejich zařízení smí servisovat pouze úspěšný absolvent příslušného servisního kurzu. A tak jsem rok dělal

šoféra kolegovi, opravoval spínané zdroje malých počítačů, vyměňoval žárovničky atd. Ve zpětném pohledu to ale až tak zbytečné nebylo. První školení u HP bylo příjemným překvapením - do detailu popsané části hlavní desky a jejich diagnostika - včetně varování neopravovat, pouze vyměnit, k čemuž na štěstí (zákazníků) nikdy nedošlo.

Nu a od té doby už to byla/je rutina.

Komentář k fotce: Pracoval jsem na kapalinovém chromatografu HP 1050 (pravidelná údržba) a na závěr jsem chtěl vrátit zpět kolonu, kterou mezitím dámy z obsluhy uklidily. Je prý v první zásuvce pod strojem. Když jsem ji otevřel ležela tam vedle oné kolony i moje fotka (A4 !!! hrůza). Při dotazu jsem se dozvěděl, že ji používají jako strašáka, pokud se něco nedaří a prý velice úspěšně.

ÓDA NA HP 1090

V době, kdy jsem opustil analytickou laboratoř (1985) a odešel do servisu HP, tehdy pod hlavičkou n. p. Kancelářské stroje, byl trh s přístroji sice bohatý, ale nic nefungovalo na 100 %. Byly zde sice přístroje již docela použitelné, nicméně pořád se o nějaké reprodukovatelnosti analýz nedalo mluvit. V této konstelaci ale daleko v čele plula vlajková loď HP – 1090. Ať se na mě příznivci konkurenčních firem nezlobí, vidím to tak.

To jen na úvod. Během času, bylo to na jaře 1986, jsem instaloval v Neratovicích první 1090ku na oddělení speciálních chemikálií a při instalaci jsem se poněkud vytahoval, že předvedu dvě po sobě jdoucí analýzy, které se nebudou na prvních třech místech (retenční časy, plochy píků) lišit. Ing. P. E. byl ovšem názoru jiného, a to, že opravdovou kvalitu ukáže až praxe, a nikoliv nějaký nacvičený trik. Pár dní poté jsem měl cestu do Neratovic znovu a při té příležitosti se zastavil optat na zkušenosti. Byly pozitivní a debata přešla do obecné roviny chromatografických problémů. V té době se k nám připojil šéf oddělení a svorně jsme kritizovali kvalitu rozpouštědel pro gradientovou analýzu. Pak se ale šéf otočil na mě a řekl: „Pane kolego, stejně ty „Vaše“ stroje fungují nějak divně.“ Jelikož před tím o nějakých problémech nic nezaznělo, zůstal jsem udiveně koukat a on pokračoval. „No on ten „Váš“ stroj neměří standardy.“ Zůstal jsem koukat ještě víc a vykoktal otázku, zda tedy měří alespoň vzorky. A odpověď byla: „Jó, vzorky ty měří, ale kalibrační standardy změří jen jednou a pak už je jen opisuje.“

6. PAVEL JANDERA



Pavel Jandera, prof. Ing. DrSc., narozen 1.4. 1944 v Hradci Králové, profesor Katedry analytické chemie Fakulty chemicko-technologické na Univerzitě Pardubice. V r. 1967 dokončil inženýrské studium na VŠCHT Pardubice, na Katedře analytické chemie, kde od r. 1970 působil postupně jako odborný asistent. V r. 1977 obhájil kandidátskou práci, v r. 1989 získal hodnost DrSc.

Habilitovat se směl až v r. 1990, v r. 1992 byl jmenován profesorem analytické chemie. V této funkci stále působí na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice. Ve vědecké práci se zabývá především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, kde se zaměřuje na studium principů separace a retenčních mechanismů. Vypracoval ucelenou teorii chromatografie s programovanou elucí, zabýval se vývojem technik gradientové eluce v preparativní chromatografii, v poslední době se věnuje vývoji monolitických kapilárních kolon a dvourozměrné kapalinové chromatografii. Výsledky publikoval formou 250 článků v mezinárodních odborných časopisech. Je autorem řady monografií a plenárních přednášek na mezinárodních konferencích. Je členem mezinárodních komisí a držitelem ocenění, z nichž poslední je ocenění Britské Chromatografické společnosti z r. 2015 medailí AJP Martina.

Před časem mi kolega Pól věnoval knížku o historii československé hmotnostní spektrometrie, která se mi moc líbila, a současně mne požádal o sepsání příspěvku do plánované knížky o historii československé HPLC. Rád jsem souhlasil a výsledkem je tato kapitola, kde se pokouším zachytit postupně blednoucí vzpomínky na postupný přechod od klasické nízkotlaké kapalinové chromatografie k moderní HPLC na Katedře analytické chemie VŠCHT v Pardubicích, v kontextu tehdejší celkové situace, na vývoj techniky a na lidi, kteří se na něm podíleli. Mé vyprávění je osobní a neúplné, řada z kolegů - pamětníků - v jiných kapitolách prezentuje svůj, v mnohém jistě odlišný a někdy možná i objektivnější, pohled na vývoj HPLC.

LÉTA ŠEDESÁTÁ - POČÁTKY CHROMATOGRRAFIE NA VŠCHT V PARDUBICÍCH

Pardubickou VŠCHT jsem studoval v letech 1962-1967. Jako specializaci jsem si vybral analytickou chemii a nelitoval jsem. Poměry na Katedře analytické chemie byly na tehdejší dobu velmi liberální, především zásluhou zcela mimořádné osobnosti jejího tehdejšího vedoucího, zakladatele československé školy organické analýzy, prof. Ing. Dr. Miroslava Jurečka, DrSc. Pan profesor vedl katedru až do r. 1971. Prof. Jureček zosobňoval nejlepší odborné a lidské kvality profesora z prvorepublikové doby a získal si neobyčejný respekt. Byl vynikajícím vědcem a náročným pedagogem, měl obrovský všeobecný přehled, vždy byl ochoten zapáleně diskutovat o svém oboru a projevoval velmi lidský přístup k mladším kolegům i studentům, s nimiž přicházel do styku.



Obr. 1: Dnes zrenovovaná budova bývalé strojnické průmyslovky na Náměstí Legii (dříve Leninovo nám.), sídlo VŠCHT v Pardubicích.

Další osobností, která měla rozhodující vliv na můj odborný vývoj, byl prof. Ing. Jaroslav Churáček, DrSc. Jaroslav patřil k prvním absolventům VŠCHT, kterou absolvoval v r. 1957. V témže roce přijal prof. Jureček čerstvého inženýra Churáčka jako asistenta na katedru, kde pod jeho vedením v r. 1963 obhájil hodnost kandidáta věd, v r. 1967 se stal docentem a v r. 1971 vystřídal prof. Jurečka jako její vedoucí. V r. 1975 získal hodnost doktora věd a v r. 1981 byl jmenován profesorem analytické chemie. Prof. Churáček si brzy po svém nástupu uvědomil rozhodující úlohu, kterou budou mít nastupující instrumentální metody v moderní organické analýze, a byl zakladatelem a průkopníkem chromatografie v Pardubicích. Od r. 1965 začal pravidelně přednášet chromatografické separační metody na VŠCHT v Pardubicích. K přednáškám vydal v r. 1966 i skripta a zavedl laboratorní cvičení, kde jsme se jako studenti seznamovali s experimentálními základy papírové, tenkovrstvá a

plynové chromatografie. V jeho chromatografické skupině pracovali dr. Dagmar Tocksteinová, Ing. Helena Pechová a Ing. Karel Komárek. Dáša a Helenka, s nimiž jsem několik prvních let po nástupu sdílel laboratoř, se zabývaly chromatografií barevných derivátů aminů, fenolů, alkoholů a dalších látek v plošném uspořádání, po derivatizaci činidly, vyvinutými na Katedře analytické chemie ve spolupráci s Katedrou organické chemie pardubické VŠCHT. Většinu těchto typů derivátů jsem později zkoušel separovat kolonovou kapalinovou chromatografií. Kája Komárek se intenzivně zabýval aplikacemi tehdy nové techniky plynové chromatografie, především pro analýzu halogenovaných esterů karboxylových kyselin.



Obr. 2: Prof. Churáček ukazuje prof. Jurečkovi jednu ze svých publikací v časopisu Journal of Chromatography.

Chromatografické experimenty ve studentských laboratořích se mi moc líbily a po promoci v r. 1967 jsem s radostí přijal nabídku

tehdejšího docenta Jaroslava Churáčka na roční studijní pobyt v jeho chromatografické skupině. V té době se ve světě začala výrazně modernizovat technika analytické sloupcové kapalinové chromatografie, kterou chtěl Jaroslav zařadit do portfolia své "separatistické" skupiny. Měl jsem tedy příležitost "být při tom", když si technika HPLC postupně nacházela cestu do Československa.

1967- 1970: IONTOVĚ-VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE.

Když jsem v září 1967 nastoupil na studijní pobyt k doc. Churáčkovi, měla československá chromatografie ve světě už velmi dobrý zvuk, zejména díky průkopnickým pracím gigantů tohoto oboru: Jaroslava Janáka v plynové chromatografii, Karla Macka a Ivo Haise v technikách chromatografie v plošném uspořádání. Vedle nich už v této době získali věhlas na poli plynové a tenkovrstvené chromatografie další osobnosti jako Josef Novák v Janákově Ústavu analytické chemie v Brně, Eva Smolková-Keulemansová na Karlově Univerzitě v Praze, Jaroslav Franc a Jiří Gasparič v Pardubicích. Postupně přibývali další.

Přesto, že kolonová kapalinová chromatografie byla objevena M. S. Cvetem již začátkem 20. století, její aplikace se až do druhé poloviny šedesátých let omezovaly na nízkotlakou klasickou techniku. Od čtyřicátých let byla nejvíce využívána chromatografie iontové výměny, pro niž byly od konce padesátých let k dispozici jednoúčelové komerční přístroje - analyzátory aminokyselin, předchůdci prvních přístrojů pro HPLC. Začátkem šedesátých let se objevila komerční zařízení pro nízkotlakou molekulovou vylučovací chromatografii na hydrofilních gelech (gelovou filtraci). V polovině šedesátých let realizovaly první separace technikou HPLC (i když s tlakovým omezením do cca 50 barů) skupiny Josefa Hubera na univerzitě v Eindhovenu a Csaby Horvátha na Yale University v USA.

První komerční přístroje pro středotlakou LC uvedly na trh koncem šedesátých let firmy Waters a DuPont. Za průlomovou práci v této oblasti lze označit (tehdy) rychlou separaci nukleotidů v úzkých kolonách s povrchově pórovitými částicemi s filmem iontově-výměnné stacionární fáze na nepropustném kulovém jádru [C.G. Horváth, B.A. Preis, S.R. Lipsky, Anal. Chem. 39 (1967) 1422]. Tato práce byla publikována v době, kdy jsem promoval.

Krátce po nástupu na katedru mě Jaroslav Churáček poslal na stáž do Ústavu makromolekulární chemie Československé akademie věd v Praze na Petřinách k dr. Jiřímu Štambergovi, který spolu s Ing. Janem Kupcem připravil ionexové "kapilární kolony". Teorii kapilárních kolon v plynné fázi publikoval Golay již v padesátých letech a od druhé poloviny šedesátých let byly k dispozici otevřené skleněné kapilární kolony pro GC. Nic takového nebylo zatím v kapalinové chromatografii. Z dnešního pohledu Štambergovy a Kupcovy kolony nelze považovat za kolony skutečně kapilární, byly to polyetylenové trubičky s vnitřním průměrem 0,5 - 1 mm, s cca 0,2 mm silnou vrstvou polystyren(ko)divinylbenzenového anexu, naroubovanou na vnitřních stěnách. Já jsem se měl pokusit využít je k chromatografické separaci, což z principiálních důvodů nemohlo být příliš úspěšné. Pokusy nakonec vyústily do krátkého sdělení o studii sorpce a desorpce chlorokomplexů železa a dalších kovů, které jsme separovali postupnou elucí vodnými roztoky s klesající koncentrací HCl [Coll. Czech. Chem. Commun., 35 (1970) 3112-3118]. První úspěšné separace technikou skutečně kapilární HPLC se objevily v USA a Japonsku až cca o dvacet let později a my jsme se v devadesátých letech k této oblasti také vrátili.

Přesto byla pro mne stáž na ÚMCH v listopadu 1967 a v březnu 1968 velmi užitečná. Poznal jsem nesmírně milé a vstřícné kolegy, kteří

mladému zelenáči velmi ochotně vycházeli vstříc, zvláště Honza Kupec (nyní profesor na Baťově Univerzitě ve Zlíně), ale i další. Šéf oddělení, Ing. Jiří Štamberg, DrSc. (autor velmi instruktivní knížky o ionexech), mi později laskavě oponoval disertační práci. V laboratoři jsem se setkal i s doc. Arturem Stoyem a oddělením párkrát prošel i ředitel ústavu, prof. Wichterle. Na ÚMCH působili především odborníci na syntézu polymerů, z nichž mnozí vyvíjeli sorbenty potenciálně vhodné pro separace, především v oblasti gelové a iontově-výměnné kapalinové chromatografie, z nich především Ing. Jiří Čoupek, který se svou skupinou vyvinul polymerní sorbenty, vyráběné pod názvem Spherony HEMA, s chemickou strukturou podobnou materiálu, z něhož prof. Wichterle připravil své slavné kontaktní čočky. O řadu let později Ing. Čoupek vyvíjel s Ing. Vozkou sorbenty pro HPLC na bázi silikagelu (Separony) a založil firmu Tessek jako *joint venture* s dánským a americkým podílem, která spolu s n. p. Laboratorní přístroje dodávala tyto kvalitní náplně v kolonách pro HPLC, jednak v kovových pláštích, a hlavně jako vyměnitelné skleněné "kartridže" v kovových držácích. Tyto kolony byly u nás léta dostupné v dobré kvalitě a na přijatelné cenové úrovni, což velice přispělo k rozšíření HPLC techniky v Československu. Ale to předbílám události. Velkým zážitkem pro mne bylo, když jsem v jiné laboratoři uviděl první typ průtokového refraktometru od firmy Waters jako kontinuálního detektoru pro LC a dokonce jsem směl k němu připojit ionexovou trubičku a změřit záznam průchodu píku inertní látky.

Během mojí stáže v Praze "šla kolem i velká historie". Koncem roku 1967 došlo ke "strahovským událostem" - studenti vyšli do ulic demonstrovat proti poměrům na kolejích, zvláště častým nepříjemným výpadkům elektrického proudu. Příslušníci SNB (tehdejší policie) studenty vytlačili na koleje a surově je tam zmlátili.

To vyvolalo bouři protestů na všech vysokých školách (včetně VŠCHT v Pardubicích) a uspíšilo změny v ústředním výboru KSČ a nástup Dubčeka a jeho skupiny do vedení. Tento polednový "obrodný proces" se veřejně projevil až v březnu, kdy jsem byl na druhé části své pražské stáže, nebývale otevřenými projevy řady "progresivních" komunistických politiků na různých veřejných vystoupeních, což v nás vzbudilo bohužel neoprávněné očekávání liberalizace a všeobecné změny poměrů. V srpnu nás před tímto vývojem přijely zachránit tanky a rázem bylo vše jinak, invaze úplně změnila životy všech.

V září 1968 mi doc. Churáček studijní pobyt prodloužil o další rok. Díky v té době ještě dožívajícímu přechodnému uvolnění politických poměrů, Katedra analytické chemie mohla v r. 1969 přijmout do zaměstnaneckého poměru dva nové asistenty, nynějšího prof. Ing. Karla Vytřase, DrSc. a mne. Bylo už "za pět minut dvanáct". V r. 1970 postupně začala "normalizace" poměrů, kdy se všechny instituce musely zbavovat "revizionistických", v období obrodného procesu "pomýlených", či jen politicky nedostatečně horlivých živlů. Já jsem s řadou jiných kolegů začátkem léta 1968 podepsal anketu tehdejších školních odborů na podporu prohlášení "2000 slov" za obrodný proces a liberalizaci poměrů. Nějaký ideologicky pevný soudruh anketu s podpisy ofotil a nespolehlivé živly na VŠCHT v průběhu normalizace oznámil. Při normalizačních prověrkách někteří svůj podpis pod anketou k 2000 slov zapřeli, jiným nebylo konkrétní provinění u prověřkových komisí sice prokázáno, ale vzhledem k celkové nespolehlivosti, pokud byli straníci, byli vyškrtnuti ze strany (lehčí trest než vyloučení) a nesměli učit. Jejich učebnice a skripta byly vyřazeny z učebních fondů, aby snad nevhodně podanou analytickou chemií nešířili ideologickou nákazu mezi studenty. Nejhůře dopadli ti členové KSČ, kteří se v r. 1968

politicky angažovali na nesprávné straně - byli nejprve vyloučeni ze strany a posléze vyhozeni z práce. Např. kolega Pepík Královský "byl odejit" z VŠCHT do VÚOS v Rybitví, kde se dostal ke kapalinové chromatografii, což nás vedlo k dalším profesním kontaktům (po r. 1989 se na naši katedru vrátil). Jiní dopadli ještě hůře. Já a většina dalších "pomýlených" nestraníků jsme byli částečně vzati na milost, dokonce jsme i směli učit, ale se zaraženými vyhlídkami na budoucí postup. Směl jsem se tedy od neutěšené politické situace vrátit zpět do laboratoře k separacím.

Po nepříliš úspěšných pokusech s ionexovými trubičkami (jimž kolegové posměšně přezdívali "makaróny"), jsem řešil otázku, co dále. Knihovna pardubické VŠCHT byla už tehdy slušně zásobena zahraniční literaturou, včetně všech hlavních časopisů, v nichž vycházely zásadní články z oblasti tehdy se rodící techniky HPLC: *Analytical Chemistry*, *Journal of Chromatography*, *Journal of Chromatographic Science*, *Chromatographia* a *Journal of High Resolution Column Chromatography* (nyní *Journal of Separation Science*), v nichž se v té době objevovaly články zásadní pro pochopení teoretických principů vysokotlaké HPLC od Josefa Hubera, Csaby Horvátha, Johna Knoxe, Viktora Pretoriu, Raymonda Scotta a dalších. Vedle knih Olofa Samuelsona a Jánosze Inczedyho o ionexové chromatografii jsem narazil na zásadní dílo L. R. Snydera "Principles of adsorption chromatography", z něhož jsem potom řadu let čerpal poučení i inspiraci. Ionexy s relativně malými dobře tříděnými částicemi byly v té době lépe dostupné než jiné typy částic pro HPLC kolony, sám jsem si připravil několik šarží katexů sulfonací drobných částic styren-divinylbenzenových kopolymerů, získaných z tehdejšího Výzkumného ústavu syntetických pryskyřic a laků (VÚSPL) v Pardubicích. Udělal jsem poměrně rozsáhlou rešerši možnosti separací různých typů látek, jejíž výsledky jsme publikovali

s Jaroslavem ve dvou přehledných referátech v Chemických listech a později v sérii čtyř článků v Journal of Chromatography (dosti citovaných) [P. Jandera, J. Churáček, J. Chromatogr., 86 (1973) 351, 423, 98 (1974) 1, 55]. Z rešerše vyplynulo, že na klasických ionexech lze úspěšně separovat i malé neiontové organické molekuly. Ze zpětného pohledu je dnes zřejmé, že se na ionexech s organickou maticí uplatňoval mechanismus separací v systémech s převrácenými fázemi, někdy i mechanismus dnes tak populárních separací HILIC.

V té době byl na VŠCHT v Pardubicích syntetizován chlorid kyseliny N,N-dimethyl-p-aminobenzenazobenzoové jako činidlo pro přípravu barevných derivátů alkoholů, fenolů a aminů a kolegové na naší katedře se zabývali separacemi těchto derivátů chromatografií na papíře a na tenkých vrstvách. Zajímalo mě, zda by tyto deriváty nešlo dělit i na ionexových kolonách. Ve sklářských dílnách mi vyrobili skleněné kolonky dle návrhu O. Samuelsona, které jsem naplnil suspenzí silného katexu Dowex 50W-X2. Do kolonky jsem nalil asi 1 ml etanolického roztoku směsi barevných esterů, nasadil dělicí nálevku s vodně-ethanolickým roztokem kyseliny chlorovodíkové a po několika minutách jsem přes skleněné stěny kolonky s uspokojením pozoroval zřetelně oddělené barevné proužky jednotlivých derivátů [J. Churáček, P. Jandera, J. Chromatogr., 53 (1970) 69].

SEDMDESÁTÁ LÉTA

1. "HEROICKÁ DOBA" - POKUSY O KONSTRUKCI "VLASTNÍHO" KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU.

Povzbuzen výsledky separací na skleněných ionexových kolonkách jsem se rozhodl převést sloupcovou chromatografickou metodu do

sofistikovanější podoby. O prvních přístrojích pro kapalinovou chromatografii jsem četl v literatuře, ale takové zařízení tehdy nebylo možné pořídit jinak než vlastní konstrukcí. Postupně se podařilo tento úkol vyřešit s pomocí školních dílen a kolegy Ing. Václava Říhy, nadšeného konstruktéra všemožných "udělátek" pro laboratoře instrumentálních analytických metod.

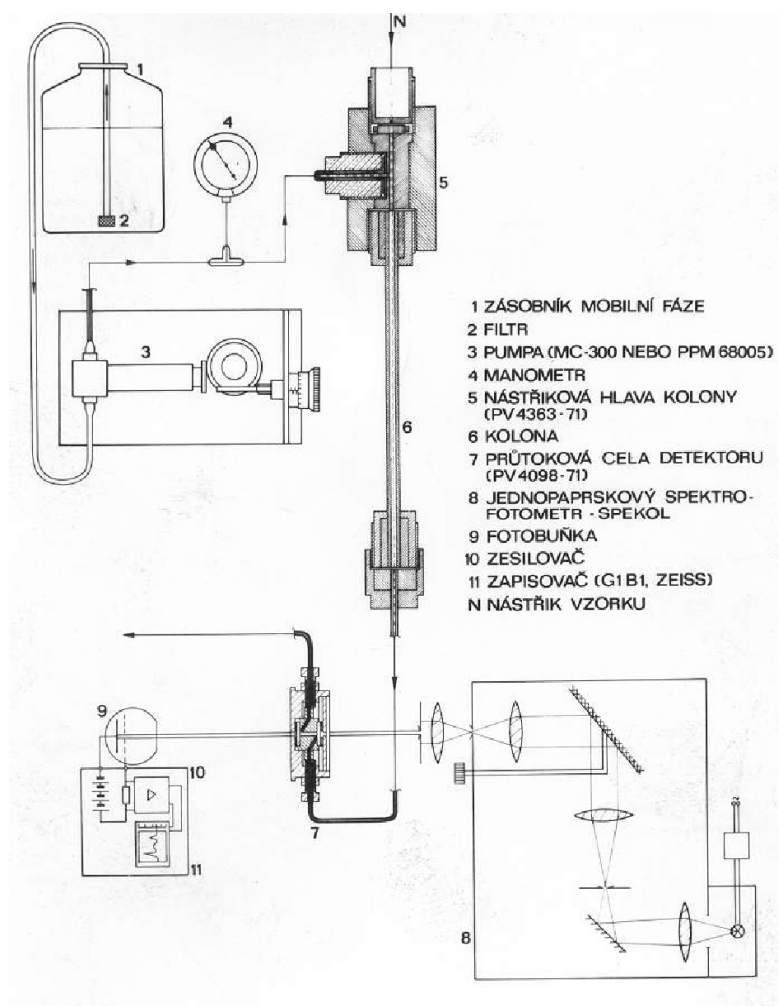
K detekci barevných derivátů jsem měl k dispozici standardní východoněmecký spektrální kolorimetr Spekol, na němž jsem dosud měřil ručně odebírané frakce eluátu ze skleněných kolonek. Ten jsme adaptovali na detektor budoucího kapalinového chromatografu konstrukcí nástavce s průtokovou celou s malým vnitřním objemem. Standardní květový prostor Spekolu jsme nahradili pouzdrem z duralu, které se z jedné strany nasadilo na krabici s optickým systémem kolorimetru, a na druhé straně se k němu připevnil fotonásobič. Do pouzdra zapadalo víčko, nesoucí průtočnou Z-celu, vyvrtanou v teflonovém bločku, opatřenou na obou stranách sklíčky, umožňujícími průchod světelného paprsku a otvory pro připojení tenkých teflonových kapilár pro přívod a výstup eluátu. Celkový vnitřní objem cely byl cca 20 μ l [P. Jandera, J. Churáček, AO 160771, 1975].

Dále bylo třeba připravit kolony, schopné přímého spojení s průtokovou celou Spekolu na jedné straně a na druhé straně přes zařízení pro dávkování vzorku s čerpadlem mobilní fáze. Jako základ kolony sloužila upravená skleněná byreta o objemu 2 ml. Její konce jsem odříznul, zabrousil do roviny a pomocí epoxidového lepidla fixoval v kovových bločcích, umožňujících připojit na výstup koncovku s průchozí teflonovou kapilárou ke spojení s průtokovou celou Spekolu a vstup upevnit do bločku pro dávkování vzorku [P. Jandera, J. Churáček, AO 1174952, 1978]. (O řadu let později u nás

začaly Tessek a Laboratorní přístroje průmyslově vyrábět skleněné kolony jako kartridže, upevněné v duralových, případně nerezových, držácích). "Byretová" kolona se našroubovala a utáhla v T-bloku s teflonovým tělem, k němuž byla po straně přes závit připojena teflonová hadička pro přívod mobilní fáze, a nahoře byl otvor, do něhož se vkládalo silikonové septum, upevněné vešroubovanou maticí. K dávkování vzorku sloužila "hamiltonka", jako u plynových chromatografů. Vzhledem k vyšším pracovním tlakům bylo třeba při dávkování dobře přidržovat píst, aby nevystřelil do stropu laboratoře. Další nevýhodou tohoto primitivního způsobu dávkování byl nepříjemný sklon k prasknutí, který skleněné stříkačky vykazovaly v ruce méně zkušených pracovníků, hlavně studentů.

Přemluvil jsem Jaroslava Churáčka, abychom koupili pístové mikročerpadlo MC 300 od firmy Mikrotechna, která ho používala ve svých analyzátoch aminokyselin.

Celé zařízení jsme vystavovali na veletrhu INVEX v Brně (Obr. 3).



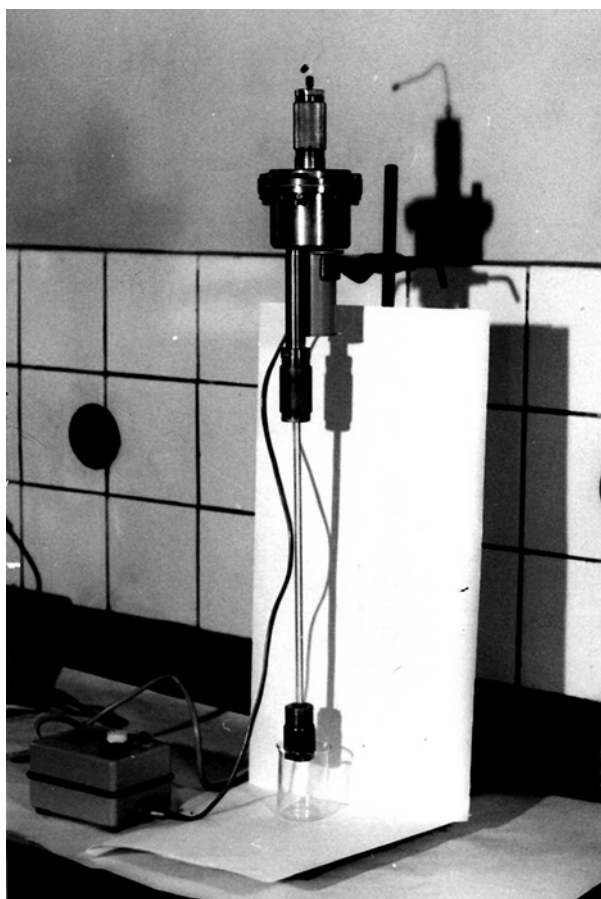
Obr. 3: Schéma přístroje pro kapalinovou chromatografii.

Čerpání agresivních mobilních fází jsme vyřešili převodníkem ve formě válcového tělesa s víkem, v němž byl zataven polyetylenový sáček s výstupní teflonovou trubičkou, který jsem naplnil etanolickým roztokem zředěné HCl. Dno převodníku bylo opatřeno

otvorem s přívodem tlačné kapaliny (vody) z mikročerpádky MC 300 do prostoru mezi sáčkem s mobilní fází a tělem pouzdra. Kapacita sáčku byla cca 200 mL. Po sešroubování a vyplnění prostoru pouzdra vodou se mohla čerpat mobilní fáze na kolonu při provozním tlaku až do cca 25 bar [P. Jandera, J. Churáček, AO 161380, 1975]. Výhodou tohoto zařízení bylo, že automaticky kompenzovalo kolísání tlaku, způsobené střídáním výtlačné a sací periody mikročerpádky.

Později jsme od Mikrotechny koupili i mikročerpádko PPM 68005 se dvěma bloky pro gradientovou eluci (Obr. 4). Zařízení se vyznačovalo zajímavým "softwarem". Požadovaný časový program změny složení mobilní fáze se nakreslil jako tlustá černá čára tuší na bílou čtvrtku papíru, která se napnula na otáčivý buben. Nad bubnem bylo umístěno reflexní čidlo se zdrojem světla a fotonkou pro sledování intenzity záření, odraženého ze čtvrtky, které bylo nastaveno na sledování rozhraní čáry, charakterizující program gradientu. Při pohybu bubnu mimo černobílé rozhraní předkresleného programu gradientu se změnila intenzita odraženého světla, na niž bylo čidlo nastaveno a generoval se proudový signál ve vyváženém můstkovém elektrickém obvodu. Signál vyvolal pohyb malého servomotoru, který kontinuálně přestavoval čidlo na měnící se polohu černobílého rozhraní tak, aby byla obnovena proudová rovnováha na elektrickém můstku. Pohyb čidla nad bubnem se přenesl na změnu polohy obou bloků, čerpajících složky mobilní fáze, jejichž poměr dodávaný jednotlivými bloky se takto měnil podle předkresleného programu při zachování celkového objemového průtoku mobilní fáze, dodávané na kolonu. Celkovou rychlost pohybu obou bloků, a tím i průtok mobilní fáze bylo možno nastavit ručně pomocí převodů ozubených koleček, podobně jako rychlost otáčení bubnu s gradientovým programem,

Pro zvýšení účinnosti separací jsme zkonstruovali plničku, kde bylo možno dosáhnout rovnoměrného plnění skleněných kolon kontinuálně promíchávanou suspenzí nabídnutých ionexů (Obr. 5).



Obr. 5: Pohled na plničku skleněných "byretových" kolon.

Konstrukce tohoto zařízení, koncem šedesátých let zřejmě jednoho z prvních kapalinových chromatografů v Československu, zabrala téměř dva roky, ale používal jsem jej potom dalších 5 let k separacím barevných derivátů aminů, fenolů a alkoholů na kolonách plněných silnými katexy s okyselenými vodně-etanolickými mobilními fázemi, později i k separacím těchto látek na tříděném silikagelu v čistě organických mobilních fázích.

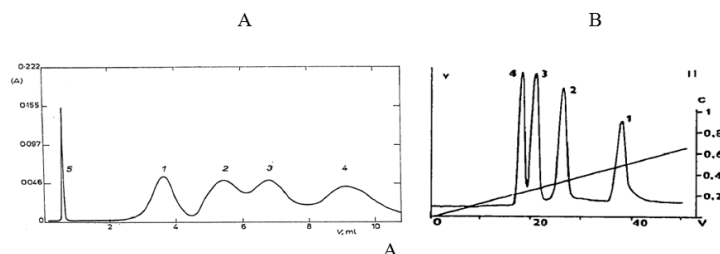


Fig. 4. Chromatographic separation of some primary aliphatic esters of *N,N*-dimethyl-*p*-aminobenzenesulfonic acid. (A) Absorbance. Column 240×2.7 mm, Dowex 50W-X2 (200-400 mesh) H^+ form. Sample volume $20 \mu l$. Eluent — $0.025 M$ HCl in 80.5% ethanol. Flow rate 0.016 ml/min, 15 mm optical path length cell, $\lambda = 510$ nm. (1) $0.5 \mu g$ of *n*-nonyl ester; (2) $0.5 \mu g$ of *n*-amyl ester; (3) $0.5 \mu g$ of *n*-propyl ester; (4) $0.5 \mu g$ of methyl ester; (5) inert compound (Ponceau 6R).

Fig. 5. Gradient elution chromatographic separation of a mixture of the dimethylamide (1), diethylamide (2), di-*n*-propylamide (3), and di-*n*-butylamide (4) derivatives on a column (400×3 mm) packed with Porasil A ($V_m = 2.00$ ml) using ethyl acetate-cyclohexane mixtures as mobile phase.

Obr. 6: Separace barevných esterů kyseliny *N,N*-dimethyl-*p*-aminobenzenazobenzové na koloně plněné katexem Dowex 50W-X-2 (A) a na koloně silikagelu (B). Přetištěno z časopisu *Journal of Chromatography*.

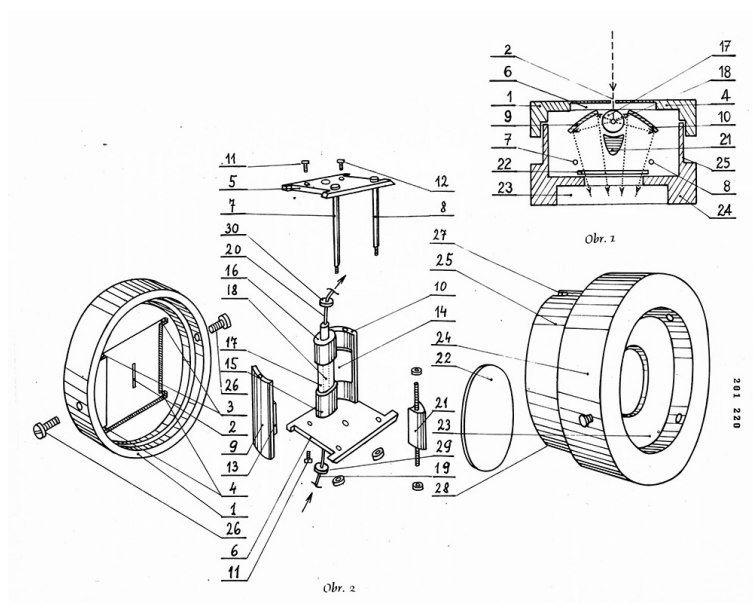
Obr. 6 ukazuje chromatografický záznam separace barevných derivátů na skleněné "byretové" koloně plněné katexem (6A) a na koloně plněné silikagelem s mobilní fází octan ethylnatý - hexan (6B). Na obou kolonách se deriváty eluují v pořadí klesajících délek alkylových řetězců, tedy v obráceném pořadí než v dnes běžných systémech s převrácenými fázemi. Je to tím, že separace na Obr. 6B se řídí mechanismem klasické (adsorpční) chromatografie v systému

s normálními fázemi, zatím co separaci neiontových látek na katexu na Obr. 6A lze považovat za jednu z raných aplikací HILIC chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), 15 let před tím, než Andrew Alpert zavedl tento akronym.

O přístroji pro LC separace jsem přednesl referáty doma i na mezinárodních konferencích 8th International Gel Permeation and Liquid Chromatography Seminar v Praze v červenci 1970 a 3rd Analytical Conference v Budapešti v srpnu 1970 a v témže roce jsme uveřejnili článek v časopisu Journal of Chromatography [J. Churáček, P. Jandera, J. Chromatogr., 53 (1970) 69]. Za tyto práce se nám v r. 1972 dostalo ocenění v rámci státního plánu vědeckého výzkumu.

Na Katedře organické chemie VŠCHT Pardubice připravili začátkem sedmdesátých let 1,2-naftoylenbenzimidazol-6-sulfochlorid jako derivatizační činidlo pro přípravu fluoreskujících derivátů alifatických aminů a aminokyselin, které se osvědčilo pro citlivou detekci při chromatografii na tenkých vrstvách. Chtěli jsme vyzkoušet možnosti separace těchto látek technikou HPLC. Navrhli jsme konstrukci průtočného fluorimetrického detektoru pro HPLC. Detektor vycházel z konstrukce přístroje s fotometrickou detekcí, kde byl spektrální kolorimetr Spekol nahrazen rtuťovou výbojkou s hranovým filtrem, vymezujícím vlnovou délku rtuťové čáry budícího záření. Místo obvyklé konstrukce fluorimetru s fotonásobičem umístěným pod úhlem 90° vůči průtokové cele, kterou tvořila křemenná kapilára se vstupem a výstupem v přímé ose, jsme z důvodů jednodušší konstrukce zvolili přímé uspořádání, kde byl paprsek po průchodu celou zacloněn černou maskou a po odrazu dutými zrcadly zaostřen na vstupní štěrbinu fotonásobiče (br. 7) [P. Jandera, V. Říha, J. Churáček, AO 201220, 1983]. Fluorimetrický detektor jsme patentovali a využívali jsme jej k separaci alifatických

aminů po předkolonové derivatizaci v prostředí vodného acetonitrilu s přísávkem K_2CO_3 [P. Jandera, H. Pechová, J. Královský, D. Tocksteinová, J. Churáček, Chromatographia, 16 (1982) 275].



Obr. 7: Schéma konstrukce průtokové cely a optického systému fluorimetrického detektoru.

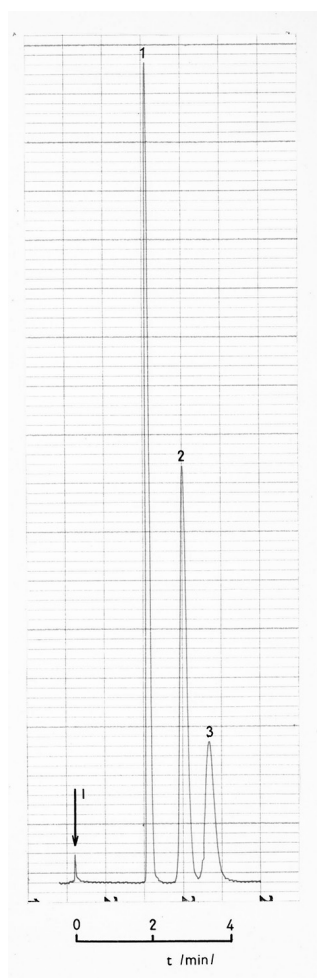
V. r. 1972 se Jaroslavu Churáčkovi podařilo prosadit nákup komerčního kapalinového chromatografu ALC 100 firmy Waters (zřejmě k tomu přispělo i pozitivní hodnocení výzkumného projektu v rámci státního úkolu). Jak ukazuje Obr. 8, jednalo se o impozantní přístroj, který byl původně určen pro gelovou chromatografii na dlouhých kolonách 60-100 cm a byl opatřen pístovým jednočinným čerpadlem Milton-Roy s hydraulickým částečným tlumením pulsů (Obr. 8 vpravo dole).



Obr. 8: Pohled na kapalinový chromatograf ALC 100 (Waters)

Přístroj pracoval s tlakovým omezením 80 bar. Naštěstí se v rámci této investice podařilo prosadit i nákup tehdy velmi moderního čerpadla M 6000, pracujícího až do tlaků 400 bar (Obr. 8 vlevo dole), jako doplňkového dílu, později i citlivého UV filtrového detektoru M 440 a vysokotlakého dávkovače U6K s volitelným objemem vzorků.

Od firmy Waters jsme zakoupili několik lahvíček plně pórovitého silikagelu (Porasil) a také povrchově pórovitého silikagelu Corasil (dle původního patentu J. Kirklanda, ke kterému se chromatografická praxe po 35 letech vrátila v provedení s mnohem menšími částicemi o průměru 2,6 μm), oba sorbenty s rozmezím částic 35-75 μm . Náplně jsme do kolon sypali po malých porcích za současného poklepávání kolonou o podložku a občasné pomoci vibrátoru, aby si náplň v koloně dobře "sedla". I tak byla chromatografická účinnost na dnešní poměry velmi nízká, u kolony dlouhé 90 cm jsme při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min dosahovali nejvýše cca 500 - 1000 teoretických pater, účinnost při vyšším průtoku rychle klesala. Přesto se nám podařilo dosáhnout někdy i docela rychlých separací (Obr. 9).



Obr. 9: Separace izomerních o- (1), m- (2) a p- (3) nitrofenolů na koloně silikagelu Corasil II, 37-75 μm , mobilní fáze: 3 % propanolu v heptanu, 0,94 ml/min.

Z různých dílů zařízení od firmy Waters jsme sestavili modulární kapalinový chromatograf, který jsme provozovali ve spojení s účinnějšími kolonami až do druhé poloviny osmdesátých let, bez

jediné návštěvy servisního technika. Veškeré výměny těsnění, ventilů a jednou i přelomeného safírového pístu čerpadla jsme si zajišťovali sami, drobné náhradní díly jsme s dostatečným předstihem několika měsíců objednávali prostřednictvím Služby výzkumu. Modulární modul kapalinového chromatografu firmy Waters byl ve světě velmi úspěšný, dokonce se dostal až na skotskou dvacetilibrovou bankovku.



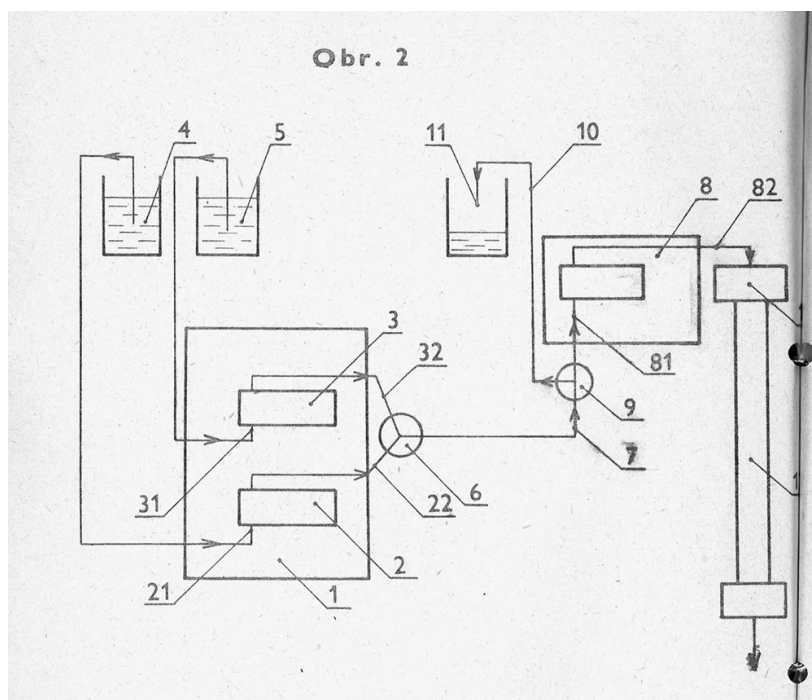
Obr. 10: Skotská dvacetilibrová bankovka s kapalinovým chromatografem.

V r. 1973 jsem podal k obhajobě kandidátskou disertaci, zahrnující práci na konstrukci vlastního kapalinového chromatografu a výsledky na něm dosažené. Obhajobu kandidátské práce tehdy musely nejprve povolit stranické orgány KSČ na VŠCHT a okresní výbor strany. Vzhledem k výše uvedenému "hříchu" z r. 1968 ležela moje disertace čtyři roky "u ledu" a povolení k obhajobě jsem dostal až v r. 1977.

SEDMDESÁTÁ LÉTA

2. POPIS VLIVU MOBILNÍ FÁZE NA RETENCI V SYSTÉMECH S NORMÁLNÍMI A PŘEVRÁCENÝMI FÁZEMI, ODVOZENÍ "OBECNÉ" TEORIE GRADIENTOVÉ ELUCE A JEJÍ OVĚŘENÍ.

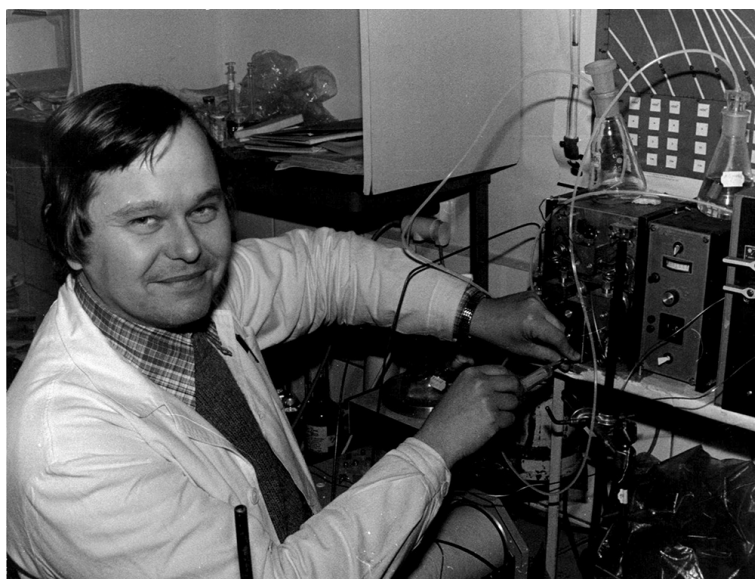
S prvními výsledky na skleněných "byretových kolonách" jsem nebyl příliš spokojen vzhledem k nízké účinnosti (s tím jsem vzhledem k materiálu, který jsem měl k dispozici, nemohl mnoho dělat) a vzhledem k dlouhým dobám separace. Dočetl jsem se, že dobu separace lze často zkrátit při použití gradientové eluce. Chtěl jsem tuto techniku vyzkoušet v praxi, s využitím gradientového mikročerpadla PPM 68005. Jeho nevýhodou však bylo omezení na nízké pracovní tlaky. Našli jsme však řešení: Výstup ze směšovací komůrky gradientového čerpadla jsme nakrátko připojili ke vstupnímu ventilu vysokotlaké pumpy Waters M6000 s průtokem nastaveným o cca 10 % výše, než byl pracovní průtok na M6000 - přebytek mobilní fáze odcházel do odpadu (Obr. 10).



Obr. 11: Schéma zařízení pro gradientovou eluci se směřováním složek na vstupu vysokotlakého čerpadla.

Toto konstrukční řešení, které jsme patentovali [P. Jandera, J. Churáček, AO 206427, 1984], přineslo velmi pozitivní efekt: Směšování rozpouštědel při tvorbě gradientu, např. metanolu nebo acetonitrilu s vodou, je spojeno se změnami parciálního molárního objemu smíšené mobilní fáze, který je nižší, než je součet objemů jednotlivých rozpouštědel před smíšením. Protože moderní vysokotlaká čerpadla dodávají časově stálý průtok mobilní fáze, může docházet v důsledku objemových kontrakcí k určitým odchylkám skutečného profilu gradientu od nastaveného. Pokud vysokotlaké čerpadlo má k dispozici přebytek smíšené mobilní fáze,

poskytuje stále stejný průtok a mění se jen objem přebytečné mobilní fáze odváděné mimo vysokotlaké čerpadlo. Podobné řešení se zapojením přesných podávacích čerpadel před vstupem do vysokotlaké pumpy využily v polovině osmdesátých let ve svých vysoce přesných gradientových chromatografech firmy Hewlett-Packard (Model 1090) a Tracor (Model 985). Na druhé straně se ukázalo, že možnost práce v režimu konstantního tlaku místo konstantního průtoku, propagovaná v posledních letech některými autory a podporovaná i některými firmami, nepřinesla očekávanou významnou úsporu doby analýzy a zvýšení počtu rozlišených látek.



Obr. 12: Autor v laboratoři u gradientového kapalinového chromatografu.

Měli jsme tedy čerpadlo, schopné reprodukovat jakýkoli typ gradientu (Obr. 11). Začátkem padesátých let popsali Drake a

Freiling princip výpočtu gradientové eluce, který byl od té doby aplikován na několik málo specifických případů gradientových separací. Tento postup jsem chtěl zobecnit pro předpověď retence v co nejširší oblasti aplikací gradientové eluce. Na rozdíl od dříve publikovaných výpočtů, které se snažily popsat časovou změnu distribuční konstanty v konkrétním chromatografickém systému, jsem řešení založil na kombinaci dvou částečných rovnic, které je možno libovolně kombinovat. První rovnice popisuje závislost změny objemové koncentrace (c) účinné eluční složky B na čase, tj. "gradientovou funkcí", kterou lze popsat 2 - 3 parametry: počáteční koncentrací (A), strmostí změny gradientu (B), případně parametrem jeho zakřivení (κ), které plně závisí na volbě operátora. Druhá rovnice popisuje vliv chromatografického systému, tj. stacionární fáze a složek mobilní fáze na chování vzorku, tedy na termodynamických vlastnostech separačního systému, které nezávisí na operátorovi. Libovolnou kombinaci obou dílčích rovnic lze dosadit do jednoduché diferenciální rovnice, popisující přírůstek čistého elučního objemu vzorku ($V'R(g)$) při postupu kolonou jako odezvu na změnu složení mobilní fáze a odpovídající snížení retenčního faktoru k (distribuční konstanty) při postupu vzorku kolonou. Při řešení lze předpokládat, že šířka píku ($w(g)$) při gradientových podmínkách závisí především na aktuálním složení mobilní fáze v okamžiku eluce.

V r. 1974 jsme publikovali základní výpočetní řešení pro tento postup v časopisu *Journal of Chromatography* [P. Jandera, J. Churáček, *J. Chromatogr.*, 91 (1974) 207, 91 (1974) 223, 93 (1974) 17, 104 (1975) 9], kde jsme uvažovali nejjednodušší dvouparametrové závislosti retence (k) na molárním či objemovém zlomku eluční složky B mobilní fáze (c), jednak v adsorpčních systémech s normálními fázemi, jednak v systémech s

nelokalizovanou sorpcí, tedy především v systémech s převrácenými fázemi. I když toto vymezení není zcela přesné, dodnes se často používá. Obr. 12 ukazuje základní výsledky řešení. O nové gradientové teorii jsem poprvé přednášel na národní konferenci o pokrocích chromatografie v průmyslu v Bratislavě.

CHROM. 7285

GRADIENT ELUTION IN LIQUID CHROMATOGRAPHY

II. RETENTION CHARACTERISTICS (RETENTION VOLUME, BAND WIDTH, RESOLUTION, PLATE NUMBER) IN SOLVENT-PROGRAMMED CHROMATOGRAPHY —THEORETICAL CONSIDERATIONS

PAVEL JANDERA and JAROSLAV CHURÁČEK

Department of Analytical Chemistry, University of Chemical Technology, Pardubice (Czechoslovakia)

equation

$$k' \approx k'_0 \cdot c^{-n} \quad (1)$$

applies in both adsorption and ion-exchange chromatography, often even in the presence of coincident equilibria (acid-base, complex formation) in the mobile phase, and the relationship

$$k' \approx k'_0 \cdot 10^{-n \cdot c} \quad (2)$$

can be used in partition chromatography (liquid-liquid, salting-out and solubilization chromatography on ion-exchange resins in mixed aqueous-organic media).
 GRADIENT ELUTION IN LC. II. 233

The retention volume, $V'_{R(g)}$, in gradient-elution partition chromatography can be obtained from the solution of eqn. 42 as

$$V'_{R(g)} \approx \frac{1}{n \cdot B} \cdot \log (2.3 n \cdot B \cdot V_m \cdot k'_0 + e^{2.3 n \cdot A}) - \frac{A}{B} \quad (43)$$

It is assumed that the peak width in gradient-elution chromatography approximately equals the width of the peak with this retention volume:

$$w_{(g)} \approx w = \frac{4 V_R}{\sqrt{N}} \approx \frac{4 V_m}{\sqrt{N}} \cdot \left\{ k'_0 \cdot 10^{-n \cdot [A + B \cdot (V'_{R(g)} - V_2)]} + 1 \right\} \quad (48)$$

the solution of which gives the required equation for retention volume in gradient elution chromatography.

$$V'_{R(g)} \approx \frac{1}{B} \cdot \left[(n \cdot n + 1) \cdot B \cdot k'_0 \cdot V_m + A \frac{n \cdot n + 1}{n} \right] \frac{1}{n \cdot n + 1} - \frac{A}{B} \quad (10)$$

According to the above assumptions, the peak width is approximately the same as in gradient-elution chromatography, $w_{(g)}$, and can be calculated by combining eqns. 15 and 16 with the defining relationship for plate number, N .

$$w_{(g)} \approx w = \frac{4 V_R}{\sqrt{N}} = \frac{4 V_m}{\sqrt{N}} \cdot \left\{ 1 + k'_0 \cdot \left[A \frac{1}{n} + B \cdot (V'_{R(g)} - V_2) \right]^{-n \cdot n} \right\} \quad (17)$$

Obr. 13: Z naší první publikace o gradientové eluci v *Journal of Chromatography*.

Velmi podobný postup řešení pro systémy s nelokalizovanou sorpcí použil Lloyd Snyder v široce používaném modelu LSS gradientů, publikovaném na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let [L. R. Snyder, J. W. Dolan, High-Performance Gradient Elution, Wiley, 2007]. Experimentálně jsem základní teorii gradientové eluce ověřil s použitím barevných azo-derivátů alkoholů a fenolů jako testovacích látek ještě na původním chromatografu vlastní konstrukce se skleněnými "byretovými" kolonami. Teoretický popis gradientové chromatografie jsme dále rozváděli a ověřovali v různých systémech, pro předpovědi retence při aplikaci zakřivených gradientů, segmentových gradientů s navazujícími lineárními i nelineárními úseky, výpočty jsme upravili, aby bylo možno kompenzovat vliv počáteční experimentální prodlevy gradientu na posuny elučních časů, a upravili jsme jej i pro popis a predikci retence při tříložkových gradientech. Tyto studie vyústily do série 11 článků v časopisu Journal of Chromatography a v osmdesátých letech v dalších publikacích, věnovaných především optimalizaci gradientových podmínek, v přehledném referátu v Advances in Chromatography, 19 (1981) 125, a především ve dvou knihách shrnujících tehdejší poznatky o vysokoúčinné gradientové kapalinové chromatografii: 1. P. Jandera, J. Churáček: Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze v nakladatelství Academia, Praha 1984, a 2. P. Jandera, J. Churáček: Gradient Elution in Column Liquid Chromatography, v nakladatelství Elsevier, Amsterdam 1985.

Ve studiích možnosti předpovědi retenčního chování a optimalizace při gradientové eluci jsme pokračovali i později. V osmdesátých letech jsme vypracovali teorii tříložkové gradientové eluce se dvěma silnými eluenty (acetonitril, metanol) a navrhli metodu optimalizace rozdělení složitých směsí nastavením rozdílné

selektivity separace v různých fázích gradientu pomocí programované změny poměru koncentrací těchto rozpouštědel [P. Jandera, J. Churáček, H. Colin, J. Chromatogr., 214 (1981) 35; P. Jandera, J. Chromatogr., 485 (1989) 113].

SEDMDESÁTÁ LÉTA

3. KOLONY PRO HPLC - "THE STRANGE HOLLOW STICKS WITH MUD INSIDE".

Ve druhé polovině sedmdesátých let bylo zřejmé, že dlouhé kolony plněné hrubými částicemi je třeba nahradit kolonami, plněnými tříděnými sorbenty s částicemi o průměru 10 μm a menším. V té době jsem dostal tříměsíční stipendium nadace DAAD (Deutsche Akademische Austauschdienst) a mohl jsem absolvovat tříměsíční stáž na univerzitě v Saarbrückenu u prof. Istvána Halásze, jedné z největších chromatografických osobností té doby, zejména v oblasti přípravy kolon s chemicky vázanými stacionárními fázemi. Prof. Halász pocházel z Maďarska, odkud po potlačení protikomunistického povstání emigroval do západního Německa, kde se stal přednostou oddělení Angewandte Physikalische Chemie na Universität des Saarlandes. Na podzim 1977 tam pobýval taky kolega Vladimír Řehák, aspirant profesorky Evy Smolkové z Prahy, který se tam zabýval syntézou a testováním chemicky vázaných fází s rozvětvenými alkyly (říkal jim "stromečkové fáze"). Vláďa mi pobyt v Německu hodně usnadnil.

Na vstupním pohovoru mi prof. Halász dal několik instrukcí:

1. Nehodnotit politiku, on ji též nehodnotí, a neříká, jestli je lepší komunismus nebo kapitalismus.

2. Zakázal mi sebevraždu.

3. Nedoporučil bližší styky s iránskými studenty, kteří tehdy bouřlivě demonstrovali proti perskému šáhovi, ani s radikálními německými levicovými či pravicovými studenty.

Prof. Halász se mnou v průběhu stáže občas diskutoval o odborných problémech, ale svěřil mne hlavně do péče (tehdy) mladého profesora Heinze Engelhardta. Experimentální záležitosti jsem probíral především s mladšími pracovníky, především s Helmuthem Elgasseem, který dokončoval doktorát a potom odešel pracovat do Waldbronnu k firmě Hewlett-Packard. Později jsme se občas setkávali na konferencích. Prof. Halász pravidelně pečoval i o zvyšování úrovně odborných znalostí svých doktorandů a stážistů v rámci pravidelných - nepříliš oblíbených - diskusí (spíše školení), každý pátek od čtyř do šesti odpoledne, kdy bychom podle jeho názoru už stejně v laboratoři žádnou kloudnou práci neudělali.

V Saarbrückenu jsem se naučil chemicky modifikovat silikagel, plnit účinné kolony pro HPLC a ještě jsem na zpáteční cestu dostal několik bezešvých nerezových trubek a nějaká šroubení použitelné jako části koncovek kolon, až si je sám v Pardubicích naplním. Každý volný víkend jsem věnoval turistice kouzelnou sárskou přírodou, která mne velmi příjemně překvapila - ani stopy po krajíně zničené těžkým průmyslem, kterou jsem očekával.

Po návratu jsem s pomocí školních dílen z dovezených dílů sestavil prázdné kovové kolony. Ty bylo třeba naplnit účinnými sorbenty s částicemi 10 nebo 5 μm (tehdejší standardy). Aby nedošlo ke shlukování částic náplně a ztrátě účinnosti, nebylo možno plnit kolony za sucha, ale stabilní od vzdušněnou suspenzí sorbentu ve viskózní a husté kapalině (směs propanolu a cyklohexanolu), která

se do prázdné trubice velmi rychle "nastřelila" pod vysokým tlakem (600 - 650 bar). Muselo se zabránit volné sedimentaci částic náplně po celou dobu plnění kolony. V Saarbrückenu se k tomuto účelu používala speciální pumpa Haskell s hydraulickým převodem, která umožňovala dosáhnout plnicího tlaku ve zlomku sekundy. Takovou pumpu jsme si nemohli dovolit koupit. S tímto problémem mi naštěstí pomohl kolega Ing. Zbyněk Plzák z ústavu AV v Řeži u Prahy, jeden z průkopníků HPLC v Čechách, který absolvoval stáž v Saarbrückenu o rok nebo dva dříve než já. Zbyněk po návratu zkonstruoval plničku tak, že spojil "natvrdo" elektromotor jako pohon vstřikovacího čerpadla, které místo nafty dávkovalo pod vysokým tlakem plnicí kapalinu. Zbyněk mi ochotně prozradil detaily konstrukce a dokonce i věnoval funkční vyřazený elektromotor.

Naftové čerpadlo do traktoru ZETOR, koupené v Mototechně za cca 1200,- Kčs, jsme propojili se zásobníkem tlačné kapaliny (hexan) a na výstupu s širší nerezovou bezešvou trubicí (získanou od ZVÚ Hradec Králové), na jejíž dno byla připojena prázdná kolona, předem naplněná tlačnou kapalinou. Do trubice se vrchem nalila suspenze částic náplně, která se převrstvila tlačnou kapalinou, trubice se rychle uzavřela našroubováním a po utažení matice uzávěru se okamžitě zapnul elektromotor. Do jedné minuty se dosáhlo pracovního maxima tlaku, což indikovalo úplné naplnění. Kolona se nechala dalších 5 minut promývat při plném tlaku, který se poté regulačním ventilem postupně snižoval. Po počátečním tápání jsme techniku plnění zvládli tak, že ze tří naplněných kolon byly dvě účinností srovnatelné s komerčními kolonami fy Merck, což byl celkem úspěch, i vzhledem k tvrzení prof. Halásze, dle něžž bylo plnění kolon z jedné třetiny věda, z jedné třetiny umění a zbývající třetina byla černá magie. Této techniky jsme používali až do devadesátých let k plnění kolon částicemi o průměru 5 - 10 μm ,

zejména materiály na bázi modifikovaného silikagelu typu Silasorb, které jsme testovali pro Lachemu Brno.

Plnění kolon nesli někteří kolegové se značnou nelibostí, protože bylo doprovázeno stejnými zvukovými efekty, jako když zemědělci vyrazí do polí, ale v omezeném prostoru staré budovy VŠCHT na Náměstí Legií. Naše laboratoř kapalinové chromatografie si vysloužila pohrdlivé přívzvisko "oddělení traktorové chemie".

OSMDESÁTÁ LÉTA

1. STÁŽ V PALAISEAU, MODEL INDEXŮ INTERAKCE

V r. 1980 se na mne usmálo štěstí - dostal jsem stipendium nadace SEA na šestiměsíční pobyt ve Francii v laboratoři profesora George Guiochona. Scientific Exchange Agreement (SEA) byla nadace založená a financovaná panem Bobem Hamiltonem, výrobcem (nejen) dávkovacích injekčních stříkaček pro chromatografii, "hamiltonek", která podporovala odborné kontakty mezi chromatografisty ze západních a tehdejších komunistických zemí. Díky velkorysosti pana Hamiltona mohla řada mladších odborníků z oblasti separačních věd z Československa a z dalších zemí východního bloku absolvovat stáže na předních pracovištích v západním světě. O výběru stážistů rozhodoval mezinárodní výbor, jehož členy byli prof. Josef Huber z Rakouska a prof. Georges Guiochon z Francie. Zástupci Československa byli prof. Janák z Brna a prof. Garaj z Bratislavy. Tentokrát se kupodivu nevyskytly vážnější překážky a po absolvování kolečka pohovorů na ministerstvu školství, s panem francouzským konzulem a panem kulturním atašé jsem dostal potřebnou výjezdní doložku a francouzské vstupní vízum

(o pobytové vízum jsem musel po příjezdu žádat na prefektuře v Paříži a dostal jsem ho až po pěti měsících, těsně před odjezdem).

V polovině března 1980 jsem dorazil na École Polytechnique v Palaiseau, asi 20 km od Paříže, na trase příměstského metra RER. Ubytoval jsem se v Cité Universitaire na jižním okraji Paříže, blízko stanice metra, takže dojíždění bylo velmi jednoduché. École Polytechnique byla škola elitní, založená už císařem Napoleonem pro výchovu špiček francouzské armády a administrativy. Byly tam i výzkumné laboratoře řady technických oborů. Jak jsem se na místě dozvěděl, s ohledem na vojenský charakter školy jsem měl štěstí, že jsem francouzským vízovým řízením proklouzl ještě na podzim roku 1979, před vpádem sovětských vojsk do Afghánistánu, který silně ochladil vztahy mezi západem a východem. Dostal jsem i propustku do objektu, kterou jsem se měl prokazovat na hlavní bráně. Nikdy jsem ji nepoužil, od zastávky metra jsem chodil na náhorní plošinu k Polytechnice strmou pěšinkou do kopce, na jejímž konci byla stále otevřená nehlídaná branka.

Na šest měsíců ve Francii dodnes velmi rád vzpomínám. Mým úkolem bylo plnění mikrokolon (s průměrem 0,5 - 1 mm) náplní na bázi silikagelu částicemi o velikosti 3 a 5 μm , určenými pro spojení HPLC/MS. K tomuto účelu jsem měl k dispozici pumpu Haskell, pracující do tlaku 300 MPa, ke které jsem připojoval 1 m dlouhé nerezové trubice se stěnami silnými 0,2 mm, z bezpečnostních důvodů uvnitř ochranné kovové klece. Přesvědčil jsem se, že tyto trubice podélně praskají po dosažení tlaku 185 MPa, za doprovodu výrazných detonací. Navštívil jsem i firmu NERMAG na předměstí Paříže v Roueil-Malmaison, kde jsem poprvé viděl pracovat přístroj pro LC-MS, tenkrát ještě koncipovaný pro elektronovou ionizaci.

Ve zbývajícím čase jsem proměřoval retenční časy velmi pestré místní sbírky standardů na kolonách C8 a C18, a na základě změřených dat jsem se spolu s dr. Henri Colinem pokoušel o sestavení kalibrační řady standardů pro charakterizaci a predikci retence v LC systémech s převrácenými fázemi, na základě nového modelu "indexů interakce" [P. Jandera, H. Colin, G. Guiochon, Anal. Chem., 54 (1982) 435]. Kromě prof. Guiochona jsem se v Palaiseau seznámil s řadou dalších kolegů, skvělých odborníků a milých přátel, s nimiž jsem se později setkával na konferencích a s některými si dopisoval. Vedle Henri Colina, s nímž jsem úzce spolupracoval, jsem se nejvíce sblížil s Michelelem Martinem a Alainem Tchaplou. O víkendech jsem se věnoval poznávání skvostů francouzské kultury, umění a architektury.

OSMDESÁTÁ LÉTA

2. TESTY KOLON, CHARAKTERIZACE SELEKTIVITY, OPTIMALIZACE SEPARACE A VÝVOJ APLIKACÍ V HPLC.

V r. 1984 vyšla v sérii Knižnice technických aktualit Státního Nakladatelství Technické Literatury, Praha, první česká monografie o HPLC, J. Churáček - P. Jandera, "Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie". Po návratu do Pardubic jsem aplikoval model indexů interakce rozpracovaný ve Francii ke kalibraci nescifické (lipofilní) a specifické polární selektivity v systémech s převrácenými fázemi, pomocí nově navržených lipofilních a polárních indexů [P. Jandera, J. Chromatogr., 352 (1986) 91, 111]. Model jsem využil i k vypracování postupu pro popis, předpověď a optimalizaci retence v homologických a oligomerních řadách, v závislosti na počtu monomerních jednotek a složení mobilní fáze jak

pro separace v systémech s převrácenými, tak i s normálními fázemi [P. Jandera, J. Chromatogr., 314 (1984) 13; 449 (1988) 361]. Tyto práce jsem později shrnul ve dvou kapitolách v knize "Retention and selectivity in liquid chromatography" (R. M. Smith, editor), která vyšla v nakladatelství Elsevier v r. 1995.

Jaroslav Churáček mě pobízel, abych na téma teorie gradientové eluce podal habilitační práci. Spisování jsem věnoval řadu večerů v Paříži a po návratu z Francie jsem na podzim 1980 - bez velkých iluzí - podal práci k obhajobě. Po několika letech mi byla vedením VŠCHT vrácena zpět s odůvodněním, že "na základě nového vysokoškolského zákona již napříště nebudou podobné spisy při habilitačním řízení vyžadovány". Habilitační práci jsem přesto využil, ale až za deset let po pádu komunismu.

Publikace o gradientové eluci vzbudily jistou pozornost a od r. 1981 jsem každoročně dostával pozvání k přednesení přednášky na mezinárodních symposiích o chromatografii, kde bylo vložné i ubytování hrazeny pořadatelem nebo nadací SEA. I přes minimální náklady z čs. zdrojů však bylo velmi obtížné získat povolení k výjezdu na konference na západě. Většinou byly mé žádosti zamítány přímo na VŠCHT. Přesto jsem však někdy dostal povolení (možná na základě instrukcí, které odrážely momentální úroveň vztahů naší republiky ke kapitalistické cizině). Tak jsem mohl jet na mezinárodní konference o chromatografii (ISC) v Londýně v r. 1982 a v Norimberku v r. 1984.

Pro ilustraci tehdejší situace mohu uvést historku, spojenou s pozváním na mezinárodní symposium o HPLC v Edinburku v červenci 1985, kam mne pozval prof. John Knox. Zřejmě v důsledku toho, že byla čerstvě publikována naše kniha o gradientové eluci, se mi

dostalo té cti, že jsem byl uveden jako jediný přednášející ze zemí na východ od Šumavy v seznamu vybraných účastníků na nadcházejícím symposiu, publikovaném v tenkrát dosti široce mezinárodně distribuovaném bulletinu britské Chromatographic Society. Když mi žádost o povolení cesty vedení VŠCHT zamítlo, šel jsem se optat Jaroslava Churáčka, vedoucího Katedry analytické chemie, jak mám organizátorům svoji neúčast zdůvodnit. Jaroslav mne okamžitě odvedl k audienci u tehdejšího prorektora pro vědu a zahraniční styky, který byl současně také kandidátem Ústředního výboru KSČ a tam mu můj dotaz přednesl. Tehdy jsem uviděl, jak se tváří člověk, který právě spolknul žábu. Soudruh prorektor nás mlčky propustil, ale druhého dne mi z rektorátu oznámili, že cestu mám povolenou.

Protože - ač to dnes zní neuvěřitelně - tehdy bylo cestování vlakem asi desetkrát levnější než letadlem, vyrazil jsem na dvoudenní cestu do Skotska po železnici přes kanál La Manche a půl Evropy, vybaven deseti dolary na útratu. Byl jsem na tom ale lépe než kolega Miloš Krejčí z Akademie věd v Brně, který také dostal deset dolarů, ale jen jako vratnou zálohu. Cesta vlakem údolím Rýna a přes Anglii byla nezapomenutelným zážitkem, stejně jako samo město Edinburk uprostřed kopců, kde začátkem července zapadalo slunce o půl dvanácté v noci. Symposium mělo vynikající úroveň jak po odborné, tak i po společenské stránce. Slyšel jsem tam první přednášku prof. Jorgensona o kapilární elektroforéze a přednášku prof. Knoxe o jeho novém účinném a chemicky i tepelně odolném materiálu Hypercarb na bázi čistého uhlíku, určeném jako náplň kolon pro HPLC. Navštívil jsem i laboratoř prof. Knoxe, kde se spolupracovníky Hypercarb připravovali polymerací v pórech silikagelu, následným rozpuštěním silikagelové matrice v kyselině fluorovodíkové, karbonizací polymerního otisku silikagelu a následující hydrotermální úpravou.

Po návratu mi bylo dáno na vědomí, že na další výjezdy na konference mám zapomenout. Ale po nástupu Gorbačova do čela SSSR se situace trochu uvolnila, i na VŠCHT se obměnilo vedení. V r. 1988 jsem dostal pozvání k přednášce na mezinárodní symposium o chromatografii (ISC) ve Vídni, kde jsem měl dostat cenu Cvětovy nadace (nezaměňovat s mnohem prestižnější Cvětovou medailí) a skutečně jsem do Vídně směl jet. Na jaře 1989 už chování vedení VŠCHT naznačovalo, že asi jsou nějaké změny ve vzduchu, protože mi povolili obhajobu "velkého doktorátu" (DrSc.), která proběhla v červnu na pražské VŠCHT. V listopadu pak čas oponou trhnul a uzavřela se jedna nešťastná etapa historie.

Musím se ještě o pár let vrátit k jedné radostné události, významné pro další vývoj HPLC na naší katedře. Byl nám schválen nákup nového kapalinového chromatografu. Vyhlédl jsem si špičkový přístroj HP 1090 od firmy Hewlett Packard. K nákupu bylo třeba získat řadu povolení, obíhal jsem podnik zahraničního obchodu KOVO, ministerstvo školství, ministerstvo průmyslu, energetický úřad a ještě nějaké další instituce. Specifikace nákupu jsem projednával na obchodním zastoupení firmy v Praze s dr. Hans Peter Schiefferem, se kterým jsem se časem spřátelil a dodnes se s ním rád setkávám. Ten mne upozornil na významnou novinku - dosud byl přístroj ovládán minipočítačem HP 85, firma však zaváděla nový model 1090 M, řízený skutečným stolním počítačem. Bylo to ještě před érou Windows, počítač fungoval pod softwarem v jazyku Pascal, v přísně hierarchickém systému a byl řízen velmi rychlým procesorem Motorola. Proto - i když celková kapacita disku byla dnes směšných 20 MB - podléhal vývoz tohoto počítače do komunistických zemí embargu a museli jsme žádat o výjimku přímo americké ministerstvo obrany ve Washingtonu. Ale vše nakonec dobře dopadlo, Pentagon nám výjimku udělil s podmínkou, že se

kdykoli může pověřený důstojník NATO u nás na místě přesvědčit, že počítač používáme k chromatografii a ne např. k řízení balistických raket (žádný kontrolor se u nás nikdy neobjevil).

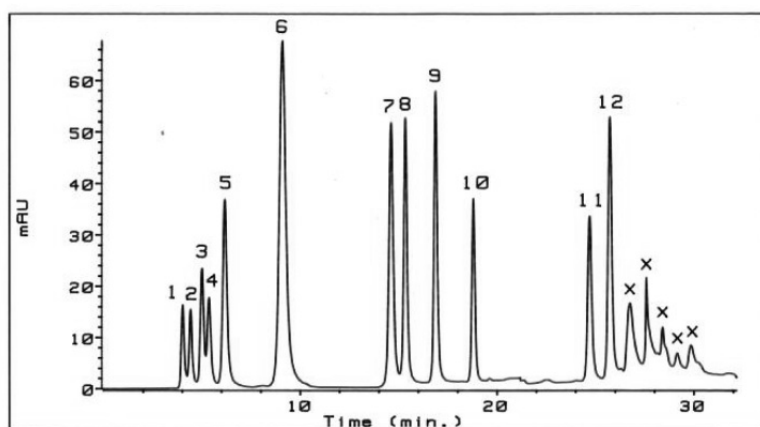
V polovině r. 1986 k nám do laboratoře tento "Mercedes mezi kapalinovými chromatografy" skutečně dorazil. Přístroj byl vybaven UV detektorem s fotodiodovým polem a umožňoval snímání UV spekter v průběhu chromatografické separace. To byla v té době u nás naprostá novinka a vzpomínám si, jak jsem fascinovaně zíral na první vlastnoručně změřený třírozměrný spektrochromatogram. Na druhé straně dvě půlhodinové analýzy se záznamy spekter v celém spektrálním a časovém rozsahu stačily spolehlivě zaplnit celou dostupnou kapacitu počítače. Po několika letech jsme s laskavým přispěním dr. Helmutha Elgasse z Waldbronn, s nímž jsem se seznámil v průběhu stáže u prof. Halásze, získali operační program pod systémem Windows, který nám umožnil převod řídicí a datové stanice na normální PC s diskovou kapacitou desítek GB. Hlavními přednostmi HP 1090 bylo přesné dávkování vzorků, v širokém nastavitelném rozmezí objemů, a především unikátní způsob tvorby gradientu mobilní fáze, založený na systému tří podávacích čerpadel, dávkujících při atmosférickém tlaku přesné objemy jednotlivých složek mobilní fáze na vstup vysokotlakého membránového čerpadla, které v rychlých pracovních cyklech převádí tyto objemy do vysokotlaké části systému. Toto řešení zaručuje vysokou přesnost nastaveného průběhu gradientu a připomnělo mi náš původní způsob tvorby gradientu. Německá důkladnost a preciznost se projevila na vysoké kvalitě přístroje, který je v naší laboratoři stále v provozu již 27 let k naší naprosté spokojenosti, hlavně zásluhou pana Václava Innemana, který řídké případy poruch vždy dokázal promptně opravit.

OSMDESÁTÁ LÉTA

3. VÝVOJ HPLC SEPARACÍ SULFONOVÝCH KYSELIN, POLÁRNÍCH LÁTEK A PESTICIDŮ. STOPOVÁ ANALÝZA, OBOHACOVACÍ TECHNIKY V PŘÍMÉM SPOJENÍ S HPLC.

Chemické závody VCHZ Synthesia v Semtíně a Rybitví na západním okraji Pardubic nás občas zásobovaly analytickými problémy, vhodnými pro HPLC aplikace. Např. už v sedmdesátých letech jsme pro ně vyvinuli metodu separace meziproductů při výrobě vitamínu D2 chromatografií na silikagelu s mobilní fází, obsahující méně než 1 % propanolu v hexanu. Dlouho se nám ale nedařilo vyřešit problém kontroly čistoty naftalensulfonových a antrachinonsulfonových kyselin, základních surovin při výrobě azobarviv, důležitého výrobního programu VCHZ. Bylo třeba rozdělit a stanovit nejen látky lišící se stupněm sulfonace, ale i polohové izomery jednotlivých sulfonačních stupňů. V sedmdesátých letech jsme se k tomuto účelu neúspěšně pokoušeli využít klasické iontově-výměnné chromatografie, která však pro tyto účely vykazovala příliš nízkou účinnost a selektivitu. Později jsme zkoušeli dělení v systémech s převrácenými fázemi, které se obecně výborně hodí pro většinu separací založených na strukturních rozdílech v uhlovodíkových částech molekul. Aromatické sulfokyseliny jsou svojí silou srovnatelné s anorganickými kyselinami, ve vodně-organických mobilních fázích jsou zcela ionizované a většina se na kolonách s chemicky vázanými alkyly vůbec nezadržuje. Začátkem osmdesátých let jsme ke zvýšení retence a selektivity separace aromatických sulfokyselin v systémech s převrácenými fázemi zkusili s částečným úspěchem využít techniku chromatografie iontových párů s přídavkem tetraalkylamoniových solí do vodně-metanolických

mobilních fází a dosáhli jsme částečné separace. Podstatně lepších výsledků jsme dosáhli přidavkem poměrně vysokých koncentrací (0,05 - 0,5 mol/l) neutrálních solí (např. síranu lithného nebo sodného) k vodně-organickým mobilním fázím, kde se projeví výrazný vysolovací efekt a výrazné zvýšení separační selektivity polohových izomerů. Aromatické sulfokyseliny se v roztocích solí dělí v pořadí klesajícího počtu sulfonových skupin a retence izomerů roste s velikostí exponovaného naftalenového či antrachinonového jádra mezi sulfoskupinami (Obr. 13). Retenční chování jsme popsali teoretickým modelem [P. Jandera, J. Churáček, B. Taraba, J. Chromatogr., 262 (1983) 121] a metodu separace praktických vzorků aromatických sulfokyselin, používaných jako barvářské meziproducty, jsme optimalizovali a patentovali [P. Jandera, J. Churáček, J. Poskočil, AO 209363, 1983].



Obr. 14: Separace naftalen mono- di-, tri- a tetrasulfonových kyselin na koloně Silasorb C18 gradientem 0 – 40 % methanolu v 0,4 M vodném síranu sodném. 1,3,5,7-tetrasulfonová k. (1), 1,3,6-trisulfonová k. (2), 1,3,5-trisulfonová k. (3), 1,3,7-trisulfonová k.(4),

1,5-disulfonylá k. (5), 2,6-disulfonylá k. (6), 1,6-disulfonylá k. (7), 2,7-disulfonylá k. (8), 1,3-disulfonylá k. (9), 1,7-disulfonylá k. (10), 1-sulfonylá k. (11), 2-sulfonylá k. (12), méně polární nečistoty (X)

Pro Lachemu Brno jsme v osmdesátých letech testovali také možnosti využití ethylenglykol-methakrylátových gelů Spheron a katexů a anexů na jejich bázi pro separace různých typů polárních látek - fenolů, bází nukleových kyselin, nukleosidů, nukleotidů, barbiturátů, sulfonamidů a některých dalších léčiv. Podrobněji jsme se zabývali separacemi pesticidů: karbamátů, fenylmočovin, triazinů, organochlorových látek a halogenfenoxycarboxylových kyselin na chemicky modifikovaných silikagelových stacionárních fázích (většinou na Silasorbch od Lachemy). Řadu těchto separací polárních látek by dnes bylo možno charakterizovat jako metody HILIC chromatografie. Pro analýzu stopových koncentrací těchto látek ve vodách a ftalátů v průmyslových exhalátech jsme využívali i off-line a on-line spojení s obohacením na krátkých kolonkách plněných nepolárními sorbenty. Na tomto tématu jsem pracoval jako školitel-specialista s prvními aspiranty, které mi předal plně na starost jejich hlavní školitel, prof. Churáček: Járrou Kubátem, Láďou Svobodou a Honzou Fischerem - poslední dva jsou nyní docenty na FChT Univerzity Pardubice.

DEVADESÁTÁ LÉTA

1. STÁŽ V USA, NELINEÁRNÍ A PREPARATIVNÍ HPLC

V létě 1989 už začaly ledy trochu roztávat a dostal jsem povolení k cestě na symposium o HPLC ve Stockholmu, kam jsem jel s přednáškou o optimalizaci tříložkových gradientů - jak jinak než opět vlakem.



Obr. 15: Zleva: Karel Macek, Jaroslav Churáček, Lois Beaver a Georges Guiochon na sympoziu HPLC 1989 ve Stockholmu.

Na schůzi ediční rady *Journal of Chromatography*, jejímž jsem se krátce před tím stal členem na doporučení editora časopisu, doc. Karla Macka (Obr. 14), jsem se znovu setkal s prof. Guiochonem. Ten mi nabídl, abych za ním přijel na roční stáž do Knoxville v USA, kam se mezitím přestěhoval z Paříže. Intenzivně se zabýval studiem adsorpčních izoterm a separací na "přetížených" kolonách za podmínek nelineární chromatografie. To bylo téma, na něž jsem okrajově narazil již při on-line obohacování zředěných vodných vzorků před navazující analýzou metodou HPLC a o kterém jsem se chtěl dozvědět více. Nabídku jsem proto rád přijal, i když bylo nejisté, zda k tomu dostanu potřebná povolení. Ale jednání se protáhla do podzimu a po listopadu 1989 už proti mé cestě nebyly námitky. Na jaře 1990 jsem ještě obhájil habilitační práci, která byla

10 let u ledu, a začátkem září jsem s manželkou Marií a dcerou Janou dorazil do města Knoxville ve státě Tennessee, malebně položeného na západním úpatí Apalačských hor (Smoky Mountains). Univerzita státu Tennessee měla na oddělení chemie instrumentálně dobře vybavené laboratoře - setkal jsem se tam se starým známým HP 1090M, na němž jsem tam pak celý rok pracoval - a skvělou knihovnu, otevřenou sedm dní v týdnu, 24 hodin denně, kde bylo k dispozici skoro všechno, na co si člověk vzpomněl.

Kvalita preparativní separace se neposuzuje úrovní dosaženého rozlišení látek, ale z ekonomického hlediska důležitější produktivitou, tj. množstvím izolované látky požadovaného stupně čistoty za jednotku času na jednotku množství náplně kolony. Je tedy třeba vypracovat výpočetní postupy pro předpověď optimálního množství dávkovaných vzorků pro přijatelnou úroveň přetížení kolony. Výpočty profilů značně asymetrických píků na přetížených kolonách vycházejí z parametrů adsorpčních izoterm, které jsem v Knoxville experimentálně měřil. Na jejich základě jsme předpovídali tvar píků numerickým řešením základních diferenciálních rovnic, popisujících distribuci látek. Cílem simulačních výpočtů je optimalizace času odběru frakcí z nesymetrických píků tak, aby bylo dosaženo maximální výtěžnosti produktu požadované čistoty v nejkratším čase [P. Jandera, D. Komers, G. Guiochon, J. Chromatogr. A, 787 (1997) 13].

Po návratu z Ameriky v létě 1991 jsem pokračoval v řešení problematiky nelineární chromatografie ve spolupráci s prof. Guiochonem v rámci bilaterálních US-ČS grantů, později ještě v rámci grantů NATO "Science for peace" i s profesory F. Dondim z Ferrary, A. Felingerem z Veszprému a A. Seidel-Morgensternem z Magdeburgu, kteří postupně také navštívili naše pracoviště. Na

výměnné stáze k nám přijeli i dva doktorandi z Knoxville a naopak tam několikaměsíční pracovní pobyty absolvovali Honza Fischer a doktorandi David Komers a Michal Škavrada, kteří později úspěšně ohájili dizertace na téma separací za podmínek nelineární chromatografie. Numerické výpočty distribuce látek za podmínek přetížení kolony jsme využili i při studiích retenčního chování při gradientové eluci, pro předpověď odchylek od očekávaného průběhu gradientu vlivem přednostní adsorpce silnější eluční složky mobilní fáze a pro výpočty jejich průnikových objemů při gradientu, což usnadňovalo volbu takových počátečních podmínek gradientu, kdy tyto efekty ještě chování látek významně neovlivní a zdokonalení modelu předpovědi retence při gradientové eluci na polárních adsorbentech v systémech s normálními fázemi [P. Jandera, J. Chromatogr. A, 965 (2002) 239]. Po odstranění stop vody důsledným vysušením složek mobilní fáze lze významně zlepšit přesnost předpovědi na úroveň srovnatelnou se standardními gradienty v systémech s převrácenými fázemi. Vypracovali jsme i postupy výpočetní kompenzace vlivu částečné migrace látek v potrubí mezi směšovačem složek mobilní fáze a kolonou před začátkem gradientu na přesnost predikce gradientových elučních objemů.

DEVADESÁTÁ LÉTA

2. HPLC/MS A CE. SEPARACE TENZIDŮ, ACYLGLYCEROLŮ, BARVIV A MEZIPRODUKTŮ. MICELÁRNÍ A SUBMICELÁRNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Teorii retence oligomerů v systémech s převrácenými i s normálními fázemi jsme aplikovali při studiích a optimalizaci separací nižších

syntetických polymerů a zejména neiontových a iontových tenzidů na bázi alkyl- a aryléterů alkoholů a fenolů s polyoxyethylenem. Zajímavým poznatkem z těchto studií byl dříve nepopsaný jev, kdy na různých kolonách s chemicky vázanými aminopropylovými, ale i alkylovými fázemi, mobilní fáze ovlivňovala pořadí eluce v oligomerních řadách tenzidů. Projevoval se zde nejen typ organického rozpouštědla (methanol-voda, acetonitril-voda, případně propanol-voda), ale i poměr koncentrací vodné a organické složky. V oblastech s vyšší koncentrací vody retence oligomerů dle očekávání rostla v pořadí rostoucího počtu ethylenoxidových (EO) jednotek, pokud ale mobilní fáze obsahovala více než 85 – 95 % organické složky, pořadí eluce se obrátilo a látky se chovaly jako v systému s normálními fázemi i na oktadecylsilikagelových kolonách. Složení mobilní fáze, při němž docházelo ke změně retenčního mechanismu, záviselo na typu oligomerních tenzidů [P. Jandera, M. Holčapek, L. Kolářová, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 6 (2001) 261]. Tohoto zjištění jsme později využili při vývoji dvourozměrných HPLC separací.

Metodami HPLC tenzidů se vedle Michala Holčapka v rámci disertací zabývali i Josef Urbánek, Bořek Prokeš a Lenka Kolářová (nyní provdaná Česlová, docentka Katedry analytické chemie) a během své stáže na stipendium NATO na tomto tématu pracoval i dr. Georgios Theodoridis z Aristotelovy univerzity v řecké Soluni [P. Jandera, M. Holčapek, G. Theodoridis, *J. Chromatogr. A*, 813 (1998) 299]. George i jeho studenti nás od té doby ještě několikrát navštívili na kratší stáže v rámci výměnného programu Erasmus a bilaterální česko-řecké spolupráce. I já a moji spolupracovníci jsme rádi do Soluně jezdili.

V r. 1995 jsme dostali peníze na nákup našeho prvního LC-MS přístroje. Byl to hmotnostní spektrometr VG Platform od fy Micromass, s kvadrupólovým analyzátozem, s APCI a ESI ionizací v pozitivním i negativním módu, s rozsahem hmotností do 3000 Da, který byl spojen s gradientovým kapalinovým chromatografem fy Waters. Od samého začátku na něm pracoval v rámci disertační práce Michal Holčapek, dnes profesor Katedry analytické chemie. Nebyl to špičkový přístroj, ale používali jsme ho hlavně jako detektor, umožňující rozlišení látek s jednotkovými rozdíly hmotností. Vedle HPLC s detektorem rozptylu světla (ELSD) nám posloužila LC-MS technika jako neocenitelný pomocník k dekonvoluci překrývajících se píků sousedních oligomerů.

Do oblasti separace oligomerů zapadal i vývoj metod analýzy tuků, olejů a technických produktů jejich zpracování, zejména kontrola konverze jednotlivých acylglycerolů na methylestery při výrobě bionafty. Volbou vhodné kolony C18 s významným podílem reziduálních silanolových skupin a kombinací postupného třísložkového gradientu voda - acetonitril - propanol - hexan se podařilo rozdělit nejen jednotlivé látky lišící se ekvivalentním počtem uhlíkových atomů (ECN = počet atomů uhlíku v acylech snížený o dvojnásobek počtu dvojných vazeb) uvnitř skupin mono-, di- a tri-acylglycerolů, ale i řadu esterů se stejnými ECN [M. Holčapek, P. Jandera, J. Fischer, B. Prokeš, J. Chromatogr. A, 858 (1999) 13]. Později se tomuto tématu velmi podrobně věnoval prof. Holčapek se svou vlastní novou skupinou.

V devadesátých letech jsme se zabývali i vývojem analytických separací (poly)sulfonovaných a metalokomplexních azobarviv, průmyslově vyráběných v podniku Synthesia, s využitím techniky HPLC-MS. Navázali jsme na naše starší práce o separacích

aromatických sulfokyselin z počátku osmdesátých let a studovali jsme vliv typu a koncentrace alkylamoniových iontově-párových činidel s různým počtem a délkou alkylů na selektivitu separace barviv a na potlačení odezvy signálu v ESI iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Přídavek tetraalkylamoniových solí významně snižuje intenzitu MS signálu, proto jsme navrhli jejich náhradu dihexylamoniovým iontově-párovým činidlem, kde je potlačení signálu méně významné a přitom retence a selektivita jsou srovnatelné jako při použití tetrabutylamoniových aditiv k mobilní fázi. K identifikaci barviv jsme používali fragmentových iontů původních barviv, i hmotnostních spekter produktů jejich redukce [M. Holčapek, K. Volná, P. Jandera, L. Kolářová, K. Lemr, M. Exner, A. Církva, *J. Mass Spectrom.*, 39 (2004) 43].

Protože jsme začátkem devadesátých let získali přístroj pro kapilární elektroforézu od fy Prince, vypracovali jsme jako doplněk HPLC i elektromigrační metody separace azobarviv a aromatických sulfokyselin používaných jako meziprodukty při jejich výrobě. V pracovních elektrolytech s fosfátovými nebo borátovými pufrů se látka dělí pouze podle počtu sulfonových skupin. Přídavkem cyklodextrinů, běžně používaných jako chirální selektory, jsme dosáhli dosud nepopsané separace polohových izomerů [P. Jandera, J. Fischer, V. Stanček, M. Kučerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 201].

V souvislosti s vývojem "zelených" metod kapalinové chromatografie, šetrnějších k životnímu prostředí, jsme zkoušeli možnosti náhrady organických rozpouštědel přídavkem tenzidů v koncentracích vyšších, než jsou kritické micelární koncentrace, k čistě vodným mobilním fázím. Tzv. micelární kapalinová chromatografie využívá distribuce vzorku mezi třemi fázemi:

klasickou náplní kolony s chemicky vázanou alkylovou stacionární fází, vodou a micelami, tj. shluky molekul tenzidu (nejčastěji dodecylsírany sodného, SDS, v koncentracích nad 8 mM). Zjistili jsme, že tenzidy do jisté míry ovlivňují separaci neiontových látek i v submicelárních koncentracích, kde se molekuly SDS neshlukují do micel. Submicelární kapalinová chromatografie do jisté míry umožňuje rozšířit rozsah polarit separovaných vzorků [P. Jandera, J. Fischer, J. Chromatogr. A, 728 (1996) 279]. S přidavkem micelárních činidel k pracovním elektrolytům v kapilární elektroforéze můžeme separovat neiontové látky technikou micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). V naší skupině se technikami micelární chromatografie a MEKC zabývali především Honza Fischer, Václav Staněk a později Petr Česla.

ZAČÁTEK 21. STOLETÍ

1. CHARAKTERIZACE SELEKTIVITY V HPLC. VÝVOJ A CHARAKTERIZACE MONOLITICKÝCH KOLON NA BÁZI ORGANICKÝCH POLYMERŮ. SORBENTY S VTIŠTĚNÝMI MOLEKULAMI. HILIC CHROMATOGRFIE. DVOUROZMĚRNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE. SEPARACE PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ V PIVU, VÍNU A NEALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH

Historie se začíná prolínat se současností, většinou témat, která jsme začali řešit na začátku tisíciletí, se zabýváme dodnes. Michal Holčapek se svou skupinou se zabývají HPLC-MS aplikacemi v oblasti analýzy lipidů a metabolitů, kde má hlavní význam hmotnostní spektrometrie, což už zachází za rámec tématu této knížky. Praktické aplikace HPLC v současné době využívají někteří kolegové mimo naší skupinu, na Katedře analytické chemie i na dalších katedrách Univerzity Pardubice.

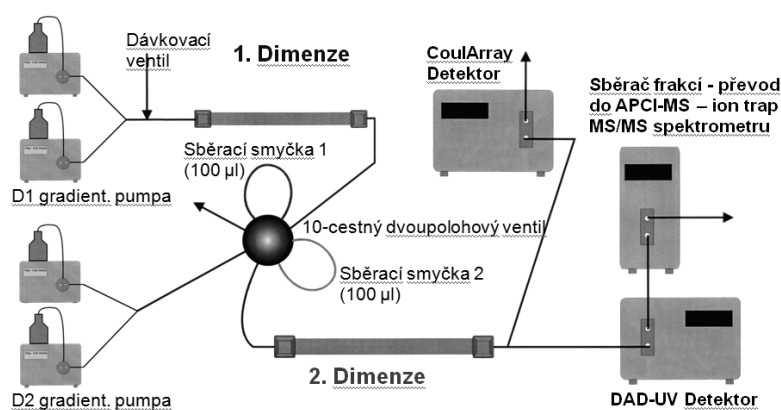
Hlavními tématickými oblastmi naší skupiny kapalinové chromatografie v tomto období je chromatografie v HILIC systémech, vývoj a optimalizace vlastností polymetakrylátových monolitických kapilárních kolon a především dvourozměrná kapalinová chromatografie. Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) používá mobilní fáze s malým obsahem vody v organickém rozpouštědle (acetonitrilu) a polárních kolon pro separace polárních látek, které se málo zadržují a špatně separují v běžných systémech s převrácenými fázemi [P. Jandera, *Anal. Chim. Acta*, 692 (2011) 1]. Doktorandi Honza Soukup a Tomáš Hájek spolu se stážisty Szymonem Bocianem a Sylvií Nogovou z Toruně porovnávali možnosti separací karboxylových kyselin, aminokyselin, fenolických a flavonoidních látek, nukleosidů a dusíkatých bází na různých typech kolon, z nichž se nám dobře osvědčily kolony na bázi hydrosilovaného silikagelu, vyvinuté skupinou prof. Joe Peseka v Kalifornii, diolové a zwitteriontové kolony [P. Jandera, T. Hájek, V. Škeříková, J. Soukup, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 841].

Vzhledem k omezené stabilitě a výběru stacionárních fází na bázi silikagelu jsme studovali možnosti vlastní přípravy monolitických kapilárních kolon na bázi polymethakrylátu. Navázali jsme na průkopnické práce Františka Švece z Univerzity v Berkeley v Kalifornii, kterému se podařilo připravit účinné monolitické kolony na bázi styrenových (ko)polymerů. My jsme se zaměřili na polymethakrylátové monolity, vzhledem k relativně snadné přípravě kolon s různými - i polárními - funkčními skupinami. Polymerní monolitické kolony poskytovaly vynikající rychlé separace proteinů a dalších biopolymerů, pro nízkomolekulární látky však vykazovaly příliš nízkou účinnost v důsledku příliš malého podílu mezopórů vhodné velikosti v monolitické matici. S doktorandy Danou Moravcovou (nyní pracuje na ÚACH AV ČR v Brně), Jiřím Urbanem

(byl 2 roky na stáži u Františka Švece v Kalifornii), Veronikou Škeříkovou a v současnosti Magdou Staňkovou, jsme se pokoušeli zlepšit morfologii pórů především optimalizací složení polymerační směsi (funkční a síťující monomer, rozpouštědla). S delším funkčním monomerem (laurylmetakrylátem) a polárními síťujícími dimetakrylátovými monomery se podařilo připravit kapilární monolitické kolony s účinností až 70 000 teoretických pater na metr pro separace v systémech s převrácenými fázemi [P. Jandera, M. Staňková, V. Škeříková, J. Urban, J. Chromatogr. A, 1274 (2013) 97]. Pro separace polárních látek jsme vyvinuli monolitické mikrokolony a kapilární kolony se sulfobetainovými funkčními skupinami, které vykazují dvojí separační mechanismus a lze je používat pro separace v alternujících módech: HILIC v 80-98 % pufovaném acetonitrilu a RP v mobilních fázích s vyšším obsahem vody a získat tak více informací o složení vzorku [M. Staňková, P. Jandera, J. Urban, V. Škeříková, J. Chromatogr. A, 1289 (2013) 47]. Tyto mikrokolony nyní používáme v první dimenzi dvourozměrné kapalinové chromatografie polárních látek.

Hlavním tématem naší skupiny je v poslední době *comprehensive* (úplná, celostní) dvourozměrná (2D) HPLC. Tato technika využívá dva nezávislé LC systémy v přímém spojení, kdy celý vzorek postupně prochází oběma separačními dimenzemi. Obě kolony jsou spojeny přepínacím dvupolohovým ventilem, který slouží k postupnému odběru frakcí eluátu z první kolony a jejich převodu na druhou kolonu. Cílem 2D chromatografie je zvýšení kapacity separace, tj. počtu látek, které lze separovat ve vymezené době. Teoreticky je kapacita separace v 2D systému rovna součinu píkových kapacit v první a ve druhé dimenzi při "orthogonální" kombinaci separačních systémů se zcela rozdílnými mechanismy a selektivitou separace. V praxi toho nelze úplně dosáhnout, je však

třeba zvolit takovou kombinaci separačních systémů, která se tomuto cíli co nejvíce blíží, a přitom dbát na kompatibilitu mobilních fází v obou dimenzích, aby nedocházelo k přílišnému rozšiřování, případně i deformaci píků ve druhé dimenzi [P. Jandera, J. Sep. Sci., 29 (2006) 1763]. Kolona v první dimenzi musí být delší a mít menší průměr než kolona ve druhé dimenzi, protože celá separace odebrané frakce na druhé koloně se musí uskutečnit v průběhu odběru následující frakce eluátu z první kolony (zpravidla 1 - 2 minuty) [P. Jandera, Cent. Eur. J. Chem., 10 (2012) 844].



Obr. 16: Schéma zařízení pro 2D LCxLC chromatografii, sestaveného v naší laboratoři. V první dimenzi je kapilární kapalinový chromatograf 1100 s monolitickou mikrokolonou, ve druhé dimenzi kapalinový chromatograf 1200 Rapid Resolution s krátkou (3 - 5 cm) RP kolonou. Pro převod frakcí eluátu z první do druhé dimenze on-line je použit deseticestný ventil Valco se smyčkami o objemu 2 nebo 5 µL.

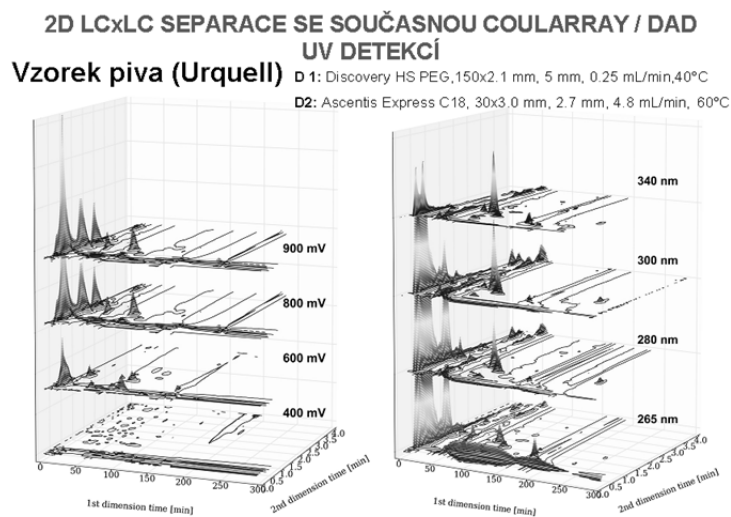
Na tématu 2D HPLC jsme začali pracovat od r. 2001 v rámci grantového projektu Evropské komise, "Comprehensive Liquid

Chromatography", s akronymem COMCHROM, ve spolupráci se skupinami profesorů Tyge Greibrokk (Oslo), Petera Schoenmakerse (Amsterdam), Luigi Mondella (Messina), Didier Thiébaulta (Paříž) a Larse Blomberga (Karlstadt, Švédsko). Cílem naší skupiny v Pardubicích bylo optimalizovat kombinace stacionárních fází, rozměrů kolon a separačních podmínek s cílem dosáhnout maximálního počtu separovaných píků v co nejkratším čase (Obr. 15). K volbě ortogonálních separačních systémů jsme používali chemometrických metod charakterizace selektivity kolon [P. Jandera, K. Vyňuchalová, T. Hájek, P. Česla, G. Vohralík, J. Chemometrics, 22 (2008) 203]. Největšího zvýšení píkové kapacity v nejkratší době analýzy jsme dosáhli při kombinaci krátké (3-5 cm) kolony plněné povrchově pórovitými částicemi (*core-shell*) nebo monolitické kolony na bázi silikagelu ve druhé dimenzi s HILIC kolonou v první dimenzi, kde se nám ve srovnání s komerčními kolonami lépe osvědčila výše popsaná monolitická sulfobetainová polymerní mikrokolona o vnitřním průměru 0,5 mm, připravená v naší laboratoři.

Významného zvýšení píkové kapacity a urychlení separace jsme dosáhli použitím souběžných gradientů mobilní fáze v obou dimenzích. Ve druhé dimenzi je doba gradientu vymezena časem převodu frakcí (1-2 min), gradienty musí být velmi strmé a musí v této době pokrýt široké rozmezí složení mobilní fáze. Pro souběžné gradienty jsme vypracovali originální postupy optimalizace - především programovaný posun změny rozmezí gradientu ve druhé dimenzi v průběhu gradientu v první dimenzi [P. Česla, T. Hájek, P. Jandera, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 3443]. K vyhodnocování chromatogramů vyvinul Petr Česla program, umožňující převod záznamu z detektoru, zapojeného za kolonou v druhé dimenzi, do třírozměrné nebo vrstevnicové prezentace. Je možno použít i

sériově zapojených vícekanálových detektorů pro zlepšení možnosti identifikace separovaných látek. My jsme k tomuto účelu používali kombinaci UV detektoru s fotodiodovým polem a electrochemického detektoru Coularray s elektrodovým polem, zejména pro separace fenolických a flavonoidních přírodních antioxidantů v nápojích, extraktech rostlin a potravinách, jak ukazuje třírozměrný záznam analýzy piva Prazdroj touto technikou (Obr. 16) [T. Hájek, V. Škeříková, P. Česla, K. Vyňuchalová, P. Jandera, J. Separation Sci., 31 (2008) 3309].

Na tomto tématu pracovali doktorandi Petr Česla, Tomáš Hájek, Veronika Škeříková a Kateřina Vyňuchalová a v rámci projektu COM-CHROM i stážisté Francesco Cacciola z Messiny, Eva Blahová a Zoltán Hajdů z Bratislavy, Kasia Krupczynska a Tomasz Welwrowicz z Toruně a Simion Beldean-Galea z Kluže.



Obr. 17: Třírozměrný chromatografický záznam separace přírodních antioxidantů ve vzorku piva Prazdroj s použitím současné detekce vícekanálovým spektrofotometrickým a Coularray elektrochemickým detektorem.

ZÁVĚR A VÝHLEDY DO BUDOUCNA?

Od devadesátých let minulého století se periodicky objevují úvahy o tom, že vývoj HPLC je prakticky ukončen, že se již nic nového nedá v této oblasti očekávat a že tato technika bude nahrazena kapilární elektroforézou či kapilární chromatografií. HPLC a další separační techniky jsou vlastně nadbytečné, vše pohodlně zvládne hmotnostní spektrometrie, případně spojená s menší předúpravou vzorku. Navzdory těmto předpovědím se HPLC stále úspěšně rozvíjí. Hlavním trendem vývoje byla dlouhou dobu příprava stále účinnějších kolon se snižující se velikostí částic náplně, až pod 2 μm při technice UHPLC. Vzhledem k problémům s generací tepla v kolonách plněných velmi malými částicemi a nárokům na instrumentaci jsou povrchově-pórovité a monolitické kolony lákavou alternativou k UHPLC. Hitem poslední doby je vysoce účinná tzv. superkritická fluidní chromatografie, kde se jako mobilní fáze s nízkou viskozitou využívá CO_2 s polárními přísadami v nad- i podkritické oblasti, je zde však omezená volba selektivity.

Selektivita byla při vývoji HPLC dosud neprávem opomíjenou Popelkou, které dle mého názoru patří budoucnost. Vzhledem k vynikající účinnosti se hlavní pozornost dosud soustřeďovala hlavně na vývoj kolon na bázi silikagelu, které mají omezenou tepelnou a chemickou stabilitu. Myslím, že můžeme brzy očekávat značný pokrok ve vývoji účinných kolon na bázi organických polymerů

(především monolitických?), které lze poměrně levně připravit s širokým výběrem polymerních matic i postpolymerních modifikací "na míru" pro různé separační problémy. Složité vzorky budou stimulem pro další rozvoj multidimenzionálních technik HPLC, ve spojení s různými detekčními technikami, především s hmotnostní spektrometrií. Doufám, že se brzy dočkáme i skutečně prakticky použitelného on-line spojení HPLC s NMR spektroskopií. To vše ukáže budoucnost. Domnívám se, že další vývoj HPLC bude zajímavý a nebude se omezovat jen na rozvoj nových aplikací.

Od konstrukce použitelného přístroje se značným tlakovým omezením před více než 40 lety, až po současný vývoj v oblasti monolitických kolon a především dvourozměrné HPLC, prošla kapalinová chromatografie i na Katedře analytické chemie v Pardubicích dlouhou cestu. Skupina HPLC se v rámci možností snažila sledovat hlavní trendy vývoje v oblasti teorie i aplikací HPLC. Doufám, že tento vývoj bude dále pokračovat.

LIDÉ

Během mého dlouhého působení na Katedře analytické chemie jsem se v naší skupině HPLC i mimo ní setkal s mnoha skvělými kolegy i (většinou) nadanými, pozornými a snaživými studenty. Především musím uvést Jaroslava Churáčka, mého dlouholetého šéfa a přítele, který na katedru zavedl chromatografii jako studijní i výzkumnou disciplínu a který také mne uvedl do této oblasti. Na naší katedře vypracovalo více než 100 studentů diplomové práce v oblasti vývoje metod a aplikací HPLC a 30 adeptů obhájilo kandidátské a disertační práce. Jejich jména uvedená v tabulce nezahrnují externí disertanty, kteří vypracovali disertaci mimo

katedru, ani ty, kteří sice používali při práci HPLC jako analytickou metodu, ale jejich hlavní téma práce bylo odlišné (čistá hmotnostní spektrometrie, úpravy vzorků před vlastní analýzou u doktorandů prof. Ventury, bioafinitní chromatografie u doktorandů prof. Bílkové z Katedry biologických věd). Prof. Michal Holčapek, PhD založil vlastní skupinu hmotnostní spektrometrie na naší katedře, v jejímž rámci školí doktorandy i v oblasti HPLC/MS. Doc. Josef Královský, CSc., se na tematiku HPLC přeškolil během svého působení ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Pardubicích - Rybitví a po návratu na Katedru analytické chemie v roce 1990 vedl oddělení analýzy potravin. Řada absolventů doktorského studia z oblasti kapalinové chromatografie stále pracuje na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice jako učitelé, nebo jako vědecko-výzkumní pracovníci v rámci různých projektů, většina z nich nadále v oblasti HPLC, HPLC/MS nebo kapilární elektroforézy (CE). Doc. Ladislav Svoboda, CSc. vede Katedru anorganické technologie. Ing. Dana Moravcová, PhD, pokračuje ve vývoji monolitických kolon na Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně, většina ostatních pardubických absolventů PhD studia v HPLC oblasti pracuje v soukromém sektoru. Omlouvám se, pokud jsem ve výčtu nechtěně na někoho zapomněl. Na Obr. 17 je současná skupina HPLC na Katedře analytické chemie.



Obr. 18: Magda Staňková, Petr Česla, Jirka Urban, Veronika Škeříková, autor, Tomáš Hájek, Katka Vyňuchalová a Honza Soukup, kolem skulptury (Heisenbergova kočka) na Univerzitě Pardubice.

Disertační práce z oblasti kapalinové chromatografie, vypracované a obhájené na Katedře analytické chemie VŠCHT a Univerzity Pardubice (jména bez titulu, rok obhajoby v závorce školitel):

Pavel Jandera, 1977 (prof. Churáček) - UPa, HPLC

Marie Janderová, 1977 (prof. Churáček)

Ladislav Svoboda, 1980 (prof. Churáček) - UPa

Jaromír Kubát, 1985 (prof. Churáček)

Josef Urbánek, 1988 (prof. Churáček)

Jan Fischer, 1993 (prof. Jandera) - UPa, HPLC, CE
Bořivoj Prokeš, 1993 (prof. Jandera)
Michal Holčapek, 1998 (prof. Jandera) - UPa, HPLC/MS
Simona Bunčková, 2001 (prof. Jandera)
Václav Staněk, 2001 (prof. Jandera) - UPa, CE
Michal Škavrada, 2003 (prof. Jandera)
David Komers, 2003 (prof. Jandera)
Lenka Kolářová - Česlová, 2004 (prof. Jandera) - UPa, HPLC-MS
Lucie Řehová - Grynová, 2005 (prof. Jandera)
Kateřina Novotná - Vyňuchalová, 2006 (prof. Jandera) - UPa, HPLC
Petr Česla, 2007 (prof. Jandera) - UPa, HPLC, CE
Michal Halama, 2007 (prof. Jandera)
Dana Moravcová, 2007 (prof. Jandera)
Jiří Urban, 2007 (prof. Jandera) - UPa - UPa, HPLC
Dana Vaněrková - Ansorgová, 2007 (prof. Jandera)
Soňa Táborská - Řezková, 2007 (doc. Královský) - UPa
Martina Lasáková, 2008 (prof. Jandera)
Miroslav Lísa, 2008 (prof. Holčapek) - UPa, HPLC-MS
Blanka Beňová - Švecová, 2008 (doc. Královský) - UPa, HPLC
Martina Molíková, 2010 (prof. Jandera)
Veronika Škeříková, 2010 (prof. Jandera) - UPa, HPLC
Tomáš Hájek, 2011 (prof. Jandera) - UPa, HPLC
Zdeňka Kučerová, 2011 (prof. Jandera)
Jan Soukup, 2012 (prof. Jandera) - UPa, HPLC
Hana Velínská - Dvořáková, 2012 (prof. Holčapek)
Eva Čáňová - Cífková, 2013 (prof. Holčapek) - UPa, HPLC-MS

V průběhu let jsme v oblasti HPLC spolupracovali s řadou pracovišť v rámci společných projektů i neformálně. V rámci ČR to bylo především s Ing. Josefem Planetou z Ústavu analytické chemie AV

ČR v Brně. V oblasti nelineární chromatografie v rámci společného grantu od nás odjeli na stáž k prof. Guiochonovi postupně Honza Fischer, David Komers a Michal Škavrada. Z University of Tennessee v Knoxville k nám přijeli doktorandi prof. Guiochona Scott Broyles a Kathleen Mihlbachler. Prof. Guiochonovi byl v r. 1998 udělen čestný doktorát Univerzity Pardubice (Obr. 18). V oblasti nelineární chromatografie jsme spolupracovali i s prof. Attilou Felingerem z univerzit ve Veszprému a v Pécsi v Maďarsku, kam vyjela na stáž Martina Molíková a k nám přijel Péter Vajda, s prof. Francescem Dondim z Univerzity ve Ferrare a s prof. Andreasem Seidelem-Morgensternem z Univerzity v Magdeburgu.



Obr. 19: Prof. Georges Guiochon při udělení čestného doktorátu Univerzity Pardubice. Zleva: prof. Jaroslav Churáček, laureát prof. Georges Guiochon, autor a prof. Karel Vytřas (prorektor).

Se skupinou prof. Boguslawa Buszewského z Univerzity Mikuláše Koperníka v Toruni jsme řadu let řešili projekty z oblasti přípravy a hodnocení vlastností plněných a monolitických kolon a vysokoteplotní HPLC. Do Toruně vycestovalo nejvíc našich doktorandů: Katka Novotná (Vyňuchalová), Zdeňka Kučerová, Dana Moravcová, Martina Molíková a Jan Soukup. K nám z Toruně přijeli kromě prof. Buszewského i doc. Michal Szumski a na tří- až šestiměsíční stáže doktorandi Kasia Krupczyńska, Szymon Bocian, Tomasz Welerowicz, Sylvia Kowalska (Studzinska), Sylvia Noga, Justyna Walczak a Natalia Denderz. Katka Novotná (Vyňuchalová) a Martina Molíková byly na stáži u prof. Romana Kaliszana na Lékařské univerzitě v Gdaňsku, kde se v rámci projektů CEEPUS i dvoustranné spolupráce zabývaly hodnocením kolon pro HPLC.

Velmi si cením spolupráce s dr. Henkem Claessensem z Technické univerzity v Eindhovenu. Henk vedl u nás na Katedře analytické chemie výborně připravený kurz pokročilých separačních metod. Od nás do Eindhovenu vyjeli na několikaměsíční stáže Jirka Urban, Václav Staněk, Lenka Kolářová (Česlová), Simona Bedleková (Bunčeková) a Michal Halama, kteří se tam zabývali hodnocením kolon, separacemi polymerů a učili se tam připravovat plněné i monolitické kapilární kolony. Erik Vonk z Eindhovenu u nás absolvoval kratší stáž.

V rámci programu NATO "Science for peace" k nám přijel dr. Georgios Theodoridis z Aristotelovy univerzity v řecké Soluni (Thessaloniki) a zabýval se separacemi oligomerních tenzidů. Ve spolupráci jsme dále pokračovali v rámci programů Socrates Erasmus a dvoustranného řecko-českého projektu. George nás ještě několikrát navštívil a ze Soluně k nám přijeli i PhD studenti Tassos Sakalis, Dimitrios Tsimachidis, Nicoleta Giantsiou a Tatiana

Konstantinidi. Několik měsíců v Soluni strávili i Dana Ansorgová (Vaněrková), Veronika Škeříková, Tomáš Hájek a Martina Lasáková. Výzkumná témata se týkala hlavně vývoje metod pro kontrolu čistoty životního prostředí, jednak aplikace HPLC/MS technik pro analýzu degradačních produktů elektrochemického odbourávání azobarviv v odpadních vodách z textílek, jednak vývoje a aplikací monolitických sorbentů s vtištěnými molekulami analytů pro izolaci a obohacení kontaminantů ve vodách, rostlinných extraktech a v nápojích (vínech).

Výše jsem se už zmínil o projektu Evropské Komise COM-CHROM pro vývoj technik dvourozměrné HPLC. Ten umožnil realizaci dlouhodobějších stáží (4 měsíce až 1 rok). Z naší skupiny byli u Tyge Greibrokk na universitě v Oslu Michal Holčapek a Katka Novotná (Vyňuchalová), u Petera Schoenmakerse v Amsterdamu Lenka Kolářová (Česlová) a Jirka Urban, u Luigi Mondella v Messině Veronika Škeříková a Václav Staněk, u Didier Thiébaulta na ESPCI v Paříži Martina Lasáková a Jirka Urban a u Larse Blomberga v Karstadtu (Švédsko) Dana Moravcová a Petr Česla. U nás v rámci "dvourozměrného" projektu pracovali Eva Blahová a Zoltán Hajdů z Bratislavy, Simion Beldean-Galea z Kluže (Rumunsko), již zmínění Kasia Krupczyńska a Szymon Bocian z Toruně a hlavně Francesco Cacciola z Messiny. Francescovi se u nás tak líbilo, že si pobyt u nás prodloužil o další rok. Spolupráce s Messinou pokračovala i po skončení projektu COM-CHROM a od prof. Mondella k nám přijeli Marco Beccaria, Giuseppe Agnello a Vanessa Oteri. Podle už poněkud otřepaného klišé - chromatografie rozděluje látky, ale spojuje lidi. To se doslova potvrdilo i u naší skupiny. Při výměnných stážích v sobě našli zalíbení Martina Molíková s Peterem Vajdou z maďarského Pětikostelí, kteří se asi před rokem vzali a v současné

době jsou oba jako *post-doc associates* u prof. Guiochona v Knoxville.

V rámci česko-rakouské spolupráce jsme před několika lety s prof. Ernstem Langmeierem a dr. Xinghua Guo z Technické univerzity ve Štýrském Hradci řešili dvoustranný projekt zaměřený na HPLC/MS aplikace monolitických kolon.

S řadou kolegů jsem udržoval trvalejší kontakty, setkával se na konferencích a konzultoval různé problémy z oblasti chromatografie, buď osobně, nebo korespondenčně, případně jsme měli i společné publikace. Vedle Georgese Guiochona, Boguslawa Buszewského, Henka Claessense, Petera Schoenmakerse a Attily Felingera to byli především Lloyd Snyder, Uwe Neue (bohužel nedávno zesnulý), Joe Pesek a František Švec z USA, Henri Colin, Michel Martin a Alain Tchapla z Francie, Dušan Berek a Josef Lehotay ze Slovenska, Tibor Macko z Německa a další.

Závěrem musím poděkovat za podporu na mé odborné dráze v HPLC především profesorovi Miroslavu Jurečkovi, který mne přijal na Katedru analytické chemie, mému mentorovi Jaroslavu Churáčkovi, který mne uvedl do oblasti chromatografie, Karlu Mackovi a Zdeňku Deylovi, kteří mi pomohli navázat kontakty s mnoha skvělými lidmi kolem časopisu *Journal of Chromatography*. Bohužel už nikdo z těchto skvělých lidí nežije. Můj velký dík patří i mé ženě Marii za její shovívavost a pochopení pro moji "separatistickou" profesní kariéru, která se stala i mým největším koníčkem.

Můj speciální dík a nezapomenutelné vzpomínky patří nedávno zesnulému mentorovi a příteli Prof. Georgesu Guiochonovi, který na mne působil skvělým příkladem, radou i pomocí po celých uplynulých 25 let, ve Francii, v Tennessee, při setkáních na

konferencích i na dálku. Za zahraničních kolegů je mou milou povinností speciálně poděkovat zetralou těsnou spoluprací a osobní přátelství Boguslawu Buszewskému. Obzvláště milým přítelem mi dlouhá léta byl i Jozef Lehotay

7. JOZEF LEHOTAY



Jozef Lehotay se narodil 9.11. 1943 v Brezne. Je absolventem Chemické fakulty Slovenské technické univerzity v Bratislavě, oboru Analytická chemie. V roku 1973 získal po skončení doktorandského studia titul „CSc“ na Prírodovedecké fakultě, Univerzity Komenského v Bratislavě. V roce 1988 se habilitoval a v roce 1999 se stává profesorem na Chemickotechnologické

*fakultě STU, Bratislava. V současné době působí na Katedře analytické chemie, Fakulty chemické a potravinářské technologie, STU a na Univerzite Sv. Cyrila a Metoda v Trnavě. Zabývá se kapalinovou chromatografií a v poslední době zejména analytickým a termodynamickým studiem separace opticky aktivních látek, ultrastopovou analýzou a vývojem nových sorpčních materiálů na bázi imprintovaných polymerů. V těchto oborech publikoval přes 225 vědeckých publikací. Působil také v zahraničí na State University of Amsterdam (1976) a na University of Liege (1997). Je autorem knihy *Separáčné metódy v analytickej chémii* (STU 2009). Jeho práce byla mimo jiné oceněna Stříbrnou a Zlatou medailí Zväzu slovenských vedecko-technických spoločností za významné výsledky v oblasti vědy a techniky.*

VZPOMIENKY

Som rodákom z Brezna, kde sme bývali 1 rok. Potom sme sa presťahovali do Senca a potom krátky čas sme bývali v Hornej Strede a od roku 1959 v Piešťanoch. V Piešťanoch som chodil na gymnázium a tam som aj maturoval. Výber štúdia na Chemickej fakulte (CHF) v Bratislave hodne ovplyvnil môj otec, ktorý bol profesorom chémie na gymnáziu. Pôvodne som chcel študovať medicínu, ale pretože som nebol robotnícky káder, tak možnosti výberu školy boli limitované. Veľmi ma ale bavila aj chémia a preto som sa prihlásil na Slovenskú technickú univerzitu v Bratislave. Prijímacie pohovory boli v marci roku 1960. V tom čase som ešte nebol po maturitách, takže som bol prijatý podmienečne.

Predsedom prijímacej komisie bol známy biochemik, profesor Nemeč a ten jednoznačne odporučil moje prijatie. Tak som sa dostal na chemickú fakultu. Najviac ma zaujala analytická chémia, zdala sa mi univerzálna a bolo možno pracovať v rôznych odboroch - kontrola potravín, farmácia atď. To bol aj dôvod, prečo som si analytickú chémiu vybral ako špecializáciu pre ďalšie štúdium po 3. ročníku.

3. augusta 1960 nám začínal trimester, vedenie fakulty uprednostňovalo, aby sa študenti najprv zoznámili aj s prácou robotníkov, takže na tri a pol mesiaca sme museli absolvovať prax v chemických podnikoch, aby sme spoznali život robotníckej triedy. Ja som nastúpil do Chemických závodov J. Dimitrova v Bratislave. Tam som nezarábal zle – mesačne som dostával 750 korún československých. To keď sa porovná s platom asistenta, ktorý som dostával neskôr a bol 960 Kčs, je zrejmé, že ako 17 ročný študent som mal porovnateľný plat s vysokoškolsky vzdelaným odborníkom. Do práce sme chodili od pondelka do piatka, v sobotu sme chodili na prednášky.

Moja diplomová práca bola zameraná na analýzu materskej kašičky plynovou chromatografiou. Vedúcim práce bol doc. Ing. Mojmír Traiter, CSc. Analyzovali sme mastné kyseliny. Pozornosť bola venovaná hlavne 2-hydroxydecénovej kyseline a jej ketoforme nakoľko rovnováha medzi keto-formou a hydroxy-formou ovplyvňovala správanie včelích matiek a následne chovanie danej včelej populácie (rozčlenenie roja a podobne). Doc. Ing. Mojmír Traiter, CSc. prišiel na fakultu zo Slovakofarmy Hlohovec, robil ašpirantúru na SAV z oblasti papierovej chromatografie a potom pracoval v oblasti plynovej chromatografie (naša práca bola založená na predseparácii papierovou chromatografiou a následnej analýze extrahovaných látok zo škvŕn plynovou chromatografiou). V roku 1965 som končil štúdium na Chemickej fakulte STU.

Na katedru analytickej chémie CHF STU som sa dostal viac-menej náhodou. Mal som už miesto na Ústave polymérov SAV ako interný ašpirant. Vtedajší vedúci katedry doc. Ing. Otakar Liška, CSc. vybavil miesto na katedre a keďže som zo skupiny analytikov mal najlepší prospech, tak vedúci katedry sa rozhodol ma prijať. Potom som začal ašpirantské štúdium na katedre analytickej chémie. Na katedru nastúpili v tomto čase viacerí čerství absolventi. Bol to profesor Mocák (v roku 1962), ktorý sa venoval predovšetkým elektrochémii a v roku 1964 Ing. Daria Šrötterová, ktorá sa zaoberala chromatografickými metódami.

Hneď po nástupe do zamestnania (1965) som musel absolvovať ročnú vojenskú službu a medzi tým sa zmenili pomery na katedre. Na katedru bol v tom čase prijatý Ing. Ján Krupčík, špecialista z oblasti plynovej chromatografie a keďže v tejto oblasti pracoval už niekoľko rokov po vzájomnej dohode som sa začal venovať kvapalinovej chromatografii. V tom čase sa tejto oblasti na katedre nikto nevenoval.

Externú ašpirantúru som začal hneď po návrate z vojenskej služby v roku 1967. Školiteľom bol doc. Ing. M. Traiter, CSc. Dizertačná práca

bola zameraná na ionexovú chromatografiu a predovšetkým na Donanové rovnováhy a separáciu organických kyselín metódou ionového vylučovania (na katexoch v H⁺ cykle). Prakticky „na kolene“ som si vyrobil vodivostný detektor, nakoľko ako mobilná fáza sa mohla použiť destilovaná voda. Na separáciu organických kyselín vo vodnom prostredí bolo použitie vodivostného detektora veľmi výhodné. Oponentmi dizertačnej práce boli prof. J. Majer z Farmaceutickej fakulty UK a prof. S. Stankoviansky z Prírodovedeckej fakulty UK.

Hodne som spolupracoval a stále spolupracujem s Farmaceutickou fakultou (máme spoločných okolo 50 CC publikácií), najviac s prof. RNDr. J. Čižmárikom, PhD. Raz sme sedeli v reštaurácii pri pive a začal mi hovoriť aké majú látky, išlo o deriváty kyseliny fenylnkarbámovej. A keďže k dispozícii boli aj homologické rady, ponúkalo to možnosť interakčných štúdií v kvapalinovej chromatografii. Pre veľký počet týchto derivátov boli zistené ich anestetické aktivity, čo sa mohlo využiť pri korelačných štúdiách s chromatografickými parametrami, kde biologický materiál bol modelovaný stacionárnou fázou (hlavne chemicky viazané fázy typu C18 a fenyl), čím sa mohlo zistiť do akej miery je rozhodujúca penetrácia daného anestetika k aktívnemu centru a čo najviac ovplyvňuje túto penetráciu.

V čase po absolvovaní ašpirantského štúdia (1973) bola možnosť navštevovať aj medzinárodné sympózia v zahraničí nakoľko bola založená organizácia SEA (Scientific exchange agreement), hlavný koordiatör bol profesor Keulemans (z Eindhovenu, manžel pani profesorky Smolkovej), potom neskôr profesor Guiochon z École polytechnique Palaiseau vo Francúzsku. Boli k dispozícii finančné prostriedky, z ktorých bolo možné financovať zahraničné študijné pobyty a účasť na sympóziách vedecko-výskumných pracovníkov zo socialistických štátov. Bolo to veľmi výhodné na získavanie zahraničných kontaktov, ktoré sa mohli využiť na spoluprácu. V roku 1976 som bol na polročnom študijnom pobyte univerzite u prof.

Hansa Poppeho v Asterdame. Prof. Poppe mal špičkové vybavenie laboratórií – spolupracoval som na stanovení estrogén glukuronidov v biologických materiáloch. V spolupráci s pracovníkmi nemocnice v Amsterdame sme vyvíjali metódu na diagnostiku vývoja plodu behom tehotenstva na základe spektra prítomných estrogén glukuronidov. Separácia estrogén glukuronidov sa uskutočnila v ionexovej kolóne typu Aminex s fotometrickou detekciou pri 254 nm. Tam som sa naučil aj filozofiu prípravy chromatografických kolón, používali sme techniku *balance density* s vysoko výkonnými tlakovými čerpadlami, vtedy sa najviac používali čerpadlá s názvom Orlita, ktorými za niekoľko sekúnd bolo možné dosiahnuť tlak 1000 atm. Na študijnom pobyte som sa spoznal aj s dr. J. Kraakom, bol zástupca prof. Poppeho. Ten sa tiež zaoberal vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou. Študijný pobyt v Amsterdame som ukončil 30. júna 1967.

S prof. Poppem sme ostali dobrí priatelia, niekoľko krát navštívil Bratislavu, či už v rámci Letných škôl HPLC alebo konferencií, taktiež som niekoľko krát navštívil jeho pracovisko v Amsterdame.

Keď by som mal spomenúť osobnosti, ktoré ma najviac ovplyvnili, musím sa zmieniť aj o prof. G. Guiochonovi. S ním sme spolupracovali v oblasti separácie dithiokarbamátov rôznych kovov, čo sme spoločne publikovali v niekoľkých prácach. Ďalší bol prof. Kromen z univerzity v Liege, kde som bol aj na dvojmesačnom prednáškovom pobyte. Veľmi významnou osobnosťou bol profesor J. F. K. Huber z univerzity vo Viedni, ktorý bol jedným zo zakladateľov viacrozmerných separácií. Často chodil prednášať aj na Letné školy HPLC do Bratislavy, organizované predovšetkým na jeho podnet.

Ďalej by som spomenul aj dvojicu profesorov Suprinoviča a Sočevinského z Lublinu, ktorí sa zaoberali separačnými metódami. Prof. Suprinovič bol aj častým prednášateľom na Letných školách HPLC. Veľkým žiakom prof. Suprinoviča bol prof. Buszewski, ktorý sa potom osamostatnil a založil svoju skupinu na univerzite v Toruni.

Prof. Buszewski je v súčasnosti častým prednášateľom na Letných školách HPLC. Príjemnú spomienku mám na prof. Kysleva z Moskvy, ktorý sa zúčastnil medzinárodného sympózia v Bratislave. Bol to predstaviteľ ešte starej ruskej školy a bol veľmi dobrý priateľ prof. Hubera. Rád si spomínam na návštevu Slovenského grobu, kde sa konali husacie hody, ktorých sme sa spoločne zúčastnili. Veľmi významná spolupráca v oblasti chirálnej analytickej chémie je aj v súčasnosti s prof. Armstrongom z University of Texas, Arlington. Na základe tejto spolupráce sme publikovali viac ako 20 CC publikácií.

Dlhou tradíciou nášho pracoviska bola organizácia letných chromatografických škôl z HPLC s medzinárodnou účasťou. Prvá letná škola HPLC bola organizovaná v roku 1978 a v intervaloch 2 rokov sa organizuje dodnes s malými výnimkami. Cieľom tejto série škôl bolo informovať odbornú verejnosť o pokrokoch v analytických metódach hlavne v oblasti HPLC, ktorá sa stále vyvíja a stále je potrebné o týchto pokrokoch informovať mladších spolupracovníkov. Účasť na letných školách bola z hľadiska kapacity vysoká. Niekedy bol počet účastníkov až 60.

Mal som rad aj priateľov z Čiech. Hodne som sa stretával s prof. P. Janderom. S Pavlom sa poznáme od 1982 roka, kedy sa konalo medzinárodné chromatografické sympóziu v Bratislave. Z Brna som sa poznal s prof. Krejčím (bol aj prednášateľ na LŠ HPLC) a s prof. P. Bočkom, ktorý často chodil aj k nám na katedru - hodne spolupracoval s doc. Polonským v oblasti izotachoforézy. Kontakty s kolegami z katedry analytickej chémie v Olomouci hlavne s prof. J. Ševčíkom zabezpečovala spolupracovníčka, prof. E. Brandšteterová. Bolo to preto, že v Olomouci študovala. Paní prof. E. Brandšteterová pomáhala pri organizácii LŠ HPLC a tiež patrila medzi hlavných organizátorov série konferencií Chromatografické metódy a zdravie človeka, ktoré dávno predtým založila prof. Šaršúnová.

Pamätám sa na prvý kvapalinový chromatograf, ktorý bol zakúpený od firmy Packard Instruments, ktorú zastupoval vtedy Ing. J. Prüger s

ktorým sme boli spolužiaci na ČHTF. V tom čase (1977) som mal už určité skúsenosti s inštrumentáciou v kvapalinovej chromatografii z Amsterdamu. Veľkú zásluhu na získaní prístroja mal prof. Ing. J. Garaj, DrSc., vtedy vedúci Katedry analytickej chémie, ktorý zabezpečil finančné prostriedky. Kvapalinový chromatograf bol pomerne poruchový, čo bývalo vtedy bežným javom a veľmi často som strávil viac času na opravu ako na meranie. Po určitej dobe som dojednal s Ing. Prügerom, že namiesto ďalšieho servisu dodá ďalší kvapalinový chromatograf bez poplatku. Na tomto prístroji potom pracovala aj. Eva Brandšteterová.

Z hľadiska histórie prvé laboratórium z oblasti HPLC na Slovensku bolo založené na našej katedre pod mojim vedením, čo dokumentujú aj prvé publikácie. Je samozrejmé, že aj pred týmto časom sme sa zaoberali kvapalinovou chromatografiou, pripravovali sme silikagél z „vodného skla“, preosievali ho, aby sme získali definovanú veľkosť častíc a kolóny sme si naplňali sami. Používali sme fotometrický detektor s jednou vlnovou dĺžkou (254 nm), prietoky sme zabezpečovali jednoduchými čerpadlami, tiež pomerne poruchovými.

Roky plynuli a my sme v priebehu doby riešili veľa analytických problémov. Zaujímavá bola napríklad separácia kovov vo forme dithiokarbamátov v silikagélovej kolóne metódou adsorpčnej chromatografie, čo sa využilo aj na stanovenie niektorých kovov v odpadových vodách. To bola v danej dobe zaujímavá alternatívna metóda k AAS. Prvý krát sme použili neuronové siete v oblasti korelačných štúdií medzi anestetickými vlastnosťami niektorých derivátov kyseliny fenylnykarbámovej s ich chromatografickými parametrami. Snažili sme sa aj o spojenie on-line HPLC-NMR, ale problémy boli s citlivosťou NMR techniky (nutné bolo použiť vysokú koncentráciu analytu - okolo 100 µg). Veľa času sme venovali separáciám optických izomérov liečiv. Chirálna analytika sa začala búrlivo vyvíjať po thalidomidovej afére. V Československu sa chirálnym separáciám v tej dobe venovala najmä profesorka

Smolková. Na tomto mieste by som rád pripomenul ešte raz spoluprácu s profesorom Armstrongom, ktorý v tom čase publikoval využitie makrocyclických antibiotík ako stacionárnych chirálnych fáz. Ďalej sme sa venovali stopovej a ultrastopovej analýze v oblasti životného prostredia s využitím on line predkoncentrácie a derivatizácie.

V súčasnosti sa hlavne venujeme interakčným štúdiám pri chirálnych separáciách, kde často využívame termodynamiku a chemometriu. Zaoberáme sa aj vývojom polymérov s odtlačkami molekúl (imprinted polymers), kde hlavne skúmame ich selektivitu pri príprave vzoriek k analýze.

Súčasne pôsobím v Bratislave na Fakulte chemickej a potravinárskej technológie STU a aj v Trnave na Fakulte prírodných vied UCM.

8. MIREK MACKA



Mirek Macka, Ph.D., je Australian Research Council Future Fellow Level 3 a Professor na katedře School of Physical Sciences a v Australian Centre for Research on Separation Science na University of Tasmania v australském Hobartu. Vystudoval chemii na Masarykově univerzitě v Brně a promoval s titulem RNDr. v roce 1981.

Pracoval jako výzkumný pracovník ve farmaceutickém průmyslu v České republice (Lachema a.s.) a později ve Švýcarsku (Lonza AG). Poté, co se po r. 1990 rozhodl přejít na akademickou půdu, po krátkém působení na Ústavu analytické chemie, AV ČR v Brně, v roce 1992, zamířil v roce 1994 do Austrálie, kde získal PhD v chemii v roce 1997. Profesor Macka získal řadu prestižních výzkumných pozic, včetně ARC Research Fellow v letech 2000-2005, Marie Curie Excellence Fellowship 2006-2010 Evropské unie, a jeho současnou pozici ARC Future Fellowship. Jeho výzkum základních a praktických aspektů analytické vědy zahrnuje především elektromigrační a a chromatografické separační metody v kapalné fázi, detekční metody, využití zdrojů světla v pevné fázi jako elektroluminiscenčních diod (LED) v chemii, miniaturizace analytické instrumentace, přenosné a vzdálené analýzy, monolitické stacionární fáze a počítačové modelování a dynamické simulace. Je autorem více než 170 dokumentů, členem poradních redakčních rad a odborných společností.

ZKUŠENOSTI Z CHROMATOGRRAFIE VE TŘECH ZEMÍCH DVOU KONTINENTŮ
- z VÚČCH LACHEMY BRNO PO AUSTRÁLIÍ

Když se dívám na jména autorů pozvaných přispět do této kompilace, nemohu se ubránit dojmu, že sem nepatřím, protože můj příspěvek specificky k vývoji oboru v Česku a na Slovensku byl velmi malý. Pozvání jsem přijal, protože doufám, že tímto mohu přispět k pestrosti příspěvků, a hlavně k rozšíření záznamů o praxi oboru v průmyslovém výzkumu v dobách 80. a 90. let. Má pracovní a životní dráha je poněkud neobvyklá, a proto dofám, že můj příběh může být pro čtenáře zajímavý. Nabízí pohled na oblast chromatografie, separací a analytické chemie z několika pohledů, a to z perspektivy výzkumného pracovníka v průmyslu v osmdesátých letech a začátku let devadesátých v tehdejší Lachemě, následovaný mou stáží během roku 1993 u firmy Lonza AG ve Švýcarsku, a přesunem do Austrálie roku 1994 a na akademickou dráhu, kde jsem zakotvil trvale. Úmyslně jsem se nevyhnul stručným odstavcům z mých následujících životních a pracovních stadií ve Švýcarsku a v Austrálii, protože ilustrují, jak se mi zkušenosti nabyté v původní vlasti dobře hodily, a protože sleduji vývoj oboru v ČR prostřednictvím mnoha aktivních kontaktů a spolupráce s kolegy v ČR.

Redakční pokyny zněly zvolit si styl dle vlastní volby tak, aby „kniha měla náladu zábavnou, formu odlehčenou a přitom si držela profesionální kvalitu obsahu a projevu“. Proto jsem se snažil spojit mé osobní vzpomínky na vývoj chromatografie a separací z různých pohledů, včetně mnoha praktických aspektů a pohledů na to, jak mi tehdy získané zkušenosti byly užitečné často o mnoho let později, ale i různé vzpomínky z pracovního-společenského života. To, jak se praktikovaly separace a výzkum před desetiletími, může být

zajímavé a užitečné zvláště pro mladší kolegy jako historický záznam z dob, které nezažili. Nakolik se mi to povedlo, je na posouzení každého čtenáře¹.

HISTORIE KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

Historické prameny o vývoji chromatografie v Českých zemích a na Slovensku jsou obecně skromné. V angličtině je možno zmínit dobře známé knihy „75 Years of Chromatography - a Historical Dialogue“ (L. S. Etre and A. Zlatkis, Elsevier 1979), „Chromatography – a Century of Discovery 1900-2000. The Bridge to the Sciences/Technology“ (Elsevier 2001), nebo „Chromatography: A Science of Discovery“², obsahující relativně stručné zmínky o přínosech z Českých zemí a Slovenska. V češtině jsou známé mnohé cenné vzpomínky významných osobností z oblasti chemie obecně, jako Otto Wichterle (Vzpomínky, Academia, Praha, 2005³), nebo Rudolf Zahradník (Laboratorní deník: Zač jsme bojovali, 2008)^{4,5}. Řada pracovišť má na svých webových stránkách informace o historii různých oblastí chemie, jako příklad Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK⁶, nebo VŠCHT⁷. Jen velmi málo se

¹ English and German versions are available at my webpage

² Wixom, Robert L., and Gehrke, Charles W. (Eds), Chromatography: A Science of Discovery, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010 9780470283455

³ ISBN 978-80-200-1495-5, <http://www.academia.cz/vzpominky-1.html>, 31. ledna 2014

⁴ ISBN 978-80-200-1632-4, <http://www.academia.cz/laboratorni-denik.html>, 31. ledna 2014

⁵ <http://www.cesky-dialog.net/clanek/3931-rudolf-zahradnik-laboratorni-denik-zac-jsme-bojovali/>, 31. ledna 2014

⁶ <http://www.natur.cuni.cz/chemistry/analchem/history>, 31. ledna 2014

⁷ <http://www.vscht.cz/homepage/absolventi/success/zahradnik>, 31. ledna 2014

váže specificky k oboru chromatografie, a proto tato kompilace Historie chromatografie může být významným přínosem a historickým záznamem pro budoucí generace.

Chromatografie byla v Česku a na Slovensku přijímána a rozvíjena tak významně, že díky tomu je podíl našich vědců na publikacích vždy podstatně větší, než by odpovídalo počtu obyvatel. Jednoduchá bibliometrická analýza s pomocí Web of Science (leden 2014) ukazuje cca 1,7 % z publikací s výrazem „Chromatogr*“ v názvu práce (Title) mělo v *affiliation* „Czech*“ nebo „Slovak*“ („Czech*“ též podchycuje „Czechoslov*“). To je při aplikaci stejné analýzy zhruba dvakrát vyšší ve srovnání s mnohými jinými evropskými zeměmi srovnatelné velikosti a srovnatelné s mnohými podstatně většími evropskými zeměmi. Tyto údaje mluví za sebe a dokumentují silné postavení chromatografie v našich zemích od počátků chromatografie do dneška. Je na současné a dalších generacích kolegů, jak tento trend bude pokračovat v budoucnosti.

Separace včetně kapalinové chromatografie se aktivně vyvíjely a praktikovaly na mnoha pracovištích v Česku a na Slovensku. Má generace se už mohla zapojit do oboru vzniklého průkopnickými pracemi v letech padesátých a šedesátých, a za všechny jmenuji průkopníka chromatografie z mého regionu profesora Jaroslava Janáka z Ústavu analytické chemie Akademie věd v Brně⁸. Seznam pracovišť, která se významně podílela, i když velmi různou měrou a v různých oblastech na rozvoji chromatografie u nás, by byl dlouhý, a tak uvádím alespoň jako příklady některá, jako Katedra analytické chemie University Karlovy, VŠCHT, Universita v Pardubicích, dnešní Masarykova universita v Brně. Dále to bylo mnoho jiných

⁸ <http://www.iach.cz/uiach-c/cz/historie.htm> , 31. ledna 2014

universitních pracovišť v ČSSR a později ČR a SR, a ústavy Akademie věd včetně velmi známého ÚOCHB jako jednoho příkladu z celkově velkého počtu ústavů ČSAV, a dále průmyslové výzkumné ústavy, a za všechny příklad Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Brně, a z podnikových výzkumných ústavů je příkladem právě Výzkumný ústav čistých chemikálií (VÚČCH) Lachema. Podíl různých pracovišť byl logicky velmi různý jak celkovou mírou, tak zaměřením. Můj příspěvek ilustruje z mé perspektivy průmyslový výzkum a praxi HPLC v dobách 80. a 90. let, a příklady převážně v oblasti analýzy léčiv.

O AUTOROVI TOHOTO PŘÍSPĚVKU

Každý pohled je nutně pohledem osobním. Proto pár informací pro ty, kteří mě neznají: Promoval jsem v roce 1981 na dnešní Masarykově⁹ universitě v oboru *chemie* - specializace *analytická chemie* s titulem RNDr., dnes ekvivalent MSc. Byl jsem dobrým studentem (promoval jsem s takzvaným červeným diplomem). Od dětských let jsem měl velký zájem o techniku, později vědu a výzkum, měl jsem vlastní chemickou laboratoř ve sklepě rodinného domku rodičů, kteří sami oba dva měli univerzitní vzdělání a intelektuální zaměření, a líbilo se mi heslo, že "nejhloupější otázka je nepoložená otázka", takže akademická vědecká dráha by bývala byla logická. Nicméně druhá polovina let sedmdesátých a osmdesátá léta byla, jak známo, společensko-politicky dobou velice těžkou, a jako dospívajícího mladého muže hledajícího odpovědi na otázky o smyslu a správnosti věcí a postupné dozrávání mých názorů znamenalo, že to byla pro mě doba nesmírně složitá a deprimující. Po ukončení vysokoškolského studia jsem zvolil politicky nekonformní postoj a vědomě si zavřel dveře ke "kariéře"

⁹ www.muni.cz, 31. ledna 2014

v tehdejší komunistickém Československu, včetně možnosti PhD (tehdy CSc.). Nikdy jsem svého rozhodnutí nelitoval.

VÚČCH LACHEMA

Po vystudování dnešní Masarykovy university jsem pracoval 10 let, až do mého odchodu v r. 1992 jako výzkumný pracovník v Analytickém oddělení ve Výzkumném ústavu čistých chemikálií (VÚČCH), Lachema, n. p. (později Lachema, a. s.)¹⁰ a fotografie na Obrázku 1 je pohledem příchozího do areálu bývalé Lachemy z autobusové zastávky veřejné hromadné dopravy. Analytické oddělení VÚČCH Lachema se mi stalo “domovem” nejen pracovním, ale našel jsem zde i řadu přátel a kolegů, jichž si velmi cením. Na to, co jsem se od nich naučil na pracovní a životní inspirace, které jsem získal, a to nejen v chemii, dodnes s vděčností vzpomínám. Mé vzpomínky na výzkum, chemii a separace jsou tak i vzpomínkami na mé kolegy. V následujících odstavcích uvedena některá jména kolegyň a kolegů zdaleka nejsou jejich úplným výčtem a doufám, že mě omlouvá odstup více než 20 let.

Analytické oddělení VÚČCH mělo jako hlavní poslání vývoj analytických metod a analytickou podporu ostatním výzkumným oddělením: organických syntéz, farmacie včetně programu cytostatik, diagnostiky (tzv. “papírků”), chromatografických materiálů, světlocitlivých látek, a dalších. Z celkově velkého počtu výzkumných pracovníků uvádím hlavně ty, se kterými jsem během let měl pracovní kontakty: Ing. Jaroslav Aufart, Ing. Jiří Bartl, Ing. Jindřich Běluša, RNDr. Petr Beňovský, RNDr. Josef Chmelík, RNDr. Vratislav Chromý, RNDr. Jiří Fischer, Ing. František Kiss, RNDr. Petr Klán, Ing. Adolf Mistr, RNDr. František Pícha, RNDr. Pavel Slanina,

¹⁰ <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lachema> , 31. ledna 2014

RNDr. Martina Slaninová, RNDr. Milan Smrž, RNDr. Josef Švaříček, Ing. Dag Růžička, Ing. Ivana Závodná, Ing. Ivan Buriánek, RNDr. Libuše Zatloukalová, a RNDr. Bořek Žaludek.

ANALYTICKÉ ODDĚLENÍ VÚČCH

Oddělení vedené RNDr. Miroslavem Holíkem, CSc. bylo pracovně členěno na 4 oddělení dle analytických metod: Strukturní a elementární analýza (převážně organická analýza); Spektrometrické metody (AAS a tedy převážně anorganická analýza)



Obr. 1: Budova bývalého VÚČCH Lachema (vpravo) a bývalá administrativní budova (vlevo), uprostřed v přízemní části byl hlavní vchod do objektu Lachemy včetně VÚČCH, kde v přízemí a 1. poschodí po celé délce budovy byly umístěny laboratoře Analytického oddělení (dnešní adresa je Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika)

Fotografie: Dr. Miroslav Maleček.

Chromatografické metody (převážně organická analýza) a Fyzikálně - chemické analýzy, pokrývající relativně širokou paletu metod jak klasických, tak moderních instrumentálních. VÚČCH byl známý řadou vynikajících výzkumných pracovníků, včetně analytického oddělení VÚČCH. V době mého nástupu v r. 1982 mělo několik aktivně publikujících výzkumníků, jako Dr. Holík v oblasti NMR se specializací na enantioselektivní komplexy organických ligandů s kovy jako lanthanoidy (později - od r. 1993 docent na Katedře organické chemie, PŘF MU Brno), Dr. Zdeněk Slovák, CSc. a Dr. Bohuslav Dočekal, CSc., oba v oblasti AAS, a řadu velmi zkušených i mladších uznávaných odborníků jako Ing. Pospíchal, Ing. Borák, Dr. Seménková, Ing. Šalamoun, a v pozdějších letech dalších (abecedně): RNDr. Marie Cigánková, Ing. Martin Kubát, Ing. Milada Kralovianska, RNDr. Miroslav Maleček, Ing. Božena Matějková, RNDr. Miloš Nechvátal, RNDr. Michaela Turečková. Jako je tomu tak často v průmyslových laboratořích, ve VÚČCH pracoval velký počet technických pracovníků, tehdy z valné většiny žen – laborantek, a rád na mnohé vzpomínám.

Po nástupu do VÚČCH Lachema jsem jako každý nový absolvoval zhruba roční "kolečko", tedy praxe v několika laboratořích Analytického oddělení. Má úvodní praxe zahrnovala klasické základní analytické metody jako např. titrační stanovení vody dle Karla Fischera nebo sulfátový popel - dodnes velice užitečné zvláště k charakterizaci čistoty organických látek, ve VÚČCH Lachema hlavně léčiv a speciálních reagensů. Teprve později jsem si uvědomil, jak univerzálně cenné takové zkušenosti jsou. Několik měsíců praxe v NMR laboratoři, tehdy pod vedením Dr. Miroslava Holíka, bylo cenným seznámením s praxí organické syntézy z analytického pohledu, při spolupráci s mnoha kolegy z jiných oddělení VÚČCH Lachema, včetně vynikajících praktiků organické syntézy. U

Dr. Holíka jsem měl příležitost si dobře osvojit principy a praxi symetrie organických molekul (důležité nejen v NMR) a praktikovat dobré návyky nezbytné v každém kvalitním výzkumu, jako je studium literatury. To bylo možné přímo na pracovišti, v knihovně Lachemy, která měla mnohé kvalitní (dnes by se řeklo „vysokoimpaktní“) časopisy včetně Journal of Chromatography (Elsevier), Analytical Chemistry (ACS - American Chemical Society), a velice cenných Chemical Abstracts – tehdy studovaných v tištěných velice těžkých knihách a nikoli v elektronické databázi z PC od vlastního stolu jako dnes. Dr. Holík dobře věděl o mém zájmu o výzkum a zvláště věnovat se kapalinové chromatografii. S obdivuhodnou trpělivostí se mě snažil přesvědčit o vědecké hodnotě NMR s naprosto racionálním argumentem, že „píky v NMR se dají odvodit z prvotních principů, z teorie, zatímco píky v chromatografii ne!“. Věděl jsem samozřejmě, že má pravdu, ale články o aplikacích tehdy relativně mladé HPLC například v populárním aplikačním časopisu LC-GC (dnes vydávané CHROMATOGRAPHYONLINE¹¹), který nám každému docházel zadarmo ze “západu”, a průkopnické práce světové úrovně na Ústavu analytické chemie v Brně (Institute of Analytical Chemistry, IACH) tehdy Československé akademie věd (dnes Akademie věd České republiky, AVČR, v.v.i.¹²) zvláště v oblastech kapilárních separačních metod (LC, SFC, elektromigrační metody), včetně pár přednášek profesora Miloše Novotného z Indiana State University (dnes Indiana University¹³), původně z IACH, o tehdy mladé kapilární LC a začínající superkritické fluidní chromatografii, to vše na mě

¹¹ <http://www.chromatographyonline.com/>, 31. ledna 2014

¹² <http://www.iach.cz/>, 31. ledna 2014

¹³ <http://www.indiana.edu/>, <http://novotny.chem.indiana.edu/>, 31. ledna 2014

mělo fascinující vliv. Spíše podvědomě jsem cítil, že chromatografie a separační metody budou mít obrovskou budoucnost a věděl jsem, že HPLC je to, co chci momentálně dělat.

ODDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

Mé přání bylo vyslyšeno, a tak jsem v r. 1983 nastoupil na mé trvalé působiště na zbývajících skoro 10 let do oddělení chromatografických metod vedené Ing. Jindřichem Borákem. Konečně jsem mohl pracovat v oblasti analytické chemie, kterou jsem si dal za cíl se naučit, což bylo pro mě důležité a považoval jsem to za naprosto fantastické. Můj příchod znamenal příležitost naučit se praxi nejen (HP)LC ale i tenkovrstvé chromatografie (TLC) a „okouknout“ plynovou chromatografii (GC). GC počátkem 80. let procházela revolucí způsobenou zavedením polyimidem potažených křemenných kapilárních kolon¹⁴) a pro mě bylo cenné se o GC bavit s tak zkušeným a laskavým kolegou, jakým byl Ing. Ota Pospíchal z vedlejší laboratoře GC. Tam zaváděli kapilární GC a většinu metod na ni uzpůsobovali (což jak známo představuje v každé průmyslové laboratoři spoustu práce, protože je potřeba metody znovu validovat a nové podmínky napsat do mnoha dokumentů a norem včetně těch poskytovaných kontrolním orgánům jako např. SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv¹⁵). GC mě vždy fascinovala kromě obdivuhodné separační síly kapilární GC též velkou přesvědčovací schopností i pro laiky, například při tak životně důležité analýze jako je separace a stanovení metanolu a vyšších alkoholů v místní slivovici.

TLC

¹⁴ Dandeneau, R. D., Zerenner, E. H., HRC&CC, 2, 351-356, 1979

¹⁵ <http://www.sukl.cz/>, 31. ledna 2014

Počáteční doba v oddělení chromatografických metod pro mě představovala především zaučování do praxe TLC a HPLC. TLC se prováděla na tenkých vrstvách komerčních (na podkladu z Al folie výhodné tím, že se daly jednoduše řezat nebo stříhat, nebo na skleněných destičkách) i na skleněných deskách vlastní přípravy, převážně na silikagelu s přídavkem fluorescenčního indikátoru s excitací rtuťovou lampou při 254 nm na nepřímou fotometrickou detekci látek absorbujících v této oblasti UV záření, a tudíž v tmavé komoře s UV lampou vybavenou filtrem zviditelněné jako tmavší skvrny na světlejším fluoreskujícím pozadí. Později, když se objevily přístroje na TLC, podařilo se vybavení též zakoupit (CAMAG¹⁶). Nicméně, dodnes je jednou z hlavních předností TLC možnost ji provádět s minimálním přístrojovým vybavením pro rychlé metody poskytující kvalitativní a semikvantitativní informace. Je zajímavé pozorovat opakující se trendy k jednoduchým metodám s minimální instrumentací v jiných oblastech, například z moderních oblastí papírovou mikrofluidiku¹⁷.

HPLC

Je známo, že kluci i v dospělém věku mají rádi technické hračky („boys like their toys“), a tak mě nejvíc zajímala HPLC. HPLC byla původně zastoupena přístroji fy Knauer¹⁸, která patří k průkopníkům přístrojové LC od jejich začátků v sedmdesátých letech¹⁹. Vybavení se skládalo z vysokotlakých pump klasické dvoupístové konstrukce,

¹⁶ Jména firem jsem uvedl, kde se mi to zdálo vhodné či nutné, bez jakéhokoli s tím spojeného prospěchu nebo konfliktu zájmu.

¹⁷ Li, X., Ballerini, D.R., Shen, W., A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends, *Biomicrofluidics* 6(1), art. no. 011301, 2012

¹⁸ <http://www.knauer.net/>, 31. ledna 2014

¹⁹ http://de.wikipedia.org/wiki/Herbert_Knauer, 31. ledna 2014

většinou manuálních injektorů Rheodyne a detektorů UV (254 nm) a indexu lomu (RI), napojené na zapisovač (anglicky *strip chart recorder*) s rolí papíru a perem plněným červeným inkoustem (mladí kolegové se musí podívat jak zapisovače vypadaly v technickém muzeu ☺). Přístrojové HPLC vybavení ze 70. let bylo většinou mechanicky velice robustní a tento design se v principu držel po další desetiletí, i když samozřejmě se změnami v elektronice, nástupem počítačů, i dílčími technickými změnami v pumpách, detektorech, rozvojem autosamplerů atd. O mnoho let později jsem používal nejmenší komerčně dostupnou HPLC pumpu „Knauer Smartline 100“. Možnost navštívit firmu Knauer GmbH v (dřívějším západním) Berlíně a hovořit s vedením a výzkumnými pracovníky byla cennou zkušeností. Firma Knauer (zakladatelé a majitelé fy Knauer GmbH Dr. Herbertem a Roswitou Knauer, dcera Alexandra převzala řízení firmy v roce 2000) je zvláště zajímavá jako příklad malých a středních firem v soukromých rukách, na rozdíl od většiny větších přístrojových firem působících v oblasti analytické chemie. Na rozdíl od akciových společností tak firma a vedení nejsou pod tlakem akcionářů, což je ekonomický model, který je v Německu pokládán za důležitou součást jejich receptu na pokračující hospodářskou prosperitu, a je příkladem tzv. „malé až střední firmy“ - v Austrálii SME – Small and Medium Enterprises, uznávané jako klíčové pro zdravou ekonomiku. Zmiňuji se o tom proto, že s radostí a nadějí sleduji v ČR *ab initio* vývoj malých a skutečně privátních firem (tím nemyslím zprivatizované firmy se staronovým vedením), které mají svůj vlastní výzkum, a zvláště mě těší, že se v ČR rodí privátní výzkumné ústavy. Taková různorodost dle mého názoru má potenciál být velmi prospěšná pro růst kvality výzkumu v ČR včetně akademického výzkumu a je potřebná, pokud má ČR mít šanci se ekonomicky a společensky vrátit mezi nejúspěšnější evropské země.

CHARAKTERIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH MATERIÁLŮ

S HPLC Knauer souvisí má praxe v laboratoři specializované na výzkumné testování i výstupní kontrolu Lachemou vyráběných chromatografických materiálů, a zvláště tehdy velice známých polymerních chromatografických materiálů na bázi hydroxymethylmetakrylátu (hydroxyethylmethacrylate) pod komerčním názvem Spheron²⁰. Testování pro gelovou chromatografii (*size exclusion chromatography*) primárně hydrofilních polymerů ve vodných mobilních fázích se skládalo z naplnění nerezové opakovaně plnitelné kolony o vnitřním průměru 7,8 mm a různých délek od cca 20 cm a naměření křivky závislosti elučního objemu na molekulové hmotnosti standardu dextransu v rozsahu cca 10^3 až 10^6 u a grafické vyhodnocení vylučovací meze jako důležitého parametru každé nové várky Spheronu. To byla práce nejen zajímavá, ale i prospěšná pro osvojení si teorie i praktických aspektů gelové chromatografie. Plnění kolon při výstupní kontrole vyráběných Spheronů prováděly laborantky OTK (Oddělení technické kontroly - QC). Dodnes mi zní v paměti jako nějaká modernistická hudební díla krásný zvonivý zvuk masivních nerezových klíčů nutných k povolení a utážení robustních matek na hlavách kolon na obou koncích, když v nepravidelných intervalech padaly na linoleem pokrytou betonovou podlahu, přičemž každá velikost klíče vydávala jiný tón, za doprovodu veselého smíchu a švitoření.

HPLC - PLNĚNÍ KOLON

²⁰ Čoupek, J., Krivakov, M., Pokorný, S., *Journal of Polymer Science Part C - Polymer Symposium* 1973, 185-190.

Fascinovaly mě aspekty technického vybavení, jako např. vysokotlaká kapalinová pneumatická pumpa poháněná stlačeným vzduchem na plnění HPLC kolon až do tlaku přes 1000 bar, která při každém rázu pístu vydávala hlasitý zvuk podobný výstřelu, takže při návštěvě nic netušících kolegů z jiných laboratoří neočekávaný hlasitý ráz (při malých průtocích a tedy pomalé frekvenci pumpování, a tudíž jen občasném pohybu pístu) dovedla pěkně vylekat. Z dnešního pohledu je zajímavé, že se tento typ pneumatických pump v plničkách kolon používá dodnes, tedy po skoro ½ století od jejich zavedení a rozšíření v HPLC. Vysokotlaká kapalinová pneumatická pumpa byla užitečná i na plnění HPLC kolon jinými materiály. Lachema vyráběla kromě Spheronů i řadu na silikagelu založených stacionárních fází, které nás v naší laboratoři efektivně nic nestály, a proto plnění vlastních kolon bylo logické. To bylo potřebnou zkušeností, kterou asi každý praktik HPLC musí projít, a asi jako pro většinu ostatních moje zkušenost a závěr byly, že plnění kolon je pro většinu z nás víc magie než opakovatelná věda. Vzhledem k obtížnosti opakovatelného dobrého naplnění, časové náročnosti, a tehdy relativní cenové dostupnosti komerčních kolon z TESSEK Praha, bylo vlastní plnění většinou vyhrazeno materiálům nedostupným v komerčních kolonách.

HPLC - PRAXE METODY

Tehdy jediné používané vysokotlaké tlustostěnné kapiláry a fitinky byly skoro výhradně z tvrdé nerezové oceli, a při typickém vnějším průměru 1/16" o.d.²¹ (cca 1,5 mm) velice tvrdé a nepohodlné na zacházení - vyžadující sílu a vytrvalost při řezání, zabrušování apod. Zacházení s nimi bylo podstatně obtížnější než s pozdějšími tenkostěnnými nerezovými kapilárami a potom polymerními

²¹ O.d. = vnější průměr, i.d. = vnitřní průměr

kapilárami z PEEK. Ve srovnání s manipulací s dnes běžnými PEEK kapilárami, bylo řezání a zabrušování konců kapilár, aplikace a odstraňování nerezových ferulí a podobné úpravy výzvami, které vyžadovaly nářadí včetně dobré sady malých pilníků, sílu a trpělivost. Ke každodenním výzvám patřilo připojování kolon tak, aby nebyl mimokolonový objem na vstupu kolony z důvodu rozdílů mezi různými používanými kolonami při kovových ferulích pevně zafixovaných na přírodní nerezové kapiláře. Proto jsem využíval vždy, kdy to bylo možné s ohledem na tlak na vstupu kolony, tehdy relativně nové plastové ferule. Ty nabízely tu výhodu, že se daly vždy posunout po nerezové kapiláře 1/16" o.d. tak, aby dosedly do vstupu kolony bez mrtvého objemu. Pro mladé kolegy dnes zvyklé na dostupnost široké škály součástek a hlavně možnost jejich okamžitého zakoupení a dodání dlužno dodat, že v dobách před rokem 1990 jsme museli vše „ze západu“ objednávat rok dopředu, a co jsme neměli v zásobách, to nebylo. Proto jsem si často připravoval improvizovaně plastové ferule z PTFE či jiných plastových hadiček nebo skalpelem vhodně uříznutých kousků plastových špiček k pipetám, tak že jsem onen kousek plastu navléknutý na konec nerezové kapiláry silně utáhnul do sedla nerezové kolony (nebo nerezové spojky kapilár) tak, že se tlakem trvale deformovaly do tvaru ferule. Tyto zdánlivé drobnosti uvádím z několika důvodů: (1) Ilustrují praxi techniky v dobách, kdy HPLC byla mladá a za podmínek tehdejšího Československa, a dokumentují ji pro mladší generace; (2) Tyto zkušenosti se mi později a do dneška mnohokrát velice hodily, a domnívám se, že překonávání technických problémů představuje skvělou příležitost tréninku technických dovedností a tvořivého myšlení, což možná příliš často říkám mladším kolegům (s různým úspěchem); a též (3)

to přispívá k vysvětlení skutečnosti, že většina českých a slovenských vědců byla v zahraničí úspěšná.

HPLC LÉČIV

V 80. letech se objevovalo více firem vyrábějících HPLC přístroje a s rozrůstajícím se programem výzkumu a výroby léčiv bylo zakoupeno tehdy nejmodernější vybavení od firmy Spectra-Physics, skládající se ze dvou gradientových HPLC systémů s dvoupístovým, ale asymetrickým designem a moderním elektronickým tlumením pulsů, jeden systém byl vybaven autosamplerem a fluorimetrickým detektorem. Ten byl velmi užitečný zvláště pro citlivé detekce nízkých koncentrací a kolega Ing. Jarda Šalamoun, který měl HPLC Spectra Physics na starost, vyvíjel a zaváděl metody na postkolonové derivatizace různých metabolitů léčiv na fluoreskující produkty pro použití na analýzy pro farmakokinetické studie pro cytostatika jako methotrexat a tamoxifen^{22,23}. Jarda Šalamoun mě inspiroval příkladem, že v průmyslovém výzkumu publikovat lze. Později po jeho odchodu a příchodu mého kamaráda ze studií Dr. Mirka Malečka, jsme pokračovali ve vývoji levných takzvaných (a doslova) pletených či háčkovaných postkolonových kapilárních fotoreaktorů, kde se uháčkovaná kapilára se spoustou záhybů působících proti rozmývání píků laminárním parabolickým tokem omotala či navlékla na UV-lampu, před napojením na fluorimetrický

²² Salamoun, J., Smrz, M., Kiss, F., Salamounova, A., Column liquid chromatography of methotrexate and its metabolites using a post-column photochemical reactor and fluorescence detection, *J. Chromatogr. - Biomedical Applications*, 419, 213-223, **1987**

²³ Šalamoun J., Macka M., Nechvátal M., Matoušek M., Knesel L., Identification of products formed during UV irradiation of tamoxifen and their use for fluorescence detection in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 514(2), 179-197, **1990**

detektor. PTFE kapiláry byly už po desetiletí dobře dostupné (pro HPLC v o.d. 1/16" a od 100 µm i.d.²⁴) ale několikametrové délky potřebné pro vývoj postkolonových reaktorů nebyly vždy snadno k dispozici. A tak jsme s kolegou Mirkem Malečkem využili inženýrům dobře známé vlastnosti mnoha polymerů, že se při natažení trubičky do délky její stěny a průměr přiměřeně zúží (toho se též využívá při výrobě křemenných kapilár pro GC a CE, ale při teplotách kolem 2000 °C^{25, 26}). Za dobrého počasí jsme před VÚČCH (s potřebou prostoru na tento „experiment“ jsme se nevešli nikam uvnitř VÚČCH) vytahovali z levné trubičky FEP (Fluorinated Ethylenepropylene Copolymer²⁷) ve výsledku přes 10 metrů kapiláry, která pak byla uháčkovaná kolegyněmi vybavenými háčkovacími schopnostmi na fotoreaktor. S ním se pak úspěšně naměřila farmakokinetická data ze sérií vzorků plasmy. To bylo mé setkání s analytickou fotochemií, ke které jsem se dostal znovu a v jiné podobě o mnoho let později od roku 2006 při pracích o fotopolymeracích monolitických stacionárních fází s použitím elektroluminiscenčních diod (*light emitting diodes*, LEDs) v UV²⁸ a hlavně viditelné^{29,30,31,32} oblasti spektra.

²⁴ O.d. = vnější průměr, i.d. = vnitřní průměr

²⁵ http://en.wikipedia.org/wiki/Fused_silica , 31. ledna 2014

²⁶ www.polymicro.com , 31. ledna 2014

²⁷ Evenhuis C.J., Johns C., Yang W.C., Guijt R.M., Macka M., Marriott P.J., Haddad P.R. Fluorinated Ethylenepropylene Copolymer as a Potential Material in CE' *Electrophoresis*, 28(19), 3477-3484, **2007**

²⁸ Abele S., Nie F.-Q, Foret F., Paull B., Macka M., UV-LED photopolymerised monoliths, *Analyst*, 133, 864 - 866, **2008**

²⁹ Walsh Z., Abele S., Lawless B., Heger D., Klán P., Breadmore M.C., Paull B., Macka M. Photo-initiated Polymerisation of Monolithic Stationary Phases Using Visible Region LEDs, *Chem. Commun.*, (48), 6504 – 6506, **2008**

Dalším příkladem úspěšně publikovaných stanovení v plasmě na farmakokinetické studie byla metoda na stanovení acykloviru v plasmě s přímým nástřikem deproteinované plasmy do originální směsné micelární mobilní fáze na bázi SDS a HTMBr se separací na silikagelové koloně a fluorimetrickou detekcí³³. HTMBr měl tu roli, že díky němu vůbec docházelo k retenci protonovaného kationtového acykloviru na silikagelové stacionární fázi, zatímco SDS je známý svou dobrou rozpouštěcí schopností bílkovin, a díky tomuto originálnímu složení mobilní fáze se směsí kationtového a aniontového tenzidu bylo možno provádět přímý nástřik deproteinované plasmy na kolony, s analýzou desítek vzorků za den, s minimální přípravou vzorku, což je v průmyslu velice cenné.

Po několika letech ve VÚČCCH jsem byl zřejmě považován za analytika s překonaným embryonálním stadiem, a tak mi k mému nadšení byl dán na starost přístroj HP 1090. Ten byl koupený díky programu léčiv a zvláště cytostatik, která byla nosným programem

³⁰ Walsh Z., Levkin P. A., Paull B., Svec F., Macka M., Visible light initiated polymerisation of styrenic monolithic stationary phases using 470 nm light emitting diodes, *J.Sep.Sci.*, 33(1), 61-66, **2010**.

³¹ Walsh Z., Levkin P. A., Abele S., Scarmagnani S., Heger D., Klán P., Diamond D., Paull B., Svec F., Macka M., Polymerisation and Surface Modification of Methacrylate Monoliths in Polyimide Channels and Polyimide Coated Capillaries using 660 nm Light Emitting Diodes, *J. Chromatogr.A*, 1218, 2954–2962, **2011**.

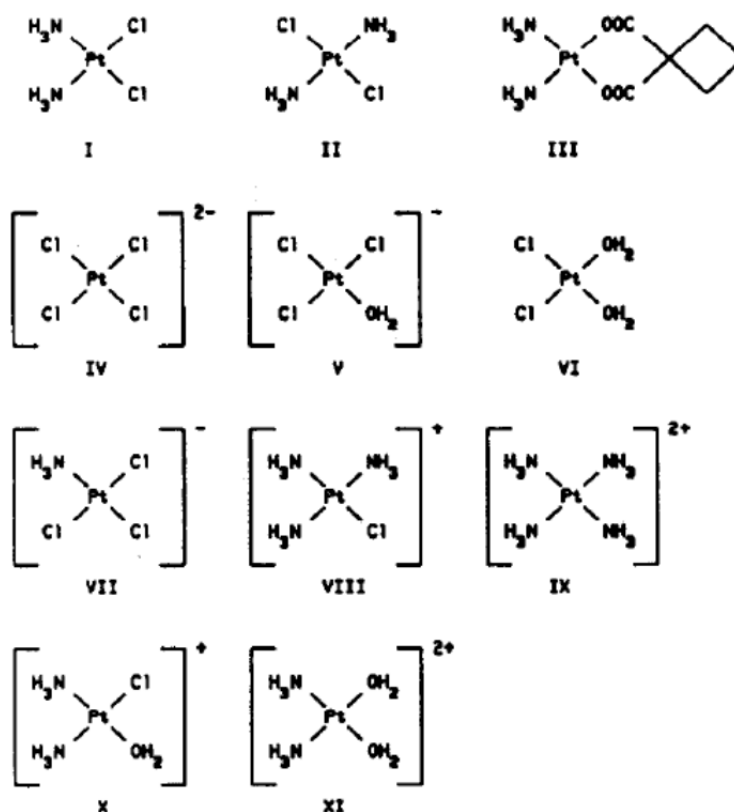
³² Knob R., Breadmore M. C., Guijt R. M., Petr J., Macka M., Porous layer open tubular monolith capillary column: switching-off the reaction kinetics as the governing factor in their preparation by using an immiscible liquid-controlled polymerization, *RSC Advances*, in print, **2013**.

³³ Macka M., Seménková L., Borák J., Mikes V., Popl M., Determination of acyclovir in serum and plasma by micellar liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, 16(11), 2359-2386, **1993**.

Lachemy a export do řady „devizových“ zemí (včetně BRD - Spolkové republiky Německo a USA) byl v letech před r. 1990 režimem velice vítaný. Firma Hewlet-Packard patřila tradičně k hlavním firmám v analytické instrumentaci, a později byla divize analytických přístrojů z HP vyčleněna a osamostatněna jako Agilent AG, s vývojem LC a kapilární elektroforézy (CE) v německém Waldbronn. HP 1090 byl naprosto mimořádný přístroj svou kompaktní konstrukcí, ale hlavně unikátním designem s oddělenými nízko- a vysokotlakými pumpami, a vybavený spektrálním detektorem s diodovým polem. Byla radost jej používat a rád vzpomínám na eluční časy opakovatelné na setinu minuty z jednoho na druhý den. Zdaleka nejen proto považuji HP1090 za jeden z nejlepších LC přístrojů v historii HPLC vůbec. Ing. Václav Ineman, zodpovědný za servis přístrojů fy Hewlet-Packard–Agilent, s dokonalou znalostí přístroje a přátelským přístupem, byl vždy schopen pomoci. Dr. Hans-Peter Schiefer jako zástupce firmy zodpovědný za oblast, jíž se říkalo „Eastern Europe“, byl natolik úspěšný, že se stal u své firmy členem „President’s Club“ pro zvláště zasloužilé zaměstnance. Měl jsem radost, když jsem po letech přerušených kontaktů mým přesunem do zahraničí, znovu začal potkávat jak Václava tak Hanse-Petra na konferencích v ČR a v Evropě jako třeba INDC (dříve Vitamins)³⁴ nebo známá série International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) každý sudý rok v Riva del Garda³⁵.

³⁴ <http://www.indc.cz/> , 31. ledna 2014

³⁵ <http://192.167.106.132/slider.html> , 31. ledna 2014



Obr. 2: Vzorce nejdůležitějších Pt^{II} komplexů dělených HPLC: I = cis-diamindichloroplatina (cisplatin), II = trans-diamindichloroplatina (transplatin), III = cis-diamin-1,1-cyklobutandikarboxylátplatina (karboplatina, Pt-CBDCA), IV = tetrachloroplatina, V = aquatrichloroplatina, VI = cis-diaquodichloroplatina, VII = aminotrichloroplatina, VIII = triaminchloroplatina, IX = tetraaminplatina, X = cis-diaminaquachloroplatina, XI = cis-diamindiaqua-platina.
(převzato z Macka M., Borák J., Kiss F., *J. Chromatogr.*, 586(2), 291-295, 1991).

HPLC PLATINOVÝCH KOMPLEXŮ

Platinové komplexy již po desetiletí patří mezi zavedená cytostatika. Chemie platinových komplexů je složitá mnoha faktory včetně oxidačního stupně Pt - Pt^{II} a Pt^{IV}, různé termodynamické stability, kinetické inertnosti, atd. Kromě hlavních látek – většinou cisplatina (Pt^{II}Cl₂(NH₂)₂) a karboplatina (Pt^{II}(C₂H₆O₄)(NH₂)₂) – byly komplexy, které bylo třeba separovat a stanovit aniontové, neutrální i kationtové, vše v jednom roztoku – viz tabulka nejdůležitějších komplexů ke stanovení v Obr. 2^{36 37}. Novost v těchto pracech spočívala v tom, že když se obyčejná C18 kolona dynamicky zmodifikovala směsí současně kationtového a aniontového surfaktantu či amfifilní látky, kolona získala vlastnosti směsného iontoměniče a jako prakticky velice důležité bylo, že se daly rozdělit aniontové, neutrální i kationtové Pt^{II} komplexy v jedné analýze. Další článek se zabýval stabilitou a rozkladem cisplatiny UV světlem a ultrazvukem, tedy za podmínek, kterým mohou tato léčiva být vystavena³⁸. Metoda se používala i na rutinní analýzy a velice mě potěšilo, když jsem později slyšel od kolegů, že metoda na analýzu platinových cytostatik, založená na mém výzkumu, byla v OTK (QC) stále v používání léta poté, co jsem odešel.

³⁶ Macka M., Borák J., Kiss F., Separation of some platinum(II) complexes using ionic strength gradient on solvent generated ion-exchange sorbent, *J. Chromatogr.*, 586(2), 291-295, **1991**

³⁷ Macka M., Borák J., Chromatographic behaviour of some platinum(II) complexes on octadecylsilica dynamically modified with a mixture of a cationic and an anionic amphiphilic modifier, *J. Chromatogr.*, 641(1), 101-113, **1993**.

³⁸ Macka M., Borák J., Seménková L., Kiss F., Decomposition of cisplatin in aqueous solutions containing chlorides by ultrasonic energy and light, *J. Pharm.Sci.*, 83(6), 815-818, **1994**

JAK PUBLIKOVAT V PRŮMYSLOVÉM VÝZKUMU?

To v průmyslu, kde se často publikovat nedá a mnoho výzkumníků ani nemá zájem, protože to většinou není finančně oceněno, je obecně těžké. Výzkumná činnost v Lachemě, i když pro mě úžasně zajímavá a po této stránce uspokojující, by se z mého dnešního pohledu akademika dala nazvat hlavně v první polovině mého působení v Lachemě seznamem promarněných příležitostí publikovat. Proto při mé práci s mladými kolegy se snažím jim pomoci si co nejdříve osvojit schopnosti, které mi tehdy chyběly. Jako je tomu u každé činnosti, publikovat je skoro snadné, ale až se to člověk naučí. Toto uvádím pro mladé začínající kolegy v průmyslovém výzkumu, kterým radím usnadnit si cestu spoluprací s těmi akademickými kolegy, kteří nezahynuli („published and did not perish“ ☺), a tudíž nutně musí být v publikování zblhlí.

Příkladem mnoha vyvinutých metod nepublikovaných v časopisech byly mnohé metody pro farmakokinetické studie, které zde ilustruji stanovením diltiazemu v plasmě pro farmakokinetiku. Bylo založené na extrakci a zakoncentrování cca 1:10 v CCl_4 (dnes se v Austrálii nesmí používat jako karcinogen), přímým nástřikem extraktu a analýze na silikagelové koloně v organické mobilní fázi na zajímavém mechanismu nevodné iontové výměny, s retencí dobře ovládanou iontovou silou octanu amonného, dobře rozpustného i v metanolu. Dalším příkladem velice zajímavé inovativní práce byly separace daunomycinu navázaného přes spojku rozpadající se v rakovinných buňkách na hydrofilní biokompatibilní polymer, který jinak jedovatý daunomycin činil až do vstupu do rakovinné buňky pro organismus neškodným. Separace vylučovací chromatografií (SEC) na hydrofilně modifikované silikagelové koloně s detekcí současně spektrofotometrickou (v nízké UV tedy vše - polymer i daunomycin)

a dále fluorimetrickou (pouze daunomycin, volný i navázaný) dovolovala dělat závěry prakticky významné pro syntézu i vývoj tak zajímavého léčiva. Výsledky z těchto metod jsem publikoval v posterech na různých většinou místních konferencích, ale i na konferenci v Lipsku v září 1989, která se mi vryla do paměti z historických důvodů - bylo to pouhé týdny před začátkem tamějších masových demonstrací vedoucích k převratným změnám.

PRACOVNÍ DOBA VE VÚČCH LACHEMA

Má práce byla pro mě vždy velice zajímavá, a i tehdy mě většina z úkolů zaujala tak, že jsem často zůstával po pracovní době, která byla na tehdejší totalitní poměry velice pokročile liberální, a dnes by se asi často nazývala „flexi“ - tedy s příchodem a odchodem v určitém daném rozmezí - myslím mezi 6:00-9:00 příchod a odchod 14:00-18:00, s časy před 6:00 a po 18:00 vyžadujícím podpis vedoucího, a celkovým počtem odpracovaných hodin za měsíc rovným 8,5 h denně. Já jsem s mým zděděným nízkým krevním tlakem nikdy nebyl ranním ptáčetem a vždy začínal ráno, jak nejpozději to šlo, a končil odchodem často kolem 18:00, nebo jak pozdě to bylo možné. V dobách, kdy i ve výzkumu se většina zaměstnanců snažila přijít co nejdříve (na 6 ráno) a odejít taky jak nejdříve to šlo, podobně jako zaměstnanci ranní směny ve výrobě, mi můj pracovní rytmus dával možnost věnovat se v klidu pozdního odpoledne případně večera tomu, co mě zajímalo. Od kolegů jsem mnohdy slyšel komentáře typu „pane kolego, za to, když tady zůstáváte déle než je potřeba, vám plat nezvednou ani nepoděkují“, a tak takové z dnešního pohledu malichernosti, jako poněkud výstřední docházka dobře viditelná před okny celého VÚČCH, byla pro mě též formou protestu proti konformismu a totalitní idiocii, a dodávaly mi energii přežít.

Jazyková výuka. Mých 10 let ve VÚČCH Lachema jsem využil pro přestování jazyků, neb jsme měli od Lachemy placené kursy angličtiny a němčiny, později i italštiny, přímo na pracovišti. Jazyky mě nejen vždy bavily, ale zvláště němčina se pro mě stala oknem do sousedního Rakouska, a tím svobodného světa. Brno je od Vídně vzdáleno pouhých cca 200 km a rakouskou televizi a rádio komunistický režim nemohl rušit, protože by se rušení nedalo omezit jen na území tehdejšího Československa a tak stanice ORF a zvláště Ö3 (Österreich 3, rock a pop) a Ö1 (Österreich 1, klasická hudba) a rakouské televizní kanály FS1 a FS2 se mi staly společníky mých večerů a víkendů na zbývající dobu totality (o které jsme tehdy nikdo netušili, že vůbec někdy skončí³⁹). Tak jsem si na stanice ORF a zvláště televizní moderátory zvykl (československé stanice jsem většinou nesledoval), že když jsem v roce 2001 na Vídeňském letišti náhodou vzal do ruky deník Der Standard a zjistil jsem, že můj nejoblíbenější televizní moderátor Robert Hochner⁴⁰ zemřel nečekaně a mlád, cítil jsem, jakoby zemřela celá má mladá léta strávená s programy ORF, které mi byly neodmyslitelně cenným zdrojem informací ze světa za železnou oponou, ale hlavně duševní a intelektuální oporou. Kursy v Lachemě byly mnohdy dobrým impulsem a s němčinou jsem pokračoval ve známé brněnské Jazykové škole v kursu přípravy na „státnici“ – Státní zkoušku, kterou jsem dělal, jelikož to byla zajímavá výzva v jinak nudné a depresivní době. Mnohé kursy, jako tento vedený rodilou mluvčí Dr. Schmit, měly výbornou úroveň, a k zajímavostem patřilo, že kurs též navštěvoval Dr. Milan Uhde, známý brněnský disident a po r. 1989

³⁹ http://de.wikipedia.org/wiki/Samtene_Revolution, 31. ledna 2014

⁴⁰ "Robert Hochner hat den Nachrichtenjournalismus in Österreich jahrzehntelang nachhaltig geprägt. Er galt als fachlich versierter, fairer und strikt unparteiischer Redakteur."
http://de.wikipedia.org/wiki/Robert_Hochner, 31. ledna 2014

ministr kultury. Tehdy jsem vůbec nemohl tušit, jak mi budou jazyky, zvláště angličtina a němčina, po r. 1989 užitečné. S úsměvem vzpomínám na dotazy některých kolegů typu „proč se ty jazyky vůbec učíš, když ti nikdy k ničemu nebudou?“. Má švýcarsko-australská manželka (doma mluvíme německy) se při této vzpomínce usmívala a já s ní. Potenciálně užitečný závěr pro mladší kolegy: ne vždy je racionální logika dobrým vodítkem našich rozhodnutí, neb při jejím přísném uplatnění bych se asi jazyky tehdy moc nezabýval „když mi nikdy k ničemu nebudou“ a je zajímavé si všimnout, že moderní psychologie zdůrazňuje opomíjenou a podceňovanou roli instinktu při lidském rozhodování – dělat to, čemu člověk podvědomě věří, a co cítí jako správné.

ČSCH

Přednášky a exkurse. Vzhledem k mým vědeckým sklonům mi byla dána na starost organizace přednášek organizovaných pobočkou Lachema České Společnosti chemické. To jsem zvládal se střídavými úspěchy, ale velice mě to začalo bavit a tuto roli jsem pak na různých pracovištích vykonával několikrát. K velice přitažlivým aktivitám patřily poměrně levné zájezdy s exkursemi někam, co pokud možno mělo nějakou souvislost s chemií, jako např. před rokem 1990 na Inchebu do Bratislavy. Samozřejmě do roku 1989 byly zahraniční zájezdy do sousedních zemí s bezvízovým stykem omezeny už jen na bývalé východní Německo a Maďarsko (pro čtenáře bez znalosti poměrů: do Polska byla třeba víza od 80. let od období hnutí Solidarita). Geograficky blízké Maďarsko tak bylo naším nejčastějším cílem. Při jednom zájezdu do Maďarska koncem 80. let jsem na vlastní kůži zažil, co jsme všichni věděli, že se na hranicích dělá: osobní prohlídka, kdy zvláště u mladých svobodných absolventů vysokých škol hledali diplomy. Vybrali si mě taky a celník

mi povídá: „Pán doktor, povedzte nám, kde máte ukrytý ten diplom, my ho stejne nájdem. Máte ho ukrytý v tých nohaviciach (pozn. pro mladé: v kalhotách) alebo kde?“ Též protože jsme věděli, že diplomy hledají, samozřejmě jsem ho u sebe neměl, a tak jsem viditelně kurážně odpověděl: „Pane celníku, já jsem vaší otázce dobře rozuměl a já jsem vám na ni jasně odpověděl.“ Školený v praktické psychologii, nedalo mu to moc práce odhadnout, že skutečně nic neskrývám a povídá „Tak běžte!“ Pár jiných mladých kolegů na celnici zůstalo déle, ale taky u nich nic nenašli, tak jsme všichni po delším zdržení směli pokračovat do Maďarska. Tyto zkušenosti zmiňuji pro ty natolik mladší kolegy, kteří si tyto doby sami nepamatují.

Samozřejmě, obrovskou změnou též pro zahraniční zájezdy byl konec listopadu 1989. Od začátku prosince jsme mohli bez víz a bez problémů jezdit do sousedního Rakouska, Německa i jinam, a byl to pocit pohádkově opojný i přes naši měnovou chudobu – káva ve Vídni stála zhruba tolik jako celý oběd v Brně. V autobusech jsme cestovali zvláště na jednodenní výlety, protože přenocování pro nás tehdy nebylo k zaplacení. Vídeň byla z Brna 2 hodiny cesty, a tak výlety zvláště do Dolních Rakous byly na programu často. Na státní svátek Rakouské republiky 26. října jsou skoro všechna muzea a výstavy přístupny zadarmo a toho jsme velice využívali, přičemž tehdy měli ještě občané Československa u našich západních sousedů velké sympatie. Ze vzdálenějších výletů vzpomínám výlety do Bavorska, severní Itálie a Švýcarska, s exkurzí ve firmě Lonza AG, která, jak jsem tehdy ještě netušil, mi bude pracovištěm v roce 1993.

PRACOVNĚ-SPOLEČENSKÝ ŽIVOT: OSLAVY, OSLAVY...

Oslavy, zvláště narozenin, ale v podstatě čehokoli co stálo za to oslavit, se dály přímo na pracovišti „s přivřením obou očí“ vedení, dle obecně platného pravidla, že spokojený personál je dobrý a pracovitý personál. V některé z velkých laboratoří se uklidilo, odstranily se chemikálie, stoly se pokryly velkými archy papíru, na kterých pak byly talíř vedle talíře chlebičků a zákusků: chlebičky a zákusky jsou českými specialitami, a mnozí kolegové a zvláště kolegyně předváděly skvosty domácí studené české kuchyně, jako široké spektrum tradičních chlebičků a jednohubek, salátů, a zákusků, a na zvlášť velkých oslavách např. při kulatých narozeninách i teplá jídla - vzpomínám např. na skvostná díla jako dršťky nakládané v červeném víně po provensálsku Dr. Jiřího Fischera a proslulý boršč Světlany Slovákové nabízený s kouzelným a nefalšovaným ruským přízvukem. Sada kádinek byla rezervována pouze na nápoje a mnozí kolegové měli kontakty k některému vinaři na jižní Moravě, takže se pilo víno přímo „ze sklepa“. Kuřáci kouřili u digestoří tak, že kouř šel do digestoře – je štěstí, že tenkrát se nemonitorovalo, co z komínů odchází. Z dnešního hlediska je možné se nad tím podívat (bezpečnost práce tehdy neměla tu roli, co má dnes) nebo pousmát, ale společensky oslavy patřily k tomu, co na rozdíl od vynucených oslav např. 1. máje patřilo k událostem, kde jsme se dobře bavili, a myslím, že nebudu jediný, kdo na ně rád vzpomíná. Je to jedním z paradoxů dnešní doby s tak obrovskými možnostmi svobody, materiálními a informačními, že v nezbytné honbě za vyšší produktivitou mnohdy nezbyvá čas nebo energie si popovídat s kolegy na pracovišti a říct víc než ono obligátní „ahoj, jak se daří“ bez očekávání smysluplné odpovědi.

Mých 10 let ve VÚČCH Lachema jsem strávil ve velmi dobré společnosti. Mnohokrát jsem si uvědomil, jaké jsem měl štěstí, když jsem měl možnost čerpat zkušenosti v chemii i mimo a učit se analytiku a chemii od takových kolegů jako ve VÚČCH Lachema a v analytickém oddělení. Některým kolegům jsme pro neuvěřitelnou šíři znalostí přezdívali „chodící databáze“ jako např. Dr. Milan Smrž a Dr. Jiří Fischer. Mnoho kolegů po roce 1989 využilo nově otevřených možností profesní kariéry a po opuštění Lachemy dosáhli mnohdy úctyhodných úspěchů, jako např. RNDr. Josef Chmelík, CSc., který byl uznávaným vědcem v oblasti proteomiky na IACH ČAV a působil též jako ředitel IACH ČAV v letech 2001 – 2005, nebo Petr Klán, který po vystudování PhD v USA vybudoval uznávanou mezinárodní výzkumnou skupinu na Katedře chemie na MU a působil též jako proděkan pro výzkum. Dr. Miroslav Holík, CSc. a Dr. Vratislav Chromý, CSc. též působili jako akademici na MU. Od roku 1990 se rodila privátní sféra v chemii a bylo radostí spolupracovat s mnohými kolegy na příklad v Synthonu, z velké části bývalých zaměstnanců Lachemy, jako František Pícha, Pavel a Martina Slaninovi, Karel Pospíšilík a později i Petr Beňovský, Petr Krajčovič a mnozí další.

UIACH AVČR

Během let 1990-1991 jsme všichni čekali, co převratně pozitivního se bude dít v Lachemě a ti naivní z nás jsme si dělali naděje. Časem jsem došel k názoru, že lepší než čekání na Godota, je vlastní aktivita. Jednoho dne jsem zašel za profesorem Petrem Bočkem na IACH na Veveří ulici v Brně a zeptal se ho, jestli bych se u něho mohl naučit kapilární elektroforézu (CE). V září 1992 jsem pak přešel na IACH do oddělení Elektromigračních metod jako přímý podřízený a

spolupracovník Petra Bočka. Tak se mi splnil můj sen se prakticky naučit „kapiláru“, tedy CE, a ještě k tomu od jejího zakladatele v ČR. To jsem netušil, že tam pobudu pouhé asi 3 měsíce (a kdybych to býval tušil, tak by mi svědomí nedovolilo tam jít na tak krátkou dobu!). Práce mě velice bavila a prováděje CE experimenty mi ty záležitosti, jak to je s elektroosmotickým tokem, mobilitami atd. najednou už nepřipadaly tak nepochopitelné, jako když jsem si o tom předtím pouze četl v literatuře. Pracoval jsem s typickou CE vyrobenou v dílnách IACH z plexiskla a s připojeným komerčním spektrálním detektorem Spectra-Physics včetně tehdy ještě ne zcela všudypřítomného PC s Windows a spektrální detektor se hodil na detekci barviv dělených micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC). Přístroj jako mnohé tehdy na IACH neměl kryt s automatickým vypínáním vysokého napětí (HV), a přesto se mi povedlo, jak tomu kolegové říkali „zůstat panícem“ čili nebýt kopnut HV (při dobře nastaveném limitu proudu na HV zdroji to není životu nebezpečné, ale člověk si to prý pamatuje). Petr se denně zastavil a jednou mi udělal veliký kompliment, když mi řekl, že při čekání od nástřiku do konce analýzy mě vidí, že si nečtu noviny pro zkrácení dlouhé chvíle, a poznamenal „víš, to je rozdíl, když člověk o práci přemýšlí, a z těch, co jsem u experimentů viděl číst noviny, to většina nikam nedotáhla“. Práce se dařila a věřil jsem, že se mi do konce roku podaří „naměřit data na publikaci“. Jednoho dne jsem přišel domů a našel jsem dopis od švýcarské firmy Lonza AG. Tam jsme byli předtím sice na exkursi s ČSCH, ale stejně jsem nechápal, proč mi píší. Po prvním přečtení jsem se musel posadit a pořádně nadechnout, protože tam byla nabídka na roční stáž ve firmě Lonza AG do Analytického oddělení výzkumu ve firemní centrále (HQ) v městečku Visp (na vzdělávací víza, pracovní víza pro občany ČR byla tehdy naprosto nemyslitelná). Druhý den jsem zašel za Petrem

Bočkem a dopis mu ukázal a s ostychem se ptal, co mám dělat, že přece nemůžu po tak krátké době a bez dokončení publikace zmizet! Vzpomínám, jak mi Petr řekl „Mirku, máš šanci, musíš jí využít.“ Byl jsem mu za to velice vděčný a navždy to bylo pro mě inspirací, jak se chová osobnost patřičného formátu.

LONZA AG VISP ŠVÝCARSKO

Nabídka praxe byla na 1 rok, ale udělení víz občanům postkomunistického Československa respektive České republiky tehdy trvalo dlouho, a tak jsem odjel teprve začátkem února. Tím na projekty, které mě čekaly a systematické zkoumání CH (Confoederatio Helvetica - latinsky Švýcarská konfederace) o víkendech jsem měl efektivně 10 měsíců. V Lonze AG se mluvilo, jak „Walliser Ditsch“ (místní nářečí a nejtěžší ze všech dialektů „Schwizer Dötsch“, kterému nerozumí dobře ani většina Švýcarů z jiných kantonů na sever od Alp), tak spisovnou němčinou Hochdeutsch i anglicky. Tak se mi samozřejmě angličtina a zvláště němčina skvěle hodily a ročního pobytu jsem využil k růstu svých aktivních jazykových schopností při denní komunikaci v práci i mimo ni. Po diskusi s mým šéfem Dr. Michaellem Bokelem o tom, co jsem dříve dělal a co mě zajímá, jsem dostal 3 úkoly: (1) Prozkoumat, jestli k něčemu může být užitečná kapilární superkritická fluidní chromatografie (Carlo Erba) zakoupená v tehdejší obecné SFC euforii; (2) Zavést preparativní LC na obrácených fázích (RP) a na základě existujících analytických HPLC metod provést jejich převedení do preparativního měřítka (*up-scaling*) za účelem izolace minoritních píků neznámých nečistot na analýzu MS a NMR; a (3) Prozkoumat potenciál nově zakoupeného prvního přístroje Agilent 3D CE ve firmě pro analýzu řady chemikálií z výroby derivátů

kyseliny nikotinové, tehdy nosného programu firmy Lonza, která vyráběla většinu světové produkce. Tehdy jsem už měl jasno, že si chci někde udělat PhD, a vědec musí publikovat, nechce-li zahynout - známé „publish or perish“⁴¹, jako výsledek mého zkoumání v projektu (1) jsem publikoval práci o separaci polyglycerolů⁴² vyráběných Lonzou, což sice kapilární SFC nezachránilo od vyřazení, ale mě umožnilo být Lonzou vyslán na pro mě první konferenci série „*International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations (HPLC)*“ tedy HPLC-1993 do Hamburgu⁴³. Problém ve firemním výzkumu je často skutečnost, že není možno publikovat většinu výsledků, a často to nejzajímavější. To byl i můj případ v obou zbývajících projektech (2) a (3), nicméně oba byly velice úspěšné. V projektu (2) jsem preparativní HPLC před mým odchodem v prosinci 1993 předal velice schopnému zkušenému laborantovi Philipovi Gundi, a při mé návštěvě Lonzy po bezmála 20 letech v roce 2012 mi Michael a Philip k mé veliké radosti ukázali, jak se mnou zavedená obecná metoda stále používá, samozřejmě s množstvím nových kolon. Během roku 1993 v Lonze jsem jasně cítil, že pobyt v cizině je co mi doposud celý život chybělo, a cítil jsem velkou touhu víc cestovat, poznat svět a vyrazit mimo starý kontinent. Než skončil můj pobyt v Lonze, měl jsem nabídku od University of Tasmania na PhD se vzácným stipendiem na pokrytí životních nákladů (UTAS jich udělovala ročně 6). Lonzu jsem opouštěl s mým nově nabytým obdivem ke Švýcarsku, a to zdaleka nejen na základě ekonomickém. To jsem neměl tušení, že za

⁴¹ http://en.wikipedia.org/wiki/Publish_or_perish , 31. ledna 2014

⁴² **Macka M.**, Mettler H.-P., Bokel M., Röder W., Analysis of silanised polyglycerols by supercritical fluid chromatography, *J.Chromatogr. A*, 675(1-2), 267-270, **1994**.

⁴³ <http://www.hplc2013.org/History.html> ,

<http://hplc2014.org/history.html> , 31. ledna 2014

nějakých 6 let potkám mou budoucí ženu a bude to Švýcarka (a Australanka)!

UTAS AUSTRÁLIE

Začátkem února 1994 jsem dorazil do Hobartu jako dvoustetisícového „hlavního města“ půlmilionového ostrovního státu Tasmánie, rozlohou podstatně větší než ČR, bohatým panenskou přírodou a s příjemným mírným klimatem. Netušil jsem, že se mi stane domovem na podstatně delší dobu než 3-4 roky na PhD, a proto můj přístup byl Tasmánii se snažit poznat, než odtud odjedu zpátky do Evropy s mým PhD. To jsem podal v roce 1997 a v následujícím roce promoval s vysněným „PhD in Chemistry“ z anglicky mluvící země. Ohledně mého návratu do Evropy člověk míní a okolnosti a život mění, a tak jsem zůstal déle a pak získal prestižní pětileté Australské „mid-career“ Australian Research Council Research Fellowship od roku 2000. Toho času jsem též poznal mou budoucí manželku, původně z CH, ale též hrdou Australanku a Tasmaňanku, která nemluví česky, a tak se doma bavíme německy. Tím bylo též rozhodnuto, že zůstávám nadále v Austrálii. Dále ve zkratce: po dalším prestižním, tentokrát evropském FP6 Marie Curie Excellence Grants and Fellowship v Irsku, jsem se opět vrátil na UTAS a jako výzkumný „New Stars Profesor“ od roku 2010. V roce 2012 jsem získal znovu další prestižní pětileté Australské Australian Research Council Future Fellowship Level 3 (první a v roce 2013 stále jediné Level 3 na UTAS). Bydlíme nedaleko od Hobartu, užíváme příjemný australský styl života a s potěšením sledujeme vzrůstající popularitu ostrovního státu Tasmánie. Kromě ekonomické prosperity ale Austrálie nabízí panenskou přírodu a největší délku pobřeží a rozlohu na hlavu a na rozdíl od pár jiných zemí, tady v Austrálii s teplými klimaty bez zimy. Rád zde vítám

mnohé kolegy a studenty z ČR i odjinud, a co se týče studentů a mladších kolegů mám radost, že mohou užívat světa bez krutých zábran, kterým jsme byly má generace a generace starší vystaveni do roku 1990.

ZÁVĚREM

Během mé pracovní dráhy jak v Česku, tak v cizině jsem měl to štěstí, že jsem mohl pracovat s mnoha skvělými lidmi, kteří mě inspirovali a obohatili můj život pracovní i osobní. Byl jsem vždy hrdý na to, odkud pocházím, a též na to, že relativně velké množství mezinárodně uznávaných odborníků v oblasti analytické chemie, separací a chromatografie pochází z Česka a ze Slovenska. V mých prezentacích, které ukazují, když dojde na tradice vědy a techniky v ČR, jsou jména čítající velikány jako Rudolf II., Gregor Mendel, Jan E. Purkyně, Sigmund Freud, Ernst Mach, Josef Resl, Viktor Kaplan, Prokop Diviš, Emil Škoda, Jaroslav Heyrovský, Oto Wichterle a jiní.

Mých více než 20 let mimo ČR mělo a má tu zásadní výhodu, na rozdíl od odchodů do r. 1989, že ty od r. 1990 jsou chemickou terminologií „reversibilní“. Proto je možnost si volnost pohybu dnes skoro všude na Zemi vychutnat bez tlaku obrovské váhy nevratných rozhodnutí. To neznamená, že bych nebýval měl stesk po vlasti, hlavně v prvních 5 letech, ale člověk ví, že se může kdykoli vrátit. Tu možnost neměly generace před námi a nedovedeme si představit, jak to muselo být tvrdé.

Dnes jsou možnosti profesní i osobní mobility masově dostupné jako nikdy předtím v historii. Já svou roli v souvislosti se svou starou vlastí Českou republikou vidím především v pomoci těm mladým kolegům z Česka a ze Slovenska, stejně jako odjinud, kteří mají zájem realizovat to, co moje generace a já jsme tolik postrádali:

jezdit po světě, pracovat v jiných zemích a dívat se kolem sebe. Mnohokrát jsem měl to potěšení uvítat u mě na pracovních návštěvách řady kolegů z ČR, včetně studentů na delších pobytech. Tím napomáhám maličkým dílem, ale snad přece trochu, aby budoucí generace znovu posunuly Českou republiku mezi nejvyspělejší země v Evropě a na světě. Moje generace se toho, zdá se, nedočkáme, ale věřím, že možné to je.

9. MILAN MINÁRIK



Narozen 1942 ve Zvolenu na Slovensku. V roce 1964 ukončil studium analytické chemie na VŠCHT Praha. Poté pracoval na oddělení čistých chemikálií ve Spolaně Neratovice a ve Výzkumném ústavu pro úpravu průmyslových vod. Zde se začal věnovat v té době vznikajícímu oboru Gelové filtrace. V roce 1966 přešel do Ústavu teoretických základů chemické techniky ČSAV (nyní Ústav chemických

procesů AV ČR), kde se naplno rozvinulo jeho zaujetí pro GPC a později HPLC. U školitele Jiřího Čoučka získal v roce 1974 titul kandidáta věd na Ústavu analytické chemie AV v Brně. Od roku 1975 působí v ÚTZCHT postupně jako vědecký pracovník a vedoucí vědecký pracovník, v letech 1983-4 působil jako asistent profesor na Ústavu organické a makromolekulární chemie, University Dusseldorf, kde spolu s Prof. Wulffem vyvinuli a jako první prezentovali HPLC separaci chirálních enantiomerů a následně vyvinuli silica endcapsulovanou fázi pro velmi rychlou GPC, jejíž patent koupila firma Macherey-Nagel. Po roce 1989 opustil akademickou dráhu a založil firmu Watrex, což byl tehdy první nezávislý distributor zahraničních výrobců HPLC přístrojů – z počátku firma Waters div. of Millipore corp, po té TSP (nyní Thermo), Hewlett Packard (nyní Agilent), Knauer, SSI a v současnosti Sykam. Po více než 25-ti letech úspěšné existence představuje Watrex neopominutelného hráče na poli HPLC techniky. Má svou vlastní budovu (Carolina Centrum), dostatek prostoru i finančních zdrojů pro talentované HPLC odborníky.

Mám-li mluvit o historii HPLC v Čechách a na Slovensku, nemohu nezmínit počátky kapalinové chromatografie a HPLC obecně. A budeme-li mluvit o HPLC, je třeba rozlišit mezi kapalinovou chromatografií jako analytickou disciplinou se svou teorií, mechanismem separace a dynamikou separačního procesu a HPLC, čímž označujeme a všeobecně vnímáme experimentální či přístrojovou techniku.

Kapalinovou chromatografii objevil M.S. Tsvět, když na zasedání biologické sekce varšavské společnosti přírodních věd prezentoval 21. 3. 1906 svůj článek „*a New Category of Adsorption Phenomena and Their Application to Biochemical Analysis*“. Jeho primitivní experiment neměl s HPLC prakticky nic společného stejně jako znovuobjevení kapalinové chromatografie Edgarem Ledererem o 24 let později¹. O málo sofistikovanější byly experimenty Arne Tiselie², Jerkera Poratha s Per Flodinem³ či Stelana Hjerténa⁴ v období 1956-1962, kteří objevili princip gelové chromatografie praktikované na skleněných gravitačních kolonách se sbíráním frakcí a následné detekci solutu v jednotlivých zkumavkách. Poněkud blíže k HPLC měla chromatografie na ionexech a zejména její automatizovaná podoba - analyzátor aminokyselin, za nějž jeho autoři Moore a Stein⁵ byli po zásluze odměněni Nobelovou cenou.

Nicméně za první kapalinový chromatograf se obecně považuje přístroj, který poskytl on-line chromatografický záznam tak, jak jej známe dnes, v podobě separovaných píků jednotlivých komponent, nebo jeden široký pík zobrazující distribuční křivku nerozdělené multikomponentní směsi molekulových hmotností polymeru. Takovýto přístroj, sestávající z pumpy (Milton Roy), septového injektoru, kovové kolony naplněné polystyrenovým gelem, průtočného refraktometru vyrobeného na zakázku Jimem

Watersem (Waters Associates) a zapisovače poprvé použil a nechal si patentovat jako Gelový Permeační Chromatograf John C. Moore⁶ (Dow Chemical Co.). Poté, co Jim Waters zjistil, účel použití svého diferenciálního refraktometru, odkoupil za 10 tisíc US \$ od Dow Chemicals licenci na tento GPC přístroj včetně polystyren-divinylbenzenových kolon (Styragel) a v roce 1963 prodal 3 prototypy GPC-100 Dow Chemicals (J. C. Moore) a další dva Mobil Chem. a Goodrich. O rok později v roce 1964 vystavil svůj první sériově vyráběný GPC-100 přístroj na Pittconu. V té době také vyšla po více než roce J. C. Mooremu jeho esenciální GPC publikace⁷, a proto můžeme rok 1964 považovat za rok vzniku moderního kapalinového chromatografu, který ještě 4 roky pod názvem GPC čekal na svůj dnešní název HPLC. S odstupem 2 let Czaba Horváth⁸ a J.F.K Huber¹¹ sestrojili podobné kapalinové chromatografy s moderními narrow-bore kolonami naplněnými RP fázemi vázanými na anorganickou matici, Czaba⁸ s použitím instrumentace od LDC (nyní Thermo-Fisher Scientific), Huber¹¹ od LKB (nyní GE Healthcare). Czaba Horváth¹⁰ potom na Pittconu 1970 poprvé nazval tuto techniku HPLC, a tím nastartovala i éra reverzních fází, která zatlačila GPC metodu na periferii zájmu výrobců i uživatelů HPLC přístrojů a HPLC se stala nejfrekventovanější separační technikou v řadě oborů mimo analytickou chemii. Ostatně většina z výše jmenovaných průkopníků kapalinové chromatografie, včetně tří nositelů Nobelovy ceny nebyli analytičtí chemici.

Jak vypadaly HPLC přístroje počátkem 70. let ukazují dva obrázky níže (Obr. 1 a 2).



Obr. 1: LDC přístroj: vlevo dole Constametric pumpa, nahoře UV detektor, vpravo Milton Roy pumpa, uprostřed manuální integrátor.



Obr. 2: Waters přístroj se dvěma pumpami M6000, RI401, UV a fluorescenčním detektorem Kratos.

Do tehdejšího Československa přišla kapalinová chromatografie a zejména její instrumentace v plném proudu až v letech 1968-70. Já jsem měl to štěstí, že mne tato doba zastihla na počátku mé vědecké kariéry v pozici výzkumného pracovníka Ústavu

teoretických základů chemické techniky ČSAV, která mi dávala značnou volnost v bádání čehokoliv zajímavého a pro GPC nebylo těžké se nadchnout. Ne že bych byl v té době nějaký odborník, ale ocitl jsem se ve správnou dobu na správném místě, nebo spíše ve správné pozici. Ti tenkrát lepší už dnes většinou nežijí, nebo nejsou v takové kondici, aby mohli tento příspěvek napsat fundovaněji, a ti mladší u toho prostě ještě nemohli být z důvodů věkových.

Pravda, že už před rokem 1968 se řada odborníků věnovala iontové chromatografii, mezi nimiž nejvíce vynikal Otakar Mikeš¹², ale počátky moderní instrumentace dnešní HPC u nás jsou spjaty především se jménem Jiřího Čoučka. Jiří byl v roce 1967 na stáži u profesora W. Heitze z University v Mainzu, a tam se seznámil jak s teorií⁹, tak i s moderní instrumentací a přípravou GPC kolon. Po návratu do mateřského UMCH-ČSAV, také díky možnostem, který tento ústav pod vedením prof. Otto Wichterleho v této krátké době měl, se vybavil přístroji od Waters a s elánem se pustil do propagace GPC i výroby komponent gelových chromatografů u nás. V ústavu ho doplňoval geniální teoretik chromatografie Mirek Kubín¹³, který měl i technické nadání, jež uplatnil při vývoji praktických LC komponent. S kolegy Špačkem a doktorantem S. Vozkou vyvinuli a podle svých iniciál pojmenovali první domácí silikagel (Spheron VSK). Kubín našel způsob tepelné reformace skleněných trubic v taveném NaNO₃, při níž se výrazně zvýšila a unifikovala tlaková odolnost skleněných kolon, které pak mohly být použity pro HPLC, a toto know-how později převzal i Merck. Kubín jako první publikoval na Makrotestu GPC¹⁴ separaci kolonou vyplněnou blokem polymeru (monolithická kolona).

V červnu 1970 se v Praze konal 8. International Gel Permeation and Liquid Chromatography Seminář, na němž se prezentovaly osobnosti GPC a HPLC jako K. J. Bombaugh (recyklace v GPC), A. E. Hamielec (axiální disperse při GPC), W. Heitz (příprava sorbentu pro GPC), H. Benoit (universální kalibrace GPC), A. deVries (anorganické materiály pro LC), J. N. Little (mechanismus GPC), ale i domácí odborníci: J. Čoupek, D. Berek a J. Churáček s P. Janderou. Na seminář přišli snad všichni, kteří se chtěli o této nové metodě něco dovědět, přednáškový sál byl na prasknutí a diskusní fóra byla plná dychtivých diskutérů. Tento seminář inspiroval nejednoho mladého vědce či technika v praxi ke změně oboru na HPLC.

V dalších několika letech ukončili své disertace oblasti HPLC S. Pokorný a já (u J. Čoupka), S. Vozka (u M. Kubína), J. Janča (u Kolínského), J. Kříž (u L. Vodičky), D. Berek ovládal GPC dění v Bratislavě a vyškolil řadu úspěšných doktorantů, Eva Brandšteterová a Jozef Lehotay zase HPLC. Miloš Krejčí dominoval HPLC na Ústavu analytické chemie v Brně. Na VŠCHT se HPLC naučil M. Popl, vystudovaný palivář, tak, že se stal vedoucím Katedry analytické chemie a sebou si přivedl V. Dolanského, který mu naměřil spoustu publikací. Nelze opomenout ani K. Pecku z Katedry paliv na VŠCHT, či Z. Deyla a K. Macka z Mikrobiologického ústavu ČSAV.

FENOMÉN ČOUPEK

J. Čoupek brzy přerostl tehdejšími vládcům přes hlavu, a když se opakovaně ředitel ústavu dostal na mezinárodních fórech do situace, že mu někdo významný při představování řekl, „...Jo Vy jste z UMCH v Praze, znám, od Čoupka, že?.. „ tak musel i s ohledem na

své politické angažmá v roce 1968 Čoupek ústav opustit. Nebyl by to ale Jiří Čoupek, kdyby odešel poražen. Zosnoval jakousi výzvu za provázání vědeckých pracovníků a průmyslových dělníků a techniků na Praze 6, sám nastoupil do podniku Laboratorní přístroje a stal se koordinátorem tohoto uskupení s kanceláří pronajatou v UMCH (jeho bývalou kanceláří). Teď teprve byl svým pánem a mohl plně rozvinout svou bezbřehou aplikační fantazii a navazoval kontakty a spolupráci v oblasti GPC i HPLC od chemie, přes potravinářskou analýzu, biologii, virologii, medicínu a forensí analýzu. U dveří jeho kanceláře stály fronty zájemců o konzultaci až k vrátnici ústavu, a to nemohlo mít dlouhé trvání. Z UMCH byl nakonec vypuzen, a to ho nastartovalo do ještě odvážnější akce. Připravil plán na tehdy nepředstavitelný útvar joint venture mezi komunistickým a kapitalistickým podnikem Tessek, což bylo spojení dánské firmy Senetek a české firmy Tesla. Ač nemohl být v nejvyšším vedení Tesseku, prakticky Tessek řídil. Z Laboratorních přístrojů si sebou přetáhl své lidi, S. Pokorného a polymerní chemiky, co uměli polymerovat sorbenty, a rozjel ve velkém výrobu HPLC kolon a HPLC přístrojů. Jiří Čoupek dosáhl takto vrcholu své kariéry, měl faktické postavení generálního manažera, jezdil si nejen do Dánska, ale do celého světa bez zábran, navazoval kontakty s významnými představiteli vědy, výzkumu i průmyslu, domlouval kontakty i jiným lidem, mne domluvil roční stáž v pozici docenta na Universitě Dusseldorf. Bestsellerem Tesseku byly HPLC kolony a sorbenty na bázi HEMA, v menší míře i kolony s modifikovaným silikagelem. Tessek umožnil mnoha domácím vědcům i průmyslovým analytikům kapalinovou chromatografií se zabývat a pro své potřeby využívat. Podle mého soudu toto byl jeden z důvodů, proč v bývalém Československu byla zejména kapalinová chromatografie na vysoké úrovni.

Po roce 1989 koupila Tessek firma Melcor Technologies Melvina Ebelinga a protože představy o vedení firmy a zejména osobnost a temperament Jiřího Čoučka se rozcházel s představou Melvina Ebelinga, Čouček musel z Tesseku odejít. Později Ebeling poznal, jakou osudovou chybou byl odchod Čoučka z firmy, neboť nová jednatelka přivedla Tessek k bankrotu a následně ho sama koupila.

Jiří Čouček pak nebyl schopen v nových podmínkách uplatnit své schopnosti, které ho v předchozích 20ti letech vynesly tak vysoko, do HPLC byznysu se už nezapojil a ztratil se z povědomí chromatografické veřejnosti. Nakonec nešťastně zemřel na zhoubný nádor, který si odmítl nechat odoperovat.

Řada českých i slovenských chromatografistů se uplatnila v zahraničí. Za všechny jmenujme ty, kteří tam natrvalo zůstali:

Imrich Sebastian (Bratislava), doktorant I. Halásze vynálezce RP fází, tzv. Halász brushes¹⁵

Miloš Novotný (Brno), profesor, Indiana University, Bloomington, IN

František Švec (Praha), University of Carolina, Berkeley, CA, souč. Facility Director in the Molecular Foundry of the Lawrence Berkeley National Laboratory

Martin Gilar (Praha), R+D, Waters Corporation

Koncem let 70tých se počet odborníků ovládajících HPLC možná lépe než ti, kteří stáli u jejího zrodu, exponenciálně zvýšil, protože si netroufám někoho jmenovat. Je třeba si uvědomit, že v letech 1968-74 jsem stačil každý měsíc projít všech 5-9 mezinárodních časopisů včetně Chemical Abstracts, a v nich si najít a přečíst všechny publikace z oboru kapalinové chromatografie. U těch zajímavějších

jsme si psali o separáty, které poštou přicházely. Neexistovaly počítače ani kalkulačky a násobilo se pomocí logaritmického pravítka (nepočítám ovšem počítače velké jako stodola, které namísto klavesnice měly polykač děrných štítků). A přesto dnes v době nesrovnatelně technicky pokročilé stále platí to, co těch úžasných několik vynálezců či zakladatelů HPLC před padesáti lety vymyslelo. Díky nim, prožila jistě řada vzdělavců šťastný profesní život a já jsem měl to štěstí, že jsem k nim patřil.

MŮJ PŘÍSPĚVEK HPLC

Kromě řady publikací, které nestojí za to číst, se mi podařilo pár věcí, které by sečtělý HPLC odborník měl znát.

Nejméně významná je publikace, ilustrující schopnost separačního mechanismu kapalinové chromatografie dokonale provést disproportionaci sodné soli trojsytné kyseliny¹⁶. Při nástřiku sulfoisofthalátu sodného na kolonu Sephadex LH-20 ve vodném nepufrovaném prostředí chromatogram poskytl dva velmi výrazně oddělené píky, první trojsodná sůl, druhý kyselina sulfoisofthalová.

Ne příliš známý je patent cirkulačního kohoutu, určeného k automatickému recyklu při HPLC^{17, 18}, který má, na rozdíl od známých systémů používaných např. K. Bombaughem, nulový „dead volume“. Vstup a výstup HPLC kolony jsou přivedeny do sousedních portů bubínkového kohoutu, jehož rotor má řadu kanálků o objemu cca 10 μ L. Proti vstupu kolony je HPLC pumpa, proti výstupu odpad. Rotor kohoutu skokově rotuje ve směru od výstupu ke vstupu kolony, a to takovým poměrem frekvence a průtoku mobilní fáze, aby ve stagnační fázi rotace se kanálek za výstupem kolony zcela

nenaplnil či dokonce nepřeplnil. Přesunutím tohoto kanálku v následujícím kroku před vstup kolony se tak kvantitativně přenesou právě jen vytlačený sloupeček eluátu na vstup kolony a konstantní průtok mobilní fáze zatlačí do kolony právě jen sloupeček, ne víc, ne méně, neboť kapalina je nestlačitelná a průtok i frekvence kroku kohoutu konstantní. Tímto způsobem se vytvoří jakési „průtokové perpetuum mobile“, kdy kolonou rotuje za vysokého tlaku kapalina v uzavřeném okruhu, aniž by v tomto okruhu byla zapojena pumpa.

Nevím, proč se mi v kohoutech tak zalíbilo, že jsem hledal další možnosti nalézt vlastnosti či způsob použití do té doby neznámé. Výsledkem pak byl o 10 let později znovu-objevený princip MBB firmy Rheodyne, který dnes zná každý chromatografista a používá jej¹⁹. Jsou to modely řady 7725 a 9725 (<http://www.instrument.com.cn/Quotation/Manual/382882.pdf>).

A poslední kohoutová invence je Variable Loop Injector²⁰

(<http://www.watrex.cz/watrex/en/research.php>), což je sliding valve, nejspíše axiálního typu Rheodyne s dvěma dávkovacími drážkami (smyčkami) na rotoru, jedna pro dávkování, druhá pro spojení pumpy s kolonou. Velikost dávky se neodměřuje Hamiltonkou ale natočením drážky vůči přívodu a odvodu vzorku tak, aby průtočná část drážky odpovídala požadovanému objemu. Přetočením na opačnou stranu se pak konce drážky spojí s pumpou a kolonou.

V roce 1983 jsem byl pozván na Universitu Dusseldorf, abych se pokusil najít podmínky pro použití polymeru s imprintovanými chirálními kavitami v HPLC. Že se to povedlo, ukazuje náš chromatogram na obálce knihy Chromatographic chiral

separations²¹. Byla to první úspěšná HPLC separace enantiomerů na sorbentu s imprintovanými kavitami^{22, 23}.

Na stejném pracovišti jsme také našli způsob enkapsulace měkkého homogeního polystyrenového gelu do makroporů mikroparticulárního silikagelu²⁴, čímž jsme získali GPC sorbent s excelentní kombinací vysoké selektivity a kapacity homogeního gelu s vysokou tlakovou odolností silikagelu. Na koloně 250 x 4 mm jsme dosáhli baseline separace osmi komponent v čase 55 sekund, což byl tehdy světový rekord v rychlosti GPC separace²⁵.

A nakonec bych se rád zmínil o jedné aktivitě po ukončení 25ti leté akademické činnosti a přechodu do oblasti podnikatelské. V období let 1992 – 2001 jsem uspořádal deset Pražských chromatografických seminářů, které zde suplovaly nedostatek oficiálních mezinárodních konferencí a s vydáním nemalých investic se mi na ně podařilo postupně pozvat většinu významných osobností chromatografie, zejména kapalinové, jako jsou, resp. byli mezi jinými tyto:

Josef F.K. Huber (Viedeň), Stelan Hjertén (Uppsala), Ernst Kenndler (Viedeň), Andreas Rizzi (Viedeň), Miloš Novotný (Bloomington), Gerhard Schomburg (Muelheim), František Švec (San Francisco), Imre Milnar (Berlin), František Tureček (Seattle), František Foret (Boston/Brno), Edward S. Yeung (Ames), Wolfgang Lindner (Viedeň), Heinz Engelhardt (Saarlandes), Christian G. Huber (Gratz), Alexej Nikiforov (Viedeň), Eva Smolková-Keulemansová (Praha), Bohuslav Gaš (Praha), Marek Minárik (Boston), Pavel Jandera (Pardubice), Jiří Ševčík (Praha), Dušan Berek (Bratislava), Zdeněk Deyl (Praha), Josef Janča (La Rochelle), Jozef Lehotay (Bratislava), Uwe Rapp (Bremen), Josef Havel (Brno), Eva Matisová (Bratislava), Petr Boček (Brno), Karel Štulík (Praha), Milan Popl (Praha),

Václav Kašička (Praha), Eva Brandšteterová (Bratislava), Karel Klepárník (Brno), Joseph W. Walsh (Deerfield), Eva Tesařová (Praha).

ZÁVĚR

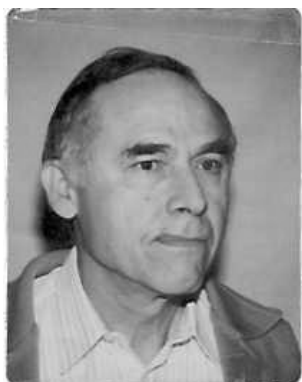
S HPLC jsem neskonal ani poté, co jsem se stal byznysmanem. Stále spolupracujeme s akademickými institucemi na grantech i našich výzkumných projektech, máme velkou HPLC laboratoř, kde se učí studenti. Je radost moci si dělat, co mne baví, a každému bych přál totéž.

REFERENCE

1. R. Kuhn, A. Winterstein and E. Lederer, Hoppe-Seyler's, *Z. Physiol. Chem.* **197** (1931) 141.
2. A. Tiselius, S. Hjerten a O. Levin, Protein chromatography on calcium phosphate columns, *Arch. Biochem. Biophys.*, **65** (1956) 132-155.
3. Jerker Porath and Per Flodin, Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature* **183** (1959) 1657–1659.
4. S. Hjerten and R. Mosbach, Molecular-Sieve Chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide, *Anal. Biochem.*, **3** (1962) 109-118.
5. D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore, Automated recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, *Anal. Chem.* **30** (1958) 1190-1206.
6. J. C. Moore, U.S. Patent 3,326,875 (1963).
7. J. C. Moore, *J. Polymer. Sci.* **A2**. (1964) 835-843.
8. C. G. Horváth and S. R. Lipsky, *Nature* **221** (1966) 748.
9. W. Heitz and J. Čoupek, *J. Chromatog.*, **36** (1968) 290.
10. C. Horváth, 21st Pittsburgh Conference, o.p.
11. J. F. K. Huber and J.A.R.J. Hulsman, *Anal. Chim. Acta* **38** (1967) 305.
12. O. Mikeš, High-performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biopolymers, *Journal of Chromatography library*, Vol. 41, Elsevier, 1988.
13. M. Kubín Contribution to the theory of chromatography, *Collection Czechoslovak Chemical Communication*, **30** (1965) 1104-18.
14. M. Kubín Makrotest

15. I. Halász and I. Sebastian, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 8 (1969) 453.
16. M. Minárik, Z. Šír, Disproportionation of the sodium salt of the 5-sulphoisophthalic acid under conditions of gel chromatography, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 42 (1977) 65.
17. M. Minárik, M. Popl and J. Mostecký, A new concept of recycle in chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, 19 (1981) 250.
18. M. Minárik, M. Popl and J. Mostecký **US Pat. No. 4,150,563** *Method of and apparatus for the recirculation of fluids in a closed circuit.*
19. P. Luby, V. Masák, L. Kuniak, V. Havlín, M. Minárik, Přepínací kohout pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii, CZ patent (AO) 199129 (1980).
20. M. Minárik, M. Popl and J. Mostecký, Variable-volume sample valve for high performance liquid-chromatography, *J. Chromatogr.* 208 (1981) 67-70.
21. G. Wulff and M. Minárik, in: *Chromatographic chiral separations*, M. Zief and L. J. Crane Eds. Marcel Dekker, New York, p. 15 (1988).
22. G. Wulff, H. G. Poll and M. Minárik, Enzyme-analogue built polymers. XIX. Racemic resolution on polymers containing chiral cavities, *J. Liq. Chromatogr.* 9, (1986) 385-405.
23. G. Wulff, M. Minárik, Template imprinted polymers for HPLC separation of racemates, *J. Liq. Chromatogr.* 13: (1990) 2987-3000.
24. G. Wulff, R. Oerschkes and M. Minárik, *Column Packing Material for gel-permeation Chromatography, Methods for its Preparation, and Applications*, **US Pat. No. 5,091,433.**
25. G. Wulff, R. Oerschkes and M. Minárik, Fast separation of small molecules using a new type of gel-permeation chromatography column packing, *LC GC-separation science*, 9, (1991) 226.

10. MILAN POPL



Narozený 10. 3. 1934 v Čáslavi, absolvoval VŠCHT v Praze na Katedře syntetických paliv a ropy v r. 1964, na téže katedře, teď již pod jménem Katedra technologie ropy a petrochemie, obhájl kandidátskou disertaci v r. 1969 a v r. 1974 obhájl doktorskou disertační práci na téma Separace aromatických uhlovodíků na alumině. V r. 1976 přešel jako docent na Katedru analytické chemie VŠCHT, kde vedl skupinu separačních metod až do r. 2000, kdy odešel do důchodu. Jako spoluautor skript Instrumentální analýza, Základy chromatografie a Analytická chemie životního prostředí má výrazný podíl na zavedení chromatografie do výuky analytické chemie a do laboratorních cvičení.

JAK JSME ZAČÍNALI S KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ NA VŠCHT

Stručně lze říci, že za šedesát let po Cvětově experimentu (v r. 1903) se v kapalinové chromatografii mnoho nezměnilo. Taková byla přibližně situace na Katedře syntetických paliv a ropy, Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, kam jsem v r. 1964 nastoupil jako vědecký aspirant.

Používal se otevřený systém adsorpční chromatografie s polárním sorbentem a nepolárním eluentem, někdy také označovaný jako systém s normálními fázemi (NP-LC), na rozdíl od systému s obrácenými fázemi (RP-LC), který vznikl později, a který v současnosti převládá. Kolony byly většinou skleněné trubice o vnitřním průměru asi 10 mm a délky 1 m, které měly nahoře natavenou skleněnou baňku, jako zásobník eluentu. Dole byly zakončeny zúžením, ve kterém byl smotek skelné vaty, nebo frity, popř. byly zakončeny skleněným kohoutem. Ukázky kolon jsou na Obr. 1. Plnily se nejčastěji aluminou nebo silikagelem a k dosažení kompaktnosti náplně se po stěnách trubice přejíždělo vibrátorem. Vzorek se vnesl do kolony injekční stříkačkou, několik mm pod vrstvu sorbentu a potom se opatrně nalil eluent, aby nedošlo k rozvíření sorbentu. Jako eluenty se používaly níževroucí uhlovodíky, např. pentan, hexan, z jiných pak diethylether. Na výstupu z kolony se potom odebíraly vzorky, které se analyzovaly většinou spektrálně. Eluce probíhala velmi pomalu, pouze na základě gravitace, často několik hodin. Proto se postupy vylepšovaly, nejprve umístěním eluentu vysoko nad kolonou, později použitím přetlaku inertního plynu nad hladinu eluentu.



Obr. 1: Kolony pro otevřený systém a hliníkové lahve s aluminou

Příkladem takového postupu byla metoda FIA, (Fluorescent Indicator Adsorption, ASTM method D 1319-66T), která dovozovala v nižších ropných frakcích stanovit tři skupiny uhlovodíků. Do

suchého silikagelu se vnesl vzorek a potom se prostor nad silikagelem naplnil isopropanolem. Ten před sebou tlačil všechny složky vzorku, šlo tedy o tzv. vytěšňovací chromatografii. K urychlení analýzy se používal přetlak dusíku. Do vzorku se přidával speciální indikátor a separované zóny složek, které postoupily do spodní části, tzv. analyzátoru, ve světle o vlnové délce 365 nm vykazovaly různá zbarvení fluorescence. Vyhodnocování bylo jednoduché, měřily se délky zóny centimetrem. Tato metoda byla používána ještě v r. 1975, možná i později.



Obr. 2: *Silnostěnná* skleněná kolona s nástříkovou hlavou

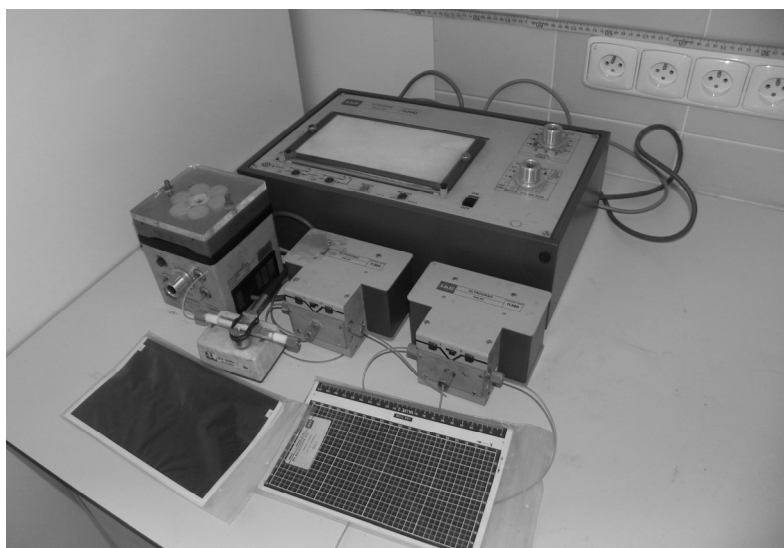
Mezi méně známé techniky patří frontální chromatografie, kdy eluentem je vlastní vzorek. Tuto techniku jsme použili v r. 1974 pro zkoncentrování aromátů z bílých olejů a dearomatizovaných n-alkanů. Vzorek byl čerpán přes kolonu naplněnou silikagelem, nasycené uhlovodíky nebyly zadržovány a aromáty se zachytily.

Také, i když v menší míře, se používaly velké kolony o průměru 10 a více cm, s délkou několika metrů, které často musely být umístěny do technologických hal s vysokým stropem. Tyto kolony se používaly k izolaci látek ze syntézy nebo z extraktů přírodních látek. Tady trvala celá operace řadu hodin a nebylo žádnou výjimkou, že se u experimentu muselo přespávat a v pravidelných intervalech odebírat vzorky.

Významným impulzem k rozvoji kapalinové chromatografie byla kniha L. R. Snydera *Principles of Adsorption Chromatography* (Marcel Dekker Inc. New York, 1968), kde se pokusil o teorii vzájemných vztahů mezi sorbentem, eluentem a analytem. Jeho práce, i když byla časem překonána, přinesla řadu poznatků o elučních datech polycyklických aromátů a některých heterocyklických látek, převážně na alumině a v menší míře i na silikagelu. Publikoval celou řadu rozpouštědel seřazených podle eluční síly, eluotropickou sérii, a zabýval se vlivem planarity molekuly analytu na jeho eluční objem. V r. 1969, po obhájení kandidátské disertace, jsem byl přijat jako vědecký pracovník na Katedru technologie ropy a petrochemie, jak zněl nový název dřívější Katedry syntetických paliv. V té době ještě nebyly dostupné chemicky vázané stacionární fáze, a tak naprostá většina experimentů probíhala technikou adsorpční chromatografie. Zaměřili jsme se na separaci aromatických uhlovodíků a na rozpracování některých Snyderových poznatků o planární adsorpci na alumině.

Důležité bylo hodnocení účinnosti kolon a stanovení faktorů, které účinnost ovlivňují. Byla využita van Deemterova rovnice, původně v r. 1956 vytvořena pro plynovou chromatografii, a byla Giddingsem úspěšně aplikována na chromatografii kapalinovou. Podstatný je

rozdíl v molekulární difúzi v mobilní fázi, která je v kapalině řádově pomalejší než v plynu. Z toho potom vyplynul vliv velikosti částic sorbentu, které musejí být co nejmenší, aby se zkrátila dráha analytu z mobilní fáze k povrchu sorbentu. Výškový ekvivalent teoretického patra H je do značné míry závislý na velikosti částic sorbentu a mírně stoupá s rostoucí lineární rychlostí mobilní fáze u . Na rozdíl od plynové chromatografie závislost H vs. u má pro kapalinovou chromatografii minimum až při tak nízkých průtocích mobilní fáze, které nemají praktické využití. Tak tomu alespoň bylo až do nástupu vysokotlaké resp. vysokoúčinné kapalinové chromatografie.



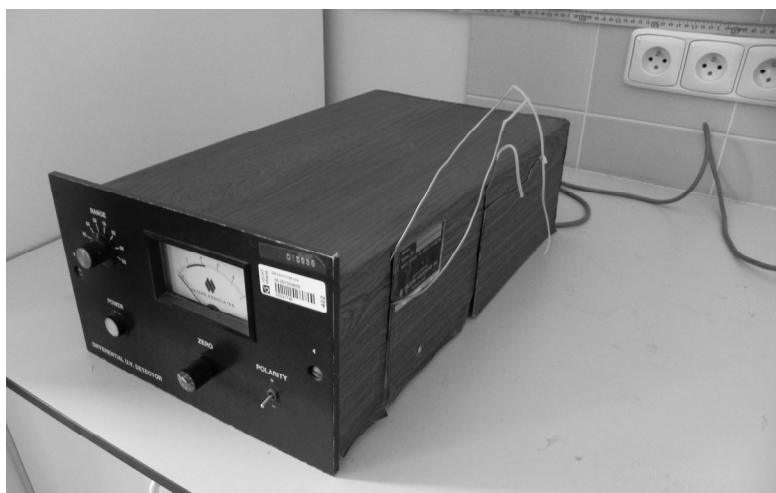
Obr. 3: Programátor gradientu firmy LKB Producter s papíry pro kreslení programu, s ventily a peristaltickým čerpadlem

Podrobněji jsme se zabývali problémem účinnosti obsáhlejší studií v r. 1975. Z dostupných adsorbentů (aluminy a silikagelu) jsme

sítovou analýzou připravili frakce o různém rozměru zrn od 30 do 220 μm , použili jsme silnostěnné skleněné kolony o vnitřním průměru 2, 3 a 4 mm a teplotu od 20 do 60 °C. Při testování různých lineárních rychlostí a velikosti nástřiku výsledky vyzněly jednoznačně ve prospěch silikagelu. Bylo dosaženo výšky teoretického patra pod 1 mm při přijatelné lineární rychlosti. Teoretické základy rozdělovací (partiční, kapalina – kapalina, LLC) chromatografie vycházely ze známých poznatků v extrakci. V principu je možno tuto techniku hodnotit jako distribuci analytu mezi dvě nemísitelné fáze. Pokusy o zavedení LLC byly většinou neúspěšné, pokud byla stacionární fáze mechanicky nanášena na inertním nosiči. Obě kapalně fáze by měly být nemísitelné, měly by se lišit polaritou a měly by vyhovovat použitému detektoru. Problém spočíval v tom, že neexistovaly dvě kapaliny, které by byly zcela nemísitelné. Pokud se na tuhý sorbent nanášela kapalná stacionární fáze, docházelo k jejímu rozpouštění eluentem. Používaným řešením bylo nasycení eluentu saturační předkolumnou, která obsahovala hrubý nosič s několika desítkami procent stacionární fáze. Tak byl např. použit Carbowax 400 s pentanem a skvalen se směsí voda – acetonitril jako mobilní fází. Často přitom docházelo k zalepování detektoru vymývanou stacionární fází.

Řešením problému LLC se staly chemicky vázané stacionární fáze. Základem těchto fází je silikagel. Nejprve byl použit ve formě porézních částic nepravidelného tvaru a hydroxylové skupiny silikagelu byly esterifikovány různými alkoholy. Tento typ sorbentu měl malou odolnost proti hydrolýze nebo případné reesterifikaci. Podstatný úspěch zaznamenaly stacionární fáze připravené reakcí silikagelu s oktadecyltrichlorsilanem v nepolárním rozpouštědle. Dalším zlepšením byly kulovité částice silikagelu, ať už plně porézní nebo s neporézním jádrem, na jejichž povrchu byla vytvořena

vrstvička chemicky vázaného silikonového polymeru. Náplně s oktadecylovými skupinami jsou nepolární a používají se ve spojení s polárními eluenty, jako jsou metanol – voda, acetonitril – voda apod., tedy pravý opak kapalinové adsorpční chromatografie. Proto se pro tento systém začal používat název kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (RP-LC).



Obr. 4: UV detektor 254 nm firmy Waters Ass.

Alternativu k chemicky vázaným stacionárním fázím představují polymerní sorbenty. Řada polymerních sorbentů připravených Ing. Jiřím Čoupkem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie ČSAV byla na našem pracovišti testována jako sorbent pro analytické separace i pro záchyt různých typů analytů z vody a ovzduší. Na tomto místě je třeba ocenit mimořádný přínos zemřelého Ing. Čouпка k rozvoji kapalinové chromatografie v Československu, a to jak na vývoji polymerních sorbentů v ÚMCH, tak i později v n. p. Laboratorní přístroje, kde se podílel na výzkumu a vývoji.

Získané poznatky byly potom využity v pedagogice, když jsem jako docent nastoupil v r. 1976 na Katedru analytické chemie. Společně s Ing. Jaroslavem Kubátem jsme napsali v r. 1978 skriptum Základy chromatografie, které potom bylo využíváno na několika katedrách VŠCHT a dočkalo se i dalších vydání, naposledy pod názvem Separace látek vyšlo v r. 1986. Vedle teoretických základů tam byla popsána tehdejší technika, jak v plynové, tak i kapalinové chromatografii.

Při mém nástupu na Katedru analytické chemie v r. 1976 byla chromatografie zcela na okraji zájmu, protože katedra byla orientována na elektrochemii a spektrální metody. Kapalinová chromatografie byla také postupně zaváděna do základních laboratoří k předmětu Analytická chemie. Nejprve v roce 1977 byla modifikována úloha z fluorimetrie na dvou pracovištích tak, že fluorimetrickému stanovení předcházela separace fluorescenčního barviva na koloně plněné polymerním sorbentem. Již v následujícím roce byla separována modelová směs dvou aromatických látek, které pak byly identifikovány a stanoveny absorpční spektrometrií na spektrometru Specord. Od roku 1979, kdy byly získány další dva fotometrické detektory z Vývojových dílen ČSAV, tato práce probíhala na čtyřech pracovištích s komerčními kolonami plněnými sorbentem Separon SE. V druhé polovině 80. let bylo vybaveno šest pracovišť lineárními dávkovači, fotometrickými detektory, nástřikovými ventily a skleněnými kolonami typu CGC se sorbentem na bázi silikagelu z produkce n. p. Laboratorní přístroje Praha. V první polovině devadesátých let byl záznam chromatogramů na zapisovači nahrazen počítačovou chromatografickou stanicí fy Apex.

Dlouhá doba experimentu v otevřeném systému vedla k tomu, že se hledaly cesty, jak chromatografický proces urychlit. Začal se

používat systém uzavřený v tomto uspořádání: zásobník eluentu – čerpadlo – nástřikové zařízení - kolona – detektor a postupně se jednotlivé prvky zlepšovaly.

ČERPADLA

Jako první se na VŠCHT objevila jednoduchá malá pístová, popř. plunžrová, čerpadla MC 300, která vyráběl podnik Mikrotechna Modřany, a která byla použitelná do tlaků v jednotkách MPa. Průtok byl regulován změnou zdvihu pístu. Vedle některých potíží s jejich těsněním byl největším problémem pulzující tok, který nesvědčil ani koloně ani detektoru. V dílnách na VŠCHT byla tato čerpadla přestavována na zdvojená, kdy se obě čerpadla v maximech střídala. Tím se dosáhlo určitého zlepšení, kdy pulzace klesla asi na polovinu, ale rovnoměrného toku se nedosáhlo. Dalším vylepšením potom byly tlumiče pulzů. Za výstup z čerpadla se zařadila kapacita, často skleněná banička nebo nerezový vlnovec, kde pulzace tlumil vzduchový polštář. Tento systém byl použitelný pouze v těch případech, kdy se pracovalo pouze s jedním eluentem. Při použití postupného zvyšování eluční síly, při gradientové eluci, byla kapalina zadržena v tlumiči pulzů na závadu.

Řešením plynulého dávkování mobilní fáze byly lineární dávkovače. V podstatě šlo o vertikální injekční stříkačku 200-500 ml zhotovenou z nerez. Její píst byl poháněn krokovým motorem, kde rychlost posunu bylo možno libovolně naprogramovat. Na VŠCHT se toto zařízení objevilo kolem roku 1970, velmi brzy potom, co se lineární dávkovač firmy ISCO Dialagrad Modell 190 objevil na trhu, a to díky manažerským schopnostem prof. Jiřího Mosteckého, který dokázal zajistit potřebné devizy. O několik let později, v mnohem robustnějším provedení, se začaly tyto dávkovače vyrábět v n. p. Laboratorní přístroje Praha. Výhodou lineárních dávkovačů byl

jednoznačně bezpulzní tok a schopnost pracovat při tlaku v desítkách MPa. Lineární dávkovače se dodávaly ve dvojicích a tak umožňovaly i gradientovou eluci. Nevýhodou byla nutnost přerušení práce, když píst dosáhne horní úvratě a pracné vyplachování při změně eluentu. Další nevýhodou byla jejich hmotnost, kdy přemístění těchto dávkovačů vyžadovalo skutečně silného muže.

Lineární dávkovače byly oblíbené a udržely se v provozu řadu let, ale jejich užití se omezilo, když se podařilo vyřešit systém několika, nejčastěji dvou, pístových čerpadel s programovaným pohybem pístů.

KOLONY

Pro uzavřený systém kolony navazovaly na dříve používaná zařízení. Na počátku jsme pracovali s kolonami firmy Nester Faust, které byly skleněné, silnostěnné, měly délku 0,5 - 1 m a vnitřní průměr 3 nebo 4 mm. Na vstupu i na výstupu byly teflonové koncovky, kde vstup byl opatřen septem, které umožňovalo nástřik vzorku injekční stříkačkou. Výstup obsahoval teflonovou fritu. Propojení s čerpadlem a detektorem zajišťovaly teflonové hadičky. Tato kolona je na Obr. 2. Plnění těchto kolon bylo stejné jako u dříve používaného otevřeného systému, tj. do kolony se nasypal suchý sorbent a přejížděním vibrátoru po koloně se docílilo kompaktnosti náplně. Podobně byly konstruovány větší kolony pro preparaci, které měly délku 1 m a vnitřní průměr 10 mm. Kolona obsahovala 75 g aluminu a eluované složky byly zaznamenány argonovým ionizačním detektorem.

Plnění kolony suspenzní technikou jsme poprvé použili v r. 1976, kdy jsme do kolony o světlosti 2,2 mm plnili suspenzi silikagelu o velikosti částic 11 μm ve směsi bromoform – tetrachlormetan.

Kolony pro gelovou permeační chromatografii (GPC) byly podstatně objemnější. V jednom případě to byla série dvou kolon, každá 150 cm dlouhá o vnitřním průměru 1,3 cm, v dalším to byla série 5 nerezových kolon 120 x 0,8 cm, s gelem o vylučovacím limitu 1.000 daltonů, které jsme použili pro porovnání retenčních dat alkylbenzenů v r. 1975.

Při práci s kolonami se sypanou náplní bylo pozorováno, že mobilní fáze u stěny kolony postupuje rychleji než v jejím středu. Tím docházelo k rozšíření zóny analytu a ke snížení účinnosti kolony. Proto byl učiněn pokus s kolonou o „nekonečném průměru“. Šlo o krátkou kolonu, která měla velký průměr několika centimetrů. Vzorek se vnesl v malém objemu na začátek kolony a během postupu kolonou se nesměl dotknout stěn. Potřeba velkého množství sorbentu a eluentu tento pokus odsoudily k neúspěchu.

ADSORBENTY

Mezi oblíbené adsorbenty v letech kolem r. 1970 patřila alumina. Používaly se nepravidelné částice o velikosti 0,12 – 0,15 mm, kterými se plnily kolony za sucha. Alumina se aktivovala žíháním na 400 °C po dobu asi 8 h a potom se její aktivita upravovala přidáním určitého množství vody. Význačným znakem aluminy je její bazicita. Kyselější látky se na alumině dělit nedaly, protože docházelo k chemisorpci. Jako varianty se objevily bazická alumina, a kyselá alumina, ale příliš se neujaly, a tak jako nejběžnější zůstala alumina označovaná neutrální. Různé druhy aluminy se dodávaly v hliníkových lahvích, které jsou na Obr. 1. Alumina má menší kapacitu než silikagel a také menší mechanickou pevnost. Později, při používání vyšších tlaků, byla alumina pro malou mechanickou pevnost opouštěna. Řešení nanesením aluminy ve vrstvičce na pevné neporézní jádro se příliš neujalo.

Silikagel se aktivoval zahříváním na 180 °C po dobu tří hodin. Potom se jeho aktivita upravovala přidávkem vody. Používal se typ s velkými póry, který měl podstatně větší kapacitu než alumina, tj. snesl dávkování většího vzorku. Hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu se vyznačují kyselostí, která způsobovala silnou retardaci např. dusíkatých bází. Silikagel se vyznačoval dobrou mechanickou pevností a snášel tlaky v řádu desítek MPa. Postupně, jak se přecházelo na stále menší částice adsorbentu, silikagel zcela převládl.

Vedle těchto dvou nejužívanějších sorbentů se ještě v malé míře používal Florisil, v podstatě křemičitan hořečnatý, jehož vlastnosti se nacházely někde uprostřed mezi silikagelem a aluminou.

Ve spolupráci s Ing. Jiřím Čoupkem z Ústavu makromolekulární chemie (ÚMCH) ČSAV jsme začali první práce v GPC, a to na styren - divinylbenzenových gelech (obsah 8 % divinylbenzenu), které jsme nejprve využívali k předběžnému oddělení polyaromátů ze složitých vzorků. V r. 1974, ve spolupráci s pracovníky ÚMCH, jsme na tomto gelu, pod označením S-gel 832, publikovali retenční data pro alkyl benzeny.

ELUENTY

Pro aluminu, podobně jako pro silikagel, byl většinou používán pentan, hexan, methylcyklopentan apod. V případě gradientové eluce na alumině jako adsorbentu byl pentan jako eluent doplněn diethyletherem. Tato sestava přinášela někdy těžkosti, kdy v horkém létě dosahovala teplota v místnosti kolem 30 °C a pentan tvořil bubliny v pístovém čerpadle, v potrubí a někdy trhal sloupec sorbentu. Klimatizace laboratoře byla v té době věcí neznámou. Pro stanovení polycyklických aromátů v dehtech jsme použili gradient

cyklopentan – diethylether, pro separaci dusíkatých heterocyklických sloučenin jsme použili směs pentanu s 10 % dichlormethanu. Při separaci montánních vosků na silikagelu jsme použili razantnější eluenty: gradienty isooktan – ethylacetát nebo ethylacetát – isopropanol. K tvorbě vhodného gradientu, v tomto případě, byl k dispozici Ultrograd švédské firmy LKB Producter (Obr. 3, který umožňoval předem připravit libovolný průběh gradientu. Tento přístroj byl zajímavý tím, že průběh gradientu se nakreslil na tuhý papír, vystříhl a umístil na přední prosklenou stěnu přístroje. Pohybující se fotobuňka za prosklenou stěnou potom řídila průběh gradientu. Používané průtoky mobilní fáze pro skleněné kolony světlosti 3 – 4 mm se pohybovaly mezi 40 - 70 ml/h. Pro gelovou chromatografii byl převážně používán jako mobilní fáze tetrahydrofuran, méně často benzen.

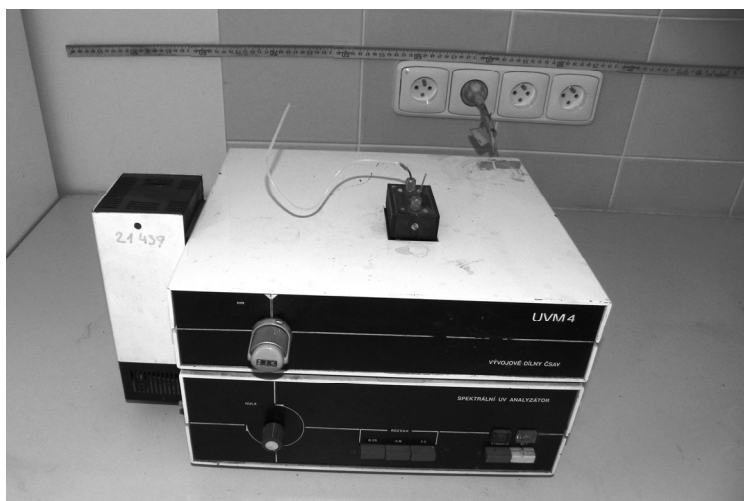
DETEKTORY

První detektory byly založeny na absorpci ultrafialového záření, což vyhovovalo našemu zaměření na polycyklické aromáty a heterocykly. Speciální detektory pro LC zatím nebyly, proto jsme v r. 1970 vyživali průtočné cely umístěné v UV-vis spektrometru Pye Unicam SP 800B. Cely měly optickou délku od 1 do 10 mm a mrtvý objem 0,2 - 0,64 ml. Větší mrtvý objem snižoval účinnost separace, ale spektrofotometr ve spojení s třibodovým zapisovačem umožňoval záznam eluovaných látek při třech vlnových délkách 260, 275 a 296 nm. Postup vyžadoval v 30 vteřinových intervalech přestavovat ručně vlnovou délku, ale přinášel do analýzy dobrou selektivitu. Pracnost postupu při analýze, která trvala 140 min (eluce koronenu) je zřejmá.

Vývoj šel rychle kupředu, a tak v r. 1973 jsme začali užívat diferenciální UV detektor firmy Waters Ass. pracující s jedinou

vlnovou délkou 254 nm, ale s optickou délkou 1 cm a mrtvým objemem 8 μ l. Tento detektor, na Obr. 4, již nepřinášel do systému další snížení účinnosti.

UV detektory československé výroby jsme dostali kolem r. 1977. Byl to výrobek Vývojových dílen ČSAV v Praze (Obr. 5), který pracoval s měnitelnou vlnovou délkou 200 – 400 nm.



Obr. 5: UV detektor s proměnnou vlnovou délkou z Vývojových dílen ČSAV

Většina polycyklických aromátů se vyznačuje charakteristickou fluorescencí, proto byl v r. 1974 využit spektrofluorimetr Aminco-Bowman (Obr. 6) s průtočnou celou o průměru 0,3 cm. Při excitaci 377 nm a emisi 403 nm se podařilo spolehlivě stanovit obsah benzo(a)pyrenu v černouhelném dehtu a v pyrolýzní pryskyřici. V dalším vývoji se objevily fluorescenční detektory, které měly

průtokovou celu o objemu 20 μ l, na excitaci sadu interferenčních filtrů a mřížkový monochromátor na emisní straně. Doplněním bylo zařízení, které umožňovalo zastavit na krátkou dobu průtok mobilní fáze a zaznamenat fluorescenční spektrum.



Obr. 6: Spektrofluorimetr Aminco-Bowman

Vzhledem k tomu, že ne všechny látky absorbují dostatečně UV záření, objevil se na trhu detektor, který měl být univerzální. Byl to argonový ionizační detektor W. G. Pye Liquid Chromatograph Modell 1., který se objevil na Katedře technologie ropy a petrochemie v r. 1970, opět zásluhou prof. Mosteckého. V postatě to byl transportní detektor, kde eluát smáčel pohybující se nerezový drátek. Část eluátu, která ulpěla na drátku, byla unášena nejprve do

odpařovací části, kde se odpařil eluent, a potom do další části, kde v proudu argonu docházelo k pyrolýze analytu. Produkty pyrolýzy byly unášeny do argonového ionizačního detektoru. Detektor vyžadoval velký rozdíl v bodech varu eluentu a analytu a opakované použití cívky nerezového drátku bylo problematické. Tento detektor jsme užívali většinou ve spojení s preparativními kolonami. Malá citlivost a poruchovost pohyblivých částí způsobily, že tento detektor brzy skončil.

Poměrně brzy se začal používat diferenciální refraktometr. První naše použití tohoto detektoru v r. 1972 souviselo s GPC, kdy byly odděleny vysokomolekulární složky pyrolýzního oleje od polycyklických aromátů. Tato preparativní separace byla zaznamenávána detektorem firmy Waters Ass. Modell R-400. Refraktometrické detektory musely být temperovány a podle indexu lomu analytu v porovnání s indexem lomu mobilní fáze byly píky zaznamenávány nahoru nebo dolů od nulové linie. Pokud se indexy shodly, nebyla eluující složka zaznamenána. Negativní píky se objevovaly zejména při použití benzenu jako eluentu. Menší citlivost RI detektoru byla vhodná právě pro preparativní separace.

KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE S OBRÁCENÝMI FÁZEMI

Tato technika začala u nás na VŠCHT trochu jinak, než bylo v té době ve světě běžné. Opět ve spolupráci s Ing. Čoupkem, tentokrát již jako vedoucím pracovníkem Výzkumného a vývojového pracoviště n. p. Laboratorní přístroje, jsme použili dva hydrofobní gely, a to:

Spheron SE jako kopolymer styrenu a etylendimethakrylátu, s velikostí sférických částic kolem 20 μm a vylučovacím limitem 40.000 u. Kolona 50 x 0,3 cm byla plněna ve vodné suspenzi a při separaci polyaromátu eluována gradientem voda – metanol -

diethylether. Zajímavé bylo, že tento sorbent separoval uhlovodíky podle počtu uhlíků, bez ohledu na to, zda jde o aromatický nebo alifatický uhlík.

Druhým gelem byl Spheron 40 S, který měl analogickou strukturu jako předchozí materiál, na vnitřní povrch pórů byl vázán rovný uhlíkový řetězec C₁₈. Oba materiály snášely tlak kolem 10 MPa a rozpouštědla od vody přes alkoholy, ethery až po nasycené uhlovodíky bez toho, že by docházelo k objemovým změnám. Oba gely byly použity jak pro kapalinovou chromatografii, tak i pro záchyt některých kontaminantů, např. fenolů, z vody.

Asi o deset let později jsme použili kapalinovou chromatografii s obrácenými fázemi při studiu chování volných bází a protonizovaných forem alkaloidů a část těchto poznatků jsme popsali v knize M. Popl, J. Fährnich a V. Tatar: *Chromatographic Analysis of Alkaloids* (Marcel Dekker Inc. New York, 1990), ale to už je zcela jiná historie.

Na závěr mimořádný dík patří prom. fyz. Janu Fährnichovi, CSc., který se podílel na většině prací při uvedeném vývoji kapalinové chromatografie a dále za pečlivé přečtení a korekce a za doplnění informací o posluchačských laboratořích. Jmenovaný je též autorem fotografií uvedených v tomto příspěvku.

11. ZBYNĚK PLZÁK



Absolvent katedry anorganické chemie a radiochemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, fakulty anorganické technologie (1965). Po řádné aspirantuře na Ústavu teoretických základů chemické techniky ČSAV přešel do Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži u Prahy a jako vědecký pracovník tam působil celou svou kariéru. Od roku 2008 je emeritním vědeckým pracovníkem AV ČR. Zabýval

se výzkumnými pracemi v oblastech chemie a analýza organokovových sloučenin, chemie a analýza boranů, kapalinová a plynová chromatografie, příprava velmi čistých látek, stopová a ultrastopová analýza, analýza hmotnostní spektrometrií, kvalita analytických výsledků a využití analytických separačních metod pro charakterizaci a studium vlastností hydridových a organokovových sloučenin pro monitorování toxických organokovů v životním prostředí. Autor více než 80 původních odborných sdělení, knižních publikací a patentů. Pedagogicky působil v oblasti zabezpečování kvality výsledků chemických analýz na VŠCHT v Praze a Pardubicích a na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Překladatel odborných textů a norem z oblasti zabezpečování kvality analytických měření, redaktor Chemical Abstracts po dobu 23 let. Recenzent časopisu Analytical and Bioanalytical Chemistry - dříve Fresenius Journal of Analytical Chemistry. Byl i jedním ze zakládajících členů a dlouholetým tajemníkem národní pobočky organizace EURACHEM, evropské organizace zabývající se otázkami kvality analytických měření a problémy akreditací laboratoří.

VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE A JEJÍ APLIKACE NA ANORGANICKÉ KOVALENTNÍ SLOUČENINY

Jak to často bývá, k mému zapojení do vývoje chromatografických technik v pionýrských dobách vysokoúčinné kapalinové přispěla řada náhod a příznivých okolností. Po skončení vědecké aspirantury jsem v roce 1970 nastoupil do Ústavu anorganické chemie ČSAV (ÚACH) do skupiny zabývající se chemií sloučenin boru. Syntéza boranů, karboranů a metaloboranů poskytuje často pestré směsi strukturně velmi podobných látek. V té době procházela vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) prudkým teoretickým a instrumentálním rozvojem. Nabízela pro potřeby analýzy komplikovaných reakčních směsí požadovanou vysokou účinnost dělení, vzhledem k rychlosti dělení a uzavřenému inertnímu systému i separaci méně stabilních látek a v případě potřeby i dělení v preparativním měřítku, což vše bylo pro oblast syntézy deltaedrálních sloučenin boru lákavou nabídkou. Dalším příznivým faktorem na tomto pracovišti bylo, že pro analýzu reakčních směsí byla rutinně využívána tenkovrstvá chromatografie a s její aplikací a materiálovým zabezpečením byly bohaté zkušenosti⁴⁴. V první polovině osmdesátých let byla v tehdejší ČSSR obtížně dostupná jak potřebná instrumentace, tak i sorbenty pro HPLC. Proto lze považovat za další příznivý faktor pro rozvoj HPLC na ÚACH existenci Vývojových dílen ČSAV, vyrábějících přístroje pro potřeby pracovišť Akademie věd. Vývojové dílny ČSAV tehdy měly ve svém výrobním programu i některé komponenty pro HPLC - čerpadla a UV detektory. Příznivým faktorem byla i technická úroveň ústavních dílen ÚACH, jejichž pracovníci běžně zvládali práci

⁴⁴ Cířka J., Heřmánek S., Helejšovský V., Lábler I., Michalec Č., Pitra J., Procházka Ž. a Schwarz V.: Chromatografie na tenké vrstvě. Nakl. ČSAV Praha 1965 str. 401.

s nerezovou ocelí a pro potřeby tlakových syntéz hydridů v autoklávech měli i zkušenosti se stavbou aparatur pracujících pod tlakem až 200 MPa.

Tak pro potřeby dělení boranů, karboranů a metaloboranů byl v letech 1974-76 na ÚACH sestaven stavebnicový přístroj pro HPLC, jehož hlavní části tvořily vysokotlaké čerpadlo VCM 150 ev. VCM 300 (Vývojové dílny ČSAV, max. tlak 15 a 30 MPa) alternativně pak vysokotlaké membránové čerpadlo (Ústav makromolekulární chemie ČSAV, max. tlak do 30 MPa) anebo pneumatická pumpa vlastní konstrukce, dávkovač U6K (Waters) či bezseptový dávkovač vlastní konstrukce⁴⁵ a pro detekci látek absorbujících v UV oblasti diferenciální UV analyzátor pracující při 254 nm s upravenou kyvetou objemu 10 μ l (Vývojové dílny ČSAV). Pro ostatní látky byl zakoupen diferenciální refraktometr firmy Knauer 2025/50. Analytické kolony o průměru 3,3 mm a délkách 150 - 300 mm stejně tak jako preparativní kolony a další součásti přicházející do styku s mobilní fází byly vyráběny v ústavních dílnách výhradně z nerezové oceli nebo polytetrafluoretylenu.

Příprava sorbentu pro adsorpční chromatografii na silikagelu byla vyřešena vytríděním silikagelu Kieselgel nach Stahl pro TLC (Merck) na vzduchovém tříděči Alpine MZR 100 ve Výzkumném ústavu nerostných surovin v Kutné Hoře a frakce 13 μ m a 29 μ m byly plněny do kolon pro analytické a preparativní účely. Silikagel uvedeného zrnění byl plněn do kolon v suspensi metodou Coguem⁴⁶ na plnicím zařízení zhotoveném na ÚACH. Jako čerpadla pro plnění, umožňujícího rychlý náběh tlaku až do maximálního tlaku až 60 MPa a průtoku 120 ml/min, bylo používáno adaptovaného vstřikovacího

⁴⁵ Plzák Z., Chem.Listy **72**, 549 (1972).

⁴⁶ Cog B., Gonnet C., Rocca J. J. Chromatogr. **106**, 249 (1975).

čerpadla naftového motoru z Prahy V3S. Tato plnička kolon se velmi osvědčila jak pro přípravu analytických, tak preparativních kolon, její jedinou nevýhodou byla nutnost práce v pozdních odpoledních hodinách, protože zvuková kulisa, kterou plnění kolon v laboratoři provázelo, byla intenzivní a neobvyklá. Obdobná plnicí sestava byla úspěšně využívána u prof. Jandery na VŠCHT Pardubice po mnoho let. Kolony naplněné částicemi 13 μm poskytovaly účinnost běžně vyšší než 10 000 teoretických pater/m, což v té době bylo srovnatelné s údaji publikovanými v chromatografické literatuře.

V roce 1976 jsem absolvoval měsíční studijní pobyt na Saarland University, Department of Applied Physical Chemistry v Saarbrückenu, u prof. I. Halásze, jednoho z významných strůjců renesance kapalinové chromatografie ve vysokoúčinnou variantu. Tento studijní pobyt nám pomohl prověřit správnost směru, kterým jsme se při zavádění HPLC na ÚACH ubírali, a dále zdokonalit techniku plnění kolon. To však již začínaly být v tuzemsku komerčně dostupné kvalitní kolony pro HPLC a vlastní přípravu jsme postupně používali jen u kolon pro preparativní chromatografii.

Zavedení vysokoúčinné kapalinové chromatografie na ÚACH bylo velmi zajímavou a úspěšnou epizodou mé vědecké kariéry. Bylo velmi příjemné být při tom, když určitý obor procházel bouřlivým vývojem jak v teorii, tak i v instrumentaci. Významnou pomocí byla v té době úzká a plodná spolupráce těch akademických a vysokoškolských pracovišť, které odhadly, že budoucnost analytické vysokoúčinné kapalinové chromatografie patří použití kolon plněných mikročásticemi o zrnění 10 μm a menším.

Výstupem práce na ÚACH byla nejen pomoc při syntéze nových sloučenin boru, která by bez účinné analýzy a i preparace

jednotlivých látek nebyla bez HPLC možná nebo byla daleko obtížněji proveditelná, ale i celá řada publikací, z nichž ty s chromatografickým zaměřením shrnuje přehledný článek v J. Chromatography⁴⁷. V této souvislosti velmi rád vzpomenu na spolupráci s prof. Janákem, který mi velmi pomohl svojí podporou a redakční radou v začátcích publikování našich prací v J. Chromatography. Původní konstrukční řešení stavebnice kapalinového chromatografu a sestavy na plnění kolon vedly i k několika přihláškám vynálezů a zlepšovacím návrhům.

Spolu s kolegy z Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie J. Heyrovského ČSAV jsme se zabývali i využitím sorbentu na bázi uhlíkaté černě připravené elektrochemickou redukcí polytetrafluoretylenu jako stacionární fáze pro HPLC⁴⁸. Bohužel však přes značný mezinárodní ohlas se nenašlo analytické chromatografické pracoviště v ČR, které by v té době systematicky ve výzkumu chromatografického využití tohoto unikátního uhlíkatého sorbentu pokračovalo, na ÚACH nebyl pro výzkum takového zaměření prostor.

Specifické chemické a fyzikální vlastnosti o-karboranu nás vedly i k původní přípravě sorbentu s chemicky vázanou fází siloxanového typu, kde použití o-karboranylové skupiny namísto oktadecylové skupiny slibovalo poskytnout sorbent s unikátní selektivitou. Tato očekávání se nenaplnila do té míry, která by vedla ke komerční přípravě takových sorbentů, jako tomu bylo u teplotně velmi odolných stacionárních fází pro plynovou chromatografii typu DEXSIL.

⁴⁷ Grüner B., Plzák Z., J. Chromatogr. A **789**, 497 (1997).

⁴⁸ Plzák Z., Dousek F. P., Jansta J., J. Chromatogr. **147**, 137 (1978).

Uvedený pohled do historie HPLC ukazuje, že již v prvních etapách svého vývoje nalézala HPLC uplatnění i mimo hlavní aplikační oblast organických sloučenin. Ukázala se jako mimořádně efektivní a perspektivní i pro oblast vyšších boranů, heteroboranů a sendvičových sloučenin boru. Od prvních aplikací v této oblasti, i když již s dokonalejší komerční instrumentací, slouží dosud jako rutinní a nepostradatelná metodika jak pro analýzu složitých reakčních směsí, tak i pro izolaci látek ze směsí v preparativním měřítku.

12. KAREL ŠLAIS



Karel Šlais se narodil 18. prosince 1948 v Praze. Absolvoval SPŠCH v Brně a tehdy Univerzitu J.E. Purkyně (1968-1973), nyní Masarykovu univerzitu v Brně, obor organická chemie. Od r 1974 je zaměstnán v Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně, kde stál u počátků oddělení kapalinové chromatografie vedeném M. Krejčím. Věnoval se zejména miniaturizaci kapalinové

chromatografie a elektrochemické detekci což byla hlavní témata kandidátské disertace (1979), ročního stipendijního pobytu na Ústavu analytické chemie Vídeňské univerzity, J.F.K.Huber, (1980) a dalších let. V roce 1986 absolvoval půlroční stáž na Free University Amsterdam, R.W.Frei, kde se zabýval použitím gradientové eluce a předkolumn v kapalinové chromatografii. V roce 1992 obhájil doktorskou disertaci na téma elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii. V roce 1993 byl jmenován vedoucím oddělení kapalinových separačních metod na UIACH AV ČR. Jeho zájem se postupně orientoval na fokusační elektromigrační metody včetně vývoje standardů pro izoelektrickou fokusaci. Je autorem a spoluautorem více než 100 publikací v zahraničních impaktovaných časopisech.

Jak jste tehdy mohli dělat vědu bez internetu?

Student PGS, 2005

POČÁTKY VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE V BRNĚ

Kapalinové chromatografii je v podstatě přes sto let (např. Smolková) [1]. O *vysokoúčinné kapalinové chromatografii* – či HPLC podle zkráceného anglického termínu *high performance liquid chromatography* se začíná ve světě mluvit od konce 60. let minulého století, viz např. přehled (Švec) [2].

V Brně se nástup této metody podařilo zachytit iniciativou J. Janáka, zakladatele a ředitele tehdejšího Ústavu instrumentální analytické chemie ČSAV (UIACh), který pověřil M. Krejčího a jeho skupinu, aby se touto metodou zabýval. Tato skupina se konstitovala jako oddělení 6. 2. 1974, kdy se statut ústavu změnil na Ústav analytické chemie ČSAV (zkratka UIACh přetrvává dodnes). V té době měl celý ústav 11 vědeckých, 4 vědecko-technické, 9 odborných a 10 technických pracovníků a dále řadu aspirantů, studijních pobytů a diplomantů. Další detaily lze nalézt např. v ročence [3] k 20 letům vývoje Ústavu analytické chemie ČSAV.

Do UIACh jsem se dostal v r. 1971 jako tzv. pomocná vědecká síla ve 4. ročníku na Katedře organické chemie UJEP v Brně. Pod vedením M. Kratochvíla jsem se tehdy podílel na výzkumu chlorace tetrahydrofuranu. Reakční produkty byly sledovány zejména plynovou chromatografií, avšak výsledky byly stále nepřehledné. Vadila zvýšená teplota při plynové chromatografii, která způsobovala rozklad reakčních produktů. M. Kratochvíl navrhl, abych se na problém podíval kapalinovou chromatografií, kterou dělali naproti přes ulici u Janáků, jak se tehdy UIACh říkalo. Absolvoval jsem přijímací pohovor u J. Janáka a dostal za úkol

prostudovat klíčové práce o HPLC, samozřejmě v angličtině, a do týdne mu o nich referovat. Zdá se, že jsem to zvládl, a pak mě uvedl do skupiny M. Krejčího.

BOD NULA

U podmínek a stavu výzkumu HPLC v Brně počátkem 70. let se trochu zdržím, z dnešního pohledu to spíš připomíná alchymii. Kapalinová chromatografie se dělala v tzv. velké laboratoři. V jedné velké místnosti bylo 7 lidí s psacími stoly a veškerou instrumentací, viz rohová místnost v 1. patře rohu dnešní Kounicova (2 okna) a Nerudova (1 okno).



Obr. 1: Budova, ve které sídlil starý ústav UIACh v přízemí a 1. patře rohu dnešních ulic Kounicova a Nerudova.

Na škole se o HPLC nic nevědělo, avšak v praktikách biochemie jsem se setkal s tenkovrstevnou chromatografií a amino-analyzátozem. Díly tohoto instrumentu, který zahrnoval i části jako čerpadlo, detektor, zapisovač české výroby jsem viděl i na UIACh. Klíčem HPLC na UIACh byly tehdy nerezové kolony o vnitřním průměru 2 mm, délky 50 cm, (Obr. 2 nahoře na stojanu vlevo), ručně za sucha plněné hlavně silikagelem tříděným síťováním.



Obr. 2: Autor u drátového transportního detektoru. V pozadí nahoře na stojanu kolona s dávkovačem a předkolona.

Plnění probíhalo poklepáváním kolony a pomalým přidáváním sorbentu po několik hodin. Ucpávky kolon byly z filtračního papíru a skleněné vaty. Průměr částic byl 20 – 40 mikrometrů. Mobilní fáze na bázi uhlovodíků byly regenerovány destilací ve skleněné aparatuře a sušené molekulárním sítem, regenerovaným žíháním v muflové peci. Vysokotlaká čerpadla byla pulzní, plunžrová nebo membránová, a proto tok musel být vyhlazen tlumičem rázů zhotoveným ze série manometrických trubic. Před separační kolonou byla sušící předkolona, sušila mobilní fázi na bázi uhlovodíků (Viz Obr. 2 – nahoře vpravo na stojanu). Vzorek se na kolonu dávkoval přes septový dávkovač (Obr. 2 nahoře vlevo) za použití vysokotlakých stříkaček. Ty byly drahé a netěsnily. Každý experimentátor měl nastavenou svou stříkačku ke svému dávkovači. Záměna k jinému chromatografu vedla ke spolehlivému ucpání vlivem vniknutí jehly do náplně kolony. K propojování dílů chromatografu se používaly mosazné fitinky vyrobené v ústavu. Nejčastěji používaným detektorem byl právě takový jako v amin-analyzátoru, t.j. UV detektor na 254 nm s příčně svícenou křemennou kapilárou. Signál z detektoru se vedl na registrační milivoltmetr s inkoustovým pisátkem, které nikdy pořádně nepsalo. Spotřeba registračního papíru byla značná už proto, že každý typ milivoltmetru potřeboval jiný papír. Podstatná část experimentu spočívala ve vyčerpávajícím boji s nulovou linií, která kolísala zejména v důsledku nedokonalého odplynění mobilní fáze. Když byly získány chromatogramy, vyhodnocovaly se za použití tužky, pravítka a logaritmického pravítka. Do publikovatelné podoby se zpracovávaly ručním překreslováním pomocí milimetrového, semilogaritmického či logaritmického papíru případně v průsvitné formě. Pro zhotovování výkresů sloužila originální předtištěná šablona, které se říkalo „duševní majetek“ viz Obr. 3.

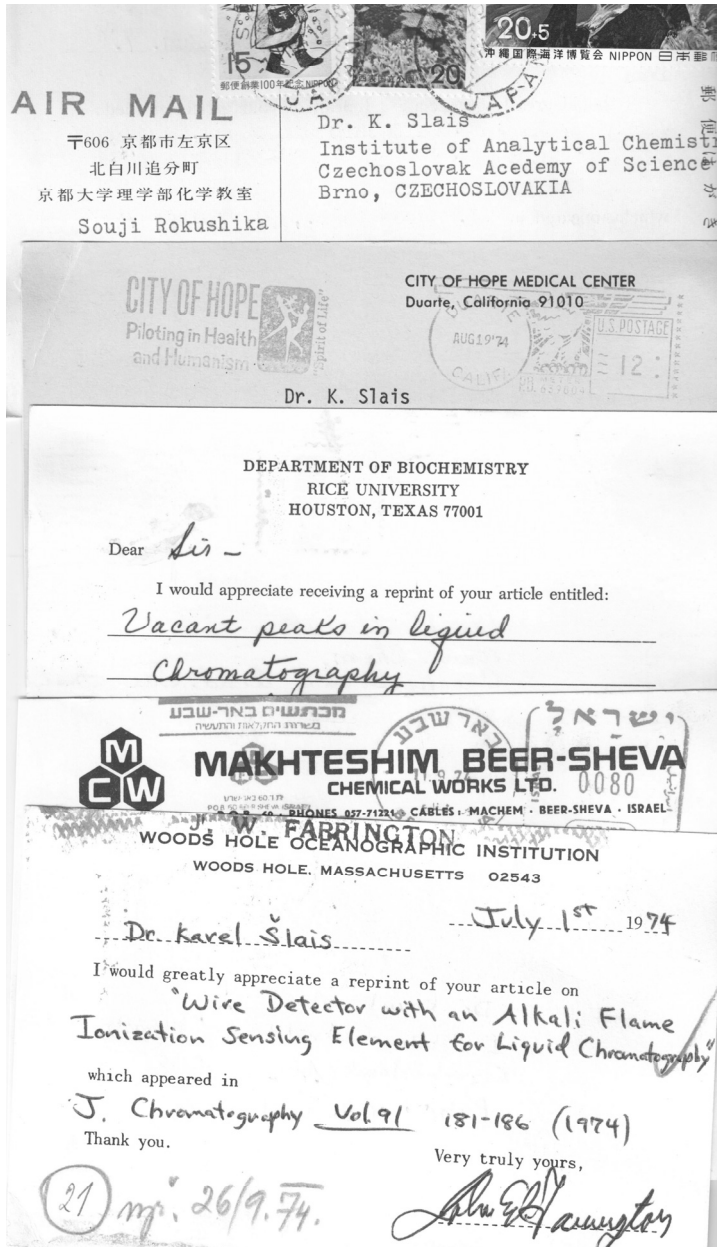
Tento dokument je duševním majetkem
Československé akademie věd

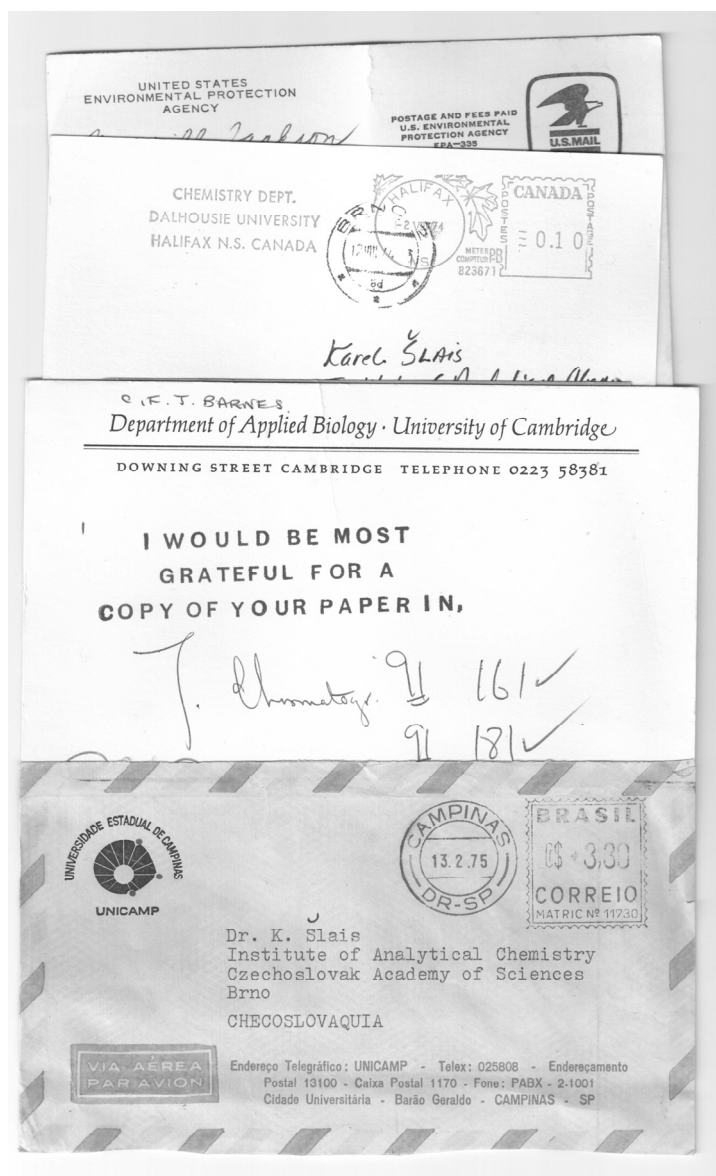
Díl				Množství		Název materiálu (Název výkresu)		
Měřítko	Vypracoval		Datum		Program			
	Schválil		Datum					
ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD ÚSTAV INSTRUMENTÁLNÍ ANALYTICKÉ CHEMIE		Název celku		Starý výkres				
		Název						
				Číslo výkresu				

Obr. 3: Výřez formuláře pro technické výkresy „duševní majetek“.

Bylo to náročné na oči. Kalkulačka, která uměla jen základní 4 matematické operace, byla velká jako dnešní desktop a byla jedna pro celou skupinu. Plánování experimentů se muselo dělat s ohledem na až roční lhůty pro přidělování deviz a objednacích procedur ze zahraničí. Pro celou skupinu byl 1 psací stroj a 1 telefonní přístroj přes ruční ústřednu. Protože tehdy ještě neexistovaly kopírky, tak se kopie článků, tzv. separáty, získávaly psaním žádank autorům. Totéž činili i autoři odjinud Obr. 4. Každý autor si je schovával na konec roku, kdy fungovaly pro tzv. houpačku – soutěž o nejúspěšnějšího autora. I v takových podmínkách počet a kvalita vyprodukovaných publikací byla přinejmenším srovnatelná s tehdejší standardem ve světě.







Obr. 4: Žádanky o kopie článků v časopisech.

Zpět k chlorovaným tetrahydrofuranům. Kromě termolability nešly detekovat UV detektorem. Tehdy se experimentovalo s transportním drátovým detektorem. Použila se modifikace s plamenovým detektorem s alkalickým kovem známým v plynové chromatografii jako selektivním detektorem na halogeny, viz Obrázek 2 a publikace [4]. Nakonec se podařilo reakční produkty chlorace separovat v mikropreparativním měřítku a strukturu určit pomocí NMR spekter v Lachemě Brno, M. Holík. Kromě diplomové a rigorosní práce se výsledky objevily i v publikaci [5].

Od tohoto bodu nula začal vývoj v řadě směrů. Instrumentace se zlepšovala díky spolupráci s k. p. Laboratorní přístroje Praha (J. Čoupek) a Vývojovými dílnami ČSAV Praha. Zásadní změna instrumentace, zejména pokud jde o materiály kolon, přišla s potřebou používat vodné mobilní fáze a nepolární povrchy sorbentů což bylo nezbytné pro separace látek významných ve farmacii, biologii a medicíně a dál k nezbytnosti zavedení instrumentace a sorbentů odolných vůči vodným roztokům o širokém rozsahu pH. Objevil se termín *chromatografie s obrácenými fázemi*, z angličtiny zkratka RP HPLC. Studenti to dnes moc nechápou.

Vývoj se odehrával i v oblasti prezentací výsledků. Na 3rd Symposium on Column Liquid Chromatography, Salzburg, září 1978 se přišlo s posterovými prezentacemi. Poster byl připraven typicky na jednom velkém srolovaném papíru, doba vyvěšení zlomek hodiny. Předpoklad - přednáška pro hlouček přítomných s ukazováním na poster. Několik desítek posterů v jedné místnosti. Dodržení časového harmonogramu i srozumitelnost byly velmi problematické.

Na konferenci Progress in Chromatography, 2nd Danube symposium, Karlovy Vary, duben 1979 měl přednášku prof. J. F. K. Huber, Vídeň,

o multidimenzionální kapalinové chromatografii. Promítání diapozitivů bylo ruční, asistentem. Diapozitivy se vysypaly během přednášky ze zásobníku. Při vracení diapozitivů po tmě, ve spěchu je pravděpodobnost správného vložení 1 : 8. A navíc i pořadí je čistě statistická záležitost. Vznikla tak podle slov přednášejícího „random presentation“.

Ekonomickým motorem HPLC ve světě byl zejména farmaceutický průmysl. Význam HPLC pro československou farmacii si včas uvědomil i J. Šubert (Laboratoř pro kontrolu léčiv KÚNZ, Brno), jehož příspěvím, viz např. publikace [6], byla zavedena HPLC do Československého lékopisu, ČSL 4 (1987), jako součást kontrolních metod.

MINIATURIZACE

Koncem 70. let byly aktuální diskuze o vlivu tzv. „stěnových efektů“ v náplňové koloně jako potenciální zábrany zmenšování průměru kolon. Byl to argument pro tehdy standardní 4 mm vnitřní průměr analytických kolon. Ještě při mé stáži ve Vídni v r. 1980 prof. Huber stále nepřijímal argumenty pro zmenšování průměru HPLC kolon. Jak se ukázalo, zhoršení účinnosti při použití úzkých kolon bylo způsobeno mimokolonovými příspěvky k rozmývání zón, a tak se potvrdil význam miniaturizace instrumentace HPLC tou měrou, že vznikl nový pojem *mikrokolonová kapalinová chromatografie*. Toto téma bylo nadále nosné pro celou skupinu v Brně. Miniaturizace šla až k testování kapilárních kolon mikronových průměrů s kapalnou stacionární na vnitřním povrchu. Díky miniaturnímu elektrochemickému detektoru vlastní konstrukce [7], viz Obr. 5a byly dosažené účinnosti separace na prázdné kapiláře o vnitřním průměru 16 mikrometrů (Obr. 5b) blízké teoretickým.

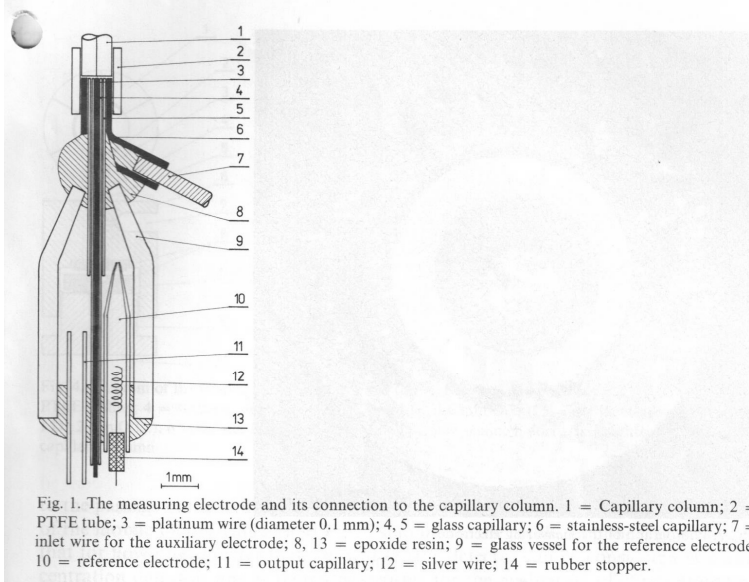
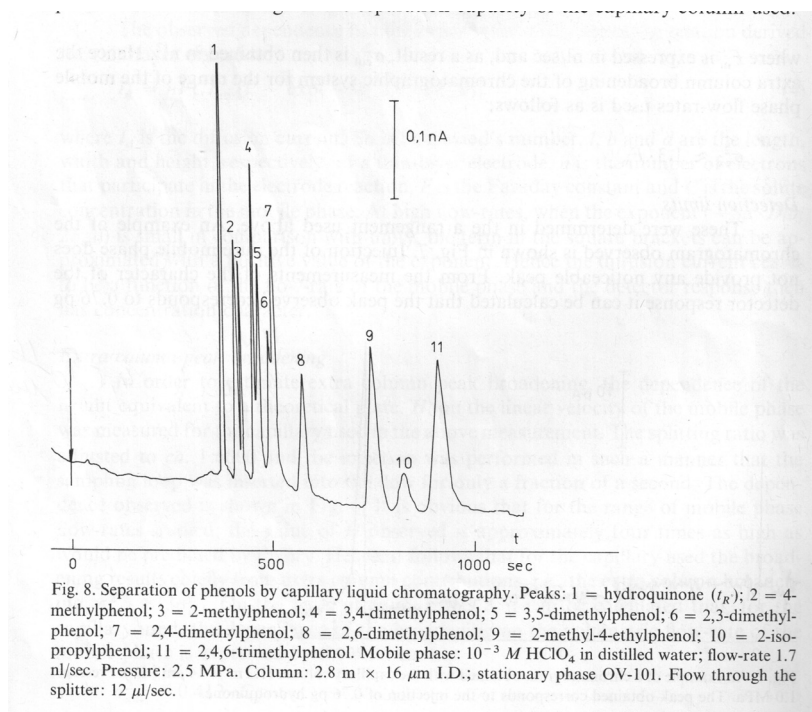


Fig. 1. The measuring electrode and its connection to the capillary column. 1 = Capillary column; 2 = PTFE tube; 3 = platinum wire (diameter 0.1 mm); 4, 5 = glass capillary; 6 = stainless-steel capillary; 7 = inlet wire for the auxiliary electrode; 8, 13 = epoxide resin; 9 = glass vessel for the reference electrode; 10 = reference electrode; 11 = output capillary; 12 = silver wire; 14 = rubber stopper.

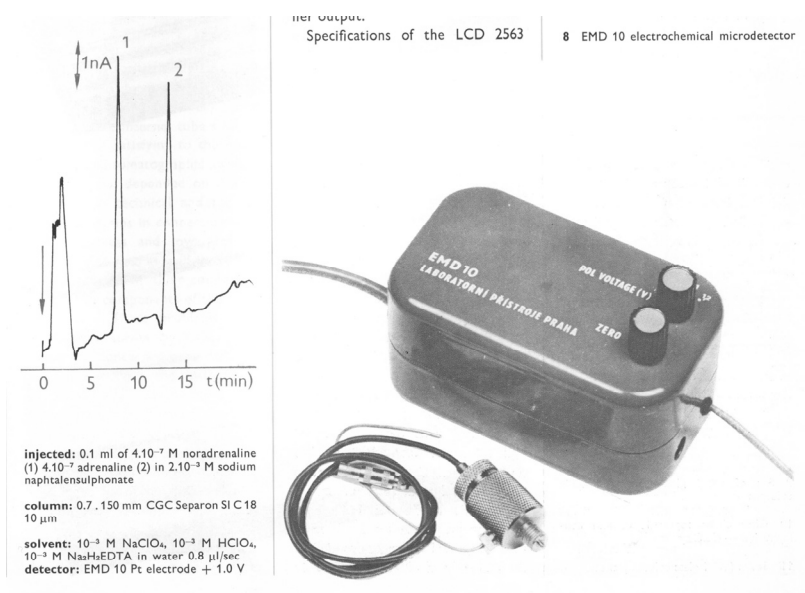


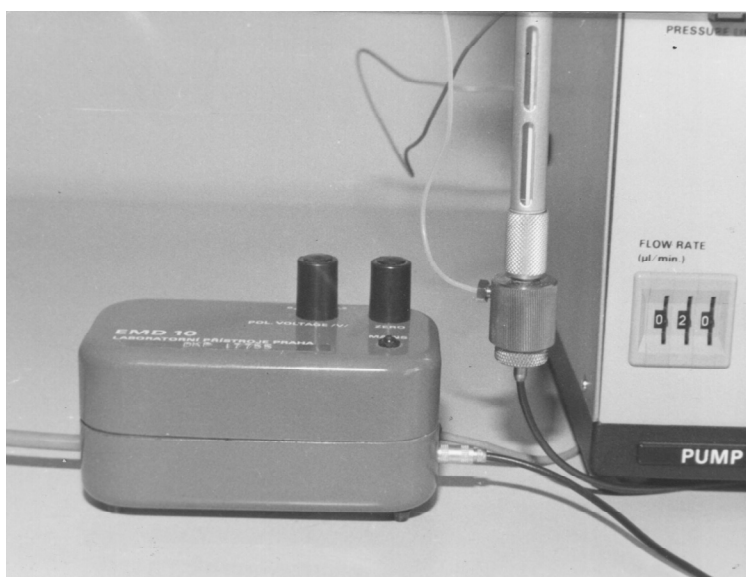
Obrázek 5: a – Nákres miniaturní elektrochemické cely připojené na výstup kapilární kolony, b – Chromatogram kapilární kapalinové chromatografie, ref. [7].

Kapilární kapalinová chromatografie v prázdných kapilárách je výzvou dosud. Samozřejmě, že tehdy byly kapilární kolony skleněné, stejně jako v plynové chromatografii. Vyráběl je na ústavu svou technologií K. Tesařík. [8]. Vzpomínám si, jak na výše zmíněné konferenci v K. Varech (1979) jeden přednášející prezentoval problémy GC způsobené kovovými ionty povrchu skla. Při diskusi po přednášce se jeden z účastníků (patrně z tehdejšího SSSR) zeptal, proč tedy nepoužívají kapiláry z taveného křemene. Celý sál se

tehdy na něj obrátil jako na úplného ignoranta, vždyť přeci každý věděl, že z křemene se kapiláry dělat nedají.

Výzkum mikrokolonové HPLC na UIACh v 80. letech vedl k řadě významných výsledků. Výzkum byl umožněn mj. i návrhem elektrochemického detektoru pro mikrokolonovou kapalinovou chromatografii [9], který se dočkal i průmyslové realizace v k. p. Laboratorní přístroje pod označením EMD10, viz Obr. 6, a publikace [10]. Tento detektor byl vhodný zejména pro kazetové skleněné náplňové mikrokolony produkované firmou Tessek, Praha (J. Čoupek) Obrázek 6a,b. Detektor EMD 10 byl základem pro simultánní konduktometricko-ampéromerický detektor [11] který byl zabudován i do mikrokolonového chromatografu zvaného Pikochromatograf.





Obr. 6: Elektrochemický detektor pro mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, průmyslová realizace v k. p. Laboratorní přístroje pod označením EMD10, ref. [9, 10].

Vývoj Pikochromatografu začal v r. 1985, Obr. 7a [12]. Dávkoč kapalin integroval v jedné vysokotlaké skleněné stříkačce funkci vysokotlakého mikročerpadla s možností programovaného binárního gradientu mobilní fáze s funkcí mikrodávkoč vzorku. Funkční vzorek řízený počítačem PMD 85 vznikl v r. 1987, kde byl ještě využit detektor EMD 10, viz Obr. 7b.

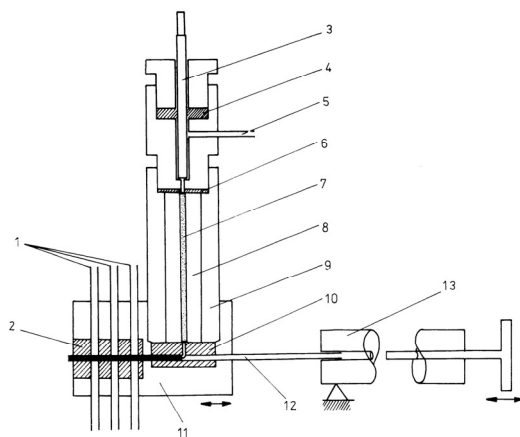
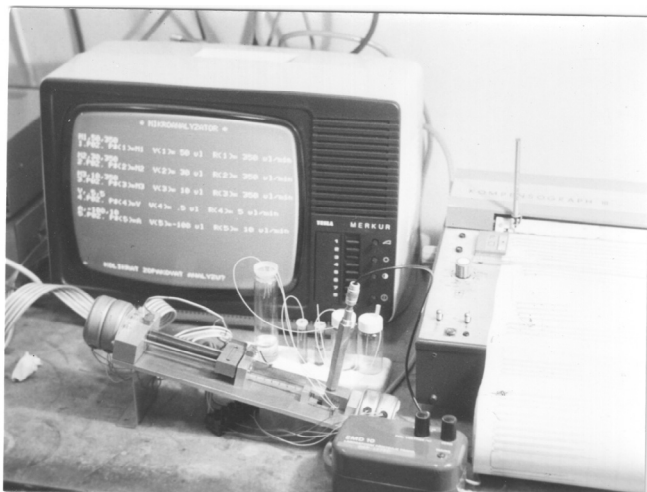


Fig. 1. Design of the micro-chromatograph. 1 = Mobile phase and sample inlets; 2 = PTFE seals for inlets; 3 = electrochemical detector electrode; 4 = silicone rubber seal; 5 = mobile phase waste; 6 = PTFE seal; 7 = column packing; 8 = glass column (30 mm \times 0.7 mm I.D. \times 7 mm O.D.); 9 = metal jacket of the column; 10 = combined seal of the column and the injection needle (with a 2 mm \times 0.15 mm I.D. coupling); 11 = liquid distribution block; 12 = injection needle (0.3 mm I.D., 0.5 mm O.D.) provided with a side outlet (0.15 mm I.D.) and closed at the end; 13 = syringe of volume 100 μ l.

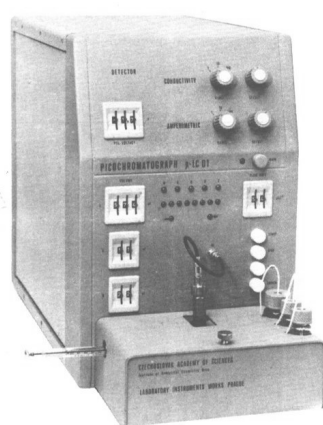


Obrázek 7: mikrokolonový kapalinový chromatograf. a – princip, b – funkční vzorek, ref. [12].

Prototyp průmyslově vyrobené verze byl vystaven na veletrhu Achema VI. 1988, viz Obr. 8 a na výstavě vědeckých přístrojů v září 1989 v Berlíně [13].

INFORMSERVIS

MICROCHROMATOGRAPH p LC 01



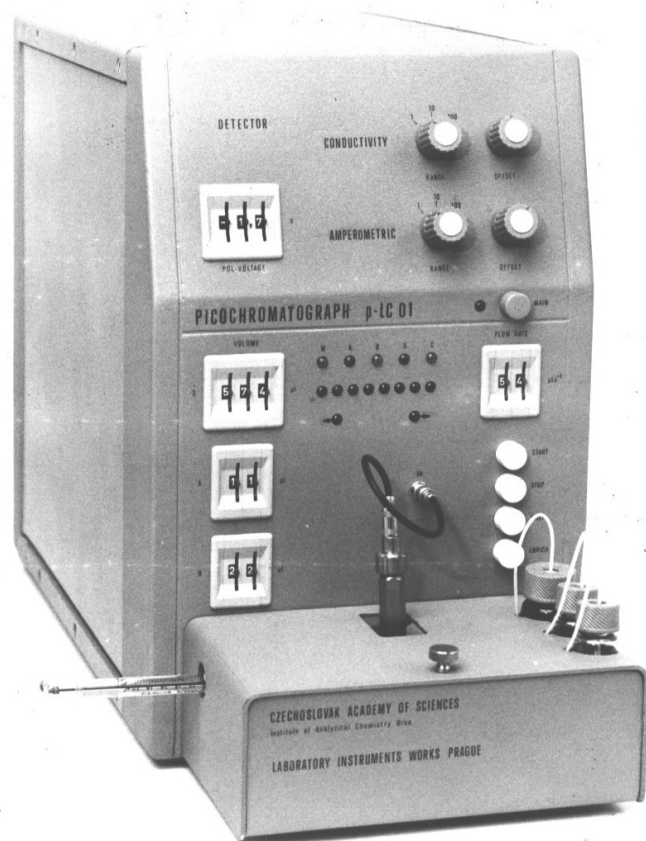
tion employed in research. It is applicable to the operation with both direct and reversed phases and is equipped as ion chromatograph. It works both in the isocratic and gradient regimes. Except a small volume of the injection channel made of a high-quality steel, the chromatograph is constructed from glass and poly-(tetrafluoroethylene) only. Its control is fully automated.

Microcolumns of the inner diameter of 0.2 to 0.5 mm are employed in the chromatograph. Column length may be from 30 mm to 300 mm. They are manufactured of thick-walled capillary tubes connected to the chromatograph by means of a metal jacket

common chromatographic analyses required in practice, the column efficiency of approx. 5,000 theoretical plates is sufficient for the injected sample volume of 100 µl.

The microchromatograph can be operated with detectors suitable for microcolumn liquid chromatography, e.g., with LCD 2040 variable-wavelength spectrometer, amperometric detectors EMD 10 or ADLC 1, and the like.

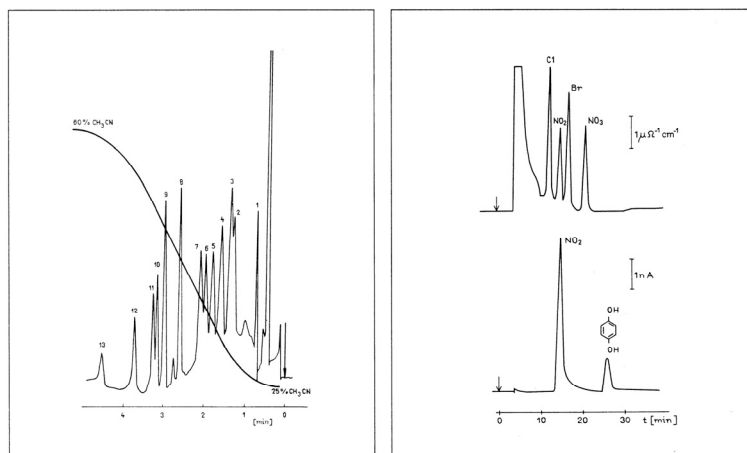
The built-in detector of microchromatograph p LC 01^{3,4} permits simultaneous amperometric and conductometric detection of solutes eluted from the microcolumn. It uses a single



Obr. 8: průmyslová realizace mikrokolonového kapalinového chromatografu „Pikochromatograf“ pod označením pLC 01, ref. [13].

Na Obr. 9 jsou ukázky separací aminokyselin 9a a iontů 9b [11, 12,13]. Zájem o přístroj projevilo několik firem, přístroj zřejmě předběhl dobu. V Berlíně té doby však svět sledoval davy občanů

NDR proudících přes Maďarsko do Rakouska a manažeři českého průmyslu začali mít jiné zájmy než vědecké přístroje.



Obr. 1 DNS deriváty aminokyselin
 Kolona: skleněná 0,7 x 30 mm, náplň: Silasorb SPH C 18, 7,5 µm
 Mobilní fáze: gradient mobilní fáze od 25 % do 60 % CH₃CN v 0,01 M
 acetatovém pufru pH 3,5
 Vzorek:
 1. DNS-L-cystein 2. DNS-L-asparagin
 3. DNS-L-glutamin 4. DNS-L-serin
 5. kyselina DNS-L-glutamová 6. DNS-hydroxy-L-prolin
 7. DNS-L-threonin 8. DNS-L-α-alanin
 9. DNS-L-prolin 10. DNS-L-phenylalanin
 11. DNS-L-leucin 12. di-DNS-L-tyrosin
 13. N,O-di-DNS-L-tyrosin
 (5 · 10⁻¹² molu každé aminokyseliny)
 Dávkování: 0,54 µl
 Detekce: EMD 10, Pt elektroda, potenciál +1, 2 V

Obr. 2 Příklad simultánní amperometrické a vodivostní detekce
 v jedné mikrokolonové iontopérové mikrokolonové chromatografii.
 Mikrokolona plněná Silasorbem C 18 (Lachema) je promývána 1 mM
 vodným roztokem tetrabutylamoniem – ftalátu. Z chromatogramu je
 patrné, že chloridový, bromidový a dusičnanový ion dávají pouze
 vodivostní odezvu, hydrochinon pouze amperometrickou odezvu,
 zatímco dusitanový ion, který je oxidovatelný a disociovaný dává
 jak vodivostní, tak amperometrickou odezvu. Chromatogram
 dokládá jak identifikační možnosti simultánní detekce, tak
 vzájemnou nezávislost obou měřených signálů.

Obr. 9: Záznam separací na pLC-01, a- záznam separace derivátů aminokyselin, b- záznam separace aniontů, ref. [13].

Přehled mikrokolonové chromatografie nejen na UIACh je v Krejčího monografii [14], která navazuje na Krejčího DrSc. disertaci v roce 1987. Foto z oslav obhajoby je na Obrázku 10.



Obr. 10: Na obhajobě titulu DrSc. M. Krejčího, jaro 1987. Zleva J. Janák, J. Čoupek, M. Krejčí.

V r. 1980 bylo rozhodnuto o výstavbě nového ústavu, Obrázek 11, ale ke stěhování došlo až po r. 1990, i když výstavba budovy byla zahájena jako rychlostavba. Od té doby vývoj HPLC v Brně dále pokračoval, jeho stopa je dobře zachycená v moderních médiích, takže je pro případného zájemce dobře dostupná. Obrázek nového ústavu a mnoho dalších skutečností viz <http://www.iach.cz>.



Obr. 11: Vize nové budovy UIACh.

ZÁVĚREM

Jak patrně, vývoj v posledních 40 letech nepřinesl jen převrat v komunikačních technologiích, ale i v kapalinové chromatografii.

LITERATURA

- [1] Smolková-Keulemansová E.: 100 výročí objevu chromatografie, život a dílo M.S.Cvěta, Chem. Listy 97, 134 (2003).
- [2] Švec F.: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? Chem. Listy 103, 266 (2009).
- [3] Annon.: 20 let vývoje Ústavu analytické chemie ČSAV v Brně, Brno, (1976).

- [4] Šlais K., Krejčí M.: Wire detector with an alkali flame ionisation sensing element for liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, *91*, 181 (1974). 4th. Symposium Advances in Chromatography, Sept. 25-27, Bratislava 1973.
- [5] Šlais K., Vaníček M.: Reactions of chlorinated tetrahydrofurans XIX. Polychlorination of Chlortetrahydrofurans. *Chemické Zvesti*, *31*, 109 (1977).
- [6] Šlais K., Šubert, J.: Determination of cis- and trans- isomers of dosulepine and dithiadene by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* *191*, 137 (1980). Progres in Chromatography, 2nd Danube Symposium, K. Vary, April 1979.
- [7] Šlais K., Krejčí M.: Electrochemical cell with effective volume less than 1 nl for liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, *235*, 21 (1982). Šlais K.: PV 5097-81, AO 220042, 4. 4. 1986.
- [8] Tesařík K., Hána K., Janíček M.: Výroba dlouhých skleněných kapilár pro plynovou chromatografii, *Chem. Listy*, *55*, 1467 (1961).
- [9] Šlais K., Kouřilová D.: Electrochemical detector With 20 nl volume for micro-column liquid chromatography, *Chromatographia*, *16*, 265 (1982). 14th ISC London, 1982.
- [10] Šlais K., Krejčí M., Pavlíček M.: PV 4635-82, AO 226985, 15. 1. 1986, Knapp S.: Kovo export, vol 32, April 1986, p. 13.
- [11] Šlais K.: Simultaneous conductivity and amperometric detector with a single cell for microbore liquid chromatography, *J. Chromatogr.* *436*, 413 (1988). Šlais K., Štikarovský J.: PV 07714-86 a AO 260057, 8. 1. 1990.
- [12] Krejčí M., Kahle V.: New principle of sample introduction integrated with mobile phase delivery for micro-column liquid, *J. Chromatogr.* *392*, 133 (1987). Krejčí M., M., Kahle V.: PV 8421-85, AO 257657.

[13] Annon.: Informservis, květen 1988, p. 5.

[14] Krejčí M.: Trace Analysis With Microcolumn Liquid Chromatography. Chromatographic Science Series 59, M. Dekker, 1992.

13. FRANTIŠEK ŠVEC

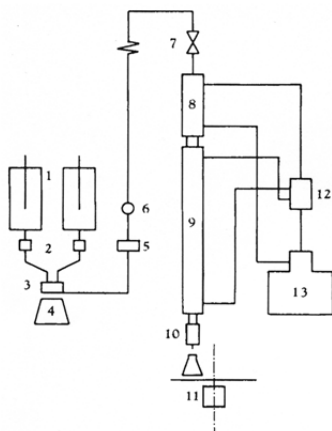


František Švec studoval na VŠCHT v Praze kde obdržel titul ing. a posléze i CSc. v oboru chemie polymerů. V roce 1976 přešel do Ústavu makromolekulární chemie ČSAV kde získal titul Dr.Sc. V roce 1992 se stal členem fakulty na Cornellově Universitě ve Spojených Státech. Od roku 1997 byl pak zaměstnán na Californské Universitě v Berkeley and od roku 2005

pak i v Lawrenceově Národní laboratoři v Berkeley. V současné době rovněž působí jako profesor na Pekingské Universitě Chemické Technologie. Během své vědecké kariéry publikoval přes 430 prací, které byly citovány zhruba 23 000 krát, editoval 2 knihy, a stal se spoluautorem na 75 patentech, z nichž některé našly uplatnění v praxi. Jeho h-index činí 86. V roce 2002 se stal presidentem CASSS (dříve California Separation Science Society). Je též vedoucím redaktorem časopisu Journal of Separation Science a členem redakčních rad významných časopisů v oblasti separačních technik. Z jeho prací jsou nejznámější ty, které se týkají porezních materiálů, zejména pak vývoj monolitických polymerů a jejich aplikací. Za tyto práce obdržel četné ceny včetně ceny Americké Chemické Společnosti.

MOJE VZPOMÍNKY NA CHROMATOGRAPHII V ČECHÁCH PO ROCE 1970

Dlužno předeslat, že jsem se zpočátku mých studií o chromatografii vůbec nezajímal. V retrospektivě mohu říci, že to se mnou bylo jako ve známém filmu *The Graduate* s Dustinem Hoffmanem v hlavní roli, kde mu jeden ze spoluherců říká: "Just one word ... Plastics. Great future in plastics." Mně rovněž učarovaly polymery. Po obdržení hrdých titulů Inženýr chemie a poté i Kandidát chemických věd jsem se jako čerstvý odborný asistent na *Katedře polymerů VŠCHT* v Praze věnoval od počátku sedmdesátých let výzkumu chemických modifikací polymerů směřovaných k novým materiálům. Leč, vše se záhy, alespoň z části, obrátilo. Profesor Jaroslav Kálal, který byl nejdříve mým vedoucím diplomové i kandidátské práce, a posléze jako vedoucí katedry i nadřazeným, obdržel kolem roku 1971 darem od doktora Poláčka z *Ústavu fyzikální chemie ČSAV* zařízení umožňující tzv. srážecí chromatografii polymerů, tj. metodu původně vyvinutou Bakerem a Williamsem v polovině padesátých let. Princip byl vcelku jednoduchý a zařízení je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma zařízení na preparativní frakcionaci polymerů podle Poláčka. 1- Nádoby na rozpouštědlo a srážedlo, 2 - solenoidní ventily, 3 - směšovač, 4 - magnetické míchadlo, 5 - odplyňovač, 6 -

zpětný ventil, 7 - solenoidní ventil k regulaci průtoku, 8 - horní část kolony, 9 - spodní část kolony, 10 - sifon, 11 - sběrač frakcí, 12 - ventilové relé, 13 - termostat.

Polymer se rozpustil a roztok smíchal v baňce s 0,1 mm drobnými skleněnými kuličkami neboli balotinou. Po odpaření rozpouštědla v rotačním odpařováku byl polymer nanesený v tenké vrstvě na skleněném nosiči, konjugát nasypán do horní části kolony, a ta posazena na spodní část. Ovládání ventilů kontrolujících zastoupení rozpouštědla a srážedla v mobilní fázi se dělo mechanickými relé stejně jako kontrola průtoku kolonou. Počáteční mobilní fáze byla bohatá srážedlem a podíl rozpouštědla se pozvolna zvětšoval. Nejprve se tedy rozpustily frakce s nízkou molekulovou hmotností, která pozvolna rostla, jak přibývalo dobrého rozpouštědla. Polymerní molekuly přešly do spodní delší kolony naplněné čistou balotinou, v jejímž plášti se vytvářel gradient teploty řízený termostatem, jenž napomáhal dělení. Celé monstrózní zařízení vysoké kolem 2 m bylo zakomponováno do klece ze železných úhelníků. Tento postup umožňoval získat dostatečné množství polymerní frakce nutné k určení distribuce molekulových hmotností polymerů daleko rychleji, typicky v rozmezí hodin, než tomu bylo u do té doby běžně používaného frakčního srážení, které se táhlo i týdny. Nicméně, jednotlivé frakce získané po odpaření rozpouštědla se stejně musely charakterizovat s použitím jiných metod jako viskozimetrie, rozptyl světla, či vylučovací chromatografie (SEC). Pokud mě paměť nešálí, mnoho výsledků z těchto experimentů nevzešlo a jediným publikovaným v lokálním časopise *Sborník Prací VŠCHT* bylo dělení kopolymerů vinylchloridu s vinylacetátem, jež závod v Loděnici u Berouna používal k výrobě gramofonových desek a měl potíže s nestejnou kvalitou jeho dodávek.

Na podzim roku 1972 jsem odjel na jeden rok postdokovat do Karlsruhe k profesorovi Vollmertovi, který byl znám pro své výzkumy v oblasti roztokového chování polymerních molekul, ale i pro teoretická zkoumání vzniku života na Zemi. Zde jsem se plně věnoval přípravě polymerů a o chromatografii jsem ani nezavádl. Po mém návratu zpět na VŠCHT se však situace začala měnit. V naší laboratoři se na zakázku v rámci tzv. vedlejší hospodářské činnosti, která umožňovala získat jistý přírůstek k jinak bídnému platu, začaly vyrábět porézní poly(styren-divinylbenzenové) částice. Účelem bylo připravit náplně do chromatografických kolon určených pro SEC, na jejichž nakupování v západním zahraničí nebyly fondy. Jelikož používaná standardní suspensní polymerizace produkovala směs částic se značnou polydispersitou, bylo nutné z produktu vysít frakce s požadovanou velikostí. To se dělalo za sucha s použitím sít, skrze které se částice doslova protlačovaly pomocí kartáče. Ten byl nejprve na „ruční pohon“, ale když si naše laborantka Máša začala stěžovat na úmornou dřinu, přešli jsme na mechanizaci vyvinutou katedrálním mechanikem. Síta byla přichycena na gramofon, jenž se otáčel nejpomalejší rychlostí 33 ot/min, a místo přenosky byl přidělán kartáč. Produktivita se tím příliš nezvedla, ale Máša mohla dělat užitečnější práci. Setí za sucha však sebou přinášelo i další újmu, protože všude ležela vrstva bílého prachu, tedy částic zviřených setím.

Kolem roku 1973 jsme byli inspirováni začínajícími výzkumy v oblasti reaktivních polymerů ve formě porézních sférických částic aplikovaných např. jako nosiče, katalyzátory, sorbenty, či separační media, jež se právě začala objevovat v literatuře. Naše předchozí zkušenost s lineárními polymery, zejména s polybutadienem obsahujícím reaktivní aldehydové a epoxidové skupiny, jakož i výše popsaná výroba zesíťovaných porézních poly(styren-

divinylbenzenových) částic nás vedla k závěru, že by bylo hříchem se nevěnovat výzkumu na tomto poli. Práci jsme si rozdělili. Zatímco kolegyně Eva Žůrková polymerizovala částice obsahující methakrolein (což často vedlo k pláči, neboť tento monomer je známý lakrymátor), já zkoumal přístupy k makroporézním částicím obsahujícím epoxidové skupiny. Bohužel, epoxidace zbytkových dvojných vazeb ve styren-divinylbenzenových kopolymerech s použitím perkyselin, jež se tak dobře osvědčila s polybutadienem, nevedla ke kýženému cíli. Z literatury a konzultací s kolegy jsem ale vyčetl, že existuje monomer zvaný glycidylmethakrylát. Ačkoliv v cizině byl komerčně dostupný, u nás se nedal sehnat, a tak jsem si zařídil jeho výrobu sám. Naštěstí to je z methakrylové kyseliny a epichlorohydrinu vcelku jednoduché. Z počátku jsem se však nedokázal odříznout od závislosti na polymeraci styrenu a divinylbenzenu. Porézní poly(styren-divinylbenzenové) částice měly v Československu velkou tradici a dobré jméno i v zahraničí, jelikož byly zkoumány na vysoké úrovni ve Výzkumném ústavu syntetických laků a pryskyřic v Pardubicích pro účely výroby iontoměničů. Jejich postupy se tedy daly snadno adoptovat a vedly k částicím se žádanými vlastnostmi. Takže jsem nejprve připravoval částice ze směsí všech tří monomerů. Epoxidy v nich byly, jak jsme dokazovali jejich reakcí s aminy, ale nějaké rozumné použití jsme pro ně nalézt nedokázali. Brzy jsme zjistili, že tudy zřejmě cesta nevede a bylo nutné přejít na jinou, kompletně methakrylátovou chemii a namísto divinylbenzenu použít jiné síťovadlo, ethylen dimethakrylát. Jakkoliv se to zdálo snadné, nebylo tomu tak. Směsi a polymerizační podmínky používané se styrenovými monomery zde prostě nefungovaly. Hlavním problémem se ukázalo být nalezení správných rozpouštědel, tzv. porogenů, přidávaných do reakční směsi, aby se dosáhlo požadovaných porézních vlastností. Ani úporné zkoumání

různých rozpouštědel nevedlo k cíli. Naštěstí se pomoc našla na *Ústavu makromolekulární chemie (ÚMCH) ČSAV* na Petřinách, kde Jiří Čoupek, o němž bude ještě řeč, připravoval makroporézní částice z kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu. Po konzultacích s ním a díky jeho radám se mi konečně podařilo můj systém ochotčit a získat požadované částice. První společná publikace pak vyšla v roce 1974 a stala se základem pro dlouhou serii článků zabývajících se různými aspekty těchto materiálů.

Rok 1976 byl pro mne přelomový. Byl jsem totiž vyzván, abych se ucházel o místo vědeckého pracovníka na ÚMCH, což jsem bez váhání učinil, protože pracovní podmínky díky prodané licenci na kontaktní čočky byly v tomto relativně bohatém ústavu mnohem lepší než na VŠCHT. Byl jsem přijat a nastoupil do Laboratoře vedené Jiřím Štambergem, která se po léta zabývala výzkumem ionexů, tedy opět částice. Pro vysvětlení: Ústav byl v té době členěn na vědecká oddělení a ta pak na jednotlivé laboratoře. Ačkoliv těžiště výzkumu celého ÚMCH spočívalo v přípravě a charakterizaci polymerů z 2-hydroxyethylmethakrylátu, tedy z monomeru, který byl předtím vyvinut profesorem Wichterlem. Jedním z nejznámějších produktů tohoto výzkumu byly právě světoznámé kontaktní čočky. Málokdo ale ví, že tento ústav byl rovněž plodnou línou na poli chromatografie. Hned několik jeho laboratoří vedených Josefem Jančou, Mirkem Kubínem, Jiřím Štambergem a Jiřím Čoupkem se drahně let angažovalo ve výzkumech souvisejících s chromatografií.

Tak např. Jančova *Laboratoř polymerní analýzy* se úspěšně zapojila do vývoje metod vylučovací chromatografie, tehdy ještě zvané gelovou permeační chromatografií, určených pro studium polymerů jako byl poly(vinyl chlorid) a jeho kopolymery a stereoisomery produkované v ústavu. Spolu se zdatným pomocníkem, Svatoslavem

Pokorným, který později odešel k pražské firmě Watrex, také zkoumali různé vlivy, které mohly ovlivňovat výsledky SEC. Janča sám pak v roce 1978 získal stipendium v rámci výměnného programu ČSAV a Národní akademie věd USA a pobyl rok na universitě v Salt Lake City, kde pracoval pod vedením věhlasného Cala Giddingse. Zde take zahořel láskou k FFF, což je zkratka pro separační metodu zvanou *field-flow fractionation*, kterou Giddings vynalezl. Po návratu z USA se však Janča na ÚMCH už příliš neohřál, neboť byl jmenován ředitelem *Ústavu analytické chemie ČSAV* v Brně, kde pak dál rozvíjel FFF. Po roce 1989 pak odešel do Francie, kde se po krátkém pobytu na Ecole Supérieure de Physique et Chemie Industrielles v Paříži, stal profesorem na Université de la Rochelle. V druhé polovině minulých dekad se pak vrátil do Česka a přijal místo profesora na Universitě Tomáše Bati ve Zlíně, kde dále rozvíjel mikrotermální mód FFF. Na toto téma též napsal vcelku úspěšnou knihu.

Jiřího Čoučka jsem zmínil již výše jako významnou pomoc při mém vývoji makroporézních částic na bázi glycidyl methakrylátu. V době, kdy jsme se poprvé potkali, byl již delší dobu zaměstnancem ÚMCH. Na rozdíl od Janči, který rozvíjel metodiku, Čoupek se soustředil na přípravu separačních medií, specificky na náplně kolon neboli stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii. Ti, kdo Jirku znali, ví, že byl velmi agilní, břitký diskutér, plynně ovládal ruštinu, němčinu a angličtinu a snadno navazoval kontakty s jinými lidmi. Angažoval se též politicky, což se mu během normalizace stalo osudným. Chromatografické ostruhy získal během stáže na universitě v německém Mainzu, kde pracoval pod vedením Waltera Heitze na gelové chromatografii malých molekul s použitím kolon plněných poly(vinyl acetátem) zesítěným divinyletherem butandiolu. Po návratu začal vyvíjet svá vlastní separační media a

není jistě náhodou, že byla připravována z 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylen dimethakrylátu. Zatímco suspenzní polymerizace ve vodě nerozpustných monomerů je relativně snadný úkol, práce s vodou rozpustným monomerem, jenž použil, byla výzva. Problém vyřešil vtipnou kombinací obou monomerů s ve vodě nerozpustnými rozpouštědly cyklohexanolem a dodekanolem, která jednak držela 2-hydroxyethylmethakrylát v organické fázi, a jednak sloužila jako porogen k řízené separaci fází během polymerizace a tvorbě požadované porézní struktury. Výsledky byly poprvé zveřejněny na IUPAC konferenci o makromolekulách ve finských Helsinkách v roce 1973. Nové částice dostaly od Čouпка nejprve jméno Uniflex, které bylo později změněno na Spheron, a nakonec byl komerční produkt zván Separon HEMA. V roce 1976 však spadla klec a Čoupek musel z politických důvodů z ústavu odejít. Naštěstí to nebylo daleko, protože zakotvil o několik bloků dál v národním podniku Laboratorní přístroje. Jeho ředitel, na rozdíl od ústavu, rozeznal obrovský Čoupkův potenciál a zaměstnal ho i přes jeho politický škraloup. V Laboratorních přístrojích Jirka vybudoval výrobu separačních medií a chromatografických kolon na světové úrovni. Sortiment náplní se rozrostl a posléze zahrnul i funkcionalizované materiály na bázi sférického porézního silikagelu.

Naše spolupráce však jeho odchodem neskončila. Jelikož o naše porézní glycidylmethakrylátové částice byl rovněž velký zájem, dostal jsem možnost zakoupit smaltovaný reaktor s objemem 50 litrů s kotvovým míchadlem, pro nějž jsme však neměli vhodný prostor. Jirka měl místo, ale neměl fondy na zakoupení odpovídajícího reaktoru. Tak jsem se s ním dohodl a reaktor skončil v jeho výrobě v Laboratorních přístrojích s tím, že ho budeme používat společně, což se i stalo. Dozvěděl jsem se, že nedávno se

tento veterán vrátil zpět na území ÚMCH. Naše téměř idylická koexistence na Petřinách dokonce vyústila happyendem. Jak Laboratorní přístroje tak i ÚMCH vystavovaly v roce 1979 chromatografické sorbenty a kolony na výstavě Incheba v Bratislavě. S Jirkou jsme se dohodli, že společně podáme tyto exponáty do soutěže o Zlatou medaili Incheby jako důkaz politicky korektní spolupráce vědy a výroby. Kupodivu, porota ocenila tento svazek a medaili zobrazenou na Obr. 2 jsme dostali.



Obr. 2: Zlatá medaile Incheby.

Zatímco Čoupek pokračoval ve vývoji materiálů, potřeboval též rozšířit škálu aplikací z původní SEC představené v roce 1973 na další separační mechanismy, zejména pak na ty umožňující separace

biologických polymerů jako jsou bílkoviny, tedy na iontově-výměnou a afinitní chromatografii. Především bylo nutné zamezit adsorpci bílkovin na povrchu pórů, která, ač mnohem menší než u typických chromatografických sorbentů, stále ještě přesahovala kýžený rozsah. Toho se dosáhlo hydrofilizací s použitím reakce s epichlorohydrinem následovanou hydrolýzou epoxidových skupin vedoucí k diolům. Tak vznikl Separon HEMA-BIO.

Jakmile byla k dispozici separační media, bylo nutné je zkoušet a vyvíjet metody pro jejich aplikace. Zde se osvědčila letitá spolupráce, kterou Jirka navázal s pracovníky *Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV* Otakarem Mikešem a zejména pak s Jaroslavou Turkovou. Celá plejáda publikací vznikla právě na základě této spolupráce a významně přispěla ke vnesení těchto materiálů jako užitečných pomocníků do podvědomí biochemiků.

Jak jsem již uvedl, Jirka Čoupek byl člověk podnikavý a ve spolupráci s firmou Senetec založil kolem roku 1987, tedy ještě za tuhého socialismu, společný česko-dánský podnik Tessek, jehož zbožím se staly separační media a kolony. Ani zde se naše interakce nezastavila. Hlavním nedostatkem produkce polymerních chromatografických materiálů klasickou suspenzní polymerizací je obtíž v přípravě co nejmenších částic a široká distribuce jejich velikostí. Pro úspěšnou chromatografii je však třeba mít malé částice v mikrometrovém rozměru s úzkou distribucí. Zatímco velikost částic byla definována použitým zařízením (vzpomeňme 50 l reaktor) i optimalizovaným postupem a nebylo možné ji dost dobře měnit, našly se však prostředky k zúžení distribuce. Přístroj od firmy Alpine v německém Augsburgu to dokázal dost dobře. Nicméně, frakce požadovaných velikostí representovaly pouze část produktu a pro zbytek nebylo upotřebení a musely být většinou vyhozeny. Řešením

by byla výroba monodispersních částic. Norský vědec John Ugelstad, s nímž se několikrát potkal, vyvinul metodu, jež poskytovala takové částice. Ty však byly z kopolymeru styrenu a divinylbenzenu a až na výjimky neporézní a v chromatografii nepoužitelné. Během našich diskusí s Jirkou jsme o tomto postupu několikrát mluvili, ale k akci došlo až v roce 1987. V Tesseku byl tehdy zaměstnán mladý muž jménem Vladimír Šmigol, absolvent VŠCHT, který měl zájem si udělat kandidaturu. Dohodli jsme se tedy, že tak může učinit na ÚMCH zatímco bude placený Tessekem, a jako téma si vzít právě přípravu monodispersních částic o velikosti pouhých několika mikrometrů. Tak se i stalo a Vladimír strávil na ústavu tři roky, kdy úspěšně vyvíjel tuto metodu. Vývoj se ovšem uskutečnil pro mně blízké kopolymery glycidylmethakrylátu a ethylendimetakrylátu, protože v Tesseku oblíbený hydroxyethylmethakrylát byl díky rozpustnosti ve vodě nepoužitelný. Po obdržení titulu kandidáta věd pak Šmigol odjel na dvouletou postdoktorální stáž do USA a do Tesseku se na podzim 1993 vrátil pouze na několik měsíců.

Bohužel, v té době nás opustil Jirka Čoupek a nová technologie se nikdy nerealizovala. Tessek byl po roce 1989 koupen kalifornským podnikatelem Melem Ebelingem, který si představoval, že firma bude fungovat na jeho „dálkové ovládání“, což samozřejmě nešlo a Tessek zbankrotoval. Nicméně zdá se, že posléze vstal z mrtvých, neboť jsem nedávno na jednom symposiu viděl stánek Tesseku a existuje i česká webová stránka, kde tato nyní pouze česká firma nabízí původní sortiment sorbentů a kolon, jakož i jisté další služby.

Kubínova laboratoř rovněž byla velmi aktivní ve vývoji chromatografických zařízení a metod. Jak bylo zvykem, soustředili se na použití 2-hydroxyethylmethakrylátového gelu. Jedna z ranných studií byla věnována tomu, co sami nazvali membránovou

chromatografií. Použili 1,5 mm silný proužek 2 % zesíťného gelu, který úspěšně aplikovali k separaci částic např. lidských erytrocytů. Na rozdíl od postupu dnes nazývaného membránovou chromatografií, při níž se separace dosahuje tokem napříč tenkou vrstvou, v Kubínově implementaci to byla metoda ne nepodobná tradiční tenkovrstvé chromatografii. Vzorek sa aplikoval jako „spot“ na začátek proužku a putoval gelem v podélném směru. Jakkoliv byl tento postup originální, věhlasu se nedočkal. Málokdo je rovněž obeznámen s tím, že se v laboratoři Mirka Kubína zrodila i první monolitická kolona, když hledali alternativní materiály, jež by mohly nahradit v té době velmi populární Sephadex používaný při separacích využívajících gelově-filtrační mechanismus, protože hydroxyethylmethakrylátové gely byly na ústavu připravovány v široké paletě porosit, nebylo od věci vyzkoušet jejich aplikaci i v této oblasti. Houbovitý elastický gel byl připraven radikálovou polymerizací 22 % vodného roztoku monomeru ve skleněné trubce, poté vyjmut, vyvařen ve vodě, aby se zbavil rozpustných součástí a zasunut do skleněné kolony, v níž byl i použit. Ačkoliv velmi malá průtočnost tohoto gelu dosahující pouhé 4 ml/h i nízká účinnost nedovolily docílit očekávaných separací a systém posloužil jenom pro jednoduché odsolení bílkoviny, tedy separaci velkých molekul od malých iontů, první monolitická kolona byla na světě.

Mirek Kubín se rovněž v polovině sedmdesátých let věnoval teorii SEC. Jeho studie byly relevantní s ohledem na skutečnost, že jednak v té době tyto teorie teprve vznikaly a jednak, že ústav je potřeboval k interpretaci měření polymerů v něm připravovaných.

Spolu s vědeckým aspirantem Stanislavem Vozkou též vyvinuli unikátní HPLC kolony z tvrzeného skla s použitím výměny sodných iontů skla za větší draselné při vysoké teplotě. Kromě dalších výhod

např. vzdorovaly tlakům do 30 MPa, což bylo mnohem více než komerční skleněné kolony a také umožňovaly pozorovat průchod separovaných zón kolonou, byly-li vidět. Laboratorní přístroje, kam později Vozka nastupil k Čoupkovi do zaměstnání, a poté i Tessek, komercializovaly tyto kolony. Za poznámku stojí, že známá sklářská firma Corning používá podobný postup k výrobě Gorilla Glass, skla, které se vyznačuje odolností vůči poškrábání a je dnes široce používáno v displejích mobilních telefonů.

V roce 1990 se Standa Vozka osamostatnil a založil firmu s poněkud kontroverzním názvem Labio, která se usadila v suterénu ÚMCH, kde sídlila až do nedávna. Vyráběli tam hlavně cenově přístupný hardware pro kapalinovou a plynovou chromatografii, jakož i kolony a separační media z porézního silikagelu nyní prodávané pod značkou Labiogel. V roce 2010 se pak firma pod novým vlastníkem přestěhovala do jiného místa na Petřinách.

Ještě na VŠCHT jsme začali zkoumat funkcionalizace našich glycidylmethakrylátových částic. Tyto práce zajímaly docentku Elišku Kálalovou, manželku již zmíněného a nedávno zesnulého profesora Kálala, která byla docentkou na *Katedře anorganické chemie VŠCHT* a věnovala se komplexům kovů. Naše částice s chelátotvornými skupinami ji zaujaly a záhy vznikla plodná spolupráce, která vyústila v sérii mnoha publikací na téma komplexotvorných sorbentů. Naše spolupráce se rozvíjela i po mém přechodu na ÚMCH. Jedním z pokročilých témat bylo měření kinetiky difúzního přenosu hmoty do pórů našich částic a kinetiky samotné komplexační reakce. Naší skupinku doplnil Miloš Marek z *Katedry chemického inženýrství VŠCHT*, jemuž takovéto výpočty byly denním chlebem. Část této studie byla zpracována s použitím částic různých velikostí, ale pro přesnější měření difúze by bylo lepší použít tenkou vrstvu ze

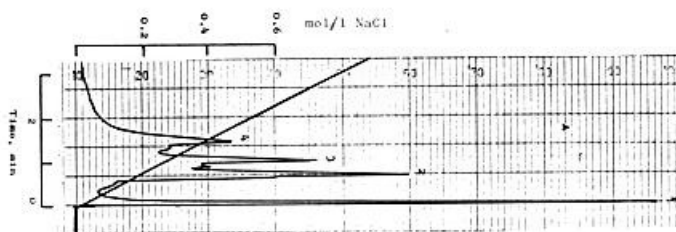
stejného polymeru, jako byly částice zabudované ve speciální dvoukomorové aparatuře. Naštěstí jsem věděl, že Jiří Vacík v ÚMCH dělal podobné pokusy s difúzí skrze poly(hydroxy methakrylátové) gely a vrstvy připravoval v doma vyrobené formě sestávající ze dvou hliníkových desek, v nichž byly kanály pro vyhřívání termostatovanou vodou, a na nichž byla nalepena polypropylénová folie bránící nalepení polymeru na povrch hliníku. Mezi tyto dvě desky byla položena polypropylenová vložka, jejíž tloušťka definovala sílu polymerní vrstvy. Tuto formu jsem si od Jirky půjčil a připravil několik polymerů ve formě vrstvy. Pokusy pak pokračovaly, leč vrstvy se nechovaly, jak by se očekávalo, k čemuž jsme tehdy nenašli vysvětlení. Studie se tedy týkala jenom pokusů s částicemi, byla v roce 1980 opublikována a zájem o porézní vrstvy opadl.

Leč, všeho do času. Další impuls k jejich vývoji přišel z leningradského *Ústavu makromolekulárních látek Akademie věd SSSR*, kde profesor Boris G. Běleňkij studoval chromatografii bílkovin v gradientově-elučním módu, při níž použil celou řadu separačních médií i kolon lišících se geometrií. Zjistil přitom, že pouze jistá, většinou velmi slabá vrstva sorbentu v koloně je postačující k dokonalé separaci, což vedlo k odvození teorie krátkých separačních loží. Příprava krátkých kolon potřebných pro experimentální ověření této teorie s použitím drobných částic se však ukázala velice obtížnou, protože jejich tenké vrstvy byly příliš neuspořádané a obsahovaly četné kanály. Nezbylo mu tedy než se poohlédnout po separačních mediích nového typu. Někdy v polovině osmdesátých let se Běleňkij objevil v Praze a při návštěvě ÚMCH mi o jeho teoriích zapáleně vyprávěl. Rovněž se ptal, jestli bych nevěděl o způsobu, jak jeho problém s krátkými vrstvami obejít. Nějak mi sepnulo a vzpomněl jsem si na naše porézní desky. Hbitě jsme jich opět několik udělali a poslali k testování. Fungovaly,

skutečně umožnily potvrdit teorii a docílit chromatografické separace bílkovin s tehdy nevídanou rychlostí. K jejich dokonalosti však ještě něco chybělo a bylo tedy na nich ještě třeba zapracovat. Chvíli jsme tak činili posíláním destiček většinou po poslu, tedy osobě z ústavu, která měla do Leningradu namířeno kvůli něčemu jinému. O výsledcích jsme buď korespondovali velmi pomalou poštou, nebo diskutovali při občasných vzájemných návštěvách. Tento způsob byl ovšem velmi nepraktický a pomalý. Aby se výzkum urychlil, dohodli jsme se s Běleňkim, že do Prahy pošle na rok jednu svoji mladou spolupracovnici. Vskutku, Tatiana Tennikova se v roce 1987 objevila v Praze, kde ale zůstala téměř 4 roky. Výzkum pak nabral na obrátkách a monolitické disky pro chromatografické separace bílkovin se staly realitou. Tatiana je nyní profesorkou na universitě a zástupkyní ředitele petrohradského *Ústavu makromolekulárních látek Ruské akademie věd* a dodnes pracuje s disky.

Za poznámku snad ještě stojí, že jsem nápad s použitím porézních desek k separacím konzultoval i s Mirkem Kubínem. Ten mne zrazoval od těchto experimentů, jelikož byl poučen jeho málo úspěšným použitím monolitického hydrogelu a též proto, že si uměl představit problémy značného tlaku potřebného k docílení toku v nepatrných pórech typických pro normální makroporénní částice. Opak se však ukázal pravdou. Docílit tok našimi disky bylo snadné a potřebné tlaky minimální. Měření totiž ukázala, že porézní struktura desek připravených polymerizací v bloku je významně odlišná od té pozorované v suspenzně polymerizovaných částicích. To nám také se zpožděním vysvětlilo, proč počáteční pokusy s měřením difúze malých iontů nedávaly žádný smysl.

Příprava našich desek, kterým se teď obecně říká monolity, byla jednoduchá. Získávaly se radikálovou polymerizací směsi, jež obsahovala monovinylický monomer s funkční či reaktivní skupinou jako je styren-, butyl- či glycidylmethakrylát, zesíťovadlo, typicky monomer se dvěma či více dvojnými vazbami např. divinylbenzen nebo častěji ethylendimethakrylát, iniciátor, a porogenní rozpouštědla. Tato směs se naplnila do formy buď plochého, nebo válcovitého tvaru, kde po zahřátí zpolymerizovala. Po vyjmutí se pak z desky či roubíku vyrobily mechanickým obráběním disky. Nebylo-li možné získat disk s požadovanými funkčními skupinami přímou polymerizací odpovídajícího monomeru, v následujícím kroku se chemicky modifikovaly. Dodnes se většina diskových separačních medií připravuje z glycidylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu, přičemž první z těchto monomerů umožňuje jejich snadnou modifikaci a uplatnění v celé plejádě technik zahrnujících obráceně-fázové, iontově-výměnné, hydrofobně-interakční a bioafinitní separace.



Obr. 3: Gradientová eluce bílkovin.

Disky jsme vkládali do po domácku, pro tento účel vyvinutého pouzdra a celá jednotka pak sloužila k separacím. Naše aktivity se nejprve soustředily na iontově výměnný mechanismus separace bílkovin gradientovou elucí. Obr. 3 ukazuje jednu takovou separaci na autentickém záznamu pořízeném na x-y zapisovači, proto je

časová osa zprava doleva, který byl napojen na jednoduchý UV detektor. Záhy jsme pak shromáždili dostatek výsledků a v roce 1988 jsme zaslali náš první rukopis, v němž jsme popsali disky a novou separační metodu, kterou jsme nazvali vysokoúčinnou membránovou chromatografií (HPMC), do *Journal of Chromatography*. Tam trvalo téměř celý rok, než nám sdělili, že článek neopublikují. Recenzenti nepovažovali tuto práci za dostatečně důležitou. Dodnes si rvu zbývající vlasy, že jsem si dopis s negativním rozhodnutím neschoval. Byl by krásným dokladem toho, jak mohou být recenzenti krátkozrací. Takže k opožděnému opublikování došlo až v roce 1990 v časopise *Journal of Liquid Chromatography*. V náš prospěch hovoří skutečnost, že jsme hbitě obdrželi na 300 žádostí o separát, tedy o kopie publikace, jež jsme tenkrát autorům poslali.

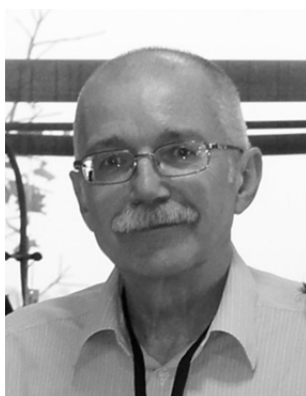
Na rozdíl od recenzentů, průmyslová komunita téměř okamžitě rozeznala potenciál naší metody využívající separační media v netradičním tvaru, a to jak na základě naší publikace, tak i díky presentacím posterů na symposiích. Posterů, protože na ústní přednášku jsme v té době nebyli ještě dost známí. Zástupci firmy Knauer GmbH se sídlem v Západním Berlíně se objevili v Praze a po krátkých jednáních zakoupili licenci na produkci a prodej disků. Záhy nato pak Knauer oddělil dceřinou společnost Säulentechnik GmbH, kde začal vývoj, při němž jsme já i Tatiana Tennova významně asistovali. První Quick-Disks®, jak byl produkt nazván, se dostal na trh v roce 1991. Nicméně shodou okolností, spočívajících podle mého názoru v nekompetentnosti vedení, firma Säulentechnik zkrachovala a licence propadla.

Jeden z původních zaměstnanců této firmy, který technologii dobře znal, ale který firmu opustil dávno před jejím krachem, byl Chorvat

Djuro Josič. Ten se zase znal s mladým ředitelem malé firmy BIA ve slovinské Lublani a o technologii mu pověděl. Ten k ní zahořel láskou, BIA zakoupila v Praze licenci a zahájila vývoj. Její situace byla o trochu snazší než u předešlého nabyvatele licence, protože už věděli, kde na ně čekala úskalí. Během krátké doby vyvinuli sérii materiálů, které se dostaly na trh a nesly obchodní značku CIM® Disks. BIA pak pokračovala ve vývoji nových formátů i chemických složení a dneska hraje důležitou roli ve výrobě separačních jednotek pro *downstream processing* v biotechnologických výrobcích.

Zde končí můj výlet do historie české chromatografie, jak jsem jí viděl a prožil já během zhruba dvaceti let po roce 1970. Bylo pro mne zajímavé se v duchu vrátit do té doby a namáhat paměť, protože písemné doklady, jako že bych si např. psal deník, nemám. A ty, co jsem snad měl, vzaly bohužel během časů za své. Trochu též pomohlo zkoumání dobových publikací hlavních aktérů. Toto říkám proto, že některé z mých postřehů nemusí být úplně správné a proto, že jejich pravdivost jsem, k mé neskonalé lítosti, už neměl s mnohými těmi, o kterých píši, možnost konzultovat.

14. STANISLAV VOZKA



Narodil se a vyrostl v jihočeském městečku Volyně. Po střední škole odešel studovat chemii na Přírodovědeckou fakultu UK do Prahy. Studia ukončil diplomovou prací a doktorátem v oboru polarografie v nevodných prostředích v roce 1972. Od té doby se věnoval jen kapalinové chromatografii. Sedm let si užíval vědy při stipendijním pobytu na Ústavu makromolekulární chemie. Po obhájení

dizertace na téma vysokoúčinná gelová permeační chromatografie a korekce tvaru píků v GPC jako kádrově neukotvený neměl jinou možnost než z Ústavu odejít. Přešel do Laboratorních přístrojů Praha, kde se mohl dále věnovat vývoji silikagelových sorbentů, chromatografických kolon a čerpadel. V LP jsem vydržel 11 let. Protože jsme některými s kolegy vývojáři měli v posledku na směrování firmy názory odlišné od vedení, rozhodl se na jaře 1990 LP opustit. Po krátké kariéře zemědělců v JZD Džbánov (okres Ústí nad Orlicí, středisko přístrojové techniky Praha) založil v září 1990 Labio a.s. Tím vlastně mohlo jeho CV skončit, protože na místě ředitele Labia pracoval 20 let. Dělali docela zajímavé věci v kapalinové a plynové chromatografii, ale záběr byl příliš široký na to, aby mohl být opravdu kvalitní. A jak se ukázalo, nic není na věky. A tak zase jednou musel odejít (2010) a zakládat novou firmu. V Separlabu teď přesluhuje jako jednatel společnosti a konečně má prostor věnovat se tomu, co podle svých slov snad trochu umí – preparativní kapalinové chromatografii.

HISTORIE KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE V ČESKOSLOVENSKU Z TROCHU JINÉHO POHLEDU

Laboratorní přístroje Praha byl národní, státní a posléze koncernový podnik, který vznikl v padesátých letech sloučením několika menších výrobců. Trpěl pochopitelně jako všechny státní podniky problematickým řízením, nedostatkem devizových prostředků i nenáročným a nenasytným sovětským trhem. Na druhé straně disponoval organizací výroby, za kterou by se žádný dnešní podnik pracující podle ISO 9001 nemusel stydět (včetně počítačového řízení). Rozsáhlá vývojová základna byla financována štědrými státními úkoly. Podnik úzce spolupracoval s výzkumnými pracovišti, především s Ústavem analytické chemie v Brně (plynová chromatografie). Výsledkem byla mimo jiné i zlatá medaile ze Světové výstavy v Bruselu 1958.

Akronym HPLC, který poprvé použil Csaba Horváth v roce 1970, v Československu zdomácněl poměrně brzy. V té době se ještě zkratka HP interpretovala spíše jako *high pressure* spíše než *high performance*. V Československu chyběla především továrně vyráběná přístrojová technika v potřebném sortimentu a kvalitě. Na druhé straně tehdejší vědecká pracoviště s takovou situací počítala a prakticky každý ústav (škola) disponoval dobrými dílenskými kapacitami. Byla to prostě doba nakloněná vývoji experimentálních technik, možná na úkor výsledků pomocí nich získaných.

Jedny z nejlepších dílen měl Ústav makromolekulární chemie. Ještě před nástupem HPLC Ústav vyráběl skříňové kapalinové chromatografy osazené kolonami průměru 10 mm. Gelová permeační chromatografie (*size exclusion chromatography*) se používala pro stanovení distribuce molekulových hmotností polymerů a na Ústavu byly pod vedením Jiřího Čoupka vyvinuty i

hydrofilní gely na bázi hydroxyethylmethakrylátu, polymeru, kterým ústav žil, protože se používal k výrobě měkkých očních čoček podle patentů profesora Wichterleho.

Za této příznivé konstelace jsem nastoupil na ÚMCH v roce 1971 jako vědecký aspirant do oddělení fyzikální chemie (vedoucí prof. Ing. Julius Pouchlý, DrSc.). J. Pouchlý byl mým oficiálním školitelem, protože skutečný školitel, Mirek Kubín, tuto funkci z politických důvodů vykonávat nemohl. Mým úkolem bylo rozvíjet metodu gelové permeační chromatografie, ale protože při nákupu komerčního chromatografu Waters R400, se kterým jsem pracoval, už nezbyly finanční prostředky na kolony, musel jsem si je, včetně sorbentu, vyrobit sám. Nejdříve jsem zkoušel Čoupkovy glykolmethakrylátové gely, ale výsledné píky byly asymetrické a pro výpočet distribuce molekulových hmotností jen omezeně použitelné.

Moje volba padla na sférický silikagel, který jsme (spolu s kolegou Kubínem, Porschem a Špačkem) vyvinuli a vyráběli podle originální patentované metody a modifikovali hydrotermálním zpracováním v autoklávu pro získání různě porézních materiálů, které GPC vyžaduje. Výsledný sorbent byl většinou deaktivován reakcí s trimethylchlorsilanem nebo hexamethyldisilazanem. Klasické kolony (10 x 900 mm) plněné novými silikagelovými sorbenty jsme v sadách po třech nebo pěti kusech zpočátku používali na zmíněném přístroji Waters. Ten ovšem, vybavený refraktometrem s velkým objemem cely a jen středotlakým čerpadlem, nebyl tím správným přístrojem pro HPLC.

HPLC nás všechny v té době oslnilo především neuvěřitelně vysokými účinnostmi kolon a krátkými časy analýz. Pro

chromatografii polymerů a stanovení jejich molekulových distribucí má vysoká kolonová účinnost zvláštní důležitost, neboť umožňuje lepší korekci výsledků na rozmytí píků (i když u vysokých hmotností se účinnost HPLC pochopitelně snižuje díky vysokým hodnotám difusních koeficientů). Rozhodli jsme se proto v roce 1973 použít principů HPLC v gelové permeační chromatografii.

V té době se na VŠCHT Praha dovezla dvě pístová čerpadla (*positive displacement pump, syringe pump*) firmy Varian. Tato čerpadla, byť poněkud obří, poskytovala zcela bezpulsní tok mobilní fáze při vysokém pracovním tlaku a relativně jednoduché konstrukci. Zkonstruoval jsem proto čerpadlo na stejném principu a dílny ÚMCH ho vyrobily. Nemaje krokové motory potřebného výkonu, použili jsme (Ing. Švantner, vedoucí oddělení elektroniky ÚMCH) systém řízení otáček pomocí tachodynamu. Přes počáteční obtíže s těsností se nakonec podařilo uvést stroj do uspokojivé funkce, nový typ těsnění z PTFE byl dokonce patentován. Vyvinuli jsme rovněž *stop-flow* dávkovač vzorku a zkonstruovali průtočnou kyvetu do UV spektrometru, který v té době vyráběly Vývojové dílny AV ČSSR. S použitím jejich digitálního voltmetru (se záznamem na děrnou pásku) a s počítačem Wang (programovaný v BASICU) jsme tak měli k dispozici kompletní HPLC - GPC chromatograf, včetně účinné počítačové metody korekce molekulárních distribucí na rozmývání píků.

Sférický silikagel, který jsme v té době už vyráběli laboratorně v asi půlkilových dávkách, bylo nutné třídit, což se nám (pomalu a ne moc kvalitně) dařilo v propojených sedimentačních nádobách o různém průměru. Samostatnou kapitolou byly kolony. Pochopitelně jsme neměli kvalitní leštěné nerezové trubky. Nahradili jsme je skleněnými trubicemi o vnitřním průměru 3 mm z Kavalieru Sázava

(materiál SIAL). Jejich povrch snesl samozřejmě nejpřísnější kritéria. Difuzí draselných iontů do skla (předválečný patent Corningu) za vysoké teploty se podařilo zvýšit tlakovou odolnost trubic až na několik stovek barů. Nemám k dispozici podrobnou rešerši tehdejšího stavu, ale myslím, že popsaný systém byl jednou z prvních aplikací vysokoúčinné gelové permeační chromatografie na světě.

Laboratorní přístroje se ve stejné době jako my na ÚMCH pustily do vývoje kapalinového chromatografu, který nesl určité charakteristiky HPLC. Membránové čerpadlo s nevýkonným krokovým motorem bylo však použitelné jen do tlaku 25 barů a UV detektor byl postaven na vysokotlaké rtuťové výbojce s jedinou vlnovou délkou – 254 nm. V době, kdy byl tento chromatograf zaváděn do výroby (1977), už byl Jiří Čoupek z politických důvodů odejit z ÚMCH a stal se zaměstnancem LP. Vytvořil v rámci technického úseku samostatné Středisko chemie, které vyrábělo glykolmethakrylátové sférické sorbenty (SPHERON, později kvůli problémům s ochrannou známkou, SEPARON), které byly plněny do kolon o vnitřním průměru 10 mm a délce 250 mm nebo 500 mm.

Na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let HPLC ovládla svět kapalinové chromatografie a systém LP rychle zastaral. Chybělo výkonné čerpadlo a především HPLC kolony plněné silikagelovými sorbenty a jejich modifikacemi. Podnik se proto rozhodl převzít jak čerpadlo, tak i sférický silikagel, které jsme vyvinuli na ÚMCH. Já jsem v té době dokončil aspiranturu, obhájil titul kandidáta věd a byl postaven před dilema - buď vstoupit do KSČ a pokračovat v kariéře vědeckého pracovníka na ÚMCH, nebo odejít. Dopadlo to tak, že i já jsem byl předán do péče Laboratorních přístrojů Praha.

Kolony plněné sférickým silikagelem byly dodávány na trh od roku 1979, nejdříve pod označím SEPARON SI VSK (Vozka, Špaček, Kubín). Později, vyráběný podle modifikovaného postupu, byl známý jako SEPARON SIX. Od počátku byly k dispozici modifikace C1, C8, C18 a CN. Později přibyl aminový a diolový derivát. Kolony byly z nerezové oceli (tovární způsob výroby v LP umožnil leštění jejich vnitřního povrchu) o vnitřním průměru 4 mm a 8 mm. Účinnosti kolon odpovídaly tehdejší světové špičce, protože LP už používaly pro třídění sorbentů kvalitní vzduchové třídičky Alpine. Mohly být proto dodávány i kolony plněné sorbenty v zrnění 5 μm .

Nový HPLC chromatograf LP (na trhu cca od roku 1981) byl svými parametry na úrovni tehdejšího dobrého světového průměru, i když velikostí a vahou ho značně překonával. Pístové čerpadlo z ÚMCH bylo rekonstruováno a vybaveno kuličkovým šroubem. *Stop-flow* dávkovač byl rovněž převzat a rekonstruován, (nicméně po celou dobu výroby představoval nejslabší článek sestavy, stejně jako ten původní z ÚMCH). Detektor s proměnnou vlnovou délkou byl kompletně vývojovým dílem LP a využíval tehdy v RVHP první holografickou mřížku z podniku Karl Zeiss v NDR.

Laboratorní přístroje v té době disponovaly silným přístrojovým střediskem vývoje kapalinové chromatografie, které bylo umístěno v detašovaném pracovišti, v montovaných přízemních stavbách v Praze Braníku, kde byla i prototypová dílna. Vedoucím pracovníkem v oblasti vývoje čerpadel byl Vladimír Řeřicha, jemu sekundoval L. Tajer. Za elektrické části přístrojů odpovídal L. Horálek. Vedoucím vývoje optických detektorů byl Ladislav Novák. Celé středisko bylo zařazeno do útvaru hlavního konstruktéra (tehdy Ing. Pavlíček).

V osmdesátých letech představovaly celé Laboratorní přístroje tu hezčí tvář socialistické ekonomiky. Moderní podnik, dobře technologicky vybavený (včetně švýcarských CNC obráběcích center), kvalitní vývoj, stabilně rostoucí odbyt. Vše tu ovšem probíhalo neskonale pomaleji než dnes. Pochopitelně prakticky nulová byla obchodní aktivita. O tu se – po svém – staral podnik zahraničního obchodu KOVO. Na ospalém dvorku představoval Jiří Čoupek neúnavného kohouta, který se zcela protivil tehdejšímu zvyklostem. Teprve po létech, když jsem se sám dostal do situace člověka, který marně bere ztečí hradby zavedených trhů, ocenil jsem jeho optimismus, tvrdohlavost a argumentační schopnosti.

Jiří vytvořil ze Střediska chemie LP jakýsi podnik v podniku, který si troufal exportovat na západní trhy, čehož se vedení podniku upřímně hrozilo. Exportující podniky se totiž rázem dostávaly pod politický drobnohled a chraň bůh, když proud dolarů jevil tendenci slábnout. Na druhé straně, my ve Středisku chemie jsme přes všechno nadšení nebyli schopni plnit maximalistické požadavky potenciálních odběratelů, nalákaných Čoupkovými sliby. Ale žili jsme v atmosféře toho, že děláme práci na světové úrovni, což tehdy v ČSSR rozhodně nemohl říkat každý.

Po negativních zkušenostech s první generací analytických chromatografických kolon převzalo Středisko chemie i jejich další vývoj. Nerezové kolony vyvinuté v LP v roce 1982 jsou na českém trhu i dnes (Tessek Praha). Naším tehdejším úspěchem však byla především nová generace skleněných kolon. Tyto kolony využívaly zkušeností z práce se sklem na ÚMCH (zpevňování), ale byly koncipované jako náplně (*cartridge*) vkládané do kovového pláště. Nové kolony byly vyráběny ze skla s vyšším obsahem sodíku (Sklárny Kavalier Otovice) a dosahovaly tlakové odolnosti až 500 barů.

Středisko chemie tak mohlo nabízet skrze PZO Chemapol „balík“ HPLC produktů sestávající z hydrofilních glykolmethakrylátových gelů s tehdy výjimečně vysokou tlakovou odolností, vysokotlakých skleněných kolon a kvalitního sférického silikagelu ve všech běžných modifikacích. V roce 1982 se dostaly do slibného stádia rozhovory s firmou Merck, Darmstadt, které nakonec vyústily v podepsání rozsáhlé dohody o spolupráci. Merck měl dlouhodobý zájem o organické gely a aktuální zájem o skleněné kolony.

Bylo štěstím, že naše patentová přihláška na skleněné kolony byla o tři měsíce starší než přihláška firmy Merck. Měli jsme neoddiskutovatelnou prioritu a Merck navíc nepoužíval tvrzené sklo. Jednání v Darmstadtu nebyla lehká, ale vyústila v dohodu, že Merck bude do Prahy dodávat sorbenty Lichrosorb a Lichrospher, které zde budou plněny do skleněných kolon LP. Dohoda o hydrofilních methakrylátových sorbentech byla rozsáhlejší a vycházela z publikačních údajů o SEPARONU HEMA, jak se tyto materiály nazývaly. Pracovníci chromatografického vývoje firmy Merck testovali i náš silikagel. Výsledky rozhodně nebyly špatné, byl už připraven i odpovídající název produktu, vedení firmy Merck však nakonec rozhodlo, že není v zájmu firmy nakupovat silikagelové sorbenty v Československu.

Realizaci dohody s firmou Merck provázely velké problémy. Sériově vyráběné skleněné kolony z neznámých důvodů po několika měsících praskaly a důvěra zákazníků se otřásala v základech. Po hektickém snažení se podařilo problém lokalizovat (šlo o mikrotrhliny na okrajích řezaných trubic) a upravit technologii tak, aby k praskání nedocházelo. Je však skutečností, že prodeje našich skleněných kolon pod značkou Merck už nikdy nedosáhly očekávaných výšin.

Ještě horší byla situace u hydrofilních organických sorbentů. Pověst těchto materiálů byla podložena úctyhodnou řadou publikací, které však vesměs využívaly jejich silných vlastností při speciálních aplikacích a o slabých se nezmiňovaly. Jakmile však byly testovány coby universální sorbenty pro biopolymery (především bílkoviny), ukázalo se, že mají řadu nepříjemných sorpcí a nejsou mechanicky dostatečně dlouhodobě stabilní. Oba problémy se podařilo postupem času v LP omezit nebo zcela eliminovat (mechanická nestabilita). Pro firmu Merck však už bylo pozdě. Z celé slávy tak zbyly jen plněné skleněné kolony a jejich pláště.

V polovině osmdesátých let Laboratorní přístroje zdokonalily pumpu převzatou z ÚMCH a vyvíjely vlastní typ reciprokého dvoupístového vysokotlakého čerpadla se safírovými písty. Vývoj ve světě se však v té době zdál přát více mikrochromatografii. Ta nabízela nezanedbatelné výhody. Jednak umožňovala používat skoro neomezeně drahé sorbenty (náplň kolony byla cca 0,1 g) a drahá speciálně čištěná rozpouštědla, jednak snižovala podstatně množství vzorku pro analýzu.

V této oblasti zachytily LP trend velmi rychle. Protože bránické středisko bylo plně vytížené, dostala vývoj mikrochromatografu na starost skupina Mirka Podoláka, která se předtím věnovala vývoji polarografů. Mirek přinesl (jak je u něj dodnes zvykem) do zavedeného pořádku nové myšlenky a zkonstruoval originální mikročerpadlo, které bylo svými parametry a především bezproblémovým použitím (ve srovnání s jinými mikrochromatografickými přístroji) na světové špičce. Systém byl doplněn skleněnými mikrokolonami o vnitřním průměru 1 mm se standardním pláštěm a UV detektorem s originální mikrocelou z VS Braník. Její objem byl jen 0,5 μ l a optika byla tvořena dvěma

leštěnými křemennými kuličkami, které koncentrovaly světelný paprsek do cely tvořené otvorem vyvrtaným napříč kovové kapiláry. Mikrocela je stále vyráběna firmou Ecom Praha s. r. o.

V roce 1985 tedy měly Laboratorní přístroje Praha vývojovou a výrobní základnu pro HPLC, za kterou by se (skoro) nemusela stydět žádná světová firma. Tato kvalita se však paradoxně stala příčinou konce slibného rozvoje. Jiří Čoupek a Středisko chemie navázalo novou spolupráci s partnerem v Kanadě, který dostal licenci na náš oblíbený chromatografický balík pro americký trh. Protože se už podařilo překonat některé problémy s organickými gely, byli jsme na další kolo boje o export lépe připraveni. Ne tak kanadská strana. Věci se sice zadržly, ale sorbenty a kolony z LP měly již tak dobrou pověst, že Čoupek mohl přikročit k realizaci svého snu. K vytvoření samostatného podniku, a to dokonce společného podniku se západním partnerem.

Jednalo se o věc v té době v Československu nevídanou. Nově vznikající firma TESSEK byla v republice teprve druhá svého druhu - podle toho také práce na nové organizaci probíhala. Oficiálně byla partnerem dánská firma SENETEK vkládající převážně finanční prostředky. Na české straně pak TESLA Brno, pod kterou spadaly Laboratorní přístroje jako koncernový podnik. Bylo třeba řešit řadu problémů, koordinovat aktivity, připravovat prospektové materiály. To vše v době, kdy oficiálně nesměl nikdo z nás samostatně jednat se západním kapitalistou a o každém jednání se měla podávat zpráva. Dnes opravdu těžko představitelné.

Mně osobně daleko víc vadilo, že z české strany se podstatným vkladem stal balík patentů a patentových přihlášek, o kterých jsem dobře věděl, že (některé) nemohou být úspěšně realizovány. Dnes

bych tehdejší problémy možná viděl méně kriticky, tehdy mě však chaotický a neseriózní průběh příprav Tesseku vedl k rozhodnutí, že se práce v nové firmě nezúčastním a zůstanu v LP Praha. Můj názor podpořila většina pracovníků vývojové sekce Střediska chemie. V LP jsem se stal (v roce 1986) vedoucím vývoje chromatografických a polarografických přístrojů. Zároveň bylo vytvořeno nové Aplikační středisko chromatografie, do kterého přešli ti chemici, kteří neměli zájem pracovat v Tesseku.

Dnes se konec osmdesátých let prezentuje jako stojatá husákovská bažina, ale přinejmenším v ekonomice to bylo docela živé období přinášející mnoho novinek. Vznikl koncept státního podniku, byly ustaveny volené rady pracujících, které formálně stály nad jmenovaným vedením podniku. Z dnešního hlediska jakási kombinace představenstva a dozorčí rady akciové společnosti. Volby do nové rady probíhaly v LP Praha kupodivu dosti svobodně, bylo víc kandidátů, ti veřejně prezentovali zaměstnancům své koncepce. Volby byly tajné.

V roce 1987 jsem se stal členem a posléze předsedou Rady pracujících LP. V realitě Rada neměla prakticky žádnou rozhodovací schopnost, už proto, že hlavním zájmem jejích členů bylo souznít s vedením a nepřijít o prémie. Já, jako předseda, jsem pak musel podávat (i když jsem nebyl členem KSČ) pravidelně zprávy závodnímu výboru KSČ. Přes to všechno jsem to vše bral naivně s optimismem.

Základním problémem chromatografických přístrojů, které byly v té době vyvíjeny a vyráběny, byla nedostatečná kvalita elektronické výbavy. V Evropě, v USA i v Japonsku se už nosily přístroje osazené mikroprocesory a schopné komunikace s počítači. My jsme bojovali

o to, abychom do vývoje získali alespoň nějaké počítačové vybavení, začali používat řízení pomocí procesorů a uvedli do provozu první integrátor.

Prvním chromatografem, ve kterém byla implantována procesorová technologie, byl plynový CHROM 6. Obsahoval dva, v tandemu pracující, osmibitové procesory Zaylog, vyráběné licenčně v NDR. Měl výrazně moderně koncipované plynové hospodářství (elektronická hmotnostní regulace průtoku všech plynů) a zajímavě řešený válcový termostat. Vše made in Ústav analytické chemie Brno.

CHROM 6 měl bohužel také obrovskou poruchovost. Vyrobito se asi dvacet kusů a servisní technici je byli nuceni neustále objíždět a seřizovat. Po dlouhých a bolestných jednáních byla příprava sériové výroby zastavena a urychleně se začal vyvíjet CHROM 7. Zároveň probíhala jednání s firmou PHILIPS SCIENTIFIC o licenci jejich výběhového typu.

V této atmosféře jsme se pokusili metodou velkého čínského skoku vyvinout procesorový kapalinový chromatograf se světovými parametry se zcela novým čerpadlem a v novém designu. Čerpadlo bylo dvoupístové, bezpulsní, s dvěma pomaloběžnými písty. Na principu čerpadla pro mikrochromatografii konstruoval Mirek Podolák. Předběhl o více než deset let firmu Waters s jejím modelem Millenium. Skříně nových (opět modulárních) přístrojů byly vyrobeny z PU pěny v tehdy módních zaoblených tvarech. Zařízení sestávalo z čerpadla, elektromotorem poháněného smyčkového dávkovače a fotometrického detektoru s proměnnou vlnovou délkou. Čerpadlo a detektor měly vlastní plnohodnotnou

klávesnici a LCD displej. Vyvíjel se automatický dávkovač pro 40 vzorků.

Prototyp nového HPLC chromatografu byl vystaven na AICHEMĚ 1988 a vzbudil zájem. K tomu, aby se prosadil na západních trzích, by bylo ale třeba marketingového úsilí, které nebylo PZO KOVO vlastní. Vývoj nicméně pokračoval a v roce 1989 se nové přístroje dostaly až do podnikové zkušebny. Tehdy však také zasáhla vyšší moc (dodnes nevím přesně odkud). Vývoj nového HPLC (včetně první československé počítačové data-stanice) byl zastaven. Oficiální linií podniku se stalo přizpůsobení se sovětskému trhu, který měl požadavky zcela odlišné od trhů západních. Vítězství tak slavily sestavy kapalinových chromatografů vyvinuté v první polovině osmdesátých let a starý dobrý plynový chromatograf CHROM 5 (řada těchto přístrojů je v Rusku ještě v provozu). Mně bylo nabídnuto místo v tehdy konstituovaném oddělení marketingu, což byla začátkem roku 1989 skoro urážka, i když oslazená dobrým platem.

Už mě nebavilo kývat na podle mého sebevražednou strategii vedení LP, a tak jsem odstoupil (v září 1989) z funkce předsedy Rady pracujících a na podzim roku 1989 jsem byl prakticky na odchodu z Laboratorních přístrojů. Po listopadu se začaly věci měnit, nikoli však v Laboratorních přístrojích. Rozhodli jsme se proto (chemici a vývojová skupina M. Podoláka), že z podniku odejdeme. Přes dočasné útočiště v JZD Džbánov (takové malé Slušovice), jsme se dostali až k založení soukromé akciové společnosti LABIO (zakládat s. r. o. v té době nešlo – chyběly zákony). Ta začala aktivně pracovat v září 1990. V prvních letech byly akcionářem Labia i Laboratorní přístroje Praha. Naší prací byl především vývoj přístrojů, které

podnik považoval za okrajové, ale zajímavé. Neměly s kapalinovou chromatografií příliš společného.

V roce 1991 jsme definitivně odešli z LP i fyzicky. V dalším roce LP skončily v konkursu, protože se kompletně zhroutil trh RVHP. Výrobu a další vývoj přístrojů pro kapalinovou chromatografii ale rychle převzala firma ECOM s. r. o. Sorbenty a kolony se dále vyráběly v podniku TESSEK, který přešel někdy v roce 1992 celý do majetku amerických podnikatelů, aby byl v roce 1994 za velmi zvláštních okolností poslán vlastní ředitelkou do konkursu. Ale to už je jiná historie.

V roce 1994 jsme v Labiu zase vyráběli sorbenty, plnili jak analytické, tak preparativní kolony. A v roce 1995 jsme pak dodali zákazníkům první čerpadla a sběrače frakcí pro HPLC.



