

## STRUČNÁ HISTORIE A SOUČASNOST PRŮTOKOVÉ INJEKČNÍ ANALÝZY A KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V ČESKÉ REPUBLICE

Článek je věnován dvěma analytickým metodám, k jejichž vzniku a rozvoji významně přispěli i čeští vědci.

PETR CHOCHOLOUŠ<sup>a</sup>, MIROSLAV POLÁŠEK<sup>a</sup>,  
PETR KUBÁŇ<sup>b</sup> a FRANTIŠEK FORET<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Akademiya Heyrovského 1203/8, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>b</sup> Ústav analytické chemie AV ČR, Veveří 97, 602 00 Brno, Česká republika

petr.chocholous@faf.cuni.cz

Došlo 5.9.21, přijato 20.9.21.

Klíčová slova: průtoková injekční analýza, kapilární elektroforéza, historie, milníky, současný stav

### Obsah

1. Průtoková injekční analýza
2. Kapilární elektroforéza
3. Přesah

### 1. Průtoková injekční analýza

Průtokovou injekční analýzu (FIA) vynalezli v roce 1975 Jarda Růžička (Čechoslovák) a Elo H. Hansen na Dánské technické univerzitě v Lyngby<sup>1</sup>. Výzkum této inovativní techniky v Československu začal počátkem 80. let na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Díky zkušenostem se spektrofotometrickými průtokovými měřeními byl jen malý krůček ke konstrukci FIA přístroje a jeho využití pro automatizaci analytických stanovení s využitím činidel. Taktéž malá dostupnost moderních a drahých přístrojů v tomto období pomáhala šíření technicky jednoduché FIA techniky. Od poloviny 80. let bylo publikováno několik prací v československých časopisech, po nichž následovala v roce 1989 (cit.<sup>2</sup>) první mezinárodně publikovaná práce v časopise *Analytica Chimica Acta* popisující systém pro stanovení močoviny v tělních tekutinách s využitím imobilizovaného ureázového reaktoru se sorbentem z porézního skla.

V tomto raném období bylo největší výzvou zkonstruovat zařízení, které by umožňovalo dávkovat přesné objemy vzorku do proudu činidla. Po mnoha pokusech umožnil ručně ovládaný ventil vyrobený ve fakultní dílně současně vstříknout dvou roztoků v rozmezí 20 až 200 mikrolitrů. Ke zkonstruování FIA analyzátoru už zbývalo vyrobit jen peristaltické čerpadlo, mísicí a reakční cívky a pro spojení

použít vhodné konektory (obr. 1). Tento analyzátor byl velice pokrokový a stal se vzorem pro sériovou výrobu. Naštěstí se našel i vhodný výrobce – Jednotné zemědělské družstvo 1. máj v obci Pouchov u Hradce Králové. Tento analyzátor FIA 20, vybavený fotometrem SPEKOL (vyrobeným ve východním Německu v tehdejší NDR) a zapisovačem grafů, se stal milníkem ve využívání FIA v Československu. V agrochemických a průmyslových laboratořích se rozšířil i díky výuce prováděné na Farmaceutické fakultě<sup>3</sup>. Koncem 80. let bylo vyvinuto mnoho protokolů pro stanovení s využitím různých činidel, včetně stanovení chloridů, amoniaku, dusitanů, dusičnanů, fenolů, boru a molybdenu v půdě, vodě a rostlinných materiálech. K dispozici byly také protokoly FIA pro stanovení vápníku, bílkovin a další klinických analytů. Klíčový podíl na počátcích a rozvoji FIA v této době měli prof. Rolf Karlíček, doc. Miroslav Polášek a prof. Petr Solich.

Po pádu železné opony v roce 1989 jsme mohli vycestovat do zahraničí a široce prezentovat náš výzkum na mezinárodních setkáních a v mezinárodních časopisech, kde se naše práce postupně stala uznávanou. Na 9. International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA) v Orlandu v roce 1997 jsme navázali úzkou spolupráci se zakladateli FIA a sekvenční injekční analýzy (SIA) – Jadou Růžičkou, Elo H. Hansenem a Garrym Christianem. Poté nám byla svěřena organizace 10. konference ICFIA v Praze v roce 1999. V roce 2008 jsme uspořádali první mezinárodní konferenci SIA v Hradci Králové, poté mezinárodní konferenci Flow Analysis v roce 2015 v Praze a společně s Jagellonskou univerzitou v polském Krakově konferenci FA&CE 2018 (Flow Analysis and Capillary Electrophoresis) v Hradci Králové.

Na přelomu tisíciletí se výzkum díky mladším vědcům rozšířil o novější SIA techniku – H. Sklenářová<sup>4,5</sup>; kombinaci metody SIA s monolitickou kolonou s názvem Sequential Injection Chromatography (SIC) – P. Solich, D. Šatinský a P. Chocholouš<sup>6</sup>; a techniku Lab-in-Syringe využívající rezervoár pístového čerpadla jako reakční/extrakční komoru – B. Horstkotte<sup>7</sup>. Úzká spolupráce s výrobcí průtokových analyzátorů (FIALab a GlobalFIA, oba z USA) podpořila významný vývoj v konstrukci čerpadel a průtokových systémů. České laboratoře navštívila a spolupracovala na výzkumu řada vědců zabývajících se průtokovou analýzou a příbuznými technikami z Rakouska, Švédska, Slovenska, Ukrajiny, Ruska, Portugalska, Španělska, Německa, Argentiny, Brazílie, Japonska, Austrálie, jmenovitě Jarda Růžička s podporou prestižního Fulbrightova programu v roce 2008. Významný počet automatizovaných metod pro SPE (Solid Phase Extraction – extrakce tuhou fází), včetně testování nanovláken jako sorbentů SPE<sup>8</sup>, SIC<sup>9</sup>, různých miniaturizovaných metod LLE<sup>10</sup> (Liquid Liquid Extraction – extrakce kapalnou fází) včetně techniky Lab-in-Syringe, a dokonce i extrakce do



Obr. 1. FIA analyzátor zkonstruovaný na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy a vyrobený ve spolupráci s Jednotným zemědělským družstvem 1. máj v obci Pouchov u Hradce Králové (80. léta 20. století). Vícekanálový analyzátor vybavený dvěma peristaltickými pumpami, dvojitým dávkovacím ventilem a jednotkou s mísicími body; optická detekce pomocí fotometru Spekol s průtokovou celou.

jedné kapky v plně automatizovaném režimu<sup>11</sup>. Metody přípravy vzorků byly online spojeny s HPLC<sup>12</sup>, GC<sup>13</sup> nebo ICP<sup>14</sup>. Dalším zaměřením výzkumu je sledování kinetických profilů uvolňování účinných látek z nových farmaceutických přípravků<sup>15</sup> nebo sledování interakcí mezi účinnými/toxickými látkami a buněčnými membránovými transportéry v reálném čase<sup>16</sup>. Na dlouhý seznam publikovaných článků v renomovaných časopisech ISI navazuje několik národních patentů a hostování online tutoriálu o průtokové injekční analýze na serveru Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, jehož autorem je Jarda Růžička<sup>17</sup>.

V posledních 25 letech se v České republice zabývaly rozvojem průtokové analýzy i další skupiny z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

#### Milníky ve vývoji průtokové analýzy v České republice

1985	první přístroje FIA
1998	spojení FIA-SPE pro online extrakci
2001	chemiluminiscence v SIA
2002	první přístroj SIA (a software)
2002	SIA-SPE pro online extrakci
2002	SIC (sekvenční injekční chromatografie)
2003	sledování uvolňování léčiv z lékových forem na bázi SIA
2009	1. generace komerční SIC
2010	DLLME (disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina) využívající dvouventilový SIA
2015	2D SIC
2016	sledování permeace léčiv přes buněčnou monovrstvu na bázi SIA
2018	2. generace komerční SIC
2018	LIS GC (spojení Lab-in-Syringe s plynovou

	chromatografií)
2019	LIS HPLC (Lab-in-Syringe s kapalinovou chromatografií)
2019	SIA + 3D tištěné části analyzátoru

## 2. Kapilární elektroforéza

Elektroforetické analytické metody mají dlouhou historii, počínaje základní teoretickou prací Kohlrausche<sup>18</sup> z roku 1897, přes počátek minulého století, kdy se objevily práce Tiseliusa o mobilitách slabých elektrolytů<sup>19</sup>, práce Hjertena<sup>20</sup> a Virtanena<sup>21</sup>, které stanovily základní koncepty elektromigračních technik, jako je izotachoforéza (ITP) a kapilární elektroforéza (CE).

Historicky mají v bývalém Československu elektroforetické metody, jako je analytická elektroforéza a izotachoforéza, dlouhou tradici a studovaly se od 60. až 70. let 20. století. Kolem roku 1970 byl k dispozici první komerční izotachoforetický přístroj švédské firmy LKB, který bylo možné s určitými úpravami použít i pro elektroforézu v teflonových kapilárách. Byla to šťastná shoda okolností, že vědci z vědeckých institucí bývalého Československa měli velmi dobré kontakty s univerzitou v Eindhovenu v Nizozemsku a jedním z průkopníků ITP a CE, profesorem F. M. Everaertsem. Na průkopnických pracích v oblasti elektroforézy se podílelo několik institucí, především Univerzita Karlova, Ústav analytické chemie ČSAV v Brně a Univerzita Komenského v Bratislavě. Pravděpodobně jednou z prvních publikací je společná publikace prof. Jiřího Vacíka a F. M. Everaertse o využití protiproudu v izotachoforéze<sup>22</sup>. Jedním z dalších spoluautorů této publikace byl Jiří Zuska, který se později proslavil prací na konstrukci bezkontaktních vodivostních detektorů<sup>23</sup> (spolu s prof. Bohuslavem Gašem z Univerzity Karlovy). Inspirován Everaertsovou prací přispěl prof. Petr Boček a jeho spolupracovníci z Ústavu analytické chemie v Brně významně k rozvoji teorie a metodiky moderní elektroforézy. K pokroku této nově se rozvíjející techniky přispěl i prof. Dušan Kaniánský z Univerzity Komenského v Bratislavě, který mimo jiné inicioval výrobu nového komerčního přístroje pro analytickou izotachoforézu ve Spišské Nové Vsi na Slovensku. Společnost Villa Labeco<sup>24</sup> má nyní téměř třicetiletou historii úspěšné výroby různých elektroforetických přístrojů. K teoretickému i praktickému rozvoji kapilární elektroforézy významně přispěli i další badatelé, například prof. Zdeněk Stránský<sup>25</sup> z Univerzity Palackého v Olomouci nebo prof. Vladimír Jokl (Joklova rovnice pohyblivosti iontů)<sup>26</sup> z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy a jejich spolupracovníci. Historické milníky ve vývoji izotachoforézy a kapilární elektroforézy v České republice/Československu byly nedávno publikovány v přehledových článcích<sup>27,28</sup>.

Průběžným rozvojem od průkopnických prací vědců v Praze, Brně a Bratislavě si elektroforetické analytické techniky získaly své stabilní místo téměř ve všech laboratořích v České republice. Jmenujme jen několik významných pracovišť, která se výrazně zasloužila o rozvoj elektroforézy, a připomeňme práci profesora Bohuslava (Boba)

Gaše na Univerzitě Karlově, který v roce 1996 převzal výzkumnou skupinu po profesoru Vacíkovi. Je autorem známých elektroforetických simulačních programů PeakMaster<sup>29</sup> a Simul<sup>30</sup>, které umožňují provádět počítačové simulace elektroforetických separací. Bob Gaš byl také jedním ze spoluautorů dvouelektrodového bezkontaktního vodivostního detektoru<sup>31</sup>. Tento detektor donedávna vyráběl zesnulý elektrotechnik Jiří Zuska (2020) a jeho firma Admet. Zásahu na pozdější vývoji různých metod využívajících detektor C4D Jiřího Zusky má i Petr Tůma na Univerzitě Karlově, který jej aplikuje v lékařském výzkumu.

Ústav analytické chemie AVČR v Brně je bezesporu nejznámější svým přínosem k rozvoji a propagaci elektroforetických technik. Teoretické práce prof. Petra Bočka a Dr. Petra Gebauera vysvětlily mnoho jevů, které se vyskytují při elektroforetických separacích. Jednou z nejcitovanějších prací je práce o separaci aniontů v pitné vodě z roku 1983 (cit.<sup>32</sup>). Mezi další významné výzkumné práce patří vývoj CE děliče vzorku (sample splitter) od Demla a spol.<sup>33</sup> nebo využití absorpce koiontů v nepřímé UV detekci<sup>34</sup>. Další významný přínos k instrumentálnímu využití elektroforézy a jejímu propojení s hmotnostní spektrometrií dosáhl současný ředitel ústavu Dr. František Foret, který strávil významný čas na Barnettově institutu v Bostonu v USA a ve výzkumu CE-MS pokračoval v Brně. Vývoj CE, vedený mladšími vědeckými pracovníky, Dr. Pavlem Kubáněm, doc. Petrem Kubáněm, Dr. Janou Křenkovou a dalšími kolegy na odděleních elektromigračních metod a bioanalytické instrumentace, směřoval i k praktickým/klinickým aplikacím.

Dalšími institucemi a vědeckými pracovníky v České republice, kteří se aktivně zabývají kapilární elektroforézou, jsou prof. Václav Kašíčka na Ústavu organické chemie a biochemie AVČR v Praze, zabývající se rozvojem teorie, metodologie a instrumentace kapilárních elektromigračních metod a jejich aplikací pro separaci, analýzu a fyzikálně-chemickou charakterizaci (bio)molekul. Dále pak jsou to vědci na Univerzitě Palackého v Olomouci (prof. Lemr, prof. Ševčík, doc. Bednář, doc. Barták, doc. Petr), kteří se zabývají studiem elektrochemické konverze, ionizací při hmotnostně spektrometrických měřeních nebo online prekoncentrací v kapilární elektroforéze a spojením CE s ICP-MS při analýzách biologických, forenzních a archeologických vzorků, a doc. Pospíšilová s Dr. Urbánkem pracující na spojení ITP a CZE.

Řada členů výzkumných týmů je členy redakčních rad významných analytických časopisů (F. Foret, B. Gaš, V. Kašíčka) a v Brně je každoročně pořádána mezinárodní konference CECE (Central European Capillary Electrophoresis).

### 3. Přesah

Není náhodou, že se v tomto článku hovoří současně o metodách průtokové analýzy a kapilární elektroforéze. Kombinace automatizovaných schémat průtokové úpravy vzorků se separačními technikami, jako je CE, může obecně zvýšit analytický výkon obou analytických technik. To

si uvědomili již před více než 20 lety Petr Kubán a Bo Karlberg na Stockholmské univerzitě, kde byl publikován první článek o spojení průtokové analýzy a kapilární elektroforézy<sup>35</sup>. Přibližně ve stejné době představil obdobný koncept profesor Z. L. Fang<sup>36</sup> v Číně. Od té doby byly vyvinuty různé přístupy a zařízení, včetně kombinace sekvenční injekční analýzy s CE (SIA-CE)<sup>37</sup> představené jedním z průkopníků průtokové injekční analýzy Jardou Růžičkou. Výzkum ukazuje, že tyto dvě techniky mají mnohem více společného, než by se na první pohled mohlo zdát, a jejich „sňatek“ byl jistě tím šťastným.

Celý článek je kompilací mnoha příběhů našich kolegů z minulosti, současnosti a snad i světlé budoucnosti těchto metod. Všem jim patří velký dík!

*Tato publikace vznikla za podpory projektu (č. 21930006) spolufinancovaného vládami České republiky, Maďarska, Polska a Slovenska prostřednictvím Visegrádských grantů z Mezinárodního visegrádského fondu. Posláním fondu je prosazovat myšlenky udržitelné regionální spolupráce ve střední Evropě.*

*Hlavním cílem projektu spolufinancovaného Mezinárodním visegrádským fondem je vytvořit tematickou platformu pro spolupráci a integraci univerzit ze zemí Visegrádské skupiny (V4), které se zabývají výzkumem a výukou v oblasti analytické chemie, zejména v oblasti průtokové analýzy a kapilární elektroforézy. Vedoucím týmem a koordinátorem projektu je Chemická fakulta Jagelonské Univerzity v Krakově a prof. Paweł Kościelniak. Partneři jsou Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky v Brně, Přírodovědecká fakulta Univerzity P. J. Šafárika v Košicích, Fakulta přírodních věd Univerzity Komenského v Bratislavě, Chemická fakulta Univerzity ve Varšavě, Přírodovědecká a technická fakulta Univerzity v Debrecenu a Výzkumný ústav biomolekulárního a chemického inženýrství Pannonské Univerzity. Spolupráce těchto pracovišť usnadní výměnu informací v rámci laboratorních postupů, zvyšování odborných kompetencí vyučujících a rozvoj jejich osobitých dovedností, jakož i výměnu zkušeností v oblasti komunikace a navazování partnerství mezi vědci a externími subjekty. Ve vzdálenější perspektivě proto může přispět k implementaci výstupů výzkumu do průmyslového sektoru a do laboratorní zabývající se rutinními analýzami a k zájmu výrobců analytických přístrojů. Proces integrace přesahující hranice jednotlivých států je tedy nezbytný pro posílení pozice univerzit v regionu V4, ale i s ohledem na západoevropské země. Integrace navíc zvyšuje přístup k finančním zdrojům, což umožňuje realizovat hodnotné vědecké a výukové projekty. Realizace předpokládaných cílů nepřímo přispěje k rozvoji inovativních řešení v oblasti analytické chemie, zvýšení měkkých i tvrdých dovedností mladých vědců a studentů a také ke spuštění programů stáží. V důsledku toho budou mít mladí lidé lepší přístup na trh práce, což by mělo vést ke zvýšení konkurenceschopnosti zemí makroregionu V4.*

*Hlavní aktivitou projektu je sympozium "Průtoková analýza a kapilární elektroforéza" (V4-FACE 2020; [https://v4face.project.uj.edu.pl/en\\_GB/v4-project](https://v4face.project.uj.edu.pl/en_GB/v4-project)), uspořá-*

dané díky epidemiologické situaci s ročním odkladem 28. 6. – 1. 7. 2021 v distanční online formě vedoucí skupinou z Jagelonské univerzity v polském Krakově. Během konference byly představeny nejnovější vědecké poznatky a diskutovány možnosti vývoje a implementace analýzy v průmyslu spolu s naznačením dalších možností spolupráce. Mladí vědci a studenti se zúčastnili workshopů zaměřených na trénink důležitých tvrdých dovedností. Současný stav a další perspektivy výuky analytické chemie na terciární úrovni byly diskutovány na speciálně vyhrazeném diskusním fóru.

## LITERATURA

- Růžička J., Hansen E. H.: *Anal. Chim. Acta* 78, 145 (1975).
- Solich P., Polášek M., Karlíček R., Valentová O., Marek M.: *Anal. Chim. Acta* 218, 151 (1989).
- ČSN EN ISO 11 732, *Jakost vod - Stanovení amoniakálního dusíku průtokovou analýzou (CFA a FIA) a spektrofotometrickou detekcí* (1998).
- Solich P., Svoboda A., Sklenářová H., Polášek M., Karlíček R.: *Instrum. Sci. Technol.* 30, 13 (2002).
- Sklenářová H., Svoboda A., Solich P., Polášek M., Karlíček R.: *Instrum. Sci. Technol.* 30, 353 (2002).
- Šatínský D., Solich P., Chocholouš P., Karlíček R.: *Anal. Chim. Acta* 499, 205 (2003).
- Maya F., Horstkotte B., Estela J. M., Cerdà V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 909 (2012).
- Šrámková I. H., Carbonell-Rozas L., Horstkotte B., Háková M., Erben J., Chvojka J., Švec F., Solich P., García-Campaña A. M., Šatínský D.: *Talanta* 197, 517 (2019).
- Chocholouš P., Vacková J., Šrámková I., Šatínský D., Solich P.: *Talanta* 103, 221 (2013).
- Andruch V., Acebal C. C., Škrliková J., Sklenářová H., Solich P., Balogh I. S., Billes F., Kocúrová L.: *Microchem. J.* 100, 77 (2012).
- Šrámková I., Horstkotte B., Sklenářová H., Solich P., Koleč S. D.: *Anal. Chim. Acta* 934, 132 (2016).
- Fikarová K., Cocovi-Solberg D. J., Rosende M., Horstkotte B., Sklenářová H., Miró M.: *J. Chromatogr. A* 1602, 160 (2019).
- Horstkotte B., Lopez de los Mozos Atochero N., Solich P.: *J. Chromatogr. A* 1555, 1 (2018).
- Sánchez R., Horstkotte B., Fikarová K., Sklenářová H., Maestre S., Miró M., Todolí J.-L.: *Anal. Chem.* 89, 3787 (2017).
- Klimundová J., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P.: *Talanta* 69, 730 (2006).
- Sklenářová H., Rosecká M., Horstkotte B., Pávek P., Miró M., Solich P.: *Anal. Chim. Acta* 1153, 338296 (2021).
- <https://www.flowinjectiontutorial.com/>, staženo 30. 4. 2021.
- Kohlrausch F.: *Ann. Phys. Chem., N. F.* 62, 209 (1897).
- Tiselius A.: *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal.* 7, 1 (1930).
- Hjertén S.: *Arkiv Kemi* 13, 151 (1958).
- Virtanen R., Kivalo P.: *Suomen Kemistilehti B* 42, 182 (1969).
- Everaerts F. M., Vacík J., Verheggen T. P. E. M., Zuska J.: *J. Chromatogr.* 60, 397 (1971).
- Vacík J., Zuska J., Muselasova I.: *J. Chromatogr.* 320, 233 (1985).
- <https://www.villalabeco.sk/>, staženo 30. 4. 2021.
- Stránský Z.: *J. Chromatogr.* 320, 219 (1985).
- Jokl V., Polášek M., Pospíchalová J.: *J. Chromatogr.* 391, 427 (1987).
- Křivánková L.: *Chem. Listy* 114, 10 (2020).
- Gebauer P., Foret F.: *Chem. Listy* 114, 3 (2020).
- <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>, staženo 30. 4. 2021.
- <https://web.natur.cuni.cz/gas/simul.html>, staženo 30. 4. 2021.
- Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 23, 3520 (2002).
- Gebauer P., Deml M., Boček P., Janák J.: *J. Chromatogr.* 267, 455 (1983).
- Deml M., Foret F., Boček P.: *J. Chromatogr.* 320, 159 (1985).
- Foret F., Fanali S., Ossicini L., Boček P.: *J. Chromatogr.* 470, 299 (1989).
- Kubáň P., Engstrom A., Olsson J. C., Thorsen G., Tryzell R., Karlberg B.: *Anal. Chim. Acta* 337, 117 (1997).
- Fang Z. L., Liu Z. S., Shen Q.: *Anal. Chim. Acta* 346, 135 (1997).
- Wu C.-H., Scampavia L., Ruzicka J.: *Analyst* 127, 898 (2002).

**P. Chocholouš<sup>a</sup>, M. Polášek<sup>a</sup>, P. Kubáň<sup>b</sup>, and F. Foret<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic, <sup>b</sup> Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Brno, Czech Republic): **Brief (Hi)story of Flow Injection Analysis and Capillary Electrophoresis in the Czech Republic (Former Czechoslovakia)**

This article describes the history, development, and current state of two analytical methods to which Czech scientists have made significant contributions. It describes the first steps of these methods in Czechoslovakia during the 1970s and 1980s, the development of the methods through innovation, and the establishment of cooperation with foreign scientists. Today, Czech scientists from the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, and Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences in Brno are among the major contributors to these fields of analytical chemistry. The milestones in the development and the prominent scientists mentioned in the individual chapters give a chance for a bright future for these methods, not only in the Czech Republic.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: flow injection analysis, capillary electrophoresis, history, milestones, current state

## BRIEF (HI)STORY OF FLOW INJECTION ANALYSIS AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE CZECH REPUBLIC (FORMER CZECHOSLOVAKIA)

PETR CHOCHOLOUŠ<sup>a</sup>, MIROSLAV POLÁŠEK<sup>a</sup>,  
PETR KUBÁŇ<sup>b</sup>, and FRANTIŠEK FORET<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, <sup>b</sup> Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Veveří 97, 602 00, Brno, Czech Republic

Keywords: flow injection analysis, capillary electrophoresis, history, milestones, current state

### 1. Flow Injection Analysis

Flow Injection Analysis (FIA) was invented in 1975 by Jarda Růžička (Czechoslovak) and Elo H. Hansen at the Technical University of Denmark<sup>1</sup>. The research on this innovative technique in Czechoslovakia begun in the early '80s at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University. Their previous experience with spectrophotometric flow-through measurements made it only a tiny step to construct the FIA manifold and adapt it to automate reagent-based assays. The lack of sophisticated and expensive instrumentation available at this period in Czechoslovakia favored a simple FIA setup. Several papers were published in national journals from the middle of the '80s, followed by the first paper published internationally in *Analytica Chimica Acta* in 1989 (ref.<sup>2</sup>) describing the system for determining urea in body fluids utilizing an immobilized urease reactor made of Control Porous Glass sorbent.

At this early period, the biggest challenge was constructing a device, which would allow the injection of precise volumes of sample into the flowing stream. After many trials, the manually operated valve allowed precise injection of two solutions within the range of 20 to 200 microliters simultaneously when fabricated in a faculty workshop. The designing and fabricating of peristaltic pumps, mixing connectors, and reaction coils completed the FIA analyzer (Fig. 1). The setup was recognized as a significant advance of then-existing technology and became a model for serial production. Fortunately, an unusual candidate was found in the Unified Agricultural Cooperative "1<sup>st</sup> of May" in the village of Pouchov, near Hradec Králové. This FIA 20 Analyzer, furnished with SPEKOL photometer (manufactured in East Germany), and chart recorder, became a milestone in accepting FIA in our country. It spread in agrochemical and industrial laboratories thanks to the tutorials done in the Faculty of Pharmacy<sup>3</sup>. During the late '80s, many reagent-based assay protocols, including chloride, ammonia, nitrite, nitrate, phenols,

boron, and molybdenum in soils, water, and plant materials, were developed. FIA protocols for calcium, proteins, and other clinical analytes became available too. The key contribution to the beginnings and development of FIA in this time was by Prof. Rolf Karlíček, Assoc. Prof. Miroslav Polášek a Prof. Petr Solich.

After the fall of the Iron curtain in 1989, we could travel abroad and widely present our research at international meetings and in international journals, where our work became gradually recognized. At the 9<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis conference in Orlando in 1997, we established a close collaboration with the founders of FIA and Sequential Injection Analysis (SIA) – Jarda Růžička, Elo H. Hansen, and Garry Christian. Then we were entrusted with the organization of the 10th ICFIA in Prague in 1999. In 2008, we organized the first international SIA conference in Hradec Králové, then Flow Analysis conference in 2015 in Prague, and together with Jagiellonian University in Kraków, Poland, the FA&CE 2018 conference in Hradec Králové.

At the turn of the millennium, thanks to younger scientists, the research expanded with newer SIA technique – H. Sklenářová<sup>4,5</sup>; monolithic column employing medium-pressure liquid chromatography technique named Sequential Injection Chromatography (SIC) – P. Solich, D. Šatínský and P. Chocholouš<sup>6</sup>; and a syringe pump as a reaction/extraction chamber based Lab-in-syringe – B. Horstkotte<sup>7</sup>. Close cooperation with companies producing flow systems (FIALab and GlobalFIA, both USA) promoted significant developments in the pumps and flow systems designs. Many scientists dealing with Flow analysis and related techniques, from Austria, Sweden, Slovakia, Ukraine, Russia, Portugal, Spain, Germany, Argentina, Brazil, Japan, Australia, and namely Jarda Růžička as Fulbright Professor in 2008, cooperated and visited Czech laboratories. A significant number of automated methods for SPE, including testing nanofibers as SPE sorbents<sup>8</sup>, SIC<sup>9</sup>, various miniaturized LLE methods<sup>10</sup> including Lab-in-syringe technique, and even single-drop extraction in fully automated mode<sup>11</sup>. The sample preparation methods were online coupled to HPLC<sup>12</sup>, GC<sup>13</sup>, or ICP<sup>14</sup>. The other way of the research is monitoring kinetic profiles of the liberation of active substances from novel pharmaceutical formulations<sup>15</sup> or real-time monitoring of interactions between active/toxic substances and cell membrane transporters<sup>16</sup>. A long list of published articles in renowned ISI journals is followed by several national patents and hosting of the online tutorial on Flow Injection Analysis written by Jarda Růžička<sup>17</sup>.

In the last 25 years, other groups in the Czech Republic have been dealing with the development of Flow analysis, located at the Faculty of Natural Science in Prague, Charles University.



Fig. 1. The FIA analyzer constructed at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University. Manufactured in cooperation with the Unified Agricultural Cooperative “1<sup>st</sup> of May” in the village of Pouchov near Hradec Králové (the 1980s). Multi-channel analyzer equipped with two peristaltic pumps, double injection valve, and unit with mixing points. For optical detection, used Spekol photometer with a flow cell.

#### Milestones in the development of Flow Analysis in the Czech Republic

1985	lab-made FIA
1998	FIA-SPE
2001	SIA chemiluminescence
2002	lab-made SIA (and software)
2002	SPE-SIA
2002	SIC (Sequential Injection Chromatography)
2003	SIA based drug liberation apparatus
2009	1st generation of commercial SIC
2010	DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction) dual valve SIA
2015	2D SIC
2016	SIA based monitoring of drug permeation across a cell monolayer
2018	2nd generation of commercial SIC
2018	LIS GC (Lab-in-syringe with Gas Chromatography)
2019	LIS HPLC (Lab-in-syringe with Liquid Chromatography)
2019	SIA + 3D printed analyzer parts

## 2. Capillary electrophoresis

Electrophoretic analytical methods have a long history, starting from the basic theoretical work by Kohlrausch<sup>18</sup> in 1897, throughout the beginning of the last century, witnessing the work of Tiselius on the mobilities of weak electrolytes<sup>19</sup> and the work of Hjerten<sup>20</sup> and Virtanen<sup>21</sup> that have set the basic concepts of the electromigration techniques, such as isotachopheresis and capillary electrophoresis.

Historically, in former Czechoslovakia, electrophoretic methods such as analytical electrophoresis and isotachopheresis have a long tradition and were studied since 1960–1970s. Around 1970, the first commercial isotachopheretic instrument from the Swedish company LKB was available and this instrument could be used with certain modifications also for electrophoresis in PTFE capillaries. It has been a lucky coincidence that the researchers at the scientific institutions of former Czechoslovakia had very good contacts with the University of Eindhoven in the Netherlands and one of the pioneers of ITP and CE, Prof. F.M. Everaerts. Several institutions, most notably the Charles University, the Institute of Analytical Chemistry of the Czechoslovak Academy of Sciences in Brno and Comenius University in Bratislava were all involved in the pioneering work on electrophoresis. Probably one of the first publications is the joint publication of Prof. Jiri Vacik and F.M. Everaerts on the use of counter-current in isotachopheresis<sup>22</sup>. One of the other co-authors of this publication was Jiri Zuska, who has become later famous for his work on the construction of contactless conductivity detectors<sup>23</sup>, (together with Prof. Bohuslav Gaš from Charles University in Prague). Inspired by the work of Everaerts, Prof. Petr Boček and his colleagues at the Institute of Analytical Chemistry in Brno have contributed significantly to the development of theory and methodology of modern electrophoresis. Prof. Dušan Kaniánský at the Comenius University in Bratislava has also contributed to the progress of this newly developing technique, among others by initiating the production of a new commercial instrument for analytical isotachopheresis in Spisska Nova Ves in Slovakia. The company, now Villa Labeco<sup>24</sup>, has now a near 30 year history of a successful production of various electrophoretic instruments. Other researchers, such as Prof. Zdeněk Stránský<sup>25</sup> from Palacký University in Olomouc or Prof. Vladimír Jokl<sup>26</sup> from Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University and their coworkers have made a significant contribution to the theoretical (Jokl's equation of ion mobility) and practical capillary electrophoresis. The historical milestones in the development of isotachopheresis and capillary electrophoresis in the Czech Republic/Czechoslovakia were recently reviewed<sup>27,28</sup>, both articles are unfortunately in Czech only.

Since the development and pioneering work of the scientists in Prague, Brno, and Bratislava, electrophoretic analytical techniques have gained their steady place in nearly all laboratories in the Czech Republic. To name only a few prominent institutions that have significantly contributed to the development of electrophoresis, we must mention the work of Prof. Bohuslav (Bob) Gaš at the Charles University, who took over the research group after Prof. Vacik in 1996. He is the author of the famous electrophoretic simulation software PeakMaster<sup>29</sup> and Simul<sup>30</sup> that allow computer simulations of electrophoretic separations to be performed. Bob Gaš was also one of the co-authors of the two-electrode contactless conductivity detector<sup>31</sup>. The detector was until recently produced by the deceased electrical engineer Jiří Zuska (2020) and his

company Admet. The credit in the late development of various methods using the C4D detector by Jiří Zuska goes also to Petr Tůma at Charles University, who applies it for medical research.

Without any doubt, the Institute of Analytical Chemistry in Brno is the most famous for its contribution to the development and propagation of electrophoretic techniques. The theoretical works of Prof. Petr Boček and Dr. Petr Gebauer have explained many phenomena occurring during electrophoretic separations. One of the most cited papers is the one on the separation of anions in drinking water from 1983 (ref.<sup>32</sup>). Later the development of a CE sample splitter by Deml et al.<sup>33</sup> or the use of absorbing co-ion in indirect UV detection<sup>34</sup> are among their prominent research pieces that are worth mentioning. Another significant contribution to the instrumental application of electrophoresis and its coupling with mass spectrometry was accomplished by the current director of the Institute, Dr. František Foret, who spent significant time at Barnett Institute in Boston, USA and continued his research on CE-MS in Brno. There has been also interest towards practical/clinical applications of CE, lead by younger scientists, Dr. Pavel Kubáň, Assoc. Prof. Petr Kubáň, Dr. Jana Křenková and other colleagues at the Departments of Electromigration methods and Bioanalytical instrumentation.

Other institutions and researchers in the Czech Republic that are actively working with capillary electrophoresis are Prof. Vaclav Kašička at the Institute of the Organic Chemistry and Biochemistry in Prague, engaged in the development of theory, methodology, and instrumentation of capillary electromigration (CE) methods and their application for the separation, analysis, micropreparation, and physico-chemical characterization of (bio)molecules, the researchers at Palacký University in Olomouc (Profs. Lemr, Ševčík; Assoc. Profs. Bednář, Barták, Petr) who work with studies of electrochemical conversion, ionization in mass spectrometric measurements or online preconcentration in capillary electrophoresis and coupling of CE to ICP-MS in analyses of biological samples, forensic evidence and archaeological samples, and Assoc. Prof. Pospíšilová with Dr. Urbánek working on the coupling of ITP and CZE.

Many members of the research teams are Editorial board members of prominent analytical journals (F. Foret, B. Gaš, V. Kašička) and an international conference CECE (Central European Capillary Electrophoresis), is organized on an annual basis in Brno.

### 3. An overlap

It is not a coincidence that Flow analysis methods and Capillary electrophoresis are discussed at the same time in this article. A combination of automated flow sample treatment schemes with separation techniques like CE can generally enhance the analytical power of both analytical techniques. This was recognized more than 20 years ago by Petr Kubáň and Bo Karlberg at Stockholm University,

where the first article on the coupling of flow analysis and capillary electrophoresis was published<sup>35</sup>. At approximately the same time, Prof. Z.L. Fang<sup>36</sup> in China presented the same concept. Since then, different approaches and devices have been developed, including the combination of sequential injection analysis to CE (SIA-CE)<sup>37</sup> by one of the pioneers of flow injection analysis, Jarda Růžička. The research shows that these two techniques have much more in common than it may seem at first glance, and their "marriage" was certainly the happy one.

The whole article is a compilation of many stories of our colleagues from the past, present, and hopefully the bright future of these methods. Many thanks to all of them!

*This publication is supported by the project (no. 21930006) co-financed by the Governments of Czechia, Hungary, Poland and Slovakia through Visegrad Grants from the International Visegrad Fund. The mission of the fund is to advance ideas for sustainable regional cooperation in Central Europe.*

*The main goal of the project co-financed by the International Visegrad Fund is to establish a thematic platform for the collaboration and integration of universities from the Visegrad Group (V4) that conduct research and teaching in the field of analytical chemistry (AC), particularly in the field of flow analysis and capillary electrophoresis. The collaboration of these units will facilitate exchanging the best laboratory practices, raising the professional competencies of lecturers and developing their distinctive skills, as well as exchanging experience in communication and setting up a partnership between scientists and external stakeholders. The process of integration across national borders is vital to strengthen the position of universities in the V4 region, especially with regard to the West-Europe countries. Furthermore, integration increases access to financial resources, allowing to undertake valuable scientific and academic teaching projects. Implementing the assumed goals will indirectly contribute to developing innovative solutions in analytical chemistry, increasing the soft and hard skills of trained young scientists and students, and triggering internship programs. As a result, young people will have better access to the labor market, which should increase the competitiveness of the Visegrad macro-region.*

*The main event of the project is the conference: V4 Symposium "Flow Analysis & Capillary Electrophoresis" V4-FACE2020 ([https://v4face.project.uj.edu.pl/en\\_GB/v4-project](https://v4face.project.uj.edu.pl/en_GB/v4-project)), which was held at the Faculty of Chemistry of the Jagiellonian University in Krakow on June 28 – Juli 1, 2021 (due to the worldwide epidemiological situation in one-year postponement). During the conference, representatives of all partners, students, young scientists, academic teachers, as well as representatives of routine laboratories and industry learned about the latest achievements in the field of flow analysis and capillary electrophoresis. They exchanged their experiences and needs in the field of chemical analysis development in the Visegrad macro-region.*

## REFERENCES

1. Růžička J., Hansen E. H.: *Anal. Chim. Acta* 78, 145 (1975).
2. Solich P., Polášek M., Karlíček R., Valentová O., Marek M.: *Anal. Chim. Acta* 218, 151 (1989).
3. National standard for determination of nitrogen in water – ČSN EN ISO 11 732, *Jakost vod – Stanovení amoniakálního dusíku průtokovou analýzou (CFA a FIA) a spektrofotometrickou detekcí*, Český normalizační institut (1998).
4. Solich P., Svoboda A., Sklenářová H., Polášek M., Karlíček R.: *Instrum. Sci. Technol.* 30, 13 (2002).
5. Sklenářová H., Svoboda A., Solich P., Polášek M., Karlíček R.: *Instrum. Sci. Technol.* 30, 353 (2002).
6. Šatínský D., Solich P., Chocholouš P., Karlíček R.: *Anal. Chim. Acta* 499, 205 (2003).
7. Maya F., Horstkotte B., Estela J. M., Cerdà V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 909 (2012).
8. Šrámková I. H., Carbonell-Rozas L., Horstkotte B., Háková M., Erben J., Chvojka J., Švec F., Solich P., García-Campaña A. M., Šatínský D.: *Talanta* 197, 517 (2019).
9. Chocholouš P., Vacková J., Šrámková I., Šatínský D., Solich P.: *Talanta* 103, 221 (2013).
10. Andruch V., Acebal C. C., Škrliková J., Sklenářová H., Solich P., Balogh I. S., Billes F., Kocúrová L.: *Microchem. J.* 100, 77 (2012).
11. Šrámková I., Horstkotte B., Sklenářová H., Solich P., Kolev S. D.: *Anal. Chim. Acta* 934, 132 (2016).
12. Fikarová K., Cocovi-Solberg D. J., Rosende M., Horstkotte B., Sklenářová H., Miró M.: *J. Chromatogr. A* 1602, 160 (2019).
13. Horstkotte B., Lopez de los Mozos Atochero N., Solich P.: *J. Chromatogr. A* 1555, 1 (2018).
14. Sánchez R., Horstkotte B., Fikarová K., Sklenářová H., Maestre S., Miró M., Todolí J.-L.: *Anal. Chem.* 89, 3787 (2017).
15. Klimundová J., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P.: *Talanta* 69, 730 (2006).
16. Sklenářová H., Rosecká M., Horstkotte B., Pávek P., Miró M., Solich P.: *Anal. Chim. Acta* 1153, 338296 (2021).
17. <https://www.flowinjectiontutorial.com/>, accessed Apr 30, 2021
18. Kohlrausch F.: *Ann. Phys. Chem., N. F.* 62, 209 (1897).
19. Tiselius A.: *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal.* 7, 1 (1930).
20. Hjertén S.: *Arkiv Kemi* 13, 151 (1958).
21. Virtanen R., Kivalo P.: *Suomen Kemistilehti B* 42, 182 (1969).
22. Everaerts F. M., Vacík J., Verheggen T. P. E. M., Zuska J.: *J. Chromatogr.* 60, 397 (1971).
23. Vacík J., Zuska J., Muselasova I.: *J. Chromatogr.* 320, 233 (1985).
24. <https://www.villalabeco.sk/>, accessed Apr 30, 2021.
25. Stránský Z.: *J. Chromatogr.* 320, 219 (1985).
26. Jokl V., Polášek M., Pospíchalová J.: *J. Chromatogr.* 391, 427 (1987).
27. Křivánková L.: *Chem. Listy* 114, 10 (2020).
28. Gebauer P., Foret F.: *Chem. Listy* 114, 3 (2020).
29. <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>, accessed Apr 30, 2021.
30. <https://web.natur.cuni.cz/gas/simul.html>, accessed Apr 30, 2021.
31. Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 23, 3520 (2002).
32. Gebauer P., Deml M., Boček P., Janák J.: *J. Chromatogr.* 267, 455 (1983).
33. Deml M., Foret F., Boček P.: *J. Chromatogr.* 320, 159 (1985).
34. Foret F., Fanali S., Ossicini L., Boček P.: *J. Chromatogr.* 470, 299 (1989).
35. Kubáň P., Engstrom A., Olsson J. C., Thorsen G., Tryzell R., Karlberg B.: *Anal. Chim. Acta* 337, 117 (1997).
36. Fang Z. L., Liu Z. S., Shen Q.: *Anal. Chim. Acta* 346, 135 (1997).
37. Wu C.-H., Scampavia L., Ruzicka J.: *Analyst* 127, 898 (2002).

**Abstract**

This article describes the history, development, and current state of two analytical methods to which Czech scientists have made significant contributions. It describes the first steps of these methods in Czechoslovakia during the 1970s and 1980s, the development of the methods through innovation, and the establishment of cooperation with foreign scientists. Today, Czech scientists from the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, and Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences in Brno are among the major contributors to these fields of analytical chemistry. The milestones in the development and the prominent scientists mentioned in the individual chapters give a chance for a bright future for these methods, not only in the Czech Republic.