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

Využití alternativních mobilních fází pro metodu Hydrofilní interakční chromatografie

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2014 Barbora Münsterová

Prohlášení:

„ Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 3.9. 2014 .....

Barbora Münsterová

Poděkování:

Děkuji doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady poskytnuté při zpracování diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry analytické chemie, kteří mi pomohli.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Barbora Münsterová

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití alternativních mobilních fází pro metodu Hydrofilní interakční chromatografie

Tato diplomová práce se zabývala možnostmi využití 1,3-dioxolanu jako alternativní organické složky mobilní fáze v hydrofilní interakční chromatografii.

Byly porovnávány změny v selektivitě a účinnosti separace při použití dioxolanu a acetonitrilu jako organických složek mobilní fáze. Jako vodná složka pro klasickou HILIC byl použit 0,5 % roztok kyseliny octové nebo 50 mM octan amonný pH 3,8, pH 6,8 a pH 9,8. Pro nevodnou HILIC bylo testováno složení mobilní fáze acetonitril-dioxolan, accetonitril-dioxolanový roztok 0,5 % kyseliny octové a acetonitril-dioxolan modifikovaný vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8.

Pro měření na koloně ACQUITY UPLC BEH Amide (1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm, Waters) bylo využito 5 různých skupin látek, a to fenolických kyselin, purinových a pyrimidinových bází, derivátů pyridinu, vitaminů rozpustných ve vodě a skupiny betablokátorů. Byla hodnocena retence, selektivita a rychlost separace. Měření probíhalo na přístroji ACQUITY Ultra Performance LC za detekce pomocí PDA detektoru při vlnové délce 280 nm, s výjimkou skupiny betablokátorů, která byla hodnocena při vlnové délce 220 nm a 270 nm. Měření probíhalo za izokratické eluce, při konstantním nastavení průtoku na 0,4 ml/min, nástřik byl 2 µl.

Pro testované skupiny byl jako vhodnější organická složka mobilní fáze vyhodnocen acetonitril, který na rozdíl od dioxolanu umožňoval účinněji separovat látky jednotlivých skupin. Byl pozorován rozdílný vliv typu vodné složky na separace s dioxolanem a s acetonitrilem. Doba separací při použití obou rozpouštědel se výrazněji nelišila. V rámci skupiny betablokátorů byl při separacích s dioxolanem eluován i labetalol, který nebyl při separacích s acetonitrilem detekován. Pro nevodnou HILIC nebyla testovaná kolona a vybrané složení mobilní fáze vhodné.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Barbora Münsterová

Supervisor: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma thesis: Application of alternative mobile phases in Hydrophilic interaction chromatography method.

This thesis was focused on the possibilities of using 1,3-dioxolan as an alternative organic component of the mobile phase in HILIC.

The changes in selectivity and efficiency of the separation were observed when using dioxolan and acetonitrile as the organic components of the mobile phase. 0.5 % acetic acid or 50 mM ammonium acetate pH 3.8, pH 6.8 and pH 9.8 were used as the aqueous components for the conventional HILIC. The mobile phase consisting of acetonitrile-dioxolan, acetonitrile-dioxolan with 0.5 % acetic acid and acetonitrile-dioxolan modified with 50 mM ammonium acetate aqueous solution pH 6.8 were tested for non-aqueous HILIC.

For the measurements on column ACQUITY UPLC BEH Amide (1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm, Waters) 5 different groups of compounds were used, including of phenolic acids, purine and pyrimidine bases, pyridine derivates, water-soluble vitamins and beta-blockers. Retention, selectivity and the speed of analysis were competed. Measurements were performed using ACQUITY Ultra Performance LC with PDA detection at 280 nm, with the exception of beta-blockers which were measured at the wavelength of 220 nm and 270 nm. The measurements were carried out at isocratic elution at the constant flow of 0.4 ml/min, injection volume was 2 µl.

Acetonitrile was evaluated as a more suitable organic component of the mobile phase for the tested compounds. Unlike dioxolan, acetonitrile allowed more efficient separation of the individual compounds of the groups. The different effect of the type of aqueous component on separation with dioxolan and acetonitrile was observed. The duration of separation was not varying significantly when using either of the solvents. In the beta-blockers group, labetalol was detected in separations with dioxolan. However, it was not detected in separations with acetonitrile. Neither the column nor the mobile phase composition tested appeared to be suitable for the non-aqueous HILIC.

Obsah

1 Úvod ... 9

2 Cíl a zadání práce ... 10

3 Teoretická část ... 11

3.1 Ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) ... 11

3.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) ... 13

3.2.1 Stacionární fáze ... 13

3.2.1.1 Kolona ACQUITY UPLC BEH Amide ... 16

3.2.2 Mobilní fáze ... 16

3.2.3 Retenční mechanismus ... 21

3.3 Použité analyty ... 23

3.3.1 Fenolické kyseliny ... 23

3.3.2 Purinové a pyrimidinové báze ... 25

3.3.3 Deriváty pyridinu ... 26

3.3.4 Vitaminy rozpustné ve vodě ... 28

3.3.5 Betablokátory ... 30

4 Experimentální část ... 32

4.1 Použité chemikálie ... 32

4.2 Přístrojové vybavení ... 34

4.3 Příprava mobilní fáze ... 35

4.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků ... 36

4.5 Podmínky UHPLC HILIC měření ... 37

5 Výsledky a diskuze ... 38

5.1 Separace fenolických kyselin ... 39

5.1.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem ... 39

5.1.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem ... 42

5.1.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC ... 44

5.2 Separace purinových a pyrimidinových bází 45
5.2.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem 45
5.2.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem 48
5.2.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC 50
5.3 Separace derivátů pyridinu 51
5.3.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem 51
5.3.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem 54
5.3.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC 56
5.4 Separace vitaminů rozpustných ve vodě 57
5.4.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem 57
5.4.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem 59
5.4.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC 60
5.5 Separace betablokátorů 61
5.5.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem 61
5.5.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem 64
5.5.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC 65
6 Závěr 67
7 Seznam použité literatury 70

Seznam zkratek

AcAc	kyselina octová (acetic acid)
ACN	acetonitril (acetonitrile)
AmAc	octan amonný (ammonium acetate)
DIO	1,3-dioxolan (dioxolane)
GAL	kyselina gallová (gallic acid)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IPA	isopropanol (isopropyl alcohol)
MeOH	methanol (methanol)
OH BA	hydroxybenzoová kyselina (hydroxybenzoic acid)
SAL	kyselina salicylová (salicylic acid)
SST	test způsobilosti systému (system suitability test)
THF	tetrahydrofuran (tetrahydrofuran)
UHPLC	ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)

1 Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří v současnosti k nejvýznamnějším a nejpoužívanějším separačním metodám v analytické chemii. Umožňuje analýzu směsí s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi.

Jedním z typů HPLC je hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), kterou v roce 1990 představil Andrew Alpert jako metodu vhodnou pro analýzu velmi polárních a hydrofilních sloučenin, jako jsou na příklad peptidy, aminokyseliny, sacharidy a mnoho dalších biologicky významných sloučenin, na jejichž analýzu neustále rostou požadavky. Tato metoda využívá polární stacionární fáze, typické pro chromatografii na normálních fázích, a vodně-organickou mobilní fázi používanou v systému reverzních fází. Kombinací těchto systémů fází bylo docíleno zlepšení rozpustnosti analyzovaných látek v mobilní fázi, značného zvýšení retence polárních látek a zlepšení reprodukovatelnosti výsledků. Díky vhodnému složení mobilní fáze, která obsahuje vysoký podíl organické složky, je tato metoda vhodná také pro spojení s hmotnostní spektrometrií.

V současné době dochází k výraznému rozvoji v oblasti nových typů HILIC stacionárních fází, které zahrnují kolony s různými povrchy modifikované širokým spektrem funkčních skupin. Komerčně dostupné jsou také kolony s částicemi menšími než 2 μm, s částicemi s pevným jádrem a monolitické kolony. Také v oblasti mobilních fází dochází k hledání nových alternativ, které by rozšířily možnosti separace, změny selektivity a využití této techniky.

HILIC, jako metoda vhodná pro separaci širokého spektra polárních látek, nachází uplatnění ve farmaceutických, chemických, biologických a mnoha dalších odvětvích.

2 Cíl a zadání práce

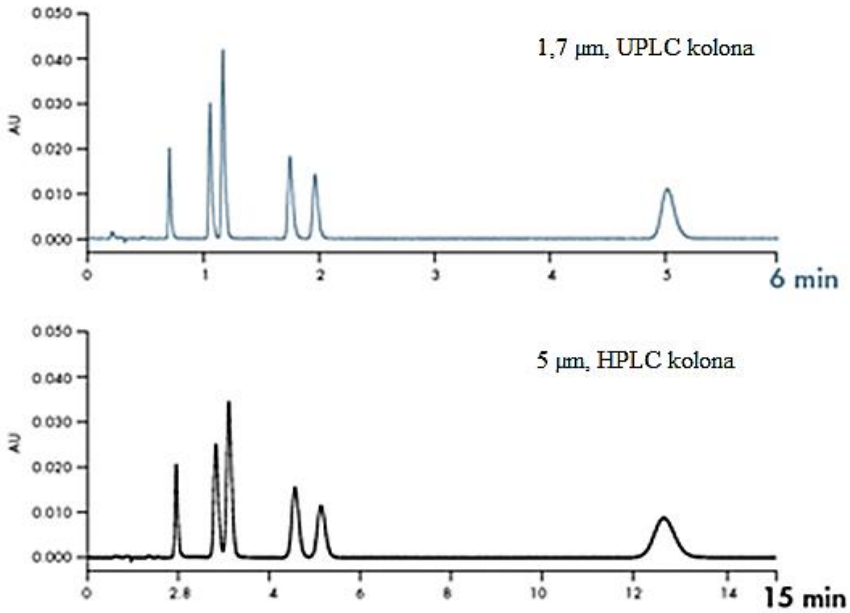
Diplomová práce byla zaměřená na zhodnocení možností použití dioxolanu jako alternativní složky mobilní fáze v hydrofilní interakční chromatografii v porovnání s acetonitrilem. K měření bylo využito 5 různých skupin látek, a to fenolických kyselin, purinových a pyrimidinových bází, derivátů pyridinu, vitaminů rozpustných ve vodě a skupiny betablokátorů.

Cílem práce bylo porovnat změny v selektivitě a účinnosti separace při použití dioxolanu a acetonitrilu jako organických složek mobilní fáze. Byla hodnocena retence, selektivita a rychlost separace. Tyto parametry byly hodnoceny při použití konstantního průtoku 0,4 ml/min konstantní teploty 30°C a různě se měnícího složení mobilní fáze při izokratické eluci. Za optimálních podmínek na dané koloně bylo proměřeno SST.

3 Teoretická část

3.1 Ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

UHPLC neboli ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie je novým směrem kapalinové chromatografie. Využívá systémy schopné pracovat za vysokého tlaku a analytické kolony o malém vnitřním průměru, naplněné sorbentem s částicemi o velikosti menší než 2 µm, které přispěly k výraznému zkrácení doby analýzy a zvýšení separační účinnosti (Obr. 1) [1][2][3][4]. V současnosti patří k nejpoužívanějším separačním technikám nacházejícím uplatnění nejen ve farmaceutickém výzkumu a analýze, ale také v monitorování lékových hladin, toxikologii a dalších oborech jako je životní prostředí a potravinářský průmysl [2].

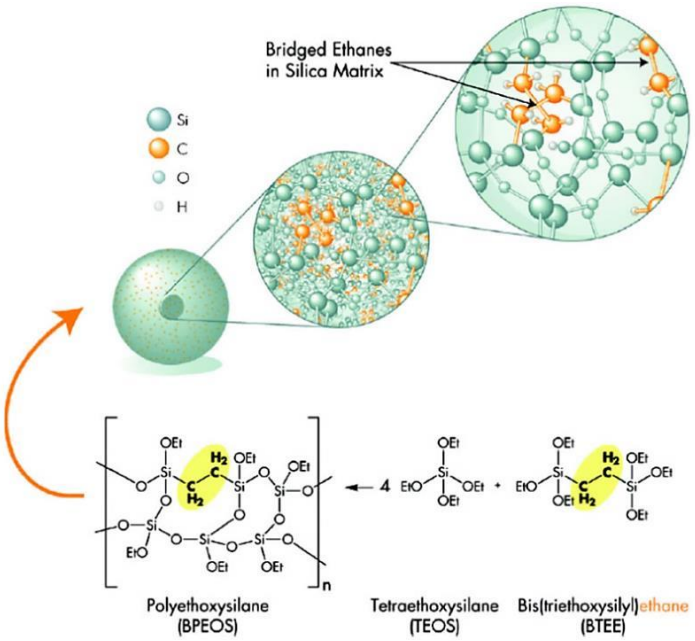


Obr. 1: Vliv velikosti částic na rychlost separace. Separace probíhaly na kolonách se stejnými parametry: 2,1 x 50mm. Pro obě separace byly použity shodné podmínky s výjimkou průtoku, který byl volen s ohledem na velikost částic. Převzato a upraveno ze zdroje [1].

Tato separační technika přináší řadu výhod v porovnání s HPLC. Mezi ně patří zvýšení separační účinnosti, zvýšení citlivosti, zlepšení rozlišení a zkrácení doby analýzy [2][4][5]. Velkou výhodou je také snížení spotřeby používaných rozpouštědel, což je významné nejen po ekonomické stránce ale také z ekologického hlediska [3].

Zmenšení velikosti částic je doprovázeno podstatným nárůstem pracovního tlaku, a to až na 100 MPa. Z tohoto důvodu jsou kladeny speciální požadavky na konstrukci UHPLC systémů, které umožňují práci i při takto vysokém tlaku. Využívají se ultra-vysokotlaká čerpadla, tlaku-odolná spojení a speciální kolony [2][6]. Optimální velikost částic využívaných v UHPLC se pohybuje pod 2 µm, nejčastěji okolo 1,7 µm. Další zmenšování částic vede pouze ke zvýšení zpětného tlaku a zvýšení účinnosti je již zanedbatelné [6][7].

Stacionární fáze používané v UHPLC jsou vystaveny působení vysokého tlaku, proto musí být mechanicky velmi odolné. Sorbenty na bázi silikagelu tuto podmínku splňují, jejich nevýhodou je limitovaný rozsah pH mobilní fáze, chemická nestabilita a také nižší termální stabilita [7]. Vyšší chemickou odolnost a mechanickou stálost i za vysokých teplot a tlaků vykazují hybridní stacionární fáze [8]. Tato technologie kombinuje výhodné vlastnosti silikagelu, jako je na příklad mechanická odolnost a vysoká separační účinnost, s výhodnými vlastnostmi polymerních sorbentů [9]. Příkladem hybridních fází mohou být sorbenty vyráběné BEH technologii (bridged ethyl hybrid). BEH hybridní fáze je tvořená tetraethoxysilanem a bis(triethoxysilyl)ethanem, které jsou zesíťovány pomocí ethylenových můstků (Obr. 2) [6][7][10][11]. Hybridní fáze může být modifikována různými skupinami, mezi které patří uhlovodíkové ligandy C8, C18, fenylová, amidová nebo karbamátová skupina.



Obr. 2: Struktura BEH částice. Převzato ze zdroje [12].

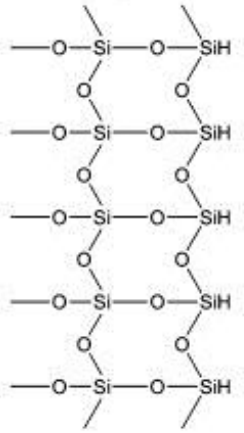
V současné době jsou v UHPLC využívány vedle normálních a reverzních fází také iontovýměnné sorbenty a HILIC stacionární fáze [2][13][14].

3.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

HILIC chromatografie je jedním z moderních trendů v separaci látek kapalinovou chromatografií. Je alternativou k chromatografii na reverzních fázích při separaci polárních, slabě kyselých nebo bazických látek. Lze ji charakterizovat jako chromatografickou techniku využívající polární stacionární fáze v kombinaci s vodnou mobilní fází, která obsahuje více než 60 % organické složky [15][16][17]. Stacionární fáze musí být polárnější než fáze mobilní. Díky tomu je možné dělit polární analyty s vysokou selektivitou, zatímco nepolární látky nejsou zadržovány [16].

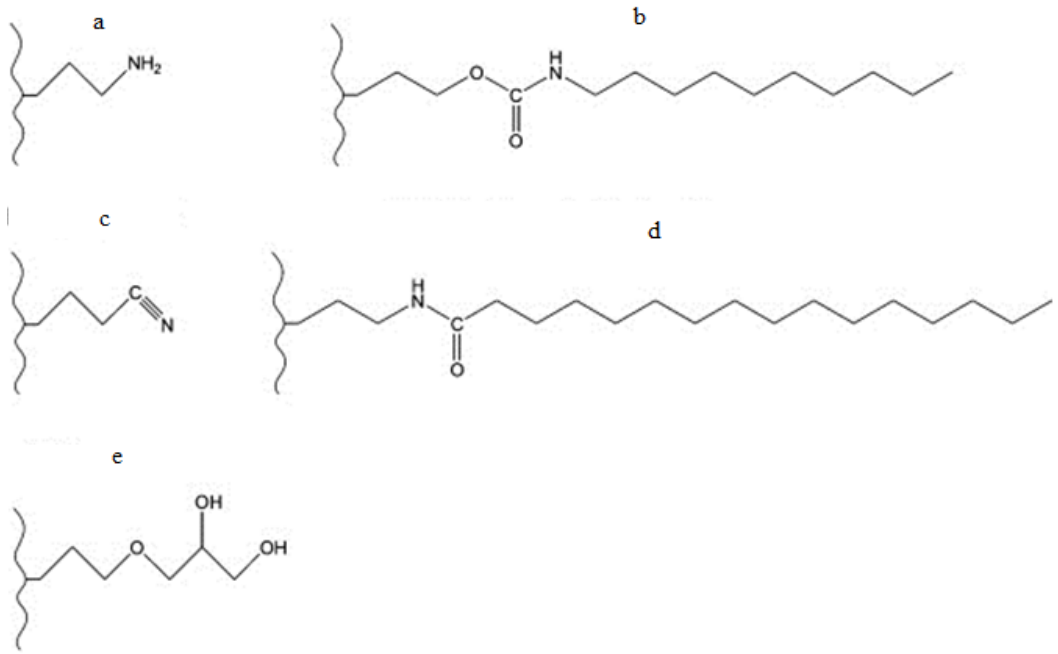
3.2.1 Stacionární fáze

Pro HILIC separace lze použít jakákoliv polární chromatografická stacionární fáze [18]. Jako první byly využity kolony obsahující nemodifikované silikagelové stacionární fáze, které zůstávají v této technice i nadále nejčastěji používanými. Silikagel typu A, obsahující jako kontaminaci kovové částice, není příliš vhodný, častěji se používá silikagel typu B, kde je obsah kovových částic minimální. Zajímavým materiálem pro HILIC separace je silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem, kde jsou silanolové skupiny (-Si-OH) na povrchu nahrazeny hydridovými skupinami (-Si-H) (Obr. 3). Díky této úpravě jsou povrchy méně polární a méně závislé na pH mobilní fáze [15][18][19].



Obr. 3: Struktura silikagelu typu C. Převzato a upraveno ze zdroje [15].

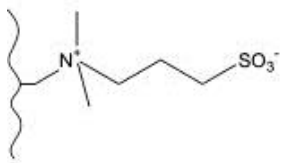
Dalším oblíbeným materiálem jsou sorbenty na bázi silikagelu modifikované aminovými, amidovými, diolovým, karbamátovými, kyanovými, polyethylenglykolovými, polyhydroxylovými nebo jinými polárními skupinami (Obr. 4) [15][18][19]. Využívají se také sorbenty s chemicky vázanými jednotkami oligosacharidů, které mají schopnost rozlišovat různá chirální uspořádání a používají se při chirální chromatografické separaci [15][19].



Obr. 4: Struktura vybraných stacionárních fází: a) amino-silikagel, b) silikagel s vestavěnou karbamátovou skupinou, c) kyano-silikagel, d) silikagel s vestavěnou amidovou skupinou, e) diol-silikagel. Převzato a upraveno ze zdroje [15].

V současné době jsou používány nejen kolony se stacionární fází na bázi silikagelu, ale také polymerní a hybridní sorbenty, které mají v silikagelové matrici inkorporované alkylové skupiny. Tato úprava zvyšuje mechanickou i chemickou odolnost použitého sorbentu [9][16][18].

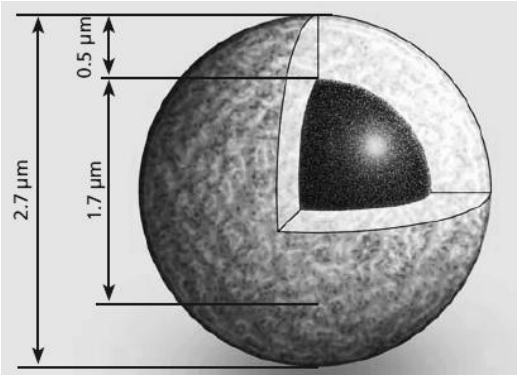
Mezi oblíbené stacionární fáze pro HILIC patří např. ZIC-HILIC stacionární fáze, obsahující chemicky vázané tzv. zwitteriontové skupiny - funkční skupiny nesoucí pozitivní a negativní náboj (Obr. 5). Tyto stacionární fáze se vyznačují vysokou polaritou, vysokou afinitou k vodě a umožňují separovat látky obsahující současně kladně a záporně nabité skupiny [15][18][20].



Obr. 5: Struktura ZIC HILIC stacionární fáze, tvořené sulfobetainovou skupinou. Převzato a upraveno ze zdroje [15].

Pro HILIC mód jsou využitelné také monolitické kolony, tvořené jedním kusem spojitého porézního materiálu, kterým může být silikagel, modifikovaný silikagel nebo polymerní materiály, jako na příklad polymetakrylát, vinylpyridin a další. Vysoce porézní materiál obsahuje makropóry o velikosti 2 µm, snižující odpor stacionární fáze a umožňující použití vyšších průtoků mobilní fáze, a mezopóry o velikosti 2-50 nm, které zvětšují aktivní povrch pro separaci [2][15][16][21].

Komerčně dostupné jsou také kolony s částicemi s pevným jádrem, které umožňují vysoce účinné a rychlé separace při použití nižších pracovních tlaků. Částice jsou tvořené vnitřním pevným jádrem a porézním silikagelovým obalem (Obr. 6). Vysoká účinnost a rychlost separace je zajištěna díky malé difuzní vzdálenosti (0,5 µm) a celkové malé velikosti částice (2,7 µm) [21][22][23].

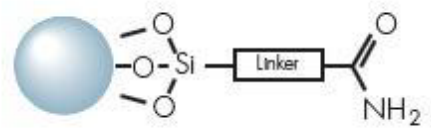


Obr. 6: Struktura částice s pevným jádrem. Převzato a upraveno ze zdroje [24].

3.2.1.1 Kolona ACQUITY UPLC BEH Amide

Kolona ACQUITY UPLC BEH Amide, jejímž výrobcem je firma Waters, je tvořena BEH částicemi o velikosti 1,7 μm modifikovanými trifunkčně vázaným amidem (Obr. 7). Tyto částice vykazují vysokou chemickou stabilitu, umožňují použití širokého rozmezí pH mobilní fáze (pH 2-11) a pracovní teploty 20-90 °C.

Na analytické koloně BEH Amide je možno separovat velmi polární sloučeniny, jako jsou například sacharidy. Používá se především pro separaci bazických látek [25][26].



Obr. 7.: BEH částice modifikovaná trifunkčně vázaným amidem. Převzato ze zdroje [26].

3.2.2 Mobilní fáze

V HILIC jsou používány organicko-vodné mobilní fáze. Složení fáze se volí podle typu použité kolony a typu separovaných analytů. Prakticky se používají mobilní fáze obsahující s vodou mísitelné organické rozpouštědlo a vodnou složku, kterou bývá voda nebo pufr. Poměr jednotlivých složek se může lišit, přičemž organická složka bývá zastoupena z více než z 50 %. Platí, že se vzrůstající koncentrací organické složky v mobilní fázi roste také retence analytů [15][17][18].

Výběr organického rozpouštědla má vliv na retenci a selektivitu separace. Eluční sílu rozpouštědla ovlivňuje jeho polarita a schopnost podílet se na donor-akceptorových interakcích. Relativní eluční sílu rozpouštědel v HILIC lze shrnout následujícím způsobem [15]:

metanol > etanol > isopropanol > tetrahydrofuran > acetonitril

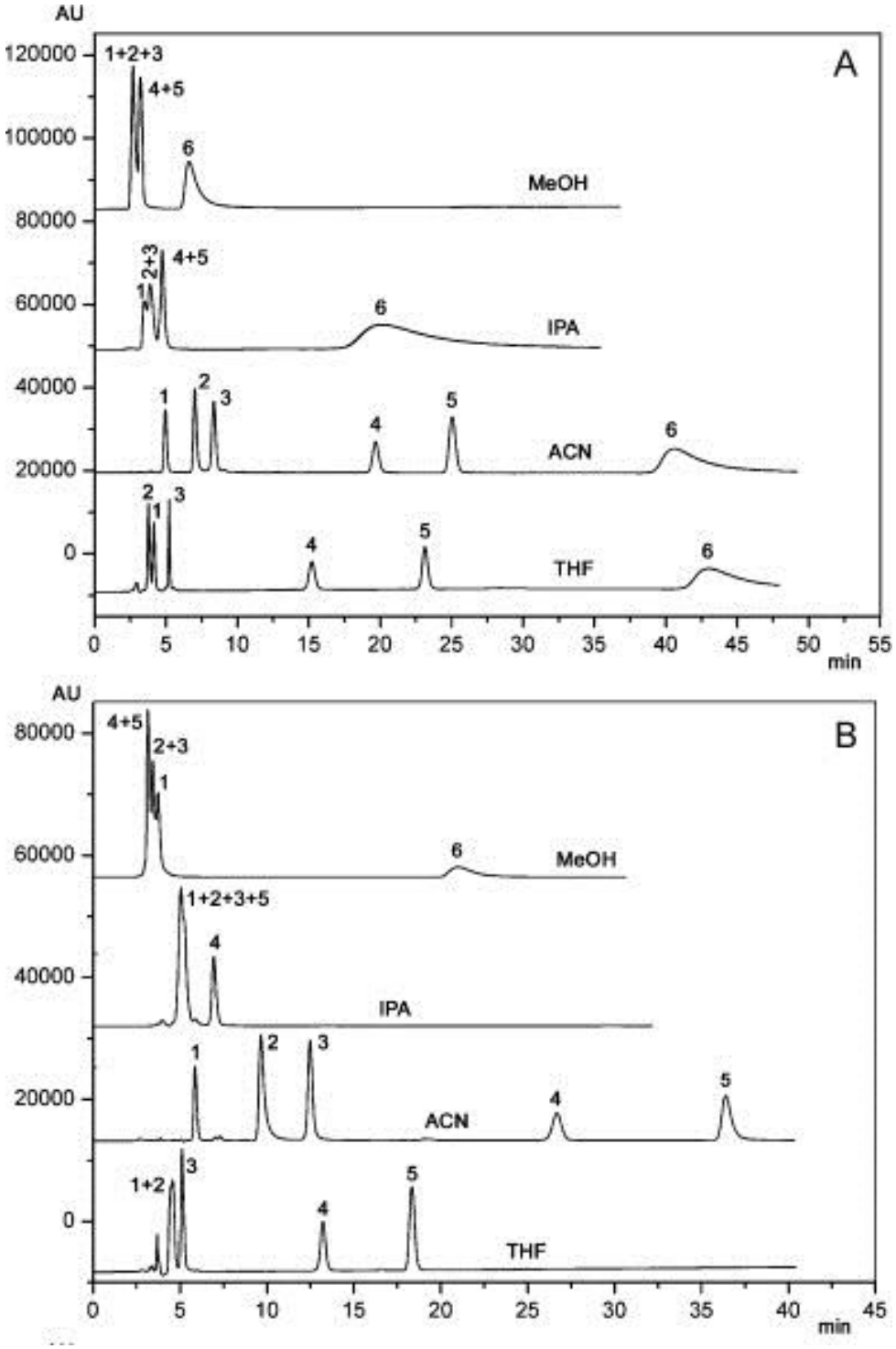
Preferovanou organickou složkou je acetonitril. Tato bezbarvá kapalina je silným aprotickým polárním rozpouštědlem mísitelným s vodou. Díky své chemické struktuře nevytváří vodíkové vazby na úrovni stacionární fáze. Dobře rozpouští iontové i nepolární sloučeniny a má poměrně nízkou viskozitu, která zajišťuje vysokou

separační účinnost a nízký tlak na koloně. Acetonitril je vysoce hořlavý a poměrně málo toxický [17][27][28].

Jako organickou složku mobilní fáze v HILIC chromatografii lze také použít další s vodou mísitelná organická rozpouštědla jako je na příklad methanol, isopropanol nebo tetrahydrofuran. V případě metanolu a méně také u ostatních alkoholů, které jsou stejně jako voda protickými rozpouštědly, dochází k tvorbě vodíkových vazeb s vodnou složkou a kompetici při tvorbě solvatační vrstvy na povrchu stacionární fáze [15][29]. To má za následek snížení retence a selektivity separace [30]. V ojedinělých případech je používán také tetrahydrofuran, který má menší vliv na narušení solvatační vrstvy než alkoholy [15]. Nevýhodou tetrahydrofuranu je jeho vyšší schopnost akceptace vodíkové vazby než jakou má acetonitril, což se projevuje významným poklesem retence analytů [30]. Tato rozpouštědla jsou v HILIC využívány spíše výjimečně za účelem změny selektivity systému (Obr. 8.) [15][29][30]. Jejich vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v Tab. 1.

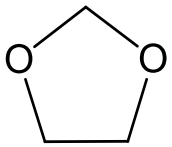
	ACN	MeOH	IPA	THF	DIO
molekulová hmotnost	41,05	32,04	60,1	72,11	74,08
hustota (20 °C) [g/ml]	0,783	0,796	0,785	0,899	1,067
bod tání [°C]	- 45,7	- 97,7	- 89,0	- 108	- 95
bod varu (760 Torr) [°C]	81,6	64,7	117,7	66,0	75,6
viskozita (20 °C) [mPa.s]	0,37	0,60	2,35	0,55	0,60
index lomu (20° C)	1,344	1,329	1,38	1,407	1,404
UV cut-off [nm]	190	205	205	230	---

Tab. 1: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti organických rozpouštědel (ACN–acetonitril, MeOH-methanol, IPA- isopropanol, THF-tetrahydrofuran, DIO-dioxolan) [31][32][33].



Obr. 8: Efekt různých organických rozpouštědel na separaci na diolové koloně (A) a silikagelové koloně (B) za podmínek: organická složka:10 mM octan amonný pH 5,0 (85:15); průtok 0,6 ml/min. 1) nikotinamid, 2) pyridoxin, 3) riboflavin, 4) kyselina nikotinová, 5) kyselina L-askorbová, 6) thiamin. Převzato a upraveno ze zdroje [30].

Podobné chemické vlastnosti jako tetrahydrofuran, který se ve skupině rozpouštědel jeví jako nejvhodnější alternativa acetonitrilu, má 1,3-dioxolan (Tab. 1). Toto aprotické organické rozpouštědlo se svou strukturou řadí mezi kyselé kyslíkaté heterocykly (Obr. 9).



Obr. 9: Struktura 1,3-dioxolanu.

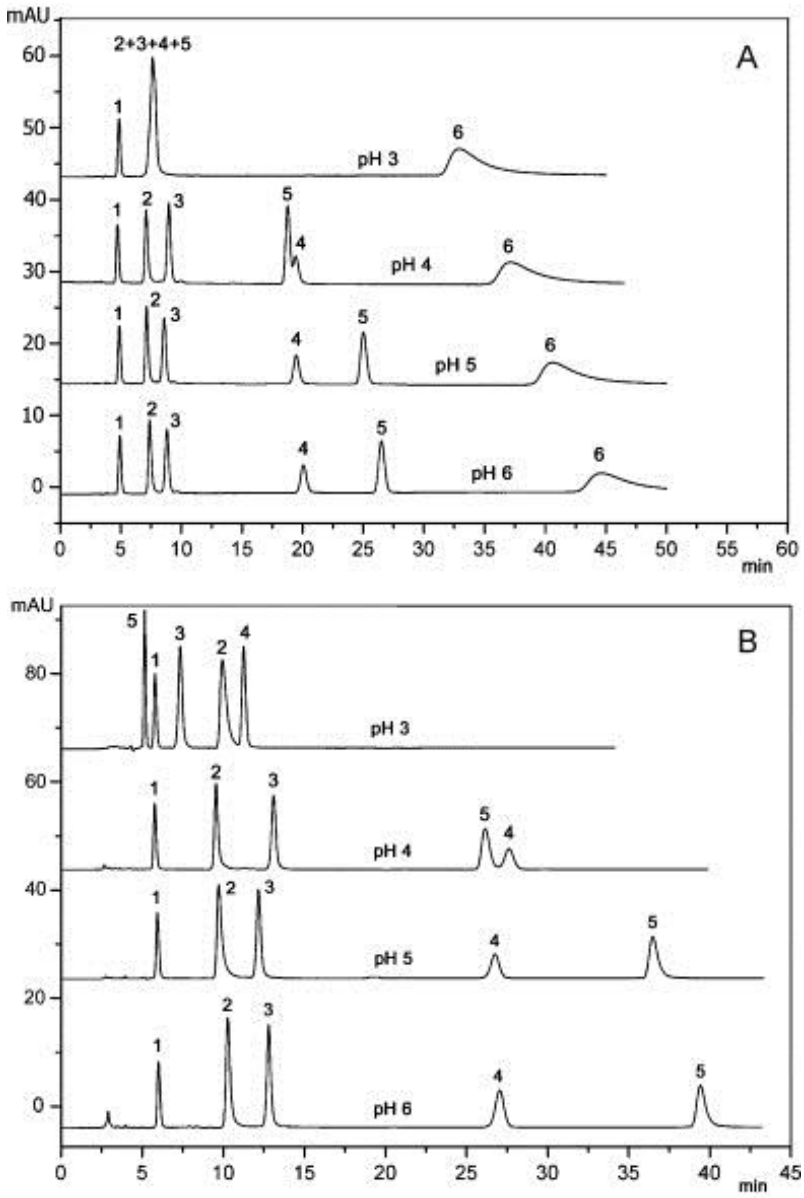
1,3-dioxolan je čirá, bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou a se všemi v HILIC běžně používanými organickými rozpouštědly. Tento cyklický reakční produkt ethylenglykolu a formaldehydu vykazuje typické chování acetalů a etherů. Kyselé prostředí zvyšuje jeho reaktivitu. Stejně jako jiné ethery, tvoří na vzduchu peroxidy a reaguje fotochemicky [34].

Dioxolan je silné aprotické rozpouštědlo a díky své nízké toxicitě a nízkým nákladům na výrobu je využíván jako alternativa k některým chlorovaným organickým rozpouštědlům při rozpouštění organických solí, organokovových sloučenin a polymerů. V dioxolanu jsou také snadno rozpustné vosky tuky a oleje. Také je používán při přípravě vodou ředitelných nátěrů, v textilním průmyslu jako ochranná složka textilních vláken, bránicí jejich pomačkání a poškození vysokými teplotami. Dále se používá jako součást barevných filmových fotorezistentních odstraňovačů a při polymerních reakcích jako regulátor délky řetězce [33].

V HILIC chromatografii je jako nejsilnější eluent používána voda. Předpokladem retence je nízký podíl vodné složky, který pro látky s velmi slabou retencí může být i méně než 5 %. Pro zajištění HILIC mechanismu by neměl obsah vody klesnout pod 2 %, protože při nižších koncentracích již nedochází k vytvoření difúzní vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze [15].

Selektivitu separace a retenci analytů lze ovlivnit přidáním vhodného pufru do vodné složky mobilní fáze [35]. Míra ionizace analyzovaných látek a také funkčních skupin stacionární fáze je ovlivněna hodnotou pH (Obr. 10) a koncentrací použitého pufru [36]. Obecně platí, že ionizované látky jsou více hydrofilní a jsou tak více zadržovány v HILIC módu [37]. Zároveň platí, že negativně nabité látky jsou

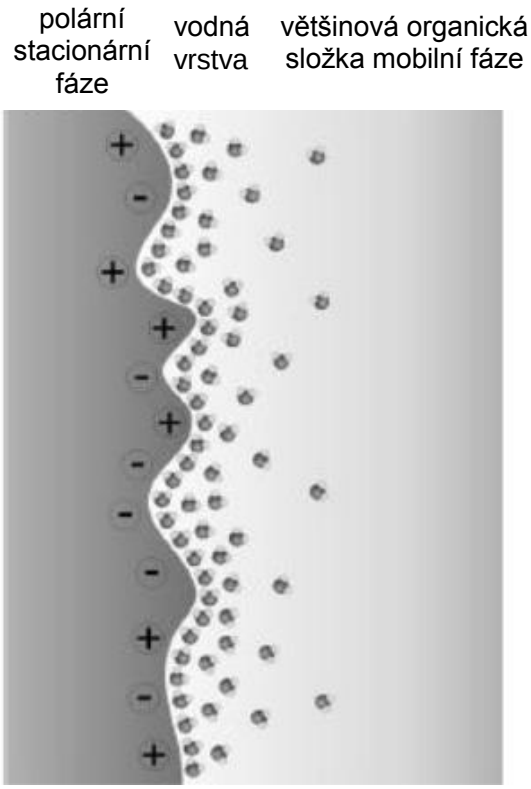
elektrostaticky odpuzovány negativně nabitou stacionární fází, což vede ke snížení retence. Přítomnost pufru může účinně snižovat elektrostatické interakce (odpudivé i přitažlivé) mezi nabitými ionty, a tím ovlivňovat retenci analytu. Zvyšováním koncentrace pufru, dochází k redukci přitažlivých sil, a tím ke snížení retence analytů s opačným nábojem než má stacionární fáze [18][29][30]. Jako pufr je obvykle používán octan amonný nebo mravenčan amonný. Tyto látky jsou dobře rozpustné v mobilní fázi bohaté na acetonitril a kompatibilní s hmotnostní detekcí [35].



Obr. 10: Vliv hodnoty pH na separaci na diolové koloně (A) a silikagelové koloně (B) za podmínek: acetonitril:10 mM mravenčan amonný (pH 3) / 10 mM octan amonný (pH 4-6) (90:10); průtok 0,6 ml/min. 1) nikotinamid, 2) pyridoxin, 3) riboflavin, 4) kyselina nikotinová, 5) kyselina L-askorbová, 6) thiamin. Převzato a upraveno ze zdroje [30].

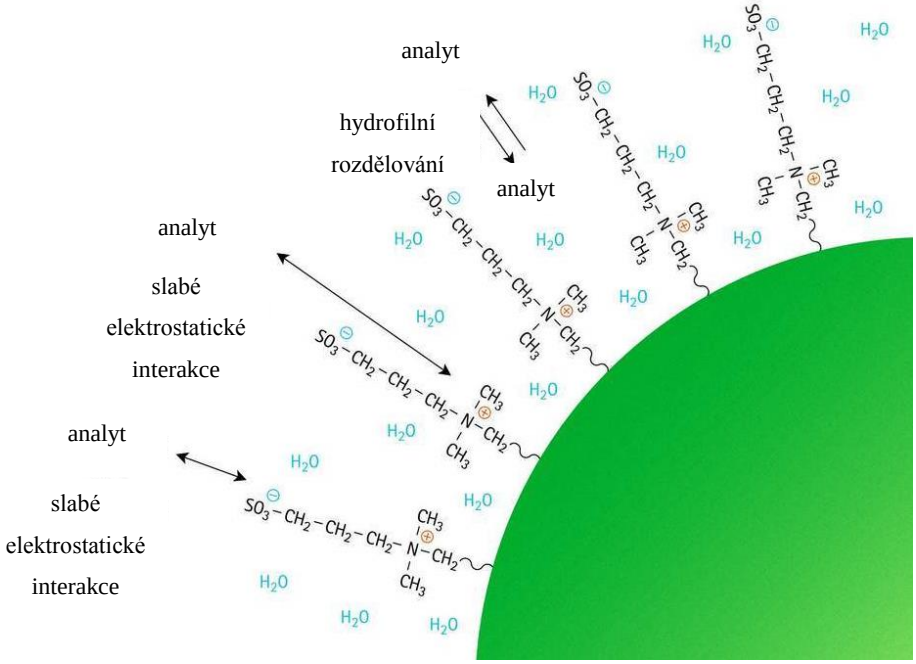
3.2.3 Retenční mechanismus

Typ stacionární a mobilní fáze ovlivňují výsledný mechanismus chromatografické separace. Stacionární fáze v HILIC je velmi hydrofilní a poutá vodu obsaženou v mobilní fázi. Dochází k hydrataci sorbentu stacionární fáze a na jejím povrchu se tvoří difúzní vrstva vody (Obr. 11) [15][36][37] .



Obr. 11: Tvorba difúzní vrstvy na povrchu sorbentu. Převzato a upraveno ze zdroje [15].

Za hlavní mechanismus retence lze tedy považovat rozdělování analyzované látky mezi difúzní vodnou vrstvu vázanou na stacionární fázi a na vodu chudší mobilní fázi podle její afinity [17]. Retence je založena na hydrofilních proton donor-akceptorových a dipól-dipólových interakcích jak s povrchem stacionární fáze, tak i s kapalinou vázanou na jeho povrchu v difúzní vrstvě (Obr. 12). U slabých kyselin a bází se mohou uplatnit i iontově-výměnné interakce [16][17][19][30][36].



Obr. 12: Mechanismus HILIC. Převzato a upraveno ze zdroje [38].

Ovlivnění retence je podobné jako při separacích na normálních fázích. Retence látek se zvyšuje s jejich polaritou a klesá s rostoucí koncentrací vodné složky (polárnějšího rozpouštědla) v mobilních fázích. Na mnoha typech polárních kolon se při nižších koncentracích ACN mění mechanismus retence a chromatografické chování látek odpovídá separacím v systémech s převrácenými fázemi (RP) – retence roste s rostoucím obsahem vody v mobilní fázi. Při separacích na jedné koloně v různých mobilních fázích lze dosáhnout velmi odlišné selektivity separace [35].

3.3 Použité analyty

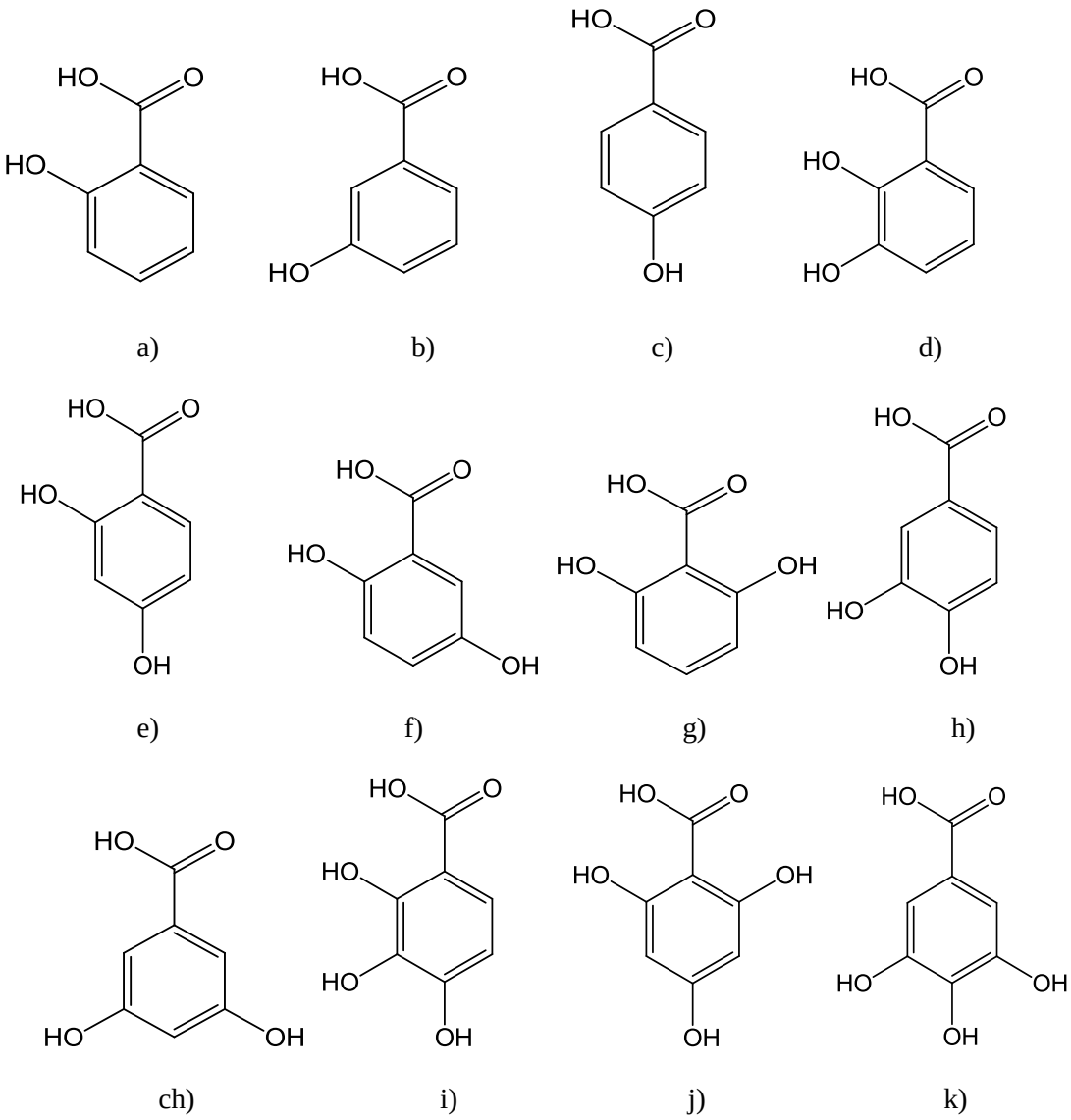
3.3.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou sekundární metabolity rostlin, z nichž mnohé mají antioxidační vlastnosti [39]. Vyskytují se v rostlinách jako volné kyseliny nebo ve formě esterů glykosidů či vázané do komplexů [40].

Skupina fenolických kyselin je odvozená od kyseliny benzoové, jejíž základ tvoří benzenové jádro a na něj navázaná karboxylová skupina. Jednotlivé kyseliny se liší počtem hydroxylových skupin a jejich vzájemným postavením na benzenovém jádře (Obr. 13). Tyto změny ve struktuře způsobují také to, že se liší svou rozpustností a polaritou [41]. Jedná se většinou o slabé organické kyseliny, které jsou také dobře rozpustné ve vodě (Tab. 2).

fenolické kyseliny	molekulová hmotnost	log P	pKa
3 – OH BA	138,12	1,227	4,08
4 – OH BA	138,12	1,401	4,57
2,3 – OH BA	154,12	1,621	2,96
2,4 – OH BA	154,12	1,765	3,32
2,5 – OH BA	154,12	1,396	3,01
2,6 – OH BA	154,12	2,376	1,30
3,4 – OH BA	154,12	1,010	4,45
3,5 – OH BA	154,12	0,808	3,96
2,3,4 − OH BA	170,12	1,315	3,30
2,4,6 – OH BA	170,12	2,042	1,62
gallová kyselina	170,12	0,531	4,33
salicylová kyselina	138,12	1,550	4,20

Tab. 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti fenolických kyselin [31].



Obr. 13: Struktury fenolických kyselin: a) salicylová kyselina, b) 3-hydroxybenzoová kyselina, c) 4-hydroxybenzoová kyselina, d) 2,3-dihydroxybenzoová kyselina, e) 2,4-dihydroxybenzoová kyselina, f) 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, g) 2,6-dihydroxybenzoová kyselina, h) 3,4-dihydroxybenzoová kyselina ch) 3,5-dihydroxybenzoová kyselina, i) 2,3,4-trihydroxybenzoová kyselina j) 2,4,6-trihydroxybenzoová kyselina, k) gallová kyselina.

3.3.2 Purinové a pyrimidinové báze

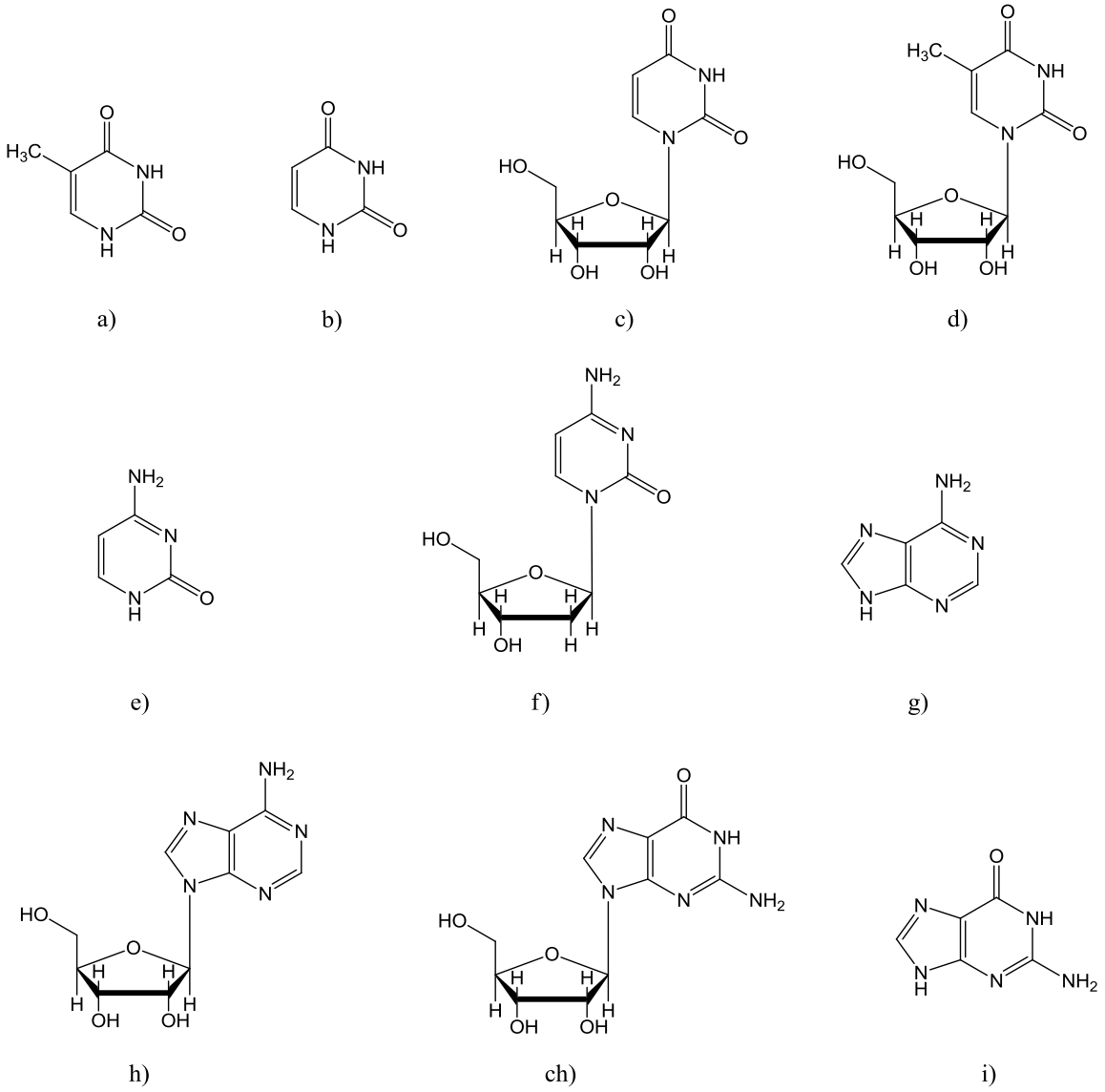
Skupina purinových a pyrimidinových bází patří mezi velmi důležité biomolekuly. Jsou součástí DNA, RNA a dalších důležitých struktur v živých organismech, např. molekul přenášejících energii jako je ATP, GTP, které mají svou nezastupitelnou roli ve všech biochemických procesech v organismech, jako je např. citrátový cyklus, glukoneogeneze a syntéza aminokyselin [42].

Jako zástupci této skupiny byly testovány vybrané purinové báze adenin, guanin adenosin a guanosin. Pyrimidinové báze reprezentuje cytidin, cytosin, thymin, uracil, uridin a 5-methyluridin (Obr. 14).

Po chemické stránce jsou to dusíkaté heterocyklické sloučeniny, jejichž skelet obsahuje 2 dusíkaté atomy v případě pyrimidinů a 4 dusíkaté atomy v případě purinů [43]. Jsou to látky velmi hydrofilní se zápornou hodnotou log P, které se řadí se mezi bazické látky. Adenin je silně bazický, má hodnotu pKa 9,42 (Tab. 3).

purinové a pyrimidinové báze	molekulová hmotnost	log P	pKa (bazické)	pKa (kyselé)
adenin	135,13	- 2,133	9,42	---
adenosin	267,24	- 0,755	3,82	13,11
cytidin	243,22	- 1,808	4,26	13,48
cytosin	111,10	- 1,962	4,18	9,00
guanin	151,13	- 0,960	3,40	9,63
guanosin	283,24	- 1,466	3,12	13,24
thymin	126,11	- 0,621	- 4,15	9,24
uracil	112,09	- 1,037	- 4,19	8,95
uridin	244,20	- 1,581	---	9,39
5-methyluridin	258,23	- 1,166	---	9,55

Tab. 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti purinových a pyrimidinových bází [31].



Obr. 14: Struktura purinových a pyrimidinových bází: a) thymin, b) uracil, c) uridin, d) 5-methyluridin, e) cytosin, f) cytidin, g) adenin, h) adenosin, ch) guanosin, i) guanin.

3.3.3 Deriváty pyridinu

Látky této skupiny obsahují ve své molekule pyridin, na který je navázaná amidická nebo karboxylová skupina.

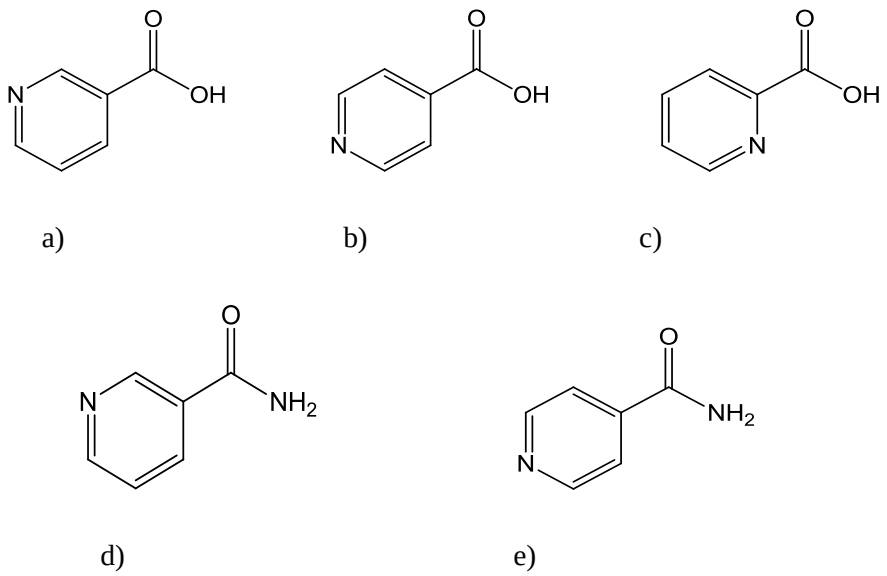
Kyselina nikotinová, známá jako niacin, snižuje hladinu cholesterolu v krvi a je v těle konvertována na nikotinamid. Společně se řadí mezi ve vodě rozpustné vitaminy [44]. Nikotinamid - vitamín B_3 je součástí nikotinamidadenindinukleotidu, který je

důležitým koenzymem energetického metabolismu [45]. Kyselina isonikotinová je nestabilní látkou a v praxi se používají její deriváty iproniazid a isoniazid, které vykazují antituberkulotickou aktivitu [46]. Kyselina pikolinová má antivirové a antibakteriální účinky [47].

Struktura jednotlivých látek se nachází na Obr. 15. Z této skupiny vystupují nikotinamid a isonikotinamid, které mají zápornou hodnotu log P a tudíž jsou velmi hydrofilní. Zbylé tři látky (kyseliny nikotinová, isonikotinová a pikolinová) jsou také hydrofilní a patří mezi silně kyselé látky. Chemické vlastnosti jednotlivých analytů této skupiny udává Tab. 4.

deriváty pyridinu	**molekulová hmotnost**	**log P**	**pKa (bazické)**	**pKa (kyselé)**
nikotinamid	122,2	- 0,368	3,54	14,83
isonikotinamid	122,2	- 0,342	3,39	14,96
kyselina nikotinová	123,11	0,219	4,80	2,20
kyselina isonikotinová	123,11	0,151	4,58	1,95
kyselina pikolinová	123,11	0,238	4,71	1,00

Tab. 4: Fyzikálně-chemické vlastnosti derivátů pyridinu [31].



Obr. 15: Struktury derivátů pyridinu: a) kyselina nikotinová, b) kyselina isonikotinová, c) kyselina pikolinová, d) nikotinamid, e) isonikotinamid.

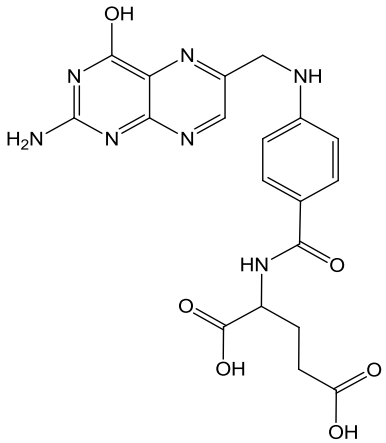
3.3.4 Vitaminy rozpustné ve vodě

Skupina vitaminů rozpustných ve vodě zahrnuje skupinu vitaminů B a vitamin C. Jsou to látky pro lidský organismus velmi významné. Jedná se o kofaktory důležitých chemických a energetických reakcí probíhajících v těle [48][49][50].

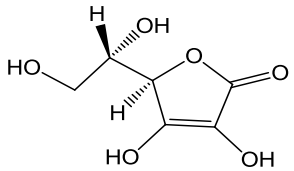
Po chemické stránce se jedná o velmi různorodou skupinu organických látek (Obr. 16) s různými chemickými vlastnostmi (Tab. 5). Jedná se o látky většinou slabě kyselé, pouze riboflavin, nikotinamid a pyridoxin jsou neutrální. Také jsou velmi hydrofilní, jak je patrné ze záporných hodnot log P.

vitaminy rozpustné ve vodě	molekulová hmotnost	log P	pKa (bazické)	pKa (kyselé)
biotin B7	244,31	0,861	-0,58	4,74
kobalamin B 12	1355,37	---	---	---
kyselina askorbová C	176,12	-2,410	---	4,37
kyselina listová B9	441,40	-1,138	1,79	3,30
kyselina pantothenová B5	219,24	-0,856	1,00	4,30
nikotinamid B3	122,12	-0,368	3,54	14,83
pyridoxin B6	169,18	-0,831	5,01	9,63
riboflavin B2	376,36	0,095	-2,19	9,89
thiamin B1	337,28	---	---	---

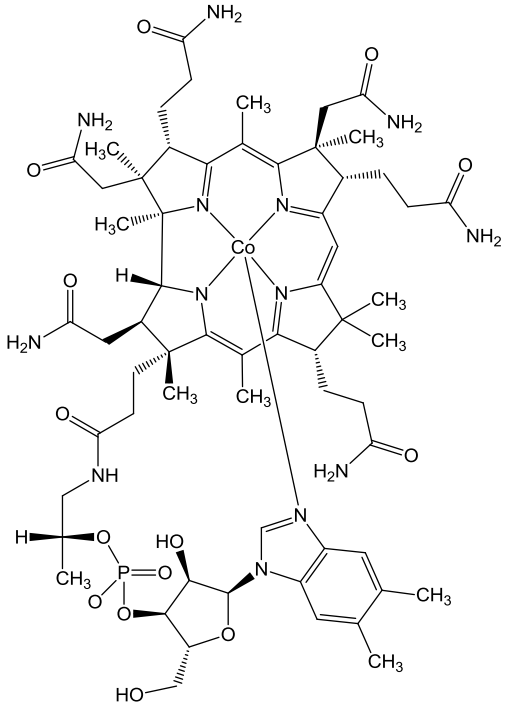
Tab. 5: Fyzikálně-chemické vlastnosti ve vodě rozpustných vitaminů [31].



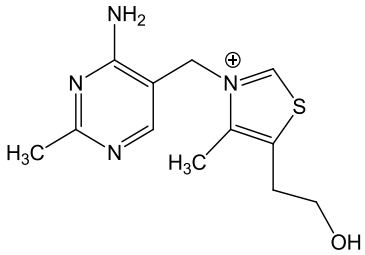
a)



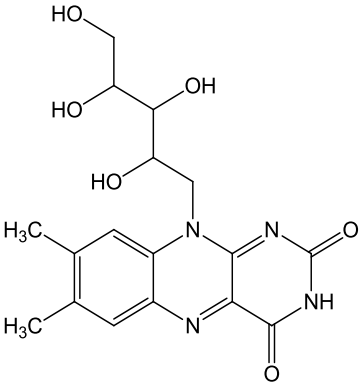
b)



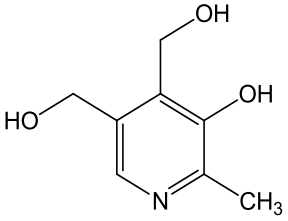
c)



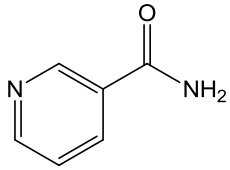
d)



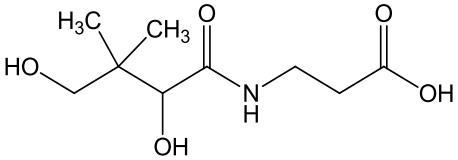
e)



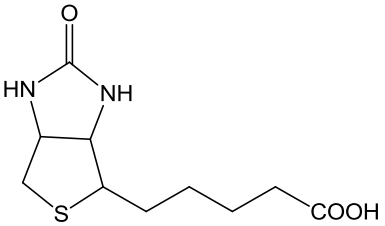
f)



g)



h)



ch)

Obr. 16: Struktury ve vodě rozpustných vitaminů: a) kyselina listová, b) kyselina askorbová, c) kobalamin, d) thiamin, e) riboflavin, f) pyridoxin, g) nikotinamid, h) kyselina pantothenová, ch) biotin.

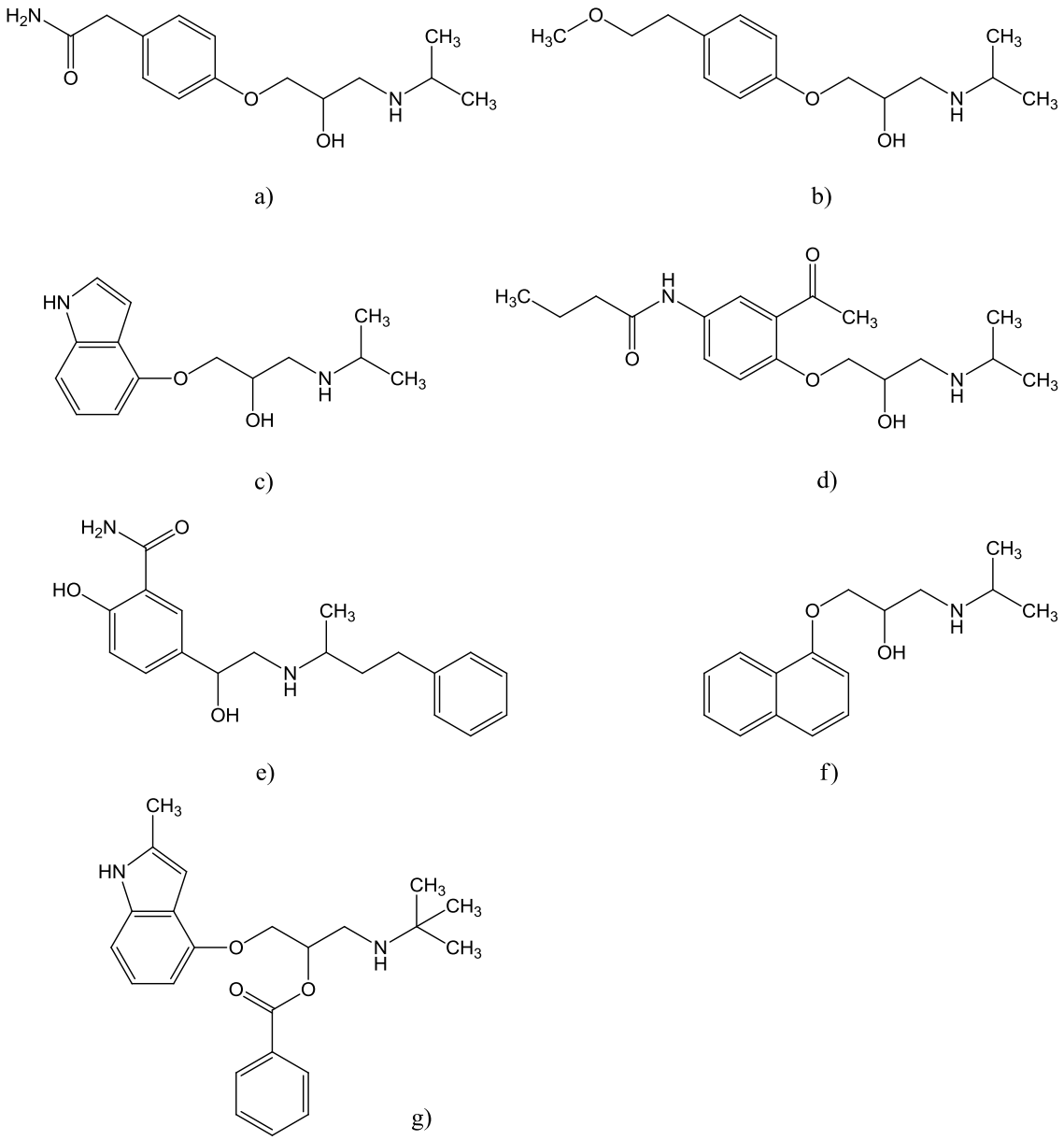
3.3.5 Betablokátory

Betablokátory jsou látky působící jako antagonisté na beta-adrenergních receptorech. Svým působením snižují srdeční frekvenci, vodivost převodního systému, sílu kontrakce a vzrušivost myokardu. Dále také působí bronchokonstrikčně. Rozlišujeme kardioselektivní (acebutolol, atenolol, metoprolol) a neselektivní betablokátory (bopindolol, labetalol, pindolol a propranolol) [51].

Společným strukturním znakem betablokátorů je $–CH(OH)CH_2NH-$ skupina navázaná na aromatickém jádře, která je pro účinek naprosto nezbytná (Obr. 17) [52]. Ze skupiny vystupují atenolol, který je podstatně hydrofilnější než ostatní látky, a bopindolol, který je naopak spíše lipofilní. Jsou to látky silně bazické a jejich fyzikálně chemické vlastnosti udává Tab. 6.

betablokátory	molekulová hmotnost	log P	pKa (bazické)	pKa (kyselé)
acebutolol	336,43	1,769	9,40	13,78
atenolol	266,34	0,335	9,43	13,88
bopindolol	380,48	4,816	9,40	17,59
labetalol	328,41	2,719	9,30	8,21
metoprolol	267,36	1,632	9,43	13,89
pindolol	248,32	1,680	9,54	13,94
propranolol	259,34	2,900	9,50	13,84

Tab. 6: Fyzikálně-chemické vlastnosti betablokátorů [31].



Obr. 17: Struktura vybraných betablokátorů: a) atenolol, b) metoprolol, c) pindolol, d) acebutolol, e) labetalol, f) propranolol, g) bopindolol.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Standardy:

2,3,4-trihydroxybenzoová kyselina 99,1 %, Sigma-Aldrich, ČR

2,3-dihydroxybenzoová kyselina 98,9 %, Sigma-Aldrich, ČR

2,4,6-trihydroxybenzoová kyselina 98,2 %, Sigma-Aldrich, ČR

2,4-dihydroxybenzoová kyselina 98,3 %, Sigma-Aldrich, ČR

2,5-dihydroxybenzoová kyselina 98,4 %, Sigma-Aldrich, ČR

2,6-dihydroxybenzoová kyselina 99,6 %, Sigma-Aldrich, ČR

3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina 99,2 %, Sigma-Aldrich, ČR

3,4-dihydroxybenzoová kyselina 99,6 %, Sigma-Aldrich, ČR

3,5-dihydroxybenzoová kyselina 98,9 %, Sigma-Aldrich, ČR

3-hydroxybenzoová kyselina 98,8 %, Sigma-Aldrich, ČR

4-hydroxybenzoová kyselina 99,5 %, Sigma-Aldrich, ČR

5-methyl uridin 98,6 %, Sigma-Aldrich, ČR

Acebutolol hydrochlorid >98 %, Sigma-Aldrich, ČR

Adenin 99,7 %, Sigma-Aldrich, ČR

Adenosin 99,7 %, Sigma-Aldrich, ČR

Atenolol 98,0 %, Sigma-Aldrich, ČR

Biotin 99,0 %, Sigma-Aldrich, ČR

Bopindolol 99,7 %, Léčiva,ČR

Cytidin 99,1 %, Sigma-Aldrich, ČR

Cytosin 98,3 %, Sigma-Aldrich, ČR

Guanin 99,1 %, Sigma-Aldrich, ČR

Guanosin 99,3 %, Sigma-Aldrich, ČR

Isonikotinamid 98,6 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kobalamin 99,0 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina askorbová 99,0 %, Fluka Analytical,ČR

Kyselina gallová 99,4 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina isonikotinová 99,8 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina listová 97,0 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina nikotinová 99,2 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina pikolinová 98,6 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina salicylová 99,7 %, Sigma-Aldrich, ČR

Labetalol hydrochlorid >98 %, Sigma-Aldrich, ČR

Metoprolol tartrat > 98 %, Sigma-Aldrich, ČR

Nicotinamid 99,1 %, Sigma-Aldrich, ČR

Nikotinamid 99,5 %, Fluka Analytical, ČR

Pantothenát vápenatý > 98,0 %, Merck, Německo

Pindolol >98 %, Sigma-Aldrich, ČR

Propranolol > 99 %, Sigma-Aldrich, ČR

Pyridoxin hydrochlorid >98 %, Sigma-Aldrich, ČR

Riboflavin >98 %, Sigma-Aldrich, ČR

Thiamin >99 %, Sigma-Aldrich, ČR

Thymin 99,0 %, Sigma-Aldrich, ČR

Uracil 99,3 %, Sigma-Aldrich, ČR

Uridin 99,4 %, Sigma-Aldrich, ČR

Chemikálie:

Acetonitril Chromasolv gradient grade, for HPLC 99,9 %, Sigma-Aldrich, ČR

Dioxolan ultra čistý, BlaVO Chemicals s.r.o, ČR

Hydroxid amonný 25 %, Sigma-Aldrich, ČR

Kyselina octová 99,7 %, Sigma-Aldrich ,ČR

Octan amonný 98,0 %, Sigma-Aldrich, ČR

Ultračistá voda Millipore Milli-Q RG, Millipore Corporation, USA

4.2 Přístrojové vybavení

- K měření byl použit přístroj ACQUITY Ultra Performance LC, který se skládá z následujících komponent:
  - ACQUITY - binary solvent manager
  - ACQUITY - sample manager
  - ACQUITY - column manager
  - ACQUITY - PDA detektor

- Analytická kolona ACQUITY UPLC BEH Amide, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm

- Analytické váhy: Sartorius 2004MP, Sartorius, Německo
- Ultrazvuková vodní lázeň: Sonorex Digitec, Bandelin electronic Berlín, Německo
- Vakuové čerpadlo: Medist s.r.o., Slovensko
- Automatické pipety: Biohit, Fisher scientific, ČR
- Třepačka- IKA MS 3 basic, CHROMSERVIS,ČR
- pH metr: Hanna, Fishcher Scientific, ČR

4.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena vždy ze dvou složek v různém poměru. První složku – organickou tvořil acetonitril nebo dioxolan filtrovaný přes 0,20 μm membránový filtr.

U druhé – vodné složky mobilní fáze byly podmínky upravovány použitím 0,5 % kyseliny octové a roztoku 50 mM octanu amonného pH 3,8, pH 6,8, pH 9,8. Pro nevodnou HILIC pak byl použit čistý dioxolan, 0,5 % dioxolanový roztok kyseliny octové a dioxolan modifikovaný vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8.

Odměřením 1 ml koncentrované kyseliny octové do 195 ml ultračisté vody a doplněním ultračistou vodou ve 200 ml odměrné baňce byla připravena 0,5 % kyselina octová.

50 mM roztok octanu amonného pH 3,8 byl připraven odměřením 0,572 ml koncentrované kyseliny octové do 150 ml vody. Za použití pH-metru bylo nastaveno pH 3,8 přidáním zředěného amoniaku. Roztok byl kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn ultračistou vodou po rysku.

50 mM octan amonný pH 6,8 byl připraven rozpuštěním 0,7708 g octanu amonného ve vodě a doplněn ve 200 ml odměrné baňce po rysku. V případě potřeby bylo pH upraveno přidáním amoniaku nebo roztoku kyseliny octové.

50 mM octan amonný pH 9,8 byl připraven odměřením 750 μl 25 % amoniaku do 70 ml ultračisté vody. Za použití pH-metru bylo nastaveno pH 9,8 zředěnou kyselinou octovou. Roztok byl kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn po rysku ultračistou vodou.

0,5 % dioxolanový roztok kyseliny octové byl připraven odměřením 1 ml koncentrované kyseliny octové do 195 ml dioxolanu ve 200 ml odměrné baňce a následným doplněním dioxolanem po rysku.

Dioxolananový roztok 50 mM octanu amonného pH 6,8 nemohl být připraven, protože octan amonný se v dioxolanu nerozpouštěl. Proto byl připraven dioxolan modifikovaný vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8 v poměru 1:1. Rozpuštěním 0,3851 g octanu amonného ve 100 ml ultračisté vody byl připraven vodný roztok 50 mM octanu amonného pH 6,8. V případě potřeby bylo pH upraveno přidáním amoniaku nebo roztoku kyseliny octové. Tento roztok byl smísen s 95 ml čistého

dioxolanu, kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn dioxolanem po rysku.

4.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků

K separaci byly použity analyty rozčleněné do pěti skupin, a to na fenolické kyseliny, purinové a pyrimidinové báze, deriváty pyridinu, vitaminy rozpustné ve vodě a betablokátory.

Zásobní roztoky standardů analytů pro separaci s acetonitrilem byly připraveny rozpuštěním 1 mg analytu v 1 ml směsi acetonitrilu a vody v poměru 50:50. Kyselina listová a riboflavin se v této směsi nerozpouštěly, proto byly jejich zásobní roztoky standardů připraveny rozpuštěním 0,1 mg standardu ve 2 ml vody. Také guanin byl z důvodu špatné rozpustnosti připraven odlišně a to rozpuštěním 0,1 mg standardu v 1 ml směsi acetonitrilu a vody v poměru 50:50. K urychlení rozpouštění standardů byla použita ultrazvuková lázeň a třepačka.

Pro separaci s dioxolanem byly zásobní roztoky standardů analytů připraveny rozpuštěním 1 mg analytu v 1 ml směsi dioxolanu a vody v poměru 50:50. Pouze guanin, kyselina listová a riboflavin byly připraveny rozpuštěním 0,1 mg analytu v 1 ml směsi dioxolanu a vody v poměru 50:50, protože v koncentraci 1 mg/ml nebyly rozpustné. K urychlení rozpouštění standardů byla použita ultrazvuková lázeň a třepačka.

Pracovní roztoky pro analýzu směsí byly připraveny smísením zásobních roztoků analyzované skupiny tak, aby obsahovaly všechny analyty skupiny v koncentraci 10 µl/ml a doplněny do objemu 1 ml, podle typu separace směsí acetonitril/voda nebo dioxolan/voda

Pracovní roztoky pro identifikaci analytů byly připravovány v čase potřeby odpipetováním 10 µl roztoků standardu a doplněny směsí acetonitril/voda nebo dioxolan/ voda, tak aby složení vzorku co nejvíce odpovídalo složení mobilní fáze.

4.5 Podmínky UHPLC HILIC měření

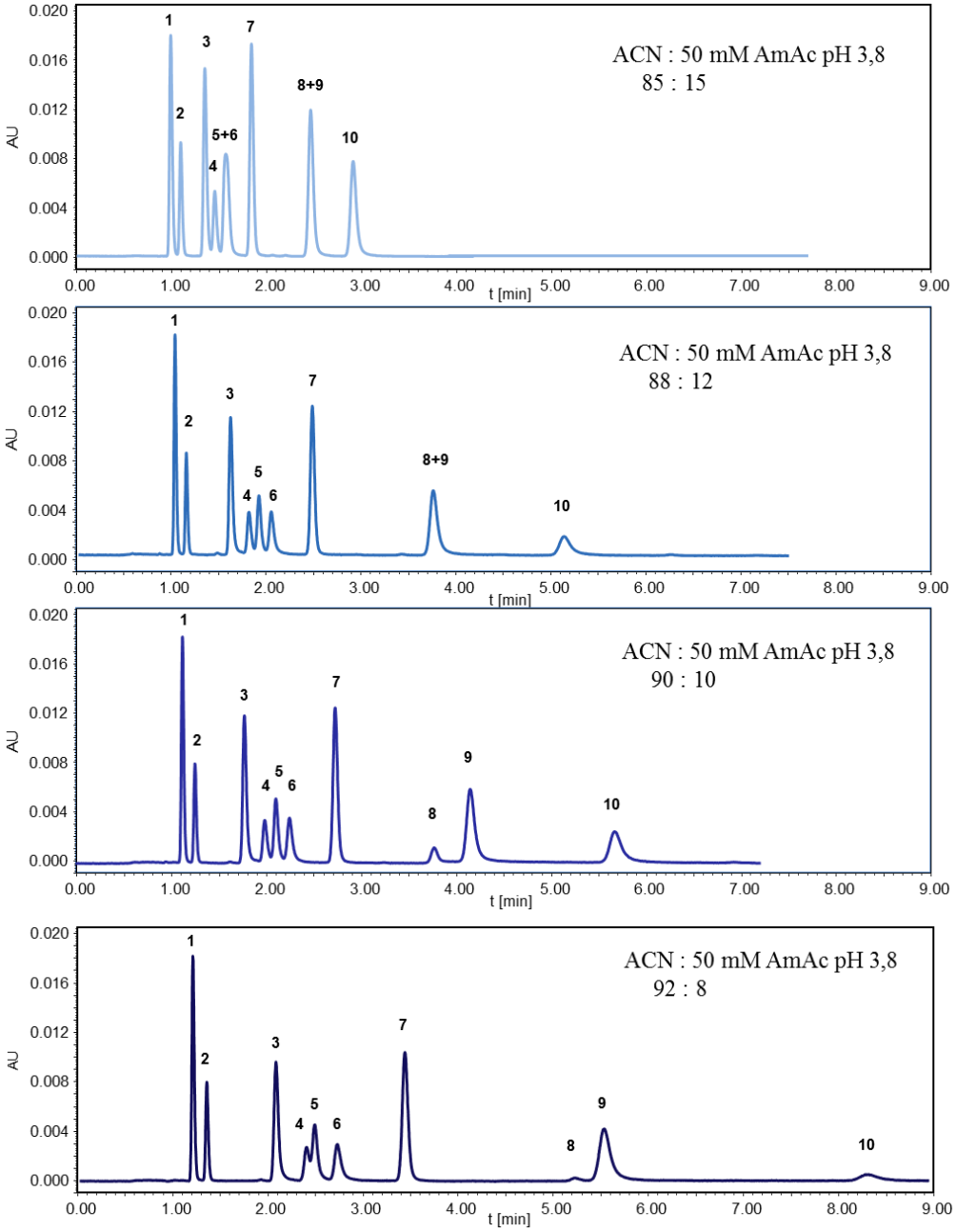
Zkoumání možností využití dioxolanu jako alternativní mobilní fáze pro HILIC chromatografii probíhalo na přístroji ACQUITY Ultra Performance LC s detekcí PDA detektorem při vlnové délce 280 nm pro všechny skupiny analytů s výjimkou betablokátorů, které byly měřeny při 220 nm a 270 nm. Měření bylo prováděno pomocí izokratické eluce při konstantní rychlosti průtoku 0,4 ml/min a konstantní teploty 30 °C. Pro každý nástřik byly použity 2 µl směsi analytů dané skupiny a každý nástřik byl pro ověření opakovatelnosti měření proveden dvakrát. Zkoušené podmínky pro jednotlivé skupiny analytů shrnuje Tab. 7.

analyty	zkoušené podmínky		
	ACN / pufr	DIO /pufr	ACN/DIO
fenolické kyseliny	0,1% AcAc; pH 3,8; pH 6,8; pH 9,8;	pH 3,8; pH 6,8	DIO + AmAc
deriváty purinových a pyrimidinových bazí	0,1% AcAc; pH 3,8; pH 6,8; pH 9,8;	pH 3,8; pH 6,8	DIO + AmAc
deriváty pyridinu	0,1% AcAc; pH 3,8; pH 6,8; pH 9,8;	pH 3,8; pH 6,8	DIO + AmAc
vitaminy rozpustné ve vodě	0,1% AcAc; pH 3,8; pH 6,8; pH 9,8;	pH 3,8; pH 6,8	DIO + AmAc
betablokátory	pH 3,8; pH 9,8;	pH 3,8; pH 6,8	DIO + AmAc

Tab. 7: Tabulka zkoušených podmínek pro jednotlivé skupiny analytů (ACN - acetonitil, AcAc - kyselina octová, AmAc - octan amonný, DIO - dioxolan).

5 Výsledky a diskuze

Měření probíhalo izokratickou elucí při konstantním průtoku 0,4 ml/min. Optimalizace podmínek HILIC separace pro jednotlivé skupiny analytů byla v rámci určitého složení mobilní fáze prováděna postupným zvyšováním koncentrace organické složky v mobilní fázi (Obr. 18). Pro větší přehlednost jsou v této práci uváděny jen chromatogramy s optimalizovaným složením mobilní fáze.



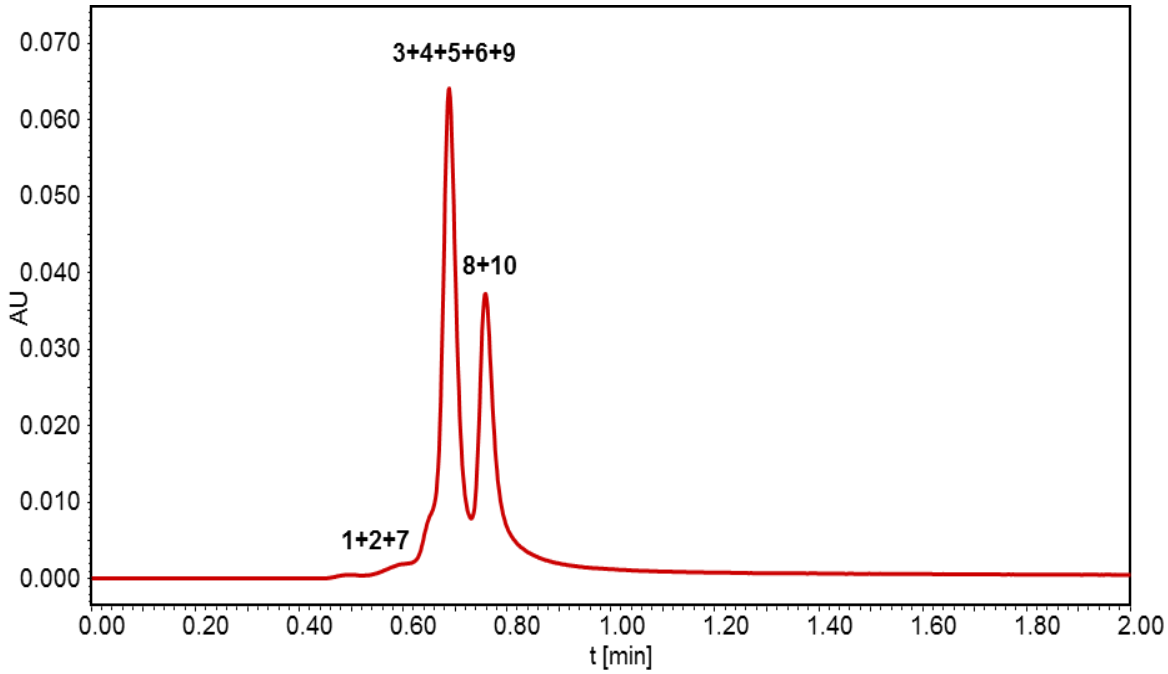
Obr. 18: Příklad optimalizace podmínek HILIC separace purinových a pyrimidinových bází při složení mobilní fáze ACN: 50 mM AmAc pH 3,8 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 -adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).

5.1 Separace fenolických kyselin

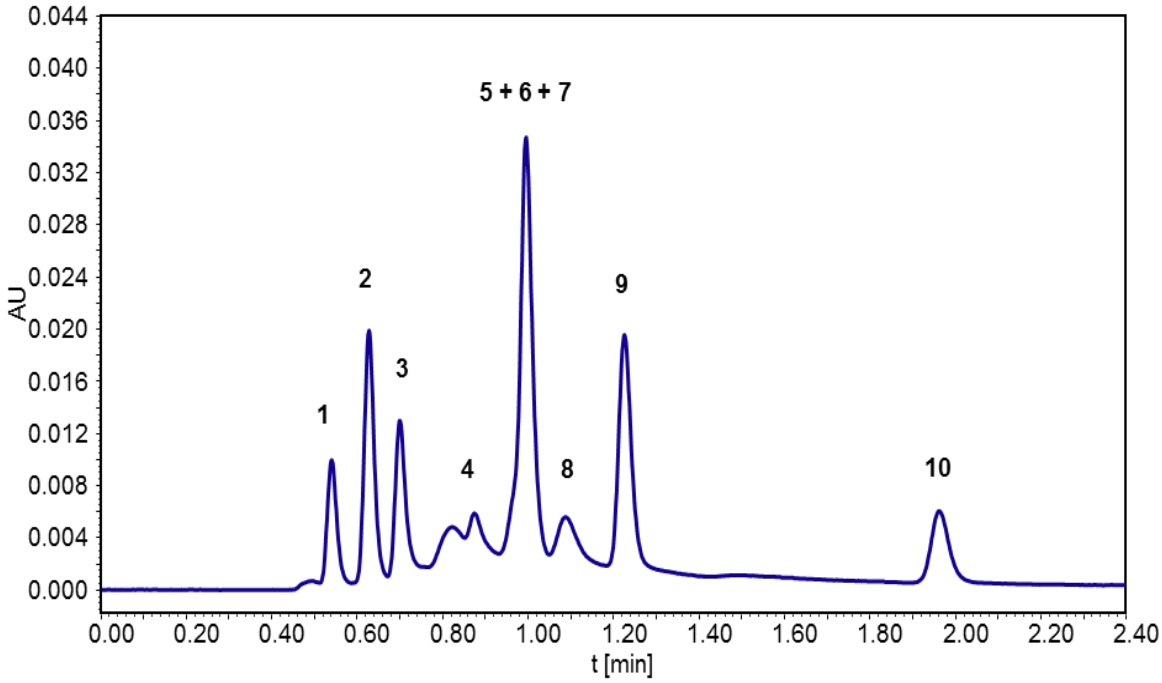
5.1.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem

Směs fenolických kyselin byla analyzována s acetonitrilem a jako druhá složka mobilní fáze byl použit pufr 50 mM octan amonný pH 3,8, pH 6,8, pH 9,8 a 0,5 % kyselina octová. Ze dvanácti kyselin nebyly detekovány 2,5-OH BA a kyselina gallová pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti v rozpouštěcích směsích, obsahujících vysokou koncentraci acetonitrilu.

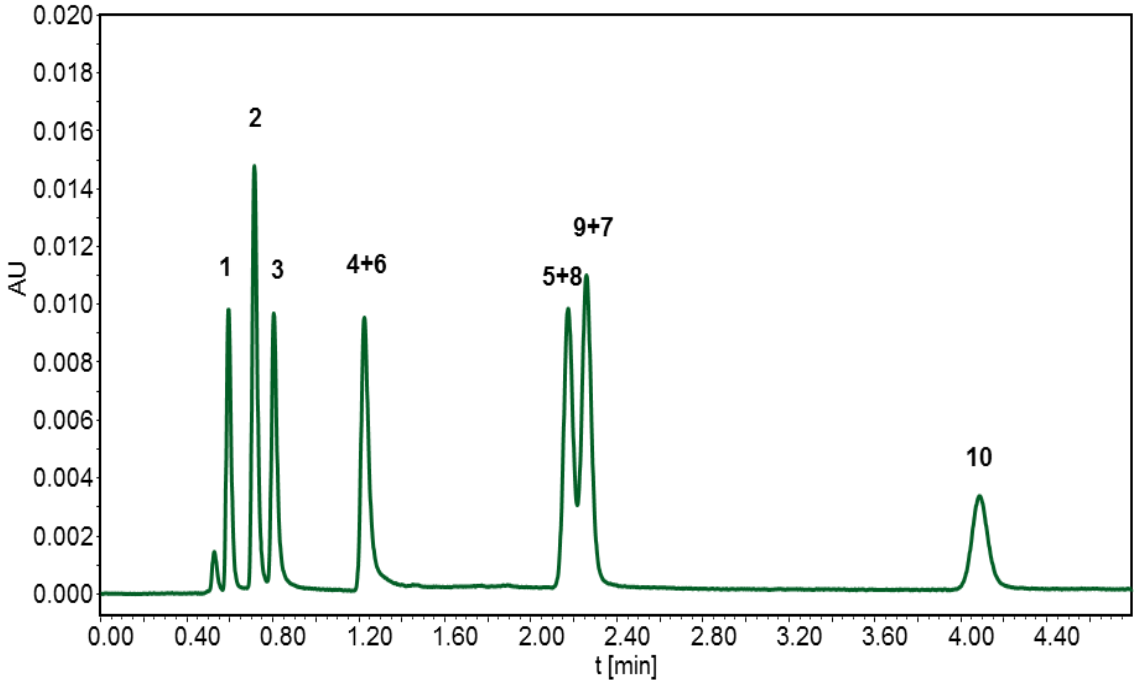
Při separaci s 0,5 % kyselinou octovou analyty nebyly od sebe dostatečně separovány a byly eluovány pouze dva píky během 1 minuty (Obr. 19). Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 jako druhé složky mobilní fáze separace trvala 2,1 minuty. Bylo eluováno 8 píků, kyselina 2,4-OH BA, 4-OH BA a 2,3,4-OH BA byly eluovány v podobném retenčním čase v rámci jednoho píku (Obr. 20). Při zvýšení pH na 6,8 byla separace delší, trvala 4,4 minut, a došlo ke změnám v pořadí eluce některých analytů. Kyselina 2,4-OH BA byla eluována v podobném retenčním čase jako kyselina 2,3-OH BA, také docházelo ke koeluci kyseliny 4-OH BA s 3,4-OH BA a kyseliny 3-OH BA s 2,3,4-OH BA (Obr. 21). Při dalším zvýšení pH na 9,8 separace trvala 3,8 minut a bylo eluováno 7 píků, které byly od sebe méně separovány než při pH 6,8 (Obr. 22). Z tohoto důvodu nebyla provedena indentifikace jednotlivých analytů a pro proměření SST byly vybrány podmínky při složení mobilní fáze 90:10 ACN:50 mM octan amonný pH 6,8 (Tab. 8).



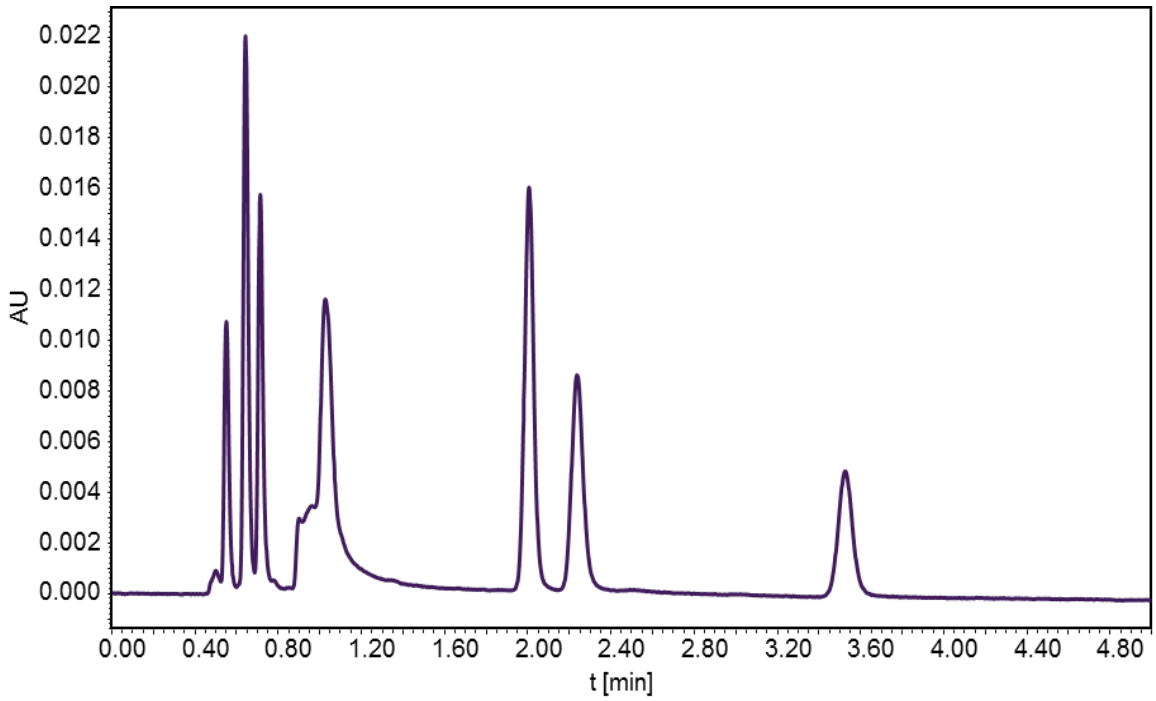
Obr. 19: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:0,5 % kyselina octová v poměru 85:15 (1 - 2,6-OH BA; 2 - 2,4,6-OH BA; 3 - SAL; 4 - 2,3-OH BA; 5 - 4-OH BA; 6 - 2,4-OH BA; 7- 2,3,4-OH BA; 8 - 3,4-OH BA; 9 - 3-OH BA;10 - 3,5-OH BA).



Obr. 20: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10 (1 - 2,6-OH BA; 2 - 2,4,6-OH BA; 3 - SAL; 4 - 2,3-OH BA; 5 - 4-OH BA; 6 - 2,4-OH BA; 7- 2,3,4-OH BA; 8 - 3,4-OH BA; 9 - 3-OH BA; 10 - 3,5-OH BA).



Obr. 21: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 90:10 (1 - 2,6-OH BA; 2 - 2,4,6-OH BA; 3 - SAL; 4 - 2,3-OH BA; 5 - 4-OH BA; 6 - 2,4-OH BA; 7- 2,3,4-OH BA; 8 - 3,4-OH BA; 9 - 3-OH BA; 10 - 3,5-OH BA).



Obr. 22: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 90:10.

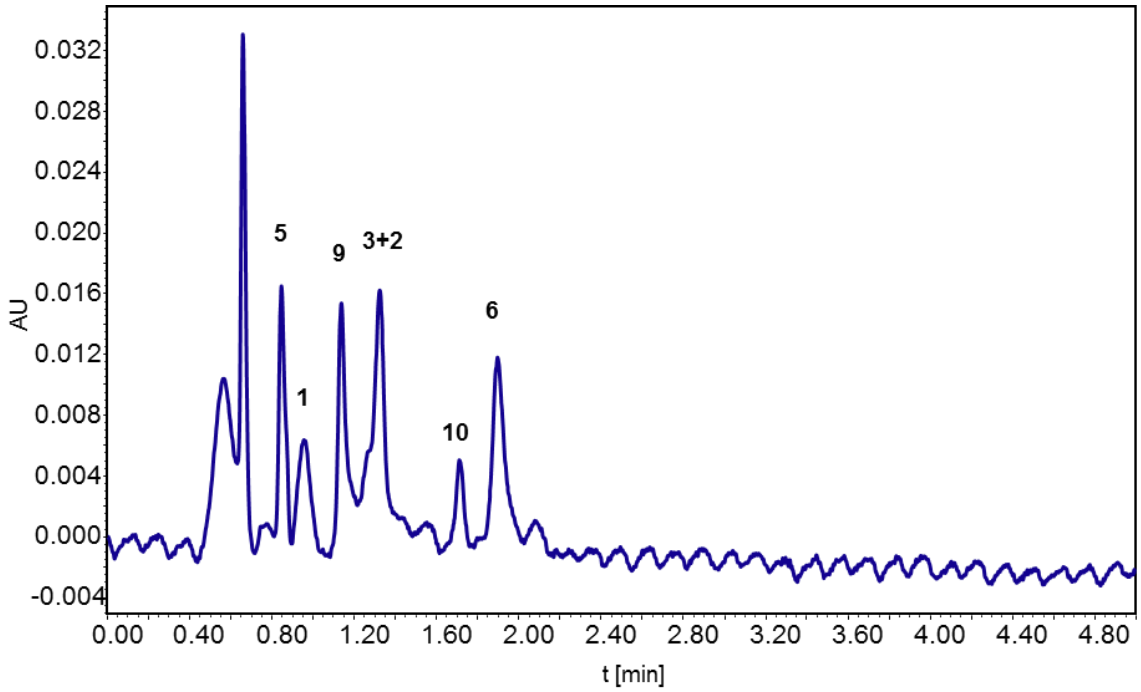
Látky	Retenční čas [%RSD]	Plocha [%RSD]	Rozlišení	Faktor symetrie	Počet teoretických pater
2,6- OH BA	0,11	0,46	---	1,30	3 558
2,4,6-OH BA	0,09	0,31	2,88	1,34	4 256
SAL	0,09	1,06	2,03	1,42	5 027
2,4-OH BA	0,09	1,44	7,88	1,48	6 356
4-OH BA	0,05	0,49	13,16	---	10 981
3-OH BA	0,06	0,45	1,03	---	11 686
3,5-OH BA	0,04	1,11	16,54	1,08	14 025

Tab. 8: Vybrané hodnoty SST pro separaci fenolických kyselin na koloně BEH Amide při složení mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 90:10.

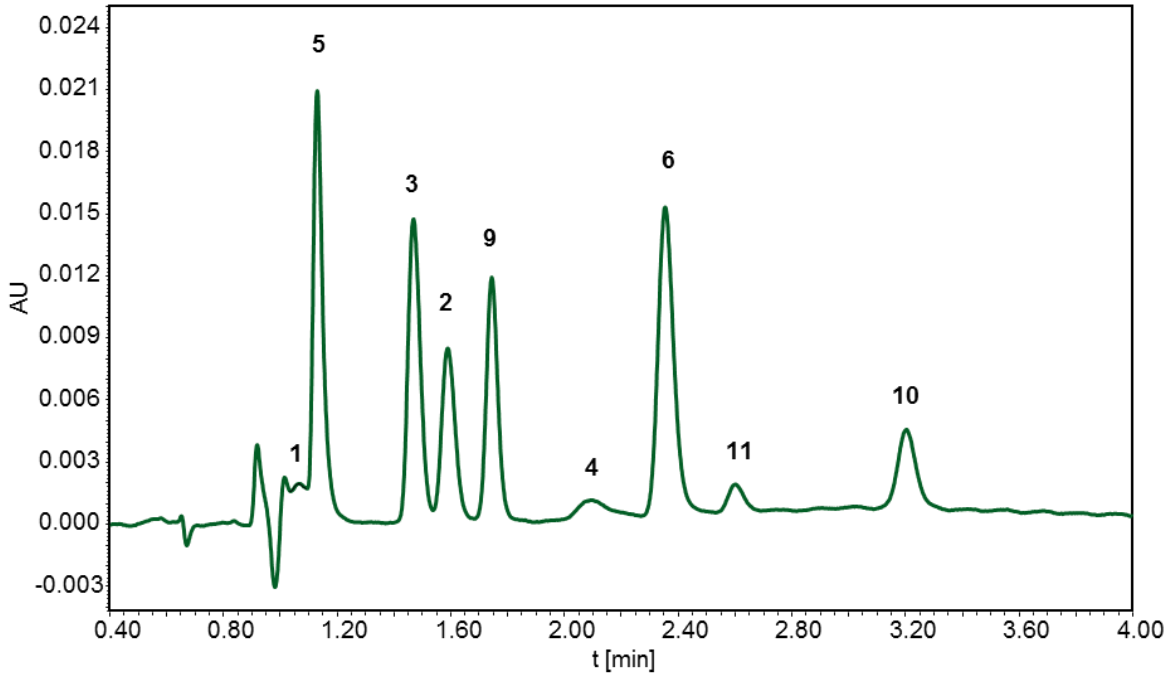
5.1.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem

Pro separaci s dioxolanem byly vybrány pufry 50 mM octan amonný pH 3,8 a pH 6,8. Bazické pH při separaci s acetonitrilem nevykazovalo výrazné rozdíly od separace s kyselým pH, také použití 0,5 % kyseliny octové jako vodné složky mobilní fáze se ukázalo pro separaci skupiny fenolických kyselin nevýhodné, a proto tyto podmínky nebyly zkoušeny při separacích s dioxolanem. Z dvanácti testovaných fenolických kyselin nebyly detekovány kyseliny 3,4-OH BA a 2,3,4-OH BA pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti v dioxolanu a také kyselina gallová, kterou se nepodařilo detekovat ani při separacích s acetonitrilem.

Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 trvala separace 2,2 minuty a bylo eluováno 6 píků. Identifikováno bylo 7 hydroxybenzoových kyselin. Kyseliny 2,5-OH BA a 2,3-OH BA nebyly detekovány pravděpodobně z důvodů přílišné retence za těchto podmínek. Při porovnání s acetonitrilem došlo ke změně pořadí eluce jednotlivých analytů. V rámci čtvrtého píku docházelo ke koeluci kyseliny salicylové s 2,4,6-OH BA. Za těchto podmínek byl pozorován zvýšený šum na základní linii (Obr. 23). Při zvýšení pH na 6,8 byla separace delší, trvala 3,4 minuty a bylo separováno 9 píků. Na rozdíl od separací s pH 3,8 a separací s acetonitrilem byla detekována i kyselina 2,5-OH BA (Obr. 24). Při separacích s dioxolanem došlo k výrazné změně v pořadí eluce jednotlivých analytů. Na rozdíl od separace s scetonitrilem byla kyselina 4-OH BA eluována dříve než kyselina 2,4,6-OH BA a kyselina salicylová. Kyselina 3-OH BA byla separována před kyselinami 2,3-OH BA a 2,4-OH BA. SST nebylo proměřováno, protože separace nebyla účinnější než separace s použitím acetonitrilu.



Obr. 23: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný 3,8 v poměru 90:10 (1 - 2,6-OH BA; 2 - 2,4,6-OH BA; 3 – SAL; 5 - 4-OH BA; 6 - 2,4-OH BA; 9 - 3-OH BA; 10 - 3,5-OH BA).

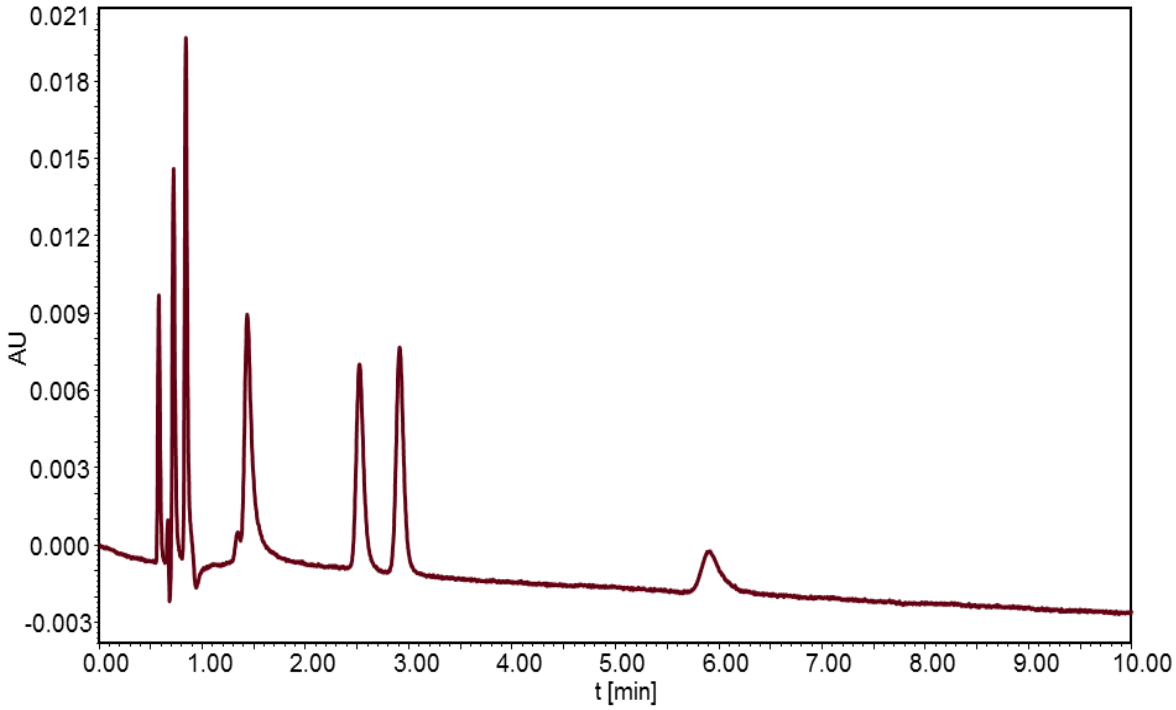


Obr. 24: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 92:8 (1 - 2,6-OH BA; 2 - 2,4,6-OH BA; 3 – SAL; 4 – 2,3-OH BA; 5 - 4-OH BA; 6 - 2,4-OH BA; 9 - 3-OH BA; 10 - 3,5-OH BA; 11 – 2,5-OH BA).

5.1.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC

V rámci nevodné HILIC byly testovány možnosti použití mobilní fáze skládající se z acetonitrilu a dioxolanu, který nahrazoval vodnou složku. Toto složení mobilní fáze se ukázalo jako nevyhovující, byl eluován pouze jeden pík. Stejné výsledky byly zjištěny i při použití mobilní fáze o složení acetonitil – dioxolan s přídavkem kyseliny octové. Při modifikaci dioxolanové složky octanem amonným bylo zjištěno, že octan amonný není v čistém dioxolanu rozpustný. Provedení analýzy bez přítomnosti vody na této koloně a za daných podmínek nebylo možné. V rámci „nevodné“ HILIC byla dále testována mobilní fáze acetonitril-dioxolan modifikovaný vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8.

Při použití mobilní fáze o složení acetonitril – dioxolan s přídavkem vodného roztoku 50 mM octanu amonného pH 6,8 separace trvala 6,5 minut. Bylo separováno 7 píků u kterých nebyla provedena identifikace jednotlivých analytů, protože separace neposkytovala lepší výsledky než separace s acetonitrilem v rámci klasické HILIC (Obr. 25).



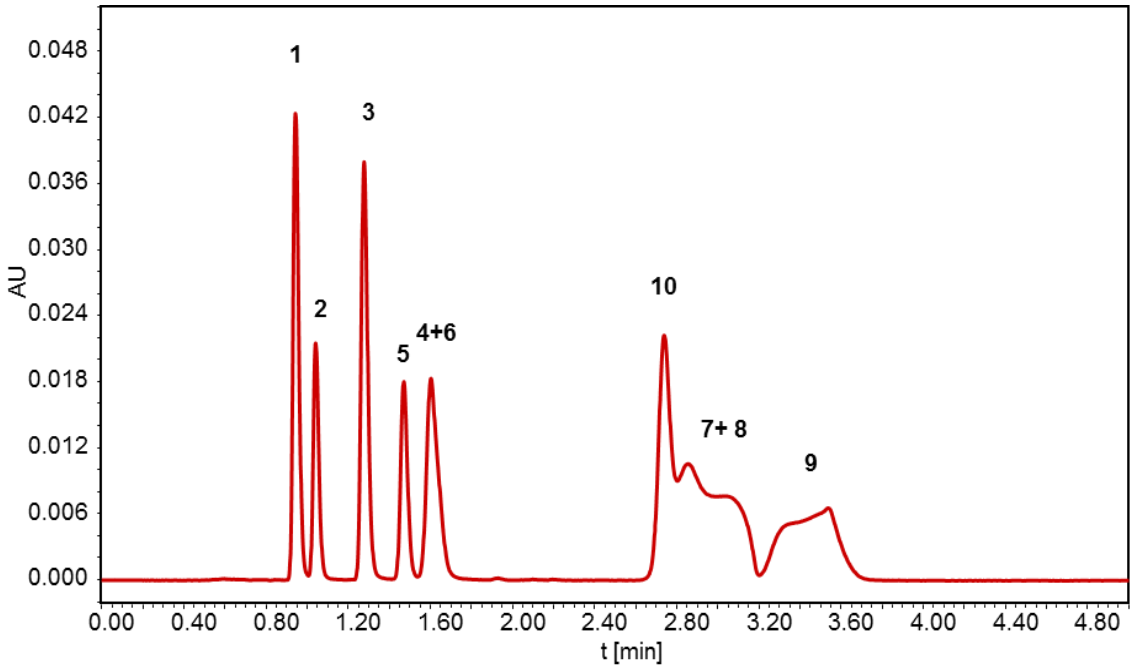
Obr. 25: Separace fenolických kyselin na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN: DIO+50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 85:15.

5.2 Separace purinových a pyrimidinových bází

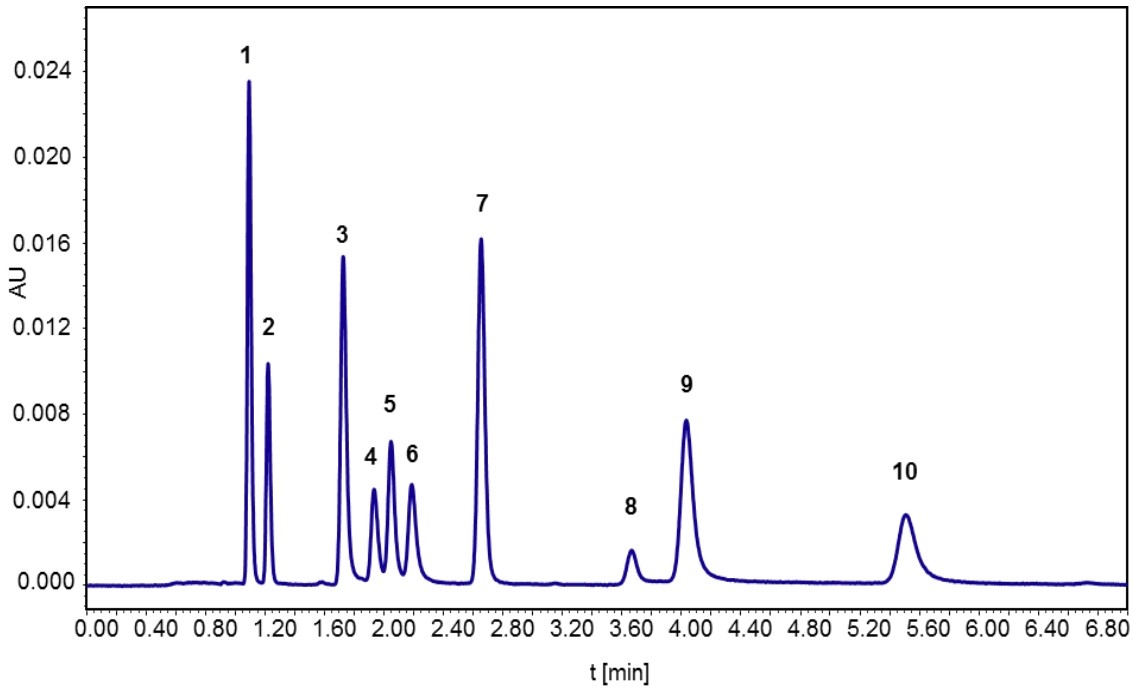
5.2.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem

Skupina purinových a pyrimidinových bází byla analyzována za stejných podmínek jako skupina fenolických kyselin. Jako druhá složka mobilní fáze byl použit 50 mM octan amonný pH 3,8, pH 6,8, pH 9,8 a 0,5 % kyselina octová.

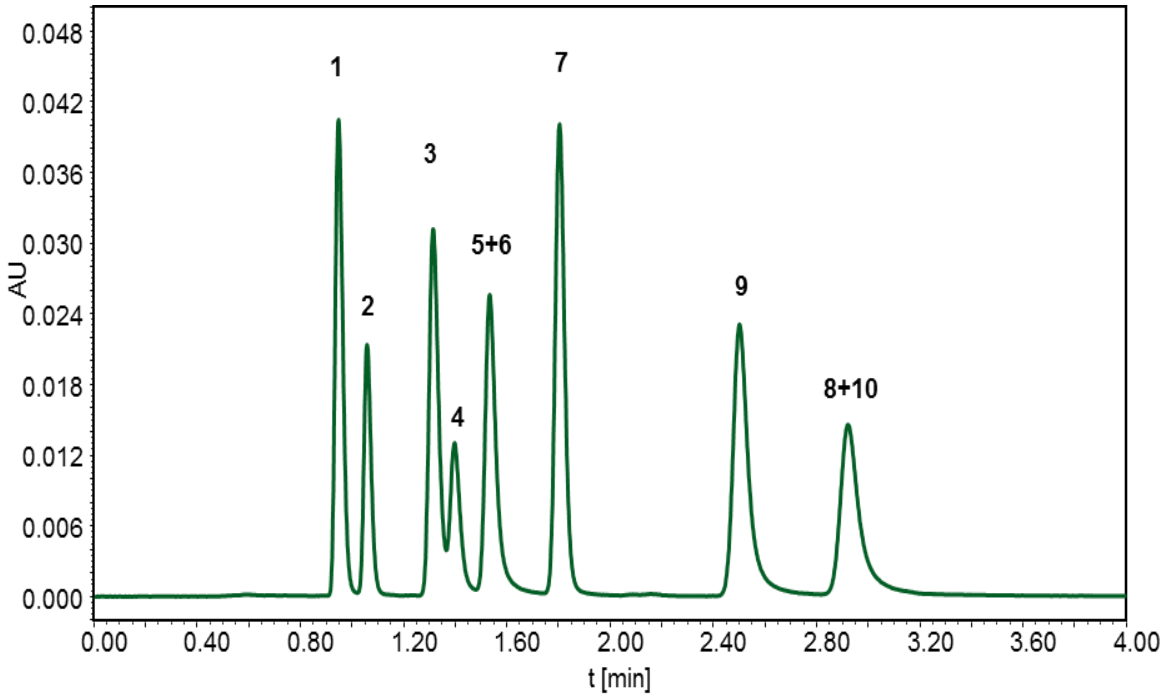
Při separaci s 0,5 % kyselinou octovou bylo separováno sedm píků a eluováno bylo všech deset látek. Separace trvala 4 minuty. V rámci šestého píku byly eluovány tři báze a to guanin, guanosin a cytosin. Cytosin a cytidin za těchto podmínek vykazovaly značné chvostování píků. Také se nepodařilo od sebe separovat adenin s adenosinem (Obr. 26). Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 bylo eluováno a separováno všech 10 bází a separace trvala 6,4 minut (Obr. 27). Při zvýšení pH na 6,8 se separace zkrátila na 3,2 minuty a bylo separováno jen 8 píků. Došlo ke koeluci uridinu s adenosinem a guaninu s guanosinem (Obr. 28). Za těchto podmínek byl cytidin eluován před guaninem. Při použití 50 mM octanu amonného pH 9,8 separace trvala stejně jako v případě pH 3,8 6,4 minut a bylo eluováno devět píků. Také v tomto případě docházelo ke koeluci guaninu s guanosinem a eluci cytidinu před guaninem (Obr. 29). Pro proměření SST byly vybrány podmínky se složením mobilní fáze acetonitril:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10, při kterých byly separovány všechny složky směsi (Tab. 9).



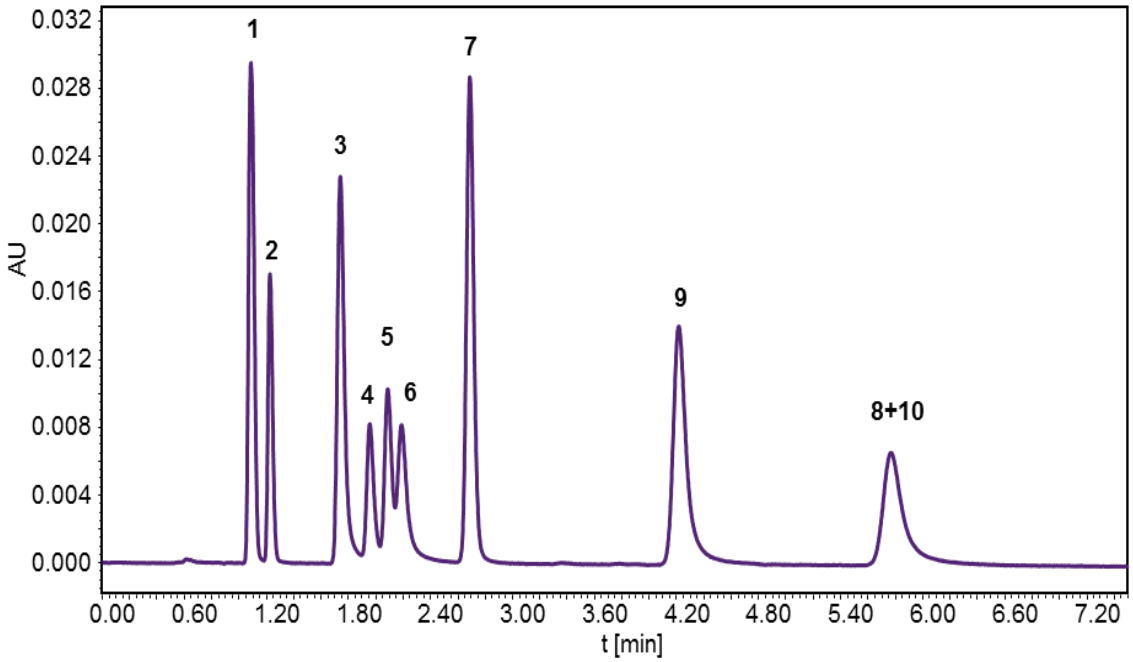
Obr. 26: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:0,5 % kyselina octová v poměru 85:15 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 - adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).



Obr. 27: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 - adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).



Obr. 28: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 90:10 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 - adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).



Obr. 29: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 90:10 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 - adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).

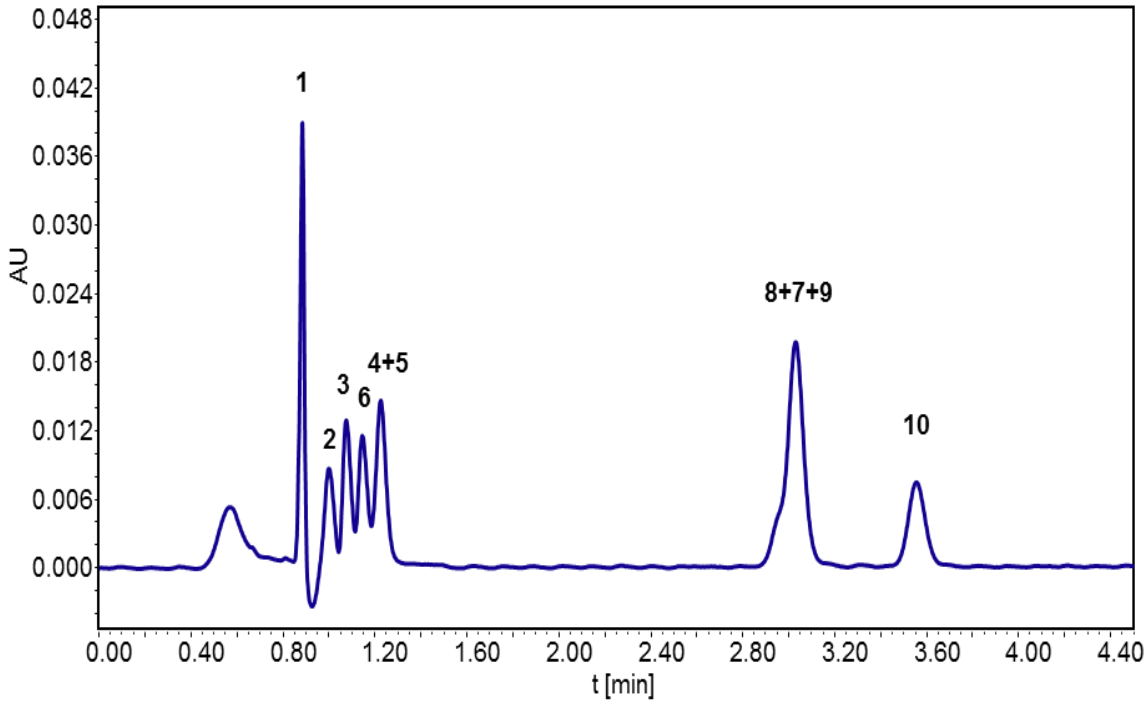
Látky	Retenční čas [%RSD]	Plocha [%RSD]	Rozlišení	Faktor symetrie	Počet teoretických pater
Thymin	0,06	0,27	---	1,21	8 607
Uracil	0,05	0,16	2,68	1,19	10 002
5-methyluridin	0,04	0,91	8,54	1,27	9 820
Adenin	0,04	0,25	2,74	---	8 828
Uridin	0,04	0,43	1,41	---	10 559
Adenosin	0,03	0,80	1,61	---	8 537
Cytosin	0,02	0,46	5,14	1,14	14 758
Guanin	0,04	3,23	9,79	1,11	14 939
Cytidin	0,02	1,01	2,73	1,32	11 872
Guanosin	0,03	3,07	8,19	1,29	10 618

Tab. 9: Vybrané hodnoty SST pro separaci purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide při složení mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10.

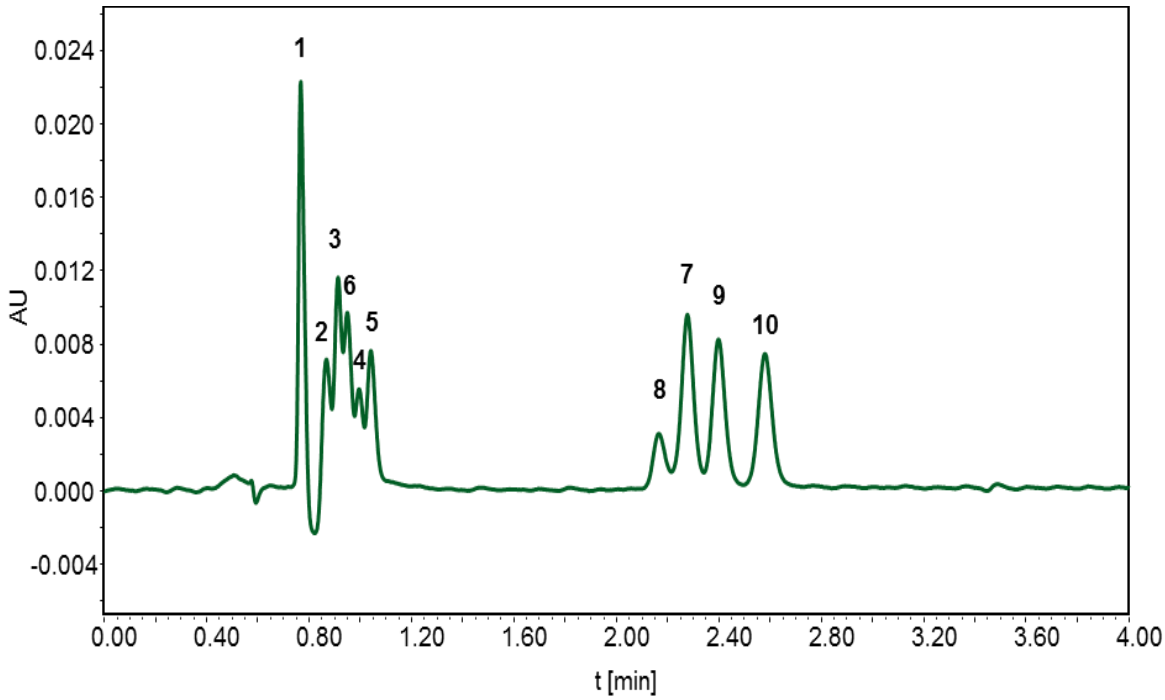
5.2.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem

Pro separaci purinových a pyrimidinových bází s dioxolanem byly vybrány podmínky s 50 mM octanem amonným pH 3,8 a pH 6,8 jako vodnou složkou mobilní fáze. Použití 0,5 % kyseliny octové nebylo vhodné pro separaci této skupiny látek a bazické pH při separaci s acetonitrilem vykazovalo podobné výsledky jako separace s 50 mM octanem amonným pH 3,8 a pH 6,8, a proto tyto podmínky nebyly zkoušeny při separacích s dioxolanem.

Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 bylo separováno 7 píků a byly eluovány, stejně jako při separacích s acetonitrilem, všechny látky této skupiny. Na rozdíl od separace s acetonitrilem při pH 3,8, kdy byly separovány všechny látky, docházelo ke koeluci adeninu s uridinem a také guaninu s cytidinem a cytosinem. Separace byla kratší než při separaci s acetonitrilem, trvala 3,8 minuty (Obr. 30). Při použití 50 mM octanu amonného pH 6,8 jako druhé složky mobilní fáze trvala separace jen 3 minuty. Eluováno bylo všech deset látek, ale nedošlo k úplnému rozlišení píků (Obr. 31). Podařilo se na rozdíl od separací s acetonitrilem odseparovat guanin od guanosinu, ale separace s dioxolanem vykazovala horší rozlišení píku uracilu, adeninu, 5-methyluridinu, adenosinu a uridinu. Na rozdíl od separací s acetonitrilem byl adenosin eluován před adeninem a uridinem a guanin před cytosinem. SST nebylo proměřováno, protože ani zvyšováním koncentrace dioxolanu v mobilní fázi nedošlo ke zlepšení rozlišení píků. Testované podmínky nebyly vhodné pro separací této skupiny látek.



Obr. 30: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 92:8 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 - adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).

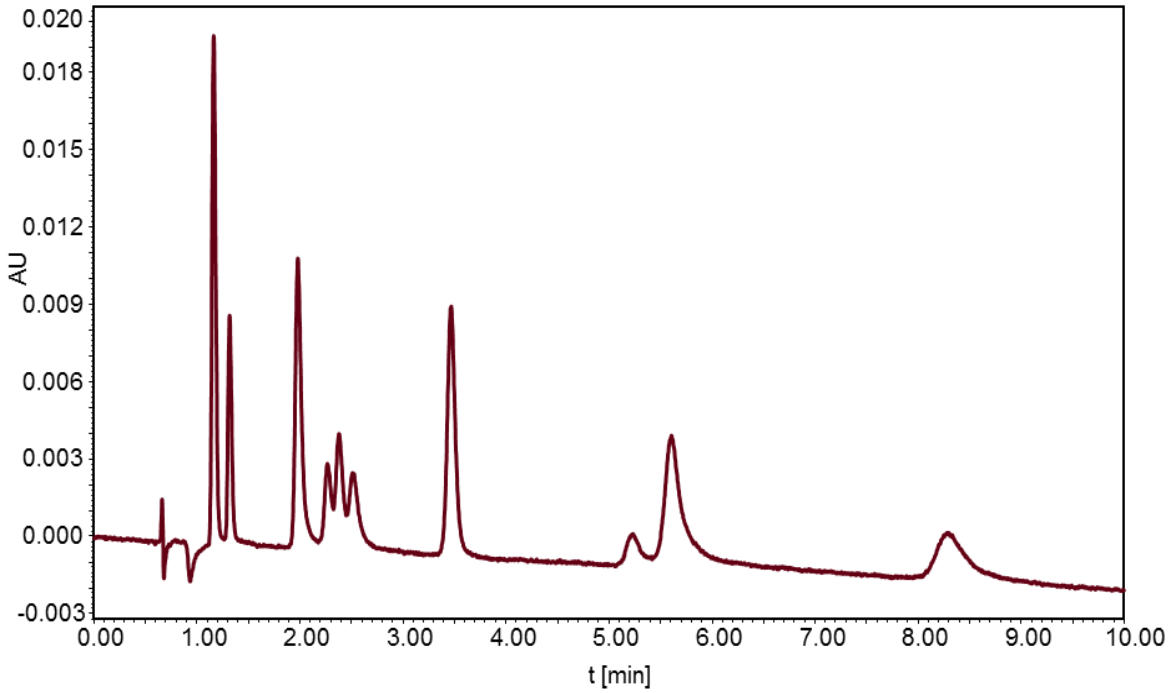


Obr. 31: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 90:10 (1 - thymin; 2 - uracil; 3 - 5-methyluridn; 4 - adenin; 5 - uridin; 6 - adenosin; 7 - cytosin; 8 - guanin; 9 - cytidin; 10 - guanosin).

5.2.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC

Stejně jako v případě skupiny fenolických kyselin byla v rámci „nevodné“ HILIC pro separaci purinových a pyrimidinových bází použita mobilní fáze složená z acetonitrilu (organická složka mobilní fáze) a dioxolanu modifikovaného vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8 (nahrazující vodnou složku mobilní fáze). Další zkoušené podmínky (acetonitril-dioxolan, a acetonitril-dioxolan s kyselinou octovou) nebyly pro separace na této koloně vhodné.

Separace purinových a pyrimidinových bází při použití dioxolanu s přídavkem vodného roztoku 50 mM octanu amonného pH 6,8, nahrazující vodnou složku mobilní fáze, trvala 9,5 minut a bylo eluováno 10 píků, přičemž u některých nedocházelo k úplnému rozlišení (Obr. 32). Protože separace byla delší a neposkytovala optimálnější rozdělení píků než separace s acetonitrilem nebyla provedena identifikace a proměřeno SST.



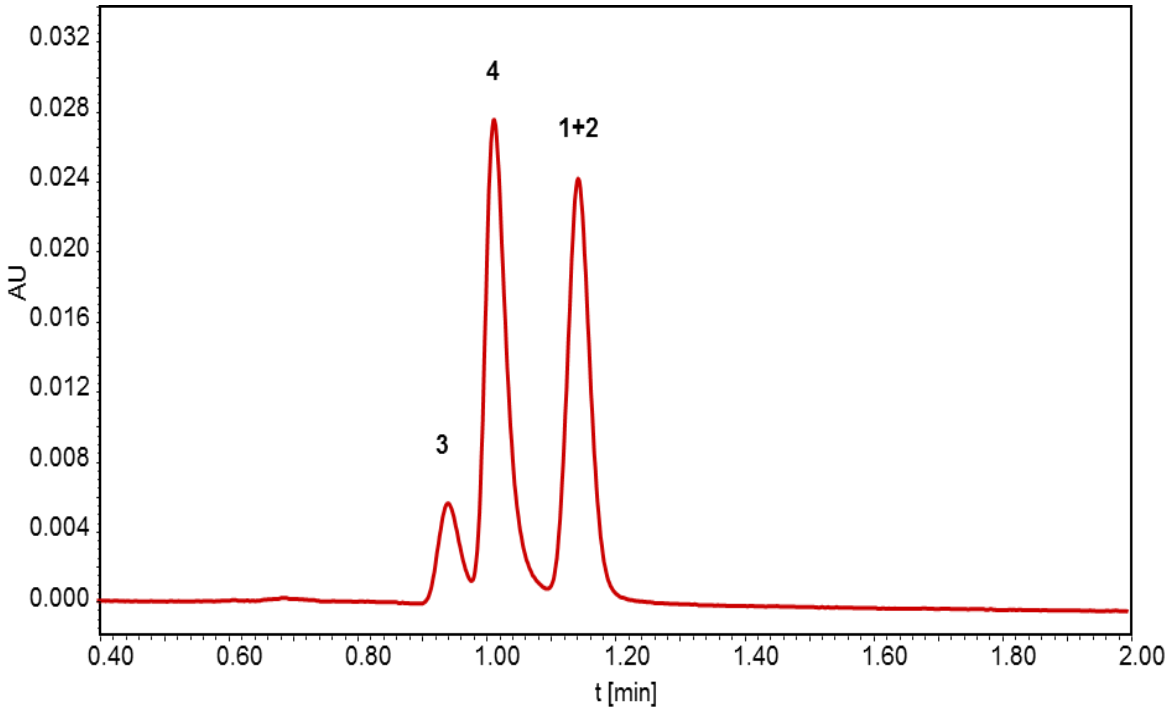
Obr. 32: Separace purinových a pyrimidinových bází na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:DIO+50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 85:15.

5.3 Separace derivátů pyridinu

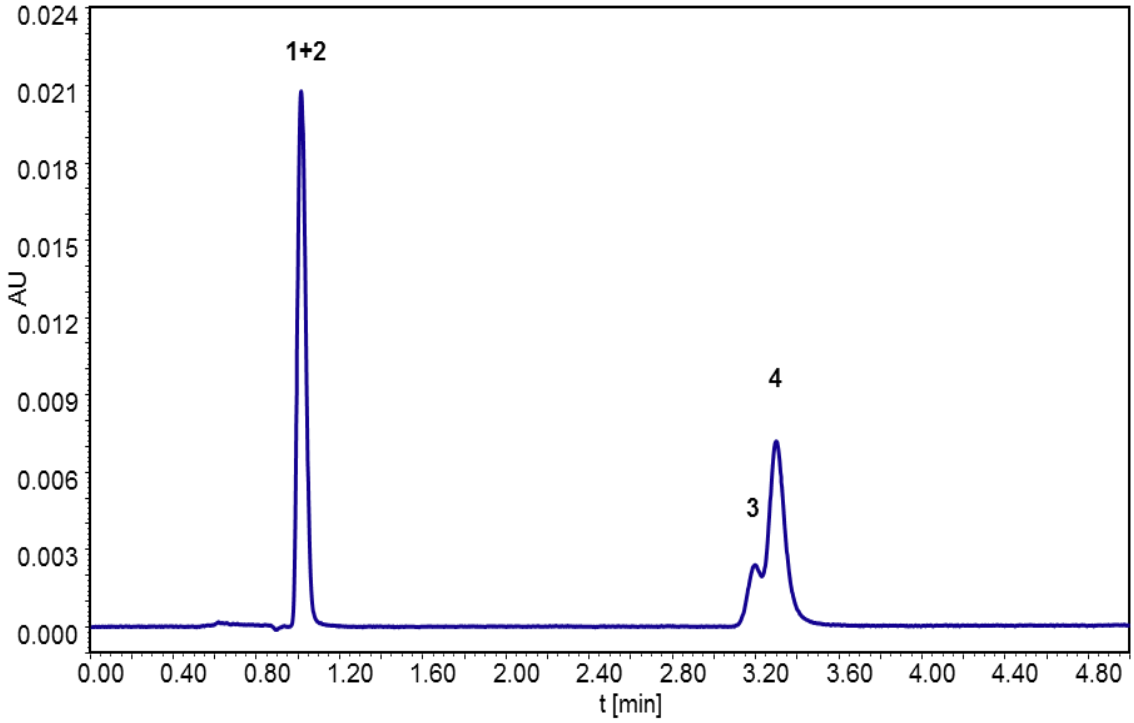
5.3.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem

Skupina derivátů pyridinu byla separována s acetonitrilem za podmínek, kdy vodnou složku mobilní fáze zastupoval 50 mM octan amonný pH 3,8, pH 6,8, pH 9,8 a 0,5 % kyselina octová. Ani v jednom případě nebyla detekována kyselina pikolinová, pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti v rozpouštěcích směsích, obsahujících vysokou koncentraci acetonitrilu.

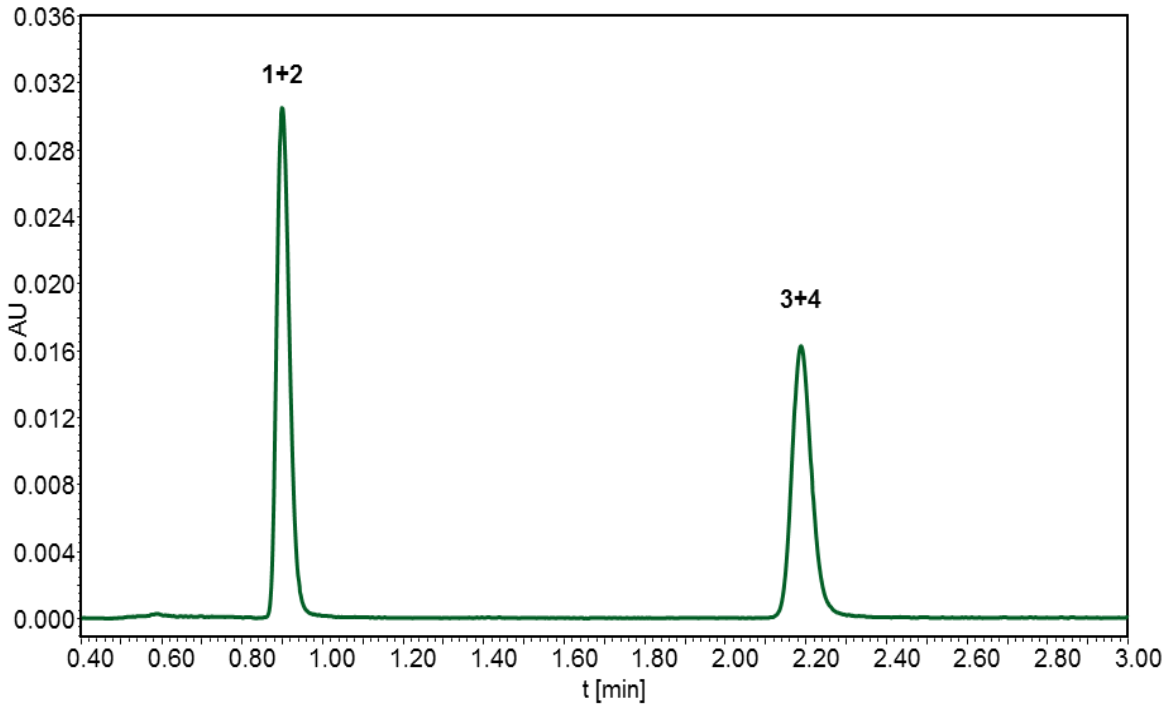
Při separaci s kyselinou octovou jako vodnou složkou mobilní fáze byly separovány tři píky, docházelo ke koeluci nikotinamidu a isonikotinamidu. Za těchto podmínek došlo k výrazné změně selektivity - na rozdíl od všech dalších separací byly kyselina nikotinová a isonikotinová eluovány před amidy. Separace trvala 1,3 minuty (Obr. 33). Při zvýšení pH na 3,8 se prodloužila doba separace na 3,8 minut. Také v tomto případě se nepodařilo od sebe separovat nikotinamid a isonikotinamid. Kyselina nikotinová a isonikotinová byly eluovány v podobném retenčním čase a ani dalším zvyšováním koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nedošlo k úplnému rozlišení jejich píků (Obr. 34). Použití 50 mM octanu amonného pH 6,8 se ukázalo jako nejméně vhodné. Byly separovány pouze dva píky, docházelo ke koeluci nejen nikotinamidu a isonikotinamidu, ale také kyseliny nikotinové a isonikotinové. Separace trvala 2,4 minut (Obr. 35). Při nastavení bazického pH použitím 50 mM octanu amonného pH 9,8 byla separace nejdelší trvala 4,4 minuty a byly separovány 3 píky. Opět docházelo ke koeluci nikotinamidu a isonikotinamidu (Obr. 36). SST bylo proměřeno při pH 9,8 (Tab. 10) a při použití 0,5 % kyseliny octové jako vodné složky mobilní fáze (Tab. 11).



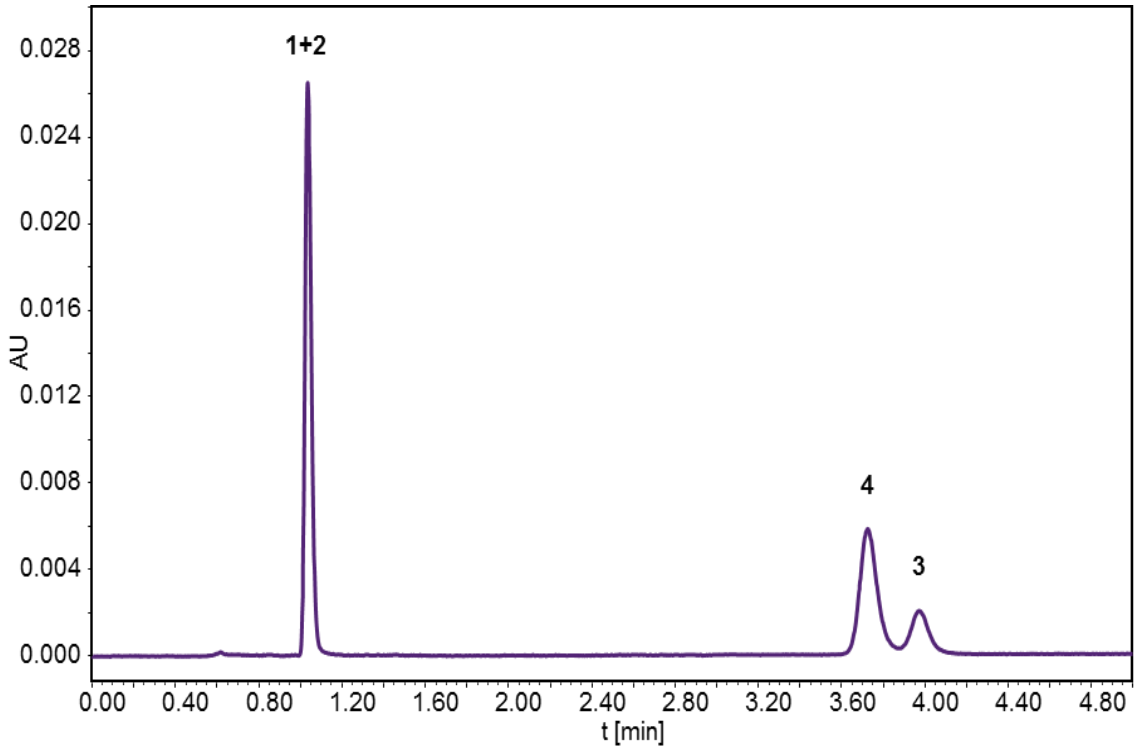
Obr. 33: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:0,5 % kyselina octová v poměru 91:9 (1 - nikotinamid; 2 - isonikotinamid; 3 - kyselina nikotinová; 4 - kyselina isonikotinová).



Obr. 34: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10 (1 - nikotinamid; 2 - isonikotinamid; 3 - kyselina nikotinová; 4 - kyselina isonikotinová).



Obr. 35: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 91:9 (1 - nikotinamid; 2 - isonikotinamid; 3 - kyselina nikotinová; 4 - kyselina isonikotinová).



Obr. 36: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 91:9 (1 - nikotinamid; 2 - isonikotinamid; 3 - kyselina nikotinová; 4 - kyselina isonikotinová).

Látky	Retenční čas [%RSD]	Plocha [%RSD]	Rozlišení	Faktor symetrie	Počet teoretických pater
Isonikotinamid	0,00	---	---	---	---
Nikotinamid	0,10	0,28	---	1,26	5 451
Kys. isonikotinová	0,12	0,46	26,00	1,28	9 707
Kys. nikotinová	0,11	2,26	1,62	---	10 500

Tab. 10: Vybrané hodnoty SST pro separaci derivátů pyridinu na koloně BEH Amide při složení mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 91:9.

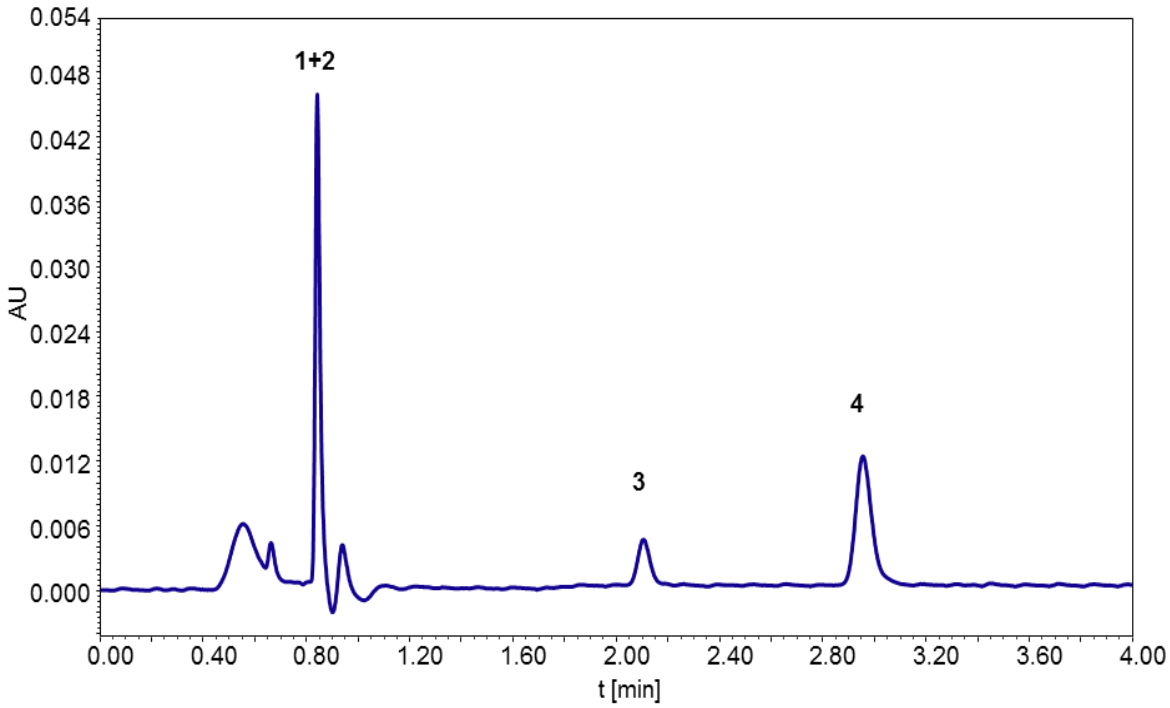
Látky	Retenční čas [%RSD]	Plocha [%RSD]	Rozlišení	Faktor symetrie	Počet teoretických pater
Kys. nikotinová	0,07	0,26	---	---	3 481
Kys. isonikotinová	0,06	0,18	1,15	1,49	4 571
Nikotinamid	0,28	0,45	2,08	1,10	5 137
Isonikotinamid	0,30	0,47	2,10	1,09	4 938

Tab. 11: Vybrané hodnoty SST pro separaci derivátů pyridinu na koloně BEH Amide při složení mobilní fáze ACN:0,5 % kyselina octová v poměru 91:9.

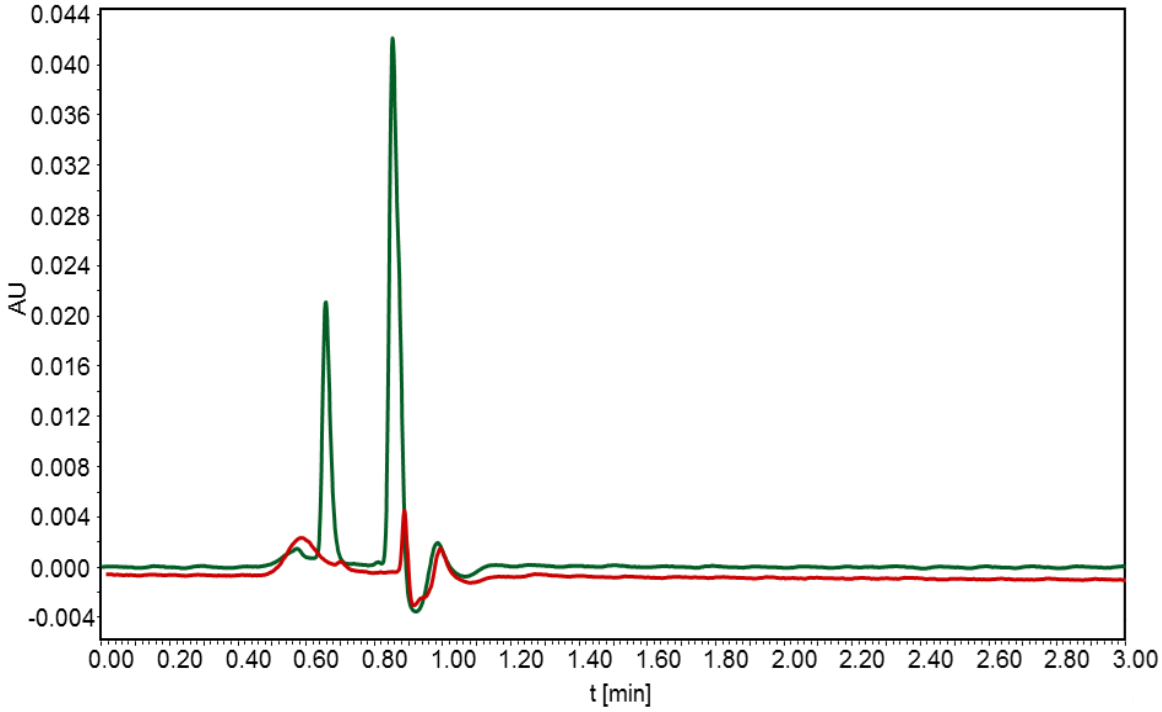
5.3.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem

Pro měření s dioxolanem byl použit jako vodná složka mobilní fáze, stejně jako v předchozích případech 50 mM octan amonný pH 3,8 a pH 6,8.

Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 byly separovány 3 píky a separace trvala 3,2 minuty. Docházelo stejně jako při separacích s acetonitrilem ke koeluci nikotinamidu s isonikotinamidem, které byly eluovány v mrtvém retenčním čase (Obr. 37). Po upravení pH 50 mM octanem amonným pH 6,8 byly analyty z této skupiny eluovány během 1,2 minut. Při porovnání s blankem, bylo zjištěno, že všechny analyty za těchto podmínek byly eluovány v mrtvém retenčním čase a tyto podmínky pro ně nejsou vhodné (Obr. 38). Protože se nepodařilo optimalizovat podmínky pro separace s dioxolanem a tyto separace neposkytovaly účinnější dělení analytů než separace s acetonitrilem nebylo proměřeno SST.



Obr. 37: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10 (1 - nikotinamid; 2 - isonikotinamid; 3 - kyselina nikotinová; 4 - kyselina isonikotinová).

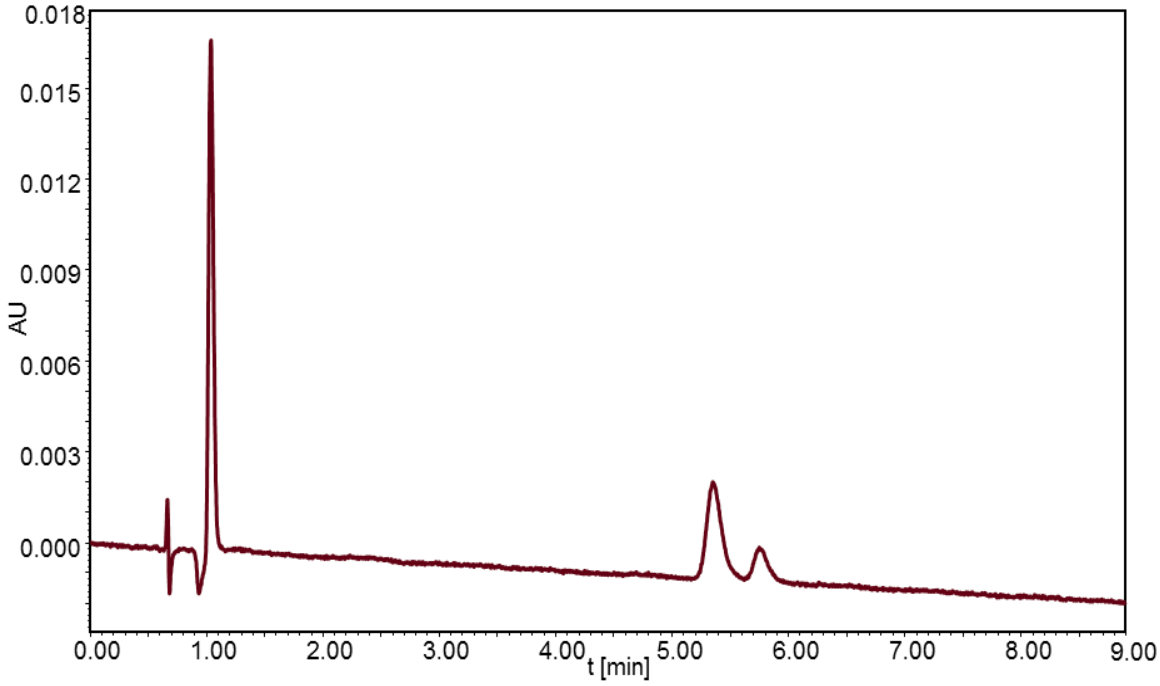


Obr. 38: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 90:10. Zelený chromatogram - separace skupiny pyridinů, červený chromatogram - blank.

5.3.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC

Po vyloučení podmínek se složením mobilní fáze acetonitril-dioxolan a acetonitril-dioxolan s kyselinou octovou, které nebyly pro separaci na koloně BEH Amide vhodné, probíhala optimalizace podmínek pro „nevodnou“ HILIC u skupiny derivátů pyridinů s mobilní fází složenou z acetonitrilu a dioxolanu modifikovaného vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8, který nahrazoval vodnou složku mobilní fáze.

Za těchto podmínek separace trvala 6,5 minut, což je nejdelší čas ze všech zkoušených podmínek, a byly separovány 3 píky (Obr. 39). Ani další zvyšování koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nevedlo k optimálnějšímu rozdělení píků a docházelo pouze k prodlužování doby analýzy. Z tohoto důvodu nebyla provedena identifikace složek směsi a proměřeno SST.



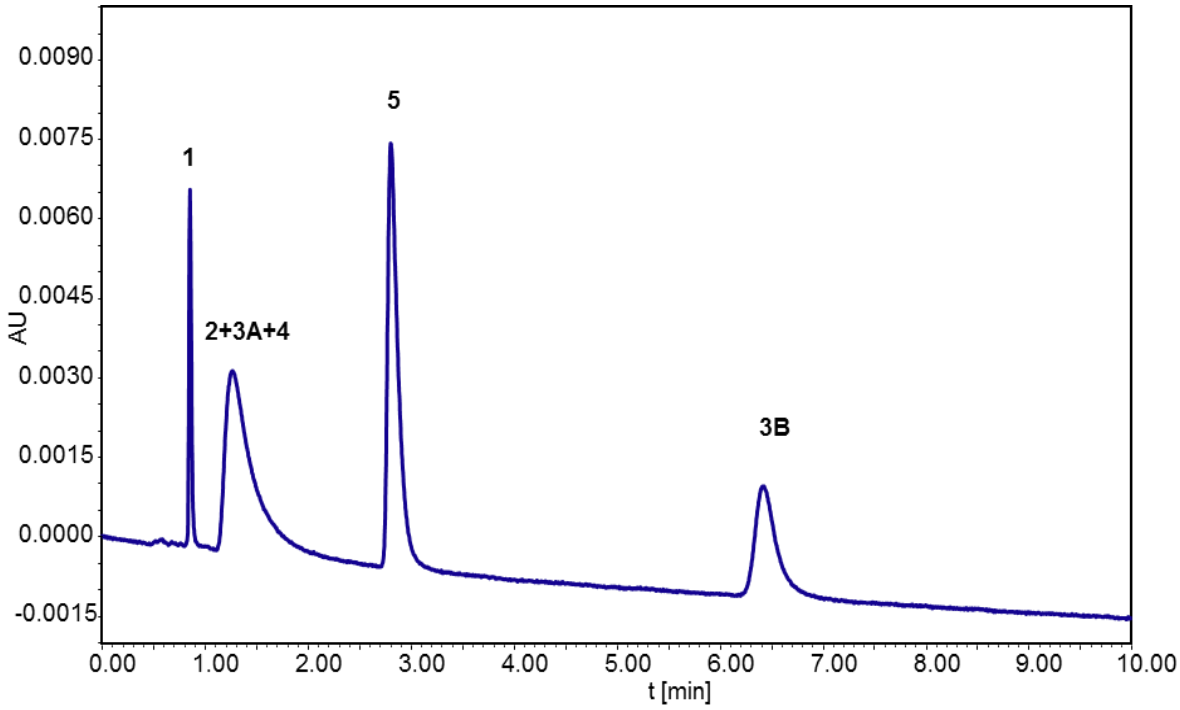
Obr. 39: Separace derivátů pyridinu na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:DIO+50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 85:15.

5.4 Separace vitaminů rozpustných ve vodě

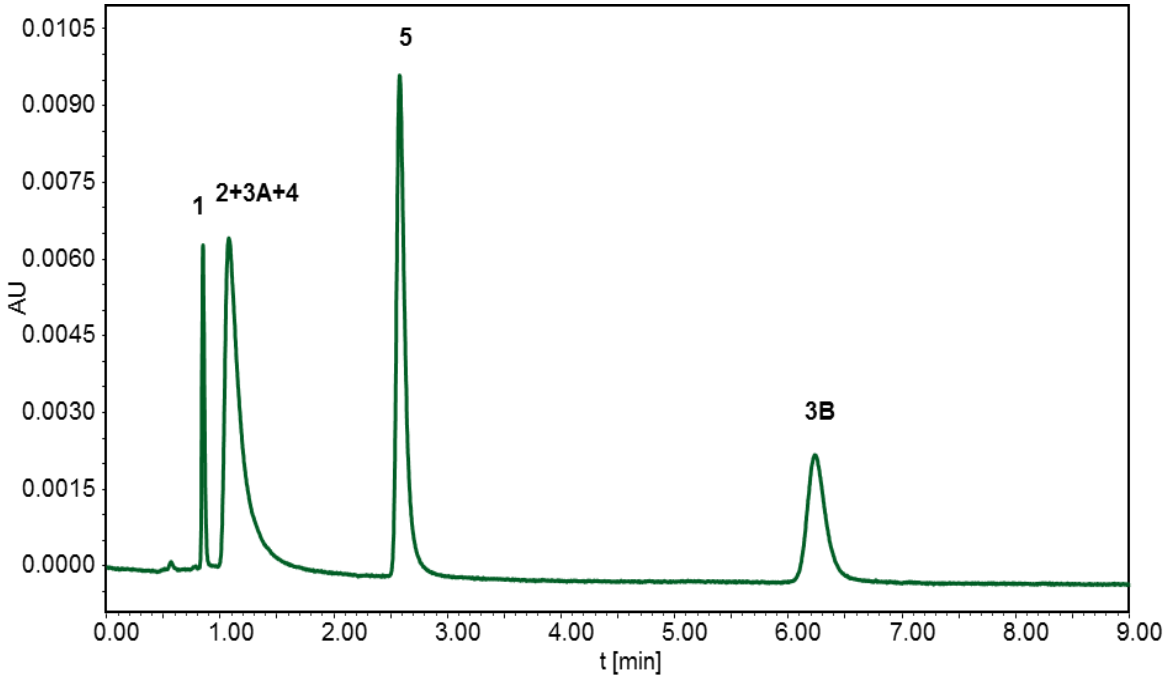
5.4.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem

Pro skupinu vitaminů rozpustných ve vodě byly podmínky separace nastaveny podobně jako u předchozích skupin analytů. Při separacích s acetonitrilem byl jako vodná složka mobilní fáze použit 50 mM octan amonný pH 3,8, pH 6,8, pH 9,8 a 0,5 % kyselina octová. Kyselina askorbová, kobalamin, biotin a kyselina pantothenová nebyly detekovány, pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti nebo přílišné retence na koloně. Pro ověření těchto teorií je třeba provést další studie. Další měření probíhalo bez těchto analytů. Testovaná směs pro další měření obsahovala látky thiamin, riboflavin, nikotinamid, pyridoxin a kyselinu listovou.

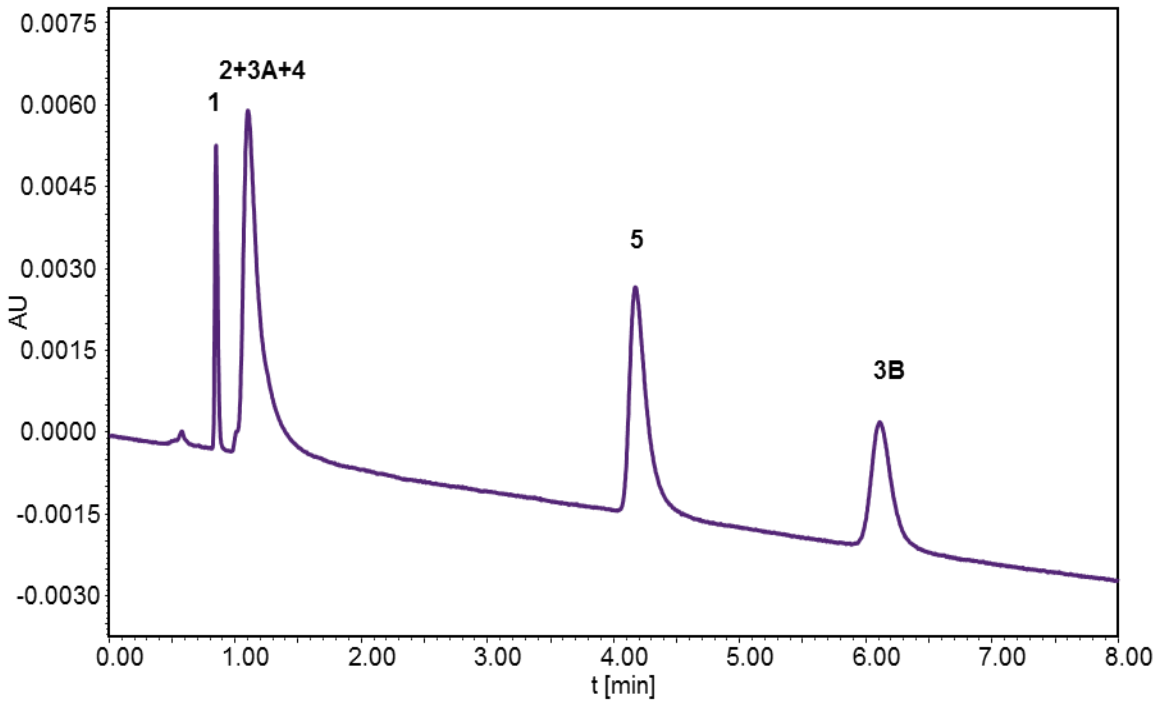
Použití 0,5% kyseliny octové jako vodné složky mobilní fáze se ukázalo pro skupinu vitaminů jako nevhodné. Během 10 minutové separace byly eluovány pouze dva píky, které vykazovaly značné chvostování. Další testované podmínky poskytovaly podobné separace, které se od sebe jen velmi málo lišily. Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 (Obr. 40) a 50 mM octanu amonného pH 6,8 (obr. 41) separace trvaly 7 minut a byly eluovány 4 píky. Docházelo ke koeluci riboflavinu a pyridoxinu s kyselinou listovou. Také pořadí eluce analytů bylo v obou případech shodné a separace se lišily jen mírným posunem retenčních časů analyzovaných látek. Pyridoxin byl nestabilní a velmi rychle se rozkládal, proto vykazoval na chromatogramu dva různé píky (značeno jako 3A a 3B). Také při použití 50 mM octanu amonného pH 9,8 byly separovány 4 píky a analyty byly eluovány ve shodném pořadí jako v předchozím případě. Separace se lišila pouze dobou analýzy, která byla 6,5 minuty (Obr. 42). Protože se nepodařilo separovat všechny látky ze skupiny a najít vhodné podmínky pro jejich analýzu nebylo proměřeno SST. Kolona BEH Amide nebyla vhodnou stacionární fází pro separace skupiny vitaminů rozpustných ve vodě.



Obr. 40: Separace vitaminů rozpustných ve vodě na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 80:20 (1 - nikotinamid; 2 - riboflavin; 3A - pyridoxin1; 3B - pyridoxin 2; 4 - kyselina listová; 5 - thiamin).



Obr. 41: Separace vitaminů rozpustných ve vodě na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 80:20 (1 - nikotinamid; 2 - riboflavin; 3A - pyridoxin1; 3B - pyridoxin 2; 4 - kyselina listová; 5 - thiamin).

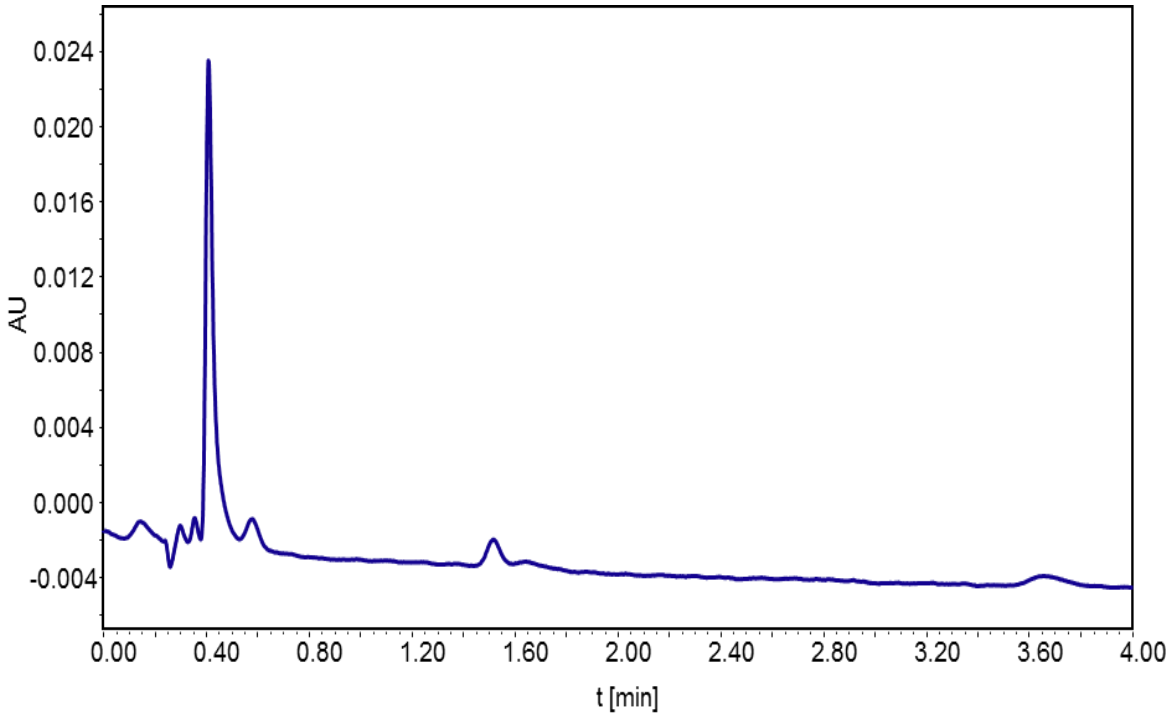


Obr. 42: Separace vitaminů rozpustných ve vodě na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 80:20 (1 - nikotinamid; 2 - riboflavin; 3A - pyridoxin1; 3B - pyridoxin 2; 4 - kyselina listová; 5 - thiamin).

5.4.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem

V případě vitaminů rozpustných ve vodě probíhala optimalizace podmínek separace s dioxolanem pouze při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8. Ostatní podmínky nebyly testovány, protože při použití různého pH při separacích s acetonitrilem se analýzy od sebe nelišily a použití 0,5 % kyseliny octové se ukázalo jako nevhodné.

Separace s dioxolanem v případě skupiny vitaminů rozpustných ve vodě trvala 4 minuty a byly eluovány 3 píky (Obr. 43). Identifikace a SST nebylo proměřováno, protože ani další zvyšování koncentrace organické složky v mobilní fázi nevedlo k lepší separaci analytů a docházelo pouze k prodlužování doby analýzy.



Obr. 43: Separace vitaminů rozpustných ve vodě na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10.

5.4.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC

Optimalizace podmínek pro „nevodnou“ HILIC u skupiny vitaminů rozpustných ve vodě probíhala s mobilní fází složenou z acetonitrilu a dioxolanu modifikovaného vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8, který nahrazoval vodnou složku mobilní fáze. Další testované podmínky (složení mobilní fáze acetonitril-dioxolan a acetonitril-dioxolan s kyselinou octovou) nebyly pro separaci na koloně BEH Amide vhodné.

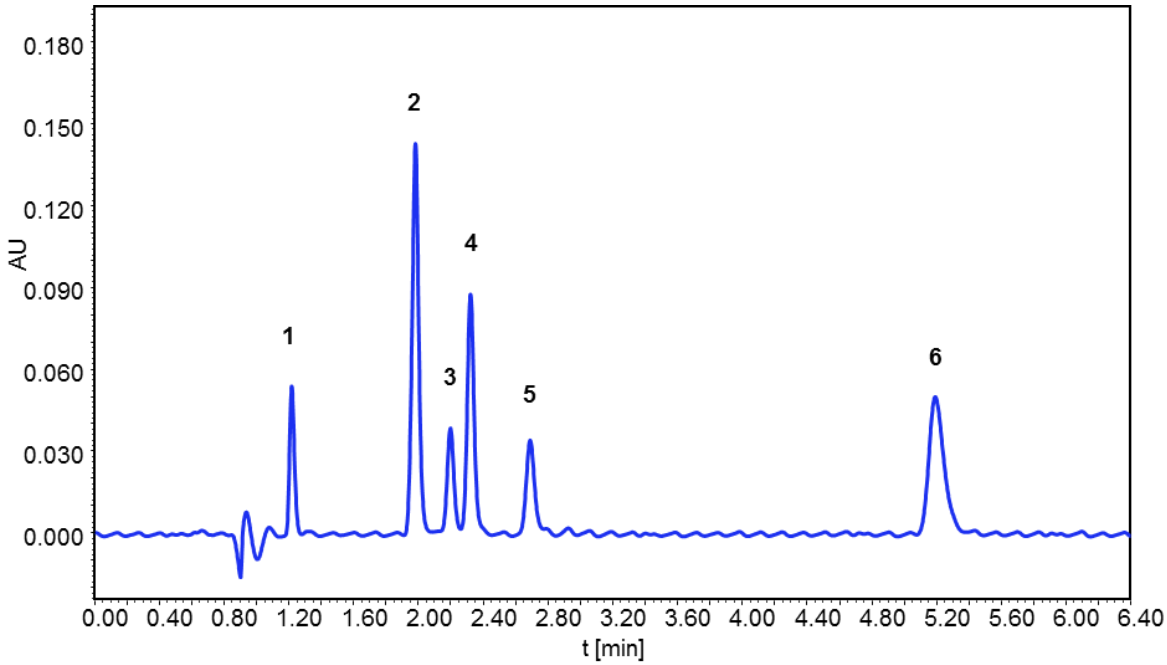
Při použití dioxolanu modifikovaného vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8 analýza trvala 5,0 minut a neposkytla lepší výsledky než separace s acetonitrilem. Byly separovány pouze 3 píky, které značně chvostovaly. Identifikace a SST nebyly provedeny, protože se nepodařilo optimalizovat podmínky pro tuto analýzu.

5.5 Separace betablokátorů

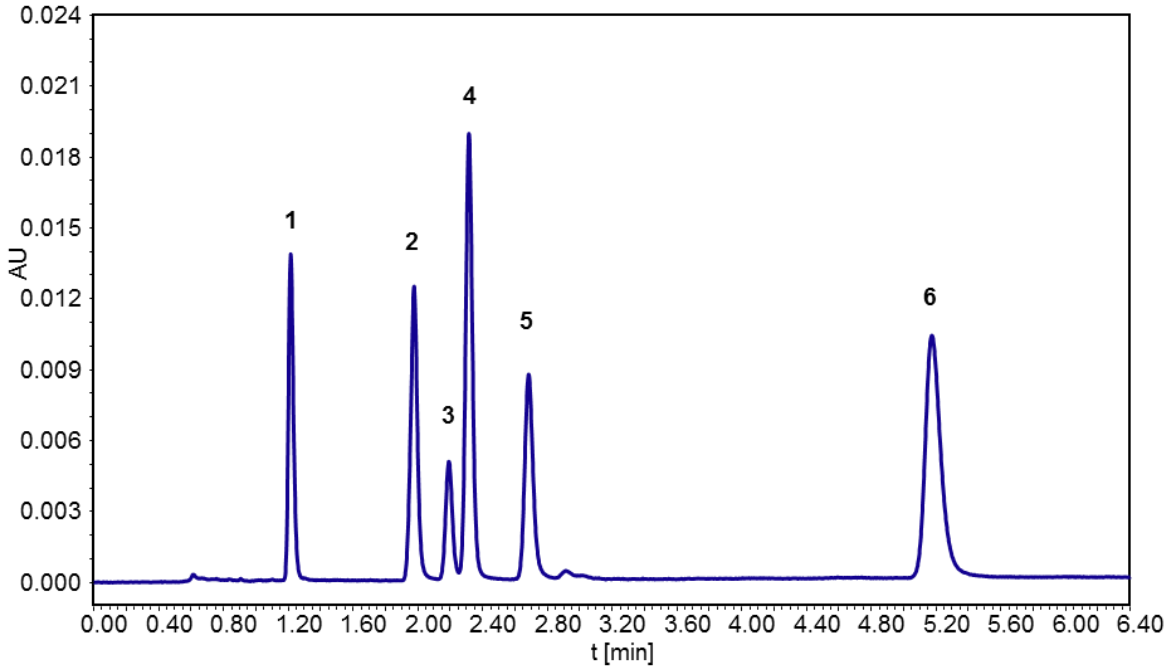
5.5.1 Optimalizace podmínek HILIC separace s acetonitrilem

Pro skupinu betablokátorů se podmínky analýzy mírně lišily od podmínek testovaných u předchozích skupin analytů. Při separacích s acetonitrilem byl jako vodná složka mobilní fáze použit 50 mM octan amonný pH 3,8 a pH 9,8. Podmínky s pH 6,8 nebyly testovány, protože po separacích s pH 3,8 a pH 9,8 se výsledky příliš nelišily a tyto podmínky byly vyhovující pro analýzu této skupiny látek. Další změnou oproti předchozím analýzám s acetonitrilem bylo použití vlnových délek 220 nm a 270 nm při hodnocení chromatogramů. Při separacích s acetonitrilem nebyl detekován labetalol, pravděpodobně se vyskytl problém s jeho rozpustností v acetonitrilu.

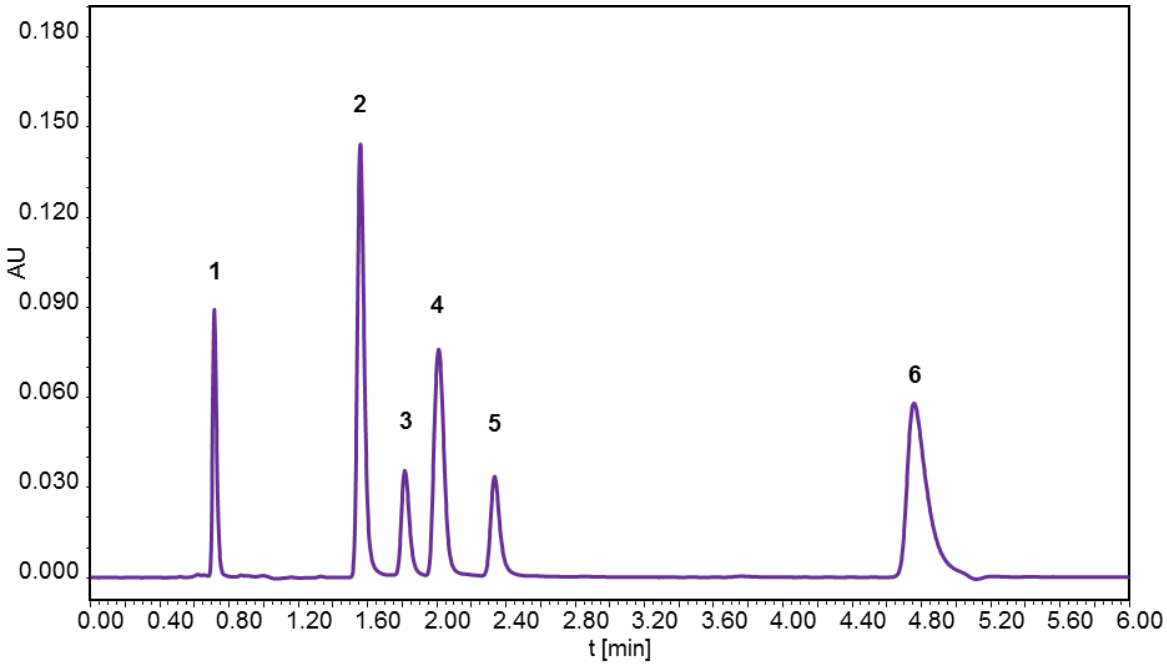
Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 analýzy trvaly 5,6 minut a byly separovány všechny analyty. Při využití vlnové délky 220 nm došlo ke zvýšenému šumu na základní linii (Obr. 44), proto byla v rámci optimalizace podmínek vybrána vlnová délka 270 nm (Obr. 45). SST bylo proměřeno při obou vlnových délkách, při použití vlnové délky 270 nm byly získány lepší hodnoty hodnocených parametrů (Tab. 12). Úpravou pH na 9,8 použitím 50 mM octanu amonného pH 9,8 došlo ke zkrácení analýzy na 5,2 minut. Analyty byly separovány ve stejném pořadí jako v předchozím případě a u metoprololu a pindololu došlo k jejich většímu rozlišení. Rozdíly v analýzách při vlnové délce 220 nm (Obr. 46) a 270 nm (Obr. 47) byly minimální. SST bylo proměřeno při obou vlnových délkách. Jednotlivé separace se lišily ve velikostech plochy píku, míře rozlišení a faktoru symetrie. Také v tomto případě bylo použití vlnové délky 270 nm vyhodnoceno jako vhodnější pro separaci této skupiny analytů (Tab. 13).



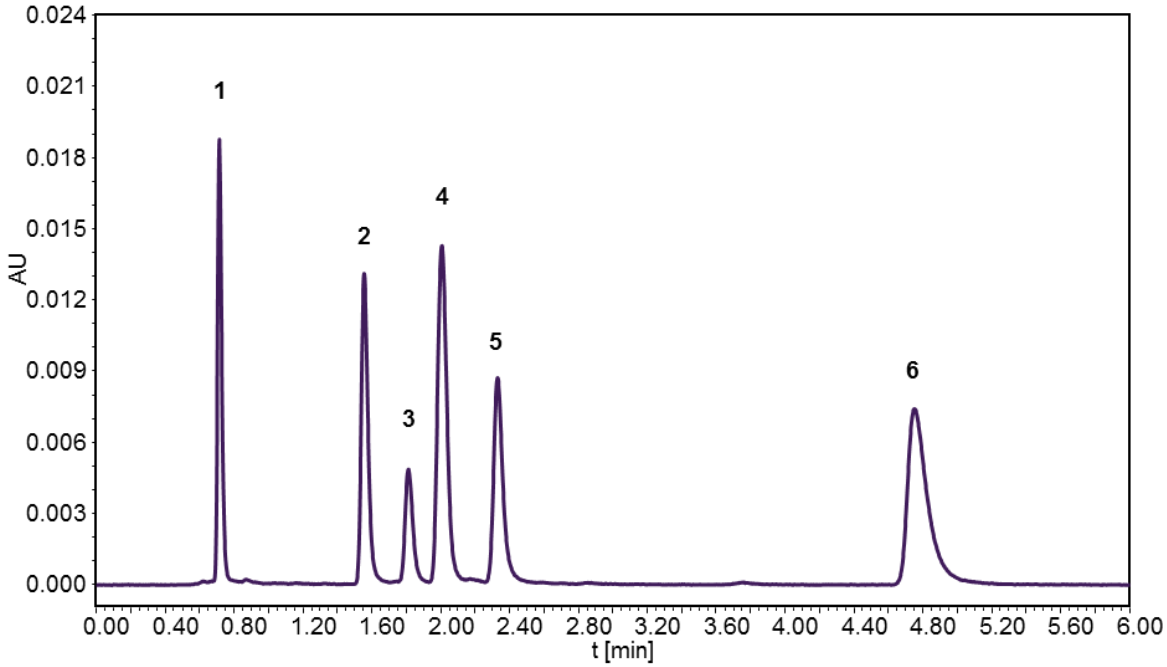
Obr. 44: Separace skupiny betablokátorů na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10 při vlnové délce 220 nm (1 - bopindolol; 2 - propranolol; 3 - metoprolol; 4 - pindolol; 5 - acebutolol; 6 - atenolol).



Obr. 45: Separace skupiny betablokátorů na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10 při vlnové délce 270 nm (1 - bopindolol; 2 - propranolol; 3 - metoprolol; 4 - pindolol; 5 - acebutolol; 6 - atenolol).



Obr. 46: Separace skupiny betablokátorů na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 91:9 při vlnové délce 220 nm (1 - bopindolol; 2 - propranolol; 3 - metoprolol; 4 - pindolol; 5 - acebutolol; 6 - atenolol).



Obr. 47: Separace skupiny betablokátorů na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 91:9 při vlnové délce 270 nm (1 - bopindolol; 2 - propranolol; 3 - metoprolol; 4 - pindolol; 5 - acebutolol; 6 - atenolol).

Látky	Retenční čas [% RSD]	Plocha [% RSD]	Rozlišení	Faktor symetrie	Počet teoretických pater
Bopindolol	0,27	0,24	---	1,23	7 567
Propranolol	0,25	0,36	11,44	1,02	10 422
Metoprolol	0,23	0,32	2,8	1,14	13 206
Pindolol	0,21	0,69	1,63	1,08	14 930
Acebutolol	0,18	0,74	4,38	1,17	13 375
Atenolol	0,10	0,39	19,00	1,29	14 822

Tab. 12: Vybrané hodnoty SST pro separaci betablokátorů na koloně BEH Amide při složení mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 3,8 v poměru 90:10, vlnová délka 270 nm.

Látky	Retenční čas [% RSD]	Plocha [% RSD]	Rozlišení	Faktor symetrie	Počet teoretických pater
Bopindolol	0,04	0,22	---	1,35	4 299
Propranolol	0,14	0,51	14,88	1,32	7 988
Metoprolol	0,10	0,55	3,42	1,34	8 036
Pindolol	0,12	0,57	2,16	1,22	6 628
Acebutolol	0,10	0,53	3,39	1,38	10 046
Atenolol	0,06	0,79	16,71	1,72	9 275

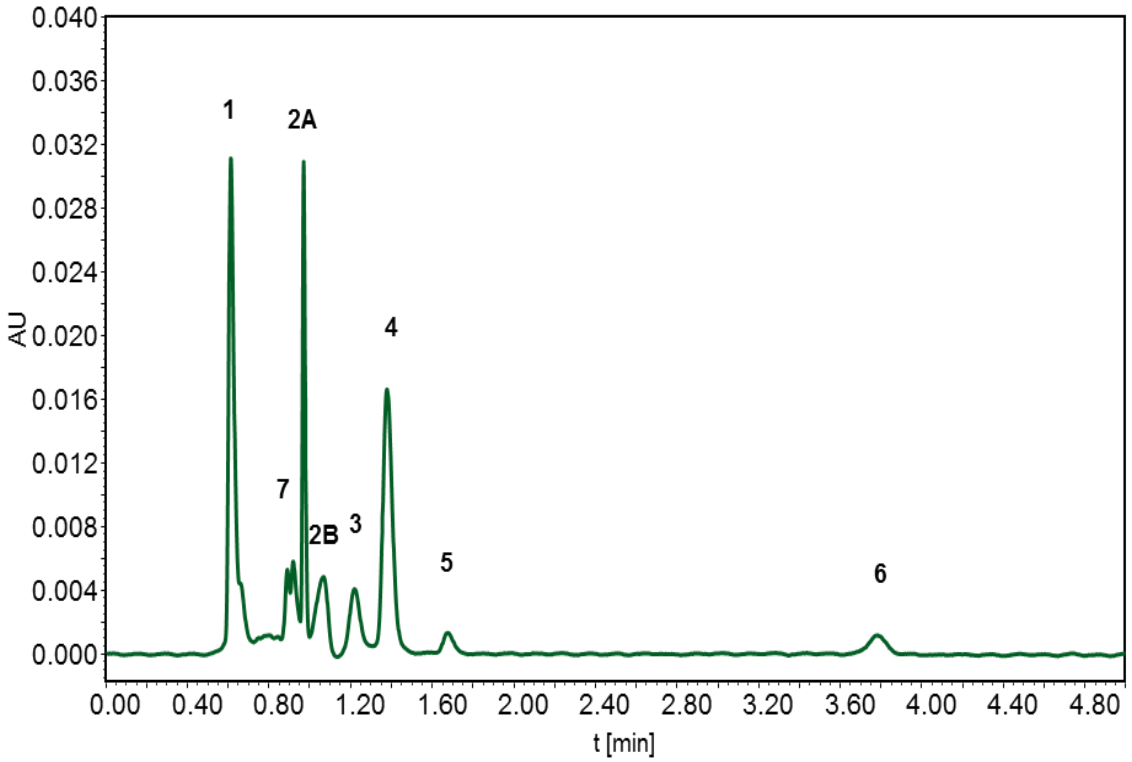
Tab. 13: Vybrané hodnoty SST pro separaci betablokátorů na koloně BEH Amide při složení mobilní fáze ACN:50 mM octan amonný pH 9,8 v poměru 91:9, vlnová délka 270 nm.

5.5.2 Optimalizace podmínek HILIC separace s dioxolanem

Pro optimalizaci podmínek separací s dioxolanem byl jako vodná složka mobilní fáze vybrán 50 mM octan amonný pH 3,8 a pH 6,8. Bazické pH a 0,5 % kyselina octová nebyly stejně jako u ostatních skupin analytů pro separace s dioxolanem testovány. Pro hodnocení chromatogramu separací skupiny betablokátorů s dioxolanem byla vybrána vlnová délka 280 nm.

Při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 byla separace na rozdíl od separací s acetonitrilem velmi krátká, trvala 2 minuty. Bylo eluováno 6 píků a byl pozorován zvýšený šum na základní linii. Protože tyto podmínky nebyly vhodné, nebyla provedena identifikace jednotlivých analytů. Při zvýšení pH na 6,8 byly eluovány všechny látky skupiny včetně labetalolu, který nebyl detekován při separacích s acetonitrilem. Propranolol pravděpodobně podléhal v dioxolanu rychlému rozkladu, na chromatogramu vykazovat 2 píky (značeno 2A a 2B) (Obr. 48). Ani zvyšováním koncentrace dioxolanu se nepodařilo zlepšit rozlišení všech píků a optimalizovat

analýzu, proto nebylo proměřeno SST. Separace byla kratší než separace s acetonitrilem, trvala 4 minuty.

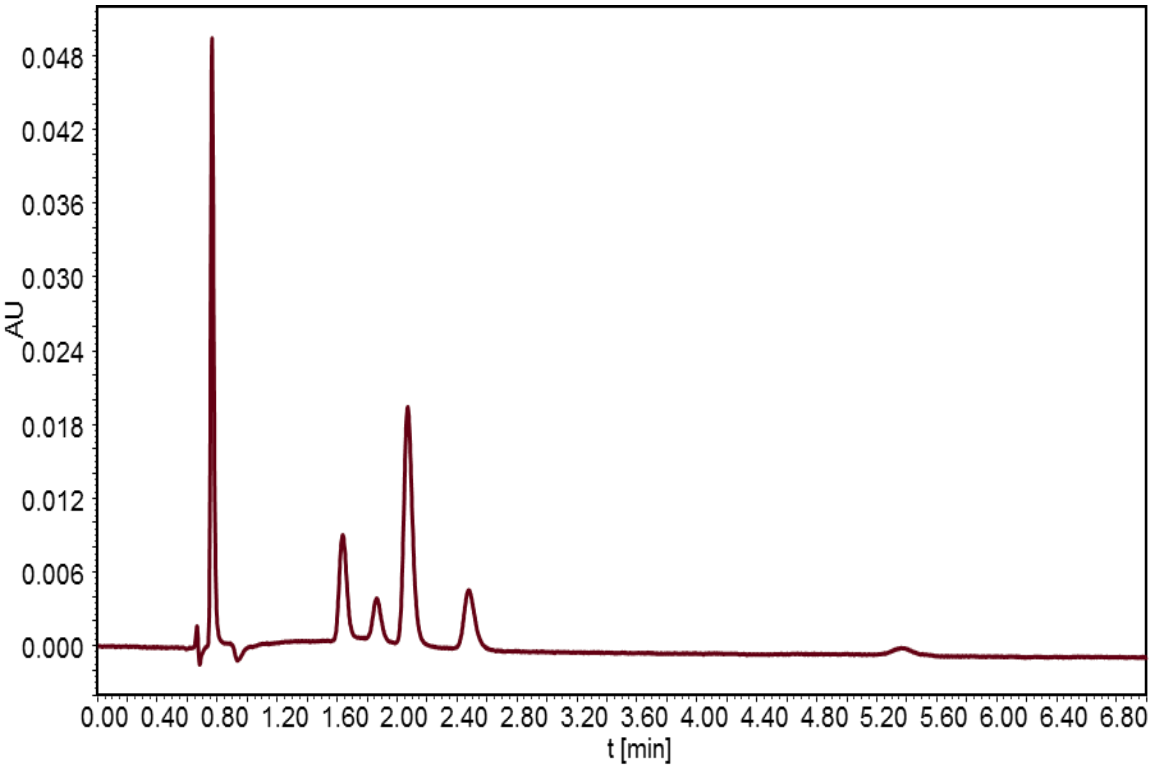


Obr. 48: Separace skupiny betablokátorů na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze DIO:50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 92:8 (1 - bopindolol; 2A - propranolol 1; 2B - propranolol 2; 3 - metoprolol; 4 - pindolol; 5 - acebutolol; 6 - atenolol; 7 - labetalol).

5.5.3 Optimalizace podmínek separace pro „nevodnou“ HILIC

Optimalizace podmínek pro „nevodnou“ HILIC u skupiny betablokátorů probíhala, stejně jako u předchozích skupin analytů, s mobilní fází složenou z acetonitrilu a dioxolanu modifikovaného vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8, který nahrazoval vodnou složku mobilní fáze.

Při použití dioxolanu modifikovaného vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8 separace trvala 5,8 minut. Za těchto podmínek bylo separováno 6 píků jejichž identifikace nebyla provedena, protože separace neposkytla lepší výsledky než separace s acetonitrilem.



Obr. 49: Separace skupiny betablokátorů na koloně BEH Amide s využitím mobilní fáze ACN:DIO+50 mM octan amonný pH 6,8 v poměru 85:15.

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala možnostmi využití 1,3-dioxolanu jako alternativní organické složky mobilní fáze v hydrofilní interakční chromatografii. Byly porovnávány změny v selektivitě a účinnosti separace při použití dioxolanu a acetonitrilu jako organických složek mobilní fáze při analýzách 5 skupin látek, a to fenolických kyselin, purinových a pyrimidinových bází, derivátů pyridinu, vitaminů rozpustných ve vodě a skupiny betablokátorů.

Pro skupinu fenolických kyselin se nepodařilo optimalizovat podmínky tak, aby došlo k účinné separaci všech vybraných látek. V rámci zkoušených podmínek se nepodařilo detekovat některé látky, pravděpodobně z důvodu jejich špatné rozpustnosti v použitých rozpouštědlech nebo přílišné retence za testových podmínek. Ověření těchto teorií nebylo součástí této práce. Při separacích s acetonitrilem nebyla detekována kyselina 2,5-OH BA. Při separacích s dioxolanem se kyselinu 2,5-OH BA detekovat podařilo, nicméně nebyly detekované jiné dvě kyseliny a to 3,4-OH BA a 2,3,4-OH BA. Kyselina gallová nebyla detekována ani v jednom případě. Pro separace s oběma rozpouštědly byl jako nejvhodnější vodná složka vyhodnocen 50 mM octan amonný pH 6,8. Ani za těchto podmínek se nepodařilo separovat všechny detekované látky směsi. Použitá kolona BEH Amide nebyla pro analýzu této skupiny látek vhodná.

V rámci skupiny purinových a pyrimidinových bází se podařilo detekovat všechny analyty skupiny a jako vhodnější organická složka pro analýzu této skupiny byl vyhodnocen acetonitril, který na rozdíl od dioxolanu umožňoval účinně separovat všechny složky směsi. Pro separace s acetonitrilem byl nejvhodnější vodnou složkou 50 mM octan amonný pH 3,8, při jehož použití došlo k separování všech deseti látek skupiny. Dioxolan vykazoval v porovnání s acetonitrilem nižší účinnost separace a kratší dobu analýzy. Při separacích s dioxolanem byla pozorována změna selektivity. Konkrétně došlo ke změně eluce adenosinu, který byl eluován dříve než adenin s uridinem a také guanin byl eluován na rozdíl od separací s acetonitrilem před cytosinem. Kolona BEH Amide byla pro skupinu purinových a pyrimidinových bází vhodně zvolenou stacionární fází.

V rámci separací s acetonitrilem a dioxolanem skupiny derivátů pyridinu nebyla detekována kyselina pikolinová, pravděpodobně pro špatnou rozpustnost v ředící směsi obsahující vysoký podíl organického rozpouštědla. Také pro tuto skupinu látek byl vyhodnocen jako vhodnější organická složka acetonitril. Během separací se složením mobilní fáze acetonitril - 0,5 % kyselina octová a acetonitril – 50 mM octan amonný pH 9,8 byly eluovány tři píky. Bohužel se nepodařilo ani v jednom případě odseparovat pár nikotinamid a isonikotinamid. Při separacích s dioxolanem probíhala eluce těchto látek v mrtvém retenčním čase. Pro analýzu derivátů pyridinu nebyla použitá kolona BEH Amide vhodnou stacionární fází.

Pro skupinu vitaminů rozpustných ve vodě nebyly zvolené podmínky a použitá kolona příliš vhodné. Nepodařilo se detekovat čtyři látky ze skupiny a to kyselinu askorbovou, kobalamin, biotin a kyselinu pantothenovou. Pyridoxin byl velmi nestabilní, rychle se rozkládal a vykazoval na chromatogramech dva píky. Při separacích s acetonitrilem byly eluovány čtyři píky docházelo ke koeluci pyridoxinu, riboflavinu a kyseliny listové a nepodařilo se optimalizovat podmínky tak, aby tyto látky byly separovány. Při použití dioxolanu byly eluovány také čtyři píky a separace s tímto rozpouštědlem neumožnila lepší analýzu skupiny látek.

Při separacích betablokátorů s acetonitrilem se nepodařilo detekovat labetalol. Ostatní látky byly účinně separovány při použití 50 mM octanu amonného pH 3,8 a pH 9,8. Pro hodnocení skupiny betablokátorů při separacích s acetonitrilem byla nejvhodnější vlnová délka 270 nm. Separace s dioxolanem nebyly tak účinné, ale podařilo se detekovat labetalol.

V rámci nevodné HILIC byly zkoušeny podmínky acetonitril-dioxolan, acetonitril-dioxolan s přídavkem 0,5 % kyseliny octové. Tyto podmínky pro kolonu BEH Amide byly vyhodnoceny jako nevyhovující. Při modifikaci dioxolanové složky octanem amonným bylo zjištěno, že octan amonný není v čistém dioxolanu rozpustný. Proto na této koloně a za testovaných podmínek nebyla nevodná HILIC možná. Také byla zkoušena varianta s dioxolanem modifikovaným vodným roztokem 50 mM octanu amonného pH 6,8, nahrazující vodnou složku mobilní fáze. Ovšem ani toto složení mobilní fáze se neukázalo jako vyhovující a separace pro jednotlivé skupiny nepřinesla účinnější možnost rozdělení látek než separace s acetonitrilem.

Jako vhodnější organická složka mobilní fáze byl v rámci této diplomové práce vyhodnocen acetonitril, který umožňoval účinnější separaci látek než dioxolan. Při separacích s dioxolanem bylo možno pozorovat změny v selektivitě u skupiny fenolických kyselin, purinových a pyrimidinových bází a skupiny betablokátorů. V mnoha případech došlo použitím dioxolanu ke zkrácení doby analýzy. Námi testované podmínky a použitá kolona BEH Amide nebyly pro separaci některých vybraných skupin látek vhodné. Pro vyhodnocení možností použití dioxolanu jako alternativní složky mobilní fáze je potřeba provést další studie s využitím jiných podmínek a dalších stacionárních fází.

7 Seznam použité literatury

[1] Grumbach,E.S., Arsenaut,J.C., McCabe,D.R., Beginners Guide to UPLC, Waters corporation, USA (2009).

[2] Nováková, L., Vlčková, H., Anal. Chim. Acta 656 (2009) 8-35.

[3] Tistaert,Ch., Dejaegher,B., Heyden,Y.V., Anal. Chim. Acta 690 (2011) 148-161.

[4] Wu,N., Clausen,A.M., J. Sep. Sci. 30 (2007) 1167 – 1182.

[5] Chesnut,M.S., Salisbury,J.J., J. Sep. Sci. 30 (2007) 1183 – 1190.

[6] Nguyen,T., Guillarme,D., Rudaz,S., Veuthey, J.-L., J. Sep. Sci. 29 (2006) 1836 – 1848.

[7] Nováková, L., Douša, M., Moderní HPLC separace v teorii a praxi I, Europrint (2013).

[8] Grumbach,E.S., Diehl,D.M., Neue,U.D., J. Sep. Sci. 31 (2008) 1511 – 1518.

[9] Sýkora,D., Tesařová,E., Vosmanská,M., Zvolánková,M., Chem. Listy 101 (2007) 190-199.

[10] Nováková,L., Kaufmannová,I., Jánská,R., J. Sep. Sci. 33 (2010) 765–772.

[11] Nováková,L., Solichová,D., Solich,P., J. Sep. Sci. 29 (2006) 2433 – 2443.

[12] http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19157-New-Frontiers-in-Chromatography/ 23.8.2014

[13] Chauve,B., Guillarme,D., Cléon,P., Veuthey, J.-L., J.Sep.Sci. 33 (2010) 752-764.

[14] Orentienė,A., Olšauskaitė,V.,Vičkačkaitė,V., Padarauskas,A., J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6884–6891.

[15] Jandera, P., Anal. Chim. Acta 692 (2011) 1-25.

[16] Vacek, J., Onofrejová, L., Klejdus, B., Kubáň, V., Chem. Listy 103 (2009) 381-385.

[17] Olsen,B.A., J.Chromatogr. A, 913 (2001) 113–122.

[18] Noga,S., Bocian,S., Buszewski,B., J. Chromatogr. A 1278 (2013) 89-97.

[19] Guo,Y., Gaiki,S., J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5920-5938.

[20] Appelblad,P. a kol. A Practical Guide to HILIC, Merck, (2008).

[21] Švec,F., Chem. Listy 103 (2009) 266-270.

[22] Gritti,F., Cavazzini,A., Marchetti,N., Guiochon,G., J. Chromatogr.A 1157 (2007) 289.

[23] Abrahim,A., Al-Sayah,M., Skrdla,P., Bereznitski,Y., Chen,Y., Wu,N., J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 131–137.

[24] http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/ultra-high-performance.html 24.7.2014

[25] http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf 13.8.2014

[26] http://kinesis.co.uk/wpcontent/uploads/downloads/2013/02/720003122en_BEH-Amide.pdf 13.8.2014

[27] Everley,R.A., Croley,T.R., J. Chromatogr. A, 1192 (2008) 239–247.

[28] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6102.html 4.4.2014

[29] Ruta,J., Rudaz,S., McCalley,D.V., Veuthey,J.L., Guillarme,D., J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8230-8240.

[30] Karatapanis,A.E., Fiamegos,Y.C., Stalikas,C.D., J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2871–2879.

[31] databáze SciFinder 20.7.2014

[32] http://www.hplc.cz/Tabs/1_solvents.htm 20.7.2014

[33] brožura 1,3-dioxolane, Novolyte technologies, 2008.

[34] http://chemindustry.ru/1,3-Dioxolane.php_ 25.3.2014

[35] Guo,Y., Gaiki,S, J. Chromatogr. A 1074 (2005) 71-80.

[36] Vlčková,H., Ježková,K., Štětková,K., Tomšíková,H., Solich,P., Nováková,L., J. Sep. Sci. 37 (2014) 1297- 1307.

[37] Fountain,K.J., Xu,J., Diehl,D.M., Morrison,D., J.Sep.Sci. 33 (2010) 745 – 751.

[38] http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/chromatographie/articles/148105/ 25.8.2014

[39] http://www.chempoint.cz/co-jsou-to-antioxidanty 24.4.2014

[40] Gruz,J., Novák,O., Strnad,M., Food Chem.111(2008) 789-794.

[41] http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A009_ 24.4.2014

[42] Jiang,Z., Reilly,J., Everatt,B., Smith,N.W., J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2439-2448.

[43] Ould-Moulaye,C.B., Dussap,C.G., Gros,J.B., Thermochim. Acta 375 (2001) 93-107.

[44] Mallett,D.N., Dayal,S., Dear,G.J., Pateman,A.J., J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 510-516.

[45] Mullangi,R., Srinivas,N.R., Biomed. Chromatogr. 25 (2011) 218-237.

[46] http://chemicalland21.com/lifescience/phar/ISONICOTINIC%20ACID.htm 28.4.2014

[47] Heffernan,M.P., Nelson,M.M., Anadkat,M.J., Br.J.Derm. 156 (2007) 548 -522.

[48] Langer,S., Lodge,J.K., J.Chromator.B 960 (2014) 73-81.

[49] Klejdus,B., Petrlova,J., Potesil,D., Adam,V., Mikelova,R., Vacek,J., Kizek,R., Kuban,V., Anal. Chim. Acta 520 (2004) 57–67.

[50] Karatapanis,A.E., Fiamegos,Y.C., Stalikas,C.D., Chromatographia 71 (2010) 751-759.

[51] Štaud,F. a kol.: studijní materiály k přednáškám z Farmakologie, Faf UK, HradecKrálové (2012/2013).

[52] Doležal,M. a kolektiv, Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém, Karolinum (2009).