

201

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

MOŽNOSTI SEPARACE HPLC
NA DISKOVÝCH MONOLITICKÝCH KOLONÁCH

Bakalářská práce

studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

VeronikaVášová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....*31. 8. 2007*.....

Kateřina Veselá
.....

podpis

Poděkování

Děkuji mému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi CSc., za odborné vedení při vypracování mé bakalářské práce a za jeho trpělivost při jejích opravách.

Také děkuji paní laborantce Anně Ammerové za její milou ochotu při poskytování potřebných pomůcek.

OBSAH

1) Základy teorie kapalinové chromatografie	8
1.1) <i>Vznik a vývoj kapalinové chromatografie</i>	8
1.2) <i>Charakteristika eluce</i>	8
1.3) <i>Účinnost chromatografické kolony</i>	11
1.4) <i>Dynamika separace</i>	12
1.5) <i>Rozlišení píků $R_{i,j}$</i>	14
2) Nanotechnologie-nanoporézní materiály	15
2.1) <i>Charakteristika nanoporézních materiálů</i>	15
2.2) <i>Příprava nanoporezních materiálů</i>	16
3) HPLC sorbety	17
3.1) <i>Neporézní, povrchově porézní a porézní sorbenty</i>	17
3.2) <i>Reverzní fáze na bázi silikagelu</i>	18
4) Monolitické materiály	21
4.1) <i>Vývoj monolitických materiálů</i>	21
4.2) <i>Charakteristika a vlastnosti monolitických materiálů</i>	22
4.2.1) <i>Silikagelové monolity</i>	23
4.2.2) <i>Organické polymerní monolity</i>	24
5) Charakteristika CIM[®] monolitických kolon	27
5.1) <i>CIM[®] monolitické disky</i>	27
5.2) <i>Možnosti použití CIM[®] monolitických disků</i>	28
5.3) <i>CIM[®] RP-SDVB monolitický disk</i>	30
6) Statistické vyhodnocení analytických výsledků	32
7) Experimentální část	35
7.1) <i>Materiál</i>	35
7.2) <i>Metody</i>	36
7.3) <i>Statistické vyhodnocení</i>	37
8) Výsledky a diskuze	38
8.1) <i>Stabilita funkce izokratického čerpadla ALPHA 10</i>	38
8.2) <i>Rozdělení rostlinných barviv na silikagelové koloně C18 a na CIM[®] monolitickém disku typu RP-SDVB</i>	42
9) Závěr	48

Seznam použitých symbolů a zkratk

A, B, C – konstanty van Deemterovy rovnice, příspěvky pro vířivou difúzi, molekulovou difúzi a o odporu proti převodu hmoty

A – absorbance [mAU]

C18 – silikagel s navázanými oktadecylovými zbytky uhlovodíků, reverzní fáze

C2 – ethylové skupiny navázané na stacionární fázi

C4 – butylové skupiny navázané na stacionární fázi

CIM[®] – Convective Interaction Media, obchodní značka (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko)

CLC – spojená kapalinová chromatografie (Conjoint Liquid Chromatography)

CM – karboxymethylová skupina navázaná na stacionární fázi

$(c_i)_s$ – koncentrace i -té složky ve stacionární fázi [mol/dm³]

$(c_i)_m$ – koncentrace i -té složky v mobilní fázi [mol/dm³]

DEAE – diethylaminová skupina navázaná na stacionární fázi

EDA – ethylendiaminová skupina navázaná na stacionární fázi

F_m – objemový průtok mobilní fáze [ml/min]

H – výškový ekvivalent teoretického patra [mm] (HETP)

h – výška [cm]

H_M, H_L, H_F – výškový ekvivalent teoretického patra pro odpor proti převodu hmoty, molekulovou difúzi a vířivou difúzi

H_{min} – minimum vyznačené na van Deemterově závislosti

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HLD – velké množství navázaných aktivních skupin na stacionární fázi, (High Ligand Density)

IDA – iminodioctová kyselina

IUPAC – International Union of Pure and Applied chemistry

k – retenční faktor

k_1 – rychlostní konstanta adsorpce

k_2 – rychlostní konstanta desorpce

K_D – rozdělovací konstanta

L – délka kolony [mm]

l – délka [mm]

$L_{1,2}$ – interval spolehlivosti

LLD – malé množství navázaných aktivních skupin na stacionární fázi, (Low Ligand Density)

λ – vlnová délka [nm]
 m – hmotnost [g]
 M_r – relativní molekulová hmotnost
 n – počet teoretických pater
 p – tlak [MPa]
QA – kvartérní aminová skupina navázaná na stacionární fázi
 Q_l – kritérium rozdílu nejmenších výsledků souboru
 Q_n – kritérium rozdílu největších výsledků souboru
 R – rozpětí souboru
 $R_{i,j}$ – rozlišení dvou látek, separační faktor
 $r_{i,j}$ – relativní retence
RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RP-SDVB – reverzní fáze na styrendivinylnbenzenu
 ρ – hustota [g/cm^3]
 SO_3 – sulfonylová skupina navázaná na stacionární fázi
 s – směrodatná odchylka
 s_r – relativní směrodatná odchylka [%]
 t – čas [min]
TFA – trifluoroctová kyselina
 t_M – mrtvý čas kolony [min]
 t_R – retenční čas [min]
 t'_R – redukovaný retenční čas [min]
 U – napětí [V]
 u – lineární průtoková rychlost [cm/min]
 u_{opt} – optimální průtoková rychlost
UV – ultrafialové světlo
 V – objem [ml]
 v – rychlost [mm/s]
 V_M – mrtvý objem [ml]
 V_R – retenční objem [ml]
 V'_R – redukovaný retenční objem [ml]
 w – šířka píku při základně [cm]
 $w_{1/2}$ – šířka píku v polovině jeho výšky [cm]
 x_m – medián, střední hodnota souboru

Cíl práce

Seznámení se s HPLC separací fotosyntetických pigmentů a ověření možností rozšíření úkolů v pokročilém praktiku z biochemie za použití CIM[®] monolitické kolony (RP-SDVB, BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko).

1) Základy teorie kapalinové chromatografie

1.1) Vznik a vývoj kapalinové chromatografie [1,2]

Za zakladatele kapalinové kolonové chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovič Cvet [1], který jako první rozdělil rostlinná barviva sloupcovou chromatografií.

Do dnešní klasické podoby se dostala kapalinová chromatografie díky A. J. P. Martinovi a R. L. M. Syngeovi v roce 1941 [2]. Používali kolony s malými částicemi (o průměru 100 až 200 μm) a vysokých tlaků, a tím docílili lepší separace. Toto byl první krok k vývoji vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

1.2) Charakteristika eluce [1,3,4]

Každá chromatografovaná látka v chromatogramu je charakterizována

- a) *retenčním časem* t_R [min], což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (*Obr. 1*)
- b) *retenční objem* V_R [ml], což je objem mobilní fáze, který proteče za dobu retenčního času.

Retenční čas a retenční objem spolu souvisejí vztahem

$$V_R = t_R \cdot Fm \quad (1.2.1)$$

kde Fm [ml/min] je objemový průtok mobilní fáze.

V_R je dán součtem dvou objemových veličin

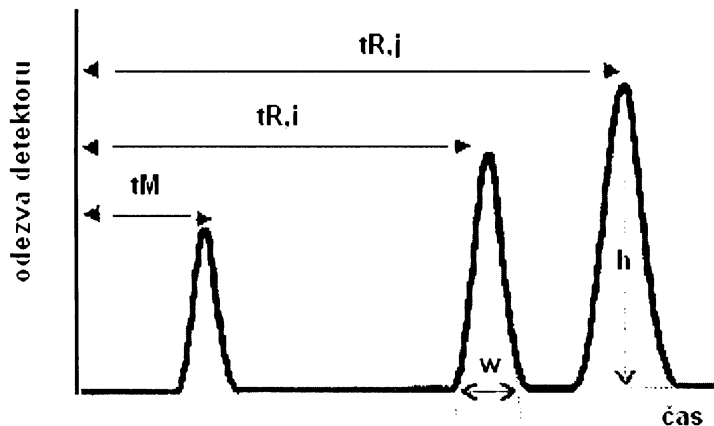
$$V_R = V'_R + V_M \quad (1.2.2)$$

kde V'_R [min] je redukovaný retenční objem a V_M [ml] je mrtvý objem, což je celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku po detektor. Zjistí se jako eluční objem látky, která se na koloně nezadržuje.

Redukovaný retenční čas t'_R [min] je čas, který stráví příslušný analyt na koloně. Je definován vztahem

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1.2.3)$$

kde t_M [min] je mrtvý čas kolony (Obr. 1).



Obr. 1: Schematické znázornění postupu určení elučních parametrů z chromatogramu [35].

Rychlost průtoku mobilní fáze lze vyjádřit dvěma způsoby:

- jako objemovou rychlost F_m [ml/min]
- jako lineární průtokovou rychlost u [cm/min].

Rozdělovací konstanta

Je definována pomocí vztahu

$$K_{D,i} = (c_i)_s / (c_i)_m \quad (1.3)$$

kde $K_{D,i}$ je rozdělovací konstanta i -té složky ve směsi, $(c_i)_s$ je koncentrace i -té složky směsi ve stacionární fázi a $(c_i)_m$ je koncentrace i -té složky směsi v mobilní fázi.

Langmuirova adsorpční izoterma

Je to závislost adsorbovaného množství určité látky na koncentraci téže látky v okolním prostředí. Nejčastěji je uváděna vztahem

$$(c_i)_s = k_1 (c_i)_m / 1 + k_2 (c_i)_m \quad (1.4)$$

kde k_1 je rychlostní konstanta adsorpce, k_2 je rychlostní konstanta desorpce.

Retenční faktor k

Tato veličina charakterizuje jakého násobku mrtvého objemu je potřeba k eluci příslušné látky. Lze ji vypočítat ze vztahu

$$k = V_{R,i} - V_M / V_M \quad (1.5)$$

Relativní retence $r_{1,2}$

Charakterizuje selektivitu chromatografického systému. Čím větší hodnota $r_{1,2}$, tím je systém selektivnější. Hodnota r je termodynamická veličina, která za konstantní teploty závisí pouze na fyzikálně chemických vlastnostech systému. Relativní retence pro látky 1 a 2 je definována vztahem

$$r_{1,2} = k_2/k_1 = V'_{R2}/V'_{R1} = K_{D2}/K_{D1} \quad (1.6)$$

1.3) Účinnost chromatografické kolony [1,2,3]

Prvním a nejjednodušším modelem charakterizujícím účinnost chromatografické kolony se stala představa chromatografie teoretického patra pocházející od Martina a Syngeho [2]. Tato teorie užívala koncepce vyvinuté pro popis destilace. Dávala představu o koncentraci rozpuštěné látky v libovolném čase a místě na koloně a také o způsobu, jakým výsledek dělení závisí na délce kolony.

Chování kolony bylo popsáno počtem teoretických pater. V každém teoretickém patře se ustavovala dokonalá rovnováha mezi dvěma fázemi. Rovnováha z každého teoretického patra poté byla popsána jednoduchými vztahy (viz.str. 10). Peters (1922) ukázal, že plynulou či naplněnou destilační kolonu, kdy je rovnováha ustavena v každém bodě, lze rozdělit na počet vrstev, z nichž každá je rovnocenná jednomu teoretickému patru a výška takové vrstvy byla nazvána výškovým ekvivalentem teoretického patra (HETP). Při velkém počtu teoretických pater, tedy vysokém celkovém počtu stupňů volnosti a za předpokladu lineárního provedení chromatografie, dochází k dělení rozpuštěných látek podle Gaussova rozdělení.

Počet teoretických pater kolony n

Počet teoretických pater lze vypočítat buď za použití hodnot šířky píku při základně, definované průsečíky tečen v inflexních bodech se základní linií, nebo za použití hodnot šířky píku v polovině jeho výšky. Z důvodu neidealit Gaussovy křivky dostaneme přesnější výsledek za použití hodnoty šířky píku v polovině jeho výšky, kde je tato neidealita, oproti základně, menší.

$$n = 5,545 \cdot (t_{R,i} / w_{1/2,i})^2 \quad (1.7.1)$$

kde $t_{R,i}$ je retenční čas i -té složky ve směsi, $w_{1/2,i}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

Výškový ekvivalent teoretického patra H [mm] slouží jako charakteristika kolon, bez ohledu na jejich délku. Lze ho vyjádřit vztahem

$$H = L/n \quad (1.7.2)$$

kde L [mm] je délka kolony, n je počet teoretických pater.

1.4) Dynamika separace [1,2,3,30]

V modelu ideální lineární chromatografie podle Martina a Synge nebyly brány v úvahu faktory, které způsobují neideální chování, jejichž účinkem dochází k rozšiřování zón separované látky. Rozšiřování zón rozpuštěné látky způsobují tři faktory. Vířivá difúze, molekulová difúze a odpor proti převodu hmoty.

Vířivá difúze

Je způsobena různou lineární rychlostí mobilní fáze v různých místech kolony. Dochází k tomu, že molekuly se v mobilní fázi nepohybují stejnou rychlostí, některé se zpožďují vlivem porézního prostředí a jiné jsou zrychlovány. Vířivou difúzi ovlivňuje velikost zrn, uspořádání stacionární fáze na koloně a rychlost mobilní fáze.

$$H_F = A \quad (1.8.1)$$

kde H_F je výškový ekvivalent teoretického patra pro vířivou difúzi, A je konstanta závislá na velikosti částic a uspořádání stacionární fáze.

Molekulová difúze

Je dána difúzním koeficientem v mobilní fázi a může být ovlivněna tvarem pórů ve stacionární fázi. Při molekulové difúzi dochází k tomu, že některé molekuly putují proti proudu mobilní fáze a tím jsou oproti ostatním opožděny. Děje se tak hlavně při malých rychlostech. V důsledku malých hodnot difúzních koeficientů je vliv molekulové difúze při vyšších průtokových rychlostech k celkové účinnosti systému zanedbatelný. Příspěvek molekulové difúze je dán vztahem

$$H_L = B/u \quad (1.8.2)$$

kde H_L je výškový ekvivalent teoretického patra pro molekulovou difúzi, B je konstanta závislá na hodnotě difúzního koeficientu separované látky a geometrickém uspořádání stacionární fáze, u je lineární průtoková rychlost mobilní fáze.

Odpor proti převodu hmoty (příčná difúze)

Molekuly putující v mobilní fázi difundují do pórů stacionární fáze, dostávají se až do stagnantní mobilní fáze, ve které nějakou dobu setrvávají. Vlivem toho dochází k jejich zpoždění a tím k nežádoucímu rozšiřování zón. Rychlost převodu hmoty závisí na velikosti a tvaru zrn, na tvaru povrchu náplně a na tloušťce vrstvy stacionární fáze. Při nevhodné stacionární fázi se tvoří chvosty. Velikost příspěvku odporu proti převodu hmoty v mobilní a stacionární fázi je dán vztahem

$$H_M = (C_M + C_S)u \quad (1.8.3)$$

kde H_M je výškový ekvivalent teoretického patra pro odpor proti převodu hmoty, C_M a C_S jsou konstanty závislé na difúzních koeficientech separované látky v mobilní a stacionární fázi, u je lineární průtoková rychlost mobilní fáze.

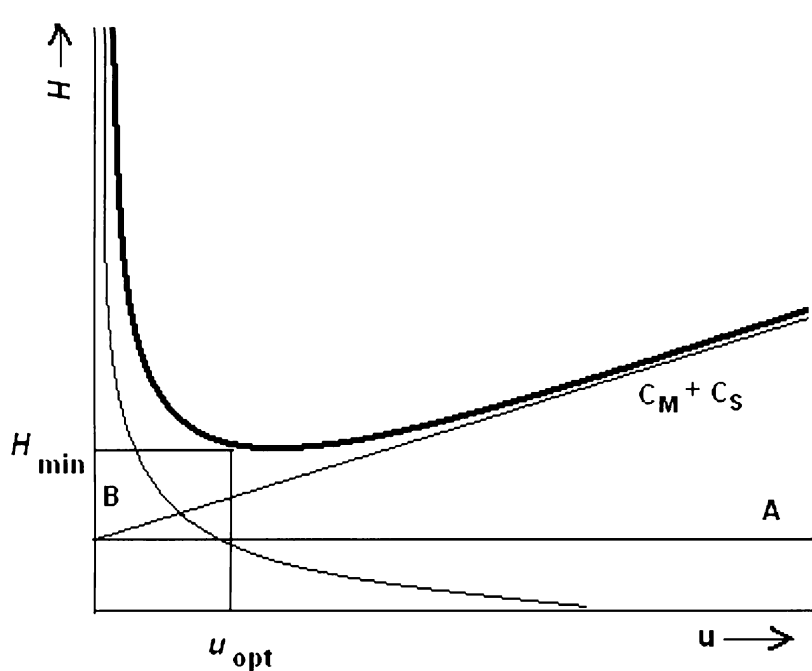
Celkový výškový ekvivalent teoretického patra je dán součtem jednotlivých příspěvků.

$$H = H_F + H_L + H_M \quad (1.8.4)$$

Zároveň z jednotlivých příspěvků plyne vliv rychlosti mobilní fáze na účinnost kolony, která je dána van Deemterovou rovnicí. Grafické znázornění van Deemterovy závislosti je na (Obr. 2).

$$H = A + B/u + (C_M + C_S)u \quad (1.8.5)$$

Nejvyšší účinnost vykazuje kolona v minimu křivky (H_{min}), které odpovídá optimální průtokové rychlosti (u_{opt}). Pak dochází k nejmenšímu rozšiřování zón.



Obr. 2: Grafické znázornění závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra H , na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze u (van Deemterova závislost [35]).

1.5) Rozlišení píků $R_{i,j}$ [1,3,4]

K vyhodnocení rozdělení dvou látek i a j slouží rozlišení $R_{i,j}$, které můžeme vyhodnotit přímo z příslušného chromatogramu. Rozlišení je dáno vztahem

$$R_{i,j} = 2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j}) / (w_i + w_j) \quad (1.9)$$

kde $R_{i,j}$ je rozlišení dvou látek i a j , $t_{R,i}$ je retenční čas i -té složky ve směsi, $t_{R,j}$ je retenční čas j -té složky ve směsi, w_i je šířka píku při základně i -té složky ve směsi, w_j je šířka píku při základně j -té složky ve směsi.

Při hodnotě $R_{i,j} = 1$ se vzdálenost mezi maximy obou píků rovná střední šířce píku a píky se nepatrně překrývají, jen asi ze 2 %. Při hodnotě $R_{i,j} = 1,5$ dochází prakticky k dokonalému rozdělení obou píků až na základní linii. Větší rozlišení prodlužuje dobu analýzy a není tedy žádoucí. Uvedené hodnoty rozlišení platí za předpokladu gaussovského tvaru píku.

2) Nanotechnologie-nanoporézní materiály

2.1) Charakteristika nanoporézních materiálů [5]

Porézní materiály jsou standardně klasifikovány podle IUPAC, která rozlišuje tři typy pórů. Tato klasifikace však není identická s definicí nanoporézních materiálů. Klasifikují se mikropóry, jejichž průměr je menší než 2 nm. Dále jsou to mezopóry o průměru v intervalu 2 až 50 nm a makropóry, jejichž průměr je větší než 50 nm. Nanoporézní materiály mohou obsahovat všechny tři typy pórů. Některé nanoporézní materiály jsou uvedeny v (Tab. 1). Jejich základní charakteristiky jsou rozděleny do šesti skupin podle chemického složení [5].

Pod pojmem nanoporézní materiály jsou tedy zahrnuty látky, jejichž parametry jsou přesně definovány. Jsou to dispersní tuhé látky, obsahující póry o velikostech od 1 do 100 nm. Objem těchto pórů se pohybuje mezi hodnotami 1,5 až 2,0 cm³/g a plocha jejich povrchu dosahuje hodnot 1500 m²/g. Charakteristickou vlastností nanoporézních materiálů je dokonalá architektura porézního systému, který je vytvořen pravidelně uspořádanými póry stejného tvaru a stejné velikosti. Díky velké ploše pórů mají nanoporézní materiály vlastnosti, kterých by neporézní látky stejného chemického složení nemohly nikdy dosáhnout. Povrch nanoporézních materiálů musí být dobře dostupný pro molekuly, ionty či jiné částice nesené ve vnější kapalně či plynné fázi. Díky těmto vlastnostem se nanoporézní materiály využívají v adsorpčních a separačních procesech, katalýze a fotokatalýze a některých biotechnologiích.

Tab. 1

Přehled druhů a klasifikace nanoporézních materiálů [5].

Vlastnost	Materiál					
	polymery	uhlík	skla	hlinito-křemičitany ^a	oxidy ^b	kovy
Velikost pórů	mezo-makro	mikro-mezo	mezo-makro	mikro-mezo	mikro-mezo	mezo-makro
Plocha povrchu	nizká	vysoká	nizká	vysoká	střední	nizká
Porozita ^c	> 0,6	0,3–0,6	0,3–0,6	0,3–0,7	0,3–0,6	0,1–0,7
Permeabilita	nizká-střední	nizká-střední	vysoká	nizká	nizká-střední	vysoká
Pevnost	střední	nizká	vysoká	nizká	nizká-střední	vysoká
Teplotní stabilita	nizká	vysoká	střední	střední-vysoká	střední-vysoká	vysoká
Chemická stabilita	nizká-střední	vysoká	vysoká	vysoká	velmi vysoká	vysoká
Cena	nizká	vysoká	vysoká	nizká-střední	střední	střední
Životnost	krátká	dlouhá	dlouhá	střední-dlouhá	dlouhá	dlouhá

^a Včetně aluminu a oxidu křemičitého, ^b typickými představiteli jsou oxid titaničitý (anatas) a zirkoničitý, ^c poměr objemu pórů a vnějšího objemu porézní látky

2.2) Příprava nanoporezních materiálů [6]

Abychom získali nanoporézní materiál o mimořádných vlastnostech, je třeba při jeho přípravě pracovat s molekulární přesností. To znamená, že musíme začít s jeho stavbou od nanočástic. V anglickém jazyce se tento postup označuje termínem „bottom up“ („odspodu nahoru“), což znamená, že stavba funkčního celku začíná právě u nejmenších částic. Z těchto částic se skládají součásti, z nichž se tvoří další složky, ale daleko složitějších systémů. Každé další větší uspořádání je sestavováno opět větším mechanismem. Pokud by se velikost funkčního uspořádání částic při každé takové iteraci zdvojnásobila, tak se od součástky o velikosti 1 nm k součástce o velikosti 1 m dostaneme pouhými 30 kroky. Je to základní princip molekulárního neboli nanotechnologického strojírenství.

Druhou možností přípravy nanoporézního materiálu je způsob založený na „zjednodušování“ až do té doby, než získáme formu, která vyhovuje svojí velikostí a funkcí našim záměrům. Tento způsob přípravy je opačný „odshora dolů“ („top down“) a jeho výhodou je, že začínáme pracovat se strukturami většími, se kterými se dobře zachází.

3) HPLC sorbety

3.1) Neporézní, povrchově porézní a porézní sorbenty [7]

Mezi neporézní materiály můžeme zahrnout jak silikagelové, tak polymerní částice. Mají obvykle rozměry kolem 2 μm a vrstva stacionární fáze, která je nanesená na povrchu nepropustné mikročástice je velice tenká. V těchto stacionárních fázích dochází k rychlému přenosu hmoty a vysoké účinnosti je dosaženo i při vysokých průtokových rychlostech mobilní fáze. Proto je tato fáze dostačující pro dělení malých molekul, biomakromolekul i syntetických polymerů. Protože je povrch stacionární fáze velikostně dosti omezený, mají tyto materiály malou sorpční kapacitu.

Povrchově porézní sorbenty mají větší, ale nepropustné jádro a silnější vrstvu stacionární fáze. Jejich velikost se pohybuje kolem 5 μm . Sorpční kapacita je větší a účinnost lepší, než na plně porézních materiálech. Tlak na koloně plněné neporézními sorbenty je větší, než tlak na koloně plněné povrchově porézním sorbentem.

Mezi nejznámější porézní materiály patří silikagel, jehož částice měly na počátku sedmdesátých let velikost kolem 10 μm a tvar těchto částic byl nepravidelný (*Obr. 4b*, viz str. 23). Začal se připravovat v různých chemických modifikacích, včetně reverzní fáze. Na jeho separační schopnost měl vliv nepravidelný tvar částic. Se zlepšením technologie výroby se podařilo tvar jednotlivých částic více či méně sjednotit (*Obr. 4c*, viz str. 23), a tak výrazně zlepšit separační účinnost. Právě vysoká separační účinnost byla a stále je jedním z hlavních kritérií při vývoji nových chromatografických sorbentů (*Tab. 2*). Povrch typických porézních sorbentů je tvořen difúzními póry. Čím větší počet menších částic tvoří sorbent, tím má sorbent větší povrch a více difúzních pórů. Difúzní proces je tak rychlejší. Rozpuštěná látka nesená mobilní fází doputuje do stagnantní mobilní fáze uvnitř póru, odkud se dostane ke stacionární fázi uvnitř póru, s níž interaguje. Poté se opět uvolní ze stacionární fáze a difunduje zpět do pohybující se mobilní fáze. Tímto způsobem putuje rozpuštěná látka kolonou tak dlouho, dokud se nedostane na konec kolony, z níž je následně vyloučena.

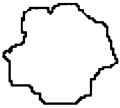








3.2) Reverzní fáze na bázi silikagelu [7, 9]

Nejrozšířenějším typem reverzní fáze na bázi silikagelu pro HPLC je oktadecylová (C18) modifikace. Silikagel má několik vlastností, díky kterým je tak oblíbený. Je to např. vysoká mechanická stabilita či příprava sorbentu s velkým specifickým povrchem. Významnou vlastností je snadná chemická modifikace nejrůznějších typů a možnost přípravy reverzní fáze. Zároveň můžeme ovlivnit velikost a distribuci pórů. Pro HPLC se dnes nejčastěji používá porézní silikagel s částicemi o velikostech 3-5 μm , s povrchem 50-500 m^2/g a velikostí pórů přibližně 10 nm. Tyto reverzní fáze jsou omezeně stabilní v bazickém a silně kyselém prostředí. Fáze C₁₈ je stabilní pouze v rozsahu pH 3-9, někdy se uvádí i jen 3-7. Při pH mobilní fáze nižším než 3 dojde ke kyselé katalyzované hydrolyze siloxanové vazby mezi silikagelem a organosilanem. Důsledkem toho je ztráta navázané fáze a tím ztráta retence pro hydrofobní analýzy.

Při vyšším pH, okolo 9, naopak dochází k rozpouštění silikagelové matrice. Tím dojde ke snížení účinnosti, vzniku volného prostoru v koloně a nakonec k úplnému zničení stacionární fáze [7].

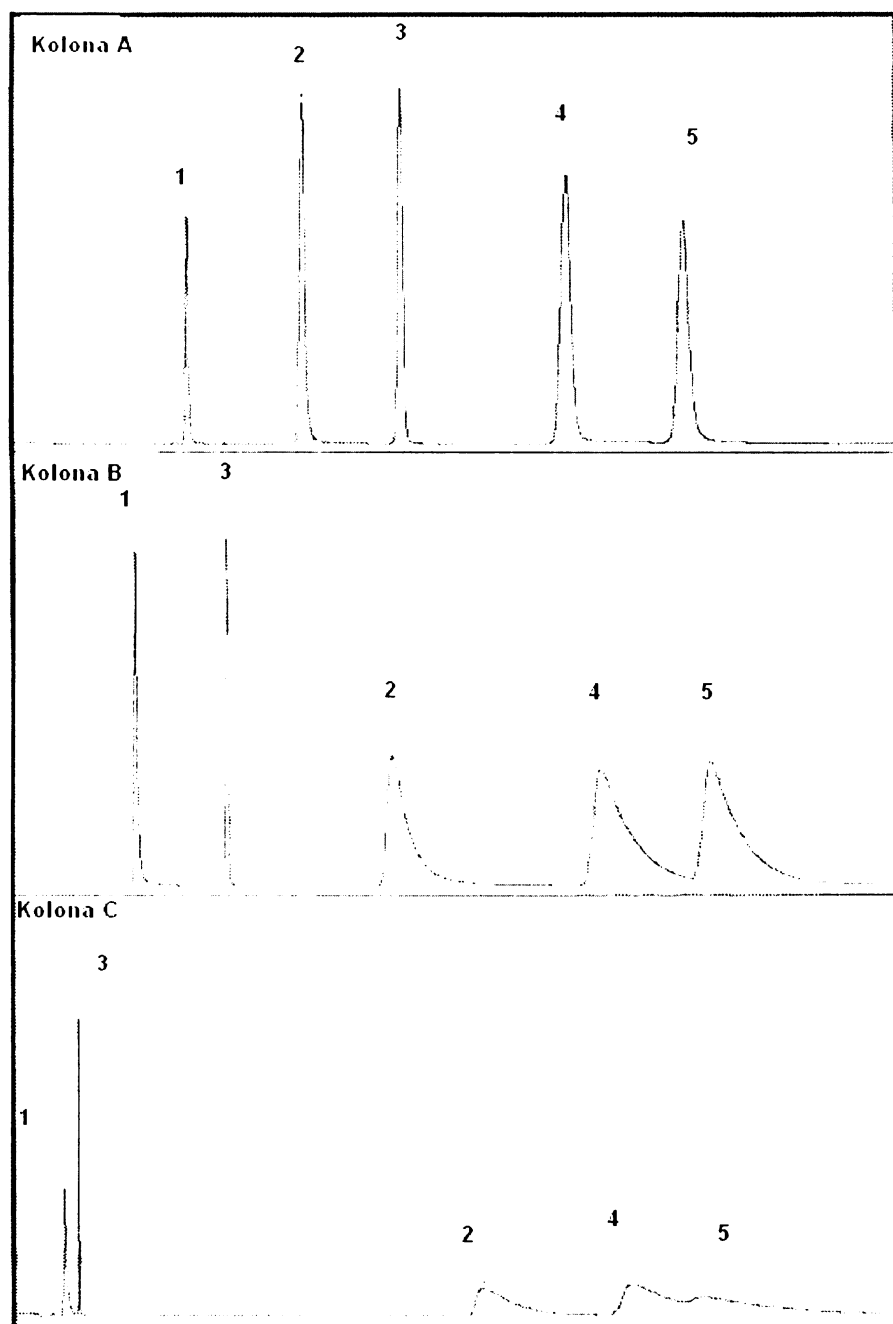
Protože jsou silikagelové (C18) kolony na reverzní fázi nejčastěji používanými kolonami, existuje mnoho výrobců těchto kolon. Přestože jsou si na základě chemických vlastností navzájem velice podobné, mohou být jejich separační vlastnosti zcela odlišné. Porovnání tří kolon C18 od různých výrobců je na *Obr. 3*. Výsledkem byly píky různých velikostí a tvarů a eluce některých analytů v jiném pořadí [9].

Tab. 2: Historie vývoje produktů pro HPLC [8]

Rok přijetí	Velikost částice	Nejoblíbenější velikost (μm)	Počet teoretických pater na kolonu o délce 15 cm
1950	 nepravidelný tvar	100	200
1967		50	1000
1972		10	6000
1985		5	12 000
1992		3-3,5	22 000
1998 ^a		1,5 ^a	30 000
1999		5,0	8000 ^b
2000		2,5	25 000
2003		1,8	32 500

^a Nephórní částice z pryskyřice či silikonové

^b Pro proteiny o M_r 5700.



Obr. 3: Porovnání schopnosti dělení tři kolony typu C18 od různých výrobců při separaci složek stejného vzorku za stejných podmínek. Komponenty: 1) norefedrin, 2) nortriptylin, 3) toluen, 4) imipramin, 5) amitriptylin; Mobilní fáze: 80:20 MeOH/25 mM KH_2PO_4 (pH 6,0); Vlnová délka: 215 nm; Rozměry: 250 x 4,6 mm; Velikost částic 5 μm ; Průtoková rychlost: 1 ml/min [9].

4) Monolitické materiály

4.1) Vývoj monolitických materiálů [10,11,12,31]

Jedním z hlavních důvodů, proč se začaly monolitické materiály vyvíjet, a to v rozmanitých typech monolitických matic, jsou jejich výhodné vlastnosti. Jsou to (a) přenos hmoty na základě proudění, (b) extrémně vysoká porosita (více než 50 % a v některých případech až 90 %), (c) levnější příprava v porovnání s obvyklými maticemi, (d) jednoduché a reprodukovatelné plnění kolon a (e) vysoká kapacita pro extrémně velké biomolekuly [12].

Ve stejnou dobu, kdy se profesor Wichterle zabýval výzkumem polymerů připravovaných z monomeru 2-hydroxyethyl-methakrylátu, se v laboratoři M. Kubína zrodila i první monolitická separační média. Gely na základě 2-hydroxyethyl-methakrylátu mohly být připraveny v široké škále porozit, a proto se nabízelo vyzkoušet je například i při gelové filtraci. Tento gel se připravoval ve skleněné zkumavce radikálovou polymerací 22 % vodného roztoku monomeru. Poté se vyndal, vyvařil ve vodě a vložil do skleněné kolony, čímž byl připraven k použití. Nevýhodou tohoto monolitu byla velmi malá průchodnost (4 ml/h) a zároveň malá účinnost, čímž nebylo dosaženo očekávaných separačních schopností. Ale i přes tyto nevýhody lze říci, že první monolitická kolona byla na světě [10].

Také J.H. Knox a P.A. Bristol z Univerzity v Edinburgu si uvědomili potenciální výhody monolitických kolon více než před 30 lety. Navrhli přípravu tuhé pěny uvnitř kolony a předpokládali, že styk pórů vytvoří síť, skrze kterou bude protékat mobilní fáze. Motivací jim bylo uvědomění si, že monolitické materiály s rozsáhlými mezopóry či kanálky mohou způsobit větší propustnost kolony.

Na základě chemické podstaty monolitických materiálů byly monolitické kolony klasifikovány jako organické polymery nebo kolony na základě silikagelu. Hjerten a kol. připravili v devadesátých letech organický polymerní monolitický materiál na základě polyakrylamidu přímo uvnitř chromatografických kolon [31]. Díky možnosti přípravy monolitického materiálu přímo uvnitř chromatografických kolon, byly polymerní monolitické nosiče úspěšně aplikovány v HPLC a kapilární elektrochromatografii. Při používání těchto materiálů v HPLC se objevilo několik nevýhod, které byly hlavní příčinou k jejich ústupu. Měli nižší efektivnost ve srovnání s kolonami na bázi silikagelu [11].

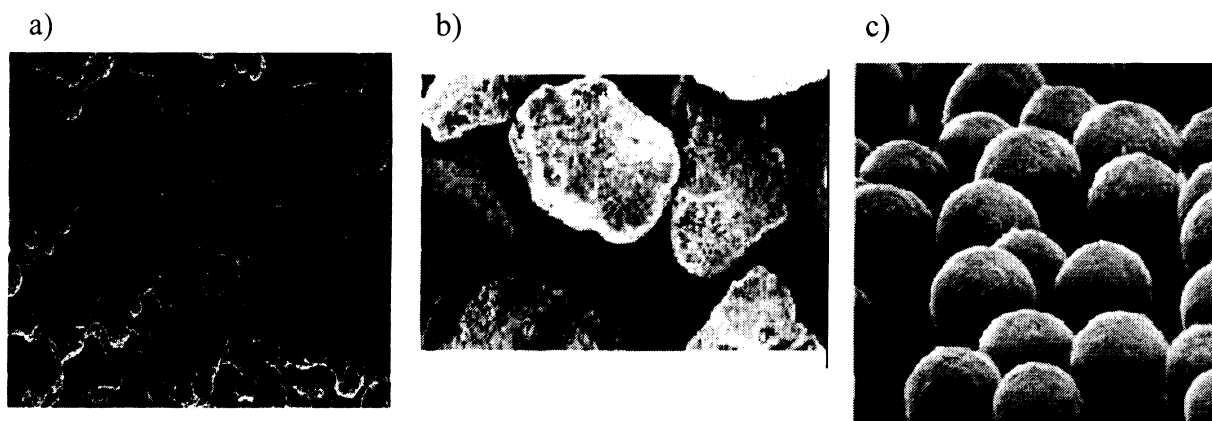
4.2) Charakteristika a vlastnosti monolitických materiálů [10,12,13,14,15-18]

Monolit je celistvý blok pórovitého materiálu. Je propustný a má dostatečně velký specifický povrch pro navázání velkého množství rozpuštěných látek. Při průtoku mobilní fáze tímto monolitem dochází ke značnému zadržování rozpuštěných látek, právě díky velkému povrchu. Monolitické materiály jsou podobné membránám, které jsou tvořeny vysoce propojenými kanálky o průměru 1 μm . Na rozdíl od membrán, lze monolity připravit v různých tvarech a rozměrech [12]. Dnes existují rozmanité typy monolitů. Mají rozdílné formy a jsou syntetizovány rozdílnými preparačními procesy [13].

Monolity musí zcela zaplňovat vnitřek separační kolony a nesmí obsahovat žádné volné prostory. Těmito prostory je myšleno např. místo mezi samotným monolitickým nosičem a chromatografickou kolonou, ve které je tento nosič uložen. V klasických kolonách se právě těmito prostory uskutečňuje velká část průtoku. Veškerá mobilní fáze musí protékat póry monolitu. Za monolit můžeme považovat například i kazetu naplněnou vrstvenými listy modifikované celulosy či srolované tkaniny.

Jednou z významných charakteristik monolitických materiálů je rychlý přenos hmoty na koloně. Právě díky konvektivnímu toku póry dochází ke zrychlenému přenosu hmoty na koloně. Konvektivní tok znamená, že veškerá mobilní fáze protéká všemi póry monolitu. V plněné koloně je hlavní hnací silou přenosu hmoty difúze. Mobilní fáze proudí kolem částic a rozpuštěné látky difundují do pórů. Konvektivní tok póry u monolitických kolon umožňuje značné zrychlení separací zejména velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny či syntetické polymery, jejichž difúze je pomalá [10]. Některé dřívější studie kinetického chování monolitických kolon studují závislost účinnosti kolony na rychlosti toku mobilní fáze [14,15-18].

Monolitické kolony a plněné kolony jsou z hlediska struktury rozdílné. To můžeme porovnat na *Obr. 4* a *Obr. 4c*. Proto i příprava např. křemenných monolitů a plněných kolon jsou odlišné, a zároveň i chemie na povrchu těchto produktů se liší [13].



Obr. 4: Obrázky křemenných stacionárních fází rozdílného charakteru pořízené elektronovým mikroskopem:

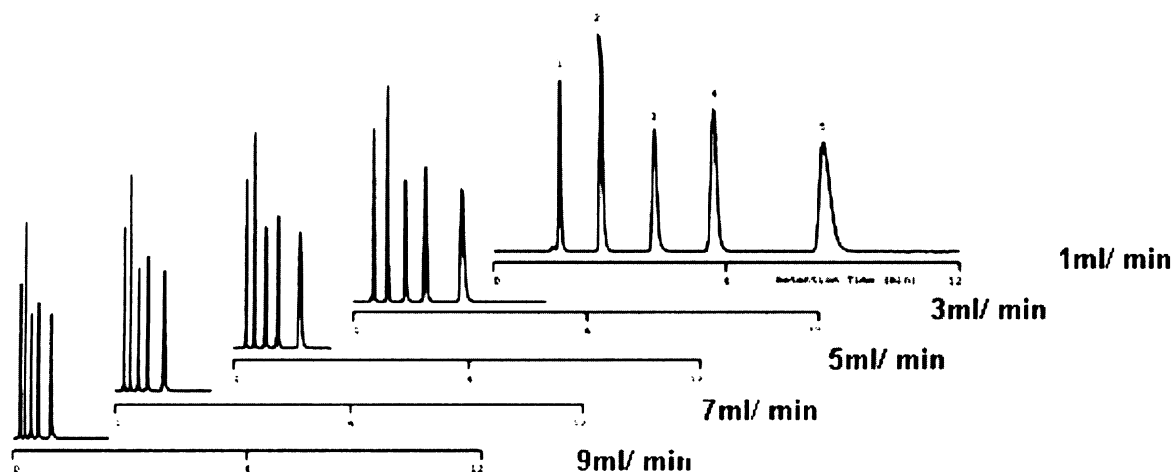
- a) křemenná monolitická stacionární fáze (Chromolith®) [19],
- b) křemenné částice nepravidelného tvaru [30],
- c) křemenné částice pravidelného kulatého tvaru [30].

4.2.1) Silikagelové monolity [7,10,14,19]

První silikagelový monolit byl připraven Tanakou [14]. Tento monolit obsahoval velké póry i velké množství mezopórů. Díky těmto pórům má tento silikagelový monolit veliký povrch, což je vlastnost, která je důležitá pro dělení malých a středně velkých molekul izokratickým dělením v reverzním uspořádání [7].

Tyto silikagelové monolity se liší od polymerních monolitů tím, že nemohou být připravovány *in situ*, tedy přímo v připravených chromatografických kolonách. Je to proto, že při tuhnutí tohoto monolitu dochází ke značnému poklesu jeho objemu. Pro představu, tyčinka o průměru 4,6 mm se získá z formy o průměru 6 mm. Proto se silikagelové monolitické nosiče připravují zvlášť a teprve připravené se vloží do vhodné chromatografické kolony a řádně se utěsní. Nakonec se provádí jeho chemická modifikace. Většinou se na tento silikagelový monolit navazují C18 skupiny [10].

Hlavními výrobci těchto silikagelových skupin jsou firma Merck v Německu a firma Phenomenex v USA. Firma Merck vyrábí tyto kolony ve dvou velikostech pro separace s obrácenými fázemi pod názvem Chromolith [7]. Na Obr. 5 je zobrazeno velmi rychlé dělení právě na koloně Chromolith [19].



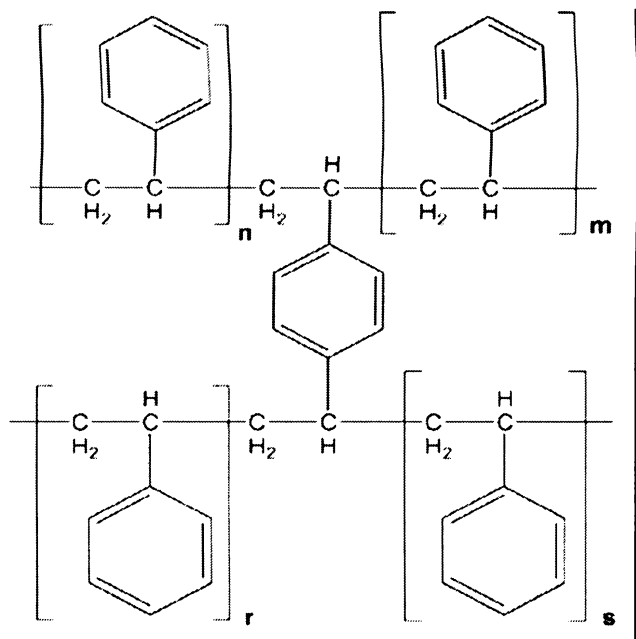
Obr. 5: Separace β -blokátorů s obrácenými fázemi při různých průtokových rychlostech s použitím monolitické kolony Chromolith. Podmínky: kolona: silikový monolit RP 18e, 50 x 4,6 mm i.d.; mobilní fáze: 20:80 acetonitril/0,1 % trifluoroctová kyselina ve vodě; průtokové rychlosti: 1-9 ml/min, UV detekce při 254 nm, píky: atenolol (1), pindolol (2), methoprolol (3), celiprolol (4), bisoprolol (5) [19].

4.2.2) Organické polymerní monolity [21]

Organické polymerní monolity jsou připravovány především pro použití v kapilární chromatografii, a to polymerizací organických monomerů za přítomnosti síťovacího činidla. Dosud byly připraveny monolity na základě polystyrenu, polymethakrylátu a polyakrylamidu.

Monolity na základě polystyrenu [21,22]

Jako monomery používané při přípravě polystyrenových monolitů jsou obvykle používány styren či jeho deriváty, jako je např. 4-chlormethylstyren, v přítomnosti divinylbenzenu, jako síťovacího činidla [21]. Polystyrenové monolity patří mezi silně hydrofobní materiály [22]. Na Obr. 6 je zakreslena struktura polystyrenového monolitu, který vzniká právě reakcí styrenu a divinylbenzenu, jako síťovacího činidla.



Obr. 6: Chemická struktura hydrofobního polystyrénového monolitu [22].

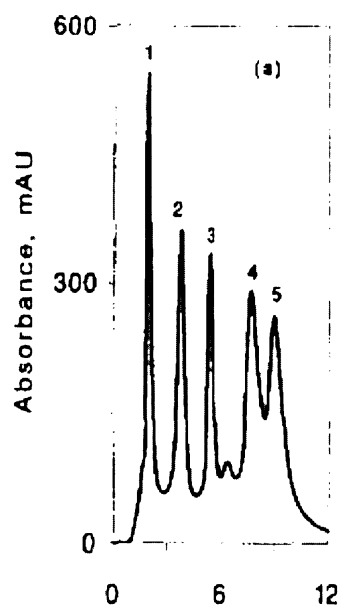
Monolity na základě polymethakrylátu [23]

Svec a Fréchet připravili polymerizační reakcí poly(glycidylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylátový) monolit používaný v chromatografii pro iontovou výměnu. Ionově výměnná chromatografie je mimo jiné užívána i pro čištění proteinů. Nevýhodou těchto polymerů je omezená stabilita esterových vazeb vůči alkalickým roztokům, které jsou používány k promývání kolony mezi jednotlivými operačními cykly. K promytí kolony nesmí být použity koncentrované roztoky alkalických hydroxidů, jinak může dojít k poškození kolony hydrolyzou esterových skupin.

Monolity na základě polyakrylamidu [22,24]

Monolity na základě akrylamidu jsou hydrofilního charakteru. Vznikají polymerizační reakcí akrylamidu či methakrylamidu a jejich derivátů. Jako síťovací činidlo je zde používán methylenbisakrylamid [22]. Xie a kol. [24] připravili rigidní pórovitou polyakrylamid-*co*-butylmethakrylát-*co*-*N,N'*-methylenbisakrylamidovou monolitickou kolonu pro chromatografické hydrofobní interakce proteinů. Zadržování proteinů záleží na hydrofobicitě povrchu proteinu a na hustotě a typu hydrofobních ligandů, které se váží na povrch media. Dostatečně koncentrovaný roztok monomeru lze získat pouze při teplotě blízké polymerizační

teplotě. Proto všechny polymerizační složky směsi jsou nejprve rozpuštěny při vysoké teplotě a samotný radikálový iniciátor je přidán do této polymerizační směsi těsně před naplněním kolony. Hydrofobní vlastnosti originálního poly(akrylamid-co-methylen-bisakrylamidu) nejsou pro separaci proteinů dostatečné, proto se přidává do polymerizační směsi více hydrofobního monomeru, butylmethakrylátu. Takto se tedy řídí hydrofobicita této monolitické kolony. Na Obr. 7 je uveden příklad dělení proteinů na poly(akrylamid-co-butyl methakrylát-co-N,N'-methylenbisakrylamidové) monolitické koloně.



retenční čas [min]

Obr. 7: Příklad dělení hydrofobní interakční chromatografií na poly(akrylamid-co-butyl methakrylát-co-N,N'-methylenbisakrylamidové) monolitické koloně. (1) Cytochrom c, (2) ribonukleasa, (3) karbonát anhydrasa, (4) lysozym, (5) chymotrypsinogen. Podmínky: kolona 50x8 mm I.D., 10 % butylmethakrylát, gradientová mobilní fáze od 1,5 do 0,1 M síranu amonného v 0,01 M pufru fosforečnanu sodného (pH 7) v 3 min. Průtoková rychlost 1 ml/min, gradientový čas 10 min (24).

5) Charakteristika CIM[®] monolitických kolon [12,31]

CIM[®] (Convective Interaction Media) monolitické kolony patří k nové generaci stacionárních fází používaných v kapalinové chromatografii. CIM[®] nosiče jsou navrženy jako homogenní fáze, které poskytují vysokou rychlost přenosu hmoty při nízkých tlacích.

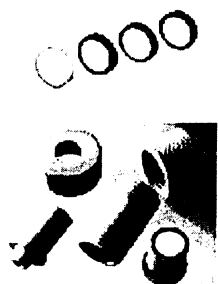
Kromě rychlosti přenosu hmoty dovoluje struktura pórů snadnou propustnost a malá délka kolony je příčinou optimálního čištění velkých molekul. Během separačních procesů také dochází ke snižování tlaku na kolonu, nescifických vazeb, degradace produktu a drobných strukturálních změn v biomolekulách. CIM[®] monolitické nosiče se proto jeví jako výhodné nosiče v metodách dělení peptidů, proteinů, oligonukleotidů a dokonce nanočástic jako jsou DNA plasmidy a viry [31].

Tato media se vyznačují vysokou mechanickou stabilitou spojenou s vysokou propustností (umožňující práce při vysokých průtokových rychlostech) a chemickou odolností (umožňující dostatečnou regeneraci a čištění) [12].

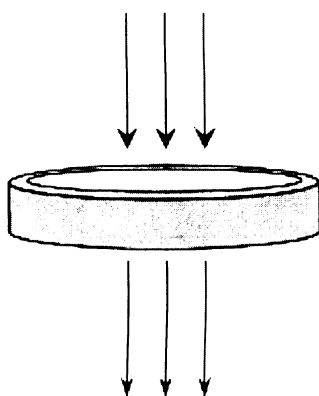
5.1) CIM[®] monolitické disky [25]

Tyto monolitické disky umožňují velice rychlé analýzy v procesech kontroly a účinné laboratorní purifikace.

CIM[®] monolitický disk se skládá z disku a ze speciálně navrženého držáku (housing) sloužícího na umístění disku. Tento držák zajišťuje malý mrtvý objem a lze ho připojit k HPLC separačnímu systému (*Obr. 8*). Disk se skládá z monolitické části, tedy samotného nosiče, který je upevněn uvnitř neporézního kroužku, který zajišťuje pouze axiální tok přes disk (*Obr. 9*). Zároveň zabraňuje jakémukoliv unikání vzorku a mobilní fáze mimo monolit. Průměr disku je 16 mm a šířka 3 mm. Objem disku činí 0,34 ml, nastavená maximální rychlost může být až 10 ml/min, tlak až 50 bar, teplota 50 °C a pH rozmezí je od 1 do 14 [26]



Obr. 8: Příklad CIM[®] disků (*nahoře*), fotografie držáku (*housing*) potřebného k upevnění CIM[®] disku (*dole*). Produkt firmy BIA Separation, Ljubljana, Slovinsko [12].

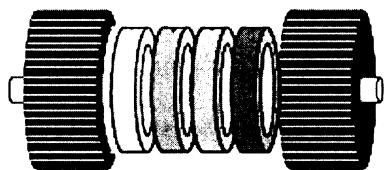


Obr. 9 : Schematické znázornění toku mobilní fáze a vzorku CIM[®] diskem [12].

5.2) Možnosti použití CIM[®] monolitických disků [25-26, 31-35]

CIM monolitické disky se dodávají v řadě chemických variant a využívají rozmanitých chemických interakcí, jak je možno vidět v *Tab. 3*. Disky jsou rozlišeny barvou kroužku kolem monolitu pro jednotlivé chemické aplikace (*Tab. 4*). Do jednoho držáku lze umístit až 4 disky (*Obr. 10*). S použitím stejných disků se zvýší kapacita a při použití rozdílných disků lze toto uspořádání použít ve spojené kapalinové chromatografii (CLC) [25].

Ve spojené kapalinové chromatografii jsou umístěny do držáku 2-4 disky s odlišnou funkční skupinou. To umožňuje separaci např. směsi proteinů, které se dělí na základě jiné chemické interakce. N. D. Ostryanina a kol.[35] použili spojenou kapalinovou chromatografii k dělení směsi králíčích polyklonálních protilátek krevního séra. Jako stacionární fázi použili 4 makroporézní polymerní CIM[®] disky na základě poly(glycidylmethakrylát-co-ethylendimethakrylátu) s různou afinitou a umístili je do jednoho držáku (*Obr. 10*).



Obr. 10: Umístění čtyř různých CIM[®] monolitických disků do jednoho držáku pro použití ve spojené kapalinové chromatografii. [25]

Tab. 3: *Druhy chemických interakcí na diskových monolitických kolonách CIM® [25].*

Druhy chemických interakcí					
Iontová výměna	Reverzní fáze	Afinita	Hydrofobní interakce	Aktivační	Imobilizované enzymy
Kvartérní amin	RP-SDVB	Protein A	Ethyl	Epoxy	
Diethylamin		Protein G	Butyl	Karboxydiimin	
Ethylendiamin		Kovový chelát	Hydroxyl	Ethylendiamin	
Sulfonyl					
Karboxymethyl					

K separaci protilátek došlo během několika minut. Tato nová separační metoda je nazývána vysokoúčinnou chromatografií s monolitickým diskem (HPMDC - z anglického high-performance monolithic disk chromatography) a byla známa již před deseti lety.

Tab. 4: *Rozlišení CIM® disků podle barvy kroužku kolem monolitu pro jednotlivé chemické aplikace [26]*

Chemie	Barva
QA (kvartérní amin)	Tmavě modrá
DEAE (diethylamin)	Zelená
EDA (ethylendiamin)	Tmavě šedá
SO ₃ (sulfonyl)	Červená
CM (karboxymethyl)	Černá
C2 (ethyl)	Hnědá
C4 (butyl)	Žlutá
Hydroxyl	Světle modrá
Epoxy	Bílá (světle šedá)
RP-SDVB ^a	Tmavě šedá
Protein A, LLD ^b	Bílá
Protein A, HLD ^c	Bílá
Protein G	Lososová
IDA	Oranžová

^aSDVB = styren divinylbenzen

^bLLD = Low Ligand Density (malé množství navázaných aktivních skupin na stacionární fázi)

^cHLD = High Ligand Density (velká hustota ligandu)

5.3) CIM[®] RP-SDVB monolitický disk [27,28]

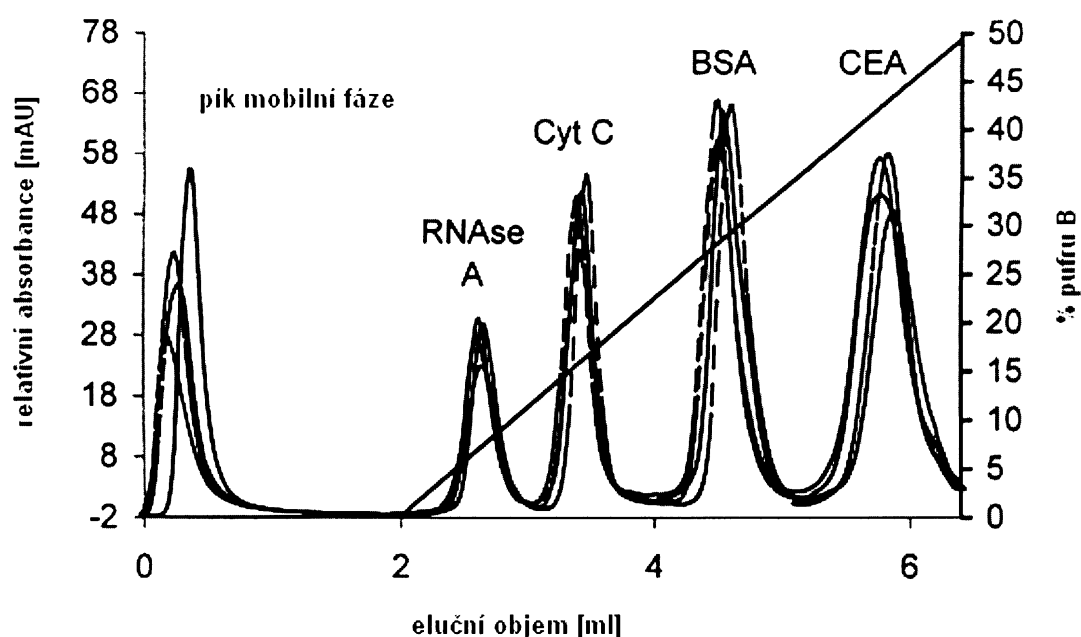
Monolitické nosiče s reverzní fází na základě styren-divinylbenzenu byly poprvé představeny v roce 1993 jako polymer připravený volnou radikálovou polymerací [28].

Materiál CIM[®] RP-SDVB diskové monolitické kolony (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko) je makroporézní styren-*co*-divinylbenzenový (SDVB) polymer. Tvar monolitu RP-SDVB monolitického disku je stejný, jako ve všech CIM[®] diskových monolitických kolonách, založených na jiných chemických interakcích. CIM[®] RP-SDVB monolitická kolona má průměr 12 mm a délku 3 mm, a její schopnosti byly testovány na separaci proteinů, petidů a oligodeoxynukleotidů.

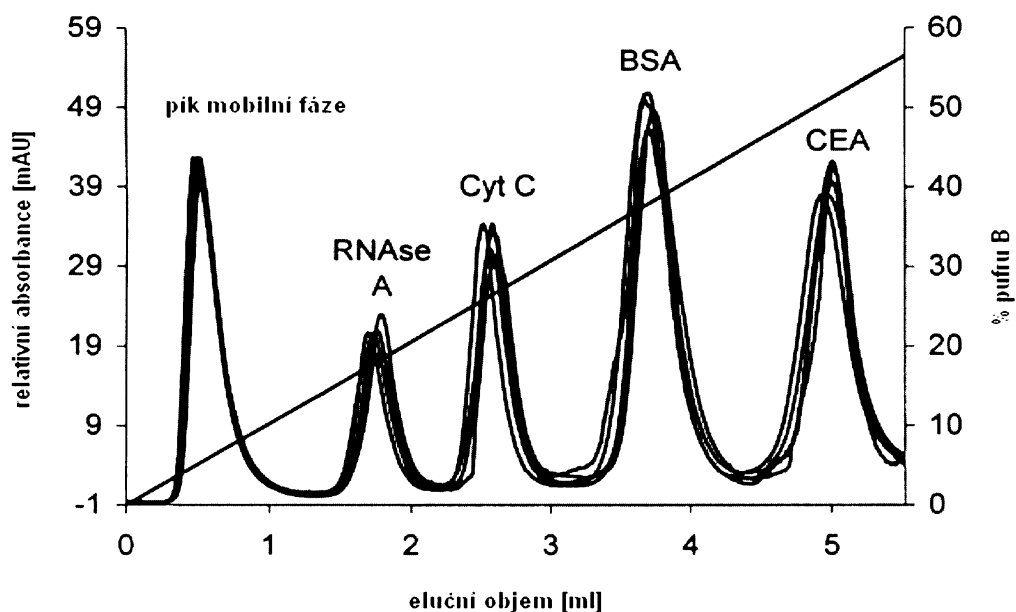
Jedna z výhod těchto monolitických kolon je možnost prodlužování kolony, umístěním jednoho až čtyř disků do jednoho držáku. Délka kolony je pak rovna počtu disků umístěných v držáku. Minimální délka kolony tedy může být 3 mm a maximální délka kolony může být 12 mm. Další výhodou je zkrácení doby analýzy až na sekundy a zvýšení průtokové rychlosti. CIM[®] monolitické kolony vykazují nižší tlak na kolonu.

Jediná zatím publikovaná práce s využitím RP-SDVB disků se zabývá separací proteinů na tomto nosiči a studiem, jak je ovlivněna separace biomolekul, když je do držáku vložen různý počet disků. Byla studována směs 4 proteinů (ribonukleázy A (RNAse A), cytochromu C (Cyt C), hovězího sérového albuminu (BSA) a ovalbuminu (CEA)). Do držáku byly vloženy nejprve 4 poté 3, 2 a na konec 1 disk (*Obr. 11*). Délka kolony se tedy měnila od maximální délky, tedy 12 mm až na 3 mm. Tlak vyvíjený na kolonu (ve 20 % acetonitrilu při průtokové rychlosti 10 ml/min) s rostoucím počtem disků v držáku vzrůstal lineárně. S každým diskem přidaným na kolonu vzrostl tlak přibližně o 3 bar. Také bylo testováno, jak je ovlivněna gradientová separace proteinů při různých průtokových rychlostech mobilní fáze (*Obr. 12*). Eluce byla prováděna lineárním gradientem acetonitrilu (od 20 % acetonitrilu s 0,15 % TFA do 70 % acetonitrilu s 0,15 % TFA).

Ačkoliv mají krátké kolony v gradientové separaci hodně výhod, nemusí být vhodné pro separaci malých molekul, pro které je délka kolony důležitá. Lepší separaci malých molekul můžeme očekávat u kolon s vyšším počtem teoretických pater [27].



Obr. 11: Vliv délky kolony na kvalitu gradientové separace proteinů. Podmínky: Stacionární fáze: RP-SDVB monolitická kolona různé délky (3, 6, 9 a 12 mm); Pufr A 20 v/v% acetonitril + 0,15 % TFA; Pufr B: 70 v/v% acetonitril + 0,15 % TFA; Průtoková rychlost: 10 ml/min; Gradient je vyznačen na obrázku; Detekce: UV při 280 nm; Teplota: pokojová; Aplikovaný objem 20 μ l; Kontrola průtoku: digitální průtokometr (K-3773, Fázové separace, VB); Vzorky 1,5 mg/ml ribonukleasa A (RNase A), 0,5 mg/ml cytochrom C (Cyt C), 2,5 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) a 3,0 mg/ml ovalbuminu (CEA), všechny rozpuštěny ve vysoce čisté vodě [27].



Obr. 12: Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na gradientovou separaci proteinů. Podmínky Stacionární fáze: RP-SDVB monolitická kolona různé délky (3, 6, 9 a 12 mm); Pufr A 20 v/v% acetonitril + 0,15 % TFA; Pufr B: 70 v/v% acetonitril + 0,15 % TFA; Průtoková rychlost: 2, 5, 10, 20, a 30 ml/min; Dále vše stejné jako na (Obr. 11) [27].

6) Statistické vyhodnocení analytických výsledků podle [36]

Výsledky experimentů jsou vždy zatíženy náhodnými chybami a mohou být navíc zatíženy hrubými a systematickými chybami. Vliv hrubých chyb se ve výsledcích projeví jako odlehlé výsledky, které lze vyloučit vhodnými statistickými testy. Systematické nenáhodné chyby, které způsobují odchylky experimentálních hodnot od „správné“ hodnoty v jednom směru (strannost výsledků), lze zjistit pouze tehdy jsou-li k dispozici výsledky jiných metod nebo měření nezatížených systematickou chybou, popřípadě porovnáním se známou „správnou“ hodnotou pomocí statistických testů shodnosti.

Náhodné chyby výsledků se projeví jejich rozdělením čili distribucí. Tímto pojmem rozumíme vztah mezi pravděpodobností zjištění dané hodnoty výsledku na této hodnotě. Převážná část souborů analytických dat má jednovrcholové (unimodální) rozdělení, které by se teoreticky mělo blížit normálnímu (Gaussovu) rozdělení, v praxi se ovšem setkáváme s odchylkami od Gaussova rozdělení. Každé takové jednovrcholové rozdělení výsledků lze popsat dvěma nezávislými parametry: parametrem centroidní tendence (charakterizuje správnost výsledků) a parametrem variability (charakterizuje shodnost analytických výsledků), který vyjadřujeme rozptylem, popřípadě druhou odmocninou rozptylu (tzv. směrodatná odchylka). Tyto úvahy platí zejména pro analyticko-chemická data, kdy se jedná o opakované experimenty (stanovení), prováděné se stejným výchozím materiálem. V případě studia reálných systémů (např. biologického materiálu) je věc navíc komplikována vlastní variabilitou tohoto materiálu (např. u fotosyntetických pigmentů se může projevit vliv zdravotního stavu jednotlivých listů, den jejich sběru atd.). Také tyto vlivy lze považovat za náhodné veličiny a projeví se jako další rozdělení, superponované na rozdělení spojeném s analytickou metodou.

Paralelní analytické výsledky zatížené pouze malými náhodnými chybami (shodné výsledky) a nezatížené systematickou chybou (správné výsledky), označujeme jako přesné. Ojedinelý výsledek v daném souboru analytických dat, který je zatížen hrubou chybou, (odlehlá hodnota) lze vyloučit např. pomocí Deanova-Dixonova testu pro odlehlé výsledky. Postupuje se tak, že se nejprve uspořádají výsledky souboru podle velikosti od nejmenšího k největšímu $x_1 < x_2 < x_3 \dots x_{n-2} < x_{n-1} < x_n$ a vypočítá se variační rozpětí souboru výsledků (R , rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou tohoto souboru)

$$R = x_{\max} - x_{\min} = x_n - x_1$$

Poté se vypočítají kritériální hodnoty Q_l a Q_n pomocí vzorců

$$Q_l = x_2 - x_1 / R \qquad Q_n = x_n - x_{n-1} / R$$

kde $(x_2 - x_1)$ a $(x_n - x_{n-1})$ je rozdíl mezi nejmenším a následujícím výsledkem resp. největším a předcházejícím výsledkem a R je variační rozpětí.

Vypočtené hodnoty Q_l a Q_n se pak porovnají s tabelovanými kritickými hodnotami kritéria Q_k pro daný počet analytických výsledků v souboru (n). Platí-li $Q_l > Q_k$, je nejmenší výsledek x_1 podle Deanova-Dixonova testu odlehlý a lze jej ze souboru vyloučit. Platí-li nerovnost $Q_n > Q_k$, pak je hodnota x_n také odlehlá od ostatních hodnot a je vyloučena ze souboru. Vyhodnocuje se pak pouze soubor analytických výsledků zmenšený o odstraněné odlehlé výsledky.

Pro menší soubory ($n \leq 20$) je výhodnější střední hodnotu souboru analytických výsledků odhadnout pomocí mediánu (x_m). Pro lichý počet výsledků je medián souboru právě roven prostřední hodnotě (po seřazení výsledků podle velikosti). U souboru se sudým počtem výsledků se střední hodnota vypočítá jako aritmetický průměr dvou sousedních prostředních výsledků.

Také směrodatnou odchylku (s) souboru analytických výsledků je vhodné pro menší soubory ($n \leq 20$) odhadnout z rozpětí celého souboru (R). Odhad směrodatné odchylky s souboru výsledků dostaneme, vynásobíme-li rozpětí daného souboru tabelovaným koeficientem k_n , pro daný počet měření n (Tab. 5)

$$s = k_n \cdot R$$

Relativní směrodatná odchylka s_r souboru dat se vypočte jako podíl směrodatné odchylky a střední hodnoty x_m souboru výsledků (resp. jejich odhadů, viz výše).

$$s_r = s/x_m$$

Její velikost se obvykle vyjadřuje v procentech. Míru shodnosti analytických výsledků dvou souborů, získaných za stejných experimentálních podmínek, lze vyjádřit pomocí intervalu spolehlivosti $L_{1,2}$. Je to interval, v němž se hledaný parametr centroidní tendence daného souboru výsledků nachází s jistou pravděpodobností (danou zvoleným koeficientem

spolehlivosti). Při hodnocení souborů výsledků se běžně používá koeficient spolehlivosti 0,95 (říkáme, že výsledky vyhodnocujeme na hladině významnosti 0,05).

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$ souboru analytických výsledků se vypočítá vynásobením rozpětí souboru výsledků koeficientem K_n , tabelovaným pro daný počet měření n a daný koeficient spolehlivosti (0,95)

$$L_{1,2} = K_n \cdot R$$

Parametr centroidní tendence výsledků leží s 95 % pravděpodobností (resp. s pravděpodobností odpovídající danému koeficientu spolehlivosti) v intervalu ohraničeném hodnotou $x_m \pm L_{1,2}$ kolem střední hodnoty analyzovaného souboru dat.

Tab. 5: Hodnoty koeficientů k_n a K_n a kritických hodnot kritérií Q_k pro daný soubor analytických výsledků o počtu n a pro koeficient spolehlivosti 0,95 [36].

n	k_n	K_n	Q_k
2	0,886	6,40	-
3	0,591	1,30	0,941
4	0,486	0,72	0,765
5	0,430	0,51	0,642
6	0,395	0,40	0,560
7	0,370	0,33	0,507
8	0,351	0,29	0,468
9	0,337	0,26	0,437
10	0,325	0,23	0,412

7) Experimentální část

7.1) Materiál [37,38, 40]

Jako zdroj konstantního průtoku mobilní fáze bylo použito izokratické čerpadlo ALPHA 10 firmy ECOM spol. s r.o., Praha. Maximální provozní tlak je 40 MPa, deklarovaná přesnost měření tlaku je $\pm 2\%$. Rychlost průtoku mobilní fáze je 0,01-10 ml/min a přesnost zvoleného průtoku je deklarována jako $\pm 1\%$ [37].

Jako mobilní fáze byl použit methanol v čistotě "pro HPLC" (výrobek firmy Lach-ner, ČR) (výrobce udávané parametry: čistota $>99\%$ v/v; obs.H₂O max. 0,05 %; $d_{20} = 0,791$; $n_d^{20} = 1,328$), který byl odplyňován po dobu 20 minut v ultrazvukové lázni, jinak byl použit bez dalších úprav.

Jako dávkovací zařízení byl použit smyčkový ventil typu C (výrobek firmy ECOM spol s r.o., Praha).

Pro sledování eluce dělených látek byl použit spektrofotometrický detektor Opál UV-VIS (ECOM spol s r.o., Praha) s fixní vlnovou délkou 450 nm. Časová konstanta detekce je 1 s, citlivost detektoru 0,00001 A [38]. Signál z detektoru byl přiváděn na liniový zapisovač (LINE RECORDER TZ 4100, Laboratorní přístroje Praha).

Při kontrole funkce čerpadla byly dále použity váhy AND A & D Instruments LTD (s citlivostí 0,01 g).

Byly použity dva typy chromatografické kolony: a) silikagelem plněná kolona na reverzní fázi s navázanými C18 uhlovodíkovými zbytky dlouhá 15 cm (Laboratorní přístroje Praha) a b) monolitický disk CIM[®] RP-SDVB (BIA Separations d.o.o., Ljubljana, Slovinsko) o průměru 12 mm a délce 3 mm, umístěný v pouzdře dodávaném výrobcem.

K vyhodnocení chromatogramů bylo použito elektronické digitální posuvné měřítko KINEX.

Zdrojem dělených pigmentů byly sušené listy špenátu (*Spinacia oleracea* L.) ze zásob, připravených během února 2007 pro pokročilé praktikum z biochemie. Pro přípravu extraktu bylo použito běžné laboratorní vybavení (třecí miska, zařízení pro filtraci, Erlenmayerova baňka), přesný soupis je uveden v návodech k praktickým cvičením [40].

7.2) Metody

7.2.1) Ověření stability funkce izokratického čerpadla ALPHA 10

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda je práce izokratického čerpadla stabilní a zda jsou výsledné rychlosti průtoku konstantní.

Aparatura se skládala z jednoduchých elektronických vah, odměrného válce (20 ml), parafilmu (na zabránění odpařování mobilní fáze) a stopovacích hodin. Dávkování mobilní fáze bylo zjišťováno u průtokových rychlostí 0,9 ml/min (*Tab. 6*) a 0,5 ml/min (*Tab. 7*). Zároveň byly zaznamenány hodnoty tlaku při průtokových rychlostech 0,9 ml/min (*Tab. 9*) a 0,5 ml/min (*Tab. 10*). Měření byla prováděna pro každou průtokovou rychlost třikrát.

7.2.2) Rozdělení rostlinných barviv na silikagelové koloně C18 a na CIM[®] monolitickém disku typu RP-SDVB

Pro dělení rostlinných barviv byla použita stejná sestava, jako je používána v pokročilém praktiku z biochemie. Pro seznámení s chromatografickou sestavou a pro ověření průběhu separace bylo v první části práce přesně stejného zařízení, jako v praktických cvičeních, tj. silikagelová plněná kolona na reverzní fázi typu (C18), s izokratickou elucí methanolem. Dělenou směsí byl methanolicý extrakt, připravený rozmělněním 0,5 g sušeného špenátu v třecí misce a extrakcí 50 ml methanolu po dobu 10 minut za občasného promíchání. Z extraktu byly nejprve odstraněny hrubé nečistoty filtrací přes skládaný papírový filtr a filtrát byl převeden do Erlenmayerovy baňky se zábrusem. Baňka zabalená v alobalu byla skladována po celou práci v chladničce, aby byl extrakt dostatečně chráněn před světlem, protože se chlorofyl na světle rozkládá. Před injekcí do chromatografické sestavy byl extrakt ještě filtrován přes mikrofiltr (0,22 μm) přímo do injekční stříkačky, používané pro injekci do dávkovače.

Náplňová kolona byla v dalším experimentu nahrazena CIM[®] monolitickým diskem (1 disk typu RP-SDVB). Pro dělení na CIM[®] monolitické koloně jsme použili stejný vzorek extraktu ze sušeného špenátu, jako při separaci na silikagelové (C18) plněné koloně, aby byla zajištěna srovnatelnost výsledků.

Chromatogramy byly vyhodnocovány manuálně ze záznamů zapisovače. Měřením posuvným měřítkem byly zjištěny hodnoty elučních časů (jako vzdálenost od startu záznamu, dělená rychlostí posuvu papíru) a parametry jednotlivých chromatografických píků (výška,

šířka v polovině výšky, šířka extrapolovaného píku při základně).

7.3) Statistické vyhodnocení

Byly vyhodnoceny střední hodnoty souborů (x_m) objemů průtokových rychlostí, tlaků a retenčních časů jednotlivých píků. Dále byly vyhodnoceny relativní směrodatné odchylky (s_r), variační rozpětí (R) a kritériální hodnoty (Q_l , Q_n).

8) Výsledky a diskuze

8.1) Stabilita funkce izokratického čerpadla ALPHA 10

Aparatura byla sestavena stejně jako při separaci pigmentů v pokročilém praktiku z biochemie, eluát za kolonou a dektorem byl jímán a vážen. Čerpadlo v tomto experimentu dávkovalo mobilní fázi proti tlaku.

Hodnoty hmotnosti dávkované mobilní fáze v deseti po sobě následujících minutových intervalech a přepočtené hodnoty objemu pro průtokové rychlosti 0,9 ml/min a 0,5 ml/min jsou uvedeny v (Tab. 6 a 7).

Porovnáním experimentálně získaných hodnot s deklarovanou hodnotou se ukazuje, že pro měření 1 a 2 je shoda dosti dobrá, měření 3 se výrazněji liší (toto měření bylo prováděno v jiný den než měření 1 a 2).

Při vysvětlení těchto rozdílů je možné uvažovat o tom, že v čerpadle byly i přes provedené odplyňování ještě přítomné bubliny vzduchu. Je třeba zdůraznit, že experiment byl uskutečněn až po stabilizování celého systému (systém byl ponechán před zahájením po dobu nejméně 30 minut v chodu). Dalším možným vysvětlením rozdílů by mohlo být, že docházelo ke zvýšenému odparu mobilní fáze. Nicméně jímací nádoba byla přikryta parafilmem, který měl bránit tomuto odparu. Dalším vysvětlením by mohly být případné netěsnosti na spojení kolony s příváděcí trubičkou na mobilní fázi, ale spoje byly vizuálně prohlédnuty a žádné netěsnosti ani úniky mobilní fáze nebyly nalezeny. Posledním možným vysvětlením by mohlo být ovlivnění činnosti čerpadla nestabilitou elektrické sítě (kolísání frekvence sítě). O tom zda a jak se může tento vlivy uplatňovat, nelze na základě stručného popisu funkce přístroje v návodu rozhodnout, návod neobsahuje téměř žádné údaje o konstrukci obvodů přístroje [37].

Objem dávkované mobilní fáze při nastavených průtokových rychlostech 0,9 ml/min a 0,5 ml/min kolísá, ale přesnost nastaveného objemu se pohybuje kolem výrobcem deklarované hodnoty $\pm 1\%$ nebo je jen o málo horší. Měření 3 je sice přesnější, ale výsledky nejsou správné vzhledem ke zvolené průtokové rychlosti.

Také musíme brát v úvahu možné chyby při zaznamenávání hmotností mobilní fáze navíc, protože byly použity váhy s relativně nízkou citlivostí, nelze stanovit přírůstek hmotnosti s přesností větší než cca 1% (pro průtokovou rychlost 0,9 ml/min) resp. 2% (pro 0,5 ml/min). Ideální by bylo použít váhy s elektronickým výstupem, které by zaznamenávaly hmotnost mobilní fáze kontinuálně.

Tab. 6: Hodnoty objemu mobilní fáze měřené v minutových intervalech po dobu 10 minut při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,9 ml/min.

Měření 1	<i>t</i> [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>m</i> [g]	0,71	0,71	0,70	0,71	0,67	0,70	0,69	0,72	0,71	0,70
	<i>V</i> [ml]	0,90	0,90	0,88	0,90	0,85	0,88	0,87	0,91	0,90	0,88
Měření 2	<i>t</i> [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>m</i> [g]	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,70	0,71	0,70	0,71	0,71
	<i>V</i> [ml]	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,88	0,90	0,88	0,90	0,90
Měření 3	<i>t</i> [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>m</i> [g]	0,65	0,64	0,64	0,64	0,65	0,65	0,65	0,65	0,64	0,65
	<i>V</i> [ml]	0,82	0,81	0,81	0,81	0,82	0,82	0,82	0,82	0,81	0,82

Tab. 6a: Statistické vyhodnocení výsledků objemu mobilní fáze dávkovaného při průtokové rychlosti 0,9 ml/min.

	x_m [ml]	s	s_r [%]	R	Q_l	Q_n	$L_{1,2}$
Měření 1	0,89	$19,5 \cdot 10^{-3}$	2,2	0,06	0,34	0,17	0,014
Měření 2	0,90	$6,5 \cdot 10^{-3}$	0,7	0,02	0	0	0,005
Měření 3	0,82	$3,3 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,01	0	0	0,002

x_m – medián souboru výsledků, s – odhad směrodatné odchylky na základě rozpětí, viz kap. 6, s_r – relativní směrodatná odchylka, R – variační rozpětí souboru, Q_l a Q_n – kritériální hodnoty pro daný soubor, $L_{1,2}$ – interval spolehlivosti

Tab. 7: Hodnoty objemu mobilní fáze měřené v minutových intervalech po dobu 10 minut při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 ml/min. Měření proběhlo třikrát.

Měření 1	<i>t</i> [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>m</i> [g]	0,40	0,37	0,38	0,40	0,39	0,40	0,40	0,40	0,38	0,40
	<i>V</i> [ml]	0,51	0,47	0,48	0,51	0,49	0,51	0,51	0,51	0,48	0,51
Měření 2	<i>t</i> [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>m</i> [g]	0,39	0,40	0,40	0,35	0,39	0,41	0,39	0,40	0,41	0,37
	<i>V</i> [ml]	0,49	0,51	0,51	0,44	0,49	0,52	0,49	0,51	0,52	0,47
Měření 3	<i>t</i> [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>m</i> [g]	0,36	0,35	0,36	0,35	0,35	0,34	0,34	0,33	0,37	0,34
	<i>V</i> [ml]	0,46	0,44	0,46	0,44	0,44	0,43	0,43	0,42	0,47	0,43

Tab. 7a: Statistické vyhodnocení měření objemu mobilní fáze dávkovaného při průtokové rychlosti 0,5 ml/min.

	x_m [ml]	s	s_r [%]	R	Q_l	Q_n	$L_{1,2}$
Měření 1	0,50	$13,0 \cdot 10^{-3}$	2,6	0,04	0,25	0	0,009
Měření 2	0,49	$26,0 \cdot 10^{-3}$	5,3	0,08	0,38	0	0,018
Měření 3	0,44	$16,3 \cdot 10^{-3}$	3,7	0,05	0,20	0,20	0,012

Účelem dalšího pokusu bylo zjištění, jak je ovlivněna práce čerpadla a výsledné průtokové rychlosti, tím že čerpadlo pracuje v HPLC sestavě proti tlaku.

Proto byla ze systému odstraněna kolona a byly zaznamenávány hmotnosti dávkované mobilní fáze, které byly přepočítány na objem (Tab. 8). Izokratické čerpadlo tedy pracovalo proti nulovému tlaku. Toto měření bylo prováděno také proto, že s ohledem na vlastnosti monolitických kolon, je tlak předpokládán při separaci na těchto kolonách velmi malý.

Bylo zjištěno, že při práci čerpadla proti nulovému tlaku a při průtokové rychlosti 0,9 ml/min jsou hodnoty objemu dávkované mobilní fáze v průměru o 0,02 ml větší, než při práci čerpadla proti tlaku o průměrné hodnotě 3,7 MPa (Tab. 9). Tlačí-li čerpadlo mobilní fázi proti tlaku, tzn., že je systém spojen s kolonou, dochází zřejmě k malým únikům mobilní fáze kolem pístu čerpadla a objem dávkované mobilní fáze je tak menší. V případě práce čerpadla proti nulovému tlaku nedochází zřejmě k žádným ztrátám mobilní fáze okolo pístu čerpadla. Také tím, že byla odstraněna kolona ze systému, mohlo také dojít k vyloučení případných netěsností na spojení kolony s příváděcí trubičkou pro mobilní fázi.

Závěrem lze říci, že v této sestavě nebyly shledány při práci čerpadla žádné větší nesrovnalosti, čerpadlo pracuje v zásadě s přesností, jakou uvádí výrobce (viz kap.7.1) [37].

Tab. 8: Hodnoty objemu mobilní fáze při průtokové rychlosti 0,9 ml/min. Čerpadlo pracovalo proti nulovému tlaku. Měření proběhlo jedenkrát.

	t [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Měření 1	m [g]	0,72	0,71	0,72	0,71	0,73	0,71	0,71	0,72	0,73	0,70
	V [ml]	0,91	0,90	0,91	0,90	0,92	0,90	0,90	0,91	0,92	0,88

Tab. 8a: Statistické vyhodnocení výsledků objemu mobilní fáze dávkovaného při průtokové rychlosti 0,9 ml/min a práci čerpadla proti nulovému tlaku.

	x_m [ml]	s	s_r [%]	R	Q_l	Q_n	$L_{1,2}$
Měření 1	0,91	$13,0 \cdot 10^{-3}$	1,4	0,04	0,50	0	0,009

V průběhu těchto měření byly také zaznamenávány změny tlaku na koloně. Při průtokové rychlosti 0,9 ml/min je tlak na kolonu vyšší a také více kolísá, než u průtokové rychlosti nižší (Tab. 9) a (Tab. 10). Jedná se o změnu v rádech desetin MPa. Z toho vyplývá, že ani tato změna tlaku na koloně není příliš vysoká. V Tab. 9a a 10a je možno vidět, že relativní směrodatná odchylka se s klesající průtokovou rychlostí snižuje. Maximální odchylka tlaku

je přibližně 4,5 %. Je otázkou, nakolik je tento rozptyl hodnot dán skutečným kolísáním tlaku na výstupu čerpadla, a nakolik jde o nepřesnost tlakového senzoru přístroje.

Tab. 9: Hodnoty tlaku zaznamenávané při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,9 ml/min. Čerpadlo pracovalo proti tomuto tlaku. Měření proběhlo dvakrát.

Měření 1	t [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	p [Mpa]	3,7	3,6	4	3,7	3,8	3,7	3,6	3,7	3,5	3,9
Měření 2	t [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	p [Mpa]	3,5	3,4	3,8	3,7	3,8	3,6	3,8	3,5	3,9	3,6

Tab. 9a: Statistické vyhodnocení tlaku na koloně měřené při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,9 ml/min.

	x_m [MPa]	s	s_r [%]	R	Q_l	Q_n	$L_{1,2}$
Měření 1	3,7	$162 \cdot 10^{-3}$	4,4	0,50	0,20	0,20	0,115
Měření 2	3,7	$162 \cdot 10^{-3}$	4,4	0,50	0,20	0,20	0,115

Tab. 10: Hodnoty tlaku zaznamenávané při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 ml/min. Čerpadlo pracovalo proti tomuto tlaku. Měření proběhlo dvakrát.

Měření 1	t [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	p [Mpa]	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Měření 2	t [min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	p [Mpa]	1,7	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7

Tab. 10a: Statistické vyhodnocení tlaku na koloně měřené při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 ml/min.

	x_m [MPa]	s	s_r [%]	R	Q_l	Q_n	$L_{1,2}$
Měření 1	1,7	$32,5 \cdot 10^{-3}$	1,9	0,10	0	0	0,023
Měření 2	1,7	$32,5 \cdot 10^{-3}$	1,9	0,10	0	0	0,023

8.2) Rozdělení rostlinných barviv na silikagelové koloně C18 a na CIM[®] monolitickém disku typu RP-SDVB

Separace byla prováděna při každé průtokové rychlosti třikrát. Bylo použito průtokových rychlostí 0,9; 0,5 a 0,3 ml/min. Signál z detektoru byl přiváděn na zapisovač a zaznamenané chromatogramy byly vyhodnoceny. Ke změření vzdáleností na jednotlivých chromatografických záznamech bylo použito elektronické digitální posuvné měřítko. Výsledky vyhodnocení jsou uvedeny v *Tab. 11-13*. Jednotlivé pigmenty nelze s určitostí přiřadit jednotlivým píkům, protože nejsou k dispozici vhodné standardy. Proto byly k jednotlivým píkům přiděleny názvy podle návodů pro pokročilá praktika [40]. Pravděpodobně se jedná o (postupujeme od nejhydrofilnější frakce) neoxantin (A), violaxantin (B), anteroxantin (C), lutein (D), chlorofyl *b* (E), chlorofyl *a* (F) a beta-karoten. Píky jsou z důvodu zjednodušení v tabulkách označovány velkými písmeny A-F, v pořadí v jakém jsou eluovány.

Pík posledního eluovaného pigmentu (beta-karoten) nebyl hodnocen. Vzhledem k elučnímu čas karotenu, který je v podmínkách izokratické eluce methanolem velmi dlouhý (tento pigment má nejhydrofobnější charakter), a pro jeho nízké zastoupení v zelených rostlinách byl jeho pík velmi malý. Jeho vyhodnocení by bylo velice obtížné bez změny nastavení zapisovače, taková změna ovšem vnáší další nepřesnosti do stanovení parametrů píku.

Další píky, které byly eluovány byly malé, nevýrazné a nedostatečně oddělené. Odpovídaly zřejmě neidentifikovaným minoritním komponentům extraktu. Tyto píky také nebyly vyhodnocovány, protože by to bylo pro jejich charakter velice obtížné.

Hodnoty elučních objemů, parametry jednotlivých píků a odpovídající vypočtené hodnoty počtu teoretických pater, resp. výškového ekvivalentu teoretického patra, jsou shrnuty pro všechny tři zkoumané průtokové rychlosti v *Tab. 11-13*.

Přehled symbolů použitých v tabulkách 11 až 13:

t_R – retenční čas, t'_R – redukováný retenční čas, V_R – retenční objem, V'_R – redukováný retenční objem, h – výška píku, w – šířka píku při základně, $w_{1/2}$ – šířka píku v polovině jeho výšky, n – počet teoretických pater, H – výškový ekvivalent teoretického patra (podrobný popis je v kap. 1.2-1.3).

Tab. 11a): Vyhodnocení chromatografických píků extraktu ze sušeného špenátu v methanolu. Kolona: silikagelová C18 dlouhá 15 cm; Podmínky; průtoková rychlost 0,9 ml/min; citlivost 0,2 V; posun papíru 1 mm/s.

Měření	pík	t_R [cm]	t_R [min]	t'_R [cm]	t'_R [min]	V_R [ml]	V'_R [ml]	h [cm]	w [cm]	w [min]	$w_{1/2}$ [cm]	n	H
1	A	7,36	1,23	1,87	0,31	1,10	0,28	7,80	1,85	0,31	0,62	778	0,019
2	A	7,34	1,22	2,04	0,34	1,10	0,31	7,60	1,62	0,27	0,63	751	0,02
3	A	7,36	1,23	2,02	0,34	1,10	0,30	7,49	1,65	0,28	0,63	750	0,02
1	B	8,53	1,42	3,05	0,51	1,28	0,46	0,65	1,41	0,24	0,50	1588	0,009
2	B	8,51	1,42	3,21	0,53	1,28	0,48	0,63	1,09	0,18	0,55	1321	0,011
3	B	8,56	1,43	3,21	0,54	1,28	0,48	0,60	1,08	0,18	0,63	1036	0,014
1	C	11,90	1,98	6,41	1,07	1,79	0,96	16,02	3,18	0,53	0,89	1002	0,015
2	C	11,81	1,97	6,51	1,09	1,77	0,98	15,70	2,80	0,30	0,91	926	0,016
3	C	11,87	1,98	6,52	1,09	1,78	0,98	15,50	2,74	0,46	0,90	970	0,015
1	D	15,82	2,64	10,33	1,72	2,37	1,55	3,91	3,20	0,53	1,12	1098	0,014
2	D	15,75	2,63	10,45	1,74	2,36	1,57	3,40	2,55	0,43	1,04	1281	0,012
3	D	15,79	2,63	10,45	1,74	2,37	1,57	4,01	2,69	0,45	1,15	1053	0,014
1	E	19,08	3,18	13,60	2,27	2,86	2,04	9,34	3,46	0,58	1,31	1180	0,013
2	E	18,95	3,16	13,65	2,28	2,84	2,05	9,26	2,98	0,50	1,28	1211	0,012
3	E	18,97	3,16	13,63	2,27	2,85	2,05	9,43	3,15	0,52	1,30	1190	0,013
1	F	30,51	5,09	25,02	4,17	4,58	3,75	0,66	2,59	0,43	1,59	2044	0,007
2	F	30,28	5,05	25,09	4,18	4,54	3,75	0,98	3,93	0,66	1,98	1292	0,012
3	F	30,30	5,05	24,96	4,16	4,54	3,74	1,01	4,79	0,80	2,11	1147	0,013

Tab. 11b): Mrtvý čas a mrtvý objem kolony. Podmínky: průtoková rychlost 0,9 ml/min; citlivost 0,2 V; posun papíru 1 mm/s.

Měření	t_M [cm]	t_M [min]	V_M [ml]
1	5,49	0,91	0,82
2	5,30	0,88	0,80
3	5,34	0,89	0,80

Tab. 11c): Statistické vyhodnocení retenčních časů pro piky A až F a průtokovou rychlost 0,9 ml/min

	x_m [min]	s	s_r [%]	R	Q_1	Q_n	$L_{1,2}$
t_M	0,89	$18,3 \cdot 10^{-3}$	2,1	0,03	0,23	0,77	0,040
Pík A	1,23	$1,8 \cdot 10^{-3}$	1,4	0,00	0,67	0,33	0,004
Pík B	1,42	$4,7 \cdot 10^{-3}$	0,3	0,01	0,50	0,50	0,010
Pík C	1,98	$8,3 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,01	0,64	0,36	0,018
Pík D	2,63	$6,5 \cdot 10^{-3}$	0,3	0,01	0,64	0,36	0,014
Pík E	3,16	$13,6 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,02	0,17	0,83	0,030
Pík F	0,51	$23,0 \cdot 10^{-3}$	0,5	0,04	0,08	0,92	0,051

Rozdělení rostlinných barviv na C18 silikagelové plněné koloně proběhlo standardním způsobem, jako při práci v praktiku.

Při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,9 ml/min byla doba analýzy přibližně 6 minut, při průtokové rychlosti 0,5 ml/min trvala analýza přibližně deset minut a při průtokové rychlosti 0,3 ml/min se doba analýzy prodloužila přibližně na 18 minut.

Při porovnávání retenčních časů z jednotlivých měření při stejné průtokové rychlosti jsme zjistili, že se příliš neliší. Relativní směrodatné odchylky retenčních časů byly malé a ve většině případech nepřekročily hodnotu 1,5 %. (tato chyba je srovnatelná s relativní chybou průtokových rychlostí, viz kap. 7.1).

Pro výpočet počtu teoretických pater bylo použito vztahu (1.7.1), s využitím šířky pásu v polovině výšky. Alternativně byly spočteny rovněž hodnoty, založené na šířce v základně extrapolovaného píku, ale tyto hodnoty se velmi lišily mezi jednotlivými měřeními. Příčinou je nepřesnost při odečtu této šířky (je výrazněji ovlivněna jak určitou nejasností v definici základní linie, tak asymetrií některých elučních vrcholů, která se při základně již výrazně projevuje).

Tab. 12a): *Vyhodnocení chromatografických píků extraktu ze sušeného špenátu v methanolu. Kolona: silikagelová C18 dlouhá 15 cm; Podmínky; průtoková rychlost 0,5 ml/min; citlivost 0,2 V; posun papíru 1 mm/s.*

Měření	pík	t_R [cm]	t_R [min]	t'_R [cm]	t'_R [min]	V_R [ml]	V'_R [ml]	h [cm]	w [cm]	w [min]	$w_{1/2}$ [cm]	n	H
1	A	13,31	2,22	3,61	0,60	1,11	0,30	8,16	2,84	0,47	1,10	812	0,018
2	A	13,31	2,22	3,47	0,58	1,11	0,29	9,46	2,65	0,44	1,00	987	0,015
3	A	12,97	2,16	3,43	0,57	1,08	0,29	6,85	2,72	0,45	1,19	658	0,023
1	B	15,48	2,58	5,78	0,96	1,29	0,48	0,89	1,80	0,30	0,99	1358	0,011
2	B	15,43	2,57	5,58	0,93	1,29	0,47	0,95	1,70	0,28	0,91	1587	0,009
3	B	15,02	2,50	5,49	0,91	1,25	0,46	0,78	1,67	0,28	0,90	1535	0,010
1	C	21,48	3,58	11,78	1,96	1,79	0,98	18,02	3,99	0,67	1,29	1543	0,010
2	C	21,41	3,57	11,56	1,93	1,78	0,96	19,90	3,55	0,59	1,31	1490	0,010
3	C	21,34	3,56	11,80	1,97	1,78	0,98	15,80	3,45	0,57	1,28	1544	0,010
1	D	28,67	4,78	18,97	3,16	2,39	1,58	4,81	4,52	0,75	1,77	1452	0,010
2	D	28,55	4,76	18,71	3,12	2,38	1,56	5,02	4,10	0,68	1,79	1414	0,011
3	D	28,25	4,71	18,72	3,12	2,35	1,56	4,82	4,22	0,70	1,80	1372	0,011
1	E	34,45	5,74	24,75	4,13	2,87	2,06	11,64	5,18	0,86	1,91	1808	0,008
2	E	34,26	5,71	24,42	4,07	2,86	2,03	11,71	4,67	0,78	1,90	1811	0,008
3	E	34,12	5,69	24,58	4,10	2,84	2,05	11,44	4,73	0,79	1,91	1779	0,008
1	F	54,62	9,10	44,93	7,49	4,55	3,74	1,17	6,46	1,08	3,16	1660	0,009
2	F	54,36	8,91	44,51	7,42	4,46	3,63	1,19	6,55	1,09	2,99	1838	0,008
3	F	54,20	9,03	44,67	7,44	4,52	3,72	1,15	6,52	1,09	3,07	1733	0,009

Tab. 12b): Mrtvý čas a mrtvý objem kolony. Podmínky: průtoková rychlost 0,5 ml/min; citlivost 0,2 V; posun papíru 1 mm/s.

Měření	t_M [cm]	t_M [min]	V_M [ml]
1	9,70	1,62	0,81
2	9,85	1,64	0,82
3	9,54	1,59	0,80

Tab. 12c): Statistické vyhodnocení retenčních časů pro píky A až F a průtokovou rychlost 0,5 ml/min

	x_m [min]	s	s_r [%]	R	Q_1	Q_n	$L_{1,2}$
t_M	1,62	$30,7 \cdot 10^{-3}$	1,9	0,05	0,54	0,46	0,068
Pík A	2,22	$33,6 \cdot 10^{-3}$	1,5	0,06	1,00	0,00	0,074
Pík B	2,57	$44,3 \cdot 10^{-3}$	1,7	0,08	0,89	0,11	0,098
Pík C	3,57	$14,2 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,02	0,46	0,54	0,031
Pík D	4,76	$41,3 \cdot 10^{-3}$	0,9	0,07	0,73	0,27	0,091
Pík E	5,71	$33,1 \cdot 10^{-3}$	0,6	0,06	0,43	0,57	0,073
Pík F	9,03	$115 \cdot 10^{-3}$	1,3	0,20	0,64	0,36	0,254

Tab. 13a): Vyhodnocení chromatografických piků extraktu ze sušeného špenátu v methanolu. Kolona: silikagelová C18 dlouhá 15 cm; Podmínky: průtoková rychlost 0,3 ml/min; citlivost 0,2 V; posun papíru 1mm/s.

Měření	pík	t_R [cm]	t_R [min]	t'_R [cm]	t'_R [min]	V_R [ml]	V'_R [ml]	h [cm]	w [cm]	w [min]	$w_{1/2}$ [cm]	n	H
1	A	22,30	3,72	5,72	0,95	1,12	0,29	9,88	4,46	0,74	1,57	1117	0,013
2	A	22,20	3,70	5,72	0,95	1,11	0,29	8,53	4,59	0,77	1,76	881	0,017
3	A	22,35	3,72	5,92	0,99	1,12	0,30	10,18	4,51	0,75	1,54	1163	0,013
1	B	25,83	4,30	9,24	1,54	1,29	0,46	1,12	2,85	0,47	1,60	1447	0,010
2	B	25,77	4,30	9,29	1,55	1,29	0,47	1,09	2,79	0,47	1,53	1575	0,010
3	B	25,94	4,32	9,51	1,59	1,30	0,48	1,08	3,03	0,51	1,71	1281	0,012
1	C	35,96	5,99	19,38	3,23	1,80	0,97	22,37	5,59	0,93	1,92	1943	0,008
2	C	35,84	5,97	19,36	3,23	1,79	0,97	20,48	5,28	0,88	1,94	1888	0,008
3	C	36,17	6,03	19,74	3,29	1,81	0,99	22,19	5,64	0,94	2,03	1768	0,008
1	D	48,00	8,00	31,42	5,24	2,40	1,57	5,84	6,90	1,15	2,75	1689	0,009
2	D	47,94	7,99	31,46	5,24	2,40	1,57	5,75	6,41	1,07	2,72	1726	0,009
3	D	48,23	8,04	31,80	5,30	2,41	1,59	5,80	6,62	1,10	2,76	1693	0,009
1	E	57,64	9,61	41,06	6,84	2,88	2,05	13,74	7,17	1,20	2,83	2295	0,007
2	E	57,56	9,59	41,08	6,85	2,88	2,05	13,56	6,87	1,15	2,79	2362	0,006
3	E	58,07	9,68	41,64	6,94	2,90	2,08	13,12	7,18	1,20	2,84	2316	0,006
1	F	92,22	15,37	75,64	12,61	4,61	3,78	1,27	7,74	1,29	4,18	2696	0,006
2	F	91,87	15,31	75,39	12,57	4,59	3,77	1,26	7,67	1,28	3,99	2947	0,005
3	F	93,24	15,54	76,81	12,80	4,66	3,84	1,22	7,79	1,30	4,19	2750	0,005

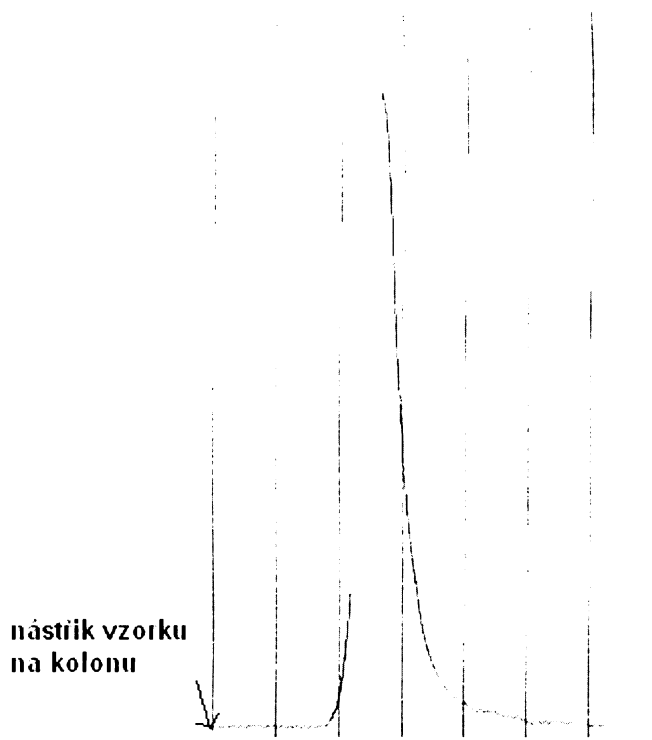
Tab. 13b): *Mrtvý čas a mrtvý objem kolony. Podmínky: průtoková rychlost 0,3 ml/min; citlivost 0,2 V; posun papíru 1 mm/s.*

Měření	t_M [cm]	t_M [min]	V_M [ml]
1	16,58	2,76	0,83
2	16,48	2,75	0,82
3	16,43	2,74	0,82

Tab. 13c): *Statistické vyhodnocení retenčních časů pro píky A až F a průtokovou rychlost 0,3 ml/min*

	x_m [min]	s	s_r [%]	R	Q_1	Q_n	$L_{1,2}$
t_M	2,75	$14,8 \cdot 10^{-3}$	0,5	0,03	0,36	0,64	0,033
Pík A	3,72	$14,8 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,03	0,68	0,32	0,033
Pík B	4,30	$17,1 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,03	0,31	0,69	0,038
Pík C	5,99	$33,7 \cdot 10^{-3}$	0,6	0,06	0,39	0,61	0,074
Pík D	8,00	$29,6 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,05	0,22	0,78	0,065
Pík E	9,61	$50,2 \cdot 10^{-3}$	0,5	0,09	0,15	0,85	0,110
Pík F	15,4	$134 \cdot 10^{-3}$	0,9	0,23	0,25	0,75	0,295

Po nahrazení silikagelové kolony monolitickým CIM[®] diskem byla nastavena průtoková rychlost mobilní fáze na 4 ml/min. Protože bylo očekáváno, že separace rostlinných barviv na CIM[®] monolitickém disku proběhne velice rychle, byla nastavena vysoká rychlost posunu papíru (1 mm/s), a nízká citlivost zapisovače (0,1 V přes celou stupnici). Protože v návodu na použití CIM[®] disků byla doporučena průtoková rychlost až 10 ml/min, zvolili jsme pro první pokus hodnotu menší než je polovina hodnoty maximální (4 ml/min). Při průtoku mobilní fáze touto kolonou a při této průtokové rychlosti byl tlak na koloně CIM[®] tak malý, že čerpadlo ukazovalo nulovou hodnotu tlaku (tzn., že tlak byl menší než 0,1 MPa). Aby byly z kolony odstraněny zbytky konzervačního média (ethanol), byla nejprve důkladně promyta mobilní fází. Poté jsme nadávkovali extrakt do smyčky a začali se separací. Výsledný signál byl nerozlišený, veškerá absorbance byla soustředěna do jediného píku, který byl eluován v době do jedné minuty po aplikaci (Obr. 13). Měření jsme opakovali ještě jednou za stejných podmínek, ale výsledek byl prakticky stejný (pík záznamu byl o cca 5% větší). Průtoková rychlost byla tedy snížena na 1 ml/min, ale ani pak nedošlo k rozdělení extraktu na disku.



Obr. 13: *Pík v němž jsou vymyty všechny složky extraktu ze sušeného špenátu najednou. Použití CIM[®] disku typu RP-SDVB. Podmínky: mobilní fáze MeOH, průtoková rychlost 4 ml/min, rychlost papíru 1 mm/s, citlivost 0,1 V, tlak na koloně 0 MPa.*

Na CIM[®] RP-SDVB monolitické koloně tedy nedošlo k žádnému rozdělení rostlinných fotosyntetických barviv. Všechny složky v extraktu byly vymyty do jednoho píku. Na chromatografickém záznamu nebylo možné zjistit ani čelo kolony, určit mrtvý objem kolony ani provést další vyhodnocení vlastností použité kolony.

Důvodem, proč byly všechny analyty vymyty najednou v jednom píku je pravděpodobně malá hydrofobicita daného monolitického disku pro naše účely. Tyto disky byly dříve testovány pouze pro separaci ve vodě rozpustných proteinů, peptidů a oligonukleotidů [28]. Data o separaci malých molekul (srovnatelných s pigmenty fotosyntetického systému) nejsou v literatuře ani ve firemních prospektech k dispozici. Nicméně je zřejmé, že ve vodě nerozpustné molekuly fotosyntetických pigmentů (chlorofyly, karoten) jsou výrazně hydrofobnější než proteiny či peptidy. Ačkoliv je kolona označena stejně jako modifikovaný silikagel, tedy reverzní fáze C18, charakteristiky tohoto monolitického disku jsou zjevně úplně jiné, než silikagelové kolony C18 používané pro praktikum.

9) Závěr

Získané výsledky ukazují, že není možné použít CIM[®] disk pro srovnání separačních vlastností tak, jak bylo původním záměrem této bakalářské práce. Směs dělená v praktiku (extrakt pigmentů) se na disku CIM[®] vůbec nedělí. Případné použití hydrofilnější mobilní fáze (např. směsi methanol/voda) není dost dobře možné, vzhledem ke značné hydrofobnosti pigmentů a k jejich nízké rozpustnosti v polárních rozpouštědlech. Proto bylo také upuštěno od pokusu o podobnou modifikaci separačního postupu s ohledem na obavy o možné zalepení CIM disku.

V nabídce disků CIM[®] není k dispozici jiná hydrofobní fáze, proto jejich použití k výše uvedenému přímému srovnání se silikagelovou kolonou v úloze pro praktikum nepřichází v úvahu. Naopak dělení proteinů na reverzní fázi nelze provést na C18 silikagelové koloně používané v praktiku. Není pravděpodobné, že by se podařilo najít takový systém, aby bylo možné jej separovat za obdobných podmínek (složení mobilní fáze) na používané HPLC sestavě a také s použitím CIM[®] monolitického disku.

Jako vhodnější se tedy jeví uvažovat o dvou samostatných úlohách pro praktická cvičení.

Reference:

- (1) Churáček, J.; Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. SNTL 1985.
- (2) Martin, A.J.P.; Synge, R.L.M.: A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem. J.* 35, 1388-1368 (1941).
- (3) Pacáková, V.; Štulík, K.: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. SPN Praha, 1986.
- (4) Kadoš, E.; Berek, D.: Základy kvapalinovej chromatografi. Alfa, Bratislava 1979.
- (5) Zukal, A.: Moderní trendy syntézy nanoporézních materiálů. *Chem. Listy* 101;208-216 (2007).
- (6) Klusoň, P.; Drobek, M.; Bartková, H.; Budil, I.: Vítejte v „nanosvětě“. *Chem. Listy* 101,262-272 (2007).
- (7) Sýkora, D.; Tesařová, E.; Vosmanská, M.; Volánková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chem. Listy* 101,190-199 (2007).
- (8) Majors, R.E.: A Review of HPLC Column Packing Technology. *American Laboratory*, 46-54, October 2003.
- (9) Monaghan, B.: All C18's are equal-but some are more equal than others. *International Labmate, Chromatography & Spectroscopy*, 4-5, April 2007.
- (10) Švec, F.: Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chem. Listy* 98, 232-238 (2004).
- (11) Lubda, D.; Cabrera, K.; Kraas, W.; Schaefer, Ch.; Cunningham, D.: New Developments in the Application of Monolithic HPLC Columns. *LCGC* 19, 1186-1191, (2001).
- (12) Barut, M.; Podgornik, A.; Brne, P.; Štrancar, A.: Convective Interaction Media short monolithic columns: Enabling chromatographic supports for the separation and purification of large biomolecules. *J. Sep. Sci.* 28, 1876-1892, (2005).
- (13) Miyabe, K.; Guiochon, G.: Characterization of monolithic columns for HPLC. *J. Sep. Sci.* 27, 853-873, (2004).
- (14) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tahala, N.: Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 68, 3498-3501, (1996).
- (15) Minakuchi, H.; Ishizuka, N.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Tanaka, N.: Performance of an octadecylsilylated continuous porous silica column in polypeptide separations. *J. Chromatogr. A* 828, 83-90, (1998).

- (16) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N.; Effect of skeleton size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 762, 135-146, (1997).
- (17) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N.: Effect of domain size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed- phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 797, 121-131, (1998).
- (18) Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Nagayama, H.; Hosoya, K.; Tanaka, N.: Performance of a Monolithic Silica Column in a Capillary under Pressure-Driven and Electrodriven Conditions. *Anal. Chem.* 72,1275-1280, (2000).
- (19) Cabrera, K.: Applications of silica- based monolithic HPLC columns. *J. Sep. Sci* 27,843-852, (2004).
- (20) Fields, S.M.: Silica Xerogel as a Continuous Column Support for High-Performance Liquid Chromatography. *Anal.Chem.* 68, 2709-2712, (1996).
- (21) Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q.: Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 954, 5-32, (2002).
- (22) Štulík, K.; Pacáková, V.; Suchánková, J.; Coufal, P.: Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography. *J. Chromatogr. B* 841, 79-87, (2006).
- (23) Svec, F.; Fréchet, J. M. J.: Modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative- scale ion-exchange chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 702, 89-95, (1995).
- (24) Xie, S. F.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.: Rigid porous polyacrylamide- based monolithic columns containing butyl methacrylate as a separation medium for the rapid hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 775, 65-72, (1997).
- (25) BIA Separations, CIM Convective Interaction Media[®]; Rapid Chromatography for Large Biomolecules; Publication CPB11106; Slovenia 2006, http://www.monoliths.com/Library/pdf/bia_brochure%2006%20final.pdf ; (staženo 19.2.2007)
- (26) BIA Separations; Product description <http://www.monoliths.com/documents/products/cimdisks.asp> (staženo 19.2.2007)
- (27) Merhar, M.; Podgornik, A.; Barut, M.; Jakša, S.; Zigon, M.; Štrancar, A.: High Performance Reversed-Phase Liquid Chromatography using Novel CIM RP-SDVB Monolithic Supports. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 24 (16), 2429-2443, (2001).

- (28) Tennikova, T. B.; Svec, F.: High-performance membrane chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. *J. Chromatogr. A* 646, 279-288, (1993).
- (29) Leinweber, F. C.; Tallerek, U.: Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phase. Hydrodynamics and adsorption capacity. *J. Chromatogr. A* 1006, 207-228, (2003).
- (30) Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychnovský, P.; Plzák, Z.; *Základní analytická chemie*. Nakladatelství Karolinum, Praha 2003.
- (31) BIA Separations d.o.o., Pioneer in Monolith Separation Technology, CIM Convective Interaction Media[®] For Biochromatography, Publication CPB10402, Slovenia 2002; www.monoliths.com , (staženo 19.2.2007).
- (32) BIA Separations, Fields of Use, <http://www.monoliths.com/fieldsfuse.asp#fouse3> , (staženo 20.8.2007).
- (33) BIA Separations, Product description http://www.monoliths.com/library/pdf/brochures/cim_bro2.pdf , (staženo 20.8.2007).
- (34) BIA Separations, CIM[®] disk monolithic columns, Instruction manual, http://www.monoliths.com/Library/pdf/manuals/CIM_DISK_manual.pdf ; (staženo 20.8.2007).
- (35) Ostryanina, N. D.; Vlasov, P.; Tennikova, T. B.: Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. *J. Chromatogr. A* 949, 163-171, (2002).
- (36) *Základní praktika z analytické chemie*, Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, 2004, <http://www.natur.cuni.cz/analchem/praktika.html> ; (staženo 24.8.2007).
- (37) *Návod k obsluze*, Izokratické čerpadlo ALPHA 10, ECOM spol. s r. o., Praha, bez vnočení.
- (38) *Návod k obsluze*, Opál UV-VIS detektor s fixní vlnovou délkou, ECOM spol. s r. o., Praha bez vnočení.
- (39) Zeug, Ch. M.; Liao, J. L.; Nakazato, K.; Hjértén, S.: *J. Chromatogr.* 753, 227-234, (1997).
- (40) Krajhanzl, A.; Hladík, J. a kolektiv;: *Biochemické metody, Návod k pokročilým praktickým cvičením*. Nakladatelství Karolinum, Praha 1991