

Univerzita Karlova v Praze
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HPLC a možnost jejího využití při vzdělávání budoucích učitelů chemie

HPLC and the Possibility of its Use in Teacher Education

Štěpán Gabriel

Vedoucí práce: Ing. Hana Kotoučová, Ph.D.

Studijní program: Učitelství pro střední školy (N7504)

Studijní obor: Učitelství všeobecně vzdělávacích předmětů pro základní školy a střední školy biologie — chemie

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **HPLC a možnost jejího využití při vzdělávání budoucích učitelů chemie** vypracoval pod vedením vedoucí práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha, 9. prosince 2016

.....

podpis

Chci touto cestou poděkovat všem, kteří mi ve zpracování této práce byli nápomocni. Především se jedná o vedoucí této práce, Ing. Hanu Kotoučovou, Ph.D. Její rady a postřehy se ukázaly být velmi cenným základem práce. Dále chci poděkovat slečnám Janě Ruzó a Dagmar „Bernešce“ Říhové, za podporu a projevenou důvěru. Nemalé poděkování zaslouží také moje rodina.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá teoretickými i praktickými aspekty vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Představuje ji jako jednu z nejčastěji používaných analytických metod. V teoretické části pojednává o instrumentaci a jednotlivých součástech sestavy pro HPLC. Věnuje se také stručnému popisu nejběžnějších mobilních a stacionárních fází, používaných v tomto analytickém postupu. Na základě teoretických poznatků je připravena laboratorní úloha pro vysokoškolské studenty, budoucí učitele chemie. Jako vhodná látka pro tuto učební úlohu byl vybrán kofein. Jedná se o látku nejen všeobecně známou, ale také hojně využívanou například v potravinářství. Součástí práce je stručný pohled na rámcové vzdělávací programy (RVP) z hlediska možného zařazení HPLC do výuky v primárním a sekundárním vzdělávání. Přílohou k práci je návod k sestavené laboratorní úloze.

KLÍČOVÁ SLOVA

chromatografie, kofein, HPLC, instrumentace HPLC, vzdělávání učitelů, RVP

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on theoretical and practical aspects of High performance liquid chromatography (HPLC). This method is introduced as one of the most frequently used current analytical methods. The theoretical part of thesis is focused on instrumentation of HPLC and particular components of HPLC analytical system. The most often used mobile phases and static phases are described as well. Based on these theoretical aspects, laboratory exercise using HPLC for future teachers is designed. Caffeine is used as ideal model material for this exercise. Caffeine is well-known substance, because of its traditional usage for example in food-processing industry. Final part of this thesis is brief view on framework educational programmes for primary and secondary education. As appendix of this thesis, manual for referenced laboratory exercise is provided.

KEYWORDS

chromatography, caffeine, HPLC, instrumentation of HPLC, teacher training, RVP

OBSAH

1	Úvod	2
2	Teoretická část	4
2.1	Chromatografie, základní princip HPLC	4
2.1.1	Stručný vývoj chromatografie	4
2.1.2	Druhy chromatografických postupů	5
2.1.3	Základní popis HPLC	8
2.2	Pracovní módy při HPLC	9
2.3	Aktuální trendy v oblasti HPLC	14
2.3.1	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	14
2.3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě	15
2.3.3	Superkritická fluidní chromatografie	16
2.3.4	Monolitické kolony a jejich využití při HPLC	16
2.3.5	Miniaturizace při HPLC	17
2.4	Mobilní a stacionární fáze používané při HPLC	18
2.4.1	Mobilní fáze	18
2.4.2	Stacionární fáze	19
2.5	Instrumentace HPLC	24
2.5.1	Zásobník mobilní fáze	25
2.5.2	Odplyňovací zařízení	25
2.5.3	Vysokotlaké čerpadlo	26
2.5.4	Dávkovač vzorku	28
2.5.5	Chromatografická kolona	29
2.5.6	Detektor	31
2.5.7	Sběrač frakcí	34
2.5.8	Datová stanice	35
2.6	Vyhodnocení postupu při HPLC	35
2.7	Kofein	40
2.8	Zařazení HPLC do výuky v primárním a sekundárním vzdělávání	42
2.8.1	RVP pro základní vzdělávání	43
2.8.2	RVP pro gymnázia	43
2.8.3	RVP pro střední odborné vzdělávání	43
2.8.4	Další rámcové vzdělávací programy	44
3	Experimentální část	45
3.1	HPLC analýza kofeinu	45
3.2	Příprava úlohy využívající HPLC	46
3.3	Úprava návodu k navrhované úloze	47
4	Diskuse	49
5	Závěr	53
6	Přehled použitých vzorců, zkratk a značek	54
7	Seznam použitých zdrojů	57
8	Seznam příloh	61

1 ÚVOD

Analytická chemie si získala nezastupitelné místo mezi vědeckými obory s praktickým využitím v každodenním životě. Její metody a postupy nacházejí uplatnění v širokém spektru oborů. Například rozborů potravin nebo monitorování stavu ovzduší jsou pouze pomyslným „vrcholem ledovce“.

Je proto nanejvýš vhodné věnovat analytické chemii patřičný důraz i při vzdělávání budoucích učitelů chemie. Kromě teoretických informací, doplněných například o výpočty, by měl mít budoucí učitel šanci si aktuálně využívané metody alespoň v základní míře prakticky vyzkoušet. Pokud uvážíme nutnost předávat žákům při výuce kromě znalostí také dovednosti, je vlastní zkušenost učitele s praktickým provedením metody nezbytná.

Jednou ze základních metod analytické chemie je chromatografie. Už mnohé učebnice pro základní školy ji zmiňují jako často používanou metodu oddělování složek směsí. S přibývajícím věkem se pak žáci mají možnost seznámit také s její konkrétní aplikací. Právě chromatografie patří mezi nejčastěji používané metody v soudobé analytické chemii. Nelze poskytnout kompletní přehled používaných metod a nezmínit se o ní. Velkou výhodou při objasňování jejího principu je možnost zapojit do výuky pokusy, přiměřené věku žáků, které její základní aspekty více žákům přiblíží.

Současná laboratorní chromatografie se ubírá směrem efektivní automatizace. Úměrně množství člověkem rozeznávaných látek také stoupá počet různých, nejen chromatografických postupů. Přesto právě princip chromatografie je jedním z nejčastěji využívaných. Oddělování složek vzorku na základě jejich průchodu dvěma odlišnými fázemi je možné aplikovat na mnoho rozličných látek. Pro tyto fáze se používá označení nepohyblivá (stacionární) a pohyblivá (mobilní). Právě do mobilní fáze je nanášen rozebíraný vzorek. Pokud je mobilní fáze v kapalném skupenství, hovoříme o tzv. kapalinové chromatografii. Pro dosažení co nejpřesnějších a nejkompletnějších výsledků je tato metoda postupně zdokonalována. Stacionární fáze je při ní nejčastěji přítomna jako pevně ukotvená součást aparatury, krytá kovovým nebo skleněným pláštěm. Tuto součást označujeme jako chromatografickou kolonu. Všechny chromatografické postupy využívající takové usazení stacionární fáze označujeme jako kolonové chromatografie.¹

Důležitým aspektem kapalinové chromatografie jsou podmínky průchodu mobilní fáze skrz chromatografickou kolonu. Mezi nimi má významnou pozici tlak, pod kterým mobilní fáze přichází. Aby dosáhla kapalinová chromatografie co nejpřesnějších a nejkompletnějších výsledků, bývá často do její aparatury umístěna součást schopná generovat zvenčí ovladatelný tlak na mobilní fázi. Postup využívající zmíněné typy mobilní a stacionární fáze, v kombinaci s využitím čerpadla, schopného vyvolat kontrolovatelný tlak na mobilní fázi, označujeme jako vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (anglicky *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC). Právě tomuto postupu je věnována následující práce.

Za cíl si klade především následující:

1. Poskytnout základní přehled o principu a instrumentaci HPLC
2. Navrhnout pro budoucí učitele chemie vhodnou učební úlohu využívající HPLC tak, aby je seznámila s kvalitativním i kvantitativním využitím této metody

Je třeba již v úvodu připomenout, že práce se zabývá instrumentální metodou analytické chemie. Jakkoli je tato oblast může být po praktické stránce (vlastní práce žáků) při primárním a sekundárním vzdělávání opomíjena, existují konkrétní učební obory a programy přímo vyžadující její ovládní. Dobrý učitel by pak neměl zůstat jen u recitování teoretických faktů. Tím například budoucí laborant téměř jistě nedosáhne na splnění nároků ve své odbornosti².

Pro většinu základních a středních škol v České republice představuje vybavení odpovídajícím materiálem a pomůckami pro HPLC značnou finanční zátěž. Jakkoli malá část učitelů chemie se tak setká přímo ve vzdělávací praxi s tímto postupem, žádný by neměl mít problém ji svým žákům patričně objasnit a přiblížit. Vyvstává tak nutnost učitele předem této situaci připravit.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografie, základní princip HPLC

2.1.1 Stručný vývoj chromatografie

Za zakladatele analytické metody chromatografie je považován ruský botanik a biochemik Mikhail Semenovich Tswett.^{3,4} První poznatky v oboru získal již roku 1901 během pokusů v St. Petěrburgu. Hlavní část svého odkazu nicméně zanechal během svého působení na Botanickém institutu Varšavské univerzity⁵. Roku 1903 dokázal jako vůbec první vědec oddělit jednotlivé rostlinné pigmenty jejich průchodem ve formě roztoku skrz skleněnou kolonu plněnou uhličitanem vápenatým. Svoji metodu označil jako chromatografii (resp. chromatografickou adsorbční analýzu⁵) na základě složení řeckých slov *chroma* (barva) a *graphein* (psát). Po publikování metody ale následovalo několik desetiletí, během kterých nebyl tento postup nikterak hlouběji rozvíjen.⁴

Teprve v polovině třicátých let dvacátého století na základě Tswettových zjištění publikuje maďarský chemik László Zechmeister první ucelenou knihu věnovanou čistě chromatografii. Navíc predikuje této metodě velkou budoucnost.

Poté se vývoj chromatografie podstatně zrychluje. Roku 1941 publikovali britští chemici Archer J. P. Martin a Richard L. M. Synge⁴ práci věnovanou částicové chromatografii, postavenou především na přesných výpočtech. Za svoji práci byli o 11 let později oceněni Nobelovou cenou za chemii. Roku 1951 americký chemik Justus G. Kirchner popsal princip tenkovrstvé chromatografie (stacionární fáze je při ní umístěna na plochem podkladu), který je používán i v současnosti. Ve zbytku padesátých let a po většinu let šedesátých je v popředí zájmu vědecké veřejnosti především plynová chromatografie. Označení získala díky skupenství použité mobilní fáze. Rovněž tuto techniku používáme i v současnosti jako jednu z nejčastějších. Jejím omezením je však možnost užití pouze pro těkavé látky.⁴

Jako reakce na stávající problém přichází koncem šedesátých let princip kapalinové chromatografie a jejího využití. Mobilní fáze je tedy v tomto případě v kapalném skupenství. Dokonce již v roce 1969 byla uvedena na trh první komerční HPLC sestava. A o pouhé čtyři roky spatřil světlo světa princip tzv. „reverzní fáze“. Kapalinová chromatografie si tak získala výsadní postavení mezi dalšími chemickými metodami studia látek.

2.1.2 Druhy chromatografických postupů

S novými poznatky v oblasti využití chromatografie bylo vyvinuto mnoho vzájemně odlišných chromatografických postupů. Jak bylo zmíněno v úvodu, společným rysem všech těchto postupů je vzájemné oddělení jednotlivých částí analyzovaného vzorku pomocí průchodu vzorku dvěma fázemi. Rozlišujeme tedy tzv. pohyblivou (mobilní) fázi a nepohyblivou (stacionární) fázi. Tyto fáze se navzájem nemísí a zkoumaný vzorek v každé z nich ulpívá na odlišnou dobu.¹

Pro snazší orientaci je vhodné chromatografické postupy rozdělit do skupin. Vlastní dělení je ale vždy plně závislé na porovnávaném parametru. Pokud budeme jako určující znak uvažovat čistě druh použitelné mobilní a stacionární fáze, získáme dělení shrnuté v Tabulce 1.

Tabulka 1: Různé druhy chromatografických postupů.⁶

Použitá mobilní fáze	Použitá stacionární fáze	Název chromatografického postupu	Používané mezinárodní označení
Plynná fáze	Kapalina upevněná na nosiči	Plynná rozdělovací chromatografie	GLC
	Pevná látka	Plynná adsorpční chromatografie	GSC
Kapalná fáze	Kapalina upevněná na nosiči	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	Kapalina vázaná v pórech sorbentu	Gelová chromatografie	GPC, SEC
	Pevná látka	Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
Kapalná fáze v nadkritickém stavu	Kapalina upevněná na nosiči	Superkritická fluidní chromatografie	SFC

Dělení chromatografických postupů do skupin pouze podle podstaty použitých fází pochopitelně neodráží všechny vzájemné odlišnosti. Dalším možným dělicím hlediskem je uspořádání stacionární fáze. V současné analytické praxi je mnohem častější tzv. chromatografie kolonová. Při ní je stacionární fází vyplněna dutá trubice. Mobilní fáze následně prochází skrz ni. Tato součást aparatury je označována jako chromatografická kolona⁶.

Mimo kolonových chromatografických metod rozeznáváme také plošné chromatografické techniky. Při nich je stacionární fáze nanášena na plochou vrstvu, na které skrz ni následně prochází i mobilní fáze. Plošné chromatografické metody dále dělíme do dvou skupin⁶:

- Papírová chromatografie: v současnosti má spíše okrajové využití, s nástupem kolonových chromatografických postupů jejím význam upadá. Stacionární fáze je v tomto případě zakotvena na chromatografickém papíru. Mobilní fáze se vzorkem může následně procházet dle uspořádání vzestupně nebo sestupně.
- Tenkovrstvá chromatografie: stacionární fází je v tomto případě pevná látka, nanášená na vhodný inertní podklad (sklo, kov). Touto pevnou látkou může být například oxid hlinitý (Al_2O_3) nebo silikagel (hydratovaný oxid křemičitý – $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$).

Nelze opomenout ani děje, probíhající při oddělování jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Probíhají na rozhraní stacionární a mobilní fáze. Podle nich rozeznáváme následující postupy⁶:

- Rozdělovací chromatografie: látky se od sebe oddělují na základě různých hodnot tzv. „Nernstových rozdělovacích koeficientů“ (K_{Nc}). Tato bezrozměrná hodnota je vlastně podílem dvou rovnovážných koncentrací (c^I a c^{II}) ve dvou různých rozpouštědlech. Obě použité fáze jsou tedy v kapalném skupenství.

$$K_{Nc} = \frac{c^I}{c^{II}}$$

- Adsorpční chromatografie: při tomto postupu využíváme faktu, že různé látky se ke stejnému sorbentu (zda v roli stacionární fáze) vážou odlišným způsobem (různou silou, po odlišnou dobu, ...). Využíváme tedy kapalnou (případně plynnou) mobilní

fázi a pevnou stacionární fázi. Sorbenty využívané při adsorpční chromatografii dělíme podle chemického charakteru do čtyř hlavních skupin (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Typy sorbentů v adsorpční chromatografii.

Typ sorbentu	Příklad sorbentu
Nepolární sorbenty	Aktivní uhlí
Polární kyselé sorbenty	Hydratovaný oxid křemičitý ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)
Polární bazické sorbenty	Hydratovaný oxid hlinitý ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)
Směsné sorbenty	

Používané mobilní fáze jsou pro účely vzájemného porovnání při adsorpční chromatografii srovnány do tzv. eluotropní řady. Zde je srovnávacím měřítkem postupně vzrůstající polarita jednotlivých látek. Nízkou polaritu vykazují například pentan a hexan, naopak vysokou voda.

- Iontově-výměnná chromatografie: při tomto postupu jsou jako stacionární fáze využity tzv. iontoměniče. Jedná se o chemické látky, které na svém povrchu obsahují chemické skupiny nesoucí náboj. Využití této metody je tak poměrně specifické. Jedná se hlavně o rozbory, při nichž lze očekávat v analyzovaném vzorku přítomnost iontů nebo částic s velkým dipólovým momentem⁶. Rozeznáváme dva druhy ionexů (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Druhy ionexů při iontově-výměnné chromatografii.

Druh ionexu	Princip a účinek
Anexy	Na povrchu nesou kladný náboj, přitahují anionty
Katexy	Na povrchu nesou záporný náboj, přitahují kationty

Vzhledem k tomu, že interakci látek ve vzorku a stacionární fáze obstarávají elektrostatické síly, jsou jednotlivé složky vzorku na stacionární fázi nejen

zpomaleny, ale obvykle úplně zastaveny. Po průchodu vzorku je tak obvykle vhodně změněno složení procházející mobilní fáze.

- Gelová chromatografie: podstatou je využití gelu jako stacionární fáze. Částice gelu totiž mezi sebou mají určitý prostor, ve kterém se mohou jednotlivé složky vzorku zdržovat po odlišnou dobu. Platí, že složky s velkou molekulovou hmotností se na koloně se stacionární fází zdrží podstatně kratší dobu (mohou využít jen vhodně velké prostory mezi částicemi gelu) než složky s malou molekulovou hmotností (mohou využít větší množství volného prostoru). Aby bylo oddělení složek úspěšné, je třeba použít takový gel, který je ke všem složkám vzorku inertní⁷.
- Afinitní chromatografie: k jejímu využití je potřeba na základ stacionární fáze nanést vhodné činidlo (ligand). Takto vzniklá stacionární fáze je schopna z procházející mobilní fáze nesoucí analyzovaný vzorek pomocí nevazebných interakcí poutat konkrétní složky. Po kompletním průchodu vzorku je následně mobilní fáze změněna a zadržené složky se postupně uvolní⁸.

V konkrétním praktickém využití jsou výše zmíněné principy většinou kombinovány. Vždy lze ale říci, že jeden z těchto principů svým rozsahem převažuje nad ostatními.

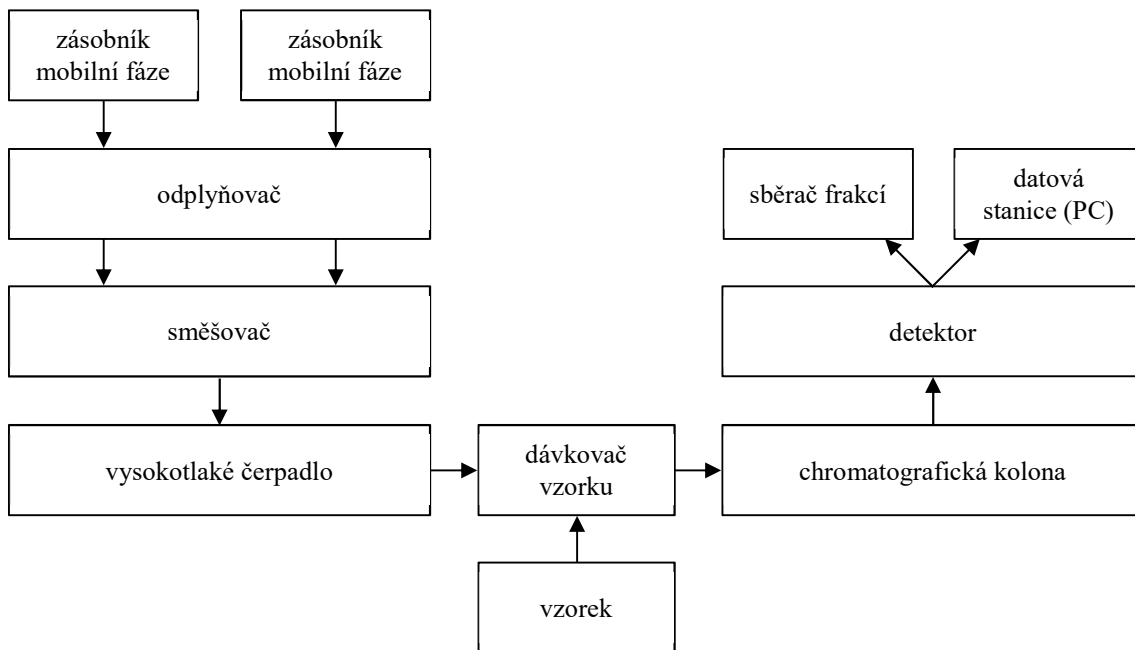
2.1.3 Základní popis HPLC

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, HPLC patří mezi kapalinové chromatografie (mobilní fáze je v kapalném skupenství) a k jejímu zdárnému průběhu je nutné do chromatografické aparatury zapojit ovladatelný zdroj tlaku na mobilní fázi (vysokotlaké čerpadlo)^{1,6}.

Bez zapojení vysokotlakého čerpadla do chromatografické aparatury by byl celý postup analýzy časově velmi náročný. Hrozila by také nižší objektivita dosažených výsledků analýzy. Velkou výhodou HPLC, jakožto typického příkladu kapalinové chromatografie je možnost separovat také tepelně nestálé a netěkavé látky, na rozdíl od různých metod plynové chromatografie.

Každý analytický postup provedený metodou HPLC tedy dodržuje obecné základní schéma instrumentace. Toto schéma je naznačeno na Obrázku 1. Možnosti jeho dalších úprav vycházejí zejména z požadavků na složení a průchod mobilní fáze.¹ Jedná se například o

umístění směšovače mobilní fáze vzhledem k vysokotlakému čerpadlu. Další možností úpravy základního schématu je použití více detektorů zároveň. S ohledem na množství dostupných druhů detektorů je i toto provedení HPLC poměrně časté.



Obrázek 1: Základní schéma instrumentace při HPLC.¹

Jednotlivými částmi chromatografické sestavy se podrobněji zabývají další následující kapitoly.

2.2 Pracovní módy při HPLC

Pokrok v oblasti využití HPLC s sebou postupně přináší množství různých postupů, které vycházejí z principu HPLC. Těchto postupů dnes rozeznáváme opravdu velký počet. Vzájemně se liší jak použitými mobilními a stacionárními fázemi, tak vhodnými podmínkami pro průběh analýzy. Pro skupiny postupů, které se shodují v určitém použitém aspektu analýzy (především právě druh mobilní a stacionární fáze), používáme označení pracovní módy.

Následující část mapuje podmínky při jednotlivých pracovních módech HPLC.

HPLC systémy s normálními fázemi

Uspořádání HPLC s normálními fázemi je charakterizováno využitím polární stacionární fáze a mobilní fáze s nižší polaritou, než má stacionární fáze. Tento princip separace patří v oblasti HPLC mezi nejstarší, bývá označován zkratkou NP-HPLC.⁹

Při průchodu stacionární fázi spolu molekuly mobilní fáze a analyzovaného vzorku prakticky soupeří o volné skupiny stacionární fáze. S rostoucí polaritou složek vzorku se zvyšuje také retence těchto složek na chromatografické koloně. Obecně platí, že při odhadu retence analytu na koloně je třeba brát v úvahu sterické vlastnosti analytu. Jakékoli omezení dostupnosti funkčních skupin analytu vůči stacionární fázi povede ke zhoršení retenčních vlastností kolony vůči danému analytu.^{1,9}

Při NP-HPLC plní nejčastěji roli stacionární fáze silikagel. Může být použit jak čistý, tak chemicky modifikovaný. Aby bylo docíleno vhodných podmínek (vhodné polarity), lze silikagel modifikovat různými skupinami. Pro vznik slabě polární stacionární fáze jsou na silikagelovém nosiči využívány látky s diolovou funkční skupinou, případně s nitroskupinou. Vyšší polaritu vykazují stacionární fáze s modifikované kyanovou skupinou. Nejvyšší polaritu vykazují stacionární fáze modifikované krátkými alifatickými aminoskupinami.¹

Mobilní fáze pro NP-HPLC je nutné vybírat s ohledem na jejich polaritu. Ta se projeví především při použití vícesložkové mobilní fáze. V takové situaci obvykle jedna ze složek způsobí v porovnání s druhou složkou mobilní fáze rychlejší vymývání vzorku na stacionární fázi. Taková složka má v porovnání se druhou složkou mobilní fáze vyšší eluční sílu. Pro vzájemné porovnání eluční síly byla zavedena tzv. eluotropická řada rozpouštědel. Nejčastější je využívání dvousložkové mobilní fáze. Při NP-HPLC je třeba uvažovat také o obsahu vody v mobilní fázi. I velmi malá změna její koncentrace v mobilní fázi se může projevit zásadní změnou v eluční síle celé mobilní fáze. Následně také zkreslit výsledky analýzy.

V současné době je klasická NP-HPLC spíše okrajovou metodou. S rostoucím důrazem na rychlost analýzy a její, pokud možno univerzální, provedení neposkytuje příliš výhod (v porovnání s dalšími postupy v HPLC). Praktické využití má především u analýzy látek, které se v přítomnosti vody rozkládají. Také se využívá pro separaci isomerních látek.¹

HPLC systémy s reverzními fázemi

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií lze aplikovat také za zcela opačné vzájemné polarity stacionární a mobilní fáze (v porovnání s NP-HPLC). Pokud budeme pro oddělování

složek vzorku využívat polární mobilní fázi a nepolární stacionární fázi, hovoříme o chromatografii na reverzních fázích, v případě HPLC označované zkratkou RP-HPLC.¹⁰

Stacionární fázi je zde nejčastěji modifikovaný silikagel. Ten na svém povrchu váže nejčastěji delší molekuly uhlovodíkových řetězců (např. C₁₈). Nosičem ale mohou být například také některé oxidy kovových prvků.

RP-HPLC je charakteristická tím, že na stacionární fázi se prakticky nevyskytují centra schopná polárních interakcí. Převládají tak nespecifické mezimolekulové interakce mezi analytem a stacionární fází. Velký vliv má také druh chemicky vázané stacionární fáze na nosiči. Retenční vlastnosti například alkylů C₈ a C₁₈ vyznívají spíše pro alkyl C₁₈. Vyšší retenci při RP-HPLC vykazují látky s větším množstvím aromatických jader. Naopak látky se silně polárními (až iontovými) skupinami mají míru retence při RP-HPLC sniženu. Při analýzách s předpokládanou přítomností těchto látek je nutné zvolit vhodnou hodnotu pH mobilní fáze.¹

U běžně používaných mobilních fází platí, že eluční síla roste s klesající polaritou organického rozpouštědla. Podobně jako při NP-HPLC, i zde se obvykle využívá dvousložkové mobilní fáze. Výběr látek pro následné složení ideální mobilní fáze je ale o něco užší. Prakticky se využívá pouze kombinace vody a organického rozpouštědla (methanol, acetonitril, dioxan). Použití samotné vody jako mobilní fáze zde nevede k úspěchu. Stacionární fáze má vůči procházející mobilní fázi hydrofobní povrch, může tak docházet k nestandardním interakcím.

RP-HPLC je v současné době jakousi metodou první volby. V porovnání s NP-HPLC nabízí využití pro širší spektrum látek. S úspěchem se dá použít i pro komplikované směsi, například pro rostlinná barviva.^{1,6}

Iontově výměnná chromatografie

Principem iontově výměnných chromatografických postupů (IEC) je využití elektrostatických interakcí k vzájemné výměně shodně nabitých částic mezi stacionární fází a mobilní fází obsahující analyzovaný vzorek. Tyto interakce mezi sebou vytvářejí ionizované funkční skupiny stacionární fáze a opačně nabité ionty. Velký vliv na průběh IEC má pH použité mobilní fáze.^{1,6}

Stacionární fáze pro IEC je charakteristická přítomností iontoměníčů. Ty můžeme rozdělit podle několika hledisek. Podle charakteru vyměňovaných částic rozeznáváme katexy (polymerní kyseliny, uvolňují a vyměňují kationy) a anexy (polymerní báze, uvolňují a vyměňují anionty).

Využití IEC je specifické, už s ohledem na zvolenou metodu oddělování složek vzorku. Využívá se například pro analýzy vzorků proteinů a nukleových kyselin, dále pro separace iontů z různých druhů vod.^{1, 11}

Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je poměrně novým postupem, v porovnání například s NP-HPCL a RP-HPLC byla objevena zhruba o 30 let později. Využívá interakcí vzorku s hydrofilní stacionární fází. Používaná mobilní fáze je dvousložková a vždy obsahuje jako podstatnou součást vodu. Vůči stacionární fázi se ale chová jako relativní hydrofob. Přesný mechanismus fungování HILIC je zatím pořád předmětem podrobného zkoumání a nebyl zcela objasněn.¹

Častým materiálem pro stacionární fáze je silikagel, případně také chemicky modifikovaný silikagel. Mobilní fáze obsahuje vysoký podíl organické složky (obvykle acetonitril, často více než 50 % mobilní fáze). Pro změnu selektivity systému ke konkrétním látkám lze kombinovat více různých organických složek (např. přídavek methanolu, ethanolu, ovšem v menším množství než acetonitrilu). V porovnání s organickou složkou mobilní fáze působí přítomná voda jako silné eluční činidlo. Jakkoli drobné změny její koncentrace v mobilní fázi proto mohou způsobit podstatné změny průběhu analýzy. Je také třeba dbát na využití malého množství vzorku. Větší množství by mohlo vést ke snížení separační účinnosti systému (prostřednictvím rozmývání píků).¹

HILIC nachází praktická využití mimo jiné jako alternativa k NP-HPLC. Využívá se především pro analýzu polárních látek. Nachází tak uplatnění v bioanalýze a farmacii.¹²

Hydrofobní interakční chromatografie

Použitím vodní mobilní fáze bez přísad organických rozpouštědel je charakteristická hydrofobní interakční chromatografie (HIC). Aby byla zachována retence analyzovaných látek, přidávají se do mobilní fáze organické i anorganické soli.

Uplatňuje se zde princip gradientové eluce. V první části chromatografie je v mobilní fázi přítomna vysoká koncentrace přidávaných solí. Analyzované látky tak přecházejí do stacionární fáze. Při postupném snížení koncentrace solí je naopak podpořena eluce. Látky postupně přecházejí zpět do mobilní fáze a následně opouštějí kolonu.¹

Stacionární fáze používané v HIC využívají silikagel jako nosič. Na jeho povrch se chemicky vážou např. ethery, acetamid nebo krátké řetězce alifatických uhlovodíků (C₃, C₄).

Využití hydrofobní interakční chromatografie je především v oblasti analýzy vzorků peptidů a proteinů. Využíváme tu vysolovacího efektu, kdy omezujeme rozpustnost těchto látek přidáním vysoce koncentrovaných solí.¹³

Iontově párová chromatografie

Iontově párová chromatografie se využívá pro analýzy vzorků látek iontového charakteru. Tyto látky totiž reagují na přítomnost opačně nabitého iontu (protiiontu, který je součástí molekuly se silným nepolárním podílem) za vzniku iontových asociátů. Následně na stacionární fázi probíhá retence těchto asociátů. Retence látek nepolární povahy zůstává neovlivněna.¹

Při iontově párové chromatografii se využívají stacionární fáze běžné pro RP-HPLC. Retenci vznikajících asociátů lze ovlivňovat prostřednictvím pH mobilní fáze a také délky nepolárního části řetězce molekuly obsahující protiiont vůči analyzované složce.

Tato metoda byla využívána hlavně v době před rozvojem HILIC. Je vhodnou možností pro analýzu vzorků s obsahem polárních kyselých i polárních bazických látek.¹

Chirální chromatografie

Pro chirální chromatografii je nutným předpokladem přítomnost chirálních center, tedy asymetrických atomů uhlíku. Molekuly, které mají vzájemně shodný sumární vzorec, ale liší se konfigurací na chirálním centru (bez ohledu na počet chirálních center) označujeme jako stereoisomery. Chemickými prostředky je možné u stereoisomerů dosáhnout jiné prostorové konfigurace příslušného chirálního centra.

Pro popis podstaty chirální chromatografie je nutné stereoisomery rozdělit do dvou skupin¹:

- Enantiomery: páry molekul, kdy proložením osy souměrnosti mezi molekuly těchto látek získáme vzájemné zrcadlové obrazy těchto molekul, označujeme jako enantiomery. Na rozdíl od druhé skupiny stereoisomerů mají oba enantiomery za stejných podmínek shodné fyzikální a chemické vlastnosti.
- Diastereoisomery: jedná se o takové stereoisomery, jejichž vzorce nelze označit jako vzájemné pomyslné zrcadlové obrazy. Aby k této situaci mohlo dojít, musejí tyto molekuly obsahovat alespoň 2 chirální centra, navzájem se ale liší konfigurací pouze na jednom z nich. Vzájemně jsou diastereoisomery látky, které se projevují rozdílnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi.

Pro separaci enantiomerů během HPLC je nutné využít tzv. chirálního selektoru. Tuto velmi různorodou skupinu látek (např. některé proteiny, polysacharidy a jejich deriváty, ...) lze využít mechanismem přímé separace. Při ní je použita chirální stacionární fáze, případně chirální selektor v mobilní fázi ke vzniku tzv. transitního diastereoisomeru. Tuto látku následně zadrží kolona.

Lze také využít metodu nepřímé separace. Tento postup je uplatňován méně, především kvůli celkové náročnosti. Jeho podstatou je derivatizace chirálního centra molekuly pomocí chirálního derivatizačního činidla. Následuje separace pomocí běžných postupů HPLC.

Použití metod chirální chromatografie je nutné například ve farmacii. Opticky isomerní látky nemusejí mít nutně stejný léčebný účinek. Je tedy pak nutné najít a oddělit látky s požadovanými vlastnostmi od případných neaktivních.¹⁴

2.3 Aktuální trendy v oblasti HPLC

Protože hranice využití HPLC se stále rozrůstají, je stále rozsáhlejší i výčet oblastí, v nichž lze tento postup použít. Kromě nových postupů (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě a superkritická fluidní chromatografie) je často diskutovanými otázkami také využití monolitických kolon a celková miniaturizace postupu.

2.3.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) poskytuje možnost využít pro separaci složek vzorku částice menší než 2 μm . Ačkoli nejvyšší účinnosti separace je zde

dosahováno při vysoké průtokové rychlosti, s klesající průtokovou rychlostí tato účinnost příliš neklesá. Tím navíc dochází také k podstatné úspoře používaných mobilních fází. Při použití těchto chromatografů je nutné využít vyšší tlak (100 MPa a více), protože s klesající velikostí použitých částic stoupá hodnota generovaného zpětného tlaku. Jako stacionární fáze je zde nejčastěji využíván silikagel. Vyhovuje nárokům na vysokou stabilitu stacionární fáze (chemickou i mechanickou).¹

UHPLC se uplatňuje především jako alternativa ke klasickým postupům HPLC. Při přepočítání parametrů separace lze dosáhnout kvalitních výsledků za mnohem kratší dobu.^{1, 15}

2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě

Samostatnou skupinou HPLC postupů, které se dostává v poslední době velké pozornosti, jsou postupy operující také s vlivem teploty na míru separace analyzovaných látek. Tyto postupy se souhrnně označují jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě (HTLC).

Z dosavadních výzkumů vyplynulo, že využití těchto metod přináší mnohé výhody. Především je zde možnost využít jako rozpouštědlo samotnou čistou vodu. Ta je před použitím zahřáta na teplotu zhruba 150 – 200 °C. Odpadá tak nutnost používat drahá organická rozpouštědla jako součást mobilních fází. Zároveň je tak poměrně nízká také cena samotné analýzy. Je však zároveň nutné počítat také s tím, že zvýšené teplotě nemusejí nutně odolat také analyzované látky.

Nezbytnou součástí systému pro HTLC jsou dva termostaty. První (předehřívací) udržuje na koloně stálou teplotu vhodnou pro separaci. Druhý (chladicí) sníží teplotu procházejících látek před vstupem do detektoru.

Stacionární fáze pro HPLC jsou založeny obvykle na přítomnosti oxidu zirkoničitého, případně grafitového uhlíku. Zatím nebyla plně prokázána odolnost silikagelových stacionárních fází při práci za zvýšených teplot.

Také HTLC (podobně jako UHPLC) vystupuje především jako alternativa klasických postupů vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Při zvolení vhodné pracovní teploty použité kolony lze provádět separace a vyhodnocení dokonce v době několika sekund.

2.3.3 Superkritická fluidní chromatografie

Pro superkritickou fluidní chromatografii (SFC) je typické použití mobilní fáze v nadkritickém stavu. Sestava pro SFC tedy musí být schopna generovat tlak a teplotu přesahující kritické hodnoty použité mobilní fáze.

Jako nejčastější mobilní fáze je při SFC využíván oxid uhličitý (CO_2). Dalšími častými příklady jsou například xenon (Xe), amoniak (NH_3) nebo oxid dusný (N_2O). Velkou výhodou oxidu uhličitého v porovnání s ostatními zmíněnými látkami jsou hodnoty jeho kritické teploty ($t_k = 31^\circ\text{C}$) a kritického tlaku ($p_k = 7,3 \text{ MPa}$). Nevýhodou je naopak jeho relativně nízká polarita. Nedá se tak použít k analýzám vzorků obsahujících polární látky.¹

V porovnání s klasickými postupy HPLC při SFC dochází k rychlejšímu ustálení rovnováhy mezi stacionární fází a mobilní fází. Při využití modifikovaného oxidu uhličitého jako mobilní fáze (modifikuje se pomocí polárnějších molekul, například methanol) lze stanovovat i přítomnost polárních látek. Nejčastěji se SFC používá ve farmaceutických analýzách. Umožňuje detekci i poměrně malých molekul.^{1, 15}

V poslední době se i při využití SFC úspěšně testuje princip chromatografie s využitím částic menších než $2 \mu\text{m}$. V takovém případě mluvíme o vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografii (UHPSFC).

2.3.4 Monolitické kolony a jejich využití při HPLC

Pojmem monolitická kolona rozumíme takovou chromatografickou kolonu, která je zevnitř vyplněna jedním kompaktním kusem pevného materiálu. Jejich výhodou, v porovnání s ostatními druhy kolon v HPLC jsou odlišné hydrodynamické vlastnosti. Důvodem je pórovitost tohoto typu stacionární fáze. Uvnitř monolitických kolon totiž najdeme¹⁷:

- a) Makropóry (velké póry), skrz které může velmi rychle procházet mobilní fáze s analyzovaným vzorkem
- b) Mesopóry (středně velké póry), které monolitu poskytují dostatečný povrch pro efektivní separaci

Kombinací těchto dvou druhů pórů získávají monolitické kolony značnou separační účinnost i při zvýšené průtokové rychlosti mobilní fáze. Navíc není potřeba ani přílišné zvyšování

tlaku. Nejvýznamnějším pozitivem je však snížení zpětného tlaku kolony na ostatní části chromatografického systému.¹

Mezi monolitickými kolonami je vhodné se orientovat především podle použitého materiálu. Rozeznáváme tak anorganické monolity, makroporézní polymerní monolity a stlačitelné monolity.

Pro výrobu anorganických monolitických kolon je velmi často používán silikagel. Výrobní postup umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou. S ohledem na použitý materiál je možné tuto kolonu také chemicky modifikovat. Proti běžnějším druhům kolon vynikají zejména možnostmi použití vyšší průtokové rychlosti a také vysokou účinností při separaci nízkomolekulárních látek.

Kolony s obsahem makroporézních polymerních monolitů jsou připravovány specifickým způsobem. Plánovaná kolona je nejprve naplněna směsí monomerů, porogenů a iniciátorů. Po uzavření a utěsnění takové kolony dojde za zvýšené teploty ke kýžené polymeraci. Aby se předešlo zkreslení výsledků při použití těchto kolon, je nutné přebytečný materiál, zbylý po polymeraci, z kolony odstranit použitím vhodného rozpouštědla. Pro výrobu těchto kolon se nejčastěji používá hydroxymethylakrylát, dále například polystyren.^{1,17}

2.3.5 Miniaturizace při HPLC

Pomocí miniaturizace postupu při HPLC je snahou vyvinout takový pracovní postup, který by nejen snížil finanční náročnost analýz, ale také poskytoval i další výhody. Zvláště žádoucí jsou:

- Zvýšení rychlosti analytického postupu
- Využití malého množství vzorku se současným zachováním přesnosti vyhodnocení
- Zvýšení citlivosti detekční části HPLC systému

Při miniaturizaci chromatografických kolon byly vyvinuty dva postupy, které se navzájem liší především průměrem používaných kapilárních kolon. Jedná se o mikrokapalinovou chromatografii (mikro-LC) a nanokapalinovou chromatografii (nano-LC). Porovnání základních parametrů těchto postupů ukazuje tabulka č. 4:

Tabulka 4: Porovnání základních parametrů mikro-LC a nano-LC.¹

Název postupu a jeho označení	Průměr používaných kolon	Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou
Mikrokapalinová chromatografie (mikro-LC)	100 – 500 μm	0,5 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$
Nanokapalinová chromatografie (nano-LC)	10 – 100 μm	100 – 500 nl/min

Kromě miniaturizace chromatografických kolon je nutné také přizpůsobení vysokotlakých čerpadel. Je třeba připravit takové podmínky pro analýzy, aby při nízkém průměru kapiláry byl vysoký tlak zachován. Postupně se uplatňují čerpadla, která jsou schopna regulovat míru generovaného tlaku na základě údajů o tlaku získaných přímo na kapilární koloně.

Rizikem při miniaturizaci postupu v HPLC je možnost zvýšení mrtvých objemů v systému. Pro zamezení tomuto riziku je nutná pečlivá práce při sestavování jednotlivých součástí aparatury.

Hojně diskutovanou možností je integrování více součástí analytické sestavy do kolony. Riziko mrtvých objemů se tímto sestavením velmi výrazně sníží, což povede k rozvoji zejména nano-LC.¹

2.4 Mobilní a stacionární fáze používané při HPLC

2.4.1 Mobilní fáze

Mobilní (pohyblivá) fáze prochází aparaturou od zásobníku přes směšovač a čerpadlo skrze chromatografickou kolonu a detektor. Přivádí s sebou na chromatografickou kolonu rozptýlený analyzovaný vzorek.

Vzhledem k různým odvozeným metodám HPLC je jako součást mobilní fáze využíváno široké spektrum látek. O druzích mobilních fází je pojednáno u jednotlivých pracovních módů HPLC.

Častým požadavkem na mobilní fázi je tvorba gradientu (proměnlivost složení mobilní fáze), který ovlivňuje výsledky analýzy. Podle principu vzniku rozeznáváme dva typy gradientu mobilní fáze¹:

- Nízkotlaký gradient: při jeho využití jsou složky zamýšlené mobilní fáze smíseny ještě před vstupem do vysokotlakého čerpadla, tedy za atmosférického tlaku. Vznikající gradient je vysoce přesný, pro jeho vznik je ale nutné dokonale sladit činnost jednotlivých pístů. K dosažení lepších výsledků je možné využít samostatné dílčí čerpadlo pro jednotlivé složky mobilní fáze.
- Vysokotlaký gradient: k jeho vytvoření je nutné každou ze složek mobilní fáze vybavit vlastním vysokotlakým čerpadlem. Následně jsou jednotlivé složky přivedeny do směšovací komory a z ní vedeny na kolonu. Větší množství objemových změn (stlačitelnou kapalin) při vzniku vysokotlakého gradientu může vést k méně přesnému gradientu.

Při práci s mobilní fází v HPLC se předpokládá využívání chemikálií o velmi vysoké čistotě. Zamezuje se tím případnému poškození kolon především mechanickými nečistotami.¹⁶

2.4.2 Stacionární fáze

Stacionární fáze je na rozdíl od fáze mobilní nepohyblivou složkou chromatografického systému. V případě HPLC se prakticky jedná o náplň chromatografické kolony. Skrz ni prochází mobilní fáze s vlastními analyzovanými vzorky. Následně zde dochází k oddělování jednotlivých složek těchto vzorků. Základním požadavkem na tuto složku chromatografického systému je tak stabilita vůči procházející mobilní fázi. Také je žádoucí tepelná stabilita. Obojí brání nežádoucím chemickým změnám, které mohou vést ke zkreslení výsledků analýzy.^{1,6}

Vzhledem k množství rozličných používaných stacionární fází je poměrně komplikované najít odpovídající třídění, které zahrne všechny stacionární fáze. Jedním z často zmiňovaných je například třídění na základě polarity (polární, nepolární a amfoterní), které je ale považováno za již ne zcela dostačující¹. Výhodnější je porovnávat místo polarity spíše chemické složení jako takové.

Na základě chemického složení a struktury rozlišujeme následující typy v HPLC nejčastěji používaných stacionárních fází¹:

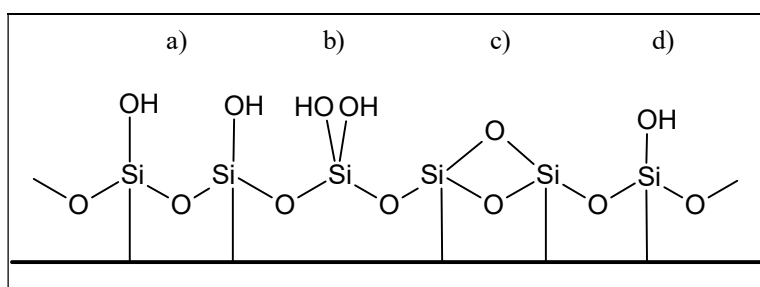
- Silikagel
- Stacionární fáze obsahující oxidy kovových prvků

- Polymerní stacionární fáze
- Hybridní stacionární fáze
- Stacionární fáze využívající grafitový uhlík

Silikagelové stacionární fáze

Základem silikagelových stacionárních fází je hydratovaná forma oxidu křemičitého ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). Obecně se jedná o nejčastější variantu stacionárních fází používaných při HPLC. Mezi jejich velkou výhodou patří možnost využití jak v klasickém uspořádání fází, tak také po nenáročném chemickém úpravě při reverzním uspořádání fází (RHPLC). Další výhodou je odolnost proti vysokému tlaku, který uvnitř chromatografické kolony vzniká.

Povrchově aktivní složkou, skrze kterou probíhají interakce se složkami vzorku, jsou přítomné silanolové skupiny. Jedná se o větší množství strukturou odlišných spojení. Nejběžnější uspořádání těchto skupin zobrazuje obrázek níže:



Obrázek 2: Nejběžnější uspořádání silanolových skupin při povrchu silikagelu: a) vicinální silanolové skupiny, b) geminální silanolové skupiny, c) siloxanové skupiny, d) izolovaná silanolová skupina.

Právě uspořádání povrchové části silikagelu nejvíce ovlivňuje výsledné vlastnosti a použití silikagelových stacionárních fází. Obecně je tento povrch slabě kyselý, tudíž silikagel více zadržuje při průchodu bazické složky vzorku než složky neutrální a kyselé. Velkým problémem silikagelu je však nutnost hlídat hodnotu pH při samotné analýze. Pokud by přesáhla hodnotu 8, došlo by k postupnému rozpouštění silikagelu a tím ke znehodnocení stacionární fáze.

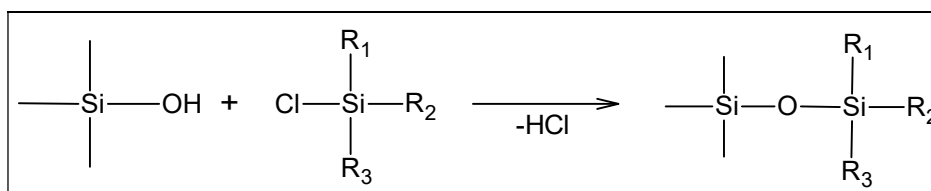
Chemicky vázané stacionární fáze

Povrchové uspořádání silikagel předurčuje také k použití do stacionárních fází založených na principu molekul chemicky vázaných na nosič. Silikagel zde plní právě roli nosiče. Obecně nachází tento typ stacionárních fází široké využití hlavně při RHPLC. Jejich

výhodou je, že žádná ze složek není strhávána a odnášena při průchodu mobilní fáze. Také vykazují vysokou odolnost proti změnám teploty a změnám ve složení procházející mobilní fáze.

Při zahájení výzkumu v oblasti stacionárních fází chemicky vázaných na nosiči se jako první možnost využívala úprava pomocí reakce silanolových skupin nosiče s alkoholy. Od tohoto principu bylo ale postupně upuštěno. Důvodem byla nízká odolnost vznikajících stacionárních fází vůči hydrolyze. Omezila se tím i možnost volby používané mobilní fáze, která musela být striktně bezvodá.

V dnešní laboratorní praxi je jednoznačně nejpoužívanějším principem v této skupině stacionárních fází úprava silanolových skupin nosiče pomocí trialkylchlorsilanů (obrázek č.).



Obrázek 3: Úprava silanolových skupin pomocí trialkylchlorsilanů.

Jako konkrétní příklad stacionární fáze s chemicky vázanou složkou lze poukázat na stacionární fáze s chemicky vázaným alkylem C₁₈ (oktadecylsilikagel = ODS). Jedná se o nejčastěji používanou variantu chemicky vázaných stacionárních fází. Uplatnění nachází v analýzách polárních i nepolárních látek. Často se také využívá možnost chemicky navázaných alkylfenylových stacionárních fází, s ohledem na vyšší stabilitu při nízkých hodnotách pH.

Dále se využívá aminopropylových a kyanopropylových stacionárních fází. Proti chemicky vázaným alkylům je zde ovšem nutno uvažovat o vyšší reaktivitě těchto skupin s procházejícími vzorky. Následné změny pH navíc mohou ovlivnit také silikagelový nosič. Tento problém lze vyřešit také využitím chemicky vázané diolové stacionární fáze.

Samostatnou skupinou s poměrně specifickým využitím jsou fluorované chemicky vázané stacionární fáze. Ačkoli pro běžné sloučeniny poskytují slabší míru retence než nefluorované

chemicky vázané stacionární fáze, pro molekuly obsahující atomy fluoru poskytují naopak vyšší míru retence.

Problémem chemicky vázaných stacionárních fází často bývá přítomnost nezreagovaných silanolových skupin nosiče (silikagelu). Aby nedocházelo k nežádoucím interakcím, využívá se nanášení difunkčních a trifunkčních organosilanů na silikagelový nosič. Pro navázání těchto molekul je tak vždy využito několik silanolových skupin zároveň. Další možností je také využití metody endcappingu. Tento postup zmenšuje zastoupení volných silanolových skupin pomocí reakce těchto skupin s malými molekulami trialkylchlorsilanů.

Pro snazší orientaci v míře modifikací silanolových skupin nosiče (silikagelu) používáme výpočet tzv. stupně pokrytí nosiče χ [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$]:

$$\chi = \frac{1}{SA} \frac{\%C \cdot 10^6}{1200n_c - \%C(MW - 1)}$$

SA označuje specifický povrch nosiče (m^2/g), %C procentuální obsah uhlíku, n_c počet atomů uhlíku v chemicky vázané skupině a MW celková molekulová hmotnost chemicky vázané molekuly. Silikagel s obsahem volných hydroxylových skupin dosahuje hodnot přibližně $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Chemicky lze vázat přibližně $4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ silanu z povrchu silikagelu. Dalšímu vázání silanolových skupin brání stericke důvody.

Stacionární fáze obsahující oxidy kovových prvků

Do této skupiny stacionárních fází řadíme zejména stacionární fáze obsahující oxid hlinitý (Al_2O_3), oxid titaničitý (TiO_2) nebo oxid zirkoničitý (ZrO_2). Jejich velkou výhodou je že odolají většímu rozsahu pH a provozních teplot než silikagelové stacionární fáze.¹⁸

Poměrně zřídka je využíván oxid hlinitý (označován také jako *alumina*). Jeho velkou nevýhodou v porovnání nejen s ostatními zmíněnými oxidy, ale také se silikagelem, je vysoké riziko katalytického štěpení a ireversibilních změn jednotlivých částí analyzovaného vzorku.

Pro účely HPLC je oxid hlinitý dodáván jako pevná, krystalická látka. Specifický povrch dosahuje hodnot od 100 až po 200 m^2/g , objem pórů od 0,2 po 0,3 ml/g a průměr pórů 10 až 20 nm. Na svém povrchu obsahuje oxid hlinitý hydroxylové skupiny. Zde tak vzniká

možnost interakcí s molekulami obsahujícími atomy s ne vazebnými elektronovými páry (Lewisovy báze), tato centra proto mají charakter Lewisových kyselin.^{1, 18}

Využití oxidu hlinitého v HPLC spočívá především v analýzách látek obsahujících alifatické uhlovodíky, případně také polyaromatické uhlovodíky.

Nepříliš častěji používané jsou také stacionární fáze využívající oxid titaničitý. Také zde platí, že tyto stacionární fáze jsou tepelně i chemicky odolnější než silikagelové stacionární fáze. Také v tomto případě mají interakční centra charakter Lewisových kyselin. Kolony obsahující oxid titaničitý mohou být použity jak pro systémy s normálními fázemi, tak po modifikaci polyethylenem také pro RP-HPLC.

Stacionární fáze s obsahem oxidu titaničitého lze s úspěchem využít pro analýzy bazických molekul, využíváme při tom mírně kyselého charakteru přítomných povrchových hydroxylových skupin.¹

Ze všech zmíněných oxidů kovových prvků má dnes nejčastější využití oxid zirkoničitý. Vykazuje proti ostatním zmíněným oxidům jako součást HPLC kolon nejvyšší míru chemické i tepelné odolnosti (stabilní v celém rozsahu pH, při teplotách až do 200 °C). Při použití takových kolon je často nutné do mobilní fáze přidávat pufr, aby se zabránilo některým nežádoucím interakcím.

Podobně jako u kolon s oxidem titaničitým také kolony s oxidem zirkoničitým lze použít jak pro uspořádání s normálními fázemi, tak také pro uspořádání s reverzními fázemi. Modifikace povrchu oxidu zirkoničitého pro RHPLC probíhá obvykle prostřednictvím polybutadienu nebo polystyrenu.

S ohledem na výše popsané vlastnosti se kolony obsahující oxid zirkoničitý s úspěchem uplatňují pro analýzy roztoků silných bází a silných zásad.¹⁸

Polymerní stacionární fáze

Dalším typem stacionárních fází, který byl vyvinut zejména jako alternativa k silikagelovým stacionárním fázím, jsou stacionární fáze obsahující polymerní částice. V porovnání se svými předchůdci tento typ stacionárních fází vykazuje vyšší chemickou i teplotní stabilitu. Nevýhodou je zde omezení pro pracovní tlak na koloně, maximem je 20 MPa. Kolony s tímto typem stacionární fáze jsou využívány především v souvislosti s RP-HPLC.¹

Mezi stacionárními fázemi obsahujícími polymerní složky rozeznáváme dvě velké skupiny¹:

- Stacionární fáze s obsahem polystyrendivinylbenzenu (PS-DVB)
- Stacionární fáze s anorganickými nosiči, pokrytými polymerem

Stacionární fáze využívající PS-DVB jsou využívány pro analýzy proteinů, glykoproteinů a peptidů. Výhodné je zde zvýšení specifického povrchu nosiče. Druhá skupina těchto stacionárních fází je často využívána pro vhodnou kombinaci mechanicky odolného anorganického základu a chemickou stabilního polymeru.

Hybridní stacionární fáze

Hybridní stacionární fáze se svým složením a strukturou velice podobají již zmíněným stacionárním fázím s anorganickými nosiči, pokrytými polymerem. Tyto stacionární fáze se ale navzájem silně odlišují vzájemným uspořádáním použitých složek. Zatímco v prvním případě jsou polymerní složky přítomny pouze uvnitř řetězců anorganické složky (obvykle silikagelu), zde jsou tyto složky přítomny i na povrchu anorganické složky. Jako polymerní složky zde využíváme organosilany. Takto vzniklé stacionární fáze poskytují lepší podmínky především pro analýzu bazických látek.

Stacionární fáze využívající grafitový uhlík

Stacionární fáze využívající přítomnost porézního grafitového uhlíku jsou v porovnání s ostatními zmíněnými druhy stacionárních fází poměrně novou, ne zcela dokonale prozkoumanou možností. Používají se prakticky od devadesátých let dvacátého století.

S úspěchem je možné tento typ stacionární fáze použít pro aromatické sloučeniny a také pro polární sloučeniny. Důvodem je vyšší míra retence těchto látek k povrchu stacionární fáze. Vysvětlován je tento jev přítomností delokalizovaných π -elektronů na povrchu sorbentu.^{1,19}

Další možností využití tohoto typu stacionární fáze jsou analýzy vzorků obsahujících polohové isomery. Proti ostatním druhům stacionárních fází vykazují stacionární fáze s grafitovým uhlíkem vyšší míru selektivity pro jednotlivé sloučeniny.¹⁹

2.5 Instrumentace HPLC

Kromě vysokotlakého čerpadla obsahují HPLC systémy některé další, obvyklé součásti. Pro správné fungování všech částí jako celku je nutno dodržovat výrobcem daná doporučení.

Jakkoli dobrá znalost parametrů jednotlivých součástí bude v případě špatné péče o sestavu bohužel málo platná.

2.5.1 Zásobník mobilní fáze

Zásobník mobilní fáze má v HPLC dvě hlavní funkce. Je to vlastně první část celé sestavy, tudíž první z funkcí především uchovávání látek použitých pro mobilní fáze. Kromě samotného uchování této fáze je ale třeba také zařídit, aby tato fáze nebyla znehodnocena vnějšími vlivy (např. vliv světla, kontaminace okolním prostředím, ...).

Materiál zásobníku je tedy nutné přizpůsobit používané mobilní fázi. Obvyklým materiálem je sklo, které s běžnými mobilními fázemi nepodléhá žádné reakci. Naopak pro mobilní fáze při iontové výměnné chromatografii je upřednostňováno využití umělých hmot. Zásobníky jsou také vybaveny filtry, skrz které je mobilní fáze přiváděna do dalších částí aparatury. Minimalizují možnost poškození chromatografické kolony přítomností tuhých částic.¹

Propojení zásobníku (zásobníků) mobilní fáze a zbytku aparatury obstarávají průtočné spoje, většinou z nerezové oceli nebo z umělých hmot. Hlavním hlediskem je opět požadavek na minimální chemické reakce materiálu spoje s procházející mobilní fází.

Je třeba mít na paměti, že zásobník mobilní fáze by měl být umístěn výše, než je vstup do využívaného čerpadla.¹⁶

2.5.2 Odplyňovací zařízení

Odplyňovací zařízení je do HPLC aparatury zařazeno především k ochraně chromatografické kolony před plynnými látkami, rozpuštěnými v mobilní fázi. Je obvykle zařazeno jako spojovací součást aparatury mezi zásobníkem mobilní fáze a směšovačem mobilních fází.

Odplynění pomáhá předcházet mj. následujícím problémům¹:

- nekvalitní detekce použitého množství mobilní fáze během analýzy
- nepravidelná základní linie chromatogramu a s ní související nepřesnosti ve výpočtech chromatografických charakteristik jednotlivých analytů
- nestability v provozu čerpadel

Principy odplynění, používané v současné době, dělíme do dvou skupin. První, spíše okrajově využívanou je odplynění pomocí probublání helia. Druhou je odplynění pomocí vakua (využití vakuového degaseru). Tato možnost je využívána podstatně častěji, s ohledem na dostupnost a nižší pořizovací náklady. Princip vakuového odplynění spočívá ve využití polopropustné kapiláry. Ta je umístěna uvnitř vakuem vyplněné komory. Díky rozdílu mezi tlaky uvnitř kapiláry a uvnitř komory jsou bublinky plynu postupně z mobilní fáze odváděny.^{1,6}

2.5.3 Vysokotlaké čerpadlo

Čerpadlo, resp. vysokotlaké čerpadlo je zásadní součástí celé HPLC sestavy. Právě zde je generován tlak, pod kterým následně mobilní fáze spolu s analyzovaným vzorkem vstupuje do chromatografické kolony se stacionární fází. Pro potřeby HPLC je třeba vyvinout na procházející mobilní fázi tlak o hodnotě 1 – 100 MPa (v závislosti na konkrétním zvoleném HPLC postupu). Zásadním požadavkem je, aby protékající mobilní fáze přicházela na chromatografickou kolonu stabilním průtokem. Jeho kolísání by mohlo výsledky analýzy znehodnotit.⁶

Rozeznáváme několik typů běžně používaných vysokotlakých čerpadel.¹

Pneumatická čerpadla

Pneumatická čerpadla pracují za využití konstantního tlaku. Důvodem pohybu kapaliny skrze čerpadlo do dalších částí chromatografického systému je síla, vznikající tlakem plynu na zásobník mobilní fáze. Změnou působícího tlaku plynu vyvoláme také změnu rychlosti průtoku mobilní fáze.

S ohledem na rozvoj dalších typů čerpadel se tento typ v současné praxi příliš neuplatňuje. Dosahuje obvykle příliš nízkých hodnot tlaku na mobilní fázi, což brání efektivnímu průběhu analýzy.

Čerpadla injekčního typu

Tento typ čerpadel používá k ovládní plnicího pístu elektromotor. Ten zajišťuje rychlý chod pístu během plnění pracovního prostoru mobilní fází. Vlastní transport mobilní fáze probíhá přesně regulovatelnou rychlostí, následný průtok mobilní fáze skrz kolonu je tak konstantní.

Slabinou tohoto druhu čerpadel je omezený objem pracovního válce čerpadla, což se projevuje nutností vynaložit ke konstantnímu průtoku mobilní fáze více času.

Pístová čerpadla

Také pístová čerpadla pro svůj chod využívají přítomnost elektromotoru. Ten reguluje pohyb pístu. Čerpadlo je doplněno o dva ventily, sací a výtlačný. První jmenovaný nasává mobilní fázi přím ze zásobníku. Následně se tato fáze dostává do prostoru vnitřní komory čerpadla, odkud ji píst (ovládaný elektromotorem) pohání směrem ke druhému ventilu, výtlačnému. Odtud pokračuje mobilní fáze přímo na chromatografickou kolonu.⁶

Výhodou pístových čerpadel je především dosahování vysokých hodnot tlaku na mobilní fázi, až 100 MPa. Naopak nevýhodou jsou projevy střídání jednotlivých fází pohybu pístu. Při stlačování a uvolňování pístu čerpadla může snadno vzniknout pulsní charakter proudění mobilní fáze, což negativně ovlivňuje průběh analýzy.

Membránová čerpadla

Membránová čerpadla pracují na podobném základu jako čerpadla pístová. Rozdíl je ale ve využití další, tzv. hydraulické kapaliny (obvykle olej). Tato kapalina je stlačována prostřednictvím pístu čerpadla. Tento tlak je přenášen na mobilní fázi skrz zabudovanou membránu, neprůchozí pro obě kapaliny. S využitím sacího a výtlačného ventilu je pak mobilní fáze dále distribuována na chromatografickou kolonu.

Vzhledem k přítomnosti membrány a riziku jejího poškození prostřednictvím mobilní fáze je nutné důkladné mechanické očištění mobilní fáze. Toho lze docílit zapojením speciálních filtrů do systému.¹

Ani membránová čerpadla nejsou příliš často používanou variantou. Důvodem je náročnost jejich výroby, stejně jako následná náročnost jejich údržby.

Sériově zapojená dvoupístová čerpadla

Při sériovém zapojení dvoupístového čerpadla je každý z pístů ovládán svým vlastním motorem. Je tak dosaženo vzájemné pracovní nezávislosti těchto pístů.

První píst prakticky slouží především pro plnění pracovního prostoru pro druhý píst. Teprve druhý píst přivádí protékající mobilní fázi na chromatografickou kolonu. Výhodou tohoto

uspořádání je minimalizování projevů střídání plnění a vyprazdňování vnitřního prostoru čerpadla prostřednictvím nepřiměřených tlakových pulsů na mobilní fázi. Tím jsou dvoupístová čerpadla předurčena k širokému použití při HPLC.¹

2.5.4 Dávkovač vzorku

Dávkovač vzorku je součástí HPLC sestavy, která přivádí analyzovaný vzorek přímo do protékající mobilní fáze. Protože přicházející mobilní fáze již prošla čerpadlem, je tedy přivedena pod vysokým tlakem. Předpokladem dobrého dávkovače je odolnost vůči tlaku v aparatuře. I při něm by měl být schopen přesného dávkování vzorku, tak aby bylo minimalizováno zkreslení výsledku.⁶

Nejstarší způsob dávkování vzorků v HPLC spočíval v použití injekčních stříkaček a vhodného septa. Od tohoto principu se s postupem času upustilo, důvodem byla jak postupující automatizace postupu analýzy, tak příchod postupů minimalizujících riziko špatného odměření.

V současné době jsou užívány především dva dávkovací principy: vysokotlaké dávkovací ventily a automatické dávkovače (autosamplery). V praxi nicméně platí, že automatizovat chod analýzy lze u obou zmíněných principů. Výrazně se tím zkracuje doba analýzy například pro velké množství vzorků.

Vysokotlaké dávkovací ventily

Jednotlivé používané druhy dávkovacích ventilů dělíme do dvou skupin. První jsou ventily využívající objem svého vnitřního prostoru a druhou ventily využívající objem své vnitřní smyčky.

V porovnání s četností využití autosamplerů se jedná spíše o okrajově užívanou možnost dávkování.¹

Automatizované dávkovače (autosamplery)

Autosamplery jsou vybaveny jehlou, skrz kterou je přesně odměřený objem vzorku přiváděn do mobilní fáze. Pro dávkování vzorků jsou využívány nádobky o malém objemu (obvykle 2 ml), z nichž jehla nabere potřebné množství vzorku. Tyto nádobky označujeme jako vialky. Jsou vyráběny především ze skla, případně z plastů. Pro izolování vzorku od vlivů

okolí jsou uzavřeny septem, případně zátkou. Skrze tento uzávěr prochází dávkovací jehla. Jednotlivé vialky se vzorky jsou připraveny k použití v zásobníku vzorků.

Podle uspořádání jehly a zásobníku vzorků rozlišujeme tři skupiny autosamplerů¹:

1. Autosamplery s fixní jehlou a pohyblivým zásobníkem vzorků
2. Autosamplery s fixním zásobníkem vzorků a pohyblivou jehlou
3. Autosamplery s fixním zásobníkem vzorků a fixní jehlou

2.5.5 Chromatografická kolona

Chromatografická kolona HPLC sestavy je částí, která obsahuje stacionární fázi. Uvnitř ní tedy dochází vlivem průchodu mobilní fáze k oddělování jednotlivé složky analyzovaného vzorku (jednotlivých analytů).

V současné době je konstrukčním materiálem kolon pro HPLC analýzu především ocel. Důvodem není v tomto případě pouze relativně vysoká chemická odolnost proti obvyklým mobilním fázím. Svoji roli hraje i poměrně snadná opracovatelnost oceli. Kolony se stacionární fází vykazují navenek rozdíly v propustnosti středem kolony a podél vnitřního okraje stěny. Tento rozdíl se ještě zvýší vlivem nerovností vnitřního povrchu kolony. Proto je ocel díky specifickým postupům, zaručujícím téměř dokonale hladký povrch, nejčastějším materiálem pro výrobu pláště kolon. Méně často se lze potkat i s tvrzeným sklem (kolony pro nižší tlaky, cca 20 MPa) a některými polymerními látkami (např. PEEK).¹

Z tohoto materiálu je zhotovena trubice dlouhá 5 – 30 cm. Vnitřní průměr kolony je obvykle v rozsahu 3 – 10 mm. Prostor uvnitř válce je vyplněn stacionární fází. Na obou koncích je kolona uzavřena a utěsněna pomocí porézní kovové frity, tak aby nedocházelo k odnášení stacionární fáze průchodem mobilní fáze. Právě použitá stacionární fáze má rozhodující vliv na výslednou účinnost dané kolony.

Pro vyjádření účinnosti chromatografické kolony byla zavedena bezrozměrná veličina N , označovaná jako počet teoretických pater. Mezi počtem teoretických pater a šířkou píku analytu nepříma úměra, tedy se stoupajícím počtem teoretických pater je pík užší. Čím vyšší je hodnota N , tím je tedy postup analýzy s ohledem na danou součást vzorku účinnější. Blíže se popisu účinnosti chromatografické kolony věnují další kapitoly této práce.⁶

Při průtoku mobilní fáze skrz chromatografickou kolonu se mění mechanická energie mobilní fáze na tepelnou. Tím je kolona ve své délce vystavena různým provozním teplotám, vzniká tu teplotní gradient. Podle jeho směru rozlišujeme teplotní gradient axiální a radiální. Aby nedošlo k ovlivnění retenčních vlastností kolony, je možné zařadit do systému termostat.¹

Chromatografické kolony vyžadují pro co nejdelší životnost dodržování vhodných podmínek nejen při vlastní analýze, ale také mimo ni. V této souvislosti jsou uplatňovány zejména následující zásady¹⁶:

- Kolona se nikdy nenechává vyschnout. Je mnohem vhodnější nechat ji naplněnou doporučenou mobilní fází.
- Pokud je využita kolona pro mód RP-HPLC, bývá lepší v době mimo probíhající analýzy kolonu zaplnit 10 % roztokem propan-2-olu ve vodě. Je tím zabráněno mikrobiálnímu znehodnocení kolony, které by mohlo mít velmi závažný vliv na životnost kolony.
- Nevystavovat kolony nárazům ani jinému nepřiměřenému vnějšímu mechanickému působení. Uvolnění stacionární fáze může kolonu nenávratně poškodit.
- Při uchovávání kolony mimo chromatografický systém dodržovat pokyny stanovené výrobcem, včetně originálních uzávěrů. Mezi různými typy výrobců obvykle nejsou uzávěry kompatibilní.

Protože mechanické poškození využití stacionární fáze může nenávratně poškodit fungování celé kolony, je vhodné využít vícestupňovou ochranu kolony před tímto vlivem. Již bylo zmíněno využití speciálních filtrů v zásobnících mobilních fází. Další možností je před kolonu zařadit předkolonový filtr. Hovoříme prakticky o vyměnitelné kovové fritě, kterou je možné spojit s kolonou buď přímo nebo pomocí kapiláry. Další možností je zapojení předkolony, která se svými parametry značně blíží parametrům vlastní kolony.¹⁶

Životnost kolony lze ovlivnit také regeneračním procesem. Používáme ho zejména pokud byla kolona kontaminována nežádoucí chemickou látkou, kterou je z ní potřeba uvolnit. Obecné doporučení v tomto směru říká, že neexistuje jeden univerzální postup pro regeneraci, který by bylo možné beze zbytku univerzálně využít. Většinou je možné proplachování vhodným rozpouštědlem za využití poloviční průtokové rychlosti

v porovnání s využívanou mobilní fází. K tomu se nejčastěji používá methanol, pro systémy v módu RP-HPLC pak spíše acetonitril.¹⁶

2.5.6 Detektor

Detektor v HPLC systému je součást umístěná za chromatografickou kolonou. Účelem tohoto zařízení je zachytávat změny signálů procházejících látek a tyto informace následně předat dále ke zpracování do datové stanice.

Díky umístění za chromatografickou kolonou mohou detektory zaznamenávat dva typy signálů:

- signál čisté mobilní fáze
- signál mobilní fáze spolu s analytem

S ohledem na výše zmíněný účel detektorů, jsou na tuto součást soustavy kladeny velmi vysoké nároky^{1, 21}:

- odezva pro co nejširší skupinu analytů
- vysoká citlivost na analyty a zároveň nízká citlivost na mobilní fázi
- spolehlivé a snadné využití
- vydrží tlak vyvolaný čerpadlem
- výsledný signál nezávislý na změnách teploty a průtoku
- výsledný signál nezávislý na složení mobilní fáze

Při jejich fungování je využíváno mnoha rozličných principů a mechanismů, podle kterých je můžeme dělit do následujících větších skupin.

Spektrofotometrické detektory

Detektory pracující na principu spektrofotometrie představují v současné době nejpoužívanější skupinu detektorů v HPLC sestavách. Jejich společným znakem je měření absorpance (míra pohlcení světelného toku) procházející mobilní fáze.

V rámci této skupiny detektorů lze dohledat několik typů, které se vzájemně liší svým principem¹:

- detektory měřící při jedné, předem dané vlnové délce paprsku, například detektory využívající jako zdroj záření rtuťovou výbojku

- detektory umožňující nastavení jedné vlnové délky procházejícího paprsku
- detektory schopné měřit spektrum světla v rozmezí předem zadaných vlnových délek paprsků, zpravidla umožňují také změnu vlnové délky paprsku během vlastní analýzy
- detektory vybavené diodovým polem, snímají celé spektrum (v rámci svých hranic snímání), jednotlivé složky procházejícího spektra dopadají na soustavu diod (diodové pole). Informace z diod jsou uloženy do paměti datové stanice. To umožňuje následně porovnat prošlé spektrum při dané vlnové délce s knihovnou spekter.

Refraktometrické detektory

Detektory využívající princip refraktometrie patří mezi nejstarší typ detektorů, používaných v HPLC. Princip detekce spočívá v měření rozdílů mezi indexem lomu čisté mobilní fáze a indexem lomu mobilní fáze nesoucí analyt.

Jejich výhodou je především univerzálnost. Lze je uplatnit na většinu nejrůznějších analytů, bez ohledu na jejich chemickou či fyzikální podstatu. Naopak limitujícím faktorem je v tomto případě nutnost dodržet konstantní teplotu při průchodu mobilní fáze skrz detektor.

Užití refraktometrických detektorů také příliš neprospívá jejich dosahovaná přesnost: v porovnání například se spektrofotometrickými detektory je zde dosahováno detekčního limitu o 3 řády nižšího (10^{-7} g/ml).¹

Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektory patří mezi selektivní detekční zařízení. Jejich použití v HPLC sestavě je tedy vhodné spojit s přítomností dalšího detektoru, například spektrofotometrického.

Využívají principu fluorescence: mobilní fáze je vystavena účinku excitačního elektromagnetického záření. Toto záření následně ve zlomku sekundy sama vyzáří o vyšší vlnové délce, než je vlnová délka excitačního elektromagnetického záření. Vzniká tak emisní záření. Právě emisní záření je rozhodující pro fungování fluorescenčních detektorů. Po jeho dopadu na fotonásobič je předán signál do detekčního zařízení. Případný analyt tedy vykáže jinou hodnotu emisního záření než čistá mobilní fáze.^{1, 22}

Elektrochemické detektory

Využití elektrochemických detektorů je podmíněno předpokládanou přítomností specifických látek, schopných elektrochemické reakce. Tyto látky, unášené mobilní fází, jsou na polarizované elektrodě uvnitř detektoru oxidovány, případně redukovány. Jedná se tak o detektory se specifickým využitím. Zmíněná reakce probíhá uvnitř měrné cely, na rozhraní elektrody a procházející mobilní fáze.

Přes větší množství různých používaných principů mají všechny elektrochemické detektory obdobnou podstatu. Skrz průtokovou cedu detektoru prochází mobilní fáze s analyty. Uvnitř této cely dochází k měření hodnoty určité veličiny, charakterizující procházející elektrický proud. Předpokládáme tak úměrnost mezi látkovým množstvím procházejícího analytu a hodnotou veličiny, charakterizující využití elektrický proud.

Použití elektrochemických detektorů předpokládá vysokou čistotu mobilní fáze. Tyto nároky jsou ale do značné míry vykoupeny vysokou přesností. Ta je u elektrochemických detektorů srovnatelná s fluorescenčními detektory.^{1, 6}

Universální detektory

Logickým požadavkem na detektory je jejich univerzálnost, možnost jejich využití bez ohledu na fyzické a chemické vlastnosti analytů. Skupinou splňující tuto náročnou podmínku jsou tzv. univerzální detektory na bázi aerosolu.

Postup při detekci látek tímto druhem detektorů zahrnuje několik dílčích kroků. V prvním dochází k zamlžení vzorku přicházejícího z kolony. K tomu je využíván dusík, vznikají drobné kapky aerosolu. Ten je veden dále do vyhřívané části detektoru. Zde se kompletně zbaví molekul rozpouštědla, zachovány jsou pouze molekuly analytu. Ty nakonec vstupují do průtokové cely, uvnitř které jsou vystaveny přítomnosti laserového paprsku. Dochází k rozptýlení intenzity dopadajícího světla, kterou je možné měřit.

Funkčnost univerzálních detektorů na bázi aerosolu je podmíněna vybráním správné mobilní fáze. Je třeba volit pouze ty mobilní fáze, které obsahují těkavá aditiva.¹

Bezkontaktní vodivostní detektory

V tomto typu detektorů nedochází k přímému kontaktu elektrod a analyzovaného roztoku. Jsou situovány na vnější stěny kapiláry, která je vyrobena z nevodivého materiálu. Používá

se obvykle čtyř elektrod. Dvě vysílají do vnitřního prostoru kapiláry vysokofrekvenční signál a zbylé dvě tento signál přijímají. Na základě změny v registrování přijímaného signálu systém detekuje jednotlivé analyty.¹

Výhodou tohoto typu detektorů je rozhodně fakt, že bez probíhajících galvanických reakcí nejsou použité elektrody zanášeny a znečišťovány. Používají se například při postupech dělení iontových farmak a aminokyselin. Kromě chromatografických postupů nacházejí využití také v elektroforézních postupech.¹

Další druhy detektorů

Mezi další druhy detektorů řadíme například využití hmotnostního spektrometru jako detektoru chromatografické soustavy. Jejich výhodou je podávání několika druhů informací zároveň. Mimo vlastní chromatografické informace poskytují také spektrální údaje analytů. Velké využití má tento postup zejména v analýzách potravin, při vývoji nových skupin léčiv, nebo dále v oblasti bioanalytického využití.^{1, 16}

Pro kombinaci kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru se používá označení LC-MS. Zmíněné bioanalytické využití zde znamená především analýzy vzorků s velkým množstvím jednotlivých analytů.

Setkáváme se také s využitím chemiluminiscenčních detektorů. Molekuly analytu vyzáří světlo, protože přejdou ze svého excitovaného stavu zpět do svého základního stavu. Tyto detektory jsou využívány především pro detekci konkrétních analytů, např. detektor specifický pro dusík.¹

2.5.7 Sběrač frakcí

Po průchodu analyzovaného materiálu, rozptýleného v mobilní fázi, skrz chromatografickou kolonu a detektor je nutné zařídit také jeho zachycení. HPLC sestavy disponují samostatnými vývody pro použitou mobilní fázi, která prošla chromatografickou kolonou. Jako sběrač frakcí tak může sloužit v podstatě jakékoli laboratorní sklo s adekvátním objemem vzhledem k zamýšlenému použitému množství mobilní fáze. Znehodnocení takto vzniklého odpadního materiálu dále probíhá dle postupů platných pro konkrétní laboratoř.

2.5.8 Datová stanice

Pojmem „datová stanice“ je pro účely HPLC rozuměn klasický stolní počítač, případně notebook. Základním předpokladem pro jeho úspěšnou činnost je možnost propojení s detektorem, potažmo celou sestavou. Protože moderní HPLC sestavy disponují množstvím přístupových portů, nebývá obvykle s propojením těchto částí větší problém.

Programové vybavení datové stanice je samostatným úskalím. Pro kvalitní vyhodnocení dat, získaných vlastní analýzou, je vhodné disponovat také přiměřeným softwarem. Výrobci HPLC sestav (celosvětově například Hewlett Packard a další, lokálně například firma PiKRON²³ a další) obvykle dodávají spolu s vlastní sestavou také balíček doporučených programů k instalaci do datové stanice.

Jednotlivé programy mají v základních rysech mnohé společné. Umožňují ovládat průběh analytického postupu z uživatelsky přívětivějšího prostředí datové stanice. Odpadá tím nutnost obsluhy jednotlivých částí manuálně. Dalším rysem dodávaných programů je možnost nejen data získat, ale zároveň je také vyhodnotit. Protože software pro obě tyto operace je obvykle totožný, vyhodnocení je otázkou několika sekund.

Starší verze dodávaného software se bohužel příliš nezaobíraly otázkou kompatibility s dalším obvyklým software v datové stanici. Pro potřeby současné chemie je ale žádoucí široká kompatibilita například s tzv. kancelářským softwarem (např. Microsoft Office, LibreOffice a mnohé další). Je tedy vhodné pracovat s takovou datovou stanicí, která kromě možnosti řídit a vyhodnotit analýzu poskytuje také možnost exportu dat, případně zpracování také dalším programem.

2.6 Vyhodnocení postupu při HPLC

Výsledným materiálem vzniklým během analýzy postupem HPLC (obecně také i při ostatních instrumentálních chromatografických postupech) je grafické vyjádření složení analyzovaného vzorku vyjádřené křivkou, označovanou jako chromatogram.⁶

Chromatogram zachycuje přítomnost jednotlivých složek vzorku pomocí tzv. píků. Jedná se o jednotlivé úseky chromatogramu, které detektor vyhodnotil jinak než jako čistou mobilní fází. Graficky se tedy jedná o narušení jinak rovné, neměnné linie, znázorňující průtok čisté mobilní fáze.²⁴

Pro správný průběh analýzy je žádoucí, aby byly jednotlivé píky snadno navzájem odlišitelné. Při splnění této podmínky lze za pomoci konkrétních číselných hodnot, charakterizujících jednotlivé píky, usuzovat na přítomnost a množství konkrétních složek v analyzovaném vzorku. HPLC tedy nabízí nejen možnost kvalitativní analýzy vzorku (potvrdit nebo vyloučit přítomnost určité látky), ale také nabízí možnost kvantitativní analýzy (poskytnutí informace o množství konkrétní látky v analyzovaném vzorku).

Retenční charakteristiky

Pod pojmem retenční charakteristiky rozumíme veličiny (a také jimi udávané hodnoty), které vypovídají o průchodu vzorku skrz kolonu se stacionární fází. Řadíme sem především retenční čas a retenční objem.^{1, 6, 16}

Retenční čas je označení pro dobu, která uplyne mezi nastříknutím vzorku do mobilní fáze a dosažením maxima jeho píku na eluční křivce. Označujeme ho t_R . Pro jeho výpočet platí následující matematický vztah:

$$t_{R,i} = t_M + t'_{R,i}$$

Označení t_M používáme pro mrtvý čas kolony. Tím je myšlen retenční čas analytu nezadržovaného na koloně. Člen t'_R značí redukovaný retenční čas, tedy dobu, kterou analyt stráví ve stacionární fázi.

Objem mobilní fáze, která je nutná k průchodu analytu přes celou chromatografickou kolonu je označován jako retenční objem. Značíme ho V_R . Platí pro něj vcelku podobný vztah, jako pro výpočet retenčního času. Pouze místo údajů o čase dosazujeme údaje o objemu:

$$V_{R,i} = V_M + V'_{R,i}$$

Pro označení objemu mobilní fáze, která musí projít celou kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od jejího začátku až na její konec používáme pojem mrtvý objem, značíme V_M . Obdobně redukovaný retenční čas t'_R určujeme také redukovaný retenční objem. Označujeme ho V'_R . Index i ve všech použitých veličinách a výpočetních vztazích odkazuje na fakt, že pro různé analyty tyto veličiny nabývají různých hodnot.

Vzájemným podílem retenčního objemu a retenčního času získáme objemovou průtokovou rychlost mobilní fáze, značíme ji F_m , používanou jednotkou jsou ml/min.

$$F_m = \frac{V_m}{t_m}$$

Kvalitativní vyhodnocení

Při kvantitativním vyhodnocení chromatografického postupu je k vyvození patřičného závěru využíván především retenční čas jednotlivých analytů. Méně často také retenční objem. Z těchto údajů je software datové stanice schopen potvrdit nebo vyvrátit přítomnost konkrétního analytu ve vzorku.^{1, 6, 16}

V poslední době došlo díky zapojení spektrálních detektorů do chromatografických systémů k využití jimi získaných signálů formou kvalitativního vyhodnocení přítomnosti analytu. K tomu je potřeba provést měření spekter neznámých vzorků. Tento postup je následně zopakován se vzorky standardních látek. Výslednou informaci získáme vzájemným porovnáním naměřených spekter.

Kvantitativní vyhodnocení

Při kvantitativním vyhodnocení kolonové chromatografie je matematicky převedena plocha, případně výška vzniklého píku na údaj vypovídající o množství dané látky. Obvykle se jedná o látkovou koncentraci analytu v roztoku.

Toto vyhodnocení obvykle probíhá prostřednictvím dodaného software, který přímo poskytne na základě zadaných parametrů přesné údaje. Aby bylo ale možné takové údaje získat, je třeba si uvědomit princip tohoto vyhodnocení. Samotná informace o píku je pro vyhodnocení konkrétního množství přítomného analytu nedostačující. Je nutné tuto hodnotu porovnat s již známou informací o vztahu vlastností píku a koncentraci analytu. Hovoříme o tzv. relativním vztahu naměřených veličin a jejich vyhodnocení. Pro poskytnutí požadovaných údajů tedy porovnááme naměřené hodnoty s již zjištěnými údaji, tzv. standardem.

Rozeznáváme několik druhů standardů^{1,6}:

- Metoda vnějšího standardu (také bývá označována jako metoda kalibrační křivky). K zajištění dat standardu je potřeba před analýzou vzorku provést měření roztoků téže látky (předpokládaný analyt) o různých koncentracích. Obvykle je použito alespoň tří roztoků s různou koncentrací dané látky, větší počet použitých roztoků

zvysuje spolehlivost získaných údajů. Vzájemná závislost naměřených údajů má nejčastěji charakter lineární funkce. Po zadání hodnot jednotlivých koncentrací u použitých roztoků získává datová stanice matematickou závislost mezi parametry píku a příslušnou koncentrací analytu. S její pomocí je následně možné provádět kvalitativní analýzu vzorku s předpokládaným analytem.

- Metodu přidavku standardu je založena na principu dvojího měření každého vzorku. V prvním případě se jedná o měření vzorku o známém množství. Před druhým měřením se k tomuto vzorku přidá známé množství předpokládaného analytu. Po provedení druhého měření je možné na základě vzájemného rozdílu parametrů píků vzniklých pro téže analyt určovat původní koncentraci analytu v roztoku. Důraz je tedy kladen především na dodržení striktně přesného dávkování vzorku i analytu. Tato metoda doznala několika modifikací. První možností je provést jedno přidání analytu do vzorku. V zájmu dosažení větší přesnosti je ale možné provést několikanásobné přidání analytu. Opět se tím zvýší přesnost vyhodnocení, na úkor prodloužení doby analýzy. Tyto několikanásobné přidávky jsou vždy ve stejném množství přidávaného analytu. Podmínkou je striktně lineární vztah závislosti charakteristiky píku a množství analytu.
- Metoda vnitřního standardu spočívá v přidání velmi specifického standardu jak do vzorku s neznámou koncentrací analytu, tak do vzorku se známou koncentrací předpokládaného analytu. V obou případech se musí jednat o totožné množství přidávaného standardu. Požadavkem na vnitřní standard je, že se bude snadno oddělovat od ostatních složek vzorku a jeho eluce proběhne co nejbližší eluci analytu. Ovšem bez vzájemného splývání píků. Pokud tyto podmínky dodržíme, datová stanice může porovnat parametry píku s neznámou koncentrací analytu vůči píku se známou koncentrací analytu. Při obou měřeních bylo totiž využito stejného množství standardu a lze tak usuzovat že při zachování stejných podmínek je mezi oběma píky analytu matematická závislost.
- Metoda vnitřní normalizace spočívá ve využití tzv. hmotnostního korekčního odezvového faktoru (CRF). K jeho zjištění je nutné provést měření speciálního vzorku. Ten bude obsahovat analyt a referenční látku, vždy o známé koncentraci (c_i a c_s). Systém vyhodnotí signály procházejících látek jako píky s plochou A_i (plocha

píku analytu) a A_s (plocha píku standardu). Následně se stanoví hodnota korekčního odezvového faktoru podle vztahu:

$$CRF = \frac{A_i \cdot c_s}{A_s \cdot c_i}$$

Tato metoda předpokládá stanovení jednotlivých hmotnostních korekčních faktorů pro všechny analyty předpokládané ve vzorku.

Tvary píků

Tvar píku, vzniklého během procesu analýzy, naznačuje mnohé o průběhu postupu. Vypovídá také o věrohodnosti postupu.^{1, 6, 16}

Zásadním faktorem, rozhodujícím o tvaru píku, je hodnota tzv. distribučního koeficientu analytu (K_D). Jeho hodnotu můžeme spočítat jako podíl koncentrace analytu ve stacionární fázi $(c_i)_{SF}$ a v mobilní fázi $(c_i)_{MF}$. Platí tedy následující matematický vztah:

$$K_{D,i} = \frac{(c_i)_{SF}}{(c_i)_{MF}}$$


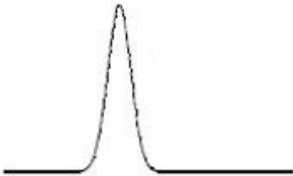
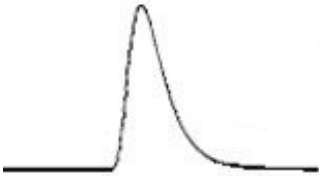
Přibližnou hodnotu distribučního koeficientu analytu lze odhadnout přímo z tvaru píku. Podle něj dělíme píky do tří základních skupin:

Tabulka 5: Rozdělení píků do skupin dle hodnoty distribučního koeficientu.

Označení píku	Hodnota K_D	Tvar píku
Frontující pík	$K_D > 1$	pík je v přední části rozmytý
Gaussovský pík	$K_D = 1$	pík je ideálně symetrický
Chvostující pík	$K_D < 1$	pík je v zadní části rozmytý

Každý z uvedených typů píku se příslušným způsobem projeví také na vzniklém chromatogramu. Základní tvar takových píků zobrazuje následující tabulka:

Tabulka 6: Příklad tvaru vznikajících píků.

		
Frontující pík	Gaussovský	Chvostující pík

Pro správné stanovení jednotlivých píků a následné další výpočty je nutné dosáhnout navzájem nezávislých ploch píků. Ke zjištění míry rozlišení dvou píků je třeba znát pro každý pík jeho šířku při základně (w_a pro pík analytu A, w_b pro analytu B) a hodnoty retenčních časů obou analytů ($t_{R,a}$ pro pík látky A, $t_{R,b}$ pro pík látky B). Pak platí pro výpočet rozlišení dvou píků ($R_{a,b}$) následující vztah:

$$R_{a,b} = \frac{2 \cdot (t_{R,a} - t_{R,b})}{w_a + w_b}$$

Existuje velké množství faktorů, které se podílejí na rozlišení dvou píků. Řadíme sem faktory účinnosti (rychlost toku mobilní fáze, délka kolony, ...), faktory selektivity (změna jednotlivých použitých fází, ...) a faktor kapacity (množství stacionární fáze v koloně, vliv teploty, ...).

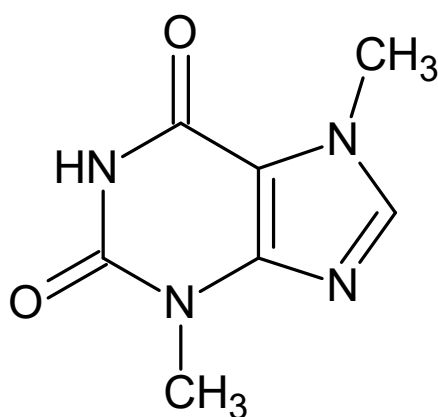
Posouzení účinnosti chromatografické kolony

Aby bylo možné posoudit kolony chromatografických systémů z hlediska účinnosti, je třeba znát hodnoty některých výše uvedených veličin. Z nich je možné spočítat počet teoretických pater konkrétní kolony (označujeme n)^{1, 6, 16}:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2$$

2.7 Kofein

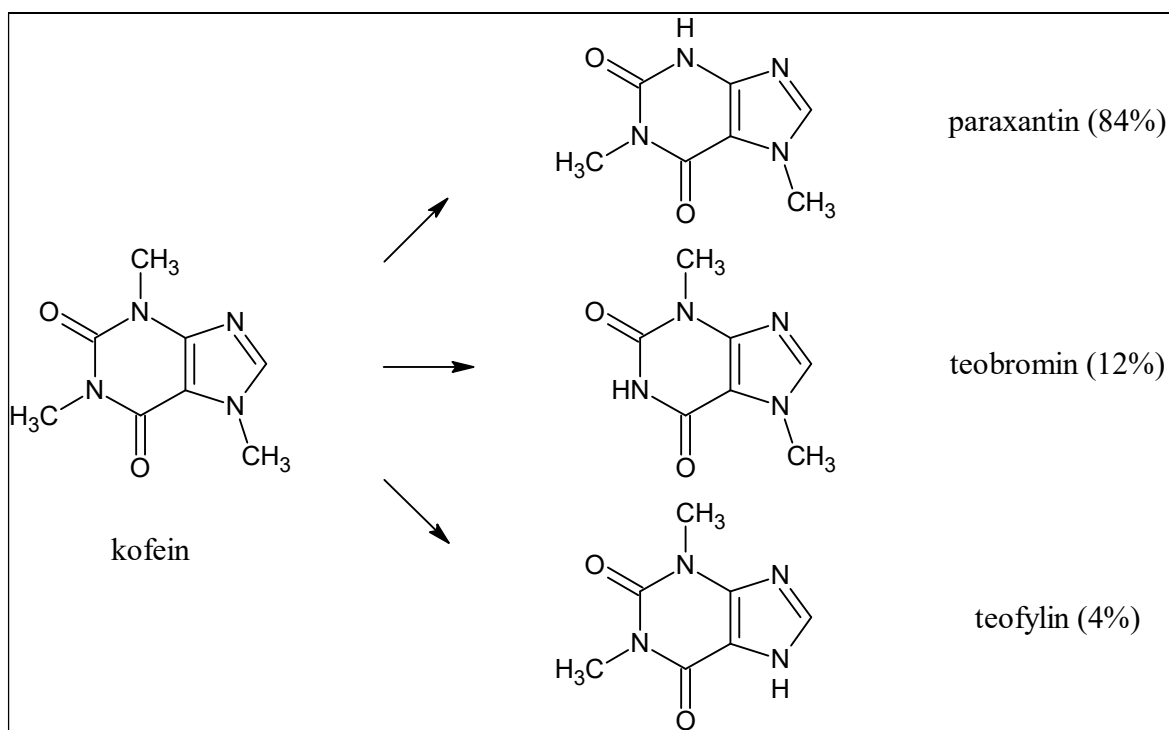
Kofein (plným systematickým označením 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion) je chemická látka náležící do skupiny tzv. methylxantinů, tedy derivátů purinu.



Obrázek 4: Zjednodušený strukturní vzorec molekuly kofeinu

Kofein řadíme díky účinku na lidský organismus mezi stimulační látky (stimulanty). Působí nejen jako psychostimulant, ale zároveň také podporuje činnost dechového a vazomotorického centra.²⁵

Do těla se kofein dostává perorálně, vstřebávání do krevního oběhu probíhá především v žaludku, v nižší míře také v tenkém střevě. Hlavní metabolické zpracování kofeinu probíhá v játrech, kde dochází ke vzniku třech různých metabolitů:



Obrázek 5: Produkty metabolizace kofeinu v lidských játrech.

Účinky kofeinu na lidský organismus bohužel nejsou vždy pozitivní. Jednou z nejhorších vlastností kofeinu je že organismus člověka si na něj při dlouhodobém užívání velmi snadno vytváří návyk. V této souvislosti se proto o kofeinu mluví jako o společensky tolerované droze. Doporučovaná maximální denní dávka kofeinu odpovídá vypití tří šálků kvalitní černé kávy.

Díky výše zmíněným účinkům se kofein řadí mezi látky pro potravinářství velmi atraktivní. Jako zdroj pro jeho následné zpracování slouží především následujících šest druhů rostlin²⁵:

- guarana (*Paulinia cupana*)
- káva (*Coffea arabica*, *C. robusta*)
- maté (*Ilex paraguariensis*)
- kakao (*Theobroma cacao*)
- čaj (*Camellia sinensis*/*Camellia assamica*)
- kola (*Cola acuminata*)

2.8 Zařazení HPLC do výuky v primárním a sekundárním vzdělávání

Na HPLC, potažmo analytickou chemii obecně, je v aktuálně platných vzdělávacích dokumentech základních škol, středních škol i gymnázií pochopitelně kladen vzájemně proměnlivý důraz.

Především, možnosti zařazení tohoto tématu do samotné výuky udávají rámcové vzdělávací programy (RVP), dokumenty vydávané centrálně Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT). Pro jednotlivé typy škol jsou vydávány příslušné RVP (např. RVP pro základní vzdělávání – RVP ZV). Jejich součástí je nejen přehled jednotlivých vzdělávacích oborů, ale také očekávané výstupy v těchto oborech. Jsou zde vymezena i tzv. „průřezová témata“, která svým obsahem zasahují do více vzdělávacích oblastí. V neposlední řadě zde najdeme i tzv. „klíčové kompetence“, tedy jakési očekávané schopnosti a dovednosti, které by si měl žák při konkrétním vzdělávání osvojit.

Jednotlivé školy si následně na jejich základě zpracují školní vzdělávací program (ŠVP). Záleží tedy nejen na aktuálně platném RVP, ale také na zpracování ŠVP. Nezanedbatelnou

rolí pochopitelně hrají i oblasti, kterým se jednotlivé školy dlouhodobě věnují (např. gymnázia se zaměřením na humanitní nebo přírodovědné obory, ...).

Pokud se zaměříme na jednotlivé RVP, zjistíme v souvislosti s využitím analytické chemie ve výuce poměrně zajímavé vzájemné odlišnosti. Ty následně předurčují určité typy škol k většímu důrazu na výuku této problematiky.

2.8.1 RVP pro základní vzdělávání

V základním vzdělávání se prostoru pro HPLC dostává velmi omezeně. Analytická chemie zde není vymezena v rámci vzdělávacího oboru Chemie jako samostatné téma²⁶. Určitý prostor nabízí téma Chemie a společnost, konkrétně učivo léčiva a návykové látky. Očekávaným výstupem je zde využívání látek v praxi (s ohledem na životní prostředí a na zdraví člověka). Pokud ale toto učivo vhodně propojíme například s učivem Částicové složení látek a chemické prvky, nabízí se poměrně zajímavý prostor pro základní informace z oblasti analytické chemie. Vzhledem ke smyslu základního vzdělávání, nelze pochopitelně předpokládat přímé zařazení HPLC do běžné výuky.

RVP ZV je podkladem také pro první část ŠVP víceletých gymnázií, konkrétně pro ročníky odpovídající 6. – 9. ročníku základních škol. Platí zde naprosto stejná pravidla jako pro zmíněné ročníky ZŠ. S přihlédnutím k této skutečnosti se ani zde nenachází příliš prostoru pro zařazení HPLC do výuky. Situace je tak obdobná jako na druhém stupni základních škol.

2.8.2 RVP pro gymnázia

Podle rámcových vzdělávacích programů pro gymnázia tvoří své ŠVP čtyřletá gymnázia a odpovídající ročníky víceletých gymnázií. V těchto typech škol dostává analytické chemie větší prostor v samotné výuce. Předpokládá se využití poznatků z tohoto odvětví při výuce témat Anorganická chemie i Organická chemie²⁷. Očekávaným výstupem je v obou případech schopnost využít znalostí základu kvalitativní i kvantitativní analýzy pro pochopení jejich praktického významu.

2.8.3 RVP pro střední odborné vzdělávání

Vzhledem k velmi širokému spektru škol patřících do této skupiny vzdělávacích institucí jsou obory středního odborného vzdělávání rozděleny do několika kategorií. Každá kategorie má sdružovat, pokud možno, zaměřením a zakončením podobné obory. Velké rozdíly zde

najdeme nejen mezi jednotlivými kategoriemi, ale občas i přímo u oborů uvnitř těchto kategorií. Je to ale logický důsledek odlišnosti například výučních oborů a studijních oborů zakončených maturitní zkouškou.

Z jednotlivých kategorií středního odborného vzdělávání najdeme nejvíce oborů vzdělání přímo vyžadujících zařazení témat z analytické chemie mezi obory kategorie M a L (obory zakončené maturitní zkouškou). Patří sem například obory Ekologie a životní prostředí, Aplikovaná chemie a Analýza potravin. Už samotné RVP pro tyto obory předpokládají zahrnutí učiva základů analytické chemie, jakkoli není přímo požadavek na uplatnění HPLC v uveden²⁸. Protože se ale jedná o jednu ze základních analytických metod, je seznámení se s jejím principem velmi vhodné.

Za povšimnutí ale také stojí, že požadavky na učivo analytické chemie mají i RVP pro některé obory s výučním listem. Najdeme je v kategorii H. Jedná se například o obor Chemik. Zde jsou v obsahovém okruhu Chemická kontrola jako předpokládané výsledky vzdělávání uvedeny například následující požadavky²:

- Žák charakterizuje základní instrumentální metody
- Žák provádí analýzu vzorků instrumentální metodou vhodnou pro příslušné chemické odvětví

Takto rozsáhlé znalosti v problematice analytické chemie vyžadují nejen kreativní přístup ze strany učitele, ale také dostatečné materiální zajištění pro provádění měření a analýz. I zde však platí, že konkrétní metody chemické analýzy nejsou přímo v RVP nikterak jmenovány nebo vybrány.^{2, 28}

2.8.4 Další rámcové vzdělávací programy

Záměrně pominutým je RVP pro předškolní vzdělávání. Pro děti ve věku cílové skupiny tohoto RVP nelze o zařazení analytické chemie, tím spíše HPLC vůbec uvažovat.

Mimo výše zmíněný RVP existují ještě některé další, určené specifickým typům škol, například RVP pro gymnázia se sportovní přípravou a RVP pro obor vzdělání základní škola speciální. Protože se jedná o specifické a spíše ojedinělé druhy základních škol, středních škol a gymnázií, tato práce se jimi blíže nezabývá.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 HPLC analýza kofeinu

Po prozkoumání teoretických aspektů HPLC a vybrání kofeinu jako ideální látky z hlediska možného využití při HPLC byla provedena pokusná analýza vzorku obsahujícího kofein. Pro získání kvalitativních informací byl použit retenční čas t_R , pro kvantitativní informace retenční objem V_R .

Analýza proběhla v módu RP-HPLC. Jako součástí chromatografického systému bylo využito:

- Chromatografická sestava: Hewlett Packard HPLC Modules 1050 series
- Kolona: GraceSmartTM Column s chemicky vázaným alkylem C₁₈, průměr kolony 4,6 mm, délka kolony 150 mm.
- Detekce: DAD detektor při použití vlnové délky 270 nm, referentní hodnota 550,1 nm
- Nástřik vzorku: dávkování pomocí autosampléru s pohyblivým zásobníkem a fixní jehlou, objem použitého vzorku 20 μ l
- Průtoková rychlost mobilní fáze: 1,5 ml/min

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu (v kvalitě pro HPLC) a destilované vody v poměru 1:1. Vzorkem byl roztok kofeinu v destilované vodě, koncentrace tohoto roztoku byla 100 mg/l.

Za výše popsaných podmínek a při použití popsaných součástí chromatografické sestavy došlo k zaznamenání signálu kofeinu v retenčním čase 1,496 minut. Shodného retenčního času bylo dosaženo také při následném použití dalších dvou vzorků stejného roztoku. Kvalitativní informace o vzorku obsahujícím kofein tedy již bylo možné získat.

Pro možnost získávání kvantitativních informací o vzorku kofeinu bylo využito metody vnějšího standardu, tedy sestavení kalibrační křivky. K tomuto účelu byl původní zásobní roztok kofeinu o koncentraci 100 mg/l zředěn na koncentrace 25 mg/l, 50 mg/l a 75 mg/l. Následně byly z těchto roztoků připraveny vzorky pro analýzu za stejných podmínek, jako původní roztok s koncentrací 100 mg/l. Údaje z jednotlivých vzorků byly vloženy do

kalibrační křivky a následně použity ke změření koncentrace kofeinu v původním roztoku (koncentrace 100 mg/l). Při tomto měření dosahovaly hodnoty retenčních objemů a následně přepočtené koncentrace kofeinu ve vzorku předpokládaných hodnot.

Záznam z měření vzorků pro přípravu kalibrační křivky je součástí práce jako příloha číslo 1. Z důvodu využití staršího typu software nebylo bohužel možné dosáhnout kvalitnějšího exportu chromatogramů.

3.2 Příprava úlohy využívající HPLC

Po vybrání vhodné modelové látky a nalezení možného postupu bylo nutné navrhnout s dostupnou HPLC aparaturou ideální modelovou úlohu. S ohledem na charakter využití úlohy (příprava budoucích pedagogů) bylo nutné splnit především následující cíle:

- Úloha musí být opatřena přehledným návodem. Dále bude dostatečně srozumitelný i studentům, kteří se s HPLC nikdy nepotkali.
- Úloha by měla se měla zaměřit především na využití HPLC v reálné situaci.
- Úloha by neměla přinášet neúměrně velké množství nových poznatků. Měla by spíše umožnit spojení teoretického základu HPLC s jeho reálným využitím.

Úloha byla koncipována pro studenty, kteří již absolvovali základní kurz analytické chemie. U nich lze předpokládat, že informace, které získají při laboratorní úloze s HPLC, úspěšně spojí s již osvojenými teoretickými informacemi. I přesto bylo zadání úlohy doplněno o náskres sestavy pro HPLC a základní fakta z této oblasti. Studenti pracovali ve dvojicích.

Na radu vedoucí práce byla modelová úloha rozdělena na dvě navazující části:

1. Příprava HPLC aparatury pro analýzu vzorku kofeinu o neznámé koncentraci.
2. Vlastní analýza vzorku obsahujícího kofein.

V první části bylo úkolem studentů připravit roztoky kofeinu o různé molární koncentraci. S jejich pomocí následně vygenerovat v ovládacím zařízení kalibrační křivku. Teprve poté přišlo na řadu měření koncentrace kofeinu v neznámém vzorku.

Aby se předešlo zbytečným prodlevám, otestoval autor úlohu ještě před samotným provedením studenty. Vzhledem k možnostem ovládnutí HPLC sestavy prostřednictvím řídicí jednotky bylo možné celý postup zvládnout do 25 minut, včetně vyhodnocení

koncentrace kofeinu v neznámém vzorku. Studentům byl následně předložen návod, který využíval menší míru automatizace (namísto kontinuálního rozboru tří vzorků ihned po sobě bylo upřednostněno třikrát připravit vzorek a následně ho analyzovat).

Při pokusném provádění úlohy se ukázala jako klíčový faktor manuální zručnost studentů. Navažování krystalického kofeinu pro jednotlivé kalibrační roztoky nebylo z časových důvodů možné. Z tohoto důvodu byl pro tvorbu kalibračních roztoků použit zásobní roztok kofeinu. Stejně jako při zkoušení úlohy autorem, koncentrace kofeinu v zásobním roztoku byla 100 mg/l. Ten byl dále ředěn, každá dvojice si tak připravila tři kalibrační roztoky o různých koncentracích kofeinu.

Vytvořit v řídicí jednotce kalibrační křivku následně nebylo pro jednotlivé dvojice větším problémem. Jednalo se sice mnohdy o jednu z prvních zkušeností s kolonovou chromatografií. I přesto připravené vzorky vykazovaly předpokládané údaje.

Následný rozbor vzorku s neznámou koncentrací kofeinu proběhl taktéž bez větších problémů. Retenční charakteristiky korespondovaly s hodnotami na kalibrační křivce. Řídicí jednotka poté sama vyhodnotila koncentraci kofeinu.

3.3 Úprava návodu k navrhované úloze

Ze pokusného provedení úlohy vyplynula některá nová zjištění:

1. Před provedením úlohy je velmi vhodné připomenout zásady práce s automatickou pipetou. Také zdůraznit, že špičky na tuto pipetu jsou jednorázové a nesmí dojít k vzájemné kontaminaci vzorků. Následné kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení analyzovaných vzorků by ztratilo na přesnosti.
2. Studentům nebylo vždy dostatečně zřejmé sestavení HPLC sestavy, respektive rozpoznání jejích jednotlivých součástí.
3. Studenti sami upozornili na zdlouhavý pracovní postup (postup obsahuje komentář, jak krok po kroku ovládat datovou stanici chromatografické sestavy).

Při přípravě konečného zadání bylo přihlédnuto k výše zjištěným faktům. Do návodu byla vložena informace o nutnosti vyměňovat jednorázové špičky automatické pipety. Do návodu bylo také přidáno základní schéma aparatury používané při HPLC. Vzhledem k použité verzi software byl zachován zápis postupu při ovládání datové stanice. Dílčí úpravou v tomto

směru byla grafická úprava návodu, tak aby bylo dosaženo větší přehlednosti. Vzniklý materiál je součástí této práce jako příloha č. 2.

4 DISKUSE

Práce si kladla za cíl především poskytnout náhled to teoretického základu HPLC. Při splnění tohoto úkolu bylo nutné velmi pečlivě třídit získané informace mezi opravdu základní informace a některá okrajová nebo nadstavbová témata. Například předložený systém běžně užívaných módů práce při HPLC rozhodně neplní funkci celkového přehledu. Omezil se na opravdu nejběžnější postupy. Dalším hledání uzpůsobení principu HPLC, vedoucí ke vzniku nového pracovního módu, probíhá kontinuálně i v současné době. Tato oblast byla zmíněna v části věnované aktuálně diskutovaným otázkám v oblasti HPLC. Lze proto právem v brzké době očekávat nejen zařazení aktuálně nových módů do skupiny běžně používaných, ale také vyvinutí zcela nových pracovních módů.^{1,16}

O velké míře využití jednotlivých prvků HPLC a vůbec kapalinové chromatografie svědčí například velké množství závěrečných prací studentů vysokých škol, které se této problematice věnují. Nemusí se vždy nutně jednat o práce v oboru chemie, ani tato práce není koncipována jako čistě chemicky odborná, je spíše na pomezí vědeckého oboru chemie a pedagogického uplatnění tohoto oboru v učební praxi.^{3,7,8,18}

Součástí předložené diplomové práce je návrh laboratorní úlohy. Tato úloha je zpracována za předem dané instrumentace, na které nebylo z finančních důvodů možné měnit jednotlivé díly chromatografického systému. Smyslem této práce nicméně bylo především poskytnout úlohu vhodnou pro vzdělávání budoucích učitelů. V takovém případě je na prvním místě požadavek dostatečné názornosti, tak aby laboratorní práce nebyla neúměrně časově náročná a zároveň poskytla snadno získatelná a vysvětlitelná data.

Navrhnutá laboratorní úloha je v mnoha ohledech silně specifická. Už zaměřením na budoucí učitele chemie se předpokládá, že bude ideálním kompromisem mezi odborně dostatečně náročnou úlohou a zároveň natolik názornou, aby se po jejím absolvování tito budoucí učitelé s metodou HPLC dostatečně seznámili. Při zachování navržených parametrů by měly být obě tyto podmínky splněny. Mezi úskalí realizace sice patřila například verze software používaného v datové stanici, tím by se ale neměl nechat žádný z budoucích učitelů odradit. S ohledem na pokračující rozvoj informačních technologií lze předpokládat postupné nahrazení novějším typem datové stanice v brzké době. Informační technologie významně pomáhají posunovat kvalitu školství v globálním měřítku. Nesnažit se je tudíž využívat

z důvodu zdánlivé zastaralosti je tak poněkud alibistický počin. Stejně tak se spoléhat na možnost, že práci spojenou s těmito učebními prostředky obstará někdo jiný.

Při dalším rozvinutí úlohy by proto jako další krok mohlo následovat upravení parametrů analýzy tak, aby se přítomnost kofeinu projevila pomocí píku s nižší hodnotou retenčního času. Dosažený retenční čas pro molekuly kofeinu nicméně dosahuje přijatelných hodnot, k detekci dochází zhruba v době po 1,5 minuty od začátku analýzy. Analýzu je následně možné například v čase 2 minuty ukončit, čímž pohodlně získáme požadovaná data. Při využití plné automatizace můžeme naprogramovat analýzu série vzorků tak, že získávání dat například pro kalibrační křivku může zabrat necelých 10 minut, v závislosti na počtu vzorků.

Další možností, jak ovlivnit charakter úlohy, je využít vzorků bez obsahu kofeinu. Na základě analýzy by měl tento vzorek vykazat nulovou koncentraci této látky. Také tato data by měl být schopen budoucí učitel chemie vysvětlit. Případně využít vzorků s obsahem jiných látek, než je kofein. Změna v retenčním času by měla vést k zamyšlení nad chemickým složením analyzovaného vzorku a vyvození patřičného závěru.

Z hlediska spektra možných sloučenin, které lze pomocí HPLC analyzovat, se využití RP-HPLC jeví jako jedna z výhodných možností zařazení instrumentální chemické analýzy do výuky. Ovlivněním polaritativy mobilní fáze lze nastavit vhodné podmínky pro separaci a eluci většího množství látek než u většiny ostatních, specializovaných metod. Ty jsou obvykle zaměřeny na více specifickou oblast látek.¹

Dále je tedy určitě na místě uvažovat o konkrétní obměně modelové látky, rozšířit možnosti použití RP-HPLC ve školní praxi. Jako velmi vhodná se jeví analýza rostlinných fotosyntetických barviv. Podobně jako v případě kofeinu i zde se jedná o látky, se kterými se žáci setkají na většině škol v primárním i sekundárním vzdělávání. Znalost základního principu fotosyntézy je vyžadována již u žáků v období mladšího školního věku. Navíc fotosyntéza má z hlediska zařazení do výuky velmi silnou pozici z důvodu celkového náhledu na funkci tohoto děje. Fotosyntéza je jevem, který se obsahem dotýká jak chemie, tak biologie. Částečně také fyziky. I průřezové téma environmentální výchova předpokládá alespoň částečnou znalost problematiky. Tyto aspekty vedou k zamyšlení nad otázkou, zda u takto často zmiňovaných látek opravdu není lépe neomezit se jen na podání teoretických informací. Pokusit se alespoň demonstrovat, že pojem „fotosyntetické barvivo“ neznamená

pouze chlorofyl, ale také pomocná fotosyntetická barviva. Jakkoli existuje více možností, jak chromatograficky rostlinná fotosyntetická barviva rozložit, při vybavení školy pro kapalinovou chromatografií bych rozhodně o tomto typu analýzy reálně uvažoval.^{2, 25, 26}

Jak již bylo zmíněno v části věnované RVP, osvojení základních dovedností z analytické chemie se očekává zejména u žáků středních škol a gymnázií. Je samozřejmě na každé škole, jakým způsobem bude s tímto požadavkem naloženo. S ohledem na finanční možnosti škol je mnohdy nutné hledat jednoduché, ale zároveň dostatečně názorné možnosti, jak předat požadované znalosti a dovednosti.

HPLC se tak zdánlivě může jevit jako jakýsi zbytečný „luxus“ pro potřeby současného školství. Je pravdou, že pořizovací náklady nové HPLC sestavy (včetně chemikálií a všech vedlejších výdajů) jsou vskutku vysoké. Mnoho odpovědných osob při zvažování investice v řádech desetitisíců až statisíců korun usoudí, že tyto prostředky by bylo možné vynaložit účelněji.

Otevírá se ale šance využití grantových programů. V současné době je pro vybavení škol prostředky pro rozvoj přírodovědné gramotnosti vypisováno každoročně několik grantových programů. Podání žádosti sice neznamená automatický nárok na finanční prostředky, při vhodném sepsání žádosti a odůvodnění se může podařit na požadované finanční prostředky dosáhnout. Navíc i v případě nedosažení na finanční podporu existuje stále možnost opětovného využití žádosti v dalších grantových akcích, pochopitelně s možnými patřičnými úpravami.²⁹

Pravdou také je, že současné doba klade na žáky stále vyšší nároky s ohledem na množství informací z nejrůznějších oborů. Úkolem školy, v širším měřítku všech vzdělávacích institucí, by tak mělo být nejen vybavit žáky skutečnostmi a dovednostmi, ale především dokazovat žákům jejich užitečnost v budoucím profesním i osobním životě. Jakkoli se výuka chemie na základních a středních školách setkává ze strany žáků mnohdy s velmi nízkou mírou oblíbenosti, je nutné pokusit se tento trend co nejrychleji a také nejefektivněji zastavit. Chemie je mnohdy prezentována pouze jako teoretická věda, která má k praktickému využití velmi daleko. Jedná se sice převážně o pozůstatek z nepříliš vhodné učební praxe poslední doby. Aktuální trendy ve výuce přírodních věd ukazují, že pro smysluplnou výuku je potřeba dosáhnout aktivního zapojení žáků do učebního procesu. Nedělat z něj pouze pasivního

diváka a posluchače. Ani sběratele popsaných sešitů. Je třeba podnítit zájem a chuť se vzdělávat. Aktivizační metody spočívající například v zařazování skupinové výuky jsou v mnoha zemích světa úspěšně aplikovanou možností, jak se zmíněným trendem úspěšně bojovat. Ve svém důsledku by mělo vzdělání v oboru přírodních věd poskytnout žákům souhrn znalostí i dovedností, které bude umět využít také v reálném životě, nejen za zdmi školy.^{26,27}

Kombinace jednoduchých pokusů a například exkurze či přímo laboratorní práce na pracovišti, které je vybaveno potřebou technikou, může tento nelehký úkol značně usnadnit. I poměrně nenáročný pokus, jako například chromatografický rozklad barvy fixu pomocí ethanolu pomáhá pochopení podstaty chromatografie. O něco náročnější je s pomocí využití tenkovrstvé chromatografie rozložit rostlinná fotosyntetická barviva. Ani tento pokus není v podmínkách současných škol nerealizovatelný a opět posouvá pochopení chromatografie jako cenné analytické metody. Ačkoli tím není využit přímo princip HPLC.³⁰

5 ZÁVĚR

Prvním hlavním cílem této práce bylo poskytnout přiměřené množství informací především v teoretických aspektech analytické metody HPLC. Věnovat se nejen principu této metody, ale také instrumentaci při její realizaci. Neopomenout ani hlavní typy používaných mobilních a stacionárních fází.

Druhým hlavním cílem bylo vytvořit učební úlohu, která budoucí učitele chemie seznámí s principem fungování HPLC. Měla by zahrnout jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu pomocí HPLC. Pro její vytvoření bylo zapotřebí zvážit možnosti dostupné chromatografické sestavy. K získání vhodných podmínek pro analýzu bylo nutné nejprve vyzkoušet postup a výsledky analýzy na dané chromatografické sestavě. Dále vybrat vhodnou modelovou sloučeninu, kterou mohou učitelé ve výuce využít také v dalších souvislostech. Na základě vlastního postupu následně navrhnout znění úlohy a vhodné parametry pro HPLC analýzu.

Oba tyto hlavní cíle se podařilo splnit. Práce obsahuje základní fakta z oblasti jak přímo HPLC, tak z oblasti vyhodnocení chromatografického postupu. Návod pro sestavenou úlohu je součástí předložené práce jako příloha ve dvou provedeních. Jako příloha číslo 2 je přiložen návod pro bakalářské studenty Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy, určený k vyzkoušení laboratorní úlohy. Příloha číslo 3 je úprava návodu na základě zjištěných nedostatků. První přílohou je dokumentace postupu analýzy vzorku kofeinu při přípravě laboratorní úlohy. Zobrazuje chromatogramy tří vzorků roztoku kofeinu.

V průběhu zpracování práce bylo postupně nutné pozornost věnovat také možnosti zařazení HPLC do výuky při primárním a sekundárním vzdělávání. K tomuto účelu byl vypracován základní rozbor aktuálně platných rámcových vzdělávacích programů. Závěrem zde je zjištění, že zařazení HPLC do učební praxe je vyžadováno jen v některých případech sekundárního vzdělávání. Zde však má svoji nezastupitelnou pozici.

6 PŘEHLED POUŽITÝCH VZORCŮ, ZKRATEK A ZNAČEK

Chemické látky

Použité označení	Název látky
Al_2O_3	Oxid hlinitý, alumina
$\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Hydratovaná forma oxidu hlinitého
C_{18}	Oktadekan
C_8	Oktan
H_2O	Voda
ODS	Oktadecylsilikagel
PEEK	Polyetheretherketon
PS-DVB	Polystyrendivynylbenzen
$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Hydratovaná forma oxidu křemičitého, silikagel
TiO_2	Oxid titaničitý
ZrO_2	Oxid zirkoničitý

Módy a typy chromatografických postupů

Použité označení	Český název módu nebo typu chromatografie
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
GPC (SEC)	Gelová chromatografie
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
HIC	Hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HTLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě
IEC	Iontově výměnná chromatografie
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
micro-LC	Mikrokapalinová chromatografie
nano-LC	Nanokapalinová chromatografie
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálním uspořádáním fází
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzním uspořádáním fází
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	Vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie

Veličiny a jejich jednotky

V tabulce jsou uvedeny pouze veličiny a jednotky, které nejsou blíže popsány ve vlastním textu práce.

Použité označení	Název veličiny nebo jednotky
c	molární koncentrace, rovnovážná koncentrace
cm	centimetr
g	gram
K_D	distribuční koeficient
K_{Nc}	Nernstův rozdělovací koeficient
l	litr

m^2	metr čtvereční
min	minuta
ml	mililitr
MPa	megapascal
t_R	retenční čas
V_R	retenční objem
μm	mikrometr
μmol	mikromol

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [2] Rámcový vzdělávací program pro obor vzdělávání 28 – 52 – H/01 Chemik. [online]. Praha: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy, 2008. 69 s. [cit. 2016-12-09]. Dostupné online: <<http://zpd.nuov.cz/RVP/H/RVP%202852H01%20Chemik.pdf>>.
- [3] FUKSOVÁ, Hana. Aplikace metody HPLC ke stanovení methylxanthinů v potravinách. Separace nukleotidů metodou HPLC. Brno, 2008. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně. Vedoucí práce Marta Farková.
- [4] ALI, Imran, Hassan Y. ABOUL-ENEIN a Jack CAZES. A JOURNEY FROM MIKHAIL TSWETT TO NANO-LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Journal of Liquid Chromatography*. 2010, 33(5), 645-653 [cit. 2016-12-09]. ISSN 10826076.
- [5] ZOLOTOV, Yu A. The Centenary of Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. 2003, 58(8), 703-705 [cit. 2016-12-09]. ISSN 10619348.
- [6] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [7] TOLASZ, Jakub. Různé metody přípravy kapilárních kolon plněných Sephadexem pro gelovou chromatografii [online]. Praha, 2013 [cit. 2016-12-09]. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Vedoucí práce Pavel Coufal.
- [8] ZEMEK, Ondřej. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie. ; vedoucí práce Jaroslav Mácha. 2010 [cit. 2016-12-09].
- [9] TOMIĆ, Tatjana a Nada Uzorinac NASIPAK. Development of a method for the determination of the blue dye in gas oils by hyphenated np-hplc/dad system. *Goriva i Maziva*. 2015, 54(2), 101-107 [cit. 2016-12-09]. ISSN 0350350X.
- [10] BHINGE, Somnath D., Sharangouda M. MALIPATIL a Lalit V. SONAWANE. Bioanalytical Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Cefixime and Dicloxacillin by RP-HPLC in Human Plasma. *Acta Chimica Slovenica*. 2014, 61(3), 580-586 [cit. 2016-12-09]. ISSN 13180207.

- [11] DUGO, G., T.M. PELLICANO, L. LA PERA, V. LO TURCO, A. TAMBORRINO a M.L. CLODOVEO. Determination of inorganic anions in commercial seed oils and in virgin olive oils produced from de-stoned olives and traditional extraction methods, using suppressed ion exchange chromatography (IEC). *Food chemistry*. 2007, 102(3), 15 - 25 [cit. 2016-12-09]. ISSN 03088146.
- [12] HETTIYADURA, A. P. S., E. A. STONE, S. KUNDU, Z. BAKER, E. GEDDES, K. RICHARDS a T. HUMPHRY. Determination of atmospheric organosulfates using HILIC chromatography with MS detection. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2015, 8(6), 2347-2358 [cit. 2016-12-09]. ISSN 18671381.
- [13] HAJ HASSAN, Maya, Danièle KLETT, Claire CAHOREAU a Yves COMBARNOUS. Straightforward isolation of phosphatidyl-ethanolamine-binding protein-1 (PEBP-1) and ubiquitin from bovine testis by hydrophobic-interaction chromatography (HIC). *Journal of chromatography*. 2011, 879(27), 56 - 63 [cit. 2016-12-09]. ISSN 15700232.
- [14] MARTÍNEZ-GIRÓN, Ana Belén, María Luisa MARINA a Antonio L. CREGO. Chiral separation of a basic drug with two chiral centers by electrokinetic chromatography for its pharmaceutical development. *Journal of Chromatography*. 2016, 67(14), 427-435 [cit. 2016-12-09]. ISSN 00219673.
- [15] FABRONI, S., G. BALLISTRERI, M. AMENTA a P. RAPISARDA. Anthocyanins in different Citrus species: an UHPLC-PDA-ESI/MSⁿ-assisted qualitative and quantitative investigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016, 32(7), 4797 - 4808 [cit. 2016-12-09]. ISSN 10970010.
- [16] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [17] Monolitické kolony. HPLC.CZ [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm
- [18] SLANINOVÁ, Jana. *Studium možností využití stacionárních fází na bázi oxidů kovů pro analýzu polárních látek* [online]. Hradec Králové, 2014 [cit. 2016-12-09]. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Petra Kovaříková.

- [19] VONDRÁŠKOVÁ, Lucie. Hodnocení mikonazolu a metronidazolu v přípravku pomocí HPLC [online]. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016 [cit. 2016-12-09]. Diplomová práce. Vedoucí práce Petr Kastner.
- [20] SÝKORA, D., M. VOSMANSKÁ, M. ZVOLÁNKOVÁ a E. TESAŘOVÁ. Modern stationary phases for RP-HPLC. *Chemicke Listy* [online]. 2007, 101(3), 190 - 199 [cit. 2016-12-09]. ISSN 00092770.
- [21] SNYDER, Lloyd R. Introduction to modern liquid chromatography. 3. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 9780470167540.
- [22] ZHAO, Xubo, Yahong YUAN, Xiaolin ZHANG a Tianli YUE. Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup. *Food Control*. 2014, 46(7), 332-337 [cit. 2016-12-09]. ISSN 09567135.
- [23] About PiKRON company. *Pikron* [online]. Praha: PiKRON, 2016 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <http://www.pikron.com/pages/company.html>
- [24] Separace na chromatografické koloně. *HPLC.CZ* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/resolution.html>
- [25] SEĎOVÁ, Karolína. Vliv vybraných biologicky aktivních přírodních látek rostlinného původu na energetický metabolismus savců [online]. Praha, 2014 [cit. 2016-12-09]. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta University Karlovy. Vedoucí práce Pavel Flachs.
- [26] Rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání. [online]. Praha: MŠMT, 2016. 164 s. [cit. 2016-12-09]. Dostupné online :<<http://www.nuv.cz/t/rvp-pro-zakladni-vzdelavani>>
- [27] Rámcový vzdělávací program pro gymnázia. [online]. Praha: Výzkumný ústav pedagogický v Praze, 2007. 100 s. [cit. 2016-12-09]. Dostupné online: <http://www.vuppraha.cz/wp-content/uploads/2009/12/RVPG-2007-07_final.pdf>. ISBN 978-80-87000-11-3.
- [28] Rámcový vzdělávací program pro obor vzdělávání 16 – 01 – M/01 Ekologie a životní prostředí. [online]. Praha: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy, 2008. 84 s. [cit. 2016-12-09]. Dostupné online: <

<http://zpd.nuov.cz/RVP/ML/RVP%201601M01%20Ekologie%20a%20zivotni%20prostredi.pdf>>

- [29] Výzva k předkládání žádostí o podporu. [online]. Praha: Hlavní město Praha, odbor evropských fondů, 2016. 14 s. [cit. 2016-12-09]. Dostupné online: http://penizeproprahu.cz/wp-content/uploads/2016/10/Text-vyzvy_020_4.1_-final.pdf
- [30] SOLÁROVÁ, Marie a Václav MARTÍNEK. Netradiční experimenty z organické a praktické chemie: Přírodní materiály, neobvyklá uspořádání a pomůcky. Praha: Universita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2007. ISBN 978-80-86561-81-3.

8 SEZNAM PŘÍLOH

1. Chromatogramy vzorků obsahujících 3 odlišné koncentrace kofeinu
2. Konečný návrh návodu k laboratorní úloze využívající princip HPLC