

**SROVNÁNÍ KOLON PRO SEPARACI**  
**FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH LÁTEK**  
**METODOU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ**  
**CHROMATOGRFIE**

Diplomová práce

Jana Vacková, studijní program Farmacie,

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

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

V Českém Těšíně dne :

Jana Vacková

Za pomoc při tvorbě diplomové práce bych chtěla poděkovat pracovníkům Katedry Analytické Chemie, především panu PharmDr. Petru Chocholoušovi, PhD.

**Obsah:**

	Seznam použitých zkratk	6
	Seznam obrázků	7
	Seznam tabulek	9
1.	Úvod a cíl	11
1.1.	Úvod	11
1.2.	Cíl práce	11
2.	Teoretická část	12
2.1.	Sekvenční injekční analýza	12
2.1.1.	Systém SIA a jeho součásti	12
2.1.2.	Využití SIA v praxi	14
2.2.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	18
2.2.1.	Systém HPLC a jeho součásti	18
2.2.2.	Využití HPLC v praxi	23
2.3.	Sekvenční injekční chromatografie	25
2.3.1.	Systém SIC a jeho součásti	25
2.3.2.	Využití SIC v praxi	26
2.4.	Částicové kolony core-shell	27
2.5.	Fenolické kyseliny	32
3.	Praktická část	34
3.1.	Použité přístroje, chemikálie, příprava vzorků a mobilních fází	34
3.1.1.	Použité přístroje	34
3.1.2.	Použité chemikálie	34
3.1.3.	Příprava mobilních fází	35
3.1.4.	Příprava vzorků	35
3.1.5.	Schéma použitého SIC přístroje	36
4.	Výsledky a diskuze	37
4.1.	Vývoj metody	37
4.1.1.	Výběr mobilní fáze	37
4.1.1.1.	Kolona C18	37
4.1.1.2.	Kolona RP-Amide	41
4.1.1.3.	Kolona Phenyl-Hexyl	47
4.1.2.	Výběr průtokové rychlosti	51
4.1.3.	Vlnová délka	51
4.1.4.	Program analýzy	52
4.2.	Výsledky	54
4.2.1.	Selektivita	54

4.2.2.	Kalibrace	55
4.2.2.1.	Kolona C18	56
4.2.2.2.	Kolona RP-Amide	63
4.2.2.3.	Kolona Phenyl-Hexyl	70
4.2.3.	Opakovatelnost	76
4.2.3.1.	Kolona C18	77
4.2.3.2.	Kolona RP-Amide	78
4.2.3.3.	Kolona Phenyl-Hexyl	79
4.2.4.	Symetrie	80
4.2.4.1.	Kolona C18	81
4.2.4.2.	Kolona RP-Amide	82
4.2.4.3.	Kolona Phenyl-Hexyl	83
4.2.5.	Účinnost a zdánlivý počet teoretických pater	84
4.2.5.1.	Kolona C18	85
4.2.5.2.	Kolona RP-Amide	86
4.2.5.3.	Kolona Phenyl-Hexyl	87
4.2.6.	Rozlišení	88
4.2.6.1.	Kolona C18	89
4.2.6.2.	Kolona RP-Amide	90
4.2.6.3.	Kolona Phenyl-Hexyl	91
5.	Závěr	92
6.	Abstrakt	94
6.1.	Abstrakt v jazyce českém	94
6.2.	Abstrakt v jazyce anglickém	96
7.	Zdroje	98

### Seznam použitých zkratk:

SIA	Sequential Injection Analysis (Sekvenční injekční analýza)
IgG	Imunoglobulin G
ISA	Intrinsic sympathomimetic activity (Vnitřní sympatomimetická aktivita)
ICP – MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)
HPLC	High Performance (pressure) Liquid Chromatography (Vysokoúčinná [vysokotlaká] kapalinová chromatografie)
FIA	Flow Injection Analysis (Průtoková injekční analýza)
MS	Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie nebo spektrometr)
ELS	Evaporative light scattering (detektor) (Odpařovací, světlo rozptylující detektor)
CAD™	Charged aerosol detector (Detektor nabitého aerosolu)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
FDA	Food and Drug Administration (Správa potravin a léčiv)
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines (Evropská správa kvality léčiv)
SIC	Sequential Injection Chromatography (Sekvenční injekční chromatografie)
DAD	Diode Array Detector (Detektor diodového pole)
psi	Pound per Square Inch (Britská libra na palec čtvereční)
UPLC	Ultra Performance (pressure) Liquid Chromatography (Ultraúčinná [ultratlaká] kapalinová chromatografie)
RSD	Relative Standard Deviation (Relativní směrodatná odchylka)

## Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma systému sekvenční injekční analýzy	14
Obr. 2 Schéma HPLC	23
Obr. 3 Schéma systému sekvenční injekční chromatografie	26
Obr. 4 Vzhled fused-core částic	27
Obr. 5 Schéma fused-core částic Ascentis Express	28
Obr. 6 Struktura C18 zbytků	31
Obr. 7 Struktura RP-Amidových zbytků	31
Obr. 8 Struktura fenyl-hexylových zbytků	31
Obr. 9 Strukturální vzorce kyselin	36
Obr. 10 Schéma používaného přístroje SIC	36
Obr. 11 Chromatograf vzorku kyseliny <i>p</i> -kumarové za použití mobilní fáze voda:acetonitril (50:50) (280 nm)	37
Obr. 12 Chromatograf vzorku kyseliny <i>p</i> -kumarové za použití mobilní fáze z 35 ml acetonitrilu a 65 ml vody, která celkově byla s větším přídavkem vody. (280 nm)	38
Obr. 13 Chromatograf opakovatelnosti kolony C18 při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)	39
Obr. 14 Chromatograf opakovatelnosti měření na koloně C18 při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)	40
Obr. 15 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze z 84 dílů vody a 16 dílů acetonitrilu. (280 nm)	41
Obr. 16 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 200 µl acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. (280 nm)	42
Obr. 17 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 800 µl acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. (280 nm)	43
Obr. 18 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 1 400 µl acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. (280 nm)	44
Obr. 19 Chromatograf identifikace píků kolony RP-Amide (280 nm)	45
Obr. 20 Chromatograf opakovatelnosti měření na koloně RP-Amide při koncentraci 1 (280 nm)	46
Obr. 21 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (22 : 78) (280 nm)	47
Obr. 22 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (20 : 80) a smíšené v poměru 0,3 ml vody na 15 ml mobilní fáze. (280 nm)	48
Obr. 23 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (20 : 80) a smíšené v poměru 0,7 ml vody na 15 ml mobilní fáze. (280 nm)	49
Obr. 24 Chromatograf vzorku mixtury kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (20 : 80) a smíšené v poměru 1,6 ml vody na 15 ml mobilní fáze. (280 nm)	49

Obr. 25 Chromatograf opakovatelnosti měření na koloně Phenyl-Hexyl při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)	50
Obr. 26 Chromatograf opakovatelnosti kolony C18 při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)	54
Obr. 27 Chromatograf identifikace píků kolony RP-Amide (280 nm)	55
Obr. 28 Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou na koloně C18	56
Obr. 29 Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou na koloně C18	57
Obr. 30 Kalibrační křivka pro kyselinu <i>p</i> -kumarovou na koloně C18	58
Obr. 31 Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou na koloně C18	59
Obr. 32 Kalibrační křivka pro kyselinu <i>o</i> -kumarovou na koloně C18	60
Obr. 33 Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou na koloně C18	61
Obr. 34 Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou na koloně C18	62
Obr. 35 Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou na koloně RP-Amide	63
Obr. 36 Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou na koloně RP-Amide	64
Obr. 37 Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou na koloně RP-Amide	65
Obr. 38 Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou na koloně RP-Amide	66
Obr. 39 Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou na koloně RP-Amide	67
Obr. 40 Kalibrační křivka pro kyselinu <i>p</i> -kumarovou na koloně RP-Amide	68
Obr. 41 Kalibrační křivka pro kyselinu <i>o</i> -kumarovou na koloně RP-Amide	69
Obr. 42 Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou na koloně Phenyl-Hexyl	70
Obr. 43 Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou na koloně Phenyl-Hexyl	71
Obr. 44 Kalibrační křivka pro kyselinu <i>p</i> -kumarovou na koloně Phenyl-Hexyl	72
Obr. 45 Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou na koloně Phenyl-Hexyl	73
Obr. 46 Kalibrační křivka pro kyselinu <i>o</i> -kumarovou na koloně Phenyl-Hexyl	74
Obr. 47 Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou na koloně Phenyl-Hexyl	75
Obr. 48 Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou na koloně Phenyl-Hexyl	76



## Seznam tabulek

Tab. 1 Základní vlastnosti kyselin	33
Tab. 2 Koncentrace roztoků standardů a roztoků pro opakovatelnost	35
Tab. 3 Program pro měření identifikace a kalibrace na koloně C 18	52
Tab. 4 Program pro měření opakovatelnosti na koloně C 18	52
Tab. 5 Program pro měření identifikace, kalibrace a opakovatelnosti na koloně RP-Amide	53
Tab. 6 Program pro měření identifikace, kalibrace a opakovatelnosti na koloně Phenyl-Hexyl	53
Tab. 7 Kalibrační data kyseliny protokatechové na koloně C18	56
Tab. 8 Kalibrační data kyseliny vanilové na koloně C18	57
Tab. 9 Kalibrační data kyseliny <i>p</i> -kumarové na koloně C18	58
Tab. 10 Kalibrační data kyseliny ferulové na koloně C18	59
Tab. 11 Kalibrační data kyseliny <i>o</i> -kumarové na koloně C18	60
Tab. 12 Kalibrační data kyseliny sinapové na koloně C18	61
Tab. 13 Kalibrační data kyseliny syringové na koloně C18	62
Tab. 14 Kalibrační data kyseliny protokatechové na koloně RP-Amide	63
Tab. 15 Kalibrační data kyseliny syringové na koloně RP-Amide	64
Tab. 16 Kalibrační data kyseliny vanilové na koloně RP-Amide	65
Tab. 17 Kalibrační data kyseliny ferulové na koloně RP-Amide	66
Tab. 18 Kalibrační data kyseliny sinapové na koloně RP-Amide	67
Tab. 19 Kalibrační data kyseliny <i>p</i> -kumarové na koloně RP-Amide	68
Tab. 20 Kalibrační data kyseliny <i>o</i> -kumarové na koloně RP-Amide	69
Tab. 21 Kalibrační data kyseliny protokatechové na koloně Phenyl-Hexyl	70
Tab. 22 Kalibrační data kyseliny vanilové na koloně Phenyl-Hexyl	71
Tab. 23 Kalibrační data kyseliny <i>p</i> -kumarové na koloně Phenyl-Hexyl	72
Tab. 24 Kalibrační data kyseliny ferulové na koloně Phenyl-Hexyl	73
Tab. 25 Kalibrační data kyseliny <i>o</i> -kumarové na koloně Phenyl-Hexyl	74
Tab. 26 Kalibrační data kyseliny sinapové na koloně Phenyl-Hexyl	75
Tab. 27 Kalibrační data kyseliny syringové na koloně Phenyl-Hexyl	76
Tab. 28 Relativní směrodatné odchytky kolony C18 pro koncentraci 0,1 mg/ml	77
Tab. 29 Relativní směrodatné odchytky kolony C18 pro koncentraci 0,01 mg/ml	78
Tab. 30 Relativní směrodatné odchytky kolony C18 pro koncentraci 0,001 mg/ml	78
Tab. 31 Relativní směrodatné odchytky kolony RP-Amide pro koncentraci 0,1 mg/ml	78
Tab. 32 Relativní směrodatné odchytky kolony RP-Amide pro koncentraci 0,01 mg/ml	79
Tab. 33 Relativní směrodatné odchytky kolony RP-Amide pro koncentraci 0,001 mg/ml	79
Tab. 34 Relativní směrodatné odchytky kolony Phenyl-Hexyl pro koncentraci 0,1 mg/ml	79
Tab. 35 Relativní směrodatné odchytky kolony Phenyl-Hexyl pro koncentraci 0,01 mg/ml	80

Tab. 36 Relativní směrodatné odchyly kolony Phenyl-Hexyl pro koncentraci 0,001 mg/ml	80
Tab. 37 Faktory symetrie píku pro kolonu C18	81
Tab. 38 Faktory symetrie píku pro kolonu RP-Amide	82
Tab. 39 Faktory symetrie píku pro kolonu Phenyl-Hexyl	83
Tab. 40 Zdánlivý počet teoretických pater pro kolonu C18	85
Tab. 41 Zdánlivý počet teoretických pater pro kolonu RP-Amide	86
Tab. 42 Zdánlivý počet teoretických pater pro kolonu Phenyl-Hexyl	87
Tab. 43 Rozlišení pro kolonu C18	89
Tab. 44 Rozlišení pro kolonu RP-Amide	90
Tab. 45 Rozlišení pro kolonu Phenyl-Hexyl	91

## **1. Úvod a cíl**

### **1.1. Úvod**

Současné analytické metody směřují k automatizaci, miniaturizaci a ke zkracování doby analýz. Je už dlouho známo, že elektronická zařízení jsou mnohem přesnější a rychlejší než člověk. Z hlediska stránky finanční a ekologické je žádoucí snižovat použitá množství vzorků, činidel a rozpouštědel. Šetří se zdroje, náklady, příroda a hlavně lidské zdraví, protože organická rozpouštědla mají hodně negativních dopadů. V průmyslu se často musí kontrolovat velké série vzorků rychle a levně. Používané metody by měly být robustní a uplatnit se v širokém spektru použití. Vhodné je, aby se mezi sebou daly různě kombinovat. Jedny z těchto metod jsou Sekvenční injekční analýza a Sekvenční injekční chromatografie. Obě dvě metody jsou založeny na stejném systému. Sekvenční injekční chromatografie by se dala pokládat za kombinaci Sekvenční injekční analýzy a kapalinové chromatografie, protože se u nich používají chromatografické kolony. Sekvenční injekční chromatografie do jisté míry splňuje tyto požadavky. Používané objemy vzorků a mobilních fází v této práci nepřesahují 4 ml u mobilních fází a 10  $\mu$ l u vzorků.

Tato diplomová práce se zabývá tvorbou separační metody na moderních chromatografických kolonách v nízkotlakém systému a porovnáním hlavních chromatografických charakteristik použitých kolon. Nejdříve se projednávají teoretické oblasti (nejvýznamnější analytické metody a typ použitých kolon), důležité vlastnosti a přiblížení použitých fenolických kyselin. Pak se přistupuje k vlastnímu experimentálnímu vývoji metody. Zjišťuje se, jaké složení mobilní fáze je nejlepší a jaké vlastnosti mají kolony. Zjištěné vlastnosti kolon se srovnávají mezi sebou a nakonec se stanoví, která je pro tuto analýzu nejvhodnější.

Většina použitých informačních zdrojů pochází z Internetu (především databáze ScienceDirect, Wikipedia) a zbytek pochází ze tří učebnic a dvou přednášek.

### **1.2. Cíl práce**

Cílem této práce je vyvinout separační metodu na systému Sekvenční injekční chromatografie pomocí moderních chromatografických kolon a porovnat hlavní chromatografické charakteristiky použitých kolon. Má se tato metoda optimalizovat pro sedm fenolických kyselin a mělo by se zjistit, která kolona je z celkového pohledu pro analýzu nejvhodnější.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Sekvenční injekční analýza

#### 2.1.1. Systém SIA a jeho součásti<sup>1</sup>

Tato technika z rodiny průtokových analytických metod byla vyvinuta J. Růžičkou a kolektivem analytiků z Washingtonské univerzity za účelem odstranění některých nevýhod průtokové injekční analýzy. Umožňuje automatizovat instrumentální analýzu velkého množství vzorků a tak zhrdosodárnit a zvýšit efektivitu běžných stanovení. První článek popisující tuto progresivní metodu vyšel roku 1990<sup>2</sup>.

Princip SIA bude vysvětlen v následujících řádcích. Analyt obsažený v roztoku vzorku se převede na vhodný detekovatelný produkt reakcí s činidlem a posléze se změří určitá analytická vlastnost vzniklého produktu (např. absorbance nebo transmitance při dané vlnové délce).

Charakteristickým rysem této metody jsou oddělené měřicí cykly a změny přímého a zpětného toku nosného média. Nejdříve jsou zóny nosné kapaliny, vzorku a činidla jednorázově aspirovány za pomoci selekčního vícecestného ventilu a pístové pumpy. Pak se pohyb pístu čerpadla obrátí do opačného směru a tak se promísí vzorek a činidlo. Vzniklý produkt se dopraví do detektoru a tím končí jeden cyklus. Analytický signál je v jednoduchém případě pík. Jedná se o záznam změny koncentračního gradientu výsledného produktu při průchodu detektorem.

Systém SIA je tvořen jednonálovým dvousměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, vhodným detektorem, mísící cívkou (složí i jako pojistka proti vniku vzorku a činidel do pumpy) a spojovacími plastovými trubičkami.

Čerpadlo je vstupní jednotka SIA systému. Nejdříve se používala pístová pumpa s mechanickou vačkou, která poskytovala proud se sinusovou geometrií toku. K nasátí určitého roztoku docházelo v oblastech nulového toku, aby se zabránilo nedefinovanému promísení zón.

Lze použít i peristaltická čerpadla s opatřením proti pulzacím. Vzhledem k relativně nízkým nákupním cenám jsou široce dostupné. Mají nižší mechanickou odolnost, a tak se používají jako pomocné pumpy, ale mohou se použít i samostatně. V tomto případě by se měla tyto čerpadla používat na maximální pumpovací frekvenci, aby se dosáhlo co největší přesnosti v systému SIA<sup>3</sup>.

Injekční pumpy nabízejí vysoce přesný tok bez pulzací, ale vyžadují kalibraci před prvním použitím, musí pracovat s omezeným množstvím kapalného média a jsou relativně drahé<sup>3</sup>.

Novější typy čerpadel jsou ovládány přesnými krokovými elektromotory a počet kroků definuje délku pístu.

Pumpy v SIA hlavně vyrábějí firmy Alitea a Cavro. Občas byly použity také automatické byrety Crison nebo upravené samočinné titrátoary Allela.

Selekční ventil je další část systému. Většinou se používají 6,8, a 10-cestné ventily firmy Valco. Jednodušší ventily firmy Rheodyne občas slouží ve funkci doplňku. Selekční ventily řídí pořadí zón

čínidel a vzorku, zajišťuje připojení všech roztoků k systému, jejich nasátí do pumpy a přechod zón přes detektor. Počítač řídí a kontroluje časování poloh ventilu a synchronizaci s čerpadlem.

Mísící cívky obvykle mají nelineární geometrii. Slouží k promíchání zón nebo obsahují reaktivní náplň, například magnetické polymerní částice s aktivním povrchem. Ve většině případů je cívka umístěna mezi čerpadlo a ventil a druhá může být mezi ventilem a detektorem (u rychle probíhajících reakcí se ale nepoužívá).

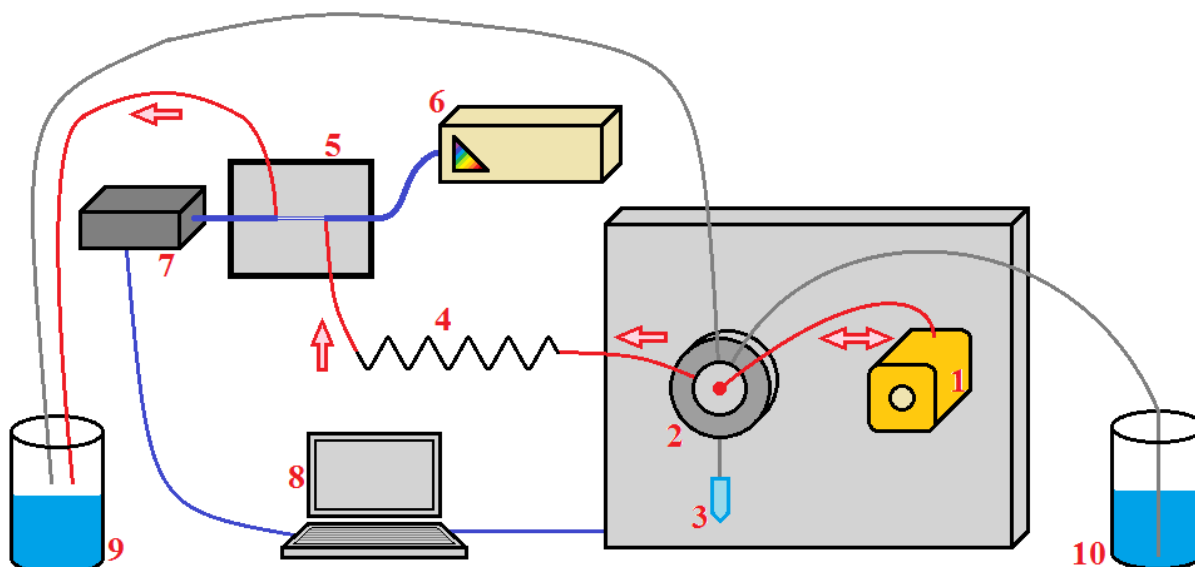
Použití a volba detektorů závisí na druhu analytické reakce. Využívají se hlavně spektrofotometrické, elektrochemické a fluorescenční s příslušnými průtokovými celami. Konstrukce těchto cel dovoluje využívat při čerpání nízkotlaké pumpy<sup>3</sup>.

Pro uskutečnění jednoduchých spektrofotchemických analýz byla panem Růžičkou a kolektivem navrhuta koncepce chemických senzorů s obnovitelným citlivým povrchem. Je tvořen čínidlem, které je navázáno na inertní polymerové částice s mikrometrovými rozměry. Tento povrch se může před každou analýzou obnovit, tudíž kovalentní pevná vazba je nežádoucí. Při různých měřeních byla použita i univerzální složená membránová cela pro průtokové měření chemiluminiscence a absorbance a mikroobjemovou celu pro komplikovanější SIA analýzy. Při perfúzních studiích živých buněk se aplikují fontánové cely. Z oblasti elektrochemie se uplatňují ampérometrické průtokové cely a iontově selektivní a enzymové elektrody.

Spojovací trubičky se skládají z různého materiálu, především chemicky odolných polymerů. Jejich vnitřní průměr je 0,5 – 0,8 mm<sup>3</sup>.

Mechanické součásti SIA systému jsou propojeny s počítačem pomocí příslušných hardwarových médií, protože právě počítač řídí celý proces analýzy, sběru, uchování a zpracování dat. Stejně důležitou součástí jako hardware je i kvalitní software pracující se SIA. Programy jsou distribuovány pod různými názvy, např. Flowtek, Fialab, Labpro, LabVIEW<sup>®</sup><sup>3</sup> atd. Obsluhující program musí umět zpracovat a vhodně prezentovat získaná data. Běžně se vypočítává výška, plocha a další charakteristiky píků. Některé programy mají možnost tvorby grafů, kalibrace a tvorbu vlastních menších programů řídících přímo průběh analýzy. Kdyby chyběla byt' jen jedna z těchto dvou důležitých komponent (hardware nebo software), nešlo by automatizovaně měřit za pomoci SIA.

Systém SIA lze přizpůsobit konkrétním požadavkům různými doplňky, například jednotkami pro kapalinovou extrakci, dialýzu a difúzi plynů přes membránu.



**Obr. 1** Schéma systému sekvenční injekční analýzy<sup>43</sup>

1 – pumpa, 2 – vícecestný ventil, 3 – vzorek, 4 – mísící cívka, 5 – Z cela, 6 – UV-VIS lampa, 7 – detektor, 8 – počítač, 9 – odpad, 10 – mobilní fáze.

### 2.1.2. Využití SIA v praxi<sup>1,3</sup>

SIA umožňuje analýzy velkých množství vzorků produktivně, relativně rychle a dostatečně spolehlivě a přesně. Je to jedna z alternativních metod, kterou lze použít v mnoha přírodních oborech a výzkumu. Nachází uplatnění v kontrole životního prostředí, medicíně, biologii, chemii, řízení technologií, monitorování biotechnologií, petrochemii a analýzách radioizotopů. Metody kontroly v těchto oborech jsou zvláště důležité, protože nám přehledně a jasně předkládají data pro monitorování a kontrolu procesů, efektivní využití času, financí, surovin a ostatních zdrojů a další nakládání se zplodinami a průmyslovým odpadem. SIA tak může být efektivně využita jako nástroj k minimalizování vznikajících škod na životním prostředí a dalšímu zdokonalování výroby. Šířka použití jasně dokazuje pružnost a přizpůsobivost této analytické metody.

Velká výhoda SIA systému spočívá v tom, že může provádět početné komplexní reakce v širokém spektru podmínek bez výraznější přestavby spojovacího materiálu. Spotřebuje také velmi málo objemu vzorku a činidla, a tak výrazně redukuje vznikající odpad při analýzách.

V ekologických oborech našla SIA uplatnění především při kontrole kvality vody nejrůznějšího původu, především odpadní. Je možno stanovit více druhů iontů najednou bez potřeby separace nebo opakovaného měření s různými činidly. Tak lze ve vodě zjistit obsah vápenatých iontů, souběžně  $\text{Ca}^{+2}$  a  $\text{Mg}^{+2}$  (za tvorby barevných komplexů a spektrofotometrické detekce) a totéž pro ionty  $\text{Fe}^{+3}$ . Vápenaté ionty (např. z papírenských vod) lze zachytit jako komplexy vápenato-*o*-cresolftaleinové. Tyto komplexy se pak detekují spektrofotometricky při 620 nm.

Je známo, že vysoký obsah fosfátů, dusičnanů a dusitanů ve vodě velkou měrou přispívá růstu sinic a jiných mikroorganismů. V práci Omse a kolektivu<sup>53</sup> byla popsána analýza dusitanů a dusičnanů z odpadních vod tzv. Greiss-Ilosvayovou metodou. Dusičnan byl redukován hydrazinem v alkalickém prostředí na dusitan. Ten se poté smísil se sulfanylamidem a naftylethylendiaminem. Vznikl barevný komplex, který se detekoval spektrofotometricky při 540 nm. Ke stanovování fosfátů v odpadní vodě použili van Staden a Taljaard<sup>54</sup> modrou molybdenovou metodu. Vznikl modrý molybdenfosfátový komplex. Ten ovšem pomalu vzniká, a tak proud nosného média byl na dvě minuty zastaven, aby se zajistilo zvýšení selektivity.

Odpadní voda z papíren obsahuje hodně vápenatých iontů a tak papírny tuto kapalinu recyklují, aby snížili objem použité a odpadní vody\*. Tato akce ovšem pomalu zvyšuje obsah vápenatých iontů ve vodě, což papírnám přináší jisté problémy týkající se výroby produktů. Díky tomuto jevu je velmi důležité monitorovat obsah iontů vápníku ve vodě. Nyman a Ivaska vyvinuli SIA metodu pro stanovení volného ionizovaného vápníku. Toto stanovení je založeno na tvorbě komplexů vápenatých iontů a *o*-kresolftaleinu. Tento komplex byl detekován spektrofotometricky při 620 nm. Hoččík, který také tvoří komplexy s *o*-kresolftaleinem, byl maskován pomocí 8-hydroxychinolinu. Vyvinutá metoda byla testována on-line přímo v provozu finské papírny<sup>5</sup>.

Z aniontů se stanovují najednou chloridy a fluoridy za pomoci iontově selektivních elektrod.

Srážecí reakce s barnatými ionty lze využít při stanovování síranů. Fosforečnany byly určovány samostatně nebo souběžně s křemičitany. Při stanovení amoniaku a organických sloučenin, ze kterých lze vytěsnit vhodnými zásaditými reakcemi amoniak, se využívá difúze amoniaku přes membránu do vhodného činidla, které převede tento plyn na detekovatelné reakční produkty. Amoniak poté reaguje s acidobazickým indikátorem a detekuje se spektrofotometricky nebo konduktometricky.

Herbicide lze také stanovit touto metodou. Wilmer, Trau, Rennenberg a Spener<sup>55</sup> se zabývali stanovením obsahu kyseliny 2,4-dichlorofenoxyoctové. Tato analýza byla uskutečněna tak, že výzkumný tým použil ampérometrickou detekci, enzymový systém peroxidázy a alkalické fosfatázy a myší protilátky IgG. Odezvu pak sledovali pomocí platínové elektrody.

Systém SIA byl použit i k detekci stopovým množstvím těžkých kovů. Zde našla využití on-line prekoncentrace extrakcí analytů do tenké vrstvy organického rozpouštědla, který byl vytvořen na stěně SIA systému. Tato metoda byla úspěšně použita při spektrofotometrických analýzách vanadu<sup>56</sup>, molybdenu<sup>57</sup> a chromu<sup>58</sup> v rozličných mocnostech. U kadmia, mědi, rtuti, india, olova, cínu a thalia byla použita SIA metoda v kombinaci s rozpouštěcí voltametrií<sup>59</sup>.

SIA byla úspěšně spojena i s některými imunoanalytickými metodami, a díky tomu se vyvíjely speciální detekční cely, které umožňují zakotvení protilátek nebo antigenů přímo v systému, například pomocí elektromagnetického pole. V některých měřeních se využívala tzv. jet-ring cela. Díky ní lze sledovat průběh vazby antigen-protilátka. Nosičem protilátky jsou větší částice sorbentu. Sleduje se

---

\* V průběhu výroby a chemických se do papíru přidává uhličitán vápenatý, aby papír byl neprůsvitný<sup>4</sup>.

například luminiscence komplexů antigen-protilátka nebo volných značených protilátek. Jet- ring cela se umístí takovým způsobem, že mezi ní a detektorem vznikne tenká štěrbin, kterou neprojde suspendovaný sorbent, ale látky rozpuštěné v nosném mediu projdou dále do detektoru. Pak větší částice odnese zpětný proud nosného média. Tohoto uspořádání se použilo při stanovení sodíku a lithia<sup>60</sup>, chromu<sup>61</sup>, IgG<sup>62</sup>, glukózy<sup>63</sup> a dokonce buněk ledvin<sup>64</sup>.

Ethanol a glukóza ve víně a pivu byly stanovovány pomocí ampérometrické detekce a využití enzymových elektrod. Při tomto měření byla využita upravená jet-flow cela. Měla pohyblivou část, která nasedala na průzor detektoru<sup>65</sup>.

Byly úspěšně provedeny i analýzy methylxantinů, různých inzulínů a albuminů v lidském séru pomocí reakcí s monoklonálními protilátkami. Detekce byla prováděna fluorescenčním mikroskopem<sup>66</sup>.

Podobně slouží i fontánová cela, ve které se nejčastěji sledují jednotlivé buňky různých kultur. Analyticky využívané enzymy jsou látky proteinového charakteru, z toho vyplývá, že jsou citlivé na teplo, vysoké odchylky od jejich optimálního pH a silné mechanické děje, například třepání. Jsou relativně drahé, protože se vyrábějí náročnými biotechnologickými postupy. Zakotvení v reakční cívice SIA soustavy snižuje jejich spotřebu a umožní jejich obnovu. Tato metoda se úspěšně a široce využívá při stanovení glukózy pomocí zakotvené glukóza oxidázy a následné reakce peroxidu vodíku s luminolem<sup>67-69</sup>.

SIA systém našel uplatnění i ve farmaceutických analýzách. Pomocí této metody byly stanovovány obsahy penicilinu<sup>68, 69</sup>, trimeprazinu, prometazinu a perfenazinu tvořících barevné komplexy s palladiem<sup>70</sup>, komplexů bromazepamu a železnatých iontů<sup>71</sup>, barevných komplexů ciprofloxacinu a norfloxacinu se železitými ionty<sup>72</sup>.

Barnett a spolupracovníci vyvinuli SIA metodiku pro dvě rozdílné analýzy morfinu, ve vodném<sup>73</sup> prostředí a nevodném<sup>74</sup>. Morfin byl extrahován opakující se postoupností vodných a nevodných extrakcí z máku setého (*Papaver somniferum L.*, Papaveraceae). Takto získaný výtažek ale obsahuje celou řadu dalších alkaloidů, rozpuštěné a suspendované pevné částice a organický balast. Vzorky byly odebírány z různých bodů progresse složité extrakce, ručně zředěny a odděleně stanoveny. Výsledky pak byly porovnány se standardní HPLC metodou. Detekce byla chemiluminiscenční, protože se využila reakce morfinu s manganistanem draselným v kyselém prostředí a následné oxidace morfinu na fluoreskující produkt. Díky shodě okolností kodein a další alkaloidy nevykazovaly chemiluminiscenci po reakci s manganistanem draselným.

Stanovení morfinu ve vodném prostředí bylo původně vyvinuto pro techniku FIA, která se ale ukázala jako nevhodná, protože použitá organická rozpouštědla rychle rozkládala trubičky peristaltické pumpy. Naopak u metody SIA bylo prokázáno, že je více než vhodná pro tento typ analýzy, jelikož vzorek se nikdy nedostane do kontaktu s trubičkami pumpy. Při stanovení morfinu v nevodném prostředí byl použit vodný roztok činidla (KMnO<sub>4</sub>), přičemž se chemiluminiscence vyskytovala v heterogenním prostředí. Získané výsledky velmi dobře korelovaly s daty ze standardního systému HPLC.



Z anorganických iontů, které jsou obsaženy v léčivých přípravcích a doplňcích stravy, byly analyzovány železité ionty se spektrofotometrickou detekcí. Sultan a Desai sledovali v kinetické studii proces oxidace kyseliny askorbové<sup>75</sup>.

Využití této metody se uplatnilo také v oborech farmaceutické technologie a to k disolučním testům ibuprofenu v obyčejných tabletách, obalených tabletách a kapslích<sup>76</sup>. Chemometrické metody se použily při zdokonalení stanovení neselektivního beta-blokátoru s ISA oxprenonolu<sup>77</sup>. Warfarin vykazuje v přítomnosti cyklodextrinu fluorescenci a takto byl také stanoven<sup>78</sup>.

V petrochemickém a nukleárním průmyslu vzniká mnoho hlavních i vedlejších produktů, které je třeba důkladně monitorovat, protože mají v drtivé většině případů vysoce negativní vliv na životní prostředí a zdraví člověka i po mnoha letech. Vzorokly z těchto oborů patří k těm nejsložitějším a nejhůře se s nimi zachází, protože vykazují teratogenní, mutagenní, kancerogenní účinky a vážně poškozují nukleové kyseliny. Proto je velmi důležité používat k analýzám těchto vzorků technologie, které maximálně zamezí přímému i nepřímému kontaktu pracovníků s těmito látkami. Grate a spolupracovníci<sup>79</sup> představili metodu sekvenční injekční analýzy pro stanovení radioizotopu <sup>90</sup>Sr z úložiště nukleárního odpadu Hannaford (Severní Dakota, USA). <sup>90</sup>Sr je produkt kontrolovaného i nekontrolovaného jaderného štěpení izotopů plutonia a uranu, především <sup>233</sup>U. Radioizotop <sup>90</sup>Sr má poločas rozpadu 28,8 let a degraduje se  $\beta^-$  rozpadem<sup>6</sup>. Patří mezi vysoce nebezpečné látky, protože se s velkou ochotou zabudovává do kostí živočichů místo vápníku. Je to logické, protože stroncium a vápník patří do II. A skupiny periodické soustavy prvků, a tudíž na základě platnosti periodického zákona lze odvodit, že tyto prvky budou mít velmi podobné chemické vlastnosti. Při stanovování <sup>90</sup>Sr se nejdříve separoval tento radioizotop pomocí extrakční kolony. Její sorbent selektivně váže <sup>90</sup>Sr jako crownetherový komplex v kyselém prostředí. Pak bylo <sup>90</sup>Sr stanoveno průtokovým scintilačním počítačem na základě záporného beta záření.

Technika sekvenční injekční analýzy našla uplatnění také v petrochemii. Aparaturu SIA lze jednoduše přizpůsobit pro metodu kolorimetrické titrace. Taylor a spolupracovníci<sup>80</sup> vyvinuli metodu pro stanovení bromového čísla vydestilovaných látek z ropy. Předpokládám, že princip této analýzy spočívá v odbarvování roztoku brómu ve vysoce inertním organickém rozpouštědle (např. tetrachlórmetanu)<sup>7</sup>. Bróm ve formě bromného kationtu se aduje na méně substituovaný uhlík ve dvojně vazbě. Tím se změni jeho forma a původně červenohnědý<sup>8</sup> roztok se odbarví. Je to spolehlivý test na přítomnost dvojných vazeb olefinů<sup>7</sup>. Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 470 nm, která se ale obtížně uskutečňovala. Taylor a spolupracovníci tedy navrhli záměnu spektrofotometrické detekce za ampérometrickou, protože by mohla vést k lepším výsledkům.

Al-Swaidan<sup>81</sup> sestrojil systém SIA, který byl propojen se systémem ICP – MS. Tato soustava sloužila ke stanovení olova, niklu a vanadu v surové ropě ze Saudské Arábie. Systém SIA umožnila zředit vzorky ropy organickým rozpouštědlem, než vzorky byly odeslány do hmotnostního spektrometru. Tím byly zmírněny problémy spojené s hromaděním organického balastu v propojení s hmotnostním spektrometrem. Byla také snížena spotřeba vzorků a rozpouštědla.

Uvedený rozsah (pochopitelně ukazuje jen zlomek využití SIA) použití metody SIA jen dokazuje jednoduchost, robustnost a spolehlivost této metody.

## **2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

### **2.2.1. Systém HPLC a jeho součásti<sup>9,10,11</sup>**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří do skupiny dělicích (separačních) metod. Vývoj této metody začal v 70. letech XX. století. Využívá dvě navzájem nesmíselné fáze. Stacionární fáze je pevná, mobilní je kapalná. Princip této metody spočívá v mnohonásobném ustalování dělicí rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. K procesu dělení látek je možné využít čtyř základních dělicích mechanismů: adsorpce, rozdělování, iontová výměna a síťový efekt gelu. Všechny tyto děje jsou vratné a tak lze najít selektivní a účinný chromatografickou soustavu k dělení směsi organických látek rozpustných ve vodě, organických rozpouštědlech či zředěných kyselinách.

Základní součásti vysokoúčinného kapalinového chromatografu jsou: vysokotlaká čerpadla, odplyňovač, směšovač, manometr, předkolona, dávkovač, kolona, detektor, sběrač frakcí a řídicí počítač.

Mobilní fáze je čerpána vysokotlakým čerpadlem, které zajistí konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1 – 10 ml/min) za tlaku až 40 MPa. Tato mobilní fáze musí být zbavena veškerých bublinek plynů, protože by se jinak do měření vnesly závažné chyby a výsledek by byl velmi nepřesný. Potlačíme tak šum a kolísání tlaku v koloně a zajistíme plynulost toku. Vysokotlaké čerpadlo by mělo být kvalitně vyrobené z odolných materiálů, jelikož mobilní fáze bývají často agresivní<sup>14</sup>.

Směšovač svojí funkcí pomůže uskutečnit tzv. gradientovou eluci, při které se složení mobilní fáze konstantně mění. K jedné mobilní fázi se přimíchává druhá mobilní fáze s větším elučním účinkem se stálou rychlostí. Vzniká tak konstantní koncentrační gradient mobilní fáze. Stejný princip lze využít i při tvorbě gradientu pH. Gradientová eluce se používá v těch případech, kdy izokratickou elucí (složení mobilní fáze je stejné po celou dobu) není možno dosáhnout optimálního rozdělení směsi. Složky těchto směsí se výrazně liší svými elučními parametry.

Manometr monitoruje tlak mobilní fáze v systému. Je důležité, aby tlak nepřekročil určitou hranici, protože by mohlo dojít k poškození a snížení životnosti pump, kolon a spojovacího materiálu, případně dalších součástí systému HPLC.

Vzorky lze dávkovat manuálně (pomocí ventilů, speciální stříkačky) a nebo autosamplerem. Druhý způsob je velmi rychlý, přesný, automatizovaný, a proto se hodí pro velké série vzorků<sup>14</sup>.

Kolony jsou trubice ze skla, oceli nebo z kombinace obou materiálů: skleněná trubička je chráněna pevným ocelovým pouzdem. Kolony většinou bývají dlouhé 5 – 30 cm, a jejich vnitřní průměr je 2 – 8 mm. Jsou naplněné stacionární fází, která musí být homogenní a rovnoměrná, proto je výhodné odebírat již naplněné kolony od výrobce<sup>9</sup>. O rozměrech částic sorbentu platí jednoduchá

úměra: čím menší částice, tím větší separační povrch a účinnost, ale i tím větší vyvíjený protitlak. Už tradičním kompromisem jsou kolony založených částicemi o rozměrech 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ . Částice o rozměrech 3 mikrometry nabízí větší účinnost a protitlak, zatímco částice o rozměrech 5 mikrometrů vykazují tytéž vlastnosti v opačném smyslu slova. Stacionární fáze mohou být různého druhu. V dalších odstavcích si postupně představíme několik různých typů sorbentů, které lze v metodologii HPLC použít<sup>10</sup>.

Stacionární fáze silikagelové dělíme na dvě skupiny: fáze pro reverzní chromatografii a pro chromatografii na normálních fázích. Oba typy se liší svojí polaritou. Chromatografie na normálních fázích používá nepolární mobilní fázi a polární stacionární fázi, zatímco reverzní chromatografie, jak už z názvu vyplývá, pracuje s fázemi opačných polarit než chromatografie na normálních fázích. Silikagelové fáze vykazují největší stabilitu při pH 2 – 7. Snesou teploty do 60° C a tlak do 35 – 40 MPa. Vzhledem k tomu, že mají relativně menší fyzikálně chemickou odolnost, tak se sorbent ještě dále povrchově upravuje. Na volné silanolové zbytky se chemickou cestou naváží nejrozličnější organické zbytky, například oktadecyl, fenylhexyl, amidové, diolové, kvartérní aminové, sulfonové atd. Tato technologie zásadně změní charakteristiku povrchu částic sorbentu. Tak můžeme měnit polaritu či iontovýměnnou aktivitu kolony. Pro zvýšení stability a snížení chvostování píků se používá endcapping, což je fyzikálně-chemický proces, který redukuje počet volných silanolových skupin na nepolární silikagelové fázi chemickou reakcí<sup>10</sup>.

Jako další sorbenty se používají polymerní látky a jako první byly zkoumány polyvinylbenzeny. Tyto látky mají velký adsorbční povrch, protože jejich struktura je makroporézní. Snesou široký rozsah pH 1 – 14 a vydrží relativně vysoké teploty až 200° C. Mají ale pár nevýhod. Může se s nimi pracovat do velikosti tlaku jen 20 MPa. Stabilita funkčních skupin polymeru zásadně ovlivňuje celkovou stabilitu kolony a její účinnost závisí na organické složce mobilní fáze. Vývoj v této oblasti šel kupředu a dnes jsou k dispozici mechanicky i chemicky odolnější kolony, avšak i tak nezatlačily do pozadí chemicky vázané nepolární stacionární fáze<sup>10</sup>.

Hybridní stacionární fáze se skládají ze silikagelu a polymerů. Touto kombinací materiálů se dosáhlo zvýšené odolnosti kolony. Lze s nimi pracovat v rozmezí pH 1 – 12, vydrží teploty do 100° C a snesou tlak 35 – 40 MPa. Vyšší mechanické stability je možno dosáhnout použitím „bridged ethyl/siloxane silica hybrid“ technologii, která je založena na tvorbě ethylenových můstků v silikagelové matici. Některé kolony tohoto typu jsou plněny sorbentem, jehož částice jsou velké jen 1,7  $\mu\text{m}$ . Budou mít mnohonásobně větší adsorbční povrch, tudíž vysokou účinnost a ovšem velmi vysoký protitlak. Vzhledem k rozměrům částic sorbentu je třeba použít k separacím vysoké tlaky až 100 MPa. Tyto kolony takové hodnoty vydrží, a proto se můžou použít pro ultraúčinnou neboli ultratlakovou kapalinovou chromatografii<sup>10</sup>.

Další materiál, z něhož je možné vyrobit sorbent do kolon, je porézní grafitický karbon. Skládá se z proužků uhlíku ve formě grafitu. Je vysoce inertní, robustní a odolný. Kolony vydrží velké rozmezí teplot i pH. Grafit díky své specifické struktuře vykazuje velmi odlišnou selektivitu retence než klasické

kolony. Elektronové interakce  $\pi - \pi$  a ionizované vazby mají mnohem větší vliv než hydrofobicita materiálu. Velkou roli zde hrají i sterické a izomerní rozdíly, a tak na kolonách s tímto sorbentem lze rozdělit strukturální izomery nebo chirální analyty<sup>10</sup>.

Monolitické fáze se vyznačují naprosto odlišnou strukturou než klasické částicové stacionární fáze. Jsou tvořeny jediným monolitickým kusem porézního materiálu, což může být speciální druh silikagelu, nebo úplně odlišný materiál, např. polymer. Vyrábí se technologií radikálové polymerizace monomerů buď přímo in situ v trubičce nebo se monolit vyrábí odděleně. Póry tohoto materiálu jsou velikostí dvojího typu – makropóry a mezopóry. Makropóry mají rozměry obvykle 1 – 2  $\mu\text{m}$  a tak razantně snižují odpor kolony a umožňují použití vyšších průtoků mobilní fáze bez odpovídajícího nárůstu protitlaku. Mezopóry jsou velké většinou 12 nm. Díky této vlastnosti zvětšují povrch dostupný pro separaci a tak tyto kolony vykazují velmi dobrou separační účinnost. Monolitický sorbent má několik výhod. Jeho použitím se dosáhne podstatného zkrácení doby analýzy, protože kolony plněné tímto sorbentem mají vysokou účinnost i při použití vysokých průtoků mobilní fáze. Tyto kolony umožňují použití vysokých průtoků díky velké poréznosti materiálu a vyvíjí nízký protitlak, což se odrazí v menším namáhání a delší životnosti zařízení HPLC. Vydrží delší dobu a výsledky analýz prováděných na těchto kolonách budou mít lepší reprodukovatelnost, protože jejich sloupec oplývá vyšší stabilitou. Kolony založené na monolitickém sorbentu našly uplatnění také v nízkotlakých průtokových systémech, např. v sekvenční injekční chromatografii, anebo v kapilární elektrochromatografii.

Předkolona je menší kolona, jejíchž hlavní funkcí je ochrana hlavní kolony před zanesením většími dispergovanými částicemi v analyzovaném roztoku, např. krevními proteiny. Pomáhá prodloužit životnost kolony<sup>14</sup>.

V HPLC metodologii je použitelných mnoho typů detektorů. Ideální detektor by měl mít vysokou citlivost a co nejširší spektrum záběru, protože se stanovují nejrůznější látky v roztoku v koncentracích ng až  $\mu\text{g/ml}$ . Často je třeba stanovit všechny oddělené látky. Vykazuje nezávislost odezvy na změně mobilní fáze při gradientové eluci a samotná odezva detektoru je dokonale reprodukovatelná a lineární. Detektory používané v praxi se tomuto ideálu více či méně jen blíží. V následujících odstavcích budou představeny základní typy detektorů.

Mezi nejvýznamnější patří spektrometrické detektory. Princip jejich činnosti spočívá v proměření intenzity elektromagnetického vlnění při určité vlnové délce, kterou analyzovaná látka ve formě roztoku nejvíce absorbuje. Využívá se především ultrafialová část spektra, viditelná část mnohem méně a infračervená část téměř vůbec ne.

Používají se hlavně UV detektory a nebo UV-VIS detektory několika rozdílných typů.

Detektory UV-VIS s libovolně volitelnou vlnovou délkou se také používají, protože je lze aplikovat na široké spektrum látek.

Skenovací UV detektory snímají během několika vteřin celé absorpční spektrum v maximu píku hodnocené látky.

Nejsložitější typ UV-VIS detektorů se nazývá diode array detektor. Záznam z tohoto detektoru je trojrozměrný: první rozměr (šířka) je vyhrazen vlnové délce, druhý rozměr (délka) patří časovému průběhu analýzy a třetí rozměr (výška) informuje o výšce píku. Snímá absorpční spektrum, hodnotí analyzovanou látku při několika rozdílných vlnových délkách najednou a porovnává poměry absorbancí. Je řízen počítačem.

UV-VIS detektory patří mezi běžně používané v analýze látek. Vykazují vysokou citlivost ( $10^{-9}$  –  $10^{-10}$  g/ml) a můžou se použít při gradientové eluci.

Fluorescenční detektory se používají v případech, kdy analyzovaná látka vykazuje fluorescenci. Nefluoreskující látky je možno převést vhodnými derivatizačními činidly na fluoreskující produkty. Tyto detektory mají užší spektrum použití než UV-VIS detektory, ale jsou citlivější ( $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  g/ml), vykazují vyšší selektivitu a lze je použít při gradientové eluci.

Refraktometrické detektory se aplikují na stanovení indexu lomu mezi eluátem z kolony a čistou mobilní fází. Mohou vyhodnotit prakticky každou látku, ale při analýzách se používají málokdy, protože mají relativně velké nevýhody. Ke správnému měření musí být umístěny v prostředí s konstantní teplotou, protože jejich odezva vysoce závisí na tomto parametru. Vykazují menší citlivost ( $10^{-6}$  g/ml) a nelze je využít při gradientové eluci.

Pro detekci analytů se HPLC kombinuje i s hmotnostním spektrometrem. Výstup dat je v podobě hmotnostního spektra, což znázorňuje četnost iontů ve vztahu k poměru hmotnost-počet nábojů. Soustava HPLC-MS je velmi citlivá, vysoce selektivní a přináší spoustu údajů. Hmotnostní spektrometr je náročný na obsluhu a finance.

Existuje více typů elektrochemických detektorů, např. konduktometrický, potenciometrický, ampérometrický, coulometrický, voltametrický, polarografický. Používají se při detekci látek, u nichž se vyskytují elektrochemické reakce na přechodu elektroda – eluent. Monitorují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci dané látky v roztoku. Detektory jsou vysoce citlivé ( $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  g/ml), nelze je ale použít při gradientové eluci.

Evaporative light scattering detector (odpařovací, světlo rozptylující detektor) se aplikuje k detekování látek, které ve své molekulární struktuře neobsahují žádný fluorofor nebo chromofor. Jako příklad lze použít polyethylenglykoly, mastné kyseliny, dextryny, polymethylmetakrylátů a jiné látky. Princip tohoto detektoru spočívá ve třech krocích. První fáze je nebulizace. Kapalina vycházející z kolony společně s plynným dusíkem (o průtoku 0,4 až 1,5 ml/min) je protlačena vysokým tlakem skrze jehlu do komůrky. V komůrce tak vzniká disperze kapiček. Velikost a stejnoměrnost kapiček mají vysoký vliv na citlivost a reprodukovatelnost detekce. V druhé fázi prochází tato mlha vyhřívanou trubičkou, kde dojde k odpaření rozpouštědla. Výsledkem je aerodisperze suchých částic vzorku a par mobilní fáze. Ve třetím kroku je tento jemný dým dostává do detekční cely, kde se jeho částice střetnou s laserovým paprskem, který je vyzařován laserovou diodou. Světlo rozptýlené částicemi pak dopadne na křemíkovou fotodiodu. Ta vytvoří elektrický signál, který je po zesílení nakonec zpracován elektronicky.

ELS detektor patří mezi univerzální detektory. Vyznačuje se vyšší citlivostí ( $10^{-8}$  g/ml), relativně lepší citlivostí, rozlišením, rychlostí a stabilní základní linií oproti refraktometrickému detektoru. ELS detektor není ovlivňován teplotou okolí a kolony. V porovnání s ostatními detektory ovšem má několik nevýhod, a tím jsou menší lineární rozsah a nižší citlivost. Cenově vychází lépe než hmotnostní spektrometr a pro obsluhující personál neklade tak vysoké požadavky v oblasti vzdělání.

Další detektor se nazývá Corona™ Charged Aerosol Detector (tento název je chráněný). Detektor CAD™ má široký lineární dynamický rozsah  $10^{-6} - 10^{-9}$  g/ml, a proto se využívá pro analýzu vzorků, kde jsou zkoumané látky v širokém rozpětí koncentrací. Poskytuje stálou a velmi dobře reprodukovatelnou odpověď. Tento detektor lze použít pro analýzy nejrůznějších chemických entit pro stanovení obsahu látek nebo pro analýzy využívající relativní hmotu. Tento detektor je vysoce univerzální. Může pracovat s jakýmkoliv kapalinovým chromatografem a na obsluhu je velmi nenáročný.

Sběrač frakcí nachází své uplatnění v případech, kdy je třeba získat jednotlivé složky analytu.

Počítač s patřičným programovým vybavením patří mezi nejdůležitější části HPLC systému, protože právě on řídí průběh analýzy, příjem, zpracování a uskladnění získaných dat.

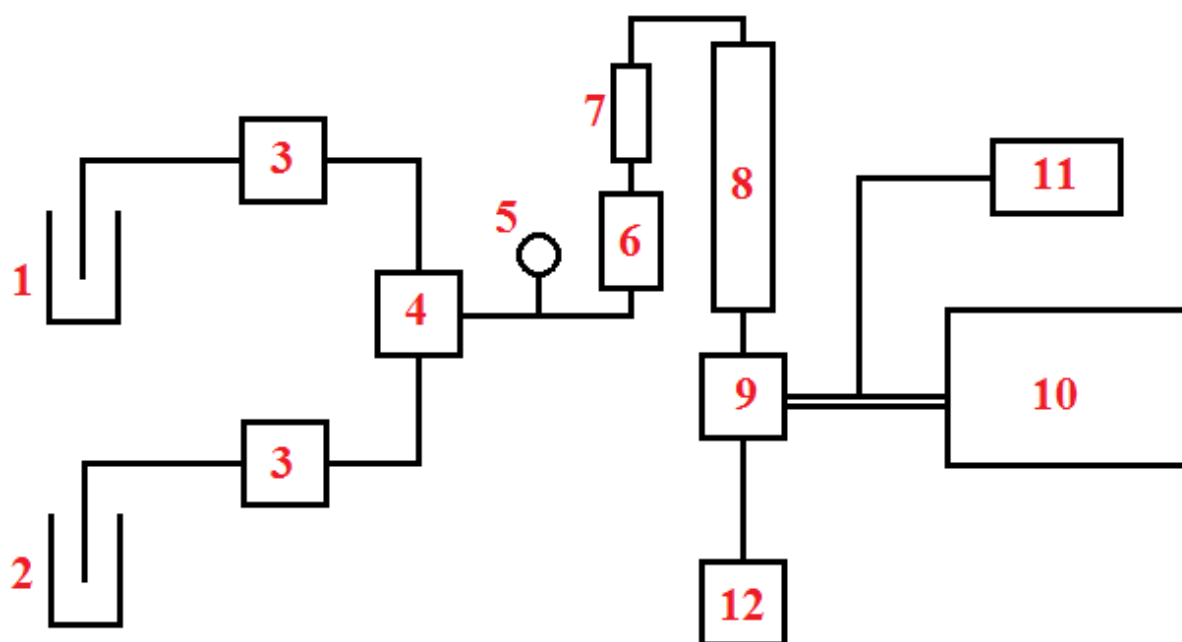
Trendy v HPLC směřovaly k miniaturizaci vybavení, zvyšování separační účinnosti a prodloužení životnosti kolon, zvyšování citlivosti metod, urychlení analýzy, snížení spotřeby rozpouštědel a snížení i ceny analýzy<sup>10</sup>.

Jistým přelomem v historii kapalinové chromatografie se stalo zavedení kolon s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Jejich citlivost a separace jsou lepší, avšak za cenu vyšších tlaků. Efekty mimo kolonu jsou výraznější u separací v menších měřítkách, a tudíž je veledůležité minimalizovat mimokolonovou disperzi. V roce 2004 byl zveřejněn první systém pro separaci za velmi vysokých tlaků. Nové vybavení mohlo pracovat do tlaků až 1 000 barr, což je 15 000 psi<sup>†</sup> a velikost částic stacionární fáze poklesla na 1,7  $\mu\text{m}$ . Tato nová technologie byla pojmenována ultraúčinná kapalinová chromatografie, aby se odlišila od vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bylo dokázáno, že čas analýzy může být zkrácen až na 1 – 2 minuty bez ztráty rozlišení a citlivosti<sup>34, 35, 36</sup>.

Jeden ze způsobů, jak snížit vysoký tlak, je zvýšení teploty. Čas analýzy může být také zkrácen pomocí záhřevu kolony, a to bez ztráty rozlišení. Se zvýšením teploty se snižuje viskozita mobilní fáze a tudíž i zpětný tlak kolony. Systémy s maximálním použitelným tlakem 400 bar mohou být tak použity s kolonami s částicemi pod 2  $\mu\text{m}$  bez přetěžování pump. Předehřívání mobilní fáze je důležité k tomu, aby se zabránilo možnému poškození kolony a spojů v důsledku rozmývání zón analytů. Další dobrou možností představují monolitické kolony (viz výše) a core-shell kolony (viz níže).

---

<sup>†</sup> 1 bar je 100 kPa. 15 000 psi přibližně činí 103,421 355 MPa. 1 psi se rovná 6,895 757 kPa a je to tíha 1 libry (453,6 g) na čtvereční palec (6,4516  $\text{cm}^2$ )<sup>33</sup>.



**Obr. 2 Schéma HPLC<sup>43</sup>**

1,2 – mobilní fáze, 3 – vysokotlaké pumpy, 4 – směšovač, 5 – manometr, 6 – dávkovač,  
7 – předkolona, 8 – kolona, 9 – detektor, 10 zapisovač, 11 – počítač, 12 – sběrač frakcí

### 2.2.2. Využití HPLC v praxi<sup>11</sup>

Využití HPLC v praxi je relativně široké. Jedna z nejdůležitějších aplikací je analýza farmaceuticky významných látek, která je rozdělena do čtyřech základních směrů. V první problematice je použití HPLC značně jednoduchou cestou k identifikaci účinné látky, stanovení obsahu a stanovení čistoty. Při vhodných chromatografických podmínkách je možno získat jedinou analýzou potřebná data ke všem třem cílům. Tak lze snadno zjistit obsah a množství případných reziduí a navíc identifikovat účinnou látku v léčivém přípravku, zvláště v kombinovaných přípravcích. Proto HPLC můžeme najít v kontrolních laboratořích většiny výrobců léčiv (např. Sanofi Aventis, Merck, Krka, Roche) a státních orgánů pověřených dohledem na léčivé přípravky (SÚKL, FDA, EDQM<sup>13</sup> atd.).

Ve druhé problematice, která se týká stability léčiv, podává HPLC přibližný obraz o průběhu rozkladného procesu a umožňuje kvantitativně sledovat úbytek léčiva a zároveň monitorovat rozkladné produkty po stránce identifikační a obsahové. Tuto aplikaci ocení hlavně výrobci léčiv, zvláště originálních.

Ve třetím směru, což jsou rostlinná léčiva, lze pomocí HPLC metodologie hodnotit zastoupení a zároveň obsah různých sekundárních metabolitů rostlinné přeměny látek, např. alkaloidy, glykosidy, saponiny a silice.

Čtvrtý směr kontrolně analytické problematiky, který sleduje léčiva a metabolity v tělních tekutinách je v současnosti jeden z nejvíce se rozvíjejících trendů. Před HPLC analýzou je třeba nejdřív

léčivo a případně jeho metabolity extrahovat do vhodného rozpouštědla z analyzované tělní tekutiny. Existuje i druhá možnost, a tou je úprava tělní tekutiny. Způsob úpravy závisí na charakteru tekutiny, obecně se zbaví všech buněk a buněčných součástí, deproteinizuje se a podstoupí ultrafiltraci. V této problematice je velká výhoda, že metodika HPLC je selektivní a lze s ní jak určovat látky, tak stanovit jejich množství.

HPLC nachází veliké uplatnění i v analýze potravin. Tasioula-Margari a Okogeri popisují simultánní stanovení fenolických látek a tokoferolů v panenském olivovém oleji, který byl vyroben z oliv odrůdy Lianolia z regionu Prevezza, Řecko. Byl použit HPLC model Shimadzu a kolona pro reverzní chromatografii C<sub>18</sub>. Detekce byla zajištěna UV spektrometrem při 280 nm<sup>15</sup>.

Zeraik a Yariwake vyvinuli HPLC metodu pro stanovení celkové množiny flavonoidů dřeneš mučenky jedlé (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*, *Passifloraceae*). Plody byly sesbírány ve městě Bauru, stát São Paulo, Brazílie. Eluce byla na reverzních fázích a gradientová. Detekce byla prováděna UV-DAD spektrofotometrem a spektra jednotlivých flavonoidů byla snímána při 200 – 400 nm<sup>16</sup>.

HPLC se osvědčila v monitorování polutantů v životním prostředí. Williamson a spolupracovníci popisují metodu HPLC stanovení hlavních polutantů charakteru polyaromatických uhlovodíků ve vodě, sedimentu a přístrojů se semipermeabilní membránou. Zkoumalo se celkem 15 různých aromatických polycyklických uhlovodíků, které byly různými způsoby extrahovány ze svých původních materiálů. Vlastní analýza byla provedena HPLC systémem na reverzní fázi C<sub>18</sub>. Polycyklické aromáty byly detekovány pomocí programovatelného skenovacího fluorometru<sup>17</sup>.

Van Elteren a spolupracovníci stanovovali obsah anorganického arsenu (přesněji obsah iontů arsenitých a arseničných) z minerálních vod z pěti různých stanovišť ve Slovinsku. Láhve s minerálními vodami byly zakoupeny ve stejný čas v supermarketu Mercator ve městě Novo Město, Slovinsko. Vody byly před analýzou odplyněny desetiminutovou ultrazvukovou sonifikací. V HPLC systému byla použita anionty měnící kolona a předkolona. Detekce probíhala pomocí spektroskopu atomové fluorescence<sup>18</sup>.

Metodologie vysokoúčinné chromatografie našla své uplatnění v petrochemickém průmyslu. Pasadakis a spolupracovníci popisují metodu identifikace specifických aromatických sloučenin těžkých frakcí ropy pomocí soustavy HPLC a UV detekce pomocí diode array detektoru. Vzorky byly získány od vakuové destilační jednotky rafinérie Motor Oil Hellas, Athény, Řecko. Jednalo se o HPLC na normálních fázích. Detekce byla zajištěna DAD-UV spektrometrem<sup>19</sup>.



## 2.3. Sekvenční injekční chromatografie

### 2.3.1. Systém SIC a jeho součásti<sup>20</sup>

V metodologii sekvenční injekční analýzy je možno simultánně analyzovat jednoduché směsi za pomoci neseparačních postupů. Nejjednodušší příklad je použití selektivních detektorů, které snímají u každé složky směsi jinou charakteristiku. Toho využili Zisiou a spolupracovníci a tento tým popsal metodologii SIA, kterou použil ke stanovení naproxenu ve formě komplexu naproxen- $\beta$ -cyklodextrin. Jako vzorky posloužily tablety Naprosyn 250 a 500 mg (Roche) a Reuxen 205 a 500 mg (Tecnofar). Tyto tablety byly rozdrceny, rozpuštěny ve vodě a pak přímo analyzovány. Detekce byla fluorimetrická při vlnových délkách 280 nm a 356 nm<sup>21</sup>.

Min a spolupracovníci vyvinuli metodu SIA pro on-line analýzu glukózy a penicilinu v průběhu kultivace plísňe *Penicillium chrysogenum*. Vzorky byly připraveny tak, jak je popsáno v dřívější práci<sup>23</sup> tohoto týmu. Chemiluminiscenční detektor glukózy byl založen na reakci glukózy s enzymem glukóza-oxidázou, při níž vzniká peroxid vodíku. Penicilin je penicilázou přeměněn na kyselinu penicilanovou, která je pak detekována buď chemiluminiscenčně nebo spektrofotometricky<sup>22</sup>.

Problémy s analýzou směsí byly jednoduše vyřešeny zavedením krátké monolitické kolony do systému SIA a tímto spojením vznikla sekvenční injekční chromatografie. Tato metoda byla poprvé popsána roku 2003 a uplatnila se úspěšně zejména na poli farmaceutické analýzy.

Systém sekvenční injekční chromatografie je postaven na základním vybavení SIA. Patří mezi nízkotlaké (do 2,5 MPa) průtokové metody. Chromatografickou část představuje krátká monolitická kolona, která je umístěna mezi Z průtokovou celou a vícecestným ventilem. SIC slouží jako dobrý automatický analyzátor pro rychlou chromatografickou analýzu. Nabízí možnost snadného zacházení a úpravy vzorku. Tato vlastnost snižuje riziko chyb, které vznikají v důsledku selhání lidského faktoru. Rovněž umožňuje analýzu vzorků biologicky nebezpečných.

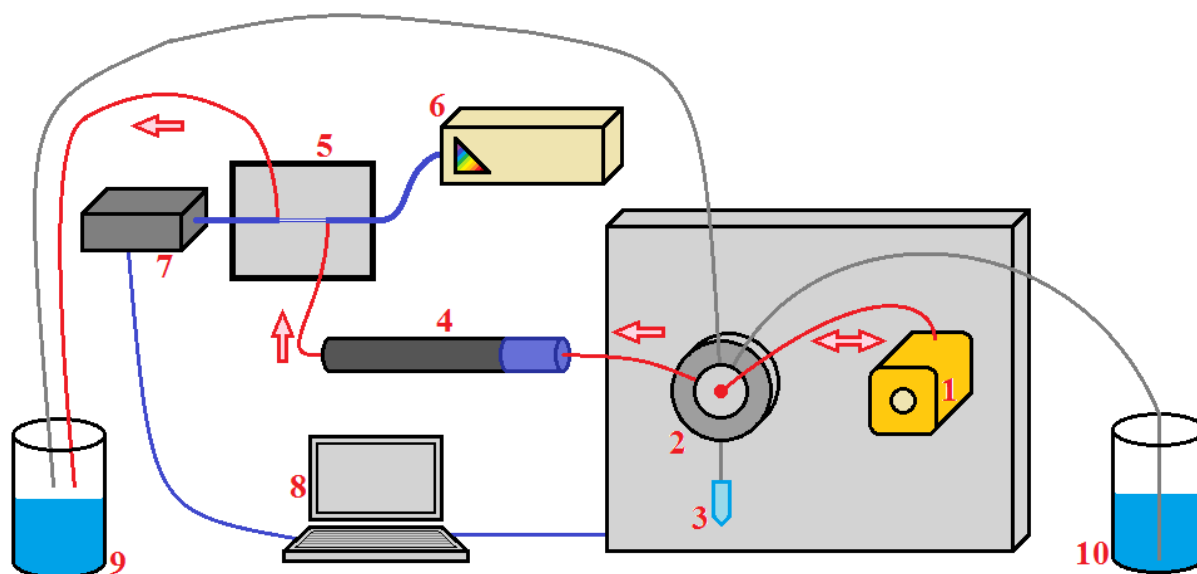
Obsah používaných pump činí 5,0 nebo 10,0 ml. Menší pumpy dokážou vyvinout vyšší pracovní tlak. Rychlost průtoku mobilní fáze bývá přizpůsobena délce kolony a tvaru píků. Objem vzorku závisí na délce kolony a činí obvykle 10 – 20  $\mu$ l.

Mobilní fáze je založena na methanolu nebo acetonitrilu. Použité množství mobilní fáze je takový objem, kterým se vymyjí všechny substance z kolony.

Monolitické kolony jsou používány v sekvenční injekční analýze, protože jejich uspořádání mikro- a mezopórů vykazuje malý protitlak při relativně vysoké rychlosti průtoku mobilní fáze. Délka kolony se vybírá v závislosti na chromatografických vlastnostech všech zkoumaných látek ve vzorku, obvykle jsou dlouhé 25 – 50 mm. Vlastnosti těchto kolon byly podrobněji pojednány v kapitole o vybavení HPLC.

Detekce je prováděna většinou DAD detektorem. Bývá kombinován se Z celou o optické aktivní délce 10 mm. Jsou používány najednou dvě až tři vlnové délky, když je potřeba zvýšit selektivitu.

Celý systém je kontrolován příslušným softwarem (např. FIALab<sup>®</sup>) podle předem daného programu.



**Obr. 3** Schéma systému sekvenční injekční chromatografie<sup>43</sup>

1 – pumpa, 2 – vícecestný ventil, 3 – vzorek, 4 – kolona s předkolonou, 5 – Z cela, 6 – UV-VIS lampa, 7 – detektor, 8 – počítač, 9 – odpad, 10 – mobilní fáze.

### 2.3.2. Využití SIC v praxi<sup>20</sup>

Nejdříve se pomocí sekvenční injekční chromatografie analyzovaly relativně jednoduché směsi, například roztoky, sirupy, kapky. Tyto kapalné přípravky, které nevykazují žádné interferující neslučitelnosti a obsahují 2 – 5 zkoumaných látek, mohou být přímo analyzovány po předchozím naředění mobilní fází. Bylo vyvinuto hodně metod pro analýzu širokého spektra kapek a sirupů.

Chocholouš a spolupracovníci zpracovali metodu pro stanovení nafazoliniumnitratu a methylparabenu v roztocích pomocí sekvenční injekční chromatografie a detekci UV-DAD. Vzorky byly připraveny z kapek Sanorin<sup>®</sup> 0,5 ‰. Měření bylo prováděno na systému FIALab<sup>®</sup> 3 000 s monolitickou kolonou Chromolith<sup>™</sup> Flash RP-18 (25 mm × 4,6 mm, Merck). Detekce byla zajištěna UV-DAD detektorem při vlnových délkách 220 a 256 nm<sup>24</sup>.

Chocholouš a spolupracovníci popsali metodu pro simultánní stanovení triamcinolon acetonidu a kyseliny salicylové na systému SIC a DAD detekci. Testovaný léčivý přípravek byl topický roztok Triamcinolon IVAX. Analýza probíhala na systému FIALab<sup>®</sup> 3 000 s monolitickou kolonou Onyx<sup>™</sup> Monolithic C18. Detekce byla zajištěna UV-DAD detektorem při vlnové délce 240 nm<sup>25</sup>.

Polotuhé a tuhé přípravky musí být před analýzou upraveny, například extrakcí do vhodného organického rozpouštědla, protože zkoumané látky jsou zapracovány do komplexního souboru pomocných látek pro zpřesnění dávkování a snadnější aplikaci.

Šatínský a spolupracovníci vyvinuli metodu pro stanovení sodné soli diclofenaku a konzervantů methylparabenu a propylparabenu na soustavě SIC s detekcí DAD. Polotuhý přípravek Dicofenac 1,0 % pocházel od firmy Herbacos-Bofarma Ltd. Tato směs pak byla sonifikována ultrazvukem a centrifugována. 10  $\mu$ l supernatantu byl analyzován systémem FIALab<sup>®</sup> 3 000 s kolonou Chromolith<sup>®</sup> Flash RP-18e. Zkoumané látky byly monitorovány UV-DAD detektorem<sup>26</sup>.

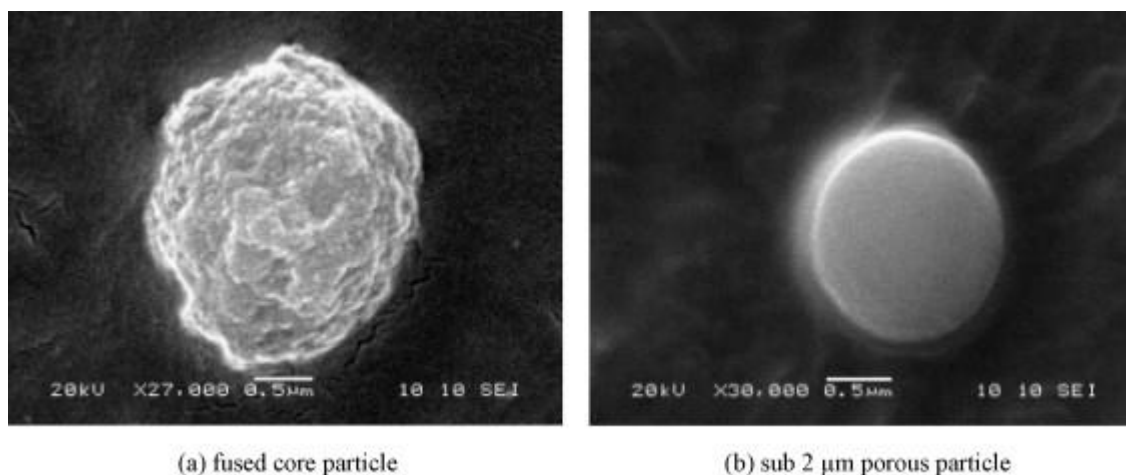
Šatínský a spolupracovníci popsali metodu sekvenční injekční chromatografie pro stanovení ambroxolium hydrochloridu a doxycyklinu za monitoringu UV detekcí. Analyzované léčivé přípravky byly Doxycyclin<sup>®</sup> AL comp. cps., Doxyhexal<sup>®</sup> 200 tbl. a Ambrosan<sup>®</sup> tbl. Analýza byla provedena na systému FIALab<sup>®</sup> 3 000 s kolonou Chromolith<sup>®</sup> Flash RP-18e. UV detekce byla při vlnové délce 213 nm<sup>27</sup>.

Byly vyvinuty i izolační metody plně založené na Sekvenční injekční chromatografii. Tato oblast se týká této práce jen okrajově a tak bude stačit jen jeden příklad.

Qiao a spolupracovníci popsali metodu izolace plutonia z pevných vzorků. Byla použita půda z Dánska a Irského moře. Separace probíhala v devíti anionty měnicích kolonách a samotné ionty plutonia a dalších prvků těžších než thalium byly detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie<sup>28</sup>.

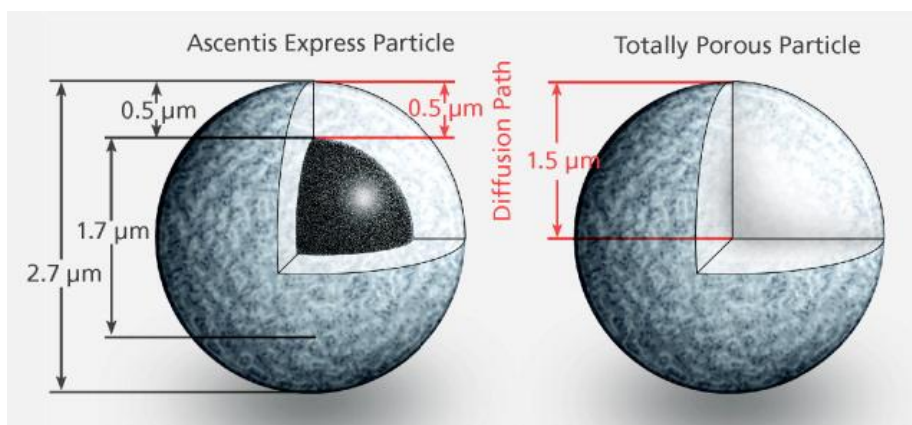
## 2.4 Částicové kolony core-shell<sup>29,32</sup>

Koncept pevných částic obalených porézni vrstvou sahá až do přelomu 60. a 70. let dvacátého století. Jako první je představili veřejnosti Horváth a spolupracovníci<sup>37, 38</sup>. Tyto částice se staly první komerční HPLC náplní, která vykazovala přesvědčivé výsledky. Nejmladší zavedení pevné částice s pórovitou slupkou je tak zvaná fused-core (core-shell) částice<sup>34</sup>.



**Obr. 4** Vzhled fused-core částic<sup>50</sup> – vlevo fused-core částice, vpravo totálně pórovitá částice

Skládají se z pevného, vysoce inertního a nepropustného jádra, které je obaleno vrstvou porézního silikagelového materiálu. Jádro má průměr 1,7  $\mu\text{m}$  a vrstva je tenká 0,5  $\mu\text{m}$ . Jeden z největších benefitů těchto fused-core částic je krátká difúzní dráha (v našem případě 0,5  $\mu\text{m}$ ) ve srovnání s celopórnými částicemi (u nich může tvořit difúzní dráha podle rozměru částice například 3  $\mu\text{m}$ ).



**Obr. 5 Schéma fused-core částic Ascentis Express<sup>51</sup>**

Tento výrazný rys zajišťuje vynikající kinetiku transferu hmoty a lepší výkonost při vyšších rychlostech mobilní fáze. Velmi význačná a unikátní vlastnost fused-core částic je jejich vysoká stejnoměrnost velikosti. To usnadňuje plnění těchto kolon s velkou robustností. Co je důležité, tak 2,7  $\mu\text{m}$  fused-core částice vytvářejí přibližně jen polovinu protitlaku částic o rozměru 1,8  $\mu\text{m}$ , což umožňuje používat kolony plněné fused-core částicemi i při tradičních HPLC systémech. První kolony plněné tímto typem částic byly zavedeny na trh v roce 2007<sup>32</sup>. Jedná se o kolony tvarově i rozměrově shodnými s tradičními kolonami, i když se mohou rozměry lišit. U kolon s fused-core 2,7  $\mu\text{m}$  částicemi lze použít frity s 2  $\mu\text{m}$  póry (tytéž frity, které se obvykle používají u kolon s 3 – 5  $\mu\text{m}$  částicemi). Tím se stanou kolony méně vnímavé k problémům při připojení, které jsou evidentní u kolon s částicemi o rozměrech méně než 2  $\mu\text{m}$  a frity s pórovitostí 0,5  $\mu\text{m}$ . Platí to zvláště pro farmaceutické vzorky se složitou maticí. Retence, selektivní chování a spotřeba vzorků pro fused-core kolony jsou cílem praktického zájmu ve farmaceutickém průmyslu. Tyto charakteristiky fused-core částic a totálně porézních částic s rozměry pod 2  $\mu\text{m}$  byly předmětem systematického vyhodnocení v práci Abrahima a spolupracovníků<sup>29</sup>. Rovněž byla srovnávána efektivita kolony a pokles protitlaku. Abrahim a spolupracovníci srovnávali základní charakteristiky (retenci, selektivitu, kapacitu vzorku, efektivitu kolony a protitlak) u kolony Ascentis Express C18 s fused-core částicemi a kolony Zorbax Eclipse Plus C-18 s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  nebo kolonou Water Acquity BEH C18.

Retenční faktor u kolony Ascentis byl menší než u kolony Zorbax. Mohlo by to být způsobeno menší dostupnou plochou povrchu, srovnáno s kolonou Zorbax. Avšak v práci Cunliffa a Maloneyho

bylo hlášeno, že stejná retence byla zjištěna u kolony s fused-core částicemi a kolony Aquity s částicemi o rozměrech 1,7  $\mu\text{m}$ <sup>30</sup>. To může značit retenční rozdíly mezi stacionárními fázemi Zorbax C18 a Acquity. Rozdíl retenčního faktoru mezi kolonou s fused-core částicemi a kolonou Zorbax by mohly být snadno vyrovnány vhodným složením mobilní fáze.

U selektivních charakteristik Abraham a spolupracovníci zjistili, že semiporézní fused-core částice a porézní částice s rozměry pod 2  $\mu\text{m}$  mají mírně vyšší selektivitu pro nepolární i polární sloučeniny, které testovali. Rozdíl byl výraznější při použitých vysokých koncentracích organiky. Selektivní vlastnosti obou kolon byly dále podrobeny různým testům selektivity. Z testovacího protokolu, který byl založen na metodologii Tanaky a spolupracovníků<sup>31</sup>, vyplynulo, že obě zkoumané kolony mají srovnatelné povrchové pokrytí a hydrofobní selektivitu. Bylo tak usouzeno díky srovnatelným hodnotám retenčních faktorů pentylbenzenu a hodnot methylenové selektivity. Ostatní testy, zvláště ty, které zkouší vodíkové můstky, obsah reiduální silanolových zbytků a iontovýměnnou kapacitu, také neukázaly žádný velký rozdíl mezi dvěma zkoušenými kolonami. Na druhou stranu v trifenylen/*o*-terfenylovém testu byl pozorován znatelný rozdíl v selektivitě. Hodnoty pro fused-core částice C18 byly přibližně o 30 % větší než pro 1,8  $\mu\text{m}$  porézní částice C18. Tyto výsledky by mohly být přičteny rozdílu prostorového rozložení, které jsou způsobeny variacemi povrchové silanizace a/nebo morfologii silikagelových částic.

Kapacita vzorků patří mezi nejdůležitější vlastnosti kolony, které jsou velice podrobně zkoumané při vývoji nové stacionární fáze, protože může výrazně ovlivnit lineární dynamický rozsah daného analytu. Kolony s vyšší kapacitou obvykle poskytují větší lineární dynamický rozsah. Celkový objem fúzovaného jádra v povrchově porézních 1,8  $\mu\text{m}$  částicích, který neposkytuje žádnou retenci, může být stanoven na 25 % hodnot 2,7  $\mu\text{m}$  porézních částic. Kapacita vzorku by tudíž měla být pro kolonu s fused-core částicemi přibližně o 25 % nižší než u kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Výsledek Abrahama a spolupracovníků naznačuje, že kolona plněná čistě porézními částicemi může vykazovat mírně vyšší lineární dynamický rozsah než kolona s fused-core částicemi.

Aby mohla být srovnávána účinnost dvou zkoumaných kolon (fused-core částice a čistě porézní částice), tak van Deemterovy křivky byly zakresleny za použití hodnot účinnosti, které byly vypočítány pro interval rychlostí 0,6 až 10 mm/s. Jako testovaný analyt byl použit benzofenon. složení mobilní fáze bylo mírně upraveno tak, aby dvě zkoumané kolony měly obdobný retenční faktor. Ukázalo se, že 1,7  $\mu\text{m}$  částice jsou účinnější (nižší výška teoretických pater), než 2,7  $\mu\text{m}$  fused-core částice za optimální lineární rychlosti a výš (0,3 – 1,0 cm/s). Účinnost, která byla získána použitím fused-core částic, má průměrné hodnoty na 85 % hodnot pro 1,7  $\mu\text{m}$  částice v tomto rozmezí rychlostí. Bylo odhadnuto, že svah křivky pro fused-core částice je o 25 % nižší než pro 1,7  $\mu\text{m}$  částice. Je to způsobeno nižším odporem transferu hmoty fused-core částic. Výsledky ukazují, že částice s pevným jádrem by měly být vhodnější pro rychlé separace ve vyšších průtocích. Minimální výška patra je ale pro částice s pevným jádrem o 18 % větší než pro 1,7  $\mu\text{m}$  čistě porézní částice, kvůli větší velikosti částic s pevným jádrem.

Efektivita kolon stoupá se zmenšováním průměru částic, ale vyvíjený protitlak stoupá mnohem rychleji než efektivita. Tlak je nepřímo úměrný druhé mocnině velikosti částic. Proto pro mnoho aplikací kapalinové chromatografie s vysokým rozlišením je třeba použít systémy vyvíjející vysoký tlak. Částice s vysokou účinností, ale vyvíjeným nízkým protitlakem, by byla vhodnější kandidát pro tradiční systémy kapalinové chromatografie. Fused-core částice o rozměrech 2,7  $\mu\text{m}$ , které jsou vyrobeny z porézní vrstvy obklopující pevné jádro, nabízejí možnost s nižším protitlakem a nepatrně sníženou účinností (ve srovnání se 1,8  $\mu\text{m}$  částicemi). Abraham a spolupracovníci ve své práci<sup>29</sup> zjistili, že pokles tlaku díky větší velikosti částic s fúzovaným jádrem (2,7  $\mu\text{m}$  versus 1,8  $\mu\text{m}$ ) byl částečně mírněn působením větší drsnosti povrchu částic. Zdvojnásobení délky kolony (na 100 mm) s fused-core částicemi produkovalo o 12 % menší protitlak než kolona s čistě porézními 1,8  $\mu\text{m}$  částicemi o délce 50 mm. Podmínky v obou případech byly identické. Tento poznatek naznačuje, že kolony s fused-core částicemi mají mnohem větší účinnost na jednotku tlaku (vztaženo na kolony s částicemi o rozměrech menších než 2  $\mu\text{m}$ ).

Chocholouš a spolupracovníci popsali novou aplikaci kolony s fused-core částicemi (Ascentis<sup>®</sup> Express C18 od firmy Supelco<sup>™</sup> Analytical) a propojili ji do systému sekvenční injekční chromatografie. Kolonu rovněž porovnávali s monolitickou kolonou Chromolith<sup>®</sup> Performance RP-18e 100-3 od firmy Merck. Jako analyty byla použita skupina estrogenů a vnitřní standard ethylparaben.

Monolitické kolony s malým vnitřním průměrem představují jeden z trendů kapalinové chromatografie. Tyto kolony vykazují nižší mrtvý objem a napomáhají rychlejší separaci bez zvýšeného pracovního tlaku v doporučených rozmezech. Tenké kolony výrazně snižují vnitřní objem, což přináší lepší využití mobilní fáze. Monolitický sorbent, jak už bylo dříve psáno, má velmi vysokou porozitu a obsahuje dva typy pórů, které zlepšují separační účinnost kolony a snižují protitlak.

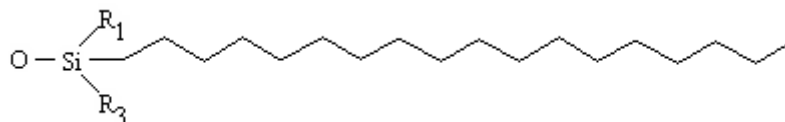
Použitá monolitická kolona byla vybrána na základě výsledků prověřování separace různých typů monolitických kolon. Kolona Chromolith<sup>®</sup> Performance RP-18e 100 vykazovala nejlepší výsledky, směs analytů byla kompletně rozdělena, délka analýzy a spotřeba mobilní fáze byla vyhovující.

Základní chromatografické parametry byly vypočteny z experimentálních dat, jako retenční časy, symetrie píku, počet teoretických pater a jejich výška.

Separace zkoušené směsi analytů byla úspěšně dosažena u obou kolon, avšak rozdílnými cestami (délka kolony, průměr a struktura stacionární fáze). Účinnost separace byla popsána počtem teoretických pater, kolona Ascentis vykazuje přibližně o 30 – 50 % nižší počet pater než kolona Chromolith. Na druhou stranu kolona Ascentis vykazovala nižší (a proto lepší) hodnoty výškového ekvivalentu pro teoretické patro. V oblasti rozlišení pík výsledky obou kolon byly stejné. Z toho vyplývá, že kolony s fused-core částicemi a s nízkým mrtvým objemem vykazují stejnou separační účinnost vzhledem k delším a tenkým monolitickým kolonám za podmínek stejného průtoku mobilní fáze<sup>32</sup>.

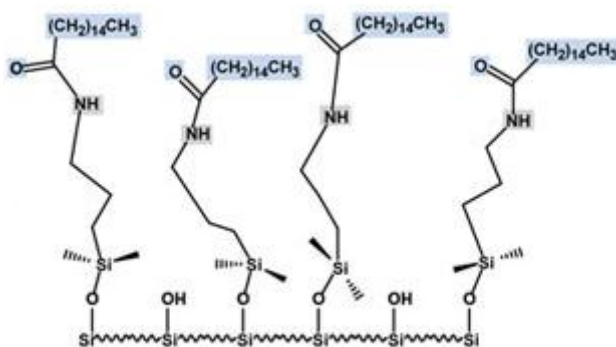
V této práci byly srovnávány některé chromatografické charakteristiky tří fused-core kolon od firmy Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA.

Kolona Ascentis Express C-18 je dlouhá 30 mm. Její vnitřní průměr je 4,6 mm a částice mají průměr 2,7  $\mu\text{m}$ . Snese teploty do 60° C. Operační spektrum pH leží v intervalu 2 – 9. Póry mají velikost 90 Å<sup>45</sup>. Na silikagelovém povrchu částic je nakondenzován oktadecylový uhlíkatý zbytek, jak ukazuje obrázek 4.



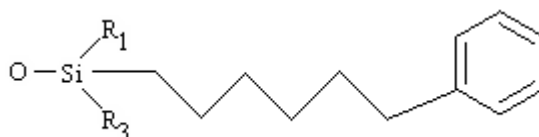
**Obr. 6** Struktura C18 zbytků<sup>46</sup>

Kolona Ascentis Express RP-Amide je dlouhá 30 mm. Její vnitřní průměr je 4,6 mm a částice mají průměr 2,7  $\mu\text{m}$ . Snese teploty do 100° C. Její rozmezí pH je 2 – 9. Póry mají velikost 90 Å<sup>47</sup>. Na silikagelovém povrchu částic jsou nakondenzovány amidové zbytky, jak je vidět na obrázku 5.



**Obr. 7** Struktura RP-Amidových zbytků<sup>48</sup>

Kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl je dlouhá 30 mm. Její vnitřní průměr je 4,6 mm a částice mají průměr 2,7  $\mu\text{m}$ . Snese teploty do 100° C včetně, její pH rozsah činní 2 – 9. Rozměr pórů je 90 Å<sup>49</sup>. Na povrchu částic jsou fenyl-hexylové zbytky.



**Obr. 8** Struktura fenyl-hexylových zbytků<sup>46</sup>

## 2.5 Fenolické kyseliny<sup>39, 40, 41, 42</sup>

Fenolické kyseliny v rostlinném organizmu vznikají jako důležité meziproducty metabolismu sekundárních metabolitů. Kyseliny zkoumané v této práci lze rozdělit do dvou skupin: deriváty kyseliny hydroxyskořicové a deriváty kyseliny gallové.

Biosyntéza těchto dvou skupin fenolických kyselin, začíná fotosyntézou. Po mnoha krocích vznikne šikimát, pak chorismát, aromatické kyseliny a nakonec kyselina skořicová, což je klíčová sloučenina pro tvorbu výše popisovaných fenolických kyselin<sup>39</sup>.

Ze skořicové kyseliny vzniká kyselina vanilová, ferulová a mnoho jiných meziproductů k fenolickým glykosidům, jejichž aglykon je odvozen z fenolu a jeho jednoduchých derivátů. Uvedeme tři příklady drog, které obsahují tyto látky. Jsou to vanilkový plod, Fructus vanillae (matečná rostlina *Vanilla planifolia* ANDR., *Vanilla tahitensis* MOORE, *Orchidaceae*), vrbová kůra, Cortex salicis (matečná rostlina *Salix alba* L., *Salix purpurea* L., *Salicaceae*), list medvědice, Folium uvae-ursi (matečná rostlina *Arctostaphylos uva-ursi* L., *Ericaceae*)<sup>42</sup>.

Druhá skupina cest metabolismu kyseliny skořicové vede přes kyselinu *o*-kumarovou ke kumarinům. Jako příklad rostlin obsahující kumariny můžou být například morač větší (*Ammi maius* L., *Apiaceae*), komonice lékařská (*Melilotus officinalis* L., *Fabaceae*) nebo mařinka vonná (*Asperula odorata* L., *Rubiaceae*)<sup>42</sup>.

Třetí a poslední skupina cest vede k tvorbě kyseliny *p*-kumarové, která je velmi důležitým substrátem pro biosyntézu flavonoidů a kyseliny kávové. Zde jsou některé příklady rostlin obsahující flavonoidy: pohanka (*Fagopyrum vulgare* T. NESS, *Polygonaceae*), jehlice trnitá (*Ononis spinosa* L. *Fabaceae*), violka tříbarevná (*Viola tricolor* L., *Violaceae*) a mnoho jiných rostlin<sup>42</sup>.

Kyselina kávová je další vcelku důležitý meziproduct biosyntézy sekundárních metabolitů rostlin. Z kyseliny kávové vznikají mnoho významných látek.

Jeden z nich je galanthamin. Tento alkaloid se získává zejména ze sněženky kavkazské (*Galanthus woronowii*, *Amaryllidaceae*). Galanthamin patří z farmakologického hlediska mezi inhibitory acetylcholinesterázy a používá se proti demencím<sup>42</sup>.

Další látkou je kolchicin, respektive další alkaloidy ocúnu jesenního (*Colchicum autumnale* L., *Colchicaceae*). Kolchicin sám o sobě patří mezi velmi silně účinné látky a je to jed dělicího vřetenka. Používá se jen velmi omezeně a to k léčbě akutního záchvatu dny<sup>42</sup>.

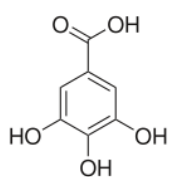
Kyselina gallová je hlavní surovinou pro tvorbu hydrolysovatelných tříslovin. Vyskytují se téměř ve všech čeledích vyšších rostlin ve větším i menším množství kvalitativním i kvantitativním, čeledi *Papaveraceae* a *Brassicaceae* třísloviny neobsahují. Jako příklady drog obsahující třísloviny byly zvoleny následující rostliny: duběnky, Gallae (matečná rostlina dub barvivý, *Quercus infecta* OLIV., *Fagaceae*), list máty, Folium menthae (matečná rostlina máta peprná, *Mentha × piperita* L., *Lamiaceae*), čaj, Folium theae (matečná rostlina *Camellia sinesis* [L.] O. Kuntze, *Theaceae*)<sup>42</sup>.



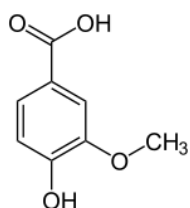
Tab. 1 Základní vlastnosti kyselin<sup>41</sup>

	K. gallová	K. vanillová	K. protokatechová	K. syringová
Sumární vzorec	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Hmotnost (g/mol)	170,11954	168,14672	154,12014	198,1727
Rozdělovací koeficient	0,7	1,4	1,1	1,0

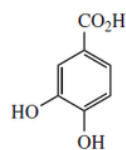
	K. sinapová	K. ferulová	K. <i>o</i> -kumarová	K. <i>p</i> -kumarová
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Hmotnost (g/mol)	224,02998	194,184	164,15802	164,15802
Rozdělovací koeficient	1,5	1,5	1,5	1,5



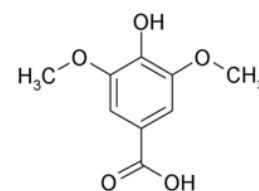
Kyselina gallová



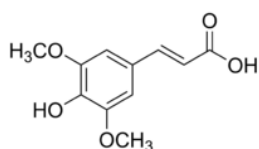
Kyselina vanillová



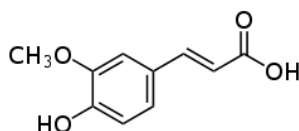
Kyselina protokatechová



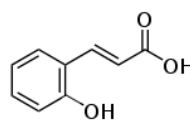
Kyselina syringová



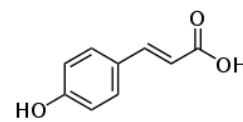
Kyselina sinapová



Kyselina ferulová



Kyselina *o*-kumarová



Kyselina *p*-kumarová

Obr. 9 Strukturální vzorce kyselin<sup>40</sup>.

### 3. Praktická část

#### 3.1. Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků

##### 3.1.1. Použité přístroje

Systém SICrom™ (FIALab®, Bellevue, WA, USA)

Kolona Ascentis Express C-18, 30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA

Kolona Ascentis Express RP-Amide, 30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA

Kolona Ascentis Express Phenylhexyl, 30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA

Osmicestný ventil z nerezové oceli (VICI® Valco Instruments, TX, USA)

Pumpa S17 (Sapphire™ Engineering, MA, USA)

Váhy analytické Sartorius Analytic

Lampa UV D-1 000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA)

Detektor CCD UV-VIS USB 4 000 (Ocean-optics, FL, USA)

Ultrazvuková lázeň

Z cela Ultem® SMA, efektivní délka 20 mm (FIALab®, Bellevue, WA, USA)

Digitální pHmetr, Hanna Instruments

spojovací PEEK trubičky o vnitřních průměrech 0,25 a 0,5 mm

optická vlákna o vnitřním průměru 0,6 mm (FIALab®, Bellevue, WA, USA)

##### 3.1.2. Použité chemikálie

Kyselina *p*-kumarová, čistota ≥ 98,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina *o*-kumarová, čistota 97,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina gallová, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina vanillová, čistota ≥ 97,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina ferulová, čistota 99,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina protokatechová, čistota ≥ 97,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina sinapová, čistota 98,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Kyselina syringová, čistota 95,0 %, Sigma – Aldrich, Steinheim (Německo)

Methanol for HPLC, Chromasolv, Sigma – Aldrich

Acetonitril for HPLC, Chromasolv, Sigma – Aldrich

Voda destilovaná

Kyselina fosforečná 85 %

Kyselina octová koncentrovaná

### 3.1.3. Příprava mobilních fází

Nejprve se v odměrném válci odměřilo požadované množství acetonitrilu a bylo přelito do láhve na mobilní fázi. Pak se odměřilo požadované množství destilované vody a bylo přelito k acetonitrilu. Láhev byla těsně uzavřena a dvakrát důkladně protřepána. Mobilní fáze byla minimálně pět minut odvzdušněna na ultrazvukové lázni. Poté se upravilo pH na požadovanou hodnotu pomocí kyseliny fosforečné 85% nebo ze začátku kyseliny octové koncentrované, mobilní fáze byla opět důkladně protřepána a odvzdušněna minimálně 1,5 minut na ultrazvukové lázni. Složení mobilní fáze se v průběhu jedné analýzy neměnilo, byly to izokratické eluce.

### 3.1.4. Příprava vzorků

Nejprve byly připraveny roztoky standardů. Odvážilo se 25 mg každé kyseliny zvlášť, kvantitativně se množství převedla do 25 ml odměrné baňky a doplnila po rysku methanolem pro HPLC. Nakonec byl obsah v baňkách důkladně protřepán. Koncentrace standardních roztoků tedy byla přibližně 1 mg/ml. Vzorky byly připravovány ředěním mobilní fází v různých poměrech (jak to měření vyžadovalo), občas i míchány dohromady (když se zkoumala selektivita kolon) a řádně protřepány.

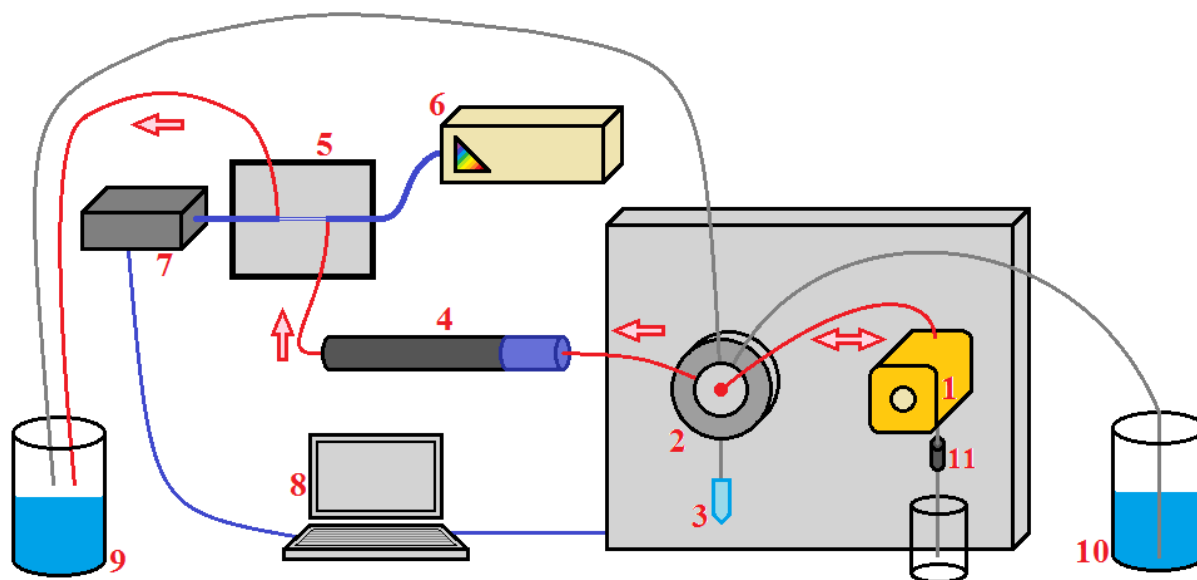
V tabulce 2 jsou přesné koncentrace roztoků standardů jednotlivých kyselin a jsou uvedeny i koncentrace roztoků použitých pro měření opakovatelnosti.

**Tab. 2 Koncentrace roztoků standardů a roztoků pro opakovatelnost**

kyselina	standard (mg/ml)	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml	0,001 mg/ml
protokatechová	1,012	0,1012	0,01012	0,001012
vanilová	1,008	0,1008	0,01008	0,001008
ferulová	1,02	0,102	0,0102	0,00102
<i>o</i> -kumarová	1,008	0,1008	0,01008	0,001008
<i>p</i> -kumarová	1,016	0,1016	0,01016	0,001016
sinapová	0,996	0,0996	0,00996	0,000996
syringová	1	0,1	0,01	0,001
gallová	1,028			

### 3.1.5. Schéma použitého SIC přístroje

Používaný SIC přístroj se skládá z pístové pumpy, osmicestného ventilu, kolony s předkolonou, Z cely, zdroje UV-VIS, DAD detektoru, počítače s příslušným softwarem, trubičkami o vnitřním rozměru 0,25 mm a 0,5 mm a nádob na mobilní fázi a odpad.



Obr. 10 Schéma používaného přístroje SIC<sup>43</sup>

1 – pumpa, 2 – osmicestný ventil, 3 – vzorek, 4 – kolona s předkolonou, 5 – Z cely, 6 – UV-VIS lampa, 7 – CCD detektor, 8 – počítač, 9 – odpad, 10 – mobilní fáze, 11 – tlaková pojistka

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Vývoj metody

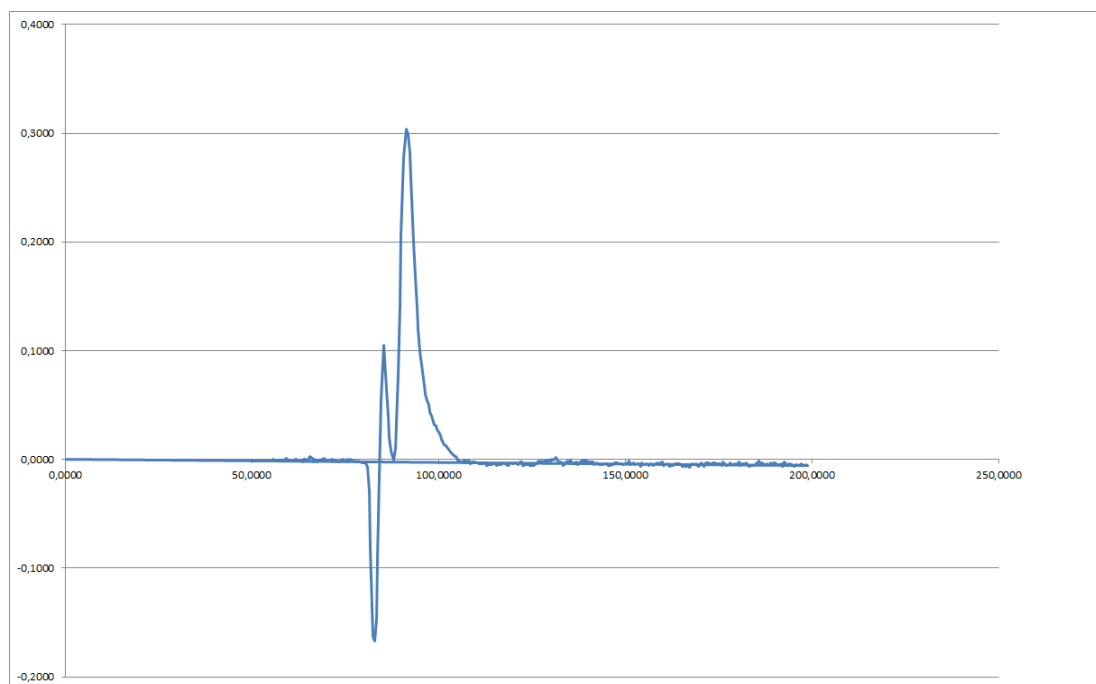
#### 4.1.1. Výběr mobilní fáze

Obecné vlastnosti mobilní fáze byly určeny typem kolon srovnávaných v této práci (jednalo se o chromatografii na reverzních fázích) a rozdělovacím koeficientem použitých kyselin. Jako základ mobilní fáze byla použita voda a acetonitril. Hodnota pH pak byla nejdříve upravována kyselinou octovou, ale pak se brzo přešlo na 85% kyselinu fosforečnou. Následující řádky popisují postupnou optimalizaci složení mobilní fáze pro jednotlivé kolony.

##### 4.1.1.1. Kolona C-18

Byl použit vzorek připravený naředěním (5 000×) standardu kyseliny *p*-kumarové (jeho koncentrace je tedy 0,2032 μg/ml).

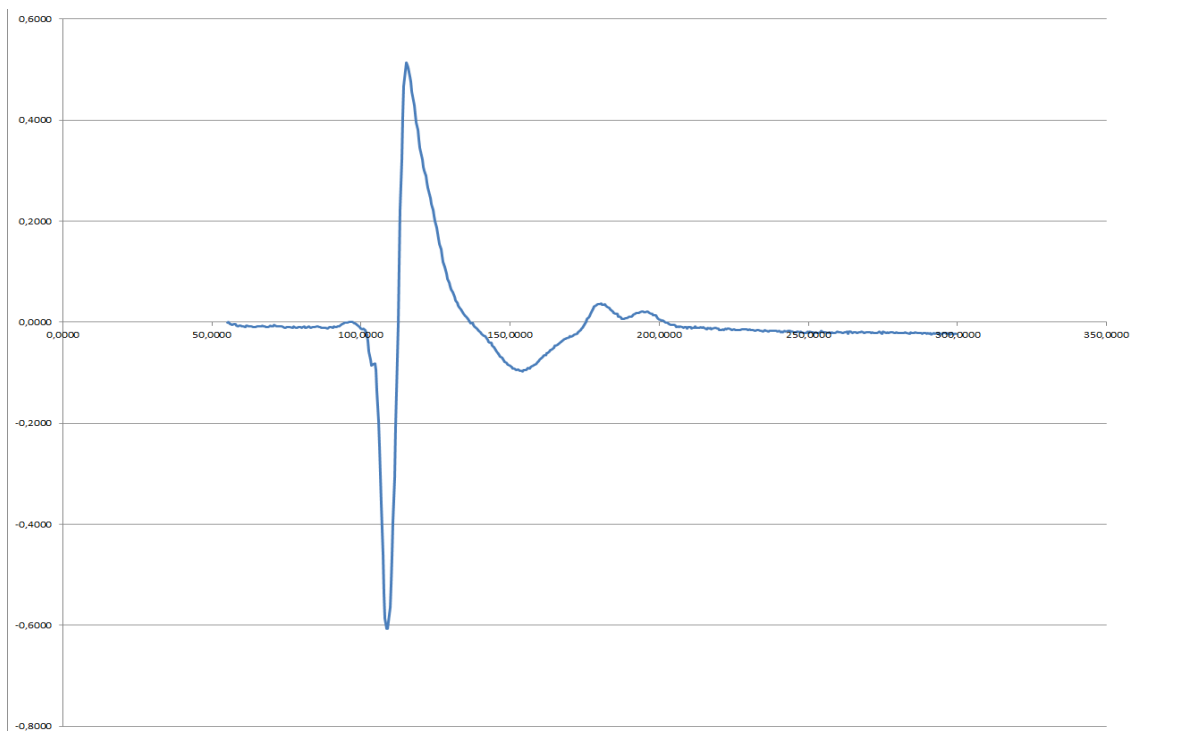
Jako první byla použita mobilní fáze skládající se z vody a acetonitrilu v poměru 50:50. Její pH bylo upraveno na 2,8 kyselinou octovou koncentrovanou. Kyselina *p*-kumarová se vymyla těsně za impulzem mrtvého objemu a je vidět mírné chvostování (obr. 11).



**Obr. 11 Chromatograf vzorku kyseliny *p*-kumarové za použití mobilní fáze voda:acetonitril (50:50) (280 nm)**

Další použitá fáze se skládala ze 75 ml mobilní fáze acetonitril:voda (50:50) a přídavku 5 ml vody. K 68 ml této mobilní fáze bylo přidáno ještě 10 ml vody. Byl použit vzorek připravený naředěním (5 000×) standardu kyseliny *p*-kumarové. Pík kyseliny *p*-kumarové se zcela spojil s impulsem mrtvého objemu a nebyl rozeznatelný.

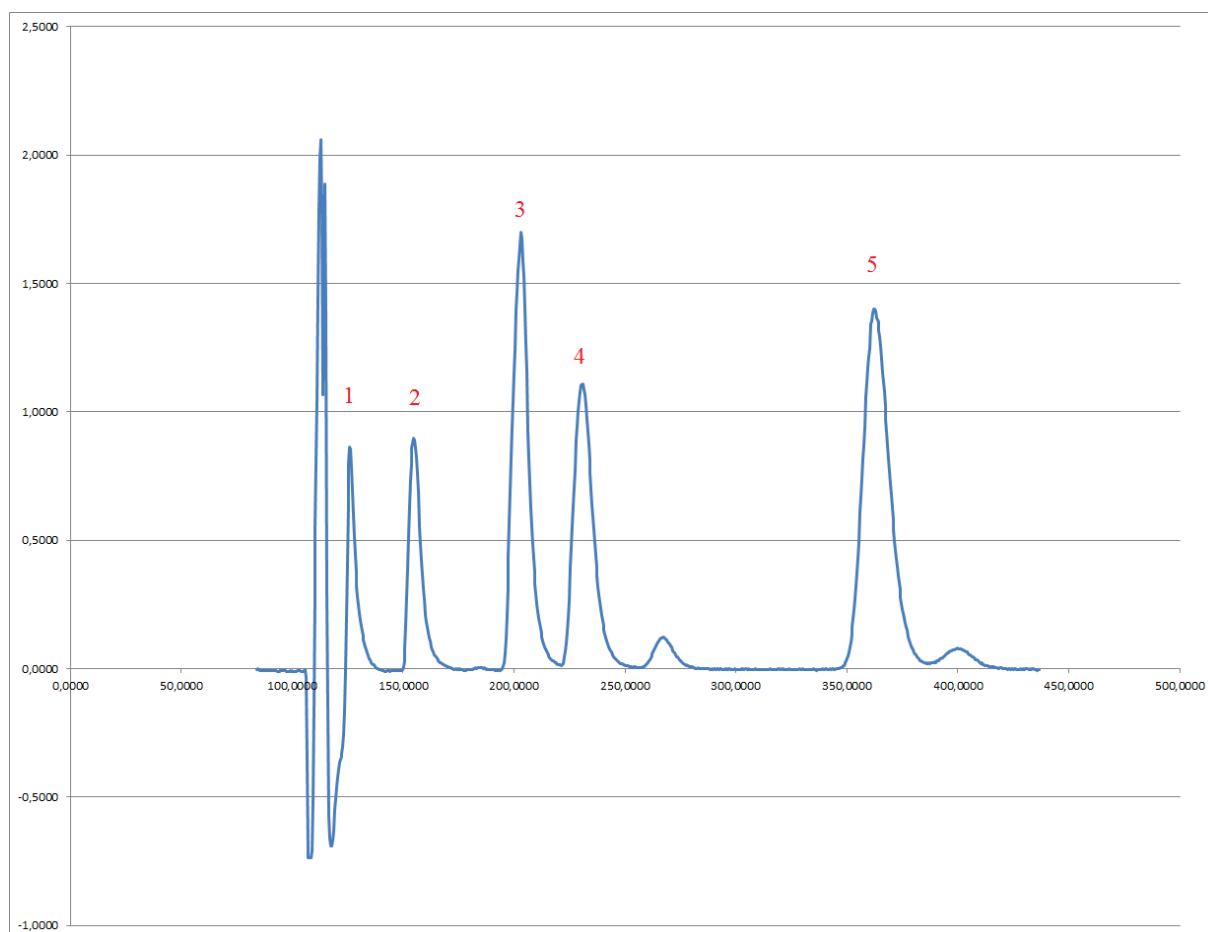
Následná použitá fáze se skládala z 23 dílů acetonitrilu a 77 dílů vody a její pH bylo upraveno na 2,21 85% kyselinou fosforečnou. Byl použit vzorek připravený naředěním (5 000×) standardu kyseliny *p*-kumarové. Pík kyseliny *p*-kumarové není rozlišitelný (obr. 12).



**Obr. 12 Chromatograf vzorku kyseliny *p*-kumarové za použití mobilní fáze z 35 ml acetonitrilu a 65 ml vody, která celkově byla s větším přídavkem vody. (280 nm)**

Při identifikaci píků byla použita mobilní fáze o složení acetonitril:voda (15:85) a její pH bylo upraveno na 2,44 85% kyselinou fosforečnou. Vzorek byl směsí standardních roztoků kyselin protokatechové, *p*-kumarové, vanilové, ferulové, *o*-kumarové, sinapové a syringové. Koncentrace kyselin ve vzorku byla 20 µg/ml (koncentrace kyseliny protokatechové byla 20,24 µg/ml, kyseliny vanilové 20,16 µg/ml, ferulové 20,4 µg/ml, *o*-kumarové 20,16 µg/ml, *p*-kumarové 20,32 µg/ml, sinapové 19,92 µg/ml a syringové 20 µg/ml). Pík 4 byl trochu nepravidelný, tvarem připomínal spíše rovnoramenný trojúhelník a na přední straně měl jemný hrbolek, protože náležel dvěma kyselinám (ferulová a sinapová).

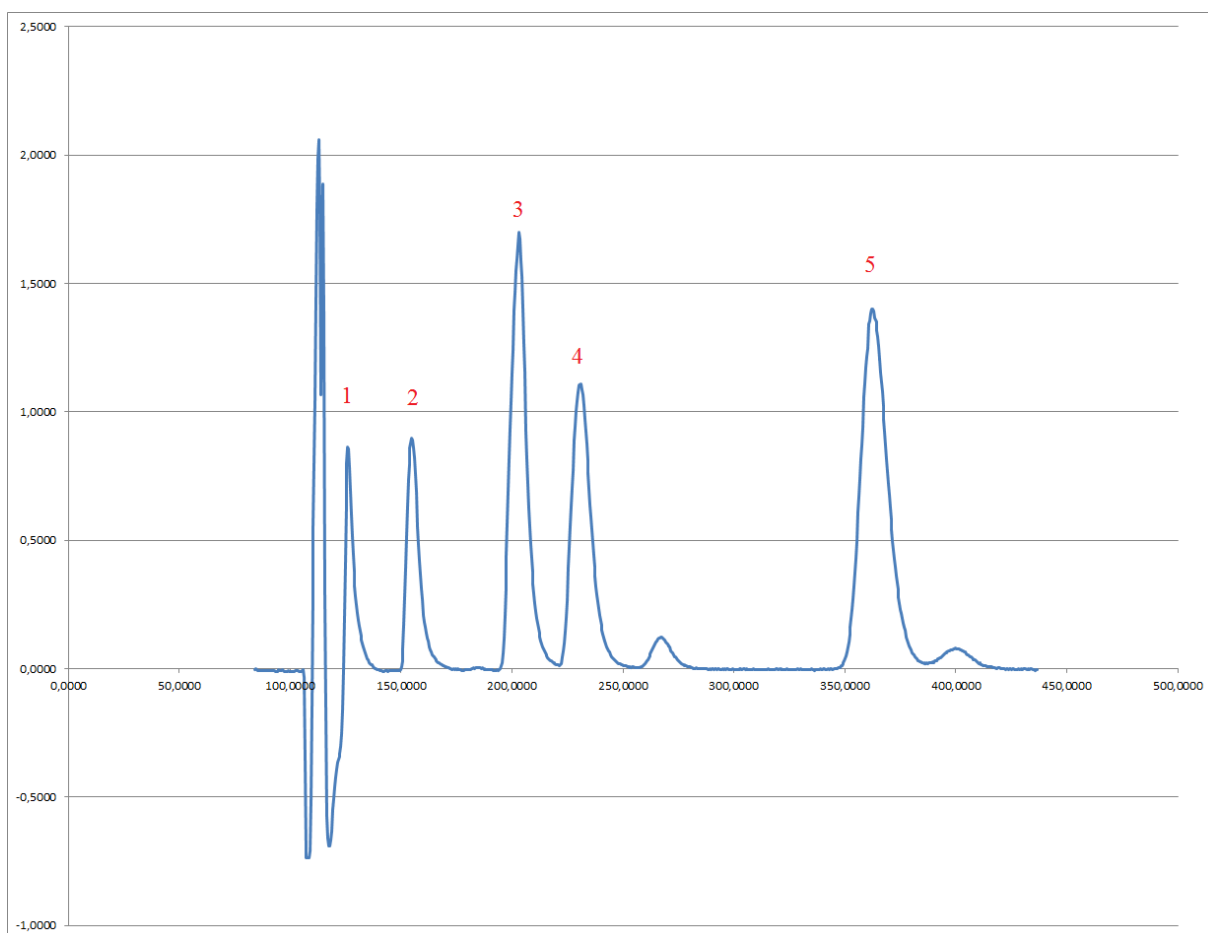
Použitá mobilní fáze se jevila jako vyhovující pro všechny kyseliny, ale ne pro kyselinu *o*-kumarovou, protože tato kyselina se začala vymývat z kolony až na samotném konci analýzy. Tato kolona vykazuje dva dvojité píky, a to pro kyseliny vanilovou a syringovou a pro kyseliny ferulovou a sinapovou.



**Obr. 13 Chromatograf opakovatelnosti kolony C18 při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – pík kyselin vanilové, 3 - pík kyseliny *p*-kumarové, 4 – pík kyselin ferulové, 5 – pík kyseliny *o*-kumarové, 2 neočíslované píky jsou zřejmě píky rozkladných produktů.

Pro měření kalibrace a opakovatelnosti (koncentrace vzorků viz dále) byla použita mobilní fáze o složení 239 ml vody a 45,5 ml acetonitrilu. Její pH bylo upraveno na 2,36 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Z obrázku 14 lze jasně vidět, že toto složení mobilní fáze se ukázalo jako vyhovující pro separaci kyselin. Píky jsou od sebe dokonale rozděleny, a je dokonce vidět, že směs není úplně čistá. Vyskytují se v ní některé nečistoty, které ale nebyly identifikovány. Všechny očíslované píky vykazují dobrou symetrii a velmi mírně chvostují.



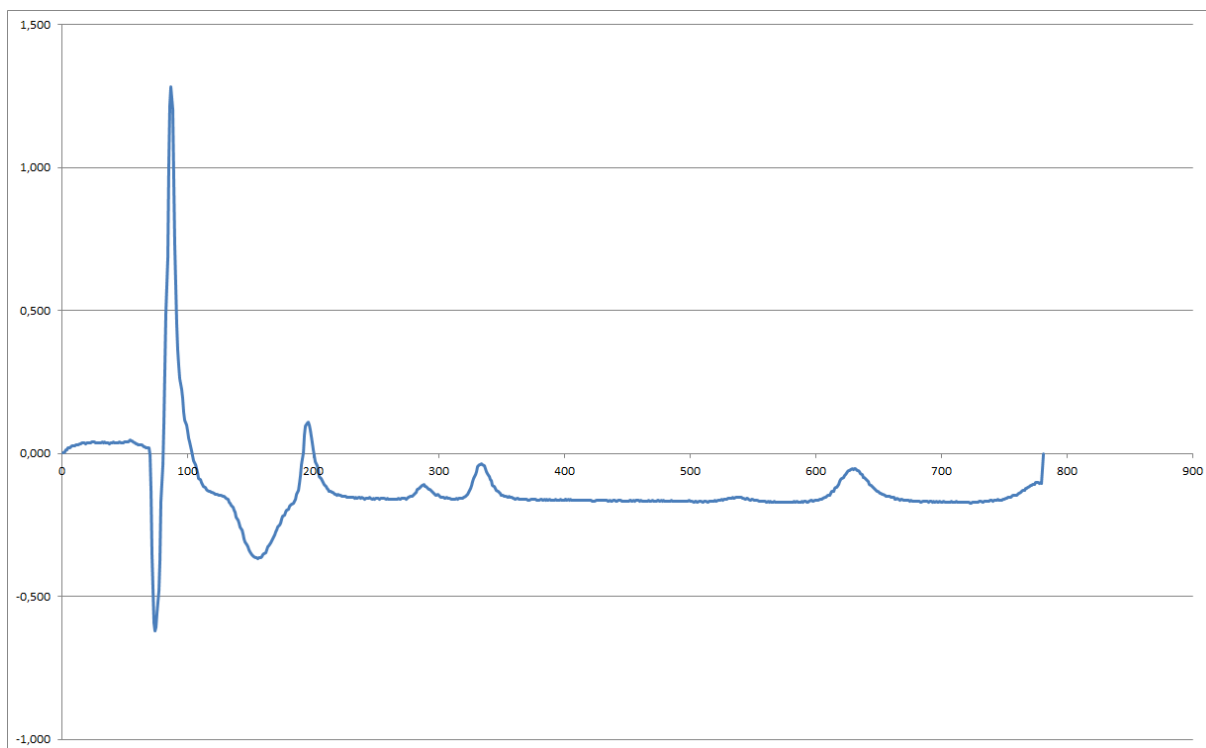
**Obr. 14 Chromatograf opakovatelnosti měření na koloně C18 při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – pík kyselin vanilové, 3 - pík kyseliny *p*-kumarové, 4 – pík kyseliny ferulové, 5 – pík kyseliny *o*-kumarové, 2 neočíslované píky jsou zřejmě píky rozkladných produktů.



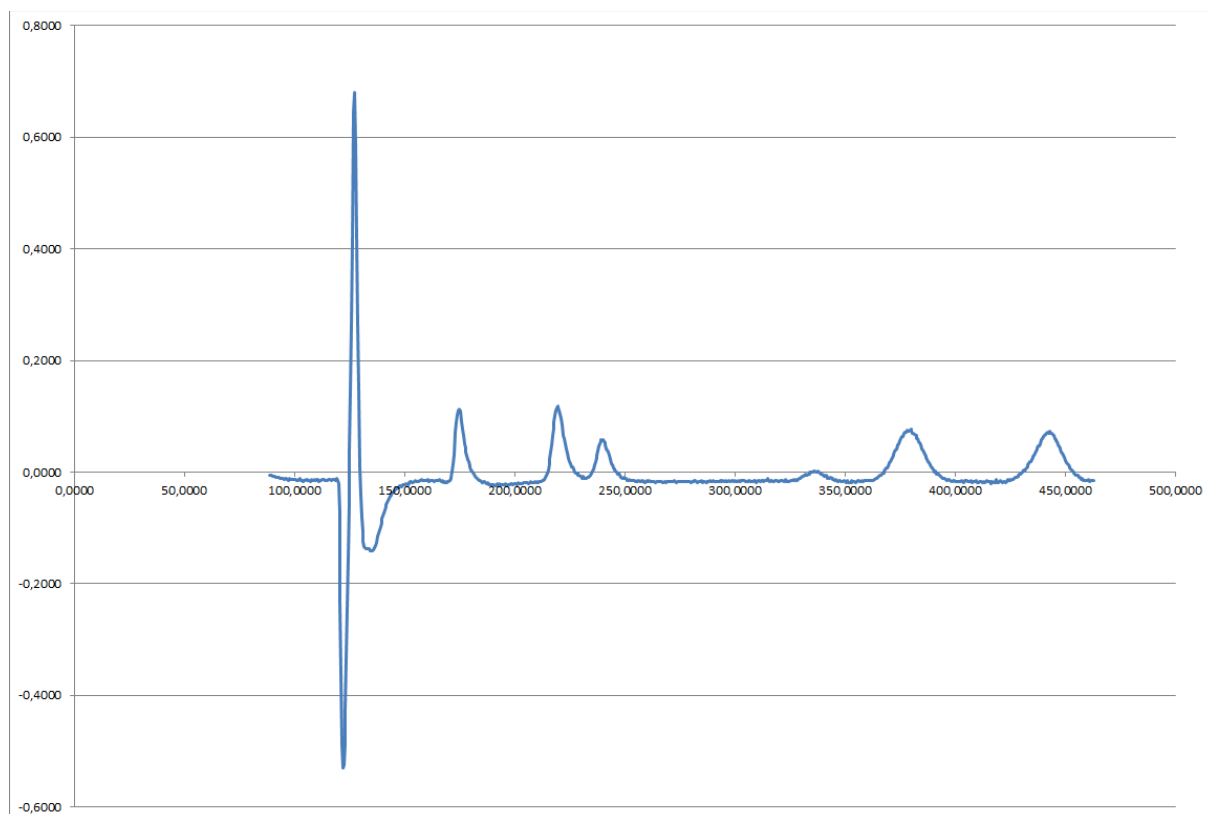
#### 4.1.1.2. Kolona RP-Amide

Na základě zkušeností z předchozích analýz na koloně C18 byla nejprve vyzkoušena mobilní fáze o složení 84 dílů vody a 16 dílů acetonitrilu. Její pH bylo upraveno na 2,36 pomocí 85% kyseliny fosforečné (jedná se o naprosto identickou mobilní fázi, která byla použita při měření kalibrace a opakovatelnosti kolony C18). Vzorek vznikl smíšením 100  $\mu$ l roztoku standardu každé zkoumané kyseliny (kromě kyseliny gallové) a doplněním do 1 000  $\mu$ l použitou mobilní fází. Z této směsi bylo odebráno 100  $\mu$ l a doplněno do 1ml (koncentrace pro jednotlivé kyseliny jsou: protokatechová 10,12  $\mu$ g/ml, vanilová 10,08  $\mu$ g/ml, ferulová 10,2  $\mu$ g/ml, *o*-kumarová 10,08  $\mu$ g/ml, *p*-kumarová 10,16  $\mu$ g/ml, sinapová 9,96  $\mu$ g/ml, syringová 10  $\mu$ g/ml). Základní linie je výrazně pod nulovou linií. Píky jsou sice zcela oddělené, ale jsou nízké navzdory vysoké koncentraci vzorků a vyskytuje se jich málo (obr.15).



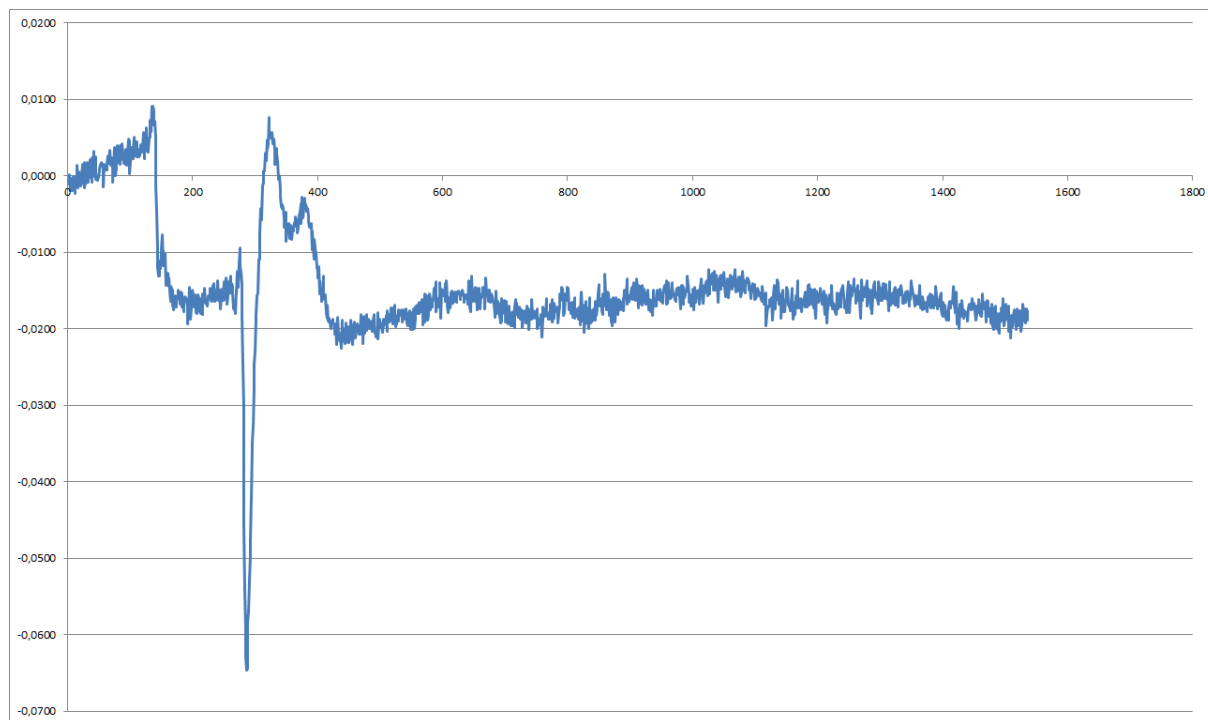
**Obr. 15 Chromatograf vzorku směsi kyselin** za použití mobilní fáze z 84 dílů vody a 16 dílů acetonitrilu. (280 nm)

Byla namíchána další mobilní fáze o složení acetonitril : voda (15 : 85), její pH bylo upraveno na hodnotu 2,38 pomocí 85% kyseliny fosforečné. K 20 ml této fáze bylo vždy postupně přidáváno 200  $\mu$ l acetonitrilu, 400  $\mu$ l, 600  $\mu$ l až po konečných 1 400  $\mu$ l acetonitrilu. Budou uvedeny chromatogramy pro přídavky 200, 800 a 1 400  $\mu$ l acetonitrilu. Vzorek je stejný jako u obrázku 15. Píky jsou výraznější a o něco vyšší než v předchozím případě (obr. 16).



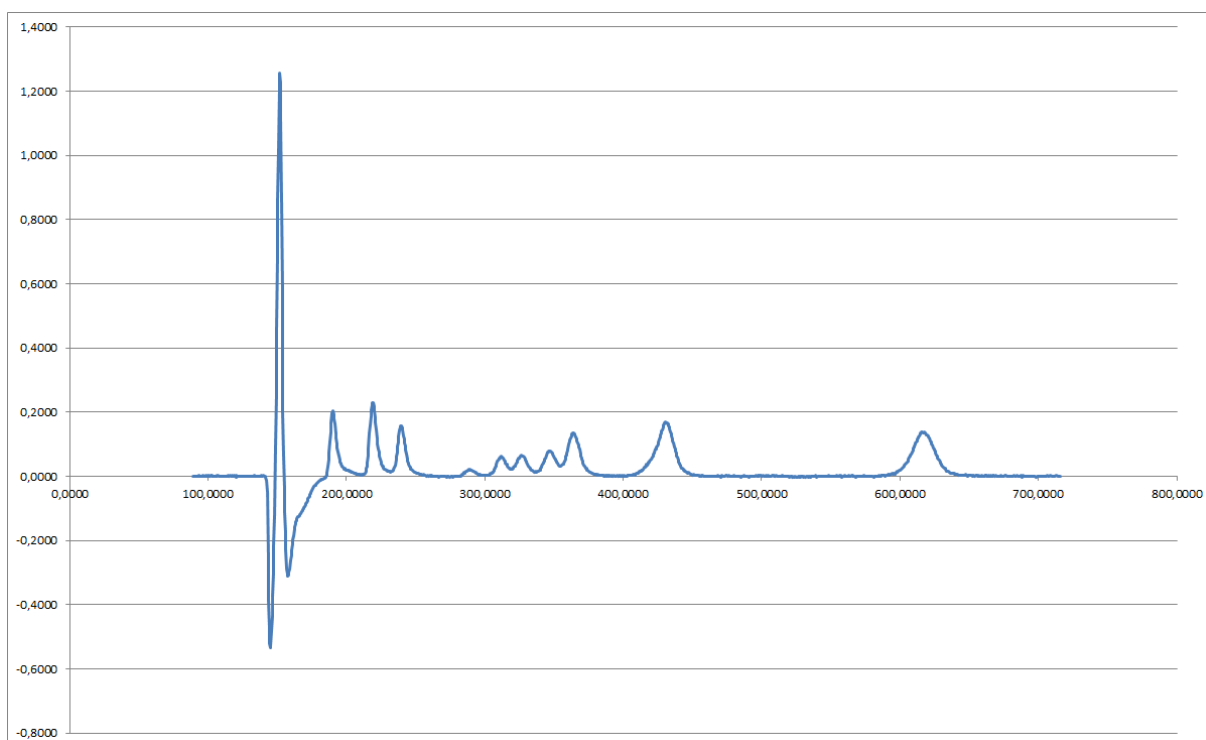
**Obr. 16 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 200  $\mu$ l acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. (280 nm)**

Složení další mobilní fáze bylo acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 800  $\mu$ l acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. Vzorek je stejný jako u obrázku 11. Toto složení mobilní fáze se ukázalo jako naprosto nevhodné, protože na chromatogramu nelze rozeznat žádné píky. Je jasně vidět jen impuls náležející mrtvému objemu (obr. 17).



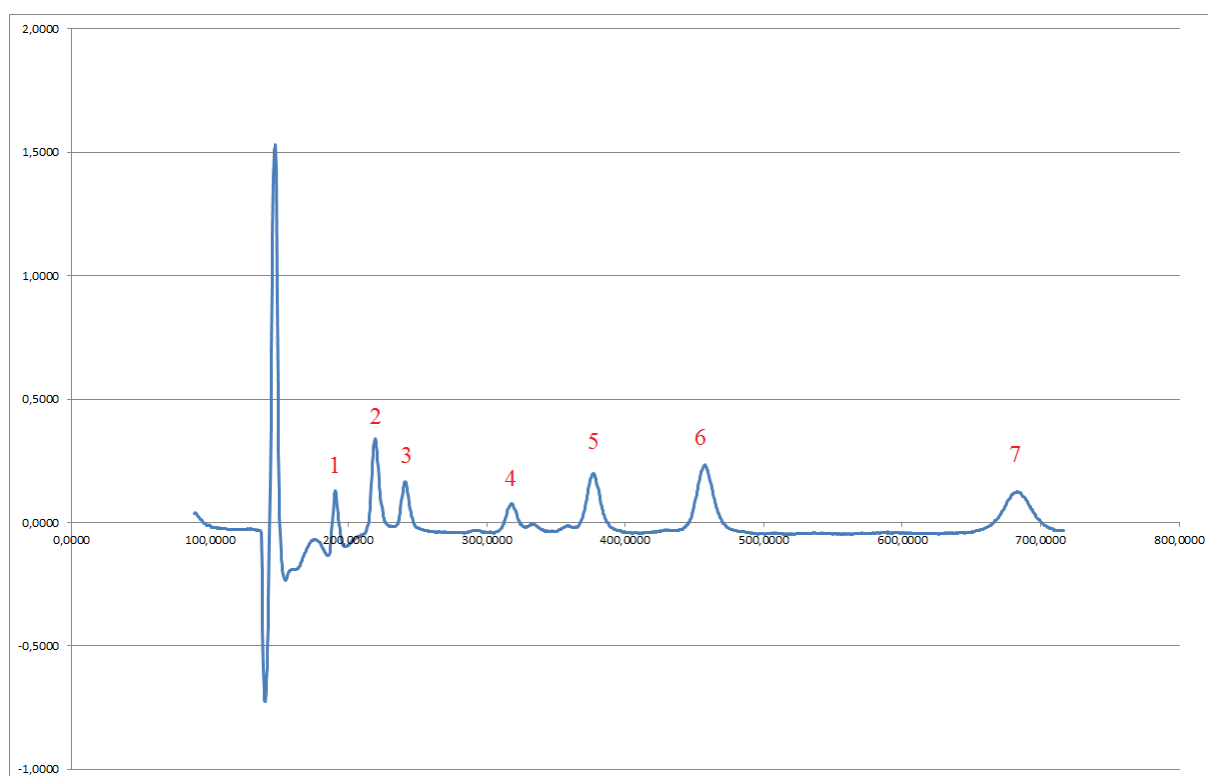
**Obr. 17 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 800  $\mu$ l acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. (280 nm)**

Mobilní fáze o složení acetonitril : voda (15 : 85) s přidavkem 1 400  $\mu$ l acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze vykazuje již lepší výsledky. Píky jsou zřetelné a oddělené, ale je jich celkově deset, což je příliš mnoho. Ve vzorku zřejmě začaly reagovat kyseliny samy se sebou anebo se částečně rozložily. To indikuje skupina píků v časovém intervalu 300 až 350 sekund. Pík s retenčním časem přibližně 430 sekund ukazuje chvostování dopředu. Tento jev je ale spíše charakteristický pro plynovou chromatografii (obr. 18).



**Obr. 18 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (15 : 85) a smíšené v poměru 1 400  $\mu$ l acetonitrilu na 20 ml mobilní fáze. (280 nm)**

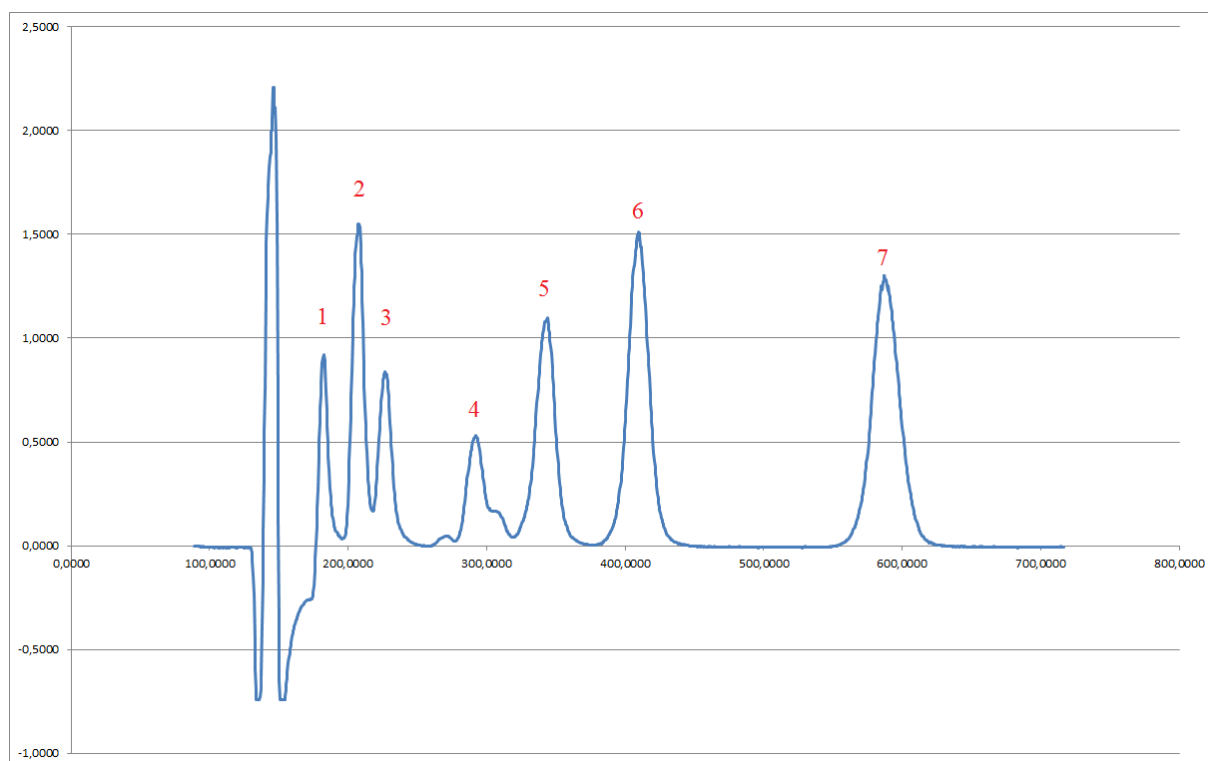
Pro identifikaci píků na koloně RP-Amide se namíchala nová fáze o složení dvacet dílů acetonitrilu a 80 dílů vody. Hodnota pH byla upravena na 2,4 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Byl připraven také nový vzorek. Bylo smíšeno 20  $\mu\text{l}$  standardního roztoku každé zmiňované kyseliny (kromě gallové) a doplněno do 1 000  $\mu\text{l}$  mobilní fáze (koncentrace kyseliny protokatechové byla 20,24  $\mu\text{g/ml}$ , kyseliny vanilové 20,16  $\mu\text{g/ml}$ , ferulové 20,4  $\mu\text{g/ml}$ , *o*-kumarové 20,16  $\mu\text{g/ml}$ , *p*-kumarové 20,32  $\mu\text{g/ml}$ , sinapové 19,92  $\mu\text{g/ml}$  a syringové 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Složení této mobilní fáze je vyhovující. Píky jsou zřetelné a jsou jasně odděleny. Dva velmi nezřetelné píky mezi píky 4 a 5 indikují možnost nečistot ve vzorku (obr. 19).



**Obr. 19 Chromatograf identifikace píků kolony RP-Amide (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – kyseliny syringové, 3 – pík kyseliny vanilové, 4 – pík kyseliny sinapové, 5 – pík kyseliny ferulové, 6 – pík kyseliny *p*-kumarové, 7 – pík kyseliny *o*-kumarové

Pro měření opakovatelnosti kolony RP-Amide byla namíchána fáze o složení 22 dílů acetonitrilu a 78 dílů vody. Hodnota pH byla upravena na 2,4 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Vzorek se skládal ze 100  $\mu$ l roztoků standardu všech kyselin (kromě gallové; je to tedy celkem 700  $\mu$ l) a doplněn do 1 000  $\mu$ l mobilní fáze (celková koncentrace vzorku je 0,1 mg/ml použité kyseliny). Píky jsou velmi jasně odlišitelné. Píky 1, 2 a 3 nejsou dokonale rozdělené a s kyselinou sinapovou (pík 4) se koeluuje neidentifikovaná látka (obr. 20). Složení mobilní fáze je vyhovující.

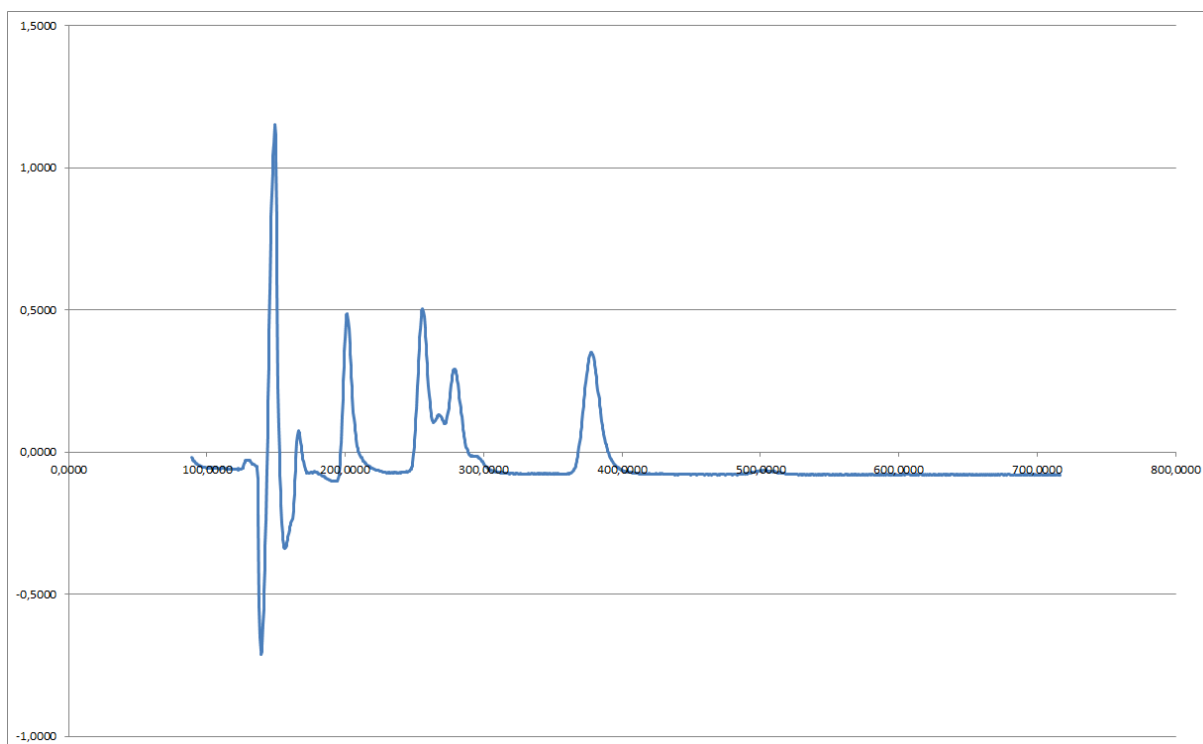


**Obr. 20 Chromatograf opakovatelnosti měření na koloně RP-Amide při koncentraci 1 (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – kyseliny syringové, 3 – pík kyseliny vanilové, 4 – pík kyseliny sinapové, 5 – pík kyseliny ferulové, 6 – pík kyseliny *p*-kumarové, 7 – pík kyseliny *o*-kumarové

#### 4.1.1.3. Kolona Phenyl-Hexyl

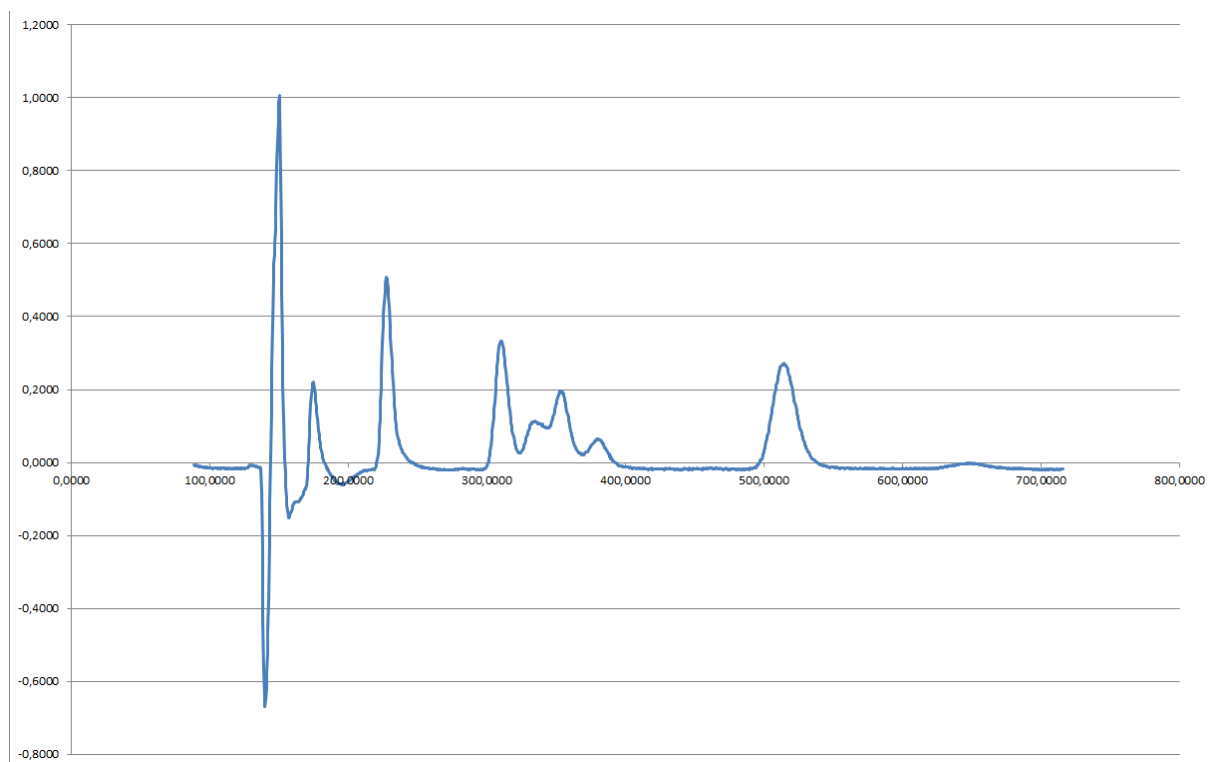
Jako první mobilní fáze byla u této kolony vyzkoušena fáze o složení 22 dílů acetonitrilu a 78 dílů vody. Hodnota pH byla upravena na 2,4 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Vzorek se skládal ze směsi 20  $\mu$ l standardních roztoků všech kyselin (kromě gallové) a byl doplněn mobilní fází do 1 000  $\mu$ l (celková koncentrace každé kyseliny je 0,05 mg/ml). Na chromatogramu je rozeznatelných šest píků, tři z nich jsou od sebe velmi špatně oddělené. Jsou spíše lokalizovány spíše do první poloviny analýzy, konec posledního píku je u retenčního času 400 sekund. Druhý pík ukazuje docela výrazné chostování (obr. 21).



**Obr. 21 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (22 : 78) (280 nm)**

Byly namíchány další mobilní fáze ve složení 20 dílů acetonitrilu a 80 dílů vody. Hodnota pH byla upravena 2,4 pomocí 85% kyseliny fosforečné. K 15 ml této mobilní fáze se postupně přidávalo 0,3 ml, 0,5 ml, 0,7 ml, 1 ml, 1,2 ml a 1,6 ml superčisté vody. Budou uvedeny chromatogramy pro přídatky 0,3 ml vody, 0,7 ml vody a 1,5 ml vody.

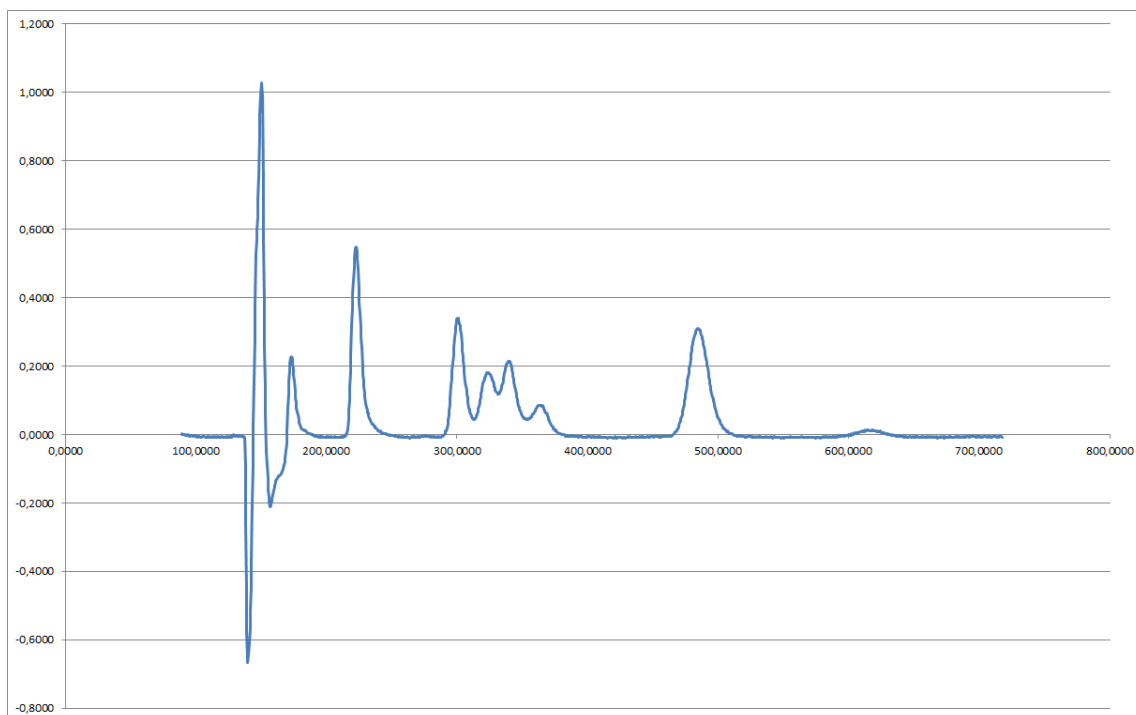
Chromatogram pro přidavek 0,3 ml vody na 15 ml mobilní fáze ukazuje, že se retenční časy všech píků prodloužily. Stejně jako v předchozím případě střední skupina čtyř píků se téměř neoddělila, ale má širší interval retenčních časů. Druhý pík ukazuje docela výrazné chvostování (obr. 22).



**Obr. 22 Chromatograf vzorku směsi kyselin** za použití mobilní fáze acetonitril : voda (20 : 80) a smíšené v poměru 0,3 ml vody na 15 ml mobilní fáze. (280 nm)

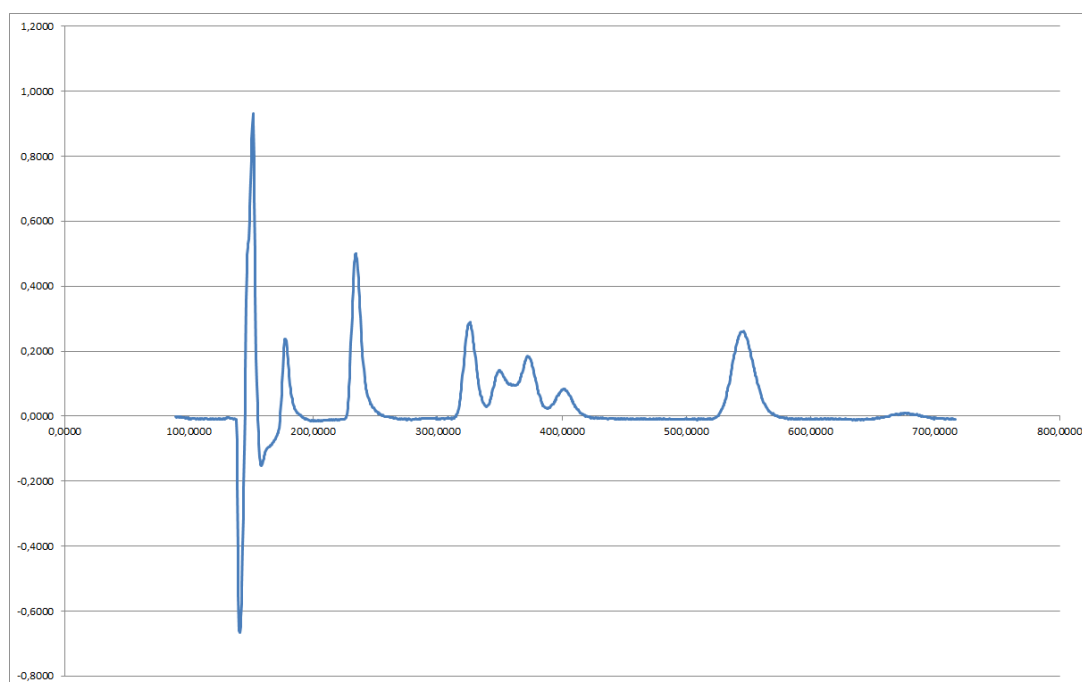
Použitá mobilní fáze s přidavkem 0,7 ml vody o trochu zkrátila retenční časy píků, je však vidět, že střední skupina čtyř spojených píků se téměř nezměnila oproti předchozímu případu. První a druhý pík vykazují docela výrazné chvostování (obr. 23).





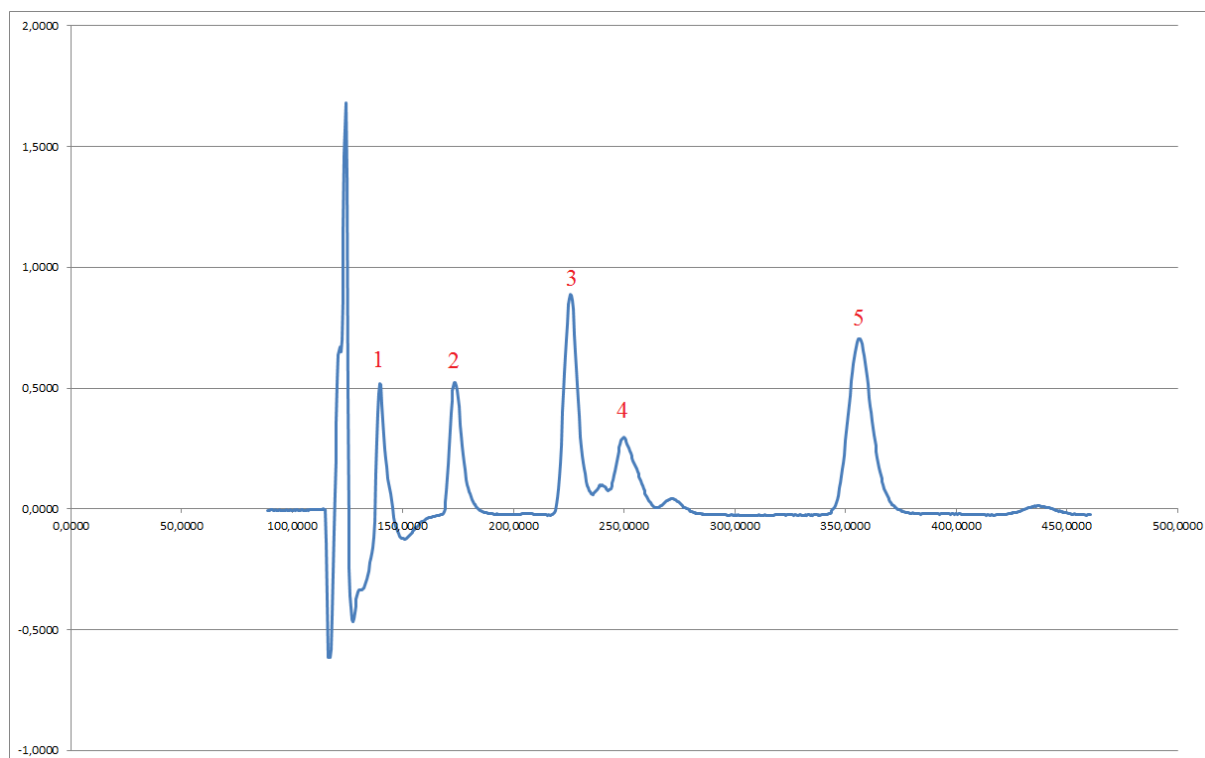
**Obr. 23 Chromatograf vzorku směsi kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (20 : 80) a smíšené v poměru 0,7 ml vody na 15 ml mobilní fáze. (280 nm)**

Složení mobilní fáze s přidavkem 1,6 ml vody nezměnilo téměř nic. Retenční časy se nepatrně prodloužily, skupina čtyř spojených píků zůstává neoddělená a první dva píky vykazují docela výrazné chvostování (obr. 24).



**Obr. 24 Chromatograf vzorku mixtury kyselin za použití mobilní fáze acetonitril : voda (20 : 80) a smíšené v poměru 1,6 ml vody na 15 ml mobilní fáze. (280 nm)**

Následující mobilní fáze byla použita pro opakovatelnost kolony Phenyl-Hexyl. Její složení bylo 16 dílů acetonitrilu a 84 dílů vody. Hodnota pH byla upravena na 2,46 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Vzorek byl připraven smíšením 100  $\mu$ l roztoku standardu kyseliny protokatechové, vanilové, *p*-kumarové, ferulové a *o*-kumarové a následným doplněním do 1 000  $\mu$ l mobilní fází (celková koncentrace použitých kyseliny je 0,1 mg/ml). Tato kolona vykazuje dva dvojité píky a to pro kyseliny vanilovou a syringovou a pro kyseliny ferulovou a sinapovou. Délka analýzy se zkrátila přibližně o jednu třetinu ve srovnání s předešlým chromatogramem, jinak píky se nijak výrazně nezměnily. Píky v těsném sousedství píků kyselin *p*-kumarové a ferulové jsou zřejmě píky nečistot (obr. 25).



**Obr. 25 Chromatograf opakovatelnosti měření na koloně Phenyl-Hexyl při koncentraci 1 (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – pík kyselin vanilové, 3 – pík kyseliny *p*-kumarové,  
4 – pík kyseliny ferulové, 5 – pík kyseliny *o*-kumarové

#### 4.1.2. Výběr průtokové rychlosti

Nejdříve byla vyzkoušena u kolony C18 průtoková rychlost 10  $\mu\text{l/s}$  a analýza proběhla bez problémů. Jakmile se v mobilní fázi zvýšil podíl vody (a tím i viskozita mobilní fáze), zvýšil se i protitlak nad únosnou mez pumpy a bezpečnostní pojistka povolila. Pojistka byla zasunuta zpět do původní polohy a průtoková rychlost byla snížena na 8  $\mu\text{l/s}$  a pak následně na 6  $\mu\text{l/s}$ , neboť se situace opakovala. Při měření dat k identifikaci, kalibraci a opakovatelnosti byla průtoková rychlost nastavena opět na 10  $\mu\text{l/s}$ . Veškeré následné analýzy u kolony C18 proběhly bez problémů.

U kolony RP-Amide byla nejdříve při první analýze použita průtoková rychlost 10  $\mu\text{l/s}$ , ale pak se přešlo na průtokovou rychlost 6  $\mu\text{l/s}$  (zřejmě z důvodu prevence vyššího opotřebování pumpy). Tato hodnota byla použita při všech následujících analýzách na koloně RP-Amide.

U kolony Phenyl-Hexyl byla zprvu použita průtoková rychlost 6  $\mu\text{l/s}$  včetně identifikace. Pro měření opakovatelnosti byla průtoková rychlost zvýšena na 10  $\mu\text{l/s}$ . V průběhu měření se zjistilo, že povolila bezpečnostní tlaková pojistka, a tudíž byla průtoková rychlost snížena na 8  $\mu\text{l/s}$ .

#### 4.1.3. Vlnová délka

Detekce probíhala pomocí detektoru UV-VIS USB 4 000 (Ocean-Optics, FL, USA). Při všech analýzách se snímaly najednou tři vlnové délky: 250 nm (kyseliny protokatechová a vanilová), 280 nm (kyseliny syringová a *o*-kumarová) a 290/325 nm (kyseliny sinapová, ferulová a *p*-kumarová). Odpovídá to ultrafialovému záření. Frekvence snímání UV záření byla 20 Hz. Všechny chromatogramy v této práci byly snímány při 280 nm.

#### 4.1.4. Program analýzy

Pro konečné analýzy identifikace, kalibrace a opakovatelnosti na koloně C18 byly použity 2 programy. Každý z nich je popsán pomocí tabulky.

**Tab. 3 Program pro měření identifikace a kalibrace na koloně C 18**

Jednotka	Činnost
	Začátek analýzy
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 2
Pumpa	Nasátí 3600 $\mu$ l mobilní faze rychlostí 70 $\mu$ l/s
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Pumpa	Pauza 4 s
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 4
Pumpa	Nasátí 10 $\mu$ l vzorku rychlostí 5 $\mu$ l/l
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 3
	Analýza nového vzorku
Pumpa	Vytlačení celkového obsahu 3 610 $\mu$ l rychlostí 10 $\mu$ l/s
Pumpa	Pauza 10 s
Spektrometr	Skenování absorbance
Spektrometr	Měření referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
	Konec analýzy
Spektrometr	Konec detekce

**Tab. 4 Program pro měření opakovatelnosti na koloně C 18**

Jednotka	Činnost
	Začátek analýzy
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 2
Pumpa	Nasátí 3600 $\mu$ l mobilní faze rychlostí 70 $\mu$ l/s
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Pumpa	Pauza 4 s
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 4
Pumpa	Nasátí 10 $\mu$ l vzorku rychlostí 10 $\mu$ l/l
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 3
	Analýza nového vzorku
Pumpa	Vytlačení celkového obsahu 3 610 $\mu$ l rychlostí 10 $\mu$ l/s
Pumpa	Pauza 10 s
Spektrometr	Skenování absorbance
Spektrometr	Měření referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
	Konec analýzy
Spektrometr	Konec detekce

Program pro konečné analýzy identifikace, kalibrace a opakovatelnosti kolony RP-Amide byl použit jen jeden. Popisuje ho následující tabulka.

**Tab. 5 Program pro měření identifikace, kalibrace a opakovatelnosti na koloně RP-Amide**

Jednotka	Činnost
	Začátek analýzy
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 2
Pumpa	Nasátí 3800 $\mu\text{l}$ mobilní faze rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Pumpa	Pauza 4 s
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 4
Pumpa	Nasátí 10 $\mu\text{l}$ vzorku rychlostí 10 $\mu\text{l/l}$
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 3
	Analýza nového vzorku
Pumpa	Vytlačení celkového obsahu 3 810 $\mu\text{l}$ rychlostí 6 $\mu\text{l/s}$
Pumpa	Pauza 10 s
Spektrometr	Skenování absorbance
Spektrometr	Měření referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
	Konec analýzy
Spektrometr	Konec detekce

U konečných analýz identifikace, kalibrace a opakovatelnosti kolony Phenyl-Hexyl byly použity 2 programy. Pro měření identifikace byl použit tentýž program, který je uveden v tabulce 4. Pro měření opakovatelnosti nejvyšší koncentrace byl použit program, který je uveden v tabulce 5. Pro zbývající koncentrace opakovatelnosti a celou kalibraci byl použit tentýž program s nižší průtokovou rychlostí přes kolonu (8  $\mu\text{l/s}$ ).

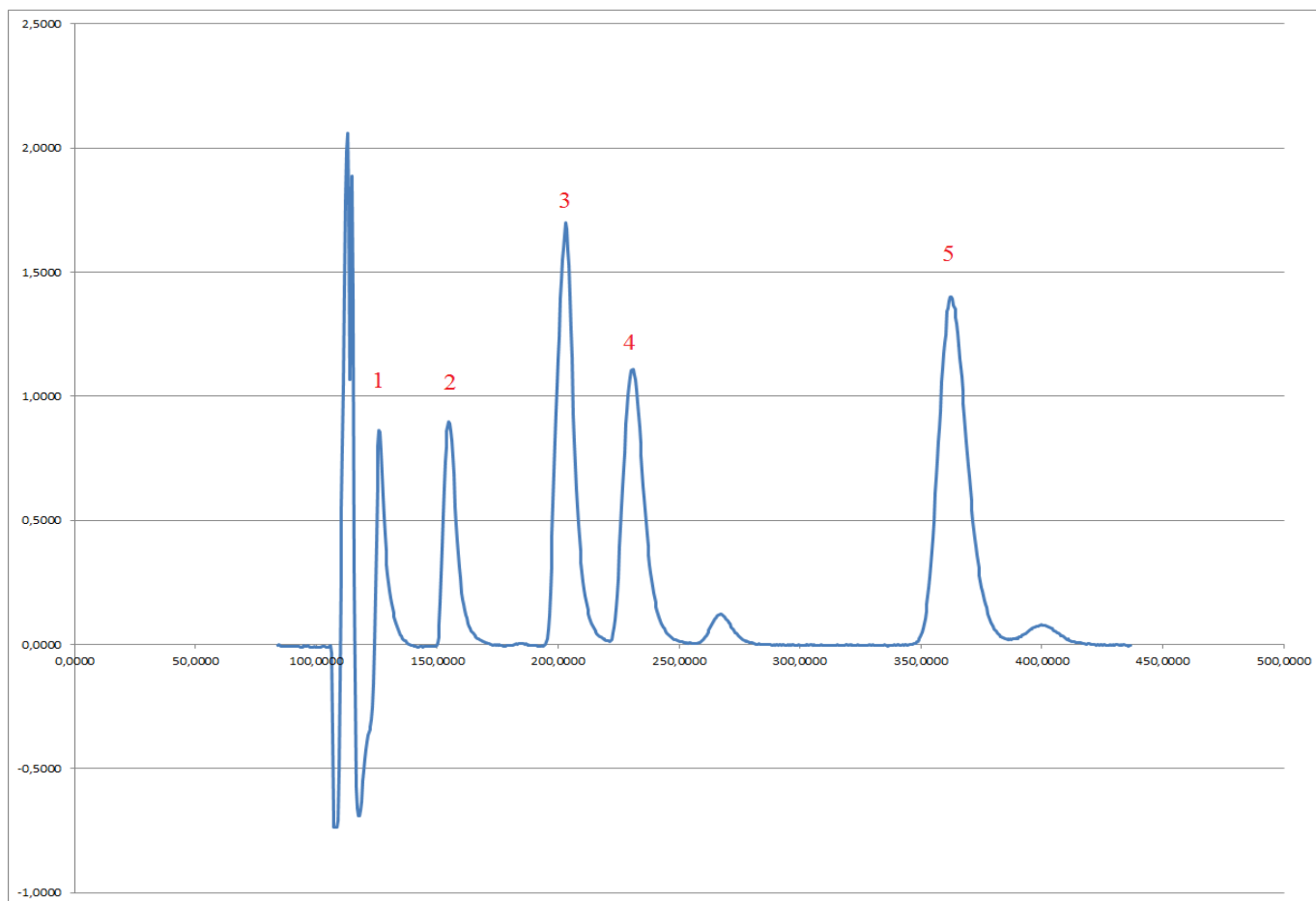
**Tab. 6 Program pro měření identifikace, kalibrace a opakovatelnosti na koloně Phenyl-Hexyl**

Jednotka	Činnost
	Začátek analýzy
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 2
Pumpa	Nasátí 3800 $\mu\text{l}$ mobilní faze rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Pumpa	Pauza 4 s
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 4
Pumpa	Nasátí 10 $\mu\text{l}$ vzorku rychlostí 10 $\mu\text{l/l}$
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
Vícecestný ventil	Přepnuto na vstup 3
	Analýza nového vzorku
Pumpa	Vytlačení celkového obsahu 3 810 $\mu\text{l}$ rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
Pumpa	Pauza 10 s
Spektrometr	Skenování absorbance
Spektrometr	Měření referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do dokončení akce
	Konec analýzy
Spektrometr	Konec detekce

## 4.2. Výsledky

### 4.2.1. Selektivita

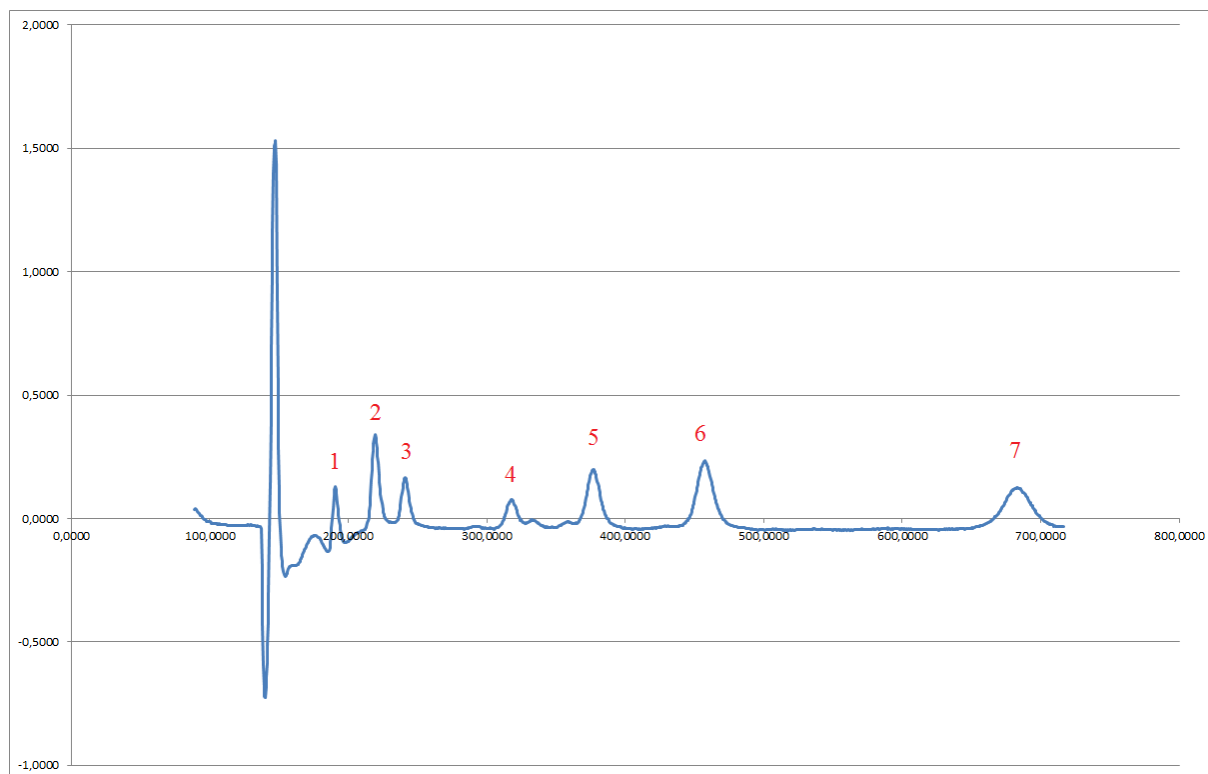
Selektivita všech tří kolon byla rozdílná. Nejvyšší selektivitu pro šest kyselin má kolona RP-Amide, pak následuje kolona Phenyl-Hexyl a nejnižší selektivitu má kolona C 18. U kyseliny syringové vykazuje největší selektivitu kolona C18 a nejmenší selektivitu kolona Phenyl-Hexyl. Kolony C18 a Phenyl-Hexyl vykazovaly na chromatogramu pět píků, z toho dva dvojitě píky, jak ukazuje ilustrativní obrázek 27. Pořadí kyselin na obou kolonách bylo stejné. První pík náležel kyselině protokatechové, druhý pík kyselinám vanilové a syringové, třetí pík patřil kyselině *p*-kumarové, čtvrtý pík kyselinám ferulové a sinapové a pátý pík kyselině *o*-kumarové (obr. 26).



**Obr. 26 Chromatograf opakovatelnosti kolony C18 při koncentraci 0,1 mg/ml (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – dvojitý pík kyselin vanilové a syringové, 3 - pík kyseliny *p*-kumarové, 4 – dvojitý pík kyselin ferulové a sinapové, 5 – pík kyseliny *o*-kumarové, 2 neočíslované píky jsou zřejmě píky rozkladných produktů.

Kolona RP-Amide jevila o poznání lepší separaci, protože její chromatogram ukazoval všech sedm píků. Jejich pořadí je uvedeno na obr. 27.



**Obr. 27 Chromatograf identifikace píků kolony RP-Amide (280 nm)**

1 – pík kyseliny protokatechové, 2 – kyseliny syringové, 3 – pík kyseliny vanilové, 4 – pík kyseliny sinapové, 5 – pík kyseliny ferulové, 6 – pík kyseliny *p*-kumarové, 7 – pík kyseliny *o*-kumarové

#### 4.2.2. Kalibrace

Kalibrační křivka byla stanovena pro každou použitou kyselinu (kromě kyseliny gallové) na všech třech kolonách. Pro kolonu C18 byly připraveny dva standardy, jeden pro směs kyselin protokatechové, vanilové, *p*-kumarové, ferulové a *o*-kumarové a jeden pro směs kyselin sinapové a syringové. Tytéž dva standardy byly použity i pro kolonu Phenyl-Hexyl. Pro kolonu RP-Amide byl připraven pouze jeden standard, který obsahoval všech sedm fenolických kyselin.

Proměřená koncentrační řada byla v intervalu 0,7812  $\mu\text{g/ml}$  až 0,1  $\text{mg/ml}$ . Začínalo se nejvyšší koncentrací (0,1  $\text{mg/ml}$ ) až po nejnižší. Ředění bylo dvojkové, vždy se vzala právě jedna polovina objemu vzorku a naředila se stejným množstvím mobilní fáze.

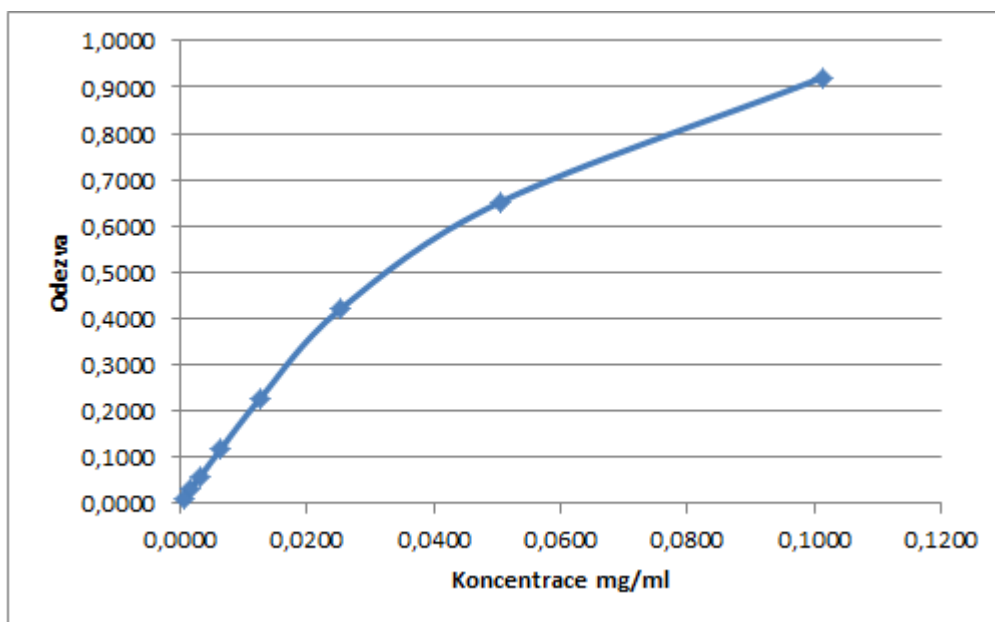
#### 4.2.2.1. Kolona C18

Pro tuto kolonu byly namíchány dva roztoky standardů, jak už bylo psáno výše. Následující tabulky popisují kalibrační data pro všechny měřené látky. Veškeré měřené koncentrace látek jsou zaznamenány v příslušných tabulkách.

Tabulka 6 popisuje křivku pro kyselinu protokatechovou. Jak je vidět na obrázku 29, křivka není lineární. Korelační koeficient je 0,9707 a reziduální odchylka je 0,0864. Limit kvantifikace je 0,7906  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2635  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab.7 Kalibrační data kyseliny protokatechové na koloně C18**

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,1012	0,9206	<b>Směrnice</b>	9,23944
0,0506	0,6526	<b>Absolutní člen</b>	0,072093
0,0253	0,4208	<b>Korelační koeficient</b>	0,97074
0,01265	0,2281	<b>Reziduální odchylka</b>	0,086401
0,006325	0,1166		
0,0031625	0,0589		
0,0015813	0,0312		
0,0007906	0,0107		



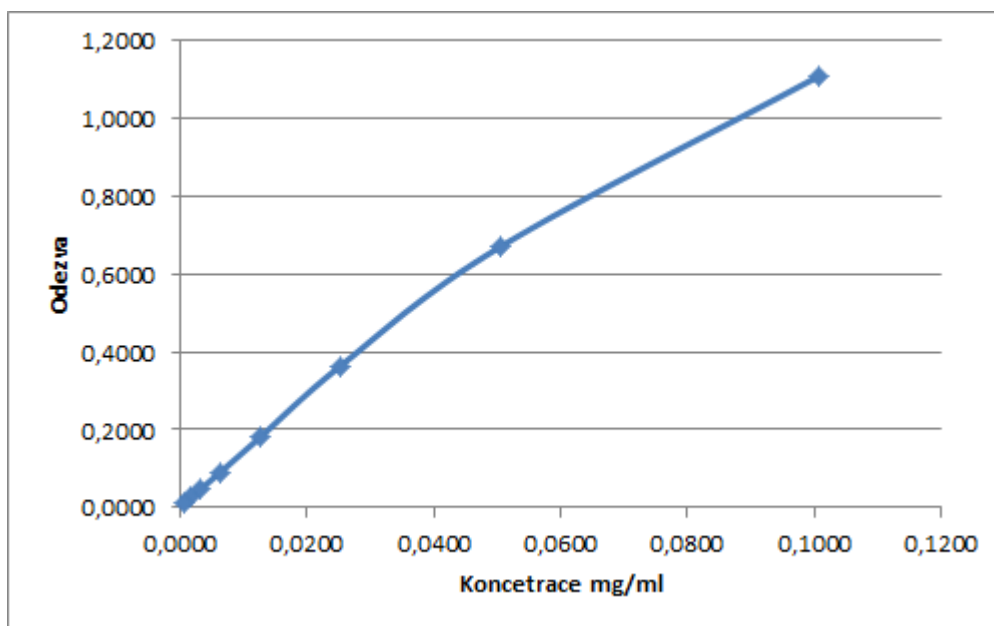
**Obr. 28 Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou na koloně C18**



Tabulka 7 obsahuje data pro kyselinu vanilovou. Kalibrační křivka ukazuje, že linearita odpovědi je přesnější než u kyseliny protocatechové. Korelační koeficient je 0,9942 a reziduální odchylka je 0,4550. Limit kvantifikace je 0,788  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2627  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 8 Kalibrační data kyseliny vanilové na koloně C18**

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,1008	1,1106	<b>Směrnice</b>	11,18577
0,0504	0,6704	<b>Absolutní člen</b>	0,031945
0,0252	0,3637	<b>Korelační koeficient</b>	0,994216
0,0126	0,1808	<b>Reziduální odchylka</b>	0,45496
0,0063	0,0910		
0,00315	0,0471		
0,001575	0,0258		
0,000788	0,0124		

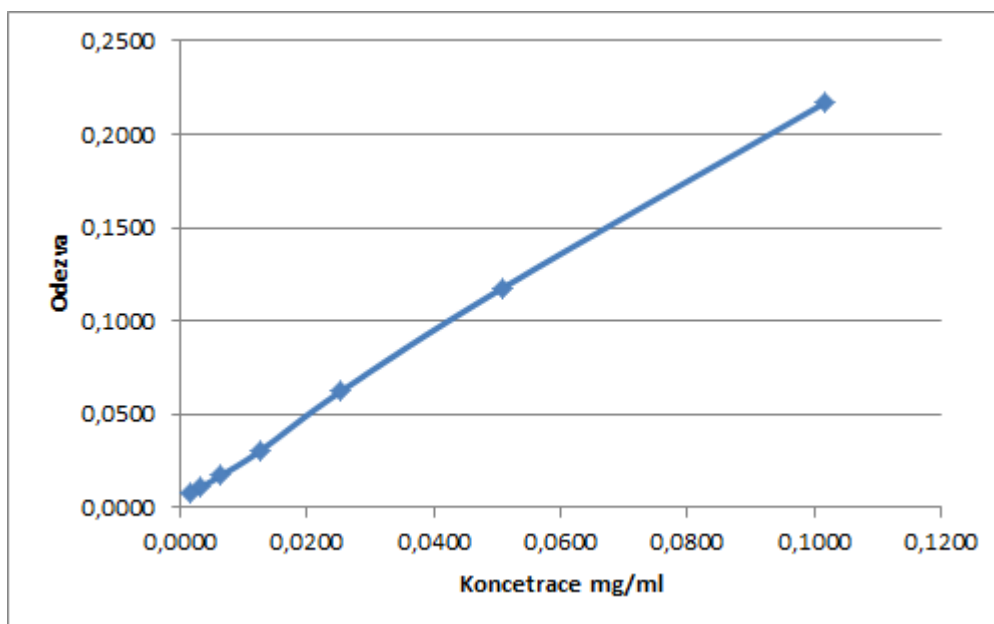


**Obr. 29 Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou na koloně C18**

Kalibrační křivka pro kyselinu *p*-kumarovou je tvořena téměř přímkou. Korelační koeficient je 0,9992 a reziduální odchylka je 0,0033. Limit kvantifikace je 1,5875 µg/ml a limit detekce je 0,5292 µg/ml.

**Tab. 9** Kalibrační data kyseliny *p*-kumarové na koloně C18

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1016	0,2168	<b>Směrnice</b>	2,110912
0,0508	0,1176	<b>Absolutní člen</b>	0,005345
0,0254	0,0624	<b>Korelační koeficient</b>	0,99924
0,0127	0,0306	<b>Reziduální odchylka</b>	0,003285
0,00635	0,0170		
0,003175	0,0108		
0,0015875	0,0078		

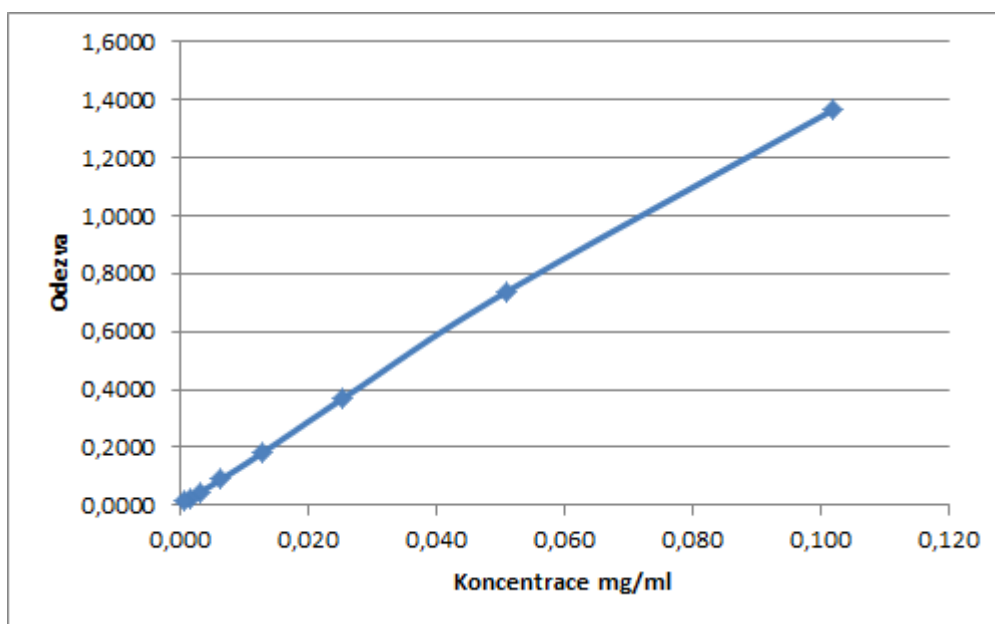


**Obr. 30** Kalibrační křivka pro kyselinu *p*-kumarovou na koloně C18

Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou je téměř přímka. Korelační koeficient je 0,9992 a reziduální odchylka je 0,0204. Limit kvantifikace je 0,7969  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2656  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 10** Kalibrační data kyseliny ferulové na koloně C18

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,102	1,3649	<b>Směrnice</b>	13,49694
0,051	0,7378	<b>Absolutní člen</b>	0,010512
0,0255	0,3704	<b>Korelační koeficient</b>	0,999217
0,01275	0,1804	<b>Reziduální odchylka</b>	0,020362
0,006375	0,0897		
0,0031875	0,0465		
0,00159375	0,0235		
0,000796875	0,0135		

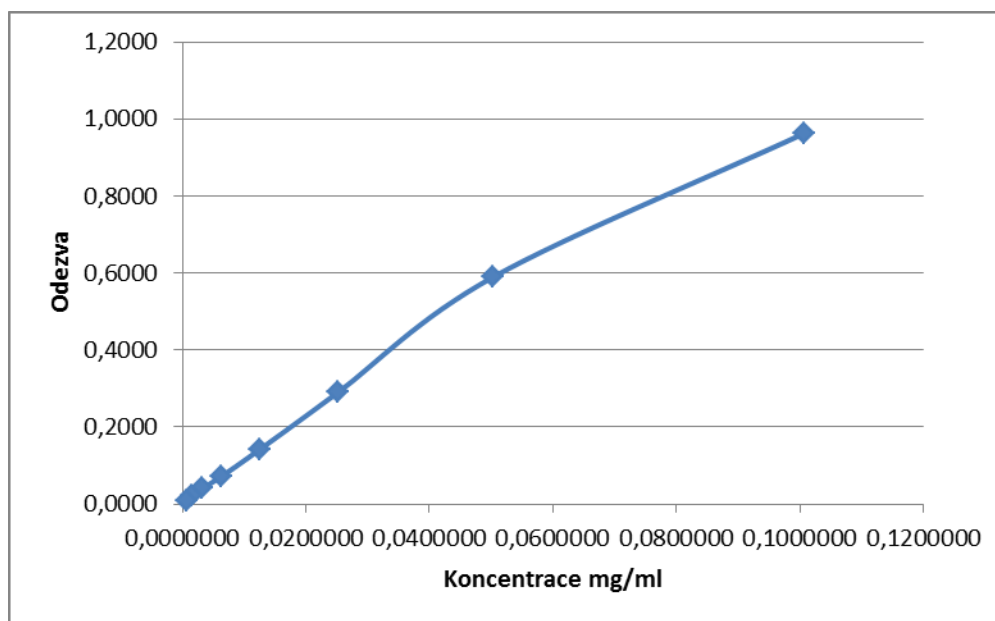


**Obr. 31** Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou na koloně C18

Kalibrační křivku pro kyselinu *o*-kumarovou lze popsat jako dvě přímky spojené ve velmi tupém úhlu. Korelační koeficient je 0,9945 a reziduální odchylka je 0,0389. Limit kvantifikace je 0,7850  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2617  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 11** Kalibrační data kyseliny *o*-kumarové na koloně C18

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,1008000	0,9633	<b>Směrnice</b>	9,774444
0,0504000	0,5902	<b>Absolutní člen</b>	0,020681
0,0252000	0,2900	<b>Korelační koeficient</b>	0,994456
0,0126000	0,1425	<b>Reziduální odchylka</b>	0,038915
0,0063000	0,0714		
0,0031500	0,0401		
0,0015750	0,0218		
0,0007850	0,0089		

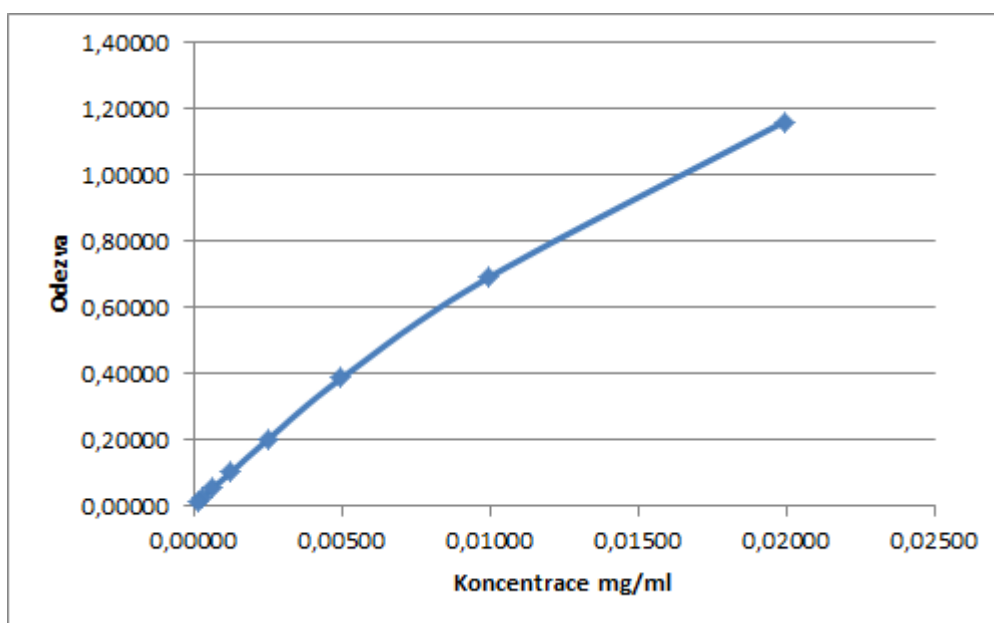


**Obr. 32** Kalibrační křivka pro kyselinu *o*-kumarovou na koloně C18

Kalibrační křivku pro kyselinu sinapovou tvoří velmi mírný oblouk. Korelační koeficient je 0,9945 a reziduální odchylka je 0,0463. Limit kvantifikace je 0,1556  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,0519  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 12** Kalibrační data kyseliny sinapové na koloně C18

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,01992	1,16188	<b>Směrnice</b>	58,84697
0,00996	0,69190	<b>Absolutní člen</b>	0,037823
0,00498	0,38694	<b>Korelační koeficient</b>	0,994451
0,0024900	0,20130	<b>Reziduální odchylka</b>	0,046323
0,0012450	0,10197		
0,0006225	0,05419		
0,0003113	0,02532		
0,0001556	0,01439		

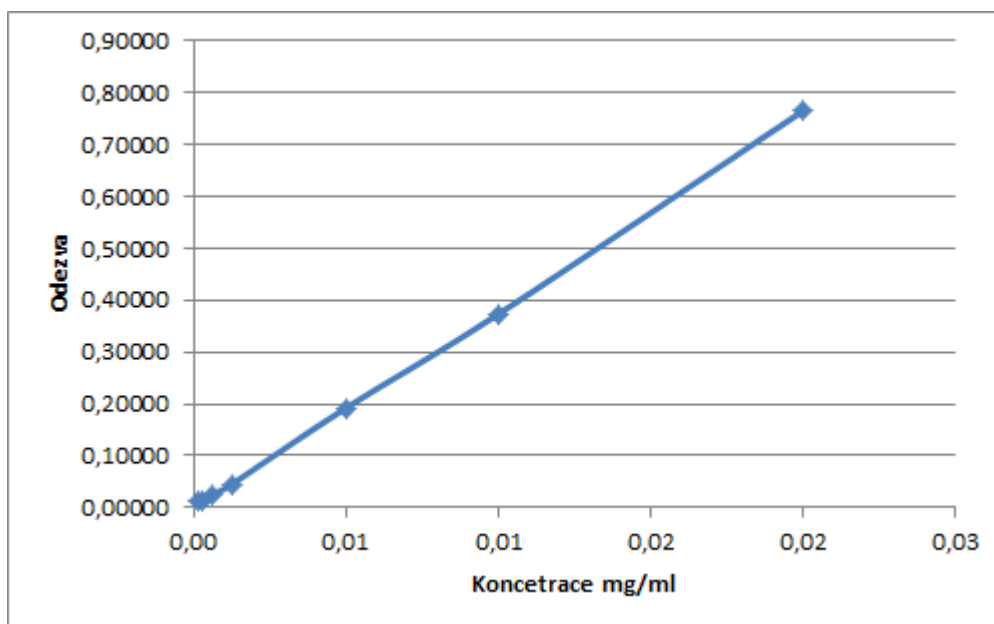


**Obr. 33** Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou na koloně C18

Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou je téměř dokonalá přímka. Čtvrtý bod měření byl vypuštěn, protože vykazoval příliš velké odchylky v odezvě. Korelační koeficient je větší než 0,9999 a reziduální odchylka je 0,0045. Limit kvantifikace je 0,1563 µg/ml a limit detekce je 0,0521 µg/ml.

**Tab. 13 Kalibrační data kyseliny syringové na koloně C18**

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,02	0,76474	<b>Směrnice</b>	38,06515
0,01	0,37330	<b>Absolutní člen</b>	$9,18 \times 10^{-5}$
0,0050	0,19238	<b>Korelační koeficient</b>	0,999891
0,0012500	0,04526	<b>Reziduální odchylka</b>	0,004546
0,0006250	0,02423		
0,0003125	0,01108		
0,0001563	0,01115		



**Obr. 34 Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou na koloně C18**

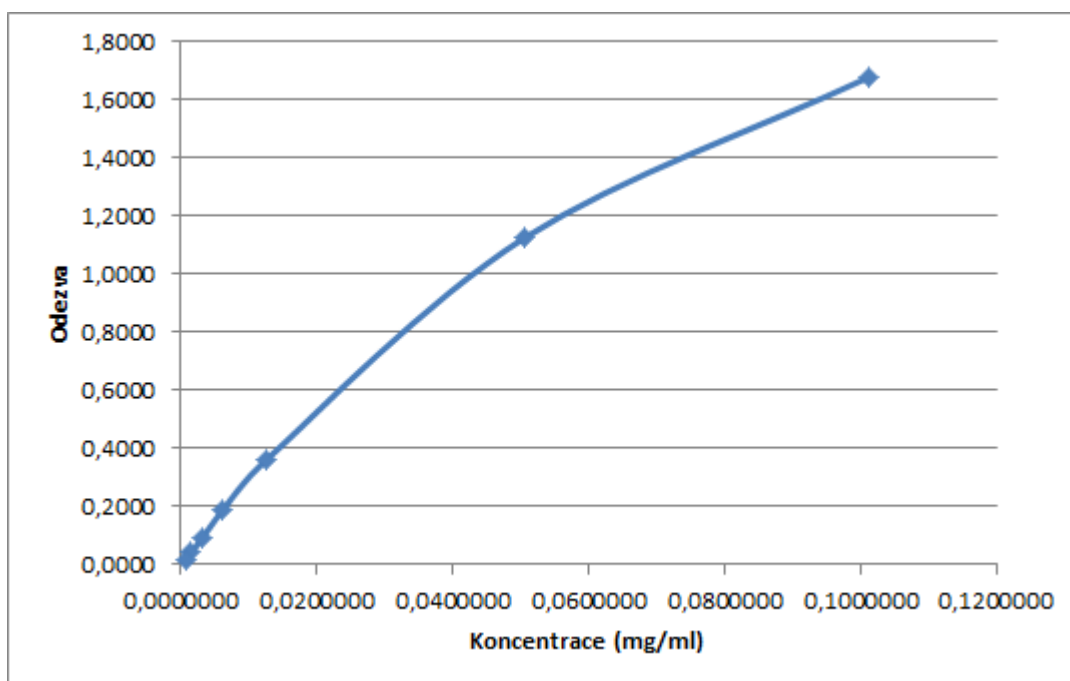
#### 4.2.2.2. Kolona RP-Amide

Pro tuto kolonu byl namíchán jeden roztok standardů, protože chromatogram ukazoval všech sedm píků. Následující tabulky popisují kalibrační data pro všechny měřené látky. Veškeré měřené koncentrace látek jsou zaznamenány v příslušných tabulkách.

Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou vykazuje široké rozmezí odezev a pro nižší koncentrace je odezva lineární. Korelační koeficient je 0,9870 a reziduální odchylka je 0,1138. Limit kvantifikace je 0,7906  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2635  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. 14 Kalibrační data kyseliny protokatechové na koloně RP-Amide

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1012000	1,6777	Směrnice	16,86986
0,0506	1,1246	Absolutní člen	0,075126
0,01265	0,3606	Korelační koeficient	0,986992
0,006325	0,1889	Reziduální odchylka	0,113793
0,0031625	0,0895		
0,00158125	0,0405		
0,000790625	0,0184		

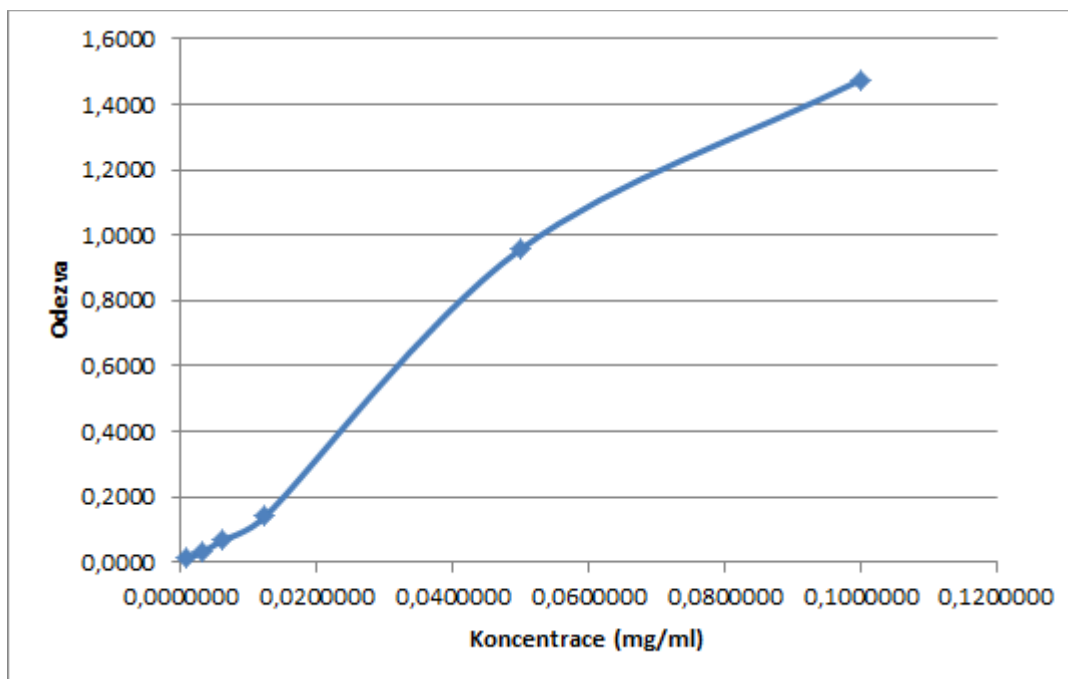


Obr. 35 Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou na koloně RP-Amide

Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou ukazuje, že pro malé koncentrace je odpověď lineární, ale u vyšších se mírně odlišuje. Bod pro čtvrtou nejvyšší koncentraci (0,0250 mg/ml) musel být vypuštěn, protože odezva (která má hodnotu 0,2702) vykazovala příliš velkou odchylku. Korelační koeficient je 0,9888 a reziduální odchylka je 0,1030. Limit kvantifikace je 0,7813  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2604  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 15** Kalibrační data kyseliny syringové na koloně RP-Amide

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	6
0,1000000	1,4741	<b>Směrnice</b>	15,54397
0,05	0,9561	<b>Absolutní člen</b>	0,0000728
0,0125000	0,1408	<b>Korelační koeficient</b>	0,98883
0,0062500	0,0686	<b>Reziduální odchylka</b>	0,103045
0,0031250	0,0302		
0,00078125	0,0144		



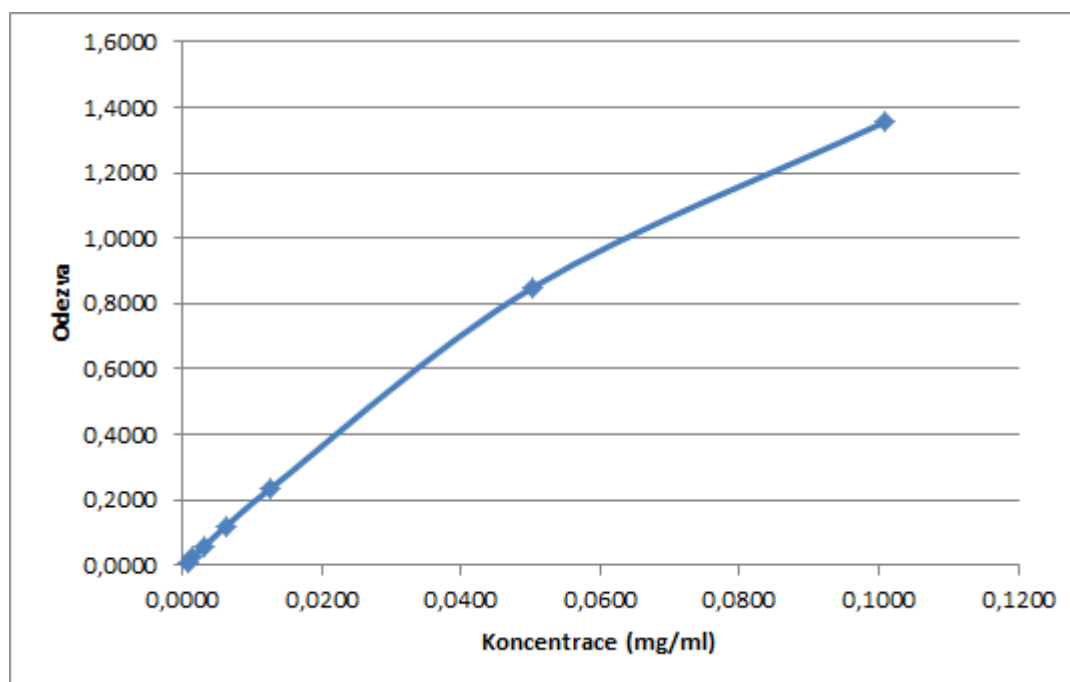
**Obr. 36** Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou na koloně RP-Amide



Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou vykazuje velmi podobné charakteristiky jako v předchozích případech u kolony RP-Amide. Odezva pro čtyři nejmenší koncentrace je lineární, pro tři zbývající leží už odezvy v určitém intervalu. Korelační koeficient je 0,9930 a reziduální odchylka je 0,0673. Limit kvantifikace je 0,7875  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2625  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 16 Kalibrační data kyseliny vanilové na koloně RP-Amide**

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1008	1,3552	<b>Směrnice</b>	13,73291
0,0504	0,8508	<b>Absolutní člen</b>	0,034718
0,0126	0,2339	<b>Korelační koeficient</b>	0,993015
0,00630	0,1198	<b>Reziduální odchylka</b>	0,067303
0,003150	0,0587		
0,001575	0,0257		
0,0007875	0,0106		

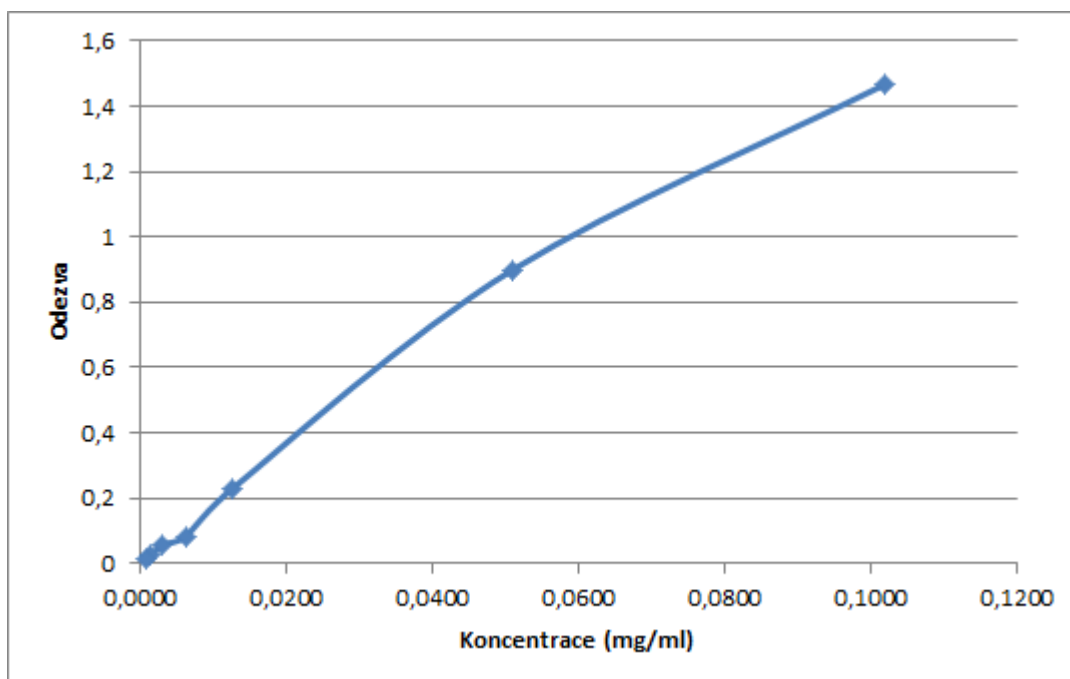


**Obr. 37 Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou na koloně RP-Amide**

Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou se jen málo blíží k přímce a jsou vidět i mírné odchylky v části čtyř nejmenších koncentrací. Korelační koeficient je 0,9944 a reziduální odchylka je 0,0654. Limit kvantifikace je 0,7969  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2656  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 17** Kalibrační data kyseliny ferulové na koloně RP-Amide

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1020	1,4669	<b>Směrnice</b>	14,77165
0,0510	0,8986	<b>Absolutní člen</b>	0,021762
0,0128	0,2309	<b>Korelační koeficient</b>	0,994421
0,0064	0,0847	<b>Reziduální odchylka</b>	0,065402
0,0031875	0,0578		
0,00159375	0,0249		
0,000796875	0,0135		

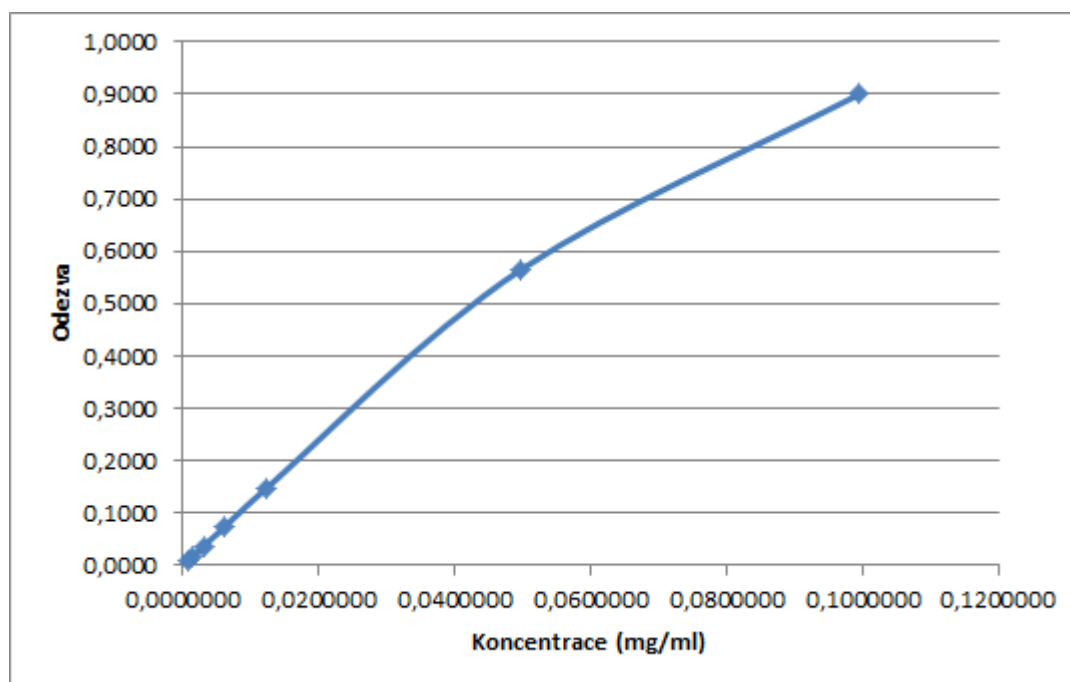


**Obr. 38** Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou na koloně RP-Amide

Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou je pro čtyři nejmenší koncentrace lineární, pro vyšší koncentrace však vykazuje určitou odchylku. Korelační koeficient je 0,9932 a reziduální odchylka je 0,0444. Limit kvantifikace je 0,7781  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2627  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 18** Kalibrační data kyseliny sinapové na koloně RP-Amide

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,0996000	0,9003	<b>Směrnice</b>	9,264351
0,0498000	0,5650	<b>Absolutní člen</b>	0,019947
0,0124500	0,1483	<b>Korelační koeficient</b>	0,993158
0,0062250	0,0735	<b>Reziduální odchylka</b>	0,044397
0,0031125	0,0364		
0,0015563	0,0147		
0,0007781	0,0090		

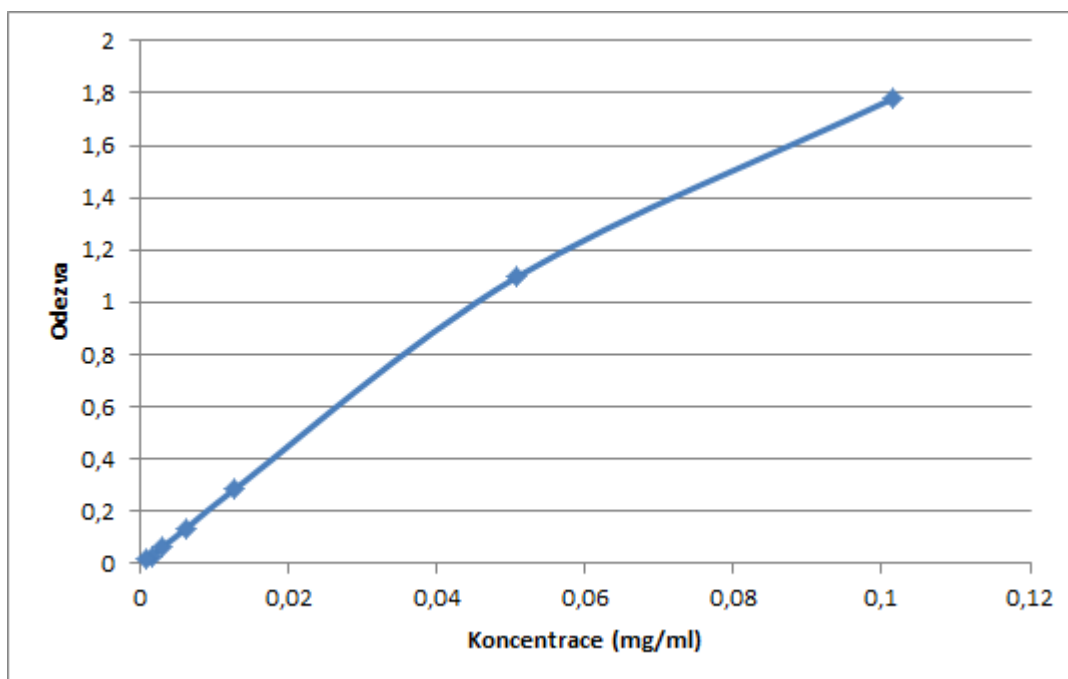


**Obr. 39** Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou na koloně RP-Amide

Kalibrační křivka pro kyselinu *p*-kumarovou vykazuje lineární odezvu pro nižší koncentrace a mírné odchylky pro vyšší koncentrace. Korelační koeficient je 0,9943 a reziduální odchylka je 0,0797. Limit kvantifikace je 0,7938 µg/ml a limit detekce je 0,2646 µg/ml.

**Tab. 19** Kalibrační data kyseliny *p*-kumarové na koloně RP-Amide

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1016	1,7802	<b>Směrnice</b>	17,94848
0,0508	1,0961	<b>Absolutní člen</b>	0,033052
0,0127	0,2825	<b>Korelační koeficient</b>	0,994336
0,00635	0,1363	<b>Reziduální odchylka</b>	0,079748
0,003175	0,0659		
0,0015875	0,029		
0,00079375	0,018		

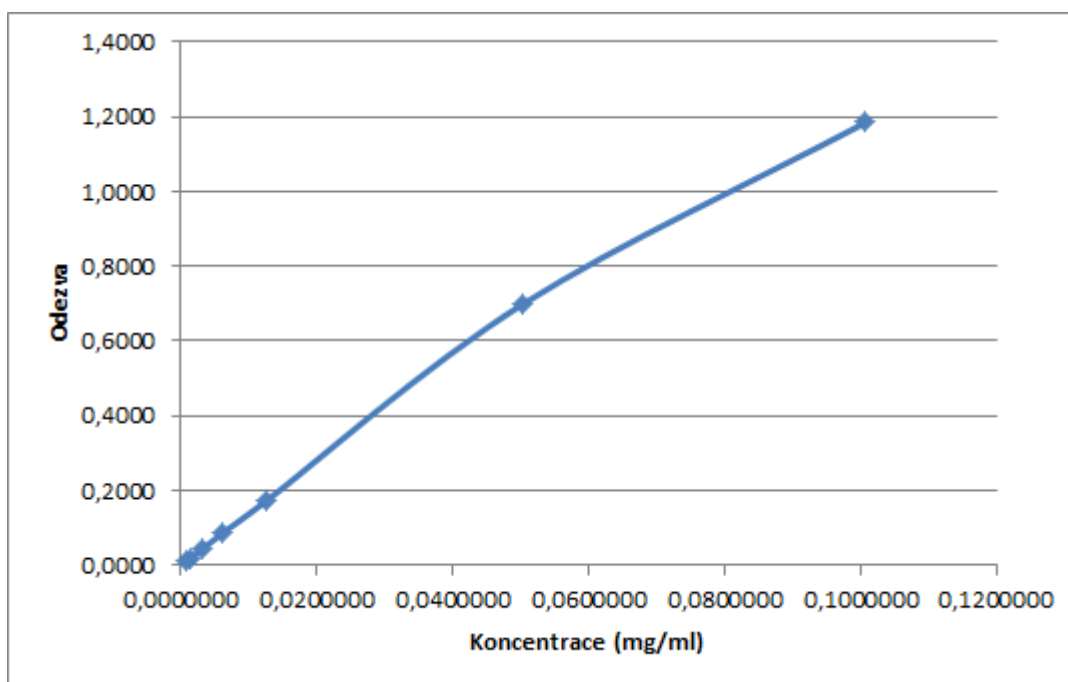


**Obr. 40** Kalibrační křivka pro kyselinu *p*-kumarovou na koloně RP-Amide

Kalibrační křivka pro kyselinu *o*-kumarovou vykazuje stejné charakteristiky jako předchozí kalibrační křivky pro ostatní kyseliny. Korelační koeficient je 0,9966 a reziduální odchylka je 0,0411. Limit kvantifikace je 0,7875 µg/ml a limit detekce je 0,2625 µg/ml.

**Tab. 20** Kalibrační data kyseliny *o*-kumarové na koloně RP-Amide

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1008000	1,1846	<b>Směrnice</b>	11,9857
0,0504000	0,6991	<b>Absolutní člen</b>	0,01752
0,0126000	0,1718	<b>Korelační koeficient</b>	0,996565
0,0063000	0,0873	<b>Reziduální odchylka</b>	0,041085
0,0031500	0,0422		
0,0015750	0,0193		
0,0007875	0,0108		



**Obr. 41** Kalibrační křivka pro kyselinu *o*-kumarovou na koloně RP-Amide

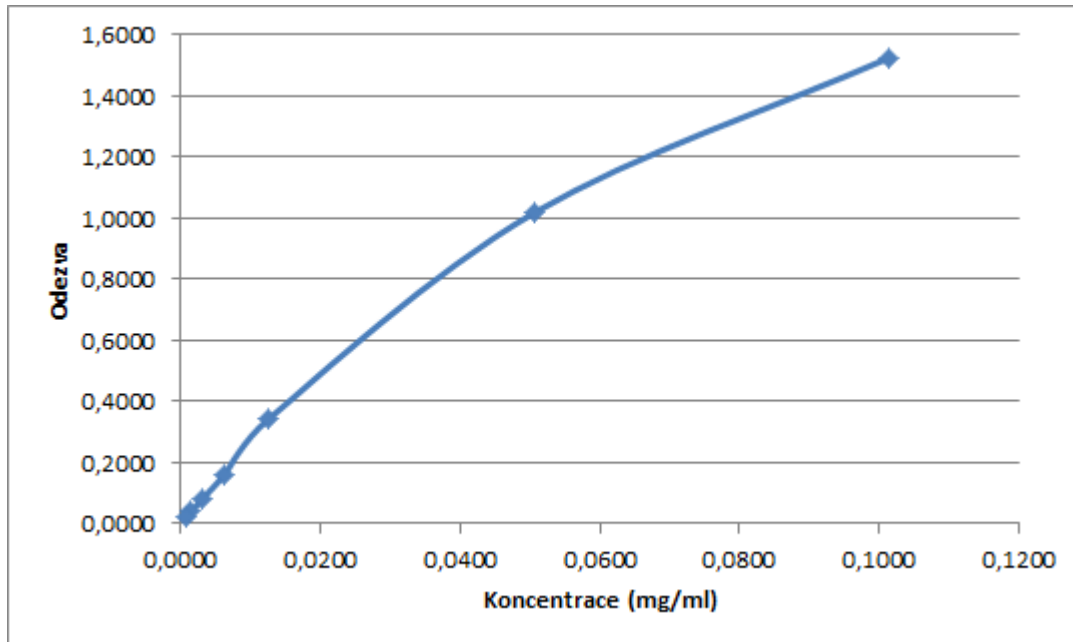
#### 4.2.2.3. Kolona Phenyl-Hexyl

Pro tuto kolonu byly namíchány dva roztoky standardů, protože má selektivitu srovnatelnou s kolonou C18. Chromatogram ukazoval dva dvojité píky. Kalibrační data jsou obsažena v následujících tabulkách, a to včetně měřených koncentrací.

Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou vykazuje v části nižších koncentrací relativně lineární odezvu, ve vyšších koncentracích lze už vidět jistou odchylku. Korelační koeficient je 0,9870 a reziduální odchylka je 0,1034. Limit kvantifikace je 0,7906  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2635  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. 21 Kalibrační data kyseliny protokatechové na koloně Phenyl-Hexyl

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1012	1,5236	Směrnice	15,28877
0,0506	1,0180	Absolutní člen	0,07035
0,01265	0,3427	Korelační koeficient	0,986936
0,006325	0,1604	Reziduální odchylka	0,103354
0,0031625	0,0811		
0,00158125	0,0398		
0,000790625	0,0224		

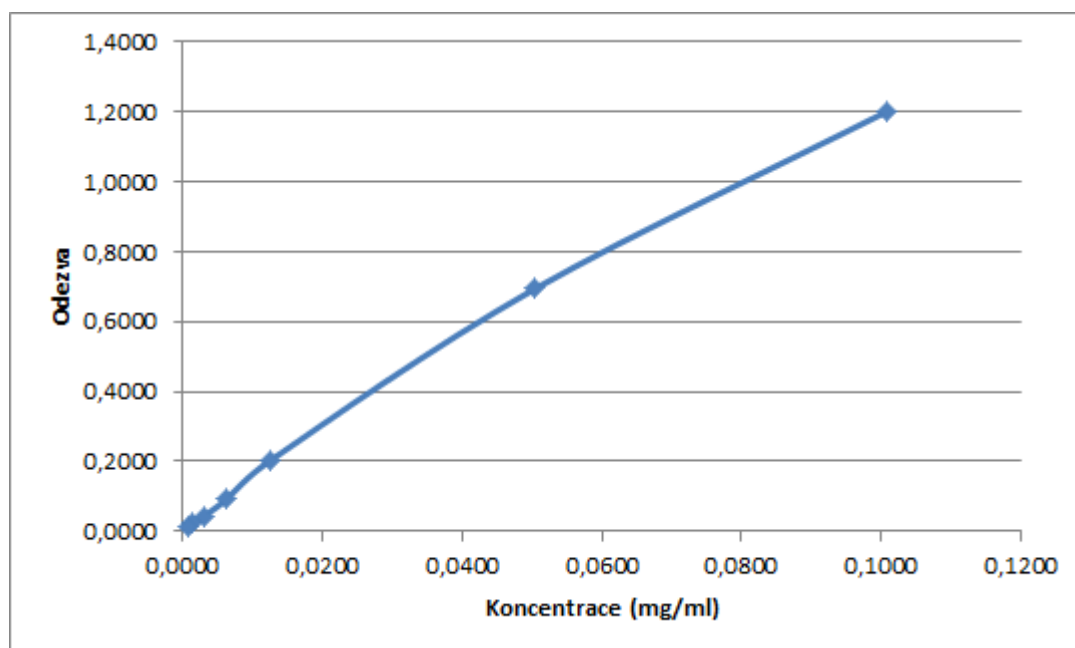


Obr. 42 Kalibrační křivka pro kyselinu protokatechovou na koloně Phenyl-Hexyl

Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou v části nižších koncentrací vykazuje lineární odpověď. Část vyšších koncentrací už ukazuje mírnou odchylku. Korelační koeficient je 0,9971 a reziduální odchylka je 0,0380. Limit kvantifikace je 0,7880 µg/ml a limit detekce je 0,2627 µg/ml.

**Tab. 22 Kalibrační data kyseliny vanilové na koloně Phenyl-Hexyl**

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1008	1,2014	<b>Směrnice</b>	12,03256
0,0504	0,6937	<b>Absolutní člen</b>	0,022154
0,0126	0,2032	<b>Korelační koeficient</b>	0,997089
0,0063	0,0918	<b>Reziduální odchylka</b>	0,037986
0,00315	0,0443		
0,001575	0,0223		
0,000788	0,0132		

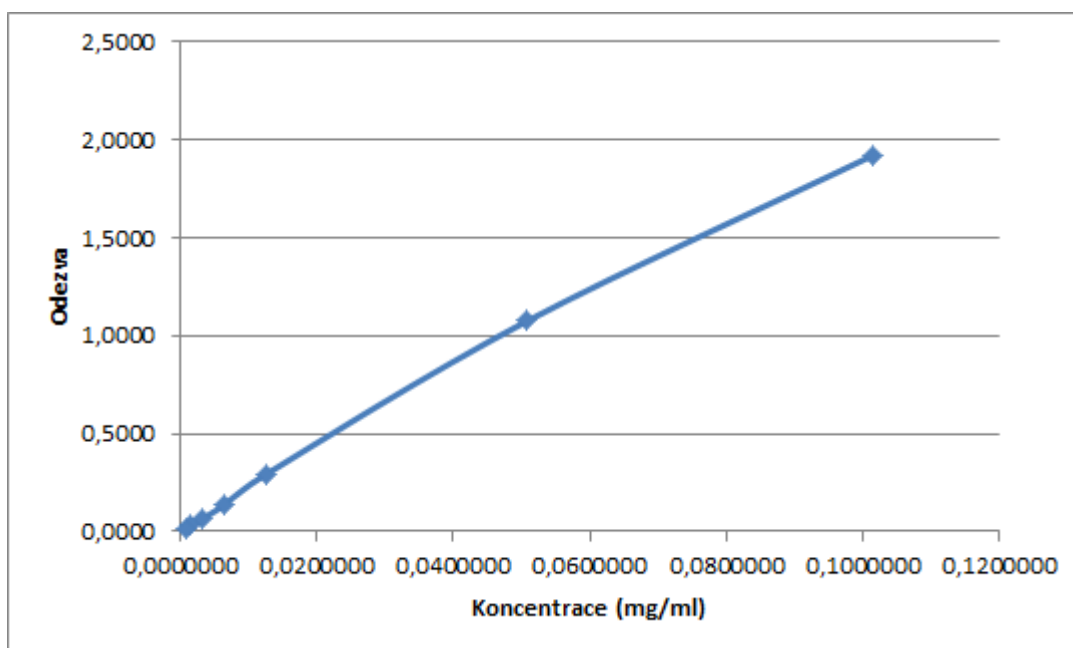


**Obr. 43 Kalibrační křivka pro kyselinu vanilovou na koloně Phenyl-Hexyl**

Kalibrační křivka pro kyselinu *p*-kumarovou ukazuje v části nižších koncentrací závislost blízkou přímce, v části vyšších koncentrací je opět mírná odchylka od ideální přímky. Korelační koeficient je 0,9983 a reziduální odchylka je 0,0460. Limit kvantifikace je 0,7938  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2646  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 23** Kalibrační data kyseliny *p*-kumarové na koloně Phenyl-Hexyl

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1016000	1,9228	<b>Směrnice</b>	19,13565
0,0508000	1,0743	<b>Absolutní člen</b>	0,021267
0,0127000	0,2950	<b>Korelační koeficient</b>	0,99833
0,0063500	0,1337	<b>Reziduální odchylka</b>	0,046029
0,0031750	0,0622		
0,0015875	0,0311		
0,0007938	0,0169		



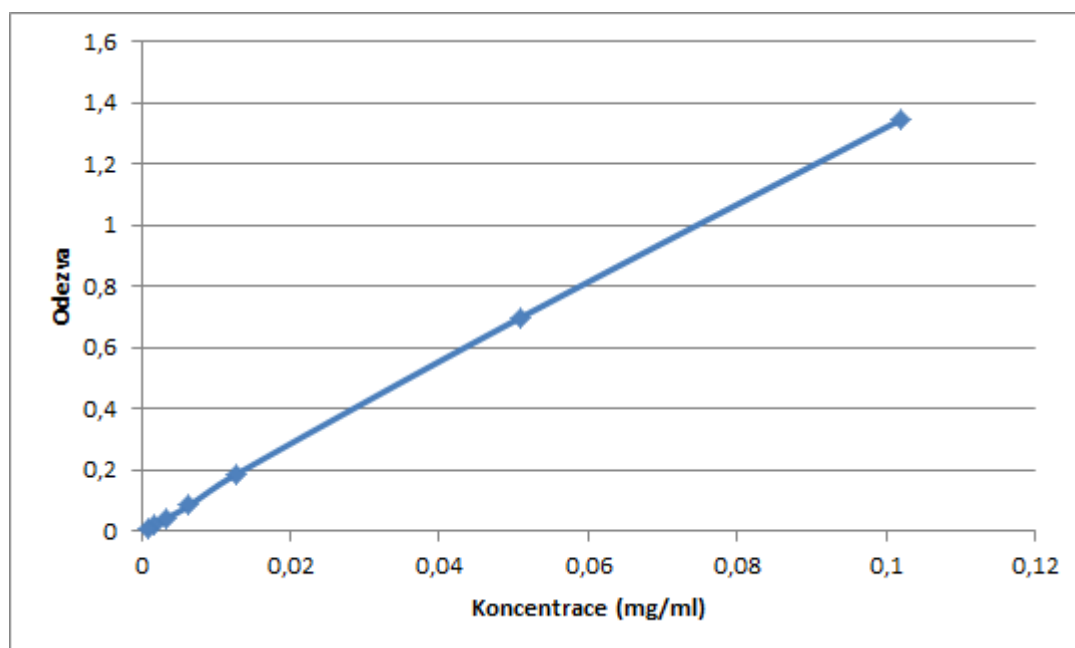
**Obr. 44** Kalibrační křivka pro kyselinu *p*-kumarovou na koloně Phenyl-Hexyl



Kalibrační přímka pro kyselinu ferulovou se v obou částech velmi blíží ideální přímce. Korelační koeficient je 0,9997 a reziduální odchylka je 0,0125. Limit kvantifikace je 0,7969  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2656  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 24** Kalibrační data kyseliny ferulové na koloně Phenyl-Hexyl

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,102	1,3462	<b>Směrnice</b>	13,25114
0,051	0,7001	<b>Absolutní člen</b>	0,005147
0,01275	0,1874	<b>Korelační koeficient</b>	0,999746
0,006375	0,0841	<b>Reziduální odchylka</b>	0,012477
0,0031875	0,0409		
0,00159375	0,0203		
0,000796875	0,0118		

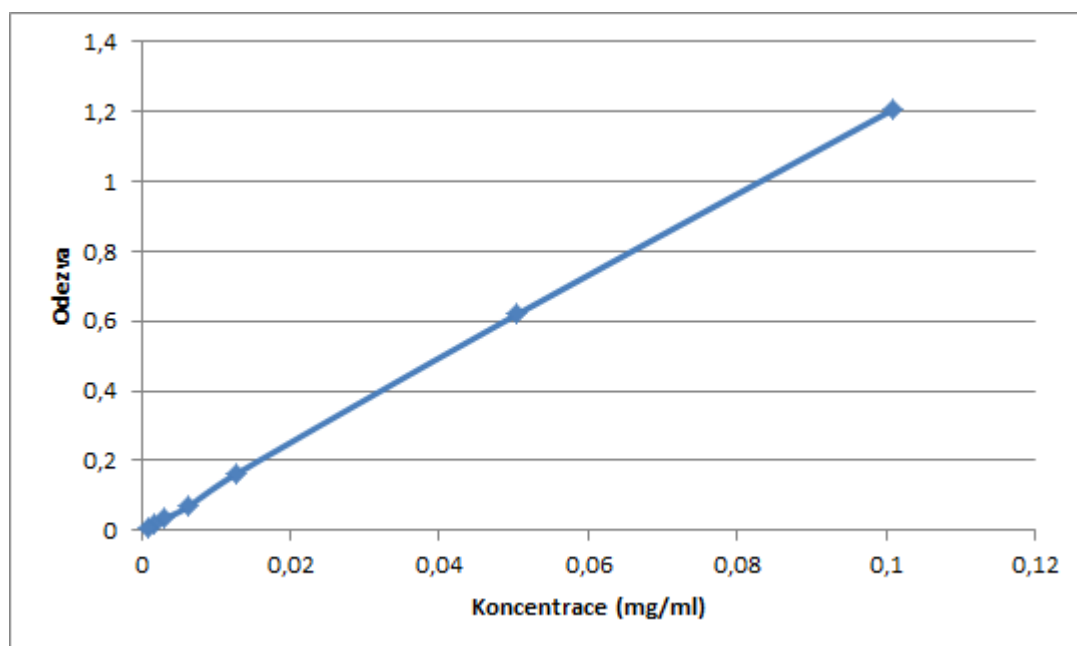


**Obr. 45** Kalibrační křivka pro kyselinu ferulovou na koloně Phenyl-Hexyl

Kalibrační křivka pro kyselinu *o*-kumarovou vykazuje v obou částech tvar, který je velmi blízký přímce. Korelační koeficient je 0,9999 a reziduální odchylka je 0,0085. Limit kvantifikace je 0,7875 µg/ml a limit detekce je 0,2625 µg/ml.

**Tab. 25** Kalibrační data kyseliny *o*-kumarové na koloně Phenyl-Hexyl

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	7
0,1008	1,2048	<b>Směrnice</b>	13,00785
0,0504	0,6192	<b>Absolutní člen</b>	0,001196
0,0126	0,1608	<b>Korelační koeficient</b>	0,999852
0,0063	0,0689	<b>Reziduální odchylka</b>	0,008511
0,00315	0,0351		
0,001575	0,018		
0,0007875	0,0103		

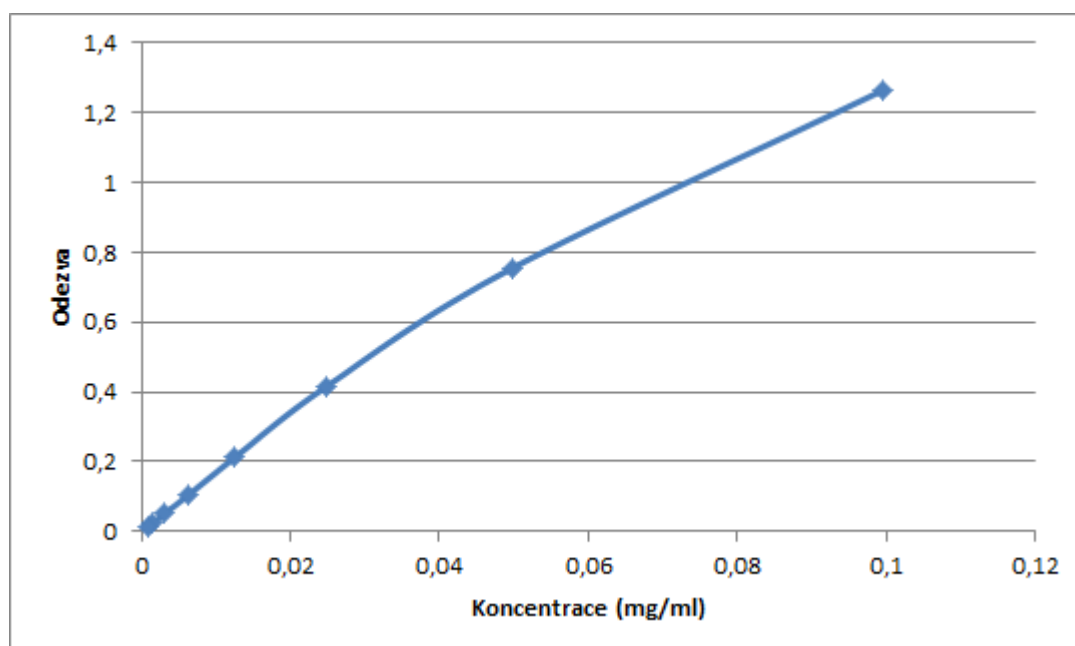


**Obr. 46** Kalibrační křivka pro kyselinu *o*-kumarovou na koloně Phenyl-Hexyl

Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou je překvapivě spojitá a nemá výrazné části pro nižší a vyšší koncentrace. Její tvar je velmi jemný oblouk, který se hodně blíží přímce. Korelační koeficient je 0,9944 a reziduální odchylka je 0,0511. Limit kvantifikace je 0,7781  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2593  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 26** Kalibrační data kyseliny sinapové na koloně Phenyl-Hexyl

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,0996	1,2644	<b>Směrnice</b>	12,87555
0,0498	0,7549	<b>Absolutní člen</b>	0,035776
0,0249	0,417	<b>Korelační koeficient</b>	0,994366
0,01245	0,2113	<b>Reziduální odchylka</b>	0,051067
0,006225	0,104		
0,0031125	0,0522		
0,00155625	0,0237		
0,000778125	0,0135		

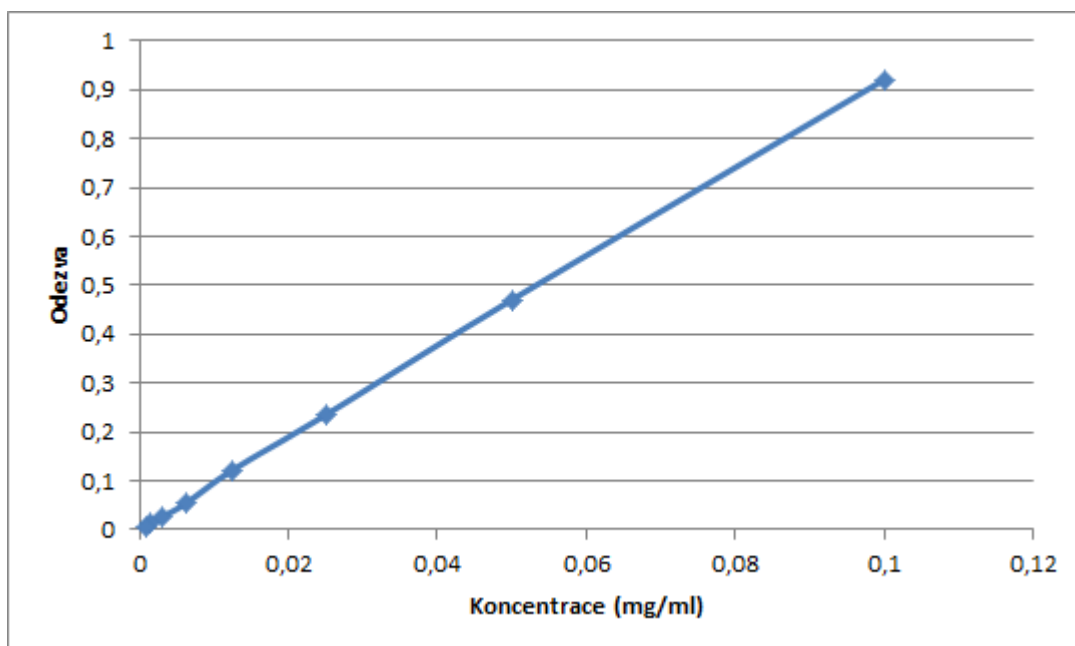


**Obr. 47** Kalibrační křivka pro kyselinu sinapovou na koloně Phenyl-Hexyl

Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou je prakticky přímka. Korelační koeficient je 0,9999 a reziduální odchylka je 0,0049. Limit kvantifikace je 0,7813  $\mu\text{g/ml}$  a limit detekce je 0,2604  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tab. 27 Kalibrační data kyseliny syringové na koloně Phenyl-Hexyl**

Koncentrace (mg/ml)	Odezva	Počet bodů	8
0,1	0,9206	<b>Směrnice</b>	9,239373
0,05	0,4703	<b>Absolutní člen</b>	0,001193
0,025	0,235	<b>Korelační koeficient</b>	0,999899
0,0125	0,1221	<b>Reziduální odchylka</b>	0,004905
0,00625	0,0543		
0,003125	0,0271		
0,0015625	0,0139		
0,00078125	0,0069		



**Obr. 48 Kalibrační křivka pro kyselinu syringovou na koloně Phenyl-Hexyl**

#### 4.2.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla proměřena na použitých kolonách pro všech sedm kyselin. U každé kyseliny se proměřovaly tři koncentrace a každá koncentrace se proměřovala šestkrát. Vzorke s nejvyšší koncentrací (0,1 mg/ml) byly namíchány ze 100  $\mu\text{l}$  roztoků standardů kyselin a doplněny do 1 000  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. Vzorke se střední koncentrací (0,01 mg/ml) byly připraveny tak, že se z roztoku o nejvyšší

koncentraci odebralo 100 µl, které byly následně doplněny do 1 000 µl. Při přípravě roztoků s nejnižší koncentrací (postupovalo se stejně, ale 100 µl se odebíralo z roztoku se střední koncentrací).

Pro kolony C18 a Phenyl-Hexyl byly namíchány dvě série vzorků, protože kolony vykazují dva dvojité píky. První série obsahovala kyselinu protokatechovou, kyselinu vanilovou, kyselinu *p*-kumarovou, kyselinu ferulovou a kyselinu *o*-kumarovou. Ve druhé sérii se analyzovaly kyseliny syringová a sinapová. Přesné koncentrace kyselin jsou v tabulce 2.

Z výsledných dat pak byla spočítána relativní směrodatná odchylka pro retenční časy a pro odezvu podle vzorce z I. dílu Českého lékopisu 2009<sup>52</sup> :

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

$RSD_{\%}$  – relativní směrodatná odchylka

$\bar{y}$  – průměr jednotlivých hodnot

$y_i$  – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu (zde se jedná o výšku píku, o hodnotu odezvy)

#### 4.2.2.1. Kolona C18

Od každého roztoku standardu byly namíchány tři koncentrace (0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001 mg/ml) a každá koncentrace byla proměřována šestkrát.

**Tab. 28 Relativní směrodatné odchylky kolony C18 pro koncentraci 0,1 mg/ml**

	Průměr $t_r$ (s)	RSD % pro $t_r$	Průměr odezvy	RSD % pro odezvu
<b>Protokatechová</b>	126,43	0,2293	1,467	1,8707
<b>Vanilová</b>	155,89	0,2293	1,267	1,8707
<b>Parakumarová</b>	204,09	0,4356	1,964	2,6607
<b>Ferulová</b>	231,8	0,2612	1,427	1,6266
<b>Orthokumarová</b>	364,27	0,4146	1,399	1,1304
<b>Sinapová</b>	157,77	0,1486	1,197	0,2792
<b>Syringová</b>	231,4	0,1616	0,721	0,9662

**Tab. 29 Relativní směrodatné odchylky kolony C18 pro koncentraci 0,01 mg/ml**

	<b>Průměr <math>t_r</math> (s)</b>	<b>RSD % pro <math>t_r</math></b>	<b>Průměr odezev</b>	<b>RSD % pro odezvu</b>
<b>Protokatechová</b>	126,61	0,4817	0,290	3,8664
<b>Vanilová</b>	157,05	0,7151	0,171	3,7951
<b>Parakumarová</b>	207,55	1,6959	0,251	6,2537
<b>Ferulová</b>	238,1	1,6643	0,155	6,4789
<b>Orthokumarová</b>	376,05	2,4917	0,141	3,0960
<b>Sinapová</b>	156,84	0,0543	0,164	1,6578
<b>Syringová</b>	231,67	0,1107	0,068	3,1755

**Tab. 30 Relativní směrodatné odchylky kolony C18 pro koncentraci 0,001 mg/ml**

	<b>Průměr <math>t_r</math> (s)</b>	<b>RSD % pro <math>t_r</math></b>	<b>Průměr odezev</b>	<b>RSD % pro odezvu</b>
<b>Protokatechová</b>	125,91	0,2627	0,030	6,7129
<b>Vanilová</b>	156,58	0,5031	0,019	17,4766
<b>Parakumarová</b>	205,92	0,4976	0,020	17,2553
<b>Ferulová</b>	237,13	0,5115	0,019	12,7004
<b>Orthokumarová</b>	370,29	0,5194	0,015	7,7575
<b>Sinapová</b>	164,65	1,1233	0,015	7,8554
<b>Syringová</b>	256,63	2,6313	0,006	23,5722

#### 4.2.2.2. Kolona RP-Amide

Od každého roztoku standardu byly namíchány tři koncentrace (0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001 mg/ml) a každá koncentrace byla proměřována šestkrát.

**Tab. 31 Relativní směrodatné odchylky kolony RP-Amide pro koncentraci 0,1 mg/ml**

	<b>Průměr <math>t_r</math> (s)</b>	<b>RSD % pro <math>t_r</math></b>	<b>Průměr odezev</b>	<b>RSD % pro odezvu</b>
<b>Protokatechová</b>	183,34	0,6510	1,659	2,1463
<b>Syringová</b>	208,27	0,6077	1,555	0,9668
<b>Vanilová</b>	228,21	0,9980	1,250	0,6372
<b>Ferulová</b>	294,28	1,1814	1,803	2,5446
<b>Sinapová</b>	345,9	1,6717	1,857	2,8265
<b>Parakumarová</b>	412,78	1,9529	1,581	3,9128
<b>Orthokumarová</b>	592,89	2,4042	1,278	3,6214

**Tab. 32 Relativní směrodatné odchytky kolony RP-Amide pro koncentraci 0,01 mg/ml**

	<b>Průměr <math>t_r</math> (s)</b>	<b>RSD % pro <math>t_r</math></b>	<b>Průměr odezev</b>	<b>RSD % pro odezvu</b>
<b>Protokatechová</b>	181,14	0,4391	0,310	1,4043
<b>Syringová</b>	207,28	0,3517	0,247	0,8993
<b>Vanilová</b>	226,79	0,5126	0,247	0,8993
<b>Ferulová</b>	292,25	0,5567	0,275	1,8137
<b>Sinapová</b>	342,05	0,6881	0,264	2,1530
<b>Parakumarová</b>	406,02	1,0262	0,204	1,9046
<b>Orthokumarová</b>	580,49	1,0342	0,143	1,9683

**Tab. 33 Relativní směrodatné odchytky kolony RP-Amide pro koncentraci 0,001 mg/ml**

	<b>Průměr <math>t_r</math> (s)</b>	<b>RSD % pro <math>t_r</math></b>	<b>Průměr odezev</b>	<b>RSD % pro odezvu</b>
<b>Protokatechová</b>	180,64	0,0920	0,031	5,6643
<b>Syringová</b>	206,97	0,2662	0,024	5,9581
<b>Vanilová</b>	226	0,2941	0,018	9,1364
<b>Ferulová</b>	291,48	0,2036	0,028	12,5155
<b>Sinapová</b>	333,18	6,2199	0,027	8,8908
<b>Parakumarová</b>	404,14	0,5320	0,020	18,6366
<b>Orthokumarová</b>	576,75	0,6670	0,016	11,7436

#### 4.2.2.3. Kolona Phenyl-Hexyl

Od každého roztoku standardu byly namíchány tři koncentrace (0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001 mg/ml) a každá koncentrace byla proměřována šestkrát.

**Tab. 34 Relativní směrodatné odchytky kolony Phenyl-Hexyl pro koncentraci 0,1 mg/ml**

	<b>Průměr <math>t_r</math> (s)</b>	<b>RSD % pro <math>t_r</math></b>	<b>Průměr odezev</b>	<b>RSD % pro odezvu</b>
<b>Protokatechová</b>	140,16	0,3364	1,117	9,3901
<b>Vanilová</b>	174,98	0,5506	1,023	12,4254
<b>Parakumarová</b>	231,46	1,3009	1,341	16,8575
<b>Ferulová</b>	258,91	1,6950	1,345	10,8517
<b>Orthokumarová</b>	369,65	1,8429	1,107	16,8288
<b>Syringová</b>	203,08	0,1407	1,239	0,5485
<b>Sinapová</b>	310,01	0,1710	1,463	0,6558

Tab. 35 Relativní směrodatné odchylky kolony Phenyl-Hexyl pro koncentraci 0,01 mg/ml

	Průměr $t_r$ (s)	RSD % pro $t_r$	Průměr odezev	RSD % pro odezvu
Protokatechová	139,83	0,4218	0,220	1,4702
Vanilová	176,64	0,6218	0,138	2,2622
Parakumarová	235,86	0,7941	0,160	6,3314
Ferulová	264,14	0,7321	0,152	3,4245
Orthokumarová	380,19	0,7383	0,114	5,0312
Syringová	202,81	0,1872	0,159	2,2910
Sinapová	310,28	0,1373	0,160	2,8444

Tab. 36 Relativní směrodatné odchylky kolony Phenyl-Hexyl pro koncentraci 0,001 mg/ml

	Průměr $t_r$ (s)	RSD % pro $t_r$	Průměr odezev	RSD % pro odezvu
Protokatechová	140,38	0,5388	0,021	6,6996
Vanilová	177,87	0,5928	0,013	10,9390
Parakumarová	239,29	1,0156	0,011	15,1515
Ferulová	267,71	0,9225	0,014	13,0687
Orthokumarová	387,44	0,9981	0,013	7,3982
Syringová	202,13	0,1353	0,016	5,5879
Sinapová	308,51	0,2232	0,016	8,6131

#### 4.2.3. Symetrie

Data, ze kterých vycházely výpočty symetrie píků, byly přebrány z měření opakovatelnosti (bližší informace viz první odstavec kapitoly Opakovatelnost). Každý chromatogram opakovatelnosti se vytiskl, manuálně se přeměřily potřebné rozměry píků a získaná data se pak zpracovala v programu Excel podle vzorců uvedených v I. dílu Českého lékopisu 2009<sup>52</sup> :

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$A_s$  – faktor symetrie píku

$w_{0,05}$  – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky (v centimetrech)

$d$  – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky (v centimetrech)



#### 4.2.3.1. Kolona C18

Následující tabulka popisuje faktor symetrie píku a výchozí data pro všechny tři koncentrace.

**Tab. 37** Faktory symetrie píku pro kolonu C18

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,541667	0,116667	2,5
<b>Vanilová</b>	0,675	0,2	1,6875
<b>p-Kumarová</b>	0,883333	0,341667	1,311508
<b>Ferulová</b>	1,008333	0,383333	1,329861
<b>o-Kumarová</b>	1,591667	0,55	1,4625
<b>Sinapová</b>	0,716667	0,225	1,636111
<b>Syringová</b>	0,983333	0,341667	1,460317

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,533333	0,133333	2,208333
<b>Vanilová</b>	0,683333	0,2	1,708333
<b>p-Kumarová</b>	0,791667	0,25	1,625
<b>Ferulová</b>	0,983333	0,333333	1,482639
<b>o-Kumarová</b>	1,283333	0,533333	1,209091
<b>Sinapová</b>	0,691667	0,2	1,729167
<b>Syringová</b>	0,916667	0,3	1,527778

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,533333	0,15	1,9375
<b>Vanilová</b>	0,591667	0,2	1,479167
<b>p-Kumarová</b>	0,666667	0,233333	1,458333
<b>Ferulová</b>	0,866667	0,316667	1,468254
<b>o-Kumarová</b>	1,208333	0,525	1,157275
<b>Sinapová</b>	0,583333	0,2	1,477778
<b>Syringová</b>	0,65	0,291667	1,106944

#### 4.2.3.2. Kolona RP-Amide

Tabulka 37 popisuje faktor symetrie pro kolonu RP-Amide. Obsahuje potřebná data pro všechny tři koncentrace.

**Tab. 38 Faktory symetrie píku pro kolonu RP-Amide**

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,558333	0,191667	1,465278
<b>Syringová</b>	0,633333	0,266667	1,205556
<b>Vanilová</b>	0,566667	0,258333	1,115278
<b>Ferulová</b>	1,025	0,383333	1,364385
<b>Sinapová</b>	0,983333	0,516667	0,955556
<b>p-Kumarová</b>	1,183333	0,583333	1,015152
<b>o-Kumarová</b>	1,525	0,733333	1,040923

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,408333	0,125	1,708333
<b>Syringová</b>	0,508333	0,191667	1,347222
<b>Vanilová</b>	0,458333	0,183333	1,256944
<b>Ferulová</b>	0,641667	0,291667	1,102778
<b>Sinapová</b>	0,825	0,408333	1,010417
<b>p-Kumarová</b>	0,883333	0,433333	1,020833
<b>o-Kumarová</b>	1,158333	0,583333	0,99359

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,375	0,15	1,316667
<b>Syringová</b>	0,458333	0,183333	1,256944
<b>Vanilová</b>	0,391667	0,166667	1,222222
<b>Ferulová</b>	0,55	0,25	1,116071
<b>Sinapová</b>	0,708333	0,308333	1,144841
<b>p-Kumarová</b>	0,775	0,366667	1,059028
<b>o-Kumarová</b>	1,016667	0,591667	0,844751

#### 4.2.3.3. Kolona Phenyl-Hexyl

Následující tabulka obsahuje faktor symetrie pro kolonu Phenyl-Hexyl a popisuje všechny tři koncentrace.

**Tab. 39** Faktory symetrie píku pro kolonu Phenyl-Hexyl

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,608333	0,183333	1,7125
<b>Vanilová</b>	0,716667	0,258333	1,4
<b>p-Kumarová</b>	0,966667	0,416667	1,180556
<b>Ferulová</b>	0,875	0,441667	0,996759
<b>o-Kumarová</b>	1,433333	0,633333	1,138095
<b>Syringová</b>	0,766667	0,275	1,427778
<b>Sinapová</b>	1	0,383333	1,319444

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,591667	0,158333	2,041667
<b>Vanilová</b>	0,683333	0,233333	1,480556
<b>p-Kumarová</b>	0,733333	0,333333	1,131944
<b>Ferulová</b>	0,833333	0,35	1,200397
<b>o-Kumarová</b>	1,375	0,591667	1,162247
<b>Sinapová</b>	1,308333	0,2	3,270833
<b>Syringová</b>	1,016667	0,358333	1,44246

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>w<sub>0,05</sub> (cm)</b>	<b>d (cm)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	0,541667	0,15	1,979167
<b>Vanilová</b>	0,6	0,25	1,3
<b>p-Kumarová</b>	0,65	0,308333	1,097222
<b>Ferulová</b>	0,725	0,316667	1,180556
<b>o-Kumarová</b>	1,066667	0,483333	1,11918
<b>Sinapová</b>	0,583333	0,2	1,516667
<b>Syringová</b>	0,783333	0,358333	1,114286

#### 4.2.4. Účinnost a zdánlivý počet teoretických pater

Chromatogramy měření opakovatelnosti poskytly potřebná data k výpočtům účinnosti a zdánlivého počtu teoretických pater. Všechny chromatogramy byly vytisknuty a u každého píku se manuálně přeměřily požadované rozměry. Výsledná data pak byla zpracována v programu Excel podle vzorce z I. dílu Českého lékopisu 2009<sup>52</sup> :

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

- $N$  – zdánlivý počet teoretických pater
- $t_R$  – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce (zde retenční čas v sekundách)
- $w_h$  – šířka píku v polovině jeho výšky (v centimetrech)

#### 4.2.4.1. Kolona C18

Následující tabulka popisuje zdánlivý počet teoretických pater pro všechny tři koncentrace a obsahuje data potřebná k výpočtům.

**Tab. 40** Zdánlivý počet teoretických pater pro kolonu C18

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	126,4273	6,2250	0,2000	5366,9616
<b>Vanilová</b>	155,8935	7,5083	0,3000	3470,1987
<b>p-Kumarová</b>	204,0913	10,0583	0,4167	3228,3774
<b>Ferulová</b>	231,8048	11,4250	0,5000	2892,5587
<b>o-Kumarová</b>	364,2657	17,6083	0,5750	5195,2994
<b>Sinapová</b>	157,7655	7,7417	0,2750	4390,4932
<b>Syringová</b>	231,3980	11,5167	0,4000	4592,4388

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	126,6122	6,2500	0,2000	5410,1563
<b>Vanilová</b>	157,0472	7,7417	0,2000	8300,7763
<b>p-Kumarová</b>	207,5497	9,9417	0,3333	4927,9997
<b>Ferulová</b>	238,0990	11,4000	0,4583	3427,3352
<b>o-Kumarová</b>	376,0472	18,4750	0,6250	4840,8165
<b>Sinapová</b>	156,8413	7,8000	0,2500	5392,8576
<b>Syringová</b>	231,6720	11,3917	0,4250	3980,2142

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	125,9140	6,1917	0,2000	5309,6380
<b>Vanilová</b>	156,5807	7,6833	0,2167	6966,6647
<b>p-Kumarová</b>	205,9243	9,8083	0,3083	5606,0794
<b>Ferulová</b>	237,1327	11,2833	0,3917	4597,8138
<b>o-Kumarová</b>	364,2657	18,3333	0,6250	4766,8622
<b>Sinapová</b>	164,6513	8,1250	0,2333	6717,4267
<b>Syringová</b>	256,6305	12,4833	0,3583	6723,5166

#### 4.2.4.2. Kolona RP-Amide

Následující tabulka popisuje zdánlivý počet teoretických pater kolony RP-Amide pro všechny tři koncentrace a obsahuje také potřebná data.

**Tab. 41 Zdánlivý počet teoretických pater pro kolonu RP-Amide**

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	183,3392	5,6833	0,2667	2516,3935
<b>Syringová</b>	208,2730	6,4667	0,2750	3063,4114
<b>Vanilová</b>	228,2137	7,0667	0,3000	3073,9477
<b>Ferulová</b>	294,2832	9,0667	0,4000	2846,3289
<b>Sinapová</b>	345,9025	10,6833	0,4750	2802,4386
<b>p-Kumarová</b>	412,7753	12,7750	0,5000	3616,5259
<b>o-Kumarová</b>	592,8863	18,3917	0,6667	4216,3287

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	181,1378	5,6167	0,1667	6291,7226
<b>Syringová</b>	207,2812	6,3750	0,2000	5628,7266
<b>Vanilová</b>	226,7863	7,0250	0,2000	6835,0616
<b>Ferulová</b>	292,2473	8,9667	0,3000	4949,1351
<b>Sinapová</b>	342,0468	10,5250	0,3000	6818,8551
<b>p-Kumarová</b>	406,0153	12,4917	0,4000	5402,9451
<b>o-Kumarová</b>	580,4922	17,8333	0,5667	5486,8045

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	180,6355	5,6083	0,1833	5184,3526
<b>Syringová</b>	206,9662	6,3833	0,2000	5643,4518
<b>Vanilová</b>	226,0028	7,0083	0,2000	6802,6680
<b>Ferulová</b>	291,4765	8,9167	0,2750	5824,3765
<b>Sinapová</b>	333,1823	10,4167	0,3167	5994,6330
<b>p-Kumarová</b>	404,1355	12,3583	0,4167	4873,6244
<b>o-Kumarová</b>	576,7502	17,7667	0,5833	5139,1120

#### 4.2.4.3. Kolona Phenyl-Hexyl

Následující tabulka popisuje zdánlivý počet teoretických pater kolony Phenyl-Hexyl pro všechny tři koncentrace a obsahuje data potřebná ke zpracování výpočtů.

**Tab. 42** Zdánlivý počet teoretických pater pro kolonu Phenyl-Hexyl

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	140,1563	6,9583	0,2333	4926,8195
<b>Vanilová</b>	174,9792	8,6833	0,2917	4910,3123
<b>p-Kumarová</b>	231,4558	11,3917	0,3667	5347,3848
<b>Ferulová</b>	258,9067	12,7417	0,4167	5180,6557
<b>o-Kumarová</b>	369,6460	17,8583	0,6167	4646,1226
<b>Syringová</b>	203,0833	8,3833	0,3000	4326,1415
<b>Sinapová</b>	310,0050	12,7917	0,4000	5665,5757

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	139,8333	6,9500	0,6167	703,6852
<b>Vanilová</b>	176,6432	8,7750	0,2167	9086,9850
<b>p-Kumarová</b>	235,8647	11,5333	0,4583	3507,9756
<b>Ferulová</b>	264,1433	12,9167	0,4000	5776,8446
<b>o-Kumarová</b>	380,1900	18,9083	0,6667	4456,5500
<b>Syringová</b>	202,8150	8,4000	0,2000	9772,5600
<b>Sinapová</b>	310,2758	12,8583	0,4083	5493,5041

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>N</b>
<b>Protokatechová</b>	140,3800	6,9833	0,1833	8038,0821
<b>Vanilová</b>	177,8670	8,8333	0,2417	7401,5981
<b>p-Kumarová</b>	239,2913	11,8750	0,3667	5810,7761
<b>Ferulová</b>	267,7130	13,2667	0,3833	6635,6005
<b>o-Kumarová</b>	387,4398	19,2667	0,5833	6043,5114
<b>Syringová</b>	202,1300	8,3667	0,2417	6640,2005
<b>Sinapová</b>	308,5053	12,7583	0,3750	6412,6143

#### 4.2.5. Rozlišení

Vycházelo se z měření opakovatelnosti. Každý chromatogram z měření opakovatelnosti se vytiskl a všechny píky byly ručně přeměřeny, aby se získala požadovaná data. Získaná data poté byla zpracována v programu Excel podle vzorce z I. dílu Českého lékopisu 2009<sup>52</sup> :

$$R_s = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$R_s$  – rozlišení

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků, přičemž platí, že  $t_{R2} > t_{R1}$  (zde retenční čas v sekundách)

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  – šířky píků v poloviční výšce (v centimetrech)



#### 4.2.5.1. Kolona C18

Následující tabulka popisuje rozlišení kolony C18 pro všechny tři koncentrace a obsahuje data potřebná ke zpracování.

**Tab. 43 Rozlišení pro kolonu C18**

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>Rs</b>
<b>Protokatechová</b>	126,4273	6,2250	0,2000	3,0287
<b>Vanilová</b>	155,8935	7,5083	0,3000	4,1986
<b>p-Kumarová</b>	204,0913	10,0583	0,4167	1,7593
<b>Ferulová</b>	231,8048	11,4250	0,5000	6,7873
<b>o-Kumarová</b>	364,2657	17,6083	0,5750	
<b>Sinapová</b>	157,7655	7,7417	0,2750	6,5993
<b>Syringová</b>	231,3980	11,5167	0,4000	

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>Rs</b>
<b>Protokatechová</b>	126,6122	6,2500	0,2000	4,4004
<b>Vanilová</b>	157,0472	7,7417	0,2000	4,8675
<b>p-Kumarová</b>	207,5497	9,9417	0,3333	2,1737
<b>Ferulová</b>	238,0990	11,4000	0,4583	7,7063
<b>o-Kumarová</b>	376,0472	18,4750	0,6250	
<b>Sinapová</b>	156,8413	7,8000	0,2500	6,2788
<b>Syringová</b>	231,6720	11,3917	0,4250	

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>Rs</b>
<b>Protokatechová</b>	125,9140	6,1917	0,2000	4,2244
<b>Vanilová</b>	156,5807	7,6833	0,2167	4,7762
<b>p-Kumarová</b>	205,9243	9,8083	0,3083	2,4864
<b>Ferulová</b>	237,1327	11,2833	0,3917	8,1826
<b>o-Kumarová</b>	364,2657	18,3333	0,6250	
<b>Sinapová</b>	164,6513	8,1250	0,2333	8,6921
<b>Syringová</b>	256,6305	12,4833	0,3583	

#### 4.2.5.2. Kolona RP-Amide

Následující tabulka popisuje rozlišení kolony RP-Amide pro všechny tři koncentrace a obsahuje data potřebná ke zpracování výpočtů.

**Tab. 44 Rozlišení pro kolonu RP-Amide**

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	183,3392	5,6833	0,2667	1,7065
<b>Syringová</b>	208,2730	6,4667	0,2750	1,2313
<b>Vanilová</b>	228,2137	7,0667	0,3000	3,3714
<b>Ferulová</b>	294,2832	9,0667	0,4000	2,1802
<b>Sinapová</b>	345,9025	10,6833	0,4750	2,5315
<b>p-Kumarová</b>	412,7753	12,7750	0,5000	5,6809
<b>o-Kumarová</b>	592,8863	18,3917	0,6667	

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	181,1378	5,6167	0,1667	2,4405
<b>Syringová</b>	207,2812	6,3750	0,2000	1,9175
<b>Vanilová</b>	226,7863	7,0250	0,2000	4,5823
<b>Ferulová</b>	292,2473	8,9667	0,3000	3,0647
<b>Sinapová</b>	342,0468	10,5250	0,3000	3,3152
<b>p-Kumarová</b>	406,0153	12,4917	0,4000	6,5205
<b>o-Kumarová</b>	580,4922	17,8333	0,5667	

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	180,6355	5,6083	0,1833	2,3857
<b>Syringová</b>	206,9662	6,3833	0,2000	1,8438
<b>Vanilová</b>	226,0028	7,0083	0,2000	4,7407
<b>Ferulová</b>	291,4765	8,9167	0,2750	2,9915
<b>Sinapová</b>	333,1823	10,4167	0,3167	3,1243
<b>p-Kumarová</b>	404,1355	12,3583	0,4167	6,3818
<b>o-Kumarová</b>	576,7502	17,7667	0,5833	

### 4.2.5.3. Kolona Phenyl-Hexyl

Následující tabulka popisuje rozlišení kolony Phenyl-Hexyl pro všechny tři koncentrace a obsahuje potřebná data k výpočtům.

**Tab. 45** Rozlišení pro kolonu Phenyl-Hexyl

<b>0,1 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	140,1563	6,9583	0,2333	3,8771
<b>Vanilová</b>	174,9792	8,6833	0,2917	4,8544
<b>p-Kumarová</b>	231,4558	11,3917	0,3667	2,0336
<b>Ferulová</b>	258,9067	12,7417	0,4167	5,8429
<b>o-Kumarová</b>	369,6460	17,8583	0,6167	
<b>Syringová</b>	203,0833	8,3833	0,3000	7,4312
<b>Sinapová</b>	310,0050	12,7917	0,4000	

<b>0,01 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	139,8333	6,9500	0,6167	2,5842
<b>Vanilová</b>	176,6432	8,7750	0,2167	4,8220
<b>p-Kumarová</b>	235,8647	11,5333	0,4583	1,9017
<b>Ferulová</b>	264,1433	12,9167	0,4000	6,6283
<b>o-Kumarová</b>	380,1900	18,9083	0,6667	
<b>Syringová</b>	202,8150	8,4000	0,2000	8,6479
<b>Sinapová</b>	310,2758	12,8583	0,4083	

<b>0,001 mg/ml</b>	<b>t<sub>r</sub> (s)</b>	<b>t<sub>r</sub> (cm)</b>	<b>w<sub>h</sub> (cm)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>Protokatechová</b>	140,3800	6,9833	0,1833	5,1365
<b>Vanilová</b>	177,8670	8,8333	0,2417	5,9000
<b>p-Kumarová</b>	239,2913	11,8750	0,3667	2,1896
<b>Ferulová</b>	267,7130	13,2667	0,3833	7,3241
<b>o-Kumarová</b>	387,4398	19,2667	0,5833	
<b>Syringová</b>	202,1300	8,3667	0,2417	8,4035
<b>Sinapová</b>	308,5053	12,7583	0,3750	

## 5. Závěr

Kolona RP-Amide se pro separaci ukázala jako nejvhodnější, protože dokázala oddělit ze směsi všech sedm fenolických kyselin. Kolony C18 a Phenyl-Hexyl neměly dost vysokou selektivitu. Nedokázaly oddělit od sebe kyselinu vanilovou od kyseliny syringové a kyselinu ferulovou od kyseliny sinapové.

Kalibrační křivky kolony C18 mají tvar velice blízký přímce, buď to jsou mírné oblouky až hyperboly (kyseliny protokatechová, vanilová, *o*-kumarová a sinapová) nebo přímky (kyseliny *p*-kumarová, ferulová a syringová). Odezvy pro různé koncentrace jsou prakticky v lineárním vztahu.

Kalibrační křivky kolony Phenyl-Hexyl vykazují smíšené charakteristiky. Kyseliny protokatechová, vanilová, ferulová, *o*-kumarová a *p*-kumarová mají kalibrační křivky stejné jako na koloně RP-Amide a se stejným rozdělením. Avšak křivka kyseliny sinapové je velmi mírný oblouk a křivka kyseliny syringové je přímka. Tato kolona z celkového pohledu většinou nebude poskytovat lineární odezvu. (Nabízí se tu neověřená domněnka, že je to způsobeno specifickou substitucí fenylového jádra kyselin sinapové a syringové.)

Kolona C18 je pro měření nejvhodnější z pohledu linearitu závislosti odezvy na koncentraci.

Reziduální směrodatné odchylky všech tří kolon se různě pohybují v závislosti na použité koncentraci.

Kolona C18 vykazuje nejmenší RSD retenčního času i odezvy při koncentraci 0,1 mg/ml ze všech tří kolon. Kolona RP-Amide má nejmenší RSD odezvy při koncentraci 0,01 mg/ml a RSD času při koncentraci 0,001 mg/ml ze všech tří kolon. Kolona Phenyl-Hexyl ukazuje nejmenší RSD času při koncentraci 0,01 mg/ml a nejmenší RSD odezvy při koncentraci 0,001 mg/ml ze všech tří kolon .

Jestli se hodnota faktoru symetrie píku rovná právě 1, tak to značí ideální symetrii píku.

Při všech koncentracích kolona RP-Amide vykazuje nejvíce souměrné píky. Vůbec nejvíce souměrný pík v této práci je pík kyseliny sinapové pro koncentraci 0,01 mg/ml u kolony RP-Amide. Jeho faktor symetrie píku je 1,0104.

Účinnost kolony se často vyjadřuje jako zdánlivý počet teoretických pater.

Ze všech tří kolon pro všechny koncentrace kolona RP-Amide vykazuje největší účinnost. Vůbec nejvyšší účinnost 8 008 895 teoretických pater je pro kyselinu protokatechovou o koncentraci 0,01 mg/ml a na koloně RP-Amide.

Nejvyšší hodnoty rozlišení při všech koncentracích vykazuje kolona RP-Amide. Vůbec nejvyšší hodnota rozlišení je mezi píky kyselin *p*-kumarové a *o*-kumarové.

Optimální podmínky pro kolonu C18 jsou následující: mobilní fáze o složení 239 ml vody a 45,5 ml acetonitrilu (pH 2,36), objem mobilní fáze 3 600  $\mu$ l, průtoková rychlost 10  $\mu$ l/s a množství vzorku 10  $\mu$ l.

Optimální podmínky pro kolonu RP-Amide jsou tyto: mobilní fáze o složení 22 dílů acetonitrilu a 78 dílů vody (pH 2,4), objem mobilní fáze 3 800  $\mu$ l, průtoková rychlost 6  $\mu$ l/s a množství vzorku 10  $\mu$ l.

Nejlepší podmínky pro kolonu Phenyl-Hexyl jsou následující: mobilní fáze o složení 16 dílů acetonitrilu a 84 dílů vody (pH 2,46), objem mobilní fáze 3 800  $\mu$ l, průtoková rychlost 10  $\mu$ l/s a množství vzorku 10  $\mu$ l.

Podařilo se vyvinout separační techniku na všech třech použitých kolonách. Z celkového pohledu je nejlepší pro analýzu kolona RP-Amide.

## 6. Abstrakt

### 6.1 Abstrakt v jazyce českém

Tato diplomová práce se zabývá vývojem separační metody na moderních chromatografických kolonách v systému Sekvenční injekční chromatografie (SIC). Systém SIC byl založen na systému SICrom™ (FIALab®, Bellewue, WA, USA) s osmicestným ventilem z nerezové oceli (VICI® Valco Instruments, TX, USA) a pumpou S17 (Sapphire™ Engineering, MA, USA).

Použité vzorky byly připraveny rozpuštěním 25 mg různých fenolických kyselin (kyselina protokatechová, kyselina vanilová, kyselina *p*-kumarová, kyselina ferulová, kyselina *o*-kumarová, kyselina sinapová a kyselina syringová) ve 25 ml methanolu.

Použité kolony byly tři, a to kolona Ascentis Express C-18 (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA), kolona Ascentis Express RP-Amide (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) a kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA). Jejich sorbent patří do skupiny částic s pevným jádrem.

Mobilní fáze byla tvořena roztokem vody a acetonitrilu v různých poměrech a její pH bylo upravováno na 2,4 pomocí 85% kyseliny fosforečné.

Podmínky pro kolonu C18 jsou následující: mobilní fáze o složení 16 dílů vody a 84 dílů acetonitrilu (pH 2,36), objem mobilní fáze 3 600 μl, průtoková rychlost 10 μl/s a množství vzorku 10 μl.

Podmínky pro kolonu RP-Amide jsou tyto: mobilní fáze o složení 22 dílů acetonitrilu a 78 dílů vody (pH 2,4), objem mobilní fáze 3 800 μl, průtoková rychlost 6 μl/s a množství vzorku 10 μl.

Podmínky pro kolonu Phenyl-Hexyl jsou následující: mobilní fáze o složení 16 dílů acetonitrilu a 84 dílů vody (pH 2,46), objem mobilní fáze 3 800 μl, průtoková rychlost 10 μl/s a množství vzorku 10 μl. Všechny analýzy proběhly za izokratických podmínek.

Absorbance byla měřena při 250 nm (kyseliny protokatechová a vanilová), 280 nm (kyseliny syringová a *o*-kumarová) a 290/325 nm (kyseliny sinapová, ferulová a *p*-kumarová) UV detekcí. Použitý UV zdroj byla Lampa UV D-1 000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA) a použitý detektor byl detektor CCD UV-VIS USB 4 000 (Ocean-optics, FL, USA). Použitá průtoková cela je Z cela Ultem® SMA, efektivní délka 20 mm (FIALab®, Bellewue, WA, USA).

Separací metoda byla vyvinuta pro každou kolonu a základní separační charakteristiky kolon byly navzájem srovnány. Kolona RP-Amide byla v selektivitě nejlepší, separovala všechny kyseliny, ale kolony C-18 a Phenyl-Hexyl nedokázaly separovat dvě dvojice kyselin. Na kalibraci se nejvíce osvědčila kolona C18, protože její kalibrační křivky jsou velmi blízké přímcem. Při vysokých koncentracích analytu vykazuje kolona C18 reziduální směrodatnou odchylku (RSD) nejnižší z všech tří kolon jak pro retenční čas, tak pro odezvu. Kolona RP-Amide má nejmenší RSD odezvy při středních koncentracích a RSD času při nízkých koncentracích ze všech tří kolon. Kolona Phenyl-Hexyl ukazuje

nejmenší RSD času při středních koncentracích a nejmenší RSD odezvy při nízkých koncentraci ze všech tří kolon. Kolona RP-Amide ukazuje nejvíce souměrné píky při všech koncentracích a má nejvyšší účinnost. Nejvyšší hodnoty rozlišení byly rovněž naměřeny u kolony RP-Amide.

Podařilo se vyvinout separační techniku na všech třech použitých kolonách. Z celkového pohledu je nejlepší pro analýzu kolona RP-Amide.

## 6.2 Abstrakt v jazyce anglickém

This diploma thesis deals with the development of the separation method in the system of the Sequential Injection Chromatography (SIC). The used SIC system was based on the system SICrom™ (FIALab®, Bellewue, WA, USA) with the eight port stainless steel multi-position valve (VICI® Valco Instruments, TX, USA) and with the pump S17 (Sapphire™ Engineering, MA, USA).

The samples were prepared by dissolving of 25 mg of various phenolic acids (protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, *o*-coumaric acid, sinapinic acid and syringic acid) in 25 ml of methanol.

Three fused-core particle columns were used in this thesis : the column Ascentis Express C-18 (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA), the column Ascentis Express RP-Amide (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) and the column Ascentis Express Phenyl-Hexyl (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA).

The mobile phase was prepared by mixing water and acetonitrile in different ratios. Its pH was adjusted by the 85% phosphoric acid to the value of 2,40.

The conditions for the column C18 are as followed: the mobile phase 16:84 (acetonitrile:water v/v; pH 2,36), the volume of the mobile phase 3 600 μl, the flow velocity 10 μl/s and the volume of the sample 10 μl.

The conditions for the column RP-Amide are as followed: the mobile phase 22:78 (acetonitrile:water, v/v; pH 2,40), the volume of the mobile phase 3 800 μl, the flow velocity 6 μl/s and the volume of the sample 10 μl.

The conditions for the column Phenyl-Hexyl are as followed: the mobile phase 16:84 (acetonitrile:water, v/v; pH 2,46), the volume of the mobile phase 3800 μl, the flow velocity 10 μl/s and the volume of the sample 10 μl.

Analyses were isocratic.

The absorbance was monitored at 250 nm (vanillic and protocatechuic acids), 280 nm (syringic and *o*-coumaric acids) and 290/325 nm (sinapinic, ferulic and *p*-coumaric acids). The used UV source was the lamp UV D-1 000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA) and the used detector was the detector CCD UV-VIS USB 4 000 (Ocean-optics, FL, USA).

The used flow cell was the Z-cell Ultem® SMA, effective length 20 mm (FIALab®, Bellewue, WA, USA).

The separation method was developed for each column and the basic separation features of the columns were compared to each other.

The column RP-Amide was the best one in the selectivity because it separated all seven acids. The columns C18 and RP-Amide were not able to separate two pairs of acids. The two peaks were the



double peaks and it was found out that the double peaks belonged to vanillic and syringic acids and ferulic and sinapinic acids.

The column C18 was the best one in the calibration because its calibration curves approach very much to the straight line.

The column C18 exhibits the lowest relative standard deviation (RSD) for the retention time and the response in the field of the high concentrations.

The column RP-Amide has the lowest RSD of the response for the middle concentrations and the lowest RSD of the retention time for the low concentrations.

The column Phenyl-Hexyl shows the lowest RSD of the retention time for the middle concentrations and the lowest RSD of the response for the low concentrations.

The column RP-Amide reports the most symmetrical peaks for the all concentrations and it has the highest effectiveness. The highest values of the peak resolution were measured by the column RP-Amide, too.

The separation method was developed for all three columns successfully.

The column RP-Amide is the best column for the analysis in this diploma thesis.

## 7. Zdroje:

1. Paseková H., Polášek M., Solich P., Chemické Listy 93 (1999), str. 354
2. Růžička J., Marshall G. D., Analytica Chimica Acta 237 (1990), str. 329
3. Barnett N. W., Lenehan C. E., Lewis S. W., Trends in Analytical Chemistry 18 (1999), str. 346
4. [www.cs.wikipedia.org](http://www.cs.wikipedia.org) (Česká wikipedie), heslo Papírna, oddíl Zpracování, odstavec Příprava, bod Chemické úpravy (k datu 3.3. 2012)
5. Nyman J., Ivaska A., Analytica Chimica Acta 308 (1995), str. 286
6. [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org) (Anglická wikipedie), heslo Strontium-90, část Radioaktivita a věta nad tabulkou Contents (k datu 9.3. 2012)
7. Hrabálek A., Vinšová J., Pour M., Kuneš J., Kubicová L., Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty, 2. dotisk 1. vydání, Univerzita Karlova v Praze, nakl. Karolinum, Praha 2004, str. 162, ISBN 80-7184-968-5, kap. Adice, podkap. Halogeny jako elektrofilny, str. 35 – 36
8. [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org) (Anglická wikipedie), heslo Bromine, box napravo, sekce Appearance (k datu 10.3. 2012)
9. Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M., Solich P., Analytická chemie pro farmaceuty, 1. dotisk 3. vydání, Univerzita Karlova v Praze, nakl. Karolinum, Praha 2009, str. 281, ISBN 978-80-246-1453-3, kap. 10 Separční metody, podkap. 10.6. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), str. 276
10. Solich P., Pokroky v kapalinové chromatografii, přednáška z kurzu Speciální metody Instrumentální analýzy pro studijní obor Farmacie, III. ročník, akademický rok 2009 – 2010
11. Klimeš J., Sochor J., Mokrý M., Kastner P., Pilařová P., Kontrola léčiv I., 2. vydání, Univerzita Karlova v Praze, nakl. Karolinum, Praha 2008, str. 149, ISBN 978-80-246-1613-1, kap. 1.3. Důkazy pomocí chromatografických metod, podkap. 1.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie, str. 33 – 40
12. [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz) (Stránky o HPLC), oddíl Teorie HPLC, kap. 4 Detektory, podkap. 4.2 Typy detektorů, část Detektor CORONA (k datu 22.3. 2012).  
Přímý odkaz: [http://www.hplc.cz/Teorie/corona\\_CAD.html](http://www.hplc.cz/Teorie/corona_CAD.html)
13. [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org) (Anglická wikipedie), hesla FDA a EDQM (k datu 23.3. 2012)
14. Mokrý M., HPLC, přednáška z kurzu Monitorování lékových hladin pro studijní obor Farmacie, IV. ročník, akademický rok 2010 – 2011
15. Tasioula-Margari M., Okogeri O., Food Chemistry 74 (2001), str. 377
16. Zeraik M. L., Yariwake J. H., Microchemical Journal 96 (2010), str. 86
17. Williamson K. S., Petty J. D., Huckons J. N., Lebo J. A., Kaiser E. M., Chemosphere 49 (2002), str. 703
18. van Elteren J. T., Stibilj V., Šlejkovec Z., Water Research 36 (2002), str. 2967

19. Pasadakis N., Gaganis V., Varotsis N., *Fuel* 80 (2001), str. 147
20. Chocholouš P., Solich P., Šatínský D., *Analytica Chimica Acta* 600 (2007) 129
21. Zisiou E. P., Pinto P. C. A. G., Saraiva M. L. M. F. S., Siquet Ch., Lima J. L. F. C. *Talanta* 68 (2005), str. 226
22. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J., *Analytica Chimica Acta* 320 (1996), str. 199
23. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J., *Analytica Chimica Acta* 312 (1995), str. 149
24. Chocholouš P., Šatínský D., Solich P., *Talanta* 70 (2006), str. 408
25. Chocholouš P., Holík P., Šatínský D., Solich P., *Talanta* 72 (2007), str. 854
26. Šatínský D., Solich P., Chocholouš P., Karlíček R., *Analytica Chimica Acta* 499 (2003), str. 205
27. Šatínský D., Dos Santos L. M. L., Sklenářová H., Solich P., Montenegro M. C. B. S. M., Araújo A. N., *Talanta* 68 (2005), str. 214
28. Qiao J., Hou X., Roos P., Miró M., *Analytica Chimica Acta* 685 (2011), str. 111
29. Abraham A., Al-Sayah M., Skrdla P., Bereznitski Y., Chen Y. Wu, N., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2010), str. 131
30. Cunliffe J. M., Maloney T.D., *Journal of Separation Science* 30 (2007), str. 3 104
31. Kimata K., Iwaguchi K., Onishi S., Eksteen R., Hosoya K., Araki M., Tanaka N., *Journal of Chromatographic Science* 27 (1989), str. 721
32. Chocholouš P., Kosařová L., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P., *Talanta* 85 (2011), str. 1129
33. [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org) (Anglická wikipedie), heslo Pounds per square inch (k datu 2.4. 2012)
34. Fekete S., Fekete J., Ganzler K., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49 (2009), str. 64
35. Swartz M. E., Murphy B., *American Laboratory* 37 (2005), str. 22
36. Swartz M. E., *Journal of Liquid Chromatography* 28 (2005), str. 1253
37. Horváth C., Lipský S. R., *Analytická Chemie* 41 (1969), str. 1227
38. Horváth C., Preis B. A., Lipský S. R., *Analytická Chemie* 39 (1967), str. 1442
39. Jahodář L., *Farmakobotanika – Semenné rostliny*, 1.vydání, Univerzita Karlova v Praze, nakl. Karolinum, Praha 2006, str. 258, ISBN 80-246-1225-9, Schéma 1. Biosyntéza sekundárních metabolitů v rostlinách, str. 12  
Pozn. Podle tohoto zdroje byly převzaty případné změny názvů a čeledí jednotlivých matečných rostlin drog.
40. [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org) (Anglická wikipedie), hesla Coumaric acid, Ferulic acid, Sinapinic acid, Gallic acid, Vanillic acid, Syringic acid, Protocatechuic acid (k datu 1.4. 2012)
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (databáze NCBI PubChem Compound), hesla Coumaric acid, Ferulic acid, Sinapinic acid, Gallic acid, Vanillic acid, Syringic acid (k datu 1.4. 2012)

42. Hubík J, Dušek J., Spilková J., Šícha J., *Obecná farmakognosie II., Sekundární látky*, 3. přepracované vydání, Univerzita Karlova v Praze, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989, str. 275, kap. 1.2. Fenolické glykosidy a lignany, str. 13 – 22, kap. 1.3. Kumariny a jejich deriváty, str. 24 – 29, kap. Flavonoidní glykosidy, str. 31 – 40, kap. 2. Třísloviny, str. 98 – 106
43. Chocholouš P., Kosařová L., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P., *Talanta* 85 (2011), str. 1129, Fig. 2
44. Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M., Solich P., *Analytická chemie pro farmaceuty*, 1. dotisk 3. vydání, Univerzita Karlova v Praze, nakl. Karolinum, Praha 2009, str. 281, ISBN 978-80-246-1453-3, kap. 10 Separční metody, podkap. 10.6. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), str. 276 – 281, obr. 10-5, str.277
45. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Stránky firmy Sigma – Aldrich), záložka Products, sekce Analytical/Chromatography, oddíl HPLC (sloupec vlevo), oddíl Columns, oddíl Ascentis – Express, tlačítko C 18, výběr podle délky a vnitřního rozměru (3 cm × 4,6 mm) kolony (k datu 14.4. 2012).  
Přímý odkaz: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/53818u?lang=en&region=CZ>
46. [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz) (Stránky o HPLC), oddíl Teorie HPLC, kap. 2 Chromatografické kolony, podkap. 2.2 Adsorbenty a chemicky vázané fáze, poslední obrázek chemických struktur (k datu 14.4. 2012).  
Přímý odkaz: <http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html>
47. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Stránky firmy Sigma – Aldrich), stránky firmy Sigma – Aldrich, záložka Products, sekce Analytical/Chromatography, oddíl HPLC (sloupec vlevo), oddíl Columns, oddíl Ascentis – Express, tlačítko RP-Amide, výběr podle délky a vnitřního rozměru (3 cm × 4,6 mm) kolony (k datu 14.4. 2012).  
Přímý odkaz: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/53921u?lang=en&region=CZ>
48. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Stránky firmy Sigma – Aldrich), stránky firmy Sigma – Aldrich, záložka Products, sekce Analytical/Chromatography, oddíl HPLC (sloupec vlevo), oddíl Columns, oddíl Ascentis – Express, tlačítko RP-Amide, výběr podle délky a vnitřního rozměru kolony (k datu 14.4. 2012), záložka Protocols & References, oddíl Articles, článek Ascentis® Express RP-Amide HPLC Columns, obrázek Figure 2. Next Generation One-step Bonding Process for EPG Amide Phases (k datu 14.4. 2012).  
Přímý odkaz: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/brochures/ascentis-express-rp-amide.html>
49. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Stránky firmy Sigma – Aldrich), záložka Products, sekce Analytical/Chromatography, oddíl HPLC (sloupec vlevo), oddíl Columns, oddíl Ascentis –

- Express, tlačítko RP-Amide, výběr podle délky a vnitřního rozměru (3 cm × 4,6 mm) kolony (k datu 14.4. 2012).
- Přímý odkaz:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/53347u?lang=en&region=CZ>
- 50 Fekete S., Fekete J., Ganzler K., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49 (2009), str. 64, Fig. 3. SEM pictures of (a) Ascentis Express shell (fused core) particle and (b) Waters UPLC BEH 1.7 μm porous particle.
- 51 [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Stránky firmy Sigma – Aldrich), záložka Products, sekce Analytical/Chromatography, oddíl HPLC (sloupec vlevo), oddíl Columns, oddíl Ascentis – Express, tlačítko C 18, barevné schéma hned nad seznamem C18 Columns (k datu 14.4. 2012).  
Přímý odkaz: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841440>
- 52 Český lékopis 2009, I. díl, Grada Publishing a.s., Praha 2009, st. 1 184 (z celkového počtu 3968), ISBN 978-80-247-2994-7 , oddíl 2 Zkušební metody, kap. 2.2 Fyzikální a fyzikálně-chemické metody, podkap. 2.2.46 Chromatografické separační metody, oddíly Faktor symetrie, Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater, Rozlišení, Opakovatelnost, str. 134
- 53 Oms M. T., Cerda A., Cladera A., Cerda V., Forteza R., Analytica Chimica Acta 244 (1996), str. 251
54. Staden J. F., Taljaard R. E., Analytica Chimica Acta 244 (1997), str. 281
55. Wilmer M., Trau D., Rennenberg R., Spenner F., Analytical Letters 30 (1997), str. 515
56. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D., Journal of Flow Injection Analysis 13 (1996), str. 148
57. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D., Microchemical Journal 55 (1997), str. 392
58. Luo Y., Nakano S., Holman D., Růžička J., Christian G. D., Talanta 44 (1997), str. 1563
59. Ivaska A., Kubiak W. W., Talanta 44 (1997), str. 713
60. Christian G. D., Analyst 119 (1994), str. 2 309
61. Egorov O., Růžička J., Analyst 120 (1995), str. 1959
62. Pollema C. H., Růžička J., Analytical Chemistry 66 (1994), str. 1 825
63. Lindfors T., Lähdesmäki I., Ivaska A., Analytical Letters 29 (1996), str. 2 257
64. Růžička J., Pollema C. H., Scudder K. M., Analytical Chemistry 65 (1993) str. 3 566
65. Mayer M, Růžička J., Analytical Chemistry 68 (1996), str. 3 808
66. Willumsen B., Christian G. D., Růžička J., Analytical Chemistry 69 (1997), str. 3 482
67. Liu X., Hansen E. H., Analytica Chimica Acta 326 (1996), str. 1
68. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J, Analytica Chimica Acta 320 (1996), str. 199
69. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J, Analytica Chimica Acta 312 (1995), str. 149
70. Sultan S. M., Suliman F. E. O., Saad B., Analyst 120 (1995), str. 561

71. Sultan S. M., Suliman F. E. O., Saad B., *Analyst* 727 (1996), str. 617
72. Barnett N. W., Lewis S. W., Tucker D. J., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 355 (1996), str. 591
73. Barnett N. W., Lewis S. W., Tucker D. J., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 355 (1996), str. 591
74. Sultan S. M., Suliman F. E. O., *Talanta* 43 (1996), str. 559
75. Sultan S. M., Desai N. I., *Talanta* 45 (1998), str. 1 061
76. Liu X., Fang Z., *Analytica Chimica Acta* 358 (1998), str. 103
77. Suliman F. E., Sultan S. M., *Microchemical Journal* 57 (1997), str. 320
78. Tang L. X., Rowell F. J., *Analytical Letters* 31 (1998), str. 891
79. Grate J.W., Strebin R., Janata J., Egorov O., Ruzicka J., *Analytical Chemistry* 68 (1996), str. 333
80. Taylor R. H., Winbo C., Christian G. D., Ruzicka J., *Talanta* 39 (1992), str. 789
81. Al-Swaidan H. M., *Talanta* 43 (1996), str. 1313