

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Praha 2007

Jana Vaníková

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233141151

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

2007

**SEPARACE
POLYHYDROXYANTHRACHINONOVÝCH
DERIVÁTŮ METODOU HPLC**

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Vypracovala: Jana Vaníková

Prohlášení

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

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

V Praze dne *6.6.2007*.....

Jana Vaníková.....

podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za ochotu, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat všem z katedry analytické chemie za vytvoření přátelského prostředí a pomoc. Svoji rodině děkuji za umožnění studia, psychickou a finanční podporu a značnou trpělivost, kterou se mnou mají. Tato práce byla finančně podporována výzkumným záměrem MŠMT ČR projekt MSM 0021620857.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	1
1 ÚVOD	3
2 TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1 HYDROXYDERIVÁTY ANTHRACHINONU	5
2.1.1 Monohydroxyderiváty anthrachinonu	5
2.1.2 Dihydroxyderiváty anthrachinonu	6
2.1.3 Trihydroxyderiváty anthrachinonu	6
2.1.4 Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu	6
2.2 ANALYZOVANÉ LÁTKY	7
2.2.1 Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu	7
2.2.2 Pentahydroxyderiváty anthrachinonu	7
2.3 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE PŘÍRODNÍCH BARVIV	8
2.4 HPLC	10
2.4.1 Stacionární fáze	11
2.4.2 Mobilní fáze	12
2.4.3 Popis separačního děje	12
2.4.4 Instrumentace v HPLC	14
2.5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ	15
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	17
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	17
3.3 POSTUPY	18
3.3.1 Výběr kolony	18
3.3.2 Příprava pufru	18
3.3.3 Příprava zásobních roztoků analytů a jejich ředění	19
3.3.4 Příprava studovaných látek k proměření jejich UV-VIS spekter	19

4 VÝSLEDKY A DISKUZE	20
4.1 DETEKCE	20
4.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ	20
4.2.1 Volba separačního systému	20
4.2.2 Methanol jako organický modifikátor mobilní fáze	21
4.2.3 Acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze	24
4.2.4 Ternární mobilní fáze methanol/acetonitril/octanový pufr	26
5 ZÁVĚR	32
6 LITERATURA	33

SEZNAM ZKRATEK

A ... plocha píku

ACN ... acetonitril

AS ... faktor asymetrie píku

CZE ... kapilární zónová elektroforéza

F_m ... objemový průtok mobilní fáze

h ... výška píku

H ... výškový ekvivalent teoretického patra

HCOOH ... kyselina mravenčí

H₂O ... voda

HPLC ... vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IR ... infračervená oblast

k ... retenční faktor

K_D ... distribuční konstanta

K_n, k_n ... koeficienty pro soubor analytických výsledků o počtu n (nejčastěji pro hladinu významnosti 0,05)

L ... délka kolony

$L_{1/2}$... interval spolehlivosti

LC-MS ... kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

MEKC ... micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MeOH ... methanol

MS ... hmotnostní detekce

n ... počet teoretických pater

NMR ... nukleární magnetická rezonance

NP-HPLC ... kapalinová chromatografie s normálními fázemi

Q_1, Q_n ... kritéria pro vyloučení odlehlých výsledků podle Deanova a Dixonova testu

Q_k ... kritické kritérium pro vyloučení odlehlých výsledků podle Deanova a Dixonova testu

R ... rozpětí souboru

$R_{1,2}$... rozlišení

RP-HPLC ... kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

s ... směrodatná odchylka
 s_r , RSD ... relativní směrodatná odchylka
 t_M ... mrtvý čas
 t_R ... retenční čas
 t'_R ... redukovaný retenční čas
TLC ... tenkovrstvá chromatografie
UV ... ultrafialová oblast
 V_m ... objem mobilní fáze
 V_M ... mrtvý retenční objem
 V_R ... retenční objem
 V'_R ... redukovaný retenční objem
 V_s ... objem stacionární fáze
VIS ... viditelná oblast
 w_b, w_1, w_2 ... šířka píku při základně
 $w_{1/2}$... šířka píku v polovině jeho výšky
 $x_1, x_n, x_{n-1}, x_{\max}, x_{\min}$... naměřené hodnoty
 \tilde{x} ... střední hodnota
 $\alpha_{1/2}$... selektivita
 λ ... vlnová délka
 σ ... směrodatná odchylka

1 ÚVOD

Kůrovcovití (*Scolytinae*) s 6000 druhy jsou jednou z nejrozmanitějších skupin hmyzu. Kůrovce najdeme v lýku a dřevě naprosté většiny stromů, ale také uvnitř ovoce, v semenech, v řapících listů, v dužnině větvíček, ve stoncích bylin, včetně kapradin, či ve vzdušných kořenech mangrovů. Mnozí z nich dokážou žít ve zcela odlišných tkáních širokého spektra hostitelů a různými způsoby k tomu využívají symbiotické houby. Za pomoci dřevokazných hub zničí kůrovci miliony stromů ročně v celé holarktické oblasti, jiné houby zase pěstují jako výhradní potravu pro své larvy.

Již na konci křídy pravděpodobně začala symbióza kůrovců s vřeckovýtrusnými houbami z řádu *Ophiostomatales* na jehličnanech - araukáriích. Většina kůrovců si „své“ houby přenáší v mykangiích (mikroskopických žláznatých prohlubních vyplněných olejovitými tekutinami). Do mykangií se kůrovcům zachytávají spory symbiotických hub rostoucích v jejich rodném požerku a ven jsou vyplavovány jen tehdy, když kůrovec tvoří závrt v novém hostitelském stromě a jeho mykangia vylučují zvýšené množství olejovitých látek. Spory hub bývají přenášeny také roztoči, kteří se na kůrovce přichytávají a cestují spolu s ním.^{1,2}

Výzkum kůrovců na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy spolu s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd České republiky (MBÚ AV ČR) odhalil, že některé druhy kůrovců jsou spojeny s vřeckovýtrusnými hyfomycety rodu *Geosmithia*. Tyto dříve přehlížené houby jsou asociovány s asi 40 druhy kůrovců, které napadají listnaté stromy, byliny i konifery po celém světě. Je známo již sedm druhů těchto hub a další ještě nejsou popsány. Jeden kůrovec může přenášet až 5 různých druhů rodu *Geosmithia*. V současné době probíhá studium sekundárních metabolitů těchto hub, které by mohlo vést k nalezení nových, komerčně využitelných látek, a mohlo by přispět k odhalení ekologické role těchto hub v požercích kůrovců.³

Pro první studie sekundárních metabolitů byl vybrán fialově sporulující druh *Geosmithia lavendula*, který se hojně vyskytuje na několika druzích kůrovců v oblasti Středozemního moře. Tento výrazný fialový pigment se převážně skládá z hydroxylovaných anthrachinonů (tetra- a pentahydroxyderivátů), i když jejich produkce je u dobře kultivovatelných hub (jako jsou *Geosmithia* spp.) velmi vzácná. Tyto pigmenty by se daly využít jako velmi stabilní barviva a mořidla textilií.

Významné jsou také proto, že hydroxylované anthrachinony vykazují řadu biologických aktivit (antibakteriální, antifungální, cytostatickou, antimalarickou). Druh *Geosmithia lavendula* obsahuje celou řadu zatím neidentifikovaných extracelulárních produktů. Jejich identifikací a testy na biologickou aktivitu se zabývá tým z MBÚ AV ČR vedený Dr. M. Fliegerem. Analýza ostatních druhů rodu *Geosmithia* se připravuje.

CÍL PRÁCE

Tato práce se zabývá vypracováním analytické HPLC metody pro separaci dvou majoritních (1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon) a jednoho minoritního (1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon) metabolitu, které jsou izolovány z houby rodu *Geosmithia lavendula*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HYDROXYDERIVÁTY ANTHRACHINONU

Chinonová barviva jsou nejrozšířenější skupinou přírodních barviv. Lze je nalézt v kořenech a kůře rostlin a stromů, dále se mohou podílet na celé řadě zbarvení některých druhů hub a barevných výměšků některých druhů brouků. Do skupiny chinonových barviv patří deriváty benzochinonu, naftochinonu, anthrachinonu a dalších. U těchto derivátů se velice často nachází jedna nebo více hydroxylových skupin, na které bývá často navázána cukerná složka, zejména glukosa nebo L-rhamnosa.⁴

Hydroxylované deriváty anthrachinonu se používaly již od starověku k barvení textilií.^{5,6,7} Od konce 19. století jsou pro barvení textilií využívána syntetická, podstatně levnější a dostupnější barviva, a v současnosti nacházejí hydroxyderiváty anthrachinonu uplatnění v zemědělství a v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Byla provedena řada studií rostlin, které se používají například v tradiční čínské medicíně. Během nich bylo prokázáno, že tyto rostliny, jejichž nejrůznější části se používají k léčení řady zdravotních problémů a onemocnění (např. nechutenství, bolesti hlavy, cholera, průjem, horečka, hemeroidy), obsahují celou řadu anthrachinonových derivátů.⁸

Deriváty anthrachinonu lze rozdělit podle zdroje jejich výskytu v přírodě, strukturního uspořádání či počtu substituentů.

2.1.1 Monohydroxyderiváty anthrachinonu

Do této skupiny patří 1-hydroxy-9,10-anthrachinon, u kterého byla studována schopnost tvořit vodíkové vazby⁹, a 2-hydroxy-9,10-anthrachinon. Oba tyto deriváty se používají jako přírodní barviva.

2.1.2 Dihydroxyderiváty anthrachinonu

Mezi tyto deriváty se řadí nejznámější a nejčastěji se vyskytující hydroxylované derivát anthrachinonu – alizarin (1,2-dihydroxyanthrachinon). Je to červené barvivo, které bylo společně s purpurinem (1,2,4-trihydroxyanthrachinon) a xanthopurpurinem (1,3-dihydroxyanthrachinon) izolováno z kořene mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*).

Quinizarin (1,4-dihydroxyanthrachinon) je hnědofialový prášek, který se získává z indické mořeny (*Rubia cordifolia*). Po rozpuštění v acetonitrilu je to oranžové barvivo, které se na Východě používá k barvení tkanin.

Aloe-emodin (2-hydroxymethyl-4,5-dihydroxyanthrachinon) byl nalezen v *Aloe vera* a také v listech a kořenech dalších rostlin. Velice často ho doprovází i jeho glykosidická forma. Svojí strukturou je velmi podobný emodinu a vykazuje cytostatické účinky.¹⁰

Dále sem ještě patří danthron (1,8-dihydroxyanthrachinon) a anthrarufin (1,5-dihydroxyanthrachinon).

2.1.3 Trihydroxyderiváty anthrachinonu

Purpurin (1,2,4-trihydroxyanthrachinon) patří mezi barviva izolovaná z mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*), dříve byla tato barviva hojně používána k barvení textilií. Společně s alizarinem se používala k barvení až do 19. století, kdy byl alizarin připraven synteticky.

Emodin (6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthrachinon) se nachází v podobě glykosidu – fragulinu v kořeni rebarbory a v bukové kůře. Lze ho také najít v některých houbách rodu *Penicillium* a v rostlinách běžně používaných v tradiční čínské medicíně, které vykazují protinádorovou aktivitu.¹⁰

2.1.4 Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu

Karmínová kyselina (7-β-D-glukopyranosyl-3,5,6,8-tetrahydroxy-1-methyl-9,10-dioxoanthracen-2-karboxylová kyselina) je červené barvivo. Používá se k barvení alkoholických nápojů nebo dražé, v cytologii a jako indikátor. Je izolována z těl sameček červce nopálového (*Coccus cacti* L.), který žije ve Střední a Jižní Americe.

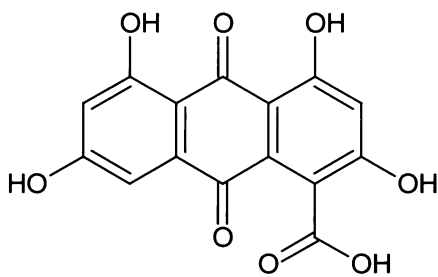
Lakaová kyselina je souhrnný název pro pět velmi si podobných hydroxylovaných derivátů anthrachinonu, které se v přírodě vyskytují ve směsi. Získává se z pryskyřičných skořápek, které obsahují sekret hmyzu *Coccus lacca*, který žije na stromech rodu *Genus ficus* v Indii.

Quinalizarin (1,2,5,8-tetrahydroxyanthrachinon) byl použit pro vytvoření nové matrice, pomocí které se dá stanovit kobalt ve vitamínech, uran ve vodních pramenech a měď, kadmium, kobalt, olovo, zinek a mangan ve vzorcích říční vody.¹¹

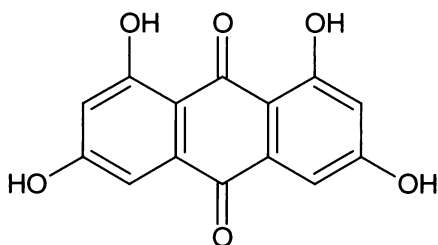
2.2 ANALYZOVANÉ LÁTKY

2.2.1 Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu

1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon

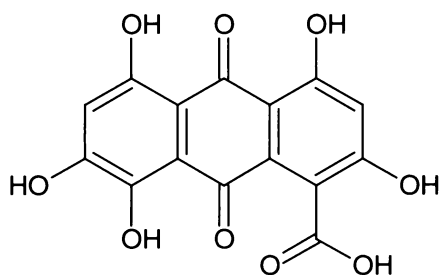


1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon



2.2.2 Pentahydroxyderiváty anthrachinonu

1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon



2.3 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE PŘÍRODNÍCH BARVIV

K analýze přírodních barviv se nejčastěji využívají následující metody:

- mikrochemické důkazy
- elektrochemické metody
- spektrální metody
- elektromigrační metody
- chromatografické metody

Mikrochemické důkazy^{5,7}

Jsou to jednoduché, selektivní reakce barviv s činidly, sloužící k předběžnému odlišení přírodních a syntetických barviv, popřípadě k identifikaci konkrétních přírodních barviv. Dnes jsou využívány především k orientačním důkazům přírodních barviv.

Elektrochemické metody⁷

Při analýze některých anthrachinonových barviv se dá využít i elektrochemických metod. Využívají jevy spojené s přenosem elektrického náboje přes fázové rozhraní a s transportem nabitých částic v roztoku.

Voltametriky bylo zjištěno, že odezva detektoru pro polyhydroxyanthrachinony je lineárně závislá na počtu –OH skupin navázaných na jejich anthrachinonový řetězec. Tento fakt byl ověřen pro 1-hydroxy-, 2-hydroxy-, 1,2-dihydroxy-, 1,4-dihydroxy-, 1,8-dihydroxy- a 1,2,5,8-tetrahydroxy-9,10-anthrachinon.¹²

Spektrální metody^{5,7}

Detekce a identifikace přírodních barviv se často provádí prostřednictvím spektrálních metod, které využívají absorpce či emise kvant energie molekulami analyzovaných látek. Patří sem infračervená spektrometrie (ve spojení s Fourierovou transformací), Ramanova spektrometrie, rentgenová fluorescenční spektrometrie, absorpční fluorescenční spektrometrie a molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti. Struktura neznámých látek se určuje pomocí NMR.

Spektrometrie v UV/VIS oblasti je nejpoužívanější ze všech spektrálních metod. Je to metoda citlivá, jednoduchá a hlavně levná.

Z kořene rostliny *Rubia yunnanensis* byly izolovány a pomocí IR spektrometrie popsány čtyři nové naftohydrochinony společně s dalšími jedenácti složkami, jednou z nich byl např. i xanthopurpurin.¹³

Vodíkové vazby u 1-hydroxy-9,10-anthrachinonu byly studovány i s využitím Ramanovy spektrometrie.⁹

Elektromigrační metody⁷

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Jsou to metody obecně poskytující vysokou účinnost a dostatečnou rychlost separace. Vyžadují malá množství vzorku a ostatních činidel.

Deriváty anthrachinonu (chrysofanol, emodin, cassiamin A a B izolované z rostliny *Cassia siamea*) byly separovány micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií.¹⁴

Chromatografické metody^{5, 7, 15}

Společně s elektromigračními metodami patří chromatografické metody k nejvíce používaným metodám pro separaci přírodních látek. Pro identifikaci a stanovení anthrachinonových derivátů se velmi často využívá tenkovrstvá chromatografie (pro svoji jednoduchost a minimální nároky na laboratorní vybavení) a HPLC ve spojení s UV-VIS nebo hmotnostní detekcí (pro vysokou separační účinnost a citlivost detekce).

Na silikagelové desce bylo ve vyvíjející soustavě hexan/acetone/terc-butanol (85:10:5) separováno pět nejvýznamnější anthrachinonů z rebarbory.¹⁶ Nejvíce používanou chromatografickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích. Metodou RP-HPLC byly separovány hydroxylované deriváty anthrachinonu v mobilních fázích ACN/H₂O s 1% přídavkem HCOOH při různých poměrech vodné a organické složky a pH vodné složky mobilní fáze v rozmezí 2,2 - 2,8, dále v mobilní fázi MeOH/0,2 M octanový pufr, rozmezí pH 3,5 - 5,5 a v mobilní fázi MeOH/0,1 M citrátový pufr pH 2,5 (izokraticky i za použití gradientové eluce).^{5, 6}

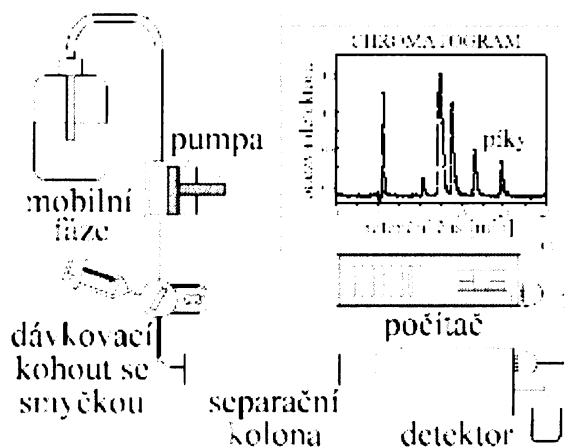
V literatuře nebyly doposud publikovány žádné údaje o separaci analytů studovaných v této práci.

2.4 HPLC ^{5, 15, 17}

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se vyvinula z chromatografie plynové na začátku 70. let minulého století. Stacionární fáze obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují celou kolonu. Tento jev společně s vysokým tlakem mobilní fáze zaručuje vysokou účinnost systému. Vzorku se dávkuje jen malá množství, v řádech desítek mikrolitrů. K detekci se používají vysoce citlivé detektory, jejichž signál je zaznamenáván počítačem.

Prostřednictvím HPLC lze analyzovat širokou škálu vzorků: ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Touto metodou můžeme rozdělit až 80 % všech známých látek. Separace se dá velice dobře ovlivňovat změnami stacionární nebo mobilní fáze.

Nejběžnější používanou technikou chromatografie je eluční technika. Látky, které mají být rozděleny, jsou nadávkovány do kolony a poté unášeny kontinuálně protékající mobilní fází. Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obr. 1.



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu (převzato z ¹⁷)

Po rozdělení látek získáme v počítači záznam – chromatogram. Ten se skládá z elučních křivek, neboli píků separovaných látek.

Z chromatogramu se pak dá odečíst mrtvý čas kolony (t_M), to je čas, který stráví látka v mobilní fázi, a retenční časy (t_R) jednotlivých analytů, ty jsou pro různé látky odlišné a závisí na době, po kterou jsou jednotlivé analyty zadržovány stacionární fází. Z těchto veličin může být vypočítán mrtvý objem kolony (V_M) – vztah (1), retenční objemy

jednotlivých analytů (V_R) – vztah (2), kde F_m je objemový průtok mobilní fáze, a také redukované hodnoty retenčních časů (t'_R) a objemů (V'_R) – vztah (3), respektive (4).

$$V_M = F_m \cdot t_M = V_m \quad (1)$$

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (2)$$

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3)$$

$$V'_R = V_R - V_M \quad (4)$$

Redukované retenční hodnoty, na rozdíl od prostých hodnot objemů nebo časů, jsou nezávislé na délce kolony a dá se pomocí nich vyjádřit retenční faktor – vztah (5), kde K_D je distribuční konstanta, V_s je objem stacionární a V_m objem mobilní fáze.

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{V'_R}{V_M} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (5)$$

Látky lze eluovat z kolony několika způsoby:

- a) mobilní fází o konstantním složení - izokratickou elucí
- b) změnou eluční síly skokem
- c) kontinuální změnou eluční síly podle určitého programu - gradientovou elucí

2.4.1 Stacionární fáze

U náplňových kolon je důležitá velikost a uspořádání částic. Čím menšími částicemi je kolona naplněna, tím je účinnost separace vyšší. Běžně používané kolony jsou naplněny částicemi o velikosti 5 nebo 10 μm , dostupné jsou ale i komerční náplně s částicemi o velikosti 2 μm i menšími.

Je možné použít i monolitické kolony, které jsou vyplněny polymerem o definované pórovitosti. Tyto kolony mají velkou mechanickou stabilitu a odolnost vůči změnám pH a zaručují vysokou účinnost separace i při vysokých průtocích mobilní fáze.

Nejběžněji používané náplňové kolony mají délku 5 - 25 cm, vnitřní průměr několik milimetrů (3, 4 až 4,6 mm), objem nadávkovaného vzorku bývá v rozsahu 1 - 20 μl a průtok mobilní fáze se pohybuje v rozmezí 0,5 až 1,5 ml/min.

2.4.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze se v kapalinové chromatografii výrazně podílí na separačním procesu. Složení mobilní fáze se dá ovlivnit změnou složení rozpouštědel, pH, iontové síly, iontově-párovými činidly apod. Mobilní fáze je charakterizována zejména polaritou a selektivitou, v detektoru by měla dávat minimální signál, mít nízkou viskozitu, stlačitelnost a být málo toxická.

Polarita je schopnost rozpouštědla podílet se na polárních interakcích.

Selektivita – vztah (6) je definována jako relativní retence dvou sousedních analytů. Čím je hodnota $\alpha_{1,2}$ větší, tím je systém selektivnější.

$$\alpha_{1,2} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D,2}}{K_{D,1}} \quad (6)$$

2.4.3 Popis separačního děje

Separace vysokoučinnou kapalinovou chromatografií probíhá v separační koloně naplněné stacionární fází (sorbentem), kterou protéká mobilní fáze (eluent). Dělení probíhá na základě rozdílných interakcí mezi mobilní fází a analytem, interakcí mezi mobilní a stacionární fází a rozdělování analytu mezi mobilní a stacionární fází (tzv. solvofobní teorie). Rozdílné analyty jsou tedy rozdílně zadržovány a zpoždovány kolonou a do detektoru doputují v různých retenčních časech.

Separací mechanismy v HPLC se dají rozdělit podle způsobu zadržování a dělení separovaných látek na několik skupin:

- rozdělovací chromatografie
- adsorpční chromatografie
- gelová permeační chromatografie
- iontově-výměnná chromatografie
- iontově-párová chromatografie
- afinitní chromatografie

Podle povahy mobilní fáze rozlišujeme dva druhy HPLC:

- chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC) – stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární (nejčastěji pentan, heptan, chloroform a jejich směsi).
- chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) – stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární (nejčastěji methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi).

Reversní chromatografií se dá rozdělit široké spektrum látek. Stacionární fází je nejčastěji silikagel, který je modifikován nepolární složkou, nejčastěji oktylem nebo oktadecylem. Díky nepolárnímu charakteru lze tyto stacionární fáze velmi dobře kombinovat s polárními organickými rozpouštědly, které se dají smísit s pufrem, vodou, kyselinami, bázemi, iontově-párovými činidly nebo chirálními selektory, používanými jako složka mobilní fáze.

K separaci analytů se nejčastěji využívají reversní stacionární fáze, které mají řadu výhod:

- použití pro široké spektrum analytů
- dá se použít široká škála mobilních fází
- reversní chromatografie je experimentálně jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda
- reversní chromatografie se s vodnými mobilními fázemi dá aplikovat i na biologické materiály

a i několik nevýhod:

- mají velmi komplikovaný mechanismus, který zatím není zcela objasněn
- nejčastěji používané stacionární fáze jsou na bázi silikagelu, silikagelová matrice je stabilní jen v omezeném rozsahu pH

Separace látek závisí na rozdílu jejich retenčních objemů (V_R) a na šířce jejich koncentračních profilů (w_b) – vztah (7), kde w_b je šířka píku při základně a σ je směrodatná odchylka.

$$w_b = 4\sigma \quad (7)$$

Ze vztahu (7) lze pak snadno vypočítat počet teoretických pater n v koloně, který určuje separační účinnost kolony – vztah (8). Čím vyšší je počet teoretických pater (n),

tím vyšší je separační účinnost kolony a tím nižší je výškový ekvivalent teoretického patra (H) – vztah (9), kde L je délka kolony.

$$n = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (8)$$

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{5,545} \cdot \left(\frac{w_{1/2}}{t_R} \right)^2 \quad (9)$$

Kromě selektivity $\alpha_{1,2}$ charakterizuje míru separace dvou píků i rozlišení $R_{i,j}$, které je definována vztahem (10), kde w_i a w_j je šířka píků při základně dříve, respektive později eluujících píků. Aby došlo k rozlišení dvou látek až na základní linii, musí být hodnota $R_{i,j} \geq 1,5$.

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j} \quad (10)$$

Faktor asymetrie píku (AS) je veličina, která charakterizuje míru odlišnosti daného píku od jeho gaussovského tvaru. Optimální hodnota faktoru asymetrie se pohybuje v rozmezí 0,98 – 1,02 a v ideálním případě může nabývat hodnoty 1,00.

2.4.4 Instrumentace v HPLC

Schéma kapalinového chromatogramu je uvedeno na obr. 1. Na ultrazvuku odplyněná mobilní fáze je přiváděna ze zásobní lahve do čerpadla. Čerpadlo musí být vysokotlaké a musí zajišťovat konstantní, reprodukovatelný a bezpuzlní průtok mobilní fáze. Nejčastěji se používají čerpadla dvoupístová. Z čerpadla je mobilní fáze vedena na dávkovací kohout se smyčkou. Vzorek se do dávkovací smyčky dávkuje injekční stříkačkou. Dávkování je reprodukovatelné a dá se snadno automatizovat. Po nadávkování je vzorek přiváděn na kolonu. Ta je nejčastěji vyrobena z nerezové oceli. Odtud putuje analyt do detektoru a signál z detektoru je vyhodnocen pomocí počítače. Jednotlivé části kapalinového chromatogramu jsou propojeny spojovacími kapilárami.

Materiál, který se používá v HPLC, musí být mechanicky a chemicky odolný a povrchově neaktivní, aby nepřispíval k rozmývání elučních křivek analytů. Proto se nejčastěji používá nerezová ocel, sklo nebo některé plasty.

Na detektory jsou kladeny vysoké požadavky, zvláště pak signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, dále by měl být dostatečně citlivý.

Detektory nejčastěji používané v HPLC:

- spektrofotometrický detektor – nejpoužívanější z detektorů kvůli svojí jednoduchosti, univerzálnosti, dostatečně širokému lineárnímu dynamickému rozsahu a kompatibilitě s gradientovou elucí
- fluorimetrický detektor – selektivní a citlivý detektor pro látky schopné fluorescence
- refraktometrický detektor – méně citlivý a selektivní detektor, založený na měření indexů lomu
- elektrochemické detektory – selektivní detekce, měří se vodivost nebo elektrický proud odpovídající oxidaci nebo redukci analytů
- hmotnostní detektor (MS) – univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor, umožňuje identifikaci analytů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje

2.5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ^{18, 19}

Každé měření je většinou zatíženo nějakou chybou. Chyby jsou příčinou toho, že při opakovaných měření stejných vzorků stejnými postupy dostáváme výsledky, které se mohou lišit od skutečné hodnoty i mezi sebou navzájem.

Chyby, kterými mohou být výsledky zatíženy se dělí na chyby náhodné, hrubé a systematické. Chyby systematické zatěžují výsledky analýzy jedním směrem, jejich příčinu lze v principu odhalit, pokud se nejedná o analýzu neznámého vzorku. Chyby náhodné jsou příčinou odchylek mezi střední hodnotou a jednotlivými výsledky měření. Tyto chyby ovlivňují přesnost analýzy.

Nezbytnou součástí každé analýzy je určení přesnosti měření hodnoty stanovované veličiny. Přesnost analýzy se určuje statistickým zpracováním opakovaných měření výsledků.

Odlehlé výsledky se dají vyloučit pomocí Deanova a Dixonova testu pro odlehlé výsledky. Naměřené hodnoty musí být seřazené od nejmenší po největší, z tohoto uspořádání se vypočítá rozpětí R souboru výsledků podle vzorce (11), kde x_{\max} je největší z naměřených hodnot a x_{\min} je nejmenší z naměřených hodnot.

$$R = x_{\max} - x_{\min} = x_n - x_1 \quad (11)$$

Pak se vypočítá kritérium Q_1 podle vztahu (12) a kritérium Q_n podle vztahu (13), kde Q_1 a Q_n jsou kritéria pro vyloučení odlehlých výsledků podle Deanova a Dixonova testu.

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (12)$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (13)$$

Kritéria Q_1 a Q_n se pak porovnávají s tabelovanou kritickou hodnotou kritéria pro vyloučení odlehlých výsledků Q_k pro daný počet měření n v souboru. Pokud je $Q_1 > Q_k$ nebo $Q_n > Q_k$, pak jsou dané výsledky podle Deanova a Dixonova testu odlehlé a musí být vyloučeny ze souboru měření.

Jako střední hodnota se pro malý počet měření používá medián, pro velký počet měření lze použít aritmetický průměr z naměřených hodnot.

Směrodatná odchylka s pro menší soubory analytických výsledků se odhaduje z vypočítaného rozpětí souboru a tabelovaného koeficientu k_n , který je tabelován pro n měření (nejčastěji pro hladinu významnosti 0,05). Výpočet směrodatné odchylky s je dán vztahem (14). Čím je směrodatná odchylka menší, tím jsou výsledky přesnější.

$$s = k_n \cdot R \quad (14)$$

Relativní směrodatná odchylka s_r se vypočítá podle vztahu (15), kde \tilde{x} je velikost střední hodnoty výsledků. Vyjadřuje se v procentech, to znamená po vynásobení výsledku 100.

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}} \quad (15)$$

Míra shodnosti naměřených hodnot je dána intervalem spolehlivosti $L_{1/2}$, který udává interval, v němž se nachází hledaný parametr s jistou pravděpodobností. Při hodnocení souborů výsledků se nejčastěji používá koeficient spolehlivosti 0,95. Interval spolehlivosti $L_{1/2}$ se vypočítá podle vztahu (16), kde K_n je tabelovaný koeficient pro soubor výsledků o počtu měření n (pro hladinu významnosti 0,05).

$$L_{1/2} = K_n \cdot R \quad (16)$$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- acetonitril R CHROMASOLV pro kapalinovou chromatografii (Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol CHROMASOLV pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (Sigma-Aldrich, Německo)
- octová kyselina (99%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- amoniak – vodný roztok (min. 25%, p.a., Lachema, Neratovice, ČR)
- deionizovaná voda

analyty:

1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon, 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon byly izolovány v Mikrobiologickém ústavu AV ČR skupinou Dr. Fliegera; jejich struktura byla určena pomocí NMR a hmotnostní spektrometrie.²⁰

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Pevné vzorky byly naváženy na analytických vahách model APX-100 (Denver Instrument, Německo).

K proměření spekter studovaných látek byl použit UV/VIS spektrofotometr model PU 8800 (Pye Unicam, Cambridge, UK).

K separaci vzorků byl použit kapalinový chromatograf, který se skládal z vysokotlaké pumpy model PU 4015, UV detektoru model PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK) a šesticestného ventilu Rheodyne 7725i (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 20 μ l. Vzorky byly dávkovány stříkačkou Hamilton o objemu 25 μ l (Reno, Nevada, USA). Při proměřování teplotní závislosti byla kolona termostatována v termostatu Mistral model Spark (Mistral, Holandsko). Pokud není uvedeno jinak, byla všechna měření prováděna při teplotě 22 ± 2 °C.

Pufř používaný v mobilních fázích byl upraven na požadované pH pomocí pH-metru model 3510 (Jenway, UK). Mobilní fáze byly sonifikovány na ultrazvuku model LC 30H (Německo).

Měření byla prováděna na koloně LiChroCart 125-4 Cartridge Purospher RP-18e, 125 x 4,0 mm I.D., velikost zrnění 5 μm (Merck, Německo) a byla použita předkolonka LiChroCart 4-4 Purospher RP-18e, 1,0 x 4,0 mm I.D. (Merck, Německo).

Ke sběru a vyhodnocení naměřených dat byly použity programy CSW32 (DataApex, Praha, ČR) a Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA).

3.3 POSTUPY

3.3.1 Výběř kolony

Na základě literárních údajů^{5,6} byla pro separaci studovaných analytů vybrána kolona Purospher RP-18e. Kolona Purospher je vhodná pro dělení kyselin, bazí i chelatačních činidel. V silikagelové matici této kolony je oproti jiným druhům kolon snížen obsah kovů a volné silanolové ($-\text{OH}$) skupiny jsou dodatečně deaktivovány. Tato kolona v řadě případů vykazuje uspokojivou reprodukovatelnost výsledků, vysokou separační účinnost dosaženou velmi dobrou symetrií píků.²¹

3.3.2 Příprava pufru

Pufř, použitý na přípravu všech mobilních fází, byl 25 mM octan amonný. Do 450 ml deionizované vody bylo přidáno 0,725 ml octové kyseliny a pH tohoto roztoku bylo upraveno na požadovanou hodnotu (pH = 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 nebo 5,5) přidavkem příslušného objemu vodného roztoku amoniaku. Poté byl objem pufru v odměrné baňce doplněn na celkový objem 500 ml.

Pufř o pH 4,0 byl použit pro mobilní fáze MeOH/25 mM octanový pufř a ACN/25 mM octanový pufř.

Pro mobilní fázi MeOH/ACN/25 mM octanový pufř byly proměřeny všechny hodnoty pH pufru.

3.3.3 Příprava zásobních roztoků analytů a jejich ředění

Zásobní roztoky 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu byly připraveny rozpuštěním 0,5 mg pevného vzorku v 1 ml MeOH.

Zásobní roztok směsného vzorku 1,3,6,8-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu byl připraven rozpuštěním 0,4 mg pevného vzorku v 0,8 ml MeOH.

Všechny připravené zásobní roztoky měly koncentraci $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ a byly uchovávány v chladu a temnu.

Pro vlastní separaci byly tyto vzorky příliš koncentrované, a proto byly 10x zředěny (100 μl vzorku v 900 μl methanolu), jejich výsledná koncentrace pak byla $c = 0,05 \text{ mg/ml}$.

Při přípravě směsí více analytů byly použity ředěné vzorky zásobních roztoků a byly smíchány v poměru 1:1.

3.3.4 Příprava studovaných látek k proměření jejich UV-VIS spektra

K proměření UV-VIS spekter zkoumaných analytů byly použity 20x zředěné zásobní roztoky 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu, jejich koncentrace tedy byla $c = 0,025 \text{ mg/ml}$.

Byly proměřovány methanolické roztoky obou analytů v kyvetě o délce $l = 1 \text{ cm}$ oproti methanolu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 DETEKCE

K zajištění dostatečné citlivosti detekce byla proměřena UV-VIS spektra analyzovaných látek – 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu. Spektra byla proměřena v rozpětí vlnových délek 200 - 800 nm. Získané dílčí výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Vlnové délky lokálních maxim analytů ($c = 0,025$ mg/ml)

analyt	λ (nm)				
1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon	224	256	292	311	455
1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon	225	271	320	537	-

Standard 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu nebyl k dispozici, protože je minoritní složkou pigmentu získaného z houby *Geosmithia lavendula*, a proto nemohlo být jeho UV-VIS spektrum proměřeno, ale předpokládalo se, že tento analyt bude vykazovat obdobné absorpční vlastnosti jako 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon.

Pro detekci samotného 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a směsi 1-acetyl-2,4,5,7- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu byla zvolena vlnová délka 290 nm. Pro detekci samotného 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu, směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-, 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonů byla zvolena vlnová délka 270 nm.

4.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ

4.2.1 Volba separačního systému

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.3, byla pro separaci studovaných analytů vybrána oktadecylová stacionární fáze a bylo měřeno v reversním separačním modu. V průběhu celého experimentu bylo pracováno izokraticky a byl sledován vliv složení mobilní fáze, průtokové rychlosti a teploty na retenci studovaných analytů. Byly použity mobilní

fáze MeOH/25 mM octanový pufr, ACN/25 mM octanový pufr, MeOH/ACN/25 mM octanový pufr, pH pufru v rozmezí 3,5 až 5,5 s proměnným obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi.

4.2.2 Methanol jako organický modifikátor mobilní fáze

Vzhledem k tomu, že všechny studované analyty jsou dobře rozpustné v methanolu, byl jako první organický modifikátor mobilní fáze zvolen methanol. Druhou složkou mobilní fáze byl 25 mM octanový pufr o pH = 4,0. V mobilních fázích o různém objemovém poměru MeOH/25 mM octanový pufr byly proměřeny nejprve samostatné vzorky 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu. Poté byla proměřena směs 1-acetyl-2,4,5,7- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu. V tabulce 2 jsou sumarizovány výsledky získané proměřením vlivu obsahu MeOH na retenci 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu při dvou různých průtokových rychlostech mobilní fáze.

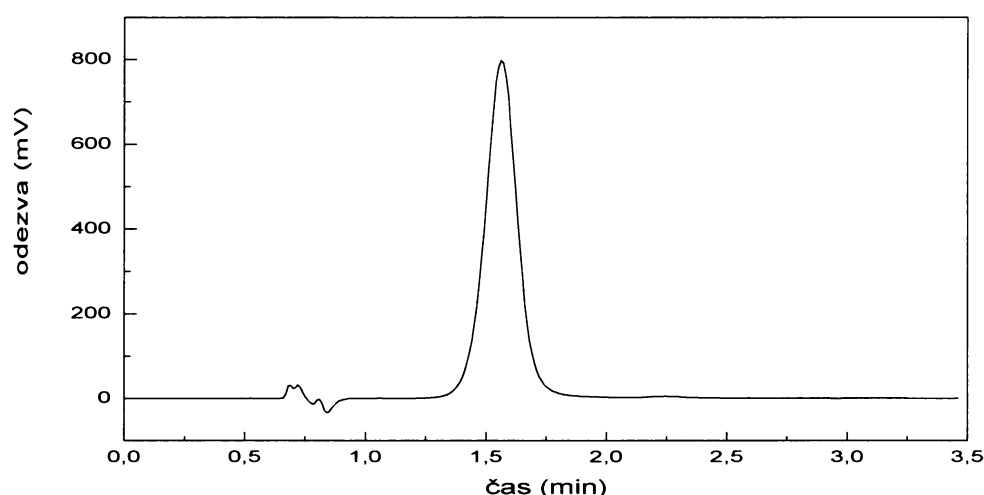
Tabulka 2. Vliv obsahu MeOH v mobilní fázi MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu ($c = 0,05$ mg/ml), UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k je retenční faktor, AS je faktor asymetrie

MeOH (%)	$F_m = 0,7$ ml/min		$F_m = 1,3$ ml/min	
	k	AS	k	AS
90	0,52	0,78	-	-
80	1,04	0,84	1,17	1,00
70	1,93	0,60	2,56	1,00
60	8,08	0,61	7,37	0,60

(- ... neměřeno)

Z tabulky 2 je vidět, že se snížením obsahu organické složky v mobilní fázi se zvyšuje retence analytu. Tento trend je patrný pro obě proměřované průtokové rychlosti. Píky jsou symetričtější při vyšším obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi.

Na obr. 2 je ukázka chromatogramu 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu při složení mobilní fáze 80/20 (v/v) MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min.



Obr. 2. Separace 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinonu při separačních podmínkách 80/20 (v/v) MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtok 1,3 ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm

Za stejných experimentálních podmínek (složení mobilních fází) jako pro 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinon, byla změřena i směs 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinonu a 1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinonu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

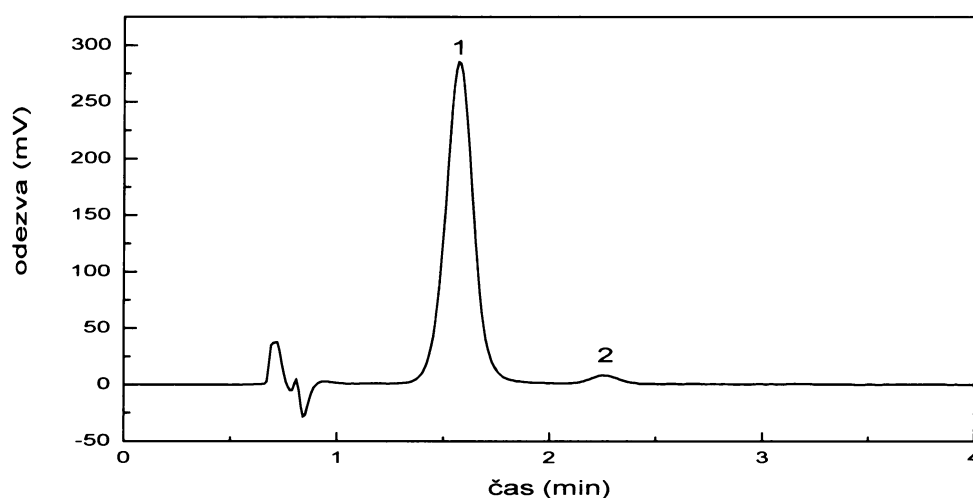
Tabulka 3. Vliv obsahu MeOH v mobilní fázi MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci směsi 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinonu a 1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinonu, UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k_1 a k_2 je retenční faktor 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinonu, respektive 1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinonu, $R_{1,2}$ je jejich vzájemné rozlišení a $\alpha_{1,2}$ je selektivita

MeOH (%)	$F_m = 0,7$ ml/min				$F_m = 1,3$ ml/min			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
90	0,52	-	-	-	-	-	-	-
80	1,10	1,91	2,56	1,74	1,21	2,17	2,76	1,80
70	2,40	4,27	4,16	1,78	2,76	4,90	3,47	1,78
60	7,17	12,71	6,10	1,77	7,53	13,59	5,55	1,79

(- ... neměřeno)

Z tabulky 3 je patrné, že 1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinon byl na koloně ve všech proměřovaných mobilních fázích podstatně déle zadržován než jeho acetylovaný

analog. Se snižujícím se obsahem MeOH v mobilní fázi docházelo v případě obou derivátů k prodlužování retence a selektivity i rozlišení mezi oběma deriváty stoupaly se snižujícím se obsahem MeOH v mobilní fázi. V žádné z výše proměřovaných mobilní fází bohužel nedošlo k eluci 1-acetyl-2,4,5,7,8-penthydroxyanthrachinonu do 120 minut. Na obr. 3 je ukázka rozdělení směsi 1-acetyl-2,4,5,7- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu změřené při složení mobilní fáze 80/20 (v/v) MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min.



Obr. 3. Separace 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (pík 1) a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu (pík 2) v mobilní fázi 80/20 ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm

Závěr:

Bylo zjištěno, že binární mobilní fáze MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 je vhodná k rozdělení směsi 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu. K velmi dobrému rozdělení ($R_{1,2} = 2,8$) dochází již ve velmi krátkém elučním čase (do 3 minut). Snižováním obsahu MeOH (průtokové rychlosti) lze snadno převést analytickou separaci do preparativního módu.

Bohužel je tato mobilní fáze nevhodná pro analýzu 1-acetyl-2,4,5,7,8-penthydroxyanthrachinonu.

4.2.3 Acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze

Protože se 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon podařilo z kolony vymýt čistým acetonitrilem, byly vyzkoušeny mobilní fáze s acetonitrilem jako organickým modifikátorem. Jako druhá složka mobilní fáze byl opět použit 25 mM octanový pufr pH 4,0. Nejprve byly proměřeny samostatně vzorky 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu.

V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky, které byly získány proměřením vlivu obsahu ACN na retenci obou acetylovaných derivátů při průtokové rychlosti $F_m = 0,7$ ml/min. V reverzním separačním módu má acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze vyšší eluční sílu než methanol, proto byl nejvyšší proměřovaný obsah ACN v mobilní fázi nižší než v případě methanolických mobilních fází (viz kap. 4.2.2).

Tabulka 4. Vliv obsahu ACN v mobilní fázi ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 na retenci 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu ($F_m = 0,7$ ml/min, koncentrace obou analytů $c = 0,05$ mg/ml), UV detekce při $\lambda = 270$ nm, kde k je retenční faktor, AS je faktor asymetrie

ACN (%)	1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-		1-acetyl-2,4,5,7-tetra-	
	k	AS	k	AS
50	0,48	0,72	1,56	1,06
30	7,90	0,61	10,91	0,56
27	15,62	1,46	18,69	0,93
26	14,98	0,47	17,90	0,60
25	17,26	0,53	19,58	0,61

(- ... neměřeno)

Z tabulky 4 je vidět, že se snižujícím se obsahem ACN v mobilní fázi se zvyšuje retence obou studovaných analytů. Při nejvyšším proměřovaném obsahu acetonitrilu docházelo k velmi rychlé eluci 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu, snížením obsahu ACN v mobilní fázi na 30 obj. % a níže došlo k podstatnému prodloužení retence obou derivátů doprovázenému zhoršením v symetrii píků.

V tabulce 5 jsou zaznamenány hodnoty retence, rozlišení a selektivity získané při separaci směsi 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu v závislosti na třech obsazích ACN v mobilní fázi. Z tabulky 4 vyplynulo, že při těchto

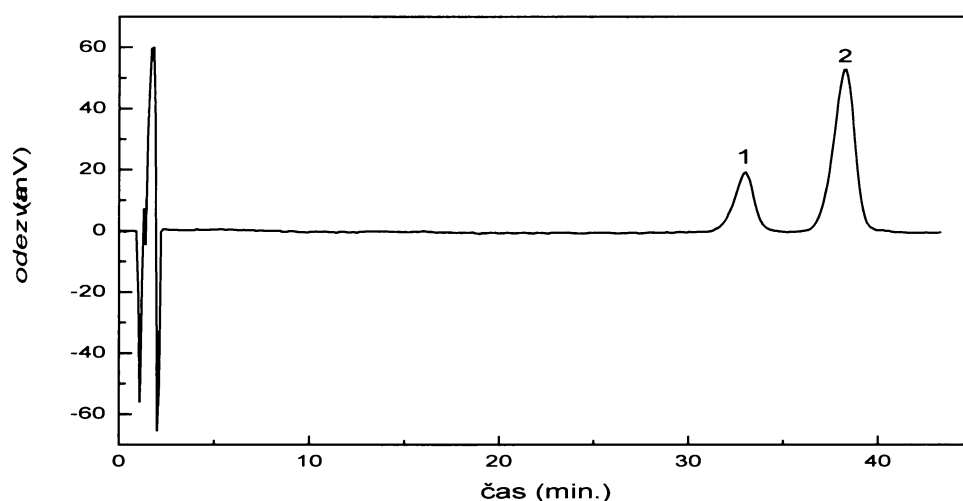
obsazích acetonitrilu v mobilní fázi (27 - 25 obj. %) by mohlo dojít k dostatečnému rozdělení obou analytů i ve směsi a následně i v reálném vzorku.

Tabulka 5. Vliv obsahu ACN v mobilní fázi ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku $F_m = 0,7$ ml/min. na retenci a rozlišení směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu, UV detekce při $\lambda = 270$ nm, kde k_1 a k_2 je retenční faktor 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-, respektive 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu, $R_{1,2}$ je jejich vzájemné rozlišení a $\alpha_{1,2}$ je selektivita

ACN (%)	$F_m = 0,7$ ml/min			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
27	10,43	12,09	2,16	1,16
26	15,20	17,64	2,42	1,16
25	16,65	19,48	2,73	1,17

Z tabulky 5 je zřejmé, že i s velmi malým snížením obsahu acetonitrilu v mobilní fázi došlo ke znatelnému zvýšení rozlišení, zatímco selektivita zůstala prakticky nezměněna. Při porovnání hodnot retenčních faktorů naměřených v identických mobilních fázích (pro jednotlivé deriváty (tabulka 4) versus deriváty ve směsi (tabulka 5)) je patrné, že ve směsi došlo ke zkrácení jejich retenčních faktorů. Tento jev není neobvyklý a bývá způsoben vzájemným ovlivňováním analytů ve směsi. Na obr. 4 je ukázka separace směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu.

Bohužel v acetonitrilových mobilních fázích se nepodařilo detekovat 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon. Vzhledem k absenci jeho standardu a vzhledem k tomu, že ve směsném vzorku s jeho acetylovaným analogem je minoritní složkou, nelze rozhodnout, zda v acetonitrilových mobilních fázích docházelo ke koeluci 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu s 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonem nebo retence 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu byla natolik vysoká, že jeho pík již nemohl být detekován.



Obr. 4. Separace směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- (pík 1) a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (pík 2) v mobilní fázi 25/75 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku mobilní fáze $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm

Závěr:

V binární mobilní fázi ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 je možné rozdělit směs 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu až na základní linii. Separace probíhá v časovém intervalu do 45 minut. Bohužel v acetonitrilové mobilní fázi nedošlo k detekci 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu.

4.2.4 Ternární mobilní fáze methanol/acetonitril/octanový pufr

Vzhledem k tomu, že 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon nebyl detekován v mobilní fázi s acetonitrilem jako organickým modifikátorem a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon neeluoval v mobilních fázích obsahujících methanol, byla vyzkoušena ternární mobilní fáze s proměnlivým obsahem MeOH a ACN. Vodnou složku mobilní fáze tvořil 25 mM octanový pufr o různých hodnotách pH (3,5 - 5,5).

Jako první byl hledán nejvhodnější objemový poměr všech tří složek mobilní fáze za přítomnosti 25 mM octanového pufru pH 4,0. Vliv složení mobilní fáze na retenci a separaci byl proměřen pro 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon, směsný vzorek

1-acetyl-2,4,5,7- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu a směs 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- s 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonem (v poměru 1:1). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6, ze které je vidět, že pokud došlo v dané fázi k vysoké retenci jednoho z analytů, další analyty (jejich směsi) již v této fázi nebyly měřeny (např. mobilní fáze s 40% MeOH a 10% ACN). Stejný princip byl aplikován i pokud jeden z analytů měl velmi krátkou retenci nebo podobnou s dalšími proměřovanými analyty.

Z tabulky 6 vyplývá, že akceptovatelných retencí a dobrého rozlišení 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (kritický pár) je dosaženo při vysokém obsahu 25 mM octanového pufru v mobilní fázi. Při zvyšujícím se obsahu MeOH v mobilní fázi se retence a rozlišení jednotlivých analytů snižují. V tabulce je tlustě vyznačena mobilní fáze, jejíž objemové poměry se jeví jako nejvhodnější. Mobilní fáze 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 poskytovala dostatečně krátkou retenci 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu, důležitou pro jeho detekci, a rozlišení téměř na základní linii směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu ($R = 1,13$).

Při tomto složení (objemových poměrech) mobilní fáze byla proměřena závislost retence směsi všech tří studovaných látek na hodnotě pH 25 mM octanového pufru v rozmezí 3,5 - 5,5 a výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Z tabulky 7 je patrné, že se vzrůstajícím pH mobilní fáze klesají retenční faktory všech studovaných látek. Rozlišení 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu se se vzrůstající hodnotou pH nejprve zvyšuje (maxima dosahuje při pH = 4,5) a pak začíná klesat. Rozlišení mezi 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonem a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonem se se stoupající hodnotou pH pufru zvyšuje.

Tabulka 6. Vliv obsahu MeOH a ACN v mobilní fázi MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,0 na retenci 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu (k_1), směsi 1-acetyl-2,4,5,7- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu (k_2 , respektive k_3) a směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (k_1 , respektive k_2); průtok mobilní fáze $F_m = 0.7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm, kde k jsou příslušné retenční faktory, R je rozlišení analytů a α je selektivita

MeOH (%)	ACN (%)	1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon		směs 1-acetyl-2,4,5,7- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu		směs 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu		$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
		k_1	k_2	k_3	$R_{2,3}$	$\alpha_{2,3}$	k_1		
40	10	24,23	-	-	-	-	-	-	-
50	10	5,70	5,59	10,01	5,25	1,79	-	-	-
60	10	3,10	3,39	5,97	4,14	1,76	-	-	-
30	20	6,56	9,32	16,30	8,29	1,75	-	-	-
40	20	3,07	3,07	5,48	5,27	1,79	-	-	-
50	20	1,17	1,23	2,31	3,62	1,88	-	-	-
60	20	0,47	0,57	1,13	2,47	1,98	-	-	-
10	30	20,20	-	-	-	-	-	-	-
14	30	-	4,48	7,88	7,24	1,76	4,08	5,03	1,25
15	30	-	5,06	8,96	7,40	1,77	3,07	3,96	1,24
20	30	2,77	3,23	5,83	5,93	1,80	2,64	3,20	1,16
30	30	1,65	2,90	4,97	4,89	1,71	-	-	-
40	30	0,99	0,91	1,75	3,51	1,92	-	-	-
5	35	2,84	2,69	4,92	7,52	1,83	2,77	3,60	1,03
10	35	2,28	2,94	5,24	6,40	1,78	2,18	2,91	1,13
15	35	1,81	2,30	4,13	5,25	1,80	1,71	2,28	1,13

(- ... neměřeno)

Tabulka 7. Vliv pH 25 mM octanového pufru v mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr na retenci a rozlišení směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu (k_1), 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (k_2) a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu (k_3); průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm

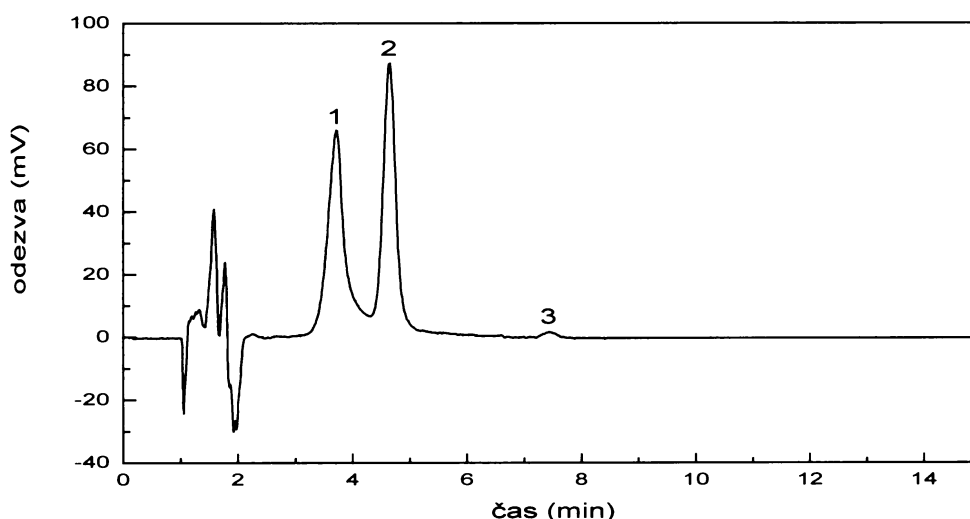
pH	k_1	k_2	k_3	$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$
3,5	3,07	3,33	5,75	0,56	6,12	1,08	1,73
4,0	1,93	2,42	4,32	0,96	5,89	1,25	1,79
4,5	1,56	2,01	3,94	1,21	6,70	1,29	1,96
5,0	1,35	1,72	3,80	0,63	7,00	1,27	2,21
5,5	0,80	1,20	3,44	0,89	7,04	1,50	2,87

Vzhledem k tomu, že při žádných doposud proměřovaných experimentálních podmínkách nedošlo k rozdělení 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu až na základní linii, byl ještě sledován vliv teploty na retenci a separaci všech tří analytů. Pro teplotní studii byla zvolena mobilní fáze 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5, ve které bylo pro směs všech tří analytů dosaženo doposud nejlepšího rozlišení kritického páru. Vliv teploty byl sledován v teplotním intervalu 10 - 38 °C. Získané výsledky jsou sumarizovány v tabulce 8.

Tabulka 8. Vliv teploty kolony na retenci a rozlišení směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu (k_1), 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (k_2) a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu (k_3) v mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5; průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm

T (°C)	k_1	k_2	k_3	$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$
10	2,11	2,84	5,65	1,67	6,82	1,35	1,99
12	2,00	2,70	5,37	1,69	6,79	1,35	1,99
14	1,87	2,54	5,00	1,68	6,10	1,36	1,97
16	1,80	2,46	4,82	1,71	6,31	1,37	1,96
18	1,69	2,30	4,51	1,70	6,32	1,36	1,96
20	1,65	2,24	4,32	1,69	6,56	1,36	1,93
22	1,55	2,13	4,12	1,67	6,27	1,37	1,93
24	1,48	2,06	3,97	1,79	6,20	1,39	1,93
26	1,40	1,96	3,77	1,77	6,06	1,40	1,92
28	1,31	1,85	3,56	1,71	5,80	1,41	1,92
30	1,30	1,77	3,38	1,44	5,75	1,36	1,91
32	1,21	1,68	3,21	1,51	5,45	1,39	1,91
34	1,13	1,60	3,06	1,51	5,66	1,42	1,91
36	1,08	1,52	2,93	1,41	5,17	1,41	1,93
38	1,01	1,44	2,75	1,32	4,66	1,43	1,91

Z tabulky 8 vyplývá, že se zvyšující se teplotou klesají retenční faktory studovaných látek ve směsi. Vzájemné rozlišení analytů 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu se se vzrůstající teplotou nejprve zvyšuje (maximum při 24 °C) a při teplotě vyšší než 24 °C jejich vzájemné rozlišení klesá. Rozlišení 1-acetyl-2,4,5,7- od 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu v rozmezí teplot 10 – 38 °C klesá. Selektivita studovaných analytů 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu s rostoucí teplotou roste, zatímco selektivita 1-acetyl-2,4,5,7- od 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu vykazuje opačný trend. Jako nejvýhodnější experimentální podmínky pro separaci všech tří studovaných derivátů se jeví mobilní fázi o složení 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5, průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min a teplotě kolony $T = 24\text{ °C}$. Na obr. 5 je uvedena separace směsi 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-, 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu za těchto podmínek.



Obr. 5. Separace 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- (pík 1), 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- (pík 2) a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu (pík 3) v mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5 a průtoku 0,7 ml/min, $T = 24\text{ °C}$, UV detekce při $\lambda = 270\text{ nm}$

Pro mobilní fázi o složení 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5, při teplotě kolony $T = 24\text{ °C}$ a průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, byla proměřena a statisticky vyhodnocena opakovatelnost separace směsi látek 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-, 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu.

Měření bylo provedeno celkem 8x a statisticky byly zpracovány retenční časy, plochy a výšky píků studovaných analytů a hodnoty jejich vzájemného rozlišení.

V tabulce 9 jsou shrnuty statisticky zpracované retenční časy, plochy a výšky píků a vzájemná rozlišení všech tří studovaných analytů (hodnota $k_8 = 0,351$ a $K_8 = 0,290$ pro výpočet směrodatné odchylky s , respektive intervalu spolehlivosti $L_{1,2}$ – převzato z tabulek ¹⁹).

Tabulka 9. Statistické vyhodnocení separace 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu (index 1), 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu (index 2) a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu (index 3) v mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr pH 4,5, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, $T = 24$ °C, kde t_R jsou retenční časy, A plochy píků, h výšky píků a R rozlišení studovaných analytů

statisticky zpracovaná veličina	průměr	s	RSD (%)	$L_{1/2}$
t_{R1}	3,706	0,004	0,095	0,003
t_{R2}	4,635	0,004	0,076	0,003
t_{R3}	7,426	0,011	0,142	0,009
A_1	1383,332	21,549	1,558	17,804
A_2	1405,391	14,018	0,997	11,581
A_3	39,417	1,071	2,718	0,885
h_1	63,695	1,115	1,751	0,922
h_2	84,930	0,926	1,091	0,765
h_3	1,970	0,067	3,385	0,055
$R_{1,2}$	1,998	0,026	1,283	0,021
$R_{2,3}$	5,952	0,135	2,271	0,112

Z tabulky 9 je vidět, že relativní směrodatná odchylka sledovaných veličin nepřesáhla u žádného ze studovaných analytů 3,5 %. Nejvyšší RSD byly vypočítány pro výšky a plochy píků, zejména pak pro minoritní metabolit 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon.

5 ZÁVĚR

Byla vypracována nová analytická HPLC metoda pro separaci 1-acetyl-2,4,5,7-tetra-, 1,3,6,8-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonů – sekundárních metabolitů produkovaných houbou *Geosmithia lavendula*.

Byly nalezeny vhodné vlnové délky pro UV detekci studovaných analytů.

Bylo zjištěno, že binární mobilní fáze MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 je vhodná pro separaci směsi 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu, bohužel v těchto methanolických mobilních fázích nedochází k eluci 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu.

Acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze byl z hlediska separace 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu podstatně výhodnější. Separace 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu s dostatečným rozlišením proběhla až při nízkém obsahu acetonitrilu jako organického modifikátoru v mobilní fázi 25/75 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Bohužel v acetonitrilových mobilních fázích nebylo možné detekovat 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon.

Vhodnou alternativou pro separaci směsi všech tří derivátů se ukázala být ternární mobilní fáze MeOH/ACN/25 mM octanový pufr s nízkými obsahy obou organických složek. V mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr byl sledován i vliv pH pufru na retenci a separaci studovaných analytů. Jako nejvýhodnější se jevila hodnota pH = 4,5. Při tomto pH byla provedena i teplotní studie v teplotním rozmezí 10 – 38 °C. Jako nejvhodnější experimentální podmínky byly vybrány - mobilní fáze o složení 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5 při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min a teplotě kolony $T = 24$ °C, při nichž došlo v rámci směsi všech tří derivátů k nejlepšímu rozdělení 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon byl ještě dobře detekovatelný.

Za optimalizovaných separačních podmínek byla provedena opakovatelnost separace směsi všech tří derivátů a pro vybrané retenční a separační charakteristiky byla určena relativní směrodatná odchylka, která pro žádný vyhodnocovaný parametr nepřesáhla 3,5 %.

6 LITERATURA

[1] Kolařík, M.: Fascinující svět podkorního hmyzu: houbové symbiózy. *Živa* **2**, 73-75 (2004).

[2] Kubátová, A.; Kolařík, M.; Prášil, K.; Novotný, D.: Bark beetles and their galleries: well-known niche for little known fungi, case of *Geosmithia*. *Czech Mycology* **55**, 1-18 (2004)

[3] Kolařík M.: *Host preference, taxonomy, diversity and host range of fungi associated with bark beetles with an emphasis on the genus Geosmithia in temperate Europe*. Disertační práce. PřF UK v Praze, Katedra botaniky 2006.

[4] Moravcová, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav chemie přírodních látek; V Praze 2006 (interní studijní pomůcka). Dostupné na URL: <<http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>> [cit. 16.4.2007]

[5] Novotná, P.: *Stanovení barviv vyskytujících se v historických textiliích metodami HPLC a CE*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 1998.

[6] Novotná, P.; Pacáková, V.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *Journal of Chromatography A* **863**, 235-241 (1999).

[7] Svobodová, E.: *Kapilární elektroforéza anthrachinonových barviv, používaných v uměleckých dílech*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 2006.

[8] Ismail, N. H.; Ali, A. M.; Aimi, N.; Kitajima, M.; Takayama, H.; Lajis, N. H.: Anthraquinones from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry* **45**:8, 1723-1725 (1997).

- [9] Cho, D. W.; Kim, S. H., Yoon, M.; Jeoung, S. Ch.: Transient Raman spectroscopic studies on the excited-state intramolecular reverse proton transfer in 1-hydroxyanthraquinone. *Chemical Physics Letters* **391**, 314-320 (2004).
- [10] Cárdenas, C.; Quesada, A. R.; Medina, M. A.: Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 3083-3089 (2006).
- [11] Kumar, M.; Rathore, D. P. S.; Singh, A. K.: Quinalizarin anchored on Amberlite XAD-2. A new matrix for solid-phase extraction of metal ions for flame atomic absorption spectrometric determination. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **370**, 377-382 (2001)
- [12] Grygar, T.; Kučková, Š.; Hradil, D.; Hradilová, D.: Electrochemical analysis of natural solid organic dyes and pigments. *Journal of Solid State Electrochemistry* **7**, 706-713 (2003).
- [13] Liou, M.-J.; Wu, P.-L.; Wu, T.-S.: Constituents of the Roots of *Rubia yunnanensis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **50** (2), 276-279 (2002).
- [14] Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Bakari, J.; Aqil, M.: Capillary Electrophoresis of Anthraquinones from *Cassia siamea*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **50** (8), 1103-1105 (2002).
- [15] Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J. G. K.; Štulík, K.: *Analytické separační metody*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze. Dotisk 1. vydání. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2005.
- [16] Zhang, H.-X.; Liu, M.-C.: Separation procedures for the pharmacologically active components of rhubarb. *Journal of Chromatography B* **812**, 175-181 (2004)

[17] Coufal, P.: *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. Dostupné na URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>> [cit. 3.4.2007]

[18] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze. První dotisk 1. vydání. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2003.

[19] *Základní praktika z analytické chemie*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, Katedra analytické chemie, 2004. Dostupné na URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~analchem/praktika.html>> [cit. 23.4.2007]

[20] Křesinová, Z.: *Studium sekundárních metabolitů houby Geosmithia Lavendula*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 2007.

[21] *Experience the performance! Purospher columns – the all-around solution for your HPLC separations*; Merck. Dostupné na URL: <http://mx.vwr.com/app/es_MX/content/homepage/pdf/folleto%20purospher.pdf> [cit. 3.4.2007].