

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



**HILIC separace acikloviru a jeho degradačního  
produktu II**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další použité zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v diplomové práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové, 15. května 2017

.....

Lenka Teplá

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení, zkušenosti, cenné rady a věnovaný čas, po celou dobu zpracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za rady k práci na experimentální části a také všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za jejich pomoc a ochotu.

# Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1. Úvod .....	8
2. Cíl práce .....	9
3. Teoretická část .....	10
3.1. Aciklovir a jeho vlastnosti.....	10
3.1.1. Vzorec a chemické vlastnosti.....	10
3.1.2. Farmakologické vlastnosti.....	11
3.1.3. Klinické údaje .....	13
3.1.4. Léčivé přípravky s aciklovirem registrované v ČR .....	15
3.1.5. Dávkování.....	16
3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	17
3.2.1. Princip HPLC .....	17
3.2.2. Kapalinový chromatograf.....	18
3.2.3. Způsoby HPLC separace .....	19
3.2.4. Stacionární fáze .....	25
3.2.5. Detekční systémy .....	32
3.2.6. Hodnocení analýzy.....	38
4. Experimentální část .....	44
4.1. Chemikálie, přístroje, pomůcky .....	44
4.1.1. Chemikálie.....	44
4.1.2. Chromatografický systém.....	44
4.1.3. Přístroje.....	44
4.1.4. Pomůcky .....	45
4.2. Obecné postupy .....	46
4.2.1. Příprava vzorků pro analýzu .....	46
4.2.2. Příprava roztoků.....	46
4.2.3. Příprava mobilní fáze.....	47
4.3. Optimalizace podmínek HPLC separace .....	49
4.3.1. Přednastavení HPLC chromatografu .....	49
4.3.2. Chromatografické podmínky.....	49
4.3.3. Vliv chromatografických podmínek na retenci ACI a GUA.....	49

5.	Výsledky a diskuze.....	52
5.1.	Vliv fluoridu amonného na retenci.....	52
5.2.	Vliv koncentrace fosforečnanového pufru na retenci .....	59
5.3.	Vliv změny poměru v mobilní fázi s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7 ..	61
5.4.	Vliv koncentrace triethylaminu na retenci.....	64
5.5.	Vliv změny teploty na retenci.....	67
5.6.	Vliv změny poměru ACN a EtOH nebo ACN a propan-2-olu v mobilní fázi .....	69
5.7.	Vliv mobilní fáze s kyselinou fosforečnou na retenci.....	75
6.	Závěr.....	77
7.	Seznam použitých zkratk.....	81
8.	Seznam obrázků.....	83
9.	Seznam tabulek .....	85
10.	Seznam grafů.....	86
11.	Seznam literatury.....	87

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Katedra:** Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Kandidát:** Lenka Teplá

**Školitel:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** HILIC separace acikloviru a jeho degradačního produktu II

V rámci diplomové práce bylo testováno retenční chování acikloviru a jeho degradačního produktu guaninu na zirkoniové koloně modifikované elementárním uhlíkem ZirChrom<sup>®</sup>-CARB s využitím hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) a byly doplněny již získané poznatky vycházející z diplomové práce Lucie Bouzkové (2016), ve které se zabývala nalezením vhodných podmínek pro separaci analytů. V této práci byl zkoumán vliv koncentrace kyseliny fosforečné, fluoridu amonného, fluoridu sodného, triethylaminu a fosforečnanových pufrů v mobilních fázích na eluci analytů. Také byl sledován vliv složení mobilních fází s různými poměry organické a vodné složky a vliv rostoucí teploty na retenci acikloviru a guaninu. Vyšší obsah organické složky v mobilní fázi vede ke zkrácení retence acikloviru i guaninu. Na separaci se podílí zadržování hydrofilních analytů ve vodné části mobilní fáze. Se stoupající teplotou klesá retence analytů a zlepšuje se symetrie jejich píků. Fluoridy a fosforečnany se v mobilní fázi chovají jako Lewisovy baze a dochází ke kompetici o vazebná místa typu Lewisovy kyseliny na povrchu zirkoniové kolony. Interakce probíhají na základě výměny ligandů. Jako Lewisova baza se také chová triethylamin. Při vyšší koncentraci triethylaminu se retence obou analytů snižuje a na mechanismu separace se podílí i uhlíková vrstva na povrchu stacionární fáze. Jednotlivé typy interakcí podle všeho závisí na podmínkách analýzy, tj. typu použitého pufru a jeho koncentraci, použité organické složce v mobilní fázi a pH.

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

**Department:** Pharmaceutical chemistry and Drug Control

**Candidate:** Lenka Teplá

**Tutor:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Title of Thesis:** HILIC separation of acyclovir and its degradation product II

The aim of this thesis is to test the retention behavior of acyclovir and its degradation product - guanine on zirconia-based column with carbon layer ZirChrom® - CARB under hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The thesis also completes the knowledge already obtained from the diploma thesis of Lucie Bouzková (2016), which deals with finding suitable conditions for the separation of analytes. The work examines the influence of the concentration of the phosphoric acid, ammonium fluoride, sodium fluoride, triethylamine and phosphate buffers in the mobile phases on the elution of the analytes. The thesis further looks into the influence of the composition of the mobile phases with different ratios of the organic and aqueous components. The effect of increasing temperature on the retention of acyclovir and guanine was also observed. A higher content of organic component in the mobile phase leads to shortening of retention of acyclovir and guanine. Separation is caused by retention of hydrophilic analytes in the aqueous phase of the mobile phase. As the temperature rises, the retention of the analytes decreases and the symmetry of their peaks is improved. The behavior of fluorides and phosphates during the mobile phase is similar to a Lewis base and they compete with Lewis acid binding sites on the surface of the zirconium column. Interactions are based on ligand exchange. Triethylamine is also behaves like the Lewis base. At a higher concentration of triethylamine the retention of both analytes decreases and the carbon layer on the surface of the stationary phase as well as are involved in the separation mechanism. The different types of interactions seem to depend on the conditions of analysis, i.e. the type of the used buffer and its concentration, the organic component used in the mobile phase and the pH.

## 1. Úvod

Aciklovir patřící do skupiny antivirotik se používá k léčbě onemocnění, která jsou vyvolána virem herpes simplex a varicella zoster. K aktivaci acikloviru na účinný trifosfát dochází ve virem napadené buňce a následně potlačuje syntézu virové DNA blokováním enzymu DNA-polymerasy. Používá se jak v lokální lékové formě, tak i v perorální nebo parenterální formě pro systémovou léčbu. Za degradační produkt acikloviru lze označit guanin. Guanin patří mezi purinové báze obsažené v nukleotidech DNA i RNA.

Důležitým prostředkem pro hodnocení bezpečnosti a účinnosti léčiv je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která se stala jednou z nejpoužívanějších metod farmaceutické analýzy. HPLC se používá nejen ve výzkumu, vývoji a výrobě léčiv, ale také slouží k identifikaci a separaci látek. Mezi hlavní výhody HPLC analýzy patří především rychlost, citlivost stanovení, malé množství analyzovaného vzorku, možnost automatizace a kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek.

V poslední době se stále častěji používají stacionární fáze na bázi kovových oxidů, především díky jejich chemické a fyzikální stabilitě a mechanické odolnosti. V průběhu analýzy je možné zvolit široký rozsah pH (1 – 14) a teplotu až 200 °C bez snížení životnosti kolony. Nejčastěji se využívají stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého, jehož povrch lze různými způsoby modifikovat, např. Zr-PBD, Zr-PS nebo Zr-C. Tyto typy kolon lze použít u různých chromatografických systémů (např. HILIC, chromatografie na reverzních fázích). Hydrofilní interakční chromatografie HILIC je stále více využívána v analýze a díky ní lze vyřešit problémy při separaci, jako např. analýza polárních a nepolárních látek.



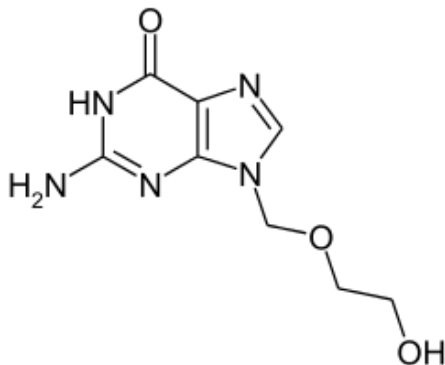
## 2. Cíl práce

Diplomová práce navazuje na práci Lucie Bouzkové <sup>(1)</sup>, která se zabývala nalezením vhodných podmínek pro separaci acikloviru a jeho degradačního produktu guaninu. Cílem mé diplomové práce bylo testování retenčního chování obou uvedených analytů na zirkoniové koloně modifikované elementárním uhlíkem ZirChrom<sup>®</sup>-CARB s využitím HILIC systému a doplnění již získaných poznatků. V této práci bude zkoumán vliv koncentrace kyseliny fosforečné, fluoridu amonného, fluoridu sodného, triethylaminu a fosforečnanových pufrů v mobilních fázích na eluci analytů. Dále bude sledován vliv složení mobilních fází při změně poměrů mezi organickou a vodnou složkou na retenci vzorků. A v neposlední řadě bude také pozorován vliv rostoucí teploty na separaci.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Aciklovir a jeho vlastnosti

##### 3.1.1. Vzorec a chemické vlastnosti



Sumární vzorec:  $C_8H_{11}N_5O_3$

Molekulová hmotnost (Mr): 225,21

Systematický název: 2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-on

Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny  $C_8H_{11}N_5O_3$ , počítáno na bezvodou látku.

##### ***Vlastnosti***

Aciklovir je guanin-nukleosidový derivát. Je to bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Těžce se rozpouští ve vodě, velmi těžce rozpustný v 96 % ethanolu a prakticky nerozpustný v heptanu. Aciklovir se také rozpouští ve zředěných roztocích minerálních kyselin a alkalických hydroxidů. Jeho bod tání je v rozmezí 256,5 – 257 °C. <sup>(2; 3)</sup>

##### ***Zkoušky totožnosti***

Infračervená absorpční spektrofotometrie

##### ***Zkoušky na čistotu***

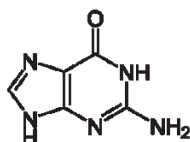
- Vzhled roztoku
- Využití kapalinové chromatografie pro zjištění příbuzných látek
- Semimikrostanovení vody
- Síranový popel
- Bakteriální endotoxiny

##### ***Stanovení obsahu***

Aciklovir – titrace s kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

### **Nečistoty**

- 2-[(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)methoxy]ethyl-acetát
- 2-amino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (guanin)



- 2-amino-7-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on
  - N-{9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl}acetamid
  - 2-[(2-acetamido-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)methoxy]ethyl-acetát
  - 2,2'-amino-1,1',7,9'-tetrahydro-7,9'-[ethylenbis(oxymethylen)]bis(6*H*-purin-6-on)
  - 9,9'-[ethylenbis(oxymethylen)]bis(2-amino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on)
  - 2,2'-(methylendiimino)bis{9-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on}
  - N-(9-acetyl-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl)acetamid; (N<sup>2</sup>,N<sup>9</sup>-diacetylguanin)
  - 2-[(2-acetamido-6-oxo-1,6-dihydro-7*H*-purin-7-yl)methoxy]ethyl-acetát
  - 2-amino-9-(2-hydroxyethyl)1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on
  - Směs 2-amino-9-{[2-(hydroxymethoxy)ethoxy]methyl}-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu a 2-amino-9-{[2-(hydroxyethoxy)methoxy]methyl}-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu
  - 9,9'-[methylenbis(oxyethylenoxymethylen)]bis(2-amino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on)
- (2)

## **3.1.2. Farmakologické vlastnosti**

### **3.1.2.1. Farmakodynamické vlastnosti**

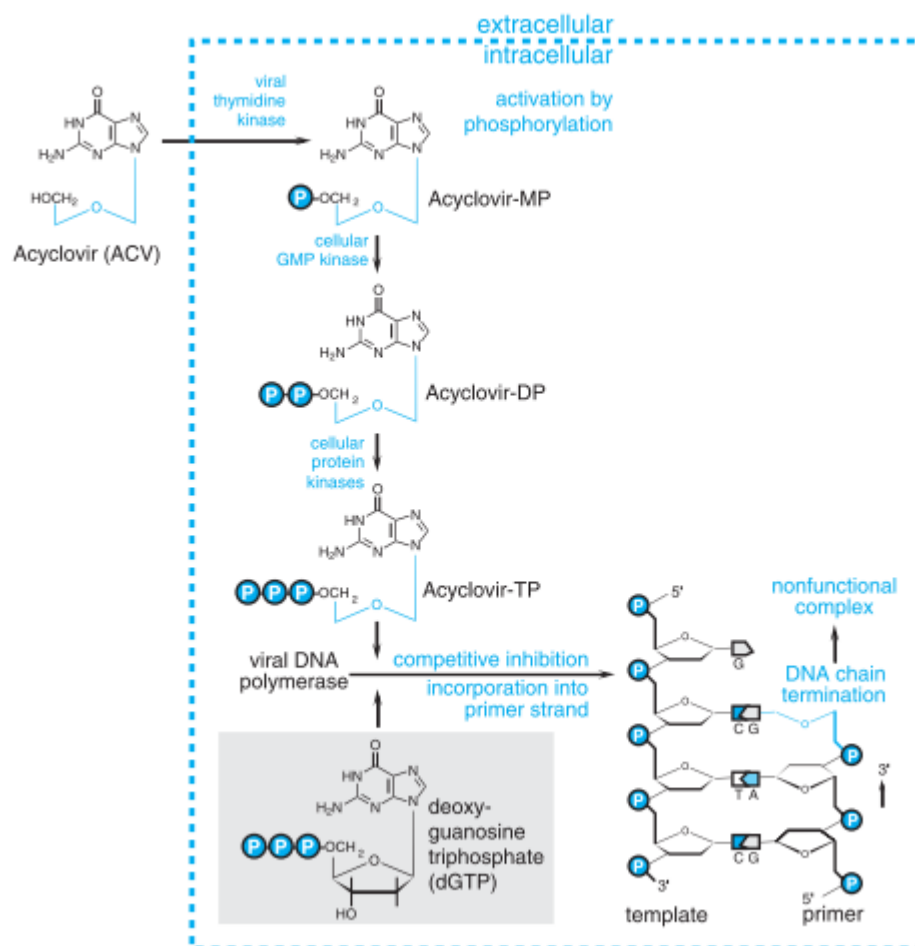
Aciklovir patří mezi látky používané proti herpetickým virům. Je to nukleosidový derivát guaninu, který je účinný proti HSV-1 (herpes simplex 1), HSV-2 (herpes simplex 2), z části také proti VZV (varicella-zoster virus), CMV (cytomegalovirus) a EBV (virus Epstein-Barrův). Aciklovir je dobře snášené virostatikum. V molekule má místo (deoxy)ribózy neobvyklý alifatický zbytek, proto je také označován jako „acykloguanosin“. (4; 5; 6)

### **Mechanismus účinku**

Aciklovir inhibuje syntézu virové DNA. Je selektivní pro buňky napadené virem. Pomocí thymidinkinázy, která je kódovaná herpetickým virem, dojde k napojení prvního

fosfátového zbytku na aciklovir. Aciklovir-monofosfát vzniká ve virem napadených buňkách, kde je buněčnými kinázami postupně přeměňován na trifosfát, což je aktivní metabolit acikloviru. Aciklovir-trifosfát se kumuluje v buňkách napadených herpetickými viry, jelikož polarita fosfátových zbytků neumožňuje molekule aciklovir-trifosfátu proniknout přes membránu. V napadených buňkách inhibuje virovou DNA polymerázu a je také začleněn do virové DNA, kde působí jako „terminátor“ řetězce DNA, čímž zastavuje replikační aktivitu z důvodu nedostatku 3'-hydroxylové skupiny. (4; 5; 6)

Rezistence vzniká jako důsledek nedostatku virové thymidinkinázy nebo jako důsledek změn ve virové DNA-polymerase. Změny u virových enzymů jsou způsobeny bodovými mutacemi, inzercí nebo deplecí v odpovídajících genech. (4; 6)



Obrázek č. 1 Aktivace a mechanismus účinku acikloviru (6)

### **3.1.2.2. Farmakokinetické vlastnosti**

Aciklovir lze podat v perorálních, lokálních nebo intravenózních lékových formách. Absorpce acikloviru z gastrointestinálního traktu je variabilní a neúplná. Po perorálním podání je lék absorbován z 15 až 30 % a se zvyšující se dávkou se rozsah absorpce snižuje. <sup>(3; 4; 6)</sup>

Aciklovir je široce distribuován do tělesných tkání a tekutin, včetně mozkomíšního moku, ledvin, plic, ale také i do mateřského mléka. Koncentrace acikloviru v likvoru jsou přibližně 50 % odpovídajících koncentrací. Aciklovir se váže na plazmatické bílkoviny pouze z 9 až 33 %, proto se lékové interakce vyvolané vytěsňováním z vazebných míst nepředpokládají. <sup>(3; 6; 7)</sup>

Eliminace acikloviru probíhá především glomerulární filtrací a tubulární sekrecí. Jeho plazmatický poločas je přibližně 2,5 hodiny u pacientů s normální funkcí ledvin a více než 20 hodin u pacientů s poruchami funkce ledvin. U pacientů s poruchami ledvin musí být dávky acikloviru sníženy. Hlavním metabolitem acikloviru je 9-karboxymetoxymetylguanin, který představuje 10 až 15 % dávky získané z moči. <sup>(3; 4; 7)</sup>

### **3.1.3. Klinické údaje**

#### **3.1.3.1. Indikace**

V perorální lékové formě se aciklovir užívá k léčbě infekcí, jejichž původcem je virus herpes simplex typu 1 a 2. Nejčastěji se jedná o infekci kůže, sliznic, ale také primární a recidivující genitální herpetické infekce. Dále je aciklovir užíván k profylaxi infekcí u imunokomprimovaných pacientů a k supresi recidivujících infekcí u imunokompetentních pacientů, k léčbě planých neštovic vyvolaných virem varicella zoster a pásového oparu, jehož původcem je virus herpes zoster. Podáním acikloviru, ve vysokých dávkách perorálně, dětem, které trpí závažnými formami planých neštovic, dojde k rychlému uzdravení, často do 24 hodin. Aciklovir je také indikován k léčbě pacientů s výrazným snížením imunitní reakce, zvláště v pokročilém onemocnění AIDS nebo u pacientů po transplantaci kostní dřeně. <sup>(3; 4; 6; 7; 8)</sup>

Studie prokázaly, že včasné zahájení léčby pásového oparu aciklovirem, má pozitivní efekt na bolest a může snížit incidenci postherpetické neuralgie. <sup>(7)</sup>

Terapie je nejúčinnější, pokud je zahájena do 48 hodin po prvních příznacích vyrážky. <sup>(3)</sup>

Aciklovir v lokální lékové formě se používá pro léčbu herpetické keratitidy, oparů na rtech a obličeji vyvolaných virem herpes simplex. Lokální formy acikloviru se používají také jako doplňková léčba ke zlepšení hojení kožních infekcí způsobených virem herpes zoster. (3; 4; 9)

U těžkých infekcí vyvolaných virem herpes simplex a herpes zoster se aciklovir podává parenterálně. Parenterální podání se také využívá k léčbě encefalitidy u imunokompetentních pacientů vyvolané virem herpes simplex. (3; 5)

### **3.1.3.2. Kontraindikace**

Léčivé přípravky obsahující aciklovir jsou kontraindikovány pouze u pacientů, kteří jsou přecitlivělí na tuto účinnou látku. (7)

### **3.1.3.3. Interakce**

Aciklovir je vylučován v nezměněném stavu tubulární sekrecí. Léčivé přípravky, které jsou podávány současně s aciklovirem a mají stejný mechanismus eliminace, mohou zvyšovat plazmatickou koncentraci acikloviru. Příkladem takových to léčiv je probenecid a cimetidin. Tato léčiva, při systémovém podávání acikloviru, zvyšují AUC (plochu pod křivkou plazmatické koncentrace) a inaktivní metabolit mykofenolát-mofetil a snižují renální clearance acikloviru. Naopak aciklovir může snížit renální clearance léků, které jsou také vylučovány tubulární sekrecí, jako je například metotrexát. Také byly provedeny studie, při kterých byl zjištěn synergistický účinek acikloviru a chlorhexidinu v inhibici syntézy virové DNA. (3; 7; 8)

### **3.1.3.4. Nežádoucí účinky**

Aciklovir je obecně dobře snášené léčivo. Přípravky v lokální nebo perorální formě jsou prakticky bez nežádoucích účinků. Občas se mohou vyskytovat bolesti hlavy a průjem, méně často únava, vyrážka, vypadávání vlasů nebo deprese. Po intravenózním podání lze očekávat výskyt nežádoucích účinků až u 3 % pacientů. Jedná se především o tromboflebitidu, neurotoxicitu (např. třes, agitace, zmatenost), psychické symptomy (např. halucinace) nebo obstrukční nefropatie (vypadávání krystalů látky v ledvinných tubulech).

Většina nežádoucích účinků je reverzibilní a jsou hlášeny u pacientů s poruchou funkce jater nebo ledvin.

Při doporučení lékaře lze aciklovir užívat i během těhotenství a kojení, neboť nebyly prokázány teratogenní ani karcinogenní účinky pro plod nebo novorozence. (3; 4; 5; 6; 10)

### 3.1.4. Léčivé přípravky s aciklovirem registrované v ČR

- **Topické**

- Aciclovir AL krém, drm crm 50 mg/g; 1 x 2g nebo 1 x 5g; ALIUD PHARMA GmbH, Německo
- Acyclostad Galmed, drm crm 50 mg/g; 1 x 20g nebo 1 x 5g; STADA Arzneimittel AG, Německo
- Herpesin krém, drm crm 50 mg/g; 1 x 2g nebo 1 x 5g; Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Česká republika
- Zovirax, oph ung 30 mg/g; 1 x 4,5g; The Wellcome Foundation Limited, Velká Británie
- Zovirax, drm crm 50 mg/g; 1 x 2g; GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o.
- Zovirax Duo 50 mg/g + 10 mg/g krém, drm crm; 1 x 2g; GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o.

- **Perorální**

- Herpesin 200, tbl nob 200 mg x 25; Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha, Česká republika
- Herpesin 400, tbl nob 400 mg x 25 nebo 400 mg x 50; Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha, Česká republika
- Provirsan, tbl nob 200 mg x 30; PRO.MED.CS Praha a.s., Česká republika
- Zovirax 200 mg, tbl nob 200 mg x 25; The Wellcome Foundation Ltd., Velká Británie
- Zovirax 400 mg, tbl nob 400 mg x 70; The Wellcome Foundation Ltd., Velká Británie
- Zovirax 800 mg, tbl nob 800 mg x 35; The Wellcome Foundation Ltd., Velká Británie

- **Intravenózní**

- Herpesin 250; plv pro přípravu infuzního roztoku; Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha, Česká republika <sup>(11)</sup>

### 3.1.5. Dávkování

Topické léčivé přípravky se nanášejí v tenké vrstvě 5krát denně po 4 hodinách s vynecháním noční dávky. Přípravky by se měly nanášet již při prvních příznacích vzniku oparu. Léčba ve většině případů trvá 5 dnů. <sup>(9)</sup>

Perorální formy léčivých přípravků jsou dostupné v silách 200 mg, 400 mg a 800 mg. Při léčbě infekcí, vyvolaných virem herpes simplex, se obvykle u dospělých pacientů podává 200 mg acikloviru 5krát denně s vynecháním noční dávky po dobu 5-ti dnů. Při léčbě infekcí vyvolaných varicella a herpes zoster je nutné podávat 800 mg acikloviru pětkrát denně opět s vynecháním noční dávky po dobu 7 dnů. U dětí se podávají dávky 20 mg acikloviru/kg tělesné hmotnosti čtyřikrát denně, ovšem jednotlivá denní dávka nesmí překročit 800 mg. <sup>(7)</sup>

Intravenózní přípravky se u dospělých pacientů, trpících infekcí vyvolanou viry herpes simplex typu I a II, většinou aplikují v dávce 5 mg/kg každých 8 hodin, po dobu 5 až 7 dní. Přípravek se podává pomalou intravenózní infuzí minimálně 1 hodinu. Léčba obvykle trvá 5 dnů, ale záleží na typu infekce a také na pacientovi. <sup>(12)</sup>



## 3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Za zakladatele chromatografie je považován rusko-italský botanik Michail Semionovič Cvet, který detailně studoval její princip. Kapalinová chromatografie se začala vyvíjet během 50. – 60. let 20. století. V roce 1952 získali vědci A.J.P. Martin a R.L.M. Synge Nobelovu cenu za objev rozdělovací chromatografie. <sup>(13; 14)</sup>

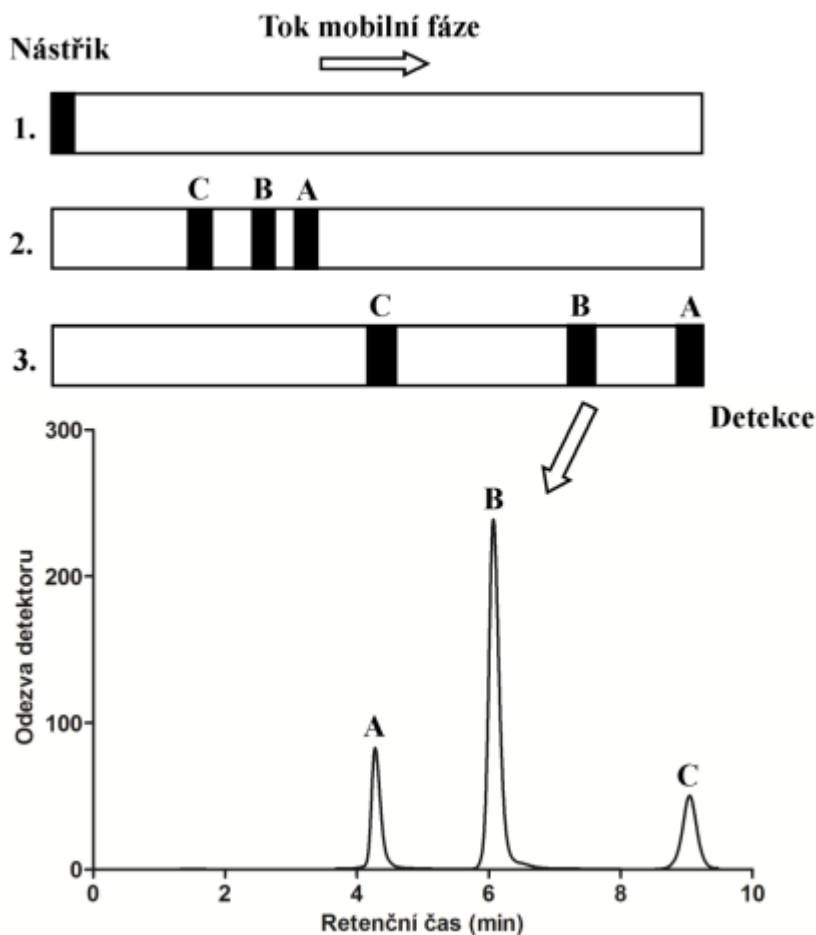
Vysokoučinná kapalinová chromatografie – *High performance liquid chromatography* (HPLC) představuje jednu z nejpoužívanějších metod farmaceutické analýzy, která se nejčastěji používá v oblastech výzkumu, vývoje i výroby léčiv. Je metodou volby při stanovení obsahu, čistoty nebo identifikaci léčiv. Využití však také nalézá i v ostatních odvětví moderního farmaceutického průmyslu, jako je např. analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu. Jedná se o separační metodu, která umožňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek.

Mezi hlavní výhody HPLC, kromě možnosti kvalitativního a kvantitativního hodnocení separovaných složek, lze zařadit rychlost analýzy, citlivost stanovení, malé množství vzorku potřebného pro analýzu a možnost automatizace. <sup>(15; 13)</sup>

### 3.2.1. Princip HPLC

Princip separace je založen na rozdílné afinitě látek k pohyblivé (mobilní) fázi a nepohyblivé (stacionární) fázi. Mobilní fáze unáší separované složky směsi a protéká stacionární fází. Stacionární fáze je zakotvena v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Složky vzorku mohou volně interagovat s oběma fázemi. Látky se slabšími interakcemi se stacionární fází jsou vymyty (eluovány) z kolony dříve. Naopak, čím je analyt na koloně zadržován silnějšími interakcemi, tím se eluce prodlužuje. Pokud se interakce jednotlivých složek směsi se stacionární fází liší, dochází k jejich eluci v různých časových intervalech. Po vymytí z kolony je analyt detekován a signál je převeden ve formě píku do chromatogramu. Plocha píku závisí na koncentraci analytu.

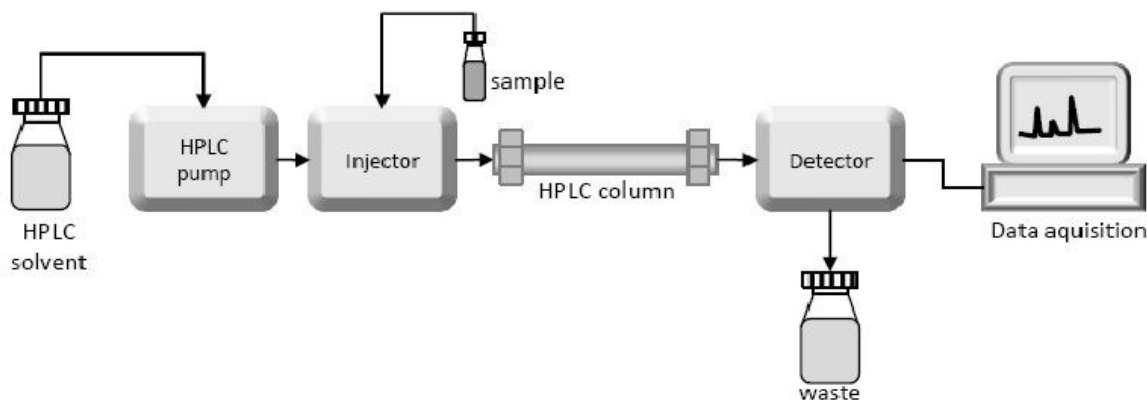
Separace a eluce jednotlivých složek směsi analytů je ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak povahou mobilní fáze. Pokud se při eluci používá mobilní fáze s konstantním složením, jedná se o isokratickou eluci. Jestliže se složení mobilní fáze během eluce mění, jedná se o eluci gradientovou. Isokratická eluce se využívá u látek, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Zatímco gradientová eluce se využívá u směsí látek, kde jednotlivé složky mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti. <sup>(13; 14; 16; 17)</sup>



Obrázek č. 2 Princip separace<sup>(13)</sup>

### 3.2.2. Kapalinový chromatograf

Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno níže na obrázku č. 3. Přístrojové vybavení HPLC zahrnuje zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, které zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze přes kolonu do detektoru. Další součástí je dávkovací zařízení, které umožňuje zavedení směsi analytů do proudu mobilní fáze ještě před vstupem do kolony. Většina dávkovacích zařízení jsou autosamplery umožňující naprogramované vstřikování vzorků v objemech od 0,1 až do 100 ml. Vzorek je dále unášen mobilní fází na kolonu. Zde dochází k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou dále unášeny mobilní fází do detektoru. Detektor zaznamenává průtok separované složky detekční celou a přenáší získaná data do počítače. Počítač zpracovává výsledky měření ve formě chromatografického záznamu a zároveň řídí celý chod chromatografu. <sup>(15; 14; 16; 18; 19)</sup>



Obrázek č. 3 Schéma kapalinového chromatografu<sup>(16)</sup>

### 3.2.3. Způsoby HPLC separace

Mezi základní typy HPLC separace patří chromatografie na normálních fázích (NP HPLC), na reverzních fázích (RP HPLC), iontově-výměnná chromatografie (IEC), molekulová vylučovací chromatografie (SEC). Jednotlivé typy separací jsou charakterizovány molekulárními interakcemi. Uplatňují se tři základní typy molekulárních sil – iontové, polární a disperzní. Polární síly jsou dominantním typem u NP HPLC, disperzní síly se využívají v RP HPLC a iontové síly v IEC. Čtvrtý typ separace HPLC, tedy SEC, je založen na rozdělování molekul podle velikosti. Nepůsobí zde žádné jiné interakce.<sup>(14)</sup>

#### 3.2.3.1. Chromatografie na normálních fázích (NP HPLC)

U tohoto typu separace se využívá polární stacionární fáze, která je nejčastěji tvořena porézním oxidem křemičitým ( $\text{SiO}_2$ ) nebo oxidem hlinitým ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Povrch těchto polárních sorbentů může být dále chemicky modifikován navázáním polárních funkčních skupin (např. kyano, diol, amino). Jako mobilní fáze se využívají nevodné směsi organických nepolárních rozpouštědel (např. hexan, heptan, chloroform) s malým přídavkem polárního rozpouštědla (např. methanol, ethanol). Mechanismus retence je založen na polárních interakcích. Retence na koloně stoupá se zvyšující se polaritou analytu a klesá s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi. Tento typ separace se používá při analýze polárních analytů, u látek snadno podléhajících hydrolyze, vysoce hydrofobních látek, izomerů, sacharidů a tuků. Postupně se od této metody upouští, její využití je už spíše minoritní.<sup>(14; 17; 20)</sup>

#### 3.2.3.2. Chromatografie na reverzních fázích (RP HPLC)

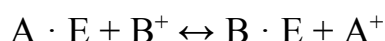
Stacionární fáze je nepolární. Většinou je tvořena silikagelem, který má modifikovaný povrch hydrofobními funkčními skupinami (např. C18, C8, fenyl). Mobilní fáze je polární

a zpravidla tvořená směsí organické a vodné složky. Z organických rozpouštědel se nejčastěji používá acetonitril, methanol nebo jejich směsi. Obě uvedené látky mají při nízkých vlnových délkách malou absorpenci, čehož se využívá v UV detekci. Vodnou složkou směsi jsou často roztoky pufrů. Důležité je, aby všechny složky mobilní fáze byly navzájem mísitelné. Mechanismus retence je založen na hydrofobních interakcích, nejčastěji na van der Waalsových silách. Méně polární analyty jsou více zadržovány na stacionární fázi, tudíž pořadí analytů při retenci je obrácené oproti předchozímu typu chromatografie. RP HPLC v současné době patří mezi nejpoužívanější separační metody. Téměř 90 % analýz nízkomolekulárních vzorků látek se provádí pomocí této HPLC separace. <sup>(14; 20)</sup>

### 3.2.3.3. *Iontově-výměnná chromatografie (IEC)*

Využívá se k separaci iontů a ionizovatelných analytů. Součástí stacionární fáze je iontová nebo ionizovatelná skupina (ionex), která nese opačný náboj než separovaný analyt. Pokud má stacionární fáze na svém povrchu záporný náboj (katex), budou se na ní zachytávat kationty analyzované látky. V opačném případě, kdy povrch stacionární fáze nese kladný náboj (anex), se na ní budou zachytávat anionty analyzované látky. Z toho vyplývá, že iontově-výměnná chromatografie je založena na elektrostatických přitažlivých silách, které vznikají mezi ionizovanými funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměniče) a opačně nabitými ionty v okolním roztoku (mobilní fáze).

Výměnu iontů lze popsat následující rovnicí:



Rovnovážná konstanta, která charakterizuje složení reakční směsi po dosažení chemické rovnováhy, je znázorněna rovnicí:

$$K = \frac{[A^+][BE]}{[AE][B^+]}$$

Čím vyšší je rovnovážná konstanta, za předpokladu, že je větší než 1, tím vyšší je schopnost kationtu  $B^+$  substituovat A na povrchu stacionární fáze.

Retence a selektivita v iontově-výměnné chromatografii závisí na pH a iontové síle mobilní fáze.

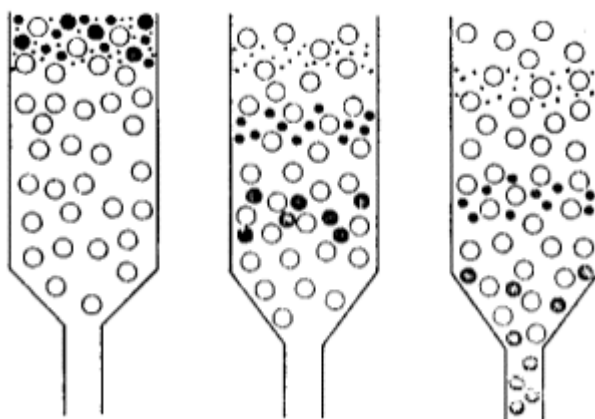
Rozlišujeme tři strukturně různé typy iontoměničů:

- Povrchově porézní s vrstvou měniče nanesenou na pórovitý nosič,
- Mikropartikulární s organickou maticí někdy také označované jako ionexové pryskyřice,
- Chemicky vázané iontoměniče na silikagelu jako maticí.

IEC se využívá pro separaci kationtů a aniontů ve vodách, separaci karboxylových kyselin ve víně, nukleových kyselin a peptidů. <sup>(14; 20; 21; 17)</sup>

#### 3.2.3.4. Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)

Princip vylučovací, nebo-li gelové chromatografie (*gel permeation chromatography*), je založen na rozdělování molekul podle jejich velikosti (přesněji podle hydrodynamického poloměru) v koloně naplněné pórovitým polymerním gelem. U tohoto typu chromatografické separace by už nemělo docházet k žádným dalším interakcím analytu se stacionární fází. Hydrodynamický poloměr molekuly analytu je hlavní faktor, který určuje zadržení molekuly na koloně. Velké molekuly nevstupují do pórů gelu vzhledem ke sterickým omezením a procházejí kolonou. Mají tedy kratší retenci. Malé molekuly pronikají do pórů gelu a na koloně jsou zadržovány. Z toho vyplývá, že malé molekuly jsou eluovány později.



Obrázek č. 4 Princip separace gelové chromatografie <sup>(22)</sup>

Velký vliv na retenci analytů mají vlastnosti pórů používaných gelů (druh polymeru, tvar, rozměry, počet, relativní objem). Používané gely můžeme rozdělit na xerogely (organické gely) a aerogely (anorganické gely). U všech gelů je uvedena vylučovací mez, tj. použitelnost příslušného gelu podle velikosti jeho pórů. Tento parametr udává nejmenší molekulovou hmotnost molekul, které již do pórů gelu nepronikají a nemohou být tedy separovány.

Mezi nejčastěji používané gely, které tvoří stacionární fázi, patří gely na bázi methakrylátů, akrylamidů, agarosové gely, dextranové gely, kopolymery styrenu a divinylbenzenu nebo se také využívá stacionární fáze na bázi silikagelu.

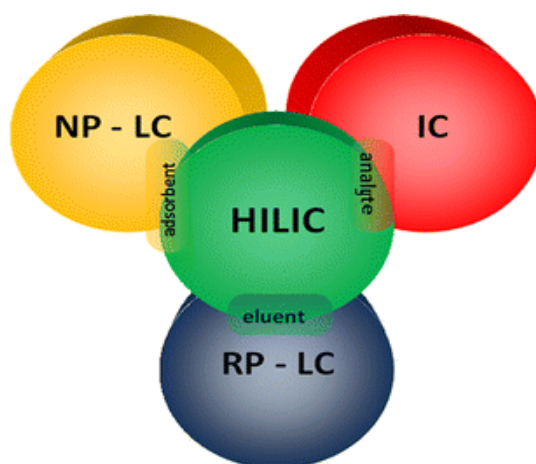
Nevýhodami SEC jsou nízká selektivita a separace, malá objemová i hmotnostní kapacita, dlouhá doba analýzy a malá účinnost separace.

Gelová chromatografie se nejčastěji využívá pro stanovení molekulové hmotnosti a distribuci velikosti molekul polymerů. <sup>(14; 19; 17)</sup>

### 3.2.3.5. *Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)*

Chromatografie hydrofilních interakcí (z ang. Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) popisuje možnost separace pro polární a hydrofilní sloučeniny. V posledních letech došlo k výraznému nárůstu zájmu o HILIC. Poprvé byla tato chromatografie představena v roce 1970. Zkratku HILIC poprvé použil Alpert v roce 1990 pro popsání chromatografické techniky, ve které analyty interagují s hydrofilní stacionární fází. Mobilní fáze je relativně hydrofobní binární směs obsahující vodnou složku jako silné eluční činidlo. <sup>(20; 21; 17; 23; 24)</sup>

Uvádí se, že HILIC je alternativou kapalinové chromatografie na normální fázi. Ovšem separační mechanismus používaný v HILIC je složitější než v NP HPLC. HILIC využívá tradiční polární stacionární fáze, jako NP HPLC. Mobilní fáze se podobají fázím, které jsou používány u chromatografie na reverzní fázi. HILIC také umožňuje analýzu nabitých látek, čímž se podobá i iontové chromatografii. <sup>(21; 23; 25)</sup>



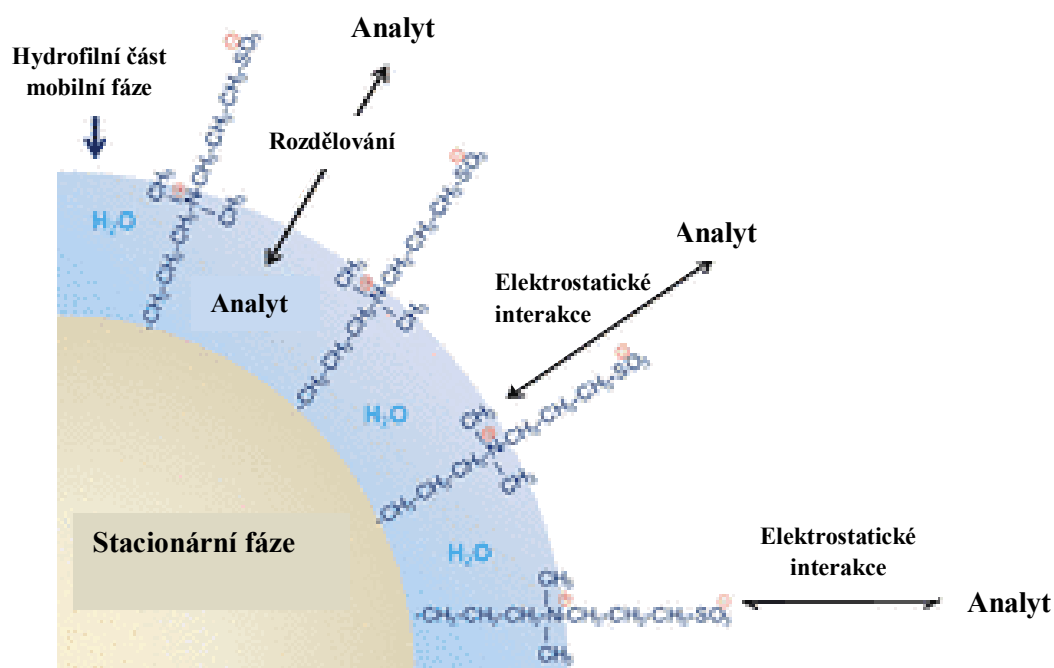
Obrázek č. 5 HILIC kombinuje vlastnosti chromatografických metod <sup>(23)</sup>

Tato metoda má oproti běžným NP HPLC a RP HPLC mnoho specifických výhod. Například je to vhodná chromatografie pro analýzu směsí látek, které se eluují v blízkosti

mrtvého retenčního času. Polární látky se dobře rozpouštějí ve vodné mobilní fázi používané v HILIC chromatografii, tím snadno nahradí chromatografii na normálních fázích, kde je problém s rozpustností polárních analytů v nepolárních mobilních fázích. Hydrofilní interakční chromatografie se také využívá pro vysoce hydrofilní a amfifilní sloučeniny, které jsou příliš polární pro separaci v RP HPLC a nemají dostatečný náboj pro IEC. Další výhodou je možnost použití vyšších průtoků mobilní fáze, díky vysokému obsahu organické složky mobilní fáze, a tím nižšímu zpětnému tlaku v systému. Také je to vhodná metoda pro spojení s ionizací elektrosprejem díky mobilním fázím s vysokým obsahem ACN. (17; 23)

### ***Mechanismus retence***

Princip separace stále není plně objasněn. Mechanismus HILIC separace je považován za komplexní. Zahrnuje iontové interakce, hydrofobní interakce, vodíkové vazby, adsorpce a rozdělování analytu mezi tenkou vrstvou vody na povrchu stacionární fáze a fází mobilní. Na polárních centrech stacionární fáze dochází k přednostní adsorpci vody a vzniká difuzní vrstva s gradientem koncentrace vody směrem do mobilní fáze. Stacionární fáze se chová jako „přenašeč“ vody, ovšem i tento mechanismus má výjimky, které nejsou dostatečně prostudované. Se zvyšující se polaritou analytu nebo stacionární fáze obvykle stoupá retence. (20; 21; 17; 23; 26)



Obrázek č. 6 Princip hydrofilní interakční chromatografie. Stacionární fáze patří mezi zwitteriontové stacionární fáze (27)

### ***Stacionární fáze pro HILIC***

Stacionární fáze používané v HILIC chromatografii můžeme rozdělit do tří následujících skupin: **neutrální** – bez elektrostatických interakcí (např. diol, amid), **nabitě** – silné elektrostatické interakce (např. aminopropyl silikagel) a třetí skupinou jsou **zwitterionty** – slabé elektrostatické interakce (např. ZIC-HILIC). Typickou stacionární fází je čistý nebo modifikovaný silikagel s polárními funkčními skupinami. Nejčastěji se pro modifikaci stacionární fáze používá diolová, amidová, aminová nebo aminopropylová funkční skupina. Pro chirální HILIC separaci se využívá stacionární fáze tvořená silikagelem s navázanou cyklodextrinovou skupinou. Další využívanou stacionární fází jsou sulfobetainy patřící mezi zwitterionty. Na povrchu těchto stacionárních fází jsou jak silně kyselé skupiny (sulfonové kyseliny), tak i silně zásadité kvartérní amoniové skupiny, vzájemně odděleny krátkým alkylovým řetězcem. Kyselé a zásadité skupiny jsou přítomné na povrchu stacionární fáze v poměru 1 : 1. Tyto skupiny jsou schopny adsorbovat vodu pomocí vodíkových vazeb a vytvořit tak objemnou vrstvu vody, která je součástí povrchu stacionární fáze, která řídí retenci. Zwitteriontové kolony jsou dostupné pod obchodními názvy ZIC-HILIC (silikagelový nosič) a ZIC-pHILIC (polymerní nosič). Také se můžeme setkat se stacionárními fázemi na bázi kovových oxidů (zirkoničitý a titaničitý), které vykazují vyšší tepelnou stabilitu a širší rozsah pH než stacionární fáze na bázi silikagelu. (17; 23; 25; 28)

### ***Mobilní fáze pro HILIC separaci***

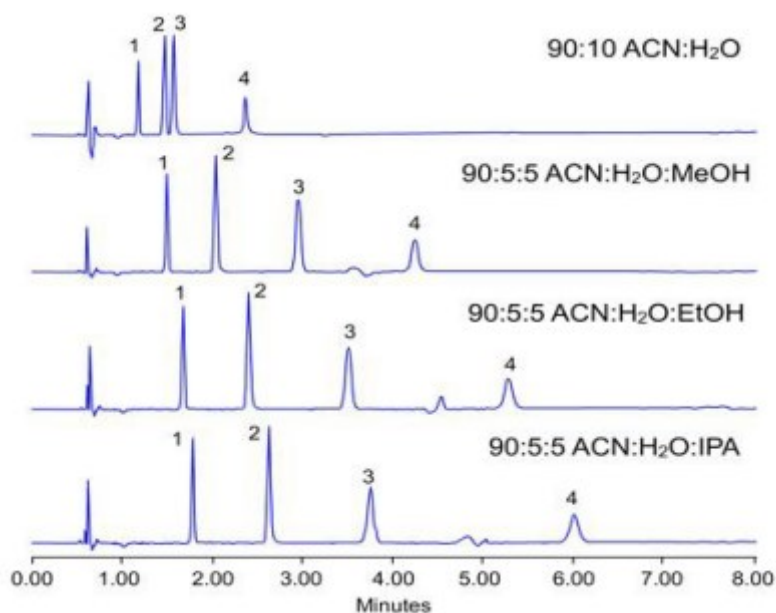
Pro mobilní fázi jsou typická vodou mísitelná polární organická rozpouštědla. Pro výběr vhodného organického rozpouštědla lze využít eluotropní řadu rozpouštědel. Výběr organického rozpouštědla má významný vliv na retenci při HILIC separaci. Nejvíce se používá acetonitril s malým množstvím vody nebo těkavého pufru. Obsah vodné složky musí být alespoň 2,5 %. Ostatní rozpouštědla jsou využívána spíše ke změně selektivity systému. (17; 23)

### ***Selektivita HILIC separace***

Selektivita separace závisí na složení jak stacionární, tak i mobilní fáze. Voda je důležitý eluent v HILIC separaci, a i malé zvýšení koncentrace vody v mobilní fázi vede k výraznému snížení retence. V některých případech lze vodu částečně nebo úplně nahradit jiným polárním rozpouštědlem, nejčastěji alkoholem. Nejčastěji se používá methanol, ethanol nebo propan-2-ol. Dále na účinnost separace má vliv použité rozpouštědlo vzorku. Pokud je



vzorek rozpuštěn v rozpouštědle s vysokým obsahem vody, dochází ke snížení retence, k distorzi nebo štěpení píku. Rozpouštědlo by mělo být stejné nebo alespoň obdobné jako je mobilní fáze používaná pro separaci. Tvar chromatografického píku ovlivňuje též dávkovaný objem. Při HILIC separaci je důležité dávkovat do HPLC systému co nejmenší objemy vzorku. Velké objemy způsobí rozmývání chromatografických píků, což snižuje separační účinnost systému. <sup>(17; 24)</sup>



Obrázek č. 7 Ovlivnění selektivity HILIC separace změnou mobilní fáze <sup>(17)</sup>

### ***Aplikace metody HILIC***

V poslední době se zájem o metodu HILIC značně zvýšil, protože díky ní lze vyřešit problémy při vývoji analytické metody, jako je nedostatečná selektivita metody, matricové efekty nebo analýza polárních a nepolárních látek. HILIC separaci lze snadno kombinovat s některými detektory, např. fluorescenční, spektrofotometrické, refraktometrické nebo hmotnostně spektrometrické detektory. Tuto metodu lze využít k analýze malých polárních molekul, včetně biomarkerů, aminokyselin, nukleotidů, peptidů, sacharidů, alkaloidů a dalších látek. <sup>(17; 23)</sup>

#### **3.2.4. Stacionární fáze**

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou HPLC systému. Tato fáze je náplní chromatografické kolony, kde dochází k separačnímu procesu. Stacionární fázi tvoří buď pevná látka, nebo film kapaliny chemicky navázaný na tuhou matici. Stacionární fáze je možné rozdělit podle různých faktorů. Nejstarší rozdělení je podle skupenství fáze, tedy na

kapalné a tuhé. Ovšem toto dělení je již zastaralé a v dnešní době se už nevyužívá. Dále můžeme fáze dělit podle polariry na polární, nepolární a amfoterní (zwitterionty). Dalším typem členění stacionárních fází je podle chromatografického módu, který je použit pro separaci, na NP HPLC, RP HPLC, IEC, HILIC, fáze pro SEC, afinitní nebo chirální. Nejúčinnější rozdělení stacionárních fází je podle jejich chemického složení. Takto lze fáze rozdělit na anorganické oxidy (např. silikagel, oxid zirkoničitý a titaničitý), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní, stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku.

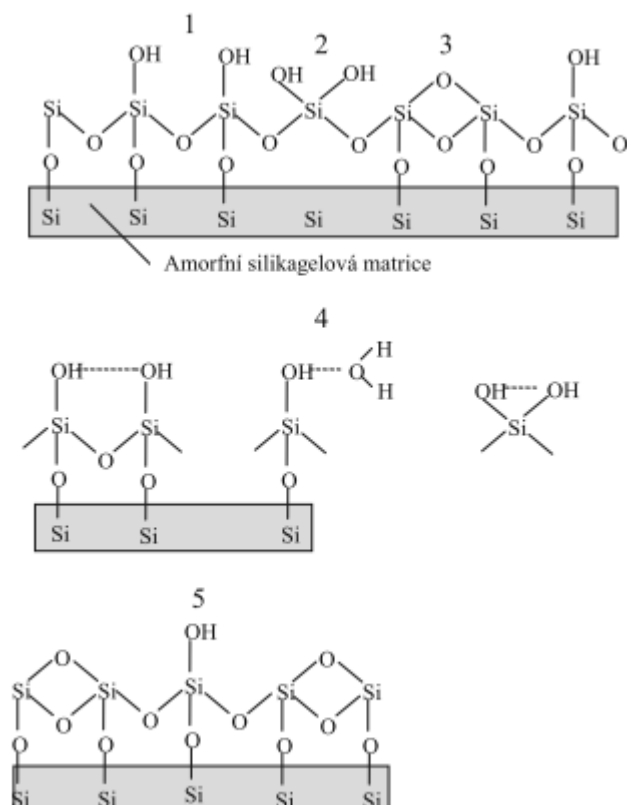
Je důležité, aby stacionární fáze byly chemicky i tepelně stabilní, nereagovaly s mobilní fází a ani se v ní nerozpouštěly. Vymývání stacionární fáze je nejčastěji způsobeno použitím nevhodné mobilní fáze nebo vysoké teploty.

Specifické vlastnosti částicových stacionárních fází jsou důležité pro správnou analýzu. Mezi tyto vlastnosti patří: průměrná velikost částic  $d_p$  [ $\mu\text{m}$ ], distribuce velikosti částic (disperzita  $d_p^{\text{max}}/d_p^{\text{min}}$ ), tvar částic (pravidelné, nepravidelné), měrný objem pórů (*pore volume*) [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ], relativní objem pórů [objemová %], měrný (specifický) povrch (*surface area*) [ $\text{m}^2/\text{g}$ ] a průměrná hodnota velikosti pórů (*pore size*) [nm].<sup>(14; 17)</sup>

#### **3.2.4.1. Silikagel**

Silikagel ( $\text{SiO}_2$ ) je jedním z nejrozšířenějších polárních anorganických sorbentů používaných při HPLC separacích jako stacionární fáze. Díky svým vlastnostem je považován za ideální nosič. Jeho vysoká mechanická odolnost umožňuje použití silikagelu v analýze HPLC, která se provádí za vysokého tlaku. Jednou z výhod silikagelu je také to, že se nerozpouští ani nebobtná v přítomnosti organických rozpouštědel. Mezi další přednosti patří i dobře známé parametry jeho povrchu, možnosti modifikace povrchu a v neposlední řadě také množství výrobců na trhu.

Na povrchu silikagelu tvoří aktivní centra nerovnoměrně rozmístěné hydroxylové skupiny, respektive silanolové skupiny Si-OH. Existuje několik rozdílných typů silanolových skupin, které vykazují různou kyselost. Rozmístění silanolových skupin na povrchu silikagelu závisí na způsobu zpracování silikagelu. Na povrchu silikagelu rozlišujeme silanolové skupiny izolované, vicinální, geminální nebo při vhodné poloze jsou sousední skupiny vzájemně vázány vodíkovými vazbami.



Obrázek č. 8 Silanolové skupiny na povrchu silikagelu. (1) vicinální silanolové skupiny, (2) geminální silanolové skupiny, (3) siloxanové skupiny, (4) asociované silanolové skupiny, (5) izolovaná silanolová skupina <sup>(29)</sup>

Povrch silikagelu je slabě kyselý, proto zadržuje více bazické látky než látky kyselé a neutrální. Při použití mobilní fáze s obsahem pufru může docházet k iontové výměně. Tento proces závisí na pH mobilní fáze. Dalším nežádoucím jevem, který může nastat, je chvostování píků. Tento efekt se především projevuje při dělení bazických látek, které mohou být protonizovány a následně zadržovány na deprotonovaných silanolech elektrostatickou interakcí. Můžeme tomu zabránit přidáním slabé organické báze, většinou se využívá trimethylamin, do mobilní fáze. Je důležité, aby pH mobilní fáze nebylo vyšší než 8, jinak dochází k rozpouštění silikagelu a následnému snížení separační účinnosti. <sup>(14; 21; 17; 29; 30)</sup>

Silikagel může být vyroben dvěma postupy. Prvním z nich je gelace roztoků křemičitanů, kdy vzniká Sil-gel, a druhým výrobním postupem, při kterém dochází ke shlukování částic solu oxidu křemičitého při pyrolýze organokřemičitých látek, vzniká Sol-gel. Podle technologie výroby rozlišujeme silikagely typu A, B a C. Vzájemně se typy silikagelu liší svými vlastnostmi. Silikagel typu A se vyznačuje menší pórovitostí a pravidelným uspořádáním pórů, je mechanicky stabilní a pomaleji se rozpouští v alkalickém

prostředí. Pro silikagel typu B je charakteristická vyšší pórovitost, nepravidelné tvary pórů a vykazuje menší stabilitu než silikagel typu A. Třetím typem silikagelu je typ C nebo-li hydrosilovaný silikagel. Tento silikagel má na svém povrchu skupiny Si-H a je pro něho typická menší polarita povrchu, vykazuje extrémně nízkou aktivitu silanolových skupin, vyšší teplotní stabilitu, vyznačuje se vysokou mechanickou odolností a je stabilní v širokém rozmezí pH. (17; 25)

#### **3.2.4.2. Stacionární fáze na bázi kovových oxidů**

Kvůli nedostatečné chemické odolnosti silikagelu v alkalickém prostředí byly hledány jiné chemicky odolnější materiály, které by se daly použít pro přípravu stacionární fáze. V HPLC se používají tři typy oxidů, a to oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý. Uvedené oxidy jsou stabilní v silně alkalickém prostředí i při zvýšené teplotě. Tyto oxidy mají amfoterní charakter a jsou schopny v závislosti na pH mobilní fáze vystupovat jako měniče kationtů nebo aniontů. (17; 28; 29; 31)

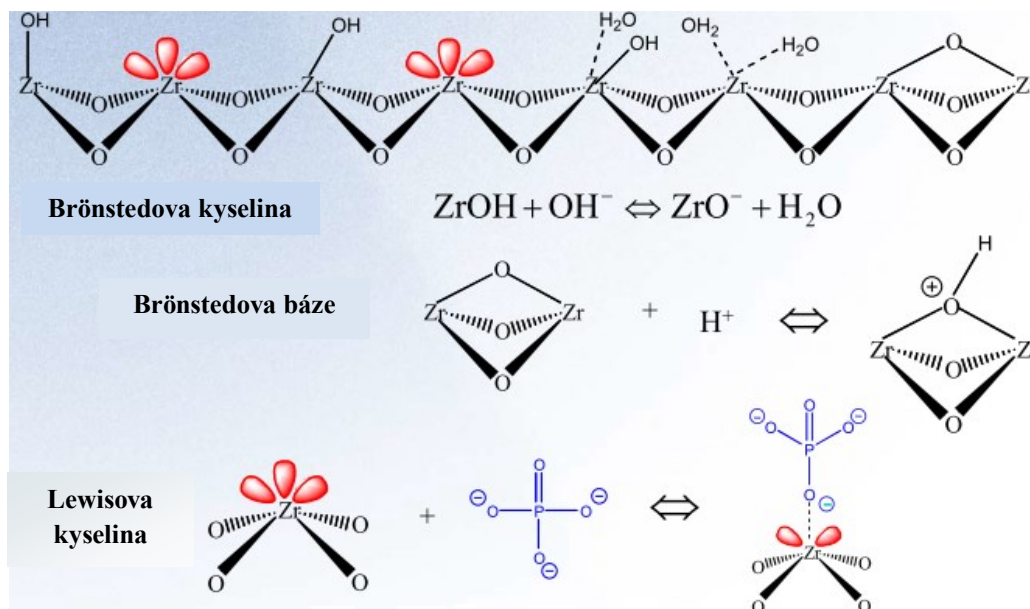
##### ***Oxid hlinitý***

Oxid hlinitý je krystalický polární anorganický sorbent. Hydroxylové skupiny na jeho povrchu se aktivují zahřátím na teplotu 200 °C. Pokud by teplota při zahřívání překročila 900 °C, oxid hlinitý ztratí svoji aktivitu. Komerčně dodávaný oxid hlinitý jako sorbent pro HPLC je aktivován při teplotě mezi 500 a 800 °C a převažuje pak struktura  $\gamma$ -oxidu hlinitého (spinelová struktura). Na povrchu oxidu hlinitého jsou také centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi, díky kterým interagují s molekulami bohatými na elektrony (Lewisovy báze). Oxid hlinitý lze tedy použít pro separaci látek, které se liší rozložením elektronů (polykondenzované aromáty s  $\pi$ -elektronovým systémem), dále pro separaci nasycených a nenasycených alifatických uhlovodíků nebo polyaromatických uhlovodíků. Oxid hlinitý je však používán méně, neboť na jeho povrchu dochází ke katalytickému štěpení a k rozkladu chromatografických látek. V současné době se oxid hlinitý jako stacionární fáze v HPLC téměř nepoužívá. (21; 17)

##### ***Oxid zirkoničitý***

Hlavní výhody stacionární fáze na bázi oxidu zirkonia jsou jeho chemická, tepelná a mechanická stabilita. Je stabilní v celém rozsahu pH (1 – 14), při vysokém tlaku a při teplotách, které dosahují až 200 °C. Oxid zirkoničitý má amfoterní charakter a v závislosti na pH prostředí se může chovat jako kationt nebo aniont. Na svém povrchu má kromě

hydroxylových skupin také adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin (viz obrázek níže). Jejich přítomnost vyžaduje přidání pufru do mobilní fáze, která minimalizuje interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými nebo karboxylovými skupinami v molekule analytu. O typu interakcí rozhodují vlastnosti analyzované látky, pH, typ pufru, celková iontová síla a koncentrace organického modifikátoru.



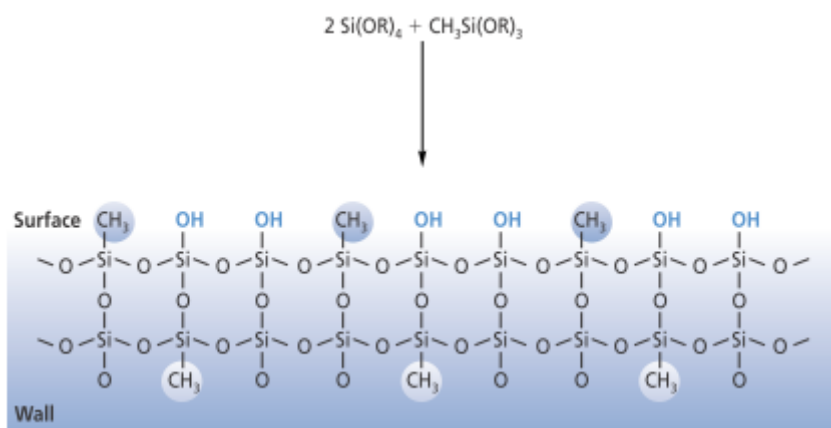
Obrázek č. 9 Typy skupin na povrchu zirkoniové stacionární fáze, Brønstedova kyselina, Brønstedova báze, Lewisova kyselina <sup>(32)</sup>

Nemodifikovaný oxid zirkoničitý lze použít v chromatografii s normálními fázemi. Ovšem častěji se používá v HILIC nebo v chromatografii s reverzními fázemi. Povrch oxidu zirkoničitého je často modifikován, a to nejčastěji tenkou vrstvou polybutadienu, polystyrenu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku, který lze případně ještě modifikovat ligandem C<sub>18</sub>. <sup>(17; 28; 30; 31; 33)</sup>

V experimentální části byla pro analýzu použita kolona ZrO<sub>2</sub> potažená vrstvou uhlíku od výrobce ZirChrom<sup>®</sup> - CARB. Oxid zirkoničitý může být zahříván až na 700 °C, aniž by došlo ke změně struktury pórů. Při výrobě je možné docílit až 97 % pokrytí povrchu ZrO<sub>2</sub>. Oxid kovu potažený vrstvou uhlíku (Zr – C) vykazuje několik vhodných vlastností, jako jsou vysoká chemická odolnost při nízkých i vysokých hodnotách pH, mechanická stabilita, odlišná a užitečná selektivita. Zr – C je v porovnání s alkylovými stacionárními fázemi mnohem selektivnější pro separace polárních a nepolárních geometrických izomerů nebo diastereomerů, je hydrofóbnější a má schopnost zadržovat molekuly analytu také pomocí elektronových π-interakcí. <sup>(33; 34; 35; 36)</sup>

### 3.2.4.3. Hybridní stacionární fáze

Základ hybridních stacionárních fází tvoří kombinace anorganického silikagelu a organického organosilanu. Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze spojují výhodné vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a mechanickou odolnost, s dobrými vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. chemickou a teplotní stabilitou, eliminací zbytkových silanolových skupin. Firma Waters jako první uvedla na trh první generaci hybridních sorbentů X-Terra. Pro přípravu těchto fází byla použita reakce tetraethoxysilanu s methyltriethoxysilanem ve vzájemném poměru 2 : 1. Vzniklé hybridní částice obsahují methylsiloxanové jednotky jak uvnitř matrice sorbentu, tak i na povrchu, viz obrázek 10. Chvostování bazických látek na hybridních fázích je výrazně omezeno a symetrie píků je mnohem lepší. Hybridní fáze vykazují také vysokou stabilitu v širokém rozmezí pH, a to od 1 – 12. (14; 17; 37)



Obrázek č. 10 Struktura hybridní anorganicko-organické částice sorbentu (37)

Druhá generace hybridních sorbentů je připravována reakcí tetraethoxysilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem. Ve srovnání se sorbenty X-Terra se podařilo ještě zvýšit chemickou odolnost a separační účinnost. (17; 37)

### 3.2.4.4. Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze vykazují dobrou stabilitu v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách, jsou kompatibilní s běžnými organickými rozpouštědly, které se používají pro aplikaci na reverzích fázích. Jejich použití je však omezeno maximálním pracovním tlakem na koloně, a to 20 MPa. Nejčastěji se využívá zesíťovaný polystyren, substituované methakryláty a polyvinylalkoholy, které umožňují snadnou modifikaci povrchu. (14; 20; 17)

Nejpoužívanější polymerní stacionární fáze je tvořena kopolymerem polystyrenu a divinylbenzenu (PS-DVB). PS-DVB v porovnání s chemicky vázanou fází C18 vykazuje vyšší retenci, díky specifickým interakcím analytu s  $\pi$ -elektrony stacionární fáze. PS-DVB fáze je stabilní v celém rozsahu pH, pokud se PS-DVB neváže na silikagelový nosič. Retenční chování PS-DVB fáze mimo jiné také závisí na použité mobilní fázi. Změny v retenci mohou být způsobeny stíněním aktivních míst na povrchu sorbentu molekulami mobilní fáze nebo bobtnáním polymeru. Polymerní sorbenty se využívají při analýze proteinů, glykoproteinů a peptidů. <sup>(14; 17)</sup>

Polymerem pokryté stacionární fáze se skládají z anorganického substrátu, tj. silikagelu, oxidu hlinitého nebo zirkoničitého, na kterém je nanášena vrstva polymeru pomocí katalýzy  $\gamma$ -záření nebo zvýšením teploty. Tyto stacionární fáze mají dobrou mechanickou odolnost, díky anorganickému základu, chemickou stabilitu a vyšší selektivitu, díky polymeru. Pro pokrytí anorganického nosiče se nejčastěji používají polysiloxany a polyethery. <sup>(17)</sup>

### 3.2.5. Detekční systémy

Detektory v HPLC systému zaznamenávají rozdíly mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Fungují jako převodníky, které převádějí fyzikální nebo chemické vlastnosti analyzované látky na elektrický signál. V současné době jsou nejčastěji používány koncentrační detektory, které lze rozdělit na selektivní a univerzální. Selektivní detektory zaznamenávají pouze vlastnosti analyzované látky, zatímco univerzální detektory zaznamenávají vlastnosti jak analyzované látky, tak i mobilní fáze. Ideální detektor by měl mít následující vlastnosti:

- Možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost)
- Široký dynamický lineární rozsah (rozsah koncentrací, ve kterém je odezva úměrná koncentraci analytu)
- Nízký příspěvek k mimokolonovému rozmývání elučních zón
- Schopnost poskytnout vysoce citlivou a reprodukovatelnou odezvu, která není závislá na teplotě, průtoku ani složení mobilní fáze
- Kvalitní informace pro detekované píky
- Umožnění gradientové eluce
- Spolehlivost a snadnost použití

V praxi samozřejmě takový detektor neexistuje. Jednotlivé typy detektorů se některým požadavkům alespoň víceméně přibližují. Využití jednotlivých HPLC detektorů závisí na principu detekce, citlivosti a dalších vlastnostech popsaných výše. V dnešní době se nejvíce využívají následující tři detekční techniky a to hmotnostní, UV-VIS a fluorescenční. <sup>(14; 21; 17; 38)</sup>

#### 3.2.5.1. Spektrofotometrické detektory

Princip spektrofotometrických detektorů spočívá v absorpci záření v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Tento typ detektoru poskytuje poměrně citlivou a robustní odezvu pro látky, které mají ve své molekule chromofor. Při kvantitativní analýze je pro vyhodnocení využíván Lambert-Beerův zákon, který popisuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy ( $l$ ), koncentrací absorbující složky ( $c$ ) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřené jako absorbance ( $A$ ). Lambert-Beerův zákon je vyjádřen v následující rovnici,

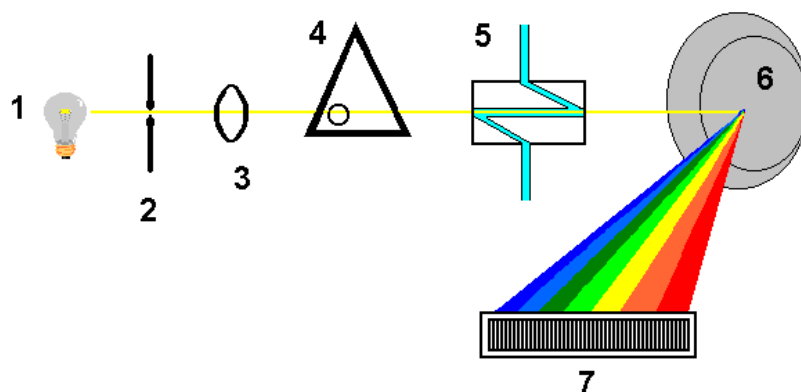
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$



kde  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient, který je charakteristický pro každou látku. Z rovnice vyplývá, že se změnou délky absorpční vrstvy a se změnou koncentrace se mění i absorbance. Platnost tohoto zákona je omezená odchylkami, a to pravými a zdánlivými, jelikož Lambert-Beerův zákon nezahrnuje vliv teploty, vlnové délky a rozpouštědla na hodnotu absorbance. Právě odchylky se vyskytnou, pokud se změní chemická rovnováha v roztoku na základě měnící se koncentrace (iontová nebo molekulová interakce, disociace, tvorba komplexů, hydrolyza, dimerace či polymerace). Zdánlivé odchylky mají fyzikální charakter, vznikají především jako důsledek nedostačující monochromatickosti záření. (15; 14; 21; 17; 38)

Pro UV oblast (200 – 400 nm) se jako zdroj záření využívá deuteriová lampa, zatímco ve viditelné oblasti se používá lampa wolframová. K získání monochromatického záření dané vlnové délky slouží monochromátor. Spektrofotometrické detektory lze na základě konstrukčního uspořádání rozdělit na čtyři typy.

- 1) Detektory s fixní vlnovou délkou jsou nejstarší a konstrukčně nejjednodušší typy. Jako zdroj záření využívají nízkotlakou rtuťovou výbojku. Tento typ detektoru umožňuje detekci látek při vlnové délce 254 nm.
- 2) Detektory s měnitelnou vlnovou délkou. Vlnové délky jsou již předem dané.
- 3) Detektory s programovatelnou vlnovou délkou patří mezi nejpoužívanější typy. Vlnovou délku můžeme nastavit v rozmezí od 190 do 700 nm tak, aby byla dosažena maximální citlivost. U tohoto typu detektoru můžeme měnit vlnovou délku i v průběhu analýzy, což umožňuje detekovat jednotlivé píky při různých vlnových délkách.
- 4) Detektory s diodovým polem (*photodiode-array, PDA; diode-array detector, DAD*). Jedná se o konstrukčně nejsložitější typ detektoru. V průběhu analýzy umožňují zaznamenávat celé spektrum v daném rozmezí a jsou schopny vybrat vhodnou vlnovou délku pro každý separovaný analyt zvlášť a získat jejich UV spektrum. Záření ze zdroje projde měrnou celou detektoru a následně je spektrálně rozkládáno pomocí holografické mřížky. Na každou fotodiodu dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru.



Obrázek č. 11 Schéma detektoru s diodovým polem. (1) deuteriová výbojka, (2) štěrba, (3) čočka, (4) clona, (5) průtoková Z-cela detektoru, (6) konkávní holografická mřížka, (7) diodové pole.<sup>(21)</sup>

Jednotlivé fotodiody jsou spojeny s předem nabitým kondenzátorem. Fotelektrický proud vznikající po dopadu záření na diodu vybije kondenzátor. V další fázi jsou kondenzátory nabity proudem, jeho velikost je zaznamenávána a ukládána do paměti řídicí jednotky. Sekvence vybíjení a nabíjení se velmi rychle opakuje. Při každé vlnové délce v každém okamžiku jsou zaznamenávány údaje o absorpci. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod (512 až 1024 diod).

PDA detektory jsou schopny analyzovat látky při různých vlnových délkách. Pomocí řídicí jednotky je možné porovnat snímaná spektra s knihovnou spekter a dále dokáží vyhodnotit, jestli se v píku eluuje jedna látka nebo směs nerozdělených analytů.

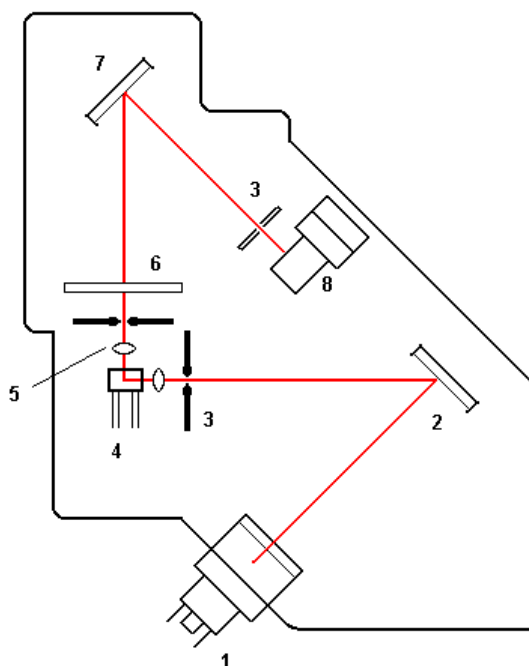
Hlavními výhodami spektrofotometrických detektorů jsou snadná obsluha, nízká citlivost odezvy na změny složení mobilní fáze a teploty. Další výhodou je možnost využití gradientové eluce nebo široký dynamický lineární rozsah (až 5 řádů).<sup>(15; 21; 17; 38)</sup>

### 3.2.5.2. Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektory fungují na principu fluorescence a následném měření sekundárního (emisního) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Na základě absorpce elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního elektronového stavu do excitovaného elektronového stavu. Excitovaná molekula je schopna absorbovanou energii znovu vyzářit jako fluorescenci, vibrační energii nebo ji předat jiným molekulám. Vlnová délka emitovaného záření je často

vyšší v důsledku vibrační relaxace. Účinnost fluorescence se zmenšuje se stoupající teplotou a dále závisí na koncentraci a pH mobilní fáze.

Jednoduché detektory používají jako zdroj monochromatického excitačního záření rtuťové výbojky s interferenčním filtrem. Fluorescenční záření detekují při všech vlnových délkách. U moderních detektorů pomocí monochromátoru je možné nastavit vlnovou délku excitačního i emitovaného záření. Pro dosažení maximální citlivosti lze vlnovou délku upravovat v průběhu eluce pro každou separovanou látku zvlášť. Na následujícím obrázku je uvedeno schéma fluorescenčního detektoru.



Obrázek č. 12 Schéma fluorescenčního detektoru. (1) výbojka (rtuťová nebo xenonová), (2) excitační mřížka (monochromátor), (3) štěrбина, (4) průtoková cela, (5) mikročočky, (6) limitní (cut-off) filtr, (7) emisní mřížka, (8) fotonásobič. <sup>(21)</sup>

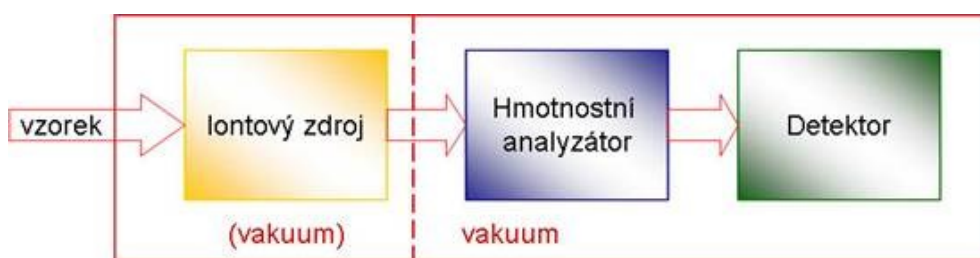
Fluorescenční detektory jsou citlivější a selektivnější než UV-VIS detektory. Lze je využít pro látky, které vykazují fluorescenci. Pokud mobilní fáze neobsahuje fluorescenční složku, detektor je kompatibilní s gradientovou elucí. <sup>(15; 14; 21; 17; 38)</sup>

### 3.2.5.3. Hmotnostně spektrometrická detekce

Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v ionizaci analyzované látky. Prvním krokem je tedy převedení rozpuštěných analytů v mobilní fázi na ionty ve fázi plynné. Následuje rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a urychlení v analyzátoru. Posledním

krokem je detekce iontů a určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Hlavní části hmotnostních spektrometrů zahrnují (viz následující obrázek):

- Iontový zdroj, který slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice.
- Hmotnostní analyzátor sloužící k rozdělení iontů v plynné fázi, za vysokého vakua, podle poměru hmotnosti a náboje.
- Detektor, který detekuje ionty po jejich separaci podle  $m/z$  a určuje relativní intenzitu jednotlivých iontů.



Obrázek č. 13 Znáznornění procesu detekce hmotnostní spektrometrií<sup>(39)</sup>

Volbu ionizační techniky ovlivňuje těkavost látky, tepelná stabilita, molekulová hmotnost a polarita látky. Ionizační techniky lze rozdělit na měkké a tvrdé. Mezi nejčastěji využívané měkké ionizační techniky patří ionizace za atmosférického tlaku (*atmospheric pressure ionization* – API technika), ionizace elektrosprejem (ESI - *electrospray ionization*), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – *atmospheric pressure photoionization*). U těchto měkkých technik dochází při ionizaci ke vzniku protonové molekuly  $[M+H]^+$  nebo deprotonované molekuly  $[M-H]^-$ . Naměřená spektra se vzájemně liší podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek nebo typu přístroje. Tato spektra není možné porovnat s knihovnou, jelikož knihovny spekter pro HPLC/MS neexistují.

K tvrdým ionizačním technikám řadíme elektronovou ionizaci (EI). Při elektronové ionizaci dochází k ovlivnění elektromagnetického pole, a tím je uvolněn valenční elektron. Vzniká tak molekulární iont  $M^+$  a také dochází k rozsáhlé fragmentaci molekuly. Pro elektronovou ionizaci existují knihovny spekter na rozdíl od měkkých ionizačních metod. Pro aplikaci EI je důležitá těkavost látek, což je využíváno ve spojení EI s plynovou chromatografií (GC). Na počátku hmotnostní spektrometrie byla EI jedinou ionizační technikou, ovšem dnes už je spíše považována za konvenční způsob ionizace.

Úkolem hmotnostních analyzátorů je rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  a jejich následné urychlení. Analyzátoři pracují na základě různých principů, mezi které patří: zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli, různá stabilita oscilací iontů v kombinaci stejnoměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól, trojitý kvadrupól, iontová past), doba letu iontů (TOF – analyzátor doby letu), absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance) a rozdělení iontů podle frekvence oscilací (orbitrap).

Jedním z významných trendů v oblasti hmotnostních analyzátorů je tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Jedná se o spojení dvou hmotnostních analyzátorů v čase nebo v prostoru. Přínos tandemové hmotnostní spektrometrie spočívá v možnosti identifikovat látky v komplexních směsích, v objasnění fragmentačních procesů a v možnosti kvantifikace látek ve složitých vzorcích. Využívá se také u měkkých ionizačních technik, které nedávají dostatečné informace o struktuře vzorku. Hmotnostní spektrometr provádí potvrzení identity analyzované látky na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů. Spojení LC-MS je důležité pro identifikaci vzorků, jako jsou biologické tkáně, tekutiny nebo environmentální matrice.

Hmotnostní spektrometry se využívají pro bioanalytické a environmentální aplikace, potravinovou analýzu, metabolomiku, proteomiku, výzkum a vývoj nových lékových struktur a dále pro identifikaci neznámých sloučenin, objasňování struktury látek a mnoho dalších aplikací. <sup>(17; 40)</sup>

#### **3.2.5.4. Další typy detektorů využívané v HPLC**

V HPLC analýze se také používají elektrochemické detektory. Tyto detektory se využívají při detekci látek, které mají v molekule elektrochemicky aktivní skupinu, tedy takovou, která je schopna oxidace nebo redukce. Elektrochemické detektory měří změnu dané elektrické veličiny (elektrodový potenciál, proud), která je zaznamenávána elektrodami v cele detektoru. Změna elektrické veličiny nastává díky přítomnosti rozpuštěných analytů v mobilní fázi. Mezi typické analyty, které jsou vhodné pro tento způsob detekce, patří katecholaminy, glykoproteiny, analyty obsahující fenolickou, amino nebo nitro skupinu.

Dalším typem jsou detektory refraktometrické, které jsou nejdéle používanými univerzálními detektory. Refraktometrické detektory měří rozdíl indexu lomu čisté mobilní fáze v referenční cele a mobilní fáze unášející analyzovanou látku v měrné cele detektoru. Důležité je, aby se index lomu analyzované látky lišil od indexu lomu mobilní fáze.

Zaznamenaný rozdíl v indexu lomu mezi referenční a měrnou celou je na výstupu detektoru převeden na napětí. Nevýhodami tohoto typu detektoru jsou nízká citlivost detekce, teplotní závislost odezvy, nemožnost použití gradientové eluce a zachování konstantního průtoku mobilní fáze.

K univerzálním detektorům také patří vodivostní detektory. Ty měří elektrickou vodivost analyzované látky v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Je důležité, aby použitá mobilní fáze byla zcela nevodivá, musí se v ní rozpouštět všechny dělené látky a musí mít dostatečně velkou permitivitu. Vodivostní detektory se nejčastěji uplatňují v iontové chromatografii.

Dalším typem jsou detektory založené na měření rozptylu světla. Nejpopulárnější z této skupiny je detektor rozptylu světla využívající odpaření (*Evaporative light-scattering detector – ELSD*), který slouží především k detekci fosfolipidů, mastných kyselin, makromolekul, sacharidů, aminokyselin a dalších látek. Je univerzálním detektorem a lze použít i gradientovou eluci.

Dále je využíván aerosolový detektor nabitých částic (*Corona-discharge detector – CAD*), který detekuje kladně nabitě částice s rozdílnou pohyblivostí. Tento detektor je považován za univerzální, je schopen citlivě detekovat všechny analyty, které jsou méně těžké než mobilní fáze. <sup>(21; 17; 38)</sup>

### **3.2.6. Hodnocení analýzy**

Výsledkem jednotlivých analýz je převod signálu pomocí detektoru do chromatografického záznamu, tzv. chromatogramu. Chromatogram charakterizují křivky Gaussovského tvaru, které se označují jako píky. K vyhodnocení parametrů píky je možné použít kvalitativní i kvantitativní analýzu. <sup>(14; 17)</sup>

Mezi základní charakteristické veličiny chromatografie patří retenční charakteristiky, účinnost chromatografické kolony, selektivita, rozlišení a faktor symetrie. <sup>(13; 14; 17)</sup>

#### ***Retenční charakteristiky***

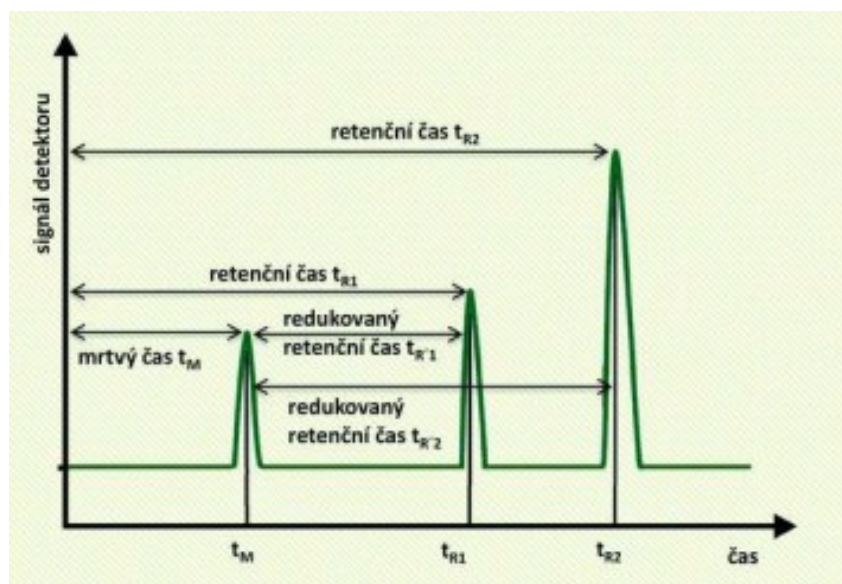
Charakteristickou veličinou pro každou analyzovanou látku je retenční čas  $t_R$  nebo eluční objem  $V_R$ . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima vrcholu píky a objem mobilní fáze, který za tuto dobu proteče, se nazývá retenční objem. Retenční čas je základní veličinou v kvalitativní analýze, a také patří mezi snadno měřitelné parametry, které popisují chování analytu. Nevýhodou retenčního času je malá univerzálnost

a závislost na průtoku mobilní fáze systémem. Čím vyšší je rychlost proudění, tím menší je retenční čas analytu. Retenční čas analyzované látky, která není zadržována na koloně a je volně unášena mobilní fází, se nazývá mrtvý retenční čas ( $t_0$ ). Odečtením mrtvého retenčního času od retenčního času analytu získáme tzv. redukovaný retenční čas ( $t'_R$ ), který udává dobu, po kterou je analyt ve stacionární fázi (viz následující rovnice):

$$t'_R = t_R - t_0$$

$t'_R$  – redukovaný retenční čas,  $t_R$  – retenční čas a  $t_0$  – mrtvý retenční čas. Kolona HPLC se skládá z malých porézních částic. Tyto póry mají určitý objem  $V_0$ , tzv. mrtvý retenční objem, kterým projde neinteragující analyt ještě před vstupem do detektoru. (13; 14; 21; 17)

Na následujícím obrázku jsou znázorněny retenční časy.



Obrázek č. 14 Retenční časy (41)

Bezrozměrnou veličinou, která popisuje retenční chování analytu nezávisle na průtoku mobilní fáze a rozměrech kolony, je retenční faktor  $k$ . Retenční faktor  $k$  lze vypočítat podle následující rovnice:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

kde je  $t_R$  – retenční čas,  $t_0$  – mrtvý retenční čas,  $V_R$  – retenční objem a  $V_0$  – mrtvý retenční objem. (13; 17)

## **Účinnost chromatografické kolony**

Účinnost je ukazatelem kvality chromatografické separace, která charakterizuje míru rozšiřování elučních zón dělených na koloně. Je to bezrozměrná veličina  $N$ , která se nazývá počet teoretických pater a lze ji vyjádřit následujícím vztahem:

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

$t_R$  – retenční čas,  $w_h$  – šířka píku v polovině jeho výšky. Počet teoretických pater není konstantní veličinou. Závisí na retenčním čase, délce kolony, rychlosti průtoku mobilní fáze, teplotě, viskozitě mobilní fáze a také na velikosti částic náplně kolony.

Pro porovnání účinnosti kolon s různou délkou lze použít výškový ekvivalent teoretického patka  $H$ , který je definovaný jako délka kolony připadající na jedno patro a vyjádřený následujícím vzorcem:

$$H = \frac{L}{N}$$

$N$  – počet teoretických pater,  $L$  – délka kolony. <sup>(13; 14; 17)</sup>

## **Selektivita**

Selektivita vyjadřuje schopnost chromatografického systému rozlišit dva různé analyty. Stanoví se jako poměr retenčních faktorů dvou analytů ( $k_1$ ,  $k_2$ ). Selektivitu  $\alpha$  ovlivňují především vlastnosti stacionární fáze a samotná povaha analytu. Rovnice pro výpočet selektivity: <sup>(13; 14)</sup>

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

## **Rozlišení**

Rozlišení  $R$  vyjadřuje míru kvality separace dvou sousedních píků. Hlavním cílem chromatografické metody je dosáhnout dobrého rozdělení analyzovaných látek v přijatelném čase. V porovnání se selektivitou jde o objektivnější charakteristiku, jelikož zahrnuje také účinnost vyjádřenou pomocí šířky píku. Rozlišení lze tedy zlepšit zvýšením účinnosti nebo úpravou selektivity. Je to bezrozměrná veličina, a čím je hodnota rozlišení větší, tím je lepší separace. V praxi je však důležité dosáhnout v analýze potřebného rozlišení pro následné vyhodnocení výsledků. Rovnice pro výpočet rozlišení dvou sousedních píků:



$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

$N$  – počet teoretických pater,  $\alpha$  – selektivita,  $k$  – retenční faktor. <sup>(13; 14; 21)</sup>

### Asymetrie píku

V ideálním případě by měl mít pík pravidelný tvar podobný Gaussovskému rozdělení. Ovšem v praxi dochází k zhoršení jeho tvaru. Existují dvě metody, které vyjadřují asymetrii píku. Jednou z nich je faktor chvostování (*tailing factor*)  $T_f$ , který je vyjádřen následující rovnicí:

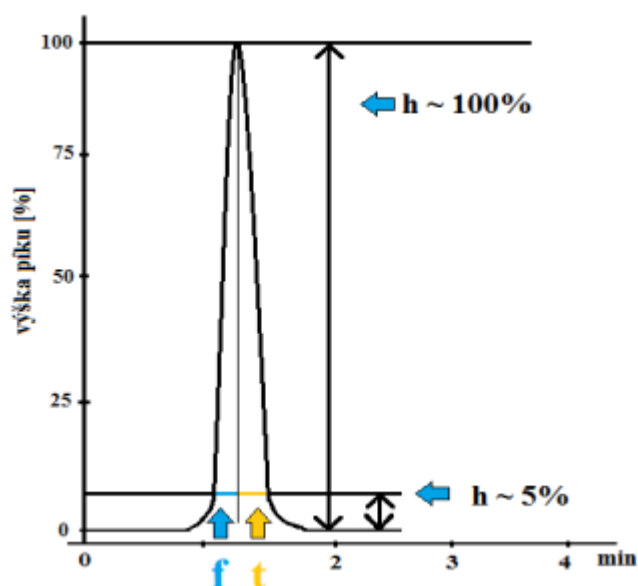
$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

$W_{0,05}$  – šířka píku v 5 % výšky,  $f$  – šířka píku vzestupné části.

Druhou metodou je faktor asymetrie  $A$ , který je dán vztahem:

$$A = \frac{t}{f}$$

$t$  – šířka sestupné části píku,  $f$  – šířka vzestupné části píku. Šířka se nejčastěji určuje v 5 nebo 10 % výšky píku. <sup>(13; 17)</sup>



Obrázek č. 15 Grafické znázornění výpočtu asymetrie píku <sup>(17)</sup>

Dále se v HPLC analýze využívá kvantitativní hodnocení. Kvantitativní hodnocení nalézá vztah mezi plochou nebo výškou píku a množstvím analyzované látky. Nepřesné určení plochy nebo výšky píku bývá častým zdrojem chyb při zpracování chromatografických dat. Také platí, že metoda použitá pro vyhodnocení plochy nebo výšky píku standardu musí být stejná i pro vyhodnocení analyzované látky. Závislost mezi naměřenou plochou nebo výškou píku a neznámou koncentrací stanovované látky je třeba určit empiricky pomocí standardů. Mezi nejčastěji využívané metody při kvantitativním hodnocení patří metoda vnějšího standardu, vnitřního standardu, metoda normalizace a kalibrační postup. <sup>(42)</sup>

### ***Metoda vnějšího standardu***

Jedná se o nejjednodušší metodu. Princip metody vnějšího standardu spočívá v nanesení roztoku analyzované látky na kolonu a v zaznamenání chromatogramu a následném nastříknutí roztoku vnějšího standardu na kolonu a opět se zaznamenává chromatogram. Jako vnější standard se nejčastěji u substancí používá standard stanovované látky (CRL – chemická referenční látka) a u složených přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se vypočítá z poměru ploch nebo výšek píků jednotlivých analyzovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

Rovnice pro výpočet stanovované koncentrace:

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

kde  $A_i$  je plocha píku stanovované látky o neznámé koncentraci  $c_i$ , plocha píku standardu  $A_s$  se získá proměřením tohoto standardu o koncentraci  $c_s$ . <sup>(15; 21; 42)</sup>

### ***Metoda vnitřního standardu***

Výhodou metody vnitřního standardu je, že celá analýza se uskuteční v jednom nástřiku. Ke známému objemu roztoku vzorku i standardu se přidá známý objem roztoku zvoleného vnitřního standardu. Původní koncentrace vnitřního standardu (*IS, internal standard*) musí být známá. Vnitřní standard je chemická látka, která musí být oddělena od ostatních složek analyzovaného vzorku, měla by se eluovat v blízkosti stanovované složky, musí mít podobnou koncentraci jako stanovované látky a musí být chemicky inertní. Koncentrace analyzovaných látek se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých

separovaných složek a plochy nebo výšky píku vnitřního standardu, jak je uvedeno na následujícím vzorci.

$$\frac{c(vz)}{A(vz)/A(IS)vz} = \frac{c(st)}{A(st)/A(IS)st}$$

$c(st)$  – známá koncentrace roztoku standardu,  $A(vz)$  a  $A(IS)vz$  jsou plochy píků analyzované látky a vnitřního standardu ve stanovovaném vzorku,  $A(st)$  a  $A(IS)st$  jsou plochy píků analyzované látky a vnitřního standardu v roztoku standardu.

Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a přesnější, jelikož není zatížena chybou dvojího nástřiku. <sup>(15; 21; 42)</sup>

### ***Metoda normalizace***

Předpokladem této metody je stejná citlivost detektoru ke všem složkám analyzované směsi. Nevýhodou metody normalizace je nutnost úplné identifikace všech píků v chromatogramu. Výsledkem této metody je bezrozměrné číslo, které udává procentuální zastoupení určité složky ve vzorku, nikoliv koncentraci látky. Rovnice pro metodu normalizace:

$$\%(x) = 100 \cdot \frac{A(x)}{A(x) + A(x_1) + A(x_2) + A(x_3) + \dots + A(x_i)}$$

Do celkové plochy všech píků chromatogramu se nezapočítávají plochy píků rozpouštědel, přidaných činidel a píky, které mají velikost plochy pod limitem zanedbatelnosti. Metoda normalizace se často využívá ve farmaceutické analýze při stanovení čistoty látek, která se udává v procentech. <sup>(21; 42)</sup>

### ***Metoda kalibrační křivky***

Při této metodě je analyzovaná řada standardů o známé, ale různé koncentraci a je změřena kalibrační křivka závislosti koncentrace analytu na velikosti plochy nebo výšky píku. Z kalibrační křivky je pak přímo odečtena koncentrace složky vzorku. Je výhodné, pokud je kalibrační funkce lineární, protože umožňuje dosahovat velmi spolehlivých výsledků. <sup>(42)</sup>

## 4. Experimentální část

### 4.1. Chemikálie, přístroje, pomůcky

#### 4.1.1. Chemikálie

- Aciklovir (ACI), guanin hydrochlorid (GUA), Pliva Lachema, Česká republika
- Acetonitril (ACN), methanol (MeOH) Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Česká republika
- Propan-2-ol ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH), Merck, Německo
- Kyselina trifluoroctová (TFA), hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O), triethylamin (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), Penta, Česká republika
- Kyselina fosforečná (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Sigma-Aldrich, Česká republika
- Fluorid amonný (NH<sub>4</sub>F), Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika
- Fluorid sodný (NaF), Zdravotnické zásobování, Vysoké Mýto, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ethanol (EtOH), Dr. Kulich Pharma, Česká republika
- Voda čištěná

#### 4.1.2. Chromatografický systém

- Kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- Čerpadlo: LC-20AD VP Shimadzu
- Degaser: DGU-20A3 VP Shimadzu
- Termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu LC Solution
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- Autosampler: SIL-20AC VP Shimadzu
- Řídící jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- Chromatografická kolona: ZirChrom<sup>®</sup>-CARB 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm, ZirChrom Separation Inc, USA

#### 4.1.3. Přístroje

- Digitální váhy: Sartorius AG A200S, Německo
- pH-metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- Magnetické míchadlo: IKA Color Squid, Německo

#### **4.1.4. Pomůcky**

- Navažovací lodičky, laboratorní lžičky, kádinky, skleněné tyčinky, odměrné válce, mikropipety, odsávací baňka, Büchnerova nálevka, membránový filtr (NY Simplepure 0,45  $\mu\text{m}$ ), stříčky, vialky, odměrné baňky, magnetické míchadlo, zásobníky mobilní fáze, alobal.

## 4.2. Obecné postupy

### 4.2.1. Příprava vzorků pro analýzu

Roztok acikloviru byl připraven smísením 25 mg acikloviru s 2,5 ml tetrahydrofuranu a následným doplněním do 25,0 ml odměrné baňky směsí acetonitril/voda v poměru 50:50 (v/v). Ze zásobního roztoku bylo odebráno 0,5 ml do odměrné baňky na 10,0 ml a doplněno směsí acetonitril/voda v poměru 50:50 (v/v). Výsledná koncentrace roztoku acikloviru byla 50 µg/ml. Během měření byla koncentrace tohoto roztoku ještě snížena na 10 µg/ml.

Při přípravě roztoku guaninu se v prvním kroku ještě přidal 1,0 ml NaOH, aby došlo k úplnému rozpuštění guaninu. Dále se postupovalo stejným způsobem jako při přípravě roztoku acikloviru.

Následně byl zhotoven směsný vzorek acikloviru a guaninu. Z obou roztoků o koncentraci 50 µg/ml byl odebrán 1,0 ml do 5,0 ml odměrné baňky a doplněn směsí acetonitril/voda (50:50, v/v). Výsledná koncentrace směsného vzorku byla 10 µg/ml.

Zásobní roztoky vzorků, byly uchovávány v lednici.

### 4.2.2. Příprava roztoků

Vypočítané množství kyseliny trifluoroctové (TFA) ( $M_{\text{CF}_3\text{COOH}} = 114,03 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,5351 \text{ g/cm}^3$ ) bylo odměřeno mikropipetou a smícháno s daným množstvím čištěné vody. Roztok byl vytvořen tak, aby celková koncentrace trifluoroctové kyseliny v jednotlivých mobilních fázích se poměry byla 0,5 mM.

Vypočítané množství kyseliny fosforečné ( $M_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 98 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,685 \text{ g/cm}^3$ ) bylo odměřeno mikropipetou a smícháno s čištěnou vodou. Byly připraveny roztoky tak, aby výsledná koncentrace kyseliny fosforečné v mobilní fázi byla 2,5 mM, 5 mM a 10 mM.

Dále byly připraveny roztoky s fluoridem amonným, jehož vypočítané množství ( $M_{\text{NH}_4\text{F}} = 37,04 \text{ g/mol}$ ) bylo naváženo a rozpuštěno v čištěné vodě. Mobilní fáze byly připraveny ve stejném poměru a celková koncentrace fluoridu amonného v jednotlivých fázích byla 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM a 20 mM.

Dalšími vyrobenými roztoky, byly roztoky s fluoridem sodným. Vypočítané množství fluoridu sodného ( $M_{\text{NaF}} = 41,99 \text{ g/mol}$ ) bylo naváženo a rozpuštěno v čištěné vodě tak, aby jeho výsledné koncentrace v připravených mobilních fázích byly 5 mM a 10 mM.

Také byl připraven podle Českého lékopisu 2009 tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7 (2) tak, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 5 mM.

Dále byly připraveny roztoky kombinací hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve vzájemném poměru 390:610 na 1000 ml. Vypočítané množství hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ( $M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 177,99 \text{ g/mol}$ ) a dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ( $M_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 156,01 \text{ g/mol}$ ) se navázilo a rozpustilo v potřebném množství čištěné vody. Připravené roztoky měly výsledné koncentrace fosforečnanů 3 mM, 5 mM, 10 mM a 20 mM.

Vypočítané množství triethylaminu ( $M_{\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3} = 101,20 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 0,726 \text{ g/cm}^3$ ) bylo odměřeno mikropipetou a smícháno s čištěnou vodou. Postupně byly vytvořeny roztoky tak, aby výsledné koncentrace triethylaminu v mobilních fázích byly 0,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM a 35 mM.

### **4.2.3. Příprava mobilní fáze**

Mobilní fáze je kapalina, kterou zpravidla tvoří směs organických rozpouštědel a vodné fáze. Pro přípravu mobilní fáze byly použity následující organická rozpouštědla: acetonitril (ACN), methanol (MeOH), ethanol (EtOH) a propan-2-ol. Vodnou fází tvořila čištěná voda s roztoky nebo pufrů uvedenými výše. Mobilní fáze se před analýzou musely zfiltrvat, aby došlo k odstranění mechanických nečistot. Jednotlivé mobilní fáze byly připraveny v různých poměrech, viz tabulka č. 1 a jejich složení bylo následující: ACN : MeOH : vodná fáze, ACN : EtOH : vodná fáze nebo ACN : propan-2-ol : vodná fáze. Některé mobilní fáze obsahovaly pouze ACN a vodnou fází v poměru 85:15, v/v.

<b>Složení mobilních fází</b>		
ACN	MeOH / EtOH / propan-2-ol	Vodná fáze
60 %	25 %	15 %
35 %	50 %	15 %
25 %	60 %	15 %
45 %	50 %	5 %
70 %	25 %	5 %
65 %	25 %	10 %
25 %	65 %	10 %
25 %	70 %	5 %

*Tabulka č. 1 Složení mobilních fází.*



### **4.3. Optimalizace podmínek HPLC separace**

#### **4.3.1. Přednastavení HPLC chromatografu**

Před každým prvním měřením nebo při výměně mobilní fáze byl chromatograf řádně propláchnut mobilní fází. Poté mobilní fáze protékala systémem alespoň 30 minut při daném průtoku, aby došlo k ustálení základní linie. Na konci měření se chromatograf propláchl 50 % acetonitrilem.

#### **4.3.2. Chromatografické podmínky**

Pro HPLC analýzu byly zvoleny následující podmínky:

- Kolona: ZirChrom<sup>®</sup> - CARB
- Průtok: 3 ml/min
- Detekce: 254 nm
- Teplota: 70 °C
- Množství nastříkovaného vzorku: 20 µl
- Mobilní fáze: směs organických rozpouštědel a vodné fáze v různých poměrech a koncentracích

Analýza byla také u dvou mobilních fází provedena za zvýšené teploty (70 – 130 °C) na přístroji Nexera. Kolona, nastavený průtok a detekce byly stejné.

#### **4.3.3. Vliv chromatografických podmínek na retenci ACI a GUA**

Pro HPLC analýzu byly připraveny vzorky acikloviru, guaninu a směsný vzorek o koncentraci 10 µg/ml. Jednotlivé vzorky byly do systému nastříkovány samostatně a každý vzorek vždy dvakrát po sobě. V HPLC analýze byly použity mobilní váze s rozdílnými poměry organického rozpouštědla a vodné fáze. Jako první byla pro analýzu použita mobilní fáze, která byla složena z acetonitrilu, ethanolu nebo propan-2-olu a vodné fáze, která obsahovala kyselinu trifluoroctovou o celkové koncentraci 0,5 mM. Vzorky v této mobilní fázi byly proměřeny ve všech poměrech uvedených v tab. 1.

Dále byly připraveny mobilní fáze, které obsahovaly 60 % acetonitrilu, 25 % ethanolu nebo propan-2-olu a 15 % vodné fáze s kyselinou fosforečnou tak, aby její výsledné koncentrace v mobilních fázích byly 2,5 mM, 5 mM a 10 mM. Také byla připravena mobilní fáze, která obsahovala pouze acetonitril a vodnou složku s kyselinou fosforečnou v poměru 85:15 (v/v).

Dalším krokem byla příprava mobilní fáze, která obsahovala ve vodné fázi fluorid amonný. Tato mobilní fáze s 25 % methanolu a 15 % vodné složky byla zkoušena v následujících molaritách: 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM a 20 mM. S využitím fluoridu amonného ve vodné složce, byly také připraveny mobilní fáze s ethanolem o celkové koncentraci 5 mM  $\text{NH}_4\text{F}$ . Zastoupení ethanolu v jednotlivých mobilních fázích bylo 25 %, 60 %, 65 % a 70 % podle následujících poměrů (60:25:15, 25:60:15, 65:25:10, 70:25:5, 25:65:10 a 25:70:5, v/v).

Následně byla zhotovena mobilní fáze tvořená směsí acetonitrilu, methanolu a vodné složky s fluoridem sodným o výsledné koncentraci 5 mM a 10 mM NaF v poměru 60:25:15 (v/v).

Dalším krokem bylo vytvoření mobilních fází s využitím tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7 (2), připraveného podle Českého lékopisu 2009 tak, aby jeho koncentrace v mobilních fázích byla 5 mM. Při přípravě těchto mobilních fází se jako součást organické složky použil jak methanol, tak i ethanol a propan-2-ol. Zastoupení organických rozpouštědel bylo 25 % nebo 60 %, přičemž poměr vodné fáze zůstal nezměněn, tedy 15 %.

Vodnou fázi pro další měření tvořily roztoky kombinací hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu a dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu. Mobilní fáze obsahovaly kombinace fosforečnanů v koncentracích 3 mM, 5 mM, 10 mM a 20 mM. Pro přípravu těchto mobilních fází byla využita organická rozpouštědla acetonitril a methanol v poměru 60:25:15 (v/v). S využitím vodné fáze s roztokem fosforečnanů o koncentraci 5 mM byly připraveny také mobilní fáze s ethanolem a propan-2-olem. Obsah ethanolu a propan-2-olu byl buď 25 %, nebo 60 %, poměr vodné fáze nebyl změněn (15 %).

Neméně důležitá byla příprava mobilních fází, jejichž součástí vodných složek byl triethylamin o celkové koncentraci 0,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM a 35 mM. Zastoupení methanolu v těchto mobilních fázích bylo 25 % a vodné složky 15 %. Následně byly připraveny mobilní fáze s triethylaminem o koncentraci 10 mM v poměrech acetonitril : methanol : vodná fáze 35:50:15 a 25:65:10 (v/v).

Analýza byla také provedena za zvýšené teploty na přístroji Nexera. Proměřeny byly dvě mobilní fáze. První mobilní fáze o celkové koncentraci 5 mM  $\text{NH}_4\text{F}$  byla složena z acetonitrilu, methanolu a vodné fáze s roztokem fluoridu amonného v poměru 60:25:15 (v/v) a proměřena v rozmezí teplot 70 – 110 °C. Při přípravě druhé mobilní fáze byla použita stejná

organická rozpouštědla i stejný poměr jako u první mobilní fáze. Vodná fáze však obsahovala triethylamin o celkové koncentraci 10 mM. Teplota při proměření druhé mobilní fáze byla v rozmezí 70 – 130 °C.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Vliv fluoridu amonného na retenci

#### *Vliv koncentrace fluoridu amonného na retenci acikloviru a guaninu*

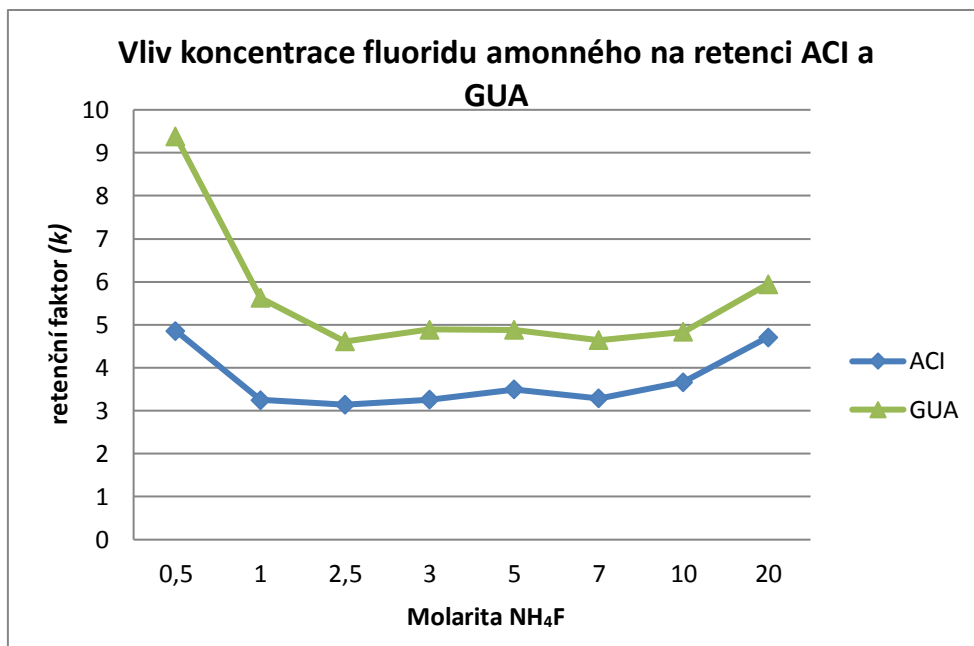
Byl zkoumán vliv rozdílných koncentrací fluoridu amonného (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM a 20 mM) v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu.

Složení mobilní fáze:

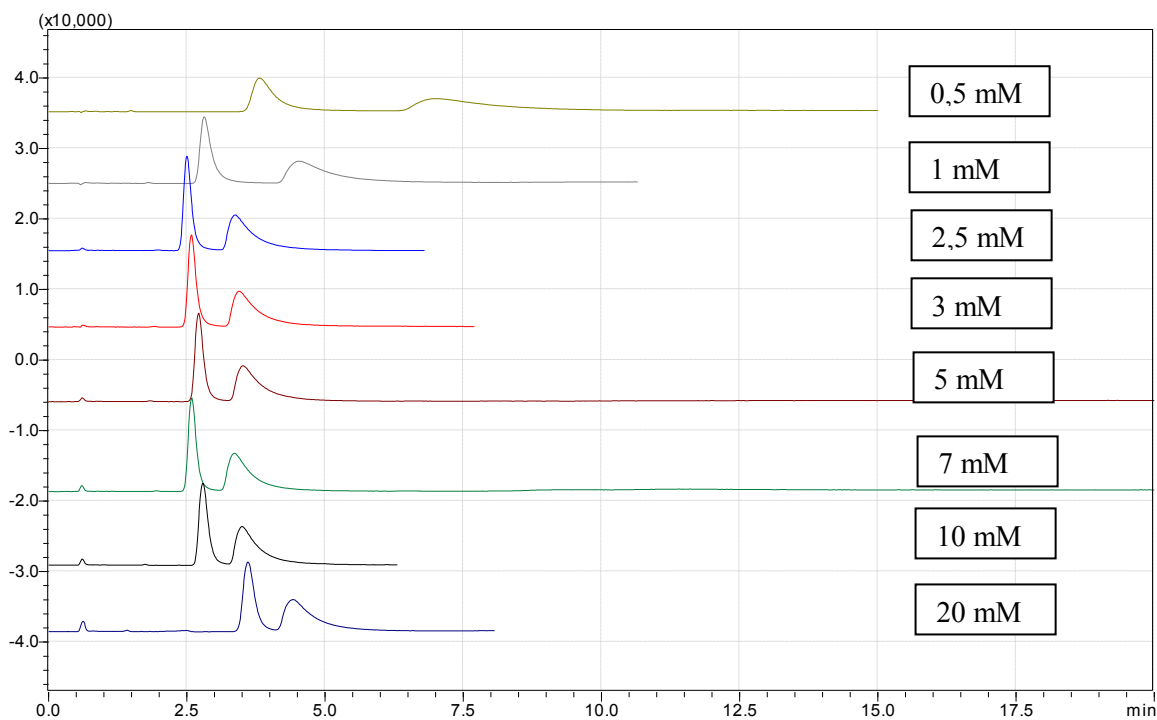
- ACN : MeOH : vodná fáze s fluoridem amonným v poměru 60:25:15
- Hodnoty pH vodné složky s fluoridem amonným a pH mobilní fáze jsou uvedeny v tabulce č. 2
- Teplota 70 °C

Tabulka s hodnotami pH		
Molarita NH <sub>4</sub> F v mobilní fázi	pH	
	Vodná složka s NH <sub>4</sub> F	Mobilní fáze
0,5 mM	4,62	7,05
1 mM	5,73	7,31
2,5 mM	4,84	7,19
3 mM	5,36	7,32
5 mM	5,98	7,37
7 mM	5,78	7,39
10 mM	5,43	7,42
20 mM	6,04	7,52

*Tabulka č. 2 Hodnoty pH mobilních fází s fluoridem amonným v různých koncentracích.*



Graf č. 1 Vliv koncentrace fluoridu amonného na retenci acikloviru a guaninu.



Obrázek č. 16 Retenční chování směsného vzorku acikloviru (vždy první pík) a guaninu (druhý pík) v závislosti na koncentraci fluoridu amonného v mobilní fázi.

*Komentář:* Na chromatogramu je znázorněn vliv koncentrace fluoridu amonného na retenční chování acikloviru a guaninu. Je patrné, že při koncentraci 0,5 mM a 1 mM je retence obou látek silnější než při vyšších koncentracích NH<sub>4</sub>F a také rozlišení je výrazně lepší. Zřejmě

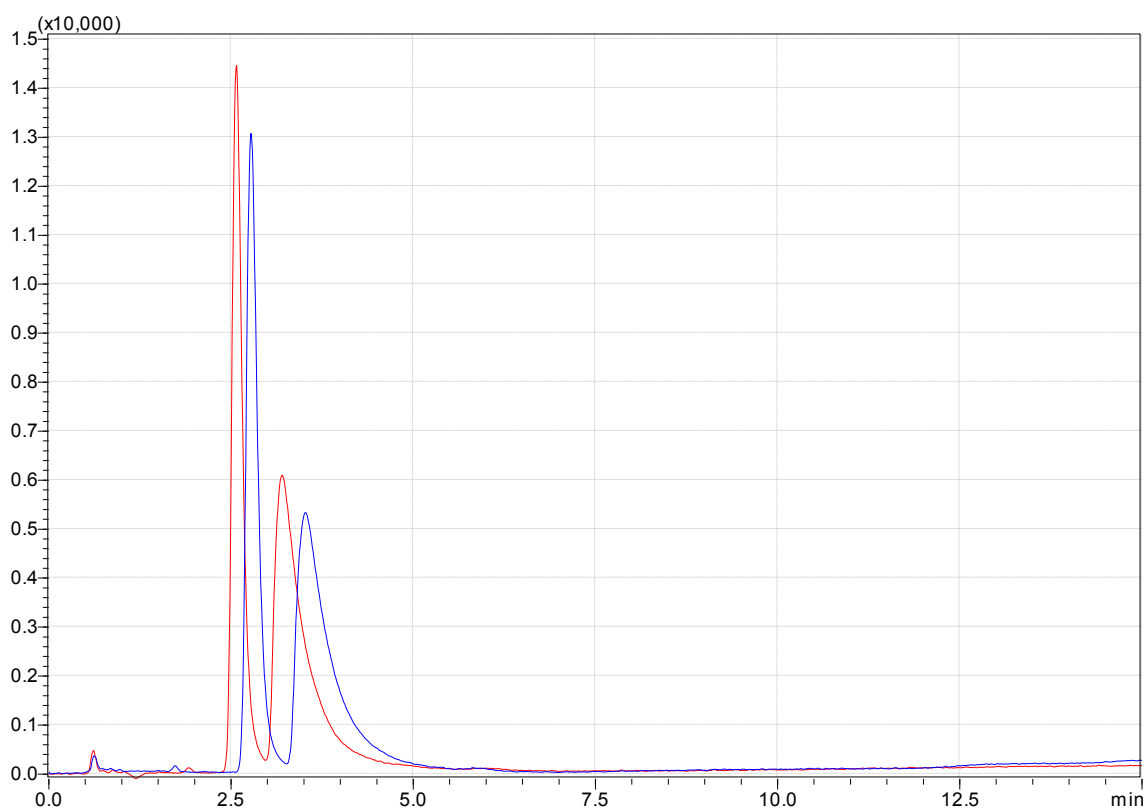
nebyla obsazena všechna vazebná místa typu Lewisovy kyseliny na povrchu zirkoniové kolony. Fluorid amonný se zde chová jako Lewisova báze, která tato místa obsadí. Dochází ke kompetici mezi analyty a fluoridem amonným. Interakce probíhají na základě výměny ligandů. <sup>(28)</sup> Ostatní koncentrace již nevykazují významný rozdíl v retenci, což může být způsobeno kompletní saturací vazebných míst na povrchu kolony.

### ***Vliv výměny amonných kationtů za sodné***

Dále byla také sledována závislost retence acikloviru a guaninu na koncentraci fluoridu sodného v mobilní fázi. Byly připraveny mobilní fáze s celkovými koncentracemi NaF 5 mM a 10 mM.

Složení mobilní fáze:

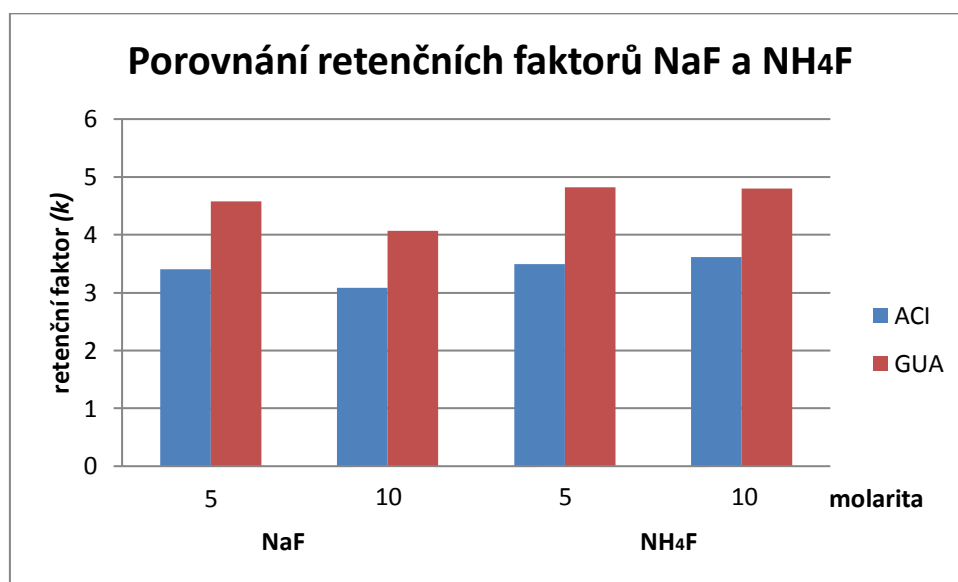
- ACN : MeOH : vodná fáze s fluoridem sodným v poměru 60:25:15
- pH vodné fáze 5 mM: 6,65 a 10mM: 7,23
- pH mobilní fáze 5 mM: 8,34 a 10 mM: 8,36
- Teplota 70 °C



Obrázek č. 17 Vliv koncentrace mobilní fáze s fluoridem sodným na retenci acikloviru a guaninu. Aciklovir představuje první pik ve směsném vzorku, guanin druhý pik. Červená – 10 mM, modrá – 5 mM.

*Komentář:* S rostoucí koncentrací fluoridu sodného v mobilní fázi se retence vzorků nepatrně snižuje. Rozlišení a symetrie piků zůstávají téměř stejné.

Výměna fluoridu amonného za fluorid sodný v mobilních fázích nevedla k výrazné změně retenčního chování acikloviru a guaninu, jak je patrné z následujícího grafu. U koncentrací NaF a NH<sub>4</sub>F 5 mM jsou retenční faktory acikloviru a guaninu téměř shodné. V mobilní fázi, ve které je koncentrace fluoridu sodného 10 mM, se aciklovir a guanin eluovaly o něco dříve než v mobilní fázi a fluoridem amonným 10 mM. Symetrie a rozlišení piků u těchto mobilních fází jsou téměř shodné.



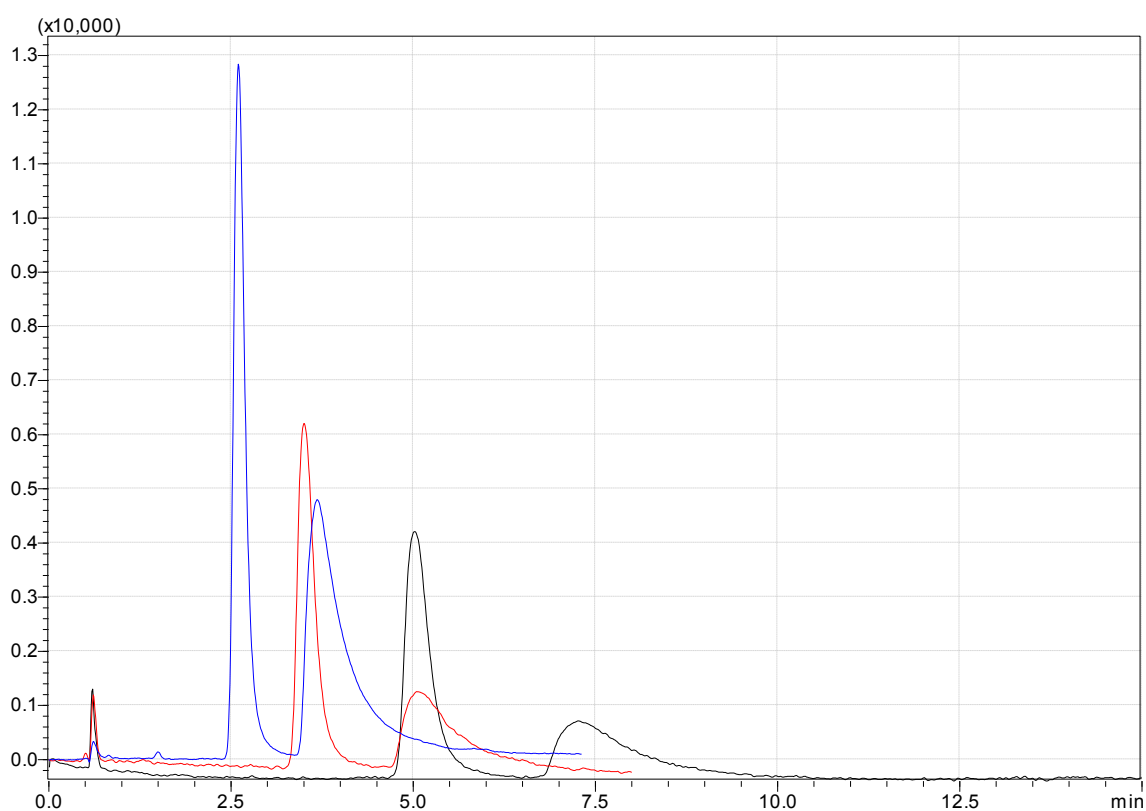
Graf č. 2 Porovnání retenčního chování acikloviru a guaninu v mobilních fázích s fluoridem amonným a fluoridem sodným o koncentracích 5 mM a 10 mM.

#### **Vliv změny složení mobilní fáze**

Dále byl methanol nahrazen v mobilní fázi ethanolem a byl zkoumán vliv změny poměru organické a vodné složky v mobilní fázi s fluoridem amonným na retenci acikloviru a guaninu. Celková koncentrace fluoridu amonného v mobilní fázi byla 5 mM a zastoupení ethanolu činilo 25 %.

Složení mobilních fází:

- ACN : EtOH : vodná fáze s NH<sub>4</sub>F – 60:25:15, pH vodné fáze: 5,78; pH mobilní fáze: 7,72
- ACN : EtOH : vodná fáze s NH<sub>4</sub>F – 65:25:10, pH vodné fáze: 5,85; pH mobilní fáze: 7,78
- ACN : EtOH : vodná fáze s NH<sub>4</sub>F – 70:25:5, pH vodné fáze: 6,15; pH mobilní fáze: 8,07
- Molarita NH<sub>4</sub>F v mobilní fázi: 5 mM
- Teplota 70 °C



Obrázek č. 18 Retenční chování směšného vzorku acikloviru (vždy první pík) a guaninu (druhý pík) v závislosti na změně poměru organické a vodné fáze. Modrá – 60:25:15; červená – 65:25:10 a černá – 70:25:5.

*Komentář:* Z chromatogramu je patrné, že při vyšším procentuálním zastoupení acetonitrilu na úkor vodné složky se retence acikloviru i guaninu prodlužuje. Při snižujícím se množství vodné fáze došlo k rozšíření eluční zóny guaninu a zvýšilo se jeho chvostování. Rozlišení píků ACI a GUA se v jednotlivých mobilních fázích příliš neliší. V mobilní fázi s 60 % ACN je rozlišení 1,97; 65 % ACN (2,08) a 70 % ACN (2,16). V mobilní fázi s vyšším množstvím



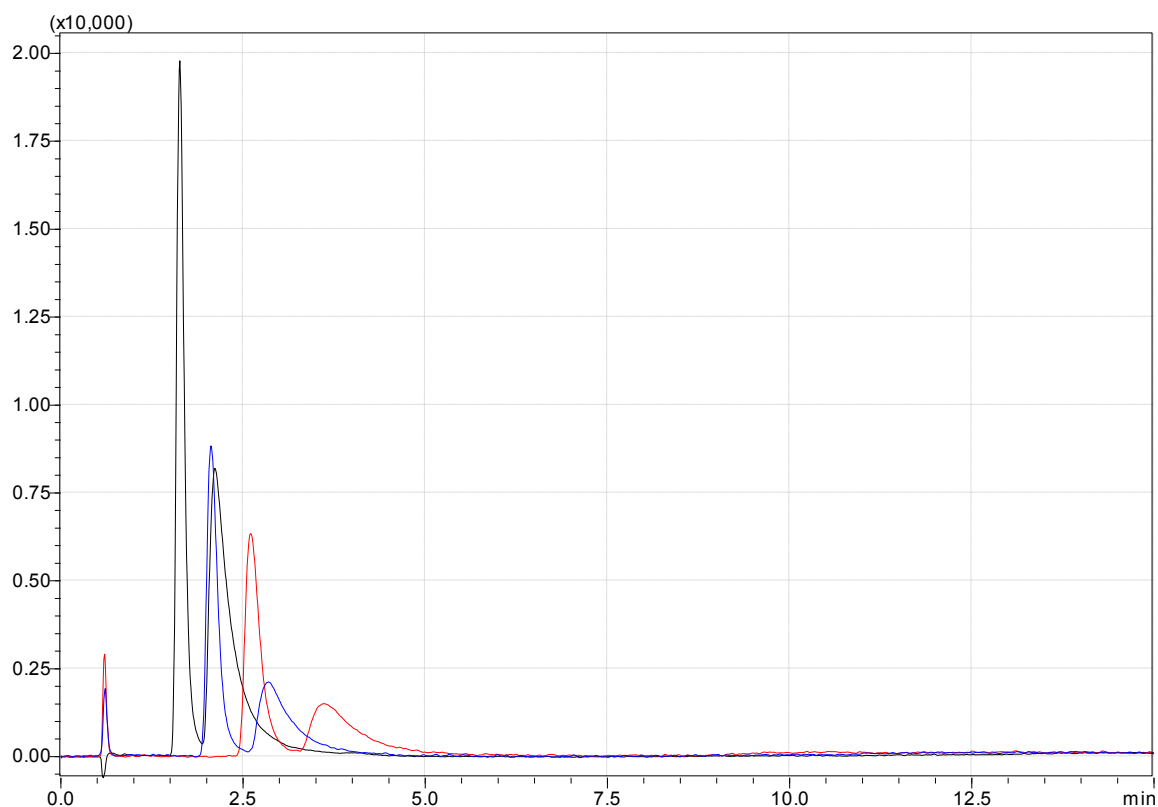
ACN se na retenci podílí vodná vrstva vlivem HILIC chování. Jelikož zkoušené analyty preferují hydrofilnější část mobilní fáze, hromadí se ve vodné vrstvě a jejich retence se prodlužuje.

### ***Vliv změny poměrů mobilní fáze***

Následně bylo sledováno ovlivnění retence acikloviru a guaninu změnou poměru mezi vodnou složkou s fluoridem amonným a ethanolem v mobilní fázi. Zastoupení acetonitrilu bylo v následujících mobilních fázích neměnné, tedy 25 %.

Složení mobilních fází:

- ACN : EtOH : vodná fáze s NH<sub>4</sub>F – 25:60:15, pH vodné fáze: 5,87; pH mobilní fáze: 7,48
- ACN : EtOH : vodná fáze s NH<sub>4</sub>F – 25:65:10, pH vodné fáze: 5,86; pH mobilní fáze: 7,64
- ACN : EtOH : vodná fáze s NH<sub>4</sub>F – 25:70:5, pH vodné fáze: 6,12; pH mobilní fáze: 7,79
- Molarita NH<sub>4</sub>F v mobilní fázi: 5 mM
- Teplota 70 °C



Obrázek č. 19 Změny retenčního chování směsného vzorku acikloviru a guaninu související s různými poměry mezi vodnou složkou s fluoridem amonným a ethanolem v mobilní fázi. Aciklovir představuje první pík ve směsném vzorku, guanin druhý pík. Černá – 25:60:15; modrá – 25:65:10 a červená – 25:70:5.

*Komentář:* Se zvyšujícím se procentuálním zastoupením ethanolu se prodlužuje retence ACI i GUA v menší míře než v předchozím případě. Rozlišení píků je přibližně stejné a opět se výrazně zhoršuje symetrie píků, především guaninu.

## 5.2. Vliv koncentrace fosforečnanového pufru na retenci

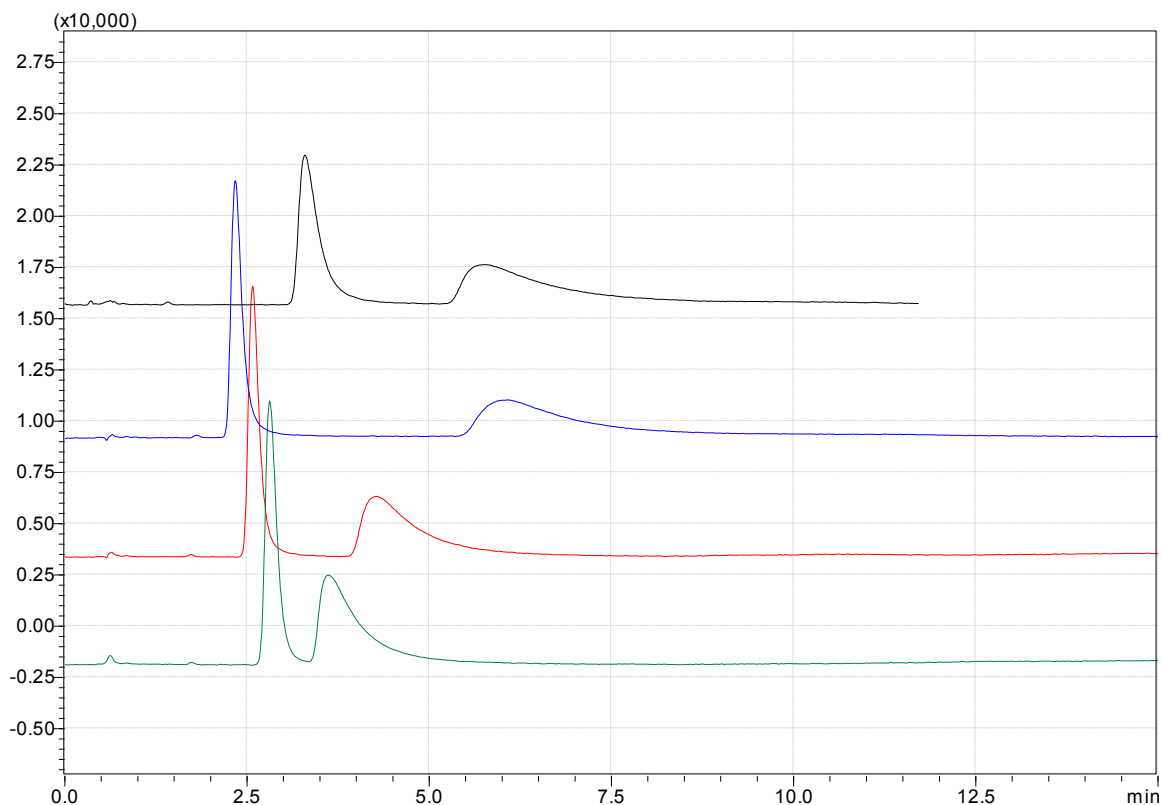
Zde bylo pozorováno ovlivňování retence acikloviru a guaninu při různých molárních koncentracích fosforečnanového pufru tvořeného hydrogenfosforečnanem sodným dihydrátem a dihydrogenfosforečnanem sodným dihydrátem. Měření bylo provedeno u roztoků s koncentrací pufru 3 mM, 5 mM, 10 mM a 20 mM.

Složení mobilní fáze:

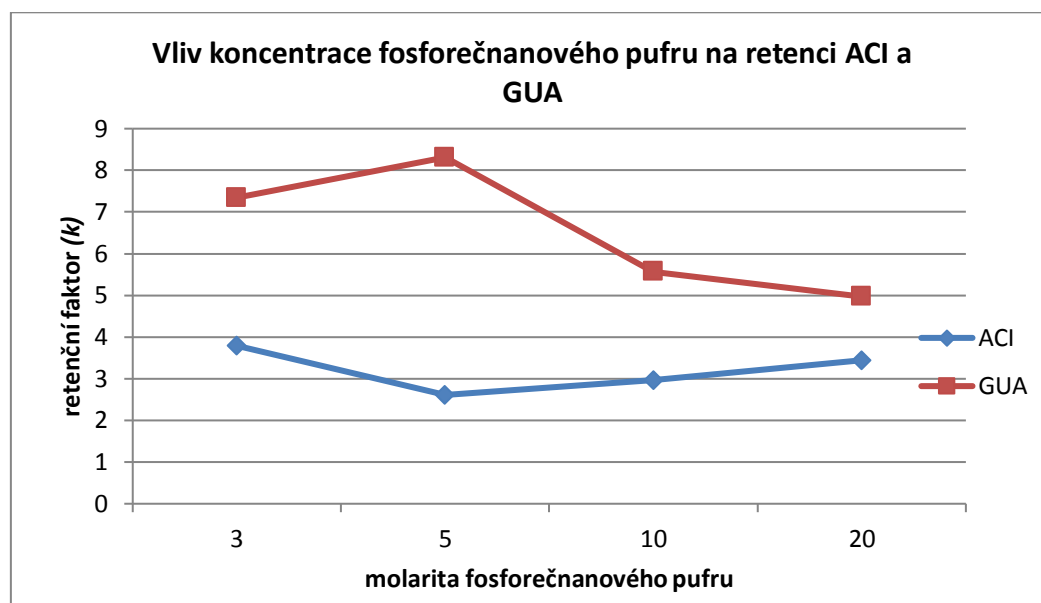
- ACN : MeOH : fosforečnanový pufr v poměru 60:25:15
- Hodnoty pH vodné složky s fosforečnanovým pufrém a mobilní fáze jsou uvedeny v následující tabulce
- Teplota 70 °C

Tabulka s hodnotami pH		
Molarita fosforečnanového pufru v mobilní fázi	pH	
	Vodné složky s fosforečnany	Mobilní fáze
3 mM	7,04	9,61
5 mM	6,97	9,51
10 mM	6,94	9,11
20 mM	6,96	8,62

Tabulka č. 3 Hodnoty pH vodné složky s fosforečnanovým pufrém a celkové pH mobilní fáze.



Obrázek č. 20 Vliv koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku. Aciklovir je první pík ve směsných vzorcích a guanin druhý pík. Černá – 3 mM; modrá – 5 mM; červená – 10 mM a zelená – 20 mM.



Graf č. 3 Vliv koncentrace fosforečnanového pufru na retenci acikloviru a guaninu.

*Komentář:* Rostoucí koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi vede k zrychlení eluce guaninu a ke zlepšení symetrie jeho píků. Rozlišení mezi píky ACI a GUA se zmenšuje s rostoucí koncentrací. Fosforečnany efektivně blokují aktivní místa na povrchu sorbentu, působí také jako Lewisovy baze.

Retenční faktory acikloviru v této mobilní fázi jsou nižší než v mobilní fázi obsahující fluorid amonný, ale symetrie píků acikloviru je lepší v mobilní fázi s fluoridy. Naopak retenční faktory guaninu mají vyšší hodnoty v mobilních fázích obsahujících fosforečnany. Symetrie píků guaninu je porovnatelná v obou zmíněných mobilních fázích. V mobilní fázi s fosforečnany je také větší rozlišení mezi píky acikloviru a guaninu.

### 5.3. Vliv změny poměru v mobilní fázi s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7

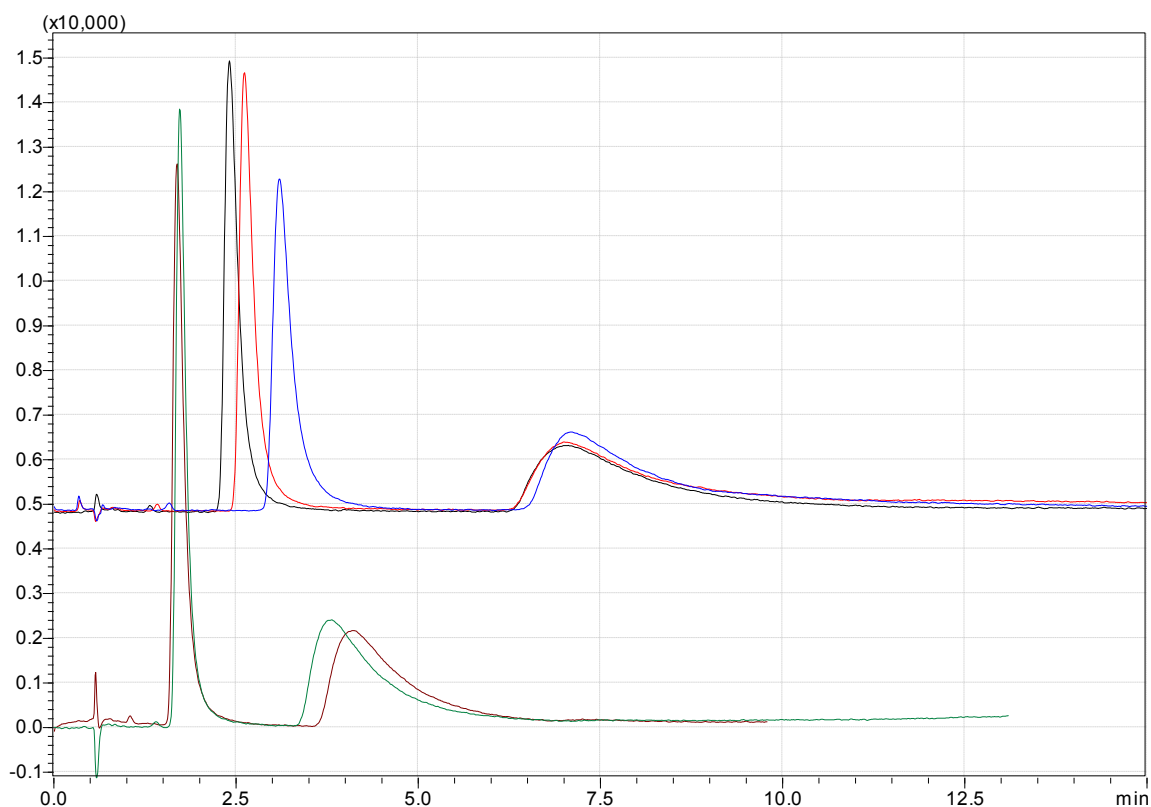
Byl pozorován vliv změny poměru mezi organickými rozpouštědly v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu. Použity byly mobilní fáze s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7 (2) a molaritě 5 mM. Připravené mobilní fáze obsahovaly 15 % vodné složky.

Složení mobilních fází

- ACN : MeOH : tlumivý roztok fosforečnanový – 60:25:15, pH: 9,61
- ACN : EtOH : tlumivý roztok fosforečnanový – 60:25:15, pH: 9,59
- ACN : propan-2-ol : tlumivý roztok fosforečnanový – 60:25:15, pH: 9,34
- ACN : EtOH : tlumivý roztok fosforečnanový – 25:60:15, pH: 9,8
- ACN : propan-2-ol : tlumivý roztok fosforečnanový – 25:60:15, pH: 9,34
- pH vodné fáze: 7,0
- Molarita tlumivého roztoku fosforečnanového: 5 mM
- Teplota 70 °C

Hodnoty retenčních faktorů				
Zastoupení MeOH, EtOH, propan-2-olu	Vzorky	Organická rozpouštědla		
		Methanol	Ethanol	Propan-2-ol
25 %	ACI	3,76	3,50	3,16
	GUA	9,93	11,06	10,99
60 %	ACI		1,54	1,48
	GUA		4,60	5,05

*Tabulka č. 4 Retenční faktory acikloviru a guaninu v závislosti na použitých organických rozpouštědlech a jejich obsahu v mobilní fázi.*



Obrázek č. 21 Vliv změny poměru organických rozpouštědel v mobilní fázi na retenci acikloviru (první pík) a guaninu (druhý pík) ve směsném vzorku. Černá - 25 % propan-2-olu, červená – 25 % EtOH, modrá – 25 % MeOH; zelená – 60 % EtOH, hnědá – 60 % propan-2-olu.

*Komentář:* Z chromatogramu vyplývá, že větší množství organického rozpouštědla v mobilní fázi vede k menšímu, ale přesto k dostatečnému rozlišení mezi píky acikloviru a guaninu a zlepšuje se i tvar píků guaninu. Retenční časy acikloviru a guaninu se při použití mobilních fází s jednotlivými organickými rozpouštědly, které tvoří ve fázi 25 %, příliš neliší. Pokud zvýšíme jejich množství v mobilní fázi na 60 %, tak retenční časy acikloviru se blíží mrtvému retenčnímu času a retenční čas guaninu se zkrátí o polovinu.

Pokud porovnáme jednotlivé mobilní fáze s 25 % methanolu, zjistíme, že největší retenční faktory a současně i největší rozlišení píků acikloviru a guaninu získáme při eluci analytů mobilní fází s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7. Mobilní fáze v poměru 25:60:15, v/v vykazuje nejvyšší retenci guaninu, pokud je součástí vodné složky tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7. Při zastoupení 25 % nebo 60 % propan-2-olu je retence acikloviru vyšší v mobilní fázi s fosforečnanovým pufrům, ale retence guaninu dosahuje

vyšších hodnot opět v mobilní fázi s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7, jak je patrné z následující tabulky.

<b>Hodnoty retenčních faktorů</b>						
Mobilní fáze s 5 mM	vzorky	Organická rozpouštědla				
		MeOH	EtOH		Propan-2-ol	
		<b>25 %</b>	<b>25 %</b>	<b>60 %</b>	<b>25 %</b>	<b>60 %</b>
NH <sub>4</sub> F	ACI	3,49	3,12	1,40	3,48	1,59
	GUA	4,82	4,84	2,11	5,58	2,66
Fosforečnanový pufr	ACI	2,61	4,11	1,65	3,51	2,21
	GUA	8,31	15,03	3,3	10,69	4,24
Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7	ACI	3,76	3,5	1,54	3,16	1,48
	GUA	9,93	11,06	4,60	10,99	5,05

*Tabulka č. 5 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích s 5 mM fluoridem amonným, fosforečnanovým pufrům a tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7.*

## 5.4. Vliv koncentrace triethylaminu na retenci

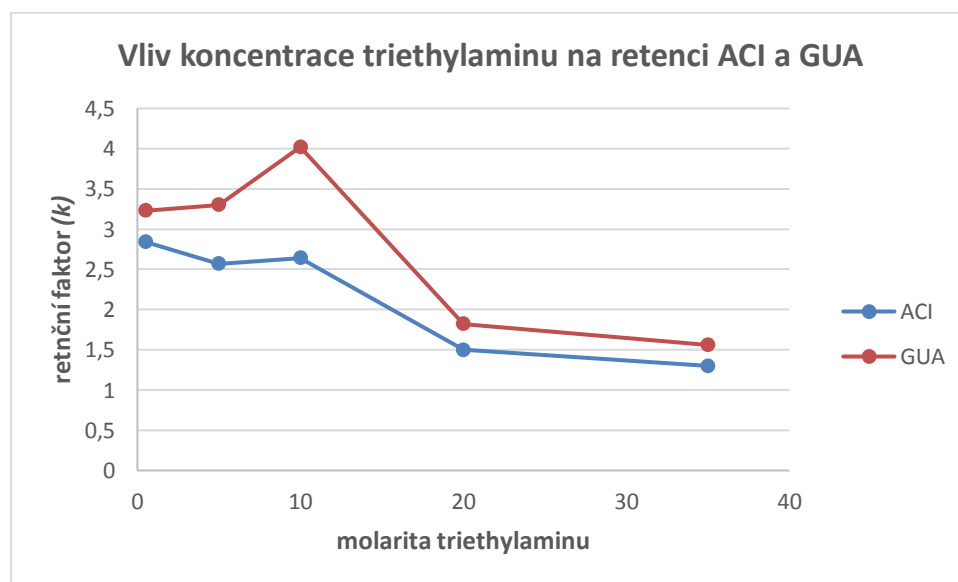
Porovnával se vliv rozdílné molarity triethylaminu v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu. Připraveny byly mobilní fáze o celkové koncentraci triethylaminu 0,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM a 35 mM v poměru 60:25:15, v/v. U mobilní fáze o koncentraci 10 mM byly také proměřeny poměry 35:50:15 a 25:65:10, v/v.

Složení mobilní fáze:

- ACN : MeOH : vodná fáze s triethylaminem – 60:25:15
- Hodnoty pH mobilních fází a vodných složek jsou uvedeny v tab. č. 6
- Teplota 70 °C

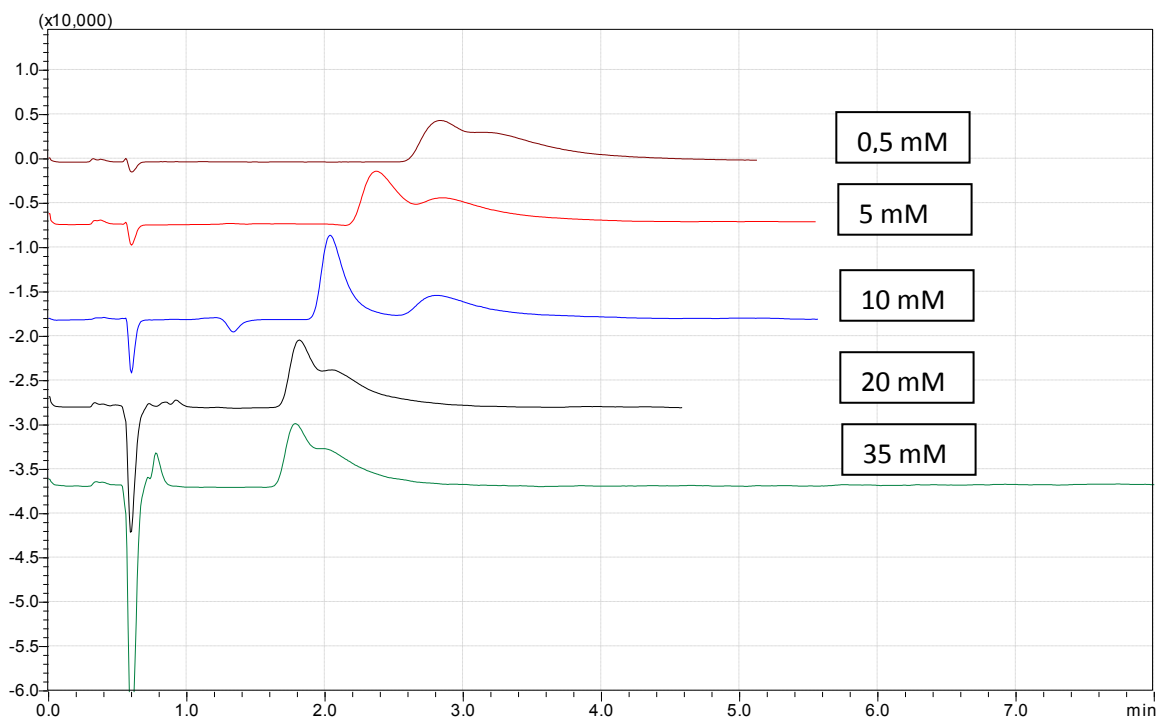
Molarita triethylaminu v mobilní fázi	Hodnoty pH	
	Vodná složka	Mobilní fáze
0,5 mM	9,53	9,49
5 mM	11,80	11,0
10 mM	11,88	11,03
20 mM	12,05	11,33
35 mM	12,16	11,68

Tabulka č. 6 Hodnoty pH mobilních fází s triethylaminem v různých koncentracích.



Graf č. 4 Vliv koncentrace triethylaminu v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu.





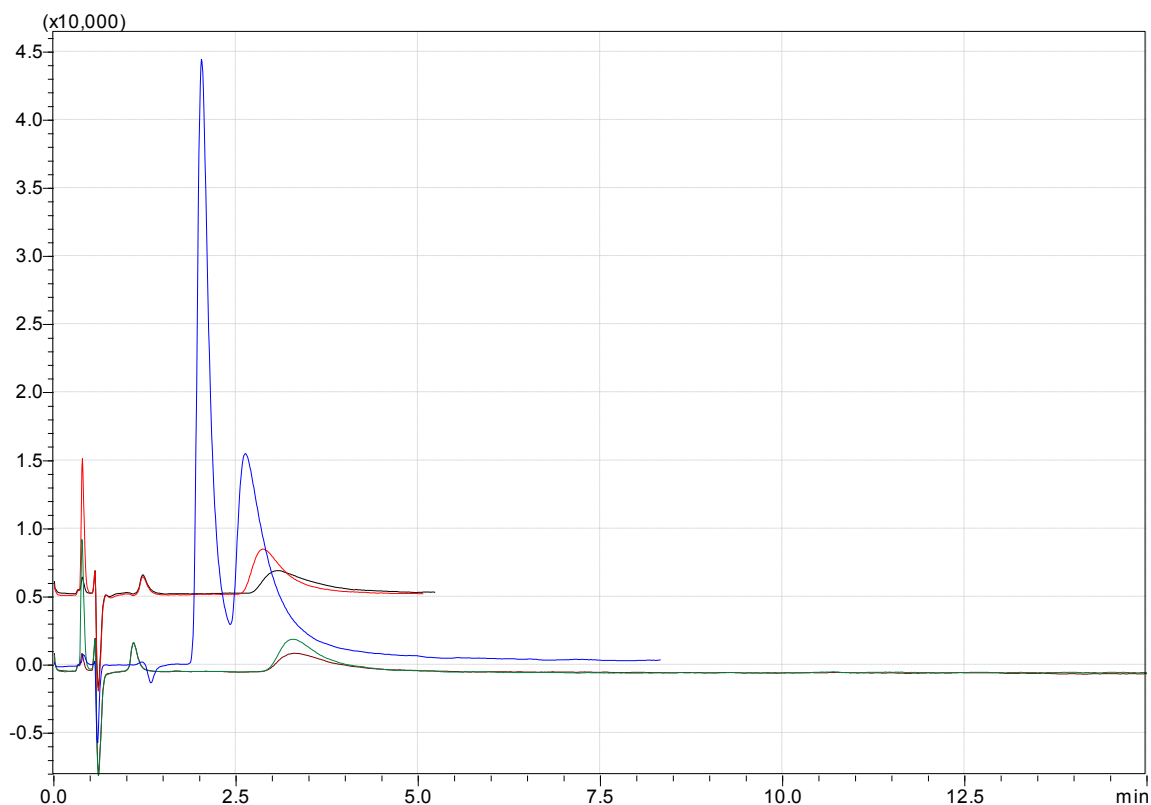
Obrázek č. 22 Retenční chování acikloviru (první pik) a guaninu (druhý pik) v závislosti na různých koncentracích triethylaminu v mobilní fázi.

*Komentář:* Na chromatogramu je znázorněn vliv koncentrace triethylaminu v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu. Při koncentraci 10 mM je největší rozlišení mezi píky ACI a GUA. Pík guaninu je však při této koncentraci neostrý. Z grafu č. 4 je patrné snižování retence acikloviru s rostoucí koncentrací triethylaminu v mobilní fázi. V ostatních koncentracích je rozlišení zanedbatelné, jelikož píky acikloviru a guaninu splývají. Triethylamin se chová jako Lewisova báze a může tedy docházet k interakcím analytu s povrchem kolony na základě výměny ligandů. U koncentrací triethylaminu 20 mM a 35 mM se na separaci zřejmě podílí i uhlíková vrstva, jinak by se píky eluovaly v mrtvém čase.

Následné měření bylo provedeno se stejným složením mobilní fáze, ale v odlišných poměrech jednotlivých složek. Celková koncentrace triethylaminu v mobilních fázích byla 10 mM. Hodnoty pH pro jednotlivé mobilní fáze jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka s hodnotami pH		
Poměry	Hodnoty pH	
	pH vodné fáze	pH mobilní fáze
60:25:15	11,88	11,03
35:50:15	11,74	10,97
25:65:10	12,07	10,87

Tabulka č. 7 Celkové pH mobilních fází lišících se zastoupením jednotlivých složek (ACN : MeOH : triethylamin).



Obrázek č. 23 Retenční chování acilkoviru a guaninu ovlivněné zastoupením jednotlivých složek mobilních fází. Modrá – směsný vzorek ACI (první pík) a GUA (druhý pík) v mobilní fázi 60:25:15 (ACN : MeOH : vodná fáze); červená – ACI a černá – GUA v mobilní fázi 35:50:15 (ACN : MeOH : vodná fáze); zelená – ACI a hnědá – GUA v mobilní fázi 25:65:10 (ACN : MeOH : vodná fáze).

*Komentář:* Změna poměrů nemá příznivý vliv na rozlišení píků ACI a GUA. Retenční časy vzorků jsou příliš blízko u sebe. Píky ACI a GUA jsou neostré a mají špatnou symetrii. V poměru 35:50:15, v/v a 25:65:10, v/v píky vzorků splývají.

## 5.5. Vliv změny teploty na retenci

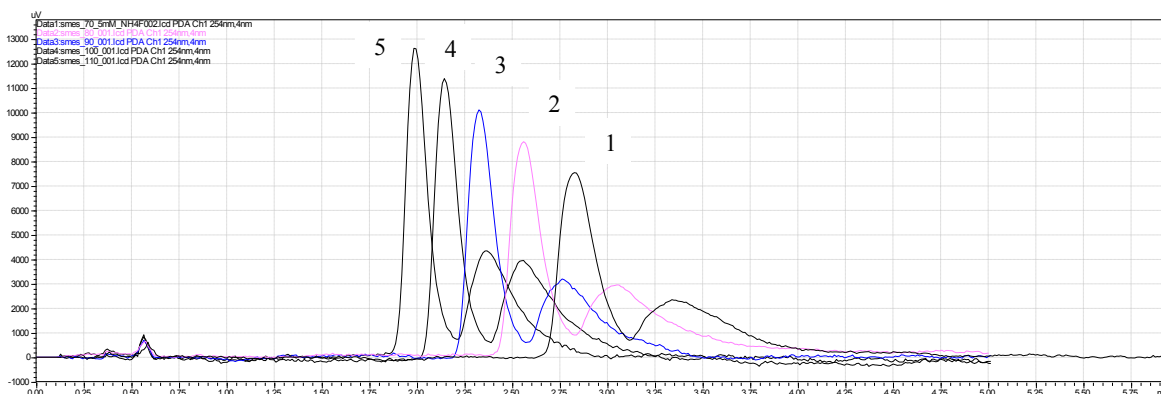
Byl sledován vliv zvyšující se teploty na retenci acikloviru a guaninu v mobilních fázích o celkové koncentraci 5 mM NH<sub>4</sub>F a 10 mM triethylaminu. V následující tabulce č. 8 jsou uvedeny retenční faktory acikloviru a guaninu při jednotlivých teplotách.

Složení mobilních fází:

- 5 mM mobilní fáze byla složena z ACN : MeOH : vodná fáze s fluoridem amonným v poměru 60:25:15 (v/v)
- pH vodné složky bylo 5,97 a pH mobilní fáze 7,42
- 10 mM mobilní fáze byla tvořena ACN : MeOH : vodná fáze s triethylaminem v poměru 60:25:15 (v/v)
- pH vodné složky s triethylaminem bylo 11,96 a celkové pH mobilní fáze 11,19
- Teplota 70 °C - 130 °C

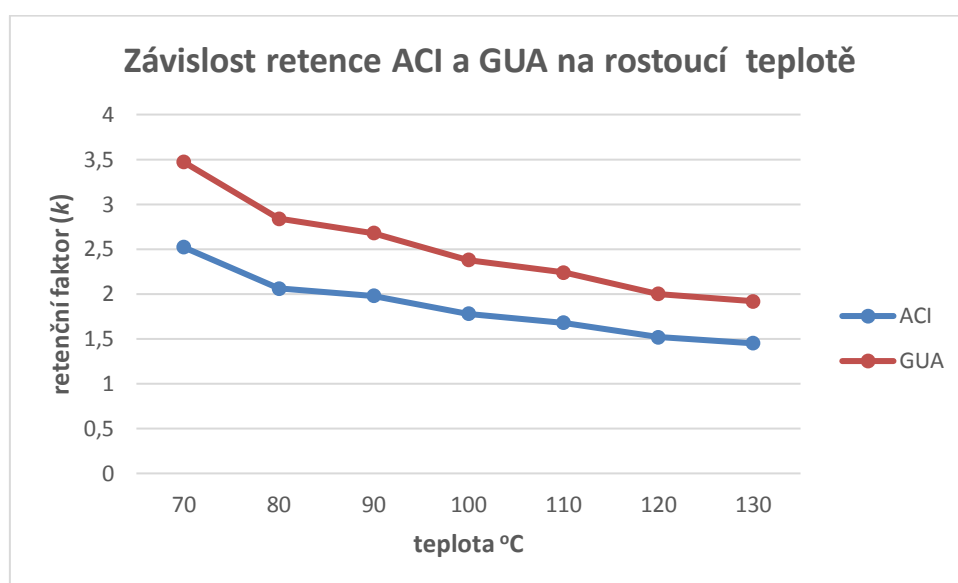
Tabulka retenčních faktorů								
Mobilní fáze	Vzorky	Teplota						
		70 °C	80 °C	90 °C	100 °C	110 °C	120 °C	130 °C
5 mM	ACI	3,82	3,44	3,13	2,79	2,51		
	GUA	4,69	4,29	3,90	3,52	3,17		
10 mM	ACI	2,52	2,06	1,98	1,78	1,68	1,52	1,45
	GUA	3,47	2,84	2,68	2,38	2,24	2,0	1,92

Tabulka č. 8 Retenční faktory acikloviru a guaninu při různých teplotách.



Obrázek č. 24 Retenční chování ACI a GUA při změnách teploty. ACI je vždy první pik ve směsném vzorku a GUA druhý pik. Mobilní fáze o koncentraci 5 mM je složena z ACN : MeOH : vodná fáze s fluoridem amonným v poměru 60:25:15. Na obrázku (5) odpovídá teplotě 110 °C, (4) – 100 °C, (3) – 90 °C, (2) – 80 °C a (1) – 70 °C.

*Komentář:* Velký vliv na retenční chování analyzovaných vzorků při HILIC separaci má i teplota kolony. Se stoupající teplotou retence vzorků klesá, dochází k snížení viskozity mobilní fáze, a tedy k jejímu rychlejšímu průtoku kolonou. Při vyšších teplotách se zlepšuje symetrie píků. V doporučení výrobce kolony ZirChrom<sup>®</sup>-CARB je uvedena minimální teplota analýzy 50 °C. <sup>(35)</sup> Pokles retenčních faktorů při vyšších teplotách není tak výrazný, jako byl pozorován u studie se zirkoniovými kolonami b-ZrO<sub>2</sub> a Zr-PBD. Tento jev může být připisován uhlíkové vrstvě na povrchu Zr-C. Naopak při studii zaměřené na polární sloučeniny na zirkoniových kolonách při HILIC podmínkách bylo zjištěno, že retence karboxylových kyselin na koloně Zr-C při vyšší teplotě stoupá. <sup>(28; 31)</sup>



*Graf č. 5 Retenční chování ACI a GUA při zvyšování teploty. ACI je znázorněn modrou křivkou, GUA červenou. Mobilní fáze o celkové koncentraci 10 mM byla složena z ACN : MeOH : vodné fáze s triethylaminem v poměru 60:25:15.*

*Komentář:* Z grafu č. 5 vyplývá, že při rostoucí teplotě se nepatrně snižuje retence ACI a GUA. Zvyšování teploty má na mobilní fáze s fluoridem amonným a triethylaminem podobný vliv.

## 5.6. Vliv změny poměru ACN a EtOH nebo ACN a propan-2-olu v mobilní fázi

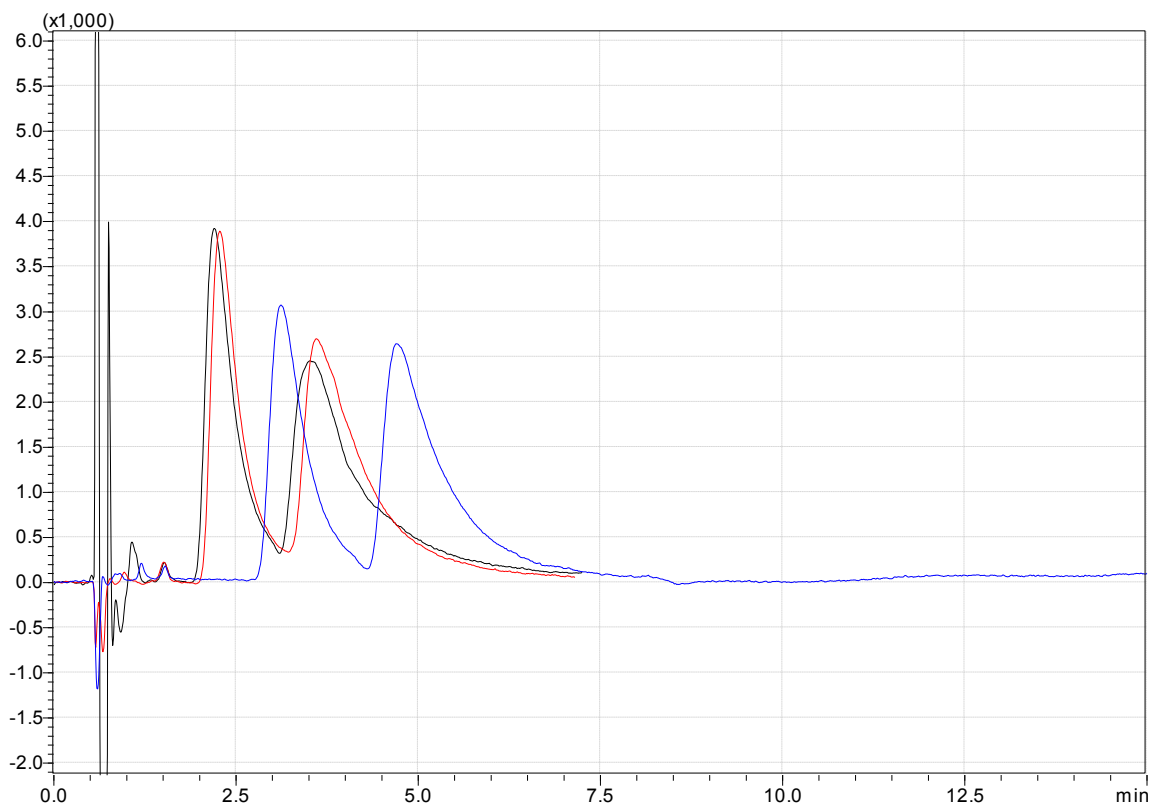
Sledování vlivu změn poměrů ACN a EtOH nebo ACN a propan-2-olu v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu. Vodná složka s kyselinou trifluoroctovou zaujímala v mobilních fázích buď 15 %, nebo 10 % anebo také 5 %.

Složení mobilních fází s 15 % vodné složky

- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 60:25:15; pH mobilní fáze: 2,48
- ACN : propan-2-ol : vodná fáze s TFA – 60:25:15; pH mobilní fáze: 2,49
- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 35:50:15; pH: 2,91
- ACN : propan-2-ol : vodná fáze s TFA – 35:50:15; pH: 3,02
- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 25:60:15; pH: 3,05
- ACN : propan-2-ol : vodná fáze s TFA – 25:60:15; pH: 3,21
- pH vodné fáze: 2,46
- Molarita TFA v mobilní fázi: 0,5 mM
- Teplota 70 °C

Množství ethanolu nebo propan-2-olu	Retenční faktory			
	Ethanol		Propan-2-ol	
	ACI	GUA	ACI	GUA
25 %	4,38	7,10	5,72	9,48
50 %	2,91	5,22	3,82	8,07
60 %	2,81	6,71	2,82	6,67

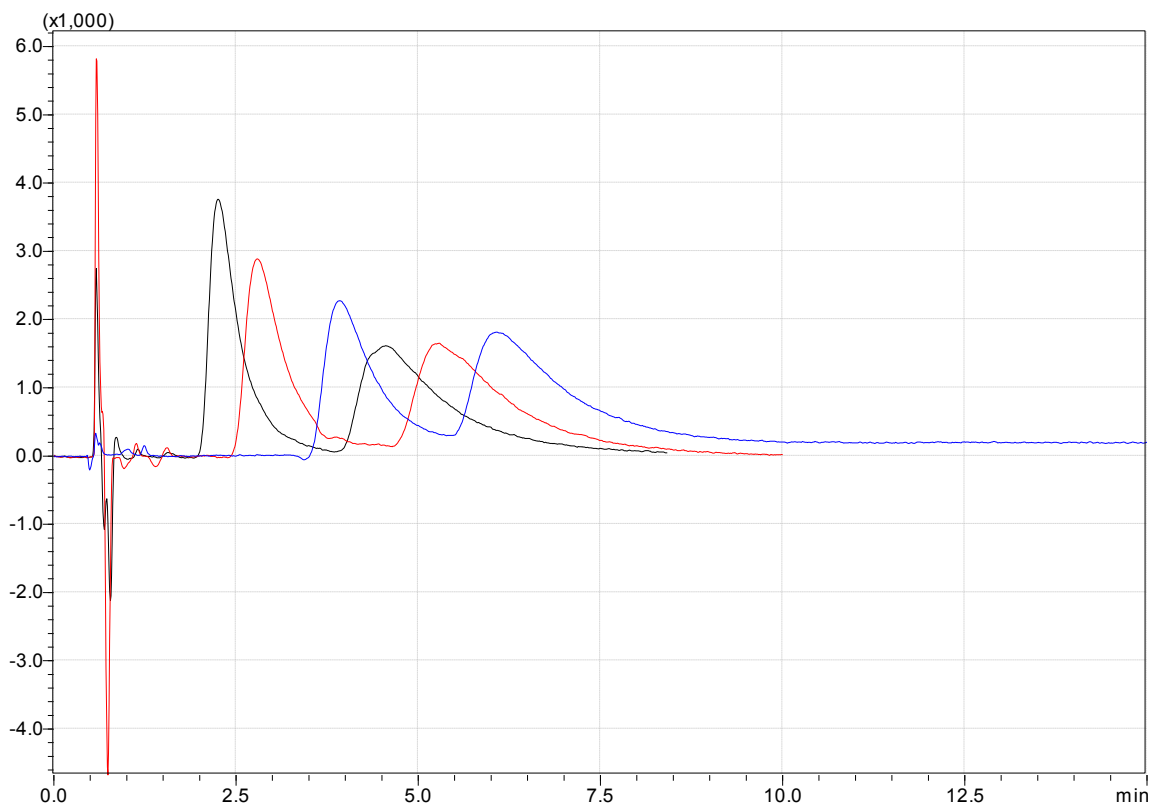
*Tabulka č. 9 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu nebo acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu. Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 15 %.*



Obrázek č. 25 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku. Ve směsném vzorku je aciklovir první pík a guanin druhý pík. Zastoupení vodné složky činní 15 %. Černá – 60 % EtOH, červená – 50 % EtOH a modrá – 25 % EtOH.

*Komentář:* Zvyšováním množství ethanolu v mobilní fázi docházelo ke zkrácení retence ACI a GUA a zároveň větší množství ethanolu nemělo příznivý vliv na rozlišení píků acikloviru a guaninu. Zvýšením množství ACN v mobilní fázi dochází k prodloužení retence ACI a GUA. Na retenci se podílí zadržování hydrofilních analytů v polárnější, tedy vodné části mobilní fáze.

V diplomové práci Lucie Bouzkové <sup>(1)</sup> byl sledován vliv změny poměru acetonitrilu a methanolu na retenci acikloviru a guaninu. Zatímco v mobilních fázích s obsahem methanolu (25 %, 50 % a 60 %) byly retenční faktory acikloviru srovnatelné, tj. 3,5; 3,5 a 3,2, tak v mobilních fázích s obsahem ethanolu 25 % a 50 % byl zaznamenán pokles retenčního faktoru acikloviru téměř o polovinu, jak je patrné z tabulky č. 9. Použitím mobilní fáze s ethanolom dostaneme i lepší rozlišení mezi píky acikloviru a guaninu. Pokud byl obsah methanolu v mobilních fázích větší než 25 %, píky acikloviru a guaninu se eluovaly v přibližně stejný čas. <sup>(1)</sup> Zatímco u mobilních fází s ethanolom bylo rozlišení píků acikloviru a guaninu vždy patrné.



Obrázek č. 26 Vliv změny poměru acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku. Ve směsném vzorku je aciklovir první pík a guanin druhý pík. Zastoupení vodné složky činní 15 %. Černá – 60 % propan-2-olu; červená – 50 % propan-2-olu a modrá 25 % propan-2-olu.

*Komentář:* Se zvyšujícím se množstvím propan-2-olu v mobilní fázi retenční faktory ACI a GUA klesají. Naopak rozlišení mezi píky s vyšším procentuálním zastoupením propan-2-olu v mobilní fázi roste a zlepšuje se i jejich tvar. V mobilní fázi s 25 % propan-2-olu je rozlišení (1,21); 50 % (1,51) a 60 % (1,73). Píky guaninu nemají dobrou symetrii. Retenční faktory ACI a GUA jsou vyšší než v předchozím případě, kdy byl v mobilní fázi použit ethanol. Což odpovídá vzájemnému postavení rozpouštědel v eluotropní řadě.

Další měření bylo provedeno u mobilních fází, ve kterých vodná složka zaujímala 10 % a opět se měnil poměr ACN a EtOH nebo ACN a propan-2-olu.

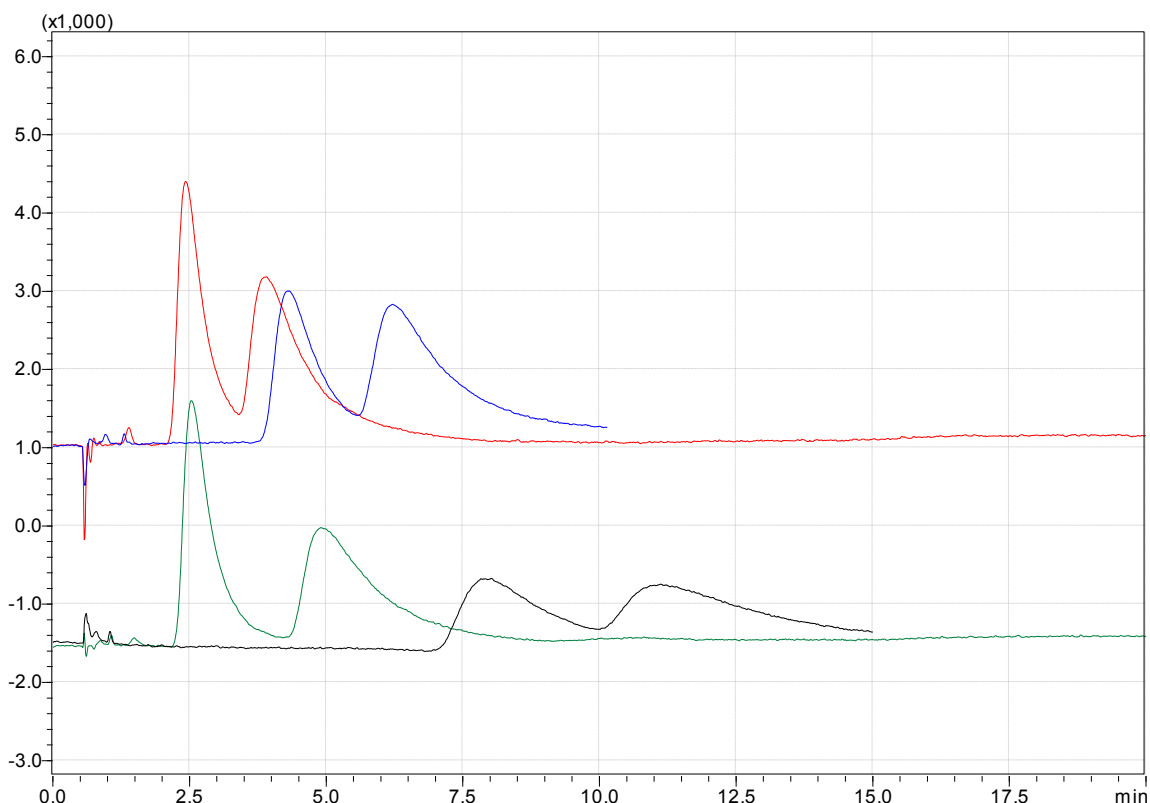
Složení mobilních fází:

- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 65:25:10; pH: 2,28
- ACN : propan-2-ol : vodná fáze s TFA – 65:25:10; pH: 2,30
- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 25:65:10; pH: 3,01
- ACN : propan-2-ol : vodná fáze s TFA – 25:65:10; pH 3,02

- pH vodné fáze s TFA: 2,23
- molarita TFA v mobilní fázi: 0,5 mM a teplota 70 °C

Množství ethanolu nebo propan-2-olu	Retenční faktory			
	Ethanol		Propan-2-ol	
	ACI	GUA	ACI	GUA
25 %	5,64	8,57	11,33	16,11
65 %	3,18	5,73	3,36	7,44

Tabulka č. 10 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu nebo acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu. Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 10 %.



Obrázek č. 27 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu nebo acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu. Ve směsném vzorku aciklovir představuje první pík a guanin druhý pík. Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 10 %. Červená – 65 % EtOH, modrá – 25 % EtOH; zelená – 65 % propan-2-olu, černá – 25 % propan-2-olu.

*Komentář:* Z chromatogramu vyplývá, že větší množství ethanolu nebo propan-2-olu v mobilní fázi posouvá retenci acikloviru i guaninu dopředu a zároveň se zlepšuje symetrie píků.

Následně bylo provedeno porovnání vlivu změny poměru ACN a EtOH u mobilních fází, které obsahují 5 % vodné složky, na retenci acikloviru a guaninu.

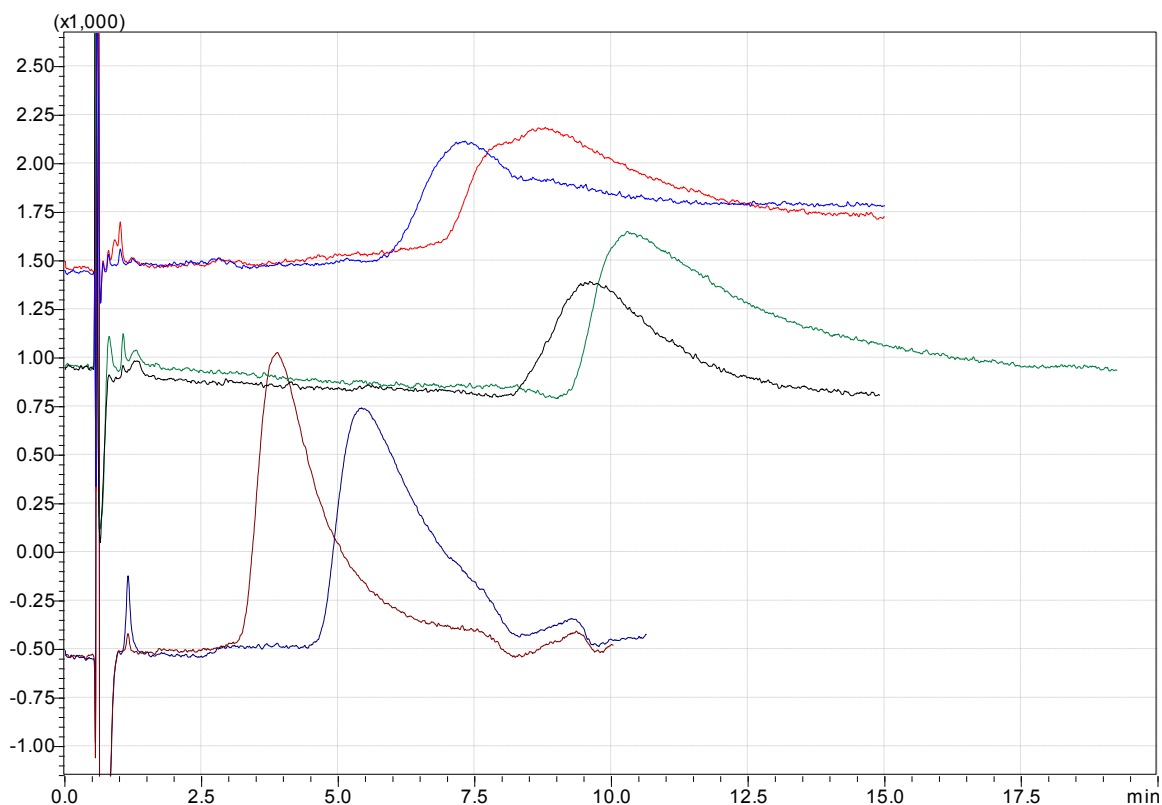


Složení mobilních fází:

- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 45:50:5; pH: 2,31
- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 70:25:5; pH: 2,08
- ACN : EtOH : vodná fáze s TFA – 25:70:5; pH: 2,75
- pH vodné fáze: 1,92
- Molarita TFA v mobilní fázi: 0,5 mM
- Teplota 70 °C

Množství ethanolu	Retenční faktory	
	ACI	GUA
25 %	13,78	14,84
50 %	11,4	13,65
70 %	5,31	7,9

Tabulka č. 11 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu na retenci acikloviru a guaninu.  
Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 5 %.



Obrázek č. 28 Ovlivnění retence acikloviru a guaninu změnou poměru ACN a EtOH v mobilní fázi, ve které vodná složka tvoří 5 %. Černá – ACI a zelená – GUA v mobilní fázi s 25 % EtOH; modrá – ACI a červená – GUA v mobilní fázi s 50 % EtOH; hnědá – ACI a tmavě modrá – GUA v mobilní fázi s 70 % EtOH.

*Komentář:* Pokud se v mobilní fázi zvyšuje množství ethanolu retence ACI i GUA klesá, což je patrné z předchozí tabulky č. 11. Ovlivnění vzájemného poměru acetonitrilu a ethanolu v mobilní fázi, ve které vodná složka zaujímá 5 %, nemělo příznivý vliv na rozlišení píků ACI a GUA.

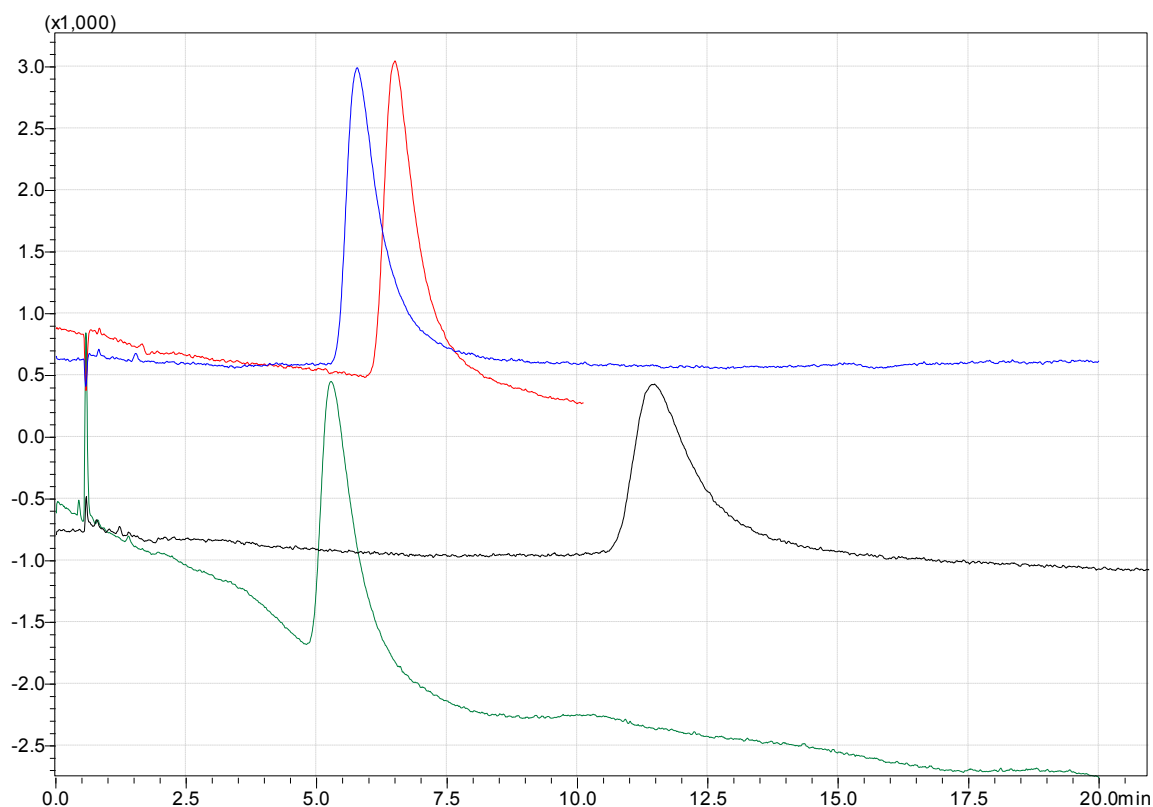
Pokud se sníží obsah vodné složky v mobilní fázi, dochází ke zvyšování retence acikloviru i guaninu. Retenční faktory obou analytů jsou v mobilních fázích s obsahem vodné složky 5 % až trojnásobně větší než v mobilních fázích, kde je vodná složka zastoupena 15 %. A dále nižší obsah vodné složky v mobilní fázi nemá dobrý vliv na rozlišení píků acikloviru a guaninu ani na jejich symetrii. I zde se na retenci podílí vodná vrstva vlivem HILIC chování jako v předchozích případech.

## 5.7. Vliv mobilní fáze s kyselinou fosforečnou na retenci

V neposlední řadě byl sledován vliv změny koncentrace kyseliny fosforečné (2,5 mM, 5 mM a 10 mM) v mobilní fázi na retenční chování acikloviru a guaninu.

Složení mobilních fází:

- ACN : EtOH : vodná složka s  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 60:25:15 (v/v);
  - molarita  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5 mM (pH = 1,99) a 5 mM (pH = 1,74)
  - pH mobilní fáze 2,5 mM: 3,02 a 5 mM: 2,82
- ACN : propan-2-ol : vodná složka s  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 60:25:15 (v/v);
  - molarita  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5 mM (pH = 1,98) a 5 mM (pH = 1,72)
  - pH mobilní fáze 2,5 mM: 3,04 a 5 mM: 2,94
- ACN : MeOH : vodná složka s  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 60:25:15 (v/v);
  - molarita  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 mM (pH = 1,69)
  - pH mobilní fáze 10 mM: 2,60
- ACN : EtOH : vodná složka s  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 25:65:10 (v/v)
  - molarita  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 mM (pH = 1,45)
  - pH mobilní fáze je 3,07
- ACN : propan-2-ol : vodná složka s  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 25:65:10 (v/v)
  - molarita  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 mM (pH = 1,46)
  - pH mobilní fáze je 3,43
- Teplota 70 °C



Obrázek č. 29 Retenční chování acikloviru v závislosti na molaritě kyseliny fosforečné v mobilní fázi ACN : EtOH : vodná složka s kyselinou fosforečnou (60:25:15, v/v) a v mobilní fázi ACN : propan-2-ol : vodná složka s kyselinou fosforečnou (60:25:15, v/v). Modrá – 2,5 mM s EtOH, červená – 5 mM s EtOH; zelená – 2,5 mM s propan-2-olem, černá – 5 mM s propan-2-olem v mobilní fázi.

*Komentář:* Za těchto podmínek se retenční faktory acikloviru pohybovaly přibližně kolem 8. Retenční časy guaninu jsou natolik velké, že nedošlo k eluci během celkového času analýzy, což bylo 30 minut. Z naměřených hodnot bylo patrné, že tyto mobilní fáze nejsou vhodné pro další analýzu.

## 6. Závěr

V teoretické části této diplomové práce jsou popsány dvě hlavní kapitoly. První z nich se zabývá fyzikálně-chemickými a farmakologickými vlastnostmi acikloviru. Je zde uveden jeho mechanismus účinku, indikace, farmakokinetika a léčivé přípravky s obsahem acikloviru dostupné na trhu v České republice. Druhá kapitola je věnována vysokoúčinné kapalinové chromatografii, která zahrnuje princip metody, popis základního schématu kapalinového chromatografu, možnosti separace a dále nejčastěji používané stacionární fáze a detektory. V rámci druhé kapitoly je také uvedena hydrofilní interakční chromatografie – HILIC ve spojení se stacionárními fázemi na bázi oxidu zirkoničitého.

Experimentální část diplomové práce se zabývá vlivem rozdílného složení mobilních fází na retenční chování acikloviru a guaninu. U mobilních fází, které obsahovaly ve vodné složce fluoridy, byla retence analytů ovlivněna interakcí probíhající na základě výměny ligandů. Fluoridy se chovají jako Lewisovy baze a vytvářejí kompetici s analyty o vazebná místa typu Lewisovy kyseliny na povrchu kolony. Při vyšších koncentracích fluoridů v mobilních fázích docházelo ke zkrácení retence acikloviru a guaninu vlivem kompletní saturace vazebných míst na povrchu kolony.

Stejným typem interakcí ovlivňují retenci analytů i mobilní fáze, které obsahují vodnou složku s fosforečnany. Fosforečnany jsou slabší Lewisovy baze než fluoridy, což vyplývá z delších retenčních faktorů guaninu.

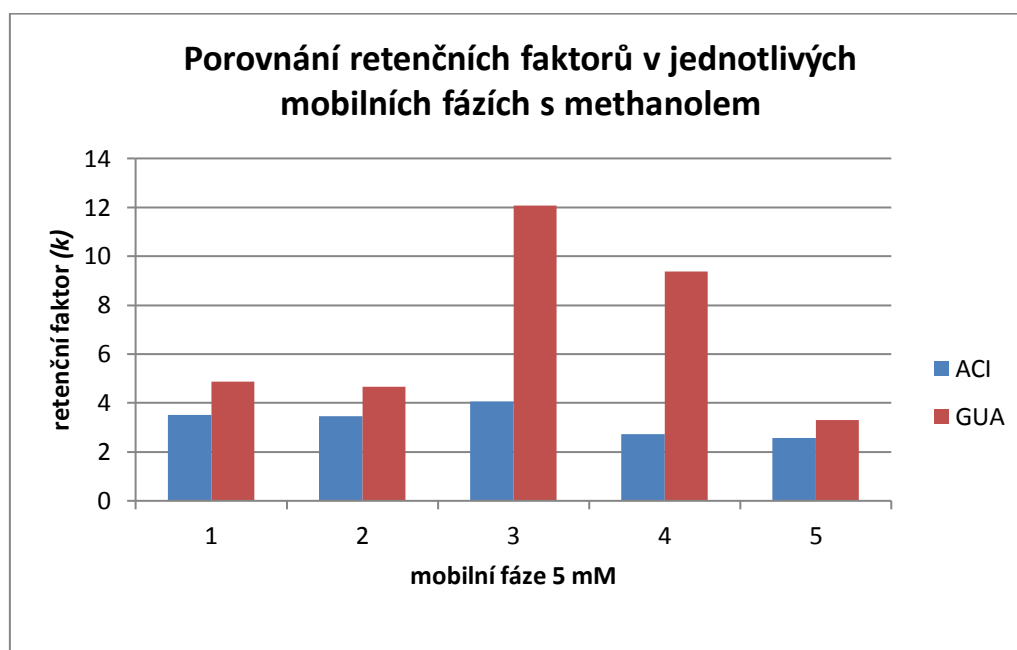
Dále byl zkoumán vliv různých koncentrací triethylaminu v mobilních fázích na retenci acikloviru a guaninu. Triethylamin se také chová jako Lewisova baze a tudíž dochází k interakcím na základě výměny ligandů. Pokud je koncentrace triethylaminu v mobilní fázi vyšší než 20 mM na separaci se zřejmě podílí i uhlíková vrstva kolony a iontové interakce, jinak by docházelo k eluci píků v mrtvém čase.

Následně byl sledován vliv teploty na retenční chování analytů. Bylo zjištěno, že se stoupající teplotou retence acikloviru i guaninu klesá a zlepšuje se symetrie jejich píků.

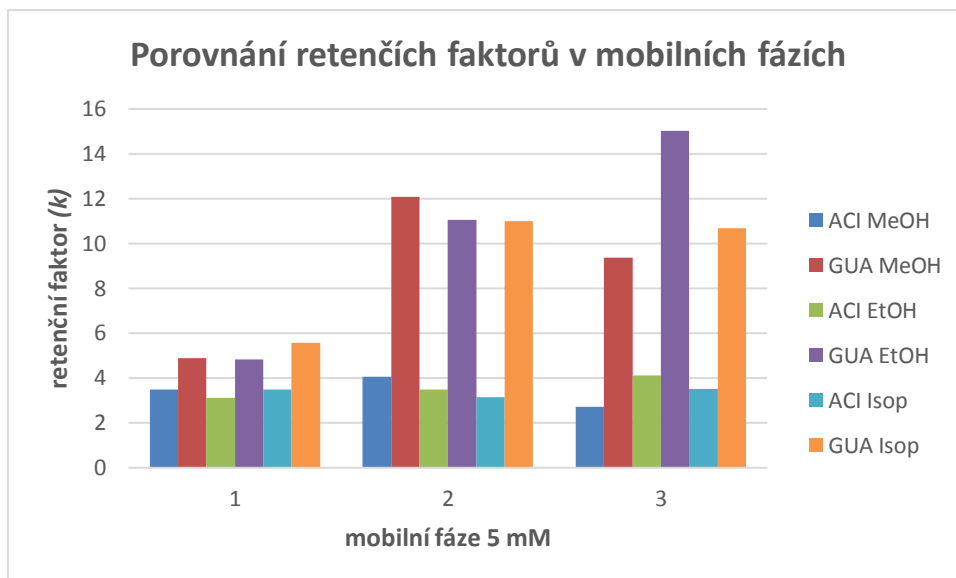
A v neposlední řadě byl popsán vliv změny poměrů mezi organickou a vodnou složkou mobilní fáze na retenci. Pokud zvyšujeme množství organické složky na úkor vodné, dochází k prodloužení retence obou analytů. Na retenci se podílí zadržování hydrofilních analytů ve vodné části mobilní fáze.

Pokud byla součástí vodné složky v mobilních fázích kyselina fosforečná, retenční časy guaninu byly delší než celkový čas analýzy, tedy 30 minut. Mobilní fáze s kyselinou fosforečnou byly vyhodnoceny jako nevhodné pro společnou analýzu acikloviru a guaninu.

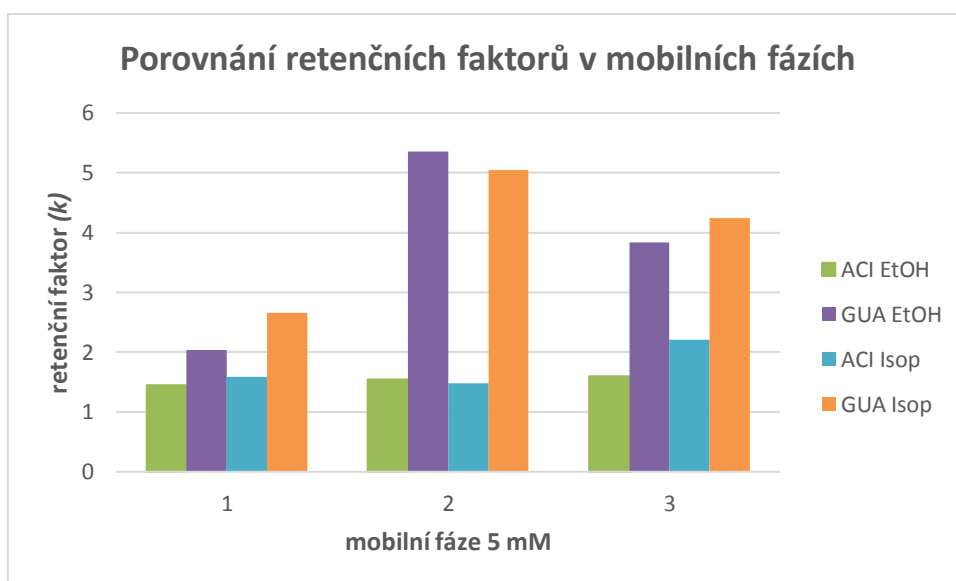
Nejlepší výsledky byly získány při eluci acikloviru a guaninu v mobilních fázích s 5 mM a 10 mM fluoridem amonným v poměru ACN : MeOH : vodná složka 60:25:15, v/v. V těchto dvou mobilních fázích měly píky acikloviru a guaninu nejlepší symetrii a zároveň dostatečné rozlišení mezi píky obou analytů, které bylo shodné pro obě mobilní fáze, tj. 1,5. Z hlediska rozlišení pík analytů byly dosaženy nejlepší výsledky při použití mobilních fází, ve kterých vodná složka obsahuje 5 mM fosforečnanový pufr nebo 5 mM tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7 (2) v poměru ACN : EtOH : vodná složka 60:25:15, v/v. Téměř shodné rozlišení je také získáno pokud v mobilní fázi (60:25:15, v/v) vyměníme ethanol (rozlišení 3,3 a 3,2) za methanol (3,3 a 3,1) nebo propan-2-ol (2,9 a 3,2). Dostatečné rozlišení mezi píky analytů bylo též získáno změnou poměrů jednotlivých složek v mobilní fázi (25:60:15, v/v). Pokud je v mobilní fázi ethanol je rozlišení 1,8 a 2,2 a v přítomnosti propan-2-olu je rozlišení 1,7 a 2,4. Souhrnné výsledky znázorňují následující grafy.



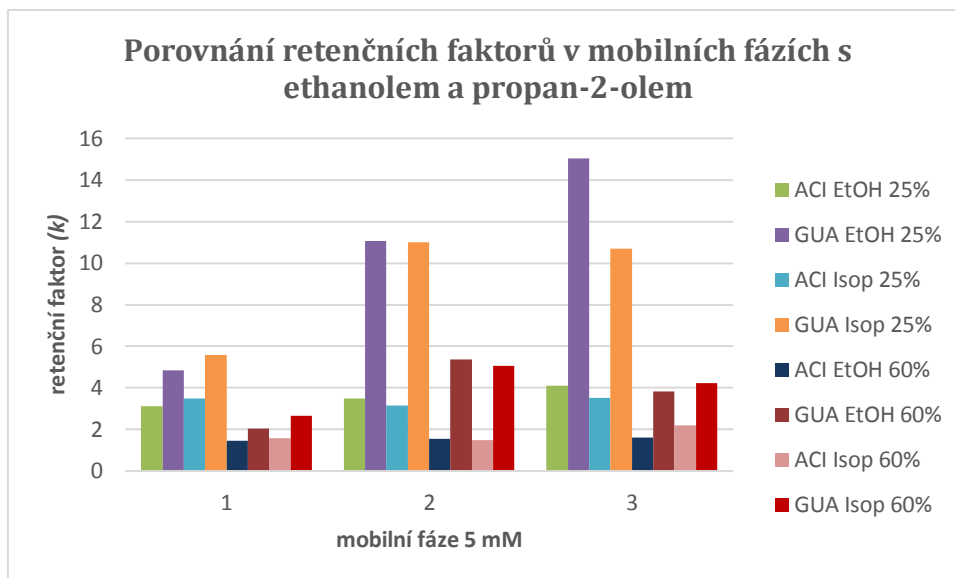
Graf č. 6 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích s methanolem a poměrem mezi jednotlivými složkami 60:25:15, v/v. (1) – fluorid amonný, (2) – fluorid sodný, (3) – tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7, (4) – fosforečnanový pufr, (5) – triethylamin.



Graf č. 7 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích s methanolem, ethanolem a propan-2-olem (Isop). Poměr mezi jednotlivými složkami je 60:25:15, v/v. (1) – fluorid amonný, (2) – tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7, (3) – fosforečnanový pufr.



Graf č. 8 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích ACN : EtOH : vodná složka a ACN : propan-2-ol : vodná složka 25:60:15, v/v. (1) – fluorid amonný, (2) – tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7, (3) – fosforečnanový pufr.



*Graf č. 9 Porovnání retence acikloviru a guaninu v mobilních fázích s ethanolem a propan-2-olem. Poměry mezi jednotlivými složkami jsou 60:25:15, v/v a 25:60:15, v/v. (1) – fluorid amonný, (2) – tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7, (3) – fosforečnanový pufr.*

Eluce acikloviru a guaninu na Zr-C koloně při HILIC podmínkách je pravděpodobně ovlivněna komplexním mechanismem, který zahrnuje výměnu ligandů, hydrofobní a hydrofilní interakce, iontové interakce a také se do separace zapojuje uhlíková vrstva stacionární fáze.



## 7. Seznam použitých zkratek

ACI	aciklovir
ACN	acetonitril
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> (chemická ionizace za atmosférického tlaku)
API	<i>atmospheric pressure ionization</i> (ionizace za atmosférického tlaku)
APPI	<i>atmospheric pressure fotoionization</i> (fotoionizace za atmosférického tlaku)
AUC	<i>area under curve</i> (plocha pod křivkou)
CAD	<i>Corona-discharge detector</i> (aerosolový detektor nabitých částic)
CARB	stacionární fáze pokrytá grafitizovaným uhlíkem
CMV	cytomegalovirus
CRL	chemická referenční látka
DAD	<i>diode-array detector</i> (detektor s diodovým polem)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deoxyribonukleová kyselina)
EBV	virus Epstein-Barrové
EI	elektronová ionizace
ELSD	<i>Evaporative light-scattering detector</i> (detektor rozptylu světla využívající odpaření)
ESI	<i>electrospray ionization</i> (ionizace elektrosprejem)
EtOH	ethanol
GC	<i>Gas chromatography</i> (plynová chromatografie)
GUA	guanin
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> (hydrofilní interakční chromatografie)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HSV-1	<i>Herpes simplex virus type 1</i> (herpetický vir typu 1)
HSV-2	<i>Herpes simplex virus type 2</i> (herpetický vir typu 2)
IEC	<i>Ion exchange chromatography</i> (iontově výměnná chromatografie)

IS	<i>internal standard</i> (vnitřní standard)
Isop	propan-2-ol
MeOH	methanol
M <sub>r</sub>	relativní molekulová hmotnost
MS	<i>Mass spektrometry</i> (hmotnostní spektrometrie)
MS/MS	<i>Tandem mass spektrometry</i> (tandemová hmotnostní spektrometrie)
NP – HPLC	<i>Normal phase HPLC</i> (chromatografie na normálních fázích)
PBD	polybutadien
PDA	<i>photodiode-array detector</i> (detektor s fotodiodovým polem)
PS	polystyren
PS-DVB	kopolymer polystyrenu a divynylbenzenu
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ribonukleová kyselina)
RP – HPLC	<i>Reverse phase HPLC</i> (chromatografie na reverzních fázích)
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (molekulová vylučovací chromatografie)
TOF	analyzátor doby letu
TFA	trifluoroctová kyselina
UV-VIS	<i>Ultra-violet/visible</i> (ultrafialová a viditelná oblast světla)
VZV	varicella zoster virus
ZIC-HILIC	zwitteriontová kolona na silikagelovém nosiči
ZIC-pHILIC	zwitteriontová kolona na polymerním nosiči
Zr-C	zirkoniová kolona potažená elementárním uhlíkem
Zr-PBD	zirkoniová kolona potažená vrstvou polybutadienu
Zr-PS	zirkoniová kolona potažená vrstvou polystyrenu

## 8. Seznam obrázků

Obrázek č. 1 Aktivace a mechanismus účinku acikloviru .....	12
Obrázek č. 2 Princip separace .....	18
Obrázek č. 3 Schéma kapalinového chromatografu .....	19
Obrázek č. 4 Princip separace gelové chromatografie .....	21
Obrázek č. 5 HILIC kombinuje vlastnosti chromatografických metod .....	22
Obrázek č. 6 Princip hydrofilní interakční chromatografie. Stacionární fáze patří mezi zwitteriontové stacionární fáze .....	23
Obrázek č. 7 Ovlivnění selektivity HILIC separace změnou mobilní fáze .....	25
Obrázek č. 8 Silanolové skupiny na povrchu silikagelu.....	27
Obrázek č. 9 Typy skupin na povrchu zirkoniové stacionární fáze, Brønstedova kyselina, Brønstedova báze, Lewisova kyselina.....	29
Obrázek č. 10 Struktura hybridní anorganicko-organické částice sorbentu .....	30
Obrázek č. 11 Schéma detektoru s diodovým polem. ....	34
Obrázek č. 12 Schéma fluorescenčního detektoru. ....	35
Obrázek č. 13 Znázornění procesu detekce hmotnostní spektrometrií.....	36
Obrázek č. 14 Retenční časy .....	39
Obrázek č. 15 Grafické znázornění výpočtu asymetrie píku .....	41
Obrázek č. 16 Retenční chování směsného vzorku acikloviru a guaninu v závislosti na koncentraci fluoridu amonného v mobilní fázi. ....	53
Obrázek č. 17 Vliv koncentrace mobilní fáze s fluoridem sodným na retenci acikloviru a guaninu .....	55
Obrázek č. 18 Retenční chování směsného vzorku acikloviru a guaninu v závislosti na změně poměru organické a vodné fáze.....	56
Obrázek č. 19 Změny retenčního chování směsného vzorku acikloviru a guaninu související s různými poměry mezi vodnou složkou s fluoridem amonným a ethanolem v mobilní fázi. .	58
Obrázek č. 20 Vliv koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku. ....	60
Obrázek č. 21 Vliv změny poměru organických rozpouštědel v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku.....	62
Obrázek č. 22 Retenční chování acikloviru a guaninu v závislosti na různých koncentracích triethylaminu v mobilní fázi.....	65
Obrázek č. 23 Retenční chování acikloviru a guaninu ovlivněné zastoupením jednotlivých složek mobilních fází.....	66
Obrázek č. 24 Retenční chování ACI a GUA při změnách teploty.....	67

Obrázek č. 25 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku. ....	70
Obrázek č. 26 Vliv změny poměru acetonitrilu a propan-2olu na retenci acikloviru a guaninu ve směsném vzorku. ....	71
Obrázek č. 27 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu nebo acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu. ....	72
Obrázek č. 28 Ovlivnění retence acikloviru a guaninu změnou poměru ACN a EtOH v mobilní fázi, ve které vodná složka tvoří 5 %. ....	73
Obrázek č. 29 Retenční chování acikloviru v závislosti na molaritě kyseliny fosforečné v mobilní fázi ACN : EtOH : vodná složka s kyselinou fosforečnou (60:25:15, v/v) a v mobilní fázi ACN : propan-2-ol : vodná složka s kyselinou fosforečnou (60:25:15, v/v). ....	76

## 9. Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Složení mobilních fází .....	48
Tabulka č. 2 Hodnoty pH mobilních fází s fluoridem amonným v různých koncentracích. ....	52
Tabulka č. 3 Hodnoty pH vodné složky s fosforečnanovým pufrem a celkové pH mobilní fáze .....	59
Tabulka č. 4 Retenční faktory acikloviru a guaninu v závislosti na použitých organických rozpouštědlech a jejich obsahu v mobilní fázi .....	61
Tabulka č. 5 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích s 5 mM fluoridem amonným, fosforečnanovým pufrem a tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7 .....	63
Tabulka č. 6 Hodnoty pH mobilních fází s triethylaminem v různých koncentracích. ....	64
Tabulka č. 7 Celkové pH mobilních fází lišících se zastoupením jednotlivých složek (ACN : MeOH : triethylamin). ....	66
Tabulka č. 8 Retenční faktory acikloviru a guaninu při různých teplotách. ....	67
Tabulka č. 9 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu nebo acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu. Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 15 % .....	69
Tabulka č. 10 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu nebo acetonitrilu a propan-2-olu na retenci acikloviru a guaninu. Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 10 % .....	72
Tabulka č. 11 Vliv změny poměru acetonitrilu a ethanolu na retenci acikloviru a guaninu. Zastoupení vodné složky v mobilní fázi je 5 % .....	73

## 10. Seznam grafů

Graf č. 1 Vliv koncentrace fluoridu amonného na retenci acikloviru a guaninu. ....	53
Graf č. 2 Porovnání retenčního chování acikloviru a guaninu v mobilních fázích s fluoridem amonným a fluoridem sodným o koncentracích 5 mM a 10 mM .....	55
Graf č. 3 Vliv koncentrace fosforečnanového pufru na retenci acikloviru a guaninu.....	60
Graf č. 4 Vliv koncentrace triethylaminu v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu .....	64
Graf č. 5 Retenční chování ACI a GUA při zvyšování teploty.....	68
Graf č. 6 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích s methanolem a poměrem mezi jednotlivými složkami 60:25:15, v/v. ....	78
Graf č. 7 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích s methanolem, ethanolem a propan-2-olem (Isop). Poměr mezi jednotlivými složkami je 60:25:15, v/v .....	79
Graf č. 8 Porovnání retenčních faktorů acikloviru a guaninu v mobilních fázích ACN : EtOH : vodná složka a ACN : propan-2-ol : vodná složka 25:60:15, v/v .....	79
Graf č. 9 Porovnání retence acikloviru a guaninu v mobilních fázích s ethanolem a propan-2-olem. Poměry mezi jednotlivými složkami jsou 60:25:15, v/v a 25:60:15, v/v .....	80

## 11. Seznam literatury

1. L., Bouzková. HILIC separace acikloviru a jeho degradačního produktu. Hradec Králové : 2016.
2. *Český lékopis 2009 - Doplněk 2014*. místo neznámé : Grada Publishing, a.s., 2014. ISBN 978-80-247-5193-1.
3. Pubchem, open chemistry database. [Online] National Institutes of Health. [Citace: 12. Únor 2017.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2022#section=Top>.
4. Lincová D., Farghali H., a kolektiv. *Základní a aplikovaná farmakoterapie*. druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha : Galén, 2007. stránky 514-517. ISBN 978-80-7262-373-0.
5. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*. překlad 15., zcela přepracované vydání. Praha : Grada Publishing a.s., 2004. stránky 536-529. ISBN 80-247-0836-1.
6. Burton L. L., Lazo S. J., Parker L. K. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. eleventh edition. New York : McGraw-Hill, 2006. stránky 1243-1250. ISBN 0-07-142280-3.
7. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 12. 12. 2014. Souhrn údajů o přípravku Zovirax 400 mg. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0013704>.
8. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 15. 11. 2013. Souhrn údajů o přípravku Herpesin 400. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0155936>.
9. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 6. 8. 2015. Souhrn údajů o přípravku Aciclovir AL krém. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0047714>.
10. Haefeli W. E., Schoenenberger R. A. Z., Weiss P., Ritz R. F. Acyclovir-Induced Neurotoxicity: Concentration-Side Effect Relationship in Acyclovir Overdose. *The American Journal of Medicine*. Únor 1993, Sv. 94, 2, stránky 212-215.
11. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch\\_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Bcategory\\_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=aciclovir&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Bcategory_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=aciclovir&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D).
12. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 15. 11. 2013. Souhrn údajů o přípravku Herpesin 250. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0155939>.
13. Kovaříková P., Stariat J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC - Historie a základní principy.

[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod\\_resource/content/7/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%201\\_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod_resource/content/7/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%201_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf).

14. Kazakevich Y., Lobrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, New Jersey : JOHN WILEY & SONS, 2007. ISBN 978-0-471-68162-5.

15. Klimeš J. a kol. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.

16. Laboratoryinfo.com all about medical laboratories. [Online] Červenec 2015.  
<http://laboratoryinfo.com/hplc/>.

17. Nováková L., Douša M., a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Praha : Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

18. Kovaříková P., Striat J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC - Popis základního hardwaru.  
[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%202\\_HPLC%20instrumentace.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%202_HPLC%20instrumentace.pdf).

19. Waters The Science of what's possible. [Online] 2017.  
[http://www.waters.com/waters/en\\_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_CZ](http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ).

20. Kovaříková P., Stariat J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC - Stacionární fáze a separační módy.  
[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod\\_resource/content/1/Lekce%204\\_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod_resource/content/1/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf).

21. M., Douša. Teorie HPLC / Základy HPLC. [Online] <http://www.hplc.cz/>.

22. J., Vávrová. [Online] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAZG.htm>.

23. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Leden 2012, Sv. 402, 1, stránky 231-247.

24. Boersema P. J., Mohammed S., Heck A. J. R. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Květen 2008, Sv. 391, 1, stránky 151-159.

25. P., Jandera. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of separation science*. 2008, Sv. 31, stránky 1421-1437.



26. Hemström P., Igrum K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science*. 2006, Sv. 29, stránky 1784-1821.
27. KNAUER. What does HILIC mean? [Online] 2017.  
<http://www.knauer.net/knowledge/faq/detail/703-what-does-hilic-mean.html>.
28. Kalau P., Kučera R., Klimeš J. The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase. *Journal of Chromatography A*. 2012, Sv. 1232, stránky 242-247.
29. Sýkora D., Tesařová E., a kol. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*. 2007, Sv. 101, stránky 190-199.
30. ZirChrom Separations, Inc. [Online] 2004. ZirChrom®-EZ & ZirChrom®-MS Method Development Guide. <http://www.zirchrom.com/pdf/DRPMDG.pdf>.
31. Kučera R., Kovaříková P., Klivický M., Klimeš J. The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions. *Journal of Chromatography A*. 2011, Sv. 1218, stránky 6981-6986.
32. McNeff C., Johnson K., Henry R. ZirChrom Separations, Inc. [Online] 2014. Method development with Zirconia - based Stationary Phases.  
<https://www.zirchrom.com/pdf/e2014.pdf>.
33. ZirChrom Separations, Inc. HPLC Column Product Guide. [Online] 2013 - 2014.  
<http://www.zirchrom.com/pdf/Catalog2013to2014.pdf>.
34. Jackson P. T., Carr P. W. Improving reversed-phase liquid chromatography. *Chemtech*. Říjen 1998, Sv. 29.
35. ZirChrom Separations, Inc. [Online] Květen 2002. Reversed-Phase Method Development Guide. <http://www.zirchrom.com/pdf/RPMDG.pdf>.
36. Kalau P., a kolektiv. An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009, Sv. 49, stránky 1150-1156.
37. Cheng, Yung-Fong a al., et. Hybrid Organic-Inorganic Particle Technology: Breaking Trough Traditional Barriers of HPLC Separations. *LC GC*. Listopad 2000, Sv. 18, 11, stránky 1162-1172.
38. Kovaříková P., Stariat J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC - Detektory.  
[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%203\\_Detektory.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%203_Detektory.pdf).

39. J., Vávrová. Hmotnostní spektrometrie. [Online]  
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/JVATE.htm>.
40. Kovaříková P., Stariat J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.  
[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod\\_resource/content/6/Lekce%206\\_MS.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod_resource/content/6/Lekce%206_MS.pdf).
41. M., Klusáčková. Chromatografie "Královna analýz". [Online] Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, AVČR, v.v.i., přednáška. <http://docplayer.cz/2058765-Chromatografie-kralovna-analyz.html>.
42. Nováková L., Douša M., a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* 1. vydání. Praha : Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.