

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Hodnocení vlastností nových typů zwitteriontových
stacionárních fází v HILIC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Daniela Nováková

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Daniela Nováková

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení vlastností nových typů zwitteriontových stacionárních fází v HILIC

Cílem této diplomové práce bylo porovnat mezi sebou šest nových zwitteriontových kolon Astra ZWIX (3 μm , 2,1 x 100 mm) firmy Chromservis s.r.o. K analýze bylo využito pět skupin látek, a to nukleové baze a nukleosidy, deriváty kyseliny nikotinové, hydrofilní vitamíny, betablokátory a fenolické kyseliny. Tyto skupiny látek byly pro porovnání analyzovány i na komerčně dostupných kolonách – BEH Z HILIC, SYNCRONIS, OMEGA SUGAR, BEH HILIC a BEH AMIDE (OMEGA SUGAR 3 μm , 2,1 x 100 mm; ostatní kolony 1,7 μm , 2,1 x 100 mm). Byly zkoumány tyto parametry: retenční čas, rozlišení, asymetrie, šířka píku v polovině jeho výšky. Poté byla provedena optimalizace, která měla za cíl zlepšit separaci píků nukleových bazí a nukleosidů, hydrofilních vitamínů a betablokátorů. Byl optimalizován gradient mobilní fáze, teplota kolony a průtok mobilní fáze.

Bylo zjištěno, že selektivita kolon se v rámci šarže neliší. Podmínka opakovatelnosti retenčního času byla splněna u všech analytů na všech kolonách, vyjma 3,5-DHBA na koloně A00280 při pH 3. Píky analytů jsou většinou symetrické, pouze u několika lze pozorovat mírné frontování nebo chvostování.

Oproti komerčně dostupným kolonám vykazují kolony Astra ZWIX mírně horší vlastnosti – píky na kolonách Astra ZWIX mají nižší hodnoty rozlišení, vyšší hodnoty asymetrie a širší píky, což je způsobeno tím, že kolony Astra ZWIX mají větší částice.

Klíčová slova: HILIC, zwitteriontové kolony, Astra ZWIX, nukleové baze, nukleosidy, deriváty kyseliny nikotinové, hydrofilní vitamíny, betablokátory, fenolické kyseliny

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Daniela Nováková

Supervisor: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Evaluation of properties of new types of zwitterionic stationary phases in HILIC

The aim of this thesis was to compare six new zwitterionic Astra ZWIX columns (3 μm , 2,1 x 100 mm) from Chromservis s.r.o. Five groups of compounds were used for the analysis, namely nucleic bases and nucleosides, nicotinic acid derivatives, hydrophilic vitamins, beta-blockers, and phenolic acids. These groups of compounds were also analysed on commercially available columns – BEH Z HILIC, SYNCRONIS, OMEGA SUGAR, BEH HILIC and BEH AMIDE (OMEGA SUGAR 3 μm , 2,1 x 100 mm; other columns 1,7 μm , 2,1 x 100 mm). The investigated parameters were retention time, peak resolution, peak symmetry, and peak width at half height. Optimisation to improve peak separation of nucleic bases and nucleosides, hydrophilic vitamins, and beta-blockers was also carried out. The mobile phase gradient was optimized, as well as the column temperature, and mobile phase flow rate.

The selectivity of the columns was found not to differ within the batch. The retention time repeatability condition was met for all analytes on all columns, except for 3,5-DHBA on column A00280 at pH 3. The peaks of the analytes are mostly symmetrical, with only a few showing slight fronting or tailing.

Compared to commercially available columns, Astra ZWIX columns have slightly worse properties - peaks on Astra ZWIX columns have lower resolution values, higher asymmetry values and wider peaks, which is due to the Astra ZWIX columns having larger particles.

Keywords: HILIC, zwitterionic columns, Astra ZWIX, nucleic bases, nucleosides, nicotinic acid derivatives, hydrophilic vitamins, beta-blockers, phenolic acids

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

V Hradci Králové, dne 13.5.2023

.....

Daniela Nováková

Děkuji prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování diplomové práce, děkuji za cenné rady a věnovaný čas. Děkuji též firmě Chromservis, s.r.o. za poskytnutí kolon Astra ZWIX a zajímavého tématu pro výzkum. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Katedry analytické chemie za vstřícný přístup a poskytnuté rady. Děkuji i své rodině za podporu nejen během psaní diplomové práce, ale i v průběhu celého studia.

Obsah

Abstrakt.....	2
Abstract.....	3
Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod.....	9
2. Cíl a zadání práce	10
3. Teoretická část.....	11
3.1 Hydrofilní interakční chromatografie.....	11
3.1.1 Mobilní fáze v HILIC	12
3.1.2 Stacionární fáze v HILIC.....	12
3.1.3 Optimalizace chromatografických podmínek v HILIC.....	16
3.1.4 Parametry hodnocení chromatografické separace	16
3.2 Vlastnosti analyzovaných látek	18
3.2.1 Nukleové baze a nukleosidy	18
3.2.2 Deriváty kyseliny ninkotinové.....	20
3.2.3 Hydrofilní vitamíny.....	21
3.2.4 Betablokátory	24
3.2.5 Fenolické kyseliny	26
4. Praktická část	28
4.1 Přístrojové vybavení.....	28
4.2 Analytické kolony	28
4.3 Chemikálie	29
4.4 Standardy	29
4.5 Příprava roztoků.....	30
4.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů	30
4.5.2 Příprava pracovních roztoků.....	30
4.5.3 Příprava MF, roztoku pro uchovávání kolony a oplachových kapalin	31
4.6 Parametry metody UHPLC – PDA.....	32
4.7 Optimalizace podmínek HILIC separace.....	32
5. Výsledky a diskuze	34
5.1 Hodnocení retence.....	34
5.1.1 Nukleové baze a nukleosidy	34
5.1.2 Deriváty kyseliny nikotinové.....	44
5.1.3 Hydrofilní vitamíny.....	53
5.1.4 Betablokátory	62

5.1.5	Fenolické kyseliny	70
5.2	Hodnocení rozlišení.....	78
5.2.1	Nukleové baze a nukleosidy	78
5.2.2	Deriváty kyseliny nikotinové.....	83
5.2.3	Hydrofilní vitamíny.....	87
5.2.4	Betablokátory	91
5.2.5	Fenolické kyseliny	95
5.3	Hodnocení asymetrie píků	98
5.3.1	Nukleové baze a nukleosidy	98
5.3.2	Deriváty kyseliny nikotinové.....	103
5.3.3	Hydrofilní vitamíny.....	107
5.3.4	Betablokátory	111
5.3.5	Fenolické kyseliny	115
5.4	Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky	119
5.4.1	Nukleové baze a nukleosidy	119
5.4.2	Deriváty kyseliny nikotinové.....	124
5.4.3	Hydrofilní vitamíny.....	127
5.4.4	Betablokátory	131
5.4.5	Fenolické kyseliny	136
5.5	Optimalizace chromatografických podmínek	140
5.5.1	Změna gradientu.....	140
5.5.2	Optimalizace teploty.....	144
5.5.3	Optimalizace průtoku	146
6.	Závěr	148
7.	Seznam citací	149

Seznam použitých zkratk

5-MU	5-methyluridin
ACN	acetonitril
BB	betablokátor
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymová imunosorpční analýza
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
FP	fluorescenční detekce
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LP	léčivý přípravek
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDA	detektor s diodovým polem
RNA	ribonukleová kyselina
RP-LC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UHPLC	ultravysokoučinná kapalinová chromatografie

1. Úvod

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je progresivní analytická metoda, která v poslední době nabývá čím dál většího významu. Nachází uplatnění v analýze polárních a ionizovatelných molekul – léčiv, aminokyselin, peptidů, metabolitů a dalších, které nejsou v systému reverzních fází dostatečně zadržovány. HILIC je proto komplementární metodou ke kapalinové chromatografii na reverzních fázích (RP-LC). Je již známo mnoho stacionárních fází s odlišnou selektivitou. I česká firma Chromservis s.r.o. se rozhodla vyrobit svoje vlastní zwitteriontové kolony. Obsahují jak kladný, tak i záporný náboj, což má za následek vyrovnaný a stále nabitý povrch. Celkový náboj je blízky nule, proto je možná současná analýza kladně i záporně nabitých sloučenin.

2. Cíl a zadání práce

Tato diplomová práce se zabývá hodnocením nových typů zwitteriontových kolon pro HILIC analýzu. Cílem práce bylo porovnat mezi sebou 6 nových kolon tří šarží firmy Chromservis s.r.o. a popsat jejich vlastnosti. Odlišnosti jednotlivých šarží nelze publikovat, jde o výrobní tajemství. Pro toto stanovení bylo vybráno 5 směsí látek: nukleové baze a nukleosidy, deriváty kyseliny nikotonové, hydrofilní vitamíny, betablokátory a fenolické kyseliny. Nejprve bylo zjištěno chování těchto směsí na komerčně dostupných kolonách, kterými byly zwitteriontové kolony BEH Z HILIC a SYNCRONIS, a dále amido/aminová kolona OMEGA SUGAR, amidová kolona BEH AMIDE a silikagelová kolona BEH HILIC, aby byla vyhodnocena vhodnost těchto směsí látek. Poté byly směsi analyzovány na kolonách nových. Hodnocené parametry byly retenční čas, rozlišení, asymetrie a šířka píku v polovině jeho výšky. Měření probíhalo při pH 3 a pH 6 s UV detekcí. Byla použita gradientová eluce. Ke zlepšení separace píků některých analytů byla provedena optimalizace.

3. Teoretická část

3.1 Hydrofilní interakční chromatografie

Separální analytická metoda HILIC je módem ultravysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC), kde polární nebo ionizované analyty mohou být rozděleny na hydrofilní stacionární fázi s relativně polárním rozpouštědlem obsahujícím 2–3 % vody [1][2]. Analyty se eluují v pořadí zvyšující se hydrofility. Retenční mechanismus je komplexní, není jeden, který by byl dominantní pro všechny separace [3]. Mechanismus rozdělování mezi hydrofóbní částí MF a hydrofilní vrstvou vody immobilizované na povrchu SF a mechanismus adsorpce jsou vzájemně propojeny [1][3]. Mezi přídatné mechanismy retence patří dipól-dipól interakce, vodíkové vazby a iontová výměna [3]. Retence v HILIC je velmi složitá, závisí na typu SF, složení MF a vlastnostech analytů. Podmínky MF ovlivňující retenci analytů jsou typ a koncentrace organického rozpouštědla, pH a koncentrace aditiv ve vodné složce. Preferovaným organickým rozpouštědlem je acetonitril (ACN). Vodná fáze obsahuje soli a také kyseliny nebo baze, které regulují pH a iontovou sílu během analýzy [4]. Pufry přidané do MF ovlivňují náboj iontových skupin na SF a náboj analytů [2]. pH MF a iontová síla mohou mít vliv na retenci a separační selektivitu. Analyty mnohdy vykazují největší retenci, když jsou ve své nabitě formě, tedy baze při nízkém pH, kyseliny při vysokém pH, což je opačné chování než u RP-LC [3].

Hlavními výhodami HILIC jsou: dobrá retence i velmi polárních sloučenin, odlišná selektivita oproti RP-LC, při spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) dobrá citlivost díky vysokému procentu obsahu organické složky v MF a odlišné matricové efekty. Mezi nevýhody patří nedostatečná rozpustnost některých sloučenin v organickém rozpouštědle, vysoká spotřeba ACN a tedy i finanční náročnost, vliv rozpouštědla a dávkovaného objemu na tvar píku, pomalejší ustalování rovnováhy [5]. HILIC se využívá pro analýzu farmaceutických, biologických, potravinářských a environmentálních vzorků, v proteomice a metabolomice [6][7].

3.1.1 Mobilní fáze v HILIC

Mobilní fáze v HILIC musí obsahovat alespoň 2-3 % polárního rozpouštědla, vody nebo pufru, aby se vytvořila hydrofilní vrstva na povrchu SF [1][3]. Větší část MF tvoří organická složka, nejčastěji se jedná o acetonitril. Eluce může být buď izokratická nebo gradientová. Gradientová eluce má profil opačný než RP-LC, typicky od 98 % ACN do 50 % ACN [1]. Eluční síla polárních rozpouštědel roste v pořadí aceton < acetonitril < isopropanol < etanol < metanol < voda [3]. Voda je nejsilnější eluent, již malé zvýšení její koncentrace významně sníží retenci analytů [8]. Zvýšení koncentrace organického rozpouštědla v MF zvýší retenci polárních sloučenin. Iontová síla a pH MF ovlivní retenci a selektivitu separace ionizovatelných analytů [9]. Přidání pufrů nebo aditiv do MF ovlivní polaritu analytu, tím i jeho retenci a tvar píku [3]. Typická koncentrace pufru bývá 5–100 mM [2]. Nejčastěji se používá octan a mravenčan amonný, dále lze použít fosforečnan amonný nebo kyselinu trifluoroctovou [9].

3.1.2 Stacionární fáze v HILIC

Stacionární fáze pro HILIC separaci jsou polární, snadno adsorbují vodu a další polární rozpouštědla, což usnadní přechod analytů z MF do adsorbované polární kapalně vrstvy na povrchu SF [3]. HILIC SF můžeme rozdělit do tří skupin podle elektrostatických interakcí: neutrální (diol, kyano, polyvinylalkohol, amid, aspartamid, polyethylenimin, pentahydroxyl, polyethylenglykol, cyklodextrin), nabitě (silikagel, aminopropyl, imidazol, triazol, močovina) a zwitteriontové (sulfobetain, fosforylcholin, vícemodální SF). Separace bazických analytů je vhodná na amidových nebo sulfobetainových SF, pro separaci kyselých analytů je naopak vhodnější použít SF s propylaminovou skupinou díky iontovým interakcím aminoskupin s negativně nabitými skupinami kyselých analytů [1]. Stupeň retence nesouvisí pouze s ionizačním stavem a funkčními skupinami sledovaných analytů, ale je úměrný také polaritě SF [3].

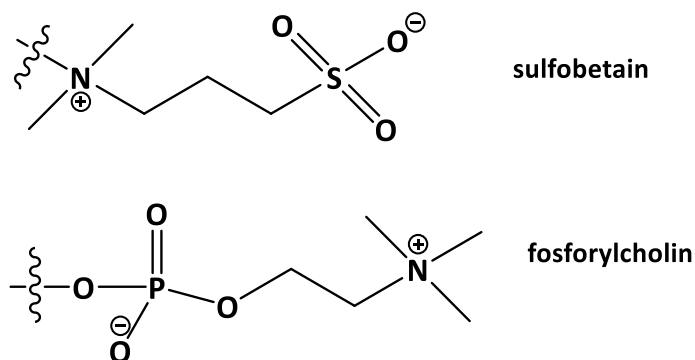
3.1.2.1 Zwitteriontové HILIC stacionární fáze

Zwitteriontové SF jsou relativně nová třída polárních SF používaných v HILIC [10]. Jejich struktura je zobrazena na Obr. 1. Nejvíce prostudované zwitteriontové SF jsou sulfobetainové [11]. Sulfobetainové fáze jsou buď na porózním silikagelu nebo polymeru s 3-sulfopropyl-dimethylalkylamoniovou funkční skupinou [10]. Aktivní

vrstva obsahuje jak silně kyselé sulfonové kyseliny, tak i silně bazické kvartérní amoniové skupiny, které jsou odděleny krátkým alkylovým řetězcem. Tyto opačně nabitě skupiny jsou přítomny v molárním poměru 1:1, takže povrchový náboj je nulový. Proto je možná současná separace aniontových a kationtových sloučenin. Reziduální silanolové skupiny jsou účinně stíněny připojením opačně nabitých funkčních skupin [8].

Sulfoalkylbetainové fáze silně adsorbují vodu. Důležité interakce na SF jsou polární (vodíkové vazby a dipól-dipól interakce), protože slabé elektrostatické interakce ovlivňují separaci analytů nesoucích pozitivní i negativní náboj [8]. Negativní náboj sulfonové skupiny na distálním konci sulfobetainové fáze může také způsobovat elektrostatické interakce s nabitými analyty [10].

Další typ zwitteriontových kolon jsou fosforylcholinové fáze, které obsahují na svém povrchu zwitteriontovou fosforylcholinovou skupinu. Rozdílem mezi těmito dvěma druhy SF je, že negativně nabitá sulfonová skupina je na distálním konci sulfobetainové fáze, zatímco u fosforylcholinové fáze je na distálním konci pozitivně nabitá kvartérní amoniová skupina [10].



Obr. 1: Struktury HILIC zwitteriontových fází, podle [10]

3.1.2.2 Využití HILIC metody se zwitteriontovými kolonami

V Tab.1 jsou uvedeny příklady látek analyzovaných na zwitteriontových HILIC kolonách a podmínky jejich analýzy. Nejčastěji byly použity sulfobetainové fáze. Analyzovány byly léčivé látky, metabolity, peptidy, oligonukleotidy, flavonoidy, pteridiny a glykany monoklonálních protilátek.

Tab.1: Příklady analyzovaných látek na zwitteriontových kolonách

látka	stacionární fáze	typ SF	mobilní fáze	detekce	citace
simvastatin	ZIC-HILIC (4,6 mm x 100 mm, velikost částic neuvedena)	sulfobetain	A: ACN, B: 40mM octan amonný (pH 4,75), gradient	UV	[12]
metabolity	ZIC-HILIC (SeQuant) (2,1 x 100 mm, 3,5 µm)	sulfobetain	A: ACN: voda = 5:95 (v/v), B: ACN: voda = 95:5 (v/v) A i B obsahovalo 5mM octan amonný (pH 6,8), gradient	ESI-MS	[13]
glykany monoklonálních protilátek	ZIC-HILIC (SeQuant) (2,1 x 150 mm, 3 µm)	sulfobetain	A: ACN, B: 0,1% kyselina octová (v/v) (pH 3,25), gradient	FP a ESI-MS	[14]
pteridiny	ZIC-HILIC (SeQuant) (2,1 x 100 mm, 3,5 µm)	sulfobetain	A: ACN, B: 14mM mravenčan amonný ve vodě (pH 6,8), gradient	ESI- MS/MS	[15]
flavonoidy	ZIC-pHILIC (SeQuant) (2,1 x 150 mm, 5 µm)	sulfobetain	A ₁ : MeOH, A ₂ : ACN, B: zásobní roztoky solí 10 mM (kys. mravenčí (pH 2,8) a mravenčan amonný (pH 7,0 nebo 9,0)), gradient	ESI-MS	[16]
peptidy	ZIC-HILIC (SeQuant) (2,1 x 100 mm, 3,5 µm)	sulfobetain	A: voda, B: (ACN:voda = 9:1) s obsahem 10mM mravenčanu amonného (pH 4,5), gradient	UV	[17]
	ZIC-cHILIC (SeQuant) 2,1 x 100 mm, 3 µm)	fosforylcholin			

látko	stacionární fáze	typ SF	mobilitní fáze	detekce	citace
β -laktámová antibiotika	ZIC-HILIC (2,1 x 20 mm, 5 μ m)	sulfobetain	A: 10% (v/v) 200mM kyselina mravenčí, pH 4,0 ve vodě, B: 10% (v/v) 200mM kys. mravenčí, pH 4,0 v ACN, gradient	ESI-MS/MS	[18]
gemifloxacin	ZIC-HILIC-C ₁₈ (4,6 x 100 mm, 5 μ m)	sulfobetain	ACN-10mM octan amonný (pH 3,5, 80:20, v/v), isokratická eluce	Fluorescenční	[19]
aminoglykosidy, amprolium, β -laktámy, linkosamidy, makrolidy, chinolony, sulfonamidy, tetracykliny	ZIC-HILIC (2,1 x 100 mm, 3,5 μ m)	sulfobetain	A: 50mM mravenčan amonný, pH 2,5, B: ACN, gradient	ESI-MS/MS	[20]
oligonukleotidy	ZIC-HILIC (Atlantis Premier BEH Z HILIC, 2,1 x 100 mm, 1,7 μ m)	sulfobetain	A: 50mM octan amonný ve vodě (pH 6,9), B: ACN, gradient	UV	[21]
	ZIC-cHILIC (2,1 x 150 mm, 3 μ m)	fosforylcholin			
	ZIC-pHILIC (2,1 x 150 mm, 5 μ m)	sulfobetain			
	Zwitterion (2 x 50 mm, 1,8 μ m)	sulfobetain			
	Zwitterion (3 x 100 mm, 2,7 μ m)	sulfobetain			
	Zwitterion (InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2,1 x 100 mm, 2,7 μ m)	sulfobetain			
	Synchronis HILIC (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m)	sulfobetain			
aminoglykosidová antibiotika	ZIC-HILIC (2,1 x 100 mm, velikost částic neuvedena)	sulfobetain	ACN – 2mM octan amonný – kyselina mravenčí, gradient	ESI-MS/MS	[22]
aminoglykosidová antibiotika	ZIC-HILIC (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m)	sulfobetain	A: 175mM mravenčan amonný (pH 4,5), B: 0,2% kyselina mravenčí v ACN, gradient	ESI-MS/MS	[9]

3.1.3 Optimalizace chromatografických podmínek v HILIC

Jako jedna z prvních metod optimalizace je doporučována změna gradientu, jež může ovlivnit rozlišení i retenční čas analytů. Nedostatečné rozlišení dvou píků lze zlepšit snížením strmosti gradientu, naopak zvýšení strmosti gradientu může pomoci při příliš velkém rozlišení. Eluují-li se první analyty příliš pozdě, lze jejich eluci urychlit zvýšením počáteční koncentrace organické složky v MF. Nedostatečné rozlišení dvou píků v určitém místě gradientu lze ovlivnit použitím méně strmého gradientu [3][23].

Změnou pH MF se změní disociace slabých kyselin nebo bazí a dojde tak ke změně jejich retence [23].

Další možností optimalizace je použití izokratického módu místo gradientového (95:5 ACN: voda s 10mM pufrům nebo s 0,2 % aditiv) nebo nahrazení podílu vodné složky v MF méně polárním rozpouštědlem (metanolem, etanolem nebo isopropylalkoholem) [3].

Dále lze použít SF s odlišnou selektivitou, změnit složení MF nebo její průtok. Použití delší kolony může zvýšit rozlišení, změna teploty kolony ovlivní difúzi analytů do pórů kolony [23].

3.1.4 Parametry hodnocení chromatografické separace

Retenční čas

Retenční čas (t_R) je základní kvalitativní charakteristika každého analytu. Je to doba od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluce (vrcholu píku) [1].

Opakovatelnost

Opakovatelnost je vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) v % pro řadu následných měření pro nejméně tři nástřiky. Lze ji vypočítat podle vzorce:

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

kde y_i značí jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku nebo retenční čas, \bar{y} průměr jednotlivých hodnot a n vyjadřuje počet jednotlivých hodnot [24]. Požadavek pro opakovatelnost retenčního času a plochy píku byl $RSD < 1 \%$.

Rozlišení

Rozlišení (R) je míra separace dvou sousedních píků. Lze jej vyjádřit rovnicí:

$$R_{1,2} = \frac{1,18 * (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy píků 1 a 2, w_{h1} a w_{h2} označují šířku píků v polovině jejich výšky [1][24]. Jako limit dostatečného rozlišení byla považována obvyklá hodnota $R > 1,5$ [24]

Symetrie píku

Symetrie píku je veličina popisující tvar píku. Prvním způsobem vyjádření symetrie píku je faktor chvostování (T_f), který lze vypočítat dle vzorce

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

kde $w_{0,05}$ značí šířku píku v 5 % jeho výšky, f značí šířku vzestupné části píku.

Druhým způsobem vyjádření je faktor symetrie (A_s), který je vyjádřen jako poměr šířky sestupné části píku (t) ku vzestupné části píku (f) v 5 nebo 10 % výšky píku:

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

Vztah mezi faktorem symetrie a faktorem chvostování lze vyjádřit rovnicí

$$A_s = 2T_f - 1$$

Pík je symetrický, je-li hodnota faktoru symetrie rovna 1,0. Je-li tento faktor $A_s > 1,0$, pík chvostuje, pokud je $A_s < 1,0$, dochází k frontování píku [1][24]. Jako limit chvostování byla považována hodnota $A_s > 1,5$ [24].

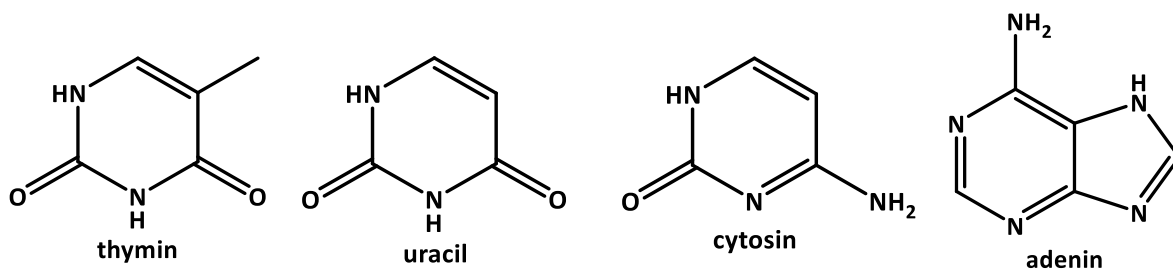
3.2 Vlastnosti analyzovaných látek

3.2.1 Nukleové baze a nukleosidy

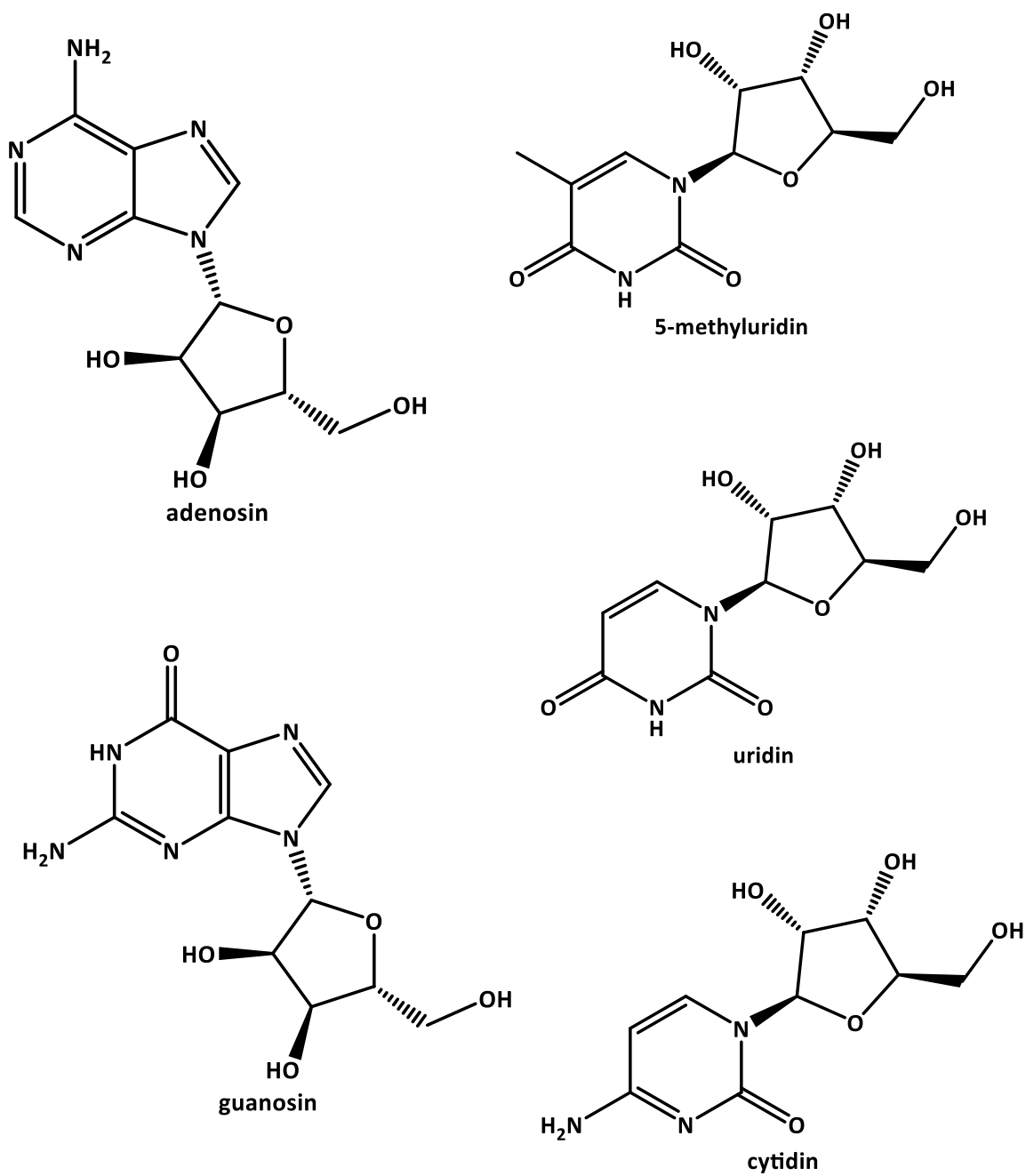
Nukleové baze, nukleosidy (vzniklé navázáním pětiuhlíkatého cukru na nukleovou bazi) a nukleotidy (vzniklé fosforylací nukleosidů) jsou základními látkami všech buněk, tvoří nukleové kyseliny, deoxyribonukleovou (DNA) a ribonukleovou (RNA), podílí se na metabolických funkcích, přenosu energie, jsou složkami koenzymů, působí jako biologické regulátory. Tělo si je dokáže samo nasyntetizovat, ale mohou být přijímány z potravy. Stanovení nukleových bazí, nukleosidů a nukleotidů má využití v biologii, potravinářském průmyslu a v medicíně. Strukturně jsou nukleové baze odvozeny od purinu (adenin, guanin) a od pyrimidinu (cytosin, thymin, uracil). Strukturní vzorce nukleových bazí a nukleosidů analyzovaných v této práci jsou zobrazeny na Obr. 2 a Obr. 3. Jejich fyzikálně chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 2. LogP analytů je záporný, pohybuje se od -2,5 až téměř k nule. Nukleové baze se stanovují z moči, krve, v rostlinách používaných v tradiční čínské medicíně. Protože jsou analyty polární, je nejlepší metodou k jejich analýze metoda HILIC. Nejčastěji se používají amidové a zwitteriontové kolony, dále např. β -cyklodextrinové kolony. Další metoda pro stanovení nukleosidů je kapilární elektroforéza (CE), RP-LC, iontově-párová RP-LC. Používá se spektrofotometrická detekce (buď UV nebo detektor s diodovým polem (PDA)), dále lze použít hmotnostně spektrometrickou (MS) detekci [25][26][27][28].

Tab. 2: Fyzikálně chemické vlastnosti nukleových bazí a nukleosidů [29][30]

analyt	MW [g/mol]	logP	pKa	pKb	rozpouštědlo	vzhled
thymin	126,11	-0,62	9,06	-5,00	50% ACN	bílý krystalický prášek
adenosin	267,24	-1,05	12,45	3,94	50% ACN	bílý krystalický prášek
uracil	112,09	-1,07	9,45	-5,50	50% ACN	bílý prášek
5-methyluridin	258,23	-1,60	9,55	-3,00	50% ACN	bílý prášek
guanosin	283,24	-1,90	10,19	0,45	50% ACN	bílý prášek
uridin	244,20	-1,98	9,70	-3,00	50% ACN	bílý prášek
cytidin	243,22	-2,51	12,55	-2,6	50% ACN	bílý krystalický prášek
cytosin	111,10	-1,73	9,00	4,18	50% ACN	bílý prášek
adenin	135,13	-0,09	10,29	3,66	50% ACN	bílý prášek



Obr. 2: Struktury nukleových bazí



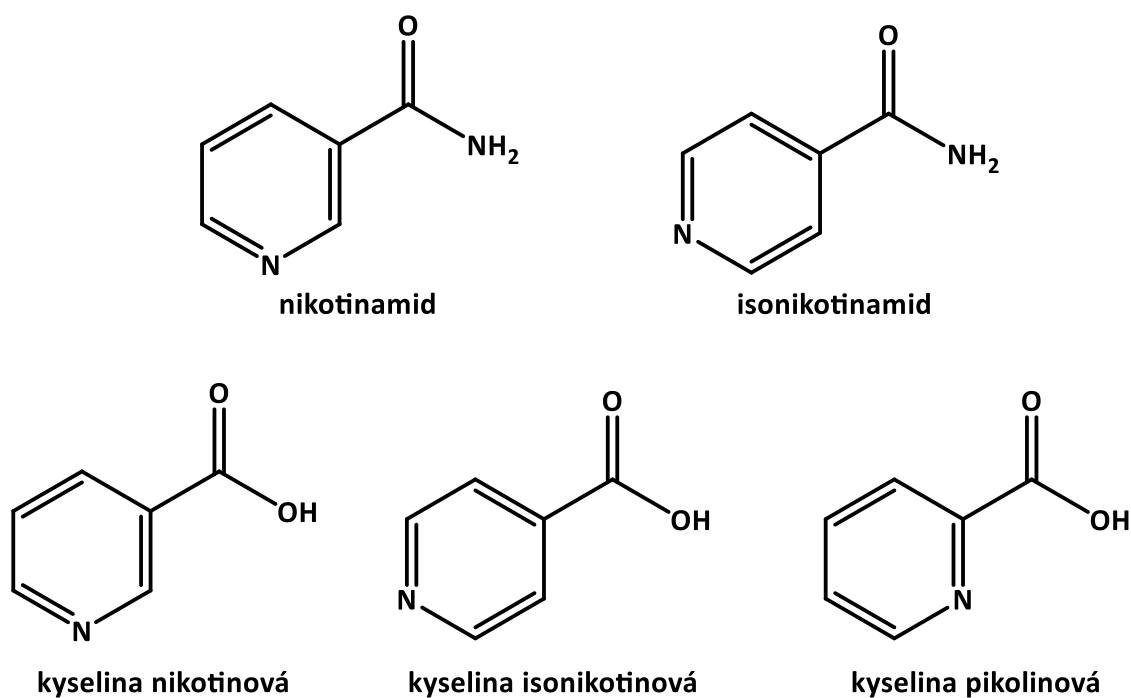
Obr. 3: Struktury nukleosidů

3.2.2 Deriváty kyseliny nikotinové

Kyselina nikotinová (vitamin B3, niacin) a nikotinamid se používají jako doplňky stravy. Gramové dávky kyseliny nikotinové snižují v krvi hladinu cholesterolu, a na rozdíl od ostatních hypolipidemik, i hladinu lipoproteinu (a) [31]. Ve formě sodné soli se používá jako profylaxe tukové embolie. V praxi se však uplatňuje jen omezeně z důvodu mnoha nežádoucích účinků. Kyselina nikotinová je provitaminem nikotinamidu, který je kofaktorem biochemických reakcí závislých na nikotinamidadenindinukleotidu (NAD) a nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP) [32]. Hydrazid kyseliny isonikotinové – izoniazid se používá jako léčivo 1. volby v terapii tuberkulózy [33]. Tyto látky jsou deriváty pyridinu, na jehož jádro je vázána buď volná karboxylová skupina nebo amid. Jejich strukturní vzorce jsou zobrazeny na Obr. 4 a jejich fyzikálně chemické vlastnosti v Tab. 3. LogP sledovaných analytů je kolem -0,35 pro amidy a 0,22 až 0,36 pro kyseliny. Stanovují se z plazmy, krve [34], séra a z moči [35]. Analyzovány byly pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS) [34], kapalinovou chromatografií (HPLC) a CE [35]. Obsahují atom dusíku, což způsobuje značné chvostování na RP-LC. Kvůli nízké hydrofilitě jsou z RP-LC rychle eluovány. Běžně se používá iontově-párový mód s C18 RP-LC kolonami. Separace se zlepší použitím CN-vázaných kolon. Kromě CE byla pro analýzu použita i micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) [35].

Tab. 3: Fyzikálně chemické vlastnosti derivátů kyseliny nikotinové [29][30]

analyt	MW [g/mol]	logP	pKa	pKb	rozpuštědlo	vzhled
nikotinamid	122,12	-0,37	13,39	3,35	50% ACN	bílý krystalický prášek
isonikotinamid	122,12	-0,34	13,39	3,35	50% ACN	bílý prášek
nikotinová kyselina	123,11	0,36	2,79	4,19	50% ACN	bílý krystalický prášek
isonikotinová kyselina	123,11	0,28	1,77	2,35	46,51% ACN	běžový prášek
pikolinová kyselina	123,11	0,22	0,99	5,52	50% ACN	bílý krystalický prášek



Obr. 4: Struktury nikotinů

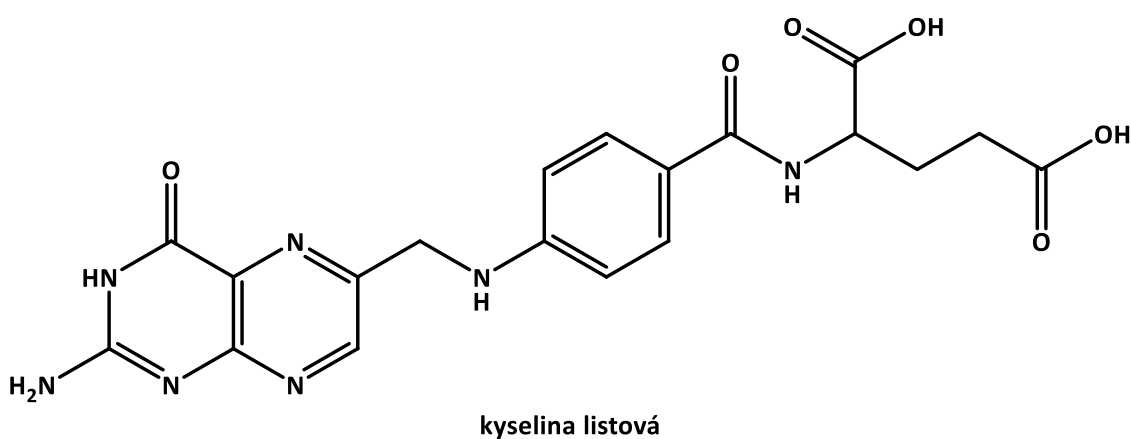
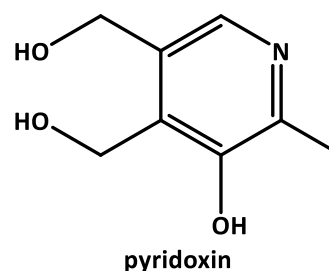
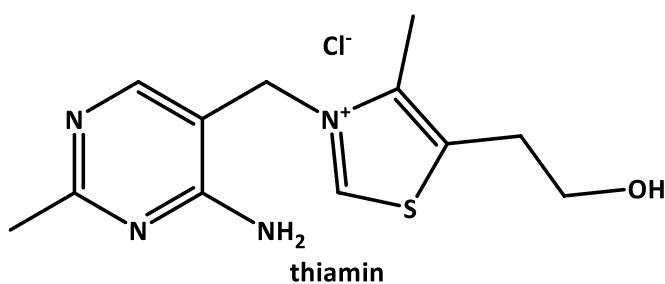
3.2.3 Hydrofilní vitamíny

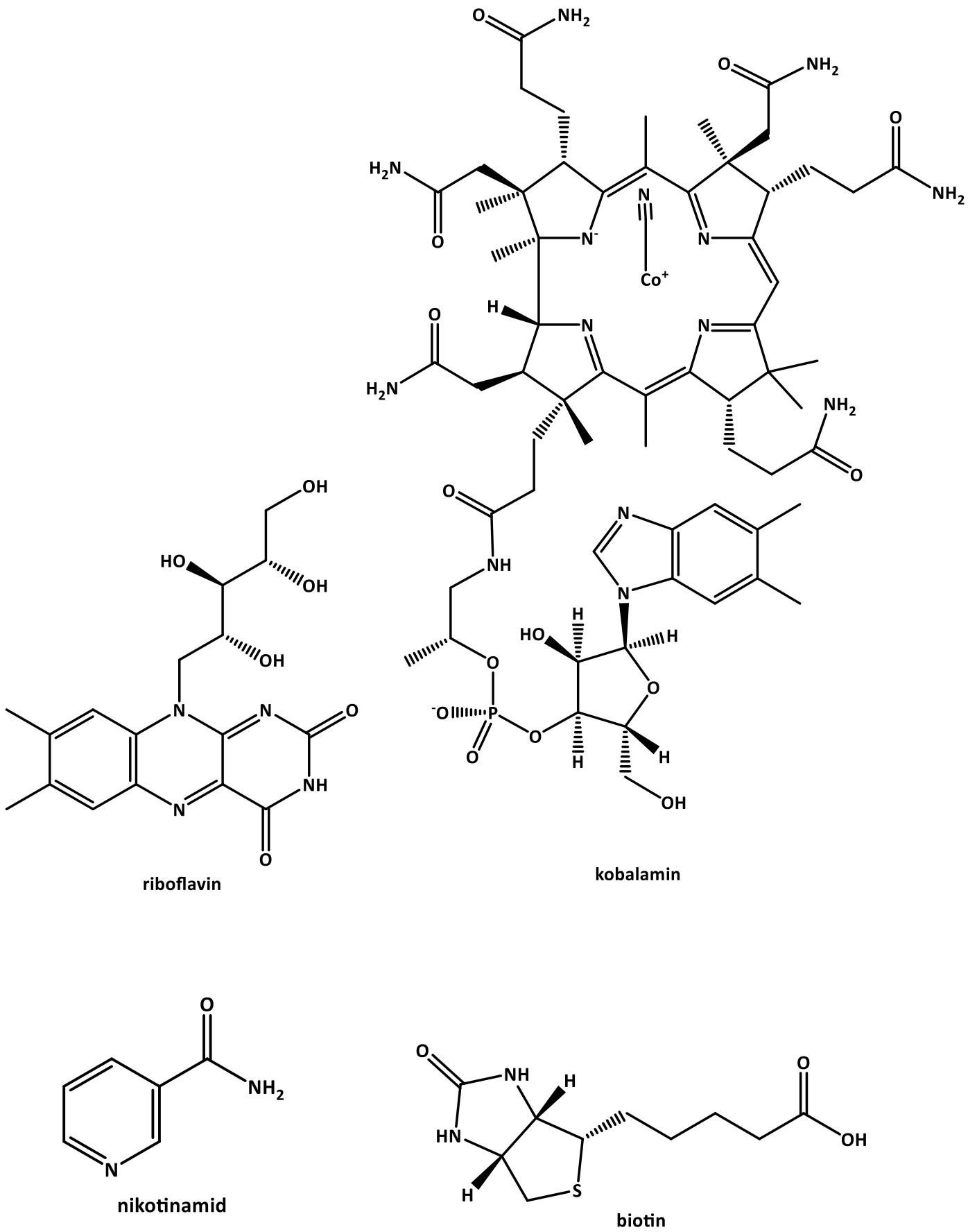
Vitamíny jsou nepostradatelné mikronutrienty, důležité pro intermediární metabolismus a specializovaný metabolismus konkrétních orgánů. V těle se přeměňují na složitější molekuly, které fungují jako koenzymy. Musí být dodávány v potravě, neboť lidské tělo je nedokáže syntetizovat. Vitamíny se dělí dle rozpustnosti na vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K) a vitamíny rozpustné ve vodě (vitamíny skupiny B, C) [36]. Nedostatek vitamínů vede k různým onemocněním. Strukturně se jednotliví zástupci výrazně liší, jejich vzorce jsou uvedeny na Obr. 5. Fyzikálně chemické vlastnosti hydrofilních vitamínů jsou uvedeny v Tab. 4. Jejich logP se pohybuje od -3 do 1,9. Stanovují se v potravinách, v léčivých přípravcích (LP), v doplňcích stravy. Nejoblíbenější technika pro analýzu hydrofilních vitamínů je RP-LC, díky výhodám jako je kompatibilita s MS detekcí, rychlé ustavení rovnováhy, lepší tvar píku a robustnost chromatografických kolon. Nejčastěji se používá kolona C18, další méně běžné kolony jsou C8, C30 a fluorované SF. S výhodou lze použít také HILIC metodu – používají se fáze na bázi silikagelu a zwitteriontové fáze. Vývoj univerzální SF pro HILIC separaci hydrofilních vitamínů je obtížný kvůli rozdílům v polaritě a přítomnosti různých funkčních skupin. Další metodou analýzy jsou techniky kapilární elektroforézy, které

jsou méně citlivé oproti chromatografickým technikám, ale vykazují vyšší účinnost. Používané metody pro stanovení hydrofilních vitamínů založené na kapilární elektroforéze jsou kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie a kapilární elektrochromatografie [37].

Tab. 4: Fyzikálně chemické vlastnosti hydrofilních vitamínů [29][30]

analyt	synonymum	MW [g/mol]	logP	pKa	pKb	rozpouštědlo	vzhled
thiamin	B ₁	265,36	-3,10	15,5	5,54	voda	bílý prášek
kobalamin	B ₁₂	1 355,40	1,90	1,84	13,57	41,67% ACN	tmavě červený prášek
kyselina listová	B ₉	441,40	-2,50	3,50	2,12	50% ACN : 100% MeOH = 1 : 1	oranžovo-žluté jehličky
riboflavin	B ₂	376,40	-1,46	10,20	1,70	50% ACN : 25% MeOH = 1 : 1	oranžovo-žlutý krystalický prášek
nikotinamid	B ₃	122,12	-0,37	13,39	3,35	50% ACN	bílý krystalický prášek
pyridoxin	B ₆	169,18	-0,77	9,40	5,58	voda	bílý prášek
biotin	B ₇	244,31	0,50	4,40	-1,90	50% ACN	bílý prášek





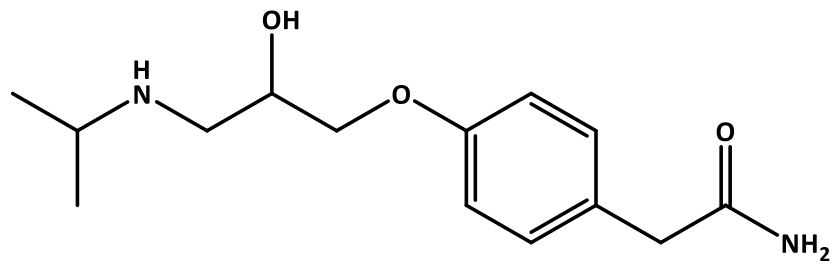
Obr. 5: Struktury hydrofilních vitamínů

3.2.4 Betablokátory

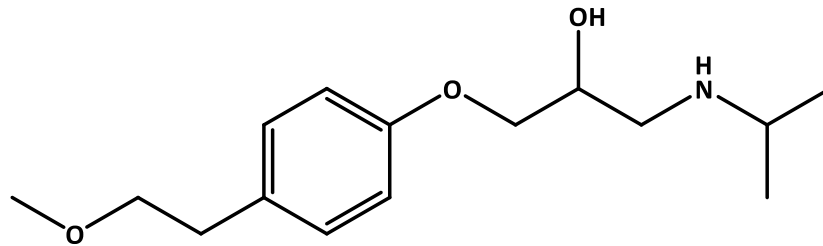
Betablokátory (BB) patří mezi základní léčiva, jež snižují morbiditu a mortalitu na kardiovaskulární onemocnění. Používají se v léčbě hypertenze, chronického srdečního selhání, arytmií, ischemické choroby srdeční, v sekundární prevenci infarktu myokardu, jako profylaktická léčba migrény a v léčbě glaukomu [38][39][40][41]. Strukturně jsou betablokátory použité v této práci aryloxyaminopropanoly, které vznikly modifikací molekuly isoprenalinu [42]. Jejich struktury jsou uvedeny na Obr. 6. a jejich fyzikálně chemické vlastnosti v Tab. 5. LogP analyzovaných BB se pohybuje od 0,16 do 4,67. Jsou analyzovány v léčivých přípravcích, v moči, v plazmě a dalších biologických vzorcích, při dopingové kontrole, v odpadních vodách. Pro analýzu betablokátorů byly vyvinuty následující metody: enzymová imunosorpční analýza (ELISA), HPLC, GC–MS, LC–MS. ELISA je nejméně selektivní metoda s nízkou citlivostí, ale lze ji s výhodou použít pro rychlý screening. HPLC analýza betablokátorů nejčastěji probíhá na kolonách C18. GC–MS a LC–MS umožňují identifikovat a kvantifikovat betablokátory, vyznačují se dobrou citlivostí, přesností a správností [43][44].

Tab. 5: Fyzikálně chemické vlastnosti betablokátorů [29][30]

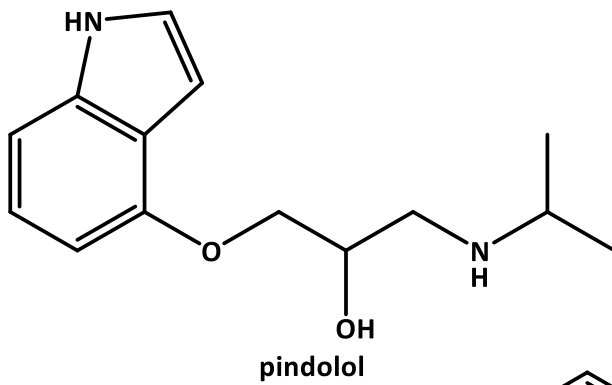
analyt	MW [g/mol]	logP	pKa	pKb	rozpouštědlo	vzhled
atenolol	266,34	0,16	14,08	9,60	50% ACN	bílý krystalický prášek
(+)-metoprolol tartarát	267,36	2,15	14,09	9,70	50% ACN	bílý krystalický prášek
pindolol	248,32	1,75	14,09	9,25	50% ACN	bílý krystalický prášek
acebutolol hydrochlorid	336,40	1,71	13,91	9,52	50% ACN	bílý krystalický prášek
propranolol hydrochlorid	259,34	3,48	14,09	9,45	50% ACN	bílý krystalický prášek
bopindolol hydrogenmalonát	380,48	4,67	16,80	9,29	50% ACN	bílý krystalický prášek



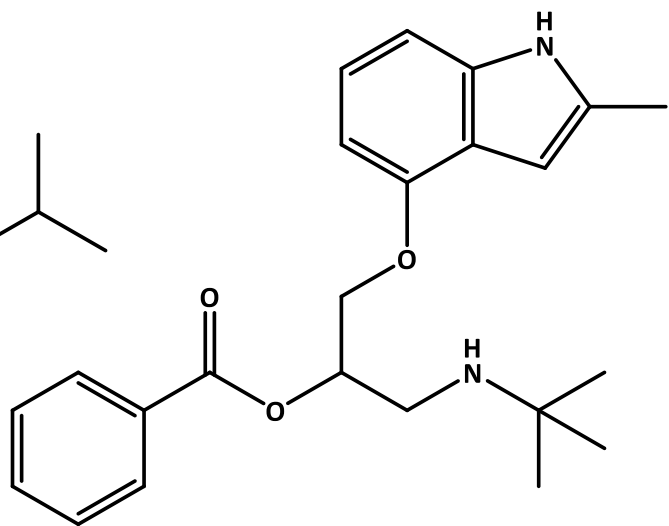
atenolol



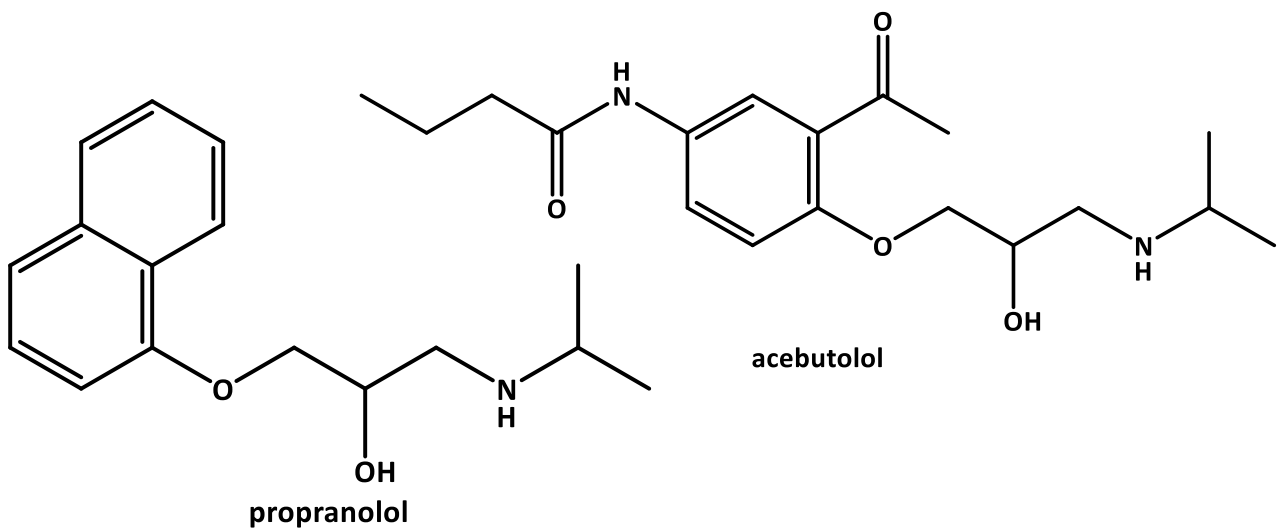
metoprolol



pindolol



bopindolol



propranolol

acebutolol

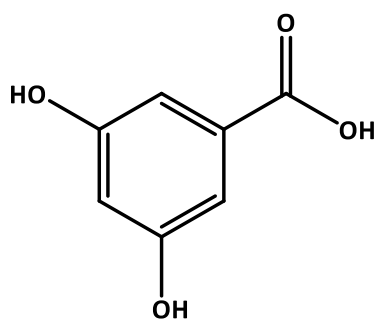
Obr. 6: Struktury betablokátorů

3.2.5 Fenolické kyseliny

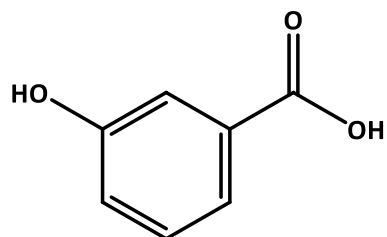
Fenolické kyseliny jsou rostlinné sekundární metabolity. Jen malá část existuje ve formě volné kyseliny. Většina je vázaná ve formě esteru, éteru nebo acetalu [45]. Fenolické kyseliny mají zdraví prospěšné účinky, a to zejména protizánětlivé, antioxidační, antimutagenní a protinádorové [45][46]. Člověk konzumuje fenolické kyseliny téměř denně v potravinách rostlinného původu. Analyzované fenolické kyseliny jsou mono a dihydroxy deriváty kyseliny benzoové. Jejich strukturní vzorce jsou uvedeny na Obr. 7 a jejich fyzikálně chemické vlastnosti v Tab. 6. LogP analyzovaných fenolických kyselin je v rozmezí 0,86 až 1,63. Byly stanovovány z rostlinných a biologických matric, jejich metabolity pak z krve a moči [45]. Analytické metody použité pro analýzu fenolických kyselin zahrnují tenkovrstvou chromatografii (TLC), jež je výhodná pro rychlý screening a vysokou kapacitu vzorků. Jako SF byl použit silikagel. Další metodou byla GC s MS detekcí. Protože hydroxyskupiny mají schopnost tvořit vodíkové vazby, čímž dochází ke zvýšení teploty tání, a tedy ke snížení těkavosti, je nutné před samotnou analýzou provést derivatizaci. Nejpoužívanější metodou je HPLC, a to RP-LC s C18 kolonami. Pro zlepšení kvality separace u komplexních vzorků je vhodné využití dvoudimenzionální LC. Při analýze fenolických sloučenin byly použity tyto detekční metody: UV, PDA, MS a nukleární magnetická rezonance (NMR). Dalšími metodami analýzy těchto látek byly kapilární elektroforéza, kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie [45].

Tab. 6: Fyzikálně chemické vlastnosti fenolických kyselin [29][30]

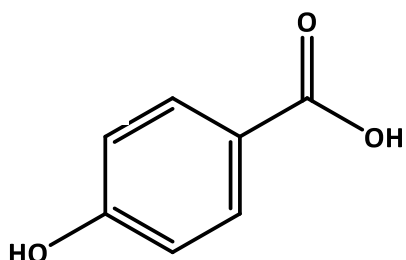
analyt	synonymum	zkratka	MW [g/mol]	logP	pKa	rozpouštědlo	vzhled
3,5-dihydroxybenzoová kyselina	α -resorcylová kyselina	3,5-DHBA	154,12	0,86	3,83	50% ACN	běžový prášek
3-hydroxybenzoová kyselina	m-salicylová kyselina	3-HBA	138,12	1,50	4,04	50% ACN	bílý nebo téměř bílý prášek
4-hydroxybenzoová kyselina	p-hydroxybenzoová kyselina	4-HBA	138,12	1,58	4,54	50% ACN	bezbarvý krystalický prášek
2,4-dihydroxybenzoová kyselina	β -resorcylová kyselina	2,4-DHBA	154,12	1,63	3,11	50% ACN	bílý krystalický prášek



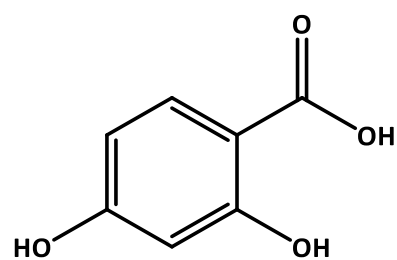
3,5-dihydroxybenzoová kyselina



3-hydroxybenzoová kyselina



4-hydroxybenzoová kyselina



2,4-dihydroxybenzoová kyselina

Obr. 7: Struktury fenolických kyselin

4. Praktická část

4.1 Přístrojové vybavení

- UHPLC systém: ACQUITY UPLC system, Waters, USA
- Program: Empower 3, Waters, Česká republika
- Analytické váhy: Sartorius, ME5-OC, Sartorius, Německo
- Automatické pipety: Eppendorf Reference 2, Eppendorf, Česká republika
- Magnetické míchadlo: IKA Big Squid, IKA, Německo
- pH metr: Hanna, Fisher scientific, Česká republika
- Třepačka: IKA Vortex 3, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Ultrazvuková lázeň: Sonorex Digitec, Bandelin Elextronic, Německo

4.2 Analytické kolony

- BEH Z HILIC 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, P/N: 186009979
- SYNCRONIS HILIC 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Thermo Fisher SCIENTIFIC, SN: 10608938
- OMEGA SUGAR 3 μm , 2,1 x 100 mm, Phenomenex, S/N: H19-132127
- BEH HILIC 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, SN: 03653818718679
- BEH AMIDE 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, SN: 01643717118448
- Astra ZWIX-4N 3 μm , 2,1 x 100 mm, Chromservis s.r.o., SN: A00279
- Astra ZWIX-4N 3 μm , 2,1 x 100 mm, Chromservis s.r.o., SN: A00277
- Astra ZWIX-4N 3 μm , 2,1 x 100 mm, Chromservis s.r.o., SN: A00278
- Astra ZWIX-4N 3 μm , 2,1 x 100 mm, Chromservis s.r.o., SN: A00280
- Astra ZWIX-4N 3 μm , 2,1 x 100 mm, Chromservis s.r.o., SN: A00283
- Astra ZWIX-4N 3 μm , 2,1 x 100 mm, Chromservis s.r.o., SN: A00281

Kolony Astra ZWIX jsou vyrobeny ve třech šaržích: šarže P1327 zahrnuje kolony A00279 a A00277, šarže P1328 zahrnuje kolony A00278 a A00280 a šarže P1329 zahrnuje kolony A00283 a A00281.

4.3 Chemikálie

- Voda LC-MS grade, Millipore, destilovaná v přístroji Milli-Q RG, Burlington, USA
- Kyselina mravenčí pro LC-MS, čistota $\geq 99\%$, WWR Chemicals, Leuven, Belgie
- Kyselina octová pro LC-MS, 100%, MERCK, Darmstadt, Německo
- Amoniak pro LC-MS, 25%, MERCK, Darmstadt, Německo
- Metanol pro HPLC ULTRA LC-MS, $>99,9\%$, WWR Chemicals, Gliwice, Polsko
- Acetonitril pro HPLC LC-MS, $>99,9\%$, WWR Chemicals, Fontenay sous Bois, Francie

4.4 Standardy

- thymin, 5-methyluridine, guanosin, uridin, cytidin, adenin, nikotinamid, isonikotinamid, kyselina nikotinová, kyselina isonikotinová, kyselina pikolinová, thiamin, riboflavin, pyridoxin, 3,5-DHBA, 3-HBA, 4-HBA, 2,4-DHBA: Zentiva k.s.
- adenosin: Sigma-Aldrich, LOT: 069K1645, 5 g, čistota 99 %
- uracil: Sigma-Aldrich, LOT: #080M0067V, 5 g, čistota $\geq 99\%$
- cytosin: SIGMA, LOT: 120M1911V, 5 g, čistota $\geq 99\%$
- kobalamin: Sigma-Aldrich, LOT:#SLBF5938V, 500 mg, čistota neuvedena
- kyselina listová: Sigma-Aldrich, LOT:#SLBH7728V, 5 g, čistota neuvedena
- biotin: Sigma-Aldrich, LOT: P500233, 1 g, čistota neuvedena
- atenolol: Sigma-Aldrich, LOT: 68H0726, 1 g, čistota neuvedena
- (+)-metoprolol tartarát: Sigma-Aldrich, LOT:#BCBH0239V, 1 g, čistota $\geq 98\%$
- pindolol: Sigma-Aldrich, LOT: 68H1314, 1 g, čistota neuvedena
- acebutolol hydrochlorid: Sigma-Aldrich, LOT:#056K1622V, 1 g, čistota neuvedena
- propranolol hydrochlorid: Sigma-Aldrich, LOT: S21145-464, 5 g, čistota 99 %
- bopindolol hydrogenmalonát: Zentiva k.s., šarže: 9400701, 1 g, čistota 99,76 %

4.5 Příprava roztoků

4.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Navážky standardů v rozsahu 0,500 – 7,000 mg byly rozpuštěny v rozpouštědle na koncentraci 1 mg/ml. Rozpouštědlem byl pro většinu látek 50% ACN, pro isonikotinovou kyselinu byl rozpouštědlem 47% ACN, pro kobalamin 42% ACN. Pro thiamin a pyridoxin byla rozpouštědlem voda, pro kyselinu listovou 50% ACN : 100% metanol (MeOH) = 1 : 1, pro riboflavin 50% ACN : 25% ACN = 1 : 1. Roztoky standardů byly uchovávány v lednici.

4.5.2 Příprava pracovních roztoků

Roztoky standardů byly naředěny 100% ACN na koncentraci 10 µg/ml. Směs nukleových bazí a nukleosidů byla připravena napipetováním 10 µl jednotlivých roztoků standardů analytů do vialky a doplněním 100% ACN do 1 000 µl. Obdobně byla připravena směs derivátů kyseliny nikotinové. Směs hydrofilních vitamínů byla připravena napipetováním 5 µl thiaminu a nikotinamidu, 10 µl kobalaminu, pyridoxinu a biotinu, 20 µl riboflavinu a 100 µl kyseliny listové do vialky. Směs byla doplněna ACN do 1 000 µl. Směsi BB a fenolických kyselin byly připraveny dle Tab. 7 a Tab. 8. Objem těchto analytů pro kolony Astra ZWIX byl zvýšen, protože při zvolené vlnové délce 280 nm poskytovaly tyto analyty pouze nízkou odezvu.

Tab. 7: Objem jednotlivých BB ve směsi

analyt	objem pro komerčně dostupné kolony [µl]	objem pro kolony Astra ZWIX [µl]
atenolol	20	40
(+)-metoprolol tartarát	20	40
pindolol	5	10
acebutolol hydrochlorid	10	20
propranolol hydrochlorid	10	20
bopindolol hydrochlorid	5	10
ACN	930	860

Tab. 8: Objem jednotlivých fenolických kyselin ve směsi

analyt	objem pro komerčně dostupné kolony [μl]	objem pro kolony Astra ZWIX [μl]
3,5-DHBA	10	40
3-HBA	10	20
4-HBA	10	10
2,4-DHBA	10	40
ACN	960	890

U roztoků standardů kyseliny listové, riboflavinu a guanosinu dochází při nízké teplotě v lednici ke zpětnému srážení, a proto byla pro tyto látky před přípravou pracovních roztoků použita ultrazvuková lázeň.

4.5.3 Příprava MF, roztoku pro uchování kolony a oplachových kapalin

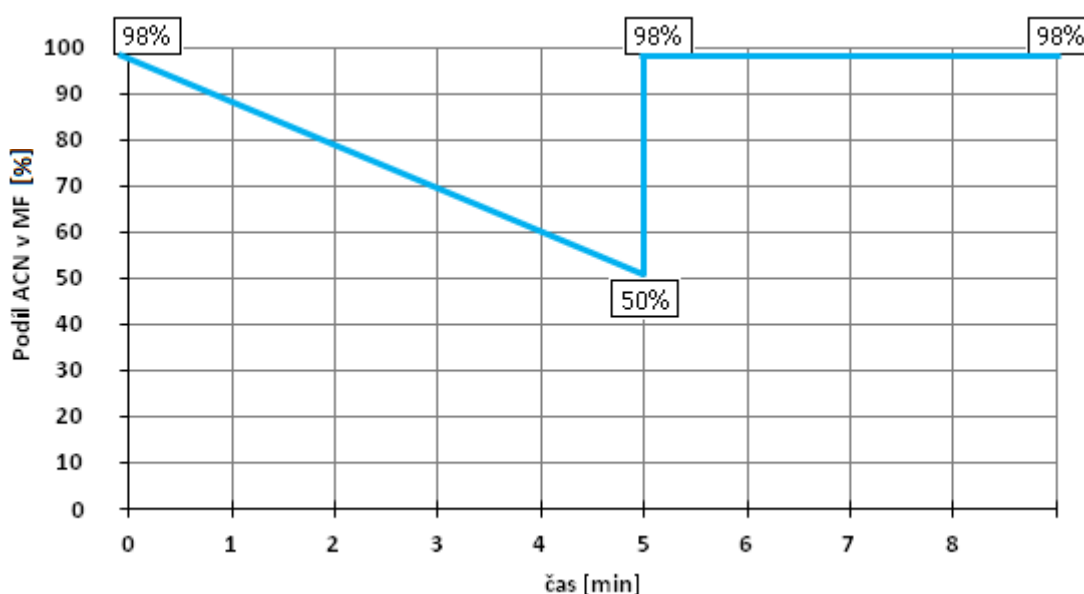
Jako mobilní fáze B byl využit ACN. Mobilní fází A byl pufr o různém pH. Mravenčanový pufr byl připraven napipetováním 377,30 μl kyseliny mravenčí do 400 ml vody. Dále byl přidáván roztok amoniaku, který byl připraven 25% NH₃ : voda = 2 : 1 a 4 : 1, až do konečného pH 3 (pH 4). Roztok byl kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Obdobně bylo postupováno u octanového pufru. Bylo napipetováno 570,28 μl kyseliny octové a byl přidáván roztok amoniaku až do pH 6 (pH 5). Pufry byly připravovány čerstvé a byly používány maximálně 48 hodin.

Roztokem pro uchování kolony byla 0,1% kyselina octová v ACN. 250ml odměrnou baňkou bylo odměřeno 250 ml vody. Do ní bylo napipetováno 250 μl kyseliny octové. Tento roztok byl přelit do 1 000ml odměrné baňky a doplněn 750 ml ACN.

Slabou oplachovou kapalinou byl 95% ACN. Bylo odměřeno 950 ml ACN a doplněno 50 ml vody. Pro oplach pístu čerpadla byl použit 10% MeOH. Bylo odměřeno 100 ml MeOH a doplněno 900 ml vody. Silnou oplachovou kapalinou byl 50% ACN. Bylo odměřeno 500 ml ACN a přidáno 500 ml vody.

4.6 Parametry metody UHPLC – PDA

- MF (A): 10 mM mravenčanový pufr pH 3/ octanový pufr pH 6
- MF (B): ACN
- Gradientová eluce: viz Obr. 8
- Průtok: 0,5 ml/min
- Dávkovaný objem: 1 μ l
- Teplota kolony: 40°C
- Teplota dávkovače vzorku: 10°C
- Detekce: 280 nm UV



Obr. 8: Průběh gradientové eluce mobilní fáze

4.7 Optimalizace podmínek HILIC separace

Optimalizace probíhala na koloně Astra ZWIX-4N, SN: A00281. U skupin betablokátorů, derivátů kyseliny nikotinové, nukleových bazí a nukleosidů, jejichž píky nebyly za výchozích podmínek dostatečně rozlišeny, bylo optimalizováno pH vodné složky MF, gradient, teplota kolony a průtok. Tyto kroky optimalizace byly prováděny při pH pufrů MF 6, 5, 4 a 3.

Jako první bylo měněno nastavení gradientové eluce. Počáteční množství mobilní fáze B (ACN) bylo postupně snižováno z 98 % na 90 %, 80 % a 70 %. Při každé změně počátečního složení MF B bylo také změněno složení MF B v 5. minutě gradientu, a to

vždy se zvyšující se tendencí od 50 % na 60 %, a poté na 70 %. Při počátečním složení MF B 70 % ACN byl gradient MF v 5. minutě měněn pouze na 50 % a na 60 %. Gradient se tedy stával méně strmý.

Bylo vyzkoušeno zvýšení teploty kolony z původních 40°C na 50°C, poté na 60°C. Nakonec byl vyzkoušen vyšší průtok 0,7 ml/min.

5. Výsledky a diskuze

Pro všechny píky sledovaných analytů byla separace na všech testovaných kolonách provedena ve třech opakováních. Výsledné hodnoty pro retenční čas, rozlišení, asymetrii píku a šířku píku v polovině jeho výšky jsou průměrem těchto tří měření. Podmínky separace analytů jsou uvedeny v kapitole 4.6.

5.1 Hodnocení retence

5.1.1 Nukleové baze a nukleosidy

5.1.1.1 Hodnocení retence při pH 3

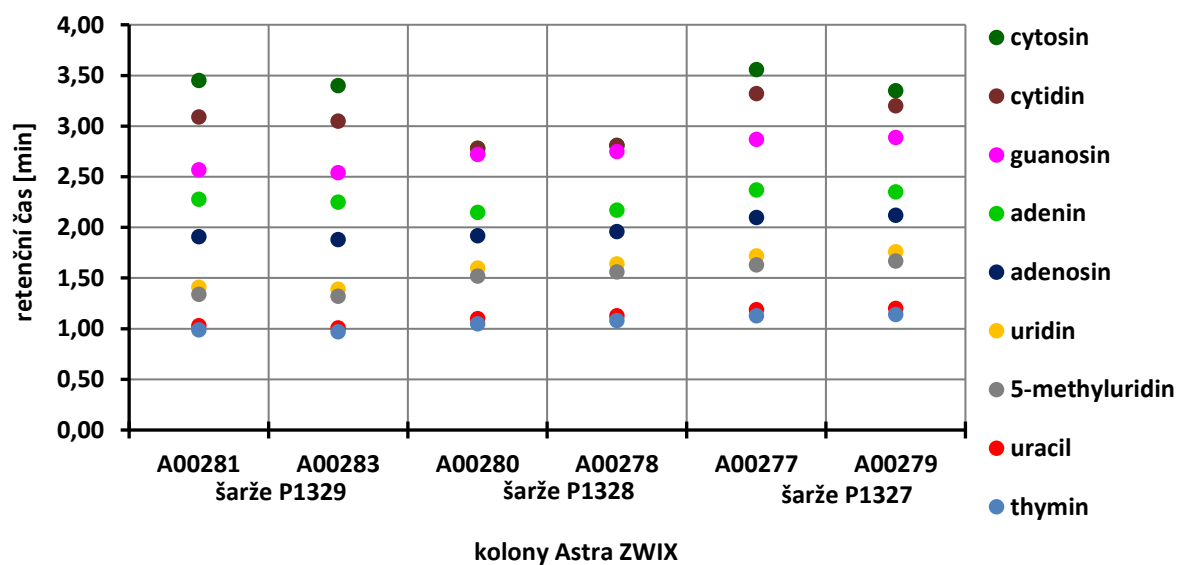
Dle retenčních časů v Tab. 9 a na Obr. 9 je zřejmé, že se retenční časy nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX v rámci jedné šarže většinou shodují, kromě šarže P1327, kde se u cytosinu a cytidinu liší o 2,60 % až 4,30 %, jak je uvedeno v Tab. 10. Mezi jednotlivými šaržemi se retenční časy analytů liší o 4,00 % až 10,55 %, nejvíce u 5-methyluridinu, uridinu a cytosinu. Na kolonách šarže P1328 dochází ke koeluci guanosinu, cytidinu a cytosinu. Nejnižší retenci mají analyty na kolonách šarží P1329 (analyty dříve eluované – od thyminu po adenosin) a P1328 (analyty později eluované – od adeninu po cytosin). Nejvyšší retence všech sledovaných analytů při pH3 je na kolonách šarže P1327. Chromatogramy jsou zobrazeny na Obr. 10.

Tab. 9: Průměrný retenční čas [min] nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

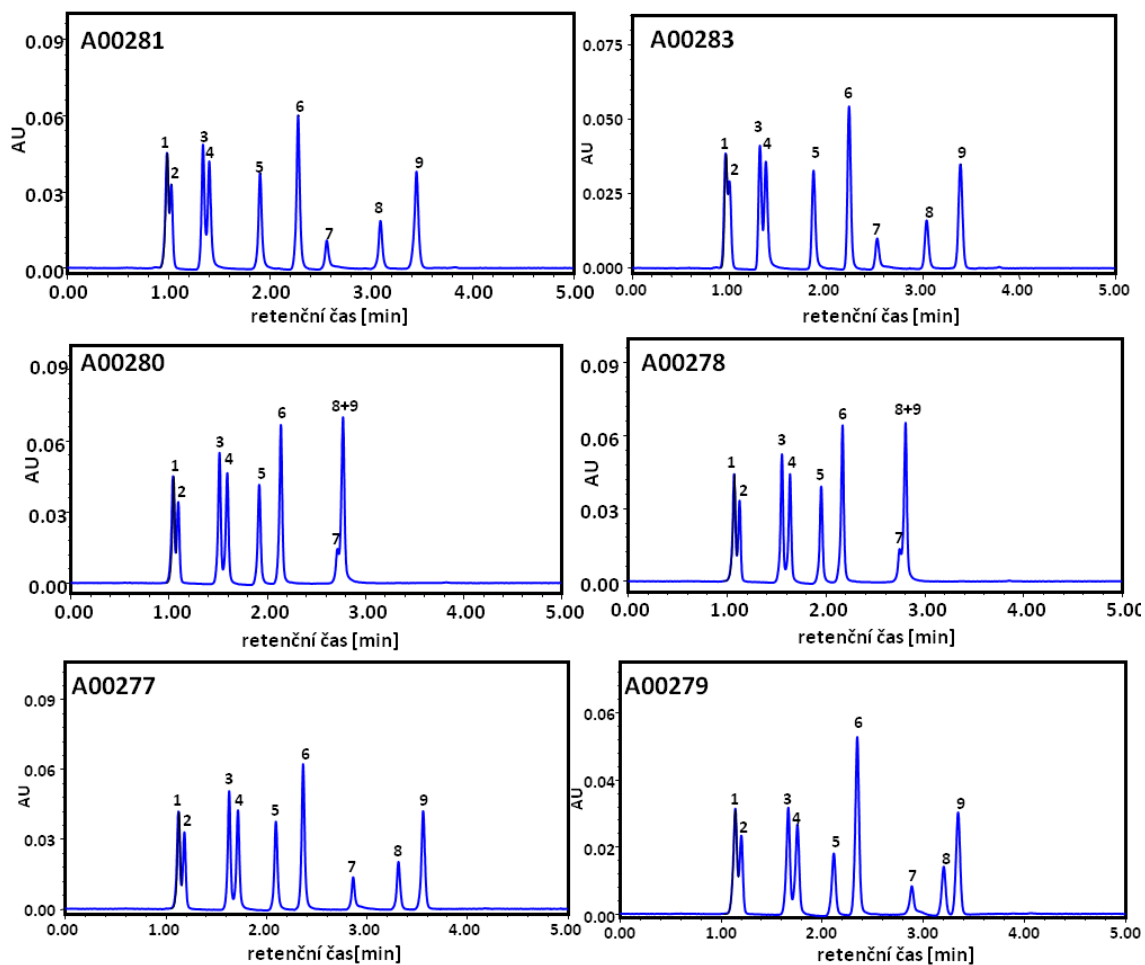
analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymin	0,99	0,97	1,05	1,08	1,13	1,14
uracil	1,03	1,01	1,10	1,13	1,19	1,20
5-methyluridin	1,34	1,32	1,52	1,56	1,63	1,67
uridin	1,41	1,39	1,60	1,64	1,72	1,76
adenosin	1,91	1,88	1,92	1,96	2,10	2,12
adenin	2,28	2,25	2,15	2,17	2,37	2,35
guanosin	2,57	2,54	2,72	2,75	2,87	2,89
cytidin	3,09	3,05	2,78	2,81	3,32	3,20
cytosin	3,45	3,40	2,78	2,81	3,56	3,35

Tab. 10: Hodnoty RSD retenčních časů [%] nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
thymín	1,44	1,99	0,62	6,64
uracil	1,39	1,90	0,59	7,14
5-methyluridin	1,06	1,84	1,71	9,73
uridin	1,01	1,75	1,63	9,79
adenosin	1,12	1,46	0,67	5,19
adenin	0,94	0,65	0,60	4,00
guanosen	0,83	0,78	0,49	5,37
cytidin	0,92	0,76	2,60	7,01
cytosin	1,03	0,76	4,30	10,55



Obr. 9: Graf retenčních časů nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

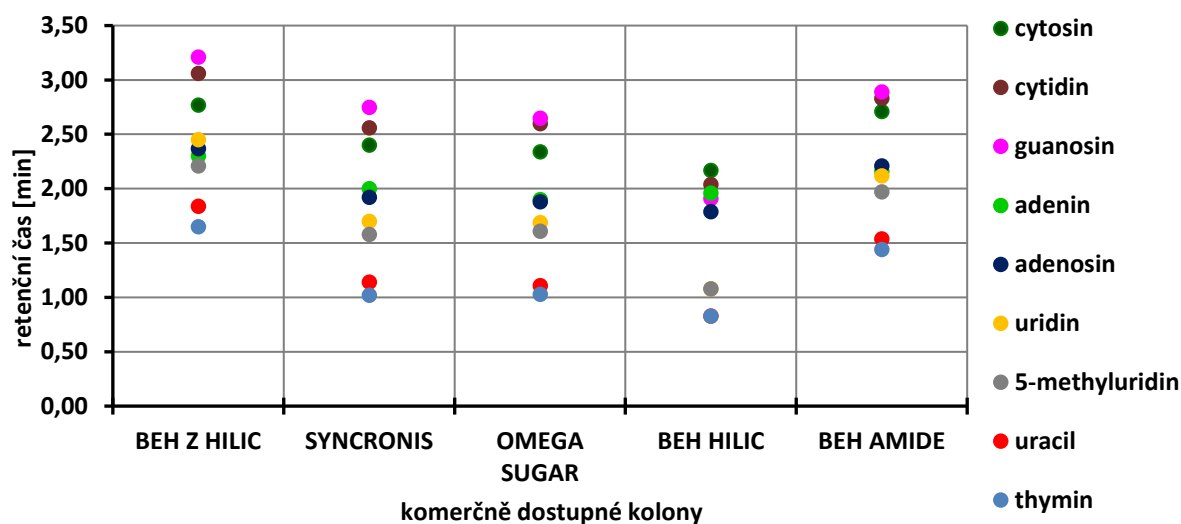


Obr. 10: Chromatogramy separace nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3 (1–thymin, 2–uracil, 3–5-methyluridin, 4–uridin, 5–adenosin, 6–adenin, 7–guanosin, 8–cytidin, 9–cytosin)

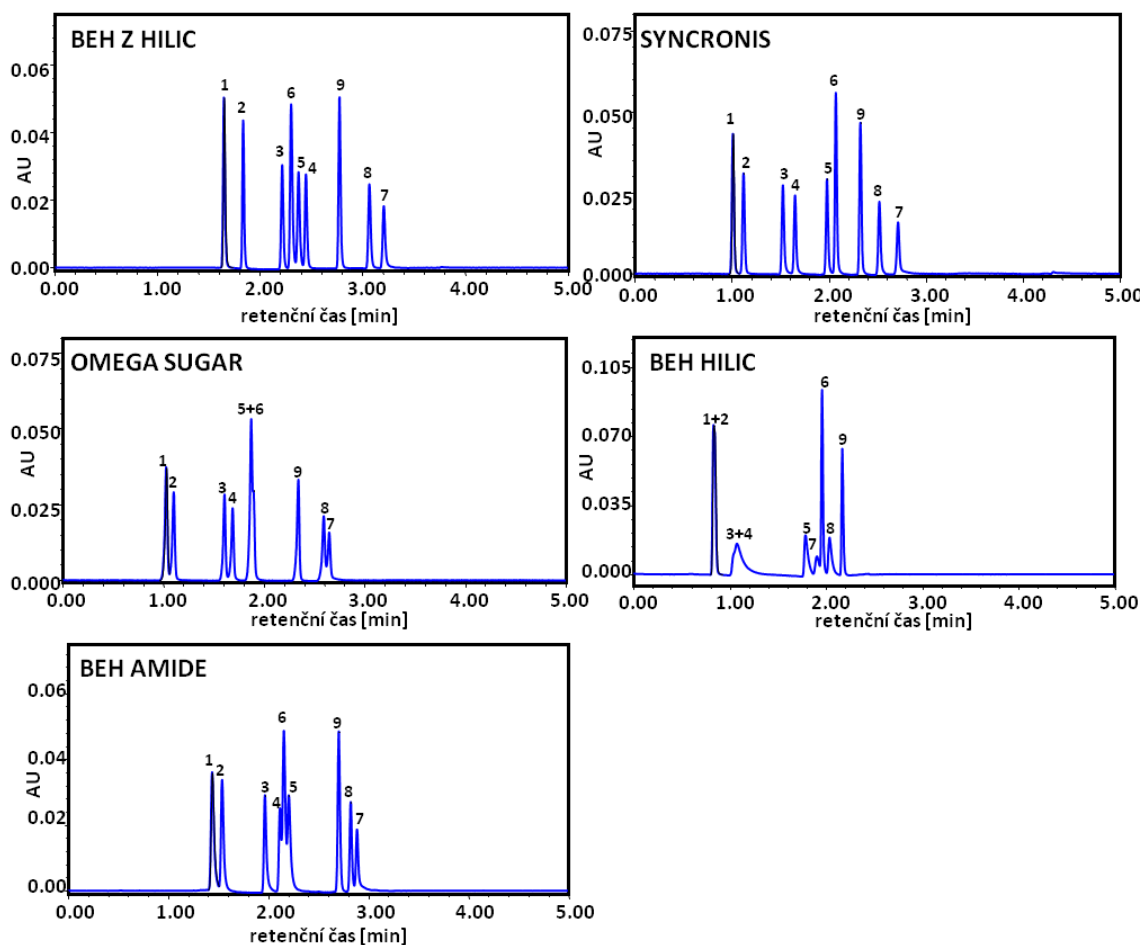
Tab. 11 a Obr. 11 ukazují, že na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS, dále též na kolonách OMEGA SUGAR a BEH AMIDE došlo oproti kolonách Astra ZWIX ke změně pořadí eluce guanosinu, který je eluován jako poslední, a cytosinu, který je eluován na sedmém místě. Na koloně BEH Z HILIC došlo též ke změně pořadí eluce uridinu, který je eluován na šestém místě, a adeninu, který je eluován na čtvrtém místě. Na koloně BEH HILIC je guanosin eluován na šestém místě a adenin na místě sedmém. Na této koloně je patrná nejnižší retence všech analytů. Retence a selektivita zwitteriontových kolon BEH Z HILIC a SYNCRONIS se odlišuje od kolon Astra ZWIX. Chromatogramy nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách jsou uvedeny na Obr. 12.

Tab. 11: Průměrný retenční čas [min] nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	1,65	1,02	1,03	0,83	1,44
uracil	1,84	1,14	1,11	0,83	1,54
5-methyluridin	2,21	1,58	1,61	1,08	1,97
uridin	2,45	1,70	1,69	1,08	2,12
adenosin	2,37	1,92	1,88	1,79	2,21
adenin	2,30	2,00	1,90	1,96	2,16
guanosin	3,21	2,75	2,65	1,91	2,89
cytidin	3,06	2,56	2,60	2,04	2,83
cytosin	2,77	2,34	2,40	2,17	2,71



Obr. 11: Graf retenčních časů nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3



Obr. 12: Chromatogramy separace nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3 (1–thymin, 2–uracil, 3–5-methyluridin, 4–uridin, 5–adenosin, 6–adenin, 7–guanosin, 8–cytidin, 9–cytosin)

Relativní směrodatná odchylka retenčních časů všech sledovaných analytů na všech kolonách je menší než 0,2 %, a tím splňuje podmínky opakovatelnosti (RSD menší než 1 %). Hodnoty RSD jsou uvedeny v Tab. 12 a Tab. 13.

Tab. 12. RSD retenčních časů [%] nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	0,06	0,10	0,06	0,05	0,20	0,10
uracil	0,06	0,15	0,05	0,05	0,19	0,05
5-methyluridin	0,07	0,12	0,04	0,04	0,11	0,00
uridin	0,04	0,07	0,04	0,04	0,07	0,03
adenosin	0,03	0,05	0,03	0,05	0,05	0,03
adenin	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02
guanosen	0,02	0,04	0,00	0,02	0,02	0,02
cytidin	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02
cytosin	0,02	0,03	0,02	0,04	0,02	0,00

Tab. 13: RSD retenčních časů [%] nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	0,09	0,10	0,06	0,07	0,12
uracil	0,06	0,09	0,05	0,07	0,11
5-methyluridin	0,05	0,06	0,04	0,00	0,03
uridin	0,05	0,03	0,03	0,00	0,05
adenosin	0,05	0,03	0,06	0,06	0,03
adenin	0,07	0,03	0,06	0,05	0,05
guanosen	0,03	0,04	0,07	0,03	0,00
cytidin	0,02	0,04	0,04	0,06	0,00
cytosin	0,04	0,04	0,04	0,05	0,00

5.1.1.2 Hodnocení retence při pH 6

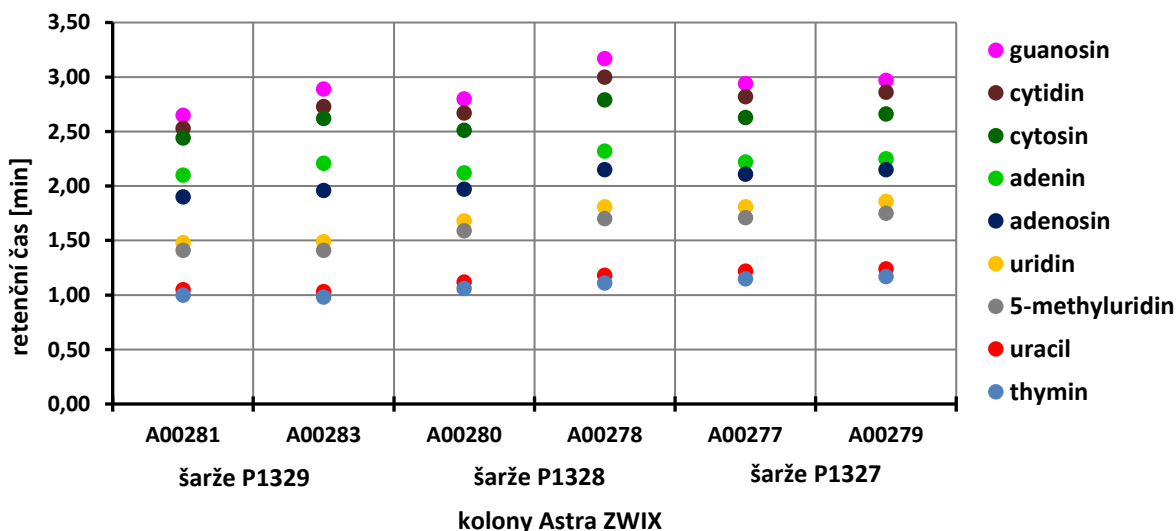
I při pH 6 je pořadí eluce jednotlivých analytů, které je uvedeno v Tab. 14 a na Obr. 13, na všech kolonách Astra ZWIX stejné. Oproti pH 3 došlo při pH 6 ke změně retence guanosinu a cytosinu. Při pH 6 se guanosen eluuje jako poslední a cytosin se eluuje na sedmém místě. Chromatogramy nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 14.

Tab. 14: Průměrný retenční čas [min] nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	1,00	0,98	1,06	1,11	1,15	1,17
uracil	1,05	1,03	1,12	1,18	1,22	1,24
5-methyluridin	1,41	1,41	1,59	1,70	1,71	1,75
uridin	1,48	1,49	1,68	1,81	1,81	1,86
adenosín	1,90	1,96	1,97	2,15	2,11	2,15
adenín	2,10	2,21	2,12	2,32	2,22	2,25
cytosín	2,44	2,62	2,51	2,79	2,63	2,66
cytidín	2,53	2,73	2,67	3,00	2,82	2,86
guanosín	2,65	2,89	2,80	3,17	2,94	2,97

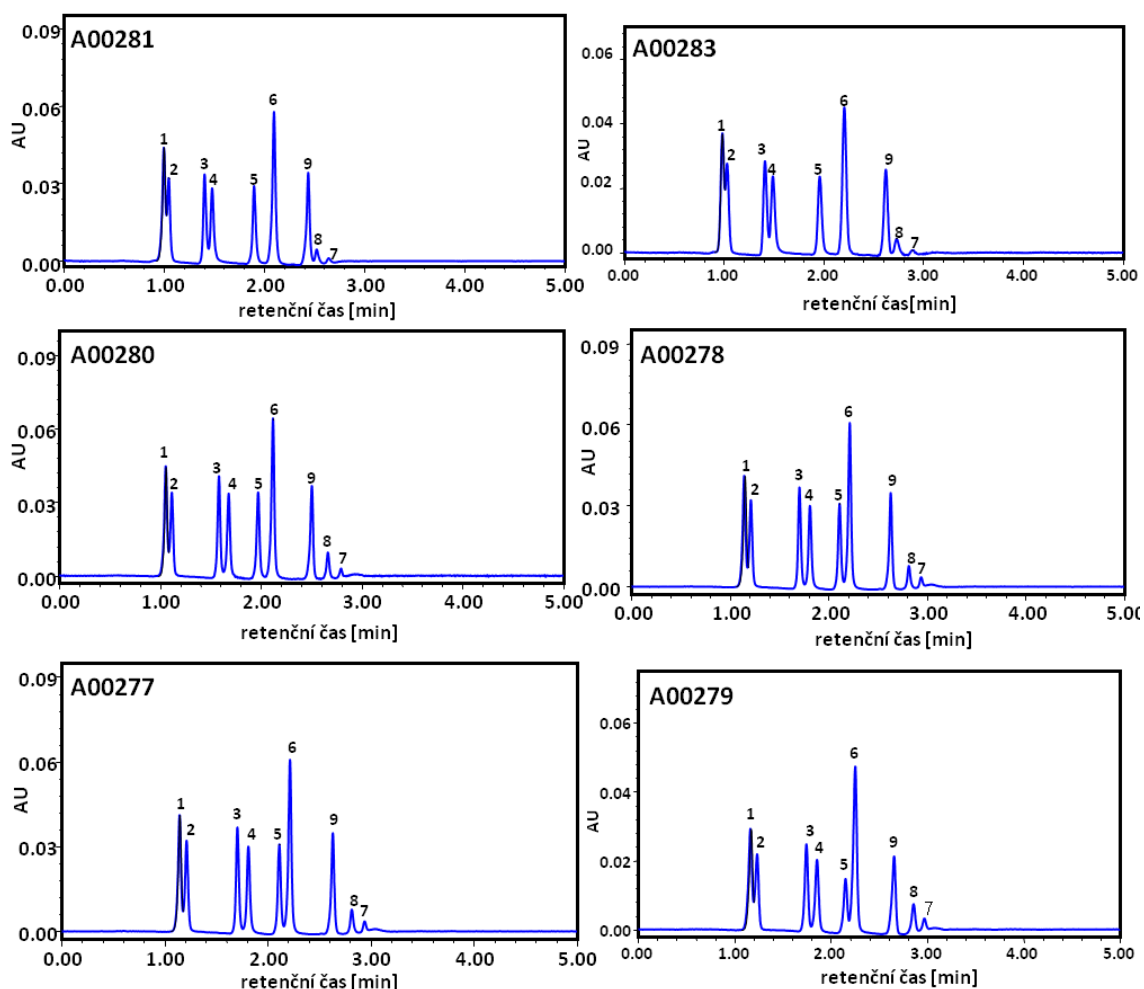
Tab. 15: Hodnoty RSD retenčních časů [%] nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
thymín	1,43	3,26	1,22	7,26
uracil	1,36	3,69	1,15	7,71
5-methyluridin	0,00	4,73	1,63	9,58
uridin	0,48	5,27	1,93	9,98
adenosín	2,20	6,18	1,33	5,37
adenín	3,61	6,37	0,95	3,73
cytosín	5,03	7,47	0,80	4,67
cytidín	5,38	8,23	1,00	5,88
guanosín	6,13	8,76	0,72	6,00



Obr. 13: Graf retenčních časů nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

Je patrné, že kolony šarže P1327 vykazují shodné retence všech analytů s RSD od 0,72 % do 1,95 % (viz Tab. 15), zatímco kolony ostatních dvou šarží vykazují mírně vyšší retenci později eluovaných analytů v rámci kolon jedné šarže s RSD od 5,03 do 8,76 %. Konkrétně na kolonách šarže P1329 jsou cytosin, cytidin a guanosin více zadržovány na koloně A00283 ve srovnání s jejich retencí na koloně A00281. U kolon šarže P1328 jsou analyty (kromě thyminu a uracilu) na koloně A00278 zadržovány více ve srovnání s jejich retencí na koloně A00280. Nejvyšší retenci mají analyty na kolonách šarže P1327, kromě později eluovaných analytů (od adeninu po guanosin), jež jsou nejvíce zadržovány na koloně A00278. Nejvyšší rozdíly v retenčních časech mezi analyty na kolonách téže šarže vykazují kolony šarže P1328 s RSD od 3,26 % do 8,76 %. Oproti pH 3 je při pH 6 selektivita na všech kolonách stejná.

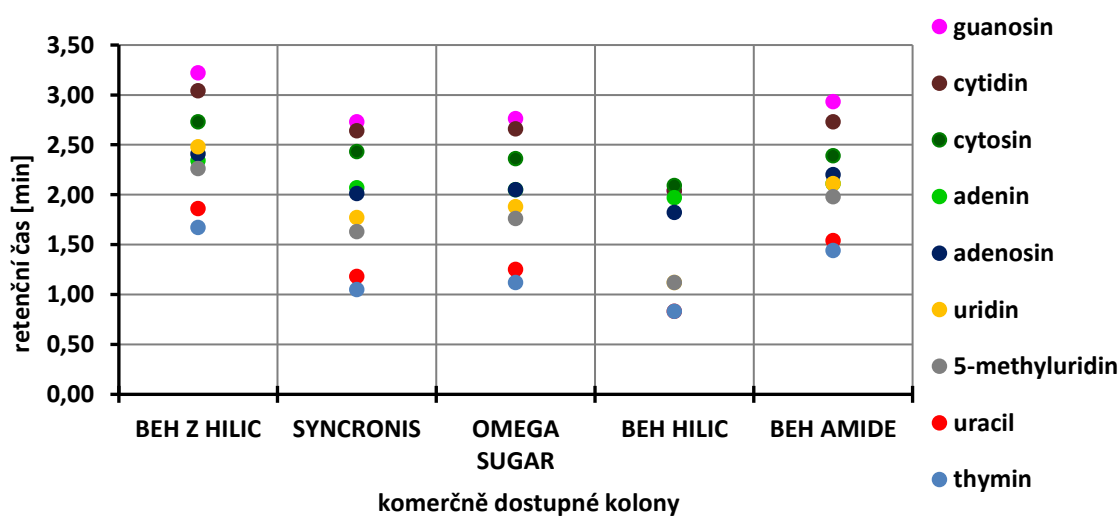


Obr. 14: Chromatogramy separace nukleových bází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (1–thymin, 2–uracil, 3–5-methyluridin, 4–uridin, 5–adenosin, 6–adenin, 7–guanosin, 8–cytidin, 9–cytosin)

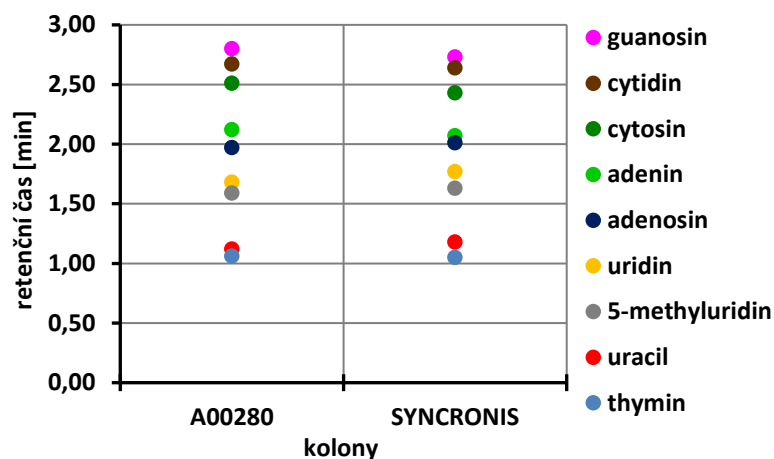
Retenční časy analytů na komerčně dostupných kolonách jsou uvedeny v Tab. 16 a na Obr. 15, chromatogramy na Obr. 17. Retence na koloně SYNCRONIS se velmi podobá retenci na koloně A00280, jak je patrné z Obr. 16. Nižší retenci lze pozorovat jen u cytosinu, cytidinu a guanosinu na koloně SYNCRONIS. Na koloně OMEGA SUGAR koeluuje adenosin s adeninem. Kolony BEH Z HILIC a BEH AMIDE, stejně jako při pH 3, vykazují vyšší retenci nukleových bazí a odlišné pořadí retence některých analytů oproti kolonám Astra ZWIX. Na koloně BEH AMIDE navíc koeluuje uridin s adeninem. Analyty vykazují na koloně BEH HILIC nejnížší retenci a mnoho jich koeluuje – thymín s uracilem, 5-ethyluridin s uridinem a guanosin s cytidinem.

Tab. 16: Průměrný retenční čas [min] nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

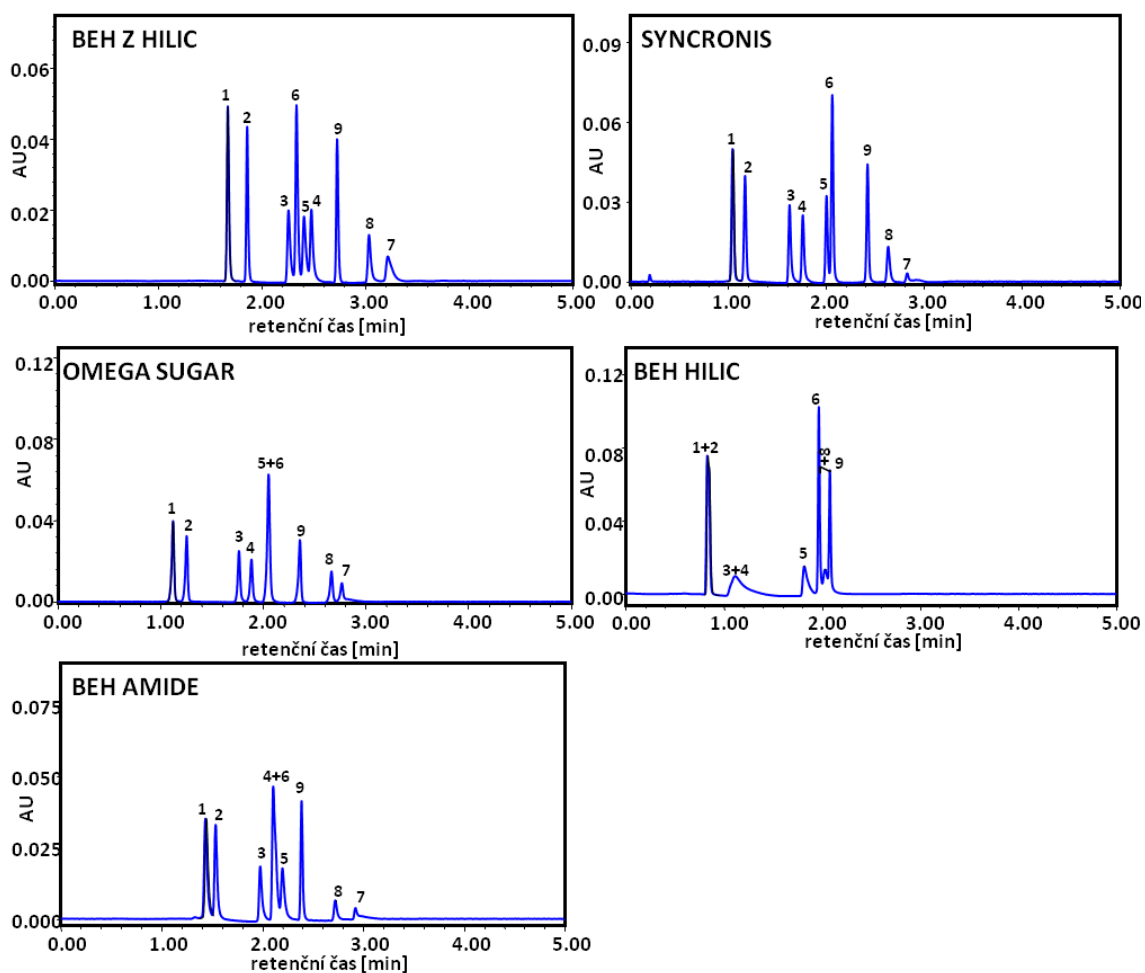
analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	1,67	1,05	1,12	0,83	1,44
uracil	1,86	1,18	1,25	0,83	1,54
5-methyluridin	2,26	1,63	1,76	1,12	1,98
uridin	2,48	1,77	1,88	1,12	2,11
adenosin	2,41	2,01	2,05	1,82	2,20
adenin	2,34	2,07	2,05	1,97	2,11
cytosin	2,73	2,43	2,36	2,09	2,39
cytidin	3,04	2,64	2,66	2,04	2,73
guanosin	3,22	2,83	2,76	2,04	2,93



Obr. 15: Graf retenčních časů nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6



Obr. 16: Graf retenčních časů nukleových bazí a nukleosidů na koloně A00280 a SYNCRONIS při pH 6



Obr. 17: Chromatogramy separace nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6 (1–thymidin, 2–uracil, 3–5-methyluridin, 4–uridin, 5–adenosin, 6–adenin, 7–guanosin, 8–cytidin, 9–cytosin)

RSD retenčních časů nukleových bazí a nukleosidů při pH 6, jež je uvedeno v Tab. 17 a Tab. 18, je na všech kolonách menší než 0,22 %, a tedy splňuje podmínky opakovatelnosti. Nejvyšší RSD jsou na koloně A00279.

Tab. 17: RSD retenčních časů [%] nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	0,10	0,00	0,34	0,09	0,05	0,15
uracil	0,06	0,15	0,32	0,13	0,08	0,19
5-methyluridin	0,04	0,11	0,18	0,03	0,03	0,22
uridin	0,04	0,10	0,14	0,03	0,03	0,20
adenosin	0,05	0,03	0,11	0,05	0,03	0,19
adenin	0,03	0,00	0,07	0,04	0,05	0,14
cytosin	0,04	0,02	0,04	0,04	0,04	0,10
cytidin	0,04	0,02	0,04	0,04	0,02	0,09
guanosin	0,02	0,10	0,04	0,05	0,02	0,05

Tab. 18: RSD retenčních časů [%] nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	0,00	0,06	0,10	0,07	0,14
uracil	0,00	0,10	0,08	0,07	0,13
5-methyluridin	0,03	0,06	0,09	0,05	0,06
uridin	0,02	0,06	0,09	0,05	0,05
adenosin	0,00	0,08	0,07	0,14	0,03
adenin	0,02	0,07	0,07	0,13	0,05
cytosin	0,00	0,06	0,06	0,14	0,04
cytidin	0,02	0,04	0,08	0,17	0,04
guanosin	0,02	0,00	0,08	0,17	0,03

5.1.2 Deriváty kyseliny nikotinové

5.1.2.1 Hodnocení retence při pH 3

Retence isonikotinamidu a nikotinamidu, jež je uvedena v Tab. 19 a na Obr. 18, se na všech kolonách Astra ZWIX liší pouze minimálně – RSD 2,84 a 2,54, naopak kyseliny nikotinové a isonikotinové se mezi šaržemi velmi liší – RSD 13,92 % a 16,91 % (viz

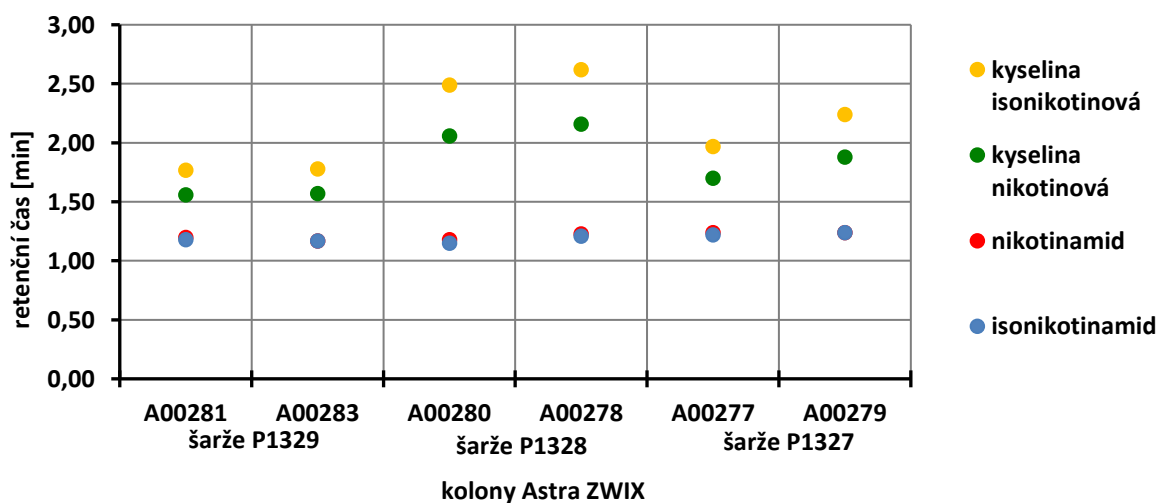
Tab. 20) Na koloně A00283 a A00279 isonikotinamid a nikotinamid koeluují, na ostatních kolonách je vidět alespoň částečná separace. Kolony šarže P1329 se mezi sebou liší pouze minimálně s RSD od 0,40 % do 1,79 %. Nejvíce se mezi sebou liší kolony šarže P1328 s RSD od 2,93 % do 3,60 %. Kyselina nikotinová a isonikotinová jsou nejvíce zadržovány na kolonách šarže P1328. Rozdíl oproti kolonám ostatních šarží je opravdu velký (viz Obr. 19). U kolon šarže P1327 jsou kyseliny nikotinová a isonikotinová více zadržovány na koloně A00279.

Tab. 19: Průměrný retenční čas derivátů kyseliny nikotinové [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

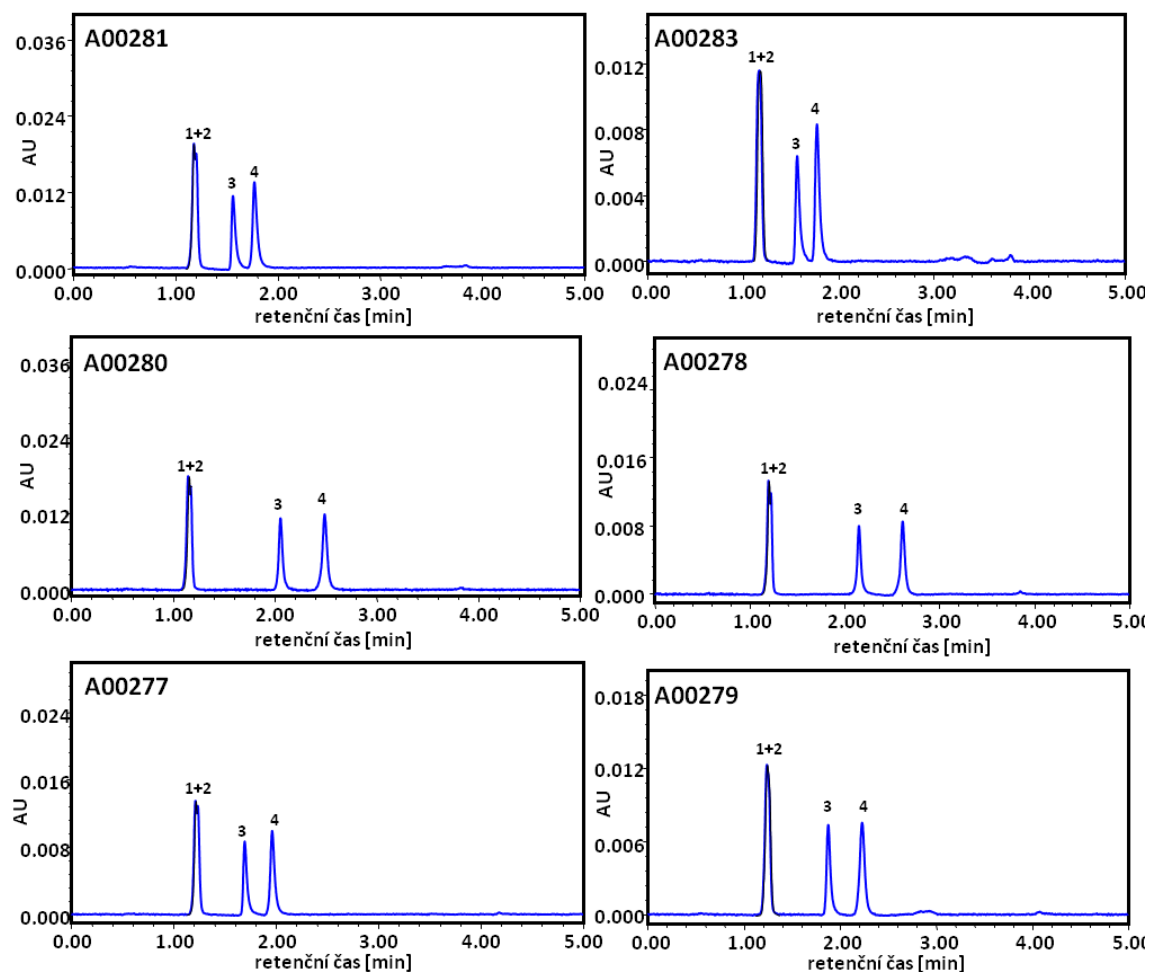
analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	1,18	1,17	1,15	1,21	1,22	1,24
nikotinamid	1,20	1,17	1,18	1,23	1,24	1,24
nikotinová kyselina	1,56	1,57	2,06	2,16	1,70	1,88
isonikotinová kyselina	1,77	1,78	2,49	2,62	1,97	2,24

Tab. 20: Hodnoty RSD retenčních časů [%] derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
isonikotinamid	0,60	3,60	1,15	2,84
nikotinamid	1,79	2,93	0,00	2,56
nikotinová kyselina	0,45	3,35	7,11	13,92
isonikotinová kyselina	0,40	3,60	9,07	16,91



Obr. 18: Graf retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3



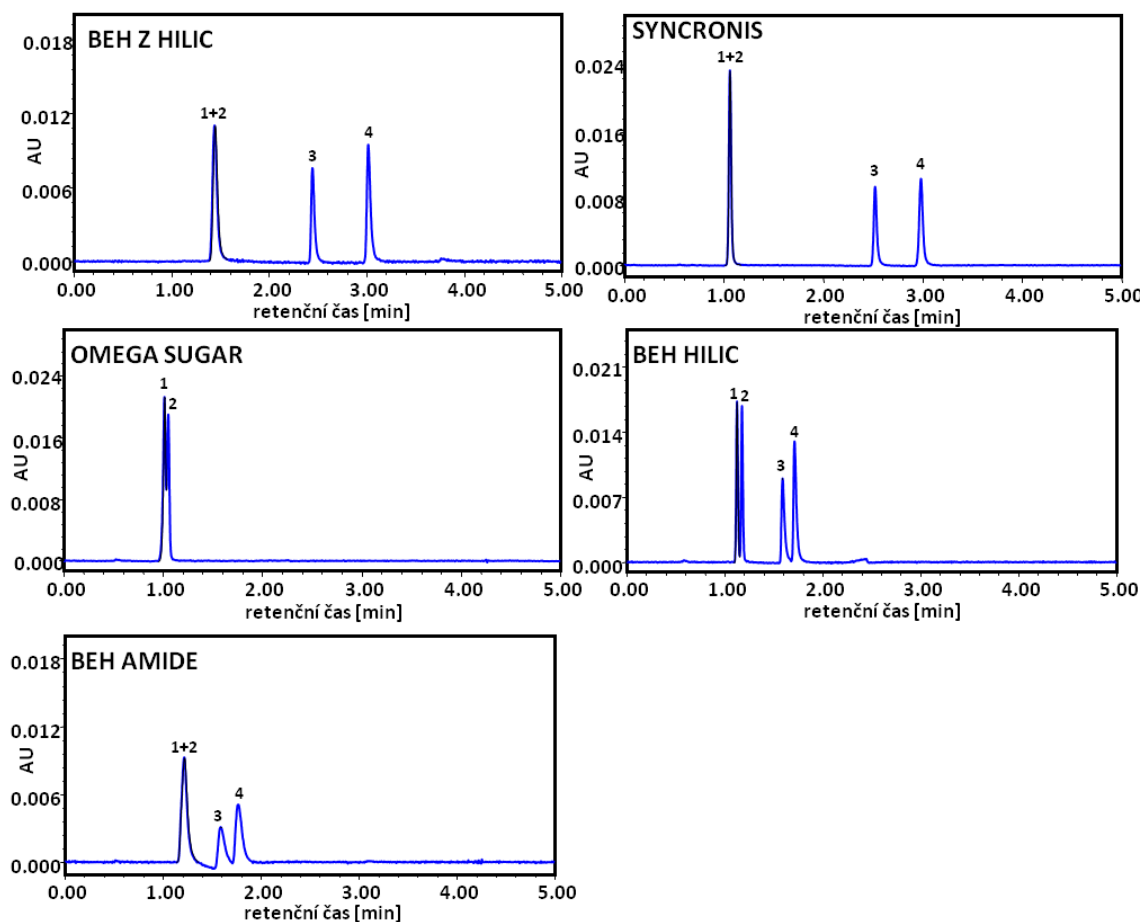
Obr. 19: Chromatogramy separace derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(1–isonikotinamid, 2–nikotinamid, 3–kyselina nikotinová, 4–kyselina isonikotinová)

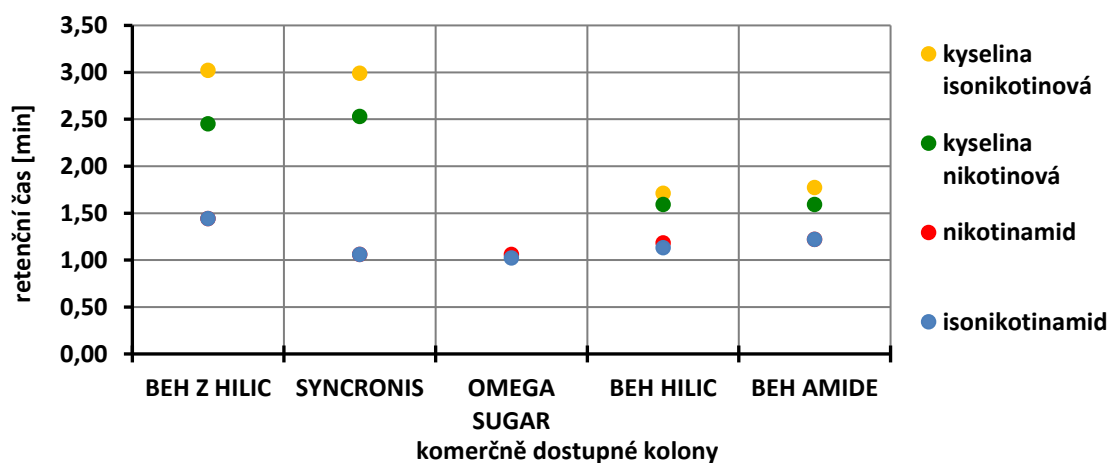
Na komerčně dostupných kolonách jsou nikotinamid a isonikotinamid při pH 3 nejvíce zdržovány na koloně BEH Z HILIC, naopak nejméně na kolonách SYNCRONIS a OMEGA SUGAR, jak uvádí Tab. 21. Na koloně OMEGA SUGAR nejsou kyseliny nikotiková a isonikotinová eluovány vůbec. Na Obr. 21 je patrný rozdíl mezi retencí kyseliny nikotinové a isonikotinové na zwitteriontových kolonách a na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE. Na kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS mají tyto kyseliny výrazně vyšší retenci oproti kolonám BEH HILIC a BEH AMIDE. Dále lze pozorovat vyšší retenci nikotinamidu a isonikotinamidu na koloně BEH Z HILIC oproti koloně SYNCRONIS. Nikotinamid a isonikotinamid jsou téměř rozseparovány na koloně BEH HILIC, částečně i na koloně OMEGA SUGAR. Na ostatních kolonách se neseparují vůbec. Chromatogramy derivátů kyseliny nikotinové při pH 3 jsou uvedeny na Obr. 20.

Tab. 21: Průměrný retenční čas derivátů kyseliny nikotinové [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	1,44	1,06	1,02	1,13	1,22
nikotinamid	1,44	1,06	1,06	1,18	1,22
nikotinová kyselina	2,45	2,53	–	1,59	1,59
isonikotinová kyselina	3,02	2,99	–	1,71	1,77



Obr. 20: Chromatogramy separace derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 3 (1–isonikotinamid, 2–nikotinamid, 3–kyselina nikotinová, 4–kyselina isonikotinová)



Obr. 21: Graf retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 3

RSD retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové je při pH 3 na všech kolonách menší než 0,75 %, a tedy splňuje podmínky pro opakovatelnost. Nejvyšší RSD mají isonikotinamid a nikotinamid na koloně BEH Z HILIC. Na kolonách Astra ZWIX mají nejvyšší RSD isonikotinamid a nikotinamid na koloně A00281. RSD retenčních časů těchto analytů je uvedena v Tab. 22 a Tab. 23.

Tab. 22: RSD retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	0,47	0,25	0,13	0,13	0,05	0,05
nikotinamid	0,51	0,25	0,13	0,16	0,08	0,05
nikotinová kyselina	0,28	0,13	0,07	0,05	0,08	0,08
isonikotinová kyselina	0,21	0,15	0,04	0,04	0,03	0,11

Tab. 23: RSD retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	0,73	0,05	0,11	0,14	0,17
nikotinamid	0,73	0,05	0,16	0,13	0,17
nikotinová kyselina	0,05	0,04	–	0,16	0,17
isonikotinová kyselina	0,03	0,05	–	0,15	0,09

5.1.2.2 Hodnocení retence při pH 6

Při pH 6 mají oproti pH 3 šarže mezi sebou mírně vyšší rozdíl v retenci isonikotinamidu a nikotinamidu, a to 3,20 % a 3,12 %, jak je uvedeno v Tab. 25. Z Tab. 24 a Obr. 22 je patrné, že při pH 6 se oproti pH 3 tak výrazně neliší ani retence kyseliny nikotinové a isonikotinové – RSD 6,16 % a 5,85 %. Nikotinamid a isonikotinamid mají pKa necelých 15, proto je jejich retence téměř stejná při pH 3 a pH 6. Naopak kyseliny nikotinová a isonikotinová mají pKa přibližně 2, proto jsou na kolonách při pH 3 méně zadržovány a při pH 6, kdy jsou již plně ionizovány, zadržovány více.

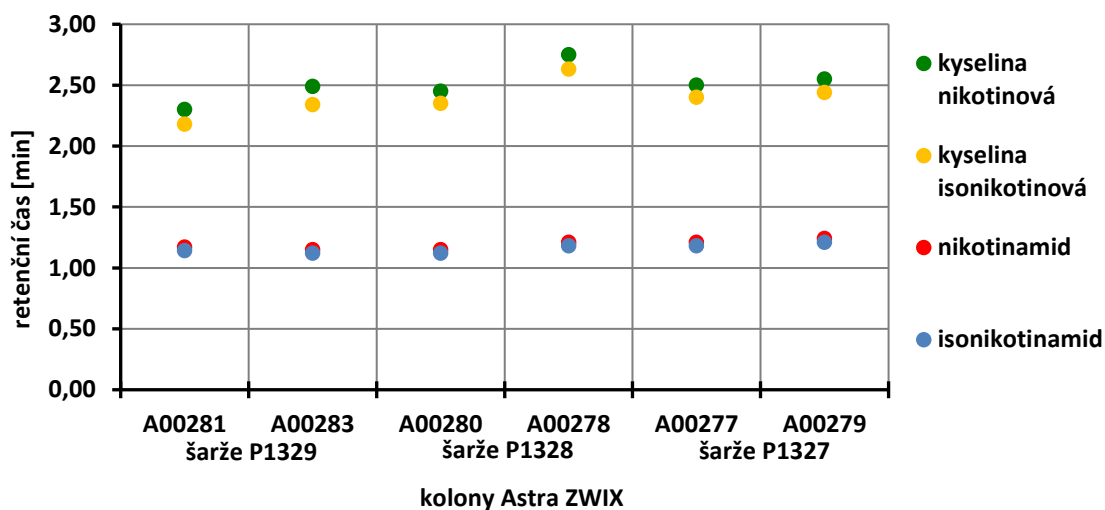
Nejnižší rozdíly v retenci mezi kolonami téže šarže mají isonikotinamid a nikotinamid na kolonách šarže P1329, a to 1,25 % a 1,22 %. Kyseliny isonikotinová a nikotinová mají nejnižší rozdíly na kolonách šarže P1327, a to 1,17 % a 1,40 %. Naopak nejvyšší rozdíly mezi sebou mají, stejně jako při pH3, kolony šarže P1328. Chromatogramy derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 23.

Tab. 24: Průměrný retenční čas derivátů kyseliny nikotinové [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

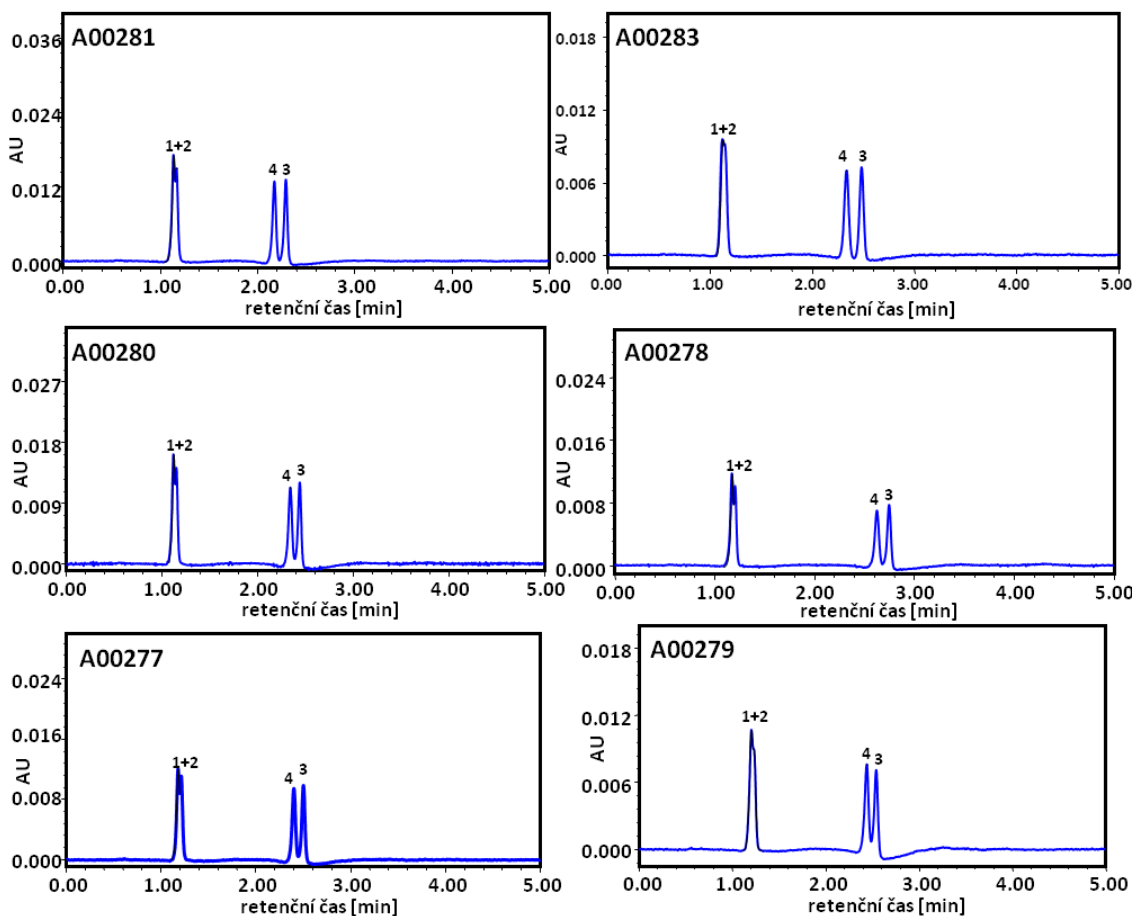
analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	1,14	1,12	1,12	1,18	1,18	1,21
nikotinamid	1,17	1,15	1,15	1,21	1,21	1,24
isonikotinová kyselina	2,18	2,34	2,35	2,63	2,40	2,44
nikotinová kyselina	2,30	2,49	2,45	2,75	2,50	2,55

Tab. 25: Hodnoty RSD retenčních časů [%] derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
isonikotinamid	1,25	3,69	1,78	3,20
nikotinamid	1,22	3,60	1,73	3,12
isonikotinová kyselina	5,01	7,95	1,17	6,16
nikotinová kyselina	5,61	8,16	1,40	5,85



Obr. 22: Graf retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6



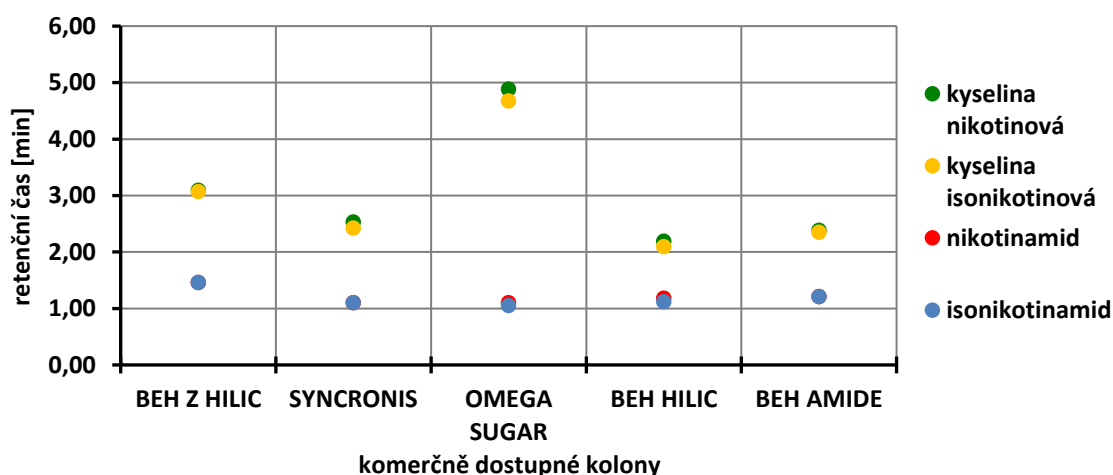
Obr. 23: Chromatogramy separace derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(1–isonikotinamid, 2–nikotinamid, 3–kyselina nikotinová, 4–kyselina isonikotinová)

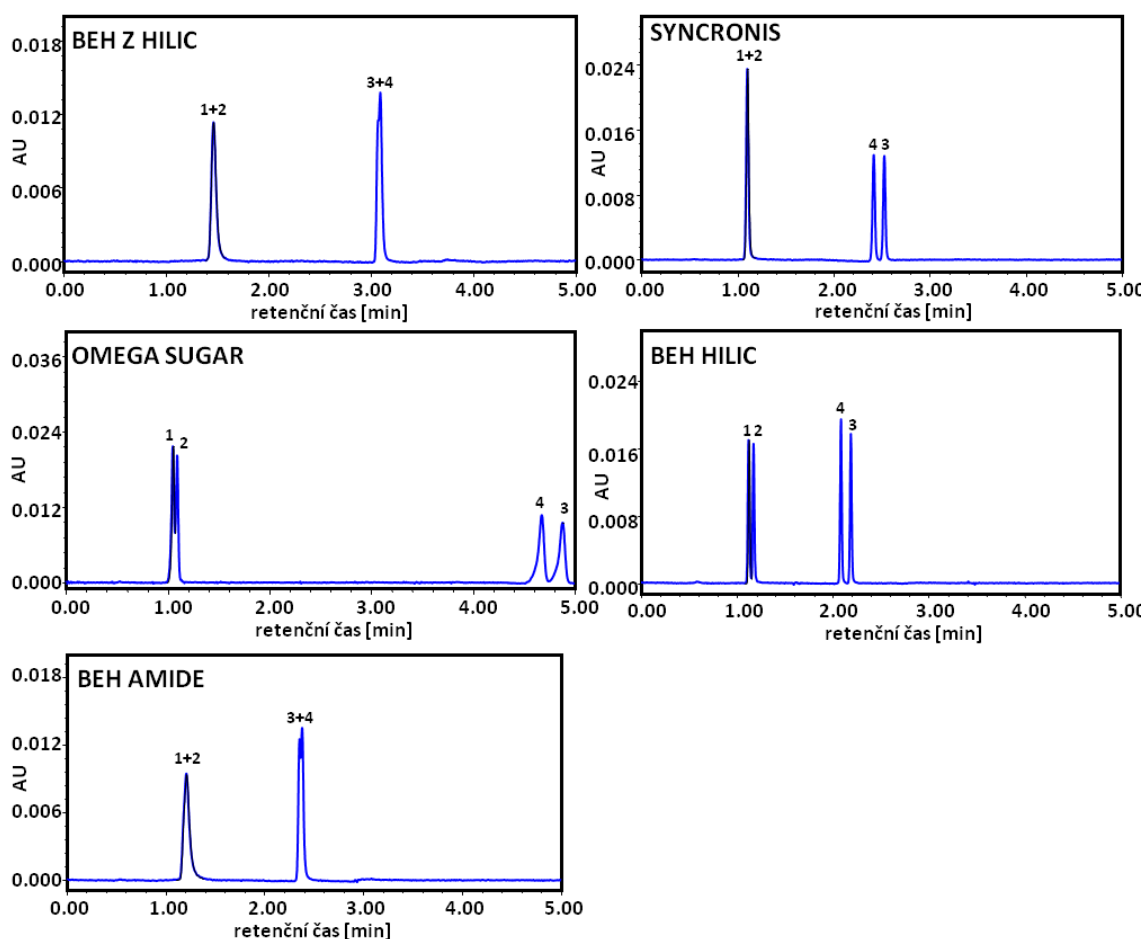
Oproti pH 3, lze při pH 6 na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS pozorovat vyšší rozdíly v retenci mezi analyty. Vyšší retenci mají analyty na koloně BEH Z HILIC, jak je uvedeno v Tab. 26 a na Obr. 24. Na koloně OMEGA SUGAR jsou nikotinamid a isonikotinamid zadržovány jen slabě, naopak vysokou retenci na této koloně vykazují kyseliny nikotinová a isonikotinová. Podobně jako při pH 3, i při pH 6 jsou nikotinamid a isonikotinamid téměř rozseparovány na koloně BEH HILIC a částečně na koloně OMEGA SUGAR, zatímco na ostatních kolonách koeluuji. Na koloně BEH Z HILIC a BEH AMIDE koeluuji též píky kyselin isonikotinové a nikotinové. Chromatogramy derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 25.

Tab. 26: Průměrný retenční čas derivátů kyseliny nikotinové [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	1,46	1,10	1,05	1,12	1,21
nikotinamid	1,46	1,10	1,10	1,18	1,21
isonikotinová kyselina	3,07	2,42	4,67	2,09	2,35
nikotinová kyselina	3,09	2,53	4,88	2,19	2,38



Obr. 24: Graf retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6



Obr. 25: Chromatogramy separace derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6 (1–isonikotinamid, 2–nikotinamid, 3–kyselina nikotinová, 4–kyselina isonikotinová)

RSD retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové při pH 6 je na všech kolonách menší než 0,50 %, a splňuje tedy podmínky opakovatelnosti. Nejvyšší RSD na kolonách Astra ZWIX je u isonikotinamidu a nikotinamidu na koloně A00280 (viz Tab. 27). Na komerčně dostupných kolonách je nejvyšší RSD opět u isonikotinamidu a nikotinamidu na koloně BEH Z HILIC (viz Tab. 28).

Tab. 27: RSD retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	0,05	0,14	0,37	0,05	0,13	0,06
nikotinamid	0,05	0,25	0,36	0,08	0,13	0,00
isonikotinová kyselina	0,03	0,02	0,04	0,02	0,02	0,09
nikotinová kyselina	0,03	0,02	0,04	0,02	0,02	0,06

Tab. 28: RSD retenčních časů derivátů kyseliny nikotinové [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	OMEGA SUGAR	SYNCRONIS	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	0,49	0,25	0,14	0,14	0,05
nikotinamid	0,49	0,26	0,14	0,09	0,05
isonikotinová kyselina	0,02	0,05	0,06	0,07	0,07
nikotinová kyselina	0,00	0,04	0,06	0,07	0,06

5.1.3 Hydrofilní vitamíny

5.1.3.1 Hodnocení retence při pH 3

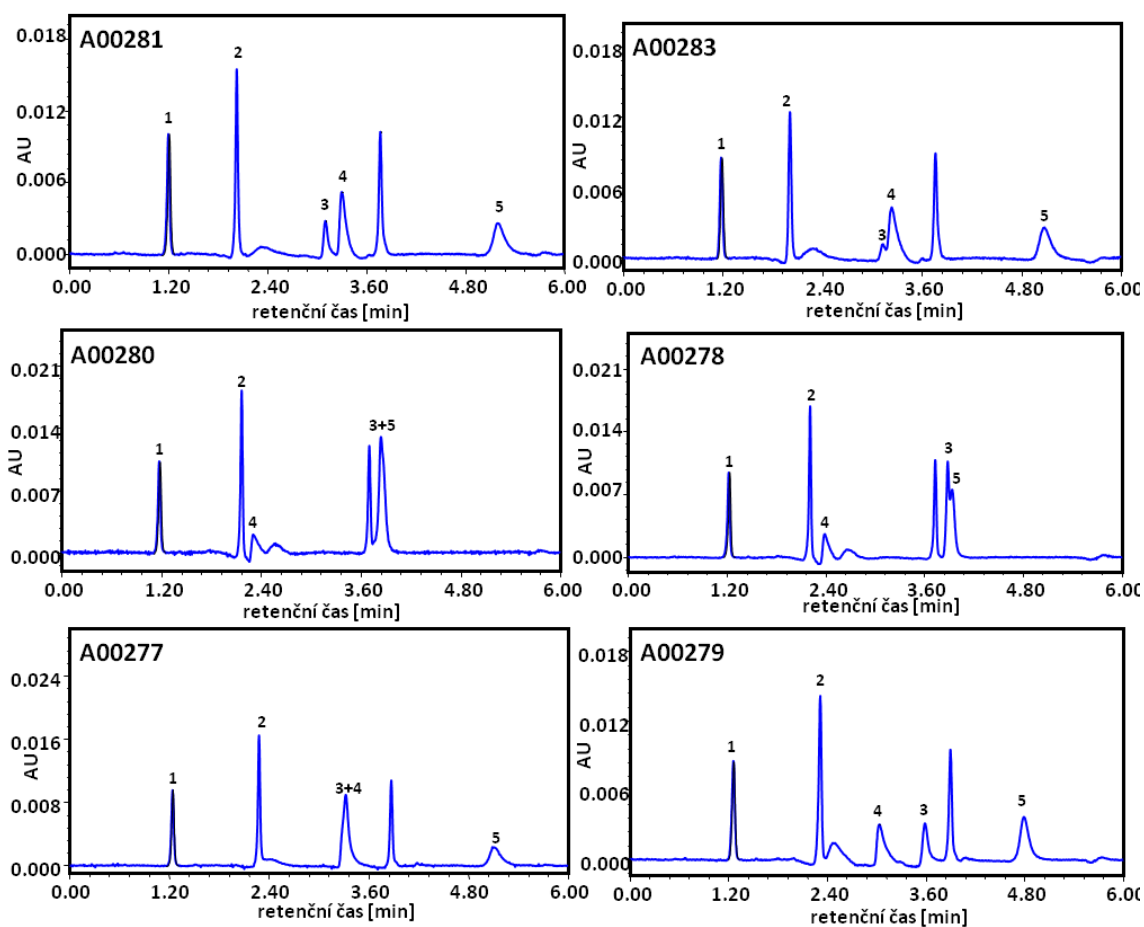
Na všech kolonách Astra ZWIX se retence nikotinamidu a riboflavinu liší pouze o 2,74 %, resp. o 5,88 %, jak je uvedeno v Tab. 30. U dalších analytů se již kolony v rámci jednotlivých šarží liší výrazně – o 13,07 % až 17,69 %. Nejnižší rozdíly mezi kolonami stejné šarže mají kolony šarže P1329, na kterých se retenční časy analytů liší pouze o 0,45 % až 1,79 %. Nejvyšší rozdíly mezi kolonami má šarže P1327, a to zvláště u píků kyseliny listové a pyridoxinu, což je způsobeno tím, že tyto dva analyty na koloně A00277 koeluuji, kdežto na koloně A00279 jsou rozděleny. Rozdíl v retenčních časech těchto dvou analytů je 30,10 % a 18,70 %. Kyselina listová a pyridoxin koeluuji též na kolonách šarže P1329. Na kolonách šarže P1328 koeluuje kyselina listová s thiaminem. Nejvíce jsou analyty zadržovány na kolonách šarže P1329, nejméně na kolonách šarže P1328, jak je uvedeno v Tab. 29 a na Obr. 27. Kobalamin není při pH 3 zadržován na žádné z testovaných kolon Astra ZWIX. Na chromatogramech, jež jsou uvedeny na Obr. 26, lze pozorovat pík, jež pravděpodobně pochází z přetížení kolony.

Tab. 29: Průměrný retenční čas hydrofilních vitamínů [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	1,20	1,18	1,18	1,23	1,24	1,26
riboflavin	2,03	2,01	2,17	2,21	2,28	2,32
kyselina listová	3,11	3,13	3,84	3,88	2,33	3,59
pyridoxin	3,31	3,24	2,31	2,39	2,33	3,04
thiamin	5,20	5,07	3,84	3,94	5,09	4,79

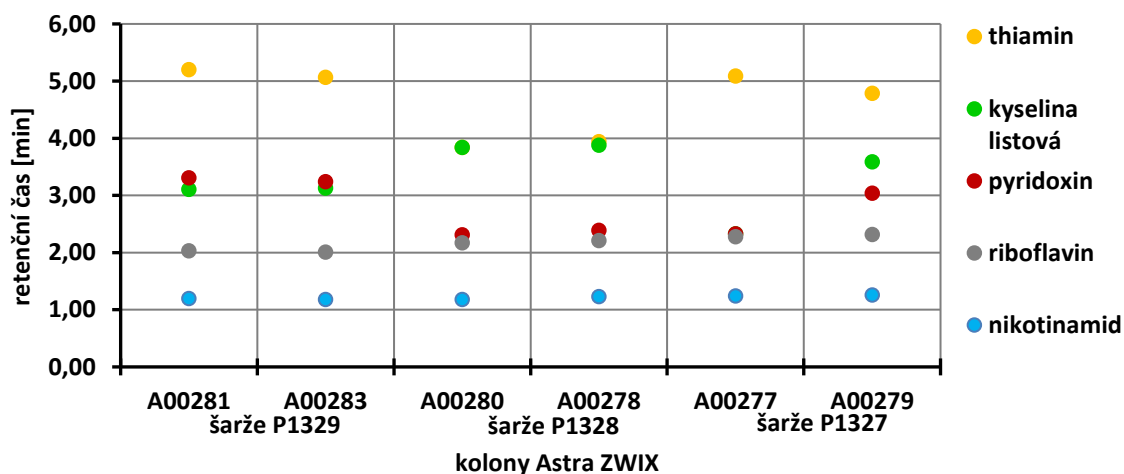
Tab. 30: Hodnoty RSD retenčních časů [%] hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
nikotinamid	1,19	2,93	1,13	2,74
riboflavin	0,70	1,29	1,23	5,88
kyselina listová	0,45	0,73	30,10	17,69
pyridoxin	1,51	2,41	18,70	17,20
thiamin	1,79	1,82	4,29	13,07



Obr. 26: Chromatogramy separace hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(1–nikotinamid, 2–riboflavin, 3–kyselina listová, 4–pyridoxin, 5–thiamin)

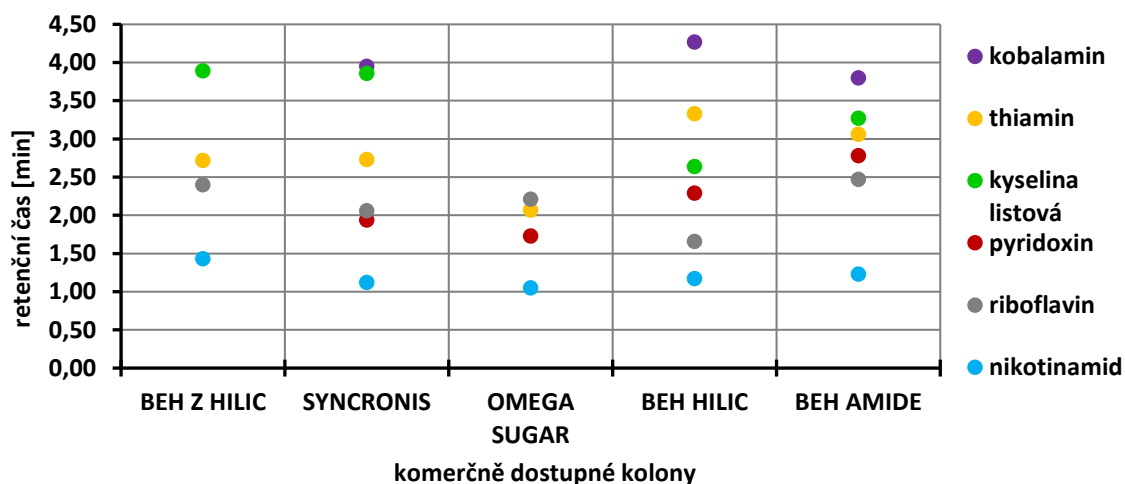


Obr. 27: Graf retenčních časů hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

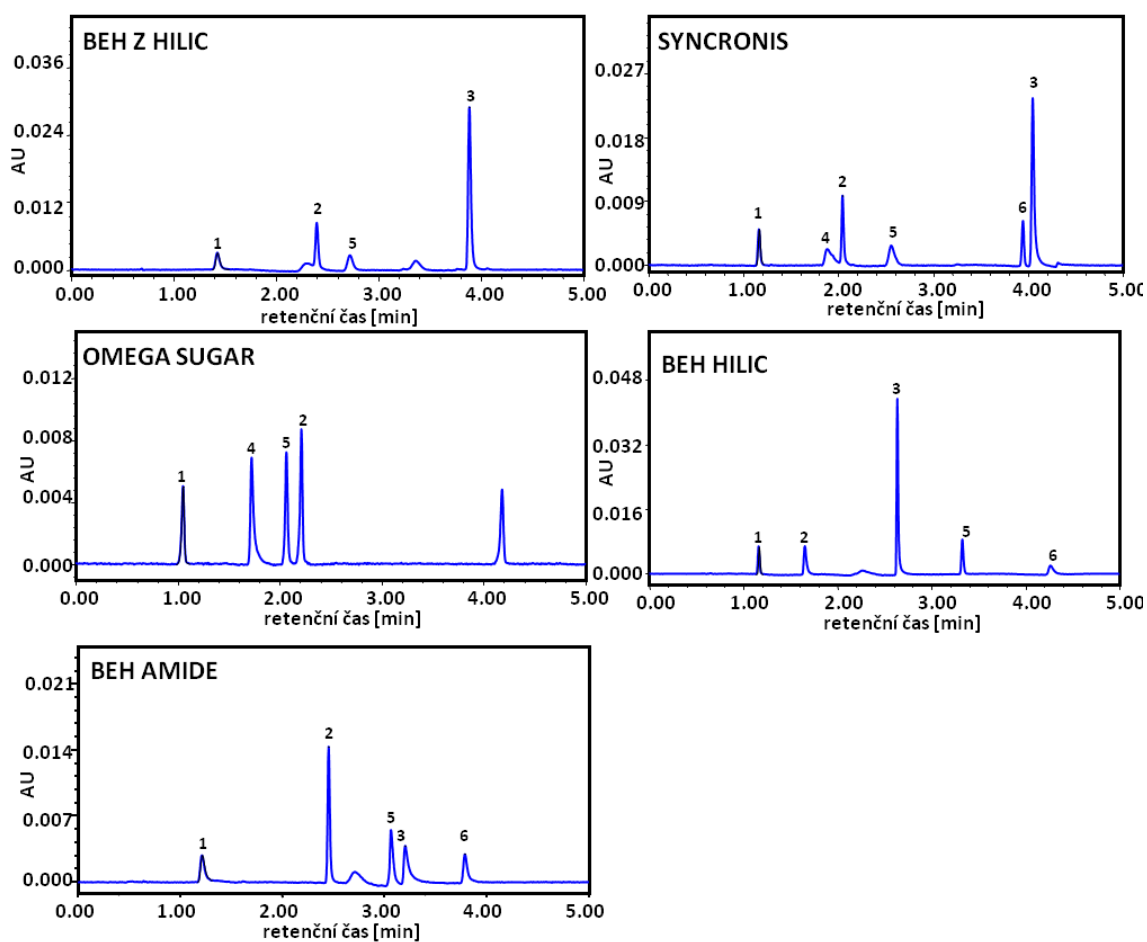
Retence hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách, která je uvedena v Tab. 31 a na Obr. 28, se liší oproti retenci na kolonách Astra ZWIX. Rozdílné je i pořadí retence jednotlivých analytů. Na kolonách Astra ZWIX šarže P1329 a P1327 je retenční čas thiaminu asi 5 minut, zatímco na komerčně dostupných kolonách je thiamin mnohem méně zadržován (retenční čas asi 3 minuty, na koloně OMEGA SUGAR dokonce 2 minuty). Kobalamin je eluován pouze na kolonách SYNCRONIS, BEH HILIC a BEH AMIDE. Pyridoxin není vůbec eluován na koloně BEH Z HILIC, kyselina listová na koloně OMEGA SUGAR. Chromatogramy hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3 jsou uvedeny na Obr. 29.

Tab. 31: Průměrný retenční čas hydrofilních vitamínů [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	1,43	1,12	1,05	1,17	1,23
riboflavin	2,40	2,06	2,21	1,66	2,47
kyselina listová	3,89	4,05	–	2,64	3,27
pyridoxin	–	1,94	1,73	2,29	2,78
thiamin	2,72	2,73	2,07	3,33	3,06
kobalmin	–	3,95	–	4,27	3,80



Obr. 28: Graf retenčních časů hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3



Obr. 29: Chromatogramy separace hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

(1–nikotinamid, 2–riboflavin, 3–kyselina listová, 4–pyridoxin, 5–thiamin, 6–kobalamin)

RSD retenčních časů hydrofilních vitamínů při pH 3 je na všech kolonách menší než 0,45 %, jak je patrné z Tab. 32 a Tab. 33. Nejvyšší RSD má nikotinamid na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE, z kolon Astra ZWIX na kolonách šarže P1327.

Tab. 32: RSD retenčních časů hydrofilních vitamínů [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	0,05	0,05	0,21	0,05	0,25	0,28
riboflavin	0,03	0,06	0,05	0,00	0,04	0,04
kyselina listová	0,05	0,12	0,04	0,03	0,03	0,02
pyridoxin	0,05	0,22	0,10	0,07	0,03	0,05
thiamin	0,06	0,14	0,04	0,03	0,00	0,04

Tab. 33: RSD retenčních časů hydrofilních vitamínů [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	0,34	0,00	0,11	0,40	0,43
riboflavin	0,00	0,07	0,05	0,12	0,08
kyselina listová	0,03	0,04	–	0,02	0,00
pyridoxin	–	0,14	0,07	0,00	0,14
thiamin	0,06	0,17	0,03	0,02	0,05
kobalmin	–	0,04	–	0,01	0,05

5.1.3.2 Hodnocení retence při pH 6

Retence nikotinamidu, pyridoxinu a riboflavinu se na všech kolonách Astra ZWIX liší o 2,76 % až 8,04 %, jak je uvedeno v Tab. 35. Nejnižší rozdíly v retenci mají kolony šarže P1327, liší se o 0,00 % až 1,94 %. Naopak nejvyšší rozdíly v retenci vykazují kolony šarže P1328, liší se o 3,01 % až 11,66 %. Oproti pH 3 se kyselina listová při pH 6 štěpí na dva píky. Mohlo by to být způsobeno tím, že kyselina listová má pKa 3,5 a je tudíž při pH 3 neionizovaná. Naopak při pH 6 je již částečně ionizovaná, a proto lze na chromatogramu pozorovat dvojitý pík. Vyšší retenci kyseliny listové lze pozorovat na kolonách A00283 a A00278, naopak na koloně A00281 je retence mírně nižší, jak je uvedeno v Tab. 34 a na Obr. 30. Thiamin má retenční čas přibližně 5,5 minuty, pouze na koloně A00280 je tento analyt méně zadržován. Na koloně A00278 je v chromatogramu thiaminu tak malý pík, že nelze jednoznačně určit, zda patří testovanému analytu.

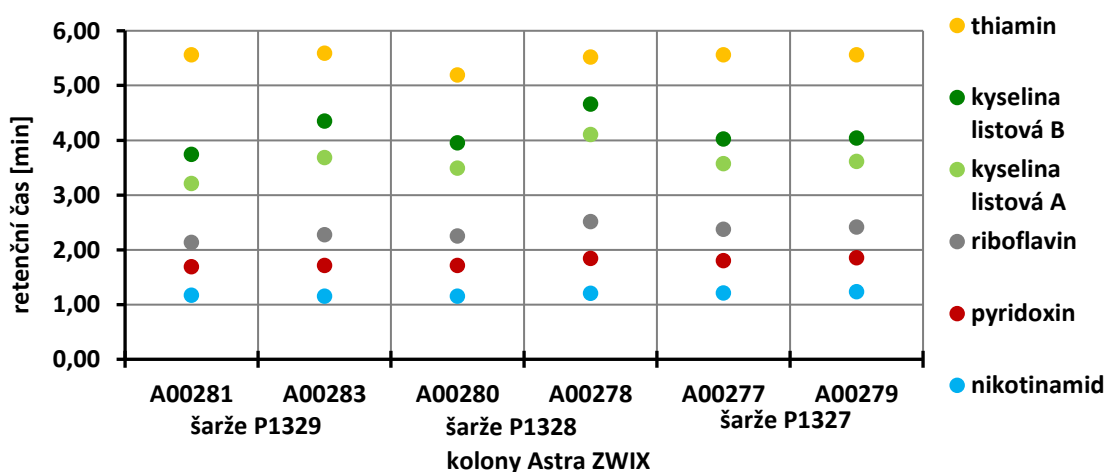
Chromatogramy hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 31.

Tab. 34: Průměrný retenční čas hydrofilních vitamínů [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

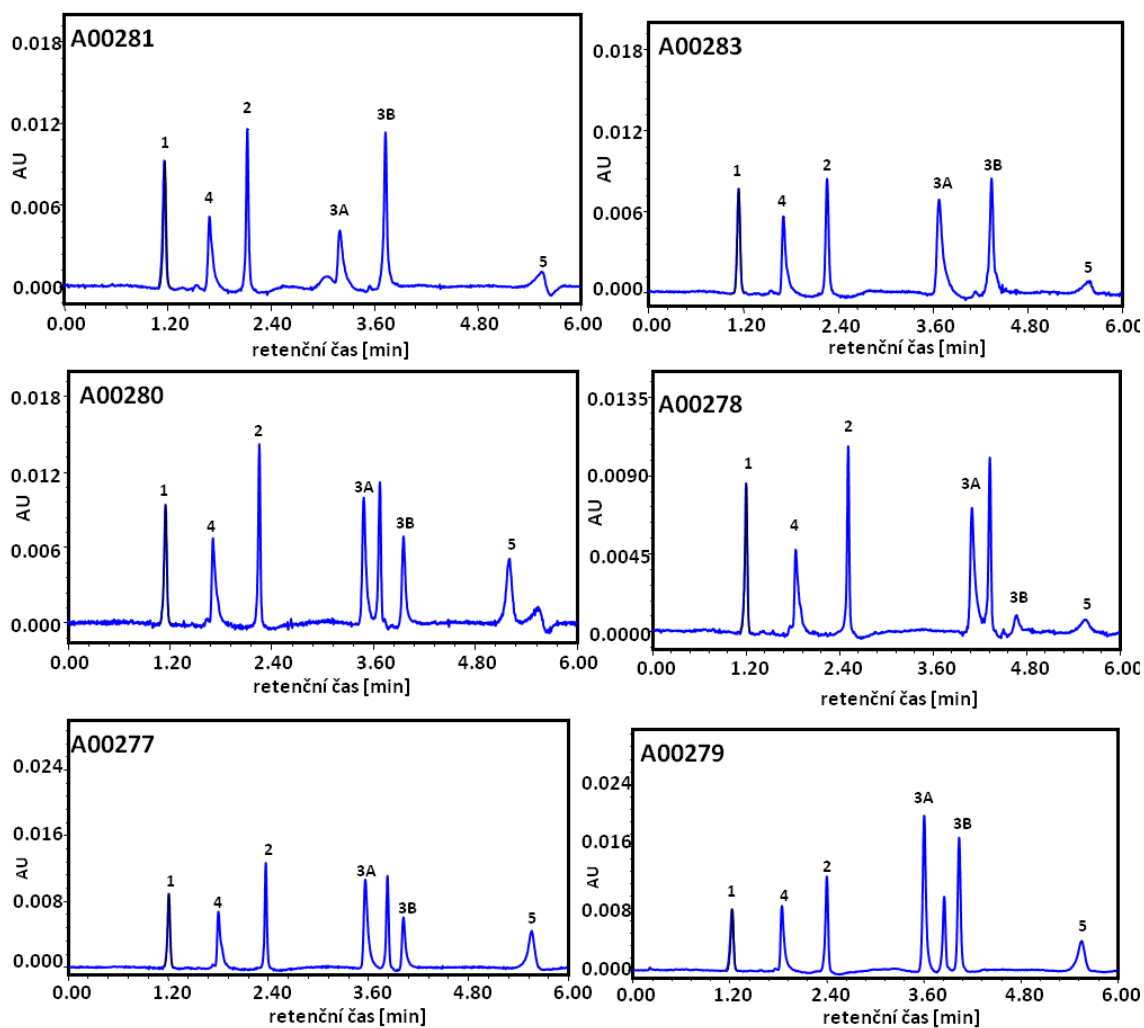
analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	1,17	1,15	1,15	1,20	1,21	1,23
pyridoxin	1,69	1,71	1,71	1,84	1,80	1,85
riboflavin	2,13	2,27	2,25	2,51	2,37	2,41
kyselina listová A	3,21	3,68	3,49	4,10	3,57	3,61
kyselina listová B	3,74	4,35	3,95	4,66	4,02	4,04
thiamin	5,56	5,59	5,19	5,52	5,56	5,56

Tab. 35: Hodnoty RSD retenčních časů [%] hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
nikotinamid	1,22	3,01	1,16	2,81
pyridoxin	0,83	5,18	1,94	4,06
riboflavin	4,50	7,72	1,18	5,78
kyselina listová A	9,65	11,37	0,79	8,04
kyselina listová B	10,66	11,66	0,35	7,92
thiamin	0,38	4,36	0,00	2,76



Obr. 30: Graf retenčních časů hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6



Obr. 31: Chromatogramy separace hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

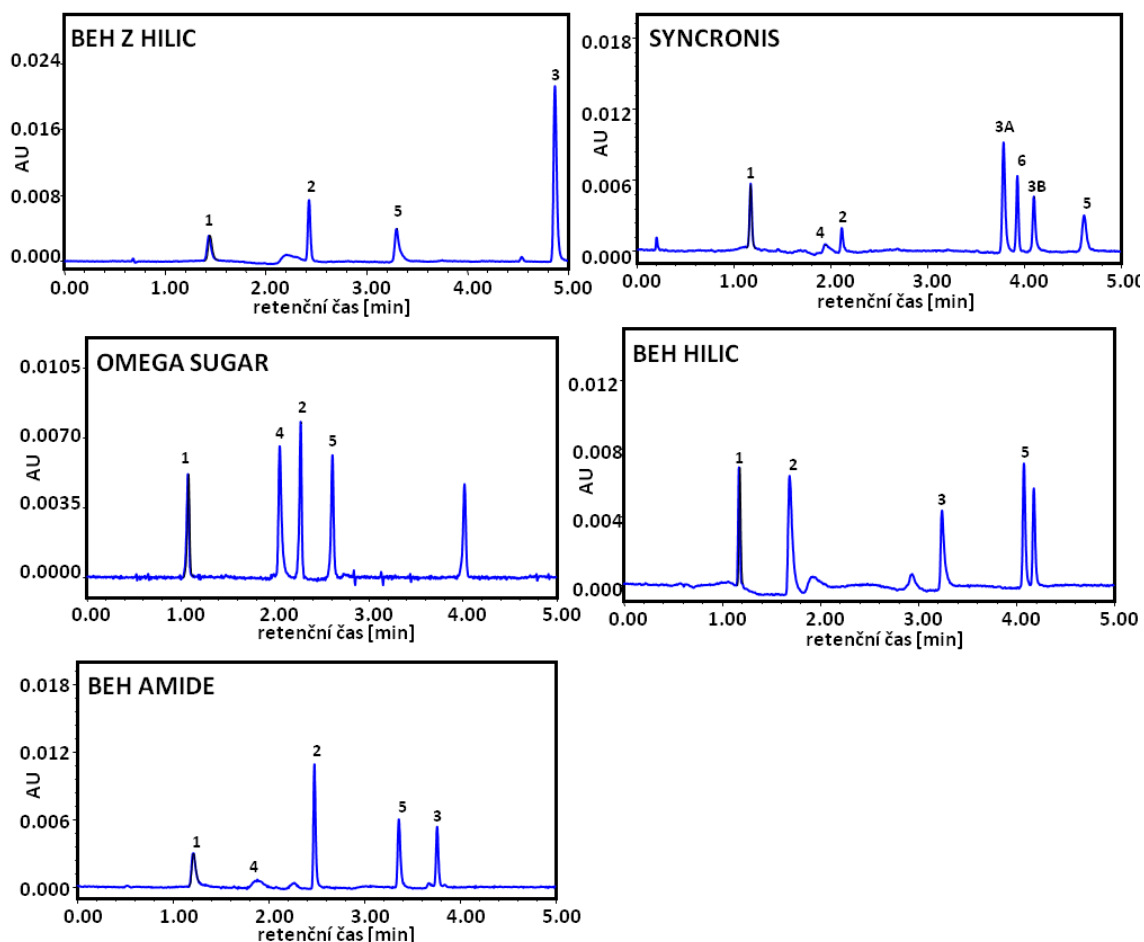
(1–nikotinamid, 2–riboflavin, 3A–kyselina listová pík A, 3B–kyselina listová pík B, 4–pyridoxin, 5–thiamin)

Jak je uvedeno v Tab. 36 a na Obr. 33, zwitteriontová kolona BEH Z HILIC má velmi odlišnou selektivitu oproti kolonám Astra ZWIX. Kolona SYNCRONIS se od kolon Astra ZWIX takto výrazně neliší, má stejné pořadí eluce analytů, kyselina listová se na této koloně, jako jediné z komerčně dostupných, štěpí na dva píky. Na koloně OMEGA SUGAR není kyselina listová eluována vůbec. I při pH 6 se liší retence thiaminu na komerčně dostupných kolonách a na kolonách Astra ZWIX. Na kolonách šarže P1329 a P1327 má thiamin retenční čas 5,5 minuty, na koloně A00280 5,19 minuty. Na komerčně dostupných kolonách je thiamin méně zadržován (retenční časy od 3,30 do 4,50, na koloně OMEGA SUGAR má thiamin dokonce retenční čas 2,62 minuty). Stejně jako při pH 3, i při pH 6 není pyridoxin eluován na koloně BEH Z HILIC a kyselina listová

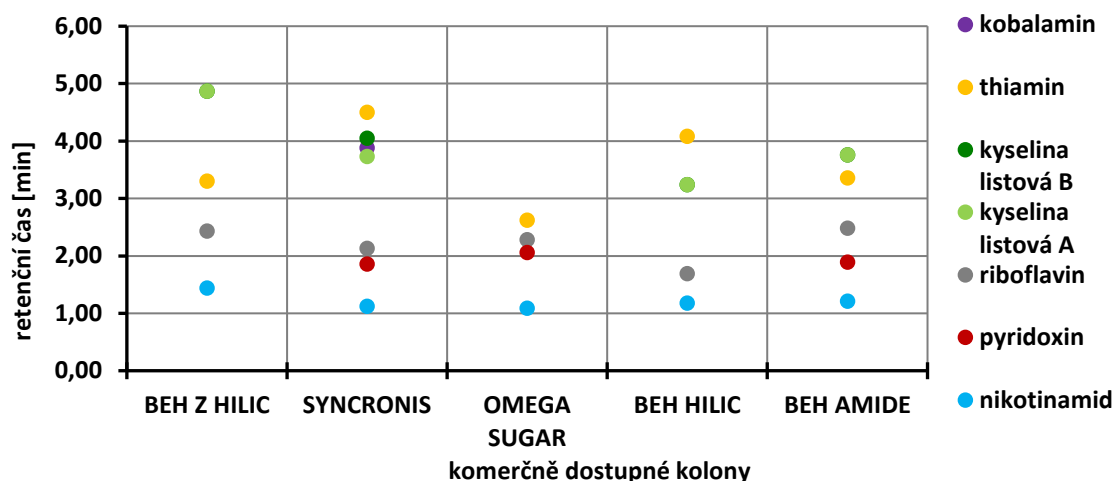
na koloně OMEGA SUGAR. Kobalamin je eluován pouze na koloně SYNCRONIS. Chromatogramy hydrofilních vitamínů při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 32.

Tab. 36: Průměrný retenční čas hydrofilních vitamínů [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	1,44	1,12	1,09	1,18	1,21
pyridoxin	–	1,86	2,06	–	1,89
riboflavin	2,43	2,13	2,28	1,69	2,48
kyselina listová A	4,87	3,73	–	3,24	3,76
kyselina listová B	4,87	4,05	–	3,24	3,76
thiamin	3,30	4,50	2,62	4,08	3,36
kobalamin	–	3,88	–	–	–



Obr. 32: Chromatogramy separace hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6 (1–nikotinamid, 2–riboflavin, 3–kyselina listová, 3A–kyselina listová A, 3B–kyselina listová B, 4–pyridoxin, 5–thiamin, 6–kobalamin)



Obr. 33: Graf retenčních časů hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

RSD retenčních časů hydrofilních vitamínů při pH 6 je na všech testovaných kolonách menší než 0,55 %, jak je patrné z Tab. 37 a Tab. 38, odpovídá tedy podmínkám opakovatelnosti (< 1 %). Nejvyšší RSD má nikotinamid na koloně OMEGA SUGAR, z kolon Astra ZWIX má nejvyšší RSD kyselina listová B na koloně A00278.

Tab. 37: RSD retenčních časů hydrofilních vitamínů [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	0,13	0,10	0,10	0,29	0,14	0,17
pyridoxin	0,03	0,03	0,06	0,16	0,06	0,08
riboflavin	0,03	0,00	0,03	0,02	0,02	0,00
kyselina listová A	0,03	0,05	0,03	0,01	0,02	0,02
kyselina listová B	0,02	0,01	0,03	0,30	0,01	0,01
thiamin	0,11	0,00	0,33	–	0,03	0,02

Tab. 38: RSD retenčních časů hydrofilních vitamínů [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	0,25	0,10	0,52	0,05	0,24
pyridoxin	–	0,03	0,05	–	0,00
riboflavin	0,02	0,05	0,03	0,00	0,02
kyselina listová A	0,01	0,04	–	0,05	0,03
kyselina listová B	0,01	0,04	–	0,05	0,03
thiamin	0,03	0,08	0,06	0,01	0,03
kobalamin	–	0,01	–	–	–

5.1.4 Betablokátořy

Selektivita kolon Astra ZWIX pro separaci betablokátořů nebyla optimální. BB se za zvolených chromatografických podmínek nepovedlo dobře rozseparovat, propranolol, metoprolol, pindolol a acebutolol při obou pH koeluovaly. Odstranění tohoto problému bylo jedním z hlavních cílů pozdější optimalizace.

5.1.4.1 Hodnocení retence při pH 3

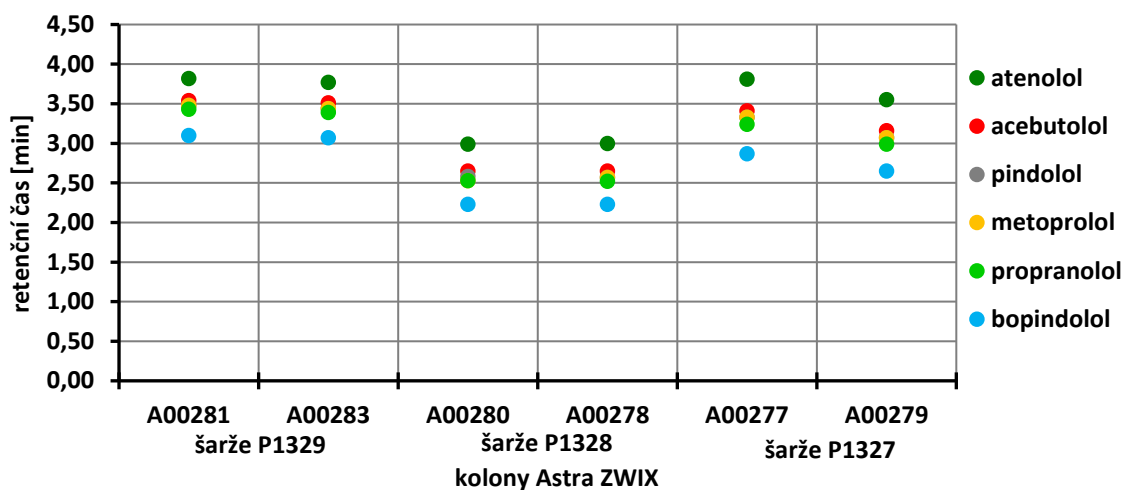
Retence betablokátořů na kolonách Astra ZWIX při pH 3 se v rámci šarže téměř neliší u šarží P1329 a P1328 (RSD 0,00 % až 1,11 %), jak je uvedeno v Tab. 40. Nejvyšší rozdíl v retenci analytů mezi kolonami má šarže P1327, kde se retenční časy liší o 5,00 % až 5,75 %. Mezi šaržemi jsou rozdíly v retenci velmi výrazně, liší se o 11,34 % až 14,58 %. Nejméně jsou BB zadržovány na kolonách šarže P1328 (viz Tab. 39 a Obr. 35). Chromatogramy BB na kolonách Astra ZWIX při pH 3 jsou uvedeny na Obr. 34.

Tab. 39: Průměrný retenční čas BB [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

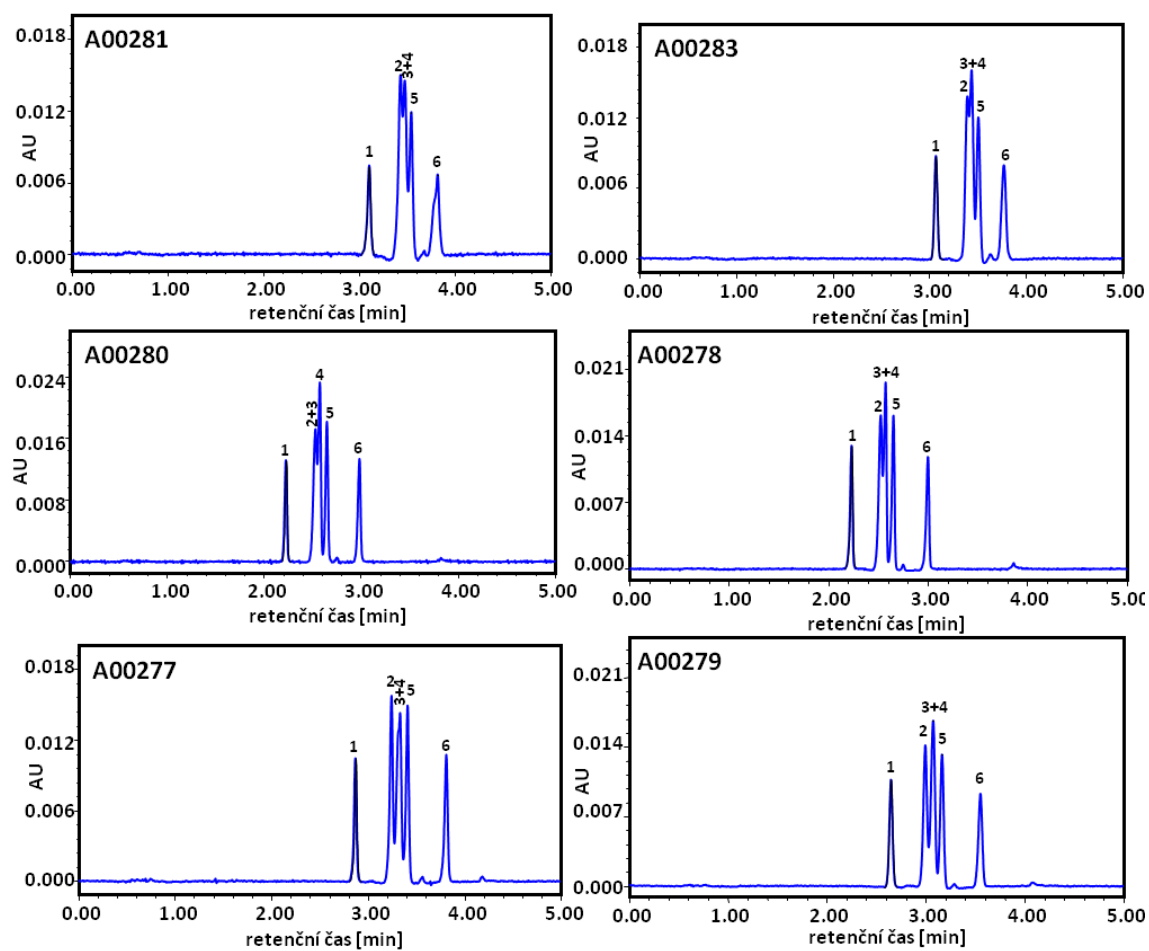
analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	3,10	3,07	2,23	2,23	2,87	2,65
propranolol	3,43	3,39	2,53	2,52	3,24	2,99
metoprolol	3,48	3,44	2,53	2,57	3,33	3,07
pindolol	3,48	3,44	2,58	2,57	3,33	3,07
acebutolol	3,54	3,51	2,65	2,65	3,41	3,16
atenolol	3,82	3,77	2,99	3,00	3,81	3,55

Tab. 40: Hodnoty RSD retenčních časů [%] BB na kolonách Astra ZWIX při pH 3 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
bopindolol	0,69	0,00	5,64	14,58
propranolol	0,83	0,28	5,68	13,62
metoprolol	0,82	1,11	5,75	13,93
pindolol	0,82	0,27	5,75	13,49
acebutolol	0,60	0,00	5,38	13,07
atenolol	0,93	0,24	5,00	11,34



Obr. 35: Graf retenčních časů BB na kolonách Astra ZWIX při pH 3



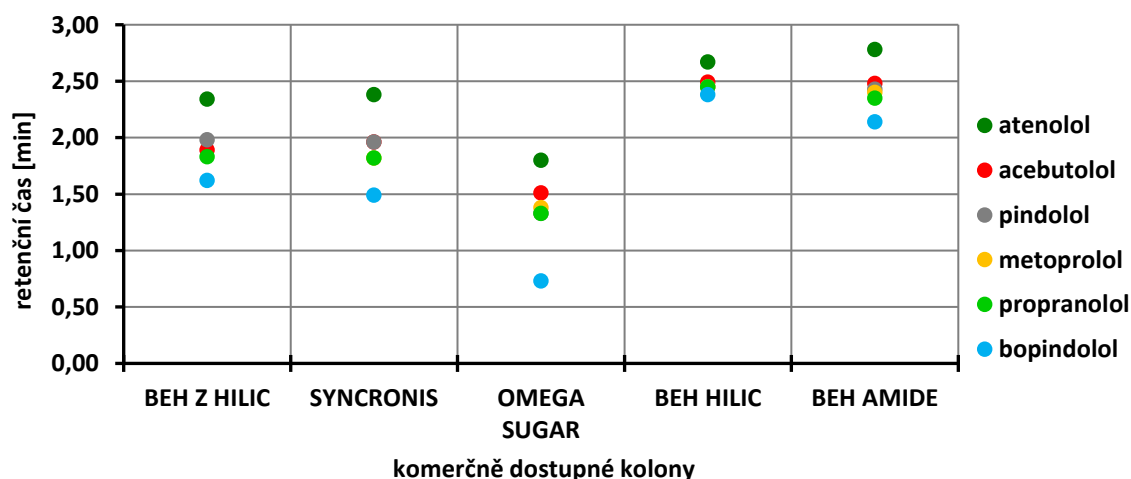
Obr. 34: Chromatogramy separace BB na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(1–bopindolol, 2–propranolol, 3–metoprolol, 4–pindolol, 5–acebutolol, 6–atenolol)

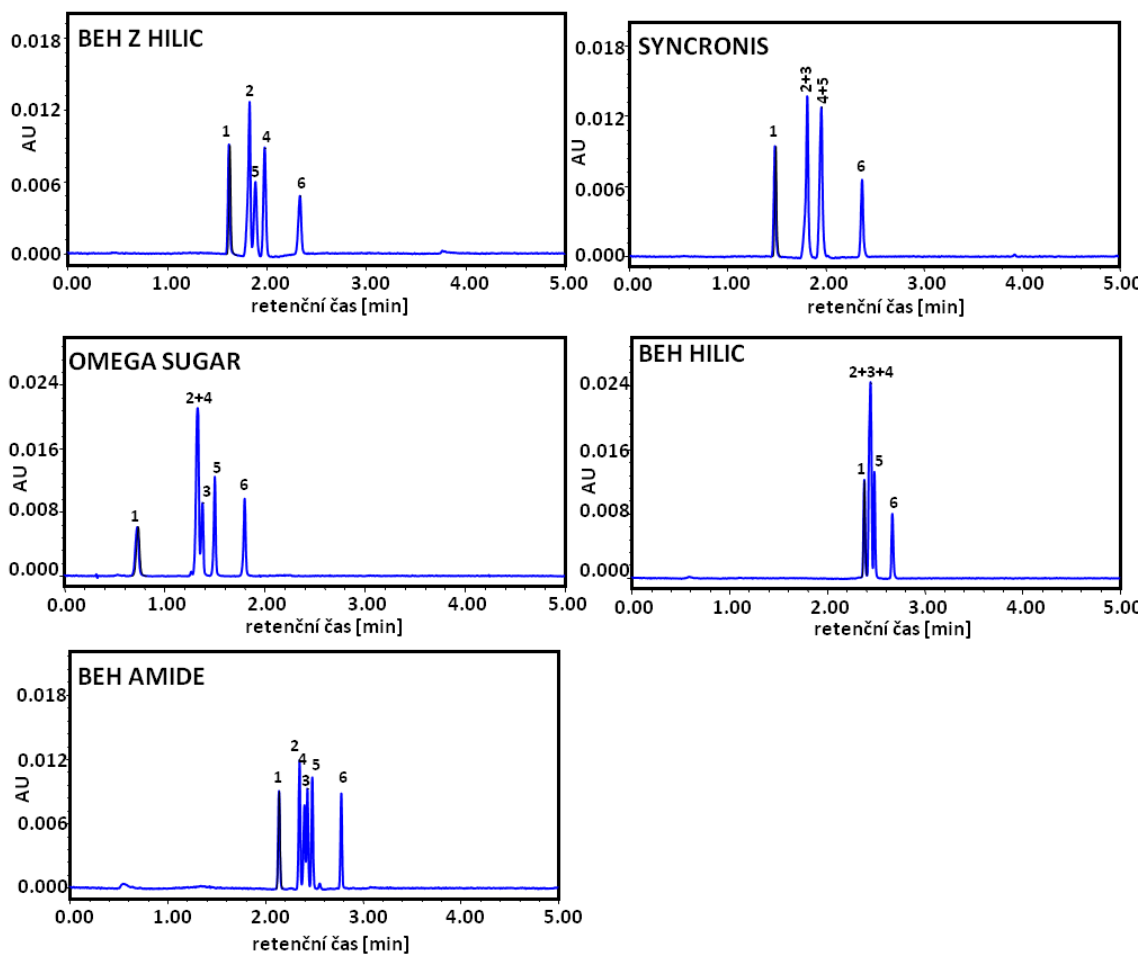
Komerčně dostupné kolony vykazují oproti kolonám Astra ZWIX nižší retenci BB, jak je uvedeno v Tab. 41 a na Obr. 36, kromě kolony BEH HILIC, na které je retence BB srovnatelná s retencí na kolonách Astra ZWIX šarže P1328. Nejméně jsou BB zadržovány na koloně OMEGA SUGAR. I na komerčně dostupných kolonách se nepovedlo BB plně rozseparovat. Nejlépe se BB separují na koloně BEH Z HILIC, na které však není vůbec eluován metoprolol. Málo selektivní pro BB je kolona BEH HILIC. Na koloně BEH AMIDE jsou BB separovány obdobně jako na kolonách Astra ZWIX. Chromatogramy BB na komerčně dostupných kolonách při pH 3 jsou uvedeny na Obr. 37.

Tab. 41: Průměrný retenční čas BB [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	1,62	1,49	0,73	2,38	2,14
propranolol	1,83	1,82	1,33	2,45	2,35
metoprolol	–	1,82	1,38	2,45	2,40
pindolol	1,98	1,96	1,33	2,45	2,43
acebutolol	1,89	1,96	1,51	2,49	2,48
atenolol	2,34	2,38	1,80	2,67	2,78



Obr. 36: Graf retenčních časů BB na komerčně dostupných kolonách při pH 3



Obr. 37: Chromatogramy separace BB na komerčně dostupných kolonách při pH 3
(1–bopindolol, 2–propranolol, 3–metoprolol, 4–pindolol, 5–acebutolol, 6–atenolol)

RSD retenčních časů BB při pH 3 je velmi nízká, jak uvádí Tab. 42 a Tab. 43. Na všech kolonách je RSD menší než 0,15 %, a tedy splňuje podmínky opakovatelnosti. Na kolonách Astra ZWIX je dokonce RSD menší nebo rovna 0,06 %.

Tab. 42: RSD retenčních časů BB [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	0,03	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04
propranolol	0,04	0,03	0,06	0,05	0,04	0,05
metoprolol	0,02	0,02	0,06	0,04	0,03	0,04
pindolol	0,02	0,02	0,06	0,04	0,03	0,04
acebutolol	0,02	0,03	0,06	0,04	0,03	0,05
atenolol	0,03	0,02	0,05	0,04	0,03	0,03

Tab. 43: RSD retenčních časů BB [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	0,06	0,08	0,14	0,06	0,03
propranolol	0,06	0,08	0,07	0,05	0,00
metoprolol	–	0,08	0,04	0,05	0,02
pindolol	0,08	0,08	0,07	0,05	0,02
acebutolol	0,08	0,08	0,04	0,05	0,00
atenolol	0,07	0,06	0,08	0,04	0,05

5.1.4.2 Hodnocení retence při pH 6

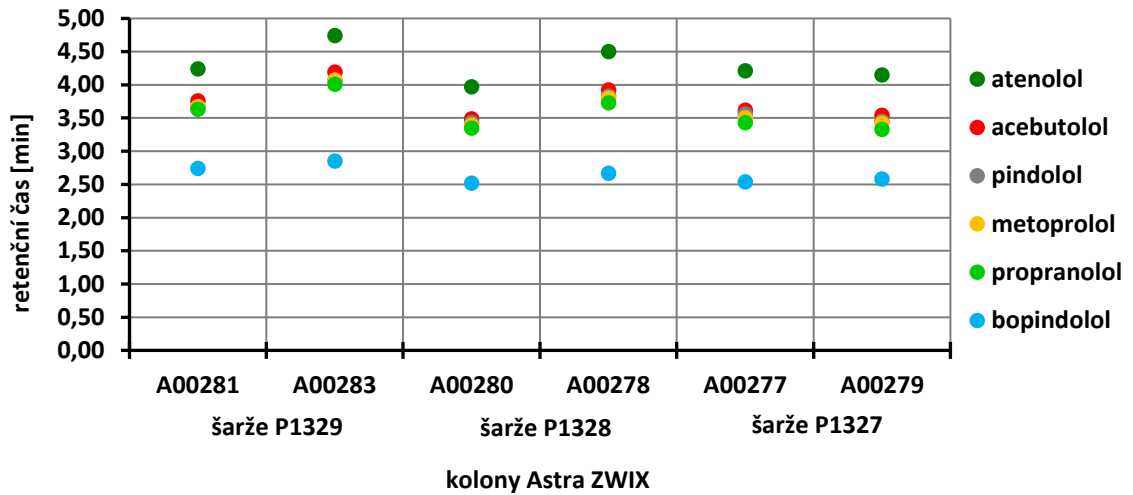
Retence BB při pH 6 je na kolonách Astra ZWIX šarže P1327 velmi podobná (RSD od 1,01 % do 2,09 %), jak je vidět v Tab. 45. U kolon ostatních dvou šarží se liší o 2,78 % až 8,85 %. V rámci šarže P1329 jsou BB více zadržovány na koloně A00283. V šarži P1328 mají analyty vyšší retenční čas na koloně A00278, jak je uvedeno v Tab. 44 a na Obr. 38. Chromatogramy BB na kolonách Astra ZWIX při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 39.

Tab. 44: Průměrný retenční čas BB [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

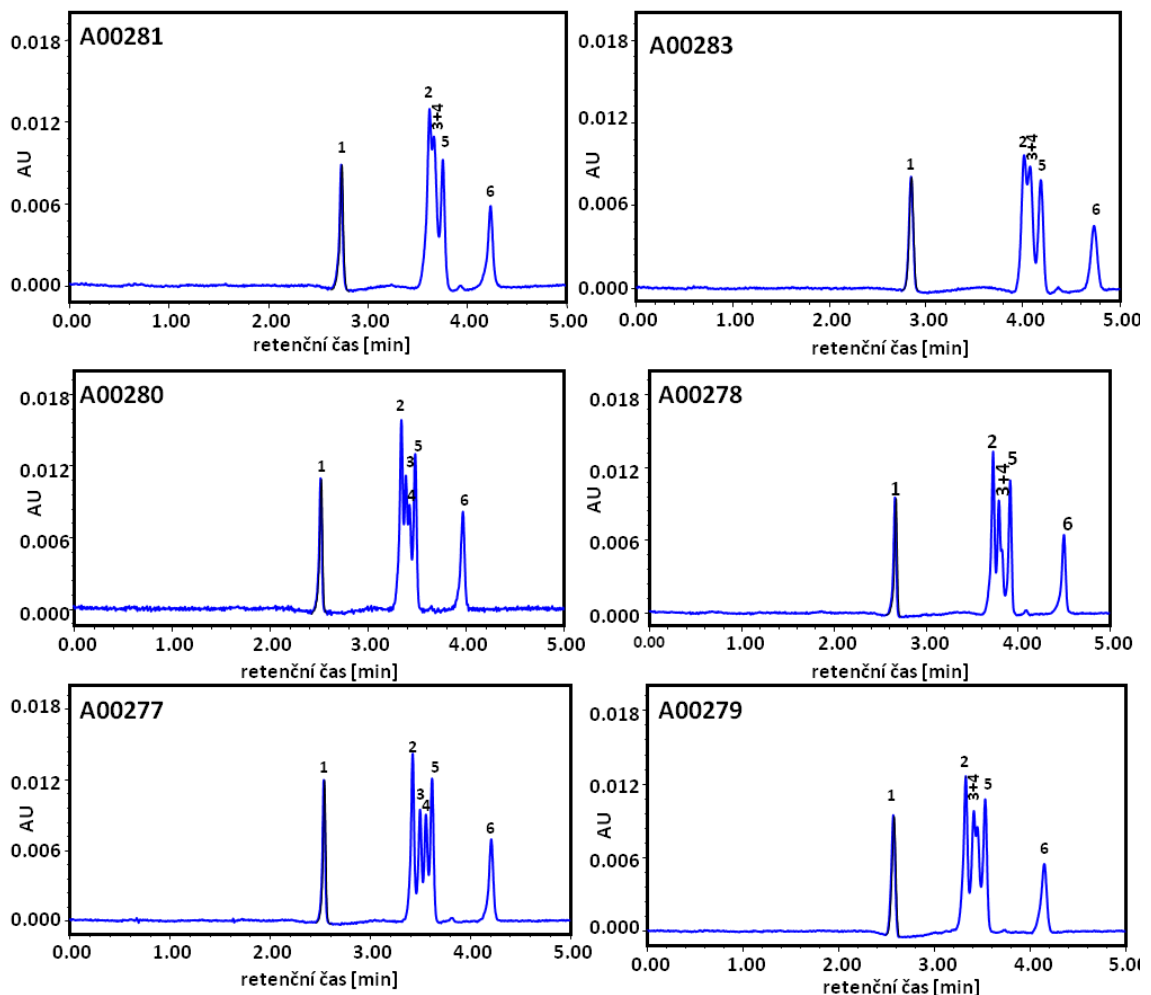
analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	2,74	2,85	2,52	2,67	2,54	2,58
propranolol	3,63	4,01	3,35	3,73	3,43	3,33
metoprolol	3,67	4,07	3,39	3,80	3,50	3,42
pindolol	3,67	4,07	3,43	3,83	3,56	3,45
acebutolol	3,76	4,19	3,49	3,92	3,62	3,54
atenolol	4,24	4,74	3,97	4,50	4,21	4,15

Tab. 45: Hodnoty RSD retenčních časů [%] BB na kolonách Astra ZWIX při pH 6 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
bopindolol	2,78	4,09	1,10	4,84
propranolol	7,03	7,59	2,09	7,37
metoprolol	7,31	8,06	1,63	7,18
pindolol	7,31	7,79	2,22	6,72
acebutolol	7,65	8,21	1,58	7,06
atenolol	7,87	8,85	1,01	6,38



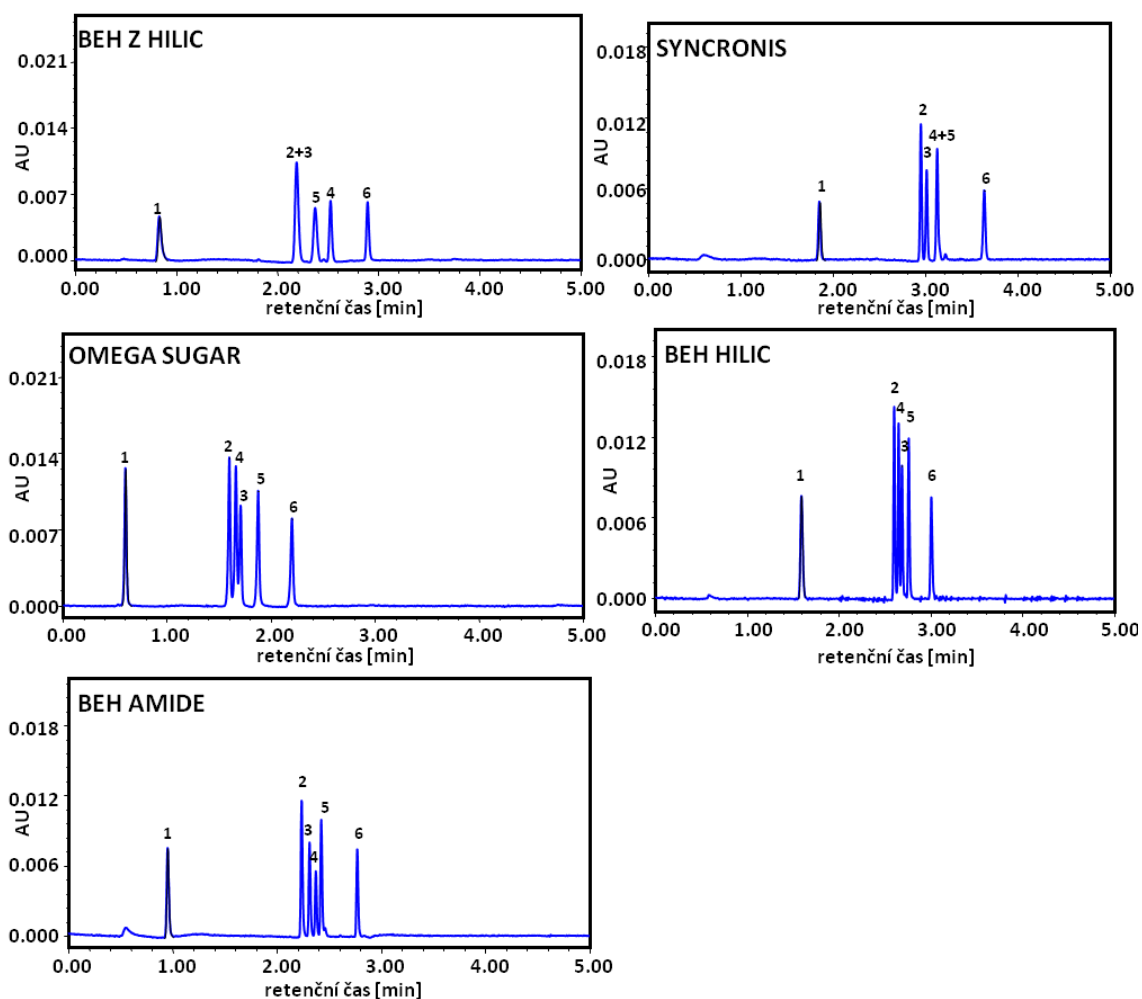
Obr. 38: Graf retenčních časů BB na kolonách Astra ZWIX při pH 6



Obr. 39: Chromatogramy separace BB na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(1–bopindolol, 2–propranolol, 3–metoprolol, 4–pindolol, 5–acebutolol, 6–atenolol)

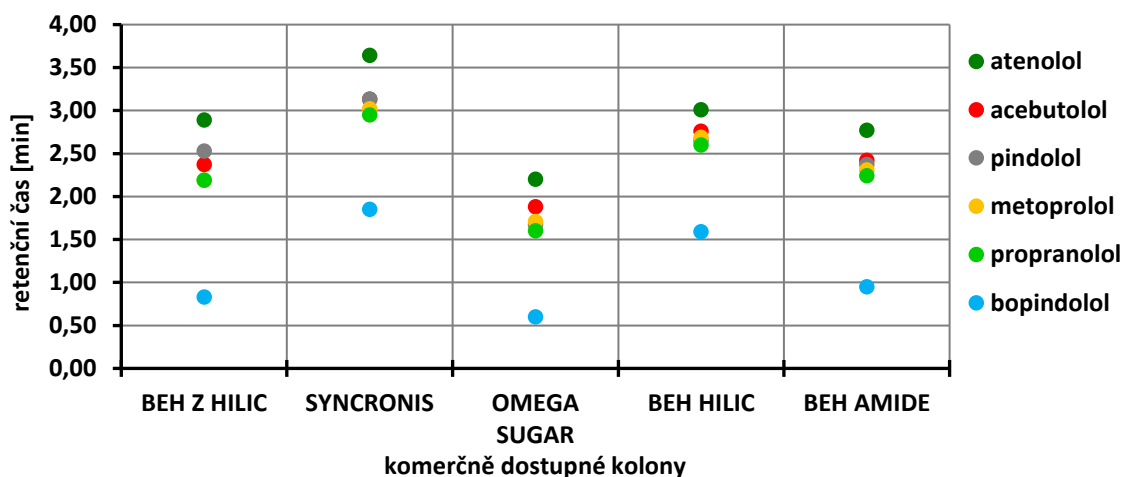
Na všech analyzovaných komerčně dostupných kolonách jsou analyty méně zadržovány, nejnižší retence je pozorovatelná na koloně OMEGA SUGAR, jak je patrné z Tab. 46 a Obr. 41. Oproti kolonám Astra ZWIX, zvýšení pH zlepšilo rozlišení na komerčně dostupných kolonách. Nejlépe se BB při pH 6 separují na kolonách SYNCRONIS a BEH AMIDE. Pouze na koloně BEH Z HILIC poskytují propranolol a metoprolol společný pík. Chromatogramy BB na komerčně dostupných kolonách při pH 6 jsou zobrazeny na Obr. 40.



Obr. 40: Chromatogramy separace BB na komerčně dostupných kolonách při pH 6 (1–bopindolol, 2–propranolol, 3–metoprolol, 4–pindolol, 5–acebutolol, 6–atenolol)

Tab. 46: Průměrný retenční čas BB [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	0,83	1,85	0,60	1,59	0,95
propranolol	2,19	2,95	1,60	2,60	2,24
metoprolol	2,19	3,02	1,71	2,69	2,31
pindolol	2,53	3,13	1,67	2,65	2,37
acebutolol	2,37	3,13	1,88	2,76	2,42
atenolol	2,89	3,64	2,20	3,01	2,77



Obr. 41: Graf retenčních časů BB na komerčně dostupných kolonách při pH 6

RSD retenčních časů BB při pH 6 je velmi nízká, pohybuje se v rozmezí 0,00 až 0,18 % (viz Tab. 47 a Tab. 48). Na kolonách Astra ZWIX je RSD menší nebo rovno 0,09 %. Splňuje podmínky opakovatelnosti.

Tab. 47: RSD retenčních časů BB [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	0,04	0,02	0,09	0,04	0,05	0,02
propranolol	0,04	0,03	0,05	0,02	0,02	0,02
metoprolol	0,03	0,02	0,07	0,02	0,02	0,03
pindolol	0,03	0,02	0,04	0,03	0,02	0,03
acebutolol	0,04	0,02	0,04	0,01	0,02	0,02
atenolol	0,05	0,04	0,04	0,01	0,01	0,06

Tab. 48: RSD retenčních časů BB [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	0,18	0,09	0,10	0,00	0,06
propranolol	0,07	0,05	0,07	0,07	0,09
metoprolol	0,07	0,05	0,07	0,06	0,11
pindolol	0,00	0,05	0,07	0,06	0,09
acebutolol	0,02	0,05	0,08	0,07	0,09
atenolol	0,02	0,06	0,05	0,05	0,06

5.1.5 Fenolické kyseliny

5.1.5.1 Hodnocení retence při pH 3

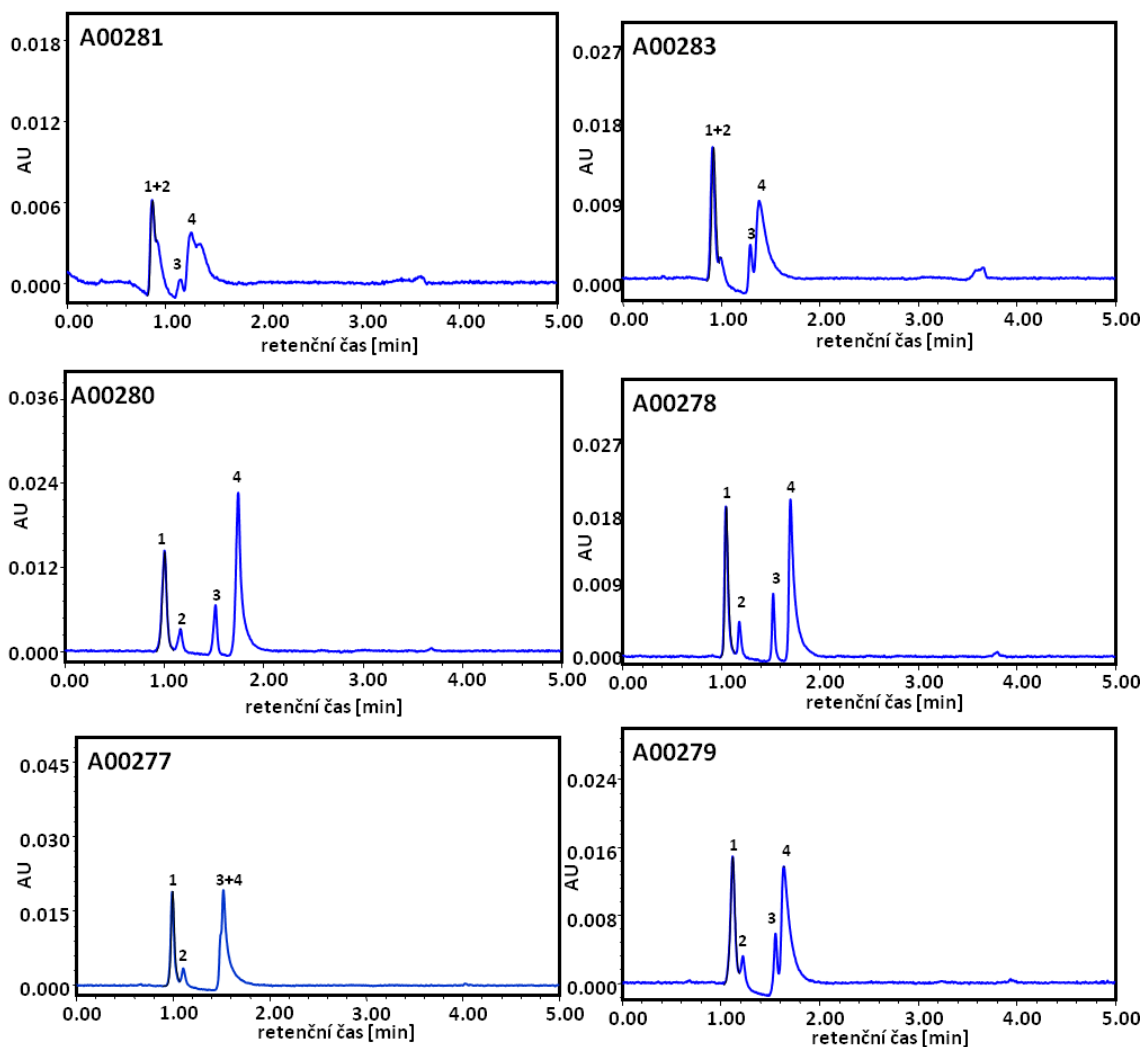
Při pH 3 lze pozorovat odlišnou selektivitu i kvalitu separace u kolon šarže P1328 a šarží P1329 a P1327, jak uvádí Tab. 49 a Obr. 43. Nejméně jsou kyseliny zadržovány na kolonách šarže P1329, nejvíce na kolonách šarže P1328. Na koloně A00277 je vidět koeluce kyselin 2,4-DHBA a 3,5-DHBA. Na koloně A00279 jsou již tyto analyty částečně separovány. Nejnižší rozdíly mezi kolonami má šarže P1328, liší se jen o 0,46 % až 3,44 %, jak je uvedeno v Tab. 50. Naopak nejvyšší rozdíly má šarže P1329, jež se liší o 3,95 % až 8,05 %. Rozdíly mezi šaržemi jsou výrazné, a to od 9,00 % do 12,39 %. Chromatogramy fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3 jsou uvedeny na Obr. 42.

Tab. 49: Průměrný retenční čas fenolických kyselin [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
4-HBA	0,87	0,92	1,00	1,05	1,00	1,12
3-HBA	0,92	1,00	1,17	1,19	1,11	1,23
3,5-DHBA	1,16	1,30	1,52	1,53	1,53	1,56
2,4-DHBA	1,26	1,39	1,75	1,71	1,53	1,64

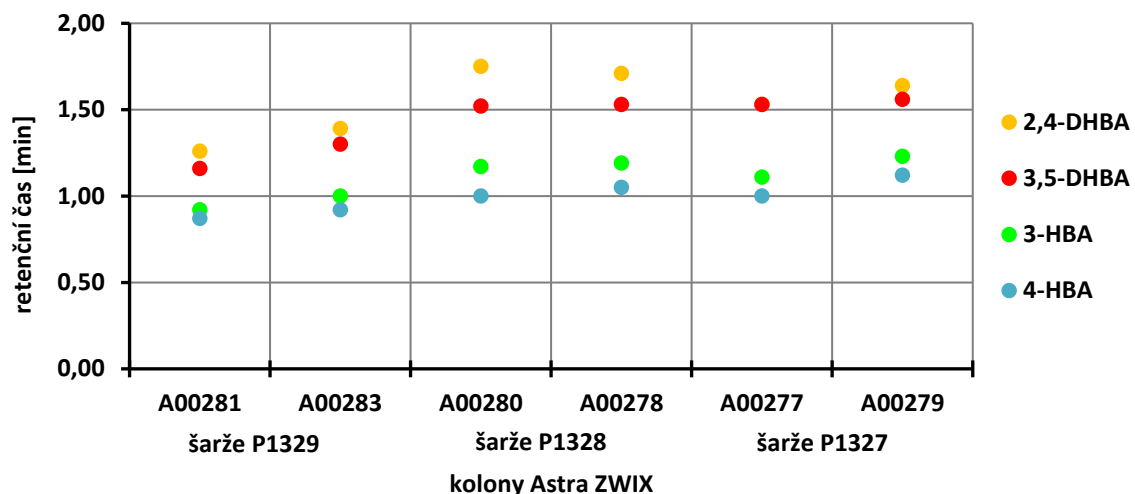
Tab. 50: Hodnoty RSD retenčních časů [%] fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
4-HBA	3,95	3,45	8,00	9,00
3-HBA	5,89	1,20	7,25	10,90
3,5-DHBA	8,05	0,46	1,37	11,45
2,4-DHBA	6,94	1,63	4,91	12,39



Obr. 42: Chromatogramy separace fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(1–4-HBA, 2–3-HBA, 3–3,5-DHBA, 4–2,4-DHBA)

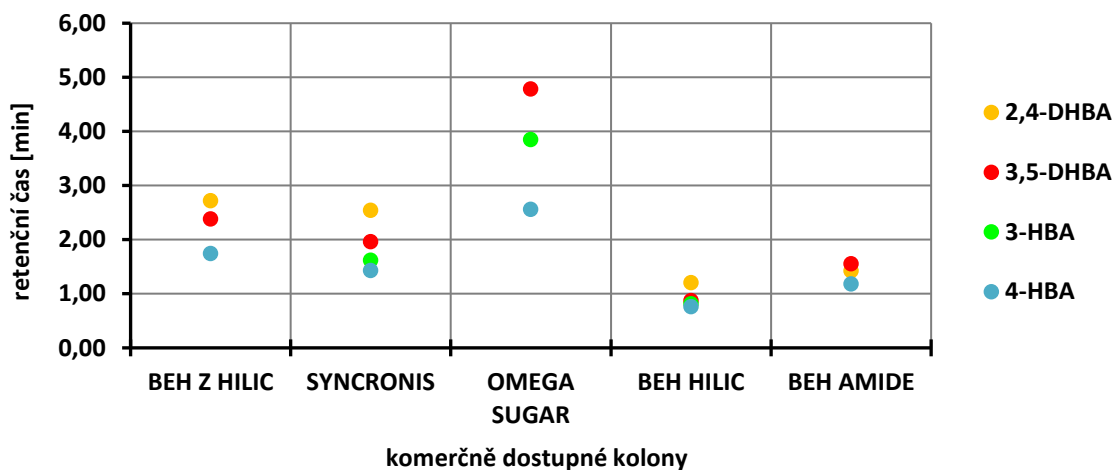


Obr. 43: Graf retenčních časů fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3

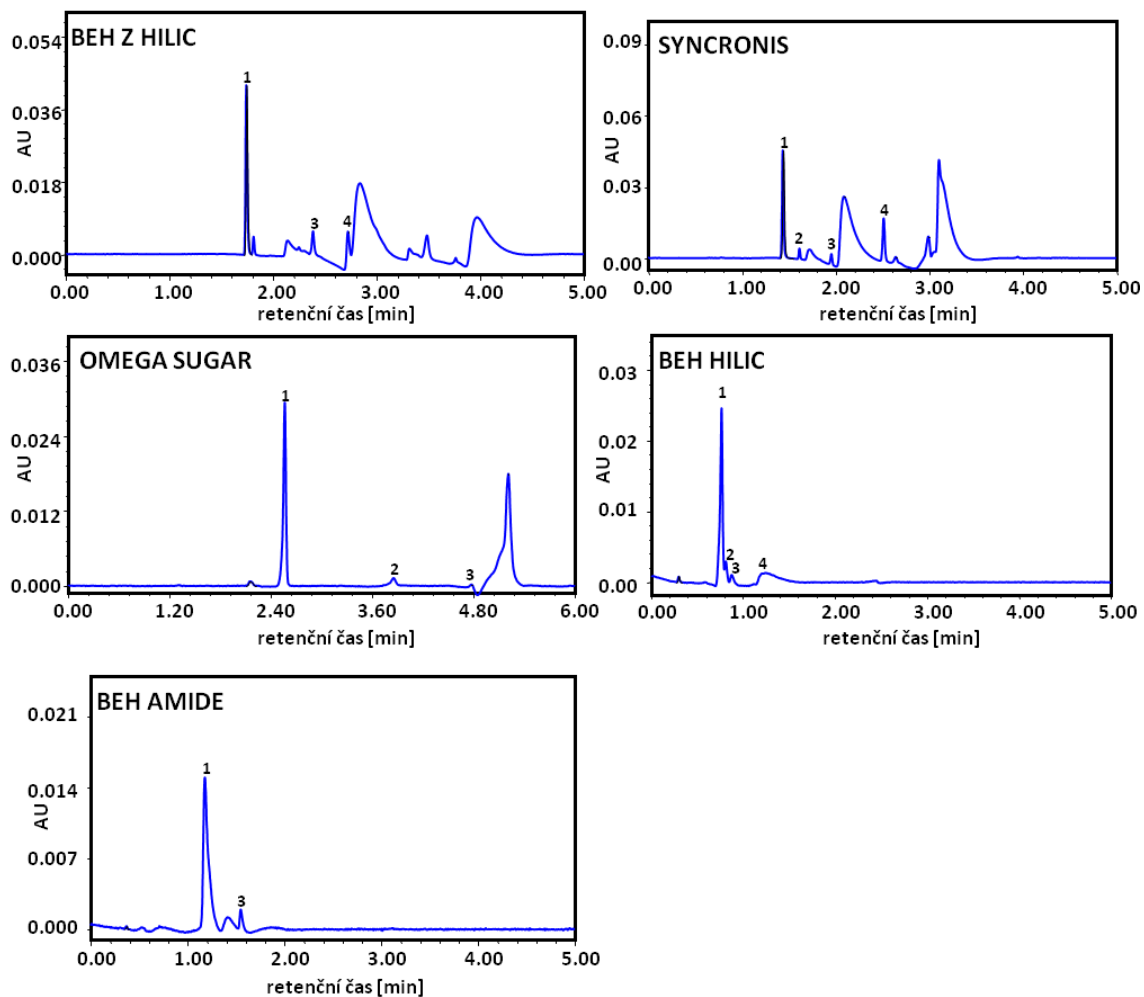
Z komerčně dostupných kolon vykazuje kolona BEH HILIC nižší retenci fenolických kyselin oproti kolonám Astra ZWIX. Na kolonách BEH Z HILIC, OMEGA SUGAR a SYNCRONIS jsou sledované analyty zadržovány více oproti kolonám Astra ZWIX. Hodnoty retenčních časů analytů jsou uvedeny v Tab. 51 a na Obr. 44. 3-HBA není zadržována na koloně BEH Z HILIC a BEH AMIDE, 2,4-DHBA na koloně OMEGA SUGAR. Na koloně BEH AMIDE je 2,4-DHBA eluována dříve než 3,5-DHBA. Chromatogramy fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3 jsou uvedeny na Obr. 45.

Tab. 51: Průměrný retenční čas fenolických kyselin [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
4-HBA	1,74	1,43	2,56	0,76	1,18
3-HBA	–	1,62	3,85	0,81	–
3,5-DHBA	2,38	1,96	4,78	0,87	1,55
2,4-DHBA	2,72	2,54	–	1,20	1,42



Obr. 44: Graf retenčních časů fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3



Obr. 45: Chromatogramy separace fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3

(1–4-HBA, 2–3-HBA, 3–3,5-DHBA, 4–2,4-DHBA)

Pozn: bylo analyzováno více fenolických kyselin

RSD retenčních časů fenolických kyselin při pH 3 se liší od 0,00 % do 1,28 % (viz Tab. 52 a Tab. 53). Nejvyšší RSD (1,28 %) má 3,5-DHBA na koloně A00281. Tato jediná fenolická kyselina nespĺňuje podmínky opakovatelnosti (RSD je větší než 1 %).

Tab. 52: RSD retenčních časů fenolických kyselin [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
4-HBA	0,13	0,06	0,12	0,11	0,06	0,09
3-HBA	0,47	0,31	0,25	0,08	0,24	0,09
3,5-DHBA	1,28	0,12	0,13	0,04	0,11	0,00
2,4-DHBA	0,50	0,17	0,11	0,07	0,11	0,04

Tab. 53: RSD retenčních časů fenolických kyselin [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
4-HBA	0,10	0,07	0,10	0,13	0,18
3-HBA	–	0,06	0,07	0,07	–
3,5-DHBA	0,08	0,08	0,06	0,07	0,07
2,4-DHBA	0,07	0,08	–	0,24	0,00

5.1.5.2 Hodnocení retence při pH 6

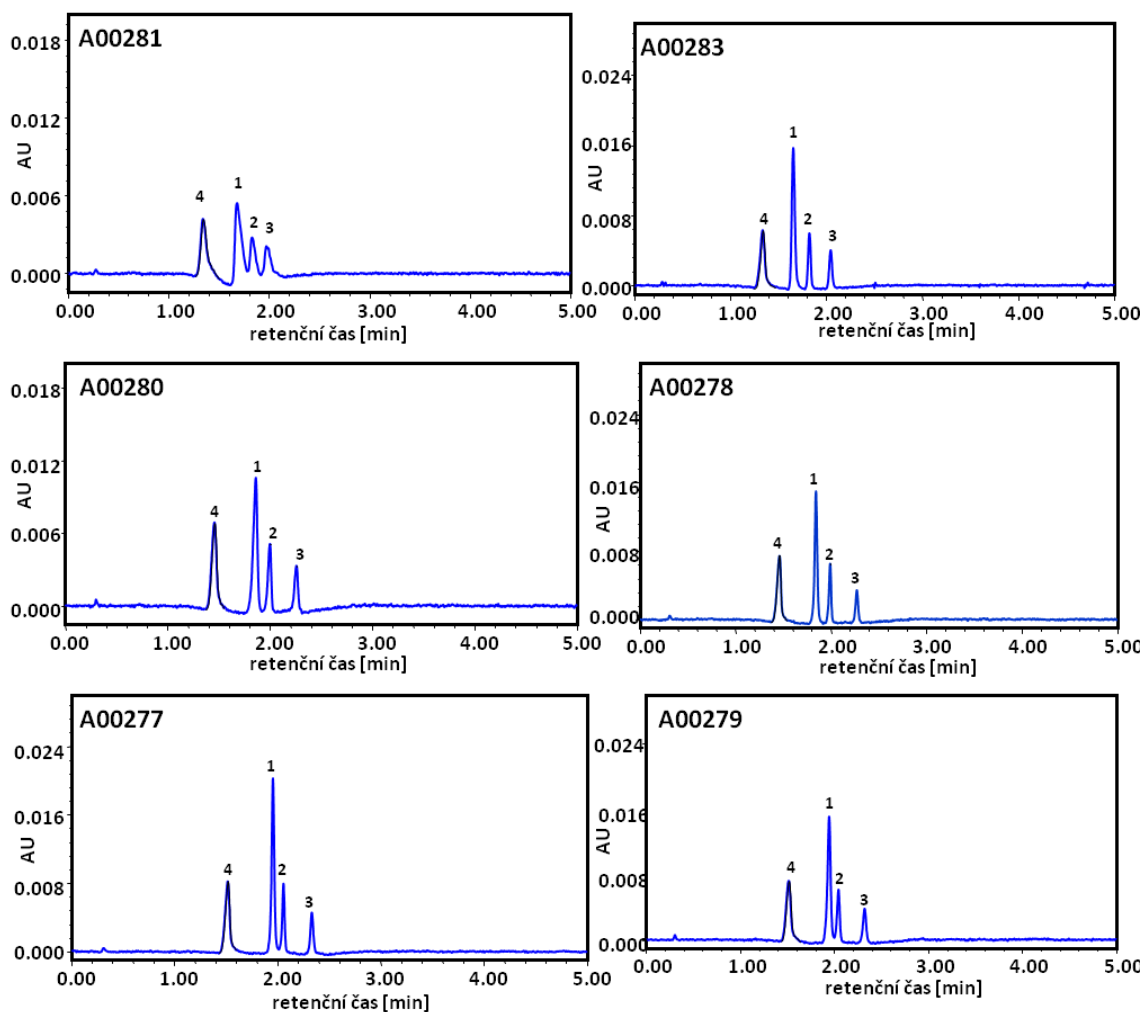
Retence kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6 v rámci šarže je velmi podobná – RSD 0,00 % až 2,47 %, jak je uvedeno v Tab. 55. Retenční časy analytů se mezi kolonami v šarži P1327 téměř neliší – RSD 0,00 % až 0,30 %. Mezi šaržemi se liší o 5,37 % až 7,13 %. Analyty jsou méně zadržovány na kolonách šarže P1329, jak uvádí Tab. 54 a Obr. 47. Nejlepší selektivitu pro fenolické kyseliny při pH 6 má šarže P1328. Chromatogramy fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 46.

Tab. 54: Průměrný retenční čas fenolických kyselin [min] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
2,4-DHBA	1,34	1,33	1,46	1,46	1,52	1,52
4-HBA	1,68	1,65	1,86	1,84	1,95	1,95
3-HBA	1,83	1,82	2,00	1,99	2,05	2,05
3,5-DHBA	1,97	2,04	2,26	2,27	2,33	2,32

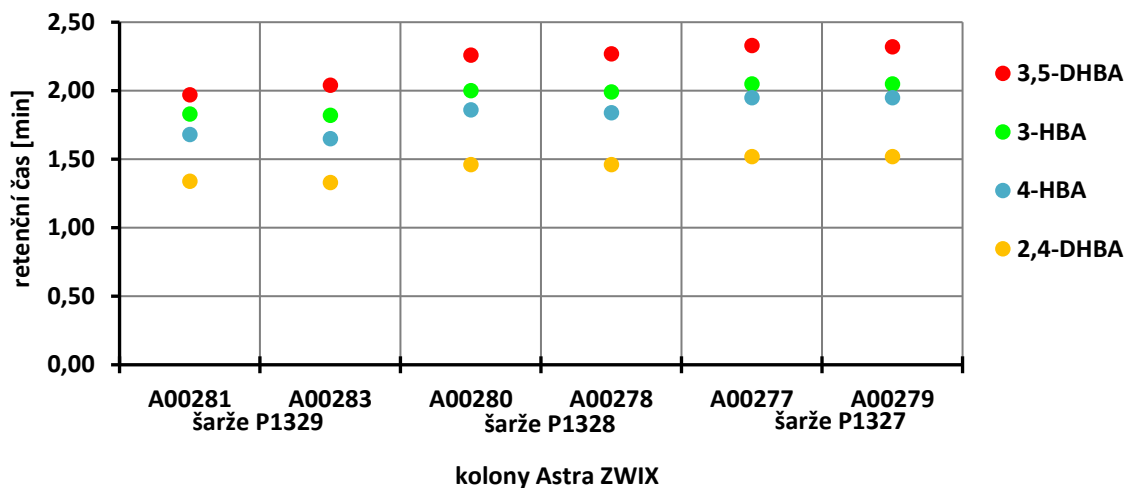
Tab. 55: Hodnoty RSD retenčních časů [%] fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6 v rámci šarže a mezi šaržemi

analyt	šarže P1329	šarže P1328	šarže P1327	RSD mezi šaržemi
2,4-DHBA	0,53	0,00	0,00	5,87
4-HBA	1,27	0,76	0,00	7,13
3-HBA	0,39	0,35	0,00	5,37
3,5-DHBA	2,47	0,31	0,30	7,00



Obr. 46: Chromatogramy separace fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(1-4-HBA, 2-3-HBA, 3-3,5-DHBA, 4-2,4-DHBA)

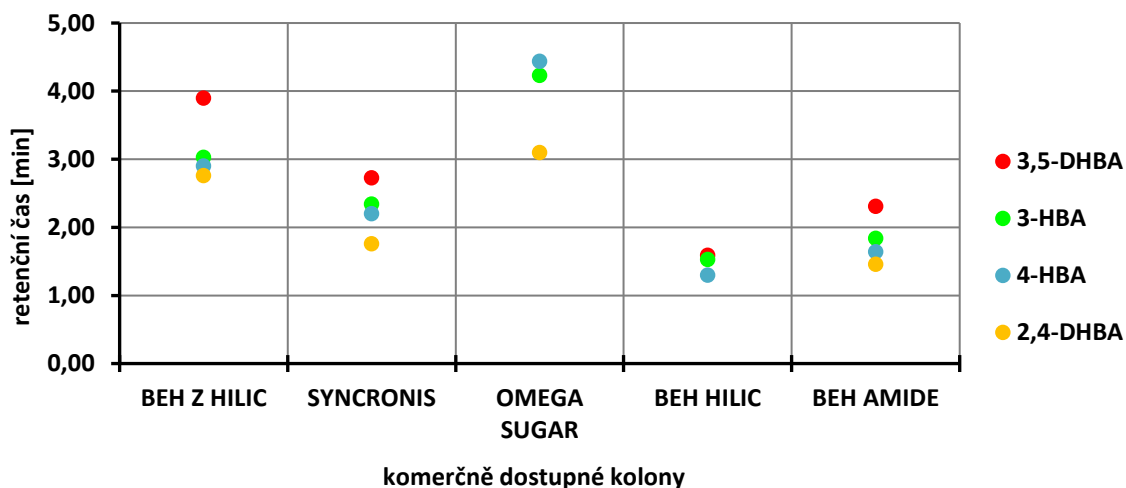


Obr. 47: Graf retenčních časů fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6

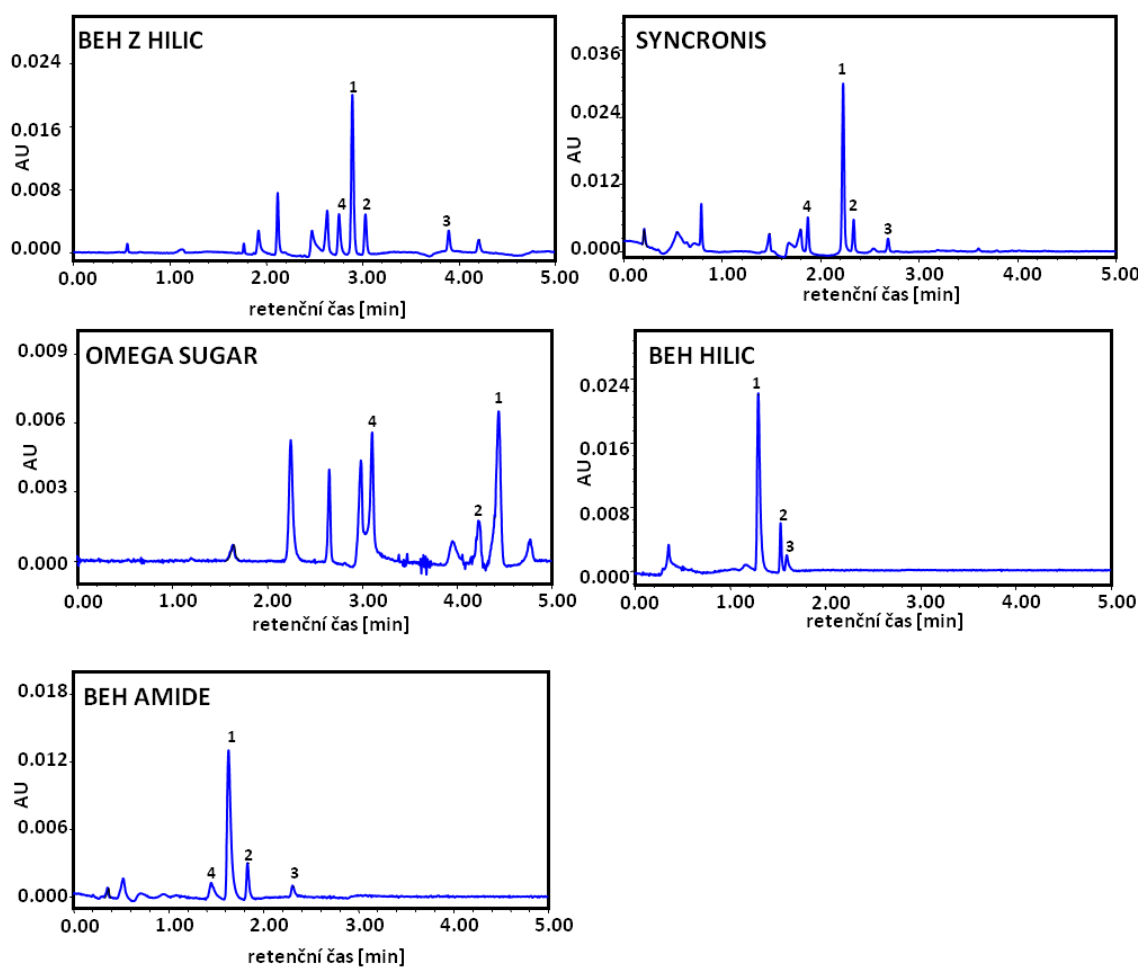
Na komerčně dostupných kolonách při pH 6, stejně jako při pH 3, vykazuje kolona BEH AMIDE obdobnou retenci jako kolony Astra ZWIX, kolona BEH HILIC nižší retenci a ostatní komerčně dostupné kolony vyšší retenci (viz Tab. 56 a Obr. 49). Na koloně OMEGA SUGAR není zadržována 3,5-DHBA. 3-HBA eluuje již před 4-HBA. Na koloně BEH HILIC není zadržována 2,4-DHBA. Chromatogramy fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6 jsou uvedeny na Obr. 48.

Tab. 56: Průměrný retenční čas fenolických kyselin [min] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
2,4-DHBA	2,76	1,76	3,10	–	1,46
4-HBA	2,90	2,20	4,44	1,30	1,64
3-HBA	3,03	2,34	4,23	1,53	1,84
3,5-DHBA	3,90	2,73	–	1,59	2,31



Obr. 49: Graf retenčních časů fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6



Obr. 48: Chromatogramy separace fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6

(1–4-HBA, 2–3-HBA, 3–3,5-DHBA, 4–2,4-DHBA)

Pozn: bylo analyzováno více fenolických kyselin

RSD retenčních časů fenolických kyselin při pH 6 se pohybuje v rozmezí 0,00 % až 0,30 %, jak je uvedeno v Tab. 57 a Tab. 58, a splňuje tedy podmínky opakovatelnosti. Nejvyšší RSD (0,30 %) má 2,4-DHBA na koloně A00281.

Tab. 57: RSD retenčních časů fenolických kyselin [%] na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
2,4-DHBA	0,30	0,15	0,12	0,10	0,04	0,10
4-HBA	0,18	0,03	0,06	0,03	0,00	0,06
3-HBA	0,09	0,03	0,08	0,06	0,03	0,06
3,5-DHBA	0,13	0,03	0,09	0,08	0,02	0,07

Tab. 58: RSD retenčních časů fenolických kyselin [%] na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
2,4-DHBA	0,06	0,03	0,15	–	0,10
4-HBA	0,04	0,07	0,14	0,08	0,06
3-HBA	0,06	0,09	0,08	0,10	0,05
3,5-DHBA	0,04	0,06	–	0,10	0,07

5.2 Hodnocení rozlišení

Rozlišení bylo hodnoceno ze tří opakování. Výsledné hodnoty jsou průměrem těchto tří měření. Jako limit dostatečného rozlišení byla považována hodnota $R > 1,5$ [24].

5.2.1 Nukleové baze a nukleosidy

5.2.1.1 Hodnocení rozlišení při pH 3

Hodnoty rozlišení na kolonách Astra ZWIX ukazuje Tab. 59 a Obr. 50. Na kolonách šarže P1329 thymin a uracil koeluuji. Částečná koeluze je i mezi 5-methyluridinem a uridinem (viz Obr. 10). Ostatní analyty jsou již rozděleny dostatečně (hodnota rozlišení je větší než 1,5). Na kolonách šarží P1328 a P1327 opět koeluuji thymin s uracilem, ale oproti šarži P1329 jsou rozděleny více. Na kolonách šarže P1328 koeluuji guanosin, cytidin a cytosin. Ostatní analyty jsou již rozděleny dostatečně.

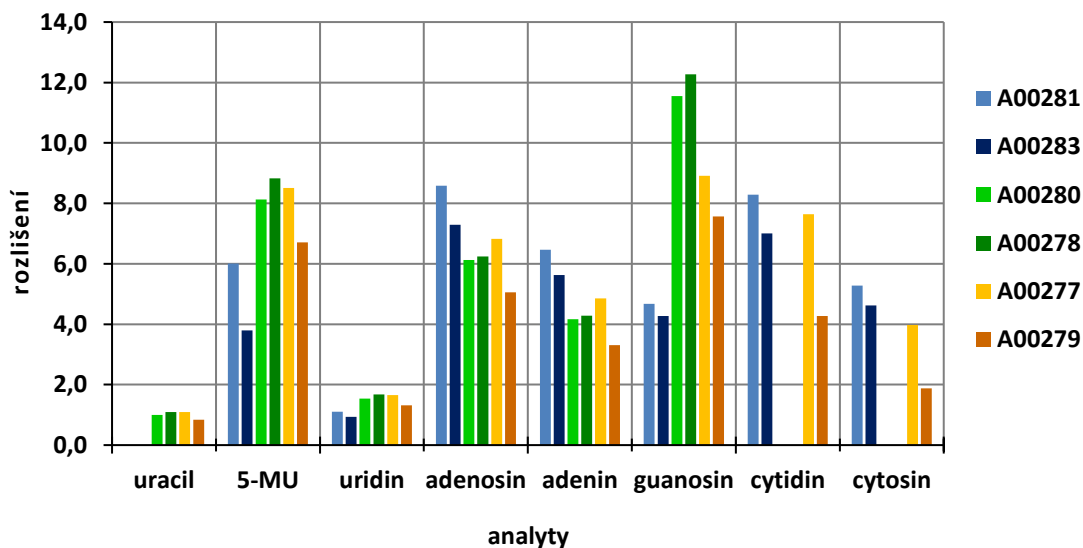
Hodnoty rozlišení jednotlivých analytů se liší mezi šaržemi i mezi kolonami téže šarže. Nejvíce se podobají kolony šarže P1328, kde kolona A00280 má jen mírně nižší hodnoty rozlišení. Na kolonách šarže P1329 má kolona A00281 vyšší hodnoty rozlišení,

na kolonách šarže P1327 má vyšší rozlišení kolona A00277. Rozlišení píků analytů na kolonách této šarže se liší nejvíce.

Chybějící hodnoty rozlišení u uracilu na kolonách šarže P1329 a u cytidinu a cytosinu na kolonách šarže P1328 jsou způsobeny koelucí těchto analytů.

Tab. 59: Průměrné rozlišení píků nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	–	–	–	–	–	–
uracil	–	–	1,00	1,09	1,09	0,84
5-methyluridin	6,01	3,80	8,13	8,83	8,51	6,71
uridin	1,10	0,93	1,54	1,68	1,66	1,32
adenosín	8,58	7,29	6,13	6,24	6,82	5,06
adenín	6,47	5,63	4,17	4,28	4,85	3,31
guanosín	4,67	4,27	11,55	12,27	8,91	7,57
cytidín	8,29	7,01	–	–	7,64	4,27
cytosín	5,28	4,62	–	–	3,97	1,88



Obr. 50: Graf rozlišení píků nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

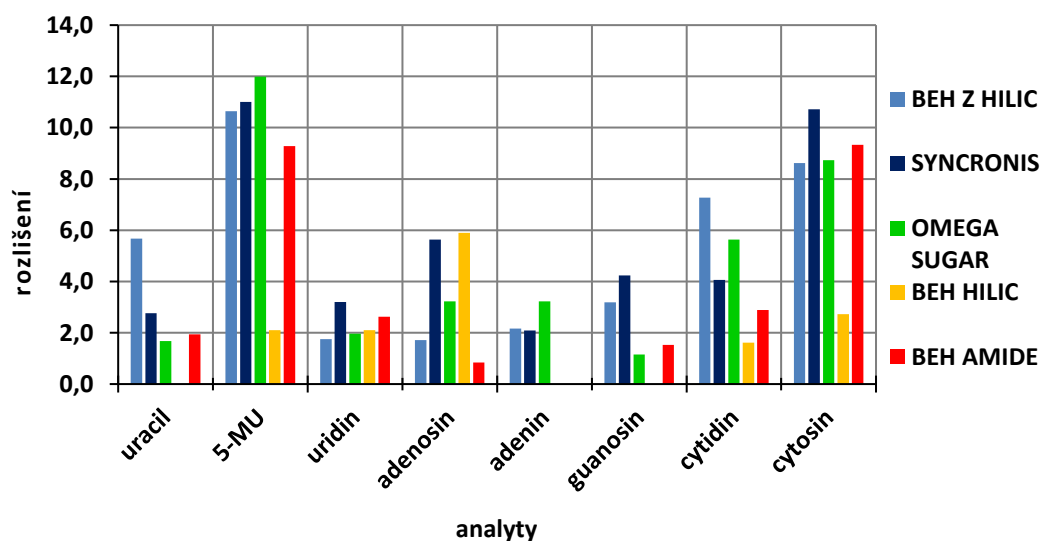
(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon jsou všechny analyty na zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS dostatečně rozdělány, jak je uvedeno v Tab. 60 a na Obr. 51. Na koloně OMEGA SUGAR plně koeluuje adenosin s adeninem a dále částečně guanosin

s cytidinem. Na koloně BEH HILIC plně koeluuje thymin s uracilem a 5-methyluridin s uridinem. Lze též pozorovat koeluci guanosinu s adeninem. Na koloně BEH AMIDE koeluuje uridin s adenosinem a adeninem, jak je patrné i z chromatogramů na Obr. 11. Ostatní analyty jsou již dostatečně rozděleny.

Tab. 60: Průměrné rozlišení píků nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymin	–	–	–	–	–
uracil	5,67	2,76	1,68	–	1,94
5-methyluridin	10,64	11,01	11,99	2,10	9,29
uridin	1,75	3,20	1,96	2,10	2,63
adenosin	1,71	5,63	3,22	5,90	0,84
adenin	2,16	2,09	3,22	–	–
guanosin	3,19	4,24	1,16	–	1,53
cytidin	7,27	4,06	5,63	1,62	2,89
cytosin	8,61	10,72	8,73	2,72	9,33



Obr. 51: Hodnocení rozlišení nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.2.1.2 Hodnocení rozlišení při pH 6

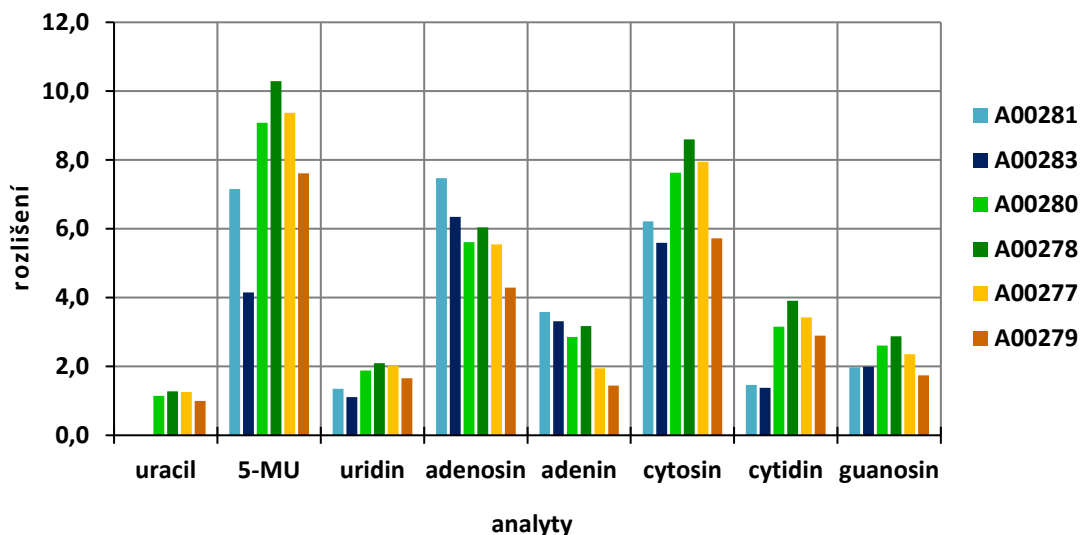
Dle Tab. 61 a Obr. 52 a chromatogramů na Obr. 14 je zřejmé, že na kolonách Astra ZWIX koeluuji thymín s uracilem a na kolonách šarže P1329 nejsou dostatečně rozlišeny ani 5-methyluridin s uridinem, cytosin s cytidinem. Dostatečnou hodnotu rozlišení nemá ani adenin na koloně A00279.

Při pH 6 lze u některých analytů pozorovat výrazné rozdíly v rozlišení pík analytů mezi kolonami jedné šarže, např. u 5-methyluridinu nebo u cytosinu. Stejně jako při pH 3, i při pH 6 má kolona A00281 vyšší hodnoty rozlišení než kolona A00283, kolona A00278 než A00280 a kolona A00277 než kolona A00279.

Při pH 6 je z hlediska rozlišení nejlepší šarže P1328.

Tab. 61: Průměrné rozlišení pík nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	–	–	–	–	–	–
uracil	–	–	1,15	1,28	1,26	1,00
5-methyluridin	7,16	4,15	9,08	10,29	9,37	7,61
uridin	1,35	1,11	1,88	2,10	2,02	1,66
adenosin	7,47	6,35	5,61	6,04	5,55	4,29
adenin	3,58	3,31	2,86	3,17	1,95	1,44
cytosin	6,22	5,59	7,63	8,60	7,95	5,72
cytidin	1,46	1,38	3,16	3,91	3,43	2,90
guanosin	1,97	1,99	2,61	2,88	2,36	1,74



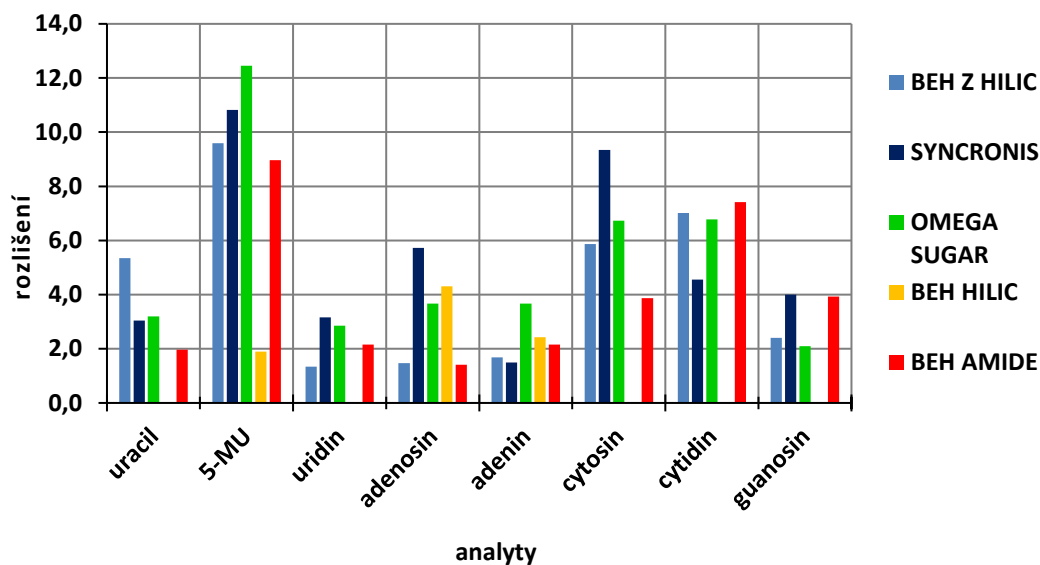
Obr. 52: Graf rozlišení píků nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon při pH 6 jsou patrné rozdíly v rozlišení mezi zwitteriontovými kolonami BEH Z HILIC a SYNCRONIS (viz Tab. 62 a Obr. 53). Kolona SYNCRONIS má vyšší hodnoty rozlišení píků analytů, kromě uracilu, adeninu a cytidinu. Na koloně BEH Z HILIC lze pozorovat nedostatečné rozlišení uridinu a adenosinu. Nejvíce analyty koelují na koloně BEH HILIC, jak je patrné i z chromatogramů na Obr. 17.

Tab. 62: Průměrné rozlišení píků nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	–	–	–	–	–
uracil	5,35	3,04	3,19	–	1,97
5-methyluridin	9,59	10,82	12,46	1,90	8,96
uridin	1,34	3,16	2,85	–	2,15
adenosin	1,47	5,72	3,67	4,30	1,41
adenin	1,68	1,50	3,67	2,43	2,15
cytosin	5,87	9,34	6,74	–	3,87
cytidin	7,01	4,56	6,78	–	7,41
guanosin	2,40	4,00	2,10	–	3,93



Obr. 53: Hodnocení rozlišení nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.2.2 Deriváty kyseliny nikotinové

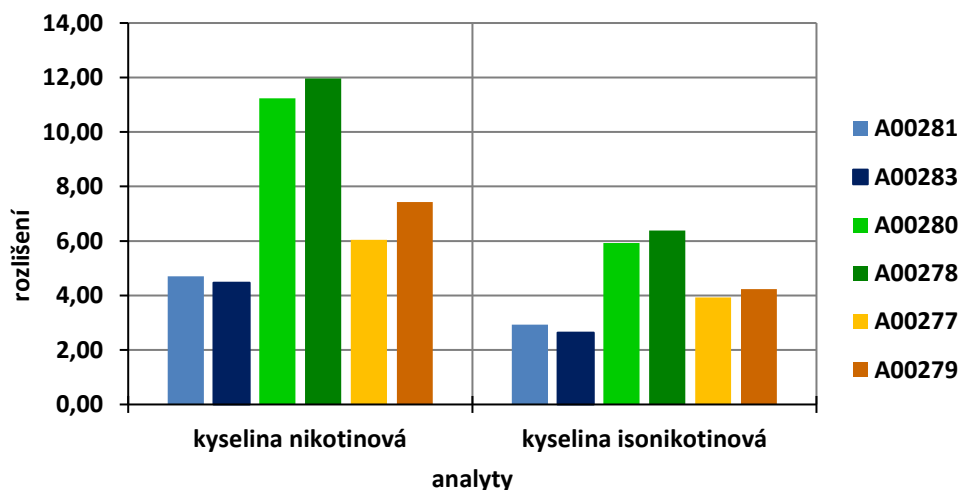
5.2.2.1 Hodnocení rozlišení při pH 3

Na všech kolonách Astra ZWIX koeluuje nikotinamid a isonikotinamid, jak je patrné i z chromatogramů na Obr. 19. Kyseliny nikotinová a isonikotinová jsou na všech kolonách dobře rozseparovány (viz Tab. 63 a Obr. 54).

U derivátů kyseliny nikotinové jsou již rozdíly v rozlišení mezi kolonami jedné šarže menší oproti nukleovým bazím a nukleosidům. I u derivátů kyseliny nikotinové má vyšší hodnoty rozlišení kolona A00281 oproti koloně A00283 a kolona A00278 oproti koloně A00280. Oproti nukleovým bazím a nukleosidům má však kolona A00277 menší hodnoty rozlišení než kolona A00279. Nejvyšší hodnoty rozlišení mají kolony šarže P1328, nejnižší kolony šarže P1329.

Tab. 63: Průměrné rozlišení píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	–	–	–	–	–	–
nikotinamid	–	–	–	–	–	–
nikotninová kyselina	4,70	4,47	11,24	11,96	6,04	7,43
isonikotinová kyselina	2,93	2,64	5,92	6,38	3,93	4,23

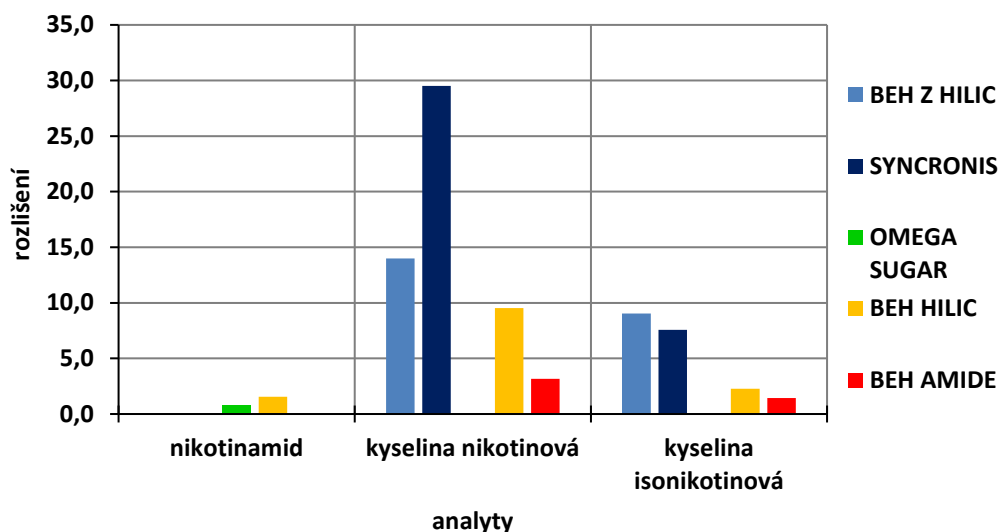


Obr. 54: Graf rozlišení píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon lze na zwitteriontových kolonách pozorovat koeluci isonikotinamidu s nikotinamidem, kyseliny nikotinová a isonikotinová jsou rozděleny dostatečně (viz Obr. 20). Vyšší hodnoty rozlišení má nikotinová kyselina na koloně SYNCRONIS, isonikotinová kyselina na koloně BEH Z HILIC, jak uvádí Tab. 64 a Obr. 55. Na koloně OMEGA SUGAR lze pozorovat nedostatečně rozdělený isonikotinamid a nikotinamid, kyseliny nikotinová a isonikotinová nejsou na této koloně eluovány vůbec. Na koloně BEH HILIC jsou všechny analyty rozděleny dostatečně, na koloně BEH AMIDE plně koeluuje isonikotinamid s nikotinamidem a částečně i kyseliny nikotinová s isonikotinovou. Nejvyšší hodnoty rozlišení mají zwitteriontové kolony.

Tab. 64: Průměrné rozlišení píků derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	–	–	–	–	–
nikotinamid	–	–	0,80	1,55	–
nikotinová kyselina	13,99	29,51	–	9,52	3,16
isonikotinová kyselina	9,04	7,58	–	2,27	1,43



Obr. 55: Hodnocení rozlišení derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 3

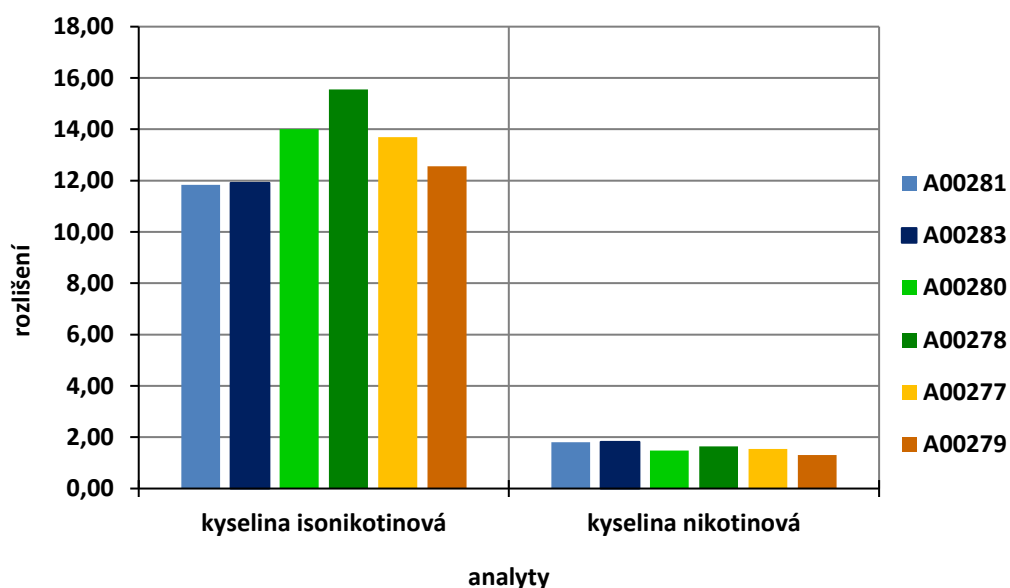
5.2.2.2 Hodnocení rozlišení při pH 6

Oproti pH 3 došlo ke zhoršení rozlišení kyseliny nikotinové a isonikotinové na všech kolonách Astra ZWIX, jak je patrné z Tab. 65 a Obr. 56. Na koloně A00280 a A00279 nejsou píky kyselin dostatečně separovány. Stejně jako při pH 3, i při pH 6 koeluuji amidy na všech testovaných kolonách (viz Obr. 23).

Nejvyšší hodnoty rozlišení kyseliny isonikotinové mají kolony šarže P1328, nejnižší kolony šarže P1329. Na kolonách této šarže lze naopak pozorovat nejvyšší rozlišení kyseliny nikotinové. Oproti pH 3 však nejsou tak velké rozdíly mezi šaržemi.

Tab. 65: Průměrné rozlišení pík derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	–	–	–	–	–	–
nikotinamid	–	–	–	–	–	–
isonikotinová kyselina	11,84	11,91	14,01	15,55	13,69	12,56
nikotinová kyselina	1,80	1,82	1,48	1,64	1,54	1,30

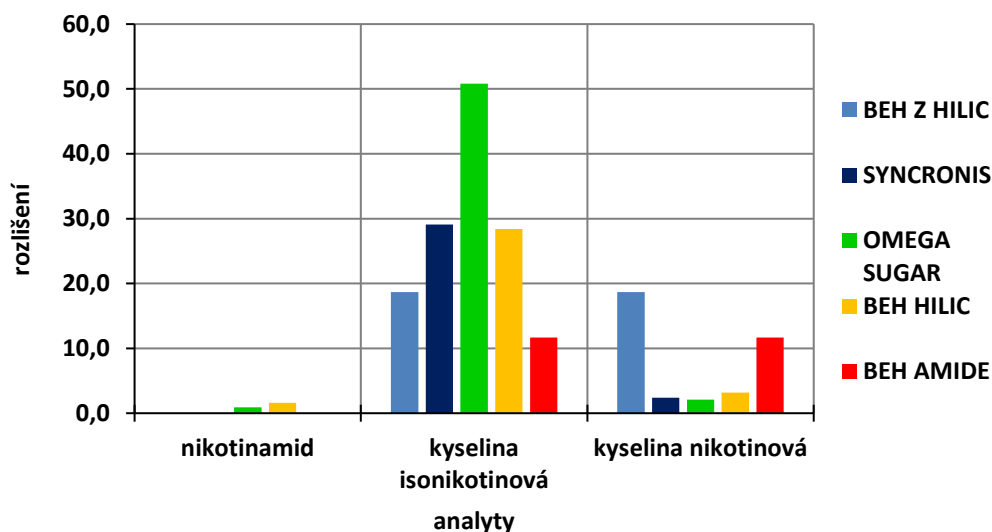


Obr. 56: Graf rozlišení píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon lze na zwitteriontových kolonách a na koloně BEH AMIDE pozorovat plnou koeluci isonikotinamidu s nikotinamidem, na koloně BEH Z HILIC a BEH AMIDE i koeluci kyseliny isonikotinové s nikotinovou (viz Obr. 25). I při pH 6 má vyšší hodnoty rozlišení kolona SYNCRONIS oproti koloně BEH Z HILIC, jak je patrné z Tab. 66 a Obr. 57. Nejvyšší hodnoty rozlišení kyseliny isonikotinové má kolona OMEGA SUGAR.

Tab. 66: Průměrné rozlišení píků derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	–	–	–	–	–
nikotinamid	–	–	0,93	1,60	–
isonikotinová kyselina	18,69	29,07	50,81	28,40	11,67
nikotinová kyselina	18,69	2,38	2,11	3,18	11,67



Obr. 57: Hodnocení rozlišení derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6

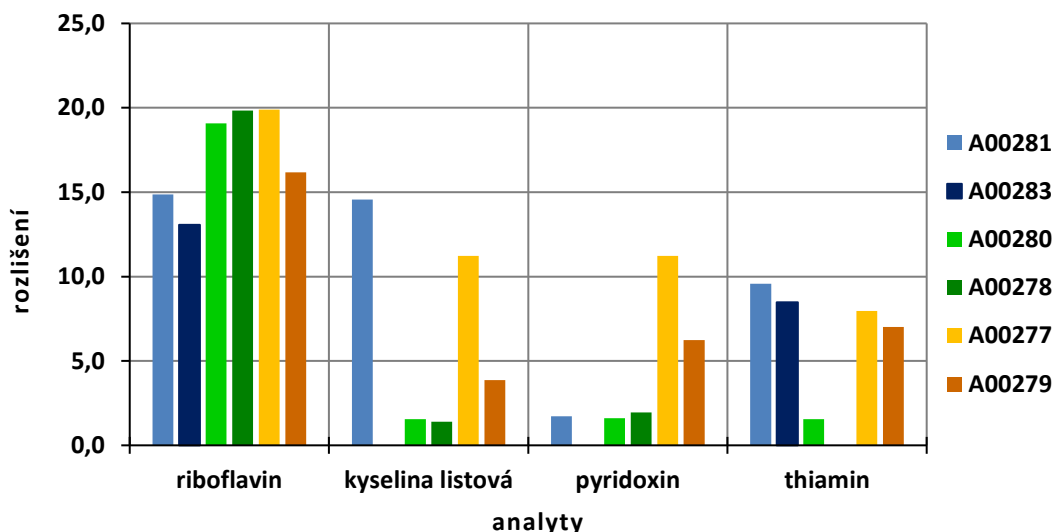
5.2.3 Hydrofilní vitamíny

5.2.3.1 Hodnocení rozlišení při pH 3

Nikotinamid a riboflavin jsou na všech kolonách Astra ZWIX dobře separovány, jak uvádí Tab. 67 a Obr. 58. Podobné hodnoty rozlišení lze vidět u analytů na kolonách šarže P1328. Rozdílné hodnoty rozlišení kyseliny listové a pyridoxinu mezi kolonami šarže P1327 jsou způsobeny tím, že dané analyty na koloně A00277 koeluuji. Koeluci těchto dvou analytů lze pozorovat i na kolonách šarže P1328 (viz Obr. 26). Chybějící hodnoty rozlišení na koloně A00283 a A00278 jsou způsobeny koelucí.

Tab. 67: Průměrné rozlišení píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	–	–	–	–	–	–
riboflavin	14,87	13,06	19,08	19,83	19,89	16,18
kyselina listová	14,57	–	1,56	1,40	11,22	3,86
pyridoxin	1,72	–	1,60	1,94	11,22	6,23
thiamin	9,57	8,47	1,56	–	7,96	7,02



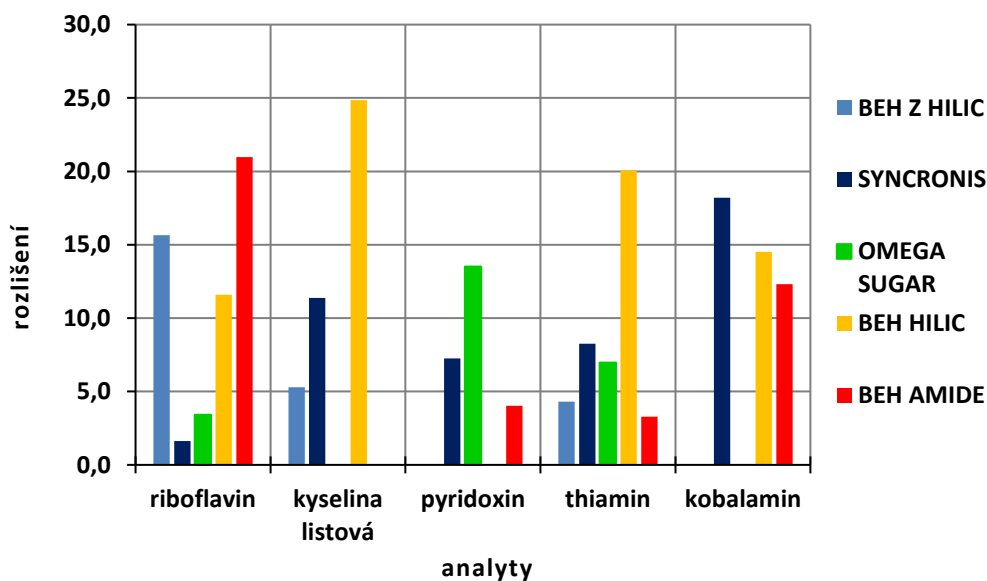
Obr. 58: Graf rozlišení píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon lze pozorovat dostatečně rozdělené analyty (rozlišení >1,5) na zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS, jak je patrné z Tab. 68 a Obr. 59. Na koloně BEH Z HILIC není eluován pyridoxin a kobalamin, na koloně OMEGA SUGAR kyselina listová a kobalamin, a proto jejich hodnoty v tabulce chybí. Na koloně BEH HILIC jsou všechny analyty dobře rozděleny, pyridoxin má mělký pík, proto jeho rozlišení nebylo spočítáno. Na koloně BEH AMIDE koeluuje kyselina listová s thiaminem (viz Obr. 29).

Tab. 68: Průměrné rozlišení píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	–	–	–	–	–
riboflavin	15,66	1,62	3,40	11,58	20,98
kyselina listová	5,28	11,37	–	24,86	–
pyridoxin	–	7,25	13,52	–	4,03
thiamin	4,31	8,25	6,97	20,06	3,28
kobalmin	–	18,21	–	14,52	12,31



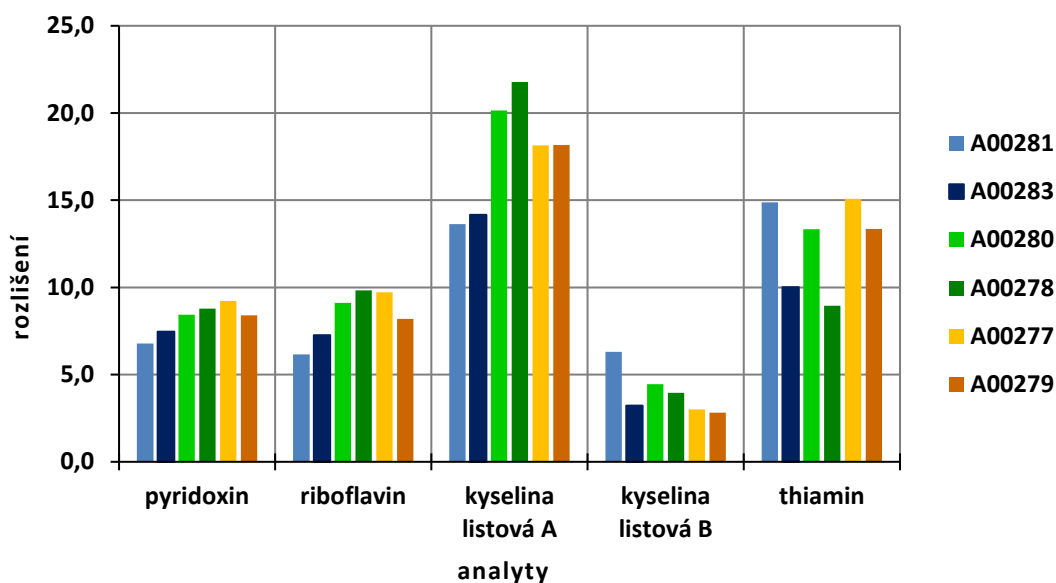
Obr. 59: Graf rozlišení píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.2.3.2 Hodnocení rozlišení při pH 6

Při pH 6 jsou všechny píky hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX dostatečně rozděleny. Hodnoty rozlišení píků jsou uvedeny v Tab. 69 a znázorněny na Obr. 60. Hodnoty rozlišení píků se liší v rámci šarže, liší se i šarže mezi sebou. Nejnížší hodnoty rozlišení mají píky analytů na koloně A00281, kromě píku kyseliny listové B, která má nejvyšší hodnotu rozlišení, a thiaminu, jež ji má druhou nejvyšší. Chromatogramy jsou uvedeny na Obr. 31. Nejvyšší hodnoty rozlišení mají kolony šarže P1328, kromě již zmíněného píku kyseliny listové B a thiaminu. Nejnížší rozdíly v rozlišení píků mají kolony šarže P1327.

Tab. 69: Průměrné rozlišení píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	–	–	–	–	–	–
pyridoxin	6,79	7,47	8,43	8,79	9,22	8,40
riboflavin	6,16	7,26	9,12	9,83	9,72	8,19
kyselina listová A	13,63	14,16	20,14	21,77	18,14	18,16
kyselina listová B	6,31	3,23	4,45	3,95	3,01	2,81
thiamin	14,88	10,02	13,33	8,94	15,07	13,36



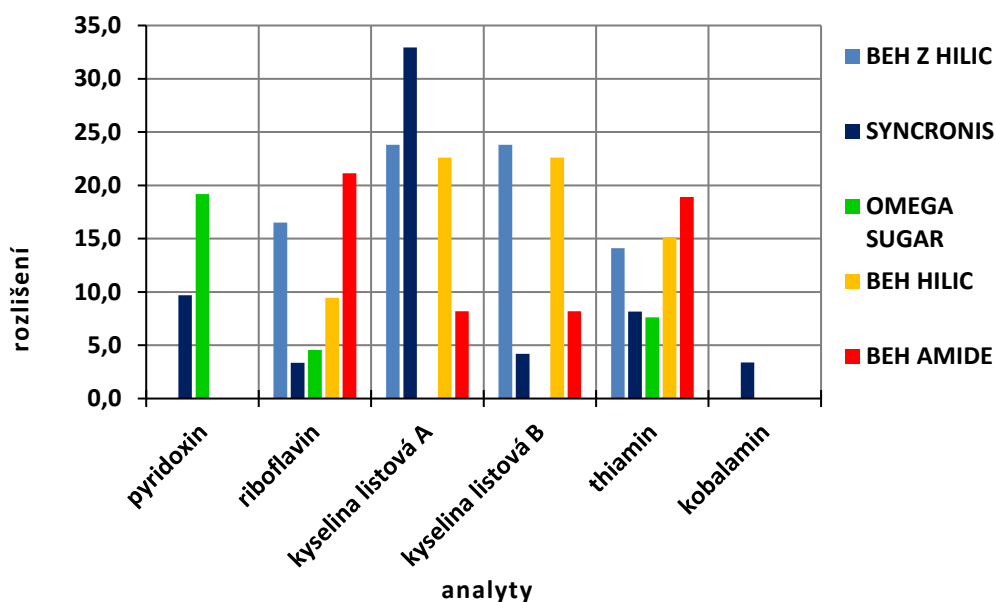
Obr. 60: Graf rozlišení píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon jsou analyty na zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS, stejně jako na ostatních kolonách, rozděleny dostatečně (viz Tab. 70, Obr. 61 a Obr. 32). Chybějící hodnota u pyridoxinu na koloně BEH AMIDE je způsobena špatným tvarem píku, proto nebyla spočítána. Ostatní analyty, u kterých chybí hodnoty, nebyly na daných kolonách eluovány. Nejvyšší hodnoty rozlišení má kolona BEH Z HILIC.

Tab. 70: Průměrné rozlišení píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	–	–	–	–	–
pyridoxin	–	9,69	19,17	–	–
riboflavin	16,50	3,35	4,55	9,46	21,13
kyselina listová A	23,81	32,95	–	22,60	8,19
kyselina listová B	23,81	4,20	–	22,60	8,19
thiamin	14,12	8,15	7,61	15,15	18,92
kobalamin	–	3,38	–	–	–



Obr. 61: Graf rozlišení píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

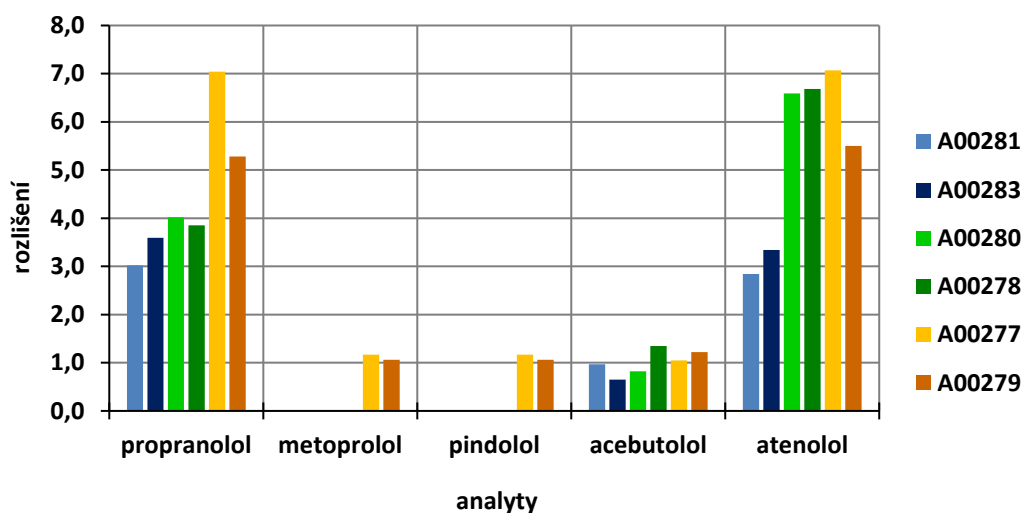
5.2.4 Betablokátory

5.2.4.1 Hodnocení rozlišení při pH 3

Na všech kolonách Astra ZWIX jsou bopindolol a atenolol dobře separovány, jak je patrné z Tab. 71 a Obr. 62. Na kolonách šarže P1328 se od koeluze píků propranololu, metoprololu a pindololu částečně odděluje acebutolol. Na kolonách šarže P1327 jsou již BB lépe separovány. Pindolol a metoprolol koelují (proto jejich hodnoty v tabulce chybí), ale od nich se odděluje propranolol a acebutolol (viz Obr. 34). Hodnoty rozlišení jsou nejnižší na kolonách šarže P1329 a nejvyšší na kolonách šarže P1327.

Tab. 71: Průměrné rozlišení píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	–	–	–	–	–	–
propranolol	3,02	3,59	4,02	3,85	7,04	5,28
metoprolol	–	–	–	–	1,17	1,06
pindolol	–	–	–	–	1,17	1,06
acebutolol	0,97	0,65	0,82	1,35	1,05	1,22
atenolol	2,84	3,34	6,59	6,68	7,07	5,50

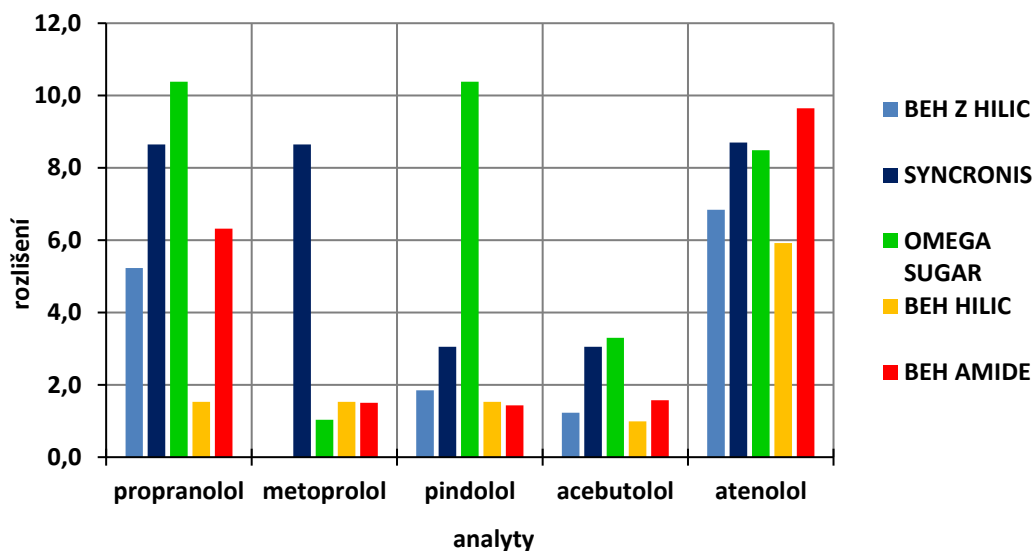


Obr. 62: Graf rozlišení píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 3 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon se zwitteriontové kolony liší. Na koloně SYNCRONIS koeluuje propranolol s metoprololem a pindolol s acebutololem. Oproti koloně BEH Z HILIC mají analyty na koloně SYNCRONIS vyšší hodnoty rozlišení, jak je patrné z Tab. 72 a Obr. 63. Na koloně OMEGA SUGAR koeluuje propranolol s pindololem a nedostatečně je od tohoto píku oddělen i pík metoprololu (viz Obr. 37). Na koloně BEH HILIC koelují propranolol, metoprolol a pindolol, nedostatečně oddělen je i acebutolol. Na koloně BEH AMIDE jsou píky rozděleny dostatečně, kromě pindololu, který má hodnotu rozlišení <1,5. Nejnížší hodnoty rozlišení mají analyty na koloně BEH HILIC.

Tab. 72: Průměrné rozlišení píků betablokátorů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	–	–	–	–	–
propranolol	5,23	8,65	10,38	1,53	6,32
metoprolol	–	8,65	1,03	1,53	1,51
pindolol	1,85	3,05	10,38	1,53	1,44
acebutolol	1,23	3,05	3,30	0,99	1,57
atenolol	6,84	8,70	8,49	5,92	9,65



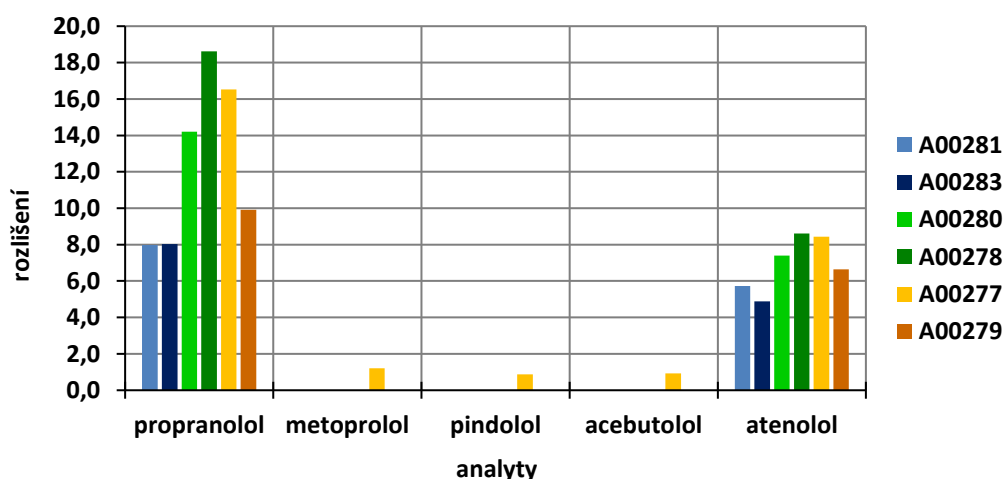
Obr. 63: Graf rozlišení píků BB na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.2.4.2 Hodnocení rozlišení při pH 6

I při pH 6 se bopindolol a atenolol dostatečně oddělují na všech kolonách (viz Obr. 64). Na kolonách šarže P1329 se od píku, kde koeluje mnoho BB, částečně odděluje acebutolol (viz Tab. 73 a Obr. 39). Na kolonách šarže P1328 se od zmiňovaného píku začíná oddělovat i propranolol. Kolona A00277 naznačuje částečnou separaci všech BB. Na koloně A00279 stále plně koeluje metoprolol s pindololem. Nejnižší rozlišení píků BB lze při pH 6, stejně jako při pH 3, pozorovat na kolonách šarže P1329. Kolony šarží P1328 a P1327 vykazují vysoké rozdíly v rozlišení mezi kolonami jedné šarže, zvláště velký rozdíl je mezi hodnotami rozlišení propranololu na koloně A00277 a A00279. Chybějící hodnoty rozlišení jsou způsobeny koelucí těchto analytů.

Tab. 73: Průměrné rozlišení píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	–	–	–	–	–	–
propranolol	7,98	8,03	14,20	18,62	16,52	9,92
metoprolol	–	–	–	–	1,20	–
pindolol	–	–	–	–	0,87	–
acebutolol	–	–	–	–	0,92	–
atenolol	5,72	4,88	7,39	8,61	8,43	6,64



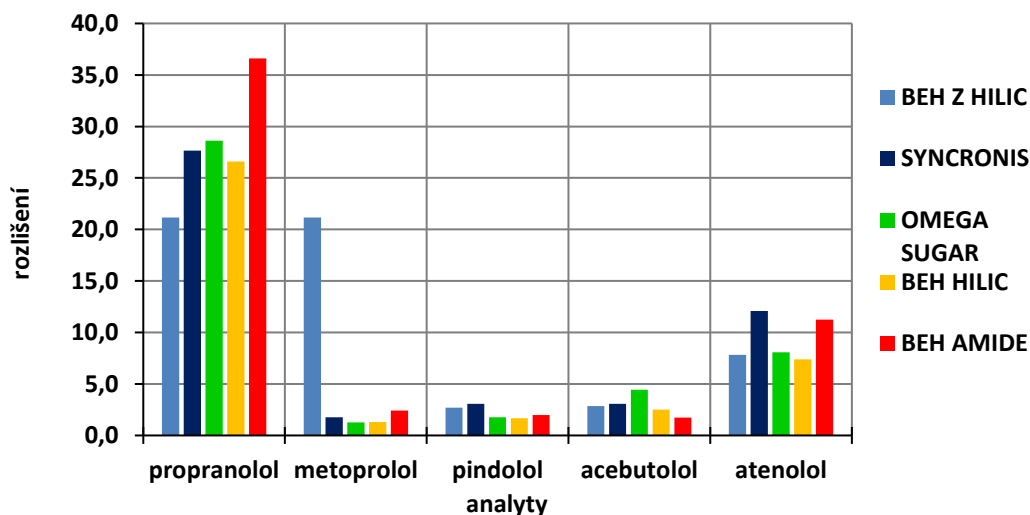
Obr. 64: Graf rozlišení píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon při pH 6 koeluuje propranolol s metoprololem na koloně BEH Z HILIC, na koloně SYNCRONIS pindolol s acebutololem (Obr. 40). Na koloně OMEGA SUGAR a BEH HILIC, jak je vidět v Tab. 74 a na Obr. 65, není dostatečně rozdělen metoprolol.

Tab. 74: Průměrné rozlišení píků betablokátorů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	–	–	–	–	–
propranolol	21,16	27,64	28,61	26,58	36,60
metoprolol	21,16	1,77	1,25	1,30	2,43
pindolol	2,69	3,07	1,75	1,68	1,97
acebutolol	2,85	3,07	4,45	2,51	1,72
atenolol	7,81	12,07	8,06	7,40	11,23



Obr. 65: Graf rozlišení píků BB na komerčně dostupných kolonách při pH 6

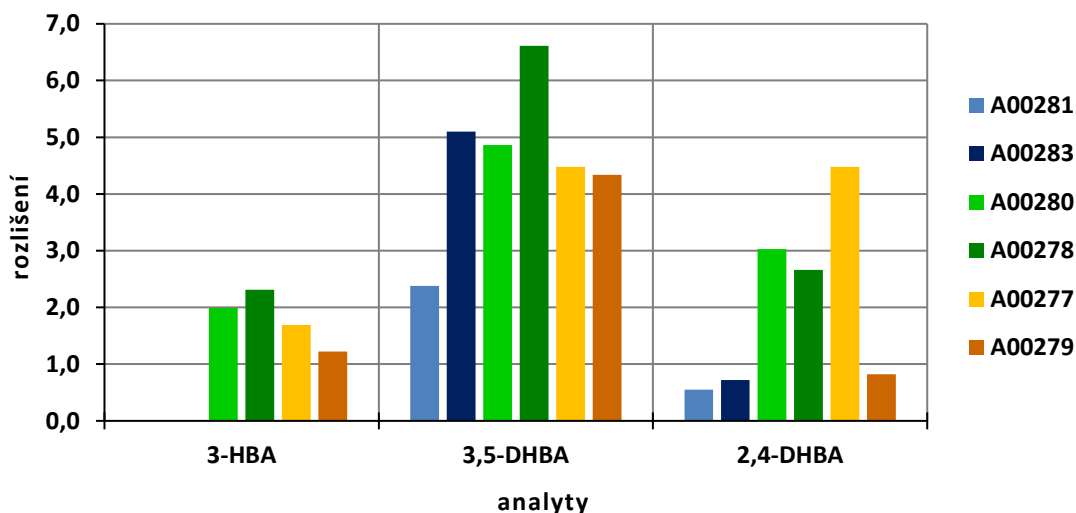
5.2.5 Fenolické kyseliny

5.2.5.1 Hodnocení rozlišení při pH 3

Fenolické kyseliny se při pH 3 nejlépe separují na kolonách šarže P1328, kde jsou všechny analyty dostatečně odděleny. Naopak nejhůře se separují na kolonách šarže P1329, kde koeluuje 4-HBA s 3-HBA (viz Obr. 42), dostatečně odděleny nejsou však ani 3,5-DHBA a 2,4-DHBA. Na koloně A00277 plně koeluje 3,5-DHBA s 2,4-DHBA, na koloně A00279 se již částečně dělí, jak lze pozorovat v Tab. 75 a na Obr. 66. Chybějící hodnoty 3-HBA na kolonách šarže P1329 jsou způsobeny již zmíněnou koelucí s 4-HBA.

Tab. 75: Průměrné rozlišení píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
4-HBA	–	–	–	–	–	–
3-HBA	–	–	1,99	2,31	1,69	1,22
3,5-DHBA	2,38	5,10	4,86	6,61	4,48	4,34
2,4-DHBA	0,55	0,72	3,03	2,66	4,48	0,82



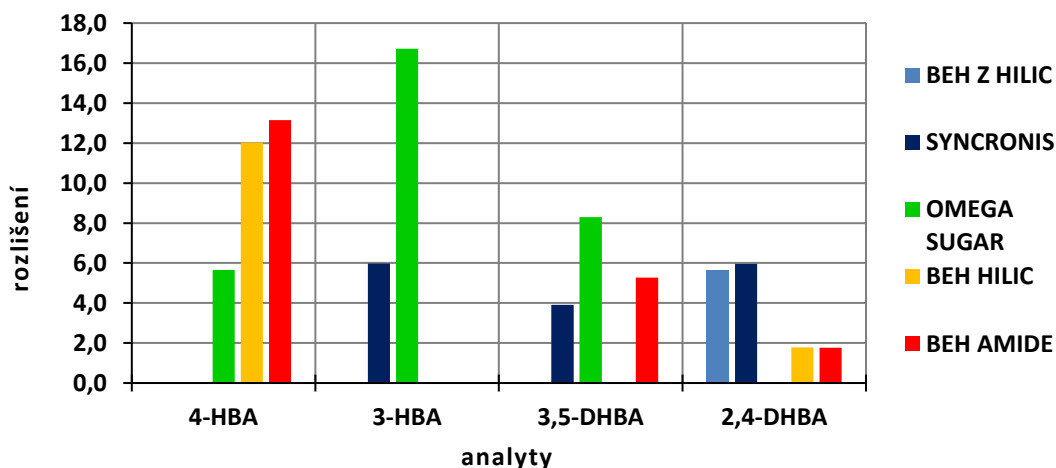
Obr. 66: Graf rozlišení píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách jsou testované analyty dostatečně rozděleny (hodnota rozlišení vyšší než 1,5) na kolonách SYNCRONIS, OMEGA SUGAR a BEH AMIDE. Nejvyšší hodnoty rozlišení mají analyty na koloně OMEGA SUGAR (viz Tab. 76 a Obr. 67). Chybějící hodnota u 3,5-DHBA na koloně BEH Z HILIC je způsobena kolísáním základní linie (viz Obr. 45), 3-HBA na této koloně není eluována, stejně jako 2,4-DHBA na koloně OMEGA SUGAR a 3-HBA na koloně BEH AMIDE. 3-HBA koeluuje s 4-HBA na koloně BEH HILIC.

Tab. 76: Průměrné rozlišení píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
4-HBA	–	–	5,65	12,03	13,15
3-HBA	–	5,98	16,72	–	–
3,5-DHBA	–	3,91	8,29	–	5,27
2,4-DHBA	5,62	5,96	–	1,78	1,76



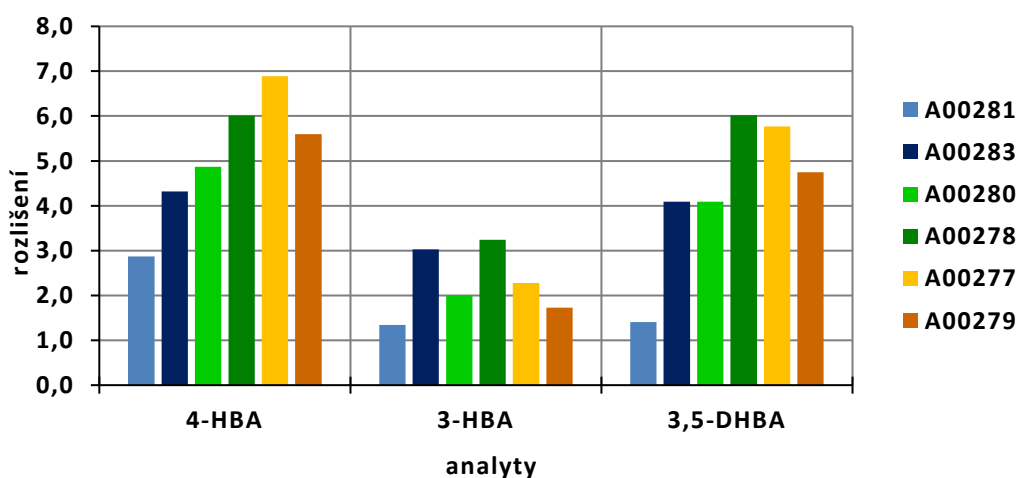
Obr. 67: Graf rozlišení píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.2.5.2 Hodnocení rozlišení při pH 6

Při pH 6 jsou na všech kolonách Astra ZWIX všechny testované fenolické kyseliny dostatečně rozseparovány (viz Obr. 46), kromě 3-HBA a 3,5-DHBA na koloně A00281. Hodnoty rozlišení píků se liší mezi sebou v rámci šarže i mezi jednotlivými šaržemi, jak uvádí Tab. 77 a Obr. 68. Nejnižší hodnoty rozlišení mají analyty na koloně A00281.

Tab. 77: Průměrné rozlišení píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
2,4-DHBA	–	–	–	–	–	–
4-HBA	2,87	4,32	4,87	6,01	6,89	5,60
3-HBA	1,34	3,03	2,01	3,24	2,28	1,73
3,5-DHBA	1,41	4,09	4,09	6,02	5,77	4,75



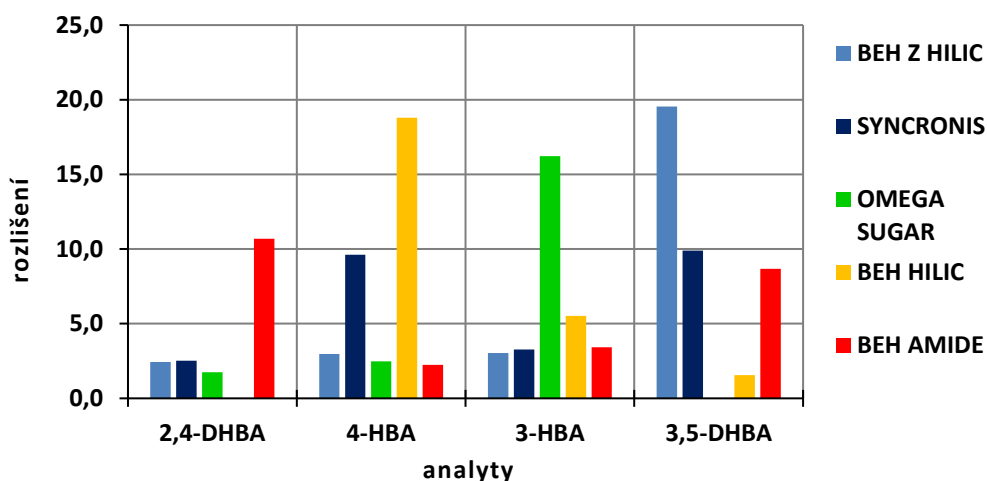
Obr. 68: Graf rozlišení píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon jsou všechny analyty dostatečně rozděleny – 3,5-DHBA na koloně OMEGA SUGAR a 2,4-DHBA na koloně BEH HILIC nejsou eluovány (viz Obr. 48). Vysoké hodnoty rozlišení, které jsou uvedeny v Tab. 78 a na Obr. 69, má 4-HBA na koloně BEH HILIC a 3-HBA na koloně OMEGA SUGAR.

Tab. 78: Průměrné rozlišení píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
2,4-DHBA	2,43	2,53	1,74	–	10,70
4-HBA	2,97	9,61	2,47	18,80	2,25
3-HBA	3,04	3,28	16,23	5,52	3,42
3,5-DHBA	19,54	9,89	–	1,55	8,67



Obr. 69: Graf rozlišení píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.3 Hodnocení asymetrie píků

Asymetrie píků byla hodnocena ze tří opakování. Výsledné hodnoty jsou průměrem těchto tří měření. Jako chvostující pík byl považován pík s faktorem symetrie $A_s > 1,5$, jako frontující pík s faktorem symetrie $A_s < 1,0$ [24].

5.3.1 Nukleové baze a nukleosidy

5.3.1.1 Hodnocení asymetrie píku při pH 3

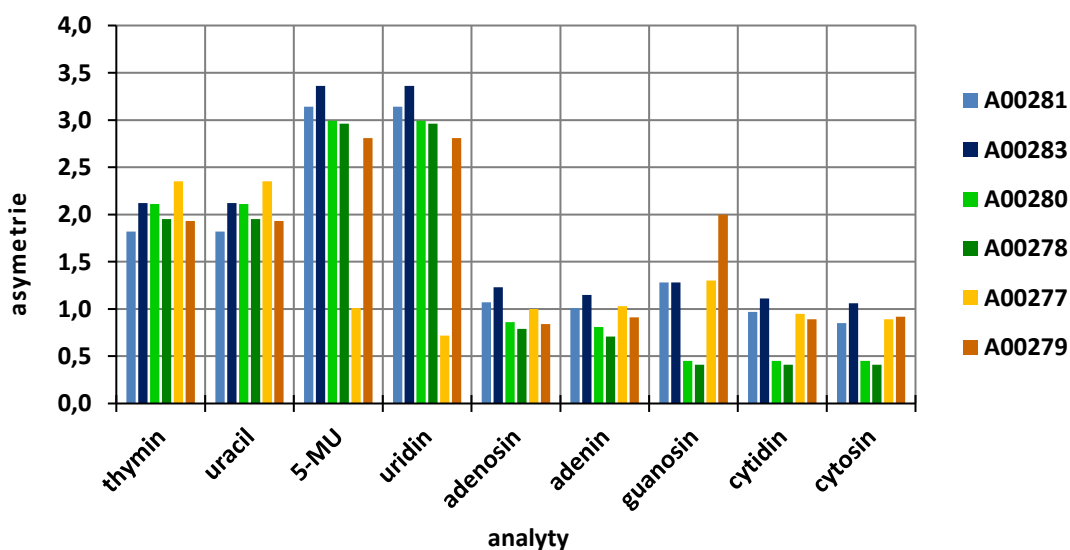
Hodnoty asymetrie píků nukleových bazí a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3 jsou zobrazeny v Tab. 79 a na Obr. 70. Thymin s uracilem na všech kolonách chvostují s asymetrií 1,82 až 2,35. Podobně 5-methyluridin a uridin chvostují na všech kolonách

s asymetrií 2,81 až 3,36, kromě kolony A00277, kde lze pozorovat frontování uridinu a kde má 5-methyluridin symetrický pík (faktor symetrie 1,01). Mírné frontování lze pozorovat u adenosinu a adeninu na kolonách šarže P1328. Cytosin a cytidin výrazně frontují na kolonách šarže P1328 (viz Obr. 10).

Kolony šarže P1328 mají velmi podobné hodnoty asymetrie jednotlivých analytů. Naopak mezi kolonami šarže P1327 jsou výraznější rozdíly, např. u guanosinu nebo u 5-methyluridinu a uridinu, u nichž je rozdíl způsoben tím, že na koloně A00279 byla asymetrie počítána z jednoho společného píku těchto analytů, kdežto na koloně A00277 byla počítána ze dvou píků.

Tab. 79: Průměrná asymetrie píků nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	1,82	2,12	2,11	1,95	2,35	1,93
uracil	1,82	2,12	2,11	1,95	2,35	1,93
5-methyluridin	3,14	3,36	2,99	2,96	1,01	2,81
uridin	3,14	3,36	2,99	2,96	0,72	2,81
adenosín	1,07	1,23	0,86	0,79	1,00	0,84
adenín	1,01	1,15	0,81	0,71	1,03	0,91
guanosín	1,28	1,28	0,45	0,41	1,30	2,00
cytidín	0,97	1,11	0,45	0,41	0,95	0,89
cytosín	0,85	1,06	0,45	0,41	0,89	0,92



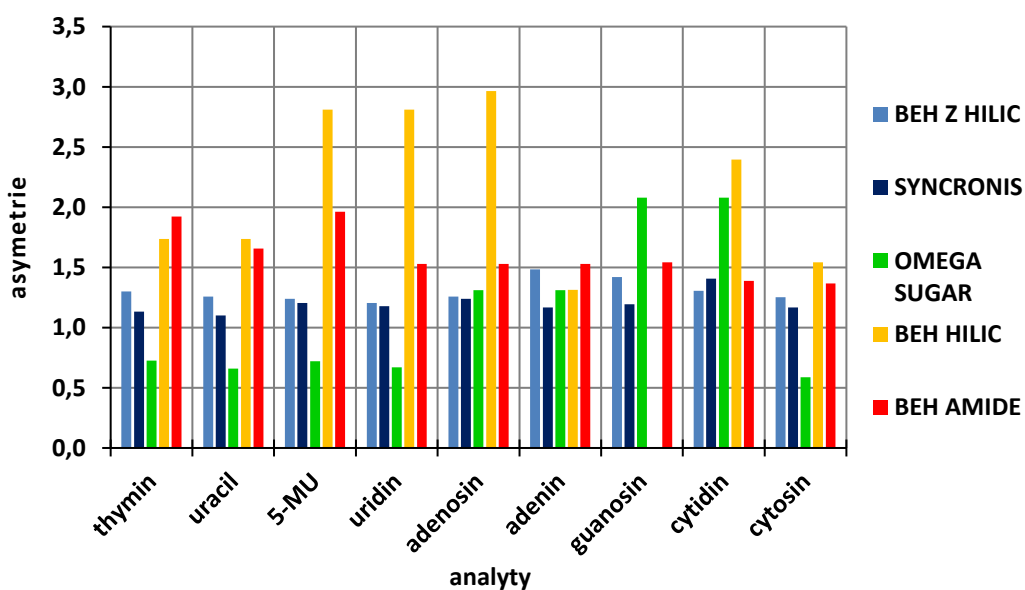
Obr. 70: Graf asymetrie píků nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS jsou píky analytů symetrické. Jak je patrné z Tab. 80 a Obr. 71, nejvíce chvostují analyty na koloně BEH HILIC s asymetrií 1,31 až 2,96, a na koloně BEH AMIDE s asymetrií 1,53 až 1,92. Frontování lze pozorovat na koloně OMEGA SUGAR u thyminu, uracilu, 5-methyluridinu, uridinu a cytosinu. Hodnota asymetrie u guanosinu na koloně BEH HILIC chybí, protože guanosin částečně koeluuje s adeninem (viz Obr. 12), a proto tato hodnota nemohla být vypočítána.

Tab. 80: Průměrná asymetrie píků nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymin	1,30	1,13	0,73	1,74	1,92
uracil	1,26	1,10	0,66	1,74	1,66
5-methyluridin	1,24	1,20	0,72	2,81	1,96
uridin	1,20	1,18	0,67	2,81	1,53
adenosin	1,26	1,24	1,31	2,96	1,53
adenin	1,48	1,17	1,31	1,31	1,53
guanosin	1,42	1,19	2,08	–	1,54
cytidin	1,31	1,41	2,08	2,40	1,39
cytosin	1,25	1,17	0,59	1,54	1,37



Obr. 71: Graf asymetrie píků nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

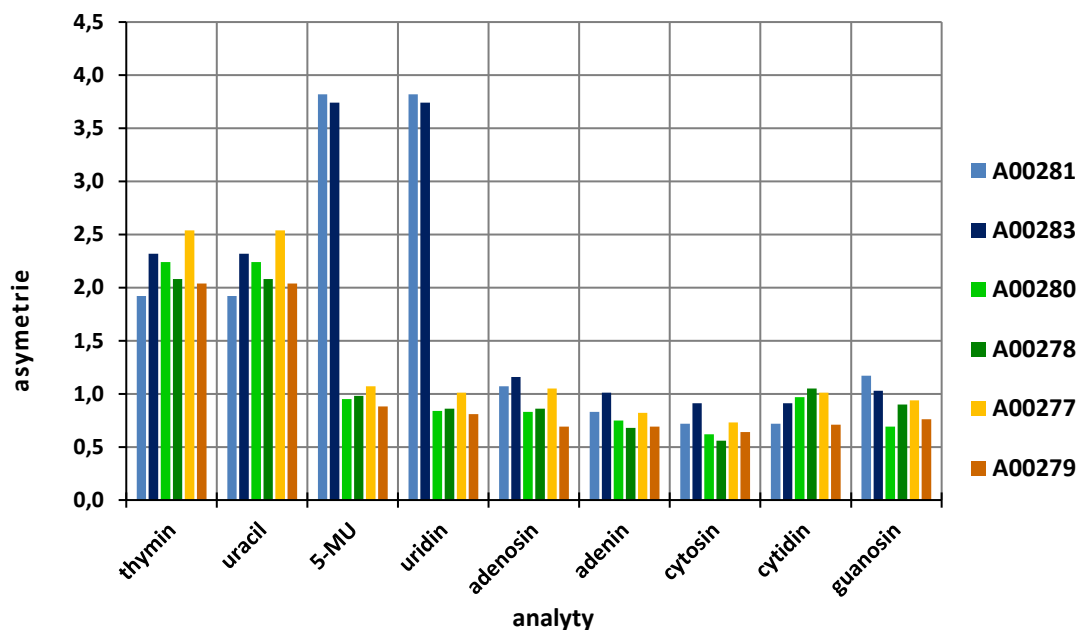
5.3.1.2 Hodnocení asymetrie píku při pH 6

Thymin s uracilem chvostují na všech kolonách Astra ZWIX s asymetrií 1,92 až 2,54. 5-methyluridin a uridin na kolonách šarže P1329 chvostují s asymetrií 3,74 a 3,82, na kolonách šarže P1328 a koloně A00279 mírně frontují, na koloně A00277 mají symetrické píky (viz Obr. 14). Píky adeninu a cytosinu frontují na všech kolonách s asymetrií 0,62 až 0,83, kromě kolony A00283, kde jsou píky téměř symetrické – faktor symetrie 1,01 a 0,91. Pík adenosinu frontuje na kolonách šarže P1328 a koloně A00279 s asymetrií 0,69 až 0,86. Cytidin frontuje na kolonách A00281 a A00279 s asymetrií 0,71 a 0,72, guanosin na koloně A00280 a A00279 s asymetrií 0,69 a 0,76, jak je uvedeno v Tab. 81 a na Obr. 72.

Kolony šarže P1328 mají velmi podobné hodnoty asymetrie pík analytů, podobně i kolony šarže P1329, kromě koeluovaného píku thyminu s uracilem, jež na koloně A00283 chvostují výrazněji. Kolony šarže P1327 se liší hlavně v asymetrii koeluovaného píku thyminu s uracilem, které chvostují výrazněji na koloně A00277. Jednotlivé šarže se mezi sebou příliš neliší, kromě 5-methyluridinu a uridinu, jež na kolonách šarže P1329 výrazně chvostují s asymetrií 3,74 a 3,82.

Tab. 81: Průměrná asymetrie píků nukleovýchází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymin	1,92	2,32	2,24	2,08	2,54	2,04
uracil	1,92	2,32	2,24	2,08	2,54	2,04
5-methyluridin	3,82	3,74	0,95	0,98	1,07	0,88
uridin	3,82	3,74	0,84	0,86	1,01	0,81
adenosin	1,07	1,16	0,83	0,86	1,05	0,69
adenin	0,83	1,01	0,75	0,68	0,82	0,69
cytosin	0,72	0,91	0,62	0,56	0,73	0,64
cytidin	0,72	0,91	0,97	1,05	1,01	0,71
guanosin	1,17	1,03	0,69	0,90	0,94	0,76

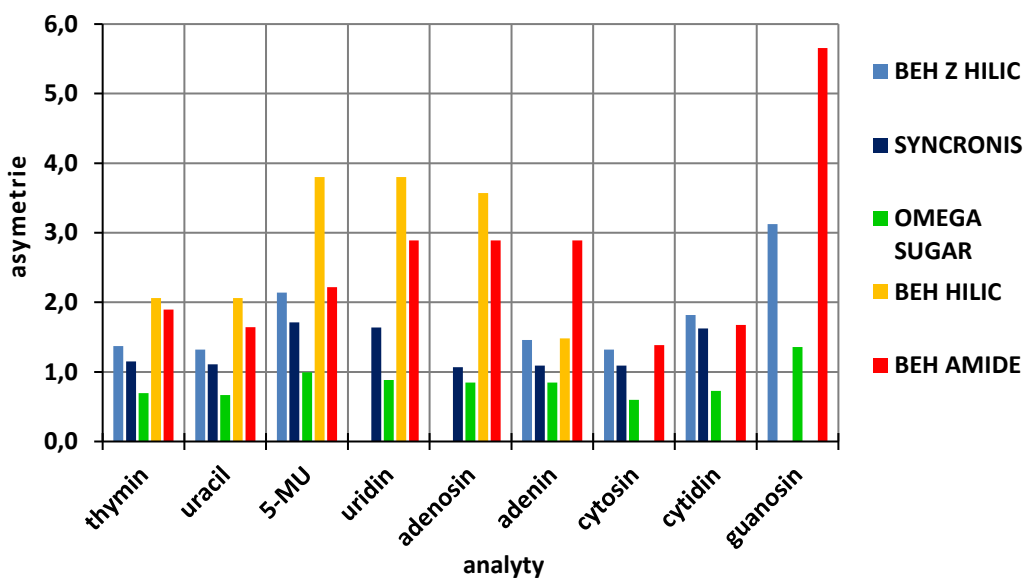


Obr. 72: Graf asymetrie píkú nukleových bází a nukleosidů na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách mají analyty na koloně BEH Z HILIC mírně vyšší faktor symetrie než na koloně SYNCRONIS, píky analytů mají na koloně BEH Z HILIC faktor symetrie 1,32 až 2,14, na koloně SYNCRONIS 1,07 až 1,71. Jak je uvedeno v Tab. 82 a na Obr. 73, na koloně OMEGA SUGAR frontuje většina píkú s asymetrií 0,60 až 0,88, kromě guanosinu a 5-methyluridinu, jež mají píky symetrické. Naopak na koloně BEH AMIDE všechny analyty chvostují s asymetrií 1,64 až 5,65. Chybějící hodnoty asymetrie jsou způsobeny tím, že píky nejsou dostatečně rozděleny (viz Obr. 17), proto nemohl být faktor symetrie spočítán.

Tab. 82: Průměrná asymetrie píků nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymin	1,37	1,15	0,70	2,06	1,90
uracil	1,32	1,11	0,67	2,06	1,64
5-methyluridin	2,14	1,71	0,99	3,80	2,22
uridin	–	1,64	0,88	3,80	2,89
adenosin	–	1,07	0,85	3,57	2,89
adenin	1,46	1,09	0,85	1,48	2,89
cytosin	1,32	1,09	0,60	–	1,38
cytidin	1,82	1,63	0,73	–	1,68
guanosen	3,13	–	1,36	–	5,65



Obr. 73: Graf asymetrie píků nukleových bazí a nukleosidů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.3.2 Deriváty kyseliny nikotinové

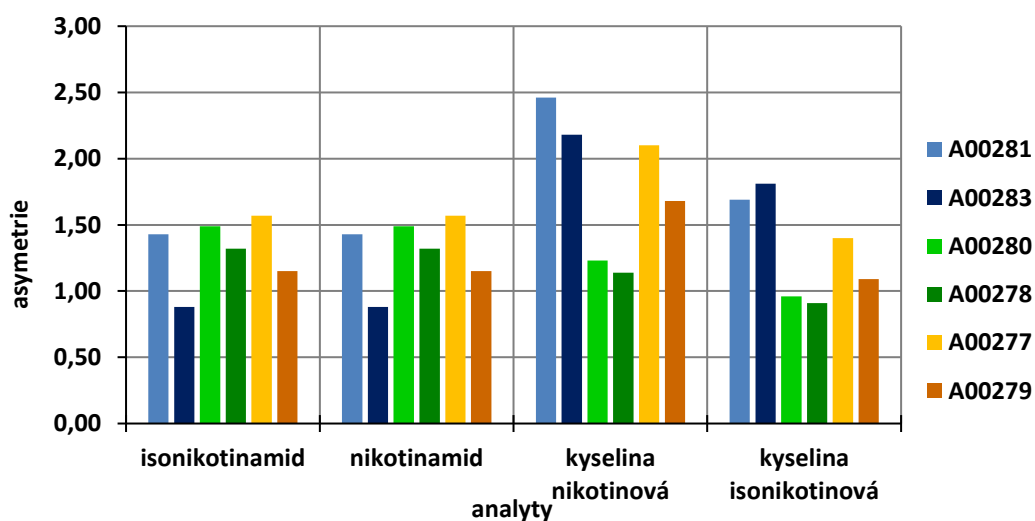
5.3.2.1 Hodnocení asymetrie píku při pH 3

Na všech kolonách Astra ZWIX při pH 3 píky isonikotinamidu a nikotinamidu splňují podmínku symetrie píku ($A_s < 1,5$), kromě kolony A00277, kde chvostují s asymetrií 1,57. Kyselina nikotinová a isonikotinová chvostují na kolonách šarže P1329 s asymetrií 1,69 až 2,46, kyselina nikotinová též na kolonách šarže P1327 s asymetrií 1,68 a 2,10,

jak je uvedeno v Tab. 83 a na Obr. 74. Na kolonách šarže P1328 píky všech analytů splňují podmínku symetrie píku (viz Obr. 19).

Tab. 83: Průměrná asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	1,43	0,88	1,49	1,32	1,57	1,15
nikotinamid	1,43	0,88	1,49	1,32	1,57	1,15
nikotinová kyselina	2,46	2,18	1,23	1,14	2,10	1,68
isonikotinová kyselina	1,69	1,81	0,96	0,91	1,40	1,09



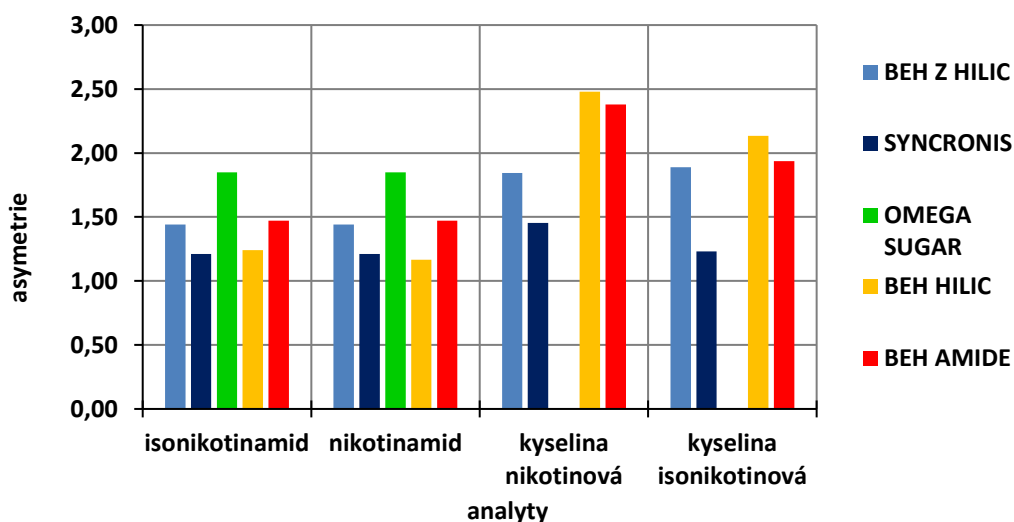
Obr. 74: Graf asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných zwitteriontových kolon mírně chvostuje kyselina nikotinová a isonikotinová na koloně BEH Z HILIC (viz Obr. 20) s asymetrií 1,84 a 1,89. Na koloně SYNCRONIS mají všechny píky symetrický tvar. Kyseliny nikotinová a isonikotinová chvostují i na koloně BEH HILIC a BEH AMIDE s asymetrií 1,94 až 2,48. Na koloně OMEGA SUGAR lze pozorovat mírné chvostování u isonikotinamidu a nikotinamidu. Hodnoty asymetrie píků jsou uvedeny v Tab. 84 a na Obr. 75.

Tab. 84: Průměrná asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	1,44	1,21	1,85	1,24	1,47
nikotinamid	1,44	1,21	1,85	1,17	1,47
nikotinová kyselina	1,84	1,45	–	2,48	2,38
isonikotinová kyselina	1,89	1,23	–	2,13	1,94



Obr. 75: Graf asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 3

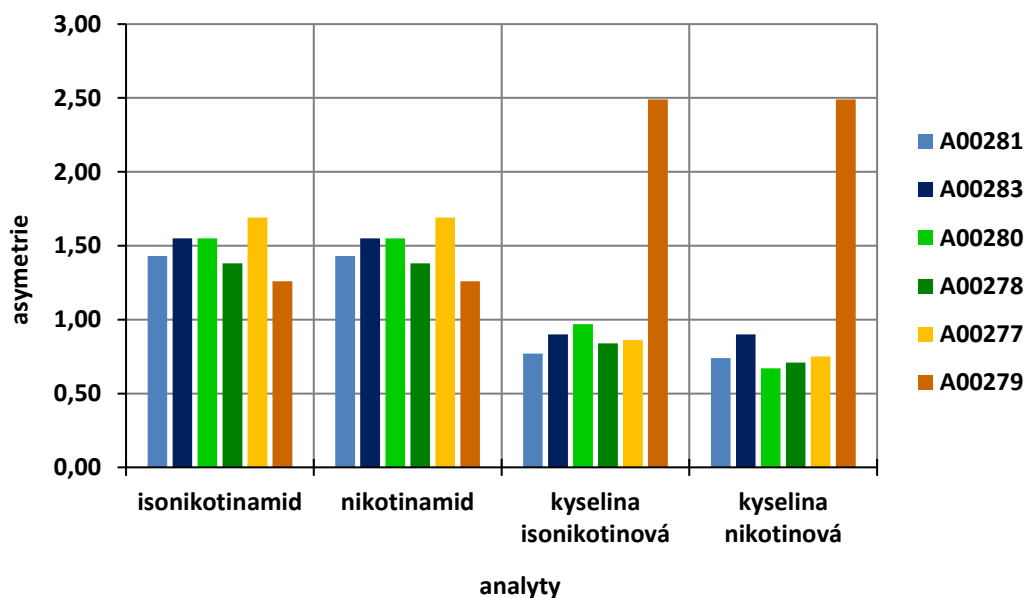
5.3.2.2 Hodnocení asymetrie píku při pH 6

Isonikotinamid a nikotinamid mírně chvostují na kolonách A00283, A00280 a A00277 s asymetrií 1,55 a 1,69, jak je zřejmé z Tab. 85 a Obr. 76. Frontování lze pozorovat u nikotinové kyseliny na koloně A00280 (faktor symetrie 0,67), mírné frontování pak u kyselin nikotinové a isonikotinové na kolonách šarže P1329 a na kolonách A00278 a A00277 (faktor symetrie od 0,71 do 0,90). Na koloně A00279 tyto kyseliny naopak výrazně chvostují s asymetrií 2,49 (viz Obr. 23).

Hodnoty asymetrie se mezi kolonami jedné šarže příliš neliší, kromě kolon šarže P1327, kde na koloně A00279 mají isonikotinamid a nikotinamid nižší hodnoty asymetrie píku, naopak kyseliny isonikotinová a nikotinová mají oproti koloně A00277 výrazně vyšší hodnoty asymetrie píků.

Tab. 85: Průměrná asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	1,43	1,55	1,55	1,38	1,69	1,26
nikotinamid	1,43	1,55	1,55	1,38	1,69	1,26
isonikotinová kyselina	0,77	0,90	0,97	0,84	0,86	2,49
nikotinová kyselina	0,74	0,90	0,67	0,71	0,75	2,49



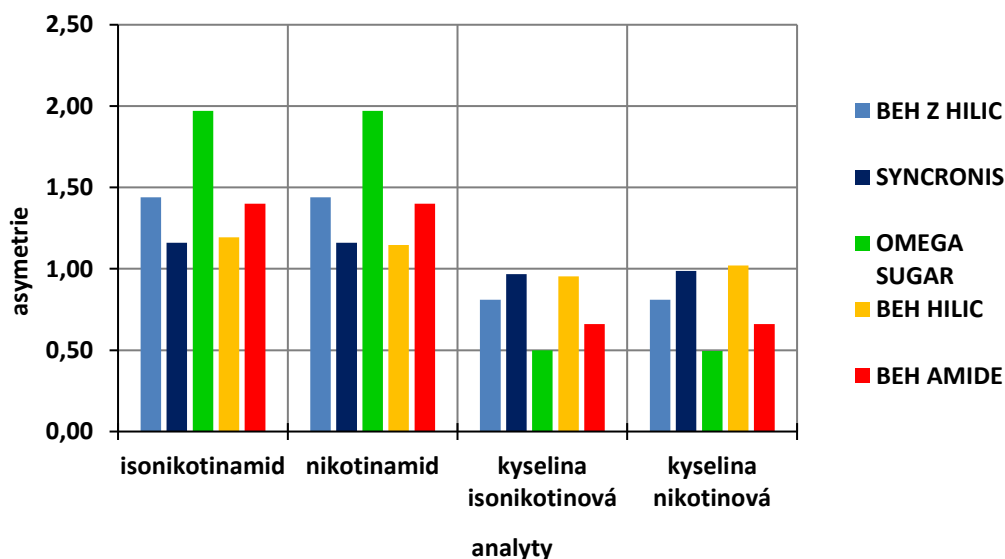
Obr. 76: Graf asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných zwitteriontových kolon lze v Tab. 86 a na Obr. 77 pozorovat symetrické píky všech analytů kromě píků kyseliny isonikotinové a nikotinové, jež na koloně BEH Z HILIC frontují s asymetrií 0,81. Na koloně OMEGA SUGAR isonikotinamid a nikotinamid chvostují s asymetrií 1,97, kyseliny isonikotinová a nikotinová naopak frontují s asymetrií 0,50. Tyto kyseliny frontují i na koloně BEH AMIDE s asymetrií 0,66, na koloně BEH HILIC mají symetrické píky (viz Obr. 25).

Tab. 86: Průměrná asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	1,44	1,16	1,97	1,19	1,40
nikotinamid	1,44	1,16	1,97	1,15	1,40
isonikotinová kyselina	0,81	0,97	0,50	0,95	0,66
nikotinová kyselina	0,81	0,99	0,50	1,02	0,66



Obr. 77: Graf asymetrie píků derivátů kyseliny nikotinové na komerčně dostupných kolonách při pH 6

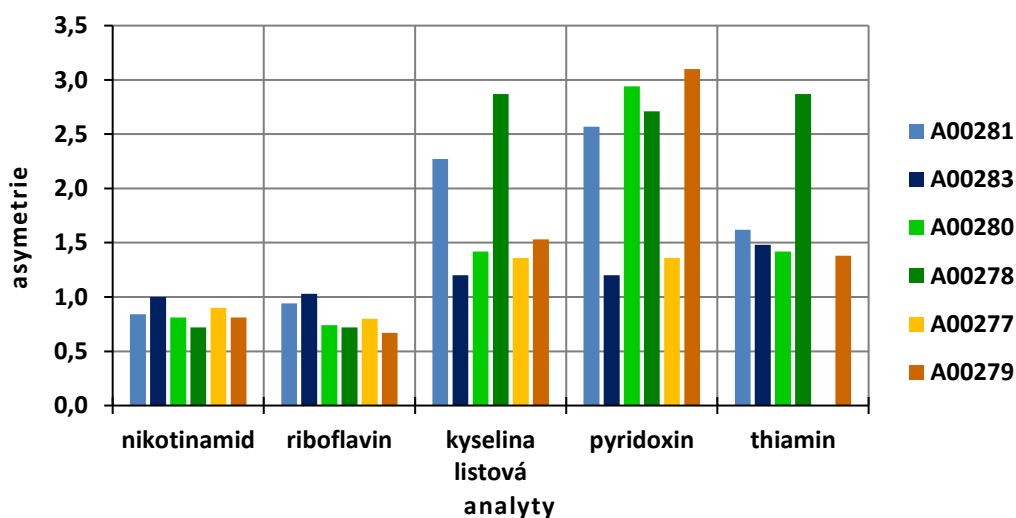
5.3.3 Hydrofilní vitamíny

5.3.3.1 Hodnocení asymetrie píku při pH 3

Z Tab. 87 a Obr. 78 je patrné, že píky nikotinamidu a riboflavinu mírně frontují na všech kolonách s asymetrií 0,67 až 0,90, kromě kolony A00283, kde jsou zmíněné píky symetrické. Nejvýrazněji chvostuje pyridoxin na kolonách A00280 a A00279 s asymetrií 2,94 a 3,10 (viz Obr. 26). U nikotinamidu a riboflavinu se kolony v rámci jedné šarže liší jen mírně, u kyseliny listové se hodnoty asymetrie liší výrazně. U kolon šarže P1329 a P1327 je velký rozdíl v asymetrii mezi kolonami u pyridoxinu, na kolonách šarže P1328 u thiaminu.

Tab. 87: Průměrná asymetrie píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	0,84	1,00	0,81	0,72	0,90	0,81
riboflavin	0,94	1,03	0,74	0,72	0,80	0,67
kyselina listová	2,27	1,20	1,42	2,87	1,36	1,53
pyridoxin	2,57	1,20	2,94	2,71	1,36	3,10
thiamin	1,62	1,48	1,42	2,87	–	1,38



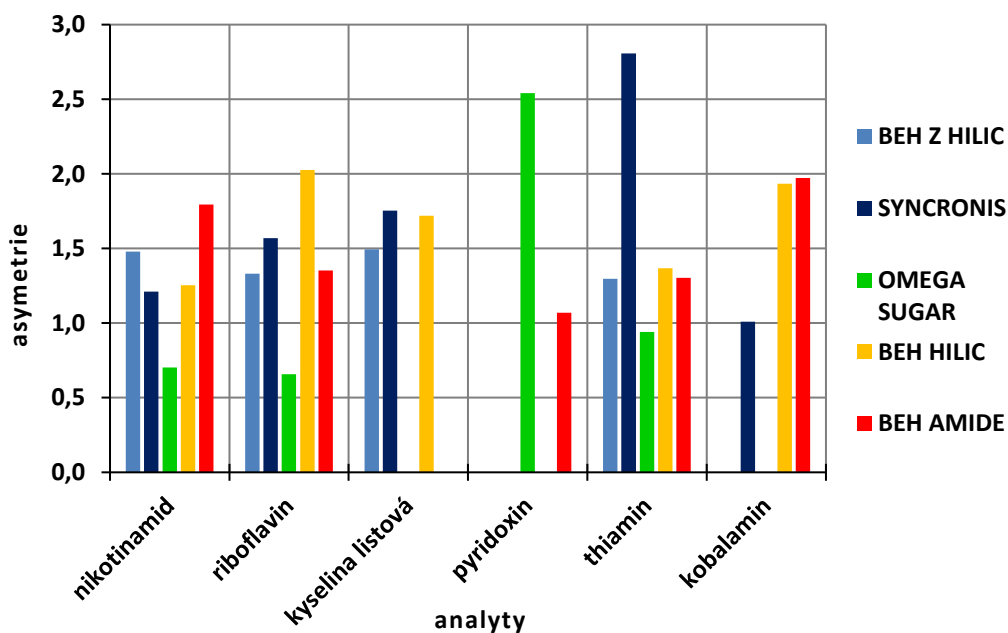
Obr. 78: Graf asymetrie píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS se hodnoty asymetrie liší především u thiaminu, který na koloně SYNCRONIS výrazně chvostuje s asymetrií 2,81 (viz Obr. 29). Na koloně OMEGA SUGAR výrazně chvostuje pyridoxin s asymetrií 2,54, na koloně BEH HILIC riboflavin s asymetrií 2,03. Hodnoty asymetrie píků hydrofilních vitamínů při pH 3 jsou uvedeny v Tab. 88 a na Obr. 79. Chybějící hodnoty jsou způsobené tím, že píky pyridoxinu na koloně SYNCRONIS a kyseliny listové na koloně BEH AMIDE velmi chvostují, hodnota asymetrie pro ně nebyla spočítána. Ostatní chybějící hodnoty asymetrie jsou u analytů, jež nejsou na daných kolonách eluovány.

Tab. 88: Průměrná asymetrie píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	1,48	1,21	0,70	1,25	1,79
riboflavin	1,33	1,57	0,66	2,03	1,35
kyselina listová	1,49	1,75	–	1,72	–
pyridoxin	–	–	2,54	–	1,07
thiamin	1,30	2,81	0,94	1,37	1,30
kobalmin	–	1,01	–	1,93	1,97



Obr. 79. Graf asymetrie píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

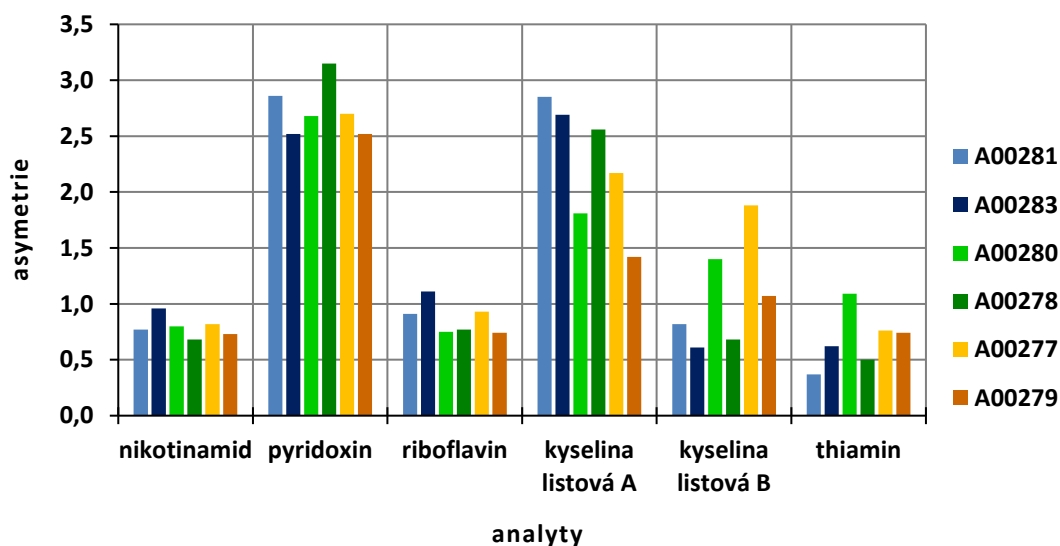
5.3.3.2 Hodnocení asymetrie píku při pH 6

Výrazné chvostování píků na kolonách Astra ZWIX lze pozorovat u pyridoxinu (faktor symetrie 2,52 až 3,15) a kyseliny listové A (faktor symetrie 1,81 až 2,85) na všech kolonách, na koloně A00277 chvostování i u kyseliny listové B (faktor symetrie 1,88). Naopak, jak je uvedeno v Tab. 89 a na Obr. 80, nikotinamid frontuje na všech kolonách s asymetrií 0,68 až 0,82, kromě kolony A00283, kde má symetrický pík. Na všech kolonách frontuje též thiamin s asymetrií 0,37 až 0,76, kromě kolony A00280, kde má symetrický pík, a riboflavin s asymetrií 0,74 až 0,93, který má symetrický pík na koloně A00283 (viz Obr. 31). Kyselina listová B frontuje na kolonách A00281, A00283 a A00278

s asymetrií 0,61 až 0,82. Kolony v rámci jedné šarže se mezi sebou liší zvláště u pyridoxinu, kyseliny listové A i B a kromě kolon šarže P1327 také u thiaminu.

Tab. 89: Průměrná asymetrie píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	0,77	0,96	0,80	0,68	0,82	0,73
pyridoxin	2,86	2,52	2,68	3,15	2,70	2,52
riboflavin	0,91	1,11	0,75	0,77	0,93	0,74
kyselina listová A	2,85	2,69	1,81	2,56	2,17	1,42
kyselina listová B	0,82	0,61	1,40	0,68	1,88	1,07
thiamin	0,37	0,62	1,09	0,50	0,76	0,74



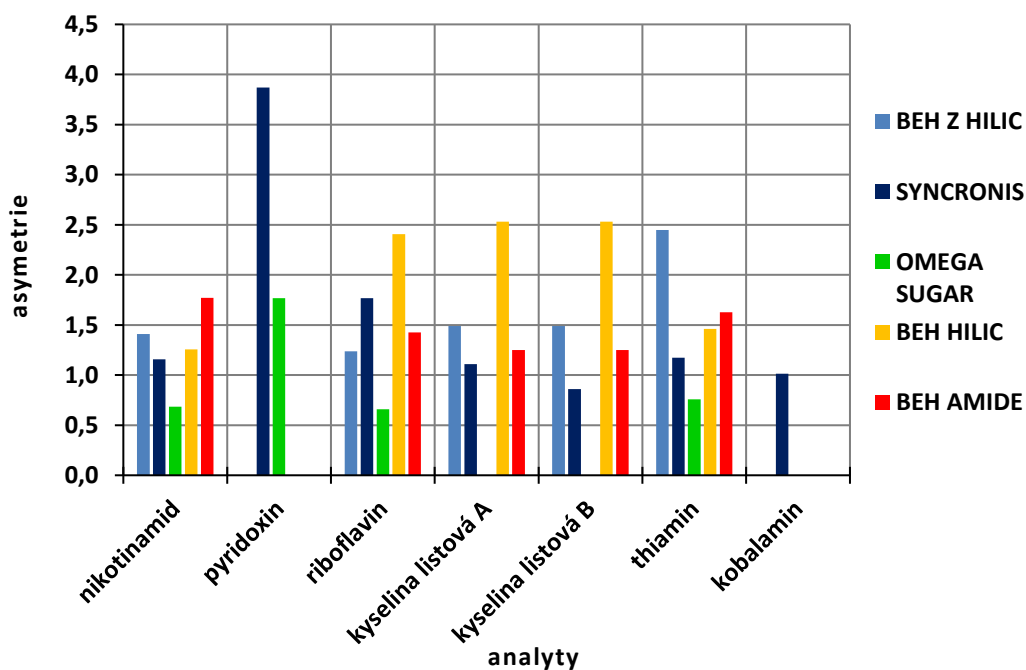
Obr. 80: Graf asymetrie píků hydrofilních vitamínů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných kolon chvostuje nejvýrazněji pyridoxin na koloně SYNCRONIS s asymetrií 3,87. Thiamin chvostuje na koloně BEH Z HILIC s asymetrií 2,45, riboflavin a kyselina listová na koloně BEH HILIC s asymetrií 2,41 a 2,53. Na koloně OMEGA SUGAR všechny analyty kromě pyridoxinu frontují s asymetrií 0,66 až 0,76 (viz Obr. 32). Hodnoty asymetrie píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6 jsou uvedeny v Tab. 90 a na Obr. 81.

Tab. 90: Průměrná asymetrie píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	1,41	1,16	0,68	1,26	1,77
pyridoxin	–	3,87	1,77	–	–
riboflavin	1,24	1,77	0,66	2,41	1,43
kyselina listová A	1,49	1,11	–	2,53	1,25
kyselina listová B	1,49	0,86	–	2,53	1,25
thiamin	2,45	1,17	0,76	1,46	1,63
kobalamin	–	0,73	–	–	–



Obr. 81: Graf asymetrie píků hydrofilních vitamínů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.3.4 Betablokátory

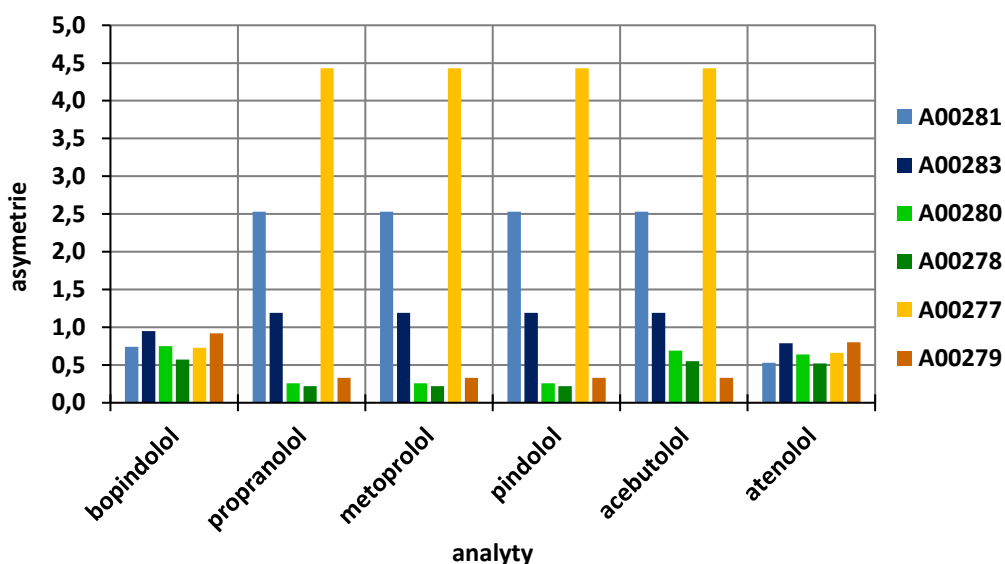
5.3.4.1 Hodnocení asymetrie píku při pH 3

Mírné frontování s asymetrií 0,52 až 0,95 lze při pH 3 pozorovat u bopindololu a atenololu na všech kolonách Astra ZWIX, na kolonách šarže P1328 a koloně A00279 i u ostatních BB (viz Tab. 91 a Obr. 82). Naopak chvostování s asymetrií 2,53 a 4,43 je patrné u propranololu, metoprololu, pindololu a acebutololu na kolonách A00281 a A00277 (viz Obr. 34). Kolony šarže P1328 se v asymetrii téměř neliší, naopak kolony

ostatních šarží se mezi sebou výrazně liší v asymetrii píků propranololu, metoprololu, pindololu a acebutololu.

Tab. 91: Průměrná asymetrie píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	0,74	0,95	0,75	0,57	0,73	0,92
propranolol	2,53	1,19	0,26	0,22	4,43	0,33
metoprolol	2,53	1,19	0,26	0,22	4,43	0,33
pindolol	2,53	1,19	0,26	0,22	4,43	0,33
acebutolol	2,53	1,19	0,69	0,55	4,43	0,33
atenolol	0,53	0,79	0,64	0,52	0,66	0,80



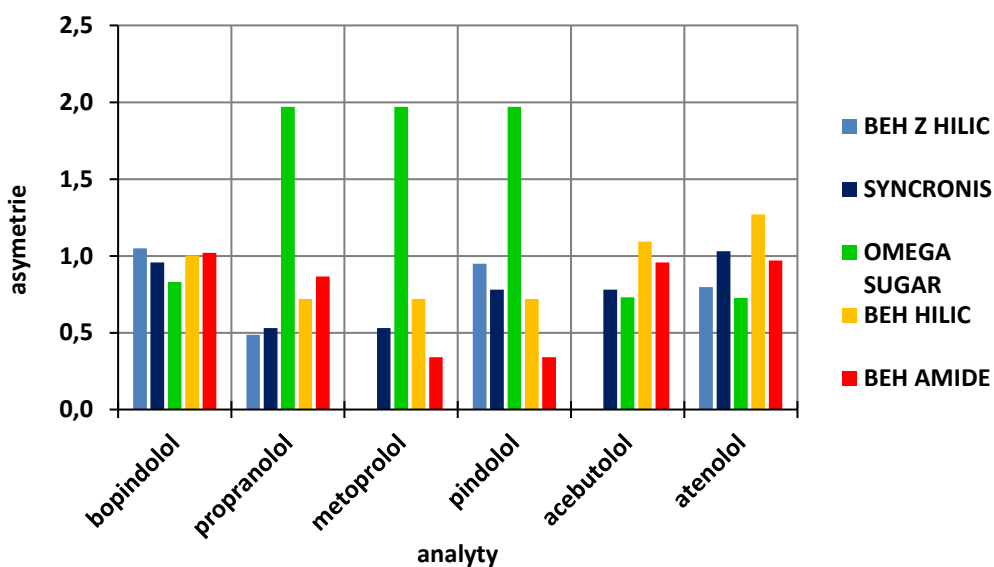
Obr. 82: Graf asymetrie píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách frontuje propranolol a na koloně SYNCRONIS i metoprolol s asymetrií 0,49 a 0,53. Píky bopindololu a atenololu jsou na těchto kolonách téměř symetrické (viz Tab. 92 a Obr. 83). Na koloně OMEGA SUGAR chvostuje propranolol s metoprololem a pindololem s asymetrií 1,97. Na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE tyto analyty mírně frontují s asymetrií 0,34 až 0,87. Bopindolol má na všech kolonách symetrický pík, kromě kolony OMEGA SUGAR, na které mírně frontuje s asymetrií 0,83 (viz Obr. 37).

Tab. 92: Průměrná asymetrie píků betablokátorů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	1,05	0,96	0,83	1,00	1,02
propranolol	0,49	0,53	1,97	0,72	0,87
metoprolol	–	0,53	1,97	0,72	0,34
pindolol	0,95	0,78	1,97	0,72	0,34
acebutolol	–	0,78	0,73	1,09	0,96
atenolol	0,80	1,03	0,73	1,27	0,97



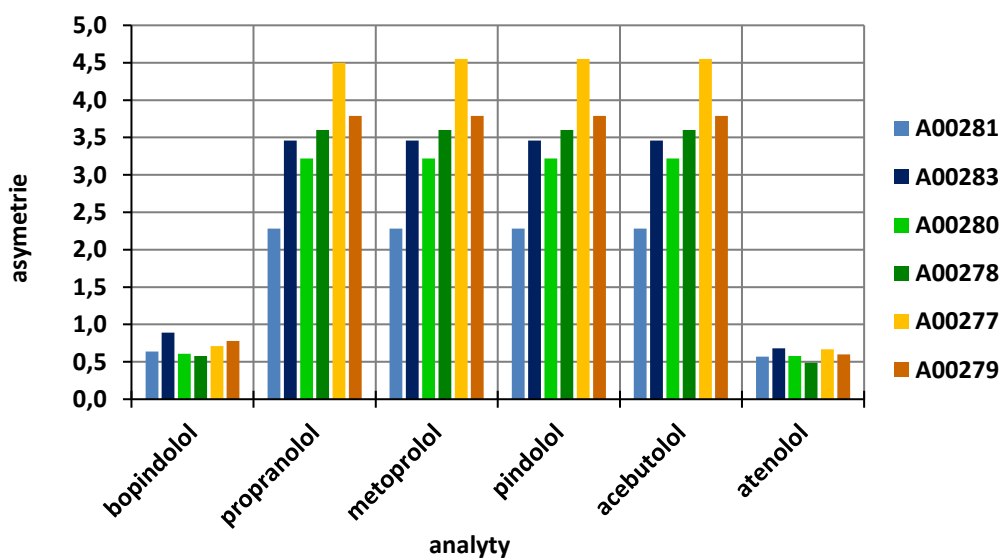
Obr. 83: Graf asymetrie píků betablokátorů na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.3.4.2 Hodnocení asymetrie píku při pH 6

I při pH 6 frontují bopindolol a atenolol s asymetrií 0,49 až 0,89 na všech kolonách Astra ZWIX (viz Tab. 93 a Obr. 84). Ostatní BB na všech kolonách chvostují s asymetrií 2,28 až 4,55, nejvíce na koloně A00277 (viz Obr. 39). U atenololu, u šarží P1328 a P1327 i u bopindololu, nejsou výrazné rozdíly v asymetrii píků mezi kolonami téže šarže. U ostatních analytů se již asymetrie píků na kolonách stejné šarže liší. Největší rozdíly jsou mezi kolonami šarže P1329, nejmenší mezi kolonami šarže P1328.

Tab. 93: Průměrná asymetrie píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	0,64	0,89	0,61	0,58	0,71	0,78
propranolol	2,28	3,46	3,22	3,60	4,55	3,79
metoprolol	2,28	3,46	3,22	3,60	4,55	3,79
pindolol	2,28	3,46	3,22	3,60	4,55	3,79
acebutolol	2,28	3,46	3,22	3,60	4,55	3,79
atenolol	0,57	0,68	0,58	0,49	0,67	0,60



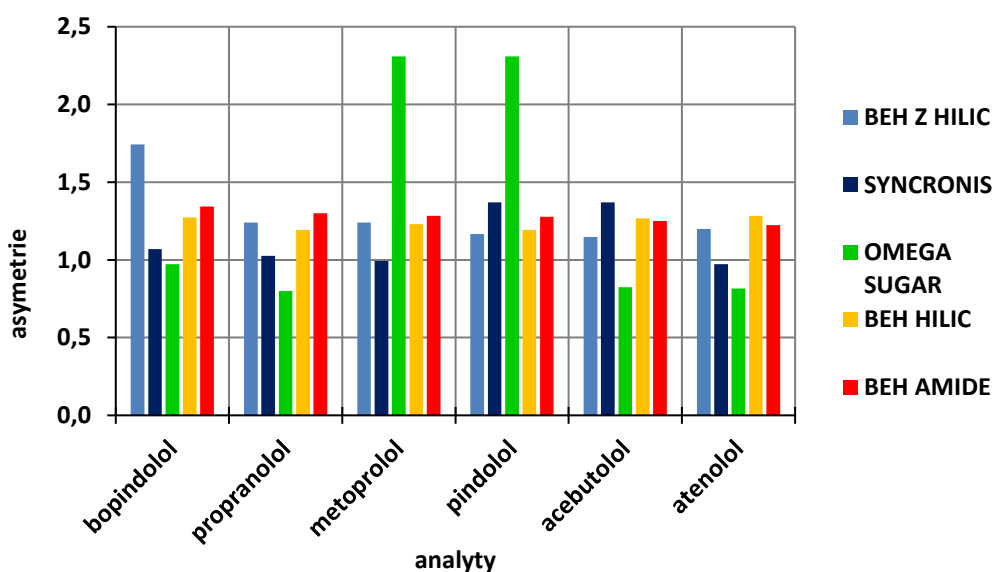
Obr. 84: Graf asymetrie píků betablokátorů na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách při pH 6 chvostuje bopindolol s asymetrií 1,74 na koloně BEH Z HILIC. Na koloně SYNCRONIS, stejně jako na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE, jsou všechny píky symetrické (faktor symetrie 0,97 až 1,37). Na koloně OMEGA SUGAR chvostuje metoprolol s pindololem s asymetrií 2,31 (viz Obr. 40). Hodnoty asymetrie BB při pH 6, které jsou uvedeny v Tab. 94 a na Obr. 85, se na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE téměř neliší.

Tab. 94: Průměrná asymetrie píků betablokátorů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	1,74	1,07	0,97	1,27	1,34
propranolol	1,24	1,03	0,80	1,19	1,30
metoprolol	1,24	0,99	2,31	1,23	1,28
pindolol	1,17	1,37	2,31	1,19	1,28
acebutolol	1,15	1,37	0,82	1,27	1,25
atenolol	1,20	0,97	0,82	1,28	1,22



Obr. 85: Graf asymetrie píků betablokátorů na komerčně dostupných kolonách při pH 6

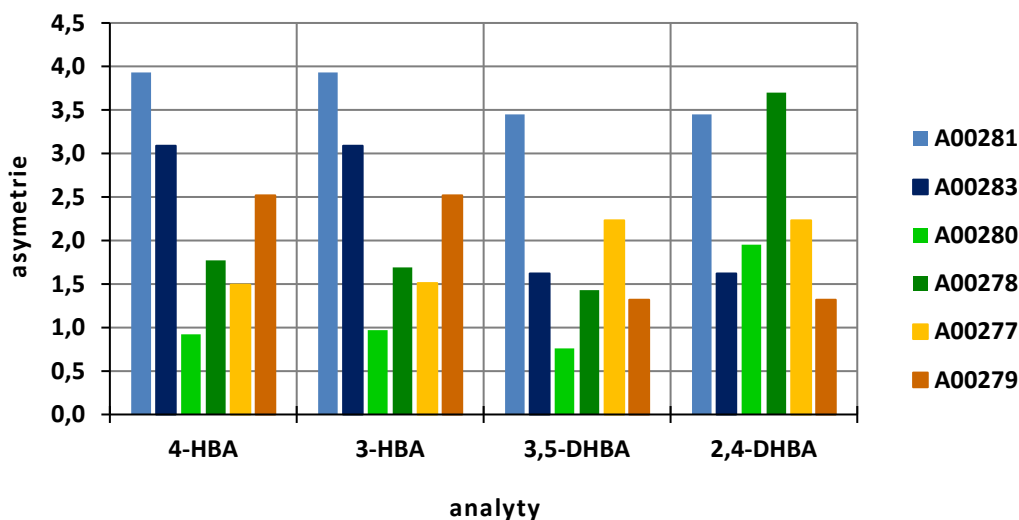
5.3.5 Fenolické kyseliny

5.3.5.1 Hodnocení asymetrie píku při pH 3

Jak je patrné z Tab. 95 a Obr. 86, chvostování s asymetrií 1,62 až 3,93 lze pozorovat u všech píků analytů na kolonách Astra ZWIX šarže P1329. Na koloně A00280 frontují 4-HBA a 3,5-DHBA s asymetrií 0,76 a 0,92 (viz Obr. 42). Pík kyseliny 3-HBA je na této koloně symetrický (faktor symetrie 0,97). Symetrické píky má i 3,5-DHBA na kolonách A00278 a A00279, 4-HBA na koloně A00277 a 2,4-DHBA na koloně A00279 (faktor symetrie 1,32 až 1,49). Kyseliny při pH 3 chvostují, protože mají pKa přibližně 3, takže část je ionizována a část neionizována. Asymetrie se na kolonách v rámci jedné šarže liší, nejvýrazněji na kolonách šarže P1327.

Tab. 95: Průměrná asymetrie píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
4-HBA	3,93	3,09	0,92	1,77	1,49	2,52
3-HBA	3,93	3,09	0,97	1,69	1,51	2,52
3,5-DHBA	3,45	1,62	0,76	1,43	2,23	1,32
2,4-DHBA	3,45	1,62	1,95	3,70	2,23	1,32



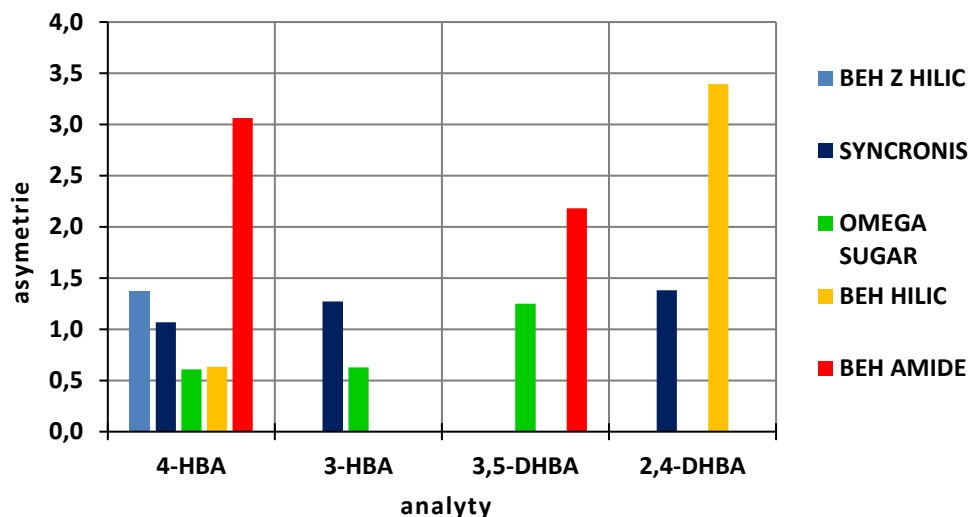
Obr. 86: Graf asymetrie píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 3

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách lze při pH 3 pozorovat výrazné chvostování analytů s asymetrií 2,18 a 3,06 na koloně BEH AMIDE a 2,4-DHBA na koloně BEH HILIC. Na koloně OMEGA SUGAR frontují 3-HBA a 4-HBA s asymetrií 0,61 a 0,63, jak je uvedeno v Tab. 96 a na Obr. 87. Všechny analyty na koloně SYNCRONIS mají symetrický pík (faktor symetrie 1,07 až 1,38). Chybějící hodnoty asymetrie na koloně BEH Z HILIC a SYNCRONIS jsou způsobeny kolísáním základní linie, na koloně BEH HILIC a BEH AMIDE koelucí (viz Obr. 45), a proto nebyly spočítány.

Tab. 96: Průměrná asymetrie píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
4-HBA	1,37	1,07	0,61	0,63	3,06
3-HBA	–	1,27	0,63	–	–
3,5-DHBA	–	–	1,25	–	2,18
2,4-DHBA	–	1,38	–	3,40	–



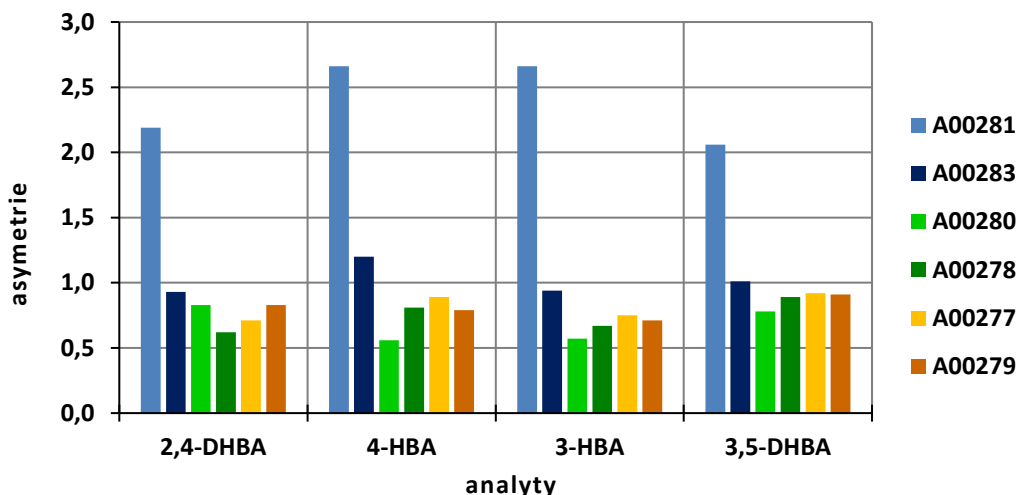
Obr. 87: Graf asymetrie píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.3.5.2 Hodnocení asymetrie píku při pH 6

Všechny testované fenolické kyseliny při pH 6 na koloně A00281 chvostují s asymetrií 2,06 až 2,66, jak lze pozorovat v Tab. 97 a na Obr. 88. Píky kyselin 2,4-DHBA a 3-HBA na všech ostatních kolonách frontují s asymetrií 0,57 až 0,94. 3,5-DHBA má na koloně A00283 symetrický pík (faktor symetrie 1,01). Na kolonách šarží P1328 a P1327 lze pozorovat frontující píky s asymetrií 0,56 až 0,92 všech testovaných fenolických kyselin (viz Obr. 46). Hodnoty asymetrie píků analytů na jednotlivých kolonách šarží P1328 a P1327 se v rámci šarže příliš neliší. Naopak výrazné rozdíly asymetrie mezi kolonami lze pozorovat v šarži P1329.

Tab. 97: Průměrná asymetrie píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
2,4-DHBA	2,19	0,93	0,83	0,62	0,71	0,83
4-HBA	2,66	1,20	0,56	0,81	0,89	0,79
3-HBA	2,66	0,94	0,57	0,67	0,75	0,71
3,5-DHBA	2,06	1,01	0,78	0,89	0,92	0,91

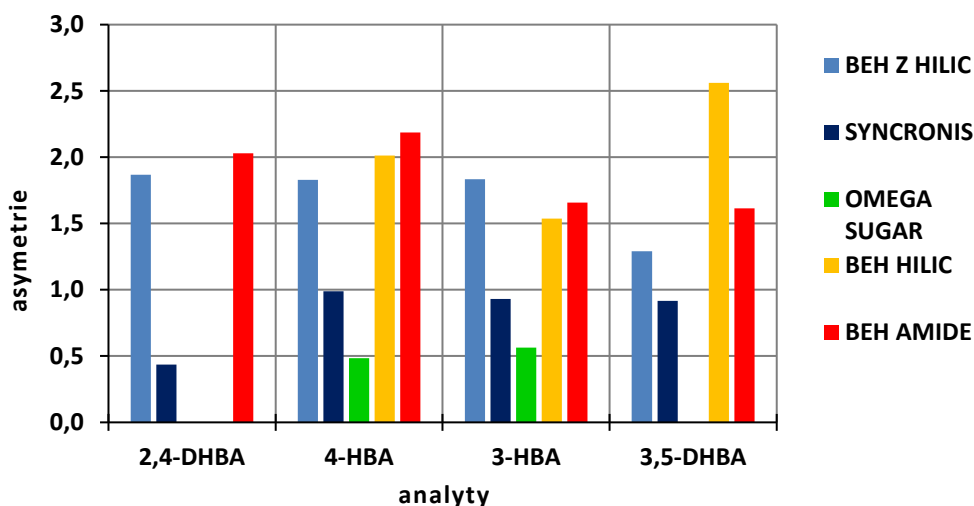


Obr. 88: Graf asymetrie píků fenolických kyselin na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných zwitteriontových kolon BEH Z HILIC a SYNCRONIS lze pozorovat výrazné rozdíly v asymetrii píků analytů, vyšší hodnoty mají analyty na koloně BEH Z HILIC (viz Tab. 98 a Obr. 89). Píky 4-HBA a 3-HBA na koloně OMEGA SUGAR frontují s asymetrií 0,49 a 0,57. Na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE lze pozorovat chvostování s asymetrií 1,54 až 2,56 u všech analytů (viz Obr. 48).

Tab. 98: Průměrná asymetrie píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
2,4-DHBA	1,87	0,44	–	–	2,03
4-HBA	1,83	0,99	0,49	2,01	2,19
3-HBA	1,83	0,93	0,57	1,54	1,66
3,5-DHBA	1,29	0,92	–	2,56	1,61



Obr. 89: Graf asymetrie píků fenolických kyselin na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.4 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky

Šířka píku v polovině jeho výšky byla hodnocena ze tří opakování. Výsledné hodnoty jsou průměrem těchto tří měření.

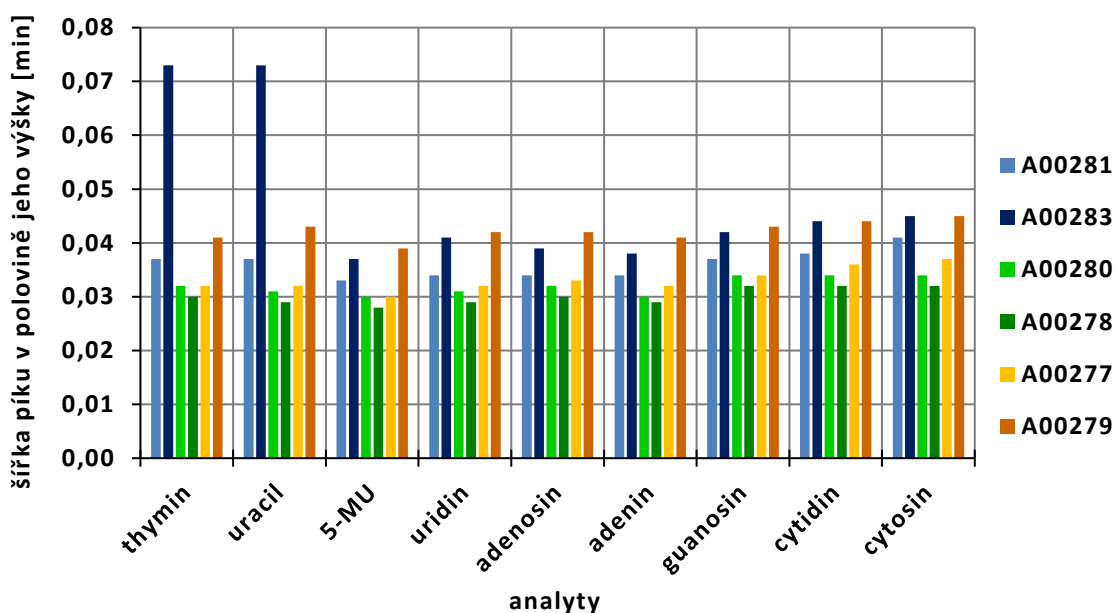
5.4.1 Nukleové baze a nukleosidy

5.4.1.1 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 3

Na kolonách Astra ZWIX mají obě kolony šarže P1328 srovnatelné šířky píků nukleových bazí a nukleosidů, jak uvádí Tab. 99 a Obr. 90. Analyty mají zároveň na těchto kolonách nejužší píky (0,028 min až 0,034 min) ve srovnání s kolonami ostatních šarží (0,030 min až 0,073 min). V šarži P1329 jsou píky analytů na koloně A00283 širší oproti píkům na koloně A00281. Obdobně je na tom šarže P1327, kde na koloně A00279 lze pozorovat širší píky oproti píkům na koloně A00277 (viz Obr. 10).

Tab. 99: Průměrná šířka píků [min] nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	0,037	0,073	0,032	0,030	0,032	0,041
uracil	0,037	0,073	0,031	0,029	0,032	0,043
5-methyluridin	0,033	0,037	0,030	0,028	0,030	0,039
uridin	0,034	0,041	0,031	0,029	0,032	0,042
adenosin	0,034	0,039	0,032	0,030	0,033	0,042
adenin	0,034	0,038	0,030	0,029	0,032	0,041
guanosin	0,037	0,042	0,034	0,032	0,034	0,043
cytidin	0,038	0,044	0,034	0,032	0,036	0,044
cytosin	0,041	0,045	0,034	0,032	0,037	0,045



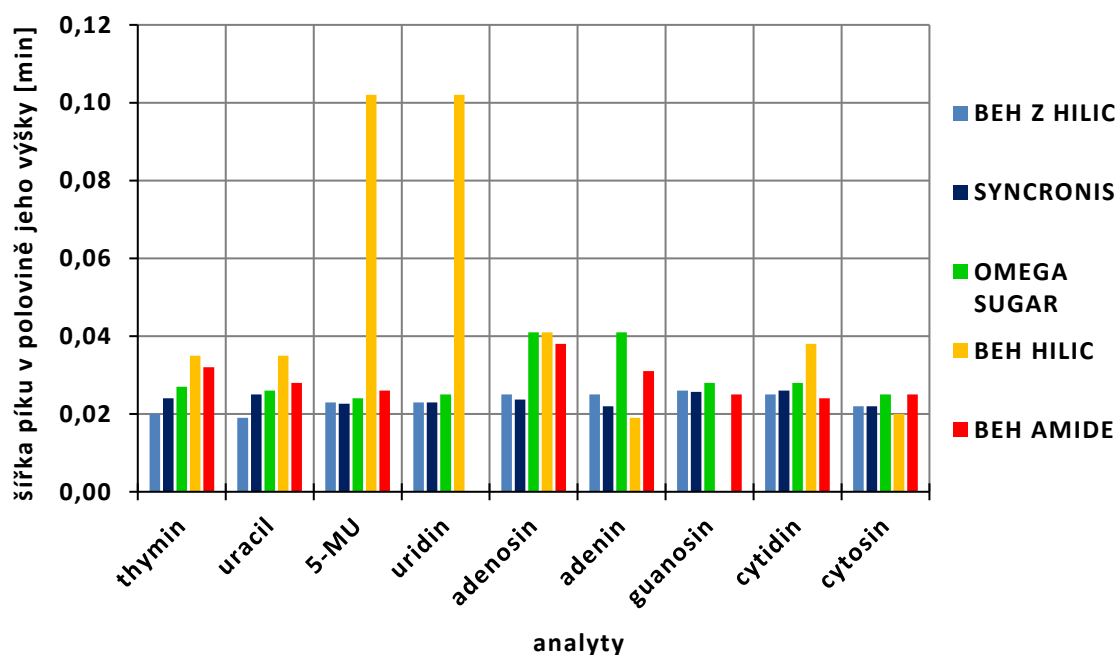
Obr. 90: Graf šířek píků nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS mají píky analytů téměř totožnou šířku píku, kromě thymínu a uracilu, které mají na koloně SYNCRONIS širší píky 0,024 min a 0,025 min (viz Tab. 100 a Obr. 91). Podobnou šířku píku jako na koloně SYNCRONIS mají analyty na koloně OMEGA SUGAR a BEH AMIDE, kromě adenosinu a adeninu, které mají na těchto kolonách píky širší (0,031 min až 0,041 min). Nejširší píky z komerčně dostupných kolon lze pozorovat na koloně BEH HILIC (0,020 min až 0,102 min), zvláště u 5-methyluridinu s uridinem (0,102 min), což je

způsobeno výrazným chvostováním tohoto píku (viz Obr. 12). Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,029 min až 0,045 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony užší píky (0,019 min až 0,026 min).

Tab. 100: Průměrná šířka píků [min] nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	0,020	0,024	0,027	0,035	0,032
uracil	0,019	0,025	0,026	0,035	0,028
5-methyluridin	0,023	0,023	0,024	0,102	0,026
uridin	0,023	0,023	0,025	0,102	–
adenosin	0,025	0,024	0,041	0,041	0,038
adenin	0,025	0,022	0,041	0,019	0,031
guanosin	0,026	0,026	0,028	–	0,025
cytidin	0,025	0,026	0,028	0,038	0,024
cytosin	0,022	0,022	0,025	0,020	0,025



Obr. 91: Graf šířek píků nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

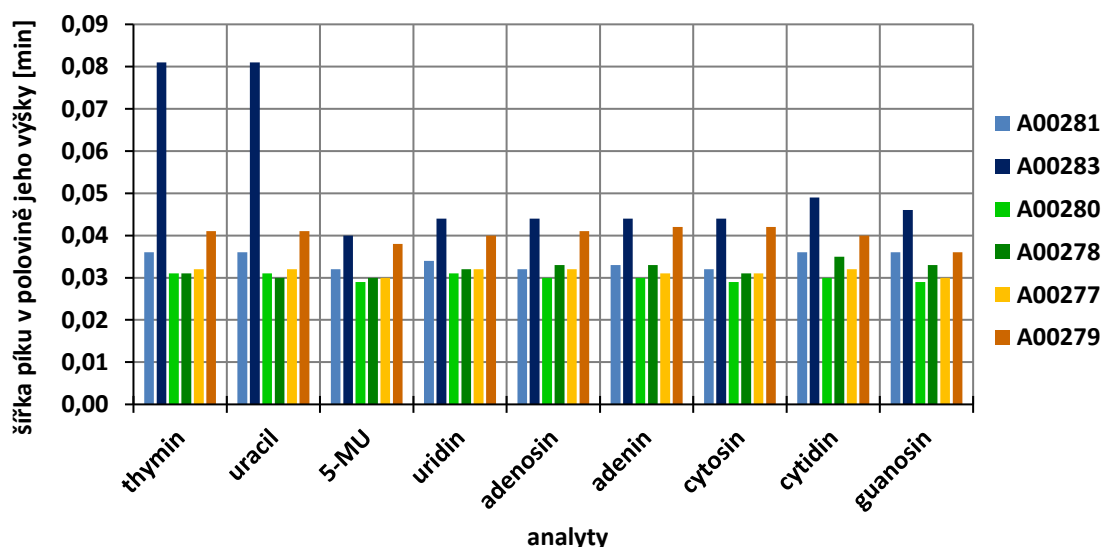
5.4.1.2 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 6

U kolon Astra ZWIX, jak je patrné z Tab. 101 a Obr. 92, jsou při pH 6 šířky píků nukleových bazí a nukleosidů na koloně A00280 (0,029 min až 0,031 min) téměř

totožné jako při pH 3, podobně i na kolonách A00278 a A00277 (0,030 min až 0,035 min). Šířky píků na koloně A00279 se pohybují kolem hodnoty 0,040 min. Píky jsou tedy širší než na dříve jmenovaných kolonách, ale u všech analytů testovaných na této koloně obdobné. Větší rozdíly v šířce píků v rámci jedné kolony lze pozorovat na koloně A00283 (viz Obr. 14), která má také nejširší píky nukleových bazí a nukleosidů při pH 6 (0,040 min až 0,081 min). Na kolonách šarže P1328 se šířky píku mezi kolonami podobají nejvíce ve srovnání s kolonami jiných šarží. Kolony této šarže mají též nejužší píky (0,029 min až 0,035 min).

Tab. 101: Průměrná šířka píků [min] nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
thymín	0,036	0,081	0,031	0,031	0,032	0,041
uracil	0,036	0,081	0,031	0,030	0,032	0,041
5-methyluridin	0,032	0,040	0,029	0,030	0,030	0,038
uridin	0,034	0,044	0,031	0,032	0,032	0,040
adenosin	0,032	0,044	0,030	0,033	0,032	0,041
adenin	0,033	0,044	0,030	0,033	0,031	0,042
cytosin	0,032	0,044	0,029	0,031	0,031	0,042
cytidin	0,036	0,049	0,030	0,035	0,032	0,040
guanosin	0,036	0,046	0,029	0,033	0,030	0,036

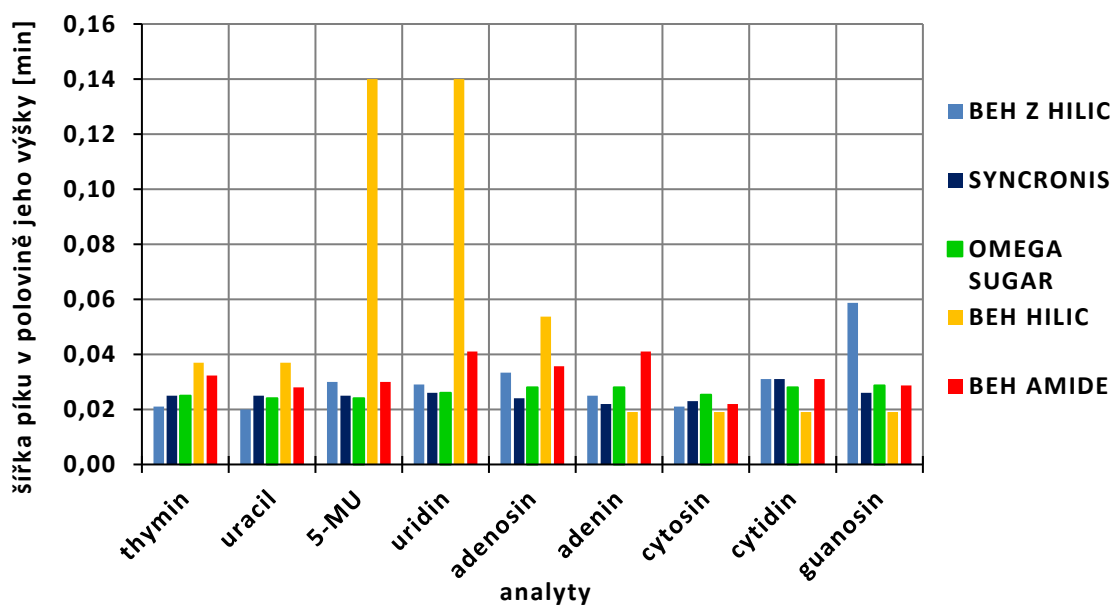


Obr. 92: Graf šířek píků nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách se podobají šířky píků na koloně SYNCRONIS a OMEGA SUGAR (0,023 min až 0,031 min), jak je uvedeno v Tab. 102 a na Obr. 93. Píky na koloně BEH Z HILIC se od těchto hodnot výrazněji liší jen u adenosinu a guanosinu (0,033 min a 0,059 min). Nejširší píky lze pozorovat u 5-methyluridinu s uridinem a adenosinu na koloně BEH HILIC (0,140 min a 0,054), viz Obr. 17. Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,029 min až 0,049 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony i při pH6 užší píky (0,020 min až 0,033 min).

Tab. 102: Průměrná šířka píků [min] nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
thymín	0,021	0,025	0,025	0,037	0,032
uracil	0,020	0,025	0,024	0,037	0,028
5-methyluridin	0,030	0,025	0,024	0,140	0,030
uridin	0,029	0,026	0,026	0,140	0,041
adenosin	0,033	0,024	0,028	0,054	0,036
adenin	0,025	0,022	0,028	0,019	0,041
cytosin	0,021	0,023	0,025	0,019	0,022
cytidin	0,031	0,031	0,028	0,019	0,031
guanosin	0,059	0,026	0,029	0,019	0,029



Obr. 93: Graf šířek píků nukleových bazí a nukleosidů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

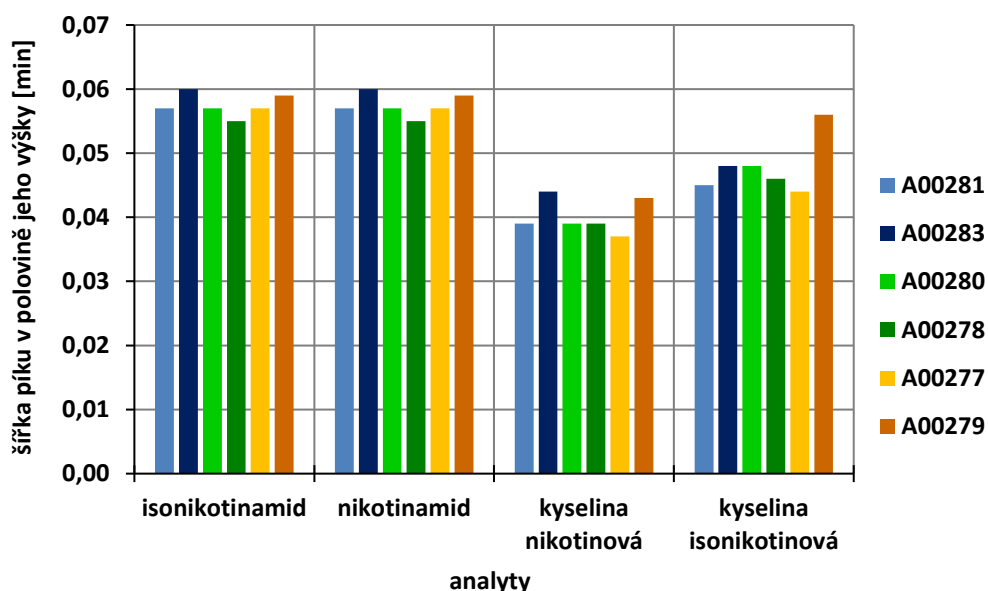
5.4.2 Deriváty kyseliny nikotinové

5.4.2.1 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 3

Šířky píků kyselin nikotinové a isonikotinové se na kolonách Astra ZWIX šarže P1328 při pH 3 téměř shodují (0,039 min, 0,046 min a 0,048 min), jak je uvedeno v Tab. 103 a na Obr. 94. U ostatních dvou šarží se již šířky těchto píků na jednotlivých kolonách mezi sebou mírně liší (0,037 min až 0,056 min). V šarži P1329 lze širší píky pozorovat na koloně A00283, v šarži P1327 na koloně A00279. Isonikotinamid a nikotinamid mají na všech kolonách obdobné hodnoty šířek píků (0,055 min až 0,060 min), nejvyšší jsou na koloně A00283 (viz Obr. 19).

Tab. 103. Průměrná šířka píků [min] derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	0,057	0,060	0,057	0,055	0,057	0,059
nikotinamid	0,057	0,060	0,057	0,055	0,057	0,059
nikotinová kyselina	0,039	0,044	0,039	0,039	0,037	0,043
isonikotinová kyselina	0,045	0,048	0,048	0,046	0,044	0,056

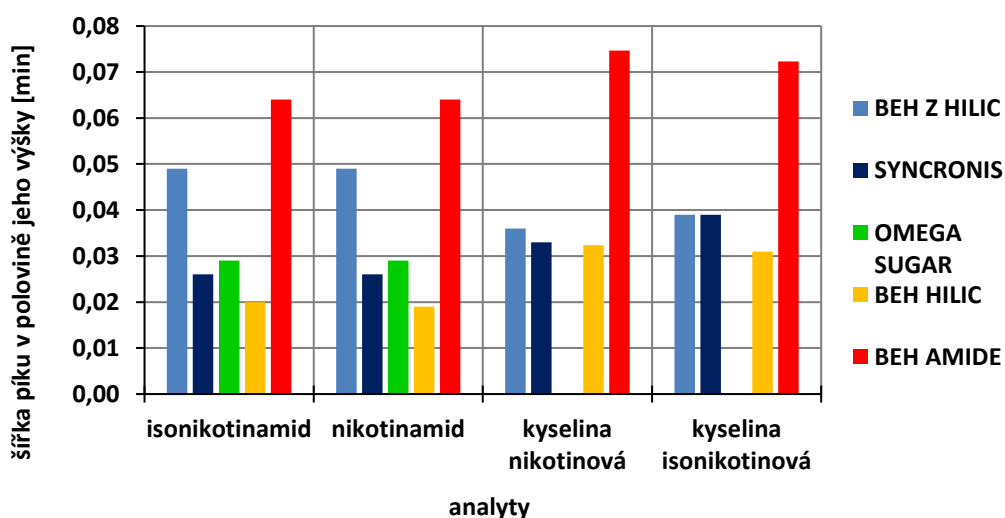


Obr. 94: Graf šířek píků derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitterionových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS se hodnoty šířek píku podobají jen u kyseliny nikotinové a isonikotinové (0,033 min až 0,039 min). U isonikotinamidu a nikotinamidu jsou na koloně BEH Z HILIC píky širší (viz Obr. 20). Nejužší píky mají analyty na koloně BEH HILIC (0,019 min až 0,032 min), naopak nejširší na koloně BEH AMIDE (0,064 min až 0,075 min). Hodnoty šířek píků jsou uvedeny v Tab. 104 a na Obr. 95. Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,037 min až 0,060 min, mají komerčně dostupné zwitterionové kolony užší píky (0,029 min až 0,049 min).

Tab. 104: Průměrná šířka píků [min] derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	0,049	0,026	0,029	0,020	0,064
nikotinamid	0,049	0,026	0,029	0,019	0,064
nikotinová kyselina	0,036	0,033	–	0,032	0,075
isonikotinová kyselina	0,039	0,039	–	0,031	0,072



Obr. 95: Graf šířek píků derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

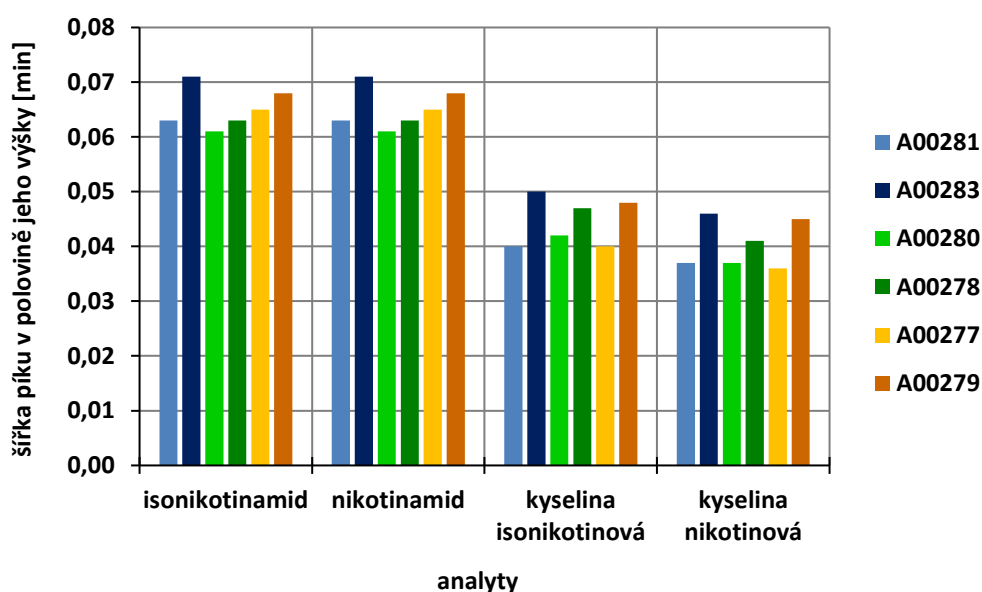
5.4.2.2 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 6

Při pH 6 lze na kolonách Astra ZWIX pozorovat vždy u jedné kolony z šarže širší píky těchto kyselin, a to u kolon A00283, A00278 a A00279. Jak uvádí Obr. 96 a Tab. 105, šířka píku kyseliny isonikotinové má na všech testovaných kolonách vyšší hodnotu než

šířka píku kyseliny nikotinové. Nejméně se liší šířky píků na kolonách šarže P1328 (viz Obr. 23).

Tab. 105: Průměrná šířka píků [min] derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
isonikotinamid	0,063	0,071	0,061	0,063	0,065	0,068
nikotinamid	0,063	0,071	0,061	0,063	0,065	0,068
isonikotinová kyselina	0,040	0,050	0,042	0,047	0,040	0,048
nikotinová kyselina	0,037	0,046	0,037	0,041	0,036	0,045

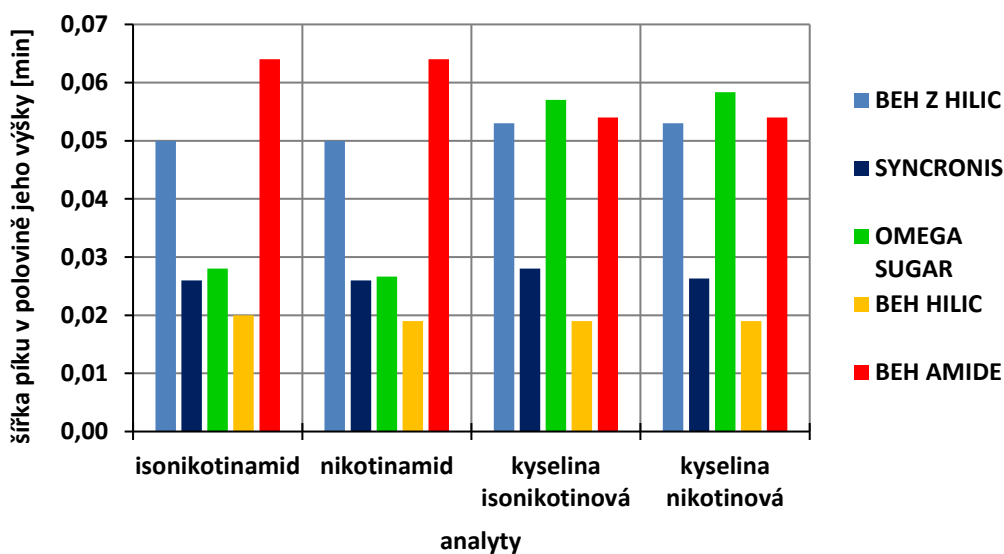


Obr. 96: Graf šířek píků derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných zwitteriontových kolon se hodnoty šířek píků velmi liší od 0,026 min do 0,053 min. Na koloně BEH Z HILIC jsou píky širší než na koloně SYNCRONIS (viz Obr. 25). Z ostatních komerčně dostupných kolon jsou všechny píky široké na koloně BEH AMIDE (0,054 min a 0,064 min) a píky kyselin isonikotinové a nikotinové též na koloně OMEGA SUGAR (0,057 min a 0,058 min). Nejužší píky mají analyty na koloně BEH HILIC (0,019 min a 0,020 min), jak je uvedeno v Tab. 106 a na Obr. 97. Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,036 min až 0,071 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony i při pH6 užší píky (0,026 min až 0,053 min).

Tab. 106: Průměrná šířka píků [min] derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
isonikotinamid	0,050	0,026	0,028	0,020	0,064
nikotinamid	0,050	0,026	0,027	0,019	0,064
isonikotinová kyselina	0,053	0,028	0,057	0,019	0,054
nikotinová kyselina	0,053	0,026	0,058	0,019	0,054



Obr. 97: Graf šířek píků derivátů kyseliny nikotinové v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.4.3 Hydrofilní vitamíny

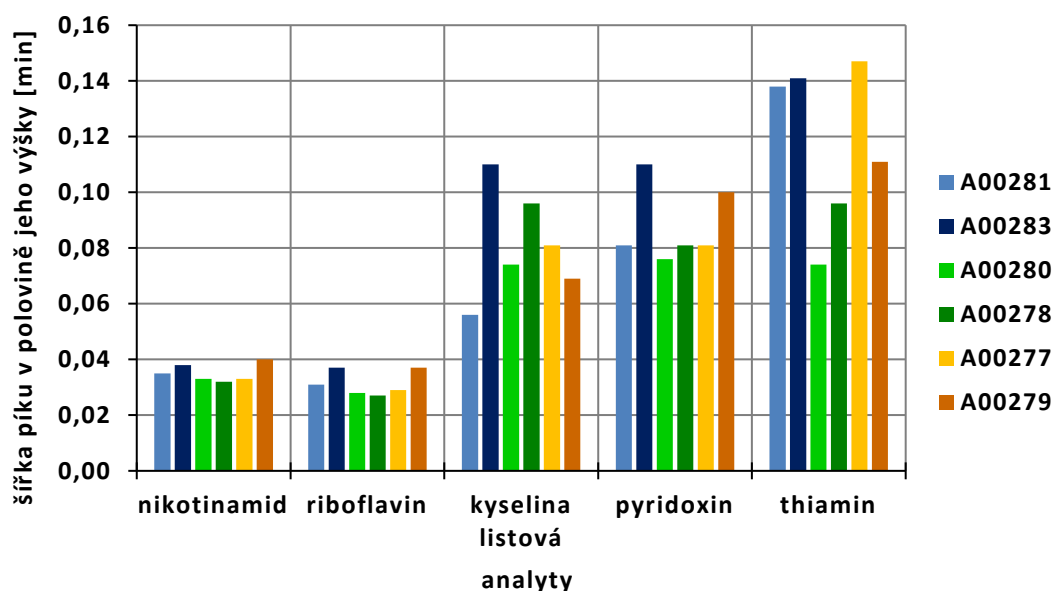
5.4.3.1 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 3

U hydrofilních vitamínů při pH 3 lze pozorovat nejširší pík u thiaminu (0,074 min až 0,0141 min), dále u pyridoxinu (0,076 min až 0,110 min) a kyseliny listové (0,056 min až 0,110 min). Naopak úzké píky (0,027 min až 0,040 min) vykazují nikotinamid a riboflavin, jejich hodnoty jsou srovnatelné na všech kolonách. Pyridoxin vykazuje srovnatelnou šířku píku (0,076 min až 0,081 min) na kolonách A00281, A00277 a na kolonách šarže P1328, jak je zřejmé z Tab. 107 a Obr. 98. Kyselina listová má nejužší pík (0,051 min) na koloně A00281, naopak nejširší pík (0,110 min) na koloně stejné šarže, a to A00283 (viz Obr. 26). Kolona A00283 vykazuje při pH 3 nejširší píky všech testovaných hydrofilních vitamínů (0,037 min až 0,141 min). Hodnoty šířek píků se na

kolonách šarže P1328 podobají nejvíce ve srovnání s kolonami jiných šarží. Liší se pouze u píku kyseliny listové a thiaminu.

Tab. 107: Průměrná šířka píků [min] hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	0,035	0,038	0,033	0,032	0,033	0,040
riboflavin	0,031	0,037	0,028	0,027	0,029	0,037
kyselina listová	0,056	0,110	0,074	0,096	0,081	0,069
pyridoxin	0,081	0,110	0,076	0,081	0,081	0,100
thiamin	0,138	0,141	0,074	0,096	0,147	0,111



Obr. 98: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

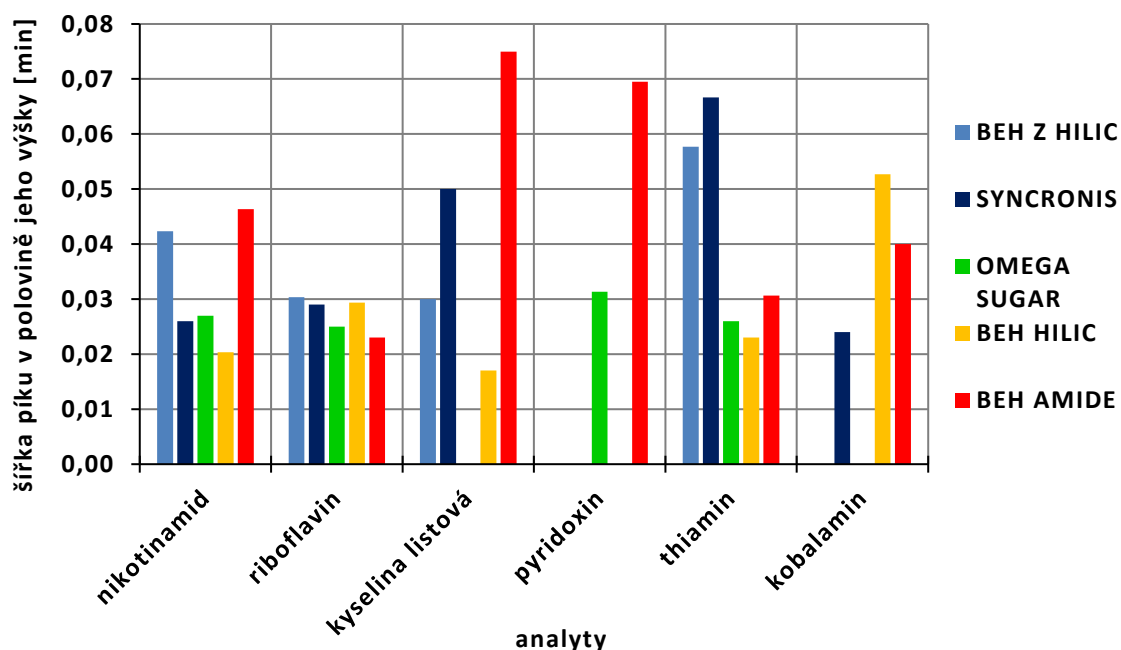
(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách lze nejširší píky pozorovat u kyseliny listové na koloně SYNCRONIS a BEH AMIDE (0,050 min a 0,075 min), u pyridoxinu na koloně BEH AMIDE (0,070 min) a u thiaminu na koloně BEH Z HILIC a SYNCRONIS (0,058 min a 0,067 min). Nejužší píky (0,017 min až 0,023 min) naopak vykazuje kolona BEH HILIC u všech analytů kromě kobalaminu, který má na této koloně nejširší pík (0,053 min), a u riboflavinu (0,029 min). Široké píky (0,042 min a 0,046 min) má nikotinamid na koloně BEH Z HILIC a BEH AMIDE, jak je uvedeno v Tab. 108 a na Obr. 99. Chybějící

hodnoty šířek píku jsou u analytů, jež nejsou na daných kolonách eluovány (viz Obr. 29). Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,027 min až 0,141 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony užší píky (0,024 min až 0,067 min).

Tab. 108: Průměrná šířka píků [min] hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	0,042	0,026	0,027	0,020	0,046
riboflavin	0,030	0,029	0,025	0,029	0,023
kyselina listová	0,030	0,050	–	0,017	0,075
pyridoxin	–	–	0,031	–	0,070
thiamin	0,058	0,067	0,026	0,023	0,031
kobalmin	–	0,024	–	0,053	0,040



Obr. 99: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

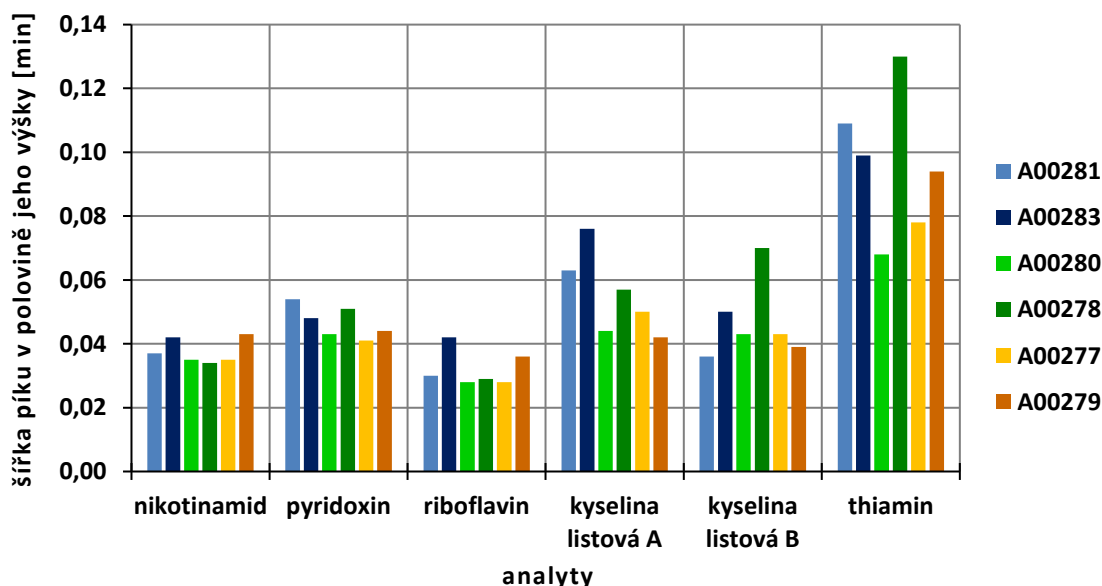
5.4.3.2 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 6

U hydrofilních vitamínů při pH 6 vykazuje nejširší pík thiamin (0,068 min až 0,130 min) na všech kolonách Astra ZWIX (viz Obr. 31). Jak je zřejmé z Tab. 109 a z Obr. 100, nejužší pík na všech testovaných kolonách má při pH 6 riboflavin (0,028 min až 0,036 min), a poté nikotinamid (0,034 min až 0,043 min). Téměř totožnou šířku píku mají tyto analyty na kolonách šarže P1328, u ostatních analytů se již tyto kolony mezi sebou liší,

nejvýrazněji u thiaminu. Podobnou šířku píku (0,039 min až 0,044 min) mají též pyridoxin a kyselina listová B na kolonách šarže P1327.

Tab. 109: Průměrná šířka píků [min] hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
nikotinamid	0,037	0,042	0,035	0,034	0,035	0,043
pyridoxin	0,054	0,048	0,043	0,051	0,041	0,044
riboflavin	0,030	0,042	0,028	0,029	0,028	0,036
kyselina listová A	0,063	0,076	0,044	0,057	0,050	0,042
kyselina listová B	0,036	0,050	0,043	0,070	0,043	0,039
thiamin	0,109	0,099	0,068	0,130	0,078	0,094



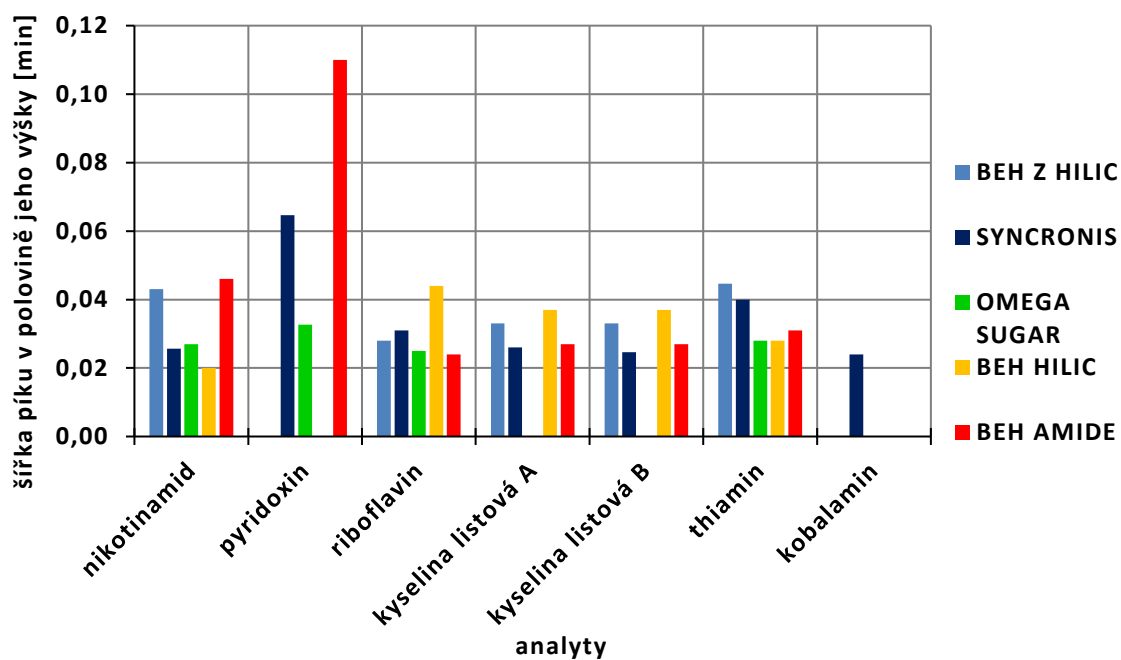
Obr. 100: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách má nejširší pík pyridoxin na koloně SYNCRONIS a BEH AMIDE (0,065 min a 0,110 min), jak je zřejmé z Tab. 110 a Obr. 101. Úzké píky vykazují analyty na koloně OMEGA SUGAR (0,025 min až 0,033 min), nejužší pík má však nikotinamid na koloně BEH HILIC (0,020 min). Ze zwitteriontových komerčně dostupných kolon mají analyty širší píky na koloně BEH Z HILIC (0,033 min až 0,045 min), kromě riboflavinu, který má na této koloně pík mírně užší (0,028 min) ve srovnání s píkem na koloně SYNCRONIS (0,031 min). Píky analytů na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách jsou užší (0,024 min až 0,065 min) oproti píkům na kolonách

Astra ZWIX (0,028 min až 0,130 min). Chybějící hodnoty šířek píku jsou u analytů, jež nejsou na daných kolonách eluovány (viz Obr. 32).

Tab. 110: Průměrná šířka píků [min] hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
nikotinamid	0,043	0,026	0,027	0,020	0,046
pyridoxin	–	0,065	0,033	–	0,110
riboflavin	0,028	0,031	0,025	0,044	0,024
kyselina listová A	0,033	0,026	–	0,037	0,027
kyselina listová B	0,033	0,025	–	0,037	0,027
thiamin	0,045	0,040	0,028	0,028	0,031
kobalamin	–	0,024	–	–	–



Obr. 101: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.4.4 Betablokátory

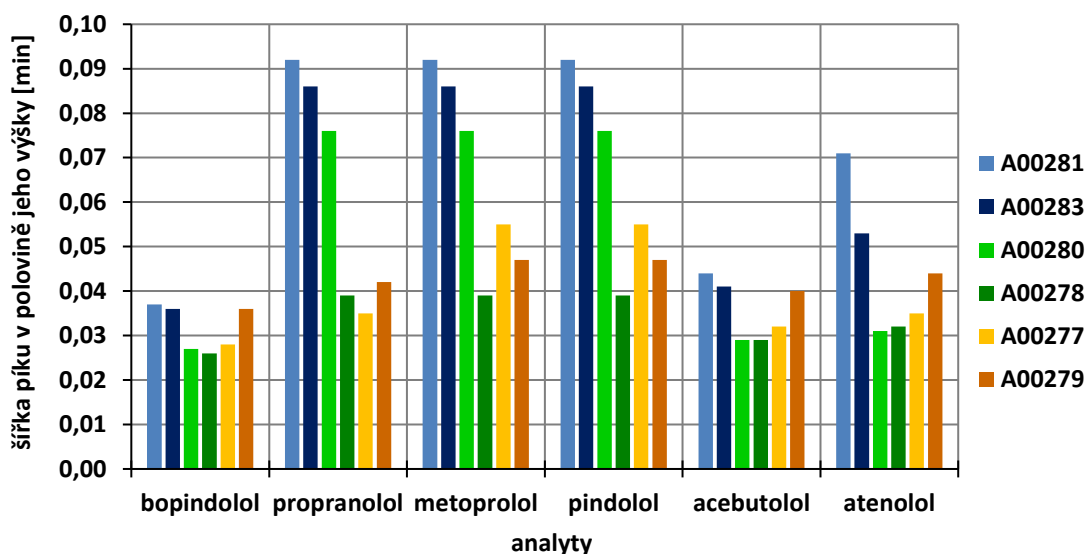
5.4.4.1 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 3

Nejužší píky (0,026 min až 0,037 min) na kolonách Astra ZWIX vykazuje bopindolol, a to zvláště na kolonách šarže P1328 a na koloně A00277 (0,026 min až 0,028 min). Na stejných kolonách lze pozorovat i úzké píky acebutololu (0,029 min až 0,032 min).

Atenolol má na kolonách šarží P1328 a P1327 úzké píky (0,031 min až 0,035 min), zatímco na kolonách šarže P1329 lze pozorovat píky širší (0,053 min a 0,071 min). Píky ostatních BB, jež koeluují (viz Obr. 34), jsou na většině kolon široké (0,047 min až 0,092 min), pouze na koloně A00278 jsou užší (0,039 min). Hodnoty šířky píků BB při pH 3 jsou uvedeny v Tab. 111 a zobrazeny na Obr. 102.

Tab. 111: Průměrná šířka píků [min] betablokátorů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	0,037	0,036	0,027	0,026	0,028	0,036
propranolol	0,092	0,086	0,076	0,039	0,035	0,042
metoprolol	0,092	0,086	0,076	0,039	0,055	0,047
pindolol	0,092	0,086	0,076	0,039	0,055	0,047
acebutolol	0,044	0,041	0,029	0,029	0,032	0,040
atenolol	0,071	0,053	0,031	0,032	0,035	0,044



Obr. 102: Graf šířek píků betablokátorů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

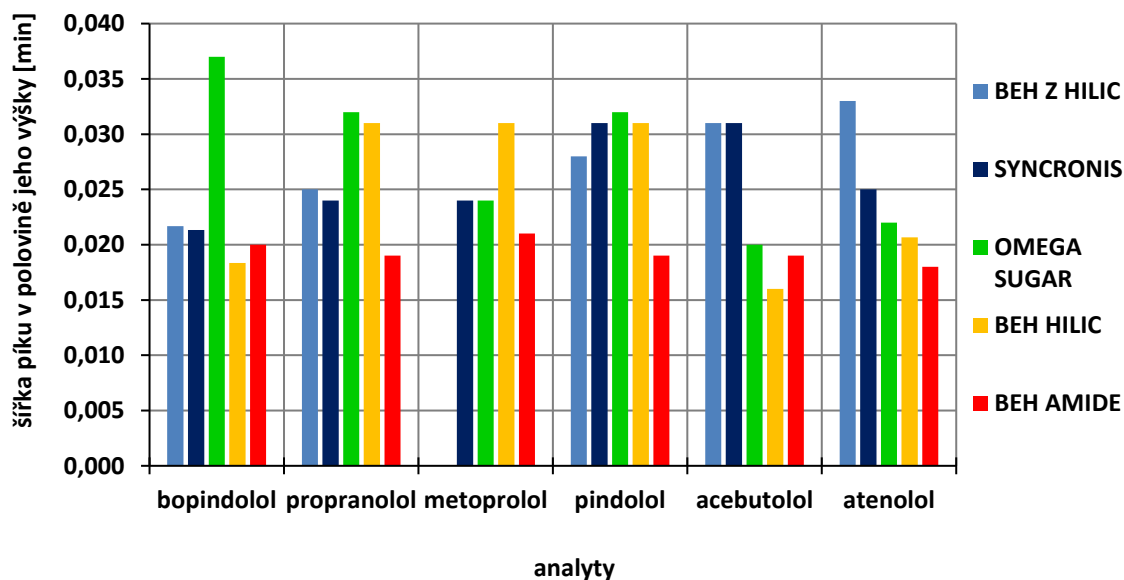
(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS lze pozorovat podobnou šířku píku u bopindololu (0,021 min a 0,022 min), propranololu (0,025 min a 0,024 min) a acebutololu (0,031 min). Pindolol má mírně širší pík na koloně SYNCRONIS (0,031 min), atenolol naopak na koloně BEH Z HILIC (0,035 min).

Téměř stejnou šířku píku lze pozorovat i u propranololu a pindololu na kolonách OMEGA SUGAR a BEH HILIC (0,032 min a 0,031 min). Nejužší píky vykazuje kolona BEH AMIDE u propranololu, metoprololu, pindololu a atenololu (0,018 min až 0,021 min), jak je uvedeno v Tab. 112 a na Obr. 103. Oproti kolonám Astra ZWIX (0,026 min až 0,092 min) mají píky na komerčně dostupných zwitteriontových kolonách užší píky (0,021 min až 0,033 min). U metoprololu na koloně BEH Z HILIC hodnota šířky píku chybí, neboť tento analyt není na dané koloně eluován (viz Obr. 37).

Tab. 112: Průměrná šířka píků [min] betablokátorů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	0,022	0,021	0,037	0,018	0,020
propranolol	0,025	0,024	0,032	0,031	0,019
metoprolol	–	0,024	0,024	0,031	0,021
pindolol	0,028	0,031	0,032	0,031	0,019
acebutolol	0,031	0,031	0,020	0,016	0,019
atenolol	0,033	0,025	0,022	0,021	0,018



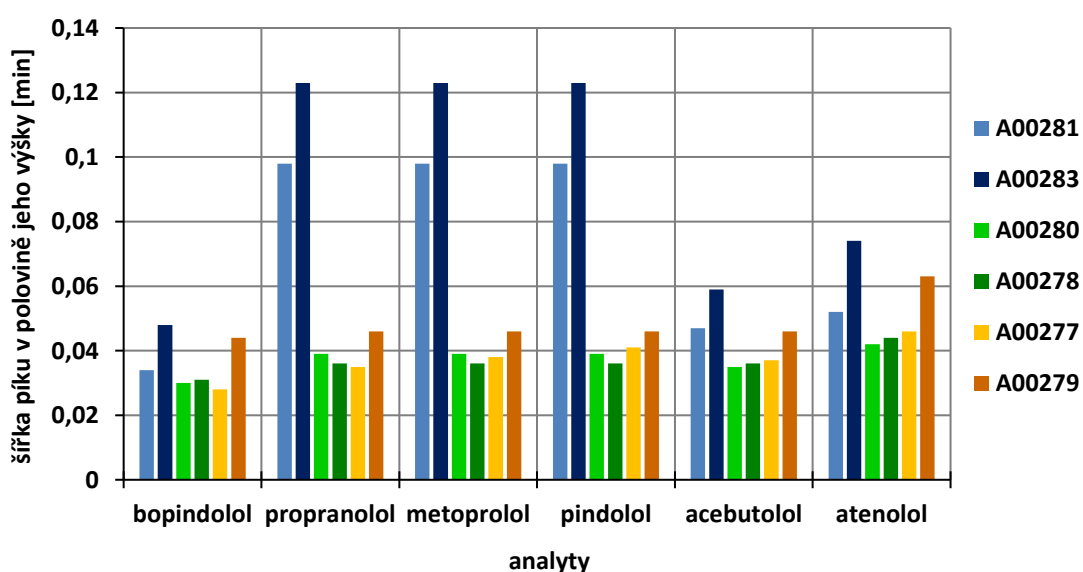
Obr. 103: Graf šířek píků betablokátorů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.4.4.2 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 6

Úzké píky (0,028 min až 0,048 min) lze na kolonách Astra ZWIX opět pozorovat u bopindololu, a to zvláště na kolonách šarže P1328 a na koloně A00277 (0,028 min až 0,031 min). Na stejných kolonách má úzké píky acebutolol (0,035 min až 0,037 min) a ve srovnání s ostatními kolonami (0,052 min až 0,074 min) i atenolol (0,042 min až 0,046). Ostatní BB mají nejužší píky na kolonách šarže P1328 (0,036 min a 0,039 min) a nejširší na kolonách šarže P1329 (0,098 min a 0,123 min). Kolona A00283 má ve srovnání s ostatními kolonami nejširší všechny píky BB (0,048 min až 0,123 min), jak je vidět v Tab. 113 a na Obr. 104. Kolony šarže P1328 mají velmi podobné šířky píků, oproti tomu kolony ostatních šarží se mezi sebou liší (viz Obr. 39). Nejvyšší rozdíly šířek píků analytů mají kolony A00281 a A00283.

Tab. 113: Průměrná šířka píků [min] betablokátorů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
bopindolol	0,034	0,048	0,030	0,031	0,028	0,044
propranolol	0,098	0,123	0,039	0,036	0,035	0,046
metoprolol	0,098	0,123	0,039	0,036	0,038	0,046
pindolol	0,098	0,123	0,039	0,036	0,041	0,046
acebutolol	0,047	0,059	0,035	0,036	0,037	0,046
atenolol	0,052	0,074	0,042	0,044	0,046	0,063



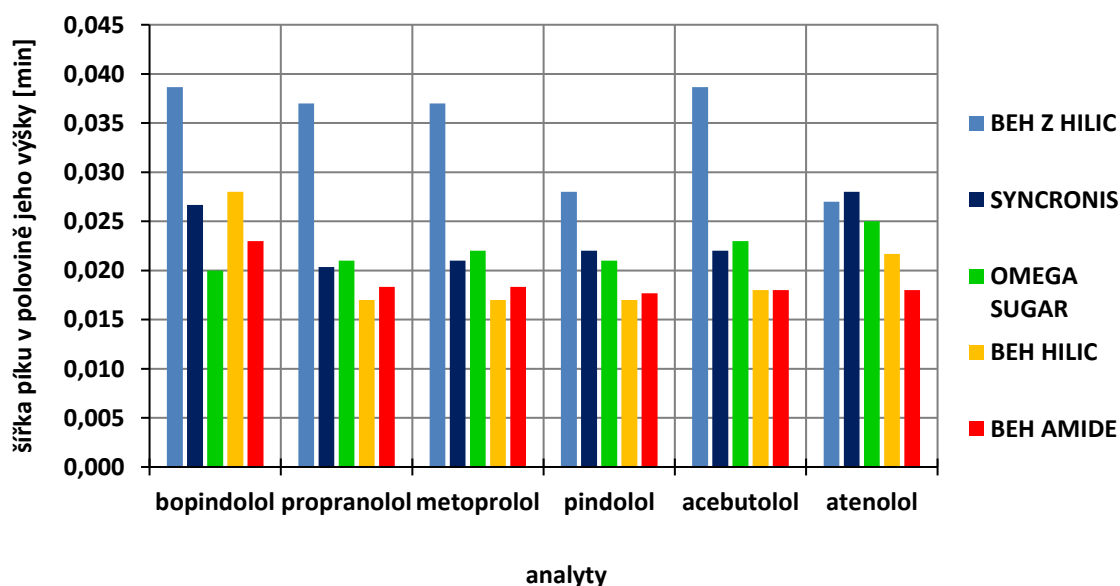
Obr. 104: Graf šířek píků betablokátorů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6

(modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

U komerčně dostupných zwitteriontových kolon se při pH 6 velmi liší šířky píků všech analytů (viz Obr. 40), kromě atenololu, který má na obou kolonách téměř totožnou šířku píku (0,027 min a 0,028 min). Ostatní analyty mají širší píky na koloně BEH Z HILIC (0,028 min až 0,039 min). Téměř stejnou šířku píku mají propranolol, metoprolol, pindolol a acebutolol na kolonách BEH HILIC a BEH AMIDE (0,017 min a 0,018 min). Hodnoty šířek píků BB na komerčně dostupných kolonách při pH 6 jsou uvedeny v Tab. 114 a na Obr. 105. Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,028 min až 0,123 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony užší píky (0,020 min až 0,039 min).

Tab. 114: Průměrná šířka píků [min] betablokátorů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
bopindolol	0,039	0,027	0,020	0,028	0,023
propranolol	0,037	0,020	0,021	0,017	0,018
metoprolol	0,037	0,021	0,022	0,017	0,018
pindolol	0,028	0,022	0,021	0,017	0,018
acebutolol	0,039	0,022	0,023	0,018	0,018
atenolol	0,027	0,028	0,025	0,022	0,018



Obr. 105: Graf šířek píků betablokátorů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

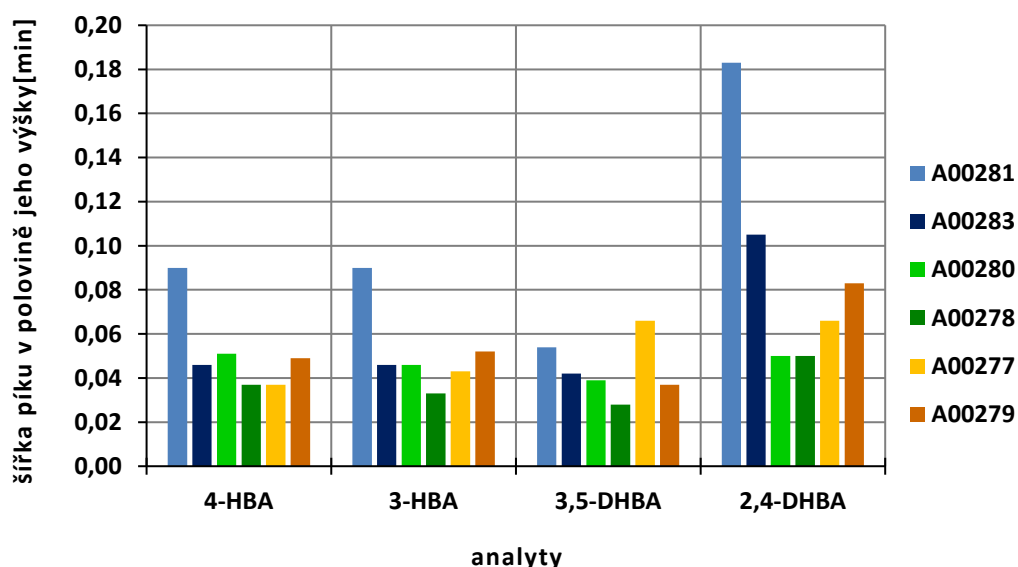
5.4.5 Fenolické kyseliny

5.4.5.1 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 3

Široké píky fenolických kyselin při pH 3 lze pozorovat na koloně A00281 (0,054 min až 0,183 min), a to především u 2,4-DHBA (viz Obr. 42). Na ostatních kolonách vykazují analyty užší píky (0,028 min až 0,083 min), jak je zřejmé z Tab. 115 a Obr. 106. Nejširší (0,050 min až 0,183 min) je vždy pík 2,4-DHBA. Na koloně A00277 má vysoké hodnoty (0,066 min) i 3,5-DHBA, a to kvůli plné koeluci s 2,4-DHBA. Na koloně A00281 má ze stejného důvodu vysoké hodnoty (0,090 min) 4-HBA s 3-HBA. Nejužší píky testovaných fenolických kyselin lze pozorovat na koloně A00278 (0,028 min až 0,050 min).

Tab. 115: Průměrná šířka píků [min] fenolických kyselin v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
4-HBA	0,090	0,046	0,051	0,037	0,037	0,049
3-HBA	0,090	0,046	0,046	0,033	0,043	0,052
3,5-DHBA	0,054	0,042	0,039	0,028	0,066	0,037
2,4-DHBA	0,183	0,105	0,050	0,050	0,066	0,083

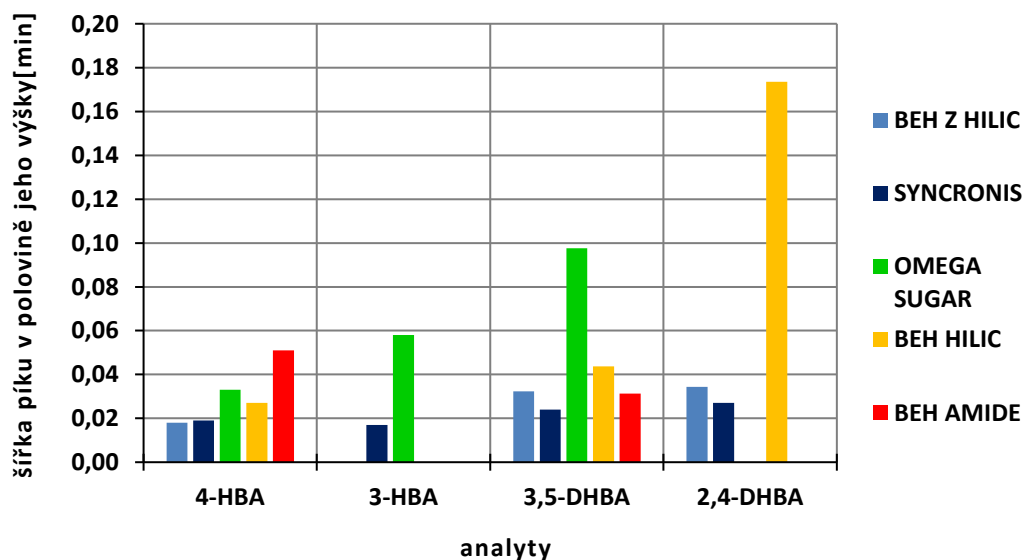


Obr. 106: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 3 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách vykazuje široké píky 3-HBA a 3,5-DHBA na koloně OMEGA SUGAR (0,058 min a 0,098 min) a velmi široký pík 2,4-DHBA na koloně BEH HILIC (0,174 min). Šířka píku 4-HBA je na kolonách BEH Z HILIC a SYNCRONIS téměř totožná (0,018 min a 0,019 min). Úzké píky má kolona SYNCRONIS i u ostatních analytů (0,017 min až 0,027 min), jak je vidět v Tab. 116 a na Obr. 107. Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,028 min až 0,183 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony užší píky (0,017 min až 0,034 min). Chybějící hodnota u 3-HBA na koloně BEH HILIC je způsobena koelucí tohoto analytu s 4-HBA, proto nebyla spočítána. Ostatní chybějící hodnoty jsou u analytů, jež nejsou na daných kolonách eluovány (viz Obr. 45).

Tab. 116: Průměrná šířka píků [min] fenolických kyselin v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
4-HBA	0,018	0,019	0,033	0,027	0,051
3-HBA	–	0,017	0,058	–	–
3,5-DHBA	0,032	0,024	0,098	0,044	0,031
2,4-DHBA	0,034	0,027	–	0,174	–



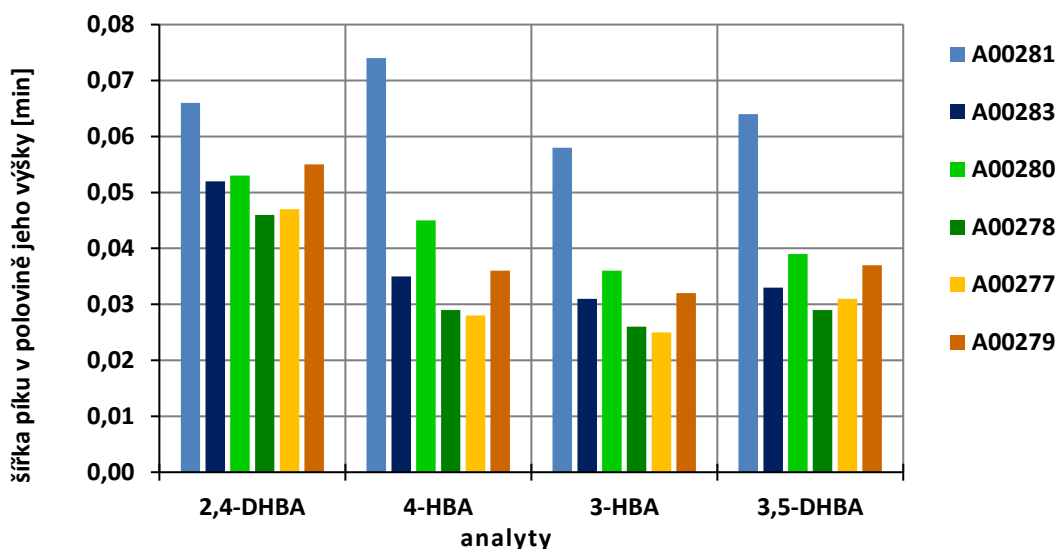
Obr. 107: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 3

5.4.5.2 Hodnocení šířky píku v polovině jeho výšky při pH 6

Při pH 6 vykazuje nejširší píky (0,058 min až 0,074 min) kolona A00281 (viz Obr. 46). Na ostatních kolonách je nejširší pík 2,4-DHBA (0,046 min až 0,055 min), na koloně A00280 je široký i pík 4-HBA (0,045 min). Nejnížší hodnoty šířky píku vykazuje na všech kolonách 3-HBA (0,025 min až 0,058 min), jak lze pozorovat v Tab. 117 a na Obr. 108. Hodnoty šířek píků se mezi kolonami v rámci šarže liší. Nejvíce se mezi sebou liší kolony šarže P1329, nejméně kolony šarže P1327.

Tab. 117: Průměrná šířka píků [min] fenolických kyselin v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6

analyt	A00281	A00283	A00280	A00278	A00277	A00279
2,4-DHBA	0,066	0,052	0,053	0,046	0,047	0,055
4-HBA	0,074	0,035	0,045	0,029	0,028	0,036
3-HBA	0,058	0,031	0,036	0,026	0,025	0,032
3,5-DHBA	0,064	0,033	0,039	0,029	0,031	0,037



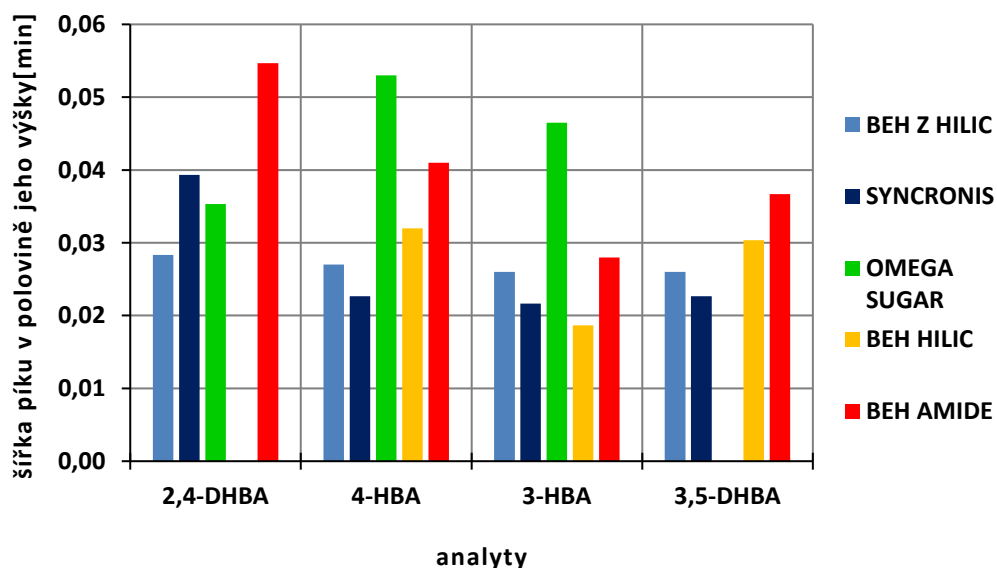
Obr. 108: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na kolonách Astra ZWIX při pH 6 (modře šarže P1329, zeleně šarže P1328, žlutohnědě šarže P1327)

Na komerčně dostupných kolonách při pH 6 má nejširší pík 2,4-DHBA na koloně BEH AMIDE (0,055 min), 4-HBA a 3-HBA na koloně OMEGA SUGAR (0,053 min a 0,047 min), 3,5-DHBA na koloně BEH AMIDE (0,037 min), jak je uvedeno v Tab. 118 a na Obr. 109. Zwitteriontové kolony BEH Z HILIC a SYNCRONIS se mezi sebou mírně liší. Širší píky mají analyty na koloně BEH Z HILIC (0,026 min a 0,027 min), kromě 2,4-DHBA, jež má širší

pík na koloně SYNCRONIS (0,039 min). Oproti kolonám Astra ZWIX, jež mají šířky píků 0,025 min až 0,074 min, mají komerčně dostupné zwitteriontové kolony užší píky (0,022 min až 0,039 min). Chybějící hodnoty šířek píků jsou u analytů, jež nebyly na daných kolonách eluovány (viz Obr. 48).

Tab. 118: Průměrná šířka píků [min] fenolických kyselin v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

analyt	BEH Z HILIC	SYNCRONIS	OMEGA SUGAR	BEH HILIC	BEH AMIDE
2,4-DHBA	0,028	0,039	0,035	–	0,055
4-HBA	0,027	0,023	0,053	0,032	0,041
3-HBA	0,026	0,022	0,047	0,019	0,028
3,5-DHBA	0,026	0,023	–	0,030	0,037



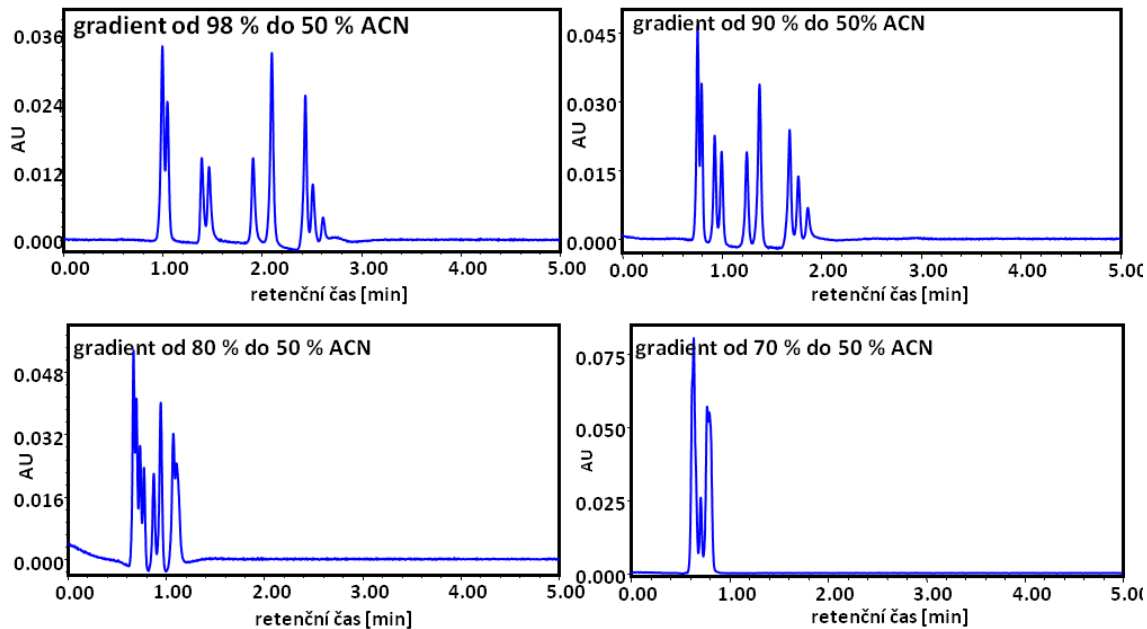
Obr. 109: Graf šířek píků hydrofilních vitamínů v polovině výšky píku na komerčně dostupných kolonách při pH 6

5.5 Optimalizace chromatografických podmínek

5.5.1 Změna gradientu

5.5.1.1 Nukleové baze a nukleosidy

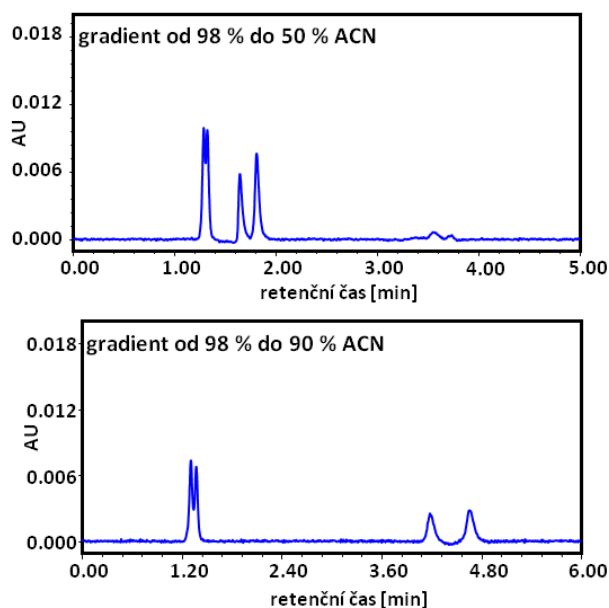
Cílem optimalizace bylo separovat thymin s uracilem a 5-methyluridin s uridinem. Nukleové baze se nejlépe separovaly za výchozích podmínek (gradient od 98 % ACN do 50 % ACN). Při gradientu od 98 % ACN nedošlo téměř k žádné změně v separaci. Při gradientu od 90 % ACN došlo k mírnému zhoršení separace. Při pH 5 koeluovaly cytosin, cytidin a guanosin, při pH 4 koeluoval cytosin s cytidinem. Při gradientu od 80 % ACN za všech hodnot pH je patrná koeluce thyminu s uracilem, 5-methyluridinem s uridinem, a dále koeluce adenosinu s adeninem a cytosinu s cytidinem a guanosinem. K ještě většímu zhoršení došlo při gradientu od 70 % ACN. Jako příklad uvádím chromatogramy nukleových bazí a nukleosidů při pH 6 při proměnlivém počátečním složení MF a při koncovém složení 50 % ACN (viz Obr. 110), neboť změnou koncového složení gradientu došlo pouze ke změně separace později eluovaných píků.



Obr. 110: Chromatogramy optimalizace gradientu nukleových bazí a nukleosidů při pH 6

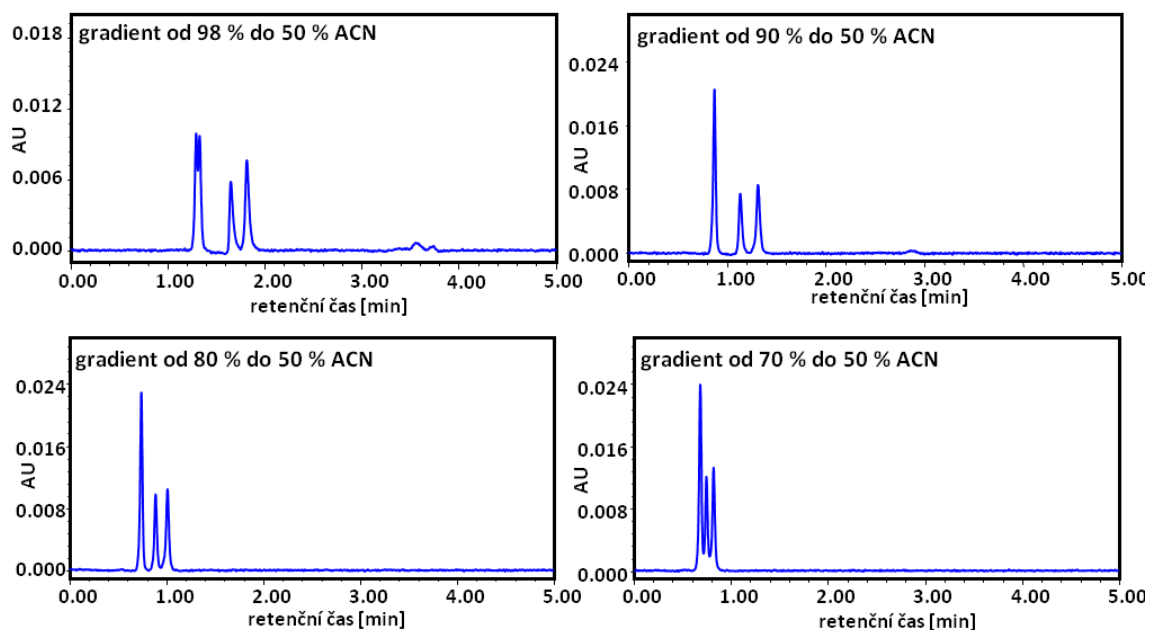
5.5.1.2 Deriváty kyseliny nikotinové

Cílem optimalizace gradientu nikotinů bylo rozdělit isonikotinamid a nikotinamid. Deriváty kyseliny nikotinové se nejlépe separovaly za výchozích podmínek (gradient od 98 % ACN do 50 % ACN). Při gradientu od 98 % ACN, jak se postupně gradient stával méně strmý, zůstávaly isonikotinamid a nikotinamid téměř beze změny, kromě gradientu od 98 % do 90 %, kde došlo k mírnému zlepšení separace těchto dvou píků (viz Obr. 111). Zhoršil se však tvar píků kyseliny isonikotinové a nikotinové.



Obr. 111: Chromatogramy optimalizace gradientu MF u derivátů kyseliny nikotinové při pH 3 při počátečním složení MF 98 % ACN

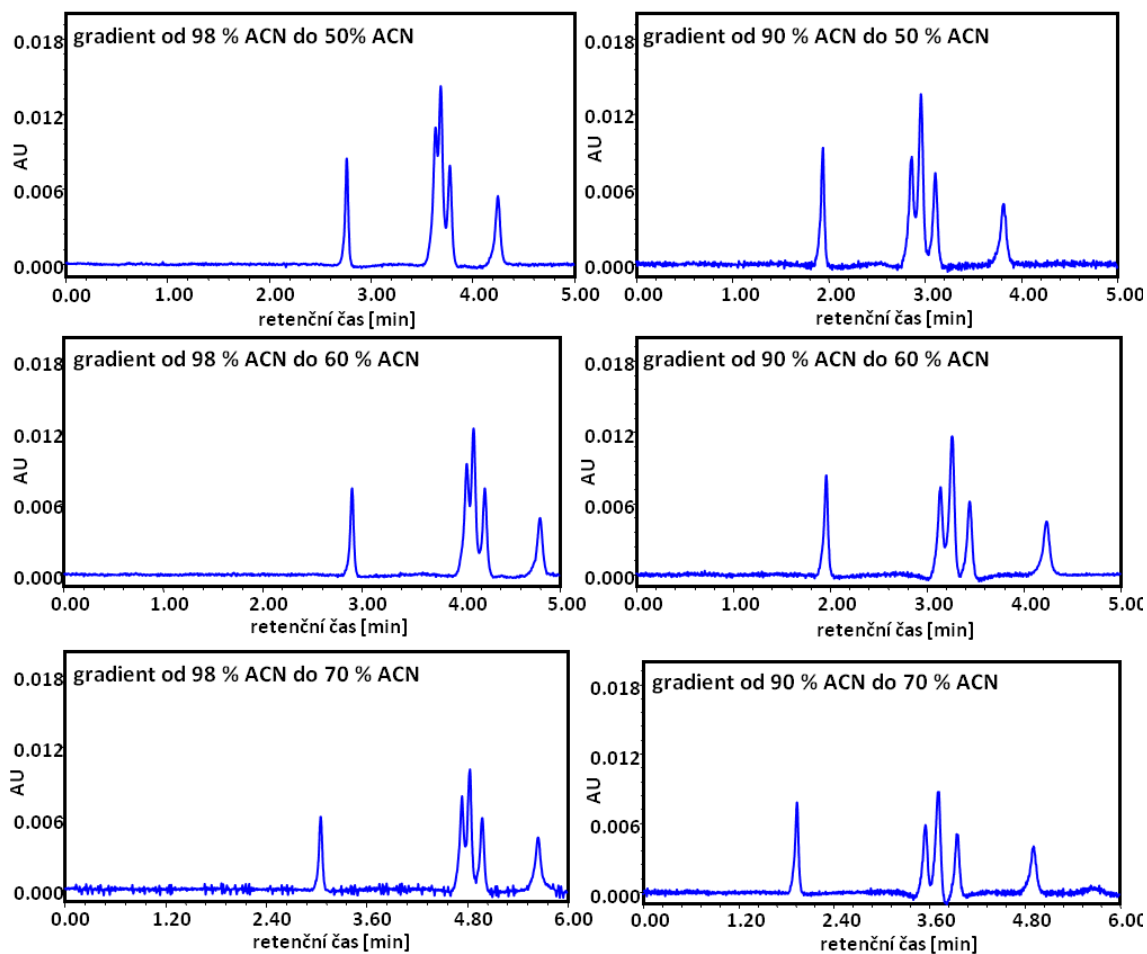
Při gradientu od 90 % ACN koeluovaly isonikotinamid a nikotinamid úplně, nedošlo ani k částečné separaci. Při gradientu od 80 % ACN i při gradientu od 70 % ACN při pH 6 a pH 5 došlo k částečné koeluci všech zkoumaných derivátů kyseliny nikotinové, při pH 4 jsou dva píky (úplná koeluce isonikotinamidu s nikotinamidem a kyseliny isonikotinové s kyselinou nikotinovou), při pH 3 tři píky (úplná koeluce isonikotinamidu s nikotinamidem, kyseliny isonikotinová a nikotinová jsou separovány dostatečně). Jako příklad uvádím na Obr. 112 chromatogramy derivátů kyseliny nikotinové při pH 3 při koncovém složení MF 50 % ACN. Zajímavostí je, že při pH 4 koeluují kyseliny isonikotinová a nikotinová již od gradientu 98 % do 70 % ACN.



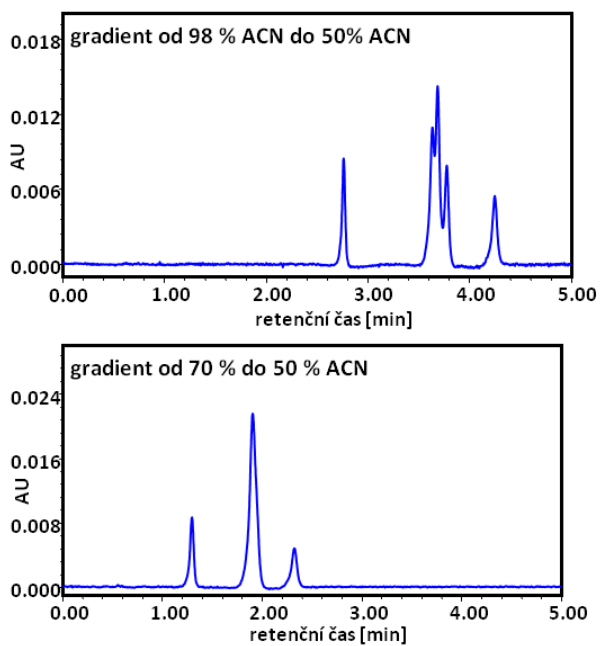
Obr. 112: Chromatogramy optimalizace gradientu MF u derivátů kyseliny nikotinové při pH 3 při koncovém složení MF 50 % ACN

5.5.1.3 Betablokátory

Cílem optimalizace gradientu BB bylo rozdělit propranolol, metoprolol, pindolol a acebutolol. Při gradientu od 98 % ACN při všech hodnotách pH docházelo postupně ke zlepšení separace acebutololu a propranololu dle toho, jak se gradient stával méně strmý. Stejně tak tomu bylo i u gradientu od 90 % ACN. Separace zmíněných dvou betablokátorů byla ještě mírně zlepšena oproti gradientu od 98 % ACN. Jako příklad uvádím na Obr. 114 chromatogramy BB při pH 6 při gradientu od 98 % ACN a od 90 % ACN. U gradientu od 80 % ACN docházelo u pH 6 a pH 5 také postupně k lepší separaci pindololu a acebutololu. Ta však byla horší než u gradientu od 90 % ACN. Při pH 4 a pH 3 nedošlo k téměř žádnému zlepšení separace při gradientu od 80 % ACN. Při gradientu od 70 % ACN došlo při všech hodnotách pH k výraznému zhoršení koeluce propranololu, metoprololu, pindololu a acebutololu, vytvořily jeden pík. Jako příklad uvádím na Obr. 113 chromatogramy BB při pH 6 při koncovém složení MF 50 % ACN. Tento gradient měl nejhorší výsledky. Nejlepší podmínky separace pro BB při pH 6 a pH 5 byl gradient od 90 % ACN do 70 % ACN, při pH 4 a pH 3 jsou nejlepší podmínky při gradientu od 98 % ACN do 70 % ACN. Při žádném gradientu se však nepovedlo ani částečně separovat metoprolol a pindolol.



Obr. 114: Chromatogramy optimalizace gradientu MF u BB při pH 6

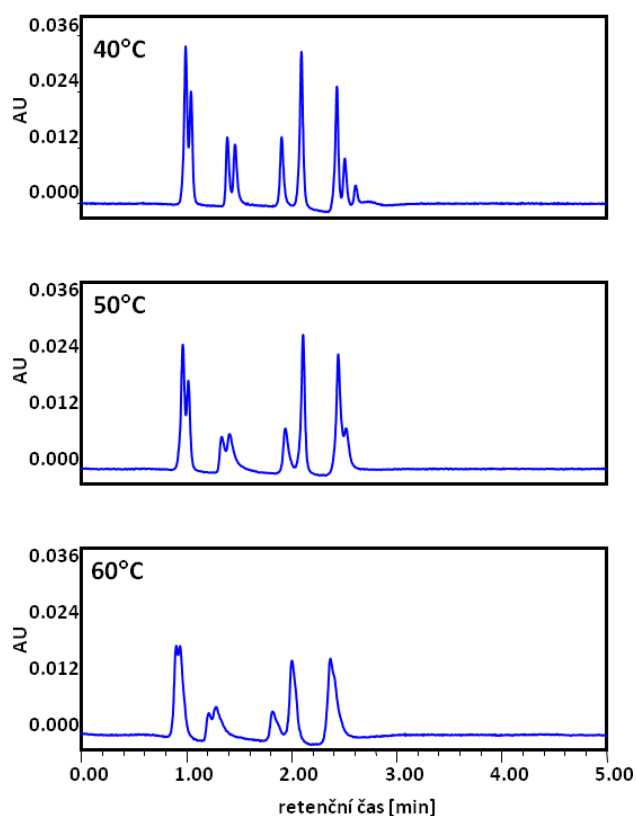


Obr. 113: Chromatogramy optimalizace gradientu MF u BB při pH 6 při koncovém složení MF 50 % ACN

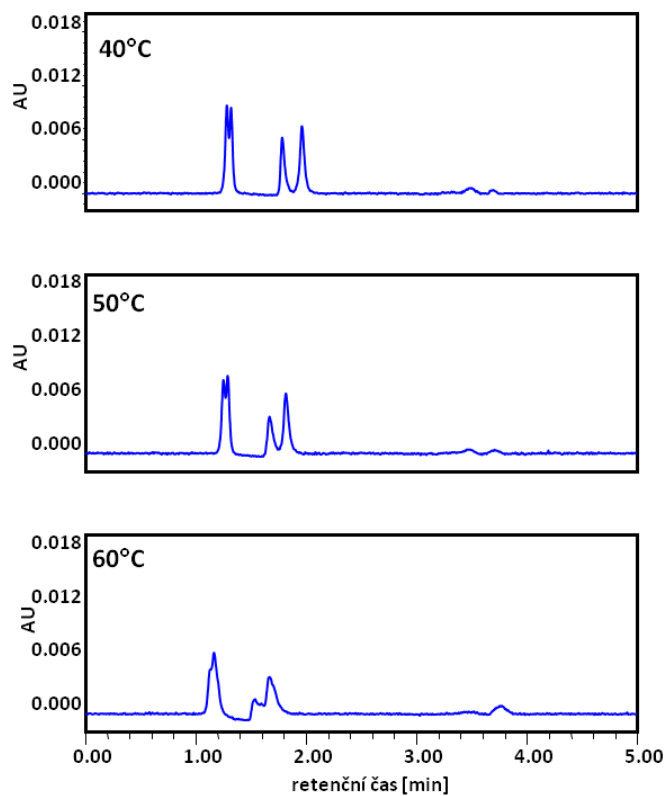
5.5.2 Optimalizace teploty kolony

Teplota kolony byla zvýšena na 50°C, a poté na 60°C.

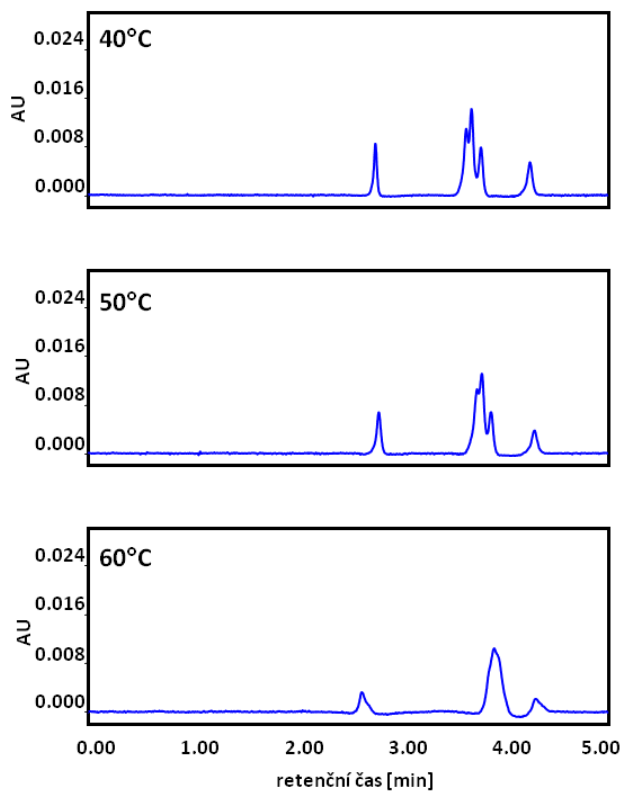
Změnou teploty došlo u všech testovaných skupin látek za všech pH k výraznému zhoršení separace sledovaných analytů. Zvyšující se teplota vedla ke zhoršení separace. Jako příklad uvádím chromatogramy nukleových bazí a nukleosidů na Obr. 115 při pH 6, derivátů kyseliny nikotinové na Obr. 116 při pH 3 a BB na Obr. 117 při pH 6.



Obr. 115: Chromatogramy optimalizace teploty kolony u nukleových bazí a nukleosidů při pH 6



Obr. 116: Chromatogramy optimalizace teploty kolony u nikotinů při pH 3

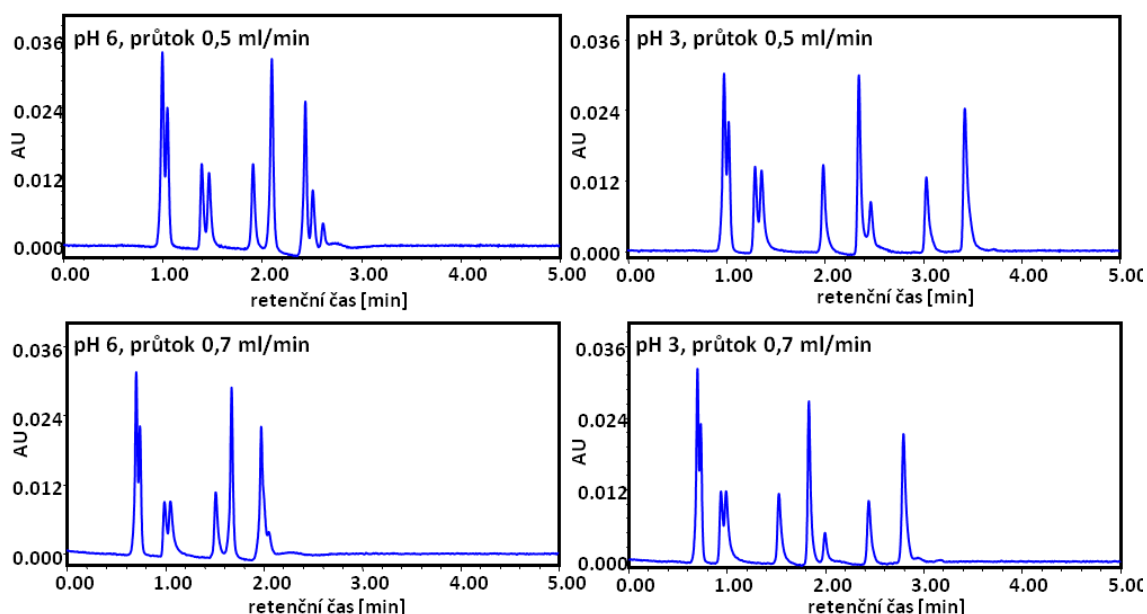


Obr. 117: Chromatogramy optimalizace teploty kolony u BB při pH 6

5.5.3 Optimalizace průtoku mobilní fáze

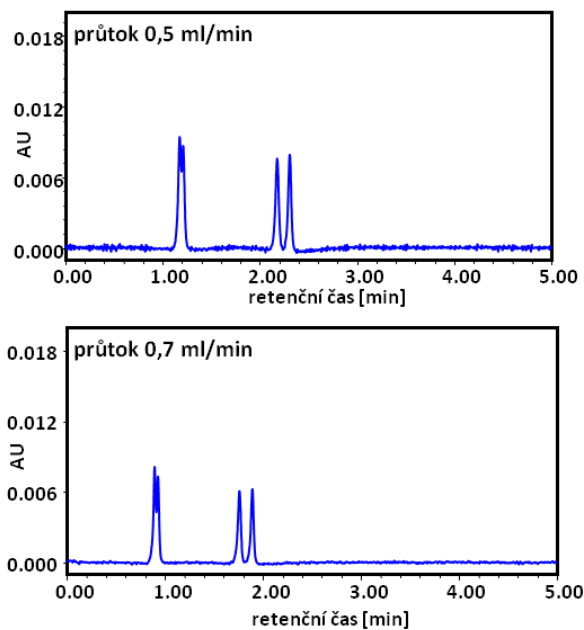
Průtok byl zvýšen z 0,5 ml/min na 0,7 ml/min, čímž došlo ke snížení retence sledovaných analytů.

Ve skupině nukleových bazí a nukleosidů došlo při pH 6, pH 5 i pH 4 ke zhoršení koeluce 5-methyluridinu a uridinu a došlo ke koeluci guanosinu, cytidinu a cytosinu. Při pH 3 však došlo k mírnému zlepšení separace adeninu a guanosinu. Jako příklad uvádím na Obr. 118 chromatogramy nukleových bazí a nukleosidů při pH 6 a pH 3.



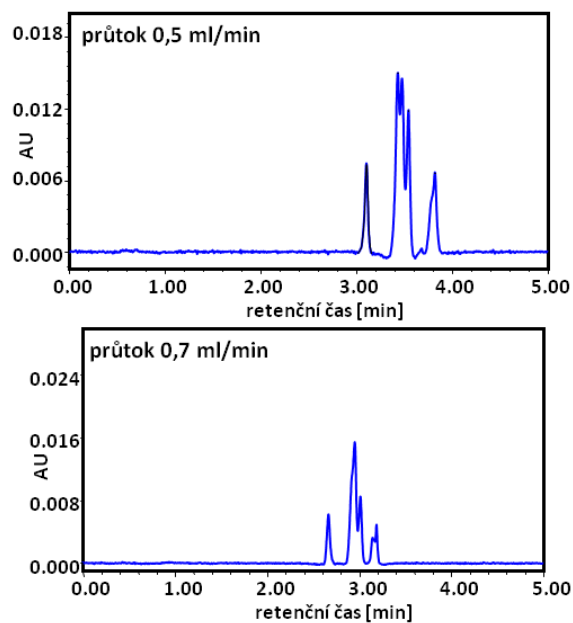
Obr. 118: Chromatogramy optimalizace průtoku MF u nukleových bazí a nukleosidů při pH 6 a pH 3

U derivátů kyseliny nikotinové změna průtoku nevedla téměř k žádným změnám za testovaných podmínek. Zlepšení separace isonikotinamidu a nikotinamidu lze pozorovat pouze při pH 6, jak je uvedeno na Obr. 119. Při pH 4 došlo k částečné koeluci kyseliny nikotinové a isonikotinové.



Obr. 119: Chromatogramy optimalizace průtoku MF u derivátů kyseliny nikotinové při pH 6

Ani u skupiny BB nepomohlo zvýšení průtoku k lepší separaci analytů, spíše naopak. Při pH 3 došlo k celkovému zhoršení separace (viz Obr. 120), při pH 4 a pH 5 atenolol frontuje výrazněji, při pH 6 se separace nezměnila.



Obr. 120: Chromatogramy optimalizace průtoku MF u BB při pH 3

6. Závěr

V rámci diplomové práce bylo hodnoceno šest kolon Astra ZWIX s využitím pěti skupin látek (nukleových bazí a nukleosidů, derivátů kyseliny nikotinové, hydrofilních vitamínů, betablokátorů a fenolických kyselin). Analýze na nových kolonách Astra ZWIX předcházela analýza na pěti komerčně dostupných kolonách (BEH Z HILIC, SYNCRONIS, OMEGA SUGAR, BEH HILIC a BEH AMIDE). Byl popsán retenční čas analyzovaných látek na těchto kolonách, dále rozlišení píků, jejich asymetrie a šířka píků v polovině výšky.

Z naměřených hodnot vyplynulo, že celkově nejnižší rozdíly mezi kolonami v rámci jedné šarže má šarže P1328. V rámci jednotlivých parametrů má nejnižší rozdíly v retenčních časech a šířce píku šarže P1327, v rozlišení a asymetrii píku šarže P1328.

Dále je zřejmé, že pro analýzu nukleových bazí a nukleosidů při pH 3 i pH 6 jsou nejvýhodnější kolony šarže P1328, pro analýzu derivátů kyseliny nikotinové kolony šarže P1329, u hydrofilních vitamínů při pH 3 kolony šarže P1329, při pH 6 šarže P1327. Pro analýzu betablokátorů jsou výhodnější kolony šarže P1328, pro analýzu fenolických kyselin při pH 3 kolony šarže P1328, při pH 6 kolony šarže P1327.

Při porovnání s komerčně dostupnými kolonami bylo zjištěno, že píky na kolonách Astra ZWIX mají oproti píkům na komerčně dostupných kolonách nižší hodnoty rozlišení, vyšší hodnoty asymetrie a širší píky, což je způsobeno tím, že kolony Astra ZWIX mají větší částice. Opakovatelnost retenčních časů splňují píky na všech kolonách Astra ZWIX i na komerčně dostupných kolonách. Jediná výjimka je 3,5-DHBA na koloně A00281, jejíž RSD při pH 3 je 1,28 %.

Kolony Astra ZWIX se hodí nejen pro analýzu vybraných pěti skupin látek, ale i pro další hydrofilní látky.

7. Seznam citací

- [1] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [2] Mc CALLEY, David V. *Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography*. Journal of Chromatography A [online]. 2017, **1523**, 49-71 [cit. 2022-10-24]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.06.026
- [3] GRUMBACH, Eric S. a Kenneth J. FOUNTAIN. *Comprehensive guide to HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography*. Milford: Waters Corporation, 2010. ISBN 978-1-879732-08-7.
- [4] SALAS, Daniela, Francesc BORRULL, Núria FONTANALS a Rosa Maria MARCÉ. *Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based detection to determine emerging organic contaminants in environmental samples*. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2017, **94**, 141-149 [cit. 2023-04-07]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.07.017
- [5] DEJAEGER, Bieke a Yvan VANDER HEYDEN. *HILIC methods in pharmaceutical analysis*. Journal of Separation Science [online]. 2010, **33**(6-7), 698-715 [cit. 2023-04-08]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200900742
- [6] QIAO, Lizhen, Xianzhe SHI a Guowang XU. *Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2016, **81**, 23-33 [cit. 2023-04-07]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.03.021
- [7] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique*. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2012, **402**(1), 231-247 [cit. 2023-04-08]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- [8] JANDERA, Pavel. *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*. Analytica Chimica Acta [online]. 2011, **692**(1-2), 1-25 [cit. 2022-10-24]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2011.02.047
- [9] KAHSAY, Getu, Huiying SONG, Ann VAN SCHEPDAEL, Deirdre CABOOTER a Erwin ADAMS. *Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2014, **87**, 142-154 [cit. 2023-01-08]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2013.04.015
- [10] GUO, Yong a Sheetal GAIKI. *Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A [online]. 2011, **1218**(35), 5920-5938 [cit. 2022-10-24]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.06.052
- [11] WALTER TH, ALDEN BA, BERTHELETTE K, FIELD JA, LAWRENCE NL, Mc LAUGHLIN J, PATEL AV. *Characterization of a highly stable zwitterionic hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on hybrid organic–inorganic particles*. J Sep Sci. 2022;45:1389–1399

- [12] FAHAD, Ali Mohammed Mahir, Ashraf Saad RASHEED a Hameed Hussein ALI. *Separation and determination of simvastatin on ZIC-HILIC stationary phases by hydrophilic interaction chromatography in pharmaceutical material products*. Materials Today: Proceedings [online]. 2022, **49**, 2817-2821 [cit. 2023-01-25]. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2021.09.535
- [13] SONNENBERG, Rosalynde Ann, Shama NAZ, Lise COUGNAUD a Dajana VUCKOVIC. *Comparison of underivatized silica and zwitterionic sulfobetaine hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases for global metabolomics of human plasma*. Journal of Chromatography A [online]. 2019, **1608** [cit. 2023-01-30]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.460419
- [14] MAUKO, Lea, Nathan A. LACHER, Matthias PELZING, Anna NORDBORG, Paul R. HADDAD a Emily F. HILDER. *Comparison of ZIC-HILIC and graphitized carbon-based analytical approaches combined with exoglycosidase digestions for analysis of glycans from monoclonal antibodies*. Journal of Chromatography B [online]. 2012, **911**, 93-104 [cit. 2023-01-30]. ISSN 15700232.
- [15] XIONG, Xin a Yanmeng LIU. *Chromatographic behavior of 12 polar pteridines in hydrophilic interaction chromatography using five different HILIC columns coupled with tandem mass spectrometry*. Talanta [online]. 2016, **150**, 493-502 [cit. 2023-01-30]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.12.066
- [16] SENTKOWSKA, Aleksandra, Magdalena BIESAGA a Krystyna PYRZYNSKA. *Effects of the operation parameters on HILIC separation of flavonoids on zwitterionic column*. Talanta [online]. 2013, **115**, 284-290 [cit. 2023-04-27]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.05.005
- [17] YEUNG, Darien, Nicole KLAASSEN, Benilde MIZERO, Victor SPICER a Oleg V. KROKHIN. *Peptide retention time prediction in hydrophilic interaction liquid chromatography: Zwitter-ionic sulfoalkylbetaine and phosphorylcholine stationary phases*. Journal of Chromatography A [online]. 2020, **1619** [cit. 2023-01-30]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2020.460909
- [18] LIU, Qiaoxia, Lingyan XU, Yanxiong KE, Yu JIN, Feifang ZHANG a Xinmiao LIANG. *Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2011, **54**(3), 623-628 [cit. 2023-01-25]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2010.09.040
- [19] KAHSAI, Getu, Huiying SONG, Ann VAN SCHEPDAEL, Deirdre CABOOTER a Erwin ADAMS. *Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2014, **87**, 142-154 [cit. 2023-01-23]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2013.04.015
- [20] CHIAOCHAN, Chayada, Urairat KOESUKWIWAT, Soparat YUDTHAVORASIT a Natchanun LEEPIPATPIBOON. *Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle*. Analytica Chimica Acta [online]. 2010, **682**(1-2), 117-129 [cit. 2023-01-25]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.09.048
- [21] LARDEUX, Honorine, Davy GUILLARME a Valentina D'ATRI. *Comprehensive evaluation of zwitterionic hydrophilic liquid chromatography stationary phases for oligonucleotide characterization*. Journal of Chromatography A [online]. 2023, **1690** [cit. 2023-01-30]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2023.463785
- [22] OERTEL, R., V. NEUMEISTER a W. KIRCH. *Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum*. Journal of Chromatography A [online]. 2004, **1058**(1-2), 197-201 [cit. 2023-01-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.08.158

- [23] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 2.* přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.
- [24] Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2017*, Grada Publishing, Praha, 2017. ISBN 978-271-0500-7
- [25] GARCÍA-GÓMEZ, D., E. RODRÍGUEZ-GONZALO a R. CARABIAS-MARTÍNEZ. *Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2013, **47**, 111-128 [cit. 2022-12-27]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2013.02.011
- [26] DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, Javier, María MATEOS-VIVAS, Encarnación RODRÍGUEZ-GONZALO, Diego GARCÍA-GÓMEZ, Myriam BUSTAMANTE-RANGEL, María-Milagros DELGADO ZAMARREÑO a Rita CARABIAS-MARTÍNEZ. *Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2017, **92**, 12-31 [cit. 2022-12-27]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.04.005
- [27] WERNER, A. *Reversed-phase and ion-pair separations of nucleotides, nucleosides and nucleobases: analysis of biological samples in health and disease*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [online]. 1993, **618**(1-2), 3-14 [cit. 2022-12-27]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(93)80024-X
- [28] MARRUBINI, Giorgio, Patrik APPELBLAD, Mariarosa MAIETTA a Adele PAPETTI. *Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review*. Food Chemistry [online]. 2018, **257**, 53-66 [cit. 2023-04-07]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.008
- [29] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. [cited 2022 Dec. 26]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [30] DrugBank [online]. [cit. 2022-12-26]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs>
- [31] GAUDINEAU, Cédric a Karine AUCLAIR. *Inhibition of human P450 enzymes by nicotinic acid and nicotinamide*. Biochemical and Biophysical Research Communications [online]. 2004, **317**(3), 950-956 [cit. 2023-01-07]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.137
- [32] HARTL, Jiří. *Farmaceutická chemie III. 2.*, nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2131-9.
- [33] UNISSA, Ameeruddin Nusrath, Selvakumar SUBBIAN, Luke Elizabeth HANNA a Nagamiah SELVAKUMAR. *Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Infection, Genetics and Evolution [online]. 2016, **45**, 474-492 [cit. 2023-01-07]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2016.09.004
- [34] SMYTHE, G.A., O. BRAGA, B.J. BREW, R.S. GRANT, G.J. GUILLEMIN, S.J. KERR a D.W. WALKER. *Concurrent Quantification of Quinolinic, Picolinic, and Nicotinic Acids Using Electron-Capture*

- Negative-Ion Gas Chromatography–Mass Spectrometry*. Analytical Biochemistry [online]. 2002, **301**(1), 21-26 [cit. 2023-01-07]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2001.5490
- [35] IWAKI, Masahiro, Etsuko MURAKAMI a Kazuaki KAKEHI. *Chromatographic and capillary electrophoretic methods for the analysis of nicotinic acid and its metabolites*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [online]. 2000, **747**(1-2), 229-240 [cit. 2023-01-07]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(99)00486-7
- [36] CAMPBELL, Iain. *Macronutrients, minerals, vitamins and energy*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine [online]. 2017, **18**(3), 141-146 [cit. 2022-12-02]. ISSN 14720299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2016.11.014
- [37] FATIMA, Zakia, Xiangzi JIN, Yilin ZOU, Han Yeong KAW, Maurizio QUINTO a Donghao LI. *Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins*. Journal of Chromatography A [online]. 2019, **1606** [cit. 2022-12-02]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.05.025
- [38] PIPILAS, Alexandra, Trejeeve MARTYN a Joann LINDENFELD. *Heart Failure Medical Therapy: A Review for Structural/Interventional Cardiologists*. Structural Heart [online]. 2022, **6**(6) [cit. 2022-12-01]. ISSN 24748706. Dostupné z: doi:10.1016/j.shj.2022.100082
- [39] FUMAGALLI, Carlo, Niccolò MAURIZI, Niccolò MARCHIONNI a Diego FORNASARI. *β -blockers: Their new life from hypertension to cancer and migraine*. Pharmacological Research [online]. 2020, **151** [cit. 2022-12-01]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2019.104587
- [40] ŠPINAR, Jindřich, Jiří VÍTOVEC, Jaromír HRADEC, et al. *Czech Society of Cardiology Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure 2011*. Cor et Vasa [online]. 2012, **54**(3-4), e113-e134 [cit. 2022-12-01]. ISSN 00108650. Dostupné z: doi:10.1016/j.crvasa.2012.03.002
- [41] NOVACK, Gary D. *Ophthalmic beta-blockers since timolol*. Survey of Ophthalmology [online]. 1987, **31**(5), 307-327 [cit. 2022-12-01]. ISSN 00396257. Dostupné z: doi:10.1016/0039-6257(87)90116-0
- [42] DOLEŽAL, Martin. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3460-9
- [43] PUJOS, E., C. CREN-OLIVÉ, O. PAISSE, M.M. FLAMENT-WATON a M.F. GRENIER-LOUSTALOT. *Comparison of the analysis of β -blockers by different techniques*. Journal of Chromatography B [online]. 2009, **877**(31), 4007-4014 [cit. 2022-12-01]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.10.014
- [44] SALEEM, Kishwar, Imran ALI, Umma KULSUM a Hassan Y. ABOUL-ENEIN. *Recent Developments in HPLC Analysis of β -Blockers in Biological Samples*. Journal of Chromatographic Science [online]. 2013, **51**(8), 807-818 [cit. 2022-12-01]. ISSN 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmt030
- [45] STALIKAS, Constantine D. *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*. Journal of Separation Science [online]. 2007, **30**(18), 3268-3295 [cit. 2023-01-07]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700261

[46] FRESCO, P., F. BORGES, C. DINIZ a M.P.M. MARQUES. *New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols*. Medicinal Research Reviews [online]. 2006, **26**(6), 747-766 [cit. 2023-01-07]. ISSN 0198-6325. Dostupné z: doi:10.1002/med.20060