

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

**Porovnání různých druhů stacionárních fází  
v HPLC analýze léčivého přípravku Diklofenak emulgel**

**Rigorózní práce**

2009

Mgr. Jitka Poláčková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 15. 9. 2009

.....

## Poděkování

Především bych ráda poděkovala PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení během celého vypracování rigorózní práce. Děkuji za její cenné rady a připomínky.

Mé poděkování také patří PharmDr. Lucii Havlíkové, Ph.D. za ochotnou pomoc, rady a trpělivost během mého vypracování rigorózní práce.

Zvláštní díky také patří Prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. za inspiraci, cenné rady a ochotu kdykoliv diskutovat o jakémkoliv odbornému i neodbornému problému.

Poděkování také patří všem zaměstnancům katedry analytické chemie.

Mgr. Jitka Poláčková

## ABSTRAKT

Cílem této rigorózní práce je porovnání různých druhů stacionárních fází při analýze léčiva *Diklofenak emulgel*.

Při řešení problematiky vývoje metodiky HPLC, validací a volby stacionárních fází analytických kolon je nutné vzít v úvahu mnoho odborných materiálů počínaje lékopisy, směrnici ICH, odbornými vědeckými časopisy. Dalším možným zdrojem jsou rešeršní databáze.

Bylo sledováno několik typů stacionárních fází, na kterých se testovaly podmínky separace léčivých látek, obsažených v léčivém přípravku Diclofenac emulgel.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo na kolonách Discovery HS-F5 (15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) s časem analýzy pod 4 min; Zorbax SB – CN (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) s časem analýzy pod 5 min a na koloně Chromolith Performance RP – 18e (100 – 3 mm) s časem analýzy pod 3 min.

## ABSTRACT

The aim of this rigorous work is a comparison of different types of stationary phases for the analysis of the drug Diclofenac emulgel.

It is necessary to take into account the many specialized materials from the pharmacopoeias, ICH guidelines and professional scientific journals in solution of the development of HPLC methodology, validation and choice of stationary phase analytical columns.

Several types of stationary phases were tested, with the testing of conditions of the separation of active substances from the pharmaceutical formulation - diclofenac emulgel.

The best results were placed on Discovery HS-F5 (15 cm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), time analysis was less than 4 minutes; Zorbax SB – CN (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) time of analysis was less than 5 min; Chromolith Performance RP – 18e (100 – 3 mm) time analysis was less than 3 minutes.

## **Seznam používaných zkratk:**

ACES – 2-[(2-amino-2-oxoethyl)amino]ethan sulfonová kyselina  
APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku  
APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku  
CAPS – 3-(cyklohexylamino)ethan sulfonová kyselina  
CEC – kapilární elektrochromatografie  
CI – chemická ionizace  
CMPA – chiral mobile phase (chirální mobilní fáze)  
CONDUCT – detektor vodivostní  
CZE – kapilární zónová elektroforéza  
DCF – diklofenak  
DCHT – dicyclohexyltartarát  
ECD – detektor elektrochemický  
EOF – elektroosmotický tok  
EI – elektronová ionizace  
ELSD – Evaporative Light Scattering Detector  
ESI – ionizace elektrosprejem  
FI – ionizace polem  
FLD – detektor fluorimetrický  
FP – desorpce polem  
FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography  
HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethan sulfonová kyselina  
GLC – plynová rozdělovací chromatografie  
GPC – gelová (slučovací) chromatografie  
GSC – plynová adsorpční chromatografie  
HETP – výškový ekvivalent teoretického patra  
HILIC – hydrofilní interakce HPLC  
HIC – chromatografie s hydrofobní interakcí  
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
ICH – International Conference on Harmonization  
IEC – iontově výměnná chromatografie  
IR detektor – infračervený detektor  
IS – vnitřní standard (flurbiprofen)

LC – kapalinová chromatografie  
LD – desorpce laserem  
LLC – kapalinová rozdělovací chromatografie  
LSC – kapalinová adsorpční chromatografie  
MALDI – ionizace a desorpce laserem za účasti matrice  
MES – 2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina  
MF – mobilní fáze  
MOPS – 3-(N-morfolino)propan sulfonová kyselina  
MS – hmotnostní spektrometrie  
MP – methylparaben  
m/z – poměr hmotnosti a náboje  
N – nečistota (1- (2, 6 - dichlofenyl)- 2 indolinon)  
*N* – počet teoretických pater  
PBD – polybutadien  
PCB – polychlorované bifenyly  
PCDF – polychlorované dibenzofurany  
PGC – porous graphitic carbon (porézní grafitový uhlík)  
PP – propylparaben  
PS – polystyren  
 $R_{ij}$  – rozlišení chromatografických píků  
RI – detektor refraktometrický  
RIC – reconstructed ion current  
RP – reverzní fáze  
SPE – solid phase extraction (extrakce na pevné fázi)  
RSD – relativní směrodatná odchylka  
T – tailing faktor  
TCDD – 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin  
TEA – triethylamin  
TES – 2-[tris(hydroxymethyl)methyl]aminoethan sulfonová kyselina  
TIC – total ion current  
TRICIN – N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin  
TRIS – tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
TF – průletový hmotnostní analyzátor  
TFA – trifluoroctová kyselina

TLC – tenkovrstvá chromatografie

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography (ultra-účinná kapalinová chromatografie)

USP – United States Pharmacopoeia (Americký lékopis)

UV – ultrafialová oblast spektra

UV-VIS detektor – detektor spektrofotometrický

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST</b> ...	<b>14</b>
3.1 DIKLOFENAK .....	15
3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	18
3.2.1 <i>Rozdělení chromatografických metod</i> .....	19
3.2.2 <i>Princip chromatografického dělení</i> .....	22
3.2.2.1 Eluční parametry .....	22
3.2.2.2 Asymetrie píků .....	24
3.2.2.3 Rozlišení chromatografických píků .....	25
3.2.3 <i>Schéma kapalinového chromatografu</i> .....	27
3.2.3.1 Detektory .....	28
3.2.3.2 Kolony .....	31
3.2.3.2.1 Životnost kolony .....	32
3.2.3.2.2 Uchovávání kolon .....	34
3.2.3.2.3 Účinnost kolony .....	35
3.2.4 <i>Trendy v kapalinové chromatografii</i> .....	36
3.2.5 <i>Druhy analytických kolon</i> .....	46
3.2.5.1 Stacionární fáze pro HPLC .....	47
3.2.5.2 Polymerní stacionární fáze .....	55
3.2.5.3 Monolitické kolony .....	56
3.2.5.4 HPLC kolony na bázi oxidu kovů .....	60
3.2.5.5 Hybridní stacionární fáze .....	63
3.2.5.6 Stacionární fáze na bázi porézního grafitického uhlíku .....	67
3.2.5.7 Stacionární fáze pro HILIC .....	69



3.2.6	<i>Vliv chromatografických podmínek na eluční charakteristiky separovaných látek</i>	72
3.2.6.1	Vliv teploty na chromatografické vlastnosti	72
3.2.6.2	Vliv složení mobilní fáze na retenci solutů	72
3.2.6.3	Vliv pH mobilní fáze na retenci solutů	72
3.2.6.4	Vliv rozpouštědla (solventu) vzorku na selektivitu a účinnost systému	73
3.2.6.5	Vliv velikosti nástřiku na účinnost kolony	74
3.2.6.6	Výběr stacionární fáze – vliv na retenci solutů a jejich selektivitu	74
3.2.7	<i>Popis používaných kolon</i>	76
3.2.7.1	Kolona Discovery Zr	76
3.2.7.1.1	Kolona Discovery Zr-Carbon	76
3.2.7.1.2	Kolona Discovery ZR – Carbon C 18	76
3.2.7.1.3	Kolona Discovery Zr-PBD	77
3.2.7.2	Kolona Discovery HS	77
3.2.7.2.1	Kolona Discovery HS-F5 (pentafluorofenylová)	78
3.2.7.2.2	Kolona Discovery HS-PEG (polyetylglykolová)	78
3.2.7.3	Kolona Discovery RP – Amide	79
3.2.7.4	Kolona Phenomenex Gemini	79
3.2.7.5	Kolona Chromolith Performance	79
3.2.7.6	Zorbax Extend C18	80
3.2.7.7	Kolony Zorbax SB	81
3.2.7.7.1	Kolona Zorbax SB – C18	81
3.2.7.7.2	Kolona Zorbax SB – Phenyl	82
3.2.7.7.3	Kolona Zorbax SB – CN	82
3.2.7.8	Kolona Zorbax TMS	82
3.2.7.9	Ascentis Express	83

<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>84</b>
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>87</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>111</b>
<b>7 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>113</b>

# 1 ÚVOD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejpoužívanější techniky analytických laboratoří, v základním výzkumu i v technické praxi. Používá se k analýze potravin, životního prostředí, monitorování hladiny léčiv, v toxikologii, biochemii. Je jedna z hlavních metodik na diagnostiku markerů různých druhů onemocnění a dědičných chorob.

Významnou výhodou metodiky je velká rychlost analýzy a možnost automatického zpracovávání naměřených dat.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je metodou velice flexibilní, v současnosti jsou k dispozici různé druhy HPLC kolon vhodné pro nejrozmanitější účely.

Moderní detekční systémy vynikají vysokou citlivostí a možností dosáhnout nízkých mezí detekce a mezí stanovitelnosti.

Vedle tradičních analytických aplikací může být vysokoučinná kapalinová chromatografie použita rovněž k čištění a preparaci složek ve směsích.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem této rigorózní práce je porovnání různých druhů stacionárních fází při analýze léčiva *Diklofenak emulgel*, případně úprava podmínek stanovení daného léčiva.

Při řešení problematiky vývoje metodiky HPLC, validací a volby stacionárních fází analytických kolon je nutné vzít v úvahu mnoho odborných materiálů počínaje lékopisy (Český lékopis, Americký lékopis, Evropský lékopis, Japonský lékopis), směrnici ICH, odbornými vědeckými časopisy, které často publikují nové analytické metodiky pro stanovení léčiv s využitím HPLC konče. Dalším možným zdrojem jsou rešeršní databáze obsahující pouze abstrakty (Analytical abstract, Web of Science apod.).

### **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1 Diklofenak <sup>1</sup>

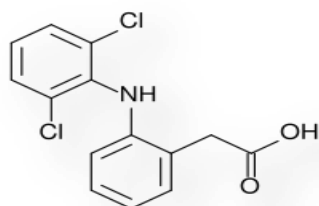
Diklofenak je derivátem kyseliny fenyloctové. Inhibicí cyklooxygenázy tlumí syntézu prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu. Diklofenak působí antiflogisticky a analgeticky při léčení místních projevů revmatických a nereumatických bolestivých stavů pohybového ústrojí. Účinnou látkou je Diclofenacum natricum (sodná sůl diklofenaku, v menší míře se používá i draselná sůl).

Degradačním produktem je 1-(2,6-dichlorfenyl)-2-indolinon.

**Chemický název** je 2-(2-(2,6dichlorofenylamino)fenyl)kyselina octová.

**Chemický vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>.

**Chemická struktura:**



Obrázek 1: chemická struktura diklofenaku

#### **Diklofenak emulgel:**

**Kvalitativní a kvantitativní složení:** Diclofenacum natricum 1,0 g (1 %) ve 100 g emulgelu.

**Popis:** Bílý, hladký gel, slabého charakteristického zápachu.

**Použití:** Používá se k místním projevům revmatizmu měkkých tkání, např. tendovaginitidy, burzitidy, syndromu rameno-ruka, k lokálním revmatickým onemocněním, např. artróza periferních kloubů a páteře, periartropatie, bolestivé stavy při osteoartróze, posttraumatickému zánětu šlach, vazů, svalů, kloubních pouzder, např. distorse, kontuze, luxace.

**Interakce s jinými léčivými přípravky a jiné formy interakce:** Nejsou známy.

**Těhotenství a kojení:** Vzhledem k tomu, že při lokální aplikaci může dojít ke vstřebání diklofenaku, a protože není dostatek zkušeností s podáním diklofenaku u těhotných žen, jeho používání v těhotenství se nedoporučuje.

---

<sup>1</sup> Text byl vypracován ze zdrojů [1 – 4].



Diklofenak byl nalezen v mléce kojících žen. Během používání přípravku není vhodné kojení.

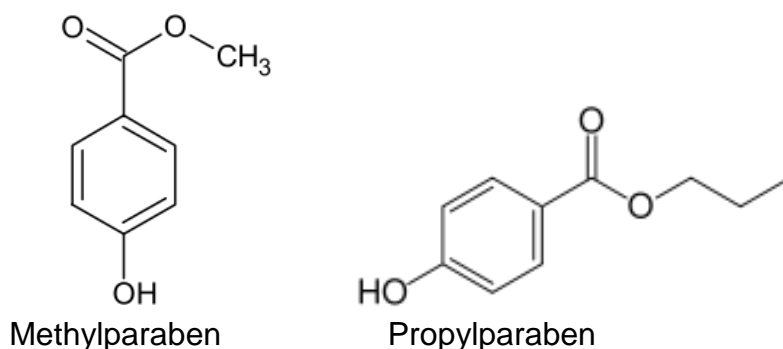
**Předávkování:** Vzhledem k tomu, že topicky podávaný diklofenak minimálně absorbuje do systémového krevního oběhu je velmi nepravděpodobné, že by došlo k předávkování.

**Farmakokinetické vlastnosti:** Po aplikaci na kůži se diklofenak dobře vstřebává do podkožních tkání. Maximální hladiny diklofenaku se po topické dávce 7,5 g v 1 % koncentraci pohybovaly u zdravých dobrovolníků kolem průměrné hodnoty 3,9 ng/ml. Po několikadenní terapii dosahovaly koncentrace v měkkých tkáních u pacientů s artrózou hodnot 30 – 40 krát vyšších než v plazmě. Absorpce diklofenaku v 1% koncentraci aplikované na intaktní kůži činila u zdravých probandů 6 – 7%.

**Farmakodynamické vlastnosti:**

Farmakoterapeutická skupina: Antirevmatikum, antiflogistikum, analgetikum.

**Seznam pomocných látek:** Hydroxid sodný, hyetelosa, karbomer, propylenglykol, střední nasycené triacylglyceroly, propylparaben, methylparaben, čištěná voda.



Obrázek 2: chemická struktura methylparabenu a propylparabenu

**Zvláštní opatření pro uchování:** V dobře uzavřeném obalu při teplotě do 25 ° C.

**Nežádoucí účinky:** Přípravek je dobře tolerován, jen výjimečně se může vyskytnout pruritus, pálení, zarudnutí či kožní erupce. Jen zcela ojediněle může vzniknout fotosenzibilizace. Při dlouhodobém používání přípravku aplikovaného na rozsáhlé plochy se mohou objevit systémové nežádoucí účinky, jako nauzea, zvracení, průjmy, bolesti v epigastriu.

**Návod k použití přípravku:** jen k zevnímu použití, pro aplikaci na kůži.

**Dávkování a způsob podání:** Na postižené místo se Diclofenac HBF aplikuje dle rozsahu postižení 3 – 4 krát denně v tenké vrstvě (velikostí odpovídající velikosti třešně až vlašského ořechu) a lehce se vetře. Délka léčby závisí na indikaci a dosažené odpovědi pacienta na léčbu. Doporučuje se zkontrolovat léčbu za dva týdny. Po aplikaci je nutné si umýt ruce, pokud nejsou místem k léčení. Přípravek lze použít i jako doplňkovou léčbu celkového podání nesteroidních antiflogistik. Přípravek je určen pro dospělé a mladistvé.

**Kontraindikace:** Přecitlivělost na některou složku přípravku, na kyselinu acetylsalicylovou a ostatní nesteroidní antiflogistika, projevující se jako astma, urtikaria a jiné alergické reakce.

**Zvláštní upozornění a zvláštní opatření pro použití:** Pravděpodobnost vzniku systémových nežádoucích účinků při topické léčbě diklofenakem je malá ve srovnání s frekvencí nežádoucích účinků při užití perorálního diklofenaku. Jestliže však je Diclofenac HBF aplikován na relativně velké plochy kůže nebo používán dlouhodobě, nelze vyloučit možnost vzniku nežádoucích účinků. Přípravek se aplikuje pouze na intaktní kůži (bez otevřených ran a poranění). Nesmí se dostat do kontaktu s oční spojivkou nebo se sliznicemi. Nesmí se používat perorálně.

**Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje:** Pozornost není použitím přípravku ovlivněna.

## 3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie <sup>2</sup>

HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je separační metoda, která umožňuje separaci široké škály látek. Umožňuje dělení prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.

### Objev chromatografie: [7]

Za objevitele chromatografie je považován ruský botanik a chemik M. S. Cvět. Jeho práce spočívala v dělení chloroplastových pigmentů z rostlinných extraktů na skleněné koloně naplněné CaCO<sub>3</sub> s použitím organických rozpouštědel. Cvět zjistil, že zvýšený odpor kolony lze překonávat zvýšením tlaku na vstupu nebo odsáváním na konci kolony. Postupoval tedy způsobem, který byl později realizován ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

### Využití HPLC:

- separace a identifikace látek ve směsích
- kvantitativní analýza látek ve směsích
- kontrola čistoty preparátů, kontrola surovin, výrobních meziproductů a produktů
- čištění a mikropreparace látek
- kontrola životního prostředí (pesticidy v ekosystémech, potravinách, krmivech)
- klinická a toxikologická analýza (hormony, léčiva, metabolity v tělních tekutinách)
- kontrola potravinářských produktů
- biologická a biochemická aplikace (analýza bílkovin a nukleových kyselin)
- zemědělská aplikace (sledování migrace herbicidů v půdě)

Mezi výhody HPLC patří především schopnost stanovit tepelně labilní, polární, nízké i vysokomolekulární látky, přímá analýza bez derivatizace – časová úspora, přímý nástřik vodných roztoků vzorků.

---

<sup>2</sup> Text byl vypracován kromě uvedených zdrojů i ze zdrojů [5, 6, 8].

Metodika má i své nevýhody, např. pomalou difúzi v kapalinách, nižší účinnost než plynová chromatografie, vyšší finanční náklady na analýzu (nákladnější přístroj, rozpouštědla).

### 3.2.1 Rozdělení chromatografických metod <sup>3</sup>

Existuje mnoho způsobů dělení chromatografických metod.

Klasifikace podle fyzikálně – chemického principu dělení:

- Chromatografie adsorpční
- Chromatografie rozdělovací
- Chromatografie na iontoměničích
- Chromatografie gelová permeační
- Chromatografie afinitní

Klasifikace podle druhu mobilní fáze:

- Plynová
- Kapalinová

Klasifikace podle uspořádání:

- Plošná (planární) - papírová, tenkovrstvá
- Sloupcová (kolonová) - vysokoúčinná kapalinová

Klasifikace podle pracovního způsobu:

- Eluční
- Frontální
- Vytěšňovací

Klasifikace dle účelu:

- Analytická
- Preparativní

✓ Chromatografie na tenké vrstvě spojuje vlastnosti sloupcové adsorpční a papírové chromatografie. Nepohyblivou fází je tenká vrstva sorbentu naneseného na inertní podložce. Nejpoužívanější sorbenty jsou silikagel, prášková celulóza, oxid

---

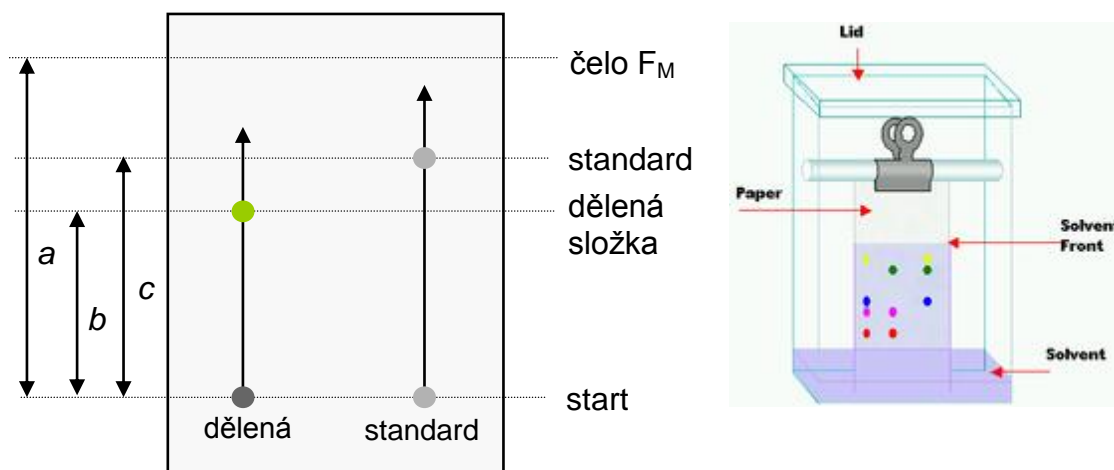
<sup>3</sup> Text byl čerpán mimo uvedené zdroje i ze zdrojů [10,12, 13].

hlinitý. Mezi komerčně dodávané sorbenty patří např. Silufol (silikagel s pojídlem na hliníkové fólii), Lucifol (prášková celulóza s pojídlem na hliníkové fólii).

Využívá se k analýze organických látek, k identifikaci, stanovení čistoty.

✓ Papírová kapalinová chromatografie je v zásadě podle povahy sil, které způsobují separaci složek směsi, rozdělovací chromatografie v plošném uspořádání. I když se na vlastním dělení podílí i adsorpce a výměna iontů.

Všechny způsoby provedení papírové i tenkovrstvé chromatografie mají stejný postup, při kterém se roztok směsi látek nanese na „start“ ve formě skvrny nebo úzkého proužku. Po jejím zaschnutí se chromatografický papír nebo tenká vrstva umístí do vhodné nádoby s mobilní fází. Jestliže čelo mobilní fáze se dostatečně vzdálí od startu, papír nebo tenká vrstva se vyjme a označí se místo, jehož čelo rozpouštědlo dosáhlo. Poloha skvrn jednotlivých složek se pak určí detekcí. Ta probíhá chemicky (např. postřikem činidlem za vzniku barevné reakce) nebo fyzikálně (např. fluorescence v ultrafialovém světle).



Obrázek 3: princip plošné chromatografie [13, 14]

✓ Adsorpční chromatografie využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrch pevné stacionární fáze s aktivními centry. Separace analytů je založena na opakované adsorpci a desorpci.

Mobilní fází je kapalina (LLC) nebo plyn (GLC). Jako stacionární fáze (náplň kolony) se používají zrnité materiály s velkým povrchem: silikagel ( $\text{SiO}_2$ ), což je polární sorbent kyselého povahy; oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), což je zásaditý sorbent. Použitá mobilní fáze – eluční činidlo musí být méně polární než složky dělené směsi. Molekuly elučního činidla, které je v koloně se sorbentem již před nadávkováním

vzorku na kolonu, obsadí aktivní centra sorbentu (polární skupiny). V průběhu dělení molekuly činidla soupeří s molekulami dělených složek o tato adsorpční místa.

Jako mobilní fáze se často používá vhodná směs kapalin, jejíž složení může být v průběhu dělení měněno, takže eluční schopnosti činidla rostou.

Dělené složky jsou poutány na centra tím více (rostoucí eluční časy), čím mají v molekule více pohyblivých elektronů, více polárních funkčních skupin a čím jsou skupiny více polární (až schopné disociace u kyselin či zásad) [15].

✓ Rozdělovací chromatografie využívá rozdílné rozpustnosti molekul analytů mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Jako stacionární fáze se používají kapaliny zakotvené na pevném nosiči, kterým bývá silikagel, agarosa atd. Povrch těchto vysoce polárních hydrofilních nosičů je chemicky upraven a na něm je zakotvena stacionární fáze.

✓ Iontově výměnná chromatografie využívá reverzibilní elektrostatické či iontové interakce mezi nabitými analyty (peptidy, proteiny nebo solemi) v mobilní fázi a nabitými iontově výměnnými skupinami stacionární fáze. Při dělení se mohou uplatňovat i jiné procesy jako adsorpce či hydrofobní interakce. Iontově výměnné stacionární fáze jsou silikagelové materiály či materiály na bázi organických polymerů, které obsahují ve své struktuře negativně nabitě funkční skupiny (měnič kationtů) nebo pozitivně nabitě funkční skupiny (měnič aniontů). Měníče kationtů a aniontů jsou dále podle přítomných funkčních skupin dále děleny na slabé a silné. Peptidy či proteiny, s opačným nábojem než má stacionární fáze, soutěží se stejně nabitými ionty z mobilní fáze o funkční skupiny stacionární fáze a jsou tak děleny. Při použití eluce s gradientem iontové síly jsou peptidy a proteiny eluovány z kolony podle své stoupající afinity k měniči.

✓ Vylučovací chromatografie využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech sorbentu na základě jejich rozdílné velikosti. Tento typ chromatografie je také nazýván jako gelová permeační chromatografie či gelová filtrace, protože využívá jako stacionární fázi nerozpustný porézní gel.

Při průchodu proteinů či peptidů kolonou dochází k dělení analytů podle velikosti a tvaru molekul. Malé molekuly jsou schopny penetrovat hluboko do pórů částic stacionární fáze, a tak jsou zpoždovány ve svém průchodu kolonou oproti

velkým molekulám, které do pórů gelu vstupují jen částečně, nebo vůbec ne. Výběrem sorbentu o určité velikosti pórů ovlivňujeme rozsah molekulových hmotností analytů separovatelných na zvoleném sorbetu (tzv. vylučovací limit kolony).

✓ Afinitní chromatografie je typ adsorpční chromatografie založený na výjimečné schopnosti biologicky aktivních látek vázat specificky a reverzibilně komplementární struktury, např. enzym – substrát, enzym – inhibitor, protilátka – antigen, hormon – receptor. Molekuly, které jsou takovýchto interakcí schopné, se nazývají afinitní ligandy. Biospecifické interakce zahrnují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce.

### 3.2.2 Princip chromatografického dělení

Ustanovení rovnováhy součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá = stacionární – má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti směsi. Druhá fáze je pohyblivá = mobilní – vymývá jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k dělení. Míra rozdělení závisí na rozsahu interakcí jednotlivých složek se stacionární fází. Interakce analytu s mobilní a stacionární fází může být ovlivňována změnami jak ve složení mobilní fáze tak použitím různých druhů stacionárních fází. Výsledkem je velmi široká rozmanitost chromatografických systémů se schopností snadné separace různých chemických směsí [16].

Separační účinnost HPLC závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší jsou jednotlivé částice, tím větší je účinná plocha a separační účinnost [5].

#### 3.2.2.1 Eluční parametry <sup>4</sup>

Od vnesení určité látky do vstupu kolony do okamžiku, kdy kolonu opustí a projeví se signálem detektoru, uplyne určitý čas, závislý na sorbovatelnosti látky v daném chromatografickém systému, a tedy na jejím druhu. Protože tento čas charakterizuje retenci, zadržování látky v koloně, označuje se jako retenční či eluční

---

<sup>4</sup> Kromě uvedených zdrojů čerpáno i ze zdroje [16].

čas. K eluci látky je zapotřebí, aby kolonou protekl určitý objem mobilní fáze – charakterizujeme jako retenční či eluční objem.

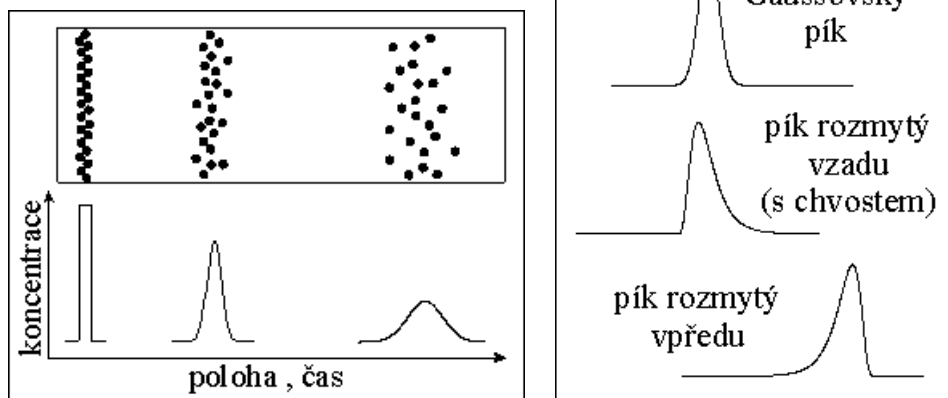
Detektor na výstupu kolony je spojen se záznamovým zařízením, který graficky registruje intenzitu odezvy detektoru v závislosti na čase. Tato závislost se charakterizuje jako chromatogram. Dokud detektorem protéká čistá mobilní fáze (eluent), registruje záznamové zařízení základní linii rovnoběžnou s osou x. Průchod zóny eluované látky detektorem vyvolává nárůst a opětný pokles signálu detektoru a tomu odpovídající maximum na chromatogramu, označené jako „pík.“

Retenční čas se z chromatogramu určuje jako průmět maxima píku na osu x. Pokud by látka nebyla vůbec sorbována nebo postupovala kolonou stejně rychle jako mobilní fáze, potom se její retenční čas označuje jako mrtvý čas => na výstupu z kolony se neobjeví žádná látka. Poměr retenčního a mrtvého času se označuje jako retenční faktor, může mít hodnotu 0 – 1. Je ale účelné, aby hodnota byla 0,2 – 0,8.

Výpočet retenčního faktoru: [17]

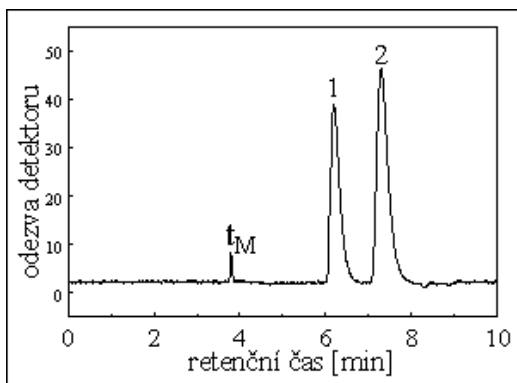
$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0} - 1$$

- k      retenční faktor
- $t_R$     retenční čas
- $t_0$     mrtvý čas



Obrázek 4: vlevo ukázka píku neboli eluční křivky, která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně, vpravo ukázka tvarů píků [11]





Obrázek 5: ukázka chromatogramu [11]

### 3.2.2.2 Asymetrie píků<sup>5</sup>

Asymetrie píku je obecně praktická veličina kvality chromatografické kolony. Asymetrie píku je nežádoucí, souvisí s účinností kolony a má negativní vliv na integraci píku, zvláště když je nízký poměr signál – šum. Existují dvě metody vyjádření asymetrie píku:

- faktor asymetrie  $A_s$ , který je vyjádřen jako poměr šířky píku vzestupné ( $t_p$ ) k sestupné části píku ( $f_p$ ) nejčastěji v 5 nebo 10 % výšky píku:

$$A_s = \frac{t_p}{f_p}$$

•

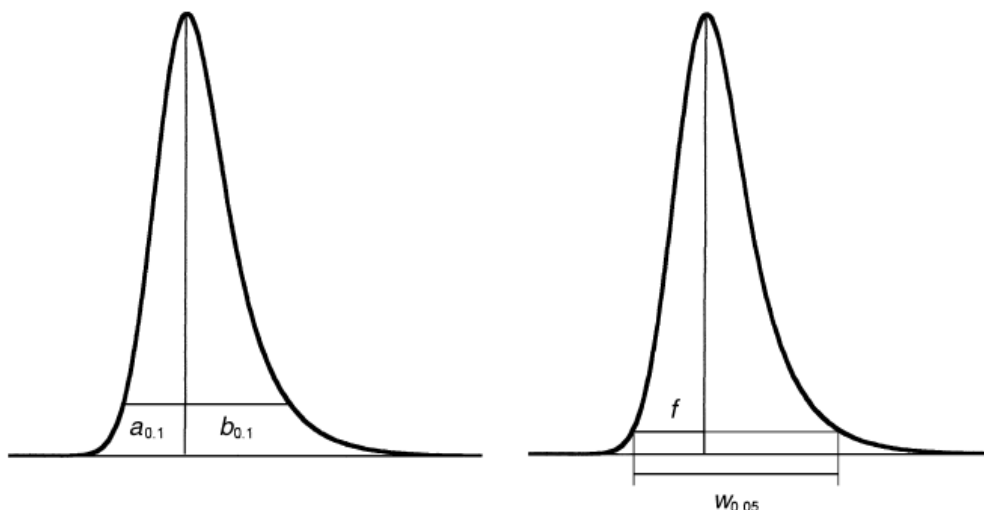
- tailing faktor  $T$ , který může být vyjádřen 2 způsoby: [17]

1) Linka je položena v 10-ti % výšce vrcholu, tím definující sekcí  $a_{0,1}$  a  $b_{0,1}$ . První popisuje vzdálenost od přední strany vrcholu k maximu, druhá popisuje vzdálenost od maxima konci vrcholu (viz levá strana obrázku č. 6).

2) Definice dle USP užívá linku v 5-ti % výšce vrcholu. První část je definovaná jako  $f$  a šíře vrcholu v 5% výši jako  $w_{0,05}$  (viz pravá strana obrázku č. 6).

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

<sup>5</sup> Kromě uvedených zdrojů čerpáno i ze zdroje [19].



Obrázek 6: způsoby popsání asymetrie píku [17]

V případě, že pík chvostuje, pak faktor asymetrie nebo tailing faktor je  $> 1$ . Chvostování má souvislost s netěsností v nástřikovém systému nebo s příliš dlouhou cestou mezi kolonou a detektorem [20]. V případě, že je faktor symetrie  $< 1$ , pak dochází k frontování píku. Frontování lze zdůvodnit kontaminací nebo degradací kolony nebo předkolony. K frontování může také docházet, pokud eluční síla solventu vzorku je příliš silná oproti eluční síle mobilní fáze [20].

### 3.2.2.3 Rozlišení chromatografických píků <sup>6</sup>

Rozdělení dvou sousedních analytů může být dokonalé nebo nedokonalé.

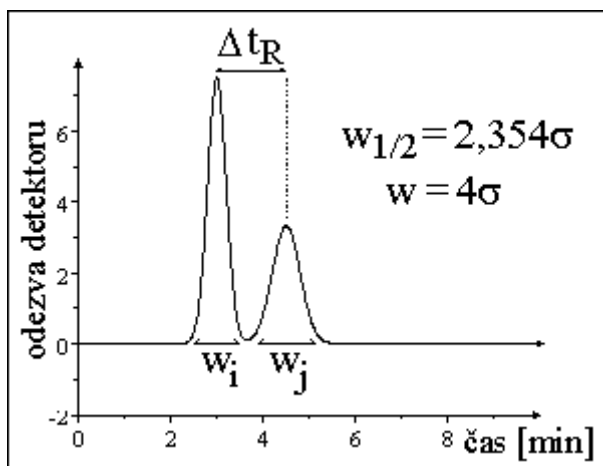
Rozlišení charakterizuje míru relativní separace popř. míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků.

$$R = \frac{2(t_R - t_{R'})}{W + W'}$$

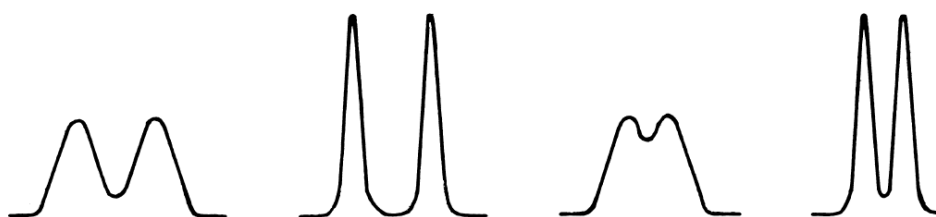
$t_R$  retenční čas složek (min)

$W$  šířka píku na základně

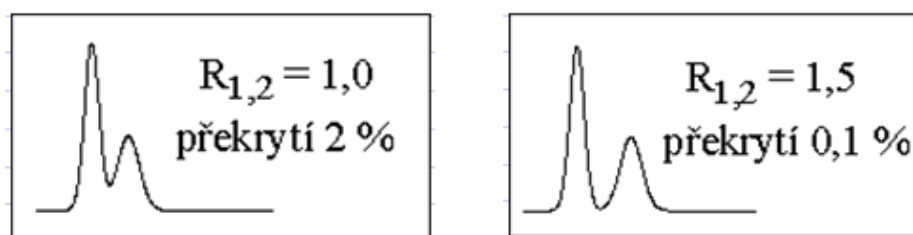
<sup>6</sup> Kromě uvedených zdrojů text čerpán i ze zdroje [11].



Obrázek 7: ukázka výpočtu rozlišení chromatografických píkú [11]



Obrázek 8: ukázka míry rozlišení píkú [17]



Obrázek 9: ukázka míry rozlišení píkú [11]

Faktory ovlivňující rozlišení: [9, 11]

*Faktor účinnosti:*

- Rychlost toku mobilní fáze
- Délka kolony
- Průměr zrna, teplota, viskozita

*Faktor selektivity:*

- Změna stacionární fáze
- Změna mobilní fáze
- Rychlost toku mobilní fáze

*Faktor kapacity:*

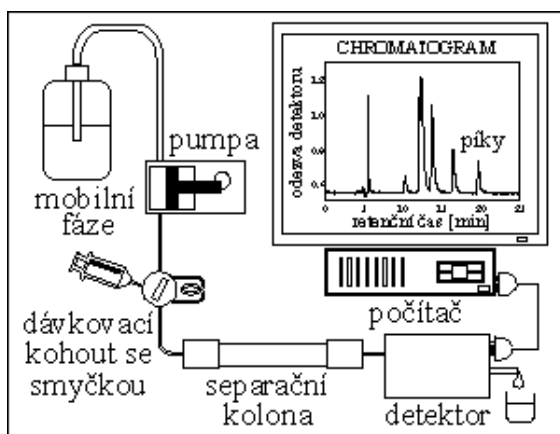
- a) Množství stacionární fáze v koloně
- b) Změna stacionární nebo mobilní fáze
- c) Teplota (v LC malý vliv)

### 3.2.3 Schéma kapalinového chromatografu <sup>7</sup>

Ze zásobníku přichází mobilní fáze přes filtr do čerpadla, schopného vyvíjet tlak až okolo 40 MPa. Zpravidla jde o pístové čerpadlo. Tlak se kontroluje manometrem. Zabezpečení dokonalé plynulosti toku mobilní fáze je důležité pro detekci (zamezení šumu).

Na vstupu do kolony je umístěn dávkovač vzorku. Nástřik vzorku se provádí buď mikrostříkačkou, pomocí dávkovacího kohoutu nebo pomocí autosampleru.

Na výstupu kolony je připojen průtokový detektor. Signál detektoru je snímán a registrován buď zapisovačem, nebo integrátorem. V dnešní době jsou většinou data zpracovávána počítačem.



Obrázek 10: schéma kapalinového chromatografu [11]

<sup>7</sup> Čerpáno kromě uvedených zdrojů také ze zdrojů [11, 23].

V kapalinové chromatografii se využívá dvou modů čerpání mobilních fází:

a) Izokratický, kdy je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková předem smíchaná), alternativně lze čerpat zároveň ze dvou až čtyř rezervoárů při konstantním poměru složek a konstantním průtoku

b) Gradientový mód, kdy v průběhu jedné analýzy lze programovaně měnit složení i průtok mobilní fáze. Kvalitní chromatografické zařízení synchronizuje činnost ventilů a čerpadel tak, aby gradientový profil byl reprodukovatelný [24].

### 3.2.3.1 Detektory<sup>8</sup>

V metodě HPLC je dostupná celá řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem [7]. Lze je rozdělit do dvou skupin:

1. selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluentu

2. univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti eluentu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty

Na detektory jsou kladeny určité požadavky:

- možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost)
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah)

- vysoká citlivost a nízkou úroveň šumu
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón co nejmenší
- umožnit gradientovou eluci

V praxi takový detektor neexistuje a různé typy detektorů se jednotlivým požadavkům víceméně přibližují. Jednotlivé typy detektorů jsou uvedeny v tabulce 1.

---

<sup>8</sup> Kromě uvedených zdrojů čerpáno i ze zdrojů [13,19, 25].

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	CORONA	ELSD
typ detektoru	n	n	n	n	d	n	d	d
odezva	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivost	elektrický proud	rozptyl světla
typická citlivost (hmotnost/ml)	µg	ng	µg	pg	pg	ng	ng	µg
lineární rozsah	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 <sup>-4</sup> jed. ind. lomu)	nízká	nízká	nízká	vysoká (1,5%)	vysoká (2%)	nízká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano částečně

Pozn.: **n** – nedestruktivní, **d** – destruktivní

Tabulka 1: charakteristika detektorů [19]

❖ Refraktometrický detektor registruje změny indexu lomu eluátu. Detektor je tím citlivější, čím větší rozdíl je mezi indexem lomu analytu a rozpouštědla. Refraktometrický detektor nelze použít při gradientové eluci. Významnou předností je zde univerzálnost. Nevýhodou je závislost indexu lomu na teplotě.

Využitelnost toho detektoru spočívá zejména v kvantitativní analýze polymerů.

❖ Fluorescenční detektor je velice citlivý selektivní detektor (pikogramy analytu). Je použitelný pouze pro látky přímo fluoreskující nebo fluoreskující po derivatizaci. Mobilní fáze nesmí obsahovat zlášče fluorescence. Intenzita fluorescence se měří ve směru kolmém k paprsku primárního záření.

❖ Spektrofotometr s diodovým polem snímá celé absorpční spektrum eluátu každou sekundu bez přerušení chromatografické separace. Umožňuje ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňuje porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter, vypočítává čistotu píku (identifikace látky) [11]. Výsledkem je 3D obraz: závislost absorbance na vlnové délce a čase [5].

❖ Použití IR spektrometrických detektorů je omezené. Využití nachází detektor na bázi IR spektrometru s Fourierovou transformací.

❖ Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze). Množství aplikací pro elektrochemickou detekci není příliš velké, ale látky, na které se aplikuje elektrochemická detekce, reprezentují velké množství důležitých léčiv, polutantů a přírodních produktů.

Podle podmínek měření elektrolytických metod se rozdělují elektrolytické metody na metody potenciostatické, kdy se měří při konstantním potenciálu pracovní elektrody a metody amperostatické, kdy se měří za konstantního proudu.

❖ Spektrofotometrický detektor je nejvíce používaný. Je založen na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy ( $l$ ), koncentrací absorbující složky ( $c$ ) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance ( $A$ ):

$$A = \varepsilon c l$$

kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient ( $l/mol/cm$ ). [11]

❖ Vodivostní detektory patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. Konstrukčně je tento typ detektoru nenáročný a celu detektoru lze miniaturizovat na objemy menší než 5  $\mu$ l. U vodivostního detektoru jsou kladené vysoké nároky na mobilní fázi, která by měla být pokud možno nevodivá, musí ovšem chromatografovaná látka dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu. Těmto podmínkám vyhovuje redestilovaná voda, popřípadě i s příměsí polárních organických rozpouštědel. V případě použití pufrů jako mobilní fáze se drasticky změní vodivost mobilní fáze a nepatrné zvýšení vodivosti v důsledku přítomnosti malého množství iontu vycházejícího z kolony detektor neumožňuje zaznamenat.

Vodivostní detektory se uplatňují nejvíce v iontové chromatografii, kdy se používá kolon plněných ionexy s nízkou kapacitou, které umožňují použití mobilní fáze s nízkým obsahem elektrolytů ( $mmol.l^{-1}$ ).

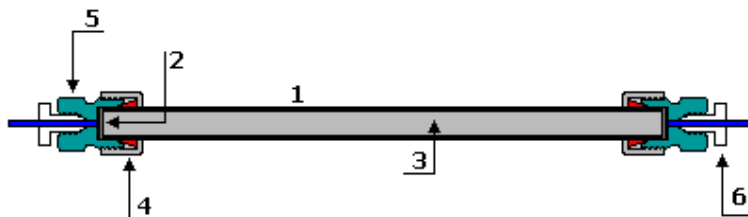
### 3.2.3.2 Kolony<sup>9</sup>

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony má za úkol udržet pohromadě stacionární fázi, má splňovat určité požadavky:

- musí být chemicky inertní
- musí odolávat poměrně vysokým tlakům
- vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty (PEEK) nebo sklo. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z:

- (1) kovového pláště
- (2) porézní kovové frity-uzavírá plášť
- (3) stacionární fáze
- (4) ochranného kroužku
- (5) koncové hlavice
- (6) vstupu pro kapiláru se šroubem



Obrázek 11: schéma kolony [19]



Obrázek 12: ukázka chromatografických kolon [22]

<sup>9</sup> Kromě uvedených zdrojů čerpáno i ze zdroje [19].



Nejčastější rozměry chromatografických kolon, které jsou komerčně dodávány, jsou 50 mm, 75 mm, 100 mm, 125 mm, 150 mm, 250 mm a 300 mm o vnitřním průměru 2 mm až 5 mm. Chromatografické kolony se dodávají v současné době jako klasické kovové kolony nebo kovové kolony typu „cartridge“ a při skladování a transportu jsou plněné mobilní fází (viz tabulka 2).

<b>Kolona</b>	<b>Mobilní fáze</b>
Silikagel	Hexan/acetonitril
C <sub>8</sub> ,C <sub>18</sub>	Acetonitril/voda (methanol/voda)
NH <sub>2</sub>	Dichlormethan/methanol
CN (normální fáze)	Hexan
CN (reverzní fáze)	Acetonitril/síran amonný (0,05 mol/l)
Fenyl	Acetonitril/voda

Tabulka 2: typy kolon a jejich uchovávání

### **3.2.3.2.1 Životnost kolony**

*Životnost* chromatografické kolony závisí na několika aspektech a příčiny nízké životnosti chromatografické kolony může mít několik příčin:

#### *1. Typu a druhu vzorku.*

Ve vzorku mohou být přítomny kontaminanty, které se silně adsorbují na sorbent a snižují tak separační účinnost kolony. Rovněž mohou být ve vzorku (extraktu vzorku) přítomny mechanické nebo koloidní částice, které neprojdou kolonou, zvyšují tak zpětný tlak na koloně a snižují její účinnost. V obou těchto případech se musíme soustředit na úpravu přípravy extraktu vzorku (SPE, filtrace nebo odstředění extraktu). Řešením je rovněž použití předkolony. K odstranění silně se adsorbujících nečistot existují promývací programy.

## 2. Slabá mechanická odolnost sorbentu.

To může být zapříčiněno nešetrným zacházením s kolonou během výroby, transportu nebo v laboratoři. K rozpoznání této příčiny by měla být k dispozici v laboratoři „porovnávací kolona“, se kterou se srovnávají některé chromatografické parametry (kapacitní poměr  $k$  testovaných látek, retenční poměr (selektivita) a vybraných látek, rozlišení  $R_{1,2}$ , počet teoretických pater  $N$ , tailing faktor  $T$ ).

## 3. Práce v extrémních oblastech pH.

U běžných typů kolon na reverzní fázi se rozmezí pH pohybuje od 2 do 8. Při použití fosfátových pufrů pH 8 na normální i reverzní fázi, zejména v kombinaci za vyšší teploty však dochází k výraznému snížení životnosti kolony – dochází k rozpouštění nosiče – většinou silikagelu. Pro vysoké teploty je před fosfátovými pufrů preferován pufr TRIS a pracovní pH 7.

Obecně:

Při  $\text{pH} < 2,5$  dochází k hydrolyze silikagelu což se projeví snížením retenčního času a dochází ke snižování životnosti kolony. V tomto případě je lepší použití polymerních kolon nebo speciálních kolon určených k tomuto účelu (např. X-terra, ZORBAX Extend-C18).

Při  $\text{pH} > 7,0$  se silikagel začíná již rozpouštět a dochází ke snížení účinnosti kolony (vlivem zvýšení mrtvého objemu kolony), dochází ke snížení retenčního času, zpětný tlak na koloně vzrůstá. V tomto případě je lepší použití např. polymerních kolon, jak již bylo uvedeno výše. V případě, že není polymerní kolonu možné použít (např. z důvodu nižší účinnosti) je možné použít tzv. presaturační kolonu k prodloužení životnosti analytické kolony. Presaturační kolona (Pre-Sat) se zařazuje mezi HPLC pumpu a nástřikové zařízení. Poněvadž je mobilní fáze pak saturována silikagelem, který se uvolňuje z presaturační kolony, rozpouštění silikagelu v analytické koloně je sníženo na minimum.

Rozpustnost silikagelu při vyšším pH mobilní fáze vedlo k vývoji alternativních HPLC kolon na bázi oxidů kovů (oxidu titaničitého, oxidu hlinitého), ale zejména oxidu zirkoničitého.

K prodloužení životnosti analytické kolony je třeba předcházet znečištění kolony kontaminanty, a proto je vhodné vždy používat rozpouštědla čistoty HPLC a věnovat zvýšenou pozornost přípravě mobilní fáze i vzorku (zařadit purifikační kroky do přípravy roztoku vzorku)!

### 3.2.3.2 Uchovávání kolon

Při **uchovávání** kolon, které se nepoužívají déle jak 72 hodin, by se mělo postupovat podle následujících doporučení:

- ✓ Nikdy nenechávat kolonu vyschnout, vždy ji uchovávat naplněnou doporučenou mobilní fází, zásadně ne pufrem.

- ✓ Kolonu s reverzní fází je nejlépe uchovávat naplněnou 10 % vodným roztokem isopropanolu, který zabraňuje mikrobakteriálnímu růstu, acetonitrilem nebo methanolem.

- ✓ Kolonu uchovávat uzavřenou originálními uzávěrkami a na suchém, ale ne příliš teplém místě.

- ✓ Chránit kolonu před vibracemi a nárazy.

- ✓ Po každé analýze kolonu propláchnout mobilní fází o vysoké eluční síle (reverzní fáze – methanol, acetonitril, normální fáze – hexan/acetonitril) a poté kolonu naplnit mobilní fází, pod kterou se bude kolona uchovávat. Při použití pufrů (na reverzní fází) neopomenout nejprve propláchnout kolonu vodou nebo mobilní fází methanol/voda (30+70 maximálně 50+50), v opačném případě může dojít k vysrážení pufrů v systému!

Kolona se používá podle typu náplně. Obecně lze říci, že u běžných typů kolon na normální a reverzní fází se rozmezí pH pohybuje od 2 do 8, při iontové chromatografii je rozmezí pH daleko širší a pohybuje se od pH 2 – 12. Při použití fosfátových pufrů pH 8 na normální i reverzní fází, zejména v kombinaci za vyšší teploty však dochází k výraznému snížení životnosti kolony – dochází k rozpouštění silikagelu. Pro vysoké teploty je před fosfátovými pufrů preferován pufr TRIS a pracovní pH 7. Pracovní tlak na chromatografické koloně by neměl překročit 40 MPa.

### 3.2.3.2.3 Účinnost kolony

**Účinnost** kolony charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek na koloně rozšiřují. Mírou účinnosti chromatografické kolony je: [11]

a) **počet teoretických pater dané kolony:** [12, 17, 26]

Teoretické patro  $N$  je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, tato délka se nazývá výškový ekvivalent teoretického patra HETP.



$N$  počet teoretických pater

$t_r$  retenční čas (min)

$w_b$  šířka píku při základně

$w_{1/2}$  pík s poloviční výškou

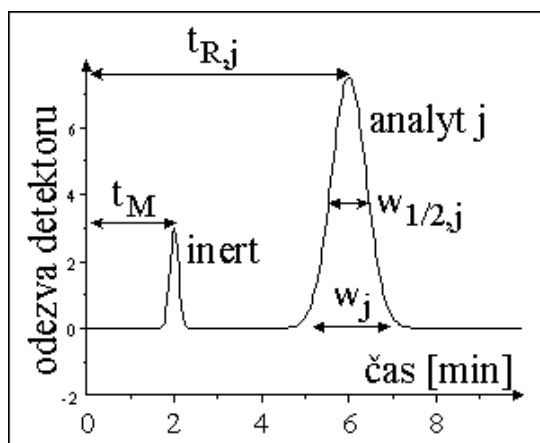
b) **výškový ekvivalent teoretického patra:** [17, 26]

**HETP**

HETP výškový ekvivalent teoretického patra

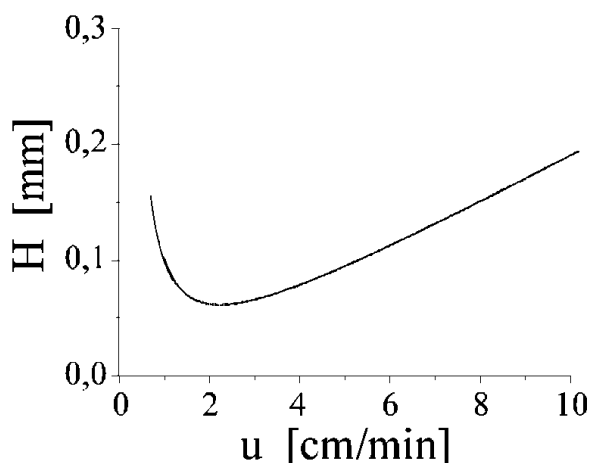
$L$  délka kolony

$n$  číslo teoretického patra



Obrázek 13: ukázka výpočtu míry účinnosti kolony [11]

Kolona je tím účinnější, čím má více teoretických pater a čím menší výškový ekvivalent teoretického patra.



Obrázek 14: závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze (u); minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které daná kolona vykazuje největší účinnost, a tedy minimálně rozšiřuje zóny analytů [11]

### 3.2.4 Trendy v kapalinové chromatografii <sup>10</sup>

Každoročně se v USA koná významná konference Pittcon, kde jsou představovány nejnovější výrobky a inovace v oblasti analytické chemie. Jedná se o největší výstavu svého druhu na světě. V rámci výstavy je věnován značný prostor také separačním technikám. Na základě poznatků z konference konané v roce 2005 lze stručně shrnout současné trendy v oblasti vysokoúčinné chromatografie do několika následujících bodů:

- zkracování kolon a zmenšování velikosti částic sorbentu,
- používání kolon s menším vnitřním průměrem, tj. mikro a kapilárních kolon,
- komplexní miniaturizace celých separačních systémů,
- důraz na automatizaci analýz,

<sup>10</sup>

Text byl čerpán mimo uvedené zdroje i ze zdroje [27].

- využití ultravysokých tlaků v chromatografii,
- stále rostoucí význam techniky LC-MS

V posledních letech je patrná silná tendence ke zmenšování rozměrů zrn/částic sorbentů. Před deseti lety byly nejpoužívanější stacionární fáze 5  $\mu\text{m}$ , dnes jsou nejrozšířenější fáze 3  $\mu\text{m}$ . Stále běžněji jsou komerčně dostupné i sorbenty s velikostí částic pod 2  $\mu\text{m}$ . Zmenšování sorbentu souvisí se zkracováním chromatografických kolon. Výsledkem je podstatné zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi provedenými na kolonách tradiční délky (25 cm) plněných 5  $\mu\text{m}$  sorbentem. Doby analýz na krátkých kolonách (5 cm, 2 cm i menších) určených pro tzv. rychlou chromatografii bývají kolem 1 až 2 minut. Tyto kolony jsou s výhodou užívány zejména pro tzv. vysokoprostupné (high-throughput) analýzy v oblastech, kde jsou denně zpracovávány stovky a tisíce vzorků. Jako příklad lze vést chromatografickou analýzu kombinatoriálních knihoven. Krátké kolony se ale začínají prosazovat i v běžných chromatografických aplikacích a celá řada firem poskytuje rostoucí sortiment kolon těchto nových formátů. Vedle zkracování kolon dochází postupně také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Tradiční průměr analytických kolon 4,6 mm je postupně opouštěn a nahrazován dnes již běžnějšími průměry kolem 3–4 mm.

S nástupem techniky LC-MS vzrostla popularita kolon o průměru 2 mm a menším. Tento trend souvisí nejen se snahou o zrychlení analýz, ale také s úsilím o zlepšení ekonomiky provozu chromatografických laboratoří a v neposlední řadě i s hledisky ekologickými. Spotřeba mobilních fází, obvykle obsahujících organická rozpouštědla, a množství vznikajících odpadů může být tímto způsobem řádově sníženo. Navíc nově se rozvíjející obory, např. proteomika, vyžadují provádění separací v kolonách kapilárních a menších, protože množství vzorků bývají velmi malá a nároky na mez detekce vysoké. Splnění těchto požadavků klade velké nároky nejen na vývoj stále lepších sorbentů, ale i instrumentálních systémů. Čerpadla mobilní fáze musí generovat potřebné tlaky, mimokolonové objemy je třeba minimalizovat stejně jako rozměry detekčních cel, příslušné časové konstanty musí být sníženy apod.

V rámci trendů v HPLC můžeme také upozornit na první komerční systém pro ultra-účinnou kapalinovou chromatografii (UPLC) schopný generovat tlaky kolem 100 MPa (Waters), který byl představen na výstavě Pittcon 2005. Pozoruhodný je také

první komerční HPLC čip s LC-MS rozhraním (Agilent technologies), který využívá mikrofluidní technologii a integruje na ploše menší než kreditní karta obohacovací kolonu, analytickou kolonu, šesticečný ventil, elektrosprejovou jehlu, elektrické kontakty a identifikační mikročip.

Je zřejmé, že právě miniaturizace je v současnosti jedním z hlavních směrů v oblasti separačních technik, kde se otevírá obrovské pole působnosti nejen pro další rozvoj instrumentace, ale i vývoj nových stacionárních fází.

Pokud se jedná o separační mody HPLC, je možno konstatovat, že dělení na reverzních fázích (RP) je stále nejrozšířenější technikou, přitom dominantní postavení mají již tradičně partikulární vázané fáze na bázi silikagelu.

Ze silikagelových RP jsou dlouhodobě nejpopulárnější C18 modifikace s tím, že tyto fáze představovaly kolem 50 % všech RP kolon nově uváděných na trh v roce 2005.

S velkým odstupem následují modifikace C8 (13 %), fluorované fáze, alkylované fáze s řetězcí delšími než 18 uhlíků, fenylové fáze, fáze se zabudovanou polární funkční skupinou, C4 modifikace a další. Vedle silikagelových partikulárních sorbentů se v moderní RP-HPLC stále více prosazují materiály nové, jako např. anorganicko-organické hybridy a modifikované oxidy kovů. Velmi perspektivní jsou také monolitické kolony.

#### Současné trendy ve vývoji HPLC sorbentů

Ačkoliv vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří ke zralým analytickým technikám, tempo vývoje sorbentů rozhodně nepolevuje a na trh jsou uváděny stále pokročilejší materiály s lepšími vlastnostmi. Tyto inovace přinášejí nejen nové chemické modifikace na stávajících maticích, ale také využití modernějších matic a změny vlastního formátu separačního lože.

#### **Porézní sorbenty:**

**Porézní sorbenty si zachovávají dlouhodobě dominantní postavení v HPLC. Začátkem sedmdesátých let byl připraven mikropartikulární silikagel s velikostí zrn menší než 10  $\mu\text{m}$ . Brzy poté byly připraveny jeho první chemicky modifikované formy, včetně reverzní fáze. Zpočátku byly částice silikagelu nepravidelného tvaru,**

ale postupně se podařilo zvládnout technologii výroby vedoucí ke sférickým částicím, a tak zlepšit separační účinnost, ale i další vlastnosti výsledných sorbentů.

Jedním z cílů při vývoji nových chromatografických sorbentů vždy bylo dosažení vysoké separační účinnosti, která úzce souvisí s morfologií porézních částic. Většina povrchu typických porézních sorbentů je tvořena difuzivními póry. Zmenšení velikosti částic sorbentu zlepšuje inter i intrapartikulární přenos hmoty. V porézní částici putuje solut z pohybující se mobilní fáze do stagnantní mobilní fáze, a pak do stacionární fáze uvnitř pórů, kde dochází k jeho interakci. Následně se analyt uvolní ze stacionární fáze a musí difundovat zpět do pohybující se mobilní fáze. Tímto mnohonásobně se opakujícím procesem analyt postupuje kolonou. V případě použití malých zrn sorbentu je difuzní proces rychlejší. Pomalý přenos hmoty ve stacionární fázi bývá hlavní příčinou malé separační účinnosti spojené s rozšiřováním píků a následně nedostatečným chromatografickým rozlišením. Výroba sférických plně porézních částic řízené velikosti (a s úzkou distribucí) je v současnosti dobře zvládnuta. Jak bylo výše uvedeno, v oblasti porézních částic jsme v současnosti svědky pokračujícího trendu, který byl nastartován již v 90. letech, tedy zmenšování velikosti sorbentu, zkracování, a také zmenšování průměru kolon.

Neporézní a povrchově porézní sorbenty:

Snaha o urychlení přenosu hmoty ve stacionární fázi vedla k vývoji neporézních materiálů. Lze je rozdělit na neporézní silikagelové a neporézní polymerní částice. Neporézní sorbenty připomínají chromatografické náplně užívané v počátcích HPLC, liší se však velikostí. Současné neporézní částice mají rozměry kolem 2  $\mu\text{m}$ . Vlastní stacionární fáze je nanášena ve velice tenké vrstvě na povrchu neprostupné mikročástice. Přenos hmoty ve stacionární fázi je velmi rychlý a vysoké účinnosti jsou dosahovány i při velkých průtocích mobilní fáze nejen při dělení malých molekul, ale i syntetických polymerů a biomakromolekul. Nevýhodou těchto materiálů je jejich malá sorpční kapacita v důsledku značně omezené velikosti povrchu stacionární fáze. Uvedené sorbenty lze snadno přetížit, a proto nejsou vhodné pro preparativní dělení. Navíc vzhledem k malým rozměrům částic sorbentu se na kolonách generuje vysoký tlak, podstatně vyšší než na mikropartikulárních plně porézních sorbentech s velikostí 5  $\mu\text{m}$ .



Povrchově porézní sorbenty jsou podobné neporézním, ale neprostupné jádro bývá větší, kolem 5  $\mu\text{m}$ , a vrstva stacionární fáze silnější. Tlaky na koloně plněné těmito materiály jsou tedy nižší než na kolonách s neporézními sorbenty, naopak sorpční kapacita je větší, a přitom dosahované účinnosti bývají lepší než na plně porézních materiálech.

#### Perfuzní sorbenty:

Perfuzní sorbenty byly vyvinuty Afeyanem, Regnierem a spol. a komercializovány firmou Perseprive Biosystems (Massachusetts, USA) koncem 80. let. Uvedené sorbenty jsou určeny především pro separace biomakromolekul. Na rozdíl od konvenčních porézních materiálů obsahují perfuzní sorbenty dva typy pórů: difuzivní a tzv. „through pores“. Difuzivní póry jsou analogické jako u běžných porézních sorbentů a zajišťují dostatečnou sorpční kapacitu materiálu, protože většina povrchu sorbentu je tvořena právě těmito póry. „Through pores“ jsou řádově větších rozměrů a díky nim část mobilní fáze prochází přímo zrna sorbentu. Tak se vytváří konvektivní proudění uvnitř částic a výrazně se zrychluje přenos hmoty ve stacionární fázi.

Výsledkem je vysoká separační účinnost i při rychlých analýzách makromolekul.

Komerční perfuzní materiály jsou polymerní sorbenty poněkud větších rozměrů než v současnosti vyráběné porézní stacionární fáze, běžně nad 12  $\mu\text{m}$ . Jejich velkou předností je nejen vysoká separační účinnost, ale i dobrá rigidita při značných průtokových rychlostech mobilní fáze.

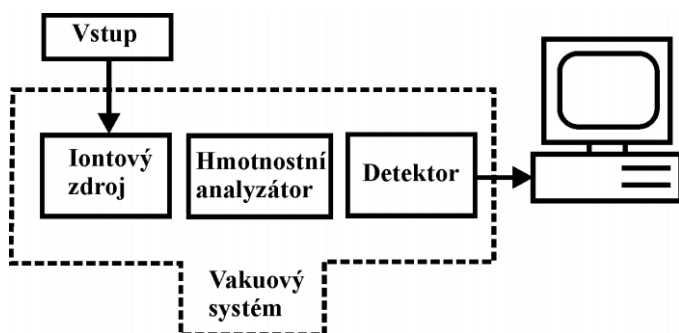
#### Monolity:

Na rozdíl od partikulárních sorbentů, kdy je chromatografická kolona naplněna velkým množstvím jednotlivých zrn vhodného materiálu, monolitická kolona obsahuje pouze jeden blok zhotovený z porézní hmoty. Podobně jako u perfuzních sorbentů monolity obsahují dva typy pórů odlišných velikostí (viz perfuzní sorbenty). Rozdíl ovšem spočívá v tom, že monolitem prochází všechna mobilní fáze, čímž je dosaženo ještě rychlejšího přenosu hmoty. Monolitické kolony se velmi rychle prosazují všude tam, kde je třeba provádět rychlé a ultra rychlé separace. Vzhledem k velké sorpční kapacitě jsou velmi dobře použitelné pro dělení v preparativním měřítku. Současně s tím mají také vynikající předpoklady pro aplikace v

mikroměřítku. Mohou být zhotoveny v nejrůznějších geometriích. Jejich příprava, zvláště rigidních polymerních monolitů, je přitom mimořádně jednoduchá. V současné době se velmi rychle prosazují i komerčně.

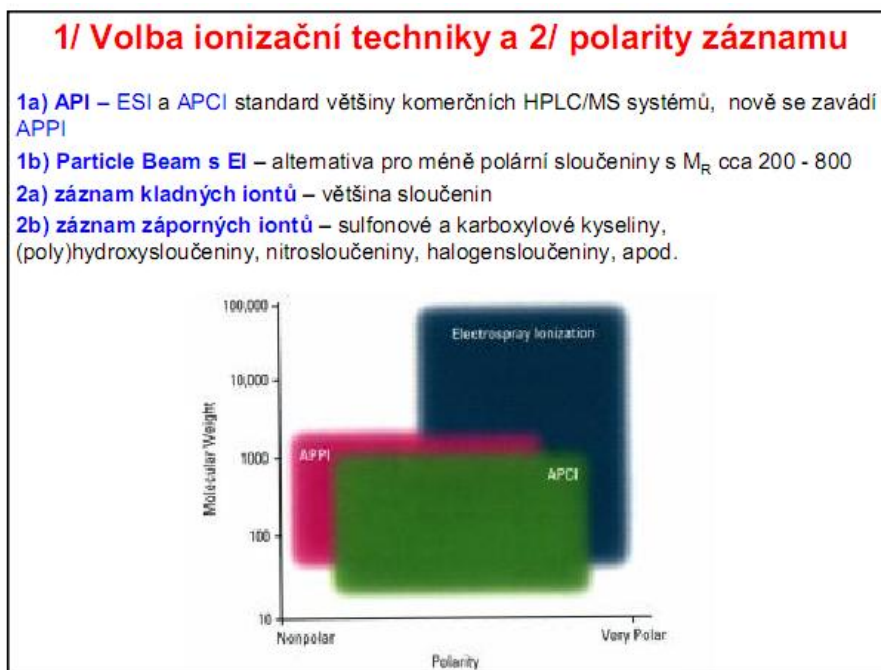
### HPLC-MS:

HPLC-MS je tandemová technika, kombinuje separační sílu HPLC s detekční silou MS. Umožňuje stanovit molekulovou hmotnost komponent analyzované směsi a během dalšího následného štěpení molekulového iontu rekonstruovat (na základě vzniku fragmentů) strukturu původní analyzované molekuly. HPLC separuje komponenty analyzované směsi, které vstupují v izolovaných koncentračních zónách do rozhraní mezi HPLC a hmotnostním spektrometrem. Zde se eliminují různými technikami nežádoucí složky mobilní fáze, dochází k desorpci molekul analytů z mobilní fáze do plynné, kde jsou ionizovány. Vzniklé ionty jsou přenášeny k optice hmotnostního spektrometru, kde jsou separovány na základě rozdílného poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a nakonec jsou izolované ionty detekovány [28].



Obrázek 15: blokové schéma hmotnostního spektrometru [8]

Existuje mnoho způsobů ionizace analytu. Některé jsou specifické pro určité typy látek, jiné více univerzální. Volba ionizační techniky je ovlivněna těkavostí látky (pro těkavé látky jsou vhodné EI, CI, FI), tepelnou stabilitou látky (pro termolabilní látky je vhodná ESI), molekulovou hmotností látky (APCI, ESI, MALDI,...) a polaritou látky (pro nepolární oblast je vhodnější APCI, pro polární oblast naopak ESI) [28].



Obrázek 16: volba ionizační techniky a polarity záznamu [16]

Nejpoužívanější způsoby ionizace ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace a desorpce laserem za účasti matrice (MALDI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

K separaci iontů podle poměru hmotnosti a náboje dochází v hmotnostním analyzátoru. Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů:

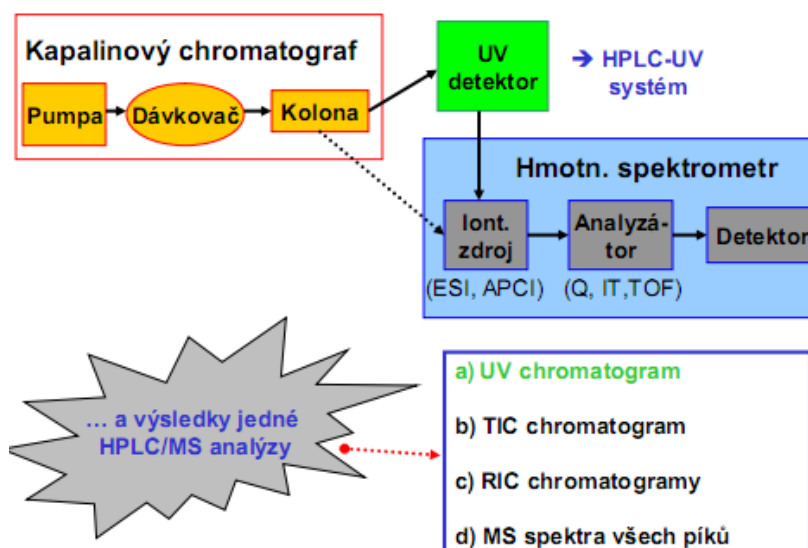
Magnetický analyzátor – v magnetickém poli dochází k zakřivení dráhy iontů, které jsou závislé na hodnotě  $m/z$  ( $m/z$  je úměrné druhé mocnině poloměru dráhy iontu).

Kvadrupólový analyzátor – v daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitý poměr  $m/z$  a tento iont projde tímto analyzátozem. Ionty s jinými hodnotami mají nestabilní oscilace a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, změnou napětí postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami  $m/z$ .

Iontová past – opakované selektivní vypuzení iontů podle hodnoty  $m/z$  z iontové pasti na detektor, možnost  $MS^n$  analýzy.

Průletový analyzátor – urychlené ionty se pohybují různou rychlostí v závislosti na  $m/z$  (menší ionty se pohybují rychleji).

Jak je patrné, HPLC – MS analýzy mají vyšší informační hodnotu než samotná analýza pomocí HPLC. Výsledkem jedné analýzy je pak nejen chromatografický záznam s UV detekcí, ale také hmotnostní spektra všech sledovaných píků a tzv. RIC (reconstructed ion current) a TIC (total ion current) chromatogram, které slouží především k odhalení píků šumu a tím vedou ke zvýšení selektivity a spolehlivosti metody [28].



Obrázek 17: schéma spojení HPLC s MS, výsledky analýzy spojených technik [28]

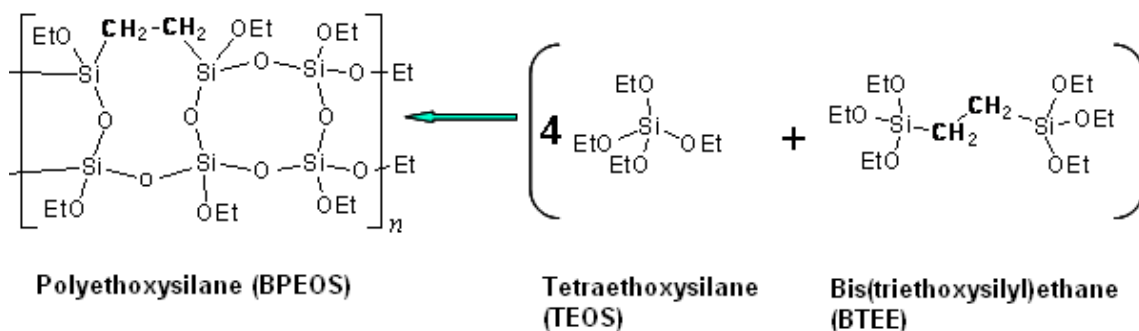
#### UPLC: [29]

Ultra Performance Liquid Chromatography - je novou separační technikou v oblasti kapalinové chromatografie. Separační proces využívá sorbentů připravených patentovanou technologií „bridged hybrid particle“, které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků (15 000 psi, 1000 bar, 100 MPa).

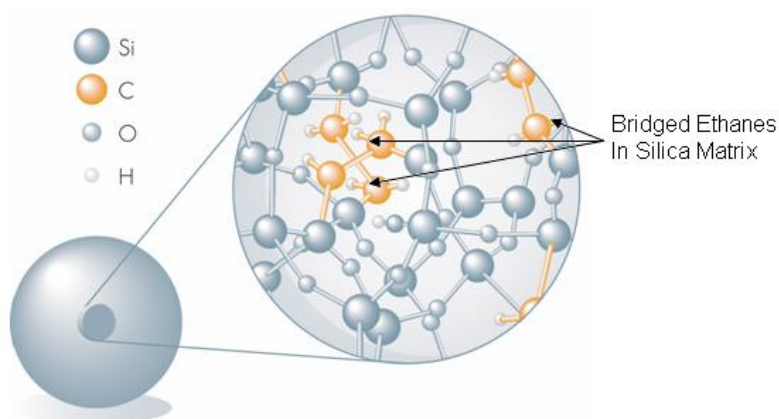
UPLC přináší řadu předností oproti klasické HPLC technice:

- kratší doba analýzy = vyšší průchodnost vzorků (vyšší produktivita)
- snížení nákladů (menší spotřeba HPLC rozpouštědel)
- zvýšení separační účinnosti
- snížení meze detekce; zvýšení citlivosti
- více kvalitativních informací

Díky technologii „bridged hybrid particle“ dochází zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení jeho mechanické odolnosti (je použito tzv. ethylenových můstků).



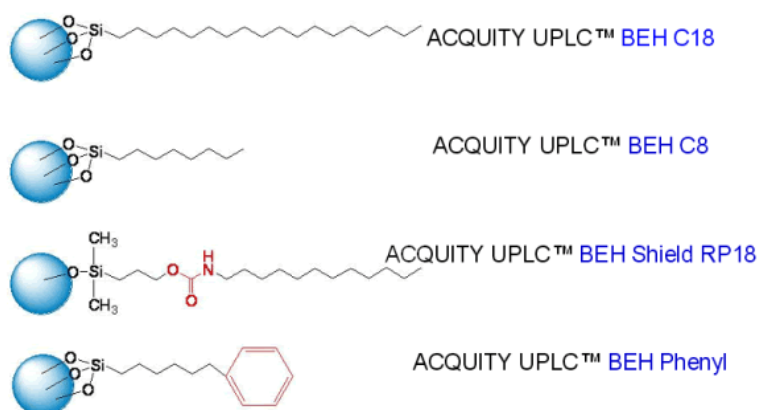
Obrázek 18: ethylenové můstky



Obrázek 19: umístění ethylenových můstků v matici silikagelového nosiče

Velikost částic UPLC se pohybuje okolo 1,7  $\mu\text{m}$ , což je optimální velikost pro UPLC, další snižování velikosti částic vede pouze ke zvyšování zpětného tlaku a zvýšení účinnosti je již zanedbatelné.

Pro UPLC kolony (ACQUITY UPLC BEH C18) jsou v současné době k dispozici 4 druhy stacionárních fází: C18 a C8, Shield RP18 (C18 se zabudovanou polární skupinou - karbamát) a fenylovou kolonou. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem.



Obrázek 20: struktura jednotlivých typů stacionárních fází pro UPLC

Pro snažší sledování životního cyklu kolon jsou kolony standardně vybaveny neodnímatelným mikročipem, který pomocí technologie eCord™ zaznamenává kompletní historii kolony:

- ✓ celkový počet nástřiků
- ✓ provedené nástřiky
- ✓ tlaková historie kolony
- ✓ data ze Systemu Suitability testů

Přenos metod mezi HPLC a UPLC je velmi jednoduchý, protože v UPLC jsou zachovány stejné mechanismy separace a chromatografické principy jako v HPLC, přičemž dojde ke zlepšení citlivosti, rozlišení a k urychlení analýzy. Při přenosu metody je tedy nutné použít menší průtokovou rychlost, zvýšit rychlost odběru dat a snížit objem vzorku dávkovaného na chromatografickou kolonu.

#### Kapilární elektrochromatografie: [30]

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je vysokoúčinná separační metoda, založená na spojení kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární zónové elektroforézy (CZE). Zatímco HPLC využívá ke generování toku rozdílu tlaku, v CEC je pohyb kapalně mobilní fáze zprostředkován elektrickým polem, které způsobuje elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF). CEC si přitom zachovává výhody obou metod ze kterých vzešla: vyšší účinnost a jednoduchost instrumentace pocházející z CZE a vyšší selektivitu a kapacitu kolony danou interakcí se

stacionární fází jako v HPLC. K separaci analytů dochází u CEC převážně dvojitým mechanismem. Elektroneutrální i ionizované látky jsou, stejně jako v chromatografii, separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází, respektive na základě síťového efektu v případě gelové permeační chromatografie. Látky ionizované se navíc pohybují v elektrickém poli rychlostí, danou jejich efektivními mobilitami, což také přispívá k větší selektivitě vlastní separace.

### 3.2.5 Druhy analytických kolon <sup>11</sup>

*HPLC kolony dělíme podle použití na:*

- analytické
- preparativní
- mikrokolony

*Podle sorbentu je dělíme na:*

- s normální fází (stacionární fáze je polární, mobilní fáze je nepolární – chloroform, methylenchlorid, hexan, heptan.)
- s reverzní fází (mobilní fáze je polární – methanol, voda, acetonitril a stacionární fáze je nepolární)
- další

Čím obsahuje sorbent menší částice SF, tím je vyšší tlak a vyšší dělicí schopnost.

Pro dosažení vhodného oddělení stanovované látky lze upravit podmínky analýzy: výběr vhodné kolony (velikost, náplň, výběr vhodné mobilní fáze, nastavení optimální rychlosti toku mobilní fáze kolonou).

*Reverzní HPLC:*

Silikagelové kolony, zirkoniové kolony, porézní kolony, monolitické kolony, kapilární kolony, kolony s částicemi menšími než 5 mikrometrů.

---

<sup>11</sup> Text byl čerpán mimo uvedených zdrojů i ze zdroje [19].

### 3.2.5.1 Stacionární fáze pro HPLC

- **stacionární fáze mechanicky nanesené na inertním nosiči:**

ethylenglykol, skvalan na silikagelu

- **stacionární fáze chemicky vázané na inertním nosiči (tj. silikagelu)**

=Si-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> - C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> nepolární

-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CN -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH polární

Group	Formula	Group	Formula				
Triacetyl <sup>9</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>29</sub> CH <sub>3</sub>	Amino	-NH <sub>2</sub>				
Docosyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>21</sub> CH <sub>3</sub>	Nitro	-NO <sub>2</sub>				
Octadecyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>	Nitrile (Cyano)	-C≡N				
Octyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	Oxypropionitrile	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C≡N				
Hexyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>		-CH-CH <sub>2</sub>				
Trimethyl	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	vic-Hydroxyl (diol)	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border: none;"> <tr> <td style="border: none;"> </td> <td style="border: none;"> </td> </tr> <tr> <td style="border: none;">OH</td> <td style="border: none;">OH</td> </tr> </table>			OH	OH
OH	OH						
Alkylcarbamate <sup>10</sup>	-CO(CO)NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CH <sub>3</sub>	Fluoroalkyl <sup>11</sup>	-(CF <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CF <sub>3</sub>				
Cyclohexyl	-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	Polycaprolactam (polyamide, nylon)	-[NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C=O] <sub>n</sub> -				
Phenyl	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>						
Diphenyl	(-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>						
Dimethylamino	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>						

Tabulka 3: funkční skupiny chemicky modifikovaných fází na silikagelu [17]

#### **Adsorbenty a chemicky vázané fáze v systému kapalina-pevná fáze:** [19]

1. polární adsorbenty – polární adsorbenty, silikagel, oxid hlinitý, chemicky vázané polární stacionární fáze

2. nepolární adsorbenty – chemicky vázané nepolární stacionární fáze, vliv aktivity zbytkových silanových skupin, retence polárních látek v reverzním módu

Ad 1:

#### **Silikagel:**

Je obecně nejpoužívanější polární sorbent. Kolony mají široké komerční využití. Povrch silikagelu je slabě kyselý, takže zadržuje více bazické látky než kyselé a neutrální a může tak působit jejich chvostování. Tomu lze zabránit přidáním slabé organické báze (např. trimethylamin) do mobilní fáze, ale je nutné dbát na to, aby pH



mobilitní fáze nepřesáhlo 8, kdy dochází k rozpouštění silikagelu. Protože povrch silikagelu je slabě kyselý, může vystupovat jako iontoměnič.

Pro účely HPLC se silikagel připravuje s poměrně velkým specifickým povrchem (pohybuje se v rozmezí 100–150 m<sup>2</sup>/g), velkým objemem pórů (0,7 ml/g), střední průměr pórů je asi 8 – 15 nm. S rostoucím objemem pórů klesá specifický povrch adsorbentu tím i distribuční konstanta a následně i retence chromatografických látek, selektivita dělení na velikosti specifického povrchu nezávisí.

Aktivními centry na povrchu silikagelu jsou hydroxylové skupiny resp. silanolové skupiny Si-OH. Existuje i několik rozdílných typů silanolových skupin.

Hydroxylové skupiny silikagelu jsou buď izolované, jednoduché, dvojité nebo jsou při vhodné poloze sousední skupiny vzájemně vázány vodíkovými vazbami. Rozmístění silanolových skupin na povrchu silikagelu závisí na způsobu zpracování silikagelu. Při vysoké teplotě dochází k odstranění silanolových skupin dvojitých a vázaných vodíkovým můstkem, dochází k ustálení jednoduchých a izolovaných silanolových skupin. Na silanolovou skupinu se adsorbuje vodíkovou vazbou rovněž voda, kterou lze odstranit zahřátím na 150 °C a tím silikagel aktivovat, při teplotě nad 200 °C dochází k ireverzibilním změnám a za teploty 300 – 500 °C kondenzují sousední hydroxylové skupiny na siloxanové skupiny, které nelze při normální teplotě hydratovat. Při ještě vyšších teplotách dochází k odštěpení volných hydroxylových skupin a silikagel nabývá hydrofobních vlastností.

### ***Oxid hlinitý:*** [27]

Vzhledem k omezené chemické odolnosti silikagelu v alkalickém prostředí byly hledány jiné chemicky odolnější materiály použitelné pro přípravu obrácených fází. Ukázalo se, že oxidy hliníku jsou podstatně stabilnější v silně alkalickém prostředí než silikagel. Navíc je oxid hlinitý v bazickém prostředí stabilní i při zvýšené teplotě, což neplatí pro silikagelové fáze. Zvýšená stabilita a pracovní rozsah pH přináší řadu výhod, kromě jiného i možnost regenerace kolon za velmi agresivních podmínek bez nebezpečí poškození sorbentu.

Oxid hliníku je nezanedbatelně rozpustný v kyselém prostředí, zvláště v kyselině chlorovodíkové. Mechanická odolnost vůči vysokému tlaku je velmi dobrá, plně srovnatelná nebo lepší než v případě silikagelu.

Chemické vlastnosti povrchu oxidů hliníku jsou podstatně odlišné od silikagelu. Zatímco nemodifikovaný silikagel má povahu měniče kationtů, zmíněné oxidy mají amfoterní charakter a jsou tedy schopny v závislosti na pH mobilní fáze vystupovat buď jako měniče kationtů, nebo aniontů. Druhou velmi významnou odlišností je skutečnost, že na povrchu oxidů zmíněných kovů jsou místa s vlastnostmi Lewisovy kyseliny. Tato centra umožňují interakce na bázi ligandové výměny. Obecně lze říci, že chemie povrchu oxidů kovů je velmi složitá, mnohem komplikovanější než v případě silikagelu.

Pro RP-HPLC aplikace je nezbytná hydrofobizace povrchu oxidů hliníku. Dosud neexistuje žádná modifikační technika vedoucí k úplnému odstínění povrchu sorbentů, a proto je nutno vždy počítat s tím, že konečná interakce s analytem nemusí mít čistě hydrofobní charakter. Pokud se jedná o způsoby modifikace povrchu, lze je třídit do několika skupin:

- a) dynamická modifikace se provádí přidávkem látky, která silně interaguje s povrchem sorbentu, do mobilní fáze,
- b) permanentní kovalentní chemická modifikace využívá reaktivity vhodných modifikujících činidel za vzniku stabilní vazby mezi povrchem sorbentu a činidlem,
- c) podstatou fyzikální modifikace povrchu je pokrytí povrchu vhodným polymerem nebo vrstvou uhlíku.

Silanizační techniky, velmi úspěšné při přípravě silikagelových obrácených fází, které měly vést ke kovalentní modifikaci povrchu oxidů kovů, se příliš neosvědčily.

Experimentálně byla potvrzena platnost řady hydrolytické stability vazby mezi křemíkem a kyslíkem v pořadí: Si-O-Si-R >> Zr-O-Si-R > Ti-O-Si-R >> Al-O-Si-R. Důsledkem toho je fakt, že většina pokusů o stabilní silanizaci povrchů oxidů kovů monofunkčními silany byla neúspěšná. Modifikace provedené trifunkčními silany v některých případech alespoň částečně k úspěchu vedly, ale otázkou zůstává, zda tento výsledek nespočíval spíše v horizontální polymeraci trifunkčních silanů na povrchu oxidů kovů. Navíc pokud jsou pro silanizaci využity trifunkční silany, vzniknou nevyhnutelně reakcí s povrchem i skupiny M-O-Si-OH (M = Al), které svou velkou kyselostí dále přispějí k značné heterogenitě modifikovaného povrchu. Příprava současných komerčně dostupných RP sorbentů na bázi oxidů kovů proto není

založena na využití silanizačních reakcí. Nejdůležitější postupy spočívají v pokrývání povrchu vhodnými hydrofobními vrstvami.

Použití: separace nasycených i nenasycených alifatických uhlovodíků, separace polyaromatických uhlovodíků. Je však méně používán, protože na povrchu dochází ke katalytickému štěpení a rozkladu nebo ireverzibilní adsorpci chromatografických látek.

### ***Chemicky vázané polární stacionární fáze:***

#### ***Aminopropyl:***

Retence na aminopropylu je ve srovnání se silikagelem a oxidem hlinitým vyšší a dobře je může substituovat. Jak můžeme očekávat, retence látek kyselé povahy na aminopropylu je daleko vyšší než na silikagelu, kyanopropylu nebo diolu. Jako příklad je možno uvést separaci steroidů s fenolickou funkční skupinou, které jsou na této fázi daleko více zadržovány než na silikagelu. Nevýhodou aminopropylu je jeho vysoká reaktivita a proto může reagovat s aldehydy nebo ketony za vzniku iminů, nebo může být funkční skupina  $\text{NH}_2$  oxidována např. peroxidy. V přítomnosti vody dochází k částečné hydrolyze  $\text{NH}_2$ -skupiny; výsledkem je vysoké alkalické prostředí v pórech, které se může pohybovat až kolem hodnoty pH 10 a vyšší a dochází k rozpouštění silikagelu. V tomto případě se i při dostatečně dlouhé ekvilibraci kolony nedosáhne úplné regenerace a takto ekvilibrovaná fáze není srovnatelná s originální fází. Proto je nutné se vyhnout promývání aminopropylové fáze vodou.

***Pentafluorfenylpropyl*** je vhodná zejména pro p-donor/p-akceptorové interakce s vhodným analytem. Separace na pentafluorfenylpropylové fázi je obdobná jako na oktadecylové fázi, pouze je nutné používat mobilní fáze o vyšší eluční síle. Stacionární fáze vykazuje vyšší selektivitu vůči aromatickým analytům. Na těchto fázích je možné používat 100 % vodné mobilní fáze bez zhroucení stacionární fáze v rozmezí pH 2 – 8 a do teplot až 70 °C.

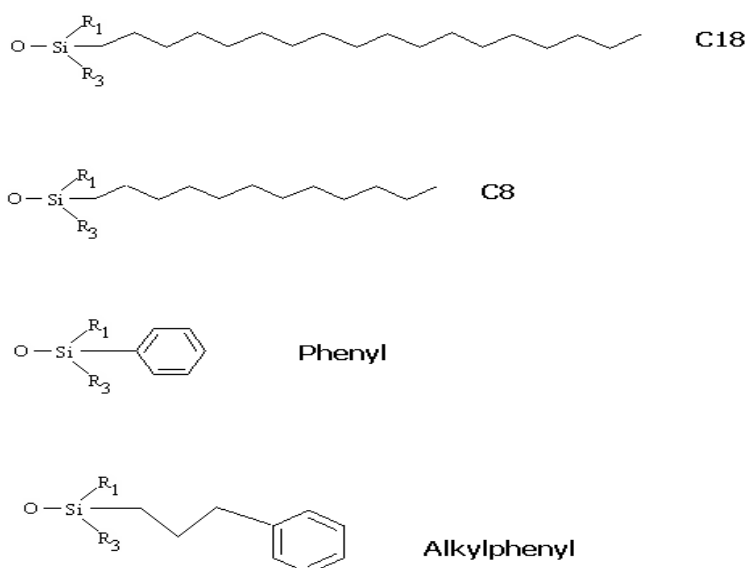
Ad 2

**Chemicky vázané nepolární stacionární fáze:**

Stacionární fáze chemicky vázané na nosiči mají proti kapalným fázím zakotveným na nosiči řadu praktických výhod – nedochází k vymývání stacionární fáze z nosiče ani jejímú částečnému rozpouštění ve fázi mobilní, ani k mechanickému strhávání při velkém průtoku mobilní fáze. Chemicky vázaná fáze je odolnější ke změně teploty a složení mobilní fáze – nedochází vlivem těchto parametrů k porušení rovnováhy na koloně, a proto se mohou volit různé pracovní podmínky a to jak složení mobilní fáze tak změny teploty na koloně.

Stacionární chemicky vázané fáze etherového typu **-Si-O-C** mají charakter monomerů a tento typ vazby (Halászovy kartáče) není stabilní vůči hydrolyze a uvedené náplně mají omezené použití (v mobilní fázi nesmí být přítomna voda). Stacionární chemicky vázaná fáze **-Si-N-C** je stabilnější k hydrolyze (pH 4 – 7,5). Zcela odolné k hydrolyze je třetí typ vazby **-Si-O-Si-C**.

Reakcí silanolových skupin -Si-OH s alkoholy přímo, chlorovaného silikagelu s aminy nebo reakcí s alkylchlorsilany vzniká chlorovodík, který je třeba vázat triethylaminem nebo pyridinem. V případě reakce alkylchlorsilanu je R<sub>2</sub> ligand (R<sub>1</sub> a R<sub>3</sub> mohou být další funkční skupiny, které se mohou dále vázat se silanolovou skupinou). Podle názvu ligandu R pak odvozujeme typy stacionární fáze, které se vyznačují různou polaritou a tím rozdílnou selektivitou (C8, C18, fenyl, alkylfenyl).



Obrázek 21: typy stacionárních fází

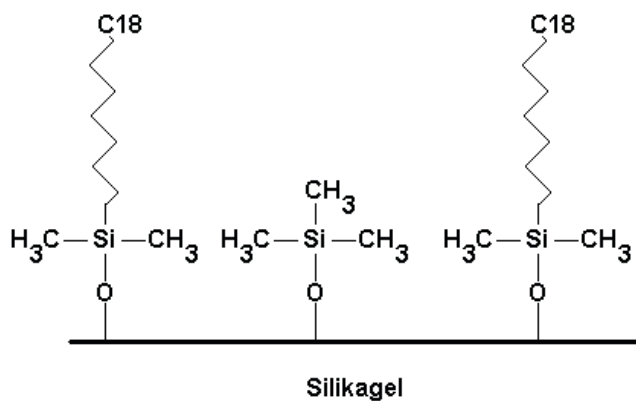
Použitím fenylové nebo alkylfenylové (např. hexylfenyl) stacionární fáze dochází ke zvýšení retence analytů a současně dochází ke změně selektivity aromatických sloučenin (vliv  $\Pi$ - $\Pi$  interakce mezi stacionární fází a solutem). Použitím alkylfenylových fází se jedná vlastně o kombinaci vlastností alkylových a fenylových fází, jsou např. vhodné pro separaci nasycených a nenasycených vazeb ve sledovaném analytu.

#### ***Vliv aktivity zbytkových silanolových skupin:***

I nejlépe připravená chemicky vázaná stacionární fáze obsahuje zbytkové polární silanolové skupiny, jejichž obsah se pohybuje kolem  $4 \text{ mmol/m}^2$  a typický obsah ligandových skupin se pohybuje někde kolem  $3,5 \text{ mmol/m}^2$ , tím pádem obsahuje více „residuálních“ silanolových skupin než ligandů. Ačkoli většina těchto silanolových skupin není sféricky dostupná chromatografovaných látkám, jsou ještě dostatečně přístupné pro interakce s analytem a mobilní fází (vodíkové vazby, dipól-dipólové interakce, iontově-výměnné) a toto je potom příčinou stoupající retence a chvostování píků polárních, zejména bazických látek. Ionově-výměnné reakce zbytkových silanolových skupin jsou dominující pro interakce s bazickými látkami a jsou funkcí pH mobilní fáze. Se stoupajícím pH mobilní fáze roste vliv zbytkových silanolových skupin, protože roste jejich počet s negativním nábojem (pH 6 – 8). Proto se v praxi používá eliminace nepolární fáze, tj. minimalizování interakce bazických látek s volnými silanolovými skupinami (minimalizace tailingu píků) a tím i nutnost zvyšování obsahu chemicky vázaného uhlíku v nepolární fázi (carbon load). Existuje několik způsobů eliminace, které budou popsány dále.

#### **Endcapping:**

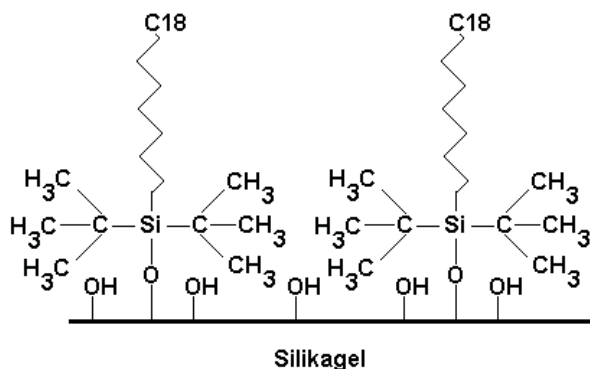
Endcapping je fyzikálně-chemický proces, který redukuje počet volných silanolových skupin na nepolární fázi (na bázi silikagelu) chemickou reakcí např. s trialkylchlorsilanem (alkyl – methyl). Trimethylchlorsilan jako menší molekula než trioktadecylchlorsilan pokryje stéricky chráněné volné silanolové skupiny.



Obrázek 22: grafické znázornění endcappingu

Stérické stínění volných OH skupin:

Eliminace silanolových skupin stérickým odstíněním při přípravě chemicky vázaných fází, tj. přípravou fází s delším organickým uhlíkovým řetězcem a zvýšením obsahu vázaného uhlíku v nepolární fázi (carbon load). S tímto však současně roste i retence látek. Dokonalé stérické odstínění zbytkových-OH skupin lze docílit použitím objemných alkyl substituentů R1, R3-diisobutyl nebo diisopropyl. Jako příklad lze uvést stacionární fázi Zorbax StableBond (Agilent, USA):



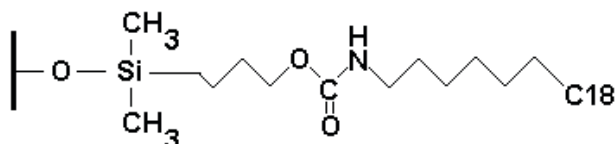
Obrázek 23: ukázka sférického stínění volných OH skupin

Výhodou těchto stacionárních fází je vysoká stabilita vůči nízkým pH mobilní fáze (~1) a mobilní fázím obsahující trifluoroctovou kyselinu, jsou stabilní při teplotě až 90°C a při použití 100 % vodné mobilní fáze nedochází ke kolapsu.

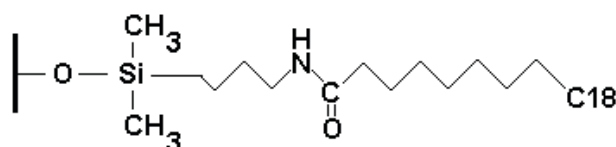
### Modifikace ligandu:

Začleněním polární skupiny do organického uhlíkového řetězce stacionární fáze mezi povrch silikagelu a nepolární vrstvy (ligand) např. karbamátové skupiny - reverzní fáze SymmetryShield RP8 nebo Supelcosil ABZ<sup>+</sup>.

SymmetryShield RP8



Supelcosil ABZ+ (Discovery RP-Amide C16)

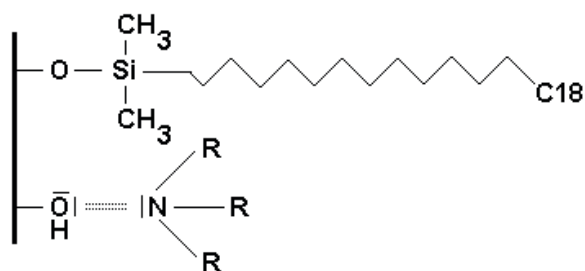


Obrázek 24: modifikace ligandy

Tento krok zmírňuje interakci analytu s povrchovými volnými silanolovými skupinami, zejména bazických polárních látek. Pravděpodobně dochází k interakci mírně polární skupiny s volnými silanolovými skupinami a zvýšením polaritu nepolární fáze dochází ke zvyšující se adsorpci vody v mobilní fázi.

### pH a složení mobilní fáze:

Z popisu chování silanolových skupin k mobilní fázi je zřejmé, že tyto můžeme eliminovat i úpravou pH mobilní fáze a to přidavkem organických aminů do mobilní fáze. Ty soutěží s analytem o aktivní centra zbytkových silanolových skupin a eliminují tak jejich nežádoucí chování. Nejčastěji se používá triethylamin, pokud je triethylamin nedostačující, používá se trioctylamin nebo cetyltrimethylamonná sůl. Použití cetyltriethylaminu je velmi efektivní, ale prodlužuje se doba ekvilibrace kolony a retenční čas analyzovaných látek. pH takto připravené mobilní fáze se musí upravit na hodnotu pH 2 – 7, jinak dochází k rozpouštění silikagelu. Jako přídatek se používá kyselina fosforečná, octová nebo citrónová, u cetyltrimethylamonné soli se pH upravovat nemusí.



Obrázek 25: eliminace volných silanolových skupin pomocí organického aminu v mobilní fázi

Z komerčně dostupných náplní s chemicky vázanými fázemi lze uvést nepolární fáze s alkylovými řetězci různé délky ( $C_2$ - $C_{18}$ ), s fenylovými a difenylovými skupinami, které mají zvýšenou polaritu a rozdílnou selektivitu zejména k fenolům a aminosloučeninám. Střední polaritou se vyznačují fáze nitrilové (alkylnitrily) a amidové, které se vykazují zvýšenou selektivitou k fenolům, cukrům a alkoholům. Aminové fáze mají slabé vlastnosti iontoměniče (anexu).

### 3.2.5.2 Polymerní stacionární fáze

Hlavní a podstatnou nevýhodou chemicky modifikovaného silikagelu je jeho rozpustnost v alkalické oblasti pH. Tento problém řeší polymerní stacionární fáze, které jsou většinou kompatibilní v celém rozsahu pH. Nevýhodou polymerních fází však je, že částičky obsahují mikropóry o velikosti asi 1 nm, což zabraňuje přenosu hmoty zejména pro malé molekuly. Polymerní stacionární fáze jsou dále omezeny maximálním pracovním tlakem na koloně, a to 20 MPa, i když 10 MPa je pro většinu aplikací HPLC dostačující. Stabilita polymerních stacionárních fází je omezena stabilitou funkčních skupin polymeru – pro methylakrylát je limitující stabilita esterové skupiny, pro akrylamid je limitující stabilita amidové skupiny. I když současně připravované polymerní fáze jsou dostatečně mechanicky i chemicky stálé, pro jejich nižší účinnost dosud nevytlačily z použití chemicky vázané nepolární stacionární fáze. Styrendivinylbenzen byl použit jako stacionární fáze v iontově-výměnné chromatografii dávno před použitím v HPLC. Ve srovnání s chemicky vázanou fází  $C_{18}$  je retence na styrendivinylbenzenu vyšší a k dosažení vhodných retenčních časů je nutné zvýšit obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi. Toto zvýšení retence



je vysvětlováno specifickými interakcemi analytu s  $\pi$ -elektrony stacionární fáze, ale toto vysvětlení neplatí pro fenyllovou fázi, která by měla vykazovat obdobné zvýšení retence. Lepší vysvětlení je zvýšení specifického povrchu nosiče a tím i fázového poměru a distribuční konstanty. Styrendivinybenzenová fáze je stabilní v rozsahu pH 0 až 14, nejčastější použití je v analýze proteinů a peptidů, kdy pro tyto druhy analytů nehraje významnou roli mikroporosita náplně a chromatografická účinnost je srovnatelná s chemicky vázanou fází C18.

#### *Retence polárních látek v reverzním módu*

Retence polárních látek v reverzním módu je velmi malá a velmi polární látky eluují s mrtvým objemem kolony. Zvýšení retence na reverzní fázi je možné několikerým způsobem. Na klasické reverzní fázi (např. C18) je nutné potlačit ionizaci polárních látek a snížit tak objemový zlomek organického modifikátoru v mobilní fázi. Potom se však pracuje již se 100 % vodnými fázemi a doporučují se speciální kolony (např. Synergi Hydro-RP). Druhý způsob je použití iontově párové chromatografie. Třetí a nejúčinnější způsob je přechod na jiný typ stacionární fáze. Může se použít způsobu, kdy se do alkylového ligandu včlení polární skupina (amid nebo karbamid – kolony Supelco RP Amide C16 nebo Waters Symmetry Shield) nebo se použije zcela jiná stacionární fáze např. fenyllová nebo propylaminová. Každá z obou uvedených fází má své výhody i nevýhody (viz. Chemicky vázané polární stacionární fáze, str. 50).

### **3.2.5.3 Monolitické kolony**

Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitické HPLC kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Klasické 3 – 5  $\mu\text{m}$  částicové kolony vykazují výbornou separační účinnost, ale se snižující se velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, takže maximální rychlost průtoku je omezená. Největší výhodou monolitických kolon ve srovnání s klasickými částicemi plněnými kolonami jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Monolitické kolony mají dva typy pórů:

a) *velké póry* (makropóry) zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází.

b) *středně velké póry* (mezopóry) poskytují monolitu dostatečně veliký povrch, a tím vysokou separační kapacitu.

Tato struktura umožňuje použití monolitů při značně vysokých rychlostech průtoku mobilní fáze bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti, a to i pro separované makromolekuly (bílkoviny, syntetické polymery).

Monolitické kolony jsou stabilní v rozsahu pH od 2 do 7,5. Jako mobilní fáze se používá methanol, voda, acetonitril a jejich směsi.

Během minulého desetiletí byla zveřejněna celá řada originálních přístupů zahrnujících jak přípravu systémů vyznačujících se pouze některými prvky charakteristickými pro monolity (jako je snížený objem mezičásticových prostorů), tak i technologie skutečně monolitické. Do první skupiny patří např. kazety naplněné vrstvenými listy modifikované celulosy či srolované tkaniny. Monolity druhého typu jsou reprezentovány stlačenými hydrofilními gely, polymerními makroporézními disky, kolonami a trubicemi a monolity na bázi silikagelu, což je dnes již vžitý termín pro materiály na bázi oxidu křemičitého. Některé z těchto materiálů již doznaly i praktického uplatnění. Tabulka 4 shrnuje některé současné komerčně dostupné monolitické separační jednotky [32].

Produkt	Tvar	Výrobce	Web	Materiál	Separací módy
CIM Disk	disk	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, hydrofobní interakce, obrácená fáze, bioafinitní
CB Silica plate	disk	Conchrom, Bremen, Německo	conchrom.de	modifikovaná silika	obrácená a normální fáze
SepraSorb	disk	Sepragen, San Leandro, Kalifornie, USA	sepragen.com	modifikovaná celulóza	iontová výměna
CIM Tube	trubka	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové kopolymery	iontová výměna
UNO	kolona	BioRad, Richmond, Kalifornie, USA	bio-rad.com	kopolymery methakrylamidových monomerů	iontová výměna
Swift	kolona	ISCO, Lincoln, Nebraska, USA	isco.com	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, obrácené fáze
Chromolith	kolona	Merck, Darmstadt, Německo	chromolith.com	modifikovaná silika	obrácené fáze
Monoliths	kolona	LC Packings, Amsterdam, Holandsko	lcpackings.nl	polystyrenové kopolymery	obrácené fáze

Tabulka 4: přehled některých současně vyráběných monolitických kolon pro HPLC [32]

Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze rozdělit:

#### Anorganické monolity

První monolitické stacionární fáze na bázi silikagelu připravili a popsali profesori Nakanashi, Soga a Tanaka.

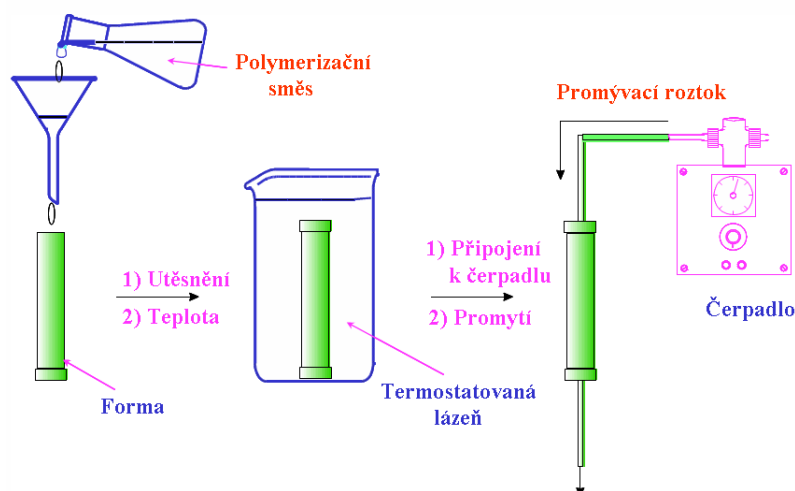
Připravují se hydrolytickou polymerací tetramethoxysilanu nebo tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octové v přítomnosti polyethylenglykolu. Technologie výroby umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou, kdy vznikají mezopóry a makropóry vhodných a nastavitelných rozměrů. Nevýhodou je objemová kontrakce, ke které při zrání monolitu dochází, což následně vyžaduje zatěsnění monolitu do pláště/kolony před jeho aplikací v HPLC. Připravené monolitické silikagelové kolony mohou být snadno modifikovány například zavedením oktadecylových funkčních skupin na jejich povrch pro použití v chromatografii s reverzními fázemi. Monolitické kolony poskytují srovnatelnou účinnost jako kolony konvenční s velikostí sorbentu 5  $\mu\text{m}$ . Výhodou monolitu je ovšem skutečnost, že se mohou aplikovat podstatně vyšší průtoky mobilní fáze, např. při použití monolitické

kolony o vnitřním průměru 4,6 mm a délce 10 cm může rychlost mobilní fáze nabývat až 10 ml/min bez překročení tlakového limitu čerpadla a kolony. Silikagelové monolity se osvědčily, na rozdíl od organických monolitů, i při separaci malých molekul.

### Makroporézní polymerní monolity

Tyto monolity jsou připravovány přímo v prázdné koloně, která se naplní polymerační směsí, tedy směsí monomerů, porogenů a iniciátorem, pak se uzavře a za tepla je provedena polymerace. Monolit se následně promyje vhodným solventem pro odstranění nezpolymerizovaných látek a může být rovnou použit pro HPLC separace.

K těmto typům organických polymerů se řadí především polymerní gely na bázi hydroxyethyl-methakrylátu, glycidyl-methakrylátu a polystyrenu.



Obrázek 26: příprava monolitů [33]

### Stlačitelné monolity (komprimované gely)

Koncem 80.tých let prováděl prof. Hjertén experimenty s částicemi neporézní agarózy a zjistil, že při stlačení sloupce sorbentu hydrostatickým tlakem proudící kapaliny překvapivě došlo ke zvýšení permeability stacionární fáze a současně i ke zlepšení separace. Na základě těchto experimentů připravil monolit polymerací vodného roztoku N, N'-methylenbis-akrylamidu a kyseliny akrylové v přítomnosti anorganické soli (síran amonný), který následně v koloně silně stlačil (až na 10 % původního objemu) a získal velmi dobré separace bílkovin. Tato technologie byla posléze vylepšena použitím 1,4-diakrylpiperazinu jako síťovadla a použita k přípravě kolon známých pod značkou UNO. Interaktivní skupiny jsou zaváděny do těchto kolon kopolymerací. Protože příprava probíhá ve vodném roztoku a všechny

komponenty musí tedy být rozpustné ve vodě, je počet způsobilých monomerů, a tedy i separačních módů, značně omezen. Většina těchto monolitů nachází proto uplatnění v iontové výměnných separacích. Výjimkou je monolit připravený z N-isopropylakrylamidu, který je použitelný pro hydrofobně-interakční separace bílkovin. Výroba monolitů pro separace s obrácenými fázemi touto technologií by však byla velmi obtížná, protože vhodné monomery nejsou rozpustné ve vodě. Podobně jako předešlé monolity, i tyto mají velice výhodný profil Van Deemterovy závislosti účinnosti na průtoku a umožňují použití velkých průtokových rychlostí, aniž by se snížila kvalita separací. Hydrofilní povaha vlastní tomuto typu monolitů je předurčuje k separacím bílkovin, peptidů, nukleových kyselin i celých adenovirů [32].

#### *Reprodukovatelnost monolitických kolon*

Přestože každá připravená monolitická kolona je vlastně prototypem, je jejich příprava většinou poměrně dobře reprodukovatelná. Například reprodukovatelnost relativních retenčních časů dosahovaná na komerčních monolitech Chromolith, vyjádřená jako RSD, je do 4%.

#### **3.2.5.4 HPLC kolony na bázi oxidu kovů**

Rozpustnost silikagelu při vyšším pH mobilní fáze vedlo k vývoji alternativních HPLC kolon na bázi oxidů kovů (oxidu titaničitého, oxidu hlinitého), ale zejména oxidu zirkoničitého (ZirChrom®). Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic. Takto připravené kolony vykazují srovnatelnou účinnost s kolonami silikagelovými. Největší výhodou oxidu zirkoničitého je jeho chemická a tepelná stabilita. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teplotě až do 200°C. HPLC kolony s oxidem zirkoničitým mohou být použity za extrémních podmínek (např. čištění kolony) a tím se prodlužuje životnost kolony. Tím se také snižuje cena analýzy a rozšiřují se možnosti použití různých chromatografických podmínek.

Oxid zirkoničitý nemá na svém povrchu silanolové skupiny, ale jsou přítomna naopak adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin. Tento fakt vede k tomu, že do mobilních fází se musí přidávat pufr, které kompenzují silné interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách látek.

Oxid zirkoničitý lze použít v obou módech – v normálním i reverzním.

Nemodifikovaný oxid zirkoničitý se používá v systému s normálními fázemi (ZirChrom®-PHASE).

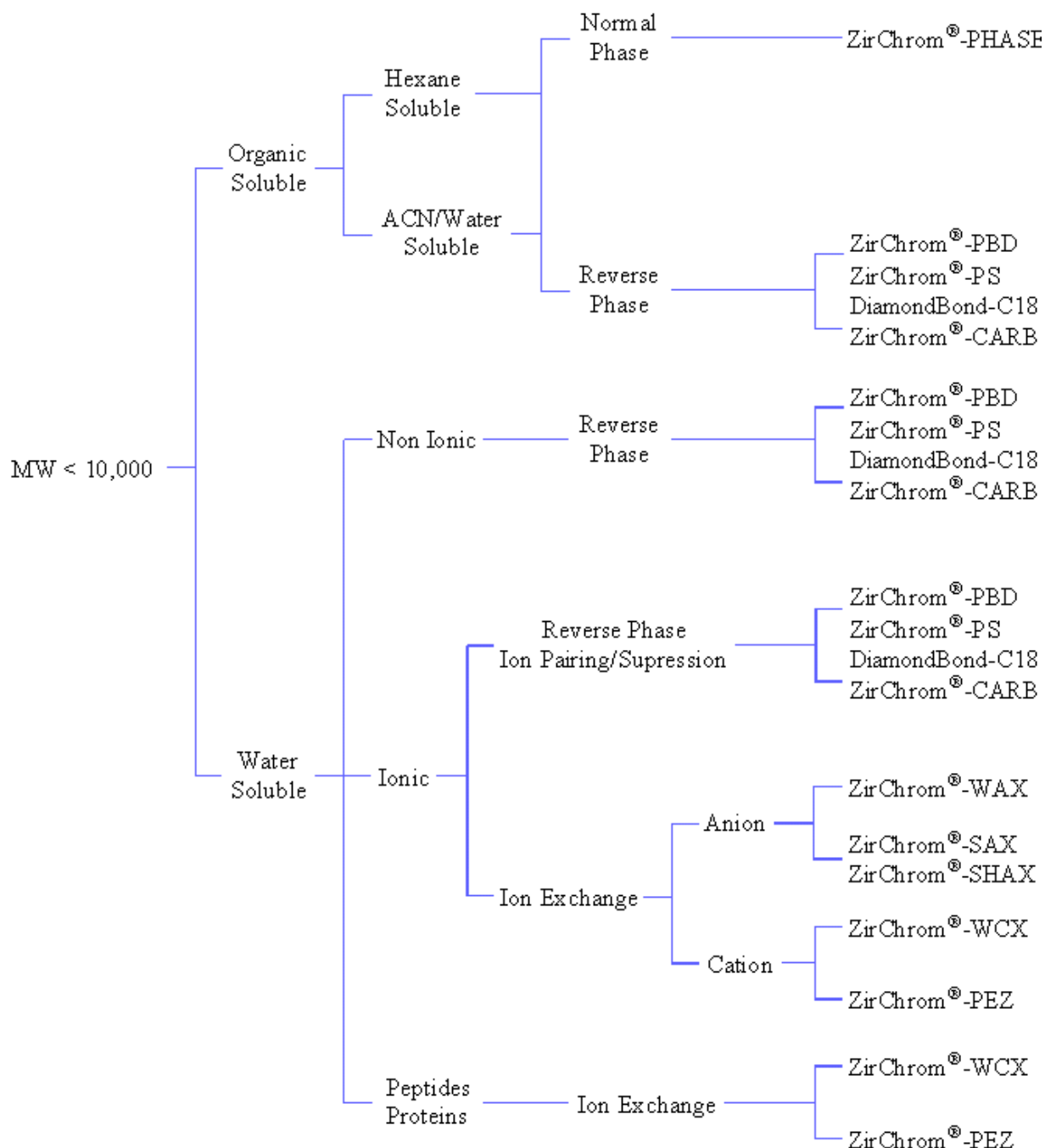
Častější je použití oxidu zirkoničitého v reverzním módu. Povrch oxidu zirkoničitého se modifikuje tenkou vrstvou polybutadienu (ZirChrom®-PBD), polystyrenu (ZirChrom®-PS) nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku (ZirChrom®-CARB), které lze případně modifikovat ligandem C18.

Polybutadien (PBD) má pro neionizovatelné látky podobnou separační selektivitu jako silikagelové C8 a C18 fáze. Polystyren (PS) je svou selektivitou spíše blízký fenylové modifikaci silikagelu. Je třeba ale zdůraznit, že nabitě a ionizovatelné látky se chovají na PBD a PS modifikacích oxidů kovů podstatně odlišně než na silikagelových reverzních fázích, což je důsledek silných iontových a ligandově-výměnných interakcí mezi nedokonale odstíněným povrchem oxidů kovů a analyty.

Pro uvedené sorbenty je proto typické, že volba typu pufru a jeho koncentrace má daleko větší vliv na retenční časy ionizovatelných analytů a na tvar píků, než je běžné v případě silikagelových reverzních fází. PBD sorbenty vykazují velmi dobrou pH stabilitu v rozmezí 1–14, také tepelná odolnost PBD fází je mimořádná. K degradaci nedochází ani při aplikaci 1 mol/l hydroxidu sodného při 100 °C. Velmi dobrou pH a tepelnou stabilitu mají i kovové oxidy pokryté vrstvou polystyrenu, které mohou být používány v rozmezí pH nejméně 1–13 a při teplotách až do 160°C. Vedle PBD a PS byl povrch oxidu zirkoničitého úspěšně modifikován také pyrogenním uhlíkem. Tato stacionární fáze je schopná velmi citlivě rozlišovat analyty podle tvaru jejich molekul, a je proto vhodná pro dělení geometrických isomerů. Důležitou vlastností moderních PBD, PS a uhlíkových fází je skutečnost, že separační účinnosti pro neutrální analyty jsou plně srovnatelné s účinnostmi dosahovanými na silikagelových fázích C18 a C8, což znamená, že přenos hmoty ve stacionární fázi je dostatečně rychlý. Plně polymerní sorbenty na bázi např. styren-divinylbenzenu nebo poly(methylmethakrylátu) jsou také vysoce chemicky stálé, ale účinnosti na nich dosahované bývají zpravidla podstatně nižší než na silikagelových reverzních fázích, pravděpodobně v důsledku přítomnosti mikropórů.

Kompatibilita sorbentů s vysokými teplotami nabízí mnoho zajímavých aplikačních výhod. Řada z nich již byla výše zmíněna, zde lze navíc připomenout možné využití samotné vody jako mobilní fáze. Je totiž známo, že při teplotě 200°C má voda podobnou polaritu jako methanol při laboratorní teplotě. Tímto způsobem lze dosáhnout snížení spotřeby organických rozpouštědel. Navíc vyloučení

organických solventů může nabídnout i nové detekční možnosti (např. měření ve vzdálené UV oblasti < 210 nm) [21, 27].



Obrázek 27: schéma k výběru správné HPLC kolony [19]

Selektivita zirkoniových fází je lepší než alkylsilikagelových fází v normálním módu (ZirChrom®-PHASE) ohledně separace stereoisomerů a velmi podobných sloučenin lišící se polaritou (steroidy), v reverzním módu při separaci silně polárních látek (ZirChrom®-EZ) [19].

### 3.2.5.5 Hybridní stacionární fáze

Velmi odlišný, zajímavý a komerčně úspěšný přístup k syntéze odolnějších reverzních fází na bázi silikagelu navrhl a poprvé publikoval Unger a spol. Koncept využívá reakce anorganického alkoxyasilanu s organickým alkoxyasilanem za vzniku anorganicko-organické hybridní částice.

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu, s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. mimořádnou pH stabilitou a sníženým efektem reziduálních silanolových skupin [27].

- **sorbenty X-TERRA:**

V roce 1999 byla na trh uvedena první generace hybridních fází pod názvem X-Terra. Syntéza je založena na reakci dvou organosilanů, jeden z nich tvoří silikagelovou matici a druhý do vznikající matrice vnáší methylsiloxanové jednotky. Konkrétně se jedná o reakci tetraethoxysilanu s methyltriethoxysilanem. Vzniklé hybridní částice obsahují methylsiloxanové jednotky, a to jak uvnitř matrice sorbentu, tak na povrchu. Pro potřeby RP-HPLC je povrch následně kovalentně modifikován buď trifunkčními silany za vzniku fází MS C8 a MS C18, optimalizovaných pro maximální chemickou stabilitu a určených pro LC-MS a nebo monofunkčními silany za vzniku fází RP8 a RP18, s vloženými karbamáty, optimalizovaných pro minimální chvostování bazických látek. Experimentálně bylo prokázáno, že selektivita MS C8 a C18 stacionárních fází pro hydrofobní i polární analyty je obdobná jako na běžných silikagelových reverzních fázích. Obdobně také selektivita hybridů se zabudovanou karbamátovou polární funkční skupinou se téměř nelišila od čistě silikagelových karbamátových kolon. Tato skutečnost se dá vhodně využít při přenosu chromatografických metod z konvenčních silikagelových sorbentů na materiály hybridní, kdy často není nutná nová optimalizace separačních podmínek. Vzhledem k tomu, že na povrchu hybridu je ve srovnání s klasickými silikagelovými materiály asi jen třetina silanolových skupin, chvostování bazických látek je na hybridních fázích výrazně omezeno a symetrie píků daleko lepší. Hybridy vykazují velkou odolnost vůči vysoké hodnotě pH mobilní fáze. Hybridní reverzní fáze byly úspěšně testovány v rozmezí pH 1,2 – 11,5. Analyty bazické povahy tak mohou být často separovány ve formě volných bází s daleko lepší separační účinností a odlišnou



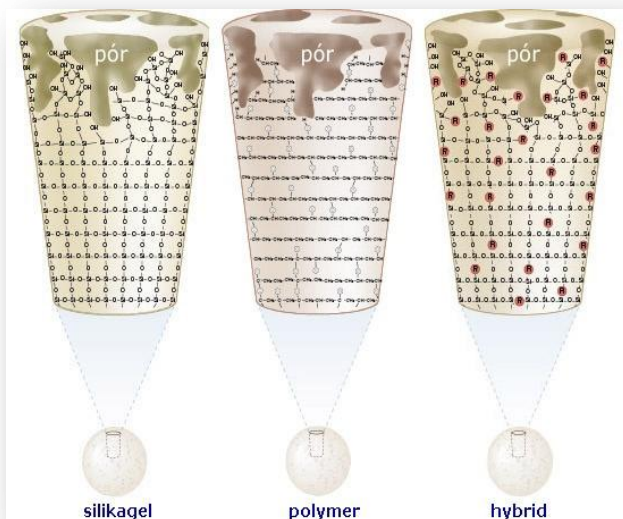
selektivitou než v kyselém prostředí. Další důležitou vlastností hybridních sorbentů je jejich zlepšená odolnost vůči zvýšené teplotě mobilní fáze. Možnost chromatografie při teplotách i kolem 60°C přináší řadu výhod:

- ✓ snížení viskozity mobilní fáze, a tím tlaku na koloně,
- ✓ zlepšení separační účinnosti,
- ✓ zmenšení závislosti účinnosti kolony na rychlosti průtoku a tím vytvoření příznivých podmínek pro uplatnění uvedených sorbentů při velmi rychlých separacích [27].

Tzv. hybridní sorbenty druhé generace jsou připravovány reakcí tetraethoxysilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem. Ve srovnání se sorbenty X-Terra byla dále podstatně zvýšena chemická odolnost v silně bazickém prostředí a separační účinnost [27].

- **twin technologie:** [34]

Vysoká dělicí účinnost a chemická stabilita jsou dvě klíčové vlastnosti, vyžadované od chromatografické kolony. Materiály na bázi silikagelu vynikají výbornou účinností, ale často jsou schopny pracovat pouze ve velmi omezeném rozsahu pH. Naopak polymery jsou stabilní v širokém rozmezí pH, avšak propadají v účinnosti dělení. Hybridní částice obsahují v celém svém objemu rovnoměrně rozložené částečně alkylované křemíkové atomy. Jde o kompromisní řešení vedoucí ke zlepšení stability částic a relativně dostatečné účinnosti dělení, nižší ovšem než u čistého silikagelu.



Obrázek 28: struktura silikagelu, polymerní, hybridní stacionární fáze

Typ částice	Výhody	Nevýhody
SILIKAGEL	Mechanická odolnost Reprodukovatelnost výsledků Vysoká účinnost dělení	Omezený rozsah pH Chemická aktivita
POLYMER	Širší rozsah pracovního pH Chemická stabilita	Nižší účinnost dělení Nižší mechanická odolnost Menší reprodukovatelnost výsledků
HYBRID	Široký rozsah pracovního pH (1–12) Vyšší účinnost dělení než polymer Vyšší mechanická odolnost než polymer	Nižší účinnost dělení než silikagel Nižší výkon dělení než silikagel Nižší kapacita než silikagel
TWIN	Široký rozsah pracovního pH (1–12) Účinnost dělení jako silikagel Mechanická odolnost jako silikagel	Pokuste se nějakou nalézt...

Tabulka 5: porovnání vlastností silikagelu, polymerní, hybridní stacionární fáze a technologie twin



Při produkci kolon Gemini projde v posledním stádiu výroby částice silikagelu speciální chemickou procedurou, jejímž výsledkem je povrchová organokřemičitá vrstva, vytvářející novou kompozitní částici. Částice si však zachovává svoji vnitřní, celým procesem nedotčenou strukturu čistého silikagelu a tím i mechanickou pevnost, rigiditu a především i vynikající dělicí účinnost. Organokřemičitanový krunýř v povrchových vrstvách chrání přitom částici před chemickým napadením.

Obrázek 29: struktura částice využívající Gemini Twin technologii

Unikátní design kolony Gemini nabízí kromě stability i prakticky velmi dlouhou životnost. Ať pracuje Gemini za isokratických podmínek či gradientu, zcela překonává kolony s hybridními částicemi. Vysoká stabilita kolon Gemini umožňuje také použití kolon ve spojení s hmotnostním spektrometrem.

Gemini zajišťuje jak vysokou životnost, tak i účinnost dělení v rozsahu pH od 1 do 12.

Modifikací pH mobilní fáze lze dosáhnout různé selektivity dělení ionizovatelných sloučenin. Typický je přírůstek retence u kyselých sloučenin při pH pod jejich pK a delší retenční časy bazických sloučenin při pH nad hodnotou jejich pK.

### 3.2.5.6 Stacionární fáze na bázi porézního grafitického uhlíku<sup>12</sup>

Porézní grafitovaný uhlík je používán od roku 1988. Jeho velkou výhodou je stabilita v oblasti pH 1 – 14 a stabilita tlaková do 40 MPa. Při porovnání retence hydrofobních látek na uhlíkových sorbentech a sorbentech typu alkylsilikagelů, se uhlíkový sorbent vyznačuje o něco vyšší afinitou, u aromatických a polárních látek je tato afinita daleko vyšší. Toto je vysvětlováno přítomností delokalizovaných  $\pi$ -elektronů na povrchu uhlíkového sorbentu a tím dochází ke specifickým interakcím sorbent-solut. Kromě toho jsou často pozorovány na uhlíkovém sorbentu chvostující píky, které indikují heterogenitu povrchu sorbentu. Přítomnost fixních adsorpčních center na povrchu sorbentu zajišťuje vyšší selektivitu sorbentu k dělení polohových isomerů. Výhodou uhlíkových sorbentů je možnost změny retence bazických látek změnou pH mobilní fáze a to, že chování těchto látek na tomto sorbentu se dá daleko více předpovídat než na sorbentech typu alkylsilikagelů, které obsahují zbytkové silanolové skupiny a jsou omezeny rozpustností silikagelu v alkalických oblastech pH [19].

**Hypercarb** je obchodní jméno pro porézní uhlík v grafitové formě (**Porous Graphitic Carbon – PGC**), který je vyráběn jako náplň do kolon HPLC. Mezi jeho vlastnosti patří:

- prostorově selektivní povrch se schopností analyzovat izomery
- netečnost k agresivním mobilním fázím
- minimální bobtnání, smršťování, či rozpouštění
- stabilita v celém rozsahu pH 0 – 14, nedochází k rozpouštění a hydrolyze
- použitelnost s normálními i reverzními mobilními fázemi
- homogenní povrch bez aktivních částí
- unikátní retenční mechanismus a selektivita
- zlepšené dělení diastereomerů, geometrických izomerů a enantiomerů
- zvýšená retence pro vysoce polární složky
- kompatibilita se všemi systémy rozpouštědel umožňující HPLC analýzu v širokém rozsahu polarit
- možnost separace i na úrovních pH mimo rozsah fáze na bázi silikagelu
- dříve nedosažitelná dělicí schopnost

---

<sup>12</sup> Text byl čerpán i ze zdroje [35].

Jednotlivé částičky Hypercarbu jsou kulovité a plně pórovité, (pórovitost je 75%). Na molekulární úrovni je Hypercarb jiný než amorfní částice silikagelu a je složen pouze z plátek hexagonálně uspořádaných atomů uhlíku s hybridizací  $sp^2$ . Grafitové plátky jsou ploché a vzdálenost mezi atomy uhlíku v sousedních plátcích je velmi malá, menší než ve velkých polycyklických aromatických molekulách. Jednotlivé grafitové plátky mohou být považovány za gigantické aromatické molekuly složené pouze z uhlíku. Mezi plátky jsou atomové valenční vazby saturovány a oproti silikagelu nejsou na grafitových plátcích žádné povrchově aktivní skupiny.

Nepřítomnost povrchově aktivních skupin na povrchu dělá z grafitu až na zeolit krystalickou látku pro chromatografický nosič. Pórovitá struktura Hypercarbu je podobná knížečkám z grafitových plátek, které jsou náhodně složitě nahromaděny.

Prostor mezi grafitovými vrstvami je typicky stejný jako u prostorového grafitu, neexistuje zde však žádné uspořádání mezi atomy v sousedních vrstvách. Hypercarb je proto dvourozměrný grafit. Právě nepřítomnost vazeb mezi vrstvami poskytuje materiálu Hypercarb vysokou mechanickou stabilitu.

PGC má schopnost separovat velmi podobné analyty, používá se pro analýzu geometrických izomerů, separaci diastereoisomerů, analýzu polárních roztoků, aromatických sulfonátů, analýzu oligosacharidů, reziduí polychlorovaných bifenyly.

PGC umožňuje práci při extrémním pH, je to dáno stabilitou kolon, to poskytuje uživateli široký prostor pro ionizaci, ovládání potlačení iontů, což jsou klíčové požadavky chromatografie.

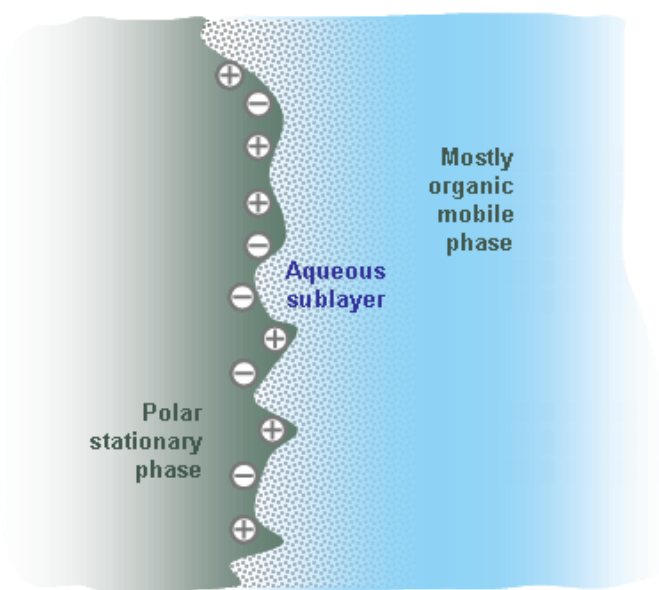
Povrch Hypercarbu není chirální, ale lze ho použít jako nosič pro separování enantiomerů s použitím CMPA (chiral mobile phase additives). Ukázalo se, že použitím prostorově selektivního povrchu Hypercarbu lze dosáhnout zlepšení rozlišení. Použití Hypercarbu v této oblasti není omezeno na eluenty v normální fázi, ale lze ho použít i ve vodných systémech. Při této aplikaci je dicyclohexyltartrát (DCHT) silně adsorbován a úplně pokrývá PGC.

### 3.2.5.7 Stacionární fáze pro HILIC <sup>13</sup>

Kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích zajišťuje separaci látek s použitím převážně organické mobilní fáze, která prochází neutrální hydrofilní stacionární fází. Voda přítomná v mobilní fázi vytváří nepohyblivou vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze, přitom umožňuje rozdělování mezi mobilní fází a vodnou vrstvu. K eluci dochází zvýšením obsahu vody. Eluce látek je založena na mechanismu rozdělování společně s elektrostatickými interakcemi.

HILIC zajišťuje separaci jak v normální, tak v reverzní fázi.

Mobilní fází je většinou acetonitril, pro změnu pH mobilní fáze lze použít i pufrů jako např.: octan amonný, mravenčan amonný, chloristan sodný [36].



Obrázek 30: grafické znázornění mikro prostředí kolem povrchu stacionární fáze v HILIC chromatografii [50]

Chromatografie HILIC byla používána již dávno, ale její jméno bylo vytvořeno teprve nedávno. Dříve byla tato technika spojována společně s jinými chromatografickými technikami a často byl ignorován separační mechanismus. HILIC

<sup>13</sup> Kromě uvedených zdrojů bylo čerpáno i ze zdroje [19].

může být chápána jako rozšířená chromatografie na normální fázi s vodnými mobilními fázemi. HILIC je separační technika vhodná pro polární látky.

### *Retenční mechanismus*

Ovlivnění retence v HILIC je velmi podobné jako při normální fázi. Retence se zvyšuje s polaritou solutu a snižuje se zvýšením polaritu mobilní fáze (klesá s rostoucím podílem vody nebo pufru). Mobilní fáze je naopak obdobná mobilním fázím používaných v reverzní chromatografii a používá se voda nebo pufr s organickým rozpouštědlem. Stacionární fáze je velmi hydrofilní: silikagel, polární vázané fáze, polární polymerní fáze a iontoměniče. Hydrofilnější stacionární fáze více poutá vodu z mobilní fáze a retence solutu se zvyšuje. Retenční mechanismus se může vysvětlit jako rozdělování solutu mezi na vodu bohatší stacionární fází a na vodu chudší mobilní fází. Stacionární fáze se tak chová jako „přenašeč“ vody, ale má i své výjimky, které nejsou dostatečně prostudované. V případě separace sacharidů chromatografií HILIC, kdy se použijí chemicky vázané různé aminové fáze, dochází k různé retenci v závislosti na použitém chemicky vázaném ligandu.

Jako druhý mechanismus, který se uplatňuje, je mechanismus iontové výměny, neboť mnohé stacionární fáze mají vlastnosti iontoměniče. Tento mechanismus může být použit při ovlivnění selektivity separace. K ovlivnění retence se používá také přídavek pufrů do mobilní fáze. Retence klesá se zvyšující se koncentrací solí. Vliv pH závisí na vlastnostech solutu; v případě že dochází k disociaci solutu retence se zvyšuje oproti neutrálním solutům.

### Stacionární fáze a kolony pro HILIC

Jako stacionární fáze se používá chemicky vázaný aminopropyl na silikagelu. Jako alternativa se používá silikagel dynamicky pokrytý polyaminy (triethyltetramin nebo spermidin) nebo zesítněném polyaminy chemicky vázané na silikagel (polyvinylalkohol derivatizovaný polyaminy), které jsou hydrolyticky stabilnější. Jako další stacionární fáze se používá samotný silikagel kde volné silanolové skupiny hrají roli středního iontoměniče. Mezi další stacionární fáze HILIC patří chemicky vázané fáze na silikagel jako je diol (glycidylpropyl) nebo acetamidopropylová fáze. K použitelným fázím pro HILIC je možné také zařadit neutrální hydrofilní polymerové fáze. Jsou to zejména hydrofilní methakrylátové fáze používané v GPC. Povrch těchto stacionárních fází obsahuje polyolové skupiny, které jsou velmi hydrofilní.

### *Mobilní fáze*

Teoreticky je možné použít jako mobilní fáze všechny vodno-organické fáze, ale preferuje se především acetonitril, který má malou viskozitu a tím vysokou účinnost separace a nízký tlak na chromatografické koloně. Obvyklá koncentrace acetonitrilu se pohybuje v rozmezí od 50 do 90 %, pro separaci například sacharidů je obsah acetonitrilu 70 % optimální. Může se také použít isopropanol, ale mobilní fáze mají vyšší viskozitu.

V případě, že se uplatňuje na koloně mechanismus iontové výměny, se k ovlivnění retence používají pufované mobilní fáze. Se zvýšením koncentrace solí klesá retence, ale stoupá doba ekvibrace kolony. Jako soli se používají organické aminy (triethylamin). Pro malé molekuly roste retence asi o 10 % se změnou o každé 1 % organického rozpouštědla. Koncentrace solí se pohybuje od 5 do 15 mM, se stoupajícím obsahem organického modifikátoru může docházet ke srážení těchto solí ze systému, a proto by se jejich koncentrace měla snižovat. Jako vhodné k použití se jeví chloristany, fosforečnany triethylaminu (koncentrace až 100 mM v 80 % acetonitrilu) a sodné soli kyseliny methylfosforečné.

### *Aplikace*

Klasickým příkladem separace technikou HILIC je separace sacharidů, aminokyselin, peptidů a polárních organických kyselin a zásad. Při separaci sacharidů se používá aminopropyllová fáze jako stacionární a mobilní fáze acetonitril-voda (70+30) ve spojení s refraktometrickým detektorem, UV detektorem při UV < 200 nm nebo ELSD detektorem. V případě UV detekce je možné použít i gradientové eluce.



## **3.2.6 Vliv chromatografických podmínek na eluční charakteristiky separovaných látek [19]**

### **3.2.6.1 Vliv teploty na chromatografické vlastnosti**

Teplota má vliv na:

- Termodynamický aspekt chromatografického procesu (z hlediska změny distribuční konstanty, obdobně pro kapacitní poměr). Se vzrůstající teplotou klesá distribuční konstanta a kapacitní poměr.
- Kinetický aspekt chromatografického procesu. Teplota má vliv na velikost difúzních koeficientů, které jsou funkcí teploty a viskozity mobilní fáze (odvozeno z Wilke – Changovy rovnice). Zvýšením teploty roste účinnost chromatografické kolony, klesá viskozita a zvyšují se difúzní koeficienty.

### **3.2.6.2 Vliv složení mobilní fáze na retenci solutů**

Složení mobilní fáze má vliv na:

- účinnost kolony
- kapacitní poměr
- retenční poměr
- rozlišení
- dobu analýzy
- citlivost

Ve dvousložkových (binárních) systémech dochází k poklesu retence s rostoucí objemovou frakcí organického rozpouštědla a s klesající polaritou organického rozpouštědla v mobilní fázi.

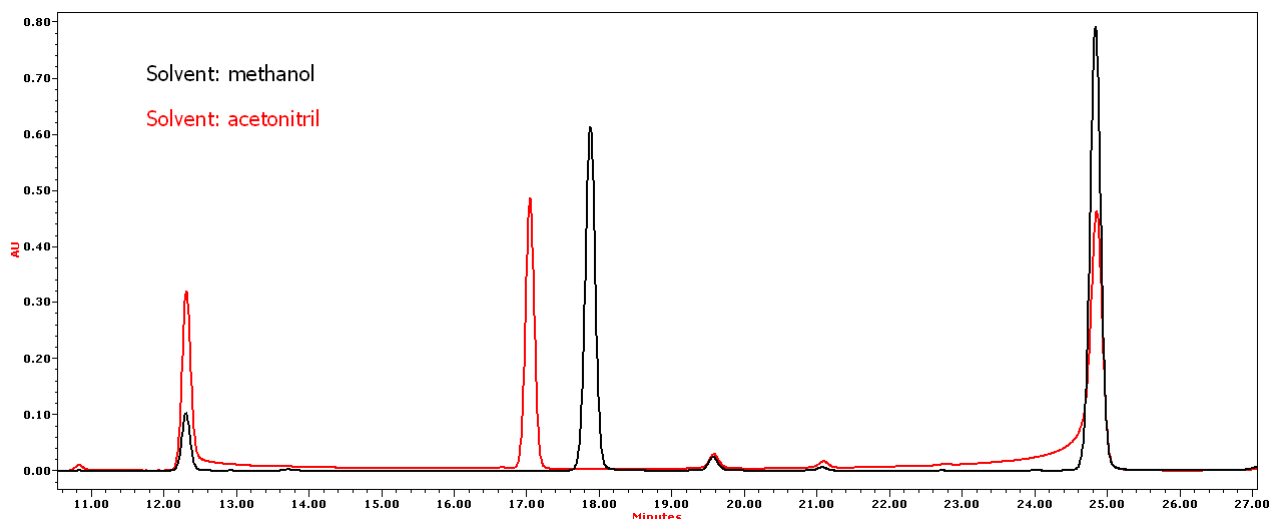
### **3.2.6.3 Vliv pH mobilní fáze na retenci solutů**

Silně polární a iontové látky se na nepolárních fázích zdržují velmi málo nebo vůbec a eluují v mrtvém objemu kolony nebo dříve, než odpovídá mrtvému objemu kolony – což je jev tzv. iontové výluky. Pro látky iontové povahy proto můžeme jejich

chromatografické chování ovlivnit volbou pH mobilní fáze, kdy změnou pH mobilní fáze dochází k potlačení disociace slabých kyselin ( $\text{pH} < 7$ ) či slabých bazí ( $\text{pH} > 7$ ). Potlačení disociace dochází ke zvýšení retence a zamezení chvostování píku dané chromatografované látky. Pro organické kyseliny dochází k potlačení disociace snížením pH na hodnotu asi  $\text{pH} 2\text{--}5$ , pro organické báze dochází k potlačení disociace zvýšením pH na hodnotu asi  $\text{pH} 7\text{--}8$ , toto pH je omezeno rozpouštěním silikagelu při  $\text{pH} > 8,5$ . Selektivita pro karboxylové kyseliny na reverzní fázi je závislá na použité mobilní fázi (její pH) a na použité reverzní stacionární fázi. V reverzních stacionárních fázích závisí retence jednosytné kyseliny HA na pH a na disociační konstantě karboxylové kyseliny. Zvýšení retence a zlepšení symetrie píků ionizovaných látek je možno dosáhnout přidávkem neutrálních solí do mobilní fáze – tzv. vysolovací efekt.

### 3.2.6.4 Vliv rozpouštědla (solventu) vzorku na selektivitu a účinnost systému

Volba rozpouštědla vzorku závisí na rozpustnosti analytutu v solventu, stabilitě solutu v daném rozpouštědle a na složení mobilní fáze.



Obrázek 31: příklad nekompatibility solventu vzorku a mobilní fáze při gradientové eluci (za povšimnutí stojí ztráta účinnosti a změna retence)

### 3.2.6.5 Vliv velikosti nástřiku na účinnost kolony

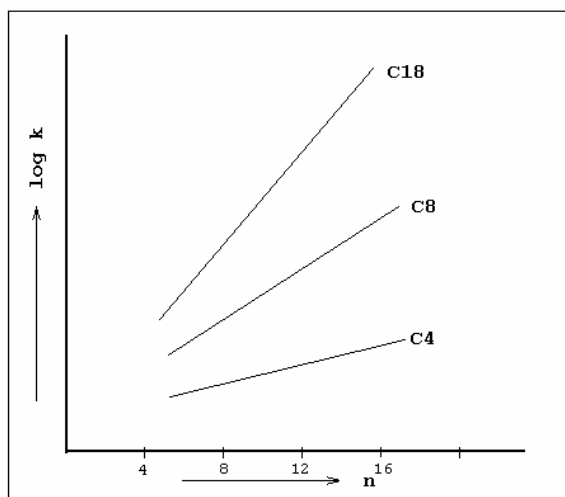
Na účinnost kolony má vliv velikost nástřiku zejména u mikrokolon.

Exaktně vyjádřeno je maximálně použitelný objem dávkovaného vzorku závislý na účinnosti chromatografického systému vyjádřený počtem teoretických pater a na retenčním objemu.

### 3.2.6.6 Výběr stacionární fáze – vliv na retenci solutů a jejich selektivitu <sup>14</sup>

Termodynamické chování chromatografovaných látek (retence a selektivita) určuje chemicky vázaná stacionární fáze a dynamické vlastnosti (účinnost kolony a permeabilita) jsou dány strukturou a velikostí části nosiče. Jako nosič se nejčastěji používá silikagel, jehož povrchové hydroxylové skupiny se modifikují příslušnou chemickou reakcí s vhodnými organickými sloučeninami (ligandem), na jejichž charakteru závisí selektivita připravené fáze.

Při chromatografii na nepolární fázi se ovlivní retence látek množstvím nepolární fáze na nosiči (obsah uhlíku a délka alifatických řetězců). S rostoucí délkou vázaného alifatického řetězce roste i retence na nepolárních fázích.

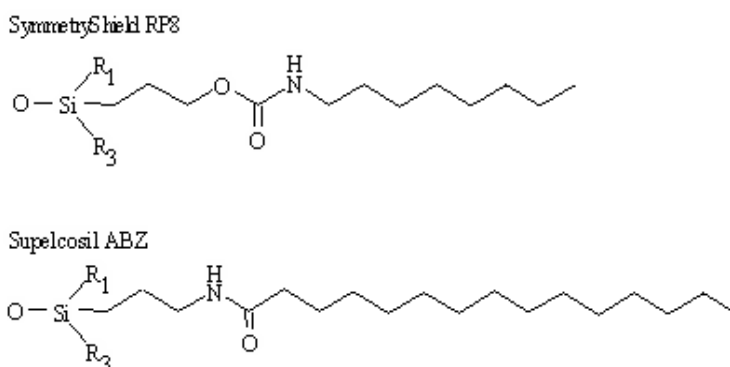


Obrázek 32: Závislost log k alkanů na počtu uhlíkových atomů v jejich molekule (n) na reverzní fázi s různými délkami vázaných alkylů (C4 až C18)

<sup>14</sup> Text byl čerpán ze zdroje [19].

Použitím polárnějších stacionárních fází (např. fenylová stacionární fáze) dochází ke zvýšení retence solutů a současně dochází ke změně selektivity aromatických sloučenin (vliv  $\Pi$ - $\Pi$  interakce mezi stacionární fází a solutem).

Zvýšením polarity stacionární fáze roste retence solutů obdobně jako s rostoucí délkou alkyly stacionární fáze. Tohoto se dosáhne modifikací ligandu tak, že se začlení polární skupina (ligand) do organického uhlíkového řetězce stacionární fáze mezi povrch silikagelu a nepolární vrstvu. Jako příklad je možné uvést komerčně dodávané sorbenty SymmetryShield RP8, která má včleněnou do ligandu karbamátovou skupinu a nebo Supelcosil ABZ+ (Discovery RP-Amide C16), která má včleněnou amidickou skupinu:



Obrázek 33: sorbenty reverzní fáze SymmetryShield, Supelcosil ABZ+

Tento krok zmírňuje interakci analytu s povrchovými volnými silanolovými skupinami, zejména bazických polárních látek.

## 3.2.7 Popis používaných kolon

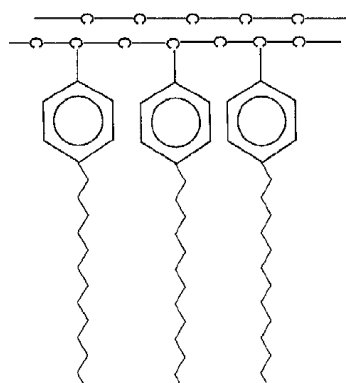
### 3.2.7.1 Kolona Discovery Zr<sup>15</sup>

Jedná se o kolony s nosičem ZrO<sub>2</sub>. Čtyři typy stacionárních fází (Zr-PS, Zr-PBD, Zr-Carbon, Zr-Carbon C18) jsou chemicky vázané na sférických, porézních částicích o velikosti 3 a 5 μm. Částice sorbentu jsou mechanicky velmi stabilní, nezávislé na iontové síle mobilní fáze, nebobtnají ani nedochází k jejich kompresi. Jsou stabilní v celém rozsahu hodnot pH (0–14). Kolony jsou tepelně stabilní do 100 °C a ve speciální úpravě až do 150 °C, popř. 200°C.

#### 3.2.7.1.1 Kolona Discovery Zr-Carbon

Částice ZrO<sub>2</sub> jsou pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Fáze je určena pro RP separace geometrických izomerů a diastereomerů. Povrch je vysoce hydrofóbní. Nedoporučuje se pro analýzu aromatických sloučenin s planární strukturou, které jsou zadržovány příliš silně. Aby nedocházelo k zadržování těchto látek na koloně, do mobilní fáze se přidává tetrahydrofuran.

#### 3.2.7.1.2 Kolona Discovery ZR – Carbon C 18

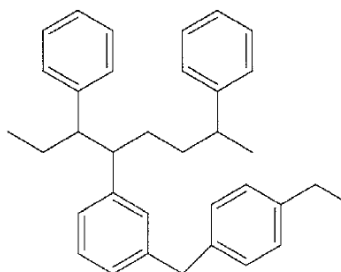


Částice ZrO<sub>2</sub> jsou pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Uhlíková vrstva je následně modifikována kovalentně vázanými oktadecylovými skupinami. Tato fáze je hodnocena jako univerzální, ideální pro separace látek kyselých, bazických i neutrálních. Její selektivita je naprosto odlišná od oktadecylových kolon se silikagelovým nosičem.

Obrázek 34: struktura Zr - Carbon C18

### 3.2.7.1.3 Kolona Discovery Zr-PBD

Částice  $ZrO_2$  jsou pokryty polybutadienem. Fáze je svými separačními vlastnostmi nejvíce podobná oktadecylovým kolonám se silikagelovým nosičem. Je určena pro separace bazí, především aminů. Mechanismus separace je reverzní, ale tento sorbent je méně hydrofóbní než C18, tudíž je třeba snížit obsah organických rozpouštědel v mobilní fázi.



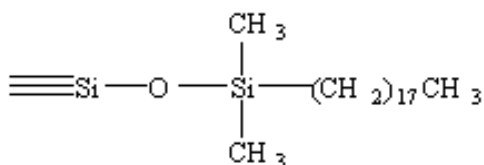
Obrázek 35: struktura Zr – PBD

### 3.2.7.2 Kolona Discovery HS [42]

Kolony Discovery HS jsou kolony na bázi silikagelu s velkým specifickým povrchem. Zkratka HS vychází z anglického označení high surface. Tyto kolony mají specifický povrch  $300 \text{ m}^2/\text{g}$ . Kolony jsou doporučovány pro aplikace s hmotnostní detekcí.

Silikagel je vysoce čistý, částice sorbentu jsou dokonale sférické s úzkou distribucí jejich velikostí.

Dodávají se s chemicky vázanou fází C18, se zvýšeným pokrytím uhlíkem (20% C), co způsobuje výrazné zvýšení hydrofobicity. Kolona je vhodná především pro analýzu směsí látek s podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi.

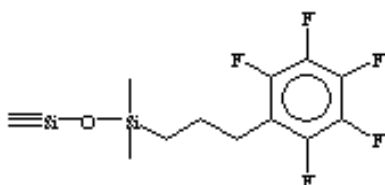


Obrázek 36: struktura C18 chemicky vázané fáze

Kromě fáze C18 jsou dodávány další nové typy chemicky vázaných RP fází s vloženou polární skupinou, a sice pentafluorofenylpropyldimetylsilan a polyetylenglykol, které se vzájemně liší především hydrofobicitou.

### 3.2.7.2.1 Kolona Discovery HS-F5 (pentafluorofenylová)

Je určena pro speciální analyty, jako např. látky bazické a halogenované deriváty.

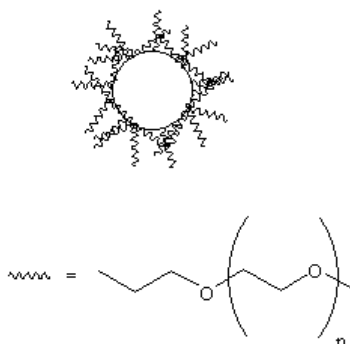


Obrázek 37: struktura HS-F5

Je vhodná zejména pro  $\pi$ -donor/  $\pi$ -akceptorové interakce s vhodným analytem. Separace na pentafluorofenylpropylové fázi je obdobná jako na oktadecylové. Stacionární fáze vykazuje vyšší selektivitu vůči aromatickým solutům. Na těchto fázích je možné používat 100 % vodné mobilní fáze bez zhroucení stacionární fáze v rozmezí pH 2,0 – 8,0 do teplot až 70 °C.

### 3.2.7.2.2 Kolona Discovery HS-PEG (polyetylenglykolová)

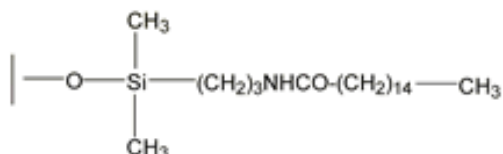
Je určena pro speciální analyty, jako např. látky fenolické.



Obrázek 38: struktura HS-PEG stacionární fáze

### 3.2.7.3 Kolona Discovery RP – Amide [43]

Kolona slouží pro stanovení molekul menších než 2000 mw, polárních sloučenin. Palmitamidopropylová stacionární fáze zakotvená na silikagelu zajišťuje stabilitu kolony v rozmezí pH od 2 do 8. Zaručuje vyšší selektivitu a lepší tvary píků oproti C18, je méně hydrofobní oproti C18 a je kompatibilní v 100% vodné mobilní fázi.



Obrázek 39: struktura RP- Amidové stacionární fáze

### 3.2.7.4 Kolona Phenomenex Gemini [18,44]

Gemini je sorbent na bázi silikagelu s vysokou stabilitou v rozmezí pH od 1 do 12. Je to dáno hybridní polymerní technologií při výrobě těchto kolon.

Změnou pH mobilní fáze může být dosaženo alternativní selektivity i pro ionizovatelné látky. Příkladem jsou kyselé látky, které vykazují vysokou retenci při hodnotě pH nižší než je jejich  $pK_a$ , zatímco bazické látky mají větší retenci v oblasti pH nad hodnotu jejich  $pK_a$ .

Gemini kolona může být použita pro stanovení všech typů látek (od polárních bazických až po kyselé a nepolární).

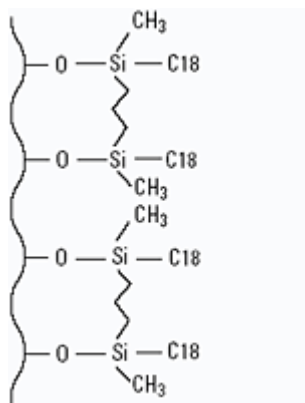
### 3.2.7.5 Kolona Chromolith Performance

Patří mezi monolitické kolony (na bázi silikagelu). Monolitní fáze kolony Chromolith TM má porézní strukturu, díky níž je zpětný tlak jen zlomkem hodnot dosahovaných v běžné praxi. Při zachování účinnosti běžných HPLC kolon (N/m typicky přes 1 000 000) je rozsah použitelných průtoků pro často používané mobilní fáze do 9 ml/min. Několikanásobné zkrácení času analýzy při využití možností současné HPLC instrumentace, které má výrazně pozitivní vliv na fungování a ekonomiku provozu analytické laboratoře, je hlavní výhodou vyplývající z uvedených vlastností.



Výroba Chromolithu™ vychází z totožného materiálu jako výroba sorbentu Purospher® (syntetický tetraetoxysilan), tzn., že stávající metody vyvinuté na koloně Purospher® jsou snadno přenosné na monolitní kolonu [45].

### 3.2.7.6 Zorbax Extend C18 [37]



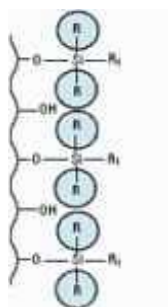
Kolony ZORBAX Extend-C18 jsou unikátní díky bonding technologii s dvojitým můstkem mezi skupinami C18. Tento typ sorbentu umožňuje práci i při velmi vysokém pH, protože bazické sloučeniny nemohou interagovat se silikagelem. Mobilní fáze při vyšším pH zpravidla obsahují např. triethylamin, pyrrolidin, glycin nebo hydroxid amonný.

Obrázek 40: struktura kolony Zorbax Extend C18

Hydroxid amonný při pH 10,5 je vynikající modifikátor mobilní fáze pro LC/MS peptidů i malých molekul a zpravidla poskytuje lepší výsledky než TFA při nízkém pH. Kolony se tedy používají pro stanovení všech typů látek (od kyselých až po bazické), zaručují stabilitu v rozmezí pH od 2 do 11,5. Nejlepší stabilita je však získána při pH > 6, používáním organických pufrů o nízké koncentraci (10 – 50 mM) a teploty nižší než 40 °C. Naopak při nízkém pH dochází k hydrolyze. Tento druh kolony je účinnější než některé polymerní kolony, kdy vykazuje lepší tvar píků.

Mobilní fází je methanol, voda, acetonitril. Obecně platí, že zvýšením množství organické komponenty v mobilní fázi dochází k prodloužení retence zadržovaných látek.

### 3.2.7.7 Kolony Zorbax SB [37]



Kolony Zorbax StableBond obsahují patentované monofunkční silany se stérickou ochranou diisobutylovými (u SB-C18) nebo diisopropylovými (u SB-C8, -C3, -Phenyl, -CN a -Aq) řetězci. Kolony jsou velmi odolné vůči hydrolýze při nízkém pH.

Obrázek 41: struktura kolony Zorbax SB

Vlastnosti kolon:

- pórovitost 80 Å (pro menší molekuly) nebo 300 Å (pro proteiny aj.)
- stabilita při nízkém pH (až do pH 1)
- stabilita i při použití mobilních fází s obsahem TFA
- doporučeno pro pH 1-6
- teplotní odolnost až do 80-90°C
- s pórovitostí 80Å jsou dostupné: SB-C18, -C8, -Phenyl, -CN, -C3 a -Aq (SB-Aq lze použít i pro 100% vodné fáze)
- s pórovitostí 300Å jsou dostupné: 300 SB-C18, -C8, -CN a -C3
- kolony jsou dostupné ve všech velikostech až pro preparativní

#### 3.2.7.7.1 Kolona Zorbax SB – C18

Stacionární fáze této kolony je nepolární. Diisobutyl n-oktadecyl silanová stacionární fáze redukuje silnou adsorpci bazických sloučenin a zajišťuje vysokou životnost a stabilitu při pH nižší než 5. Možné používané rozmezí pH se ale pohybuje od 0,8 – 8. Při pH vyšším než 6 je nutno k docílení delší životnosti kolony snížit teplotu pod 40 stupňů a použít pufrů o nízké koncentraci.

Mobilní fázi je voda, methanol, acetonitril, přičemž platí, že s vyšším obsahem organické komponenty v mobilní fázi dochází k prodloužení retence zadržovaných látek.

### **3.2.7.7.2 Kolona Zorbax SB – Phenyl [46]**

Tato kolona obsahuje chemicky modifikovanou diisopropyl phenetylovou stacionární fází, která zajišťuje velkou životnost a stabilitu kolony v rozmezí pH od 1 do 8. Umožňuje stanovení všech typů látek – od kyselých až po bazické. Nejvyšší stabilita kolony je zajištěna při pH nižším než 4 (tudíž je možno použít velmi agresivní mobilní fázi – pH pod 2), naopak při používání vyššího pH než 6 se vysoké stability docílí použitím pufrů o nízké koncentraci a snížením teploty pod 40 stupňů. Nejčastěji používané pufrů jsou uhličitanový a fosforečnanový.

Používá se pro RP separaci. Maximální možná teplota je 80 stupňů.

### **3.2.7.7.3 Kolona Zorbax SB – CN [47]**

Diisopropyl cyanopropyl (zakotvený ke speciálnímu Rx-Sil pórovitému silikagelu) stacionární fáze je chemicky stálá v nízkém pH a zajišťuje dlouhou životnost kolony. Stabilita je však zaručena v rozmezí pH 1 – 8. Při vyšších pH se stabilita kolony docílí snížením teploty pod 40 stupňů a používáním pufrů o nízké koncentraci (0,01-0,02 M). Může se použít pufr fosforečnanový, uhličitanový.

Jako mobilní fáze se používá methanol, voda, acetonitril. Zvýšením organických komponent v mobilní fázi se zvýší retence zadržovaných látek.

Použití jako RP-HPLC.

### **3.2.7.8 Kolona Zorbax TMS [48]**

Jedná se o kolonu, kde stacionární fáze (trimethylové skupiny upevňují Zorbax SIL silikagelové částice) je mírně nepolární, jako mobilní fáze je používán methanol, voda, acetonitril. S vyšším obsahem organické komponenty v mobilní fázi se prodlužuje retence zadržovaných látek.

Kolona zajišťuje vysokou stabilitu a životnost při teplotě mezi 40 a 50°C a pH od 2 do 7. Nejvyšší životnost je při pH nižším než 5. Při použití pH vyššího než 6 by se měla teplota snížit pod 40°C a použít pufrů o nízké koncentraci (např. pufr uhličitanový a fosforečnanový).

### 3.2.7.9 Ascentis Express [48, 49]

Byly vyvinuty pro rychlou a vysoce účinnou separaci pomocí LC-MS, ale také konvenčních HPLC systémů. Fused-Core částice jsou tvořeny pevným jádrem průměru 1,7  $\mu\text{m}$  a porézním obalem 0,5  $\mu\text{m}$ . Celková velikost částic je tedy 2,7  $\mu\text{m}$ . Ascentis Express mají srovnatelnou účinnost s kolonami plněnými sub-2  $\mu\text{m}$  částicemi, ale pouze poloviční nárůst tlaku na koloně. V současné době jsou dostupné jako **Ascentis C18** a **Ascentis C8**.



Obrázek 42: struktura Fused-Core částice

Výhodou této kolony je možné použití vyššího průtoku mobilní fáze, čímž dochází ke zrychlení analýzy. Kolona zajišťuje mechanickou stabilitu v rozmezí pH od 2 do 9.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

*Přístrojové vybavení:*

**Kapalinový chromatograf:**

Sestava: Waters 1525, Binary HPLC Pump Waters 2487 Dual Absorbance  
Detector Waters 717 Plus Autosampler, Waters corp., USA

Kolony: Phenomenex Gemini 3u C18 110A; 50 x 20 mm, 3 µm  
Zorbax Extend C18; 4,6 x 75 mm, 3,5 µm  
Zorbax SB – C18; 4,6 x 50 mm, 1,8 µm  
Ascentis Express C18; 10 cm x 2,1 mm, 2,7 µm  
Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 µm  
Zorbax SB – Phenyl; 4,6 x 75 mm, 3,5 µm  
Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5 µm  
Zorbax TMS; 4,6 x 250 mm, 5 µm  
Discovery HS F5; 15 cm x 4,6 mm, 5 µm  
Discovery HS PEG; 10 cm x 2,1 mm, 3 µm  
Discovery RP Amide C16; 25 cm x 3 mm, 5 µm  
Discovery ZR – CARBON C18; 7,5 cm x 4,6 mm, 3 µm  
Discovery ZR – PBD; 15 cm x 4,6 mm, 5 µm  
Merck Purospher RP – 18 e; 15 cm x 4,6 mm, 5 µm

Vyhodnocení: program Breeze, Waters corp., USA

**Laboratorní pH metr:**

Hanna instruments, pH 212, Německo

**Analytické váhy:**

Sartorius 2004 MP, Německo

*Chemikálie:*

**Ultračistá voda**, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

**Acetonitril for HPLC**, CHROMASOLV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Německo

**Methanol for HPLC**, CHROMASOLV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Německo

**Tetrahydrofuran**, CHROMASOLV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

**Kyselina fosforečná**, 85% p. a., Merk, Německo

**Methylester kyseliny p-hydroxybenzoové**, Sigma Aldrich Chemie GmbH,  
Německo

**Propylester kyseliny p-hydroxybenzoové**, Sigma Aldrich Chemie GmbH,  
Německo

**Flurbiprofen**, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Německo

**Diklofenak sodný**, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Německo

**1- (2, 6 - dichlorfenyl)- 2 indolinon**, Amoli Organics Ltd, Mumbai, India

*Příprava standardního roztoku:*

Navážka 25,00 mg diklofenaku sodného; 1,25 mg methylparabenu; 1,25 mg propylparabenu; 0,50 mg nečistoty [1-(2,6-dichlorfenyl)-2 indolinon]; 1,00 mg flurbiprofenu doplněna methanolem do 100 ml odměrné baňky.

*Mobilní fáze:*

Methanol/roztok kyseliny fosforečné o pH 2,5 (65:35)

*Původní podmínky dle metody Faf: [51]*

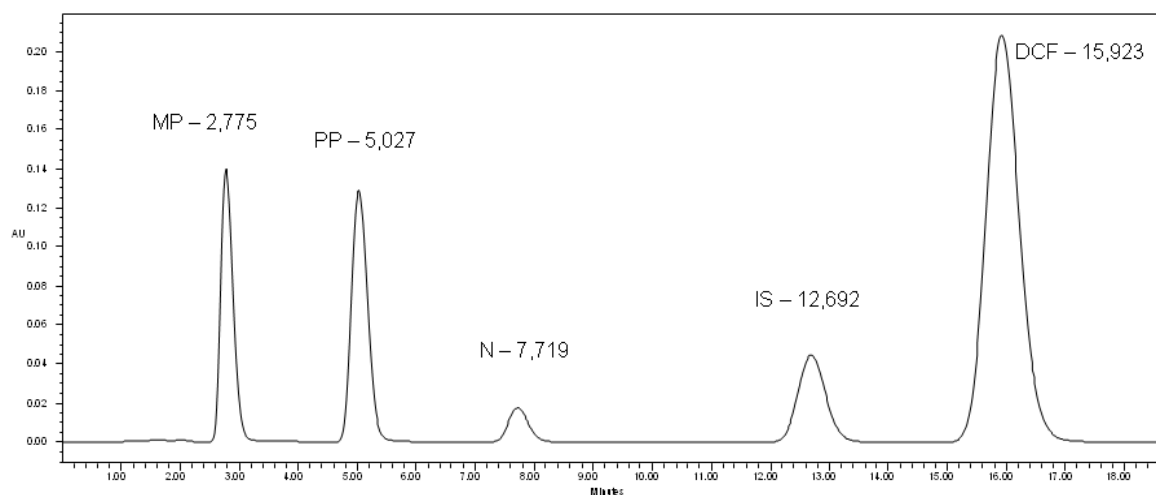
Kolona MERCK PUROSPHER RP – 18 e; 150 x 4,6, 5 µm, nástřík 20 µl, UV detekce při 254 nm, průtok mobilní fáze 0,7 ml/ min, mobilní fáze methanol/voda (65:35) – pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5.

## **5 Výsledky a diskuze**



Nejdříve byla testována kolona, na které se provádí stanovení dle metody Faf. Píky jednotlivých látek byly dokonale oddělené, doba analýzy trvala necelých 17 min.

Byly zkoušeny kolony s navázanou C18 stacionární fází, různé chemicky modifikované stacionární fáze, podle následujícího postupu: nejprve za podmínek dle původní metody Faf, poté se podmínky upravovaly tak, aby došlo k dokonalému oddělení píků jednotlivých látek pokud možno v co nejkratší době.



Obrázek 43: Kolona MERCK PUROSPHER – 18 e; 150 x 4,6, 5  $\mu\text{m}$ , nástřik 20  $\mu\text{l}$ , UV detekce při 254 nm, průtok mobilní fáze 0,7 ml/ min, mobilní fáze methanol/voda (65:35) – pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5.

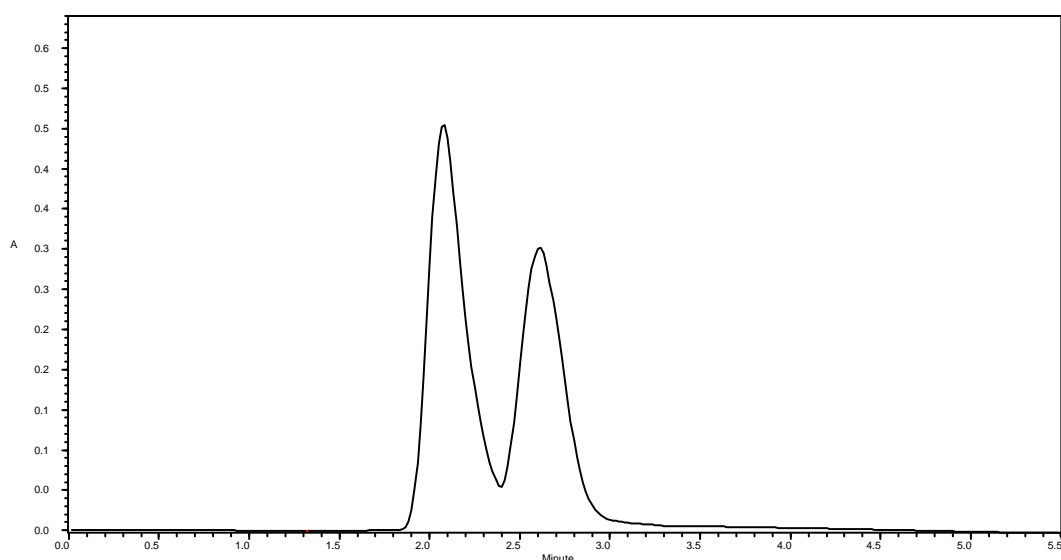
Píky jednotlivých látek dokonale odděleny až na základní linii, nevýhodou dlouhá doba analýzy.

hodnocené látky	N	T	HETP	hodnocené látky	R <sub>ij</sub>
MP	779	1,29	192,5	MP – N	4,93
N	1511	1,18	92,3	N – PP	4,67
PP	2345	1,14	64,0	P – IS	6,59
IS	3374	1,12	44,5	IS – DCF	3,38
DCF	3741	1,12	40,1		

Tabulka 6: výsledky analýzy na koloně Merck Purospher – 18 e; 150 x 4,6, 5  $\mu\text{m}$ ; průtok mobilní fáze 0,7 ml/ min, mobilní fáze methanol/voda (65:35) – pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5

*Discovery ZR – Carbon C 18; 7,5 cm x 4,6 mm, 3  $\mu$ m:*

Na této koloně při průtoku 0,7 ml/min a složení mobilní fáze methanol:tetrahydrofuran:voda (35:30:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5) nedošlo k oddělení jednotlivých látek. Stejně se dělo i při změně složení mobilní fáze na: methanol:tetrahydrofuran:voda (30:25:45, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5 při průtoku 0,7 ml/min) i methanol:tetrahydrofuran:voda (24:21:55, pH vodné složky opět upraveno 85% kyselinou fosforečnou na 2,5 při průtoku 1 ml/min).



Obrázek 44: ukázka chromatogramu na koloně Discovery ZR – Carbon C 18; 7,5 cm x 4,6 mm, 3  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:tetrahydrofuran:voda (35:30:35), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l

Po úpravě pH vodné složky 85% kyselinou fosforečnou na 4,5 opět nedošlo k rozdělení jednotlivých látek.

Kolona není vhodná pro dané stanovení - kolona není vhodná pro aromatické sloučeniny s planární strukturou – zadržování těchto látek na koloně.

*Discovery ZR – PBD 15 cm x 4,6 mm, 5 μm:*

Na této koloně při průtoku 0,7 ml a složení mobilní fáze methanol:tetrahydrofuran:voda (35:30:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85 % na 2,5) nedošlo k oddělení látek, látky se zadržovaly na koloně. Stejně se dělo i při změně mobilní fáze na methanol:tetrahydrofuran:voda (25:40:35; 10:55:35; 12:68:20, pH vodné složky vždy upraveno 85 % kyselinou fosforečnou na 2,5).

Kolona není vhodná pro dané stanovení látek - kolona je určena především pro stanovení bazických látek.

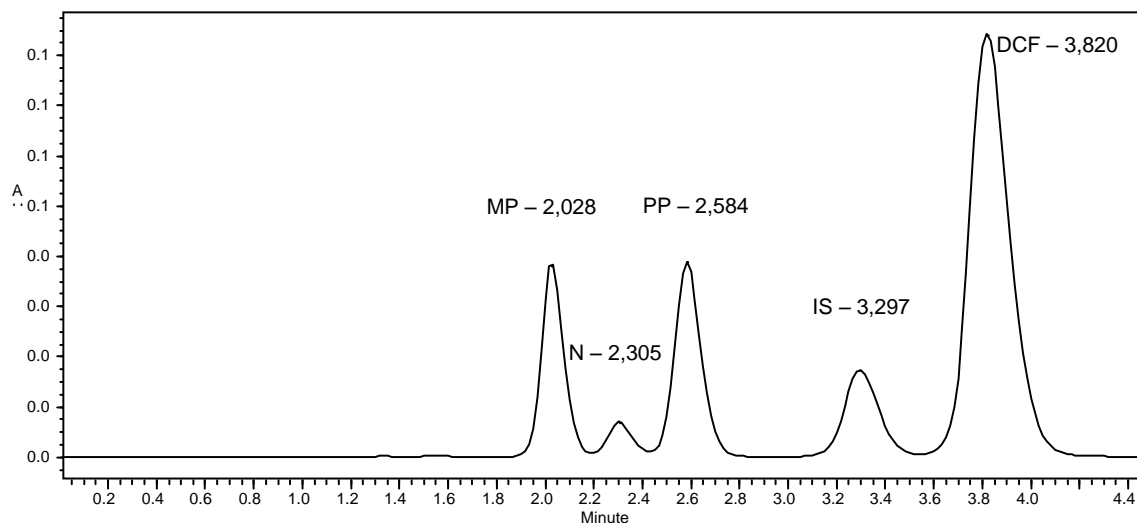
*Discovery HS-F5; 15 cm x 4,6 mm, 5 μm:*

Tato kolona je určena pro speciální analyty, jako např. látky bazické a halogenované deriváty. Je vhodná zejména pro  $\pi$ -donor/  $\pi$ -akceptorové interakce s vhodným analytem.

Na této koloně došlo k oddělení jednotlivých látek. Doba analýzy však byla příliš dlouhá (22 min). Stejně tak se dělo i při změně průtoku mobilní fáze na 1 ml/min. Doba analýzy byla 16 min. K dalšímu zkrácení doby analýzy došlo při průtoku MF 1,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (65:35), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5. Doba analýzy byla necelých 11 min.

Při změně složení mobilní fáze methanol: voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5; průtoku 1,5 ml/min došlo opět ke zkrácení doby analýzy a to na necelé 4 min.

Vlivem ionizace nečistoty došlo k přesunu píku nečistoty před propylparaben.

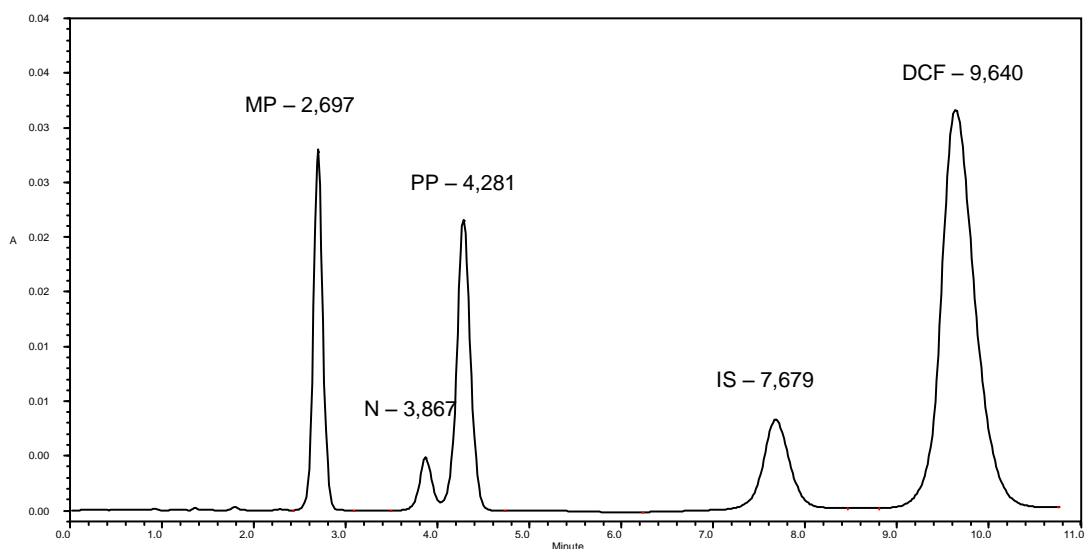


Obrázek 45: Ukázka chromatogramu na koloně Discovery HS-F5; 15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Píky jednotlivých látek dokonale rozděleny, s vysokým počtem teoretických pater a rozlišením  $R_{ij} > 1$ .

hodnocené látky	N	T	HETP	hodnocené látky	$R_{ij}$
MP	2276	1,09	65,91	MP – N	1,54
N	2354	1,07	63,72	N – PP	1,43
PP	2653	1,09	56,54	P – IS	3,07
IS	2528	1,14	59,33	IS – DCF	1,86
DCF	2574	1,19	58,28		

Tabulka 7: výsledky na koloně Discovery HS-F5; 15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5



Obrázek 46: Ukázka chromatogramu na koloně Discovery HS-F5; 15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (65:35), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Píky jednotlivých látek oddělené, s vysokým počtem teoretických pater, píky MP, N, PP vysoké, úzké, píky IS a DCF se rozšiřují.

hodnocené látky	N	T	HETP	hodnocené látky	R <sub>ij</sub>
MP	3475	1,04	43,17	MP – N	5,63
N	4248	0,89	35,31	N – PP	1,61
PP	4146	0,98	36,18	P – IS	8,82
IS	3688	1,01	40,67	IS – DCF	3,38
DCF	3506	1,19	42,78		

Tabulka 8: výsledky na koloně Discovery HS-F5; 15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (65:35), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5

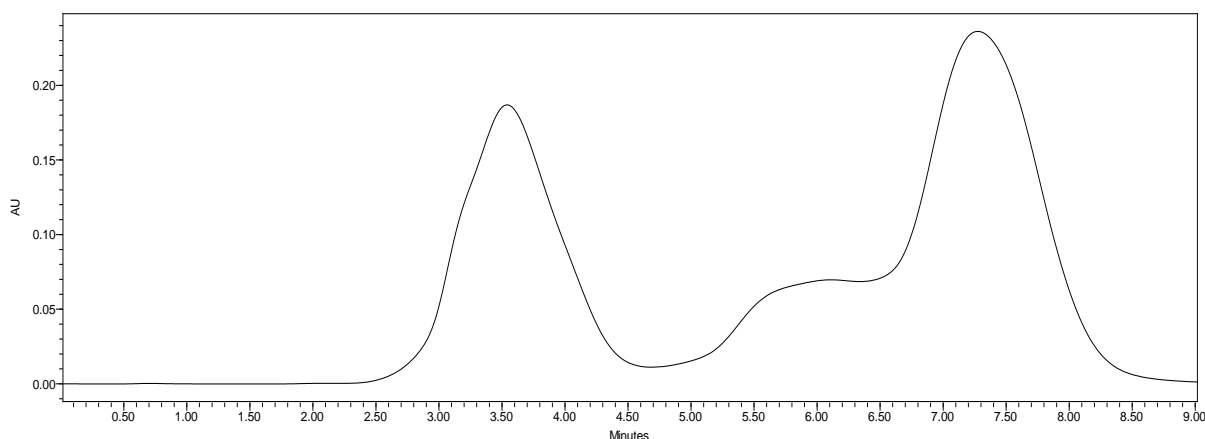
Kolona je vhodná pro dané stanovení. Nejlepších výsledků bylo dosaženo za podmínek: složení mobilní fáze methanol: voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5; průtoku 1,5 ml/min, nejen pro krátký čas analýzy, ale i pro dosažení zachování vysoké separační účinnosti (píky jednotlivých látek

dokonale rozděleny, počet teoretických pater nad 2000, dobré rozlišení jednotlivých píků).

*Discovery HS PEG; 10 cm x 2,1 mm, 3 μm:*

Na této koloně, vzhledem k vysokému tlaku, nebylo možné vyzkoušet původní metodu dle Faf, proto byla zvolena průtoková rychlost mobilní fáze 0,2 ml/ min. Během testování však nedošlo k oddělení jednotlivých látek. Byly zkoušeny tyto mobilní fáze: methanol:voda (65:35; 55:45; 30:70), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5.

Byla zkoušena i změna pH vodné složky na 3,5, ale opět nedošlo k oddělení jednotlivých látek.



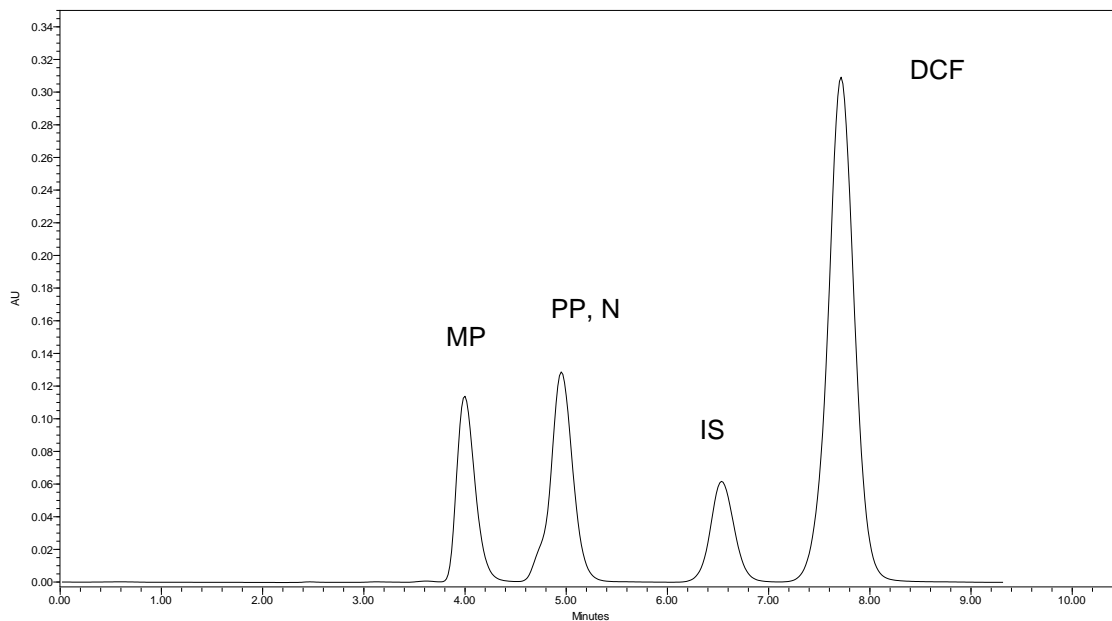
Obrázek 47: Ukázka chromatogramu na koloně Discovery HS PEG; 10 cm x 2,1 mm, 3 μm při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (55:45), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5), nástřik vzorku 5 μl.

Kolona není vhodná pro stanovení daných látek.

Kolona je určena pro speciální analyty, jako např. látky fenolické.

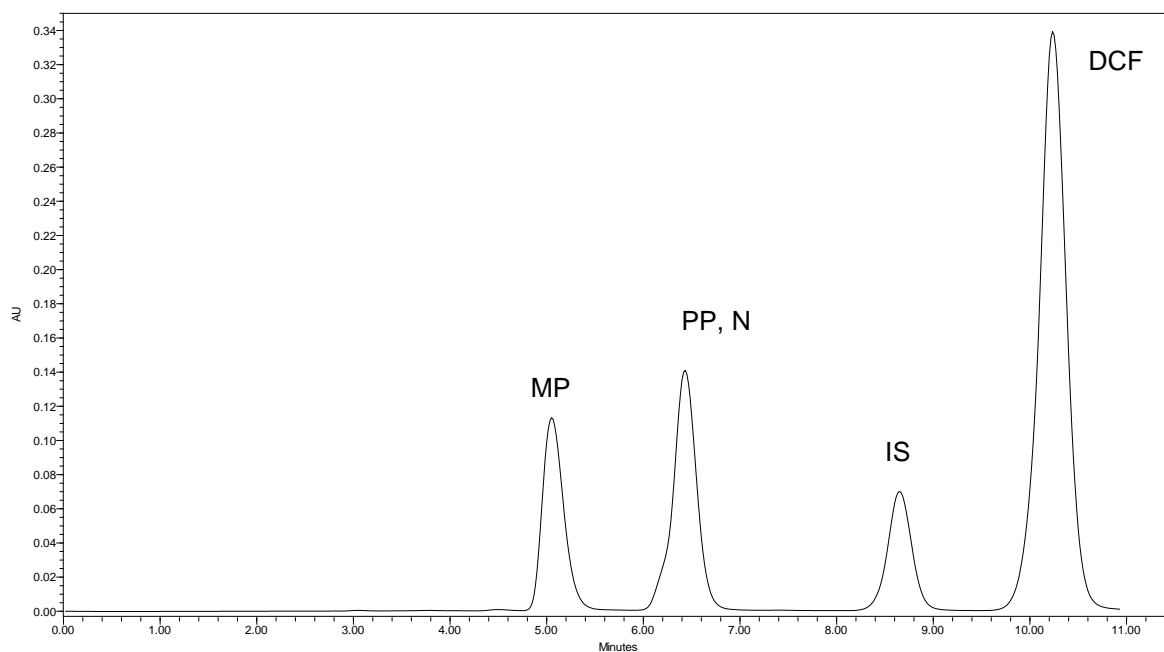
*Discovery RP Amide C16; 25 cm x 3 mm, 5 μm:*

Na této koloně, vzhledem k vysokému tlaku, nebylo možné vyzkoušet původní metodu dle Faf, proto byla zvolena průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml/ min. Během testování však nedošlo k úplnému oddělení jednotlivých látek (píky nečistoty a propylparabenu se překrývaly). Byly zkoušeny tyto mobilní fáze: methanol:voda (65:35, 75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5 a následně na 3,5.



Obrázek 48: Ukázka chromatogramu na koloně Discovery RP Amide C16; 25 cm x 3 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Nedochází k oddělení všech daných látek – píky PP a N se překrývají. Píky ostatních látek pěkného tvaru (vysoké, úzké).



Obrázek 49: Ukázka chromatogramu na koloně Discovery RP Amide C16; 25 cm x 3 mm, 5 µm při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 3,5), nástřik vzorku 5 µl.

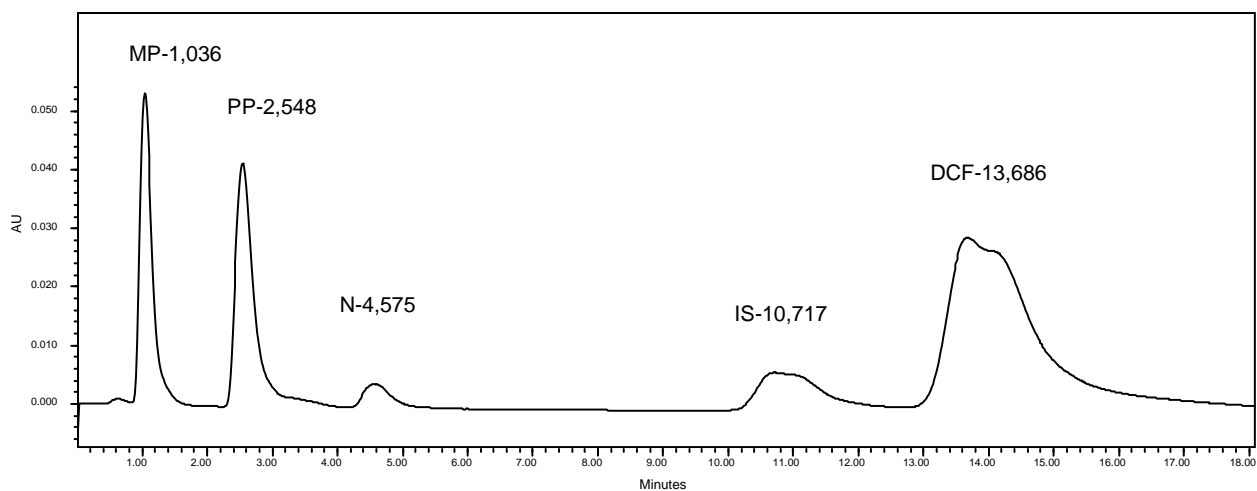
Nedokonalé oddělení jednotlivých látek, píky PP a N se překrývají.

Kolona není vhodná pro stanovení daných látek. Slouží pro stanovení polárních sloučenin.

*Kolona Phenomenex Gemini; 3u C18 110A; 50 x 2,00 mm, 3 µm:*

Při zachování původních podmínek nebyly píky jednotlivých látek dokonale oddělené. Totéž se dělo při zmenšení průtoku mobilní fáze na 0,2 ml/min a na 0,5 ml/min, proto se zkoušely různé poměry jednotlivých složek mobilní fáze methanol:voda (65:35; 60:40; 55:45; 50:50). K oddělení píků jednotlivých látek došlo při průtoku 0,5 ml/min a složení mobilní fáze methanol/voda (50:50), pH vodné složky bylo upraveno 85% kyselinou fosforečnou na 2,5. Doba analýzy trvala necelých 15 min.



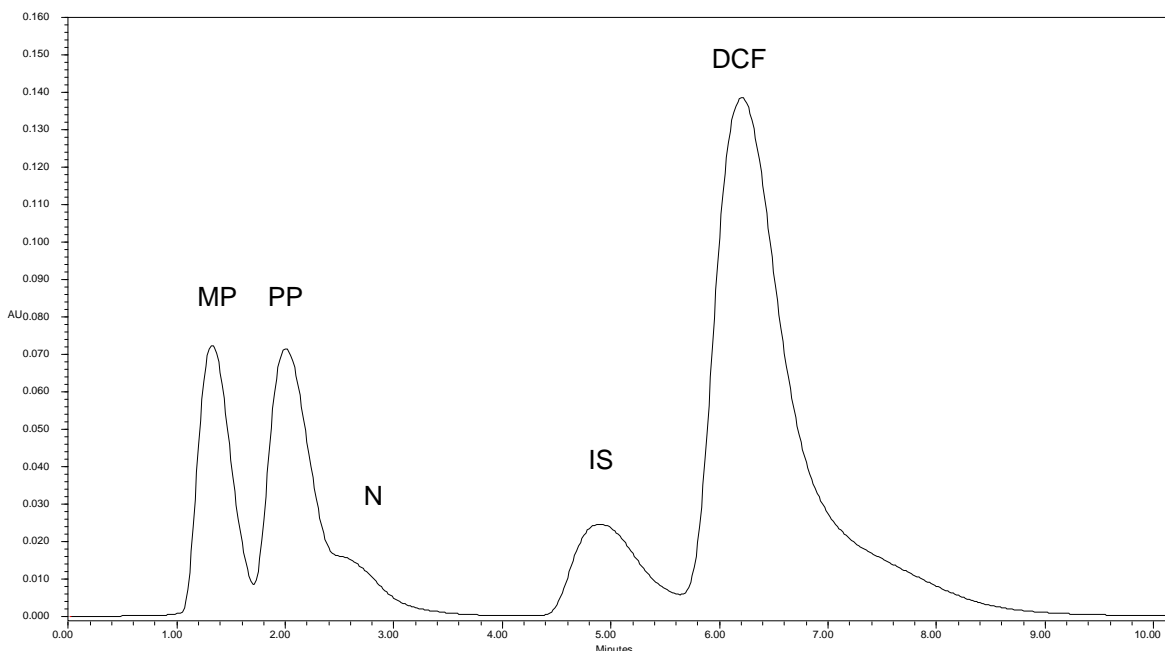


Obrázek 50: Ukázka chromatogramu na koloně Phenomenex Gemini; 3u C18 110A; 50 x 2,00 mm, 3  $\mu\text{m}$  při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (50:50, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu\text{l}$ .

Látky rozděleny na základní linii, píky jednotlivých látek široké, malý počet teoretických pater, chvostování píků.

hodnocené látky	$N$	$T$	HETP	hodnocené látky	$R_{ij}$
MP	131	1,76	381,7	MP – PP	3,42
PP	383	1,54	130,55	PP – N	2,90
N	448	1,91	111,61	N – IS	4,82
IS	632	2,09	79,11	IS – DCF	1,52
DCF	598	2,95	83,61		

Tabulka 9: výsledky pro kolonu Phenomenex Gemini; 3u C18 110A; 50 x 2,00 mm, 3  $\mu\text{m}$  při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (50:50, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5)



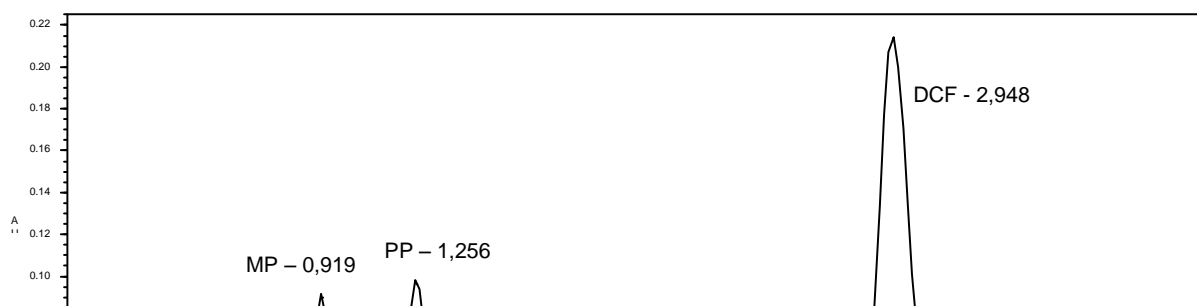
Obrázek 51: Ukázka chromatogramu na koloně Phenomenex Gemini; 3u C18 110A; 50 x 2,00 mm, 3  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Píky jednotlivých látek se překrývají, nedokonalé rozdělení až na základní linii, píky široké.

I přesto, že dochází k oddělení jednotlivých látek, tato kolona není vhodná vzhledem k špatné separační účinnosti pro dané stanovení.

*Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm:*

Na této koloně při zachování podmínek dle metody Faf došlo k úplnému oddělení látek, analýza proběhla do 5 min. Při změně průtoku mobilní fáze na 1 ml/min došlo ke zkrácení doby analýzy na necelé 3 min.



Obrázek 52: Ukázka chromatogramu na koloně Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Dokonalé oddělení jednotlivých látek, píky se nepřekrývají, odděleny až na základní linii, počet teoretických pater nad 1000 (mimo MP).

hodnocené látky	<i>N</i>	<i>T</i>	HETP	hodnocené látky	<i>R<sub>ij</sub></i>
MP	749	1,30	133,5	MP – PP	2,44
PP	1196	1,30	83,6	PP – N	1,94
N	1465	1,31	68,3	N – IS	5,42
IS	3013	1,27	33,2	S – DCF	2,37
DCF	3311	1,36	30,2		

Tabulka 10: výsledky na koloně Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5)



Obrázek 53: Ukázka chromatogramu na koloně Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Píky jednotlivých látek dokonale odděleny až na základní linii, počet teoretických pater nad 1000 mimo MP.

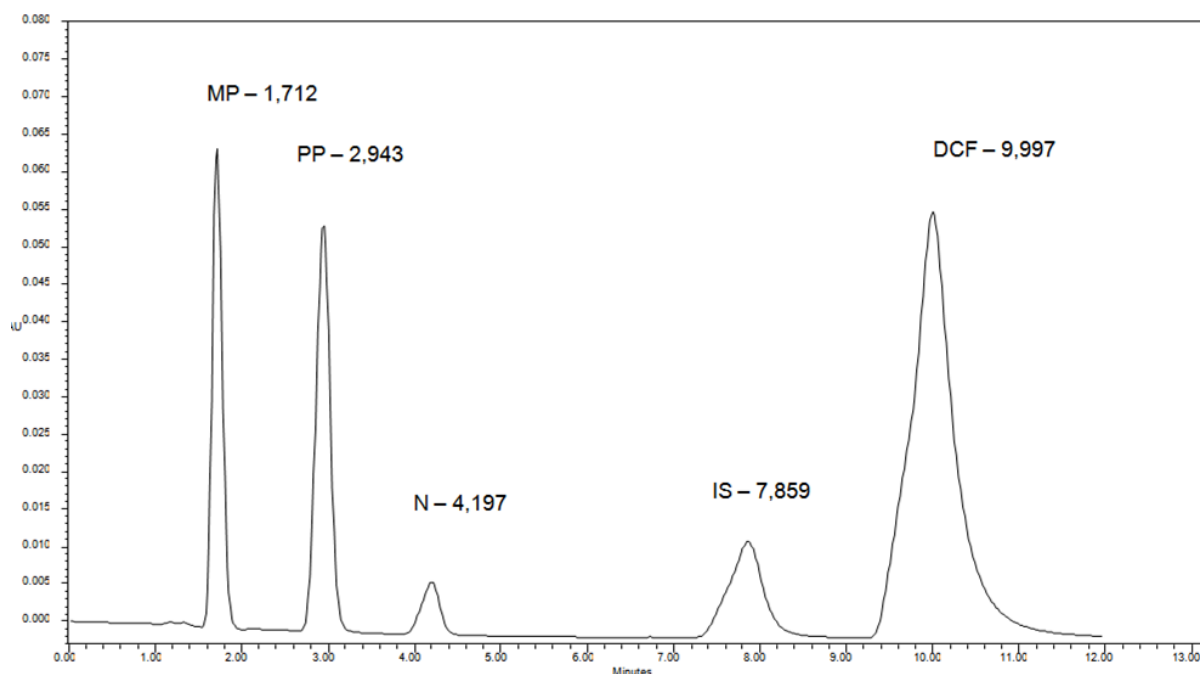
hodnocené látky	<i>N</i>	<i>T</i>	HETP	hodnocené látky	<i>R<sub>ij</sub></i>
MP	721	1,36	138,7	MP – PP	2,34
PP	1143	1,34	87,5	PP – N	1,86
N	1337	1,38	74,8	N – IS	5,22
IS	2758	1,39	36,3	IS – DCF	2,36
DCF	3238	1,48	30,9		

Tabulka 11: výsledky na koloně Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5)

Kolona je vhodná pro stanovení daných látek. Vzhledem k rychlosti analýzy a k zachování co nejlepších separačních podmínek, nejlepších výsledků bylo dosaženo při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5).

Zorbax Extend – C18; 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ :

Na této koloně byly zachovány původní podmínky, za kterých došlo k dokonalému oddělení jednotlivých píků, doba analýzy byla 10 min. (Při zvýšení průtoku mobilní fáze na 1 ml/min nedošlo k oddělení jednotlivých látek, píky jednotlivých látek byly široké). Při změně poměru složek v mobilní fázi na methanol:voda (70:30, pH vodní složky upraveno 85% kyselinou fosforečnou na 2,5) došlo ke zkrácení analýzy na necelých 7 min.



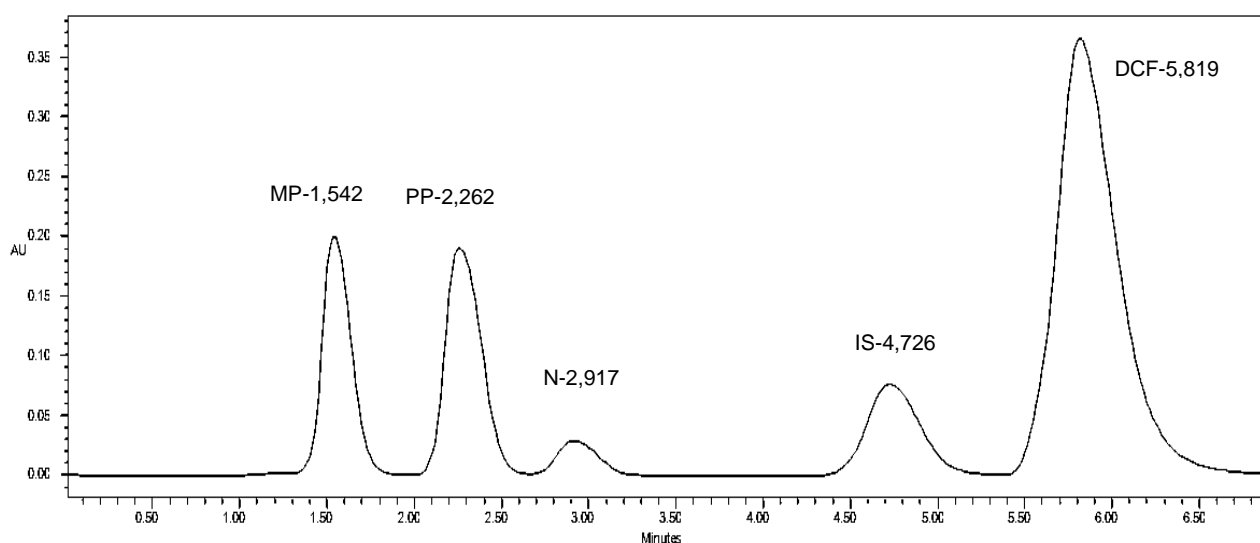
Obrázek 54: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax Extend – C18; 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu\text{l}$ .

Píky jednotlivých látek jsou dokonale odděleny, píky MP, PP vysoké, úzké, s vysokým počtem teoretických pater ( $N$  nad 1000), u  $N$  a  $IS$  dochází k frontování píků a rozšíření píků, stejně tak i u  $DCF$ .

hodnocené látky	$N$	$T$	HETP
MP	1015	1,13	73,89

PP	1494	1,00	50,20	hodnocené látky	R <sub>ij</sub>
N	1771	0,92	42,35	MP – PP	4,76
IS	1859	0,99	40,34	PP – N	3,57
DCF	2351	1,17	31,91	N – IS	6,52
				IS – DCF	2,75

Tabulka 12: výsledky na koloně Zorbax Extend C18; 4,6 x 75 mm, 3,5 µm při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5)



Obrázek 55: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax Extend – C18; 4,6 x 75 mm, 3,5 µm při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (70:30, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 20 µl.

Píky jednotlivých látek dokonale odděleny, s malým počtem teoretických pater (pod 1000), nedochází k frontování ani ke chvostování píků.

hodnocené látky	N	T	HETP
-----------------	---	---	------

MP	394	1,22	116,8	hodnocené látky	R <sub>ij</sub>
PP	527	1,26	87,2	MP – PP	2,04
N	668	1,10	68,9	PP – N	1,55
IS	1134	1,17	40,6	N – IS	3,58
DCF	1426	1,36	32,3	IS – DCF	1,86

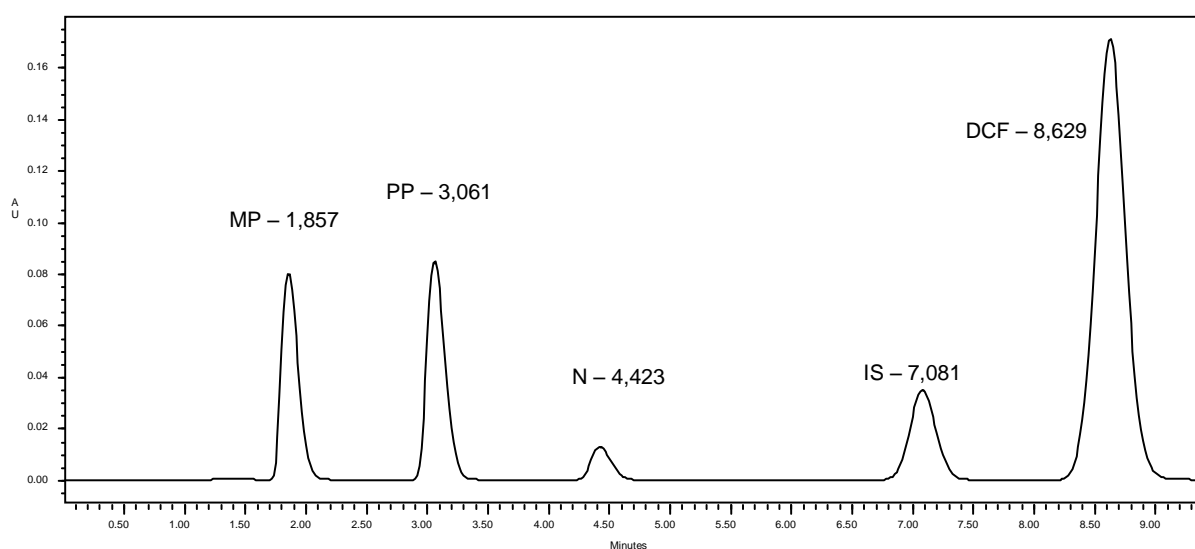
Tabulka 13: výsledky na koloně Zorbax Extend – C18; 4,6 x 75 mm, 3,5 µm při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (70:30, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 20 µl

Na této koloně dochází k oddělení jednotlivých látek, není však zachována dobrá separační účinnost kolony.

Kolona je používána především pro stanovení bazických látek.

*Zorbax SB – C18; 4,6 x 50 mm, 1,8 µm:*

Na této koloně byly opět zachovány původní podmínky dle metody Faf, za kterých došlo k oddělení píků látek, analýza proběhla do 10 min. Při změně poměru mobilní fáze methanol:voda (70:30, pH vodné složky upraveno 85% kyselinou fosforečnou na 2,5) nedošlo k oddělení jednotlivých látek. Stejně tak se dělo i při zvýšení průtoku mobilní fáze na 1 ml/min.



Obrázek 56: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax SB – C18; 4,6 x 50 mm, 1,8 µm při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze

methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřík vzorku 5  $\mu$ l.

Pěkné tvary píků jednotlivých látek, látky dokonale od sebe odděleny, počet teoretických pater > 1000 (mimo MP).

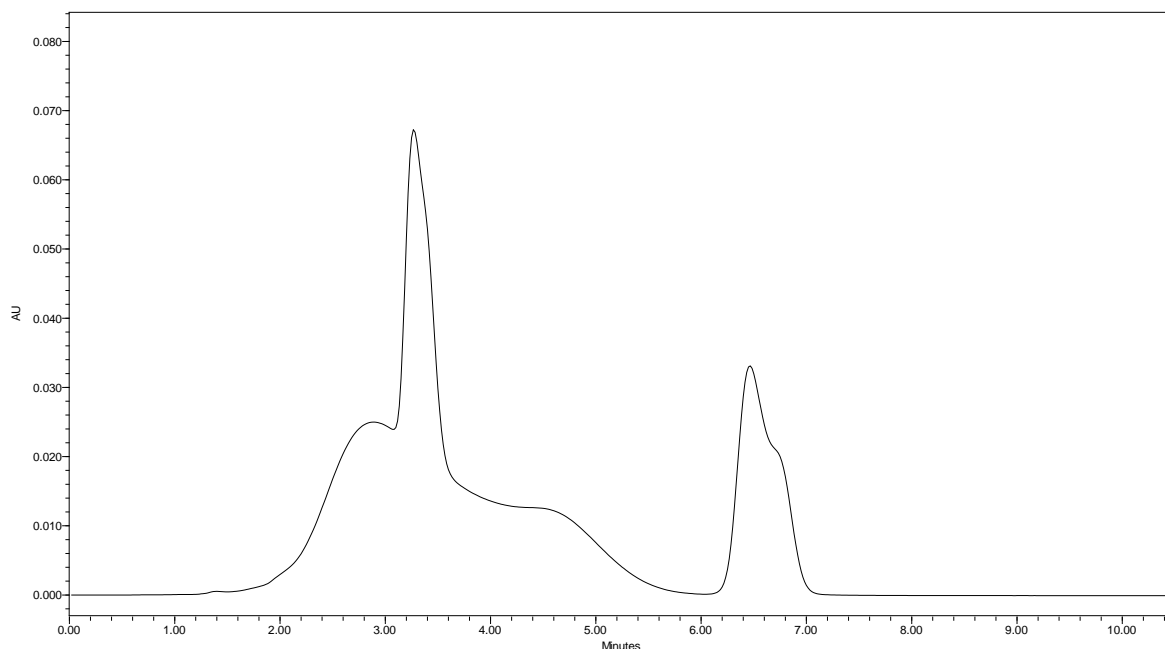
hodnocené látky	N	T	HETP	hodnocené látky	R <sub>ij</sub>
MP	822	1,33	60,83	MP – PP	4,40
PP	1809	1,28	27,64	PP – N	4,51
N	3107	1,20	16,09	N – IS	7,38
IS	4849	1,06	10,31	IS – DCF	3,60
DCF	5616	1,04	8,90		

Tabulka 14: výsledky na koloně Zorbax SB – C18; 4,6 x 50 mm, 1,8  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5)

*Zorbax SB – Phenyl; 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu$ m:*

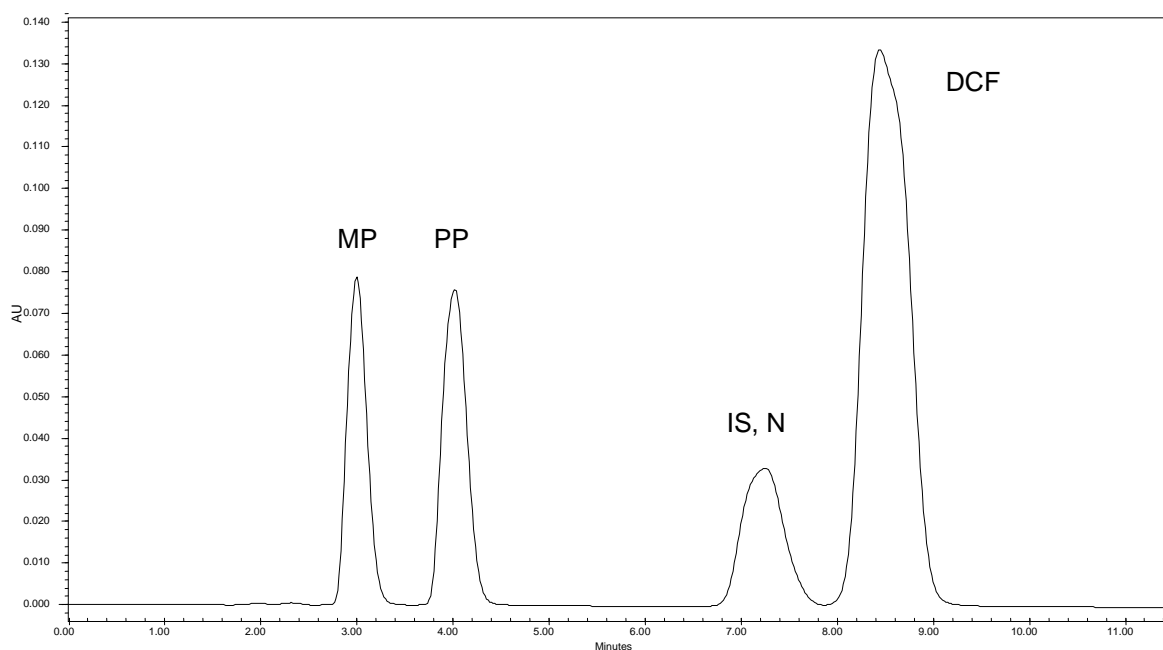
Na této koloně byla vyzkoušena původní metoda dle Faf, při které nedošlo k oddělení jednotlivých látek. Stejně tak se dělo i při změně průtoku mobilní fáze na 0,5 ml/min, 1 ml/min a změně poměru složení mobilní fáze ve prospěch vodné složky. Byly testovány poměry mobilní fáze methanol: voda (60:40, 55:45, 50:50). Byla zkoušena i změna pH vodné složky, která byla upravena 85% kyselinou fosforečnou na pH 2,8 a 3,5. Přesto však nedošlo k dokonalému oddělení jednotlivých látek.





Obrázek 57: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax SB – Phenyl; 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (50:50, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu\text{l}$ .

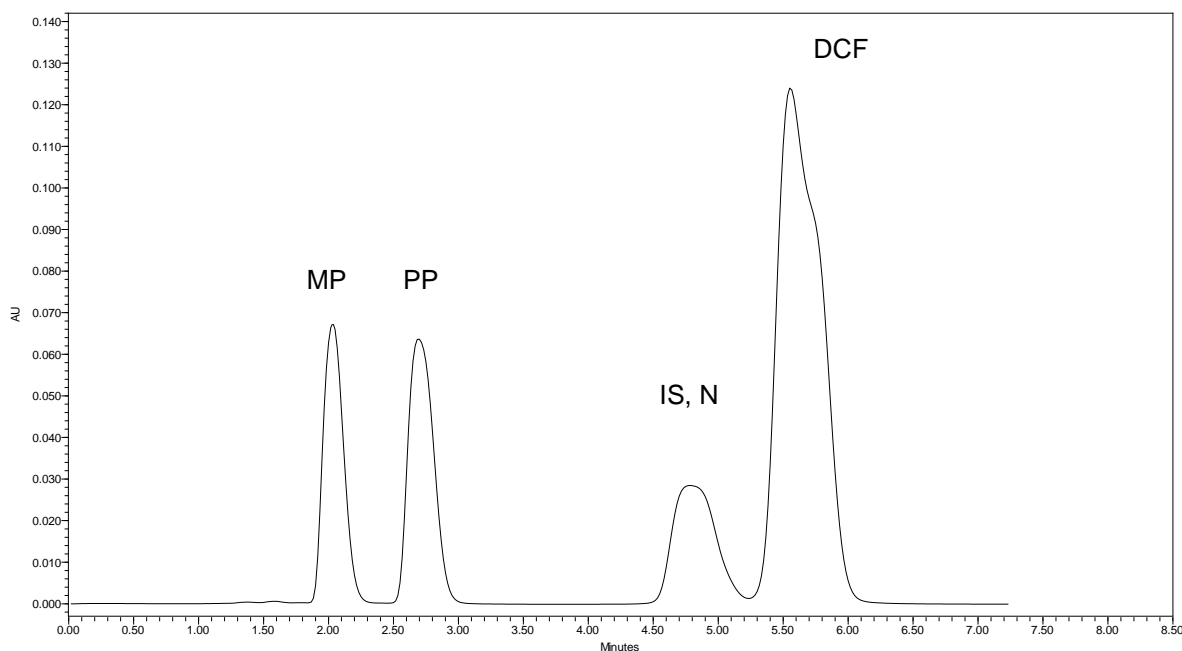
Píky jednotlivých látek splývají, nejsou oddělené.



Obrázek 58: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax SB – Phenyl; 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze

methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,8), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Pěkné tvary píků MP, PP, píky vysoké, pík nečistoty široký, píky nečistoty a vnitřního standardu se překrývají.



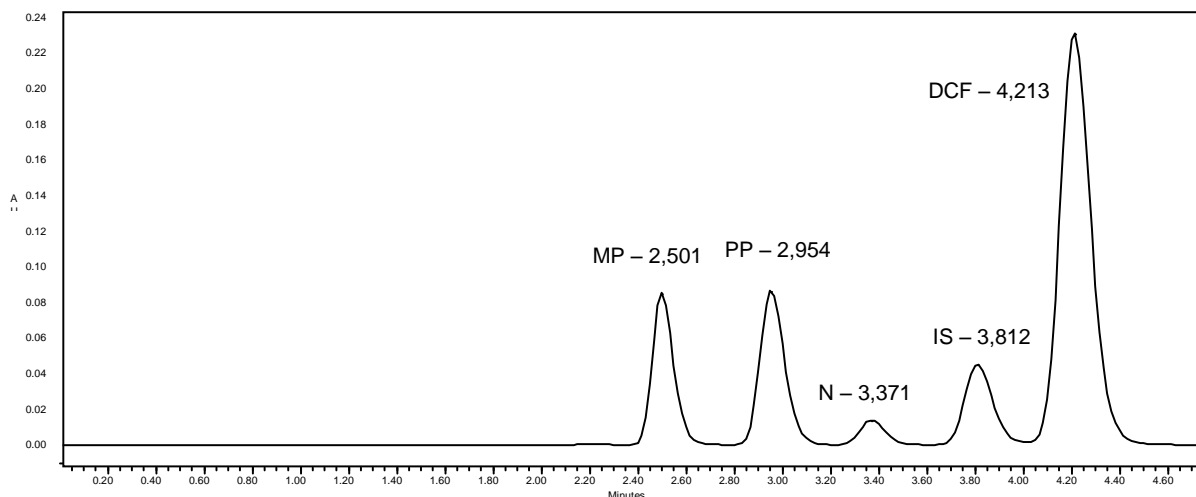
Obrázek 59: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax SB – Phenyl; 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 3,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Píky nečistoty a vnitřního standardu se překrývají, jsou široké.

Kolona není vhodná pro stanovení daných látek.

*Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m:*

Na této koloně při zachování podmínek metody Faf došlo k úplnému oddělení látek, doba analýzy trvala necelých 6 min. Přesto však při změně průtoku mobilní fáze na 1 ml/min došlo ke zkrácení doby analýzy na necelých 5 min, aniž by došlo ke změně tvaru píků či změně oddělení jednotlivých látek.



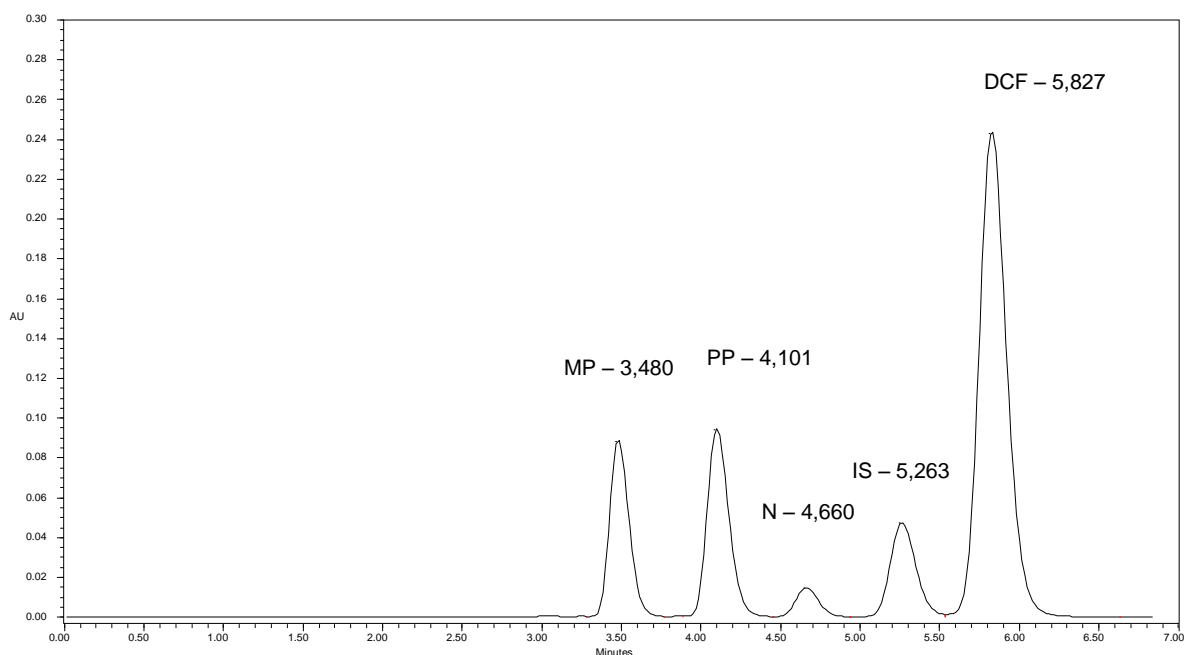
Obrázek 60: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5 µm při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5 µl.

Pěkné tvary píků, látky dokonale od sebe odděleny, počet teoretických pater je u všech stanovených látek >1000, doba analýzy necelých 5 min

hodnocené látky	<i>N</i>	<i>T</i>	HETP
MP	3647	1,20	41,13
PP	3924	1,19	38,26
N	4377	1,18	34,27
IS	4714	1,20	31,82
DCF	4850	1,16	30,93

hodnocené látky	<i>R<sub>ij</sub></i>
MP – PP	2,50
PP – N	2,07
N – IS	2,05
IS – DCF	1,75

Tabulka 15: výsledky na koloně Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5 µm při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5 µl



Obrázek 61: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik stanovované látky vzorku 5  $\mu$ l.

Pěkné tvary píků, látky dokonale od sebe odděleny, počet teoretických pater je u všech stanovených látek >1000, doba analýzy necelých 6 min.

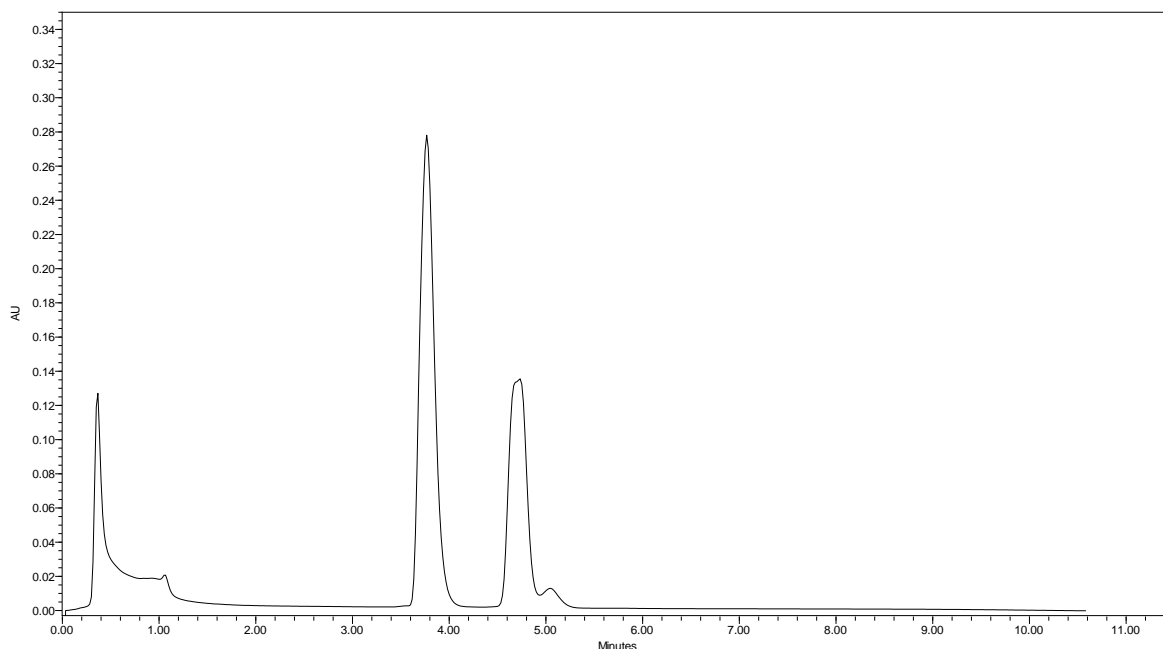
hodnocené látky	N	T	HETP	hodnocené látky	R <sub>ij</sub>
MP	3862	1,22	38,84	MP – PP	2,60
PP	4303	1,19	34,86	PP – N	2,17
N	4867	1,15	30,82	N – IS	2,14
IS	5173	1,15	29,00	IS – DCF	1,85
DCF	5362	1,17	27,97		

Tabulka 16: výsledky na koloně Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik stanovované látky vzorku 5  $\mu$ l

Tato kolona je pro zachování vysoké separační účinnosti vhodná pro stanovení daných látek. Vzhledem k času analýzy bylo nejlepších výsledků dosaženo za podmínek: složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 1 ml/min.

*Kolona Zorbax TMS; 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m*

Na této koloně nedošlo k oddělení jednotlivých látek ani za původní metody Faf, ani při změnách průtoku mobilní fáze či změně poměru složek v mobilní fázi. Byly testovány tyto mobilní fáze: metanol – voda (65:35 při průtoku 1 ml/min, 0,7 ml/min a 0,5 ml/min, 55:45 při průtoku 0,7 ml/min, pH vodné složky vždy upraveno 85% kyselinou fosforečnou na 2,5).



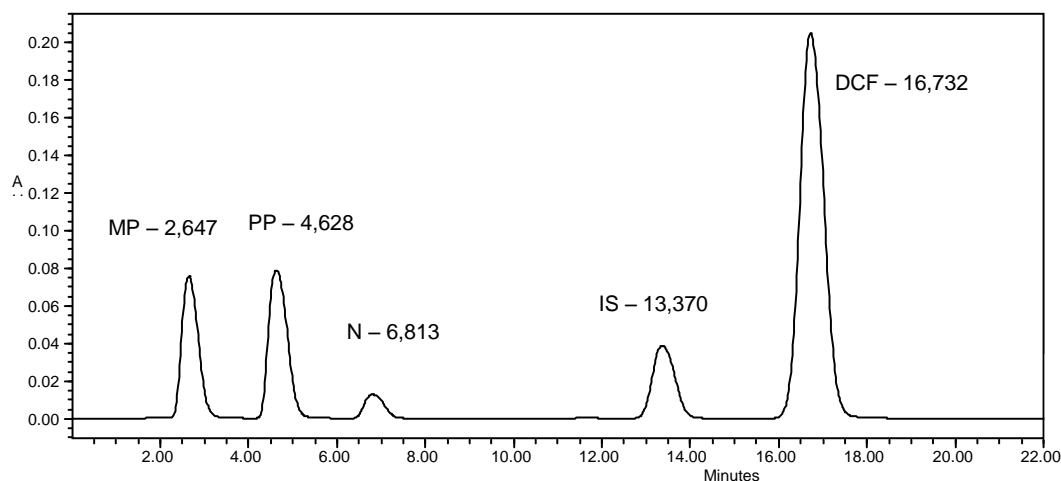
Obrázek 62: Ukázka chromatogramu na koloně Zorbax TMS; 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5  $\mu$ l.

Píky jednotlivých látek od sebe neodděleny, splývají.

Tato kolona není vhodná pro stanovení daných látek.

*Ascentis Express C18; 10 cm x 2,1 mm, 2,7 μm:*

Na této koloně je maximální možný průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, proto nebylo možné vyzkoušet metodu prováděnou na katedře Analytické chemie. Testoval se průtok mobilní fáze methanol:voda (65:35) 0,2 ml/min, pH vodné složky bylo upraveno 85% kyselou fosforečnou na 2,5. Doba analýzy byla pod 10 min, nedošlo ale k dokonalému oddělení všech látek. Proto byl změněn poměr složek v mobilní fázi ve prospěch vodné složky [methanol:voda (60:40)], při kterém došlo k úplnému oddělení látek a to do 17 min.



Obrázek 63: Ukázka chromatogramu na koloně Ascentis Express; 10 cm x 2,1 mm, 2,7 μm při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (60:40, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5 μl.

Píky jednotlivých látek dokonale od sebe odděleny, počet teoretických pater u MP a PP <1000, dobré rozlišení jednotlivých píků.

hodnocené látky	<i>N</i>	<i>T</i>	HETP	hodnocené látky	<i>R<sub>ij</sub></i>
MP	221	1,28	133,5	MP – PP	2,5
PP	510	1,31	83,6	PP – N	2,07
N	1015	1,25	68,3	N – IS	2,05
IS	3028	1,16	33,2	IS – DCF	1,75
DCF	4307	1,12	30,2		

Tabulka 17: výsledky na koloně Ascentis Express; 10 cm x 2,1 mm, 2,7 μm při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (60:40, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5)

Kolona není pro dlouhý čas analýzy a při malé separační účinnosti vhodná pro stanovení daných látek.

## **6 ZÁVĚR**



Předložená rigorózní práce se zabývá využitím kapalinové chromatografie a aplikací vybraných moderních trendů ve vývoji nových stacionárních fází v kapalinové chromatografii. Tyto trendy umožňují zkrácení doby analýzy, úsporu použitých rozpouštědel, snížení nástřiku vzorku při současném zachování nebo zlepšení separačních parametrů.

V práci jsou nejprve shrnuty teoretické poznatky o HLPC, historie chromatografie, typy chromatografie, principy chromatografického dělení látek.

V této rigorózní práci jsou také krátce zmíněny nové trendy v technologii HPLC a podrobně se zabývá různými typy stacionárních fází pro HPLC.

V experimentální části bylo sledováno několik typů stacionárních fází, na kterých se testovaly podmínky separace léčivých látek, obsažených v léčivém přípravku Diclofenac emulgel. Na jednotlivých typech kolon byly měněny chromatografické podmínky tak, aby daná analýza proběhla pokud možno v co nejkratším čase, společně se zachováním, případně zlepšením separačních parametrů.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo na kolonách **Discovery HS-F5; 15 cm x 4,6 mm, 5 μm, Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5 μm a Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm**. Podmínky separace: průtok mobilní fáze 1,5 ml/min, složení mobilní fáze methanol: voda (75:25), pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou 85% na 2,5), nástřik vzorku 5 μl. S časem analýzy pod 4 minuty. Na koloně **Zorbax SB – CN; 4,6 x 150 mm, 5 μm**, při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5 μl, s časem analýzy pod 5 min. A také na koloně **Chromolith Performance RP – 18e; 100 – 3 mm** při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, složení mobilní fáze methanol:voda (65:35, pH vodné složky upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5), nástřik vzorku 5 μl, s časem analýzy pod 3 min.

## **7 SEZNAM LITERATURY**

- [1] [en.wikipedia.org/wiki/Diclofenac](http://en.wikipedia.org/wiki/Diclofenac) – 11/2007
- [2] [doktoronline.cz/leky/index.php?cast=1&act=14&nazev=diclofenac](http://doktoronline.cz/leky/index.php?cast=1&act=14&nazev=diclofenac) – 11/2007
- [3] [en.wikipedia.org/wiki/Propylparaben](http://en.wikipedia.org/wiki/Propylparaben) – 11/2007
- [4] [en.wikipedia.org/wiki/Methylparaben](http://en.wikipedia.org/wiki/Methylparaben) – 11/2007
- [5] Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum 2001, 267–281
- [6] [tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane\\_kapitoly/kapal\\_chrom\\_vyber.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm) – 12/2007
- [7] [old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc). – 05/2008
- [8] [lf1.cuni.cz/Data/files/Dan-soubory/toxi/Kapalinová%20chromatografie%20v%20toxikologii.ppt](http://lf1.cuni.cz/Data/files/Dan-soubory/toxi/Kapalinová%20chromatografie%20v%20toxikologii.ppt) – 07/2008
- [9] [tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separa.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm) – 05/2007
- [10] [mzcr.cz/data/c764/lib/ajaof.htm](http://mzcr.cz/data/c764/lib/ajaof.htm) – 12/2007
- [11] [natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html](http://natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html) – 05/2007
- [12] [vscht.cz/kchkestazenisylabysepar.pdf](http://vscht.cz/kchkestazenisylabysepar.pdf) – 01/2008
- [13] [artemis.osu.cz8080artemisuploaded154\\_BF%201.doc](http://artemis.osu.cz8080artemisuploaded154_BF%201.doc). – 03/2008
- [14] [chromatografie.navajo.cz/](http://chromatografie.navajo.cz/) – 06/2008
- [15] [fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/Chromatografie1.doc](http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/Chromatografie1.doc). – 06/2008
- [16] Studijní materiály z fakultní nemocnice k předmětu Analýza exogenních a endogenních látek – 11/2002
- [17] Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fourth edition Veronika R. Meyer # 2004 John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-470-09377-3 (Hardback) 0-470-09378-1 (Paperback), str. 22,25,33
- [18] [chromservis.cz/gemini.htm](http://chromservis.cz/gemini.htm) – 05/2007
- [19] [sweb.cz/HPLC](http://sweb.cz/HPLC) – 01/2008
- [20] [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/gc/GC02.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC02.pdf) – 08/2008
- [21] [natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/separace.pdf](http://natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/separace.pdf) – 05/2008
- [22] [kemomed.si/KEMOMED,prodajni\\_program,hplc\\_potrosni.htm](http://kemomed.si/KEMOMED,prodajni_program,hplc_potrosni.htm) – 11/2007
- [23] Studijní materiály z předmětu instrumentální analýza – 2005
- [24] [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/AJALB.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJALB.htm) – 08/2008
- [25] [vscht.cz/poustkaj/ISM%20HPLC%20DETEKTORY%20092007.pdf](http://vscht.cz/poustkaj/ISM%20HPLC%20DETEKTORY%20092007.pdf). - 04/2008
- [26] [vscht.cz/ktk/www\\_324/laboratory/OborI/GC.pdf](http://vscht.cz/ktk/www_324/laboratory/OborI/GC.pdf) – 11/2007

- [27] [www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_03\\_190-199.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf) – 11/2008
- [28] [holcapek.upce.cz/teaching/MS\\_prednasky\\_NEW\\_06\\_Spojzeni\\_separacni\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_prednasky_NEW_06_Spojzeni_separacni_MS.pdf) – 11/2007
- [29] [http://www.hplc.cz/UPLC/sorbent\\_uplc.html](http://www.hplc.cz/UPLC/sorbent_uplc.html) – 09/2008
- [30] KVASNIČKOVÁ, Leona - GLATZ, Zdeněk - KAHLE, Vladislav. Kapilární elektrochromatografie. *Chemické Listy*, Praha, Česká společnost chemická. ISSN 0009-2770, 2003, vol. 97, no. 7, str. 86-92.
- [31] [chemicke-listy.cz/docs/full2004\\_05\\_01.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full2004_05_01.pdf) – 08/2008
- [32] [http://www.hplc.cz/Faq/monolithic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Faq/monolithic_columns.htm) – 09/2008
- [33] [http://www.hplc.cz/Faq/monolithic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Faq/monolithic_columns.htm) – 09/2008
- [34] [chromservis.cz/item/gemini-3-m-c18-110a-hplc-column-50-x-2-0-mm?lang=CZ](http://chromservis.cz/item/gemini-3-m-c18-110a-hplc-column-50-x-2-0-mm?lang=CZ) – 11/2007
- [35] [chromservis.cz/hypercarb.htm](http://chromservis.cz/hypercarb.htm) – 11/2007
- [36] [en.wikipedia.org/wiki/Hilic](http://en.wikipedia.org/wiki/Hilic) – 11/2007
- [37] [labicom.cz/default.aspx?server=1&article=293&section=23](http://labicom.cz/default.aspx?server=1&article=293&section=23) – 1/2008
- [38] [chromatografie.cz/betabasic.pdf](http://chromatografie.cz/betabasic.pdf) – 11/2007
- [39] [sigmaaldrich.com/img/assets/13660/031.pdf](http://sigmaaldrich.com/img/assets/13660/031.pdf) – 12/2007
- [40] [sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Europe\\_Home/Czech\\_Republic/Informace\\_o\\_produktech/Chromatografie/HPLC.html](http://sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Czech_Republic/Informace_o_produktech/Chromatografie/HPLC.html) – 11/2007
- [41] [chemagazin.cz/Texty/CHXI\\_3\\_cl11.pdf](http://chemagazin.cz/Texty/CHXI_3_cl11.pdf) – 12/2007
- [42] [sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Europe\\_Home/Czech\\_Republic/Informace\\_o\\_produktech/Chromatografie/kolony\\_HS.html](http://sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Czech_Republic/Informace_o_produktech/Chromatografie/kolony_HS.html) – 1/2008
- [43] [sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/Discovery\\_RP\\_Amide\\_C16\\_HPLC\\_Columns.html](http://sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/Discovery_RP_Amide_C16_HPLC_Columns.html) – 11/2007
- [44] [phenomenex.com/phen/products/gemini/twin\\_tech.htm](http://phenomenex.com/phen/products/gemini/twin_tech.htm) – 1/2008
- [45] [vscht.cz/zkp/ustav/Sbornik\\_kontaminanty.pdf](http://vscht.cz/zkp/ustav/Sbornik_kontaminanty.pdf) – 8/2008
- [46] [chem.agilent.com/temp/rad752F0/00000044.PDF](http://chem.agilent.com/temp/rad752F0/00000044.PDF) – 11/2007
- [47] [chem.agilent.com/temp/rad82949/00000046.PDF](http://chem.agilent.com/temp/rad82949/00000046.PDF) – 11/2007
- [48] [chem.agilent.com/temp/radD5BA3/00000059.PDF](http://chem.agilent.com/temp/radD5BA3/00000059.PDF) – 12/2007
- [49] [labicom.cz/default.aspx?server=1&article=89&section=23](http://labicom.cz/default.aspx?server=1&article=89&section=23) – 8/2008
- [50] [http://www.sielc.com/Technology\\_HILIC.html](http://www.sielc.com/Technology_HILIC.html) – 11/2008
- [51] R. Hájková, P. Solich, M. Pospíšilová, J. Šícha, *Anal Chim Acta* 467(2002) 91-96