

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

**Studium interakcí podílejících se na mechanismu separace
v chromatografických separačních systémech**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Květa Kalíková

Praha 2009

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky získané v letech 2005 – 2009 během mého doktorského studia na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK v Praze.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Dizertační práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29.10.2009

Květa Kalíková

Předmětová hesla

separační systémy, chiralita, HPLC

Klíčová slova

LFER, systémové píky, optimalizace separace, chirální separace

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mají nezastupitelný podíl na tom, že jsem to dotáhla až k odevzdání této práce.

V první řadě bych tedy chtěla poděkovat své školitelce a frajerce Evě Tesařové, jejíž konzultace, nápady a rady, i postupné vedení k samostatnosti mě provedlo celým studiem. Dále bych chtěla poděkovat Vlastimilu Hruškovi za odvození matematického modelu na systémové píky, s čímž souviselo mnoho úžasných konzultací i několik let mé práce na HPLC.

Skupině elektromigračních metod, a zejména Periplanetce Richardu Chudobovi a frajerkám Martině Riesové a Janě Svobodové, jsem zavázána za mnohou nezištnou pomoc při řešení problému, stejně jako za občasná vyrušení z pracovního stereotypu.

Svému malému velkému bratru Miroslavu „Sérnečkovi“ Kalíkovi děkuji za bezpočet kávových seancí, které mě udržovaly v reálném světě, a také za to, že se pravidelně měnil v jazykového korektora mých prací.

Svým rodičům Ladislavě a Miroslavu Kalíkovým a sestře Marii Kalíkové děkuji za všeobecnou podporu během celého studia, kterou mi vždy neochvějně dokazovali, ačkoliv mé studium separačních mechanismů v HPLC je oslovovalo jen velmi okrajově.

V neposlední řadě děkuji také Jiřímu Hájkovi a kocouru Bonifácovi ... za všechno, a hlavně že neutekli.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
Seznam použitých symbolů	7
1. ÚVOD	8
1.1 Optimalizace separace	8
2. CÍL PRÁCE	10
3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ - PUBLIKACE I	11
3.1 Model lineárního vztahu volných energií	11
3.2 Chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu	13
3.3 Výsledky a diskuze	16
3.4 Literatura I	19
4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY SYSTÉMOVÝCH PORUCH - PUBLIKACE II	20
4.1 Systémové píky	20
4.2 Výsledky a diskuze	21
4.3 Matematický popis a predikce systémových piků	25
4.4 Literatura II	27
5. PŘÍKLADY NALEZENÍ A VYUŽITÍ OPTIMALIZOVANÝCH SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ	28
5.1 Achirální systémy	28
5.1.1 Optimalizace HPLC metody pro separaci vybraných estrogenů - publikace III	28
5.1.2 Optimalizace separace 1,4-benzodiazepinů metodou HPLC (připravovaná publikace)	31
5.2 Chirální systémy – publikace IV	35
5.2.1 Optimalizace a validace HPLC metody pro enantioseparaci (±)-cloprostenolu - publikace V	36
5.3 Literatura III	39
6. ZÁVĚRY	40
Seznam publikovaných prací	42
Příspěvky na konferencích	43
PŘÍLOHA	46

Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
CSP	chirální stacionární fáze
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EDS	endokrinní disruptory
E1	estron
E3	estriol
EE	17 α -ethinylestradiol
HAc	kyselina octová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LFER	lineární vztahy volných energií
M	mestranol
MeOH	metanol
MTAG	methylovaný teikoplanin aglykon
NCSS	statistický program (Number Cruncher Statistical System)
RP HPLC	reverzní mod vysokoúčinné kapalinové chromatografie
T	teikoplanin
TAG	teikoplanin aglykon
TEA	triethylamin
TEAA	triethylaminacetátový pufr
UV	ultrafialový
α E2	17 α -estradiol

Seznam použitých symbolů

a	regresní koeficient LFER rovnice
b	regresní koeficient LFER rovnice
c	úsek/konstanta v rovnici LFER
ΔG	změna Gibbsovy energie
k	retenční faktor
r	regresní koeficient LFER rovnice
R	rozlišení píků
R_2	rozsah molární refrakce
s	regresní koeficient LFER rovnice
S	faktor symetrie
t_R	retenční čas
v	regresní koeficient LFER rovnice
V_x	McGowanův charakteristický objem solutu
$\Sigma\alpha_2^H$	charakteristika proton-donorové schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby
$\Sigma\beta_2^H$	charakteristika proton-akceptorové schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby
π_2^H	dipolarita/polarizibilita

1. ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou spolehlivostí, dobrou opakovatelností a robustností. Výhodou této metody je možnost ovlivňovat separaci nejen volbou stacionární fáze, ale také změnami složení mobilní fáze, která není pouze inertním nosičem vzorků (jako tomu je např. u plynové chromatografie), ale podílí se na interakcích rozpuštěných látek se sorbentem. V HPLC jsou používány dva, případně tři separační módy: nejčastější je reverzní (mobilní fáze je polárnější než stacionární fáze), pak normální (stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní), a dále se hovoří o polárně-organickém (mobilní fáze je většinou tvořena acetonitrilem, methanolem a malým množstvím triethylaminu a kyseliny octové na ovlivnění selektivity). Touto technikou lze separovat širokou škálu strukturně velmi odlišných sloučenin [1] a lze ji použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Volba vhodného separačního systému se často provádí empiricky, na základě zkušeností experimentátora, podle informací získaných z literatury, s využitím některých optimalizačních programů nebo čistě postupem pokus-omyl. Lze však využít i některých fyzikálně-chemických charakteristik.

1.1 Optimalizace separace

Pro výběr optimálních separačních podmínek, tj. výběr vhodné stacionární fáze a mobilní fáze (popřípadě chirálního selektoru přidávaného do mobilní fáze), je nutné hlubší poznání interakčních a retenčních mechanismů. Separace v reverzním separačním módu (RP HPLC) představují převážnou část aplikací, a tudíž i studií zaměřených na základní výzkum a následné využití získaných poznatků pro optimalizaci separačních podmínek v tomto uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie. S rostoucím využitím RP HPLC vzniká i široké spektrum reverzních stacionárních fází. Známé technické parametry chromatografických kolon nejsou ve většině případů postačující k výběru optimální kolony pro konkrétní separaci [2]. Z tohoto důvodu je žádoucí nalézt vztah mezi chemickou strukturou analytů, fyzikálně-chemickými vlastnostmi stacionárních fází a jejich separačními účinky, a proto byla navržena řada testů pro charakterizaci chromatografických kolon v těchto separačních systémech. Žádný z testů zatím není všeobecně akceptován z důvodu složitosti chromatografického systému a počtu parametrů, které ovlivňují retenci analytů. Jedním z možných semiempirických postupů charakterizace separačních systémů je metoda lineárních vztahů volných energií (LFER – Linear Free Energy Relationship) [3, 4].

Proces optimalizace separace může velmi zkomplikovat výskyt systémových píků. Existují případy, kdy je daná systémová zóna detekovatelná a ve výsledném chromatogramu se objeví více píků než odpovídá počtu analyzovaných látek anebo systémová zóna „interaguje“ se zónou analytu a nastane jev nazývaný rezonance. Porozumění jevům probíhajícím (vyskytujícím se) v chromatografických separačních systémech má zásadní vliv na správnou interpretaci analytických dat, a tudíž výsledky analýzy.

2. CÍL PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo studium interakčních mechanismů ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Dílčí cíle lze rozdělit do několika bodů:

- charakterizace a srovnání interakčních možností tří chirálních stacionárních fází: teikoplaninu, teikoplanin aglykonu a methylovaného teikoplanin aglykonu v různých mobilních fázích pomocí modelu LFER, zjištění interakcí, které nejvíce ovlivňují retenci analytu a ukázání možnosti predikce retence nových analytů v popsáných separačních systémech
- studium systémových píků v RP HPLC, tzn. popsání jejich vzniku resp. výskytu a chromatografického chování v daném systému
- aplikace získaných poznatků na separace konkrétních směsí analytů

3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ - PUBLIKACE I

Během posledních desetiletí bylo navrženo několik typů testů pro charakterizaci chromatografických kolon. Používané testy využívají spektroskopické techniky (infračervená spektroskopie a nukleární magnetická rezonance), statistické (chemometrické) metody (analýza hlavních komponent, faktorová analýza), van't Hoffovy závislosti (termodynamické měření), určení fyzikálních vlastností stacionární fáze a chromatografické testovací metody. Přestože první čtyři jmenované typy testů poskytují informaci o stacionární fázi, pro výběr optimálního typu separační kolony pro konkrétní separace je nutné použít chromatografické testovací metody. Použití chromatografických testů umožňuje charakterizaci kolon obecně pomocí parametrů, jako je hydrofobicita, silanolová aktivita, procentuální zastoupení uhlíku, či pomocí parametrů charakterizujících fyzikálně-chemické vlastnosti stacionární fáze. Mezi chromatografické testy patří například metody založené na určitém modelu - Horváthův model, Galushkův model, model interakčních indexů dle Jandery a modely LFER [5]. Dále se do chromatografických testů řadí Tanakův test, Engelhardtův test a Waltersův test, pomocí kterých je možné určit například silanolovou aktivitu stacionární fáze.

3.1 Model lineárního vztahu volných energií

Popis separačního systému pomocí modelu LFER umožňuje kvalitativní i kvantitativní objasnění interakcí, které se uplatňují v daném systému, a tudíž mají vliv na retenci analytů. Mezi tyto interakce se řadí hydrofobní interakce, elektrostatické interakce, vodíková vazba, disperzní síly, vazby s přenosem náboje, koordinační vazba a sterické repulze [6]. V RP HPLC je retence analytu nejvýznamněji ovlivněna hydrofobními interakcemi. Tyto interakce spočívají v tom, že se hydrofobní skupiny ve vodném prostředí snaží minimalizovat styčnou plochu s polárním (vodným) okolím [7]. Na základě získaného popisu všech možných interakcí lze následně volit vhodnou kombinaci stacionární a mobilní fáze pro separace požadované směsi analytů.

Model LFER je založen na lineární závislosti změny Gibbsovy energie (ΔG), a tím i všech vlastností, které s ní souvisejí (např. retenční faktor), na charakteristikách prostředí. Se změnou Gibbsovy energie systému je v kapalinové chromatografii spojen přenos analytu z mobilní fáze do fáze stacionární. ΔG při přenosu analytu mezi fázemi může být rozdělena na příspěvky jednotlivých nezávislých typů molekulárních interakcí [4], které jsou v LFER rovnici vyjádřeny jako součin dvou členů: fyzikálně-chemických parametrů analytů a vlivu prostředí na danou interakci.

V HPLC je retence analytů dána součtem všech interakcí, kterých se v daném separačním systému analyt účastní. Pokud je daná interakce silnější se stacionární fází, bude retenci analytu zvyšovat a naopak. Rovnice LFER vyjadřuje korelaci experimentálně zjištěných logaritmu retenčních faktorů s parametry analytů:

$$\log k = \mathbf{c} + \mathbf{r}.R_2 + \mathbf{s}.\pi_2^H + \mathbf{a}.\Sigma\alpha_2^H + \mathbf{b}.\Sigma\beta_2^H + \mathbf{v}.V_x \quad (1)$$

kde k je retenční faktor (závisle proměnná), nezávisle proměnné členy na pravé straně rovnice (označené kurzívou) jsou: R_2 rozsah molární refrakce (cm^3) [3, 4], π_2^H dipolarita/polarizibilita, $\Sigma\alpha_2^H$ charakteristika proton-donorové schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby, $\Sigma\beta_2^H$ charakteristika proton-akceptorové schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby, V_x McGowanův charakteristický objem solutu ($\text{cm}^3.\text{mol}^{-1}$) [8]. Objem solutu V_x se dělí stem a rozsah molární refrakce deseti, aby byly deskriptory ve stejném měřítku [9]. Regresní koeficienty \mathbf{r} , \mathbf{s} , \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{v} získané multidimenzionální lineární regresí popisují rozdíly v dané vlastnosti mezi stacionární a mobilní fází. Symbol \mathbf{c} představuje konstantu (viz níže).

LFER tedy koreluje retenci s vlastnostmi analytu. Tyto vlastnosti jsou popsány pomocí deskriptorů, které se získávají empiricky. V rovnici se vyskytuje pět na sobě nezávislých deskriptorů, které udávají schopnost analytu podílet se na určitých typech interakcí: V_x - hydrofobní interakce, deskriptor zahrnuje disperzní a kohezivní interakce (schopnost tvorby kavity) analytu s chromatografickým systémem, $\Sigma\beta_2^H$ a $\Sigma\alpha_2^H$ - interakce prostřednictvím vodíkové vazby ($\Sigma\alpha_2^H$ - popisuje proton-donorovou schopnost analytu pro tvorbu vodíkové vazby s molekulami mobilní a stacionární fáze, $\Sigma\beta_2^H$ - odráží proton-akceptorovou schopnost analytu pro tvorbu vodíkové vazby s molekulami mobilní a stacionární fáze), π_2^H - elektrostatická interakce, R_2 - disperzní interakce. Deskriptory kvantitativně popisují strukturní odlišnosti mezi sloučeninami. V roce 1993 M. H. Abraham publikoval nové deskriptory, které patří k často používaným charakteristikám látek [10]. Tyto parametry byly publikovány pro velký počet sloučenin a jsou vhodné pro model LFER, protože jsou vztažené ke změně Gibbsovy energie.

Získané regresní koeficienty popisují rozdíly v daných molekulárních interakcích mezi stacionární a mobilní fází. Pokud je daný regresní koeficient kladný, daná interakce je silnější mezi analytem a stacionární fází než mezi analytem a mobilní fází a naopak. Koeficienty větší než nula zvyšují retenci analytu, zatímco záporné koeficienty způsobují opačný efekt. Výsledná retenční faktor analytu je pak určena součtem všech příspěvků.

Regresní koeficient r popisuje rozdíl ve schopnosti stacionární a mobilní fáze interagovat s n - a π -elektrony analytu. V koeficientu s je zahrnut rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě mezi stacionární a mobilní fází - poukazuje na schopnost fází účastnit se interakcí dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól. Regresní koeficient a odráží rozdíl v akceptorové bazicitě vodíkové vazby (schopnost působit jako akceptor vodíku pro vodíkovou vazbu) mezi stacionární a mobilní fází (bazická fáze bude interagovat s kyselým solutem). Rozdíl v donorové aciditě vodíkové vazby (schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu) mezi stacionární a mobilní fází je popsán koeficientem b . Regresní koeficient v představuje rozdíl v hydrofobicitě mezi stacionární a mobilní fází, který závisí na rozdílu kohezivít obou fází a na rozsahu disperzních interakcí mezi solutem a stacionární fází a solutem a mobilní fází [11]. Člen c rovnice LFER není vysvětlován pomocí solvatačních parametrů. Odpovídá změnám ve fázovém poměru systému (podíl objemů stacionární fáze a mobilní fáze) [12]. Zahrnuje též všechny možné vlivy na retenci, které nejsou popsány pomocí regresních koeficientů.

Pokud je použita fixní mobilní fáze lze regresní koeficienty použít přímo pro charakterizaci stacionárních fází, a tudíž umožnit jejich porovnávání [3, 4]. Přestože regresní koeficienty v tomto případě charakterizují přímo stacionární fází, mohou být ovlivněny nasorbovanou mobilní fází a jsou tedy charakteristické pro daný chromatografický systém, danou kombinací stacionární fáze a složení mobilní fáze.

Vlastnosti separačního systému vyjádřené pomocí regresních koeficientů v rovnici (1) se „určují“ pomocí tzv. testovací sady solutů. Vybraná testovací sada solutů by měla obsahovat strukturně odlišné látky, aby rozložení hodnot jednotlivých deskriptorů bylo rovnoměrné a pokrývalo celou škálu interakcí popsaných pomocí těchto deskriptorů [13] a tudíž se nepreferoval žádný typ interakce na úkor jiného. Výsledek metody LFER má tím větší váhu, čím větší počet látek je do regrese zahrnut, na určení každého regresního parametru se počítají alespoň tři až čtyři látky [12, 14].

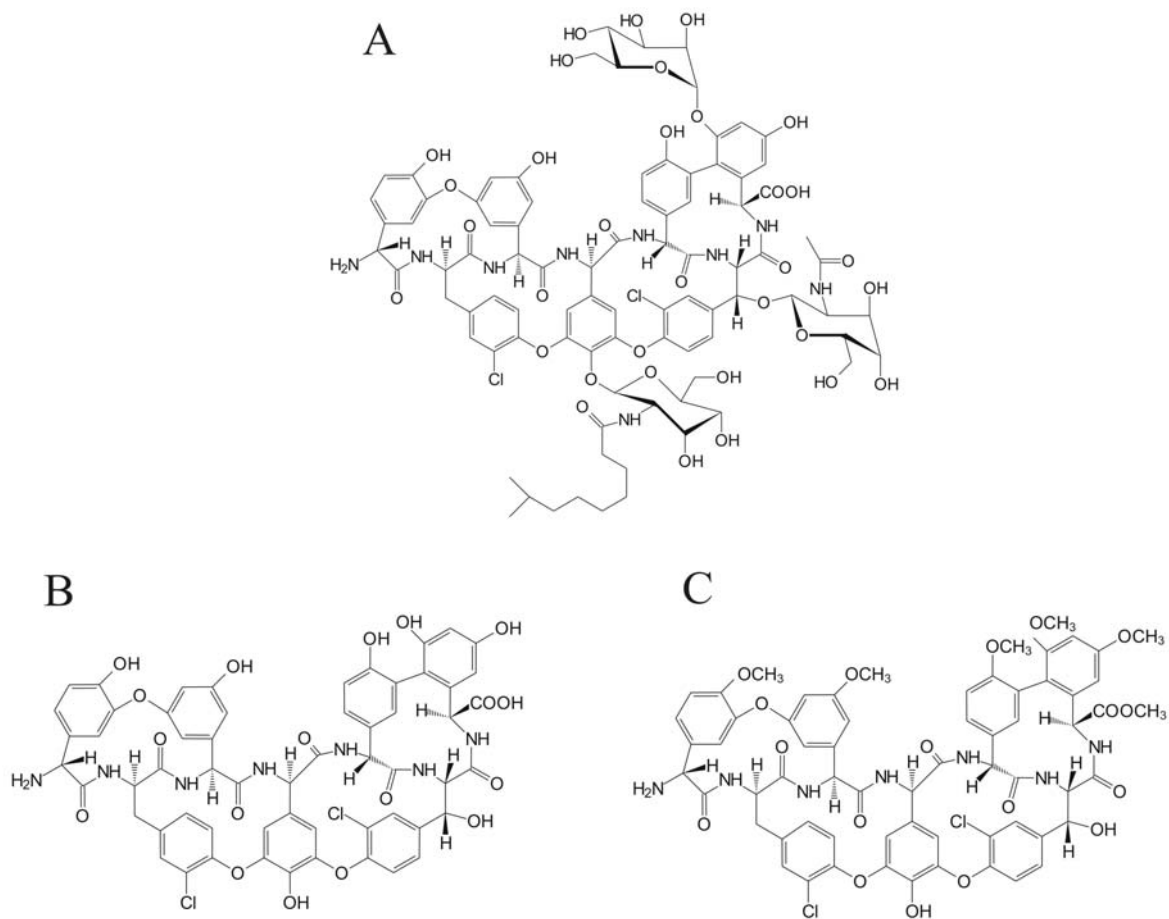
3.2 Chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu

Pro dělení chirálních látek je třeba v separačním systému vytvořit enantioselektivní (chirální) prostředí. V HPLC lze toto prostředí realizovat přidávkem chirálního selektoru do mobilní fáze nebo využitím chirální stacionární fáze. Druhému přístupu se přitom většinou dává přednost. Mezi významné chirální selektory resp. CSP se řadí makrocyclická antibiotika.

Chirální stacionární fáze (CSP) na bázi teikoplaninu – teikoplaninová (T), teikoplanin aglykonová (TAG) a methylovaná teikoplanin aglykonová (MTAG) se řadí do skupiny makrocyclických antibiotik, glykopeptidů. Struktury těchto chirálních selektorů jsou uvedeny na Obr. 3.1. V systémech s makrocyclickými antibiotiky lze v HPLC použít všechny tři separační módy (normální, reverzní a polárně-organický).

Teikoplanin je glykopeptid, jehož struktura je tvořena bohatě substituovanou peptidovou kostrou a cukernou složkou. Molekula teikoplaninu obsahuje řadu polárních i nepolárních skupin a dvacet tři chirálních center. Mezi polární skupiny teikoplaninu patří deset hydroxylových skupin, čtyři fenolické skupiny, jedna primární amino skupina a jedna volná karboxylová skupina. Mezi nepolární části molekuly se řadí především devět methylenových jednotek, které tvoří acylový řetězec vázaný na cukerný zbytek (2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosylový zbytek). Hydrofobní řetězec významně přispívá k malé rozpustnosti teikoplaninu ve vodě. Mezi další nepolární skupiny patří řada šesti amidů vzniklá spojením peptidovými vazbami a vytvářející makrocyclickou část molekuly (tzv. aglykonový koš) a sedm benzenových jader na ně navázaných. Molekula teikoplaninu dále obsahuje další dva cukerné zbytky bez acylového řetězce a etherové skupiny [15]. Molekula teikoplanin aglykonu se liší od nativního teikoplaninu absencí cukerných podílů a skupin na ně navázaných (hydrofobní acylový řetězec). Díky nepřítomnosti cukerných složek jsou jeho ionizovatelné skupiny odhalenější a tím přístupnější pro interakce s některými analyty. Naopak TAG ztrácí interakční možnosti poskytované cukernými substituenty. Methylovaní pěti fenolických skupin a jedné karboxylové skupiny molekuly TAGu lze připravit další chirální selektor odvozený od teikoplaninu - methylovaný teikoplanin aglykon [16]. Substitucí se potlačí dispozice pro vodíkové vazby, které se mohou tvořit mezi fenolickými skupinami a analytem.

Ze struktury teikoplaninových chirálních selektorů je patrné, že typ interakce s analytem v separačním systému může být různý - vodíkové vazby, π - π interakce, interakce dipól-dipól, hydrofobní interakce apod.



Obr. 3.1. Struktura teikoplaninu (A), teikoplanin aglykonu (B) a předpokládaná struktura metylovaného teikoplanin aglykonu (C).

3.3 Výsledky a diskuze

Výše popsáný model LFER byl použit pro porovnání interakčních možností tří CSP na bázi teikoplaninu (T, TAG, MTAG) v RP HPLC. Pro studium byly vybrány čtyři mobilní fáze lišící se poměrem methanolu (MeOH) a 1% triethylaminacetátového pufru (TEAA), pH 4,20 (obsah MeOH v mobilní fázi se pohyboval mezi 20% a 80%) neboť, jak již bylo výše zmíněno, i složení mobilní fáze významně ovlivňuje retenci a separaci analytů v HPLC. Jak bylo ukázáno v kap. 3.2., tyto chirální selektory obsahují velké množství potenciálních interakčních míst. Z tohoto důvodu jsou chirální separace na CSP na bázi teikoplaninu komplexním procesem zahrnujícím i různé vlivy složení mobilní fáze. Zásadní úlohu hrají specifické interakce mezi CSP a enantiomery. Volba vhodného typu chirální stacionární fáze podle chemické podstaty solutu není dosud beze zbytku možná, protože u řady z nich není znám přesný mechanismus interakce. Volba je tedy často empirická, podepřená jen údaji o separaci podobných sloučenin z dostupné literatury [17]. Popis separačních systémů modelem LFER umožňuje objasnit z kvalitativního i kvantitativního hlediska typy interakcí, kterými daný systém disponuje. Tento model převádí experimentálně získané výsledky z úrovně retenčních dat do roviny intermolekulárních interakcí, které jsou základem pro pochopení retenčního mechanismu. Kvantitativním určením jednotlivých interakcí lze předpovědět retenci nových solutů se známými deskriptory a zvolit tak vhodný typ stacionární fáze pro vybranou směs analytů.

Všechny porovnávané CSP jsou tvořeny silikagelovým nosičem, na který jsou vázány příslušné chirální selektory (viz Obr. 3.1.). Použitím pufru o pH 4,20 jako vodné složky mobilní fáze byla potlačena disociace silanolových skupin, triethylamin přítomný v mobilní fázi kompenzuje volné silanolové skupiny. Za těchto podmínek jsou interakce vyvolatelné volnými silanolovými skupinami značně omezené a retenci analytů ovlivňují především interakce analyt/chirální selektor a analyt/mobilní fáze. Testovací sada solutů obsahovala 34 strukturně odlišných látek (viz Table 1 v publikaci I) a pokrývala celou škálu interakcí vyjádřených molekulovými deskriptory, aby rozložení hodnot jednotlivých deskriptorů bylo rovnoměrné, a tím se nepreferoval žádný typ interakce na úkor jiného.

Pro porovnání interakčních možností jednotlivých chromatografických separačních systémů byly použity regresní koeficienty optimálních LFER modelů získané multidimenzionální lineární regresí pomocí statistického programu NCSS. Tyto regresní koeficienty jsou uvedeny v tabulce Table 2 a na obrázcích Figures 1-5 v publikaci I.

V RP HPLC se hydrofobní interakce významně podílí na zvýšení retence převážně nepolárních analytů. V modelu LFER je hydrofobicita reprezentovaná regresním koeficientem v . V námi studovaných systémech tento koeficient roste se zvyšujícím se obsahem pufru v mobilní fázi. Nejvyšší hodnota koeficientu v byla získána pro MTAG CSP ve všech použitých mobilních fázích. Důvodem je zvýšení hydrofobicity chirálního selektoru methylací karboxylové skupiny a fenolických skupin teikoplanin aglykonu. Pořadí významnosti hydrofobních interakcí je $MTAG > TAG > T$ ve všech studovaných separačních systémech. Při použití mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru (v našem případě 80 % methanolu) regresní koeficient v se stane statisticky nevýznamným pro všechny CSP, což znamená že se tato interakce významně nepodílí na retenčním mechanismu.

Schopnost interagovat s n - a π - elektrony analytu (vyjádřená regresním koeficientem r) také roste s rostoucím obsahem pufru v mobilní fázi. Celkově nižší hodnoty koeficientu r oproti koeficientu v ukazují, že příspěvek tohoto typu interakce k celkové retenci analytů je menší než příspěvek hydrofobicity. Nejnižší hodnoty koeficientu r byly získány na T CSP (oproti TAG a MTAG CSP při použití stejné mobilní fáze), která má hůře přístupná aromatická jádra a karbonylové skupiny díky přítomnosti cukerných zbytků. Při použití mobilní fáze s 80 % methanolu interakce s n - a π - elektrony analytu obdobně jako interakce hydrofobní nemají významný vliv na retenci.

Regresní koeficient s (popisující možné polární interakce) nabývá kladné hodnoty pro všechny studované systémy (pouze v systému TAG CSP v mobilní fázi obsahující 20 % methanolu je tento koeficient statisticky nevýznamný), neboť CSP na bázi teikoplaninu obsahují mnoho polárních (hydroxylové skupiny, amino skupiny atd.) a polarizovatelných skupin. Oproti tomu v reverzním modu s oktadecylovými či oktylovými stacionárními fázemi nabývá tento regresní koeficient záporných hodnot, to znamená, že na těchto stacionárních fázích se neuplatňují interakce s n - a π - elektrony analytu, tento typ interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází [4]. V mobilní fázi obsahující 80 % methanolu se interakce dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól stávají významným faktorem ovlivňujícím retenci na TAG a MTAG CSP (nahrazují hydrofobní a n - a π - elektronové interakce).

Záporné hodnoty regresních koeficientů a a b ve všech studovaných systémech značí, že daný typ interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází než mezi analytem a stacionární fází. Acidita a bazicita tedy patří mezi faktory snižující retenci analytů, které mají předpoklady účastnit se těchto typů interakcí. Regresní koeficient b je v systému tvořeném mobilní fází MeOH/1% TEAA, pH 4,20 (20/80, v/v) a TAG CSP statisticky nevýznamný, což znamená, že acidita stacionární a mobilní fáze je velmi podobná.

Model LFER je (na rozdíl od chromatografických testů např. dle Tanaky či Walterse, které poskytují jen dílčí informace [2, 5]) obecná metoda charakterizující interakční možnosti separačních systémů. Tento model slouží k popisu separačních systémů, nikoliv k charakterizaci chirálních separací. Stereoselektivní diskriminace nejsou explicitně popisovány regresními koeficienty LFER modelu. Regresní koeficienty lze ovšem využít k predikci retence chirálních látek, popřípadě částečně i k predikci enantioseparace. Zde je třeba uvážit, že pro dělení enantiomerů na CSP se ale předpokládá alespoň tříbodová interakce molekul solutu s CSP [18], kde je alespoň jedna interakce stereoselektivní [19]. Podle známé struktury enantiomerů a regresními koeficienty popsaného separačního systému (tedy znalostí interakčních možností, které systém poskytuje) lze získat určitou představu o jeho enantioselektivitě.

3.4 Literatura I

- [1] Claessens H.A.: Thesis. Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven 1999.
- [2] Claessens H.A., Straten M.A., Cramers C.A., Jezierska M., Buszewski B.: J. Chromatogr. A 826, 135 (1998).
- [3] Sándi Á., Szepesy L.: J. Chromatogr. A 818, 19 (1998).
- [4] Sándi Á., Nagy M., Szepesy L.: J. Chromatogr. A 893, 215 (2000).
- [5] Tan L.C., Carr P.W., Abraham M.H.: J. Chromatogr. A 752, 1 (1996).
- [6] Kopecká K.: Thesis. PřF UK Praha 2002.
- [7] Moore W.J.: Fyzikální chemie. SNTL, Praha 1979.
- [8] Abraham M.H., McGowan J.C.: Chromatographia 23, 243 (1987).
- [9] Abkay C., Shamsi S.A.: Electrophoresis 25, 635 (2004).
- [10] Abraham M.H.: Chem. Soc. Rev. 22, 73 (1993).
- [11] Reta M., Carr P.W., Sadek P.C., Rutan S.C.: Anal. Chem.: 71, 3484 (1999).
- [12] Vonk E.C., Lewandowska K., Claessens H.A., Kaliszan R., Cramers C.A.: J. Sep. Sci 26, 777 (2003).
- [13] Nasal A., Haber P., Kaliszan R., Forgács E., Cserhádi T., Abraham M.H.: Chromatographia, 43, 484 (1996).
- [14] Pytela O.: Empirický přístup k popisu vlivu rozpouštědel na děje v roztoku. VŠCHT, Pardubice 1989.
- [15] Péter A., Árki A., Tourwé D., Forró E., Fülöp F., Armstrong D.W.: J. Chromatogr. A 1031, 159 (2004).
- [16] Xiao T.L., Tesarova E., Anderson J.L., Egger M., Armstrong D.W.: J. Sep. Sci. 29, 429 (2006).
- [17] Gilar M., Tesařová E., Patzelová V., Deyl Z.: Chem. Listy 88, 514 (1994).
- [18] Dalglies C.E.: J. Chem. Soc. 47, 3940 (1952).
- [19] Pirkle W.H., Pochapsky T.C.: Chem. Rev. 89, 347 (1989).

4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY SYSTÉMOVÝCH PORUCH - PUBLIKACE II

4.1 Systémové píky

Významným, ale často rušivým jevem, ztěžujícím proces optimalizace separace nejen ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, ale též v dalších separačních metodách –např. kapilární zónové elektroforéze (CZE), je výskyt systémových píků.

Během chromatografického separačního procesu se při průtoku mobilní fáze systémem ustavuje rovnováha mezi stacionární a mobilní fází. Tuto rovnováhu lze porušit náhlou změnou složení mobilní fáze [1, 2]. Nejčastější příčinou porušení této rovnováhy je nadávkování vzorku, který se svým složením liší od složení používané mobilní fáze [3]. Další příčinou porušení rovnováhy může být například náhlá změna teploty kolony [3].

Po narušení rovnováhy začne chromatografický systém ihned směřovat k novému rovnovážnému stavu [4]. Výsledkem je vznik systémových zón (poruch). Tyto systémové zóny se pohybují chromatografickým systémem stejně jako zóny analytů [4]. Pokud je systémová zóna detekovatelná, objeví se ve výsledném chromatogramu ve formě systémového píku. Základní vlastností systémových píků je nezávislost jejich retenčních faktorů na charakteru dávkovaných analytů [4]. Jsou charakterizovány vlastními retenčními faktory, tvarem píků a vykazují obvyklé adsorpční izotermy, které lze získat v HPLC [5].

Studiu systémových píků byla, a v současné době nadále je, věnována značná pozornost, což dokazuje velký počet prací zabývajících se touto problematikou [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Nepochopením podstaty systémových píků může dojít ke špatné interpretaci získaných výsledků, tyto píky bývají často chybně zaměňovány s píky měřených analytů [15]. Závažný problém při vyhodnocování naměřených dat může nastat, pokud systémová zóna „interaguje“ se zónou analytu, tj. v kapalinové chromatografii v případě, že retenční časy systémového píku a píku analytu jsou shodné nebo velmi blízké [16]. Tento jev se nazývá rezonance a byl podrobně popsán v CZE [17, 9, 18]. Výsledkem „interakce“ zón může být deformace tvaru zón, a následně nadměrné rozšíření obou píků. Signál sledovaný nepřímou detekcí získá charakteristický „cik-cak“ tvar, je abnormálně velký a není úměrný množství analytu. Takto získané chromatogramy nelze bezchybně vyhodnotit.

Systémové píky však nemají pouze rušivé či negativní vlivy na separaci a detekci, ale lze je využít např. v HPLC k určení mrtvého času [1, 19], který je nezbytný pro výpočet retenčních faktorů a tedy k charakterizaci separovaných látek. Správné určení mrtvého času kolony bývá v kapalinové chromatografii často problematické [20, 21, 22]. K určení mrtvého

času se v mnoha případech používá analyt, který „neinteraguje“ se stacionární fází. Vzhledem k tomu, že se na retenci podílí mnoho rozdílných typů interakcí (viz kap. 3), je velmi obtížné zajistit, aby zvolený marker mrtvého času skutečně se stacionární fází neinteragoval žádným typem interakce. Tímto způsobem zjišťovaný mrtvý čas je zásadně ovlivněn výběrem markeru. V závislosti na vybraném markeru je možné získat různé hodnoty pro mrtvý čas kolony [23]. Jinou možností je využívat k určení mrtvého času systémového (rozpuštědlového) píku.

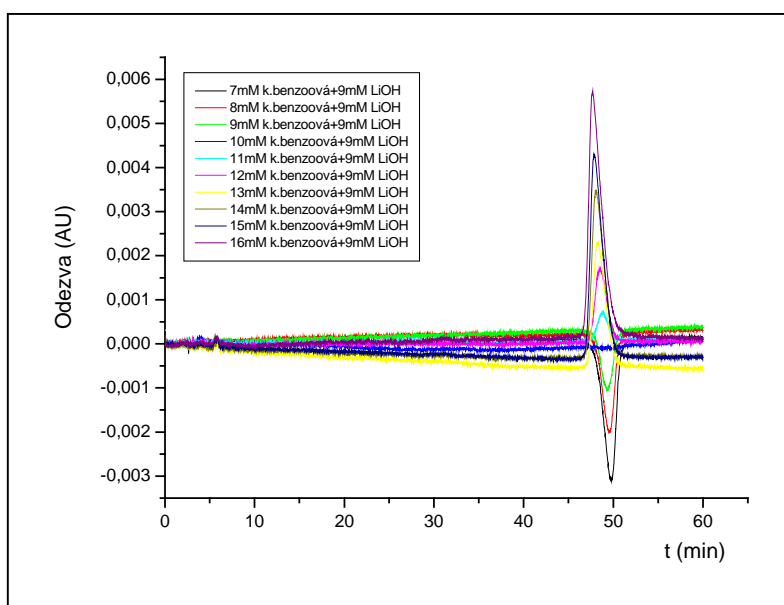
Stacionární systémový pík v CZE je možné použít jako marker elektroosmotického toku [24].

4.2 Výsledky a diskuze

Vznikem a chromatografické „chování“ systémových píků bylo sledováno v RP HPLC. K řešení této problematiky byla použita kolona Discovery® RP Amide C16, která je kompatibilní se 100% vodnou mobilní fází. U těchto typů kolon není nutné použít organický modifikátor v mobilní fází, aby nedošlo ke kolapsu stacionární fáze, jak se děje např. u běžných C18 nebo C8 kolon. Mobilní fáze byly tvořené dvou nebo tříložkovými vodnými pufrů o různých koncentracích (a příslušných hodnotách pH). Dvousložkové mobilní fáze byly tvořené kyselinou benzoovou a hydroxidem alkalického kovu (LiOH nebo CsOH). Tříložkové mobilní fáze se skládaly z kyseliny benzoové, kyseliny tropové a hydroxidu lithného. Kyselina tropová (kyselina 3-hydroxy-2-fenylpropionová) byla vybrána jako třetí složka mobilní fáze z důvodu strukturní podobnosti s kyselinou benzoovou; dala se proto předpokládat jejich kompetice o vazebná místa na stacionární fází. Dávkované poruchy obsahovaly stejné složky jako používaná mobilní fáze se změněnou koncentrací jedné nebo dvou z nich.

Obecně platí, že systémové píky mohou být negativní či pozitivní v závislosti na koncentraci dané složky v zóně dávkované poruchy a v mobilní fází [1, 3, 7]. Nadávkováním poruchy LiOH (CsOH) (tzn. koncentrace LiOH (CsOH) ve vzorku se liší od jeho koncentrace v mobilní fází a koncentrace ostatních složek jsou zachovány) získáme dva systémové píky při použití binárního pufru jako mobilní fáze, respektive tři systémové píky u ternárního pufru (viz Figure 5 v publikaci II). První systémový pík je vždy stacionární, zatímco ostatní mění svou pozici v závislosti na složení pufru. V případě vyšší koncentrace LiOH (CsOH) v dávkované zóně než v binární mobilní fází, získáme chromatogram s prvním píkem kladným, zatímco druhý pík je záporný a naopak (viz Figure 4 v publikaci II). Pokud do téže mobilní fáze nadávkujeme kladnou/zápornou poruchu kyseliny benzoové, získáme pouze

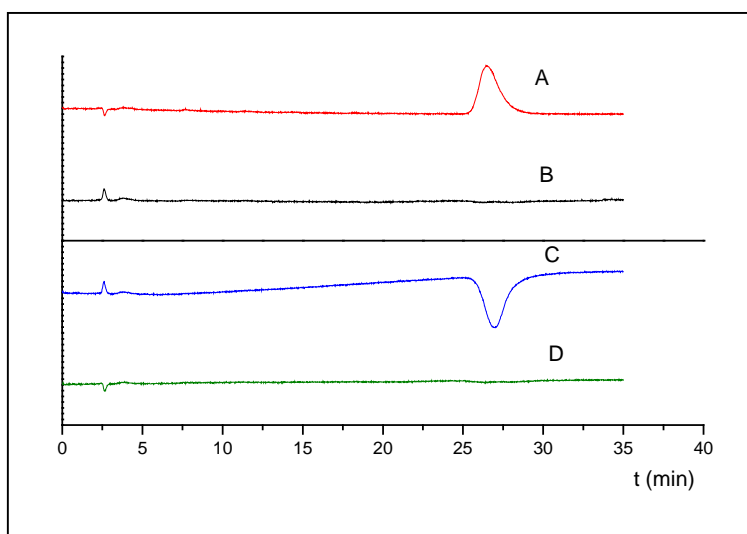
jeden kladný/záporný systémový pík, který svou pozicí odpovídá druhému (později eluujícímu) systémovému píku vytvořenému při poruše LiOH (viz Obr. 4.1.). Tento jev je s největší pravděpodobností způsoben tím, že se hydroxidy alkalických kovů neváží na tuto stacionární fázi a bude diskutován později. Z Obr. 4.1. je patrné, že nadávkováním vzorku o zcela stejném složení jako mobilní fáze nezískáme ve výsledném chromatogramu žádný systémový pík, protože nedojde k porušení ustavené rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází.



Obr. 4.1. Chromatogramy získané nadávkováním poruchy kyseliny benzoové. Mobilní fáze: 10 mM kyselina benzoová + 9 mM LiOH. Složení jednotlivých dávkovaných poruch je uvedeno v obrázku. Nepřímá UV detekce: 290 nm, teplota kolony a v karuselu: 25 °C, průtoková rychlost mobilní fáze: 0,2 ml/min, dávkovaný objem: 10 μ l.

Změnou koncentrace obou složek, LiOH i kyseliny benzoové, v dávkované zóně oproti koncentraci těchto složek v mobilní fázi lze dosáhnout vyrovnání obou poruch a „zmizení“ druhého systémového píku z chromatogramu, což je patrné z Obr. 4.2. Nadávkováním poruchy o složení 12 mM kyselina benzoová + 3 mM LiOH do mobilní fáze tvořené 10 mM kyselinou benzoovou + 5 mM LiOH (Obr. 4.2. A) získáme záporný první systémový pík (koncentrace LiOH v dávkované zóně je nižší než v mobilní fázi). Druhý systémový pík je kladný a je dán součtem kladné poruchy kyseliny benzoové a záporné poruchy LiOH (ta vyvolá kladný druhý systémový pík, jak již bylo uvedeno výše). V případě nástřiku poruchy o složení 12 mM kyselina benzoová + 7 mM LiOH do téže mobilní fáze

(Obr. 4.2. B) dostaneme ve výsledném chromatogramu první systémový pík kladný. Druhý systémový pík „zmizí“ z chromatogramu, protože koncentrace kyseliny benzoové v dávkované zóně je vyšší než v mobilní fázi – to by způsobilo kladný druhý systémový pík, a zároveň je i koncentrace LiOH v dávkované zóně vyšší než v mobilní fázi, což vyvolává záporný systémový pík, v tomto případě se tedy obě poruchy vyrovnají. Analogického efektu s opačnými amplitudami lze dosáhnout pro poruchy s nižší koncentrací kyseliny benzoové (a k tomu příslušnými koncentracemi LiOH) než je v mobilní fázi (Obr. 4.2. C, D).

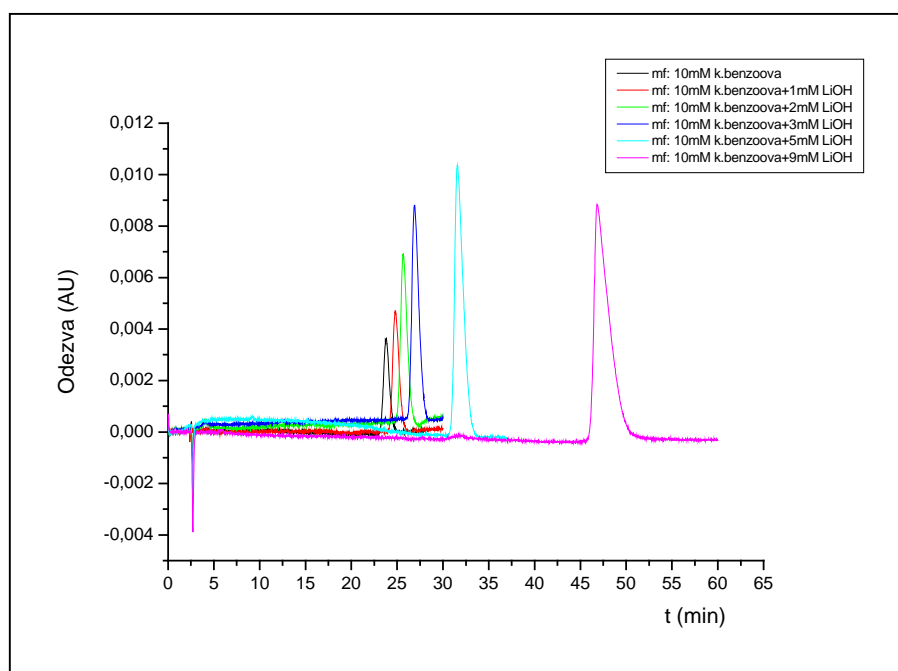


Obr. 4.2. Chromatogramy získané nadávkováním: A – 12 mM k. benzoová + 3 mM LiOH, B – 12 mM k. benzoová + 7 mM LiOH, C – 8 mM k. benzoová + 7 mM LiOH, D – 8 mM k. benzoová + 3 mM LiOH. Mobilní fáze: 10 mM k. benzoová + 5 mM LiOH. Nepřímá UV detekce: 290 nm, teplota kolony a v karuselu: 25 °C, průtoková rychlost mobilní fáze: 0,2 ml/min, dávkovaný objem: 10 μ l.

K ověření předpokladu, že se kationty alkalických kovů neváží na stacionární fázi, a tudíž je možné použít tyto látky k určení mrtvého času kolony, byl LiOH zaměněn za CsOH o stejné koncentraci v daném pufru při zachování všech ostatních experimentálních podmínek. Získaná data jsou uvedena v tabulce viz Table 2 v publikaci II. Z této tabulky je zřejmé, že záměna hydroxidů nemá vliv na pozici obou systémových píků. Taktéž, pokud nadávkujeme směsnou poruchu dvou alkalických hydroxidů (např. LiOH s CsOH nebo LiOH s NaOH) se zachovanou koncentrací kyseliny benzoové, ve výsledném chromatogramu se neobjeví žádný další systémový pík. V takovém případě je plocha resp. výška prvního systémového píku dána součtem obou komponent.

Další způsob, který byl použit pro ověření předpokladu, že kationty alkalických kovů neinteragují se stacionární fází, byl speciální „cyklický experiment“ (s následným měřením v CZE), který je podrobně popsán v publikaci II. Tímto postupem bylo ověřeno, že se LiOH neváže na stacionární fází, zatímco kyselina benzoová se stacionární fází interaguje. Hydroxid lithný je tedy vhodný marker mrtvého času pro tento typ kolon.

Pozici prvního systémového píku (stacionární pík) nelze změnit, protože, jak již bylo uvedeno, hydroxidy alkalických kovů se na stacionární fází neváží. Změnit pozici druhého systémového píku je v binárních systémech možné dvěma způsoby. S rostoucí disociací kyseliny benzoové v mobilní fází (tzn. s rostoucí koncentrací hydroxidu alkalického kovu) se druhý systémový pík posouvá k vyšším retenčním časům (viz Obr. 4.3. a Table 1 v publikaci II). Tento posun může být vysvětlen tím, že se na stacionární fází váže přednostně nenabitá (nedisociovaná) kyselina benzoová. S rostoucí disociací kyseliny benzoové je v daném pufru k dispozici nižší množství nenabitě složky, a tím se snižuje kompetice o vazebná místa na stacionární fází a dojde ke zvýšení retence.



Obr. 4.3. Chromatogramy získané nadávkováním 10 μ l 12 mM kyseliny benzoové. Složení jednotlivých mobilních fází je uvedeno v obrázku. Nepřímá UV detekce: 290 nm, teplota kolony a v karuselu: 25 °C, průtoková rychlost mobilní fáze: 0,2 ml/min.

Druhým způsobem je ředění mobilní fáze. V tabulce viz Table III v publikaci II jsou uvedeny retenční časy pro oba systémové píky v různých mobilních fázích tvořených kyselinou benzoovou a LiOH v poměru 2:1, kdy mají všechny uvedené pufrů maximální pufráční kapacitu (při dané koncentraci pufrů). S ředěním mobilní fáze (s klesající koncentrací složek pufru) se druhý systémový pík posouvá k vyšším retenčním časům. Důvodem je opět nižší pokrytí stacionární fáze kyselinou benzoovou a tedy menší kompetice o vazebná místa na stacionární fázi.

V ternárních systémech tvořených dvěma kyselinami (kyselinou benzoovou a tropovou) a 5 mM LiOH získáme nadávkováním poruchy LiOH tři systémové píky, z nichž první pík je opět stacionární. Druhý a třetí systémový pík mění svou pozici v závislosti na složení (koncentraci obou kyselin) mobilní fáze (viz Figure 5 v publikaci II). Pozice druhého systémového píku se s rostoucí koncentrací kyseliny tropové (od 2 mM do 8 mM) v ternární mobilní fázi přibližuje pozici systémového píku, který získáme porušením rovnováhy při použití binární mobilní fáze (10 mM kyselina tropová + 5 mM LiOH). Totéž platí pro třetí systémový pík (se zvyšující se koncentrací kyseliny benzoové) v ternárním systému ve srovnání s druhým systémovým píkem v binárním systému (10 mM kyselina benzoová + 5 mM LiOH). Pozice druhého a třetího systémového píku se přibližují s klesající koncentrací kyseliny benzoové v mobilní fázi. Zjištěné chování potvrzuje předpoklad o soutěžení těchto dvou kyselin o vazebná místa na stacionární fázi.

Ukázka jevu nazývaného v odborné literatuře rezonance v chromatografickém systému je znázorněna na obrázku viz Figure 6 v publikaci II. „Interakce“ systémové zóny a zóny analytu nastala při nadávkování pentan-1-olu do jednosložkové mobilní fáze tvořené 10 mM kyselinou benzoovou. Získaný signál má „cik-cak“ tvar, který je charakteristický při použití nepřímé UV detekce. Oba píky jsou rozšířené a nelze je bezchybně kvalitativně ani kvantitativně vyhodnotit.

4.3 Matematický popis a predikce systémových píků

Na základě získaných experimentálních dat byl odvozen matematický model, který popisuje chování systémových píků v chromatografickém systému tvořeném vodnými mobilními fázemi složenými z kyseliny benzoové a LiOH v různých poměrech a kolonou Discovery® RP Amide C16. Formulovaný matematický model interakce neutrální formy

kyseliny benzoové se stacionární fází byl přenesen do programu Simul 5 původně navrženého pro elektroforetické systémy. Tak bylo umožněno simulovat časový vývoj popisovaného systému v různých počátečních uspořádáních. Popis základních experimentů, získané výsledky využité jako podklady pro matematické odvození, příslušný komentář a ukázky predikovaných chromatogramů programem Simul 5 jsou uvedeny v příloze.

4.4 Literatura II

- [1] Levin S., Grushka E.: *Anal. Chem.* 59, 1157 (1987).
- [2] Gaš B., Hruška V., Dittman M., Bek F., Witt K.: *J. Sep. Sci.* 30, 1435 (2007).
- [3] Levin S., Abu-Lafi S., Golshan-Shirazi S., Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* 679, 213 (1994).
- [4] Levin S., Grushka E.: *Anal. Chem.* 58, 1602 (1986).
- [5] Mizrotsky N., Kristol L., Grushka E.: *J. Chromatogr. A* 691, 21 (1995).
- [6] Arvidsson E., Crommen J., Schill G., Westerlund D.: *J. Chromatogr. A* 461, 429 (1989).
- [7] Levin S., Abu-Lafi S.: *Chirality* 6, 148 (1993).
- [8] Sellmeyer H., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 960, 175 (2002).
- [9] Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 25, 3901 (2004).
- [10] Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 831, 105 (1999).
- [11] Sajonz P., Yun T., Zhong G., Fornstedt T., Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* 734, 75 (1996).
- [12] Williams S.: *J. Chromatogr. A* 1052, 1 (2004).
- [13] Knox J.H., Kaliszan R.: *J. Chromatogr.* 349, 211 (1985).
- [14] Mizrotsky N., Grushka E.: *Anal. Chem.* 67, 1737 (1995).
- [15] Srbek J., Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.* 28, 1263 (2005).
- [16] Fornstedt T., Westerlund D.: *J. Chromatogr.* 648, 315 (1993).
- [17] Štědrý M., Jaroš M., Gaš B.: *J. Chromatogr. A* 960, 187 (2002).
- [18] Poppe H.: *J. Chromatogr.* 506, 45 (1990).
- [19] Levin S., Grushka E.: *Anal. Chem.* 61, 2428 (1989).
- [20] Riedo F., Kovats E.S.: *J. Chromatogr.* 239, 1 (1982).
- [21] McCormick R.M., Karger B.L.: *Anal. Chem.* 52, 2249 (1980).
- [22] Krstulovic A.M., Colin H., Guiochon G.: *Anal. Chem.* 54, 2438 (1982).
- [23] Leha N., Ungvaral J., Kovats E.S.: *Anal. Chem.* 54, 2410 (1982).
- [24] Hruška V., Gaš B.: *Electrophoresis* 28, 3 (2007).

5. PŘÍKLADY NALEZENÍ A VYUŽITÍ OPTIMALIZOVANÝCH SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ

5.1 Achirální systémy

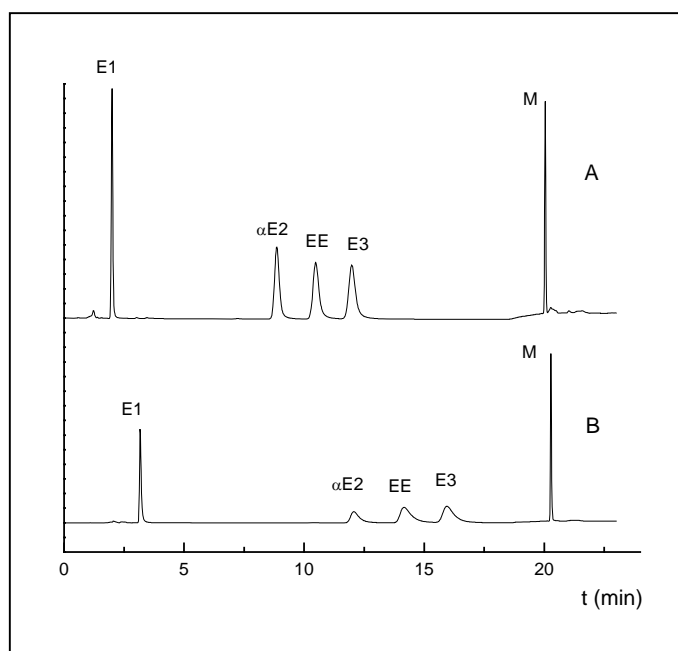
5.1.1 Optimalizace HPLC metody pro separaci vybraných estrogenů - publikace III

Přírodní a syntetické estrogeny se řadí mezi tzv. endokrinní disruptory (EDS). Tyto látky jsou charakteristické tím, že pozměňují funkce endokrinního systému různých organismů, a to i při velmi nízkých koncentracích, ve kterých se vyskytují v životním prostředí [1, 2]. Vzniklé změny v endokrinním systému mohou negativně ovlivnit daného jedince nebo dlouhodobě působit na jeho potomstvo [3]. S rostoucím používáním různých hormonálních přípravků se tyto sloučeniny nebo jejich metabolity dostávají do tekoucích vod, kde mohou nepříznivě působit na vodní živočichy, a proto je nutné monitorovat koncentrace EDS. Cílem této práce bylo vyvinout jednoduchou HPLC metodu pro stanovení pěti estrogenů, konkrétně estronu (E1), 17α -estradiolu (α E2), estriolu (E3), 17α -ethinylestradiolu (EE) a mestranolu (M). Struktury jednotlivých estrogenů jsou uvedeny na obrázku viz Figure 1 v publikaci III.

Pro separaci uvedených estrogenů byl použit reverzní mod vysokoúčinné kapalinové chromatografie se stacionární fází C18 (tj. nepolární oktadecylové řetězce kovalentně navázané na dodatečně odstíněný (endcapped) silikagelový nosič). Snahou bylo použít co nejjednodušší mobilní fázi. Acetonitril (ACN) byl vybrán jako organický modifikátor, vzhledem k jeho vyšší eluční síle než methanolu v těchto systémech, a druhou složkou mobilní fáze byla deionizovaná voda. První testovanou kolonou byl Supelcosil TM LC-18-DB (250 x 4,6 mm, velikost zrnění 5 μ m). Na této koloně bylo postupnou úpravou poměru ACN a deionizované vody v mobilní fázi dosaženo rozdělení všech pěti estrogenů na základní linii. Nejvhodnější složení mobilní fáze v izokratickém modu bylo ACN/deionizovaná voda 40/60 (v/v) (viz Figure 2 v publikaci III). Retenční čas mestranolu však nabýval v tomto systému velmi vysoké hodnoty (85,8 min), příčinou je silná hydrofobní interakce, která se uplatňuje v retenčním mechanismu této sloučeniny. Z důvodu snahy po zkrácení doby analýzy byla následně použita gradientová eluce. Jako nejvhodnější se ukázal být lineární gradient do 100% ACN, aplikovaný od 16. do 17. minuty; prvních 16 minut bylo složení mobilní fáze konstantní - ACN/deionizovaná voda 40/60 (v/v). Získaný chromatogram je znázorněn na obrázku viz Figure 4 v publikaci III. Za optimalizovaných podmínek gradientové eluce byla stanovena mez detekce a mez stanovitelnosti estrogenů (viz Table 2

publikace III). Kratší retence, lepší symetrie píků a vyšší účinnost separace byly získány za použití gradientové eluce oproti eluci izokratické.

Kratší kolona Symmetry® C18 (150 x 4,6 mm, velikost zrnění 5 µm) s principiálně stejným typem stacionární fáze byla následně testována za účelem zkrácení doby analýzy a zlepšení symetrie píků. Vybraná kolona má deklarovanou velmi nízkou aktivitu silanolových skupin, takže by se tyto skupiny neměly významně podílet na retenci analytů. Nejprve byl na této koloně vyzkoušen optimalizovaný gradient použitý pro kolonu Supelcosil. Na Obr. 5.1. a v Tabulce 5.1. jsou pro porovnání uvedeny chromatogramy resp. chromatografická data získaná pro obě kolony při použití tohoto gradientu. Z obrázku je zřejmé, že kolona Symmetry je mnohem vhodnější pro danou separaci, protože nejenže se sníží retence estrogenů s výjimkou mestranolu, ale zároveň se výrazně zvýší symetrie píků, zejména v případě 17α-estradiolu, ethinylestradiolu a estriolu.

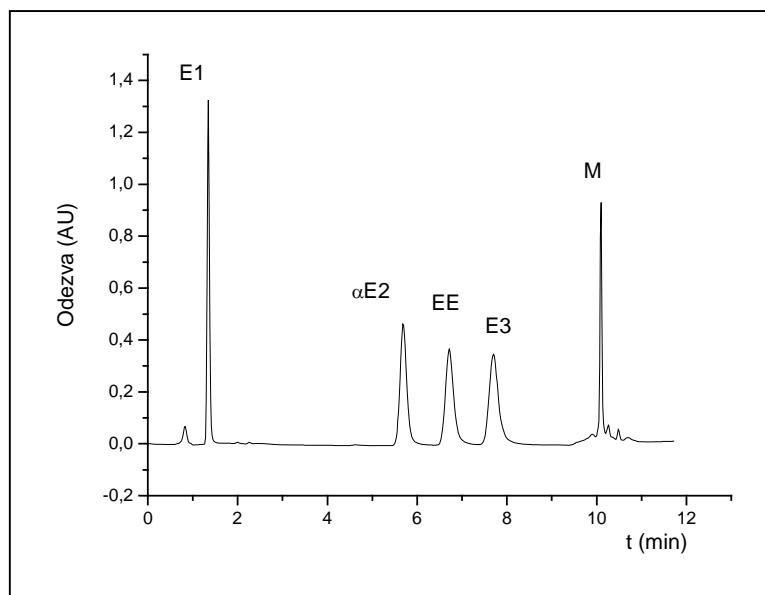


Obr. 5.1. Porovnání chromatogramů separace směsi 5 estrogenů za použití kolon: A) Symmetry® C18, B) Supelcosil TM LC-18-DB; gradientová eluce, složení mobilní fáze: ACN/voda 40/60 (v/v) do 16. min, od 16. do 17. min lineární gradient do 100% ACN; rychlost průtoku mobilní fáze: 1,3 ml/min; teplota kolony: 20 °C; UV detekce: 200 nm.

Tabulka 5.1. Porovnání vybraných chromatografických parametrů (t_R – retenční čas, R – rozlišení a S – faktor symetrie) uvedených látek při použití dvou odlišných kolon; gradientová eluce; složení mobilní fáze: ACN/voda 40/60 (v/v) do 16. min, od 16. do 17. min lineární gradient do 100% ACN; rychlost průtoku mobilní fáze: 1,3 ml/min; teplota kolony: 20 °C; UV detekce: 200 nm.

	kolona Supelcosil TM LC-18-DB			kolona Symmetry® C18		
	t_R (min)	R	S	t_R (min)	R	S
E1	3,16		1,43	2,00		1,14
α E2	11,91	24,43	1,83	8,86	28,75	1,18
E3	13,99	3,04	1,97	10,48	4,02	1,33
EE	15,77	2,27	1,76	11,99	3,19	1,33
M	20,27	10,27	1,21	20,05	27,23	0,96

Vzhledem k lepším hodnotám rozlišení na koloně Symmetry byla gradientová eluce dále upravována za účelem zkrácení doby analýzy. Záznam separace estrogenů na koloně Symmetry za optimalizovaných podmínek je uveden na Obr. 5.2., příslušná chromatografická data jsou shrnuta v Tabulce 5.2.



Obr. 5.2. Chromatogram separace směsi estrogenů za použití kolony Symmetry® C18; gradientová eluce, složení mobilní fáze: ACN/voda 40/60 (v/v) do 8. min, od 8. do 9. min lineární gradient do 100 % ACN; rychlost průtoku mobilní fáze: 2 ml/min do 8. min, od 8. do 9. min lineárně zvyšován průtok na 3 ml/min; teplota kolony: 20 °C; UV detekce: 200 nm.

Tabulka 5.2. Chromatografické parametry (symboly jako v tabulce 5.1.) uvedených estrogenních látek za optimalizovaných podmínek gradientové eluce (viz Obr. 5.2.) při použití kolony Symmetry.

	t_R (min)	R	S
E1	1,35		1,07
α E2	5,69	23,68	1,12
E3	6,72	3,44	1,20
EE	7,70	2,83	1,20
M	10,10	10,88	0,97

Srovnání separací na koloně Symmetry při aplikaci dvou různých gradientových elucí (viz Obr. 5.1. a 5.2. a Tabulky 5.1. a 5.2.) ukazuje, že v případě aplikace druhého lineárního gradientu do 100 % ACN, a zároveň zvýšení průtokové rychlosti mobilní fáze mezi 8. a 9. min došlo k podstatnému zkrácení retence mestranolu (a tudíž celé analýzy), a navíc se zvýšila symetrie píků všech pěti analytů.

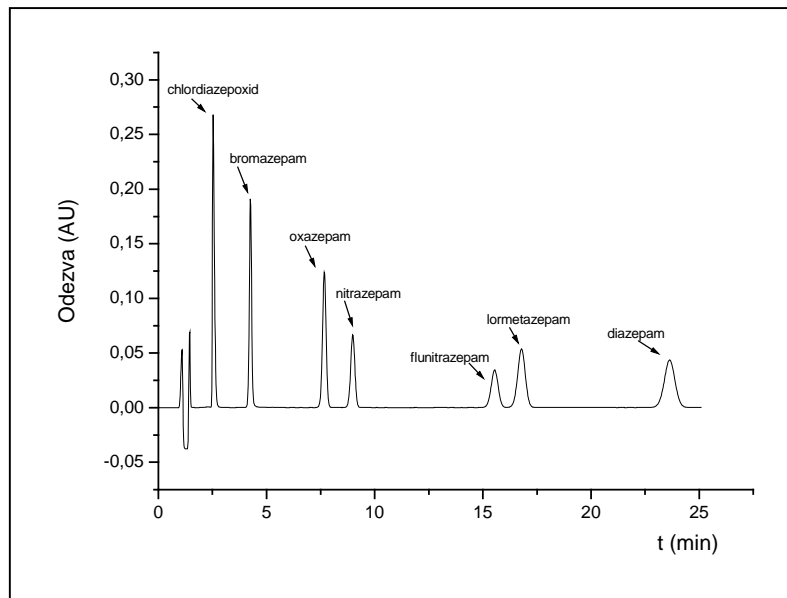
5.1.2 Optimalizace separace 1,4-benzodiazepinů metodou HPLC (připravovaná publikace)

Skupina benzodiazepinů se řadí mezi tzv. malé trankvilizéry (sedativa). Tato léčiva mají čtyři druhy účinku: anxiolytický (tlumí úzkost), protizáchvatový (v prevenci i v léčbě křečí), myorelaxační (uvolňují svalové napětí) a sedativní/hypnotický (navozují spánek) [4, 5]. Jedná se o chirální látky, které rychle podléhají racemizaci, a proto je těžké izolovat jednotlivé enantiomery [6]. Benzodiazepinová léčiva se vyrábějí a používají pouze ve formě racemátů [7], a proto není nutné kontrolovat enantiomerní čistotu těchto léčiv. Na druhou stranu tyto léky mohou být zneužívány. Z tohoto důvodu je žádoucí vývoj analytických metod pro jejich stanovení.

Cílem této práce bylo nalézt vhodné separační podmínky v RP HPLC systému pro sedm 1,4-benzodiazepinů - bromazepam, oxazepam, nitrazepam, chlordiazepoxid, flunitrazepam, lormetazepam a diazepam.

Nejprve byla testována kolona Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 μ m), naplněná oktylsilikagelovou stacionární fází. Na této koloně bylo postupnou úpravou poměru ACN a okyselené deionizované vody (octovou kyselinou (HAc) na pH 3,0) v mobilní fázi dosaženo rozdělení všech sedmi benzodiazepinů na základní linii. Nejvhodnější (optimalizované)

složení mobilní fáze v izokratickém modu bylo ACN/okyselená deionizovaná voda HAc, pH 3,0 30/70 (v/v) (viz Obr. 5.3., Tabulka 5.1.). Okyselení mobilní fáze bylo aplikováno za účelem zvýšení symetrie píků.



Obr. 5.3. Chromatogram separace směsi benzodiazepinů za použití kolony Zorbax SB-C8; složení mobilní fáze: ACN/okyselená deionizovaná voda HAc, pH 3,0 30/70 (v/v); rychlost průtoku mobilní fáze: 1,5 ml/min; teplota kolony: 25 °C; UV detekce: 240 nm.

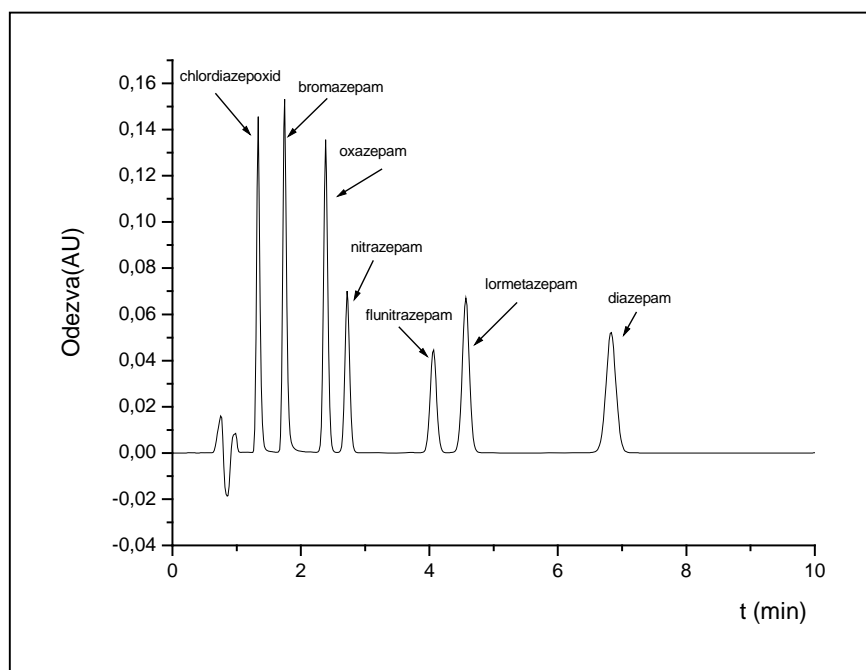
Tabulka 5.3. Chromatografická data (symboly viz Tabulka 5.1.) pro separaci směsi benzodiazepinů za optimalizovaných podmínek izokratické eluce (viz Obr. 5.3.) na koloně Zorbax SB-C8.

	t_R (min)	R	S
chlordiazepoxid	2,53		1,54
bromazepam	4,25	9,61	1,02
oxazepam	7,68	13,59	0,97
nitrazepam	8,99	3,92	0,99
flunitrazepam	15,56	13,62	0,98
lormetazepam	16,81	1,97	0,98
diazepam	23,66	8,72	0,99

Pro separaci benzodiazepinů na koloně Zorbax SB-C8 byla zkoušena též gradientová eluce za účelem snížení celkové doby analýzy. Byly použity různé typy gradientů, ale aby byla zachována separace flunitrazepamu a lormetazepamu, bylo možné aplikovat zvyšující se

množství ACN v mobilní fázi až od 15. minuty, což přineslo snížení celkové doby separace na 18,5 minuty oproti 25 minutám v izokratickém modu. Symetrie píků je pro gradientovou i izokratickou eluci srovnatelná, proto je pro opakovaná měření vhodnější izokratická eluce, kterou se předejde nutné „ekvilibraci“ kolony před dalším měřením.

Výrazné zkrácení doby separace bylo dosaženo při použití kolony Zorbax SB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m), která se od předchozí liší nepolárnější stacionární fází (oktadecylové řetězce navázané na silikagelový nosič). V tomto separačním systému bylo možné použít mobilní fázi s vyšším obsahem ACN (40 objemových procent), přičemž separace na základní linii všech benzodiazepinů byla zachována a celková doba analýzy v izokratickém modu se snížila na 10 minut při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min. Zvýšením rychlosti průtoku mobilní fáze na 2 ml/min klesla celková doba separace na 7 minut (viz Obr. 5.4., Tabulka 5.4.).



Obr. 5.4. Chromatogram separace směsi benzodiazepinů za použití kolony Zorbax SB-C18; složení mobilní fáze: ACN/okyselená deionizovaná voda HAc, pH 3,0 40/60 (v/v); rychlost průtoku mobilní fáze: 2 ml/min; teplota kolony: 25 °C; UV detekce: 240 nm.

Tabulka 5.4. Chromatografická data (symboly viz Tabulka 5.1.) pro separaci směsi benzodiazepinů za optimalizovaných podmínek izokratické eluce (viz Obr. 5.4.) na koloně Zorbax SB-C18.

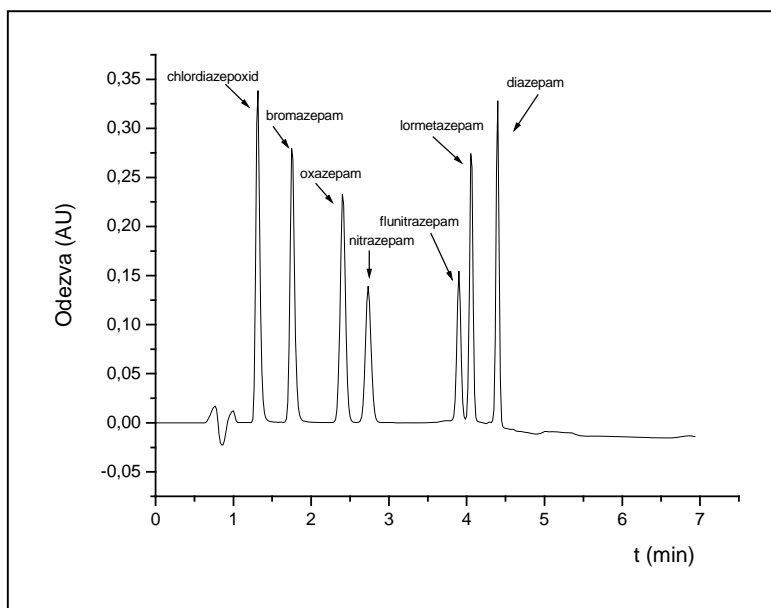
	t_R (min)	R	S
chlordiazepoxid	1,32		1,21
bromazepam	1,76	4,44	1,12
oxazepam	2,41	5,61	1,05
nitrazepam	2,74	2,50	1,05
flunitrazepam	4,09	8,39	1,03
lormetazepam	4,60	2,65	1,01
diazepam	6,83	9,07	1,02

Za optimalizovaných podmínek izokratické eluce na koloně Zorbax SB-C18 byly stanoveny meze detekce a meze stanovitelnosti 1,4-benzodiazepinů. Mez detekce byla stanovena jako trojnásobek výšky šumu, mez stanovitelnosti jako desetinásobek výšky šumu. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.5.

Tabulka 5.5. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) určené pro studované 1,4-benzodiazepiny.

	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
chlordiazepoxid	8,68	28,92
bromazepam	7,89	26,28
oxazepam	8,91	29,69
nitrazepam	17,05	56,83
flunitrazepam	26,70	89,00
lormetazepam	17,77	59,23
diazepam	22,76	75,86

Použitím gradientové eluce bylo dosaženo další snížení doby analýzy na 4,5 minuty. Záznam separace je ukázán na Obr. 5.5. Symetrie píků je pro gradientovou i izokratickou eluci opět srovnatelná, proto je pro opakovaná měření jako v předchozím případě vhodnější izokratická eluce.



Obr. 5.5. Chromatogram separace směsi benzodiazepinů za použití kolony Zorbax SB-C18; složení mobilní fáze: ACN/okyselená deionizovaná voda HAc, pH 3,0 40/60 (v/v) do 2. minuty, od 2. do 3. min lineární gradient do ACN/okyselená deionizovaná voda HAc, pH 3,0 90/10 (v/v); rychlost průtoku mobilní fáze: 2 ml/min; teplota kolony: 25 °C; UV detekce: 240 nm.

5.2 Chirální systémy – publikace IV

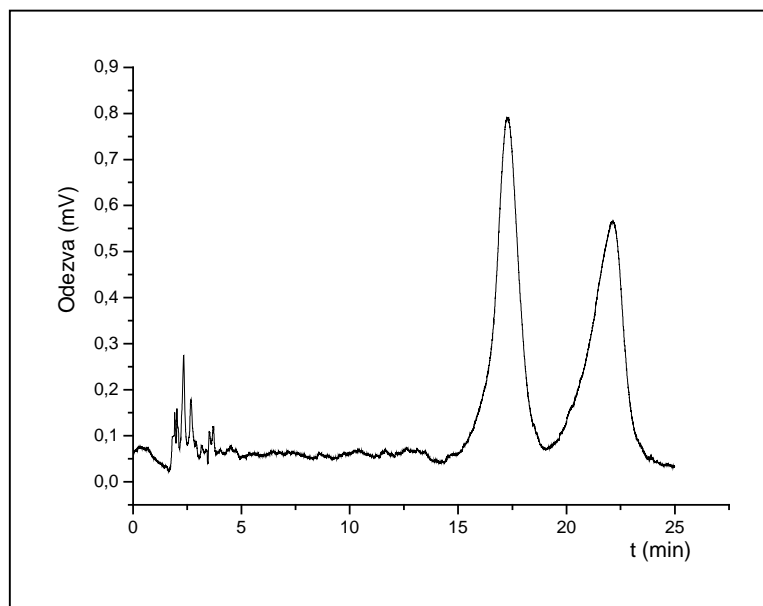
Chiralita se vyskytuje u řady důležitých sloučenin, např. u více než poloviny užívaných léčiv. Většina syntetických postupů vede k tvorbě racemátu (tj. ekvimolární směsi enantiomerů). V případě léčiv má velmi často pouze jeden z enantiomerů požadované terapeutické účinky. V posledních letech se projevuje snaha používat jako léčivo pouze aktivní enantiomer. Nežádoucí izomery mohou interagovat s odlišnými receptory nebo enzymy a vést ke vzniku rozdílných metabolitů a nežádoucích vedlejších účinků, toxicitě léčiva nebo jen zatěžují organismus vstupem neaktivní látky [8]. Podobný trend byl zaznamenán i při aplikaci pesticidů. Také v potravinářské chemii se vzhledem k rozdílným chutím, vůním i výživové hodnotě různých enantiomerů stále více sleduje enantiomerní zastoupení složek potravin a aditiv. Stanovení enantiomerního zastoupení v potravinách a nápojích má velkou vypovídající hodnotu a je významnou součástí potravinářské analýzy. Základní přehled nejdůležitějších chirálních složek potravin a nápojů a jejich význam při hodnocení kvality výrobků je uveden v podrobné rešerši publikaci IV.

Chirální separace jsou důležitou podskupinou aplikací separačních metod. Pro kontrolu enantiomerní čistoty se nejčastěji využívá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo kapilární elektroforézy [9]. Chirální kapalinová chromatografie je vhodná separační technika, která je používána během procesu vývoje léčiv, stejně jako pro studium farmakologických vlastností každého enantiomeru. Uplatnění nalézá enantioselektivní HPLC více i v analýze enantiomerního složení potravin. Nejčastěji se používá přímá separace na chirálních stacionárních fázích, jejichž výběr je velmi rozmanitý a je stále obohacován vývojem nových CSP s novými či modifikovanými chirálními selektory.

5.2.1 Optimalizace a validace HPLC metody pro enantioseparaci (±)-cloprostenolu - publikace V

Cloprostenol (struktura sodné soli (+)-cloprostenolu je znázorněna na obrázku viz Figure 1 v publikaci V) je syntetickým analogem prostaglandinu $F_{2\alpha}$. Aktivní látka se používá ve veterinární medicíně (nejčastěji ve formě sodné soli) k synchronizaci a indukci říje, k léčení reprodukčních poruch u hovězího dobytka, k indukci porodu u prasnic a k léčení některých chorob pohlavního ústrojí hospodářských zvířat. Cloprostenol má schopnost vyvolat luteolýzu a kontrakci dělohy. Nicméně bylo zjištěno, že (+)-enantiomer cloprostenolu má vyšší biologickou aktivitu než racemát a pouze tento enantiomer je schopen vyvolat luteolýzu [10, 11]. Rozdílné účinky racemátu a (+)-cloprostenolu byly popsány v řadě publikací [12, 13, 14] a nadále jsou intenzivně studovány. Proto cílem této práce bylo vyvinout rychlou a jednoduchou HPLC metodu pro stanovení enantiomerů cloprostenolu resp. pro kontrolu jeho enantiomerní čistoty.

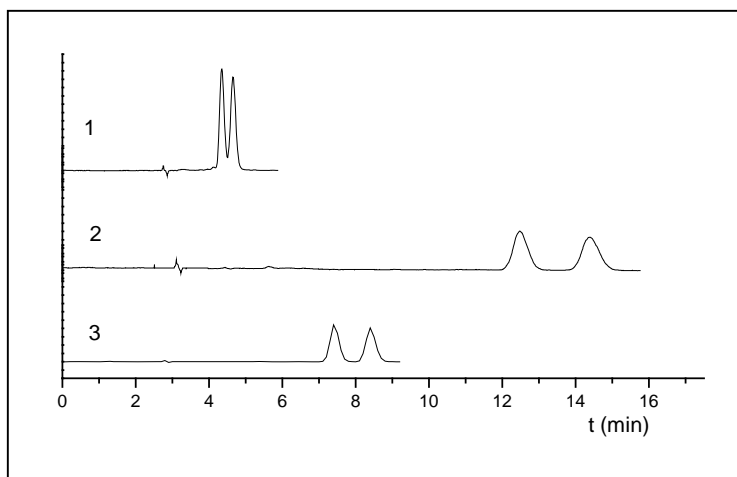
Nejprve byly pro enantioselektivní separaci (±)-cloprostenolu vyzkoušeny chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických antibiotik. Jako nejvhodnější ze stacionárních fází tohoto typu se ukázala být teikoplanin aglykonová CSP, která se dříve osvědčila např. při separaci běžných α -aminokyselin, β -aminokyselin obsahujících cykloalkanový nebo cykloalkenový kruh [15] a některých léčiv – např. benzodiazepinů [16]. Ačkoliv na této koloně byly postupně vyzkoušeny všechny tři separační módy s různým složením mobilních fází, teplotou kolony a průtokovou rychlostí, nebylo dosaženo optimální enantioseparace cloprostenolu. Nejlepší separace těchto enantiomerů bylo dosaženo v normálním modu při použití mobilní fáze propan-2-ol/hexan/MeOH/TEA 10/60/30/1,5 (v/v/v/v). Za těchto podmínek byly enantiomery cloprostenolu rozděleny, nicméně dosažená symetrie píků ($S_1 = 0,75$; $S_2 = 0,44$), zejména později eluujícího enantiomeru byla nevyhovující (viz Obr. 5.6.).



Obr. 5.6. Chromatogram enantioseparace (\pm)-cloprostenolu na TAG CSP v normálním modu; složení mobilní fáze: propan-2-ol/hexan/MeOH/TEA 10/60/30/1,5 (v/v/v/v); rychlost průtoku mobilní fáze: 1ml/min; měření probíhalo při laboratorní teplotě; UV detekce: 276 nm.

Na TAG CSP bylo v normálním modu dosaženo separace až na základní linii při použití mobilní fáze propan-2-ol/hexan/MeOH/TEA 15/60/25/0,5 (v/v/v/v), ale celková doba analýzy byla příliš dlouhá (cca 45 minut) pro praktické použití a obdobně jako v případě na Obr. 5.6. byly oba píky značně nesymetrické.

Vzhledem k tomu, že separaci v HPLC je obecně možno ovlivnit složením mobilní fáze, teplotou, rychlostí průtoku mobilní fáze (což bylo vše zkoušeno na TAG CSP), ale především výběrem stacionární fáze, byla pro optimalizaci separace vybrána jiná CSP. Vhodnou alternativou k CSP na bázi makrocyclických antibiotik, glykopeptidů, jsou polysacharidové chirální stacionární fáze. Pro další experimenty byla použita kolona Chiralcel OD-RH s celulosou modifikovanou tris (3,5-dimethylfenyl)-karbamátem navázanou na silikagelový nosič. Struktura tohoto chirálního selektoru je ukázána na obrázku viz Figure 2 v publikaci V. Uvedená kolona je určena pro separace v reverzním modu. Testované mobilní fáze byly tvořeny ACN a 20 mM fosfátovým pufrům o pH 3,0 a 6,0. S klesajícím množstvím ACN v mobilní fázi se zvyšovala retence, a také rozlišení enantiomerů zejména při použití fosfátového pufru o pH 3,0 jako složky mobilní fáze. Příslušné chromatogramy získané v závěrečných krocích optimalizace poměru organického modifikátoru a pufru jsou ukázány na Obr. 5.7. Chromatografická data jsou shrnuta v tabulce viz Table 1 v publikaci V.



Obr. 5.7. Chromatogramy enantioseparace (\pm)-cloprostenolu na koloně Chiralcel OD-RH; složení mobilní fáze: 1) ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 40/60 (v/v), 2) ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 30/70 (v/v), 3) ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 33/67 (v/v); rychlost průtoku mobilní fáze: 0,7 ml/min; teplota kolony: 20 °C; UV detekce: 274 nm.

Jak je patrné z Obr. 5.7., optimalizované chromatografické podmínky pro enantioseparaci (\pm)-cloprostenolu jsou: kolona Chiralcel OD-RH, mobilní fáze: ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 33/67 (v/v), rychlost průtoku mobilní fáze: 0,7 ml/min, teplota kolony: 20 °C, UV detekce: 274 a 210 nm. V optimalizovaném systému byly dále stanoveny základní validační parametry (stabilita vzorků, opakovatelnost a reprodukovatelnost metody, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti a robustnost metody) – viz publikace V. Metoda byla optimalizována pro kontrolu enantiomerní čistoty léčiva, nicméně změnou poměru ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 v mobilní fázi lze vypracovanou metodu použít i pro semipreparativní účely.

5.3 Literatura III

- [1] Mao L., Sun Ch., Zhang H., Li Y., Wu D.: *Anal. Chim. Acta* 522, 241 (2004).
- [2] Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A.: *Pure Appl. Chem.* 75, 631 (2003).
- [3] Reinen J., Vriese E., Vermeulen N.P.E.: *Anal. Biochem.* 357, 85 (2006).
- [4] McGrath G., McClean S., O'Kane E., Smyth W.F., Tagliaro F.: *J. Chromatogr. A* 735, 237 (1996).
- [5] Mercolini L., Mandrioli, R., Amore M., Raggi M.A.: *J. Sep. Sci.* 31, 2619 (2008).
- [6] Yang S.K., Lu X.L.: *Chirality* 4, 443 (1992).
- [7] Vree T.B., Baars A.M., Wuis E.W.: *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* 13, 83 (1991).
- [8] Gilar M., Tesařová E., Patzelová V., Deyl Z.: *Chem. Listy* 88, 514 (1994).
- [9] Doležalová M., Tkaczyková M.: *Chem. Listy* 94, 994 (2000).
- [10] Beretta C., Cavalli M.: *Theriogenology* 62, 837 (2004).
- [11] Hospes R., Thumes M., Holsteg M., Failing K., Bostedt H.: *Tieraertzliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere* 33, 395 (2005).
- [12] Hirsbrunner G., Knutti B., Kupfer U., Burkhardt H., Steiner A.: *Anim. Reprod. Sci.* 79,17 (2003).
- [13] Grunberg V.W.: *Tieraertzliche Umschau* 57, 508 (2002).
- [14] Pena F.J., Gil M.C., Pena F.: *Anim. Reprod. Sci.* 68, 77 (2001).
- [15] Péter A., Árki A., Tourwé D., Forró E., Fülöp F., Armstrong D.W.: *J. Chromatogr. A* 1031, 159 (2004).
- [16] Tesařová E., Bosáková Z.: *J. Sep. Sci.* 26, 661 (2003).

6. ZÁVĚRY

Dizertační práci tvoří komentovaný soubor 5 publikací, které jsou zaměřeny jak na základní výzkum, tak na ukázky aplikací.

Model LFER byl použit k porovnání tří chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu ve čtyřech mobilních fázích z hlediska jimi poskytovaných interakčních možností. Pomocí modelu byly zjištěny interakce rozhodující o retenci analytů v těchto systémech, a také vliv složení mobilní fáze na velikost a zastoupení jednotlivých typů interakcí. Zatímco při použití mobilní fáze s vysokým obsahem pufru (80 objemových procent) je faktorem určujícím retenci hydrofobicita, při použití mobilní fáze s vyšším obsahem organického modifikátoru (40 až 60 objemových procent) je příspěvek hydrofobicity srovnatelný s příspěvkem dalších typů interakcí, příp. menší. V mobilní fázi obsahující 80 % methanolu se interakce dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól stávají významným faktorem určujícím retenci na TAG a MTAG CSP (nahrazují hydrofobní a n - a π - elektronové interakce). Mezi faktory, které významně snižují retenci analytů v těchto separačních systémech, patří acidita a bazicita.

Výskyt a chromatografické chování systémových píků byly sledovány a popsány v RP HPLC na koloně Discovery® RP Amide C16 v mobilních fázích, které byly tvořeny pouze vodnými pufrů. Bylo zjištěno a pomocí CZE ověřeno, že kationty alkalických kovů neinteragují s použitou stacionární fází, a proto jsou tyto látky vhodné k určování mrtvého času kolony. Naproti tomu organické kyseliny použité jako složky mobilních fází interagují se stacionární fází a jejich pozice v chromatogramu lze ovlivňovat změnou disociace kyseliny anebo pouhým ředěním pufru. Na základě rozsáhlého souboru získaných experimentálních dat byl vytvořen matematický model popisující systémové píky. Zformulovaný matematický model interakce neutrální formy kyseliny benzoové se stacionární fází byl přenesen do programu Simul 5, původně navrženého pro elektroforetické separační systémy, což umožnilo simulovat časový vývoj popisovaného systému za různých počátečních podmínek.

Byly optimalizovány HPLC metody pro separace vybraných estrogenů a 1,4-benzodiazepinů. V obou případech byl použit reverzní mod vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nejvhodnější nalezené HPLC podmínky pro separaci estrogenů gradientovou elucí jsou: kolona Symmetry® C18, mobilní fáze ACN/voda 40/60 (v/v) do 8. min, od 8. do

9. min lineární gradient do 100 % ACN, rychlost průtoku mobilní fáze 2 ml/min do 8. min, od 8. do 9. min lineárně zvyšován průtok na 3 ml/min. Za těchto podmínek bylo všech pět studovaných estrogenů rozděleno na základní linii a doba separace nepřesáhla 11 minut. Vhodné podmínky pro separaci 1,4-benzodiazepinů byly nalezeny v izokratickém modu: kolona Zorbax SB-C18, mobilní fáze ACN/ deionizovaná voda okyselená octovou kyselinou pH 3,0 40/60 (v/v), rychlost průtoku mobilní fáze 2 ml/min. Za těchto podmínek se podařilo rozdělit všech sedm zástupců této skupiny analytů na základní linii do 8 minut. Při aplikaci gradientu by bylo možné dobu analýzy zkrátit na 4,5 minuty.

Byla vyvinuta a následně validována HPLC metoda pro kontrolu enantiomerní čistoty veterinárního léčiva (\pm)-cloprostenolu. Optimalizované chromatografické podmínky, při kterých bylo docíleno dobrého rozlišení enantiomerů a doba analýzy nepřesáhla 9 minut, jsou: kolona Chiralcel OD-RH, mobilní fáze ACN/20mM fosfátový pufr, pH 3,0 33/67 (v/v), rychlost průtoku mobilní fáze: 0,7 ml/min.

Seznam publikovaných prací

- I. Kalíková K., Lokajová J., Tesařová E.: *Linear free energy relationship as a tool for characterization of three teicoplanin-based chiral stationary phases under various mobile phase compositions*, J. Sep. Sci 29, 1476 - 1485 (2006).
- II. Kalíková K., Hruška V., Svobodová J., Chudoba R., Gaš B., Tesařová E.: *Occurrence and behavior of system peaks in RP HPLC with solely aqueous mobile phases*, J. Sep. Sci 32, 2864 – 2870 (2009).
- III. Loukotková L., Zlesáková D., Kalíková K., Tesařová E., Bosáková Z.: *Identification and quantification of selected estrogens using HPLC method*, Book of Proceedings, 4th International Student Conference – Modern Analytical Chemistry 83 - 88 (2008). ISBN 978-80-903103-2-2.
- IV. Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: *Výskyt a význam enantiomerů v potravinách*, Chem. Listy 102, 480 - 486 (2008).
- V. Kalíková K., Tesařová E., Bosáková Z.: *HPLC method for enantioselective analysis of cloprostenol*, J. Pharm. Biomed. Anal. 46, 892 - 897 (2008).

Příspěvky na konferencích

2009

- 5th Conference by Nordic Separation Science Society 2009, Tallin, Estonsko: Kalíková K., Hruška V., Gaš B., Tesařová E., *Behavior of system peaks in RP HPLC with solely aqueous mobile phases*, poster.
- CEEPUS International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2009, Blagoevgrad, Bulharsko: Kalíková K., Chudoba R., Schmid M., Tesařová E., *Separation of selected 1,4-benzodiazepines by HPLC and CZE – A comparison of methods*, poster.
- CEEPUS International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2009, Blagoevgrad, Bulharsko: Tesařová E., Kalíková K., Bosáková Z., *Effect of Macrocyclic Antibiotics Coverage/Contents on Enantioselective Resolution in Liquid Chromatography*, přednáška.
- ISSS 2009 - 15th International Symposium on Separation Sciences & 8th Balaton Symposium, Siofok, Maďarsko: Janečková L., Tesařová E., Kalíková K., Bosáková Z., *Characterization and Application of Zirconia-Based Stationary Phases*, poster.
- PBA 2009 - 21st International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Orlando, Florida, USA: Díšková J., Kalíková K., Bosáková Z., Tesařová E., Ševčík J., *Stability of tetracyclines in water*, poster.

2008

- 14th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2008, Primošten, Chorvatsko: Kalíková K., Hruška V., Gaš B., Tesařová E., *Variability of system peaks in HPLC depending on mobile phase composition*, poster.
- 60. jubilejní sjezd asociací českých a slovenských chemických společností 2008, Olomouc, Česká republika: Kalíková K., Hruška V., Gaš B., Tesařová E., *Studium systémových poruch v HPLC*, poster.
- 60. jubilejní sjezd asociací českých a slovenských chemických společností 2008, Olomouc, Česká republika: Tesařová E., Bosáková Z., Kalíková K., Lokajová J., Vadinská M., Loukotková L., Znaležiona J., Megová M., Maier V., Petr J., Knob R., Muller L., Ševčík J., *Těž neznamená to _těž, to není to _těž!*, přednáška.

- 4th International Student Conference 2008, Praha, Česká republika: Loukotková L., Zlesáková D., Kalíková K., Tesařová E., Bosáková Z., *Identification and quantification of selected estrogens using HPLC method*, přednáška.

2007

- Chirality 2007, San Diego, USA: Kalíková K., Bosáková Z., Tesařová E., *Enantioselective analysis of cloprostenol by HPLC*, poster.
- 13th International Symposium on Separation Science ISSS 2007, Štrbské Pleso, Slovenská republika: Kalíková K., Tesařová E., Hruška V., Gaš B., *Study of the behavior of system peaks in high performance liquid chromatography*, poster.
- Chiranal 2007-Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2007, Olomouc, Česká republika: Kalíková K., Zlesáková D., Bosáková Z., Tesařová E., *HPLC Method for Determination of Estrogens in Water*, poster.
- CEEPUS, 7th International Symposium and Summer School on Bioanalysis 2007, Pécs, Maďarsko: Kalíková K., Koc M., Trenčevska O., Zlesáková D., Bosáková Z., Tesařová E., *HPLC method with UV detection for determination of estrogens*, poster.
- Pražské Analytické Centrum Inovací Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR 2007, Praha, Česká republika: Lokajová J., Kalíková K., Tesařová E., *Studium interakčních mechanismů v separačních systémech – LFER*, přednáška.

2006

- 12th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2006, Lipica, Slovinsko: Kalíková K., Hradiská M., Tesařová E., *Study of retention and enantioseparation of (\pm)-cloprostenol on teicoplanin aglycon-based CSP in HPLC*, poster.
- 15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques ITP 2006, Paříž, Francie: Tesařová E., Kalíková K., Bosáková Z., Gaš B., *Enantioselective separation of (\pm)-cloprostenol with teicoplanin aglycon-based CSP in HPLC and CEC*, poster.

2005

- 17th International Symposium on Chirality 2005, Parma, Itálie: Kalíková K., Lokajová J., Tesařová E., *Teicoplanin based chiral stationary phases for HPLC in the frame of LFER*, poster.

- 11th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2005, Pardubice, Česká republika: Lokajová J., Kalíková K., Tesařová E., *Comparative Study of Three Teicoplanin-based Chiral Stationary Phases Using the LFER*, poster.
- CEEPUS Summer School on Theoretical background of capillary electromigration methods in bioanalysis 2005, Praha, Česká republika: Lokajová J., Kalíková K., Tesařová E., *Comparative study of teicoplanin based chiral stationary phases for HPLC in the frame of LFER*, poster.
- Chiranal 2005, Olomouc , Česká republika: Lokajová J., Kalíková K., Tesařová E., *Porovnání chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu pomocí modelu LFER*, přednáška.

PŘÍLOHA

Květa Kalíková, Vlastimil Hruška: Matematický popis a predikce systémových píků.

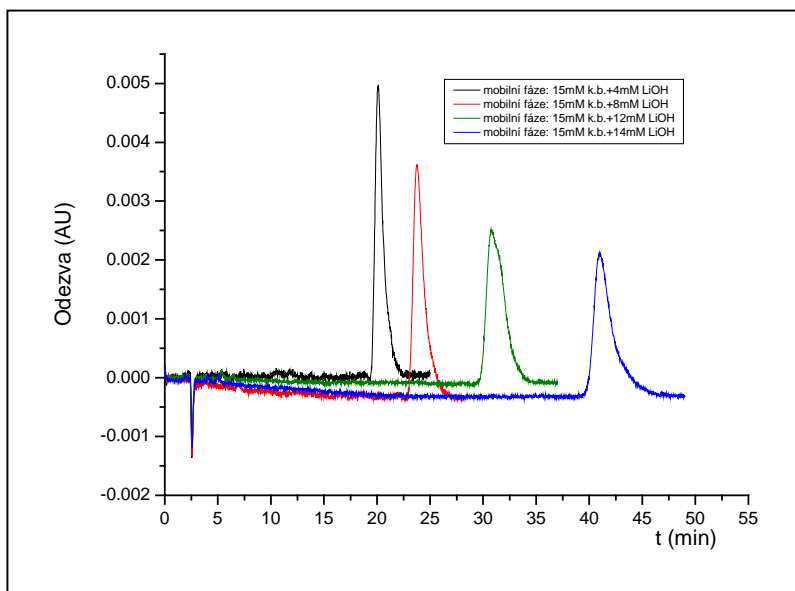
Nepublikovaná data.

Popis systémových píků v HPLC

Experiment

V návaznosti na publikaci diskutovanou v kapitole 4 bylo dalším cílem popsat výskyt, pozice a amplitudy systémových píků ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Matematický popis systémových píků, včetně vytvořených simulačních programů (Simul, PeakMaster) již existuje pro CZE resp. MEKC. Abychom mohli využít tyto informace a znalosti i pro popis systémových píků v HPLC, vybrali jsme pouze vodné mobilní fáze tvořené vodou + malým množstvím kyseliny benzoové a hydroxidu alkalického kovu. Takové mobilní fáze jsou podobné základním elektrolytům používaným v CZE. Hlavní výhodou je, že ve vodě jsou dobře popsány acidobazické rovnováhy. Další výhodou vodných roztoků je, že voda na rozdíl od organických rozpouštědel netěká, a tudíž se během měření nemění složení mobilní fáze ani dávkovaných poruch. Kyselina benzoová jako složka pufrů byla vybrána vzhledem k její absorpci v UV oblasti spektra, a tedy k možnému využití pro detekci systémových píků.

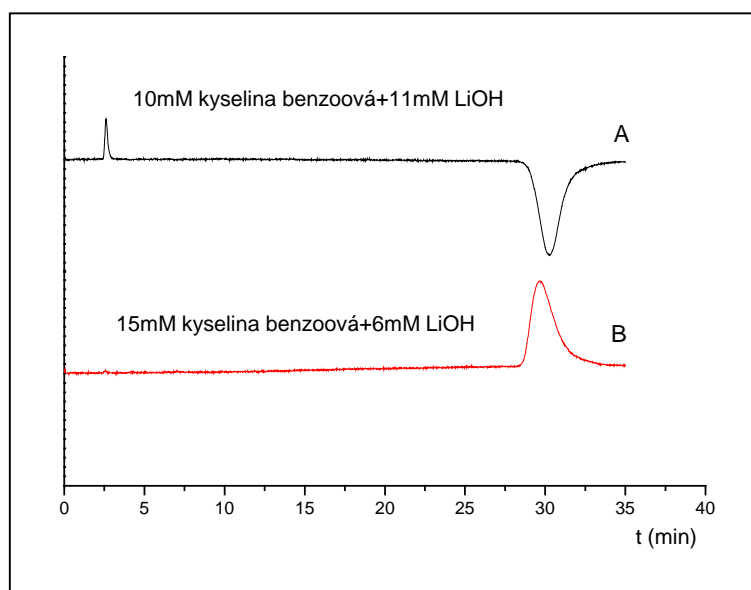
Nejprve byly studovány systémy s konstantní koncentrací kyseliny benzoové a různou koncentrací hydroxidu lithného v mobilní fázi. Na obrázku P1 jsou ukázány chromatogramy získané pro pufrы tvořené 15 mM kyselinou benzoovou (Bz) a proměnlivou koncentrací LiOH.



Obr. P1. Chromatogramy získané nadávkováním poruchy LiOH (složení poruch: vždy -3 mM LiOH ve vzorku oproti koncentraci LiOH v mobilní fázi). Složení jednotlivých mobilních fází je uvedeno v obrázku. Nepřímá UV detekce: 290 nm; teplota kolony a v karuselu: 25 °C; průtoková rychlost mobilní fáze: 0,2 ml/min; dávkovaný objem: 10 μ l.

Z obrázku je patrné, že s rostoucí koncentrací LiOH v mobilní fázi, tzn. s rostoucí disociací kyseliny benzoové se druhý systémový pík posouvá k vyšším retenčním časům, zatímco první pík je stacionární ve všech případech. Tento trend byl zaznamenán pro všechny koncentrace kyseliny benzoové a bude osvětlen níže.

Další pozornost byla věnována amplitudám systémových píků. Nadávkování poruchy hydroxidu lithného způsobí dva systémové píky (jeden stacionární a jeden pohyblivý), zatímco nadávkováním poruchy kyseliny benzoové získáme pouze jeden systémový pík (stacionární pík chybí) – viz Obr. P2.



Obr. P2. Chromatogramy získané nadávkováním poruch (+5 mM): A) LiOH, B) kyseliny benzoové. Složení dávkovaných poruch je uvedeno v obrázku. Mobilní fáze: 10 mM kyselina benzoová + 6 mM LiOH. Nepřímá UV detekce: 290 nm; teplota kolony a v karuselu: 25 °C; průtoková rychlost mobilní fáze: 0,2 ml/min; dávkovaný objem: 10 μ l; $t_M = 2,62$ min, což odpovídá pozici stacionárního píku.

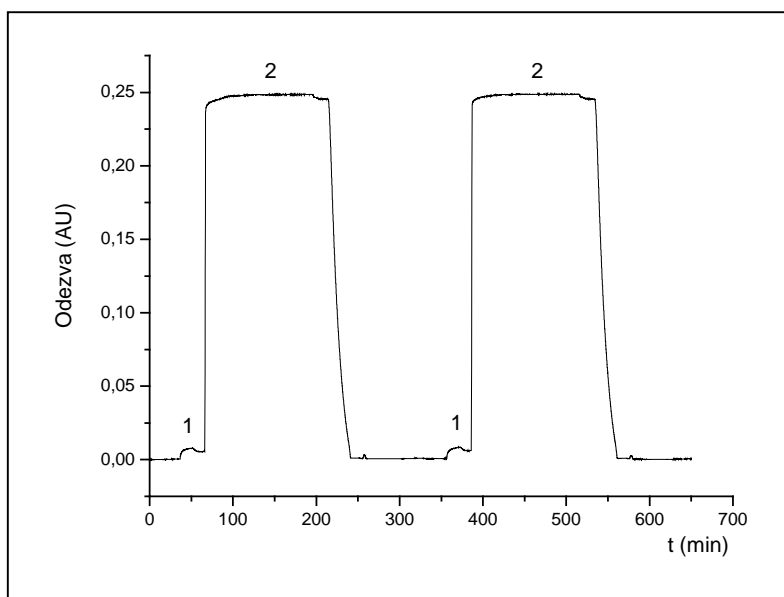
Nadávkováním kladné/záporné poruchy (koncentrace v dávkované zóně je vyšší/nížší než v mobilní fázi) kyseliny benzoové dostaneme jeden kladný/záporný systémový pík (pohyblivý). Z toho je zřejmé, že porucha kyseliny benzoové nezpůsobí poruchu LiOH, což poukazuje na skutečnost, že se LiOH nesorbuje na stacionární fázi (další důkazy jsou uvedeny v publikaci II). Při nadávkování kladné/záporné poruchy LiOH bude ve výsledném chromatogramu první (stacionární) pík kladný/záporný a druhý (mobilní) záporný/kladný. Plochy pohyblivých systémových píků na obr. P2 A a B jsou shodné a liší se pouze orientací.

V případě A je porucha LiOH +5 mM oproti koncentraci v mobilní fázi, v případě B je porucha kyseliny benzoové +5 mM oproti její koncentraci v mobilní fázi. Toto platí obecně pro všechny případy, kdy porucha kyseliny i báze jsou číselně (koncentračně) stejné. Plocha prvního píku (Obr. P2 A) odpovídá 5 % plochy druhého systémového píku.

Spektrofotometrickým měřením absorbance kyseliny benzoové - sledován různý stupeň disociace - bylo zjištěno, že při vlnové délce 290 nm disociovaná forma kyseliny benzoové absorbuje dvacetkrát méně než forma nedisociovaná. (Celková absorbance je dána z pěti procent absorbancí disociované formy kyseliny benzoové a z devadesáti pěti procent absorbancí nedisociované formy kyseliny benzoové.) Porovnání hodnot absorbancí disociované a nedisociované formy kyseliny benzoové při 290 nm s velikostí ploch prvního a druhého systémového píku zjištěných nepřímou UV detekcí také při 290 nm ukazuje, že v prvním systémovém píku je porucha složena jen z disociované formy kyseliny benzoové, tj. poruchy způsobené LiOH a Bz se rovnají.

Další důležité informace o studovaném systému nám poskytly také následující experimenty, které jsou založeny na změnách složení mobilní fáze při promývání kolony (viz Obr. P3). Vybrané mobilní fáze se lišily jednak analytickou koncentrací kyseliny benzoové, a jednak poměrem disociované a nedisociované formy této kyseliny.

Složení mobilní fáze deionizovaná voda resp. pufr bylo časově měněno stejným způsobem uvedeným u obrázku P3 pro šestnáct mobilních fází s různými koncentracemi kyseliny benzoové a LiOH.



Obr. P3. Experimentální podmínky: mobilní fáze: 0.-30. min - deionizovaná voda, 30.-190. min – 9 mM kyselina benzoová + 2 mM LiOH, 190.-350. min – deionizovaná voda, 350.-510. min – 9 mM kyselina benzoová + 2 mM LiOH, 510.-650. min – deionizovaná voda. UV detekce: 290 nm; teplota kolony a v karuselu: 25 °C; průtoková rychlost mobilní fáze: 0,2 ml/min; dávkování: 10 µl deionizované vody. Zóna 1 – benzoát lithný, zóna 2 – disociovaná + nedisociovaná kyselina benzoová (mobilní fáze).

Zóna 1 v obrázku P3 patří benzoátu lithnému, což jsme prokázali podle poměru absorbancí disociované a nedisociované formy kyseliny benzoové a faktu, že se LiOH neváže na stacionární fázi. Tato část chromatogramu odpovídá postupné sorpci nedisociované kyseliny benzoové na stacionární fázi – v chromatogramu vidíme pouze zónu benzoátu lithného, nedisociovaná forma kyseliny benzoové se zadržuje na koloně. Těmito experimenty bylo prokázáno, že disociovaná forma kyseliny benzoové neinteraguje se stacionární fází (při změně mobilní fáze z čisté deionizované vody na pufr eluuje pouze čistý benzoát lithný bez nedisociované kyseliny benzoové), a tudíž disociovaná kyselina není na koloně zadržována stejně jako lithium. Horní plato zóny 2 ukazuje ustavení rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází a eluuje již nepozměněná mobilní fáze. Pravdivost výsledků je ověřena množstvím experimentů s různým složením mobilní fáze.

Teorie

Výsledky získané z výše popsaných sérií měření s velmi dobrou opakovatelností byly porovnány s teoretickými výpočty.

Na základě zjištěných experimentálních dat byla z amplitud systémových píků odvozena matice systému:

$$\begin{pmatrix} \lambda & 1-\lambda \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (1)$$

kde λ je retenční poměr, který odpovídá poloze systémového píku (vypočtený z experimentálního retenčního času):

$$\lambda = \frac{t_M - t_x}{t_i - t_x} \quad (2)$$

kde t_M je mrtvý čas kolony, t_i retenční čas systémového píku, t_x je konstanta, která odpovídá času, za který projde analyt systémem bez kolony. Matice (1) je odvozena na základě amplitud systémových píků zjištěných experimentálně a výše uvedené skutečnosti, že první (stacionární) pík obsahuje veškeré lithium, naopak v pohyblivém systémovém píku žádné lithium není obsaženo.

Vztah mezi λ a retenčním faktorem k je:

$$k = \frac{1}{\lambda} - 1 \quad (3)$$

Matematické odvození λ vychází z rovnic kontinuity:

$$\frac{\partial c_{Bz}}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} (V \cdot c_{Bz,0,f} + V \cdot c_{Bz,-1,f} + 0 \cdot c_{Bz,S}) = -V \frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial x} \quad (4)$$

$$\frac{\partial c_{Li}}{\partial t} = -V \frac{\partial c_{Li}}{\partial x} \quad (5)$$

kde c_{Bz} je celková koncentrace všech forem kyseliny benzoové v obou fázích, c_{Li} je celková koncentrace lithia v obou fázích, $c_{Bz,-1,f}$ označuje koncentraci disociované formy kyseliny benzoové v mobilní fázi (nevázané na stacionární fázi), $c_{Bz,S}$ je koncentrace kyseliny benzoové vázané na stacionární fázi. Symbol $c_{Bz,f}$ značí celkovou koncentraci kyseliny benzoové v mobilní fázi, se kterou budeme dále v derivacích nakládat jako s funkcí proměnných c_{Bz} a c_{Li} . Počet rovnic kontinuity je obecně stejný jako počet složek v mobilní fázi bez ohledu na počet jejich forem (mocností). Tento model popisuje závislost koncentrace kyseliny benzoové v mobilní fázi na celkové koncentraci v daném místě. Pomocí aplikace úplného diferenciálu $dc_{Bz,f}$ na parciální derivaci $\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial x}$:

$$\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial x} = \frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Bz}} \frac{\partial c_{Bz}}{\partial x} + \frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Li}} \frac{\partial c_{Li}}{\partial x} \quad (6)$$

a upravením rovnic kontinuity (4) a (5) do maticové formy:

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} \mathbf{c}_{Bz} \\ \mathbf{c}_{Li} \end{pmatrix} = -V \begin{pmatrix} \frac{\partial \mathbf{c}_{Bz,f}}{\partial \mathbf{c}_{Bz}} & \frac{\partial \mathbf{c}_{Bz,f}}{\partial \mathbf{c}_{Li}} \\ \mathbf{0} & \mathbf{1} \end{pmatrix} \times \frac{\partial}{\partial x} \begin{pmatrix} \mathbf{c}_{Bz} \\ \mathbf{c}_{Li} \end{pmatrix} \quad (7)$$

kde symbol \times označuje maticové násobení, získáme matici systému:

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial \mathbf{c}_{Bz,f}}{\partial \mathbf{c}_{Bz}} & \frac{\partial \mathbf{c}_{Bz,f}}{\partial \mathbf{c}_{Li}} \\ \mathbf{0} & \mathbf{1} \end{pmatrix} \quad (8)$$

Porovnání odvozené matice (8) a experimentálně získané matice (1) nám dává teoretický vztah pro výpočet retenčního poměru λ :

$$\lambda = \frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Bz}} \quad (9)$$

V našem teoretickém modelu na základě výše uvedených skutečností uvažujeme, že v daném systému se ustavuje pouze jedna rovnováha mezi nedisociovanou kyselinou benzoovou

sorbovanou na stacionární fázi (Bz^0S) a volnou v mobilní fázi (Bz^0); benzoát lithný se na stacionární fázi nesorbuje:



takže pro β_0 platí:

$$\beta_0 = \frac{[Bz^0S]}{[Bz^0] \cdot [S]} = \frac{c_{Bz,0,S}}{c_{Bz,0,f} \cdot S} \quad (11)$$

kde $c_{Bz,0,S}$ je koncentrace nedisociované formy kyseliny benzoové vázané na stacionární fázi, S označuje „koncentraci“ volných vazebných míst na stacionární fázi. Volumetrické koncentrace ve vztahu k vazebným místům na stacionární fázi (tj. veličiny S a c_S) a obdobně koncentraci nasorbované nedisociované kyseliny benzoové ($c_{Bz,0,S}$) definujeme jako podíl molárního množství v průřezu kolony určité šířky (v limitě infinitesimální) a příslušného objemu mobilní fáze. Koncentrace nedisociované kyseliny benzoové sorbované na stacionární fázi je pak dána součinem:

$$c_{Bz,0,S} = \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f} \cdot S \quad (12)$$

V mobilní fázi je kyselina benzoová přítomná v nabitě ($c_{Bz,-1,f}$) a neutrální formě ($c_{Bz,0,f}$). Jejich součet dává celkovou koncentraci kyseliny benzoové v mobilní fázi $c_{Bz,f}$:

$$c_{Bz,0,f} = c_{Bz,-1,f} + c_{Bz,0,f} \quad (13)$$

Na stacionární fázi se sorbuje jen neutrální forma a její koncentraci budeme značit $c_{Bz,0,S}$. Celková koncentrace kyseliny benzoové c_{Bz} v daném místě je dána součtem koncentrací v mobilní a stacionární fázi:

$$c_{Bz} = c_{Bz,f} + c_{Bz,0,S} \quad (14)$$

Z této rovnice si můžeme vyjádřit koncentraci kyseliny benzoové v mobilní fázi a za $c_{Bz,0,S}$ dosadit z rovnice (12):

$$c_{Bz,f} = c_{Bz} - c_{Bz,0,S} = c_{Bz} - \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f} \cdot S \quad (15)$$

Pro celkovou koncentraci vazebných míst na stacionární fázi c_S platí:

$$c_S = S + c_{Bz,0,S} = S + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f} \cdot S \quad (16)$$

kde S označuje volná vazebná místa na stacionární fázi, která z této rovnice můžeme vyjádřit:

$$S = \frac{c_S}{1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f}} \quad (17)$$

Dosazením vztahu (17) do rovnice (15) získáme:

$$c_{Bz,f} = c_{Bz} - \frac{\beta_0 \cdot c_S \cdot c_{Bz,0,f}}{1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f}} \quad (18)$$

Jelikož $c_{Bz,f}$ a $c_{Bz,0,f}$ jsou funkce koncentrací c_{Bz} a c_{Li} , tak nám rovnice (18) poslouží k odvození parciálních derivací $c_{Bz,f}$ podle c_{Bz} a c_{Li} , které potřebujeme pro získání matice systému (8) a retenčního poměru systémového píku λ (9):

$$\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Bz}} = 1 - \frac{\beta_0 \cdot c_S}{(1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f})^2} \cdot \frac{\partial c_{Bz,0,f}}{\partial c_{Bz}} \quad (19)$$

$$\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Li}} = - \frac{\beta_0 \cdot c_S}{(1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f})^2} \cdot \frac{\partial c_{Bz,0,f}}{\partial c_{Li}} \quad (20)$$

K vyjádření finálních tvarů vzorců (19) a (20) potřebujeme znát závislost $c_{Bz,0,f}$ na c_{Bz} a c_{Li} . Ta se obecně získá řešením acidobazických rovnováh kyseliny benzoové a rovnice elektroneutality v mobilní fázi:

$$c_{Bz,0,f} = c_{Bz,f} \frac{c_H}{c_{H^+} + K_{Bz}} \quad (21)$$

kde K_{Bz} je rovnovážná konstanta disociace kyseliny benzoové a c_{H^+} je koncentrace H_3O^+ v mobilní fázi, kterou získáme řešením rovnice elektroneutality:

$$c_{H^+} + c_{Li} = c_{Bz,-1,f} + c_{OH^-} \quad (22)$$

Po úpravě rovnice (22) zjistíme, že neznámá c_{H^+} v ní vystupuje jako polynom 3. stupně (kubická rovnice), proto je výhodné uvážit akceptovatelné aproximace. První zjednodušení je zřejmé, pokud vezmeme v úvahu jak oblast pH, kde kyselina benzoová pufruje (přibližně pH 4-6) a dále bezpečnou oblast pH pro použitou kolonu (pH < 7) – můžeme zanedbat přítomnost OH^- iontů. Další zjednodušení, které je ale podstatnější, je zanedbání koncentrace c_{H^+} vůči koncentracím c_{Li} a $c_{Bz,-1,f}$, ze kterého plyne:

$$c_{Li} = c_{Bz,-1,f} \quad (23)$$

a tedy

$$c_{Bz,0,f} = c_{Bz,f} - c_{Li} \quad (24)$$

Dále při odvozování budeme pracovat pouze v této aproximaci – tj. v přibližné oblasti pH od 4 do 6. Pomocí dosazení vztahu (24) do rovnic (19) a (20) snadno získáme výsledné parciální derivace pro $c_{Bz,f}$:

$$\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Bz}} = \lambda = \frac{(1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f})^2}{(1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f})^2 + \beta_0 \cdot c_S} \quad (25)$$

$$\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Li}} = \frac{\beta_0 \cdot c_S}{(1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f})^2} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\beta_0 \cdot c_S}{(1 + \beta_0 \cdot c_{Bz,0,f})^2}} = 1 - \lambda \quad (26)$$

Závěry, které můžeme učinit z rovnic (25) a (26) v **použité aproximaci** (pH \approx 4 .. 6), jsou následující:

1) Rovnice (25) popisuje závislost retenčního poměru systémového píku a tedy i jeho pozici v chromatogramu na složení mobilní fáze (přesněji $c_{Bz,0,f}$). Tato rovnice tedy může být využita k získání parametrů β_0 a c_S pomocí fitování experimentálních dat.

2) Funkce λ je vůči koncentraci $c_{Bz,0,f}$ monotónní ($c_{Bz,0,f} \geq 0$). Minimální hodnoty λ_0 a tedy maximálního času retence dosahuje pro $c_{Bz,0,f} = 0$:

$$\lambda_0 = \frac{1}{1 + \beta_0 \cdot c_S} \quad (27)$$

a pro $c_{Bz,0,f} \rightarrow +\infty$ limituje λ k hodnotě 1, což odpovídá nulovému zadržování na koloně a eluci s mrtvým časem.

3) Hodnota retenčního poměru systémového píku λ je výlučně závislá na koncentraci neutrální formy kyseliny benzoové v mobilní fázi. Toto je důležitý výsledek, který osvětluje zdánlivě nelogické chování systémového píku na Obr. P1. Jak vidíme, s rostoucí koncentrací LiOH v mobilní fázi narůstá retenční čas pohyblivého systémového píku a mohlo by se tedy zdát, že narůstající obsah disociované kyseliny benzoové v mobilní fázi způsobuje posun retenčního času systémového píku k vyšším hodnotám. Pokud bychom systémový pík posuzovali stejně jako analyt, můžeme dospět k mylnému závěru, že se disociovaný benzoát sorbuje silněji na stacionární fázi než neutrální forma. Správná interpretace dat pomocí rovnice (25) však ukazuje, že je tomu naopak. K nárůstu retenčního času druhého systémového píku v Obr. P1 dochází z toho důvodu, že se přidavkem LiOH do mobilní fáze snižuje koncentrace neutrální formy kyseliny benzoové ($c_{Bz,0,f}$) a tím se snižuje hodnota λ . Jak bylo výše ukázáno, nabitá forma se na stacionární fázi vůbec nesorbuje.

4) Další velice důležitý výsledek je rovnost $\frac{\partial c_{Bz,f}}{\partial c_{Li}} = 1 - \lambda$ v rovnici (26). Ta zaručuje, že se

experimentálně získaná matice (1) a matice odvozená pomocí našeho modelu (8) vždy shodují. To znamená, že zvolený model správně popisuje hodnoty amplitud obou systémových píků v našem systému pro jakékoliv složení mobilní fáze i dávkované poruchy.

Platnost závěrů modelu a možnosti jeho rozšíření

Při odvozování modelu jsme se pro jednoduchost omezili na oblast pH, kde můžeme zanedbat jak koncentraci OH^- iontů, tak i H_3O^+ iontů. Bazická oblast pH není z praktických důvodů v kapalinové chromatografii v nejběžnějším uspořádání, tj. se stacionárními fázemi na bázi silikagelu aktuální a proto se omezíme na diskuzi pro mobilní fáze o $\text{pH} < 4$. Při těchto hodnotách pH lze bezpečně zanedbat koncentraci OH^- iontů, ale H_3O^+ ionty začnou nabývat na významnosti a z tohoto důvodu výše odvozené vztahy postupně pozbývají svoji platnosti. Pro další rozšíření modelu o H_3O^+ je potřeba ponechat c_{H^+} v rovnici elektroneutality (22), což povede ke komplexnějším rovnicím. Dále je nutné vzít v úvahu fakt, že v nově obměněné rovnici (24) pro $c_{\text{Bz},0,\text{f}}$ bude vystupovat rovnovážná disociační konstanta K_{Bz} , pro kterou je nutné uvažovat její závislost na iontové síle, jinak by rozšíření modelu pravděpodobně postrádalo smysl. Závislost na iontové síle by se také silně odrazila na složitosti odvozených vzorců (především kvůli nenulovým členům $\frac{\partial K_{\text{Bz}}}{\partial c_{\text{Bz}}}$ a $\frac{\partial K_{\text{Bz}}}{\partial c_{\text{Li}}}$) a aplikace výsledné funkce λ na fit experimentálních dat by byla poměrně složitá.

Uvedený rozbor ukazuje, že zvolené aproximace pro stávající model jsou pro základní prozkoumání studovaného systému prakticky nezbytné a velmi žádoucí.

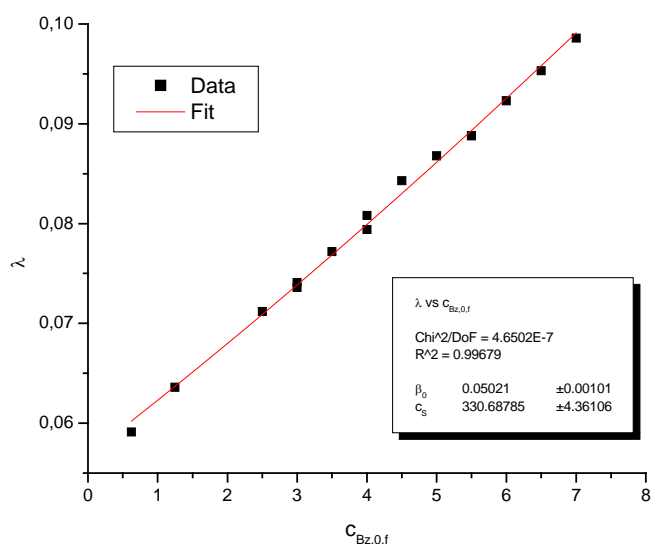
Fitování experimentálních dat k získání parametrů β_0 a c_s

Rovnice (25) je významná tím, že ji lze použít k fitování experimentálních dat, jako závislost retenčního poměru λ (vypočítané z retence systémového píku) na koncentraci neutrální formy kyseliny benzoové. Výsledkem fitu jsou parametry β_0 a c_s , které popisují interakci neutrální formy kyseliny benzoové se stacionární fází.

V Tabulce P1 jsou uvedeny výsledné retenční časy obou systémových píků (t_M pro rychlý systémový pík eluující s mrtvým časem a t_i pro pomalejší systémový pík) a složení mobilních fází.

Tabulka P1. Složení pufrů a experimentální data pro fit λ vs. $c_{Bz,0,f}$. Hodnota λ byla vypočtena pomocí vzorce (2) za použití stanovené hodnoty $t_x = 0,26$ min. Tučně označené jsou veličiny použité ve fitovací proceduře. Uvedené hodnoty pH jsou vypočtené v programu PeakMaster 5. Tabulka je seřazena podle hodnot λ .

$c_{Bz,f}$ (mM)	c_{Li} (mM)	$c_{Bz,0,f}$ (mM)	t_i (min)	t_M (min)	λ	pH
1,25	0,625	0,625	42,89	2,78	0,0591	4,27
2,50	1,25	1,25	39,24	2,74	0,0636	4,23
5,00	2,50	2,50	34,23	2,68	0,0712	4,20
8,00	5,00	3,00	32,75	2,65	0,0736	4,40
15,0	12,0	3,00	31,32	2,56	0,0741	4,76
9,00	5,50	3,50	31,07	2,64	0,0772	4,38
10,0	6,00	4,00	29,84	2,61	0,0794	4,35
20,0	16,0	4,00	28,34	2,53	0,0808	4,76
9,00	4,50	4,50	28,38	2,63	0,0843	4,19
10,0	5,00	5,00	27,55	2,63	0,0868	4,18
11,0	5,50	5,50	26,72	2,61	0,0888	4,18
10,0	4,00	6,00	25,84	2,62	0,0923	4,02
11,0	4,50	6,50	25,02	2,62	0,0953	4,03
15,0	8,00	7,00	23,80	2,58	0,0986	4,23



Obr. P4. Fit experimentálních dat závislosti λ na $c_{Bz,0,f}$ pomocí funkce (25) v programu Origin.

Fit experimentálních dat je uveden v Obr. P4. Získané hodnoty parametrů jsou pro $\beta_0 = 0,05 \text{ mM}^{-1}$ a pro $c_S = 330 \text{ mM}$.

K orientačnímu ověření získaných parametrů můžeme použít zcela jiný (nezávislý) druh fitu, který je založen na experimentech uvedených na Obr. P3, kde jsme kolonu střídavě promývali vodou a po ustálení mobilní fáze. O zóně označené 1 víme, že obsahuje prakticky jen benzoát lithný, a tedy že došlo v této zóně k poklesu koncentrace z původní $c_{Bz,f}$ na $c_{Bz,-1,f}$, tj. o $c_{Bz,0,f}$. Ze šířky této oblasti, kterou označíme Δt , můžeme vypočítat celkové množství adsorbované kyseliny benzoové na stacionární fázi a pomocí mrtvého času t_M přepočteme toto množství na koncentraci $c_{Bz,0,S}$ podle následujícího vztahu:

$$c_{Bz,0,S} = c_{Bz,0,f} \frac{\Delta t}{t_M - t_x} \quad (28)$$

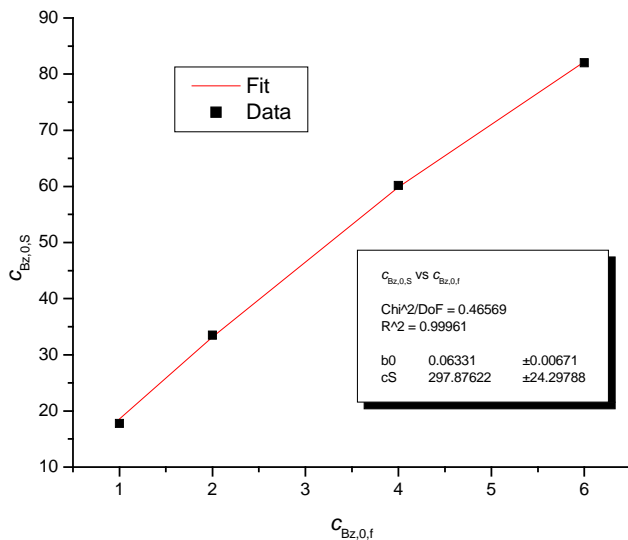
Závislost a tedy i fitovací funkci $c_{Bz,0,S}$ na $c_{Bz,0,f}$ získáme kombinací rovnic (12) a (17):

$$c_{Bz,0,S} = \frac{c_S \beta_0 c_{Bz,0,f}}{1 + \beta_0 c_{Bz,0,f}} \quad (29)$$

Vstupní data pro fit jsou uvedena v Tabulce P2 a výsledky fitování na Obr. P5. Hodnoty fitovaných parametrů jsou $\beta_0 = 0,06 \text{ mM}^{-1}$ a $c_S = 300 \text{ mM}$. Přestože má tato závislost mnohem menší počet fitovaných bodů než předešlý fit v Obr. P4, výsledek ukazuje, že hodnoty parametrů z obou fitů jsou velmi blízké, což nám ověřuje smysluplnost získaných parametrů.

Tabulka P2. Složení pufrů a experimentální data pro fit $c_{Bz,0,S}$ vs. $c_{Bz,0,f}$. Hodnoty $c_{Bz,0,S}$ byly vypočteny pomocí vztahu (28) za použití $t_x = 0,26 \text{ min}$ a $t_M = 2,63 \text{ min}$ (průměr hodnot t_M v Tabulce P1). Tučně označená jsou data použitá pro fit. Tabulka je seřazena podle rostoucích hodnot $c_{Bz,0,f}$.

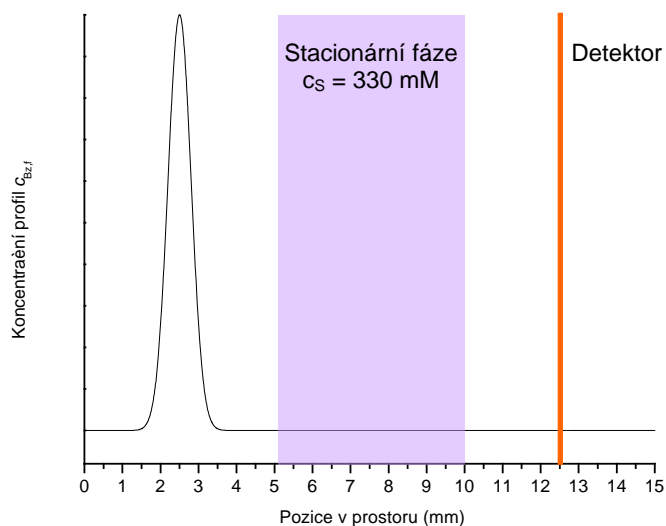
$c_{Bz,f}$ (mM)	c_{Li} (mM)	$c_{Bz,0,f}$ (mM)	Δt (min)	$c_{Bz,0,S}$ (mM)
10,0	9,0	1,0	32,5	18,6
10,0	8,0	2,0	35,5	33,2
10,0	6,0	4,0	39,3	59,9
10,0	4,0	6,0	44,0	82,2



Obr. P5. Fit experimentálních dat závislosti $c_{Bz,0,S}$ na $c_{Bz,0,f}$ pomocí funkce (29) v programu Origin.

Simulace: Modifikace elektroforetického programu Simul 5 pro popisovaný chromatografický systém

Zformulovaný matematický model interakce neutrální formy kyseliny benzoové se stacionární fází jsme přenesli do programu Simul 5, původně navrženého pro elektroforetické separační systémy, což nám umožnilo simulovat časový vývoj popisovaného systému za různých počátečních podmínek. Jako ukázkou uvádíme výsledky dvou simulací se stejnou mobilní fází (složení: 10 mM kyselina benzoová + 6 mM LiOH) a dvou poruch – první bude mít přebytek kyseliny benzoové (10,25 mM kyselina benzoová + 6 mM LiOH) a druhý s přebytkem LiOH (10 mM kyselina benzoová + 6,25 mM LiOH). Schéma počátečního uspořádání je znázorněno na Obr. P6.



Obr. P6. Schématické znázornění počátečního uspořádání simulace v programu Simul 5 s poruchou kyseliny benzoové ve vzorku. Střed nástřiku je v simulovaném prostoru umístěn do pozice 2,5 mm, 5 mm dlouhá kolona s „koncentrací“ stacionární fáze $c_s = 330$ mM je umístěna v prostoru mezi 5 mm až 10 mm a detektor je ve vzdálenosti 12,5 mm.

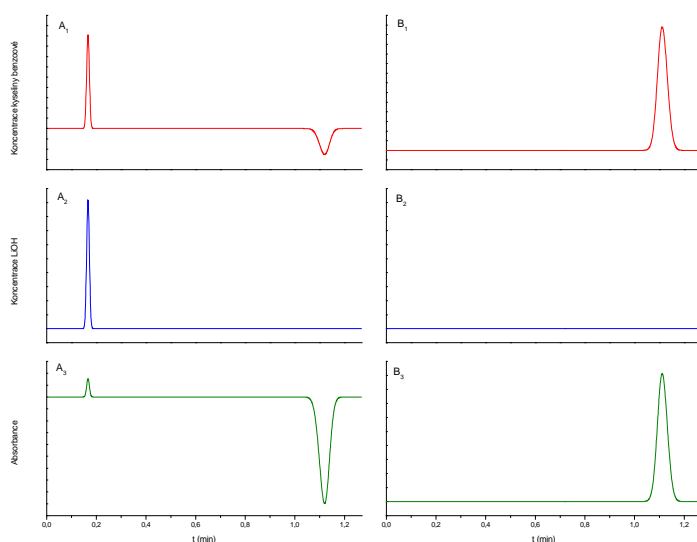
Kolona (stacionární fáze) je široká 5 mm a vzdálenost od nástřiku k detektoru je 10 mm. Detektor slouží k získání časového záznamu simulace a to jednak formou koncentračních profilů kyseliny benzoové a LiOH, a také formou záznamu absorbance (viz Obr. P7) - potřebné údaje o závislosti absorbance nabitě a nenabitě formy byly získány z kalibrace při vlnové délce 290 nm:

$$A = 0,0360c_{Bz,0,f} + 0,0017c_{Bz,-1,f} \quad (30)$$

Je nutné zdůraznit, že v simulaci nám nešlo o zachycení reálných rozměrů, tudíž se budou simulované časy lišit od reálných. Různé průtokové rychlosti v koloně a připojených kapilárách také nejsou implementovány. Dílčím cílem bylo získat správné hodnoty retenčního poměru λ systémového píku a poměry amplitud obou píků. K tomuto účelu uvedená zjednodušení nejsou na závadu – naopak, pomocí nich bude simulace mnohonásobně rychlejší se stejnou výpovědní hodnotou.

Na Obr. P7 jsou uvedeny simulované chromatogramy za výše zmíněných experimentálních uspořádání, které byly voleny složením mobilní fáze a dávkováním tak, aby byly

porovnatelné s experimentem na Obr. P2. Lze říci, že záznamy absorbancí jsou z pohledu velikosti amplitud velmi podobné. Pomocí vzorce (2) a schématu na Obr P6. můžeme spočítat retenční poměr λ pro pomalejší systémový pík (rychlý se nezadržuje na koloně a tudíž je jeho retenční poměr roven jedné). Nasimulované časy jsou následující: $t_1 = 1,12$ min, $t_M = 0,166$ min, $t_X = \frac{1}{2} \cdot t_M \rightarrow \lambda = 0,08$; což je správná hodnota pro tento systém s $c_{Bz,0,f} = 4$ mM (viz Tabulka P1 - 7. a 8. mobilní fáze).



Obr. P7. Simulované chromatogramy s mobilní fází 10 mM kyselina benzoová + 6 mM LiOH. Nadávkové poruchy: A₁-A₃) LiOH, B₁-B₃) kyselina benzoová. Indexy: 1 - záznam profilu kyseliny benzoové detektorem, 2 – záznam profilu LiOH detektorem, 3 - profil absorbance počítaný dle (30). Uspořádání simulace je stejné jako je uvedeno na Obr. P6. Simulační parametry: počet bodů 4000, čas 76 s, časový krok 0,002 s, reálná doba simulace okolo 30 min, průtoková rychlost 1 mm/s.

Podářilo se ukázat, že vytvořený simulační program poskytuje i za podmínek zvolených aproximací reálné výsledky, které mohou pomoci k objasnění systémových píků v separačních systémech HPLC.