

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Zuzana Šromová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko technologická

Separace polárních látek na kapilárních monolitických kolonách v RP a HILIC
systémech

Bc. Zuzana Šromová

Diplomová práce

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Šromová**
Osobní číslo: **C15589**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Separace polárních látek na kapilárních monolitických kolonách v RP a HILIC systémech**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vyhledejte v literatuře práce zabývající se separacemi polárních látek na kapilárních monolitických kolonách. Zaměřte se na systémy s převrácenými fázemi a na systémy HILIC chromatografie.
2. V návaznosti na disertační práci Ing. Magdy Staňkové připravte monolitické kolony polymetakrylátového typu polymerací v křemenných kapilárách. Na těchto kolonách změřte retenční data vybraných skupin nízkomolekulárních polárních látek a navrhňte pracovní podmínky pro jejich separaci.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem v oboru separací na kapilárních monolitických kolonách.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Pavel Jandera, DrSc.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Zuzana Šromová

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala především panu prof. Ing. Pavlovi Janderovi, DrSc za odborné vedení diplomové práce, řadu cenných rad a připomínek. Velké díky patří také Ing. Tomášovi Hájkovi, Ph.D. za pomoc a rady v průběhu experimentální práce. Díky patří také mé rodině a přátelům.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá separacemi polárních látek na kapilární monolitické koloně polymethakrylátového typu, konkrétně s zwitteriontovým funkčním monomerem MEDSA, a navazuje tak na disertační práce Ing. Magdy Staňkové.

Práce byla zaměřena na separaci polárních látek v systému s převracenými fázemi a v systému HILIC chromatografie, kde byla změřena retenční data vybraných skupin těchto látek a byly navrženy podmínky pro jejich separaci. Retence a separace jednotlivých látek byla posléze porovnána s již dříve připravenou monolitickou kolonou BIGDMA, která se osvědčila jako účinná pro separace látek v těchto systémech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Monolitické kolony, polární látky, HILIC, RP, separace, mobilní fáze, zwitteriontová stacionární fáze, N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain, dioxyethylen dimethakrylát, bisfenol A glycerolát dimethakrylát

TITLE

Separation of polar compounds on capillary monolithic columns in RP and HILIC systems

ANNOTATION

The aim of this thesis are separation of polar substances on the polymethacrylate type capillary monolithic column, specifically with zwitterionic functional monomer MEDSA, and follows the dissertation work of Ing. Magda Staňková. This work was aimed on separation of polar substances in a reverse phase system and in the HILIC system, where the retention data of selected groups of these substances have been measured and the conditions for their separation have been proposed. The retention and separation of individual substances has been compared with the one already done monolithic column BIGDMA, which has been proved to be effective for separation substances in these systems.

KEYWORDS

Monolithic columns, polar compounds, HILIC, RP, mobile phase, separation, zwitterionic stationary phase, N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)ammonium betaine, dioxyethylene dimethacrylate, bisphenol A glycerolate dimethacrylate

Obsah

0	Úvod.....	11
1	Teoretická část	12
1.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	12
1.1.1	Mikrokolonová chromatografie	12
1.2	Monolitické kolony	13
1.2.1	Vlastnosti monolitických kolon	14
1.3	Monolitické stacionární fáze	15
1.3.1	Anorganické monolitické stacionární fáze	15
1.3.2	Organické monolitické stacionární fáze	16
1.3.2.1	Typy organických polymerů.....	17
1.3.3	Stacionární fáze s funkčními monomery (zwitteriontové stacionární fáze)	17
1.4	Příprava monolitických kolon	18
1.4.1	Ovlivnění vlastností monolitických kolon	21
1.5	Aplikace monolitické HPLC	21
1.5.1	Chromatografie hydrofilních interakcí	21
1.5.2	Chromatografie s reverzními fázemi	23
1.6	Separace polárních látek na kapilárních monolitických kolonách.....	24
1.7	Charakterizace monolitických kolon.....	28
2	Experimentální část.....	32
2.1	Použité chemikálie	32
2.1.1	Silanizace kapiláry	32
2.1.2	Síťující a funkční monomer	32
2.1.3	Porogenní rozpouštědla a iniciátor	33
2.1.4	Standardy	33
2.1.4.1	Alkylbenzeny.....	33

2.1.4.2	Nukleové báze a nukleosidy	33
2.1.4.3	Deriváty triazinů	34
2.1.4.4	Deriváty kyseliny ftalové	35
2.1.4.5	Barbituráty	35
2.1.4.6	Sulfonamidy	36
2.1.5	Další chemikálie	37
2.2	Přístrojové vybavení.....	37
2.3	Pracovní postup	38
2.3.1	Příprava polymethakrylátové monolitické kolony DiEDMA.....	38
2.3.2	Příprava standardů	39
2.3.3	Příprava mobilní fáze.....	39
2.3.4	Podmínky měření	39
3	Výsledky a diskuze	41
3.1	Účinnost polymethakrylátové kolony DiEDMA	41
3.2	Separace nukleových bází a nukleosidů.....	42
3.3	Separace derivátů triazinů	44
3.4	Separace derivátů kyseliny ftalové.....	45
3.5	Separace barbiturátů.....	47
3.6	Separace sulfonamidů	49
4	Závěr	51
5	Seznam literatury	53
6	Přílohová část.....	61
6.1	Seznam tabulek	62
6.2	Seznam obrázků	64

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Struktura stacionární fáze v náplňové a monolitické koloně

Obrázek 2 - Struktury methakrylátových monomerů

Obrázek 3 - Schéma přípravy monolitické kolony

Obrázek 4 - Porézní struktura monolitu

Obrázek 5 - Struktura funkčního monomeru MEDSA

Obrázek 6 - Morfologie monolitických kolon DiEDMA a BIGDMA

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
BIGDMA	bisfenol A glycerolát dimethakrylát
DiEDMA	dioxyethylen dimethakrylát
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MEDSA	funkční monomer N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain
NH ₄ AC	octan amonný
RP	chromatografie v systému reverzních fází
UV	ultrafialová spektrometrie

0 Úvod

Monolitické kapilární kolony jsou dnes v mikrokolonové chromatografii používány jako vhodná alternativa kolon plněných. V této oblasti se monolitické kolony využívají pro separace široké škály látek v různých separačních módech ve spojení s různými spektrálními metodami. Tyto kolony jsou připravovány tepelnou nebo radikálovou polymerizací v křemenných kapilárách za využití nemalého množství kombinací různých monomerů.

V návaznosti na disertační práce Ing. Magdy Staňkové [1] byla připravena monolitická kolona polymethakrylátového typu, DiEDMA. Tato kolona obsahovala zwitteriontový funkční monomer N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) amonium betain a ethylendioxydimethakrylát síťující monomer. Tento typ zwitteriontové stacionární fáze je schopen poskytovat retenci polárním látkám, jak v režimu HILIC chromatografie tak i v režimu reverzních fází. V těchto separačních módech byla testována retence vybraných skupin polárních látek, kterými byly nukleové báze a nukleosidy, deriváty triazinů, deriváty kyseliny ftalové, barbituráty a sulfonamidy.

Retence látek na této koloně byly porovnány s již dříve připravenou polymethakrylátovou monolitickou kolonou BIGDMA, na které byly separovány stejné skupiny látek. Monolitická kolona BIGMA obsahovala síťující monomer bisfenol A glycerolát dimethakrylát a stejný funkční monomer jak monolitická kolona DiEDMA.

1 Teoretická část

1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) je separační metoda, která se datuje do roku 1973 [2], avšak posledních 30 letech se HPLC stala jednou z nejpoužívanějších separačních technik v nejrůznějších oblastech včetně výzkumu, výroby, diagnostiky a kontroly kvality [3,4], a to hlavně díky spojení s různými spektrálními metodami, jako jsou UV/VIS spektrometrie, nukleární magnetická spektrometrie, infračervená spektrometrie nebo hmotnostní spektrometrie, umožňující přímou identifikaci látek [5].

Pro rychlé a účinné separace s dostatečným rozlišením se používají mnohem menší částice stacionární fáze, vyšší průtoky mobilní fáze a pracovní tlak nabývající hodnot až 100 MPa [5,6].

Požadavek ještě rychlejších separací vedl k vývoji takzvané UHPLC (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*). Tato chromatografická technika používá stacionární fázi s plně porézními částicemi o velikosti 2 μm a méně. Separace jsou prováděny při velmi vysokém tlaku, který často přesahuje 100 MPa [7,8].

Zvýšení rychlosti analýzy při nižších tlacích lze dosáhnout náhradou plně porézních částic částicemi neporézními, případně povrchově porézními [8], nebo použít jiný typ náplně kolony, a to monolitickou stacionární fázi.

1.1.1 Mikrokolonová chromatografie

Vývoj HPLC vedl postupně i k její miniaturizaci, tzv. mikrokolonové chromatografii. Její význam a přednosti spočívají v řadě oblastech, ve kterých je schopna zlepšit výsledky v analytické separaci, tak i ve stopové analýze [9].

Používané průměry kolon mají, na rozdíl od klasické chromatografie, mnohem menší rozměry. V mikrokapalinové chromatografii se používají kolony okolo průměru 1 mm (0,5-1,5 mm), v kapilární kapalinové chromatografii kolony okolo průměru 300 μm (150-500 μm) a v nanokapalinové chromatografii jsou to kolony okolo 75 μm (10-150 μm) [10,11].

Mikrokolonovou chromatografií lze dosáhnout vyšší citlivosti a většího počtu teoretických pater. Stejně, jako v případě konvenční HPLC, se používá vyšších tlaků, které vedou ke značnému snížení doby analýzy. Výhodou je malá spotřeba chemikálií, zejména při nutnosti použít drahá aditiva. Vzhledem k malým průtokům mobilní fáze, je také minimální výstup odpadu, ve srovnání s klasickou kolonovou chromatografií, což má kladný vliv na životní prostředí, a v neposlední řadě provádění okamžité identifikace například ve spojení s hmotnostní spektrometrií [10,11].

Široce používané nejen v mikrokolonové, ale i kapilární chromatografii jsou monolitické kolony. Tyto kolony poprvé zavedl Hjertén se svými spolupracovníky v roce 1989, kteří vytvořili souvislé polymerní lůžko na bázi akrylamidu pro rychlé separace biopolymerů [12]. Monolity jsou vyráběny v různých formách, jako porézní tyče, vytvořené v tenkých kapilárách nebo vyrobené jako tenké membrány a disky [13].

1.2 Monolitické kolony

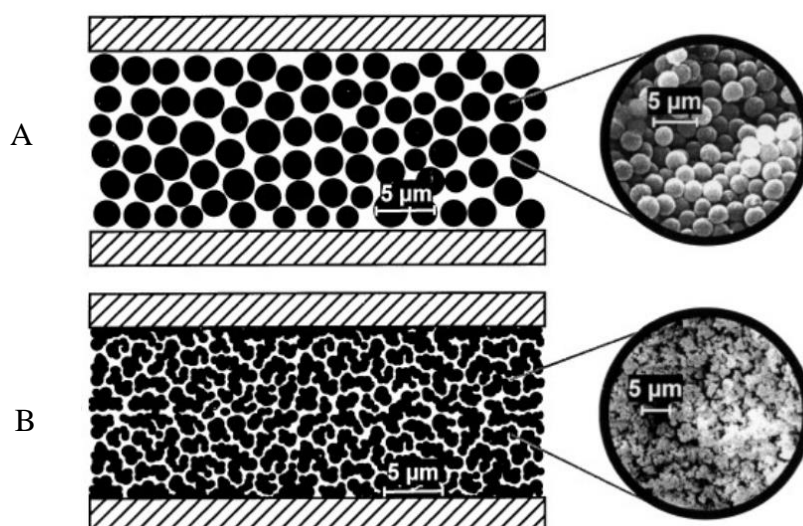
Monolitické kolony můžeme charakterizovat jako separační medium, které se podobá jedné velké částici, zaplňující celý objem kolony [14]. První pokus o takovéto vytvoření byl již v roce 1960 a později v roce 1970. V roce 1967 Kubín a spol. připravili monolitický polymerní gel volnou radikálovou polymerací vodného roztoku 2-hydroxyethylmethakrylátu s 0,2% etylendimethakrylátu, vložili jej do skleněné trubice a použili pro vylučovací chromatografii. Účinnost této kolony však byla velmi nízká [15], neboť tento materiál byl stlačitelný, protože jeho zesítení bylo velmi malé [16].

Od roku 1990 se monolitické kolony, zejména polymethakrylátové monolitické stacionární fáze, stávají atraktivní alternativou plněných kapilárních kolon pro HPLC. Monolitické stacionární fáze jsou široce používány pro separace v nejrůznějších systémech kapilární a mikrokolonové chromatografie. A to nejen v systému reverzních fází a HILIC chromatografie, které byly předmětem této diplomové práce, ale také v chromatografii hydrofobních interakcí nebo chromatografii iontové výměny. Monolitické kolony se také používají při separacích látek v kapilární elektrochromatografii [17,18]. Jako příklad lze uvést separaci nukleosidů na methakrylátových monolitických kolonách [19] nebo separace s využitím zwitteriontové stacionární fáze [20].

1.2.1 Vlastnosti monolitických kolon

Monolitické kolony jsou na rozdíl od klasické plněné HPLC kolony vyrobeny z jednoho kusu materiálu. [21]. Pravděpodobně největší výhodou monolitických stacionárních fází je snadnost a rozmanitost jejich přípravy [16] a možnost měnit vnitřní strukturu (objem a distribuci póru), a tím ovlivňovat výsledné separační podmínky [22].

Oproti kolonám plněnými klasickými částicemi, monolity částice nemají, tudíž ani nemají mezi částicemi žádný prostor [15], a jsou téměř dvakrát propustnější. Díky tomu je možné použít průtoky mobilní fáze až 10 ml/min [4], s ohledem na typ monolitické kolony. Rozdíl ve struktuře klasické plněné a monolitické kolony lze vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1 - Struktura stacionární fáze (A) v náplňové a (B) v monolitické koloně [23].

Monolitické kolony obsahují různé typy pórů. Póry velké, makropóry, jejichž velikost je větší než 50 nm, nejčastěji však 1 µm. Ty umožňují mobilní fázi, aby protékala. Díky makropórům může být zkrácena doba analýzy, protože lze použít vyšší průtok mobilní fáze, aniž by došlo ke ztrátě účinnosti a překročení tlakového limitu. Dále to jsou póry malé, mezopóry 2-50 nm, které zajišťují svým specifickým povrchem interakci s analytem. Mobilní fáze pak přímo fází stacionární protéká a analyty se tak dostávají k aktivnímu centru rychleji [22] a díky tomu jsou separace poměrně rychlé.

Monolitické kolony jsou velmi mechanicky stabilní (i za extrémních hodnot pH), jsou odolné vůči vysokým průtokům a vysokým tlakům [14,17,24-26]. Klíčovou výhodou

v použití monolitických kolon je absence frit. Není zde nutné zachycovat monolitickou stacionární fázi na konci kolon fritami, na rozdíl od plněných kolon, u kterých by docházelo k vytřepání stacionární fáze [27].

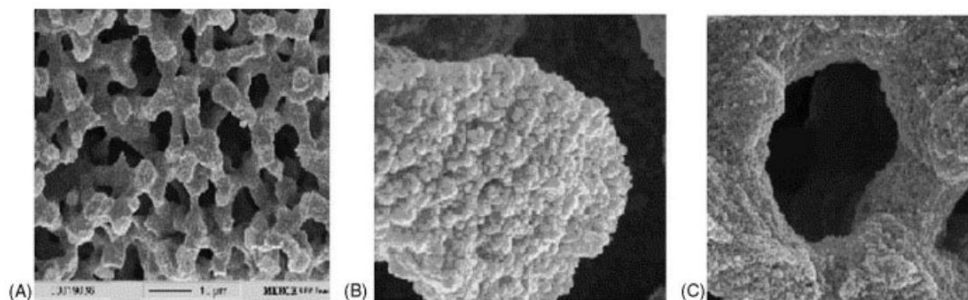
1.3 Monolitické stacionární fáze

Monolitické HPLC kolony můžeme dle jejich chemické podstaty klasifikovat na dva typy a to anorganické, na bázi silikagelu a organické, které mohou být připraveny různými způsoby [17].

Chromatografické vlastnosti obou monolitických stacionárních fází jsou odlišné. Rychlé separace nízkomolekulárních vzorků umožňují monolity na bázi silikagelu. Účinnost těchto kolon dosahuje až 100 000 teoretických pater/m. Pro separaci makromolekulárních sloučenin však vykazují výkon horší. Naopak organické polymerní monolitické fáze jsou vhodné k rychlé separaci nukleových kyselin, proteinů a syntetických polymerů. Ovšem pro separaci malých molekul je jejich účinnost nízká, a to zejména v isokratickém režimu [28].

1.3.1 Anorganické monolitické stacionární fáze

Anorganické monolitické kolony se připravují z anorganických polymerů, jako je silikagel. Tato stacionární fáze distribuuje dvěma typy pórů a to makropóry a mezopóry, která je díky nim dostatečně propustná [4]. Typickou porézní strukturu monolitu lze vidět na Obrázku 2.



Obrázek 2 - Porézní struktura monolitu - (A) porézní struktura na bázi oxidu křemčitého; (B) struktura mezopórů; (C) struktura průtočných pórů [4]

První takováto monolitická kolona byla připravena a popsána na začátku roku 1990 Nakanishim a jeho spolupracovníky [26].

Monolitické kolony na bázi silikagelu jsou vysoce účinné a poskytují dostatečné plochy k rychlé separaci. Tyto stacionární fáze byly použity pro separace peptidů, biomolekul, ale také analytů s nízkou molekulovou hmotností [13], protože velikost mezoporů umožňuje snadné proniknutí k adsorpčním místům [29]. Lze je využívat pro separaci látek nejen v režimu reverzních fází [13], ale také v HILIC chromatografii [30].

Neobvyklá není také jejich povrchová modifikace různými nepolárními, slabě nebo silně polárními funkčními skupinami pro různorodé aplikace kapalinové chromatografie [29]. Příkladem může být příprava monolitické kolony RP-18 s využitím reaktivní silanové skupiny. Tato kolona byla s modifikovaným oktadecylalkylovým řetězcem použita pro separaci biomolekul chromatografií s reverzními fázemi [21]. Ke komerčně dodávaným monolitickým kolonám na bázi silikagelu s chemicky vázanými alkyly patří Chromolith C₁₈ nebo Chromolith C₈, které jsou pro separace nízkomolekulárních látek také využívány [4].

1.3.2 Organické monolitické stacionární fáze

Organické polymerní monolitické kolony mají také porézní strukturu. Na rozdíl od anorganických stacionárních fází, mohou, ale nemusí obsahovat mezopóry [22]. Organické polymerní monolity připomínají síť vzájemně propojených mikrokuliček s výrazně nižším povrchem [31]. Tyto monolity jsou velice populární pro rychlé separace proteinů, nukleových kyselin a syntetických polymerů [32-34], jak již bylo uvedeno výše. Obecně platí, že organické polymerní monolitické fáze jsou účinnější v separaci biopolymerů než monolitické kolony na bázi silikagelu, právě kvůli velmi nízkému podílu mezopóru s porovnáním s póry průtokovými [35]. Kromě separace makromolekul, je možné tyto stacionární fáze využít i pro rychlou separaci malých molekul [17].

Organické monolitické stacionární fáze jsou vysoce stabilní, zejména při extrémně vysokém pH, což bývá v případě některých separací značnou výhodou. K dispozici je také široký výběr monomerů s různými funkčními skupinami, pomocí kterých je možné připravit různorodé stacionární fáze [36].

1.3.2.1 Typy organických polymerů

Organické monolitické kolony se připravují z organických polymerů [4] v křemenných skleněných kapilárách o průměru 0,1-0,4 mm [35]. Existují čtyři skupiny těchto polymerů v závislosti na použitém systému monomeru.

První skupinu tvoří styren-*ko*-divinylbenzen. Jedná se o silně hydrofobní materiály připravené polymerací styrenu a jeho derivátu s divinylbenzenem jako zesít'ovadlem. Druhou skupinu tvoří nepolární monolity, připravené polymerizací, umožňující roubování na povrchu různými ligandy. Třetí skupinou jsou středně polární monolity na bázi esterů kyseliny metakrylové [17], které jsou nejčastěji využívány pro přípravu monolitických kolon [4]. K poslední, čtvrté, skupině patří vysoce polární monolity na bázi akrylamidu [17].

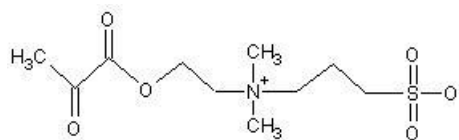
Monolitické methakrylátové stacionární fáze jsou pro separace oproti akrylamidovým vhodnější, hovoříme-li o HILIC separačním módu. Pro přípravu methakrylátových monolitických kolon, existuje široké spektrum komerčně dostupných hydrofilních monomerů s různými funkčními skupinami [36].

1.3.3 Stacionární fáze s funkčními monomery (zwitteriontové stacionární fáze)

Zwitteriontové stacionární fáze jsou zajímavým typem tzv. multifunkční stacionární fáze [37]. Jedná se o chemicky vázané funkční skupiny nesoucí jak pozitivní tak i negativní náboj, přičemž jejich celkový náboj je neutrální. Tyto stacionární fáze se vyznačují vysokou polaritou a afinitou k vodě [38]. Výhodou je skutečnost, že se jejich náboj nemění při různých hodnotách pH [39].

Samotná zwitteriontová látka má čtyři parametry, které ovlivňují její selektivitu. K těm patří délka řetězce, mající vliv na stabilitu, ale také na kapacitu kolony. Dále to jsou vzdálenost mezi nabitými skupinami, jejich pořadí a síla působící na tyto dvě nabitě skupiny [40].

Nejčastěji používaným funkčním monomerem pro syntézu těchto monolitických stacionárních fází je N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain (MEDSA) (Obrázek 3), nejspíše z důvodu své komerční dostupnosti. Tento funkční monomer nese kvarterní amonou a sulfonovou skupinu [41,42]. Tento funkční monomere byl použit pro přípravu polymethakrylátové monolitické kolony DiEDMA a také BIGDMA.



Obrázek 3 - Struktura funkčního monomeru N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain (MEDSA)

Viklund a Irgum vyvinuli dva nové způsoby syntézy pro začlenění zwitteriontových sulfobetainových skupin do porézních polymerních monolitů pomocí metakrylátových monomerů [43]. Tato polymerní monolitická kolona, obsahovala sulfoalkylbetainovou zwitteriontovou skupinu a byla připravena ko-polymerací ethylendimethakrylátu (EDMA) a MEDSA uvnitř křemenné kapiláry. Následně byla použita pro separaci neutrálních, kyselých a polárních sloučenin ve vodně-organické mobilní fázi [30]. Kapilární polymethakrylátové zwitteriontové sulfobetainové kolony jsou schopné separovat polární sloučeniny nejen v HILIC chromatografii, ale také v chromatografii s reverzními fázemi [32].

K dispozici jsou také různé komerčně dostupné sulfobetainové zwitteriontové kolony, kterými jsou ZIC-HILIC, dále ZIC-pHILIC, obsahující sulfoalkylbetainovou skupinu, nebo ZIC-cHILIC, které obsahují cholinovou skupinu [42]. Všechny tyto kolony jsou používány pro separace malých polárních sloučenin [30].

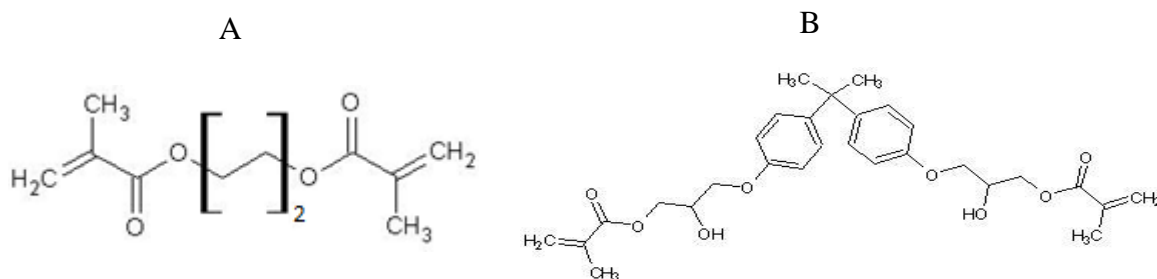
1.4 Příprava monolitických kolon

Kapiláry vyplněné organickou monolitickou stacionární fází nejsou komerčně dostupné a musí se připravovat přímo v laboratoři [22] v kapiláře či trubce kolony tzv. *in situ*. Kapiláry se naplní polymerizační směsí, uzavřou a zpolymerizují za tepla. Vytvořený monolit pak zůstává během veškeré manipulace a použití v koloně. Ovšem pouhá výměna monolitu v té samé kapiláře je prakticky nemožná [14].

Polymerizační směs se pro přípravu organických monolitů skládá z monomeru, síťovacího činidla (molekula podobná monomeru, obsahující dvojně vazby), iniciátoru a porogenní směsi.

Nejpoužívanějšími monomery jsou deriváty methakrylátu, akrylamidu nebo styrenu. K nejběžněji používaným síťovacím činidlům patří ethylendimethakrylát a divinylbenzen [23,27]. Pro přípravu polymethakrylátové monolitické kolony DiEDMA byl jako síťující monomer použit dioxyethylendimethakrylát (DiEDMA). Avšak k přípravě monolitické

kolony BIGDMA byl jako síťující monomer použit bisfenol A glycerolát dimethakrylát (BIGDMA). Struktury těchto síťujících činidel jsou zobrazeny na Obrázku 4.



Obrázek 4 - Struktury síťujících monomerů - A- DiEDMA; B - BIGDMA [28, 44]

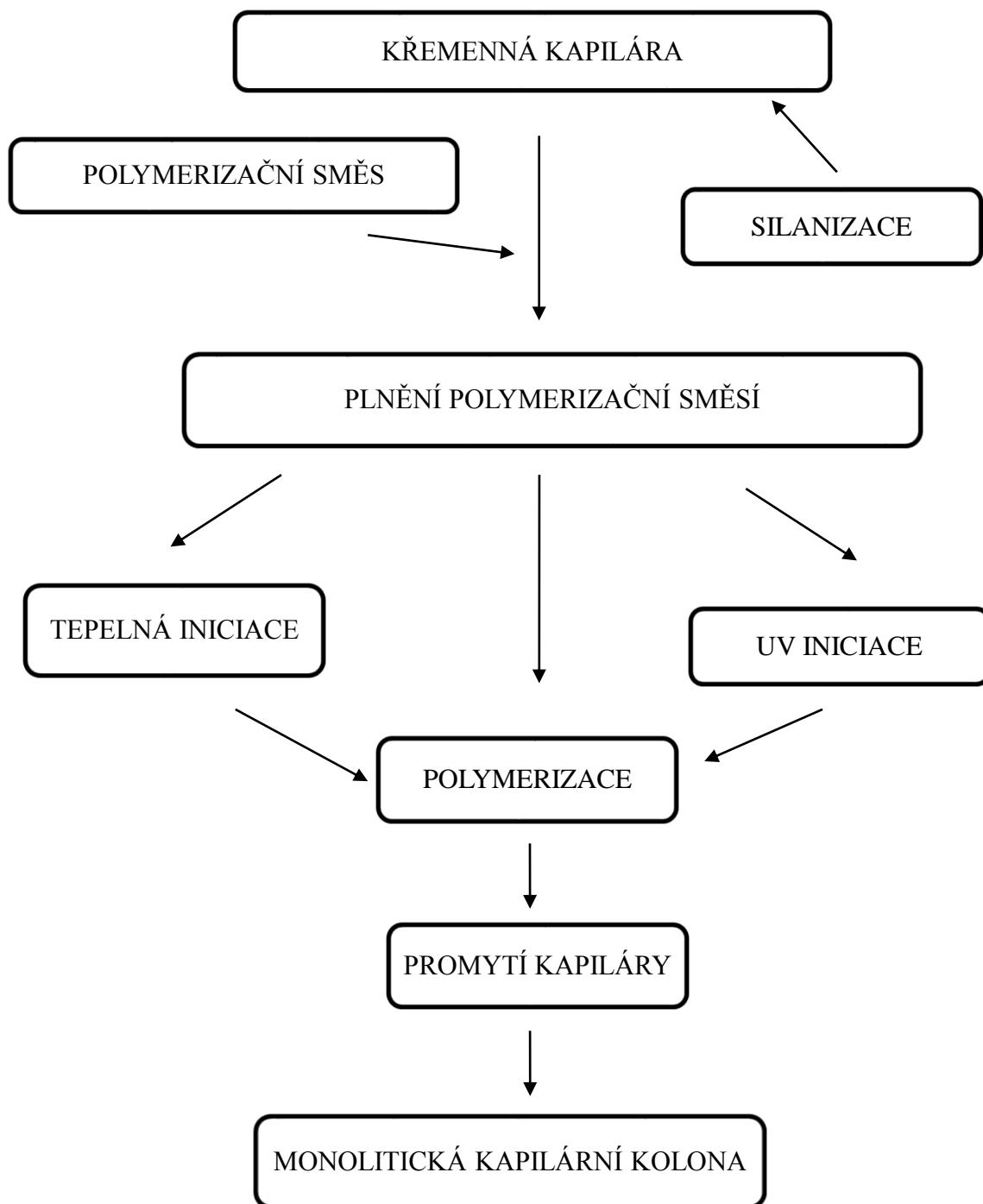
Pro zavedení funkčních skupin do stacionárních fází se používá funkčních monomerů [22, 45], například N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain, 2-(methakryloyloxy)ethyltrimethylamonium methylsulfát, 1-(3-sulfopropyl)-4-vinylpyridinium betain nebo 2-methakryloyloxyethyl fosfocholin [46].

Stejně tak jako monomer a síťovací činidlo je pro přípravu methakrylátových monolitických kolon důležitá i porogenní směs, která je tvořena obvykle třemi rozpouštědly v různých poměrech. Složkami porogenní směsi jsou voda, 1-propanol a 1,4-butandiol [27]. Složky porogenní směsi nejsou zabudovány do konečné struktury monolitu, jejich objem ale udává konečnou pórovitost monolitu, neboť vznikající monolit pouze solvují [22].

Pro účely kapalinové chromatografie je důležité pevné uchycení monolitické stacionární fáze k vnitřní stěně kapiláry, aby vlivem tlaku kapaliny, nedošlo k jejímu vytlačení. Toto pevné spojení se provádí takzvanou silanizací. Na stěnu kapiláry se naváže sloučenina s dvojnou vazbou, která se účastní přímo polymerace. Monolit je pak navázán ke stěně kapiláry na několika místech [22]. Po aktivaci povrchu se kapilára naplní polymerizační směsí a na obou koncích se uzavře gumovým septem. Polymerizace se pak iniciuje termicky, či UV zářením [17].

V prvním kroku dochází k rozpadu iniciátoru na radikály a ty iniciují vlastní polymerizační reakci za vzniku polymerizačních řetězců, které postupem času rostou, síťují se a precipitují jako polymerizační jádra [22]. Do takto vytvořených jader se začleňuje síťující monomer. S postupem času jádra rostou a vytváří úzce propojenou síť, obsahující průtočné póry, která zaplní celé separační médium [28]. Po ukončení polymerizace se zátky odstraní, kapilára se zkrátí na potřebnou délku a promyje vhodným rozpouštědlem pro odstranění

zbytků porogenní směsi a jiných rozpustných sloučenin z monolitické kolony [17]. Schéma jednotlivých kroků přípravy monolitické kolony s organickou fází je uvedeno na Obrázku 5.



Obrázek 5 - Schéma přípravy monolitické kapilární kolony [22,47]

1.4.1 Ovlivnění vlastností monolitických kolon

Jandera a spol., zkoumali faktory ovlivňující účinnost kolony. K těm patří směs síťujícího monomeru, funkční monomery, typ a směs porogenního rozpouštědla a také teplota a doba polymerizace [34]. Neomezené možnosti kombinování těchto faktorů mohou vést ke zlepšení chromatografických vlastností dané monolitické kolony [44].

Typická velikost póru monolitů je 1 μm . Velikost a rozdělení póru se obvykle řídí typem a složením porogenního rozpouštědla [14,17]. Chemická podstata monolitu, včetně morfologie, je dána použitím monomeru [14], stejně tak má na ni vliv i množství síťovacího činidla [22].

Morfologie póru může být ovlivněna i drobnými změnami podmínek polymerizace [46]. Teplota polymerizace ovlivňuje konečnou velikost pórů. S vyšší polymerizační teplotou se vytváří menší póry a vyšší povrchová plocha, která brání rychlé separaci [44]. Protože se s vyšší teplotou rychleji rozpadá iniciátor a vzniká více jader, a tak i více shluků [22]. Doba polymerizace ovlivňuje tvorbu póru a vlastnosti polymerních materiálů, protože tvorba polymeru je nejrychlejší právě v počáteční fázi polymerizace [44].

Nevýhodou je že podmínky polymerizace, optimalizované pro jeden systém kolony, nelze přenést na systém jiný. Proto je nutné optimalizovat polymerizační podmínky pro nové směsi, aby bylo dosaženo dostatečného výkonu výsledného monolitu [17].

1.5 Aplikace monolitické HPLC

1.5.1 Chromatografie hydrofilních interakcí

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je technika, která byla od roku 1975 používána k separaci sacharidů a oligosacharidů. Linden a Lawhead popsali úspěšnou separaci sacharidů za použití chemicky modifikovaného silikagelu s aminovými skupinami jako stacionární fázi a směs vody s acetonitrilem jako fázi mobilní. Ve stejném roce provedl podobnou studii také Palmer, který analyzoval sacharidy na aminové koloně se stejnou mobilní fází [7]. I přesto, že tato technika byla již několik let známá, teprve v roce 1990 Alpert zavedl pojem hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) [48].

HILIC v posledních desetiletí zaznamenala obrovský nárůst a to zejména jako vhodná alternativa RPLC pro separaci polárních sloučenin [49,50]. Úspěšně je využívána v separacích sacharidů, peptidů a proteinů [26,30,45]. Velmi rychlou separaci peptidů a proteinů, poskytují polymerované poly(styren-*ko*-divinylbenzen) monolity [51]. Dalšími často separovanými látkami jsou nukleosidy, nukleotidy [52], pomocí kterým se zjišťuje schopnost dané kolony poskytovat retenci v HILIC separačním módu.

Jako stacionární fáze se v HILIC používají polární materiály, stejně jako v chromatografii s normálními fázemi. Avšak mobilní fáze pro HILIC jsou podobné těm, které se používají v chromatografii s fázemi reverzními. Mobilní fáze obsahuje vysoký podíl organického rozpouštědla [30,41,53] a malé procento vody, obvykle 5 až 40 % proto, aby byla zajištěna hydrofilní interakce [6,7,25,26,30,54]. Běžně používanou mobilní fází je kombinace vody a acetonitrilu, případně dalšího pufru [25]. V některých případech je možné použít také metanol, etanol, isopropanol nebo aceton. Tato rozpouštědla však nemusí poskytovat dostatečnou retenci [30], případně použít vhodné modifikátory, například tetrahydrofuran, 1,4-dioxan nebo N,N-dimethylformamid [55].

V případě stacionárních fází se lze setkat s chemicky vázanými fázemi na partikulárním, či monolitickém nosiči [30,34]. Jedná se buď o samotný oxid křemičitý nebo klasické silikagelové stacionární fáze. Ty mohou být modifikovány různými polárními funkčními skupinami, jako jsou skupiny diolové (-CH(OH)CH₂), kyanové (-CN), aminové (-NH₂), amidové (-CONH₂) [24,25,36,56,57], případně stacionární fáze na bázi cyklodextrinu, která našla uplatnění v separaci oligosacharidů za použití HILIC-ESI-MS [58]. Další možností pro stacionární fázi je možné použít silikagel modifikovaný hydrofilními polymery jako je polyhydroxyethyl nebo polysulfoethyl [30,41]. Velmi častým typem stacionární fáze jsou také zwitteriontové stacionární fáze vázané na oxidu křemičitém [58].

Podmínkou v HILIC separačním módu je, aby stacionární fáze byla více polární než fáze mobilní. Díky takovému uspořádání pak HILIC umožňuje dělit polární analyty, které jsou dostatečně zadrženy, s vysokým rozlišením a separační účinnosti, přičemž nepolární látky, které afinitu ke stacionární fázi nevykazují, zadržovány nejsou [30]. Hnací silou retence jsou uplatňované hydrofilní proton-donor-akceptorové a dipól-dipólové interakce jak s povrchem stacionární fáze, tak i s kapalinou, která je adsorbovaná v nepatrném množství v difúzní vrstvě [59].

Samotná retence vzorku v HILIC systému však závisí také na mnoha dalších faktorech. Jedním z nejdůležitějších je struktura vzorku. Čím má látka větší počet polárních funkčních skupin, jako je hydroxylová skupina, u malých molekul, v oligosacharidech nebo

polárních jednotkách aminokyselin v peptidech, tím se retence zvyšuje. Naopak retence klesá se zvyšující se teplotou kolony [30] a s rostoucím obsahem polárního rozpouštědla v mobilní fázi, tedy vody [57]. Důležitou roli v ovlivnění retence a selektivity separace látek hraje také pH mobilní fáze [38].

1.5.2 Chromatografie s reverzními fázemi

Původně navržená chromatografii s normálními fázemi (NPLC), u které se používá polární stacionární fáze a nevodná fáze mobilní jako je aceton, chloroform, benzen a další, byla postupně nahrazena chromatografií s fázemi reverzními (RPLC). Toto chromatografické uspořádání je vhodné pro separace látek nepolárních, ale také pro dělení slabě nebo mírně polárních sloučenin [30]. Pro separace polárních látek, včetně derivátů cukrů, karboxylových kyselin a aminokyselin nebo peptidů, vhodná není. Polární látky jsou často v RP separačním módu eluovány jako nesouměrné píky, bez dostatečného oddělení, vzhledem ke slabé interakci mezi látkou a stacionární fází. Tento problém je však možné řešit, a to přidáním vhodného činidla, které obsahuje polární skupinu, nebo modifikací stacionární fáze [60].

Liang a spol. ve svém článku uvedli různé druhy monolitických kapilárních kolon, které byly syntetizovány právě pro separaci proteinů a peptidů v tomto systému. Těmi byly například poly(styren-*ko*-divinylbenzen), poly(butylmethakrylát-*ko*-ethylendimethakrylát) nebo poly(laurylmethakrylát-*ko*-ethylendimethakrylát) monolity, modifikovaná silikagelová kolona C18 nebo fenyloxid hybridní silikagelové monolity [18].

Oddělování velkých molekul proteinů se oproti nízkomolekulárním sloučeninám v několika hlediskách liší. Při isokratické separaci je obtížné dosáhnout rozdělení, protože retence těchto molekul je velmi citlivá a to i na velmi malé změny ve složení vodné mobilní fáze a rozpouštědla. Různě velké molekuly vyžadují různé složení mobilní fáze. Z tohoto důvodu je vhodnější pro úspěšnou a reprodukovatelnou separaci použít gradientovou eluci [35]. Například pro oddělování proteinů a peptidů byla použita monolitická kolona poly(*p*-methylstyren-*ko*-1,2-bis(*p*-vinylfenyl)ethan (MS/BVPE) [61]. Dále monolitická kapilární kolona připravena tepelně iniciovanou volnou radikálovou polymerací fenylakrylátu (PA) a 1,4-fenyleniakrylátu (PDA) byla použita pro separaci proteinů a oligonukleotidů [62].

Mobilní fáze v RP systému je polární, kterou tvoří směs vody a jednoho nebo více polárních rozpouštědel nebo pufru. Retence se zvyšuje se zvyšující se polaritou vzorku a polaritou stacionární fáze. Naopak se snižuje se zvyšující polaritou fáze mobilní [30].

1.6 Separace polárních látek na kapilárních monolitických kolonách

Doménou separace polárních látek je HILIC separační mód. V následující části jsou uvedeny některé příklady kapilárních monolitických kolon, které byly syntetizovány pro poskytování retence polárních látek, z nichž právě většina byla studována pouze v HILIC separačním módu. Velmi častým typem separace látek na monolitických kolonách byly nukleové báze, nukleosidy a nukleotidy, které jsou významnými sloučeninami mnoha enzymatických reakcí a účastní se řady metabolických procesů. Mezi další často uváděné látky, které byly separovány, patřily kyselina benzoová a její deriváty, sacharidy nebo peptidy.

Moravcová a spol. [63] syntetizovali kapilární monolitickou kolonu na bázi silikagelu s zwitteriontovým monomerem MEDSA a kapilární monolitickou kolonu s 2-(methylkryloyloxyethylfosfocholinem) (MEPC) monomerem. Na obou kolonách byla separována směs nukleobází nukleosidů a nukleotidů s UV detekcí při 210 nm za isokratických podmínek a při gradientové eluci v HILIC chromatografickém systému. Pro isokratické podmínky byla použita směs dvou nukleosidů a šesti nukleotidů, kdy došlo k rychlé a efektivní separaci všech nukleotidů v 70% acetonitrilu 50 mM octan amonný (pH = 4,5). Nukleosidy za těchto podmínek odděleny nebyly.

Moravcová a spol. [41] zavedli zwitteriontovou monolitickou kolonu na bázi silikagelu, připravenou kyselou hydrolyzou tetramethoxysilanu v přítomnosti polyethylenglykolu a močoviny. Ta byla následně modifikována MEDSA funkčním monomerem. Na této koloně byly separovány směsi obsahující báze nukleových kyselin, nukleosidů a 2-deoxynukleosidů, s UV-detekcí při 210 nm, za isokratických podmínek a gradientové eluce v HILIC separačním módu. Jako mobilní fáze byla použita směs pufovaného acetonitrilu a vody. Touto studií bylo potvrzeno, že dvoustupňová modifikace monolitických kapilárních kolon na bázi silikagelu a stabilním funkčním monomerem je vhodná pro separaci širokého spektra polárních látek.

Ikegami a spol. [60] syntetizovali monolitickou kolonu polymerizací akrylamidu, modifikovanou N-(3trimethoxysilylpropyl)methakrylátem jako kotvící skupinu. Na této koloně byly separovány nukleosidy, nukleové báze a deriváty sacharidů v systému HILIC chromatografie. Retenční chování nukleosidů a nukleových bází bylo zkoumáno za použití směsi acetonitril a voda jako mobilní fáze. Stejná mobilní fáze byla použita pro separaci derivátů cukrů. Připravená monolitická kolona poskytovala vysoce účinné separace v režimu HILIC pro uvedené skupiny látek při 70-90 % acetonitrilu.

Wang a spol. [64] vyvinuli zwitteriontovou organickou polymerní monolitickou kolonu *ko*-polymerizací 1-vinyl-3-(butyl-4-sulfonat)imidazolium, akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu v kvarterním porogenním rozpouštědle obsahujícím formamid, dimethylsulfoxid, polyethylenglykol 8000 a polyetylenglykol 10000 pro kapilární HILIC separace. Na této koloně byly separovány deriváty kyseliny benzoové a nukleosidy, kde byl prokázán HILIC zádržný mechanismus s vyšším podílem ACN v mobilní fázi.

Liu a spol [46] připravili zwitteriontovou hydrofilní monolitickou stacionární fázi tepelně iniciovanou *ko*-polymerizací ethylenglykoldimethakrylátu (EDMA) síťovacího monomeru a N,N-dimethyl-N-(3-methakryl-amidopropyl)-N-)3-(sulfopropyl) amonium betain (SPP) jako monomeru funkčního, poly(SPP-*ko*-EDMA). Tato kolona byla aplikována na oddělení řady neutrálních, kyselých a zásaditých polárních analytů v HILIC separačním módu. Byly separovány slabé polární fenoly při 90% ACN, u kterých bylo zjištěno, že jejich retence závisí na jejich polaritě. Dále byla separována kyselina askorbová a dehydroaskorbové při 80 % ACN, které jsou vysoce polární sloučeniny a za daných podmínek byly dostatečně odděleny.

Horie a spol. [65] připravili kapilární monolitickou silikagelovou kolonu, která byla modifikovaná kyselinou poly(akrylovou). Na této koloně byly separovány nukleosidy a sacharidy za isokratických podmínek a dále peptidy gradientovou elucí ve směsi ACN-voda jako mobilní fáze. Takto syntetizovaná kolona se ukázala jako vhodná pro separace široké škály sloučenin s vysokou polaritou.

Chen a spol. [66] studovali monolitickou kolonu poly(metakrylatovou kyselinu-*ko*-ethylenglykol dimetakrylát) (MAA-*ko*-EDMA) v HILIC separačním módu. Na této koloně byly s úspěchem separovány nukleosidy, deriváty kyseliny benzoové, aniliny a peptidy.

Holdšvendová a spol. [67] připravili monolitickou kolonu na bázi hydroxymethakrylátu. Směs monomerů v polymerizační směsi byla složena z N-(hydroxy)methakrylamidu (HMMAA) a ethylenglykoldimethakrylátu (EDMA). Na této byly úspěšně separovány oligonukleotidy v režimu HILIC chromatografie za použití 100 mM triethylamin acetátu v acetonitrilu jako mobilní fáze.

Jiang a spol. [25] připravili monolitickou kolonu tepelnou *ko*-polymerizací MEDSA a EDMA. Tato kolona byla úspěšně použita pro HILIC separace směsi neutrálních amidů s nízkou molekulovou hmotností.

Lin a spol. [68] připravili monolitickou stacionární fázi poly(META-*ko*-PETA) *ko*-polymerací 2-(methakryoyloxy)ethyltrimethylamonium methyl sulfátu (META) a pentaerythritol triakralátu (PETA) v binární porogenní směsi sestávající se z cyklohexanolu

a ethylenglykolu. Tato monolitická kolona vykazovala velice dobrou selektivitu pro neutrální, bazické a kyselé polární analyty (nukleové kyseliny a báze a deriváty kyseliny benzoové), které na ni byly separovány.

Polární látky lze v RP separačním módu dělit obtížně. Pro zjištění schopnosti kolon poskytovat retenci v RP separačním módu se využívají alkylbenzeny. Alkylftaláty byly také častým typem látek separovaných v tomto módu.

Núnez a spol. [69] studovali monolitickou silikagelovou kolonu, potaženou poly(oktadecylmethakrylátem) (ODM). Tato kolona byla připravena volnou radikálovou polymerací a testována v RP separačním módu. Jako vzorky pro testování kolony byly použity benzenové a naftalenové deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky, steroidy, alkylftaláty a deriváty vitamínu E. Pro získání chromatogramu byla použita mobilní fáze směsi metanol-voda a acetonitril-voda v různých poměrech (od 30 % vody). Ve výsledku se tato kolona ukázala jako velice výkonná pro separaci v RP módu polárních látek, a ne jen látek nepolárních.

Jak již bylo zmíněno, některé monolitické zwitteriontové stacionární fáze mohou poskytovat dvojí zádržný retenční mechanismus. Rozdíly v selektivitě mezi dvěma systémy mohou být získány použitím dvou různých kolon, vykazující různou selektivitu k polárním látkám. Zde pak hovoříme o 2D separaci. Druhou možností je použití právě jediného typu monolitické kolony, která pracuje s různým poměrem vodně-organické mobilní fáze v systému prvním a systému druhém [8]. Níže jsou uvedeny práce autorů, kteří se duálním separačním módem zabývali.

Jing a spol. [50] připravili zwitteriontovou monolitickou stacionární fázi poly(MPC-*ko*-EDMA) tepelnou *ko*-polymerizací metakryloyloxyethylfosforylcholin (MPC) a EDMA monomerů. Typický HILIC mechanismus byl pozorován při vysokém obsahu acetonitrilu a byla prokázána velice dobrá separace pro řadu polárních analytů, zejména malých peptidů. Při separaci testovací směsi alkylfenolů v systému s obrácenými fázemi bylo dosaženo základního rozdělení.

Jing a spol. [42] syntetizovali další zwitteriontovou kolonu poly(SPV-*ko*-MBA) tepelnou *ko*-polymerizací 1-(3-sulfopropyl)-4-vinylpyridiniumbetain (4-SPV) a N,N'-metylenbisakrylamidu (MBA). Na této koloně zkoumán duální retenční mechanismus HILIC-RP, přičemž přechod z HILIC do RP byl kolem 30% ACN. U tohoto monolitu byla prokázána srovnatelná selektivita s komerčními ZIC-pHILIC pro polární testované látky. (puriny a pirimidiny). Nicméně tato monolitická stacionární fáze má dvě nevýhody, a to

nízkou rozpustnost zesíťovacího činidla MBA a oproti komerčním kolonám relativně malou účinnost.

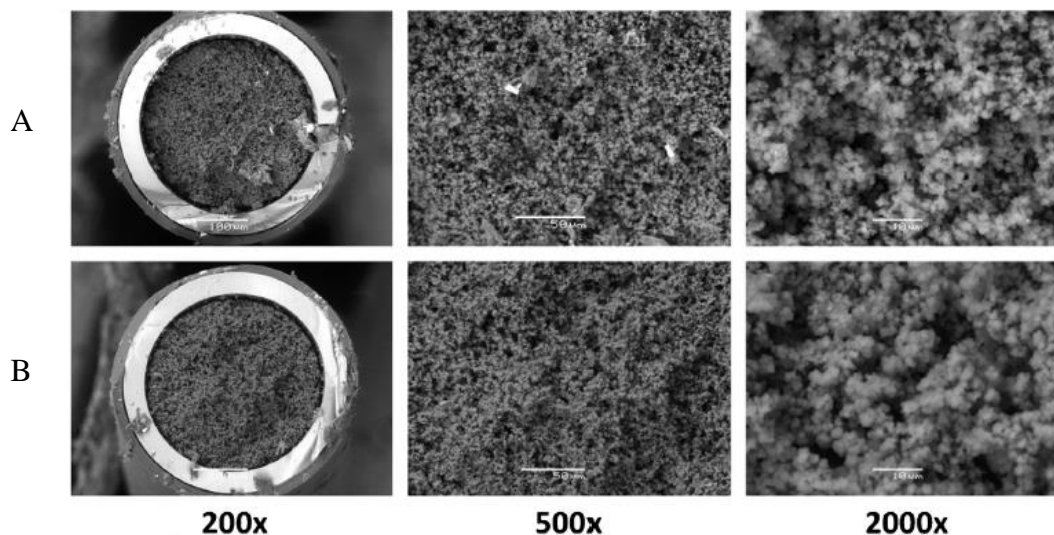
Urban a spol. [70] připravili kapilární polymethakrylátové monolitické kolony pro HILIC separace radikálovou *ko*-polymerací MEDSA a EDMA s různým poměrem porogenní směsi. Na těchto kolonách byly separovány polární fenolické kyseliny v HILIC a RP separačním módu. V HILIC kolony vykazovaly pro tyto látky separační selektivitu, a RP měli selektivitu omezenou vzhledem k nižší retenci.

Škeříková a Jandera [32] připravili zwitteriontovou polymethakrylátovou monolitickou kolonu pro separaci silně polárních fenolických kyselin obsažených v pivu. Jako monomer použily opět MEDSA a EDMA. Autory bylo prokázáno, že výsledná kolona může být použita jak pro HILIC tak i pro RP režim.

Staňková a spol. [44] zkoumali vlastnosti polymethakrylátových monolitických kolon připravených kombinací funkčního monomeru MEDSA s různými dimethakrylátovými síťovacími monomery v HILIC a RP režimu pro separaci fenolických kyselin.

Dále byla připravena monolitická polymethakrylátová kolona BIGDMA, kde byl jako síťující monomer bisfenol A glycerolát dimethakrylát (BIGDMA) a MEDSA funkční monomer. Na této koloně byly separovány nízkomolekulární polární látky v duálním režimu. A to fenolické kyseliny a flavony, barbituráty, ftaláty, sulfoamidy, nukleové báze a nukleosidy, deriváty triazinů a deriváty fenylmočoviny v duálním retenčním módu. Stejně tak byla připravena polymethakrylátová monolitická kolona DiEDMA. V tomto případě byl jako funkční monomer použit MEDSA. Na této koloně byly separovány fenolické kyseliny a flavony v HILIC i RP retenčním režimu [1].

Tyto dva typy monolitických kolon byly vybrány z důvodu prokázání jejich největší účinnosti [28]. U obou kolon byl prokázán duální retenční mechanismus, ve kterém lze využít jak mobilní fáze s vysokým obsahem acetonitrilu, tak i mobilní fáze s vysokým podílem vody pro široké spektrum látek [66]. Obrázek 6 znázorňuje morfologii těchto monolitických kolon. Struktura těchto dvou monolitů si je velice podobná, ale BIGDMA má oproti DiEDMA více pravidelný tvar mikroglobulí [28].



Obrázek 6 - Morfologie monolitických kolon - A - monolitická kolona DiEDMA, B - monolitická kolona BIGDMA [44]

Pro tuto diplomovou práci byla připravená také monolitická kolona DiEDMA s funkčním monomerem MEDSA, návaznosti na disertační práci Ing. Magdy Staňkové [1]. Vzhledem k tomu, že na této koloně již byly úspěšně separovány některé polární látky, fenolické kyseliny a flavony, byl tento typ monolitické zwitteriontové kolony použit pro separaci stejných skupin polárních látek, a to nukleosidů a nukleových bází, derivátů triazinů, ftalátů, barbiturátů a sulfonamidů, které již byly separovány na koloně BIGDMA.

1.7 Charakterizace monolitických kolon

Retenční čas t_R je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do maxima píku. Retenční objem je pak objem, který protekl kolonou za tuto dobu. Tyto veličiny jsou charakterizovány vztahem [47]:

$$V_R = t_R \cdot F_m \quad (1)$$

Mrtvý retenční čas, t_M , je přiřkládán látce, která není zadržována v koloně. Tato látka má stejnou rychlost jako mobilní fáze, F_m , a putuje společně s ní. Mrtvý retenční čas je charakterizován vztahem [47]:

$$t_M = \frac{V_M}{F_m} \quad (2)$$

Průměrná rychlost (lineární rychlost) inertu, \bar{u} , je další veličinou, která charakterizuje chromatografický proces. Lineární rychlost, \bar{u} , je dána vztahem (3), kde l je délka kolony a t_M mrtvý retenční čas [47]:

$$\bar{u} = \frac{l}{t_M} \quad (3)$$

Pro retenční faktor, k , platí vztah [47]:

$$k = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{V_R}{V_M} - 1 \quad (4)$$

Účinnost chromatografické kolony je její schopnost separovat látky. Kolona dokáže od sebe rozdělit látky tím lépe, čím vyšší je její účinnost. Účinnost je vyjádřena počtem teoretických pater kolony N :

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (5)$$

kde t_R je retenční čas a $w_{0,5}$ šířka píku v polovině výšky [47]

Pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází se nazývá teoretické patro. Výška toho patra je tzv. výškový ekvivalent teoretického patra H :

$$H = \frac{l}{N} \quad (6)$$

kde l je délka kolony a N je účinnost kolony [47].

Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti popisuje van Deemterova rovnice:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (7)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra, A je vliv turbulentní difúze, způsobené neuniformity toku, B/u je vliv podélné difúze látky v mobilní fázi a $C \cdot u$ je vliv odporu proti převodu hmoty v mobilní fázi. Pro objektivní posouzení účinnosti kolony je nejvhodnější proměřit závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti za vytvoření takzvané H - u křivky [47].

Závislost retenčního faktoru k , na složení mobilní fáze je dána rovnicí 8, případně rovnicí 9. Tyto vztahy lze použít pro popis závislosti jak v chromatografii s reverzními fázemi, tak i v HILIC chromatografii:

$$\log k = a - m \cdot \varphi \quad (8)$$

$$\log k = a - m \cdot \log \varphi \quad (9)$$

Konstanty a a m jsou charakteristické pro polaritu stacionární fáze. Konstanta a odpovídá retenčnímu faktoru dané látky v čisté vodě a roste s klesající polaritou. Konstanta m odpovídá velikosti změny $\log k$ s eluční koncentrací φ . Konstanty jsou ovlivňovány jak polaritou stacionární fáze, tak i polaritou fáze mobilní, ale také polaritou stanovované látky [71].

Pro HILIC separační mód může být někdy závislost retenčního faktoru, k , na složení mobilní fáze nevhodná. Pro výpočet retence je pak vhodné namísto rovnice 8 a 9 použít tříparametrovou rovnici 10, která může poskytnout lepší výsledky, zejména pokud je látka v HILIC separačním módu velmi zadržována:

$$k = (a + b \cdot \varphi)^{-m} \quad (10)$$

a , b , a m jsou experimentální konstanty rovnice [72].

Pro popis retence látek v HILIC a RP separačním módu lze využít rovnici 8. Pokud však chceme popsat retenci látek v celém rozsahu podílu vody v mobilní fázi (0-100 %), lze použít tříparametrovou rovnici 11 a čtyřparametrovou rovnici 12. Rovnice 11 by měla být vhodnější pro RP separační mód, respektive pro látky, které jsou v RP separačním módu zadržovány více, naopak rovnice 12 je vhodnější pro HILIC separační mód:

$$\log k = a_1 + m_{RP} \cdot \varphi(H_2O) - m_{HILIC} \cdot \varphi(H_2O) \quad (11)$$

$$\log k = a_1 + m_{RP} \cdot \varphi(H_2O) - m_{HILIC} \cdot \log[1 + b \cdot \varphi(H_2O)] \quad (12)$$

Parametr m_{RP} charakterizuje příspěvek zvyšování koncentrace vody v mobilní fázi, parametr m_{HILIC} je příspěvkem pro klesající koncentraci vody v mobilní fázi a parametr a_1 je empirická konstanta bez zvláštního fyzikálního významu. Parametr a_2 je $\log k$ čistého organického rozpouštědla ($\varphi(H_2O) = 0$). Parametr b (obvykle $b > 1$) charakterizuje termín pro HILIC retenci s velmi nízkou koncentrací vody v mobilní fázi [73,72].

φ_{min} značí minimální koncentraci vody, kde dochází k přechodu z HILIC módu do módu RP. Tento přechod je popsán rovnicí 13 při použití tříparametrové rovnice 11 a rovnicí 14 při použití čtyřparametrové rovnice 12 [72]:

$$\varphi_{\min} = 0,434 \cdot \frac{m_{HLLC}}{m_{RP}} \quad (13)$$

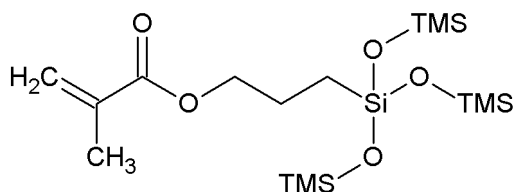
$$\varphi_{\min} = 0,434 \cdot \frac{m_{HLLC}}{m_{RP}} - \frac{1}{b} \quad (14)$$

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

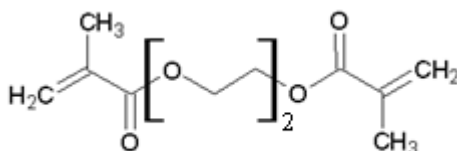
2.1.1 Silanizace kapiláry

- Aceton (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)
- Redestilovaná voda (Millipore SAS, Molsheim, Francie)
- Hydroxid sodný (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)
- Etanol (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)
- 3-(trimethoxysilyl)propyl metakrylát (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

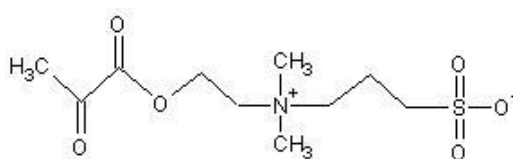


2.1.2 Síťující a funkční monomer

Ethylendioxydimethakrylát - DiEDMA (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

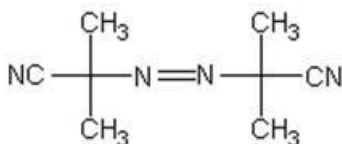


N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain - MEDSA (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)



2.1.3 Porogenní rozpouštědla a iniciátor

- 1,4 - butandiol (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)
- 1 - propanol (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)
- Azobisisobutyronitril (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)



2.1.4 Standardy

2.1.4.1 Alkylbenzeny

benzen (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

toluen (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

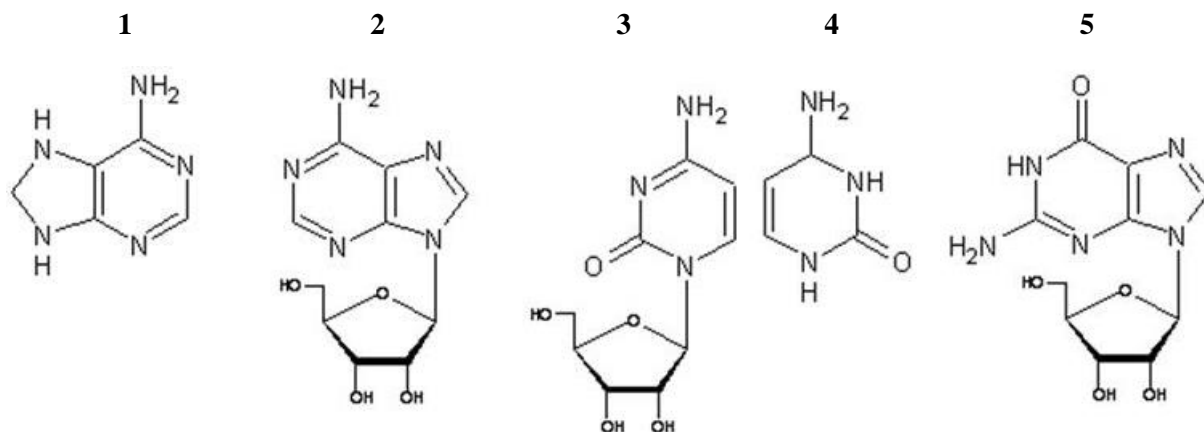
ethylbenzen (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

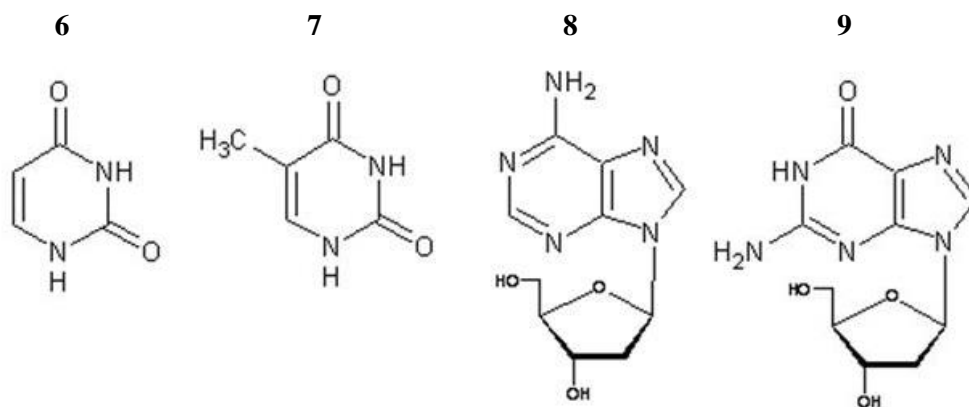
propylbenzen (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

butylbenzen (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

amylbenzen (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

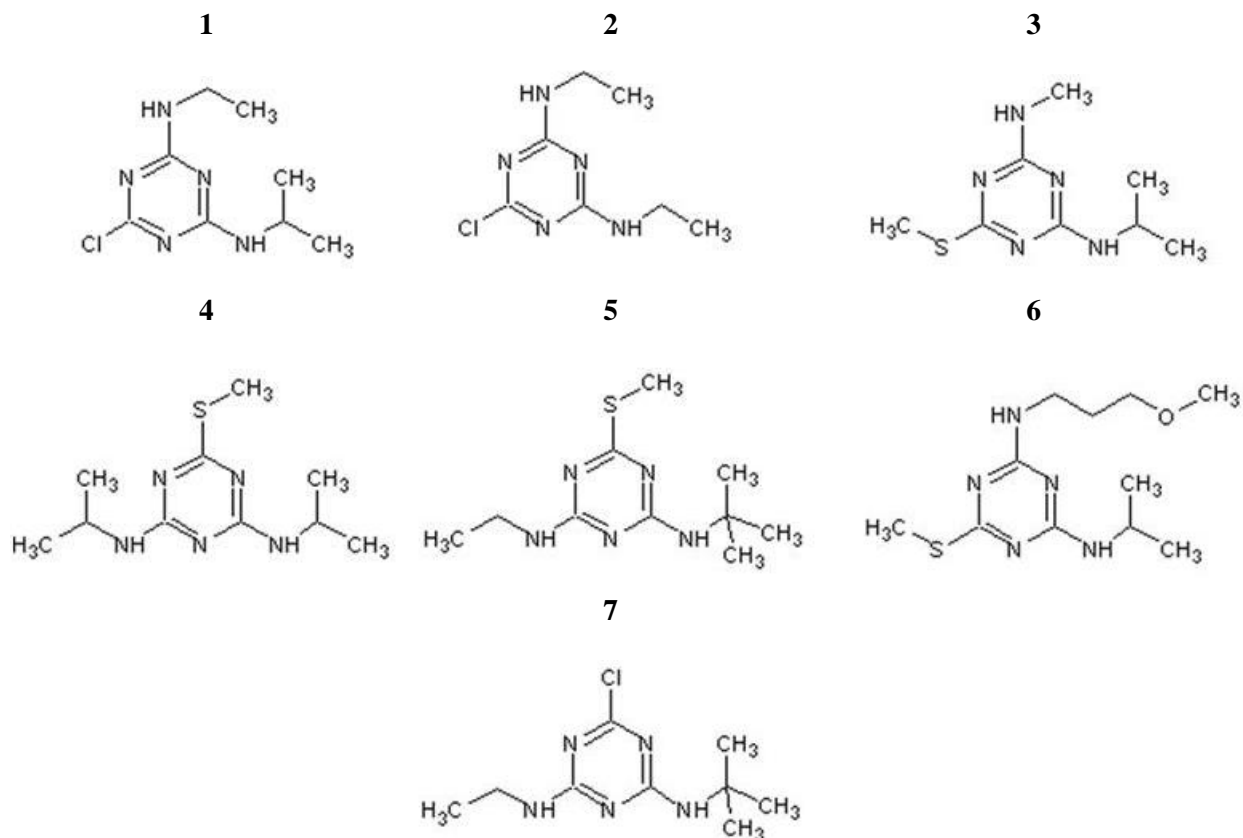
2.1.4.2 Nukleové báze a nukleosidy





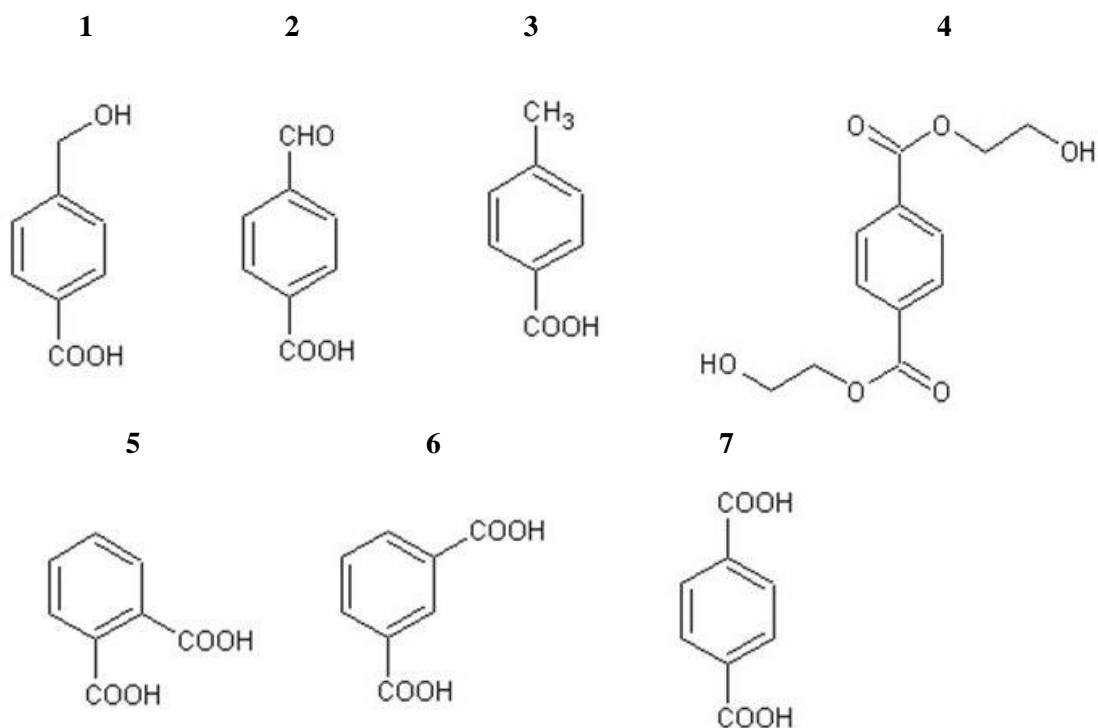
(1) adenin; (2) adenosin; (3) cytidin; (4) cytosin; (5) guanosin; (6) uracil; (7) thymin; (8) 2-deoxyadenosin; (9) 2-deoxyguanosin (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

2.1.4.3 Deriváty triazinů



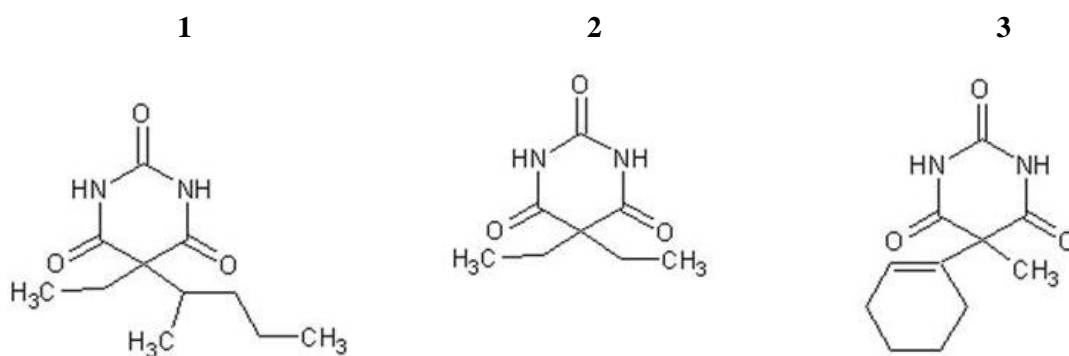
(1) atrazin; (2) simazin; (3) desmetryn; (4) prometryn; (5) terbutryn; (6) methoprotryn (7) terbutylazin (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

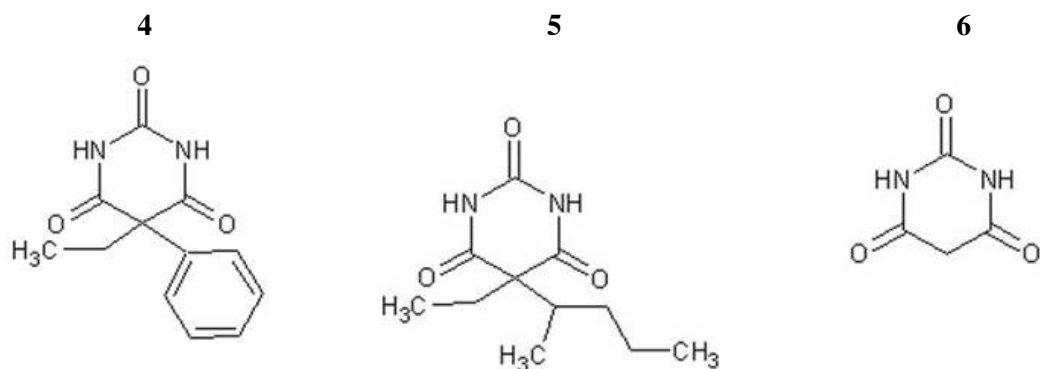
2.1.4.4 Deriváty kyseliny ftalové



(1) kyselina 4-(hydroxymethyl) benzoová; (2) kyselina 4-formylbenzoová; (3) kyselina toluyllová; (4) bis(2-hydroxyethyl)tereftalát; (5) kyselina ftalová; (6) kyselina isoftalová; (7) kyselina tereftalová (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

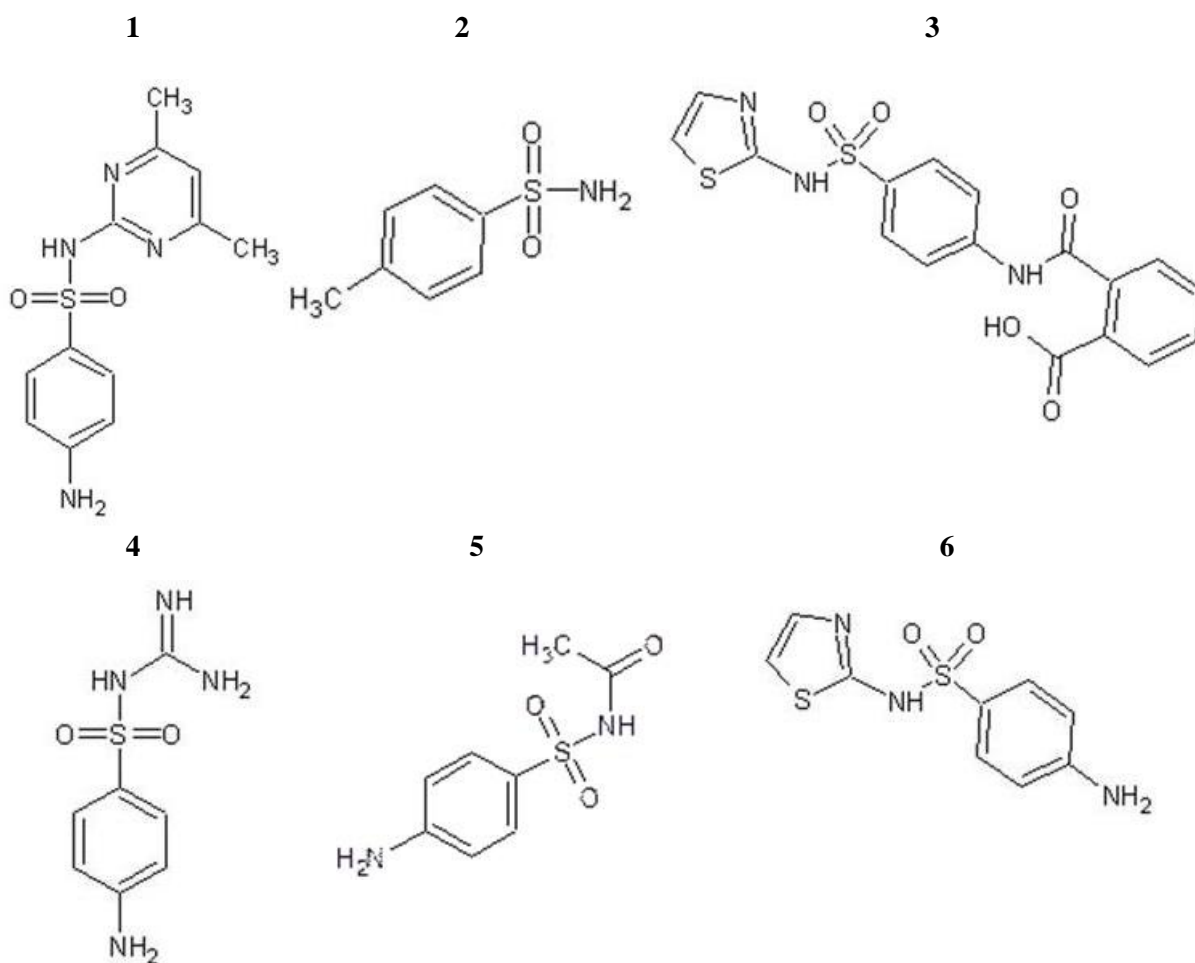
2.1.4.5 Barbituráty





(1) amobarbital; (2) barbital; (3) hexobarbital; (4) fenobarbital; (5) pentobarbital; (6) kyselina barbiturová (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

2.1.4.6 Sulfonamidy



(1) sulfadimidin; (2) sulfanilamid; (3) ftalazol; (4) sulfaguanidin; (5) alesten; (6) sulfathiazol (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

2.1.5 Další chemikálie

Aceton (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

Metanol (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

ACN - acetonitril - pro HPLC (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo; Scharlau, Španělsko)

Kyselina mravenčí (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

Octan amonný (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo)

2.2 Přístrojové vybavení

Měření standardů bylo provedeno na kapalinovém chromatografu skládajícího se z následujících částí:

- 2 skleněné láhve sloužící jako zásobníky mobilních fází
- kapilární čerpadlo se splitrem Agilent Technologies 1260 Infinity (Palo Alto CA, USA)
- dávkovací zařízení VICI Valco Instruments s pneumatickým dávkováním a s vnitřní dávkovací smyčkou o objemu 60 nl (Valco, USA)
- monolitická kapilární kolona
- detektor ECOM LCD 2083 (Ecom, Praha)
- skleněná mikrostříkačka HAMILTON-BONADUZ (Švýcarsko) 50 μ l pro měření aktuálního průtoku mobilní fáze

Další přístroje

- analytické váhy HR-120 (Helado s.r.o., Hradec Králové, Česká republika)
- pH meter pH 211 (Schott, Mainz, Německo)
- ultrazvuková lázeň UC 405 BJ1 (Tesla, Praha, česká republika)

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava polymethakrylátové monolitické kolony DiEDMA

Polymethakrylátová monolitická kolona byla připravena dle postupu Staňková a spol. [44]. Před samotnou polymerací byla vnitřní stěna křemenné kapiláry pro zlepšení stability monolitického lůžka modifikována. Křemenná kapilára o vnitřním průměru 320 μm byla promyta acetonem, vodou a 0,2 mol/l roztokem hydroxidu sodného po dobu 30 minut. Poté znovu vodou do neutrálního pH, následně 0,2 mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové po dobu 30 minut a nakonec etanolem.

Vnitřní povrch stěny byl aktivován propláchnutím 40% roztoku 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu v 95% etanolu o pH 5 (upraveném pomocí kyseliny octové) po dobu 3 hodin. Modifikovaná kapilára byla propláchnuta etanolem, vysušena v proudu dusíku a 24 hodin nechaná při pokojové teplotě.

Polymerizační směs byla připravena navážením jednotlivých komponent do vialky na analytických vahách. Směs obsahovala 20,25 % zwitteriontového sulfobetainového MEDSA funkčního monomeru a 15,00 % DiEDMA síťujícího monomeru. Monomery byly rozpuštěny ve vodně-porogenním rozpouštědle, složeného z 15,08 % vody, 25,01 % 1-propanolu, 25,05 % 1,4-butandiolu a 3,6 % azobisisobutylnitrilu jako iniciátoru. Takto připravená polymerizační směs byla vložena do ultrazvuku, aby došlo k odstranění kyslíku, který ruší polymerizační reakci.

Křemenná kapilára s upraveným vnitřním povrchem byla naplněna polymerizační směsí, tak aby v ní nebyly přítomny vzduchové bubliny. Oba konce kapiláry byly uzavřeny gumovou zátkou a kapilára byla uchovávána v termostatu po dobu 20 hodin při 60 °C. V této době následovala polymerizační reakce.

Po ukončení polymerizační reakce byla kolona vyjmuta z termostatu a kolona byla seříznuta na potřebnou délku. Kapilární monolitická kolona byla nakonec promyta acetonitrem z důvodu odstranění nezreagovaných zbytků a nakonec mobilní fází.

2.3.2 Příprava standardů

Pro přípravu standardních roztoků alkylbenzenů bylo odpipetováno 100 μl jednotlivých alkylbenzenů (benzen, toluen, etylbenzen, propylbenzen, butylbenzen, amylbenzen) do 5 ml čistého acetonitrilu. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 100 μl do 1 ml směsi acetonitrilu-voda (50:50). Na připravené kapilární monolitické koloně DiEDMA byly proměřeny retenční charakteristiky těchto alkylbenzenů.

Pro přípravu standardů nukleových bází a nukleosidů, derivátů triazinů, derivátů kyseliny ftalové, barbiturátů a sulfonamidů (struktury jsou uvedeny v kap. 2.2.4.2-2.2.4.6) bylo naváženo asi 10 mg jednotlivých standardů do ampulek a rozpuštěno v 3-5 ml mobilní fáze. Postupně byly proměřeny retenční charakteristiky jednotlivých standardů v HILIC (s vysokým podílem ACN v mobilní fázi) a RP (s vysokým podílem vody v mobilní fázi) separačním módu.

2.3.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravována smícháním acetonitrilu a vody v různých poměrech pomocí kapilárního čerpadla. Oba zásobní roztoky byly pufovány 10 mM octanem amonným. pH vody bylo upraveno pomocí kyseliny mravenčí na hodnotu 3.

2.3.4 Podmínky měření

Veškeré experimenty byly měřeny za isokratických podmínek při laboratorní teplotě a každé měření bylo provedeno třikrát. Objem nástřiku jednotlivých standardů byl 60 nl. Průtok mobilní fáze se pohyboval od 0,5 do 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ a byl ověřován pomocí stopek a 50 μl mikrostřičky Hamilton. Detekce byla prováděna pomocí UV detektoru při vlnových délkách 254 nm pro alkylbenzeny, 230 nm pro nukleové báze a nukleosidy a 214 nm u zbylých skupin látek.

Pomocí počítačového systému Clarity byly získány hodnoty retenčních časů jednotlivých standardů, t_R , a retenčního času toluenu, v případě HILIC a uracilu, v případě reverzních fází, jako mrtvý objem kolony, t_M , a následně byly vypočteny retenční faktory, k .

Hodnoty, tabulky a grafy byly zpracovány pomocí vyhodnocovacího programu Adstat, MS Excel a MS Word.

3 Výsledky a diskuze

Tato diplomová práce se zabývá separacemi nízkomolekulárních polárních látek na monolitických kapilárních kolonách v systému s převrácenými fázemi a systému HILIC chromatografie. Cílem práce bylo, v návaznosti na disertační práci Ing. Magdy Staňkové, připravit monolitickou kolonu polymethakrylátového typu v křemenné kapiláře, na které byly separovány vybrané skupiny polárních látek ve výše uvedených separačních módech.

Pro separace polárních látek byla připravena monolitická kolona DiEDMA s zwitteriontovým funkčním monomerem N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betain (MEDSA) a síťujícím monomerem dioxyethylen dimethakrylát (DiEDMA), na které byly separovány nukleové báze a nukleosidy, deriváty triazinů, deriváty kyseliny ftalové, barbituráty a sulfonamidy. Vybrané skupiny látky byly již dříve separovány na monolitické koloně BIGDMA [1], obsahující MEDSA funkční monomer a bisfenol A glycerolát dimethakrylát síťujícím monomer. Retence a separace těchto látek byly porovnávány s připravenou monolitickou kolonou DiEDMA.

3.1 Účinnost polymethakrylátové kolony DiEDMA

Monolitická kolona DiEDMA byla připravena tepelnou polymerací. Křemenná kapilára o vnitřním průměru 320 μm byla nejprve modifikována a byl aktivován její vnitřní povrch. Poté byla naplněna polymerizační směsí, která byla tvořena zwitteriontovým sulfobetainovým MEDSA funkčním monomerem a DiEDMA síťujícím monomerem. Monomery byly rozpuštěny ve vodně porogenním rozpouštědle složeného z vody, 1-propanolu, 1,4-butandiolu a azobisisobutylnitrilu jako iniciátoru. Oba konce byly uzavřeny gumovou zátkou a vloženy do termostatu, kdy následovala polarizační rekce. Po ukončení byla kolona seříznuta a promyta acetonitrilem z důvodu odstranění nezreagovaných zbytku a nakonec mobilní fází.

Pro zjištění účinnosti takto připravené monolitické kolony DiEDMA byla vybrána směs alkylbenzenů. Tyto nepolární látky se také využívají pro zjištění schopnosti kolon poskytovat retenci v RP separačním módu. Jako jednotlivé alkylbenzeny byly použity benzen a dále aromatické uhlovodíky obsahující jeden až pět uhlíku v postranním řetězci. Směs alkylbenzenů byla separována za různého složení mobilní fáze (50-90 % ACN) a detekci

254 nm. Při vysokém podílu acetonitrilu v mobilní fázi (90 % ACN) se směs eluovala prakticky s mrtvým objemem kolony. Vhodného rozdělení bylo dosaženo při 70 % ACN v mobilní fázi.

Za těchto podmínek byly proměřeny retenční charakteristiky jednotlivých alkylbenzenů při různém průtoku mobilní fáze (0,5-5 $\mu\text{l}/\text{min}$). Z naměřených dat byla vypočítána účinnost kolony, N , (rovnice 5) a výškový ekvivalent teoretického patra, H (rovnice 6). Z retenčního času uracilu, jako mrtvý objem kolony, t_M , a délky kolony byla vypočtena lineární rychlost mobilní fáze, u , (rovnice 3). Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 1. Ze získaných dat byla vytvořena závislost výškového ekvivalentu teoretického patra, H , na lineární rychlosti mobilní fáze, u , alkylbenzenů dle van Deemterovy rovnice (rovnice 7), tzv. H-u křivka (Obrázek 7).

Nejvyšší účinnost vykazuje kolona při lineární rychlosti 0,23 mm/s (při průtoku mobilní fáze 1 $\mu\text{l}/\text{min}$). Zde je také výškový ekvivalent teoretického patra minimální a účinnost kolony dosahuje téměř 70 000 teoretických pater/m. Tento průtok však pro zjištění retenčních charakteristik separovaných skupin látek nebylo vhodné použít. Separace by trvaly dlouhou dobu a veškeré měření by bylo velmi časově náročné. Z tohoto důvodu bylo použito vyššího průtoku mobilní fáze a to 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, kde se účinnost monolitické kolony DiEDMA pohybuje okolo 30 000 teoretických pater/metr. Pro měření retenčních časů byl tento průtok vyhovující, i když chromatografické píky byly poněkud širší.

3.2 Separace nukleových bází a nukleosidů

Nukleové báze a nukleosidy (glykosidy nukleových bází), jsou látky, které jsou základní součástí nukleových kyselin hrající významnou roli v genetice a účastnící se řady významných biochemických reakcí. Mimo jiné se tyto polární látky používají pro zjištění schopnosti dané kolony poskytovat retenci v HILIC separačního módu.

U připravené polymethakrylátové monolitické kolony DiEDMA bylo zjišťováno, zda je tato stacionární fáze schopná pro tuto skupinu látek poskytnout duální retenční mechanismus. Pro zjištění retenčních charakteristik byly použity jednotlivé standardy, a to adenin, adenosin, cytidin, cytosin, guanosen, uracil, thymin, 2-deoxyadenosin a 2-deoxyguanosen (struktury jsou uvedeny v kapitole 2.1.4.2). U těchto standardů byly postupně proměřeny retenční časy v mobilní fázi s vysokým podílem acetonitrilu 98-90 % (HILIC) a s vysokým podílem vody 90-95 % (RP), při UV detekci s vlnovou délkou $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Retenční data jednotlivých látek k_{exp} jsou uvedeny v Tabulce 2. Z těchto hodnot byly sestrojeny grafické závislosti logaritmu retenčního faktoru, $\log k$, na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro HILIC (Obrázek 8) a RP separační mód (Obrázek 9) a grafická závislost logaritmu retenčního faktoru, $\log k$, na logaritmu obsahu vody, $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro HILIC (Obrázek 10) a RP separační mód (Obrázek 11). Proložení rovnic 8 a 9 bylo v obou případech pro HILIC systém neuspokojivé. Korelační koeficienty, R^2 , se u obou závislostí pohybovaly v rozmezí hodnot 0,94-0,99. Na Obrázku 9 a 11 lze vidět, že $\log k$ u většiny látek v RP módu v minusových hodnotách. Jejich k_{exp} je menší než 0,1 a proto pro další vyhodnocování nemají význam.

Pomocí rovnic 8 a 9 byly také vypočítány retenční faktory $k_{(rovnice\ 8)}$ (Tabulka 3) a $k_{(rovnice\ 9)}$ (Tabulka 4) jednotlivých látek pro HILIC separační mód. Vzhledem k menším odchylkám retenčního faktoru k_{exp} , od $k_{(rovnice\ 8)}$ a $k_{(rovnice\ 9)}$ byla sestrojena dále závislost retenčního faktoru k na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro HILIC separační mód (Obrázek 12). Pomocí rovnice 10 byly vypočítány hodnoty $k_{(rovnice\ 10)}$. Ty se z velké části shodují s k_{exp} . Hodnoty $k_{(rovnice\ 10)}$ a parametrů a, b a m rovnice 10 uvedeny v Tabulce 5

Nukleové báze a nukleosidy jsou v mobilní fázi s vysokým obsahem acetonitrilu velmi silně zadržovány. Nejvíce zadržovanou látkou v HILIC separačním módu byl guanosin. Naopak nejméně zadržovanou látkou v tomto separačním módu byl thymin. Látky, které obsahují ve své struktuře sacharidovou část (guanosin, deoxyguanosin, cytidin, adenosin a deoxyadenosin) se na koloně zadržují více, než ty, které ve své struktuře sacharid nemají (adenin, thymin, uracil, cytosin). V RP separačním módu nukleové báze a nukleosidy velmi zadržovány nebyly.

K popisu retence látek v rozsahu 0-100 % vodné složky ve vodně-organické mobilní fázi byla použita čtyřparametrová rovnice 12 (Obrázek 13). Objemový podíl vody, φ_{min} , (rovnice 14) při přechodu mezi HILIC a RP separačním mechanismem se pohybuje okolo $\varphi_{min} = 0,5$. Výjimku tvoří thymin, jehož $\varphi_{min} = 0,43$, dále guanosin s $\varphi_{min} = 0,62$, cytidin s $\varphi_{min} = 0,65$ a cytosin s $\varphi_{min} = 0,66$ (Tabulka 6).

Retence látek roste v pořadí thymin, uracil, 2-deoxyadenosin, adenin, adenosin, cytosin, 2-deoxyguanosin, cytidin a guanosin. Na Obrázku 14 je znázorněna separace v 90% pufrovaném vodném acetonitrilu. Došlo zde k separaci všech látek, pouze u 2-deoxyadenosinu, uracilu a adeninu nedošlo k rozdělení na základní linii. Guanosin je za těchto podmínek v koloně stále silně zadržován. Z kolony ho bylo možné vymýt až s vyšším obsahem vody v mobilní fázi. Při isokratické separaci v 80% ACN již došlo k úplné separaci pouze cytidinu a silně zadržovaného guanosinu (Obrázek 15). Obrázek 16 znázorňuje separaci

této skupiny látek v 5% pufrovaném vodném acetonitrilu. Tato separace potvrzuje, že nukleové báze a nukleosidy nejsou zadržovány v RP separačním módu a tyto polární látky není možné dostatečně rozdělit.

Nukleové báze a nukleosidy na koloně BIGDMA poskytovaly velmi podobnou retenci. Stejně jako na koloně DiEDMA byly silně zadržovány v mobilní fázi s vysokým obsahem acetonitrilu a s relativně malou retencí v RP separačním módu. Nejméně zadržovanou látkou byl thymin s $\varphi_{min} = 0,5$. Nejvíce zadržovanou látkou byl guanosin s $\varphi_{min} = 0,72$. Objemový podíl vody přechodu mezi HILIC a RP systémem je s porovnáním na koloně DiEDMA pro obě látky vyšší. I v případě guanosinu bylo nutno použít vyššího obsahu vody v mobilní fázi, aby ho bylo možné vymýt z kolony neboť byl silně zadržován [1]. Na koloně BIGDMA bylo možné identifikovat všechny látky již v 95% acetonitrilu, které se eluovaly v pořadí thymin, uracil, 2-deoxyadenosin, adenin, adenosin, cytosin, 2-deoxyguanosin a cytidin. Guanosin byl za těchto podmínek silně zadržován [74].

3.3 Separace derivátů triazinů

Další skupinou látek pro studium duálního retenčního mechanismu na koloně DiEDMA byly deriváty triazinů. Tyto látky patří do základního spektra herbicidů používaných k hubení plevelu. Mohou, zejména při nevhodném používání, působit na životní prostředí a kontaminovat vodu nebo potraviny.

Jako standardy byly použity atrazin, simazin, desmetryn, prometryn, terbutryn, methoprotryn a terbutylazin (struktury jsou uvedeny v kapitole 2.1.4.3). Tyto látky byly proměřeny v RP (40-15 % ACN) a HILIC (90-98 % ACN) separačním módu, s UV detekcí při vlnové délce $\lambda = 214$ nm.

Hodnoty retenčních faktorů k_{exp} jsou uvedeny v Tabulce 7. Z těchto hodnot byly sestrojeny grafické závislosti logaritmu retenčního faktoru $\log k$ na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi a grafická závislost logaritmu retenčního faktoru $\log k$ na logaritmu obsahu vody, $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro RP separační mód (Obrázek 17 a Obrázek 18). Proložení rovnicí 8 v prvním případě je vhodnější než proložení rovnicí 9 v případě druhém. Korelační koeficienty, R^2 , tohoto proložení se pohybují okolo hodnoty 0,99 (Tabulka 8). Deriváty triazinů jsou v HILIC systému pouze minimálně zadržovány i při velmi malé koncentraci vody v mobilní fázi. Proto pro tento separační mód nebyly sestrojeny grafické závislosti. Pomocí rovnic 8 a 9 byly také vypočítány retenční faktory $k_{(\text{rovnice } 8)}$ (Tabulka 8) a $k_{(\text{rovnice } 9)}$

(Tabulka 9) jednotlivých látek pro HILIC separační mód. Vypočítané hodnoty z modelu rovnice 8 a rovnice 9, $k_{(rovnice\ 8)}$ a $k_{(rovnice\ 9)}$ nejsou od k_{exp} velmi odlišné.

Nejvíce zadržovanou látkou v RP separačním módu byl terbutryn, nejméně zadržovaným byl simazin. S přibývajícím obsahem vody v mobilní fázi se retence všech triazinů postupně zvyšovala a rostla téměř lineárně. V mobilní fázi obsahující s vysokým obsahem acetonitrilu (95 %), nebylo možné deriváty triazinů od sebe oddělit, protože byly všechny eluovány prakticky s mrtvým objemem kolony.

Obrázek 19 prezentuje separaci derivátů triazinů provedenou již v RP separačním módu (60 % vody v mobilní fázi). V tomto případě k rozdělení testovaných látek docházelo, ale pouze částečně. Eluovaly se společně simazin a methoprotryn, desmetryn a atrazin, následoval terbutylazin a jako poslední se eluoval společně prometrynem terbutryn. Při isokratické separaci v 20% ACN došlo k úplné separaci všech sedmi derivátů triazinů, která je zobrazena na Obrázku 20. U simazinu, prometrynu a atrazinu nebylo za daných podmínek separace dosaženo nulové linie.

Monolitická kolona DiEDMA nevykazuje pro tuto skupinu látek dvojí zádržný mechanismus. Deriváty triazinů bylo možné rozdělit pouze v RP separačním módu s vysokým obsahem vody v mobilní fázi.

Deriváty triazinů vykazovaly také velmi nízkou retenci v HILIC separačním módu i na koloně BIGDMA. Na rozdíl od kolony DiEDMA, bylo však možné identifikovat už všech sedm látek v mobilní fázi obsahující 50% vodného acetonitrilu. Látky se eluovaly v pořadí simazin, atrazin, methoprotryn, desmetryn, terbutylazin, prometryn, a terbutryn. Po zvýšení obsahu vody na 70 % došlo k prodloužení doby eluce a separaci všech sedmi látek na nulovou linii [1].

3.4 Separace derivátů kyseliny ftalové

Látky v této skupině se nejčastěji používají při výrobním procesu plastů, hydrolyzují se a následně se používají k výrobě vláken. Dnes je můžeme nalézt téměř ve všech každodenně používaných výrobcích. Tyto deriváty nemusí být pevně chemicky vázané a mohou se tak uvolňovat do vody, půdy a ovzduší.

K popisu retence derivátů kyseliny ftalové v RP (15-35 % ACN) a HILIC (90-98 % ACN) separačních módu bylo použito sedm látek, kterými byly kyselina 4-(hydroxymethyl) benzoová, kyselina 4-formylbenzoová, kyselina toluyllová, bis-(2-hydroxyethyl) tereftalát, kyselina ftalová,

kyselina isoftalová a kyselina tereftalová (struktury jsou uvedeny v kapitole 2.1.4.4), při UV detekci o vlnové délce $\lambda = 214$ nm.

Hodnoty retenčních faktorů k_{exp} jsou uvedeny v Tabulce 10. Z těchto dat byly sestrojeny grafické závislosti logaritmu retenčního faktoru k , $\log k$, na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro HILIC (Obrázek 21) a pro RP separační mód (Obrázek 22) a logaritmu retenčního faktoru k , $\log k$, na logaritmu obsahu vody, $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi rovněž pro HILIC (Obrázek 23) a pro RP separační mód (Obrázek 24). Proložení rovnicí 8 a rovnicí 9 bylo v obou případech uspokojivé. Korelační koeficienty, R^2 , se u obou závislostí pohybovaly v rozmezí hodnot 0,97-0,99 (Tabulka 11 a Tabulka 12). Pomocí rovnice 8 a 9 byly také vypočítány retenční faktory $k_{(rovnice\ 8)}$ (Tabulka 11) a $k_{(rovnice\ 9)}$ (Tabulka 12) jednotlivých látek pro oba separační módy, jejichž hodnoty se od k_{exp} příliš neliší.

Nejvíce zadržovanou látkou v HILIC separačním módu byla kyselina ftalová, obsahující ve své struktuře karboxylovou skupinu v poloze 1 a 2, kyselina 4-(hydroxymethyl)benzoová a kyselina 4-formylbenzoová. Nejméně zadržovanou látkou v HILIC separačním módu byly kyselina toluylová, obsahující nepolární skupinu v para poloze, a bis(2-hydroxyethyl)tereftalát. V RP separačním módu měla nejvyšší retenci kyselina toluylová. Nejméně zadržovanou látkou byl opět bis(2-hydroxyethyl)tereftalát. V porovnání s HILIC separačním módem poskytuje kolona DiEDMA pro RP separační mód větší rozsah.

Skupina derivátů kyseliny ftalové pokrývá HILIC i RP separační mód. Pro popis retence derivátu kyseliny ftalové v rozsahu 0-100 % vodné složky ve vodně-organické mobilní fázi byla použita čtyřparametrová rovnice 12 (Obrázek 25). Objemový podíl vody, φ_{min} , při přechodu mezi HILIC a RP systémem byl vypočítán pomocí rovnice 14. Oblast minima křivek se pohybuje v rozmezí hodnot 0,36-0,44, s výjimkou, která náleží kyselina toluylové s $\varphi_{min} = 0,26$ (Tabulka 13).

Na Obrázku 26 je znázorněna isokratická separace v 92% pufrovaném vodném acetonitrilu. Zde je možné identifikovat všech prvních pět eluovaných látek. Těmi byly bis(2-hydroxyethyl) tereftalát, kyselina toluylová, kyselina 4-formylbenzoová, kyselina 4-(hydroxymethyl)benzoová a kyselina ftalová. Pík kyseliny 4-(hydroxymethyl)benzoové v pravé části chvostuje, pravděpodobně kvůli separačním podmínkám a působící iontové síle. Obrázek 27 zobrazuje separaci v RP separačním módu v 25% pufrovaném vodném acetonitrilu v pořadí eluce bis(2-hydroxyethyl) tereftalát, kyselina 4-hydroxymethylbenzoová, kyselina ftalová, kyselina 4-formylbenzoová, kyselina isoftalová, kyselina tereftalová a kyselina toluylová. Kyselinu isoftalovou a tereftalovou nebylo možné za těchto podmínek od sebe dostatečně oddělit, protože jejich retenční faktory jsou téměř totožné.

Monolitická kolona DiEDMA s funkčním monomerem MEDSA je schopna poskytovat retenci u této skupiny látek jak v HILIC tak i v RP separačním módu.

V případě monolitické kolony BIGDMA byly změřeny retenční faktory k v rozsahu vodně-organické mobilní fázi pokrývající 15-95 % ACN. V HILIC separačním módu byla stejně jako na koloně DiEDMA nejvíce zadržovanou látkou kyselina ftalová. Na koloně BIGDMA byla také v HILIC módu zadržována kyselina isoftalová a kyselina tereftalová, které spolu vykazovaly téměř totožnou retenci. V RP separačním módu poskytovala nevyšší retenci kyselina toluylová a nejméně zadržovanou látkou byl bis(2-hydroxyethyl)tereftalát stejně jako na koloně DiEDMA. I tato kolona poskytuje v porovnání s HILIC větší rozsah v RP separačním módu [1].

3.5 Separace barbiturátů

Dalším předmětem zkoumání duálního retenčního mechanismu monolitické kolony DiEDMA byly barbituráty. Jedná se o deriváty kyseliny barbiturové, jejichž kostra je tvořena pyrimidinem. Barbituráty byly v dřívější době používány jako silná sedativa či anestetika, avšak s poměrně velkými nežádoucími účinky.

Jako standardy pro popis retence barbiturátů byl použit amobarbital, barbital, hexobarbital, fenobarbital pentobarbital a kyselina barbiturová. Struktury jsou zobrazeny v kapitole 2.1.4.5. Separace těchto látek byly prováděny v HILIC (80-90 % ACN) a v RP (15-35 % ACN) separačním módu, s UV detekce při vlnové délce 214 nm.

Hodnoty retenčních faktorů k_{exp} jsou uvedeny v Tabulce 14. Z těchto hodnot byly sestrojeny grafické závislosti logaritmu retenčního faktoru k , $\log k$, na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro HILIC (Obrázek 28) a pro RP separační mód (Obrázek 29) a grafická závislost logaritmu retenčního faktoru, $\log k$, na logaritmu obsahu vody, $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi obou separačních módů (Obrázek 30 a Obrázek 31). Proložení rovnicí 8 bylo v prvním případě nevhodné, zejména pro separační mód v oblasti HILIC. Některé hodnoty retenčních faktorů, k_{exp} , barbiturátů jsou menší než 0,1 a jejich logaritmus je v záporných hodnotách. Naopak korelační koeficienty v RP separačním módu, po proložení rovnice 9, nejsou menší než 0,99 (Tabulka 16). Pomocí rovnice 8 a rovnice 9 byly vypočítány retenční faktory $k_{(rovnice\ 8)}$ (Tabulka 15) a $k_{(rovnice\ 9)}$ (Tabulka 16) pro kyselinu barbiturovou a látek zadržujících se v RP separačním módu.

Kyselina barbiturová je nejvíce zadržovanou látkou, v porovnání s ostatními, v HILIC separačním módu a eluuje se až při vyšším podílu vody v mobilní fázi. Retence barbitalu, hexobarbitalu, pentobarbitalu a fenobarbitalu se od sebe velmi neodlišují. Na rozdíl od HILIC, v RP separačním módu retence barbiturátů pomalu roste se zvyšujícím se podílem vody ve vodně-organické mobilní fázi. Hexobarbital, pentobarbital a fenobarbital, mají v RP separačním módu retenci vyšší, barbital má oproti výše zmiňovaným retenci nižší. Retence kyseliny barbiturové v tomto módu je příliš nízká, její $\log k$ se nachází v záporných hodnotách. Odlišný průběh retence této látky je může být pravděpodobně způsoben její strukturou.

Vliv složení mobilní fáze na retenci barbiturátů je znázorněn na Obrázku 32. K popisu retence barbiturátů v celém rozsahu podílu vodné složky ve vodně-organické mobilní fázi (0-100 %) byla použita tříparametrová rovnice 11 a čtyřparametrová rovnice 12. Rovnice 11 byla použita pro amobarbital a hexobarbital, kde se proložení jeví jako vhodnější. Čtyřparametrová rovnice 12 byla použita pro ostatní barbituráty, včetně kyseliny barbiturové. Objemový podíl vody, φ_{min} , při přechodu mezi RP a HILIC byl vypočítán pomocí rovnic 13 a 14. Oblast minima křivek je posunuta do levé části závislosti. Výjimku tvoří kyselina barbiturová, jejíž minimum křivky je výrazně posunuto doprava, a nachází se za oblastí 50% pufrované vodně-organické mobilní fáze, $\varphi_{min} = 0,59$ (Tabulka 17).

Obrázek 33 znázorňuje separaci barbiturátů v HILIC separačním módu (95% ACN), který potvrzuje, že v tomto módu je retence nízká. Amobarbital, hexobarbital a pentobarbital se elují jako jeden pík, dále pak barbital, následovaný fenobarbitalem. Kyselinu barbiturovou nebylo možné identifikovat, neboť za těchto podmínek byla silně zadržovaná v koloně. Na Obrázku 34 lze pozorovat isokratickou separaci v 30% pufrovaném vodném acetonitrilu, kde bylo možné samostatně identifikovat tři látky. Zde se látky elovaly v pořadí kyselina barbiturová a barbital samostatně, dále amobarbital, hexobarbital a pentobarbital jako jeden pík a jako poslední fenobarbital.

Monolitická kolona DiEDMA vykazuje pro barbituráty retenci pouze v RP separačním módu, avšak ani s vysokým obsahem vody v mobilní fázi nedošlo k úplnému rozdělení.

U monolitické kolony BIGDMA byla také kyselina barbiturová s $\varphi_{min} = 0,53$ se zadržovala více oproti ostatním barbiturátům. Substituované barbituráty jsou méně polární a výrazně méně udržovány při vysokých koncentracích acetonitrilu (> 50%). Fenobarbital, pentobarbital, amobarbital a hexobarbital mají velmi podobnou retenci jak RP tak i v HILIC separačním módu [75]. V 60 % pufrovaném acetonitrilu bylo možné identifikovat všech šest látek v pořadí eluce barbital, amobarbital, pentobarbital, hexobarbital, fenobarbital a kyselina

barbiturová, ale nebylo dosaženo nulové linie. V 30 % pufovaném ACN byly úspěšně odděleny čtyři látky. Na rozdíl od monolitické kolony DiEDMA poskytuje monolitická kolona BIGDMA duální retenční mechanismu pro tuto skupinu látek, nicméně až na kyselinu barbiturovou, je tento mód příliš úzký (0-16 % vody v mobilní fázi) [1,74].

3.6 Separace sulfonamidů

Poslední skupinou látek, u kterých byl na koloně DiEDMA testován duální retenční mechanismus byly sulfonamidy. Tato sloučeniny mají všestranné využití zejména pro farmaceutický průmysl. Nejčastěji se používají k léčbě bakteriálních infekcí a jako antibiotika.

K popisu retence sulfonamidů byly změřeny retenční faktory k_{exp} v HILIC (98-90 % ACN) a v RP (40-20 % ACN) separačním módu, s UV detekcí při vlnové délce $\lambda = 214$ nm. Těmito standardy byly sulfadimidin, sulfanilamid, ftalazol, sulfaguanidin, alesten a sulfathiazol. Struktury sulfonamidů jsou zobrazeny v kapitole 2.1.4.6.

Hodnoty retenčních faktorů k_{exp} jsou uvedeny v Tabulce 18. Z těchto dat byly sestrojeny grafické závislosti logaritmu retenčního faktoru $\log k$, na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi pro HILIC (Obrázek 35) a pro RP separační mód (Obrázek 36) a logaritmu retenčního faktoru $\log k$, na logaritmu obsahu vody, $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi rovněž pro HILIC (Obrázek 37) a pro RP (Obrázek 38) separační mód. Proložení rovnicí 8 nebylo vhodné, korelační koeficient se u některých látek pohyboval okolo hodnoty 0,91 (Tabulka 19). Po proložení rovnicí 9 v grafické závislosti logaritmu retenčního faktoru k na logaritmu vody, $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$, se korelační koeficienty, R^2 , zvýšily na hodnoty 0,98-0,99 v obou separačních módech (Tabulka 20). Pro HILIC separační mód byla ještě sestrojena grafická závislost retenčního faktoru k , na obsahu vody, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, v mobilní fázi a proložena tříparametrovou rovnicí 10 (Obrázek 39), kromě ftalazolu a sulfoguanidinu, u kterých toto proložení nebylo možné. Hodnoty a , b a m jsou uvedeny v Tabulka 21. Pomocí rovnic 8, 9 a 10 byly také vypočítány retenční faktory $k_{(rovnice\ 8)}$, $k_{(rovnice\ 9)}$ a $k_{(rovnice\ 10)}$ jednotlivých látek pro oba separační módy. Hodnoty modelu rovnice 10, $k_{(rovnice\ 10)}$ (Tabulka 21) jsou nejbližší k_{exp} .

Sulfonamidy jsou na koloně DiEDMA zadržovány v HILIC i RP separačním módu. V HILIC módu vykazoval nejnižší retenci sulfadimidin. Všechny logaritmy retenčního faktoru k byly v minusových hodnotách. Nejvyšší retence na koloně DiEDMA poskytovaly ftalazol a sulfaguanidin. S postupným přidáváním vody do mobilní fáze a přecházením do RP

separačního módu se retence zvyšovala. V RP separačním módu byl nejvíce zadržovanou látkou ftalazol, následovaný sulfathiazolem a nejméně zadržován byl sulfaguanidin.

Pro popis retence sulfonamidů v rozsahu 0-100 % vodné složky ve vodně-organické mobilní fázi, byla použita čtyřparametrová rovnice 12 (Obrázek 40). Objemový podíl vody, φ_{min} , přechodu mezi HILIC a RP separačním mechanismem byl vypočítán pomocí rovnice 14. Hodnoty φ_{min} sulfonamidů se naházejí spíše v levé části závislosti a pohybují se v rozmezí od 0,25 pro sulfadimidin do 0,38 pro sulfaguanidinu (Tabulka 22).

Obrázek 41 zobrazuje isokratickou separaci sulfonamidů v HILIC separačním módu při 95% ACN v mobilní fázi. Za těchto podmínek došlo k separaci a identifikaci všech šesti testovaných látek a to v pořadí eluce sulfadimidin, sulfanilamid, ftalazol, sulfathiazol, alesten a sulfaguanidin. S vyšším podílem vody v mobilní fázi (92 % ACN) byl vzorek rozdělen, ale v tomto případě nebylo již dosaženo dostatečné selektivity pro ftalazol a sulfanilamid (Obrázek 42). Na Obrázku 43 lze vidět separaci v 30% pufrovaném vodném acetonitrilu. Tyto podmínky neposkytovaly dostatečnou selektivitu a nebylo dosaženo nulové linie. Bylo získáno pět píků sulfonamidů eluujících se v pořadí sulfoguanidin, společně sulfadimidin a alesten, následoval sulfanilamid, sulfathiazol a ftalazol. Přesto lze konstatovat, že monolitická kolona DiEDMA je schopna separovat látky jak v HILIC tak i v RP separačním módu.

Sulfonamidy na koloně BIGDMA vykazují také duální retenční mechanismus. Poskytují retenci při vysokých i nízkých koncentracích acetonitrilu s výjimkou alestenu a sulfadimidinu, které jsou nejméně zadržovanou látkou v HILIC separačním módu. Retence látek stoupá s přidáním vody v mobilní fázi a přechodu do RP separačního módu, kde je nejvíce zadržovanou látkou sulfathiazol, následující sulfadimidinem a ftalazolem. Toto pořadí je od retence na koloně DiEDMA odlišné. Objemový podíl vody, φ_{min} , při přechodu mezi HILIC a RP separačním módem se pohybuje v rozsahu od 0,14 pro sulfadimidin až 0,35 pro sulfaguanidin. Přechod mezi HILIC a RP systéme sulfadimidinu na koloně BIGDMA nastává při nižším podílu vody v mobilní fázi, než na koloně DiEDMA. Při separaci sulfonamidů v 90% acetonitrilu nebylo dosaženo dostatečné selektivity pro sulfanilamin a sulfathiazol. Při separaci v RP separačním módu (40% ACN) bylo získáno pět píků, kde spolu koleují pouze sulfadimidin a ftalazol [1,74].

4 Závěr

Cílem této diplomové práce, v návaznosti na disertační práci Ing. Magdy Staňkové, byla příprava polymethakrylátové zwiteriontové monolitické kolony, DiEDMA, pro separaci nízkomolekulárních polárních látek v HILIC a RP separačním módu. Tato kolona byla připravena tepelnou polymerizací s zwiteriontovým funkčním monomerem MEDSA, síťujícím monomerem ethylendioxydimethakrylát a klasickou porogenní směsí v křemenné kapiláře. Takto připravená monolitická kolona poskytovala účinnost téměř 70 000 teoretických pater na metr při průtoku mobilní fáze 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Na této koloně byly separovány jednotlivé skupiny polárních látek, kterými byly nukleové báze a nukleosidy, deriváty triazinů, deriváty kyseliny ftalové, barbituráty a sulfonamidy za isokratických podmínek v mobilní fázi s vysokým obsahem acetonitrilu (HILIC) a s vysokým obsahem vody (RP). Retence a separace těchto skupin byla posléze porovnána s již dříve připravenou monolitickou kolonou BIGDMA, která se osvědčila jako účinná pro separace látek v těchto systémech.

Bylo zjištěno, že monolitická kolona DiEDMA poskytuje duální retenční mechanismu pro deriváty kyseliny ftalové, kde docházelo k retenci látek jak v HILIC tak i v RP separačním módu, a bylo možné identifikovat většinu standardů separovaných ve směsi. V porovnání s monolitickou kolonou BIGDMA dochází k přechodu mezi HILIC a RP systémem až při vyšším podílu vody v mobilní fázi (0,36-0,44 pro DiEDMA a 0,30-0,37 pro BIGDMA).

Monolitická kolona DiEDMA poskytuje také duální retenční mechanismus pro sulfonamidy. V tomto případě však za daných podmínek nedošlo k úplnému rozdělení testovaných látek ani v RP a ani v HILIC separačním módu. Nicméně, ani na koloně BIGDMA nebylo dosaženo za daných podmínek dostatečné selektivity a tyto látky nebyly rozděleny na jednotlivé píky.

U ostatních skupin testovaných látek duální retenční mechanismus nebyl na koloně DiEDMA prokázán. Nukleové báze a nukleosidy byly zadržovány pouze v HILIC módu, s vysokým obsahem acetonitrilu v mobilní fázi. Retence v RP separačním módu byla nízká, a látky nebylo možné od sebe oddělit. Na rozdíl koloně DiEDMA, která poskytuje retenci všech testovaných látek až při vyšším obsahu vody (10 %) v mobilní fázi je monolitická kolona BiGDMA schopna poskytovat retenci a eluovat všechny látky (kromě silně zadržovaného guanosinu) i při vysokém obsahu acetonitrilu v mobilní fázi.

Opačným příkladem byly deriváty triazinů. Všechny deriváty triazinů se v HILIC módu eluovaly s mrtvým objemem kolony, proto je bylo možné oddělit pouze v RP separačním módu s vysokým podílem vody v mobilní fázi. V tomto režimu došlo k separaci všech testovaných látek pouze pomocí isokratických podmínek. Nevýhodou však byla dlouhá doba separace. V tomto případě by bylo vhodné použít gradientovou eluci. Deriváty triazinů na koloně BIGDMA vykazovaly podobnou retenci. Na rozdíl od kolony DiEDMA bylo možné identifikovat všech sedm látek v RP módu již při nižším obsahu vody v mobilní fázi. V HILIC separačním módu tyto látky nejsou vůbec zadržovány a jejich retence postupně roste se zvyšujícím se obsahem vody v mobilní fázi.

Barbituráty vykazovaly na koloně DiEDMA retenci pouze v RP separačním módu. Bohužel však ani za vyššího obsahu vody v mobilní fázi separaci všech testovaných látek nedošlo, protože některé koeluovaly. Výjimkou byla kyselina barbiturová, která se oproti výše zmiňovaným barbiturátům silně zadržovala v HILIC separačním módu a naopak velmi slabě v RP módu. Monolitická kolona BIGDMA vykazovala velmi úzký HILIC mód. Stejnou výjimku tvořila i kyselina barbiturová, která se v tomto módu také silně zadržovala. I pro případ monolitické kolony BIGDMA je výhodnější využití separace v RP separačním módu.

Monolitická kolona DiEDMA s zwitteriontovým funkčním monomerem MEDSA poskytuje pro různé skupiny látek HILIC i RP separační mód. Takovouto kolonu je možno použít k separaci široké škály látek, stejně tak, jako kolonu BIGDMA. Retence látek na kolonách nejsou výrazně odlišné. Avšak rozsah jednotlivých módů je závislý nejen na podmínkách separace a struktuře separovaných vzorků, ale také na typu síťujícího monomeru pro přípravu polymethakrylátové monolitické kolony.

5 Seznam literatury

- [1] M. Staňková, Disertační práce, *Univerzita Pardubice*, (2015), 194.
- [2] U. D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997
- [3] A. Ahmed, W. Abdelmagid, H. Ritchie, P. Myers, H. Zhang, *Investigation on synthesis of spheres-on-sphere silica particles and their assessment for high performance liquid chromatography applications*, *J. Chromatogr. A*, 1270 (2012) 194-203.
- [4] K. Cabrera, *Applications of silica-based monolithic HPLC columns*, *J. Sep. Sci*, 27, (2004) 843-852.
- [5] J. Churáček a kolektiv, *Analytická separace látek*, *Nakladatelství technické literatury* (1990), 202.
- [6] P. Appelblad, T. Jonsson, W. Jiang, K. Irgum, *Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase*, *J. Sep. Sci*, 31 (2008) 1529-1536.
- [7] M. R. Gama, R. G. C. Silva, C. H. Coliins, C. B. G. Bottoli, *Hydrophilic interaction chromatography*, *TrAC*, 37 (2012) 48-60.
- [8] P. Jandera, T. Hájek, M. Staňková, *Monolithic and core-shell columns in comprehensive two-dimensional HPLC: a review*, *Anal Bioanal Chem*, 407 (2015) 139-151.
- [9] M. Krejčí, *Liquid Chromatography with Small-Bore Columns*, *Advancet insrumental Methods of Chemical Analysis*, *Academia Praha*, (1993), 270.
- [10] P. Coufal, M. Čihák, J. Suchánková, E. Tesařová, *Preparation and Testing of Methacrylate Monolithic Columns in Capillary Liquid Chromatography*, *Chem. Listy*, 95 (2001) 509-512.

- [11] P. Coufal, M. Čihák, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková, K. Stulík, *Methacrylate monolithic columns of 320 μm I.D. for capillary liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 946 (2002) 96-106.
- [12] S. Hjerten, J. L. Liao, R. Zhang, *High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds*, J. Chromatogr. A, 473 (1989) 273-275.
- [13] K. K. Unger, R. Skudas, M. M. Schulte, *Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal*, J. Chromatogr. A, 1184 (2008) 393-415.
- [14] F. Švec, *Monolitické stacionární fáze pro HPLC. Město zrození: Praha*, Chem. Listy, 98 (2004) 232-238.
- [15] F. Svec, *Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths*, J. Sep. Sci., 27 (2004) 747-766.
- [16] M. B. Buchmeiser, *Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications*, Polymer, 48 (2007) 2187-2198.
- [17] J. Urban, P. Jandera, *Polymethacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography*, J. Sep. Sci., 31 (2008) 2521-2540.
- [18] Y. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, *Recent advances in monolithic columns for protein and peptide separation by capillary liquid chromatography*, Anal. Bioanal. Chem., 405 (2013) 2095-2106.
- [19] G. Ping, W. Zhang, L. Schmitt-kopplin, P. Zhang, *Rapid separation of nucleosides by capillary electrochromatography with a methacrylate-based monolithic stationary phase*, J. Chromatogr. A, 57 (2003) 629-633.
- [20] H. Fu, Ch. Xie, J. Dong, X. Huang, H. Zou, *Monolithic Column with Zwitterionic Stationary Phase for Capillary Electrochromatography*, Anal. Chem., 76 (2004) 4866-4874.
- [21] F. Roohi, M. Antonietti, M. M. Titirici, *Thermo-responsive monolithic materials*,

- J. Chromatogr. A, 1203 (2008) 160-167.
- [22] J. Vojta, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, Z. Bosáková, *Preparation and Application of Monolithic Columns as Modern Separation Media*, Chem. Listy, 108 (2014) 127-134.
- [23] H. Oberacher, C. G. Huner, *Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry*, Trends. Anal. Chem., 21 (2002) 166-174.
- [24] H. Lin, J. Ou, Z. Zhang, J. Dong, M. Wu, H. Zou, *Facile Preparation of Zwitterionic Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary Column with an Improved “One-Pot” Approach for Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography (HILIC)*, Anal. Chem., 84 (2012) 2721-2728.
- [25] Z. Jiang, N. W. Smith, P. D. Ferguson, M. R. Taylor, *Hydrophilic Interaction Chromatography Using Methacrylate-Based Monolithic Capillary Column for the Separation of Polar Analytes*, Anal. Chem., 79 (2007) 1243-1250.
- [26] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1184 (2008) 474-503.
- [27] D. Moravcová, P. Jandera, J. Urban, J. Planetaová, *Comparison of monolithic silica and polymethacrylate capillary columns for LC*, J. Sep. Sci., 27 (2004) 789-800.
- [28] P. Jandera, M. Staňková, V. Škeříková, J. Urban, *Cross-linker effects on the separation efficiency on (poly)methacrylate capillary monolithic columns. Part I. Reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1274 (2013) 97-106.
- [29] P. Jandera, *Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review*, J. Chromatogr. A, 1313 (2013) 37-53.
- [30] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*, Analytica Chimica Acta, 692 (2011) 1-25.
- [31] J. Urban, P. Jandera, *Recent advances in the design of organic polymer monoliths for reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography separations of small*

- molecules*, Anal. Bioanal. Chem., 405 (2013) 2123-2131.
- [32] V. Škeříková, P. Jandera, *Effects of the operation parameters on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic monolithic capillary columns*, J. Chromatogr. A, 1271 (2010) 7981-7989.
- [33] P. Jandera, M. Staňková, T. Hájek, *New zwitterionic polymethacrylate monolithic columns for one- and two-dimensional microliquid chromatography* J. Sep. Sci, 36 (2013) 2430-2440.
- [34] P. Jandera, M. Staňková, *The Effects of the Column Length on the Efficiency of Capillary Zwitterionic Organic Polymer Monolithic Columns in HILIC Chromatography*, Chromatographia, 78 (2015) 853-859.
- [35] P. Jandera, J. Urban, V. Škeříková, P. Laingmaier, K. Kubíčková, J. Planeta, *Polymethacrylate monolithic and hybrid particle-monolithic columns for reversed-phase and hydrophilic interaction capillary liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 22-33.
- [36] Z. Jiang, N. W. Smith, Z. Liu, *Preparation and application of hydrophilic monolithic columns*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 2350-2361.
- [37] A. Wijekoon, M. E. Gangoda, R. B. Gregory, *Characterization and, multi-mode liquid chromatographic application of 4-propylaminoethyl benzoic acid bonded silica-A zwitterionic*, J. Chromatogr. A, 1270 (2013) 212-218.
- [38] J. Vacek, L. Onofrejevová, B. Klejdus, V. Kubáň, *Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek*, Chem. Listy, 13 (2009) 381-385.
- [39] S. Di Palma, P. J Boersema, A. J. R. Heck, S. Mohammed, *Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-CHILIC) Provide High Resolution Separation and Increase Sensitivity in Proteome Analysis*, Anal.Chem., 83 (2011) 3440 -3447.
- [40] C. Ó. Ríordáin, P. Nesterenko, B. Paull, *Zwitterionic ion chromatography with carboxybetaine surfactant-coated particle packed and monolithic type columns*,

- J. Chromatogr. A, 1070 (2005) 71-78.
- [41] D. Moravcová, J. Planeta, V. Kahle, M. Roth, *Zwitterionic silica-based monolithic capillary columns for isocratic and gradient hydrophilic interaction liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1270 (2012) 178-185.
- [42] Z. Jiang, N. W. Smith, P. D. Ferguson, M. R. Taylor, *Novel highly hydrophilic zwitterionic monolithic column for hydrophilic interaction chromatography*, J. Sep. Sci, 32 (2009) 2544-2555.
- [43] D. N. Gunasena, Z. El Rassi, *Organic monoliths for hydrophilic interaction electrochromatography/chromatography and immunoaffinity chromatography*, Electrophoresis, 83 (2012) 251-261.
- [44] M. Staňková, P. Jandera, V. Škeříková, J. Urban, *Cross-linker effects on the separation efficiency on (poly)methacrylate capillary monolithic columns. Part II. Aqueous normal-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1289 (2013) 47-57.
- [45] Z. Jiang, N. W. Smith, Z. Liu, *Preparation and application of hydrophilic monolithic columns*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 2350-2361.
- [46] Z. Liu, Y. Peng, T. Wang, G. Yuan, Q. Zhang, J. Guo, Z. Jiang, *Preparation and application of novel zwitterionic monolithic column for hydrophilic interaction chromatography*, J. Sep. Sci, 36 (2013) 262-269
- [47] M. Staňková, Diplomová práce, *Univerzita Pardubice* (2011) 194.
- [48] A. J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, J. Chromatogr. A, 499 (1990) 177-196.
- [49] L. Lv, Z. Lin, F. Svec, *Hypercrosslinked Large Surface Area Porous Polymer Monoliths for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography of Small Molecules Featuring Zwitterionic Functionalities Attached to Gold Nanoparticles Held in Layered Structure*, Anal. Chem, 84 (2012) 8457-8460.
- [50] Z. Jiang, J. Reilly, B. Everatt, N. W. A. Smith, *Novel zwitterionic polyphosphorylcholine monolithic column for hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1216

- (2009) 2439-2448.
- [51] F. Svec, *Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation*, J. Chromatogr. A, 1217 (2006) 902-924
- [52] A. Premstaller, H. Oberacher, Ch. G. Huber, *High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Single- and Double-Stranded Nucleic Acids Using Monolithic Capillary Columns*, Anal. Chem., 72 (2000) 4386-4393.
- [53] X. D. Chang, X. T. Peng, Q. W. Yu, B. F. Yuan, Y. Q. Feng, *Preparation of a Novel Amino-Phosphate Zwitterionic Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Chromatography*, Chromatographia, 76 (2013) 1569-1576.
- [54] E. P. Nesterenko, P. N. Nesterenko, B. Paull, *Zwitterionic ion-exchangers in ion chromatography: A review of recent developments*, Analytica Chimica Acta, 652 (2009) 3-21.
- [55] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Tabuko, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, *Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 5903-5919.
- [56] G. Yuan, Y. Peng, Z. Liu, J. Hong, Y. Xiao, J. Guo, N. W. Smith, J. Crommen, Z. Jiang, *A facile and efficient strategy to enhance hydrophilicity of zwitterionic sulfoalkylbetaine type monoliths*, J. Chromatogr. A, 1301 (2013) 88-97.
- [57] X. D. Cheng, Y. H. Hao, X. T. Peng, B. F. Yuan, Z. G. Shi, Y. Q. Feng, *Preparation and chromatographic evaluation of zwitterionic stationary phases with controllable ratio of positively and negatively charged groups*, Talanta, 141 (2015) 8-14.
- [58] H. Qui, E. Wanigasekara, Y. Zhang, T. Tran, D. W. Armstrong, *Development and evaluation of new zwitterionic Hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases based on 3-P,P-diphenylphosphonium-propylsulfonate*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 8075-8082.

- [59] P. Jandera, *HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích*, Chemmagazín, 22 (2011) 8-9.
- [60] T. Ikegami, H. Fujita, K. Hovie, K. Hosoua, N. Tanaka, *HILIC mode separation of polar compounds by monolithic silica capillary columns coated with polyacrylamide*, Anal. Bioanal. Chem., 386 (2006) 578-585.
- [61] L. Trojer, S. H. Lubbad, C. P. Bisjak, G. K. Boon, *Monolithic poly(p-methylstyrene-co-1,2-bis(p-vinylphenyl)ethane) capillary columns as novel styrene stationary phases for biopolymer separation*, J. Chromatogr. A, 1117 (2006) 56-66.
- [62] C. P. Bisjak, D. S. Lubbad, L. Trojer, G. K. Bonn, *Novel monolithic poly(phenyl acrylate-co-1,4-phenylene diacrylate) capillary columns for biopolymer chromatography*, J. Chromatogr. A, 1147 (2007) 46-52.
- [63] D. Moravcová, M. Haapala, J. Planeta, T. HoyötySaienn, R. Konstaianen, S. Wiedmer, *Separation of nucleobases, nucleosides, and nucleotides using two zwitterionic silica-based monolithic capillary columns coupled with tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1373 (2014) 90-96.
- [64] T. Wang, Y. Chen, J. Ma, X. Zhang, L. Zhang, Y. Zhang, *Ionic liquid-based zwitterionic organic polymer monolithic column for capillary hydrophilic interaction chromatography*, Analyst, 140 (2015) 5585-5592.
- [65] K. Horie, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1164 (2007) 198-205.
- [66] M. L. Chen, M. L. Li, B. F. Yuan, Y. Q. Feng, *Preparation and characterization of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1230 (2012) 54-60.
- [67] P. Holdšvehová, J. Suchánková, M. Bunček, V. Bačková, P. Coufal, *Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography*, J. Biochem. Biophys. Methods,

- 70 (2007) 23-29.
- [68] J. Lin, J. Lin, X. Lin, Z. Xie, *Preparation of a mixed-mode hydrophilic interaction/anion-exchange polymeric monolithic stationary phase for capillary liquid chromatography of polar analytes*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 801-806.
- [69] O. Núñez, T. Ikegami, K. Miyamoto, N. Tanaka, *Study of a monolithic silica capillary column coated with poly(octadecyl methacrylate) for the reversed-phase liquid chromatographic separation of some polar and non-polar compounds*, J. Chromatogr. A, 1175 (2007) 7-15.
- [70] J. Urban, V. Škeříková, P. Jandera, R. Kubíčková, M. Pospíšilová, *Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds*, J.Sep.Sci., 32 (2009) 2530-2543.
- [71] P.Jandera, T. Hájek, M.Staňková, K.Vyňuchalová, P.Česla, *Optimization of comprehensive two-dimensional gradient chromatography coupling in-line hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1268 (2012) 91-101.
- [72] P. Jandera, T. Hájek, *Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants*, J. Sep. Sci, 32 (2009) 3603-3619.
- [73] P. Jandera, T. Hájek, V. Škeříková, J. Soukup, *Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column*, J. Sep. Sci., 33 (2010) 841-852.
- [74] M. Staňková, P. Jandera, *Dual Retention Mechanism in Two-Dimensional LC Separations of Barbiturates, Sulfonamides, Nucleic Bases and Nucleosides on Polymethacrylate Zwitterionic Monolithic Micro-Columns*, Chromatographia, 79 (2016) 657-664

6 Přílohová část

6.1 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Retenční data pro charakterizaci kolony DiEDMA

Tabulka 2 - Hodnoty retenčních faktorů k nukleových bází a nukleosidů (rovnice 4)

Tabulka 3 - Hodnoty retenčního faktoru k nukleových bází a nukleosidů z modelu rovnice 8 pro HILIC separační mód

Tabulka 4 - Hodnoty retenčního faktoru k nukleových bází a nukleosidů z modelu rovnice 9 pro HILIC separační mód

Tabulka 5 - Hodnoty retenčního faktoru k nukleových bází a nukleosidů z modelu rovnice 10 pro HILIC separační mód

Tabulka 6 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b nukleových bází a nukleosidů podle rovnice 12 na koloně DiEDMA

Tabulka 7 - Hodnoty retenčních faktorů k derivátů triazinů (rovnice 4)

Tabulka 8 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů triazinů z modelu rovnice 8 pro RP separační mód

Tabulka 9 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů triazinů z modelu rovnice 9 pro RP separační mód

Tabulka 10 - Hodnoty retenčních faktorů k derivátů kyseliny ftalové (rovnice 4)

Tabulka 11 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů kyseliny ftalové z modelu rovnice 8 pro HILIC a RP separační mód

Tabulka 12 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů kyseliny ftalové z modelu rovnice 9 pro HILIC a RP separační mód

Tabulka 13 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b derivátů kyseliny ftalové podle rovnice 12 na koloně DiEDMA

Tabulka 14 - Hodnoty retenčních faktorů k barbiturátů (rovnice 4)

Tabulka 15 - Hodnoty retenčního faktoru k barbiturátů z modelu rovnice 8 pro HILIC a RP separační mód

Tabulka 16 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů kyseliny ftalové z modelu rovnice 9 pro HILIC a RP separační mód

Tabulka 17 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b barbiturátů podle rovnice 12 na koloně DiEDMA

Tabulka 18 - Hodnoty retenčních faktorů k sulfonamidů (rovnice 4)

Tabulka 19 - Hodnoty retenčního faktoru k sulfonamidů z modelu rovnice 8 pro HILIC a RP separační mód

Tabulka 20 - Hodnoty retenčního faktoru k sulfonamidů z modelu rovnice 9 pro HILIC a RP separační mód

Tabulka 21 - Hodnoty retenčního faktoru k sulfonamidů z modelu rovnice 10 pro HILIC separační mód

Tabulka 22 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b sulfonamidů podle rovnice 12 na koloně DiEDMA

6.2 Seznam obrázků

Obrázek 7 - Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra, H , (rovnice 6) na lineární rychlosti mobilní fáze, u , (rovnice 3) alkylbenzenů pro kolonu DiEDMA (rovnice 7)

Obrázek 8 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 8)

Obrázek 9 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 8)

Obrázek 10 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 9)

Obrázek 11 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 9)

Obrázek 12 - Závislost retenčního faktoru, k , na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 10)

Obrázek 13 - Vliv vodné frakce $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , nukleových bází a nukleosidů na koloně DiEDMA (rovnice 12)

Obrázek 14 - Separace nukleových bází a nukleosidů na koloně DiEDMA (90 % ACN)

Obrázek 15 - Separace nukleových bází a nukleosidů na koloně DiEDMA (80% ACN)

Obrázek 16 - Separace nukleosidů a nukleových bází na koloně DiEDMA (5% ACN)

Obrázek 17 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů triazinů (rovnice 8);

Obrázek 18 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů triazinů (rovnice 9)

Obrázek 19 - Separace triazinů na koloně DiEDMA (40 % ACN)

Obrázek 20 - Separace triazinů na koloně DiEDMA (20 % ACN)

Obrázek 21 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 8)

Obrázek 22 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 8)

Obrázek 23 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 9)

Obrázek 24 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 9)

Obrázek 25 - Vliv vodné frakce, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , derivátů kyseliny ftalové na koloně DiEDMA (rovnice 12)

Obrázek 26 - Separace derivátů kyseliny ftalové na koloně DiEDMA (92 % ACN)

Obrázek 27 - Separace derivátů kyseliny ftalové na koloně DiEDMA (25 % ACN)

Obrázek 28 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód barbiturátů (rovnice 8)

- Obrázek 29** - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód barbiturátů (rovnice 8)
- Obrázek 30** - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód barbiturátů (rovnice 9)
- Obrázek 31** - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód barbiturátů (rovnice 9)
- Obrázek 32** - Vliv vodné frakce, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , barbiturátů na koloně DiEDMA (rovnice 12 a 13)
- Obrázek 33** - Separace barbiturátů na koloně DiEDMA (95 % ACN)
- Obrázek 34** - Separace barbiturátů na koloně DiEDMA (30% ACN)
- Obrázek 35** - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód sulfonamidů (rovnice 8)
- Obrázek 36** - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód sulfonamidů (rovnice 8)
- Obrázek 37** - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód sulfonamidů (rovnice 8)
- Obrázek 38** - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód sulfonamidů (rovnice 9)
- Obrázek 39** - Závislost retenčního faktoru, k , na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód sulfonamidů (rovnice 9)
- Obrázek 40** - Vliv vodné frakce $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , sulfonamidů na koloně DiEDMA (rovnice 12)
- Obrázek 41** - Separace sulfonamidů na koloně DiEDMA (95 % ACN)
- Obrázek 42** - Separace sulfonamidů na koloně DiEDMA (92 % ACN)
- Obrázek 43** - Separace sulfonamidů na koloně DiEDMA (30 % ACN)

Tabulky

Tabulka 1 - Retenční data pro charakterizaci kolony DiEDMA

d = 320 μ m; l = 145 mm; F_m- průtok mobilní fáze; t_R - retenční čas, k - retenční faktor (rovnice 4); w_{0,5} - šířka piku v polovině výšky; u - lineární rychlost (rovnice 3); N - počet teoretických pater (rovnice 5); H - výškový ekvivalent teoretického patra (rovnice 6)

	F _m , μ l/min	t _R , min	k	w _{0,5} , min	P, MPa	u, mm/s	N, tp/m	H, μ m
benzen	5,0	2,80	1,26	0,15	132,2	1,34	24800	40,3
	4,0	3,49	1,28	0,18	132,2	1,08	32400	30,9
	3,0	4,68	1,24	0,21	132,2	0,79	35800	27,9
	2,0	7,20	1,21	0,29	132,2	0,51	48100	20,8
	1,0	16,07	1,19	0,58	132,2	0,23	59600	16,8
	0,5	28,64	3,03	1,53	132,2	0,18	47800	20,9
toluen	5,0	3,08	1,75	0,17	104,9	1,35	26600	37,7
	4,0	3,84	1,75	0,20	104,9	1,08	31800	31,4
	3,0	5,14	1,69	0,24	104,9	0,79	39400	25,4
	2,0	7,92	1,65	0,34	104,9	0,51	48200	20,7
	1,0	17,62	1,62	0,66	104,9	0,23	61300	16,3
	0,5	34,25	3,69	1,53	104,9	0,18	57500	17,4
etylbenzen	5,0	3,53	2,28	0,21	77,9	1,35	28100	35,5
	4,0	4,38	2,29	0,24	77,9	1,08	32600	25,4
	3,0	5,85	2,21	0,30	77,9	0,79	39100	25,6
	2,0	9,01	2,17	0,41	77,9	0,51	50900	19,7
	1,0	20,02	2,12	0,78	77,9	0,23	62100	16,1
	0,5	47,70	4,59	1,70	77,9	0,18	61500	16,3
propylbenzen	5,0	4,10	0,54	0,11	50,8	1,35	29900	33,5
	4,0	5,09	0,56	0,12	50,8	1,08	31600	31,6
	3,0	6,78	0,53	0,15	50,8	0,79	40100	24,9
	2,0	10,47	0,52	0,20	50,8	0,51	50900	19,7
	1,0	23,20	0,51	0,41	50,8	0,23	61200	16,4
	0,5	54,05	1,14	0,81	50,8	0,18	81200	12,3
butylbenzen	5,0	4,95	0,70	0,12	24,0	1,35	31000	31,9
	4,0	6,13	0,72	0,13	24,0	1,08	35900	27,9
	3,0	8,76	0,69	0,16	24,0	0,79	43200	23,2
	2,0	12,56	0,67	0,22	24,0	0,51	51300	19,5
	1,0	27,85	0,66	0,44	24,0	0,23	67500	14,8
	0,5	62,83	1,56	0,88	24,0	0,18	64700	15,4
amylbenzen	5,0	5,96	0,94	0,13	13,3	1,35	30800	31,9
	4,0	7,34	0,96	0,15	13,3	1,08	36600	32,5
	3,0	9,77	0,92	0,18	13,3	0,79	40600	27,3
	2,0	15,01	0,90	0,25	13,3	0,51	50500	24,7
	1,0	33,07	0,89	0,48	13,3	0,23	69000	19,8
	0,5	74,68	2,56	1,19	13,3	0,18	74400	14,1

Tabulka 2 - Hodnoty retenčních faktorů k nukleových bází a nukleosidů (rovnice 4); $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ čínicí rozmezí od 0,02 do 0,25 platí pro HILIC separační mód a od 0,85 do 0,95 pro RP separační mód

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	k_{exp}								
	adenin	adenosin	cytidin	cytosin	guanosin	uracil	thymín	2-deoxyguanosin	2-deoxyadenosin
0,02	12,12	-	-	32,13	-	6,35	2,41	-	7,73
0,04	6,22	12,41	-	18,53	-	3,99	1,65	-	4,48
0,05	4,60	7,57	-	12,36	-	2,86	1,13	-	3,19
0,08	2,28	3,66	16,25	6,23	-	1,85	0,75	15,75	1,82
0,10	1,62	2,34	9,88	5,27	-	1,45	0,68	8,48	1,30
0,15	-	-	3,72	-	5,58	-	-	3,05	-
0,20	-	-	1,87	-	2,58	-	-	1,51	-
0,25	-	-	-	-	1,43	-	-	-	-
0,85	0,12	0,08	0,11	0,15	0,29	0,28	0,35	0,29	0,07
0,90	0,16	0,14	0,13	0,17	0,43	0,33	0,46	0,42	0,14
0,95	0,23	0,23	0,17	0,20	0,64	0,45	0,62	0,68	0,25

Tabulka 3 - Hodnoty retenčního faktoru k nukleových bází a nukleosidů z modelu rovnice 8 pro HILIC separační mód; hodnoty a a m_{HILIC} rovnice 8, R^2 - korelační koeficient

$\varphi(H_2O)$	$k(\text{rovnice 8})$								
	adenin	adenosin	cytidin	cytosin	guanosin	uracil	thymin	2-deoxyguanosin	2-deoxyadenosin
0,02	10,80	-	-	28,73	-	5,77	2,19	-	7,06
0,04	6,56	11,10	-	18,06	-	4,00	1,45	-	4,55
0,05	5,12	8,49	-	14,32	-	3,33	1,01	-	3,65
0,08	2,42	3,81	14,68	7,14	-	1,93	0,72	14,68	1,89
0,10	1,47	2,23	10,26	4,49	-	1,34	3,02	10,26	1,22
0,15	-	-	4,18	-	5,41	-	-	4,18	-
0,20	-	-	1,71	-	2,74	-	-	1,71	-
0,25	-	-	0,70	-	1,39	-	-	0,70	-
a	1,25	1,51	1,79	1,66	1,62	0,48	0,92	1,79	1,04
m_{HILIC}	10,82	11,62	7,79	10,08	5,91	6,98	7,94	9,55	7,79
R^2	0,9845	0,9823	0,9884	0,9666	0,9939	0,9400	0,9709	0,9836	0,9884

Tabulka 4 - Hodnoty retenčního faktoru k nukleových bází a nukleosidů z modelu rovnice 9 pro HILIC separační mód; hodnoty a a m_{HILIC} rovnice 9, R^2 - korelační koeficient

$\varphi(H_2O)$	$k_{(rovnice\ 9)}$								
	adenin	adenosin	cytidin	cytosin	guanosin	uracil	thymin	2-deoxyguanosin	2-deoxyadenosin
0,02	13,20	-	-	35,06	-	6,76	2,57	-	8,43
0,04	5,51	11,76	-	15,47	-	3,55	1,45	-	3,91
0,05	4,16	7,94	-	11,89	-	2,88	1,20	-	3,05
0,08	2,30	3,47	16,58	6,83	-	1,86	0,81	15,39	1,81
0,10	1,74	2,34	9,77	5,25	-	1,51	0,67	8,71	1,41
0,15	-	-	3,74	-	5,64	-	-	3,10	-
0,20	-	-	1,89	-	2,63	-	-	1,49	-
0,25	-	-	1,11	-	1,45	-	-	0,84	-
a	-1,02	-1,39	-1,38	-0,46	-1,44	-0,75	-1,00	-1,61	-0,96
m_{HILIC}	1,26	1,76	2,37	1,18	2,66	0,93	0,83	1,11	2,55
R^2	0,9858	0,9957	0,9998	0,9784	1	0,9856	0,9725	0,9827	0,9804

Tabulka 5 - Hodnoty retenčního faktoru k nukleových bází a nukleosidů z modelu rovnice 10 pro HILIC separační mód; hodnoty a , b a m_{HILIC} rovnice 10, SD - směrodatná odchylka, D^2 - koeficient proložení

$\varphi(H_2O)$	$k_{(rovnice\ 10)}$								
	adenin	adenosin	cytidin	cytosin	guanosin	uracil	thymín	2-deoxyguanosin	2-deoxyadenosin
0,02	12,13	-	-	32,13	-	6,36	2,41	-	7,73
0,04	6,14	12,39	-	15,94	-	3,98	1,34	-	4,47
0,05	4,65	7,63	-	12,24	-	3,24	1,12	-	3,50
0,08	2,31	3,46	16,25	6,67	-	1,90	0,78	16,25	1,84
0,10	1,57	2,54	9,86	4,89	-	1,41	0,66	9,86	1,28
0,15	-	-	3,76	-	-	-	-	3,76	-
0,20	-	-	1,83	-	-	-	-	1,83	-
0,25	-	-	1,03	-	-	-	-	1,03	-
a	0,27	-0,12	0,09	0,06	-	0,39	-0,07	-0,10	0,45
SD	0,04	0,02	0,06	0,02	-	0,1	0,12	0,01	0,05
b	5,66	5,46	3,26	3,60	-	4,86	18,53	4,59	4,18
SD	0,17	1,00	0,63	0,07	-	0,68	2,62	0,02	0,38
m_{HILIC}	2,64	1,07	1,67	2,86	-	2,57	0,72	3,36	2,07
SD	0,25	0,23	0,50	0,18	-	0,68	0,15	0,44	0,06
D^2	99,99	99,88	99,94	99,99		99,67	99,93	99,99	99,99

Tabulka 6 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b nukleových bází a nukleosidů podle rovnice 12 na koloně DiEDMA
 $d = 230 \mu\text{l}$, $l = 145 \text{ mm}$, SD - směrodatná odchylka, D^2 koeficient proložení, φ_{min} objemový podíl vody při přechodu mezi HILIC a RP mechanismem (rovnice 14)

	a_1	SD	m_{RP}	SD	m_{HILIC}	SD	b	SD	φ_{min}	D^2 [%]
adenin	1,37	0,02	9,21	0,89	17,79	2,58	3,18	0,41	0,52	99,99
adenosin	1,67	0,06	20,84	4,19	61,46	21,93	1,36	0,36	0,54	99,96
cytidin	2,30	0,04	11,97	1,56	34,50	7,22	1,67	0,28	0,65	99,99
cytosin	1,75	0,01	5,39	0,46	11,70	1,21	3,63	0,34	0,66	99,99
guanosin	2,02	0,06	47,62	16,51	396,05	271,27	0,33	0,14	0,62	99,99
uracil	0,61	0,02	6,23	0,78	9,56	1,91	4,27	0,82	0,43	99,92
thymin	1,01	0,03	5,87	1,16	10,56	3,02	3,72	0,95	0,51	99,93
2-deoxyadenosin	1,11	0,02	28,24	6,05	118,17	47,68	0,78	0,20	0,54	99,99
2-deoxyguanosin	2,23	0,10	15,77	3,75	41,22	17,04	1,73	0,58	0,56	99,94

Tabulka 7 - Hodnoty retenčních faktorů k derivátů triazinů (rovnice 4); $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,02 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,60 do 0,85 pro RP separační mód

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{exp})}$						
	atrazin	simazin	desmetryn	prometryn	terbutryn	methoprotryn	terbutylazin
0,02	0,17	0,21	0,21	0,15	0,15	0,13	0,14
0,05	0,10	0,13	0,14	0,08	0,09	0,07	0,07
0,10	0,03	0,05	0,05	0,02	0,02	0,00	0,01
0,60	1,13	0,79	1,03	2,15	2,35	0,86	1,70
0,70	2,91	1,82	2,56	6,64	7,28	2,48	5,22
0,75	4,76	2,30	4,46	13,04	15,92	4,77	9,84
0,80	8,44	4,79	7,94	26,33	34,82	9,55	20,23
0,85	15,84	8,63	14,92	-	-	20,29	-

Tabulka 8 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů triazinů z modelu rovnice 8 pro RP separační mód; hodnoty a a m_{RP} rovnice 8, R^2 - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 8})}$						
	atrazin	simazin	desmetryn	prometryn	terbutryn	methoprotryn	terbutylazin
0,60	1,02	0,74	0,97	2,07	2,18	0,78	1,65
0,70	2,90	1,92	2,82	7,19	8,34	2,75	5,64
0,75	4,89	3,09	4,81	13,41	16,31	5,16	10,41
0,80	8,25	4,97	8,20	25,00	31,92	9,68	19,23
0,85	13,90	7,98	13,98	-	-	18,18	-
a	-2,71	-2,60	-2,79	-2,93	-3,16	-3,39	-2,98
m_{RP}	-4,53	-4,12	-4,63	-5,41	-5,83	-5,47	-5,33
R^2	0,9956	0,9950	0,9946	0,9962	0,9920	0,9934	0,9962

Tabulka 9 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů triazinů z modelu rovnice 9 pro RP separační mód; hodnoty a a m_{RP} rovnice 9, R^2 - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 9})}$						
	atrazin	simazin	desmetryn	prometryn	terbutryn	methoprotryn	terbutylazin
0,60	1,01	0,71	0,91	2,02	2,14	0,75	1,60
0,70	3,19	2,01	2,92	7,58	8,89	2,97	5,90
0,75	5,35	3,20	4,93	13,70	16,81	5,50	10,57
0,80	8,65	4,95	8,04	23,85	30,52	9,81	18,24
0,85	13,60	7,46	12,73	-	-	16,89	-
a	1,66	1,35	1,64	2,21	2,38	1,86	2,08
m_{RP}	-7,46	-6,76	-7,58	-8,59	-9,24	-8,96	-8,45
R^2	0,9558	0,9846	0,9846	0,9901	0,9828	0,9817	0,9896

Tabulka 10 - Hodnoty retenčních faktorů k derivátů kyseliny ftalové (rovnice 4); $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,04 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,65 do 0,85 pro RP separační mód

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{exp})}$						
	4-(hydroxymethyl) benzoová kyselina	4-formylbenzoová kyselina	kyselina toluylová	bis(2-hydroxyethyl) tereftalát	kyselina ftalová	kyselina isoftalová	kyselina tereftalová
0,04	10,69	8,49	1,21	0,29	11,38	-	-
0,05	8,20	6,24	1,01	0,24	8,03	-	-
0,08	2,30	2,31	0,48	0,12	4,13	-	-
0,10	1,63	1,57	0,38	0,07	3,02	13,91	13,10
0,65	0,48	0,97	1,61	0,08	0,87	1,29	1,29
0,75	1,12	2,41	4,38	0,48	1,68	3,29	3,25
0,80	1,74	3,87	7,69	0,98	2,39	5,78	5,79
0,85	2,90	6,43	13,94	2,13	3,48	10,87	10,93

Tabulka 11 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů kyseliny ftalové z modelu rovnice 8 pro HILIC a RP separační mód; $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,04 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,65 do 0,85 pro RP separační mód; hodnoty $a_{\text{HILIC/ RP}}$ a $m_{\text{HILIC/ RP}}$ rovnice 8, $R^2_{\text{HILIC/ RP}}$ - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 8})}$						
	4-(hydroxymethyl) benzoová kyselina	4-formylbenzoová kyselina	kyselina toluyllová	bis(2-hydroxyethyl) tereftalát	kyselina ftalová	kyselina isoftalová	kyselina tereftalová
0,04	10,53	8,27	1,19	0,30	10,73	-	-
0,05	7,55	6,19	0,97	0,24	8,62	-	-
0,08	2,78	2,60	0,53	0,12	4,48	-	-
0,10	1,43	1,46	0,35	0,07	2,89	-	-
0,65	0,43	0,95	1,58	0,08	0,86	1,39	1,22
0,75	1,05	2,44	4,62	0,43	1,73	4,00	3,53
0,80	1,63	3,91	7,91	0,99	2,44	6,79	6,01
0,85	2,54	6,26	13,52	2,24	3,46	11,53	10,21
a_{HILIC}	1,60	1,42	0,43	0,11	1,41	-	-
m_{HILIC}	14,44	12,56	8,86	10,32	9,49	-	-
R^2_{HILIC}	0,9766	0,9897	0,9843	0,9975	0,9856	-	-
a_{RP}	-2,86	-2,68	-2,83	-5,71	-2,02	-2,85	-2,91
m_{RP}	-3,84	-4,09	-4,66	-7,13	-3,01	-4,60	-4,61
R^2_{RP}	0,9981	0,9994	0,9981	0,999	0,999	0,9947	0,9939

Tabulka 12 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů kyseliny ftalové z modelu rovnice 9 pro HILIC a RP separační mód; $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,04 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,65 do 0,85 pro RP separační mód; hodnoty $a_{\text{HILIC/ RP}}$ a $m_{\text{HILIC/ RP}}$ rovnice 9, $R^2_{\text{HILIC/ RP}}$ - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 9})}$						
	4 - (hydroxymethyl) benzoová kyselina	4-formylbenzoová kyselina	kyselina toluyllová	bis(2-hydroxyethyl) tereftalát	kyselina ftalová	kyselina isoftalová	kyselina tereftalová
0,04	11,79	8,83	1,27	0,32	11,04		
0,05	7,23	5,78	0,94	0,23	8,01		
0,08	2,58	2,37	0,50	0,11	4,07		
0,10	1,58	1,55	0,37	0,08	2,95		
0,65	0,46	0,94	1,50	0,08	0,86	1,19	1,19
0,75	1,18	2,44	4,70	0,46	10,03	3,66	3,65
0,80	1,81	3,91	7,86	1,02	9,47	6,06	6,04
0,85	2,71	6,26	12,77	2,14	8,97	9,73	9,71
a_{HILIC}	-1,99	-1,71	-1,77	-2,65	-0,97	-	-
m_{HILIC}	2,19	1,90	1,34	1,54	1,44	-	-
R^2_{HILIC}	0,9936	0,9960	0,9931	0,9994	0,9949	-	-
a_{RP}	0,90	1,28	1,67	1,19	0,89	1,54	1,54
m_{RP}	-6,62	-6,98	-7,99	-12,19	-5,12	-7,82	-7,83
R^2_{RP}	0,9936	0,9960	0,9931	0,9994	0,9949	0,9875	0,9875

Tabulka 13 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b derivátů kyseliny ftalové podle rovnice 12 na koloně DiEDMA
 $d = 230 \mu\text{m}$, $l = 145 \text{ mm}$, SD - směrodatná odchylka, D^2 koeficient proložení, φ_{min} objemový podíl vody při přechodu mezi HILIC a RP mechanismem (rovnice 14)

	a_1	SD	m_{RP}	SD	m_{HILIC}	SD	b	SD	φ_{min}	D^2 [%]
kyselina 4-hydroxymethylbenzoová	1,91	0,07	9,08	0,62	10,40	1,22	7,78	1,27	0,36	99,87
kyselina 4-formylbenzoová	1,76	0,05	8,59	0,41	8,89	0,74	8,79	1,06	0,34	99,84
kyselina toluylová	0,68	0,02	8,17	0,33	6,89	0,60	9,07	1,16	0,26	99,97
bis(2-hydroxyethyl) tereftalát	0,06	0,06	14,49	1,99	19,94	5,31	3,55	0,88	0,32	99,85
kyselina ftalová	1,58	0,04	7,99	0,58	10,87	1,39	5,01	0,74	0,39	99,86

Tabulka 14 Hodnoty retenčních faktorů k barbiturátů (rovnice 4); $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,02 do 0,20 platí pro HILIC separační mód a od 0,65 do 0,85 pro RP separační mód

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{exp})}$					
	amobarbital	barbital	hexobarbital	fenobarbital	pentobarbital	kyselina barbiturová
0,02	0,36	0,69	0,25	1,17	0,43	-
0,05	0,16	0,33	0,13	0,48	0,20	-
0,08	0,07	0,18	0,07	0,28	0,10	-
0,10	0,03	0,12	0,03	0,21	0,06	15,15
0,15	-	-	-	-	-	5,88
0,20	-	-	-	-	-	2,43
0,65	1,05	-	1,07	1,50	1,17	-
0,70	1,82	0,42	1,95	2,36	1,98	0,26
0,75	3,19	0,65	3,27	4,10	3,48	0,30
0,8	5,83	0,99	5,53	7,06	6,36	0,36
0,85	-	1,49	-	-	-	0,44

Tabulka 15 - Hodnoty retenčního faktoru k barbiturátů z modelu rovnice 8 pro HILIC a RP separační mód; $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,10 do 0,20 platí pro HILIC separační mód a od 0,65 do 0,85 pro RP separační mód; hodnoty $a_{\text{HILIC/ RP}}$ a $m_{\text{HILIC/ RP}}$ rovnice 8, $R^2_{\text{HILIC/ RP}}$ - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 8})}$					
	amobarbital	barbital	hexobarbital	fenobarbital	pentobarbital	kyselina barbiturová
0,10	-	-	-	-	-	15,07
0,15	-	-	-	-	-	6,05
0,20	-	-	-	-	-	2,43
0,65	1,03	0,28	1,09	1,42	1,14	-
0,70	1,83	0,42	1,88	2,38	2,01	0,26
0,75	3,24	0,65	3,24	4,00	3,53	0,31
0,8	5,73	0,99	5,57	6,73	6,19	0,37
0,85	10,14	1,51	9,59	11,31	10,88	0,44
a_{HILIC}	-	-	-	-	-	-1,43
m_{HILIC}	-	-	-	-	-	2,62
R^2	-	-	-	-	-	0,9938
a_{RP}	-3,21	-2,95	-3,03	-3,12	-2,78	-1,68
m_{RP}	-4,96	-3,68	-4,72	-4,89	-4,51	-1,56
R^2	0,9995	0,9994	0,9989	0,9990	0,9981	0,9995

Tabulka 16 - Hodnoty retenčního faktoru k derivátů kyseliny ftalové z modelu rovnice 9 pro HILIC a RP separační mód; $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,10 do 0,20 platí pro HILIC separační mód a od 0,65 do 0,85 pro RP separační mód; hodnoty $a_{\text{HILIC/ RP}}$ a $m_{\text{HILIC/ RP}}$ rovnice 9, $R^2_{\text{HILIC/ RP}}$ - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 9})}$					
	amobarbital	barbital	hexobarbital	fenobarbital	pentobarbital	kyselina barbiturová
0,10	-	-	-	-	-	15,68
0,15	-	-	-	-	-	5,42
0,20	-	-	-	-	-	2,55
0,65	1,02	0,25	1,07	1,44	1,12	-
0,70	1,88	0,41	1,92	2,38	2,51	0,26
0,75	3,32	0,64	3,31	4,00	4,21	0,31
0,8	5,65	0,98	5,49	6,73	6,83	0,37
0,85	9,31	1,46	8,83	11,31	10,75	0,44
a_{HILIC}	-	-	-	-	-	1,97
m_{HILIC}	-	-	-	-	-	-7,92
R^2	-	-	-	-	-	0,9960
a_{RP}	1,55	0,63	1,50	1,57	1,56	-0,18
m_{RP}	-8,23	-6,60	-7,85	-8,13	-7,49	-2,76
R^2	0,9889	0,9946	0,9932	0,9985	0,9769	0,9996

Tabulka 17 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b barbiturátů podle rovnice 12 na koloně DiEDMA
 $d = 230 \mu\text{m}$, $l = 145 \text{ mm}$, SD - směrodatná odchylka, D^2 koeficient proložení, φ_{min} objemový podíl vody při přechodu mezi HILIC a RP mechanismem (rovnice 14)

	a_1	SD	m_{RP}	SD	m_{HILIC}	SD	b	SD	φ_{min}	D^2 [%]
amobarbital	-4,50	0,02	6,29	0,03	2,32	0,02	-	-	0,16	99,99
barbital	0,14	0,02	6,59	0,28	5,92	0,45	9,03	0,88	0,28	99,94
hexobarbital	-3,95	0,07	5,62	0,09	1,91	0,05	-	-	0,14	99,96
pentobarbital	0,21	0,03	6,96	0,15	3,60	0,17	28,94	2,919	0,19	99,99
fenobarbital	0,42	0,02	7,36	0,24	5,28	0,33	12,27	1,06	0,23	99,98
kyselina barbiturová	2,37	0,07	10,00	1,26	23,05	4,66	2,44	0,46	0,59	99,98

Tabulka 18 - Hodnoty retenčních faktorů k sulfonamidů (rovnice 4); $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ čínicí rozmezí od 0,02 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,60 do 0,80 pro RP separační mód

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{exp})}$					
	sulfadimidin	sulfanilamid	ftalazol	sulfaguanidin	alesten	sulfathiazol
0,02	0,74	4,39	-	-	13,78	18,19
0,05	0,41	1,46	2,16	7,51	4,33	3,40
0,08	0,25	0,93	0,93	3,39	1,85	1,44
0,10	0,20	0,81	0,59	2,40	1,06	0,97
0,60	0,50	0,94	1,40	0,66	0,53	0,84
0,70	1,18	1,64	4,23	1,02	1,17	1,81
0,75	1,80	2,20	8,50	1,32	1,76	2,83
0,80	2,90	2,99	-	1,78	2,78	4,69

Tabulka 19 - Hodnoty retenčního faktoru k sulfonamidů z modelu rovnice 8 pro HILIC a RP separační mód; $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,02 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,60 do 0,80 pro RP separační mód; hodnoty $a_{\text{HILIC/ RP}}$ a $m_{\text{HILIC/ RP}}$ rovnice 8, $R^2_{\text{HILIC/ RP}}$ - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 8})}$					
	sulfadimidin	sulfanilamid	ftalazol	sulfaguanidin	alesten	sulfathiazol
0,02	0,70	3,62	-	-	12,72	14,98
0,05	0,43	1,93	2,11	7,23	4,91	5,41
0,08	0,26	1,03	0,97	3,62	1,89	1,96
0,10	0,19	0,68	0,58	2,28	1,00	0,99
0,60	0,49	0,92	1,37	0,66	0,52	0,81
0,70	1,18	1,65	4,49	1,07	1,18	1,91
0,75	1,83	2,20	8,13	1,37	1,78	2,92
0,80	2,83	2,94	-	1,75	2,68	4,47
a_{HILIC}	-0,01	0,74	0,89	1,36	1,38	1,47
m_{HILIC}	7,11	9,09	11,30	10,02	13,78	14,73
R^2	0,9903	0,9107	0,9964	0,9879	0,9930	0,9107
a_{RP}	-2,58	-1,54	-2,96	-1,46	-2,42	-2,31
m_{RP}	-3,79	-2,51	-5,16	-2,13	-3,56	-3,70
R^2	0,9994	0,9995	0,9964	0,9943	0,9989	0,9955

Tabulka 20 - Hodnoty retenčního faktoru k sulfonamidů z modelu rovnice 9 pro HILIC a RP separační mód; $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ činící rozmezí od 0,02 do 0,10 platí pro HILIC separační mód a od 0,60 do 0,80 pro RP separační mód; hodnoty $a_{\text{HILIC/ RP}}$ a $m_{\text{HILIC/ RP}}$ rovnice 8, $R^2_{\text{HILIC/ RP}}$ - korelační koeficient

$\varphi(\text{H}_2\text{O})$	$k_{(\text{rovnice 9})}$					
	sulfadimidin	sulfanilamid	ftalazol	sulfaguanidin	alesten	sulfathiazol
0,02	0,77	4,15	11,83	34,14	14,91	17,87
0,05	0,37	1,56	2,17	7,53	3,60	3,37
0,08	0,26	0,94	0,91	3,47	1,74	1,43
0,10	0,21	0,74	0,60	2,40	1,23	0,95
0,60	0,48	0,92	1,36	0,65	0,51	0,79
0,70	1,22	1,71	4,60	1,09	1,22	1,96
0,75	1,85	2,25	7,95	1,38	1,81	2,94
0,80	2,73	2,91	13,26	1,71	2,62	4,29
a_{HILIC}	-1,47	-1,20	-2,07	-1,27	-1,46	-1,84
m_{HILIC}	0,80	1,07	1,85	1,65	1,55	1,82
R^2	0,9842	0,9921	0,9992	0,9950	0,9826	1
a_{RP}	1,02	0,85	1,89	0,56	0,97	1,2
m_{RP}	-6,02	-3,99	-7,92	-3,37	-5,7	-5,86
R^2	0,9956	0,9957	0,9924	0,9862	0,9946	0,9924

Tabulka 21 - Hodnoty retenčního faktoru k sulfonamidů z modelu rovnice 10 pro HILIC separační mód; hodnoty a , b a m_{HILIC} rovnice 10, SD - směrodatná odchylka, D^2 - koeficient proložení

$\varphi(H_2O)$	$k_{(rovnice\ 10)}$					
	sulfadimidin	sulfanilamid	ftalazol	sulfaguanidin	alesten	sulfathiazol
0,02	0,79	4,30	-	-	13,78	18,88
0,05	0,41	1,46	-	-	4,34	3,53
0,08	0,26	0,95	-	-	1,81	1,57
0,10	0,20	0,79	-	-	1,11	1,00
a	0,91	-0,17	-	-	0,37	-0,003
SD	0,04	0,03	-	-	0,06	-0,002
b	12,06	15,56	-	-	6,02	10,02
SD	3,62	0,51	-	-	0,46	0,01
m_{HILIC}	2,16	0,74	-	-	3,68	1,81
SD	0,46	0,07	-	-	0,54	0,01
D^2	99,98	99,98	-	-	99,99	99,99

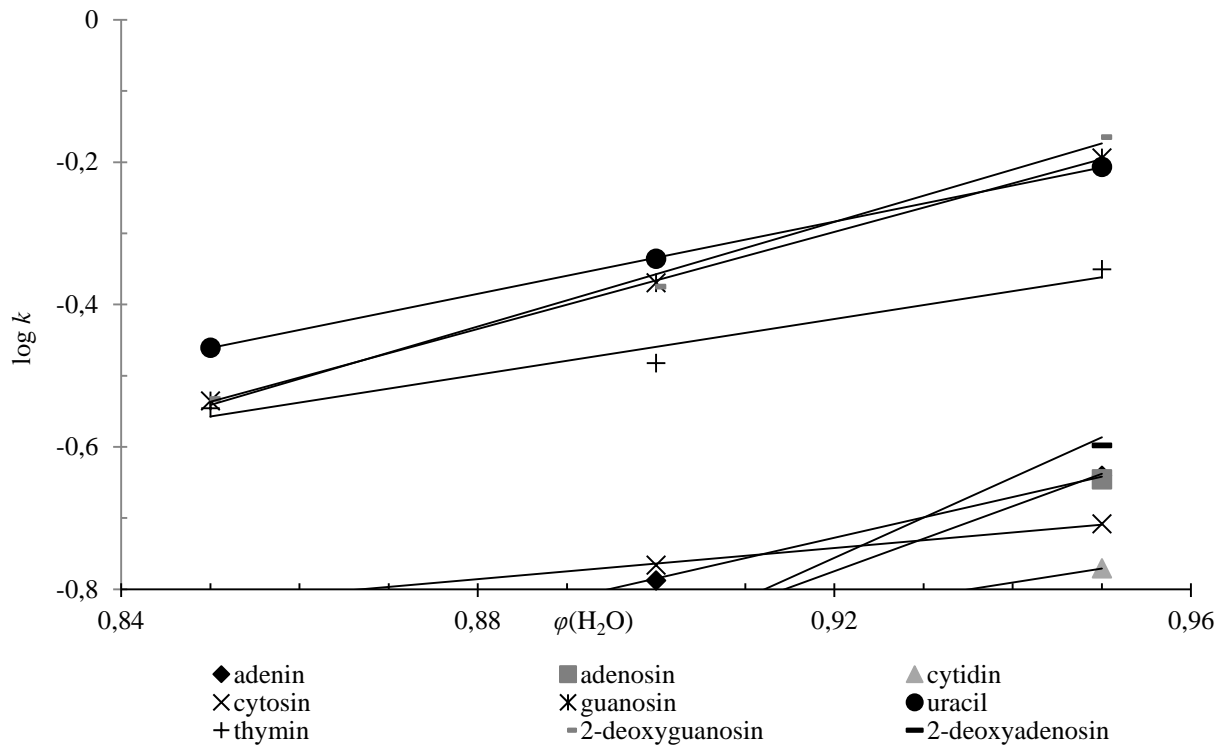
Tabulka 22 - Parametry a_1 , m_{RP} , m_{HILIC} a b sulfonamidů podle rovnice 12 na koloně DiEDMA

$d = 230 \mu\text{m}$, $l = 145 \text{ mm}$, SD - směrodatná odchylka, RSC - reziduální součet čtverců, D^2 koeficient proložení, φ_{min} objemový podíl vody při přechodu mezi HILIC a RP mechanismem (rovnice 14)

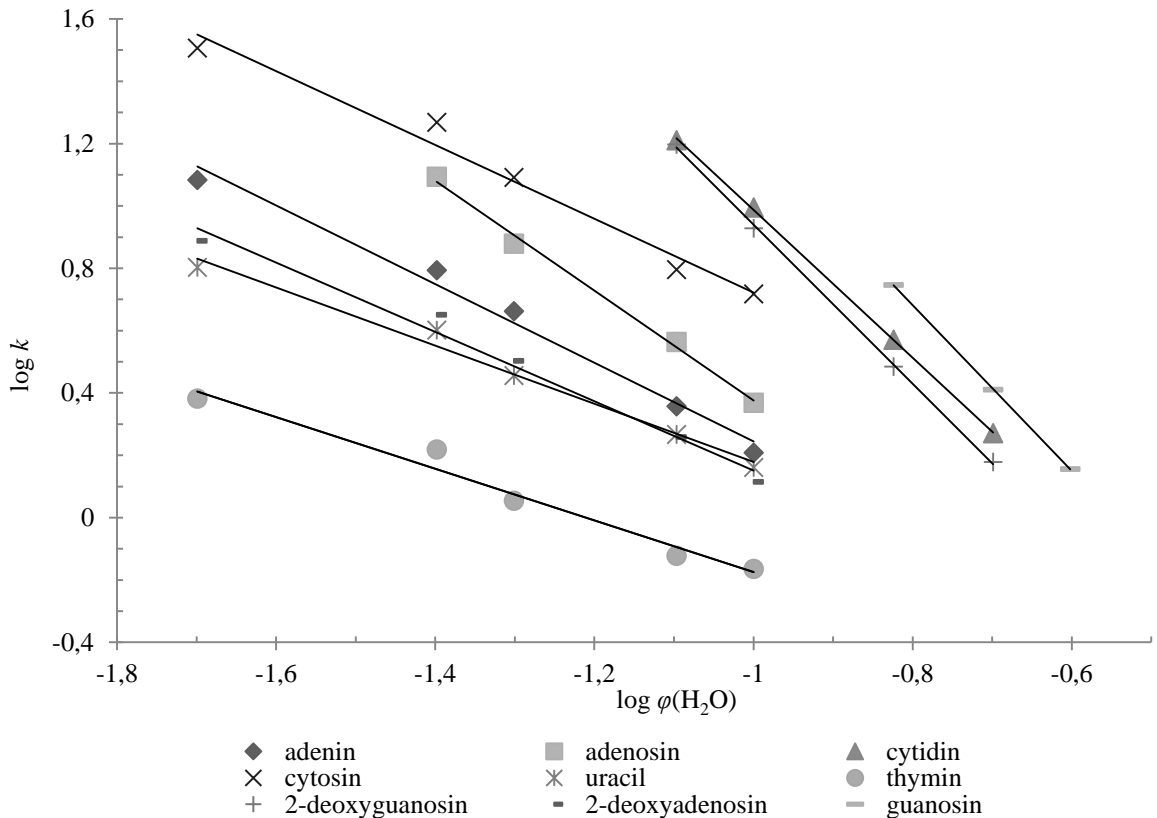
	a_1	SD	m_{RP}	SD	m_{HILIC}	SD	b	SD	φ_{min}	D^2 [%]
sufldimidin	0,10	0,01	7,27	0,18	6,72	0,34	6,85	0,40	0,25	99,98
sulfanilamid	1,16	0,09	4,10	0,38	2,76	0,57	32,88	5,13	0,26	99,69
ftalazol	1,32	0,02	10,04	0,16	8,60	0,27	9,77	0,47	0,27	99,99
sulfaguanidin	1,73	0,06	5,24	0,25	5,58	0,42	11,73	1,59	0,377	99,95
alesten	1,57	0,01	7,98	0,12	8,18	0,20	9,12	0,30	0,33	99,99
sulfathiazol	1,96	0,09	6,55	0,49	5,03	0,56	23,87	5,13	0,29	99,69

Obrázky

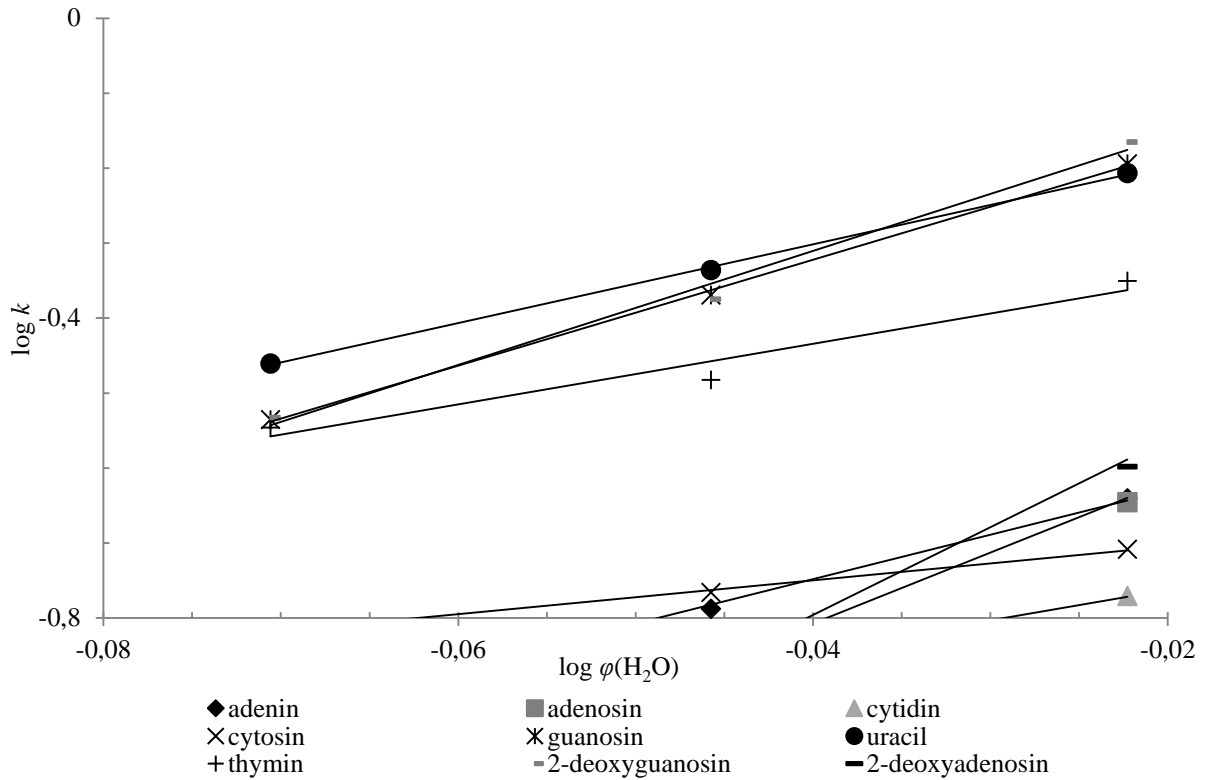
Obrázek 9 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 5-15 %



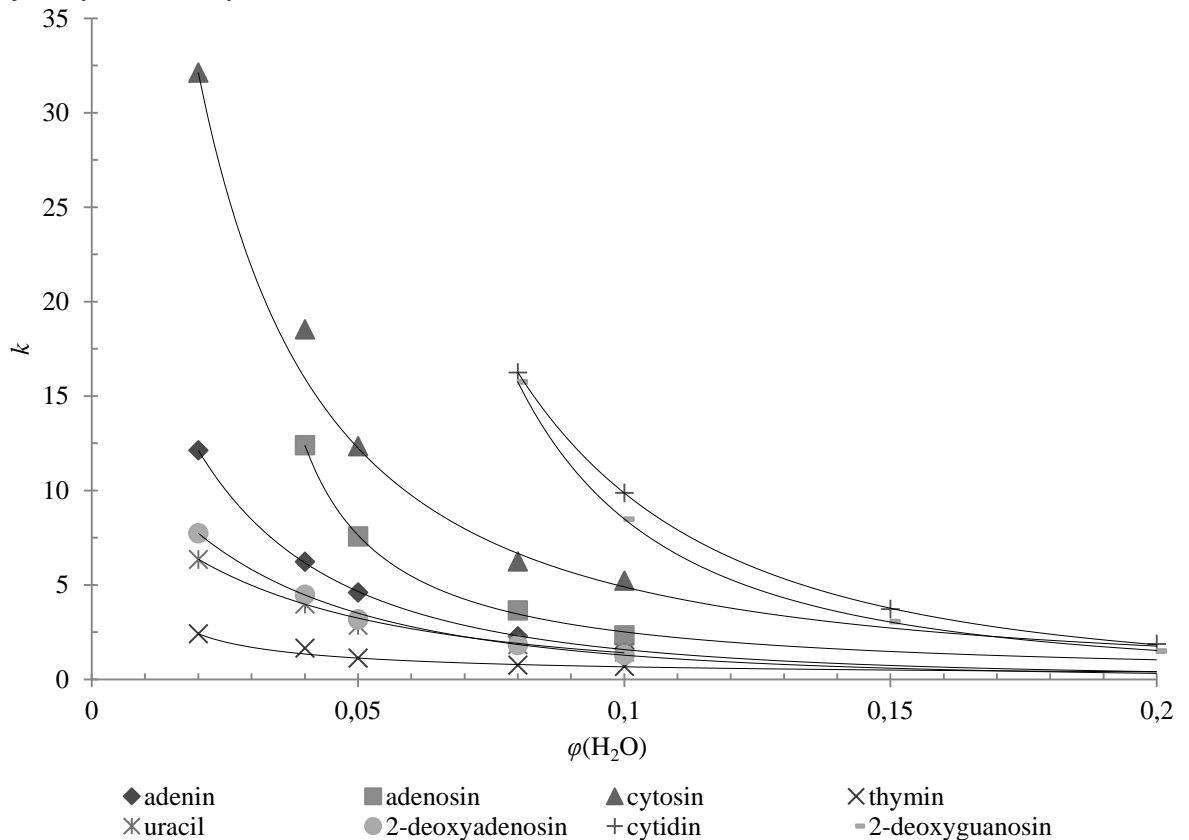
Obrázek 10 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-98 %



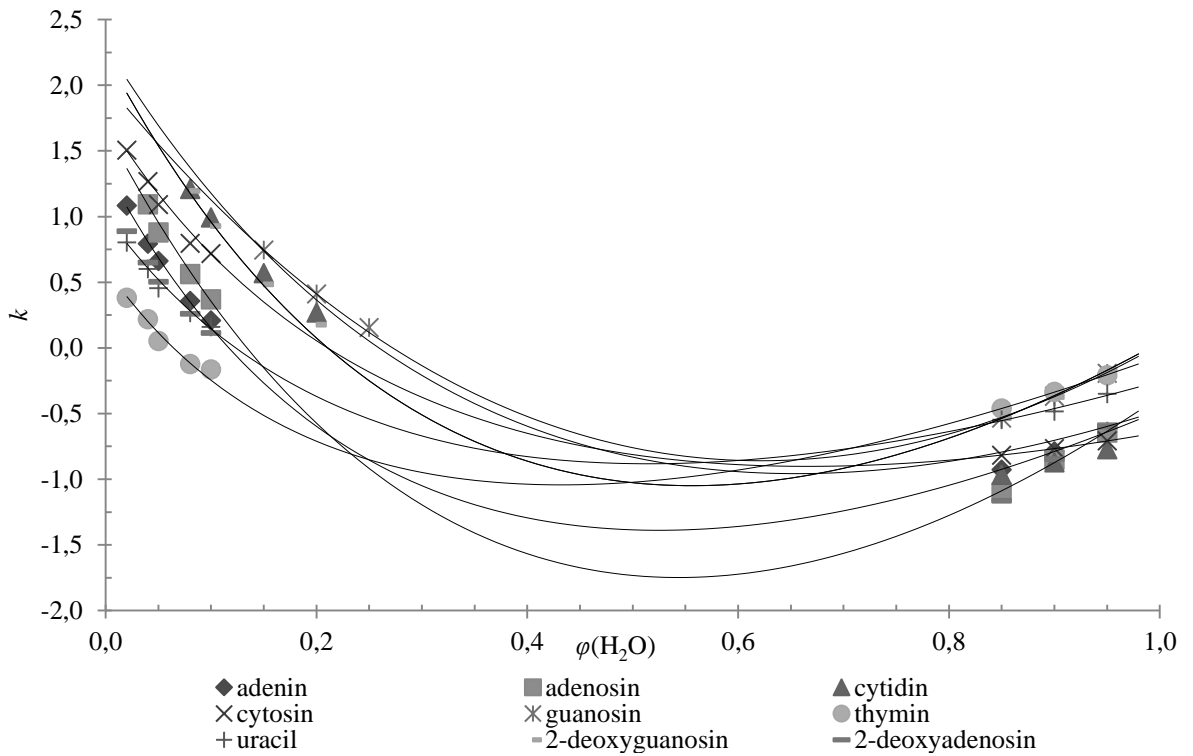
Obrázek 11 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 5-15 %



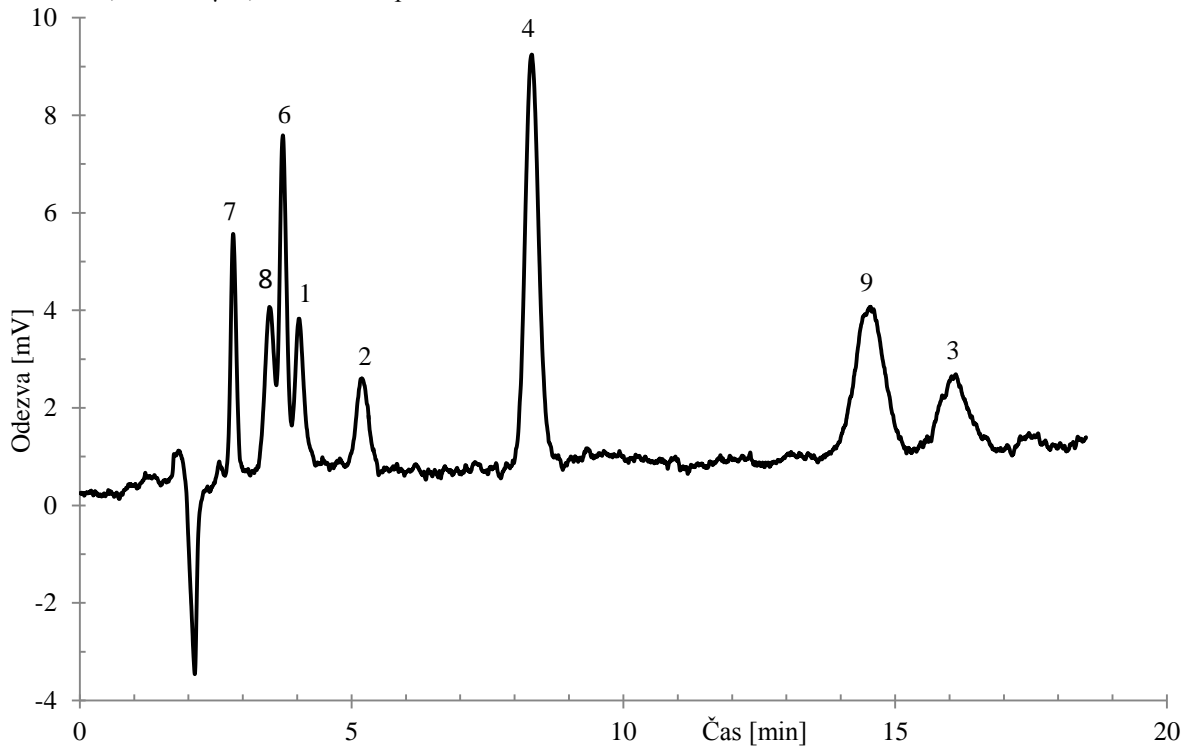
Obrázek 12 - Závislost retenčního faktoru, k , na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód nukleových bází a nukleosidů (rovnice 10); mobilní fáze: 10 mM NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-98 %



Obrázek 13 - Vliv vodné frakce $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , nukleových bází a nukleosidů na koloně DiEDMA (rovnice 12)
 mobilní fáze: 10 mM NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH=3), kde φ označuje objemový zlomek voda, rozsah složení mobilní fáze 5-98 % ACN



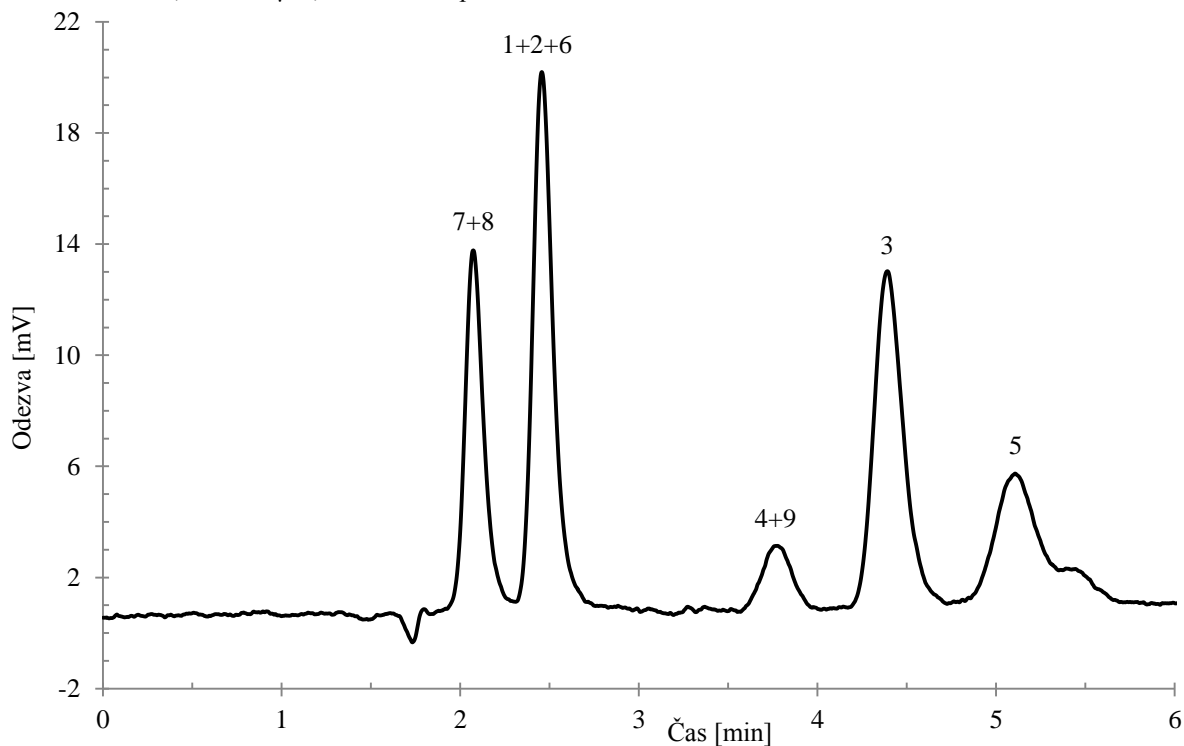
Obrázek 14 - Separace nukleových bází a nukleosidů na koloně DiEDMA
 Mobilní fáze: 90 % 10 mM NH_4AC v ACN a 10 % mM NH_4AC ve vodě (pH = 3); $F_m = 5 \mu\text{l}/\text{min}$, $p = 4 \text{ MP}$,
 $l = 145 \text{ mm}$, $d = 320 \mu\text{m}$, UV detekce při $\lambda = 230 \text{ nm}$



Směs: (1) adenin; (2) adenosin; (3) cytidin; (4) cytosin; (6) uracil; (7) thymin; (8) 2-deoxyadenosin; (9) 2-deoxyguanosin

Obrázek 15 - Separace nukleových bází a nukleosidů na koloně DiEDMA

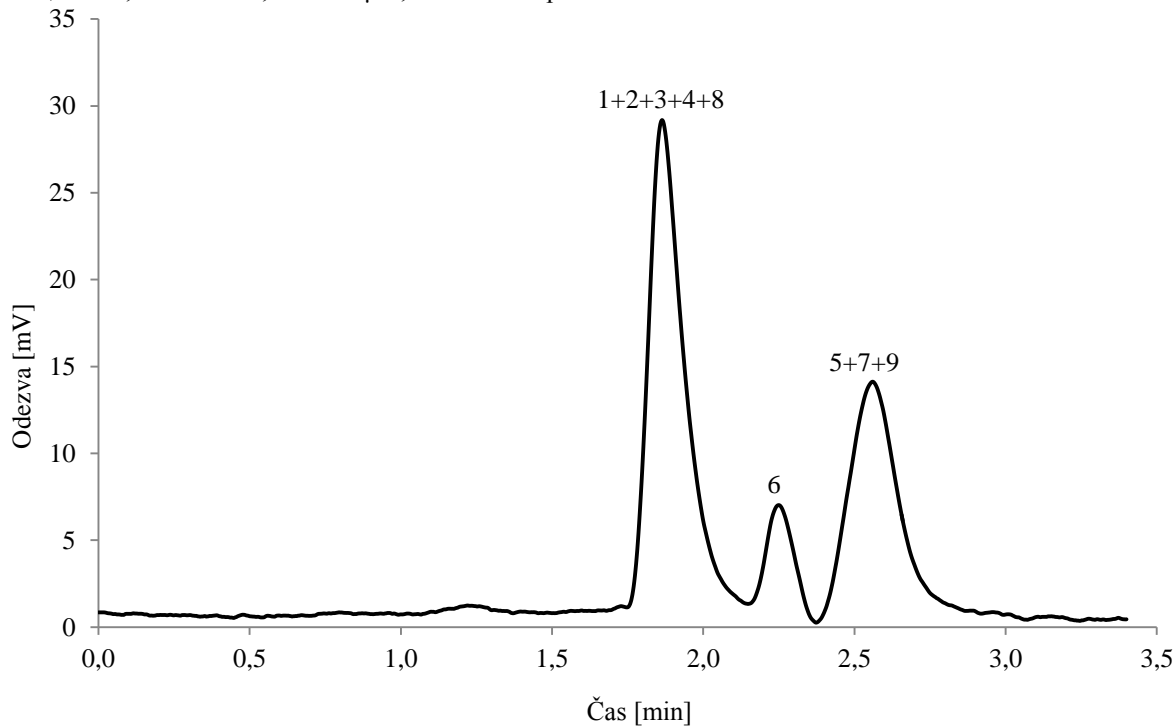
Mobilní fáze: 80 % 10 mM NH₄AC v ACN a 20 % 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); Fm = 5 μl/min, p = 7,6 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 230 nm



Směs: (1) adenin; (2) adenosin; (3) cytidin; (4) cytosin; (5) guanosin; (6) uracil; (7) thymin; (8) 2-deoxyadenosin; (9) 2-deoxyguanosin

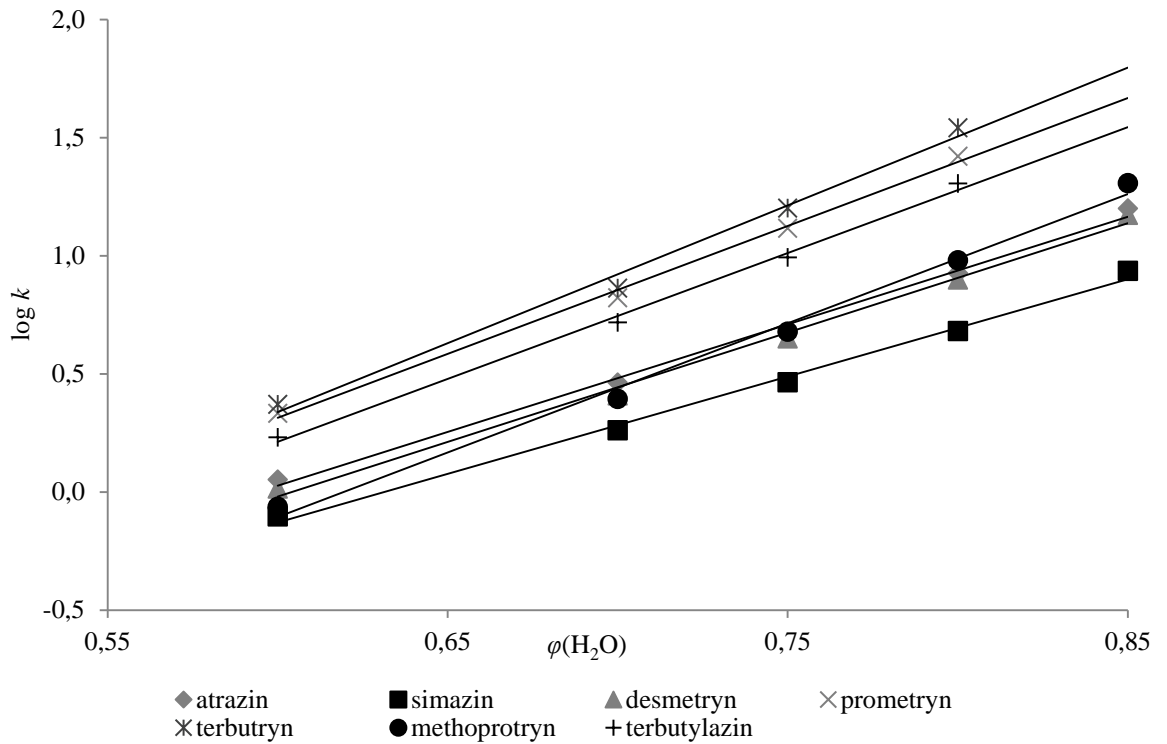
Obrázek 16 - Separace nukleosidů a nukleových bází na koloně DiEDMA

Mobilní fáze: 5 % 10 mM NH₄AC v ACN a 95% 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); Fm = 5 μl/min, p = 11,2 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 230 nm

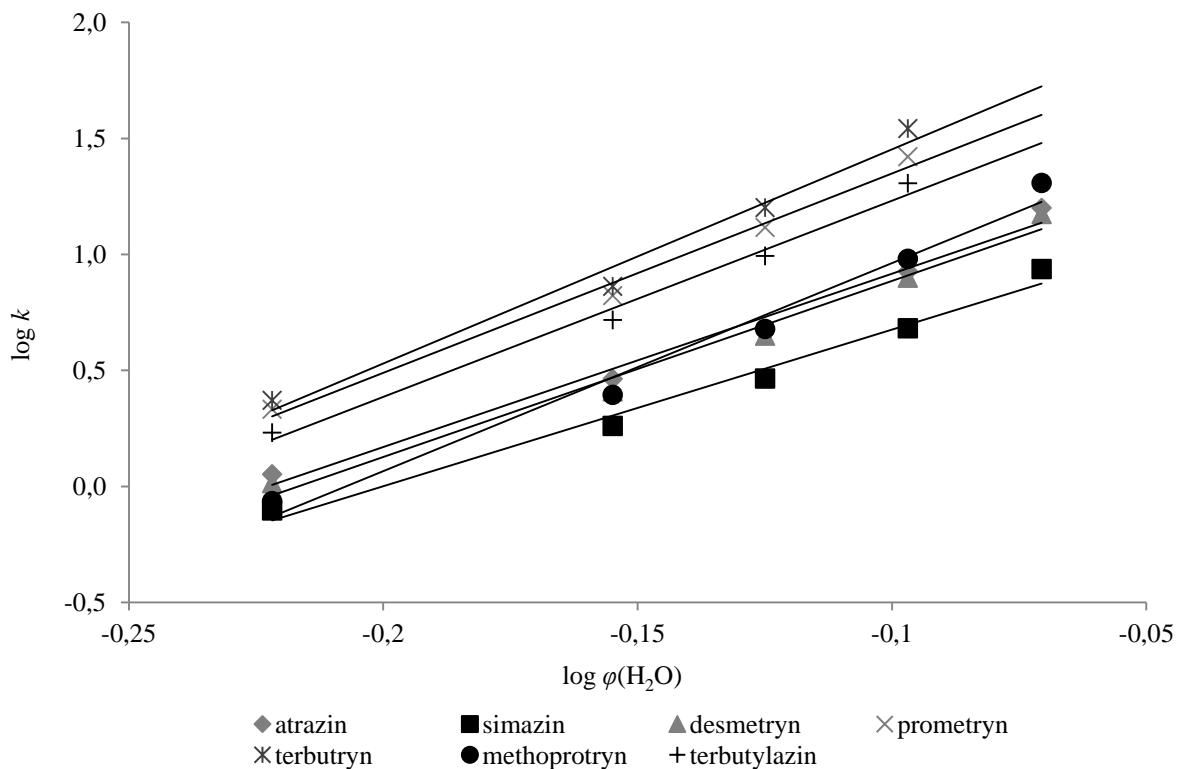


Směs: (1) adenin; (2) adenosin; (3) cytidin; (4) cytosin; (5) guanosin; (6) uracil; (7) thymin; (8) 2-deoxyadenosin; (9) 2-deoxyguanosin

Obrázek 17 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů triazinů (rovnice 8); mobilní fáze ACN a voda, kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 15-40 %

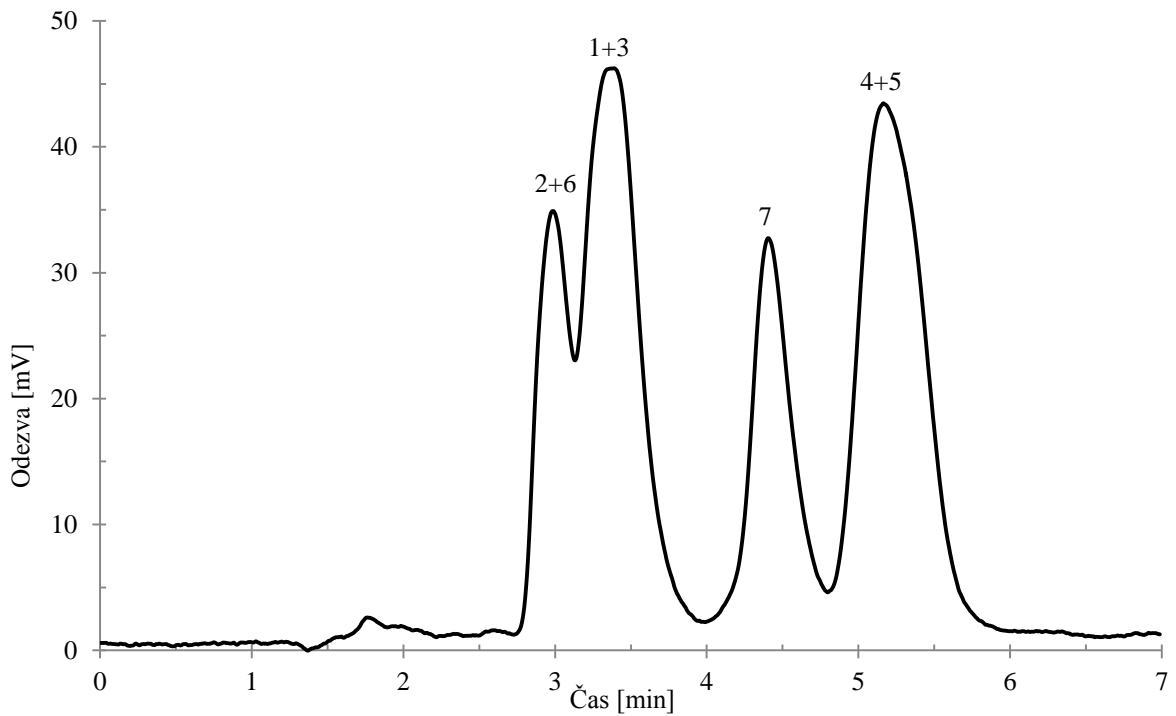


Obrázek 18 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů triazinů (rovnice 9); mobilní fáze ACN a voda, kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 15-40 %



Obrázek 19 - Separace triazinů na koloně DiEDMA

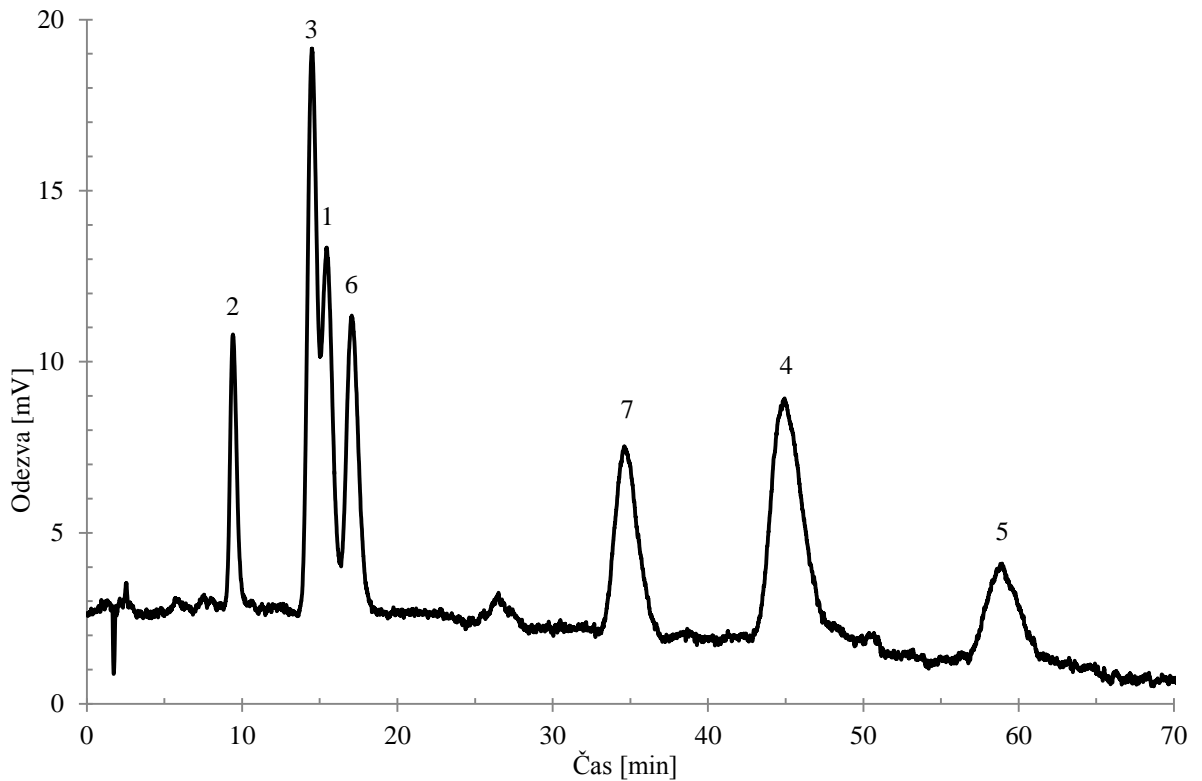
Mobilní fáze: 40 % ACN a 60 % voda; $F_m = 5 \mu\text{l}/\text{min}$, $p = 15,3 \text{ MPa}$, $l = 145 \text{ mm}$, $d = 320 \mu\text{m}$, UV detekce při $\lambda = 214 \text{ nm}$



Směs: (1) atrazin; (2) simazin; (3) desmetryn; (4) prometryn; (5) terbutryn; (6) methoprotryn (7) terbutylazin

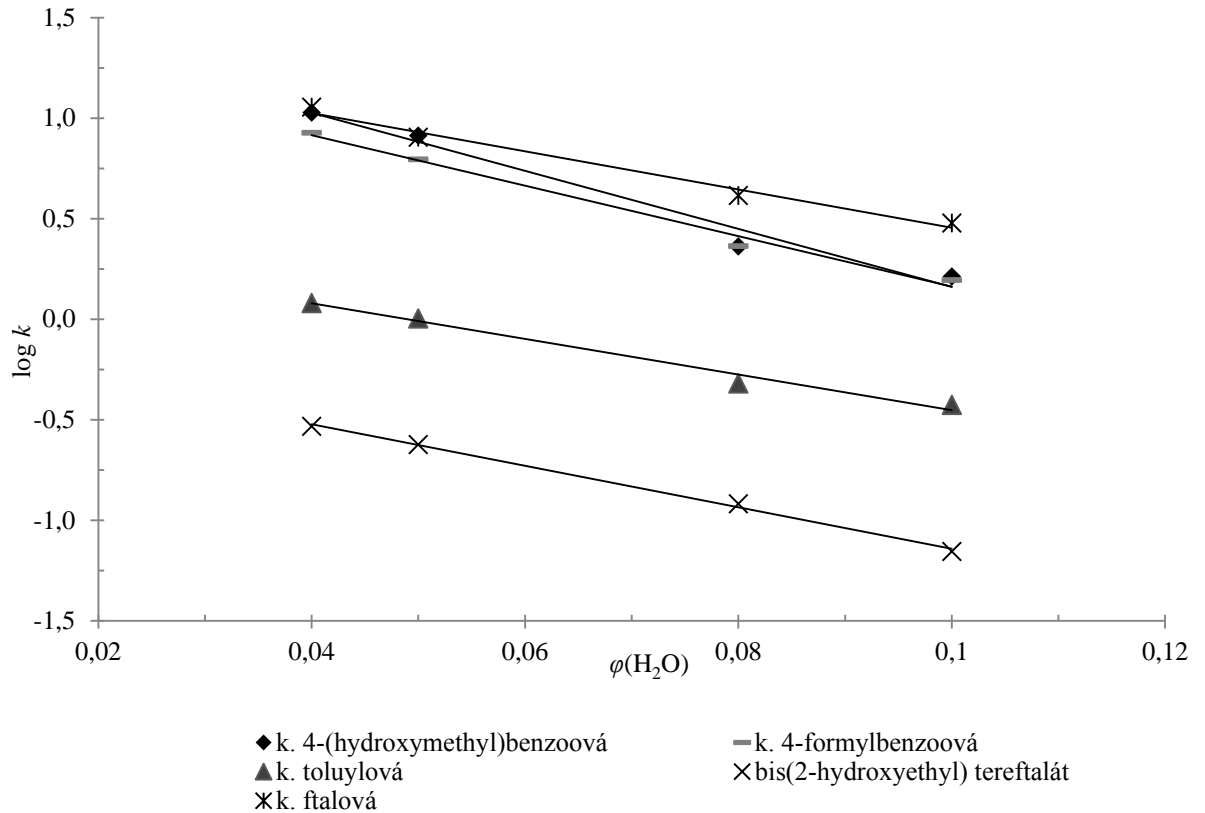
Obrázek 20 - Separace triazinů na koloně DiEDMA

Mobilní fáze: 20 % ACN a 80 % voda; $F_m = 5 \mu\text{l}/\text{min}$, $p = 14,9 \text{ MPa}$, $l = 145 \text{ mm}$, $d = 320 \mu\text{m}$, UV detekce při $\lambda = 214 \text{ nm}$

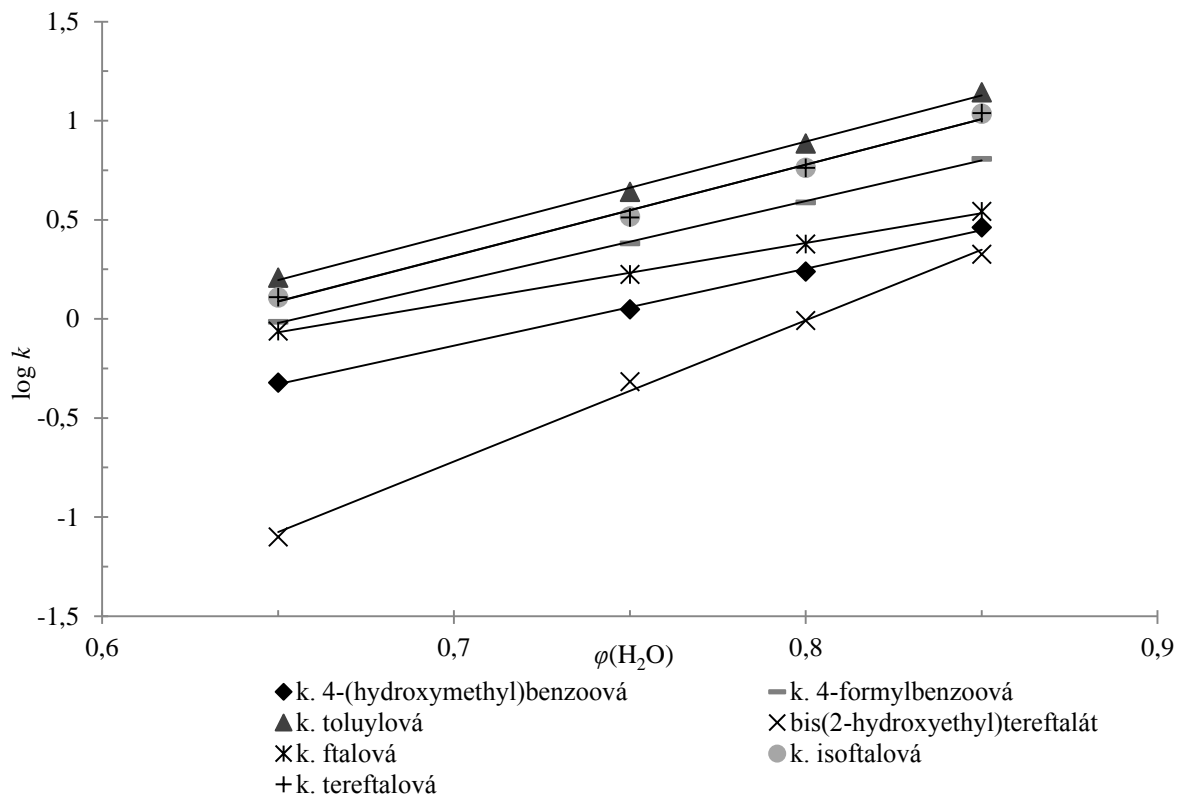


Směs: (1) atrazin; (2) simazin; (3) desmetryn; (4) prometryn; (5) terbutryn; (6) methoprotryn (7) terbutylazin

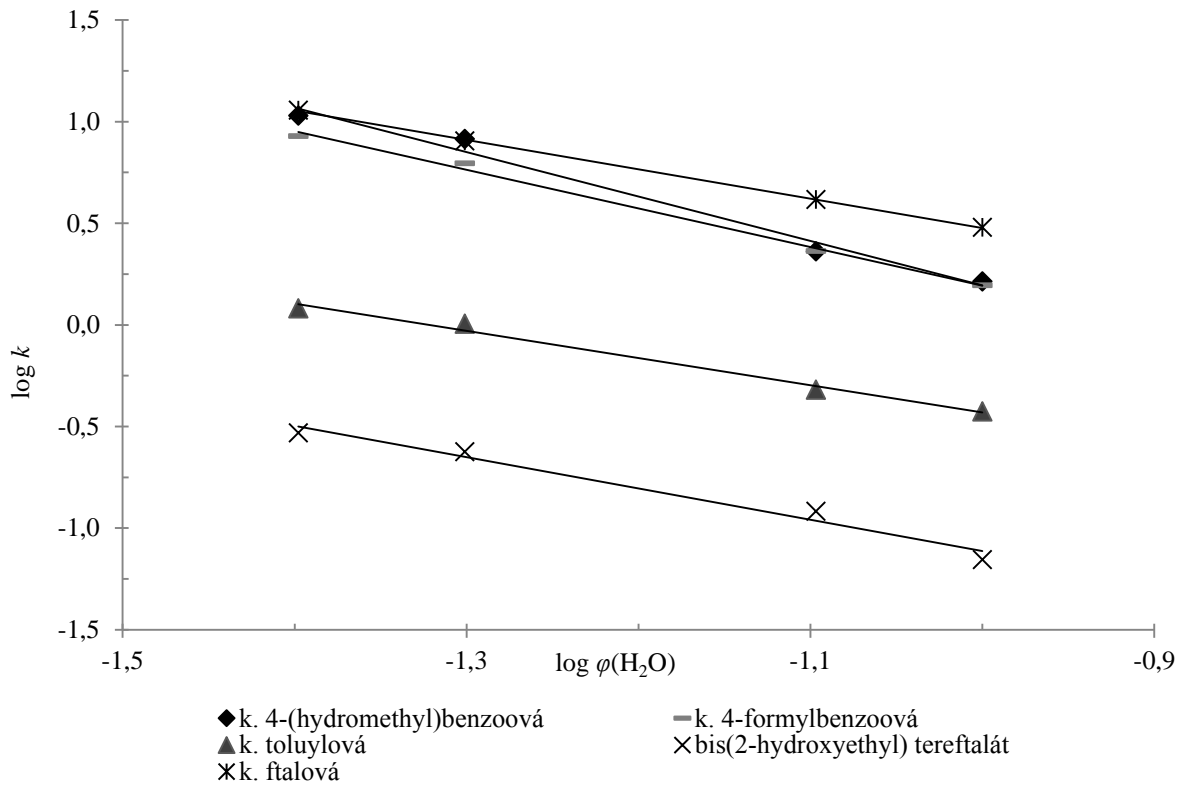
Obrázek 21 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-96 %



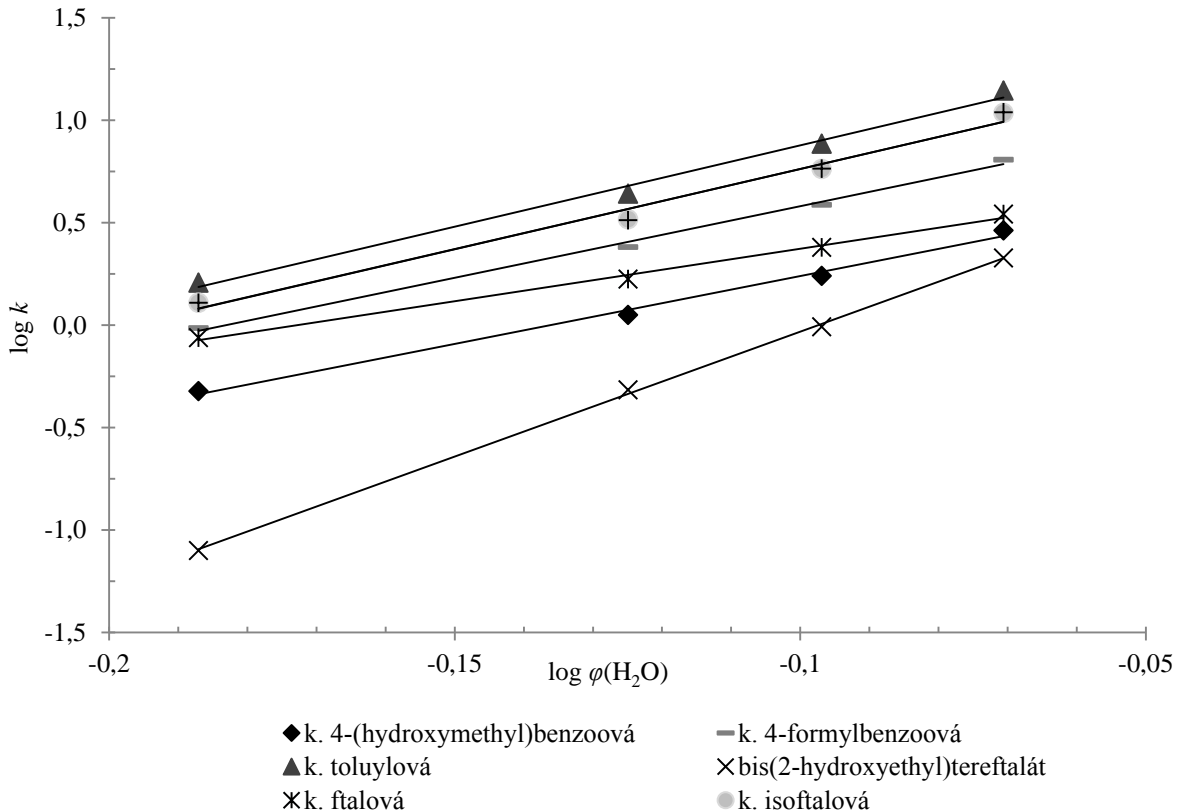
Obrázek 22 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 15-35 %



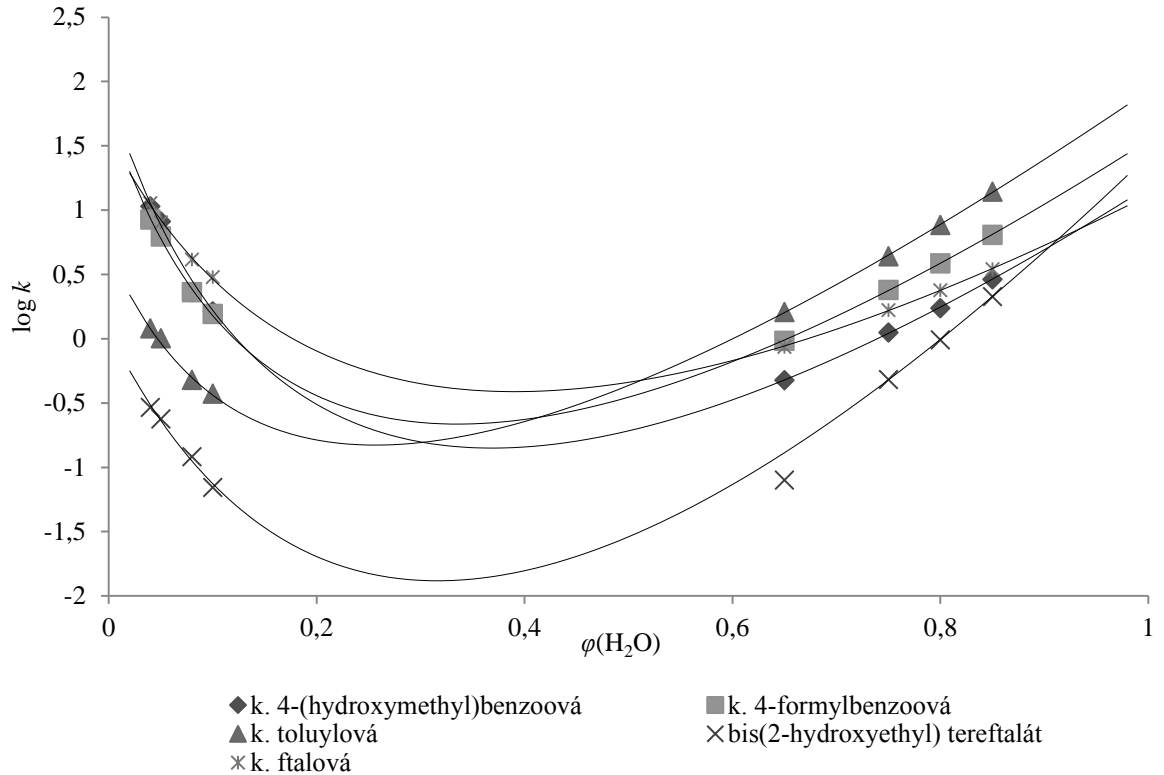
Obrázek 23 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 9), mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-96 %



Obrázek 24 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód derivátů kyseliny ftalové (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 15-35 %

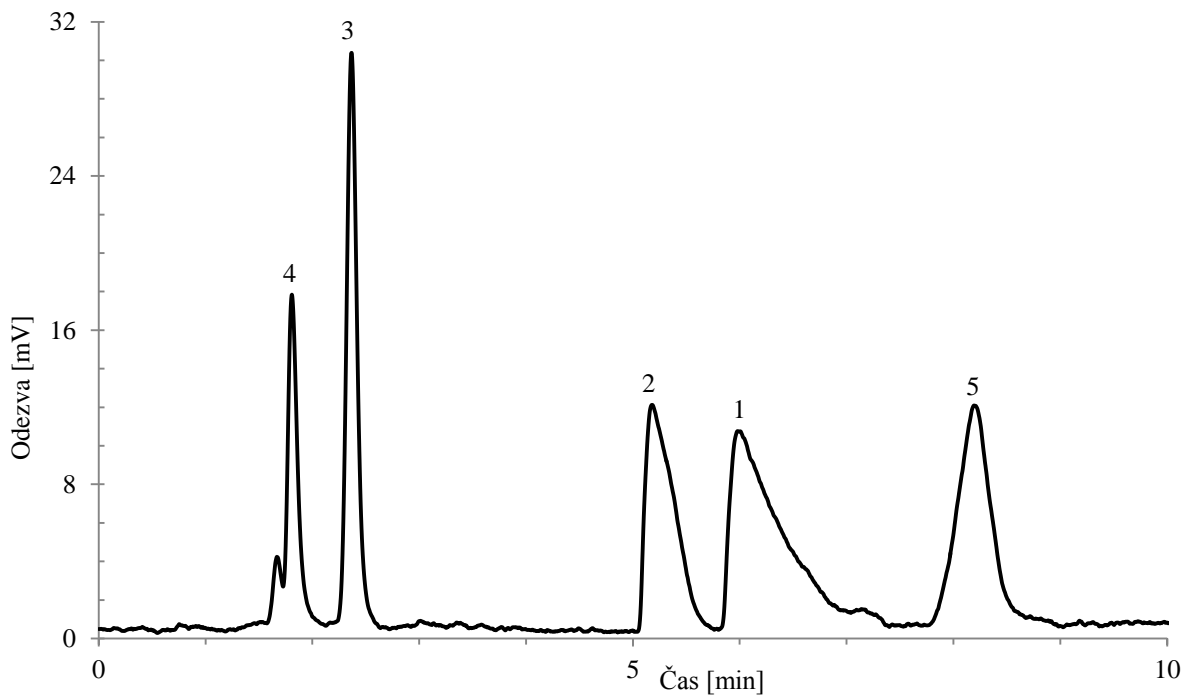


Obrázek 25 - Vliv vodné frakce, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , derivátů kyseliny ftalové na koloně DiEDMA (rovnice 12); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah složení mobilní fáze 15-96 % ACN



Obrázek 26 - Separace derivátů kyseliny ftalové na koloně DiEDMA

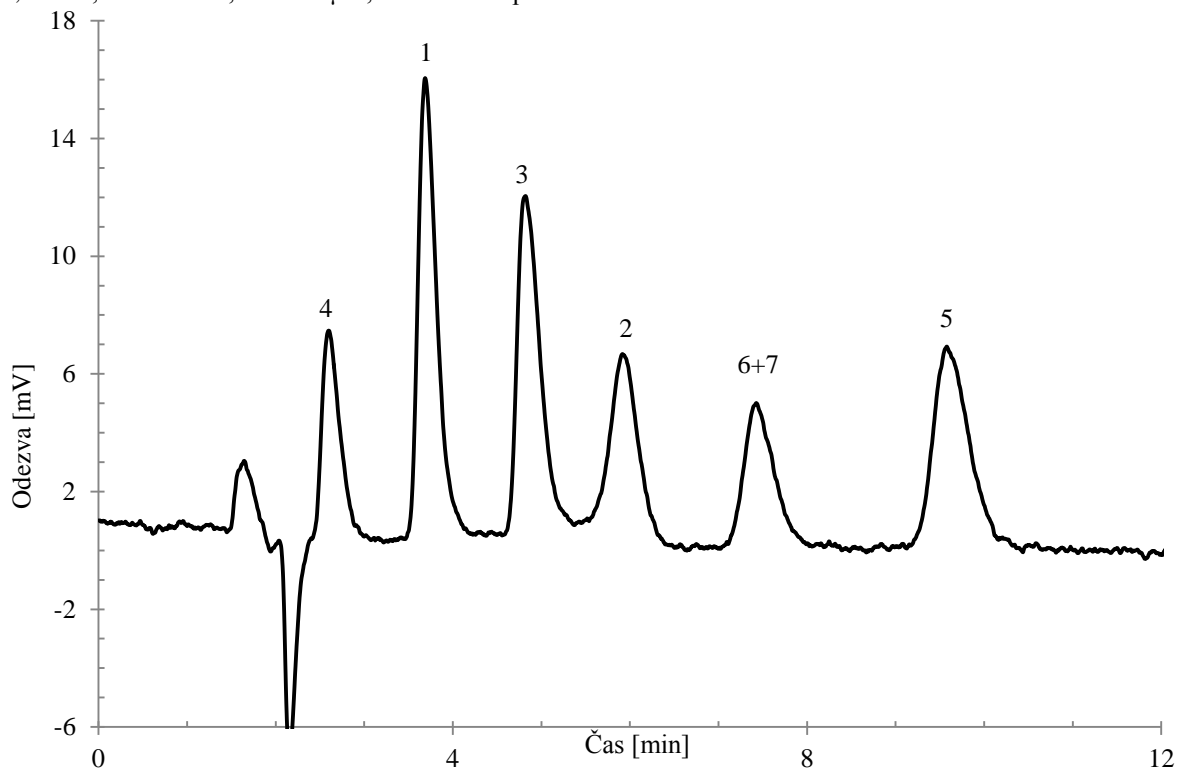
Mobilní fáze: 92 % 10 mM, NH_4AC v ACN a 8 % 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3); $F_m = 5 \mu\text{l}/\text{min}$, $p = 3,3$ MPa, $l = 145$ mm, $d = 320 \mu\text{m}$, UV detekce při $\lambda = 214$ nm



Směs: (1) kyselina 4-(hydroxymethyl) benzoová; (2) kyselina 4-formylbenzoová; (3) kyselina toluylová; (4) bis(2-hydroxyethyl) tereftalát; (5) kyselina ftalová; (6) kyselina isoftalová; (7) kyselina tereftalová

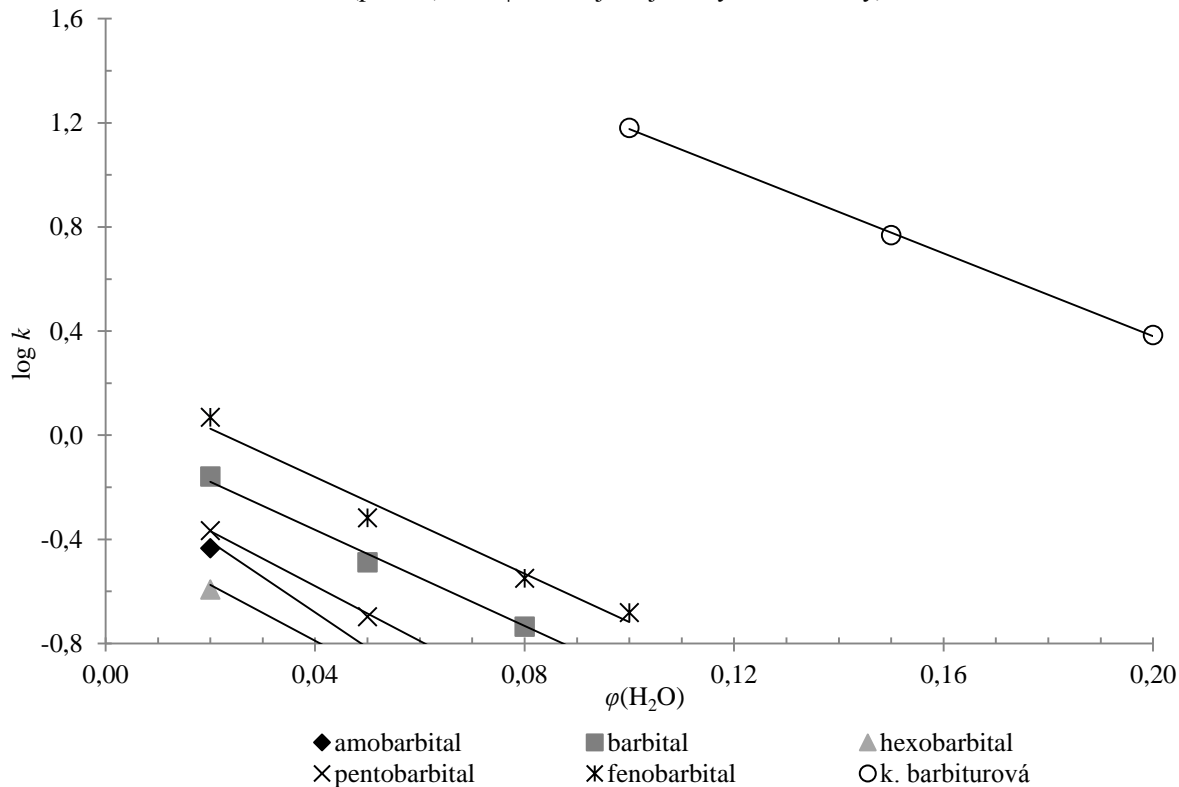
Obrázek 27 - Separace derivátů kyseliny ftalové na koloně DiEDMA

Mobilní fáze: 25 % 10 mM, NH₄AC v ACN a 75 % 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); F_m = 5 μl/min, p = 15,6 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 214 nm

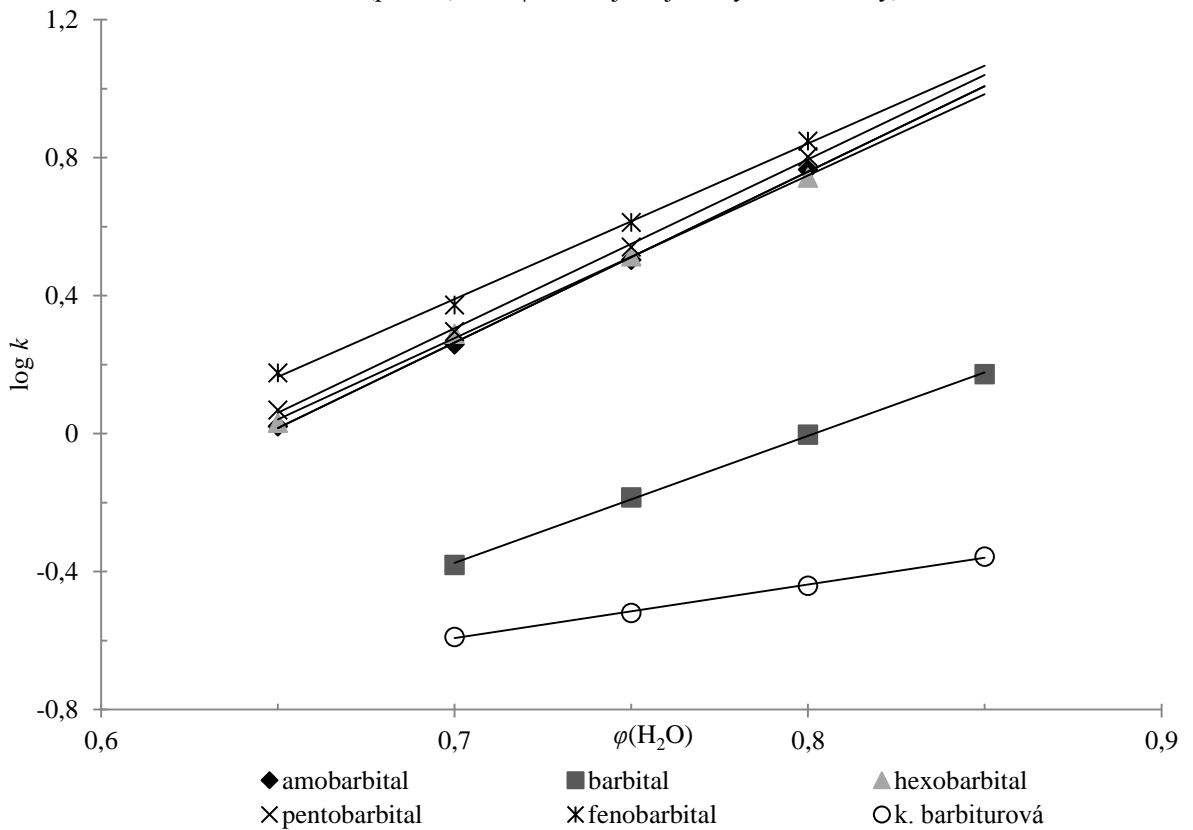


Směs: (1) kyselina 4-(hydroxymethyl) benzoová; (2) kyselina 4-formylbenzoová; (3) kyselina toluylová; (4) bis(2-hydroxyethyl) tereftalát; (5) kyselina ftalová; (6) kyselina isoftalová; (7) kyselina tereftalová

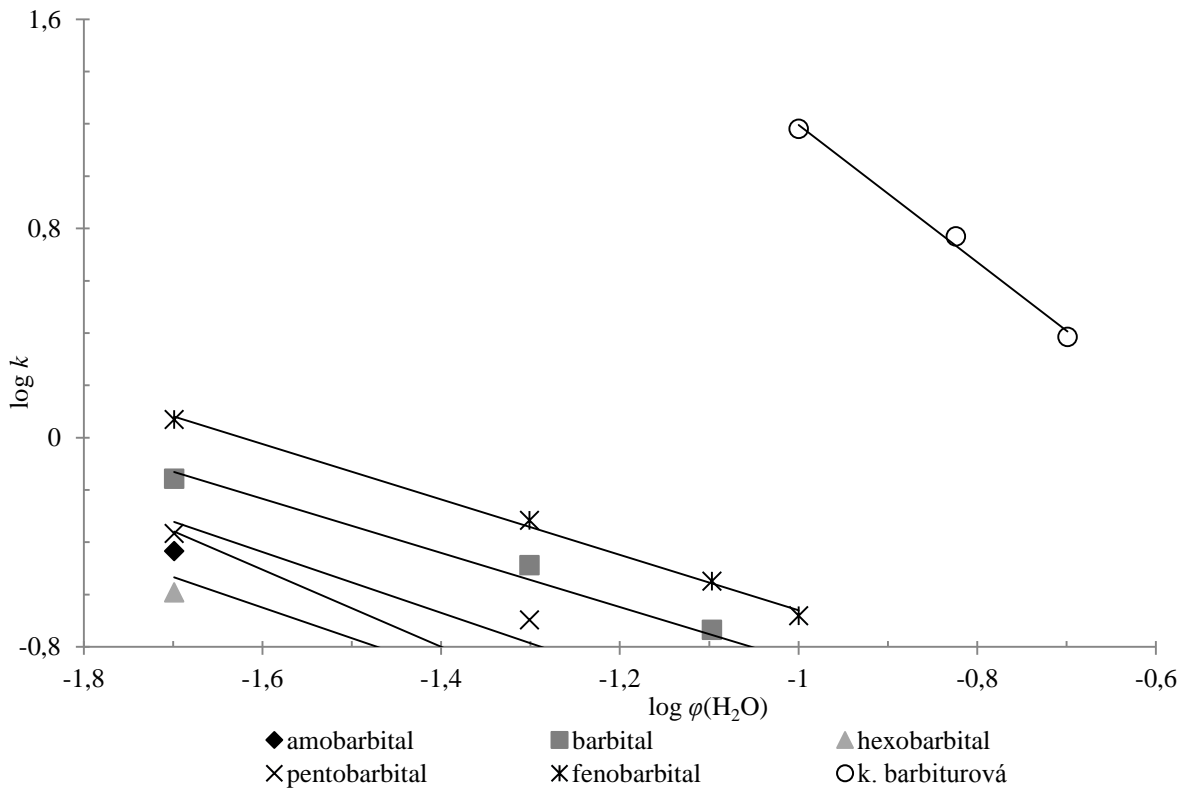
Obrázek 28 - Závislost log *k* na φ(H₂O) pro HILIC mód barbiturátů (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH₄AC v ACN a 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-98 %



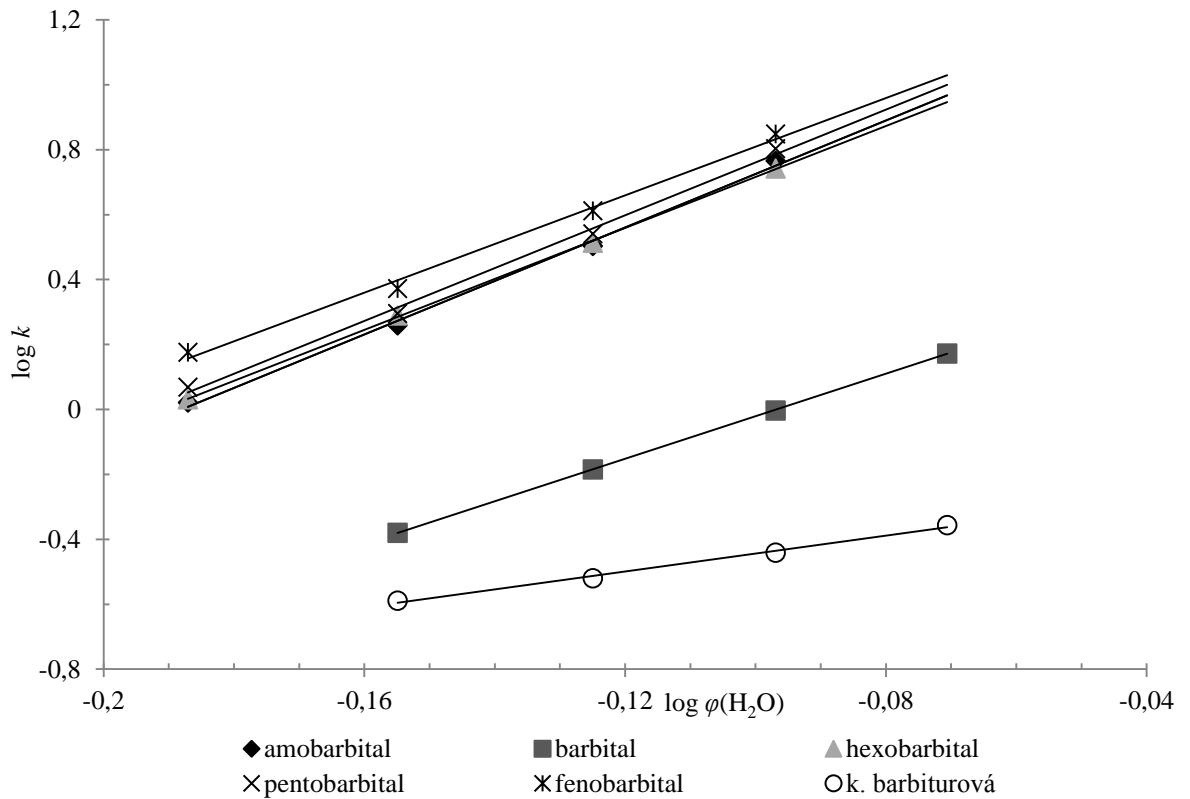
Obrázek 29 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód barbiturátů (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 15-35 %



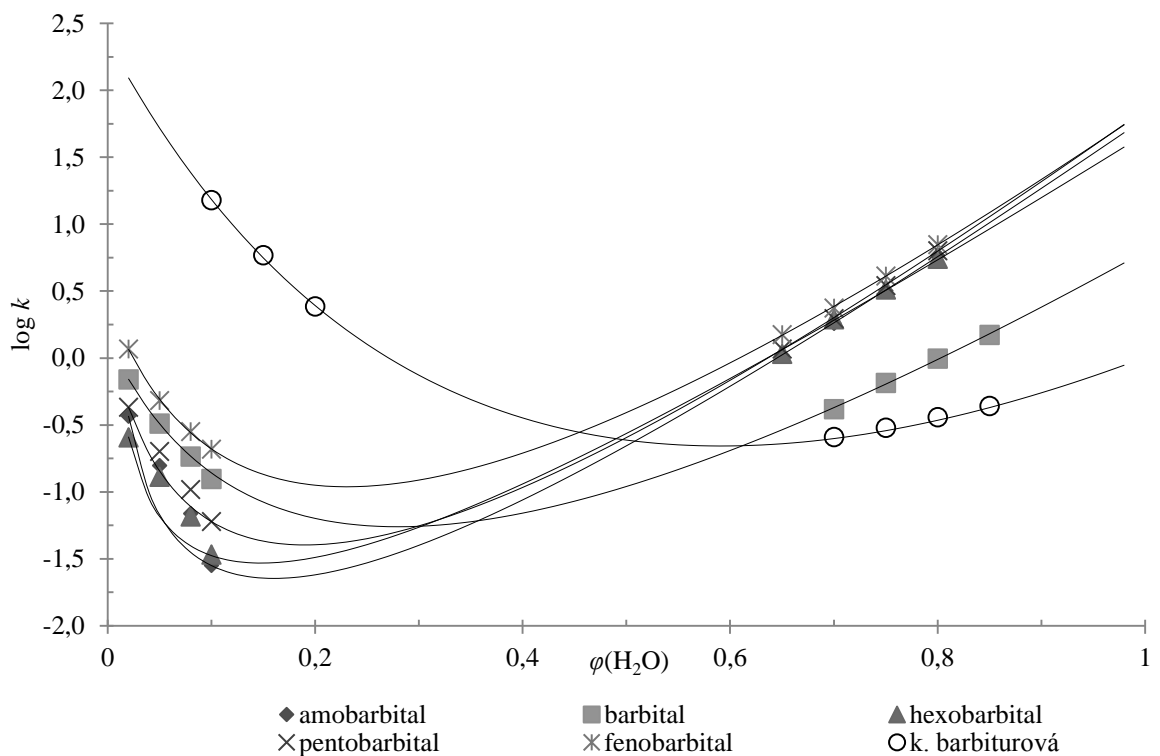
Obrázek 30 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód barbiturátů (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-98 %



Obrázek 31 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód barbiturátů (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 15-35 %

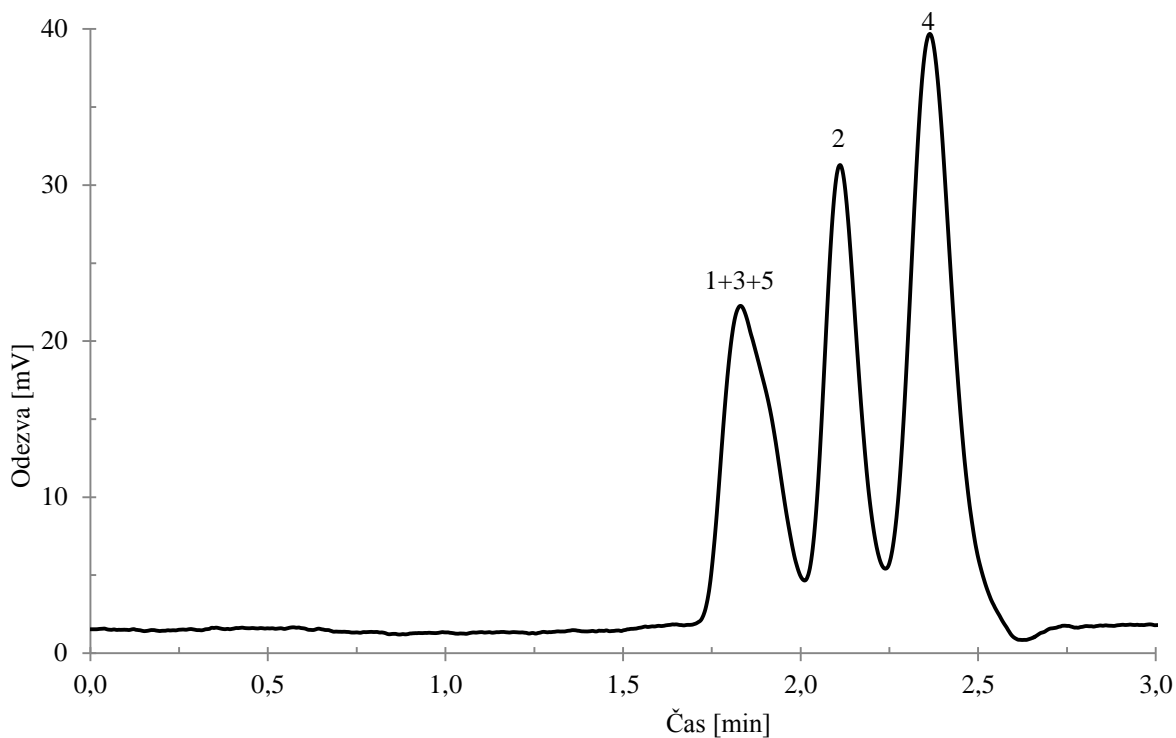


Obrázek 32 - Vliv vodné frakce, $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , barbiturátů na koloně DiEDMA (rovnice 12 a 13) mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah složení mobilní fáze 15-98 % acetonitrilu



Obrázek 33 - Separace barbiturátů na koloně DiEDMA

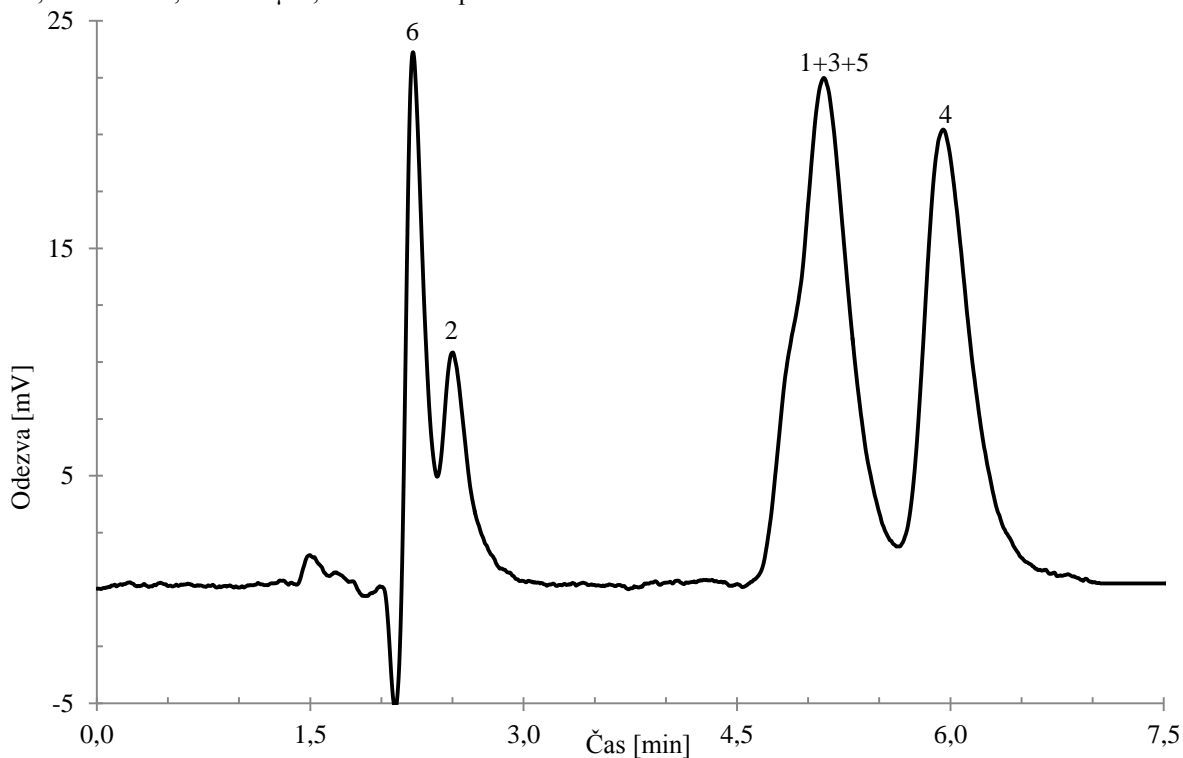
Mobilní fáze: 95 % 10 mM, NH₄AC v ACN a 5 % 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); F_m = 5 μl/min, p = 2,5 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 214 nm



Směs: (1) amobarbital; (2) barbital; (3) hexobarbital; (4) fenobarbital; (5) pentobarbital; (6) kyselina barbiturová

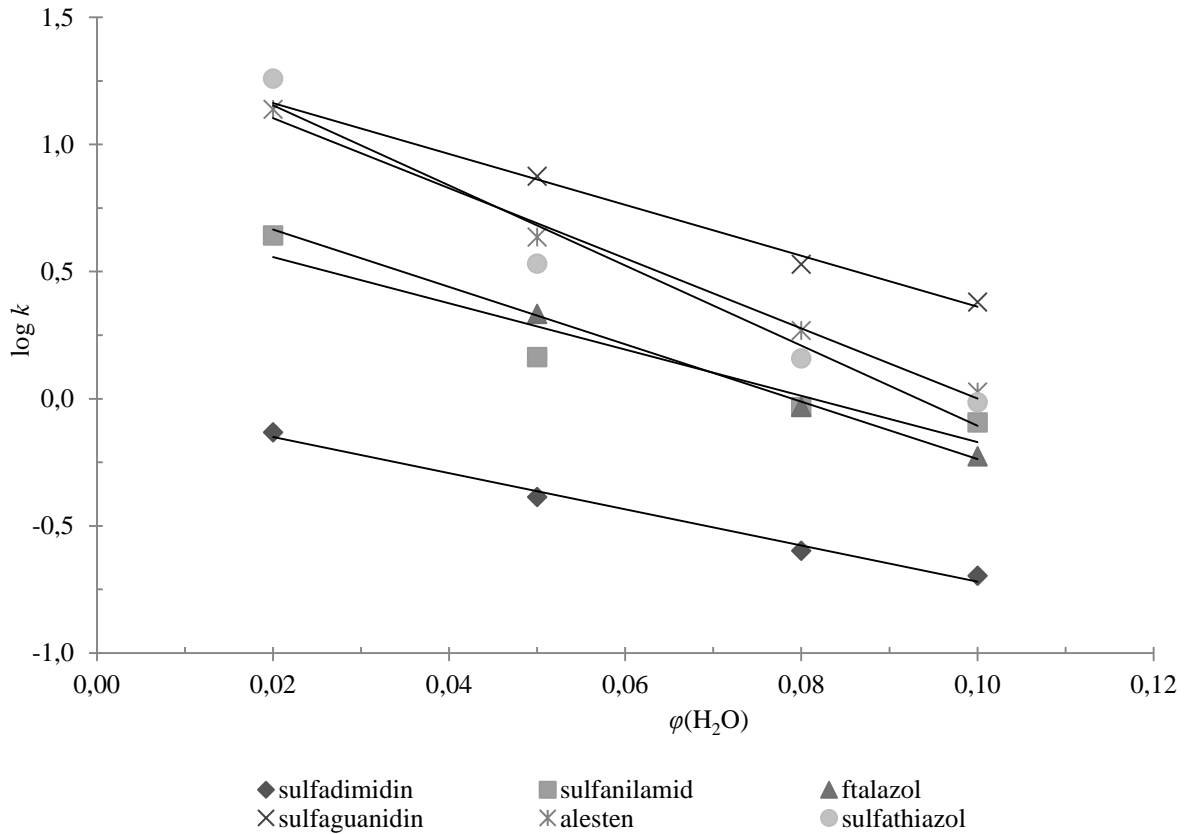
Obrázek 34 - Separace barbiturátů na koloně DiEDMA

Mobilní fáze: 30 % 10 mM, NH₄AC v ACN a 70 % 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); F_m = 5 μl/min, p = 15,7 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 214 nm

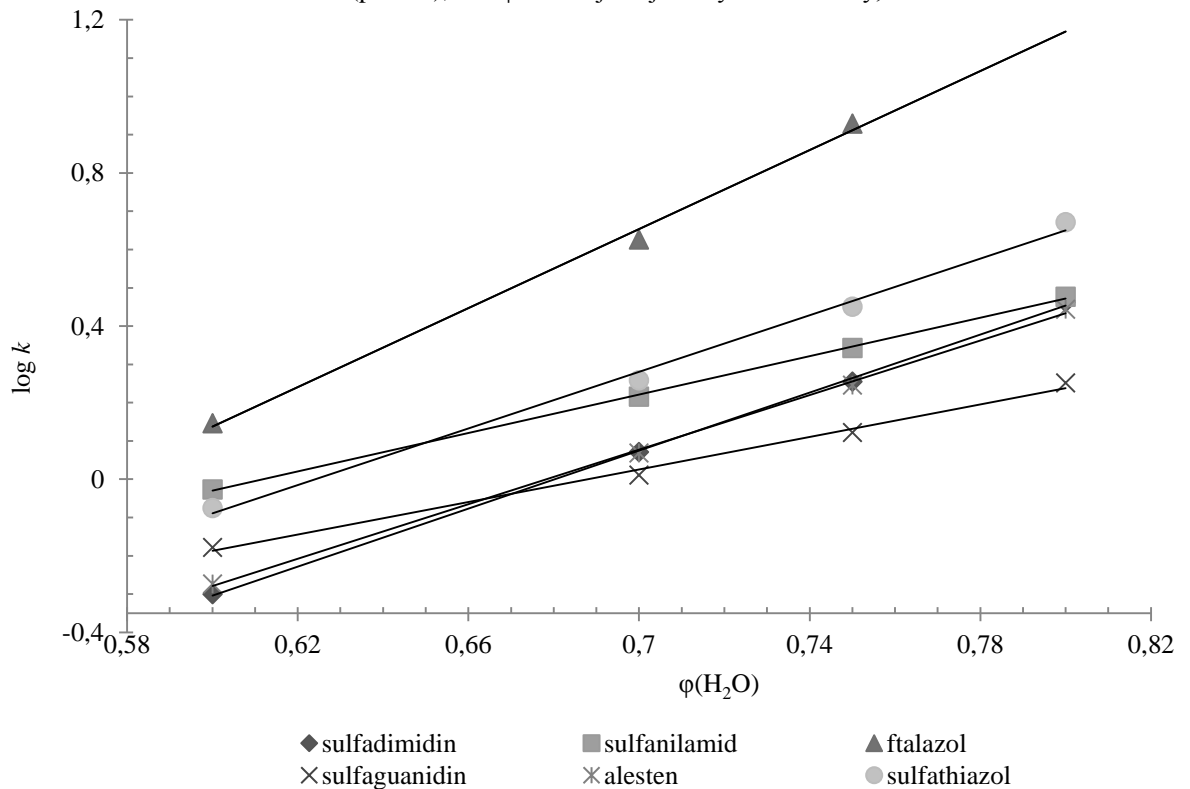


Směs: (1) amobarbital; (2) barbital; (3) hexobarbital; (4) fenobarbital; (5) pentobarbital; (6) kyselina barbiturová

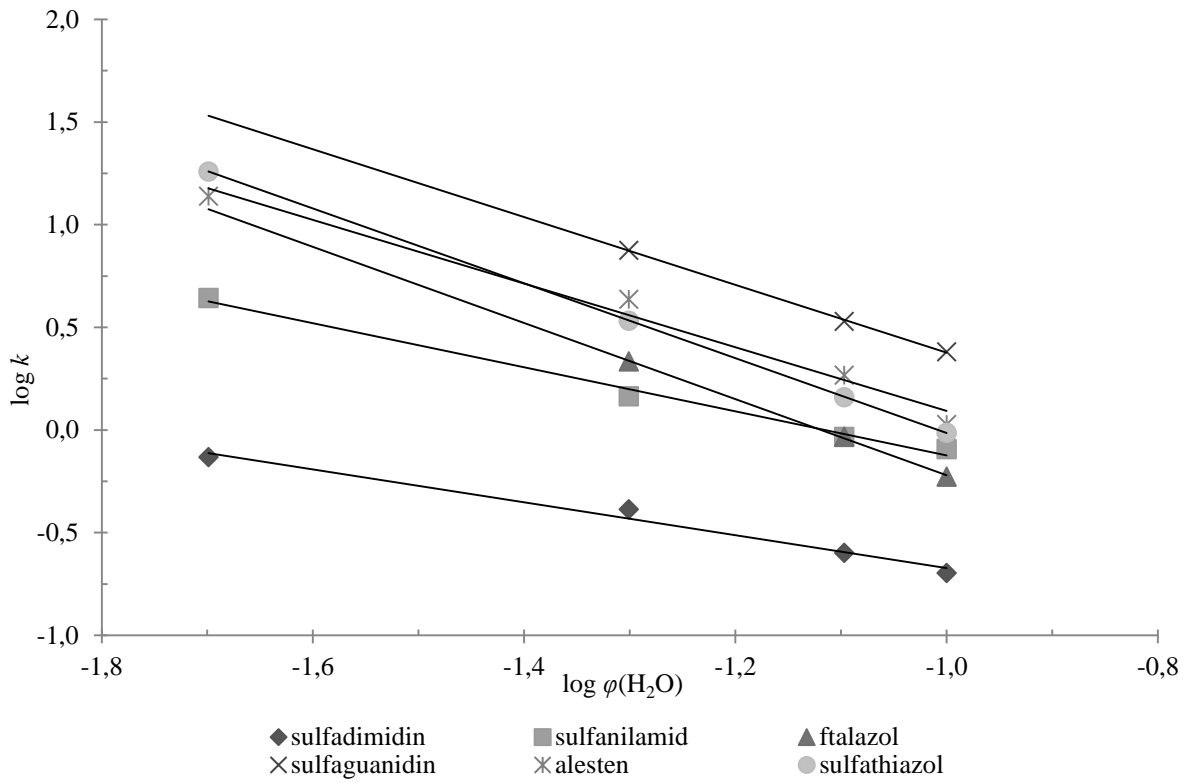
Obrázek 35 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód sulfonamidů (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90-98 %



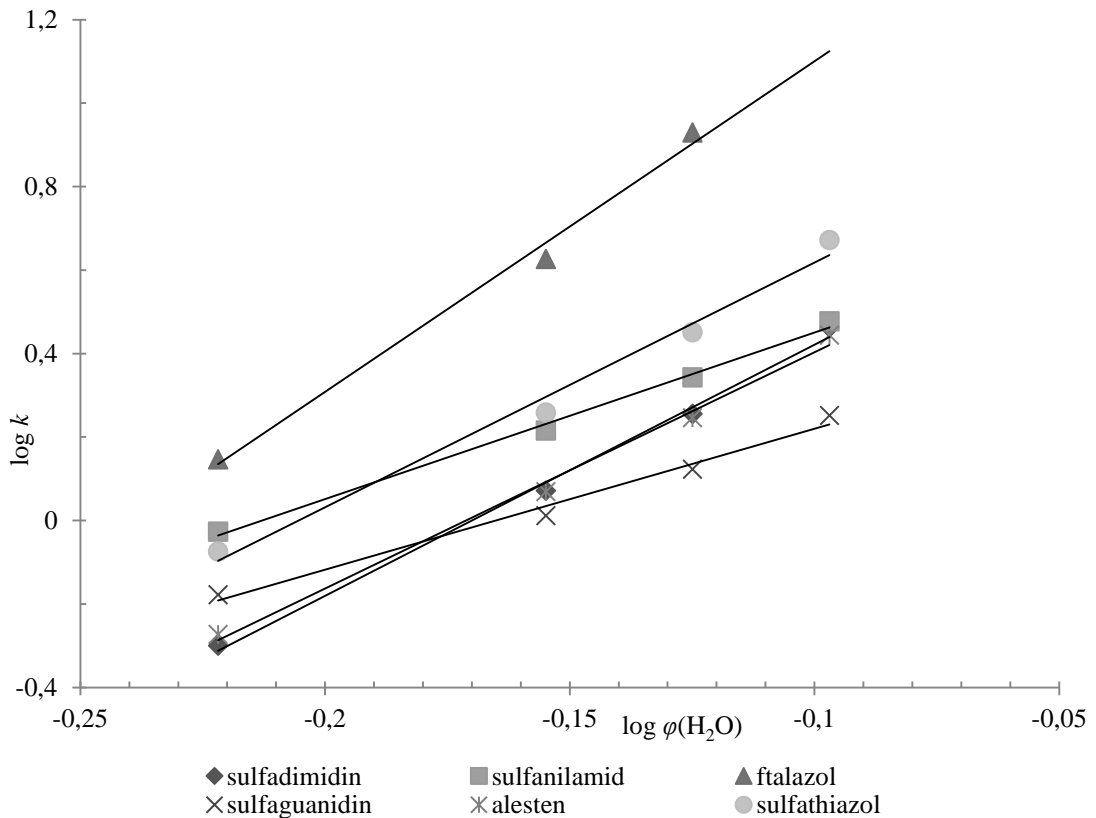
Obrázek 36 - Závislost $\log k$ na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód sulfonamidů (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 20-40 %



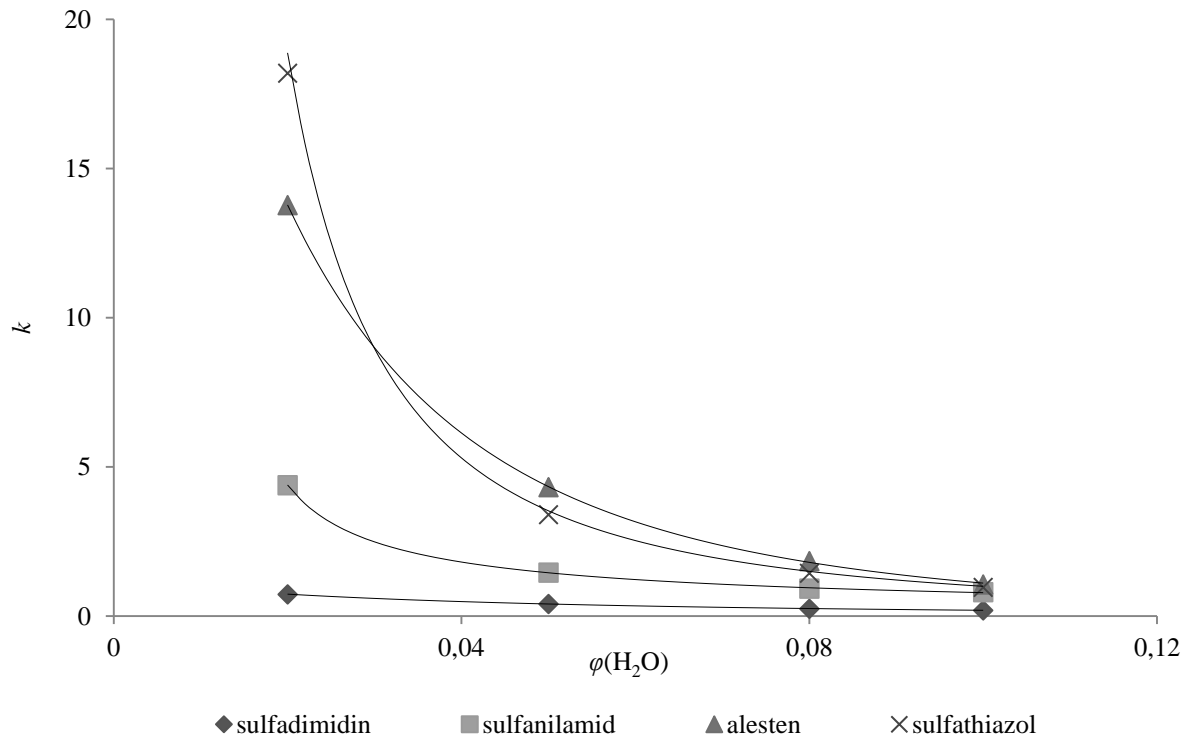
Obrázek 37 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód sulfonamidů (rovnice 8); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90 - 98 %



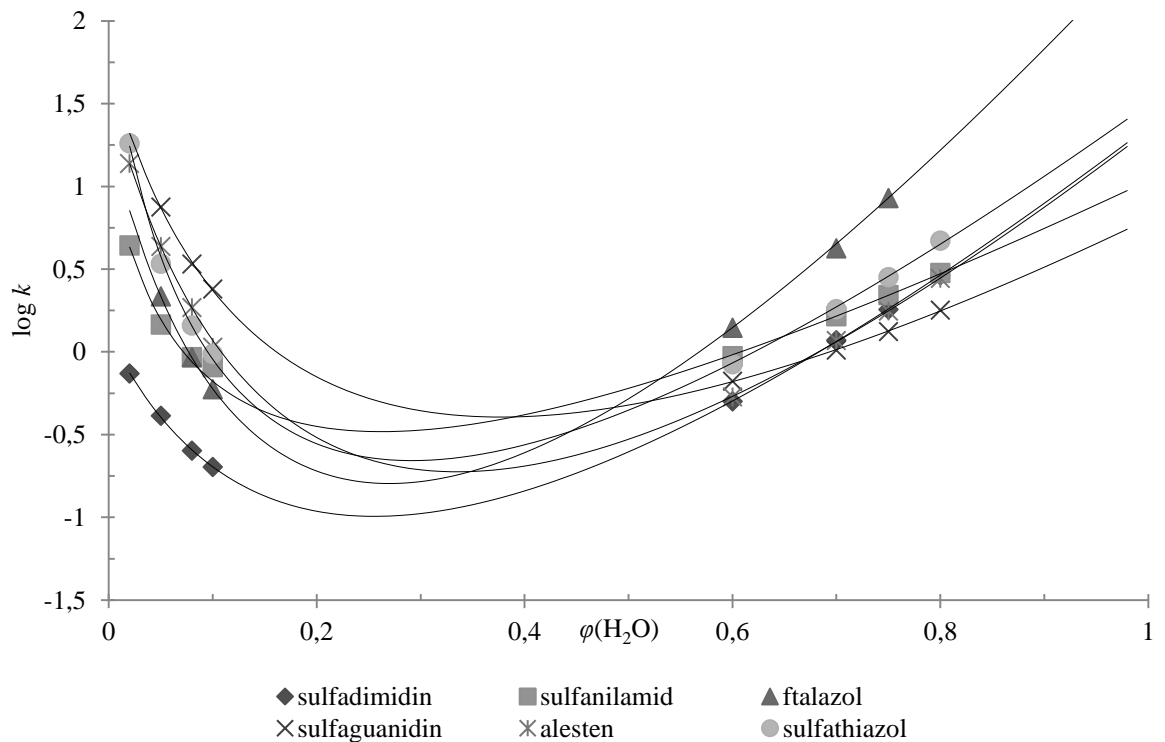
Obrázek 38 - Závislost $\log k$ na $\log \varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro RP mód sulfonamidů (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 20-40 %



Obrázek 39 - Závislost retenčního faktoru, k , na $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ pro HILIC mód sulfonamidů (rovnice 9); mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3), kde φ označuje objemový zlomek vody, rozsah ACN 90 - 98 %

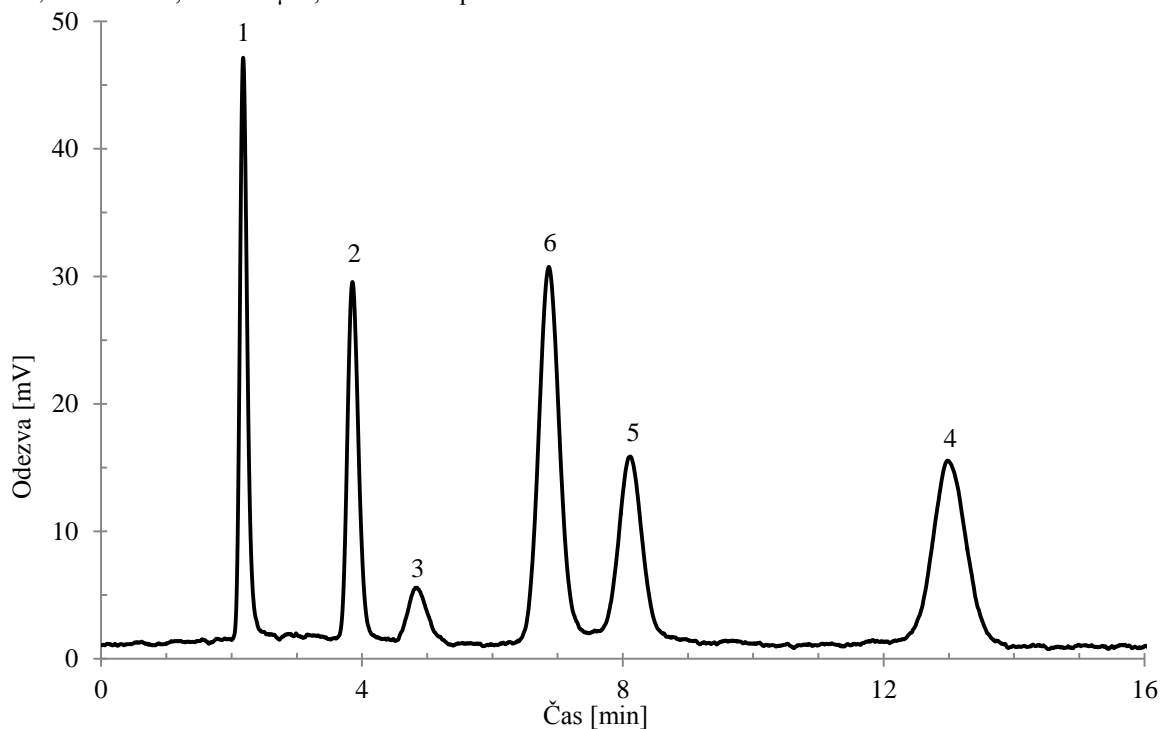


Obrázek 40 - Vliv vodné frakce $\varphi(\text{H}_2\text{O})$, ve vodně-organické mobilní fázi na retenčním faktoru, k , sulfonamidů na koloně DiEDMA (rovnice 12) mobilní fáze: 10 mM, NH_4AC v ACN a 10 mM NH_4AC ve vodě (pH = 3) rozsah složení mobilní fáze 20-98 % ACN



Obrázek 41 - Separace sulfonamidů na koloně DiEDMA

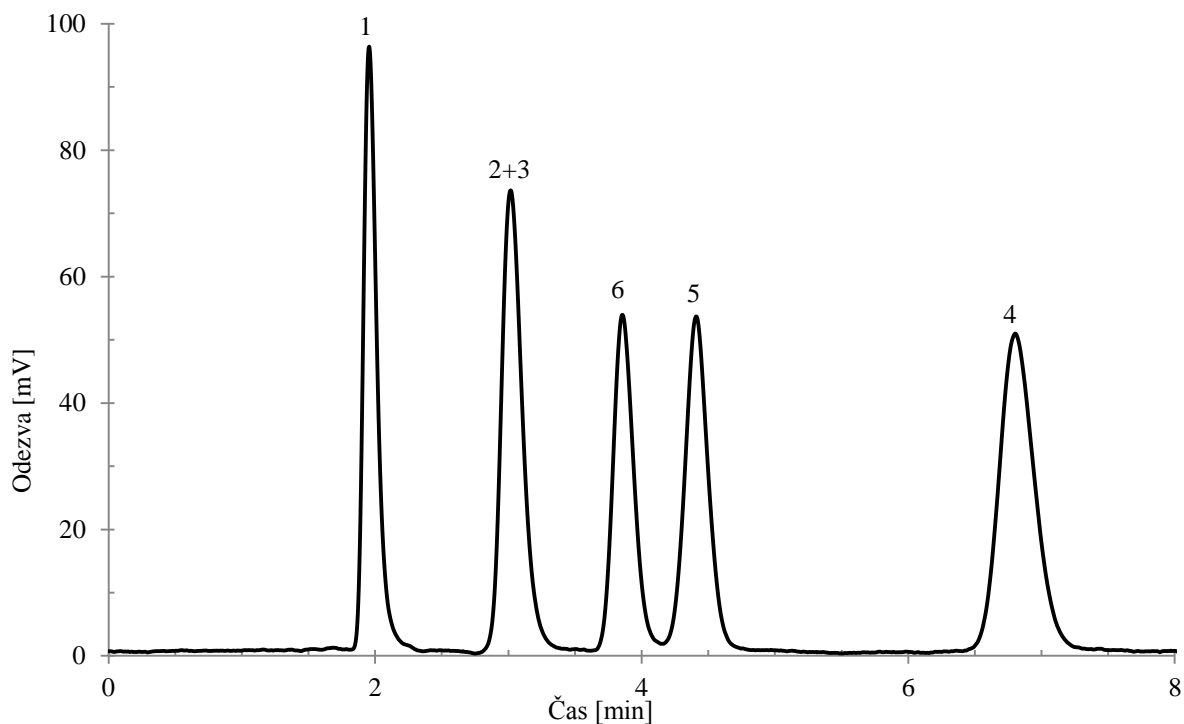
Mobilní fáze: 95 % 10 mM, NH₄AC v ACN a 5% 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); Fm = 5 μl/min, p = 28,6 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 214 nm



Směs: [1] sulfadimidin; [2] sulfanilamid; [3] ftalazol; [4] sulfaguanidin; [5] alesten; [6] sulfathiazol

Obrázek 42 - Separace sulfonamidů na koloně DiEDMA

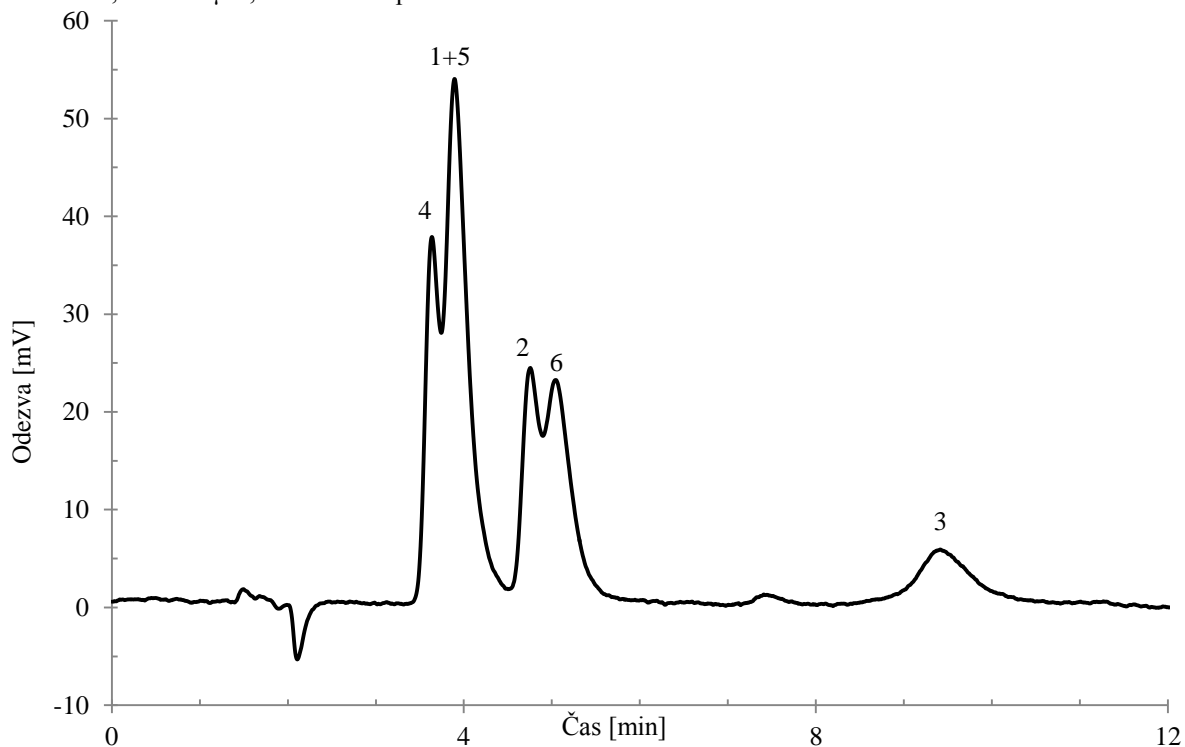
Mobilní fáze: 92 % 10 mM, NH₄AC v ACN a 8% 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); Fm = 5 μl/min, p = 40,3 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 214 nm



Směs: [1] sulfadimidin; [2] sulfanilamid; [3] ftalazol; [4] sulfaguanidin; [5] alesten; [6] sulfathiazol

Obrázek 43 - Separace sulfonamidů na koloně DiEDMA

Mobilní fáze: 30 % 10 mM, NH₄AC v ACN a 10 mM NH₄AC ve vodě (pH = 3); Fm = 5 μl/min, p = 15,7 MPa, l = 145 mm, d = 320 μm, UV detekce při λ = 214 nm



Směs: [1] sulfadimidin; [2] sulfanilamid; [3] ftalazol; [4] sulfaguanidin; [5] alesten; [6] sulfathiazol