

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Separace polykondenzovaných alkoholů po derivatizaci pomocí  
kapalinové chromatografie

Bc. Kamila Křapková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamila Křapková**  
Osobní číslo: **C16544**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Separace polykondenzovaných alkoholů po derivatizaci pomocí kapalinové chromatografie**  
Zadávající 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. V teoretické části diplomové práce popište principy kapalinové chromatografie, instrumentaci a nejčastěji používané fázové systémy. Rešeršně zpracujte téma polykondenzovaných alkoholů včetně možností jejich stanovení. Zaměřte se zejména na polyethylenglykoly a polypropylenglykoly.
2. Připravte deriváty vybraných polykondenzovaných alkoholů vhodné pro spektrofotometrickou detekci v UV oblasti. Proměřte retenční chování vybraných vzorků polyolů v systémech s obrácenými fázemi a v chromatografii hydrofilních interakcí.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jana Váňová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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 využití 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 5. 2018

Kamila Křapková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při měření dat pro experimentální část a také za čas strávený při konzultacích a vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Váňové, Ph.D. za praktické rady a podporu při měření.

## **ANOTACE**

V této práci byly separovány polykondenzované alkoholy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV i MS detekcí. Byly využity systémy s obrácenými fázemi a následně i chromatografie hydrofilních interakcí. Cílem práce byla optimalizace separačních podmínek pro dané polyoly. Jednotlivé standardy polyolů byly před analýzou derivatizovány pomocí fenylisokyanátu. Nejlépe byly oligomery derivatizovaných polyolů rozseparovány v systému s obrácenými fázemi, zatímco v systému HILIC většinou koeluovaly.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

polykondenzované alkoholy, kapalinová chromatografie, derivatizace, fázové systémy

## **TITLE**

Separation of polycondensed alcohols after derivatization using liquid chromatography

## **ANNOTATION**

The polycondensed alcohols were separated in this diploma thesis by the high performance liquid chromatography with both, UV and MS detection. The reversed-phase systems were used, followed by separations in hydrophilic interaction liquid chromatography. The aim of the diploma thesis was to optimize the separation conditions for given polyols. Individual polyol standards were derivatized with phenyl isocyanate before analysis. The most of the oligomers of derivatized polyols were separated in the reversed-phase system, whereas in the HILIC system most of them coeluted.

## **KEY WORDS**

polycondensed alcohols, liquid chromatography, derivatization, phase systems

# OBSAH

Úvod.....	15
1. Teoretická část.....	16
1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	16
1.1.1 Instrumentace pro HPLC .....	16
1.1.1.1 Transport mobilní fáze .....	16
1.1.1.2 Dávkování vzorku .....	17
1.1.1.3 Chromatografické kolony .....	17
1.1.1.4 Detekce látek .....	19
1.1.1.5 Zařízení pro zpracování získaných dat .....	21
1.1.2 Hodnocení chromatografické separace .....	21
1.1.3 Fázové systémy v kapalinové chromatografii .....	23
1.1.3.1 Chromatografie v systému s normálními fázemi (NP-HPLC) .....	23
1.1.3.2 Chromatografie v systému s reverzními fázemi (RP-HPLC).....	24
1.1.3.3 Hydrofilní interakční chromatografie .....	24
1.1.4 Eluce .....	25
1.1.4.1 Gradientová eluce .....	25
1.1.4.2 Izokratická eluce.....	26
1.1.5 Derivatizace pro kapalinovou chromatografii .....	26
1.2 Polykondenzované alkoholy (polyoly) .....	26
1.2.1 Polykondenzace .....	27
1.2.1.1 Mechanismus polykondenzace .....	27
1.2.2 Technické polyoly.....	28
1.2.2.1 Výroba polyetherpolyolů.....	28
1.2.2.2 Polyethylenglykol.....	30
1.2.2.3 Polypropylenglykol .....	30

1.2.3	Možnosti separace polyolů .....	31
2.	Experimentální část .....	32
2.1	Přístroje a zařízení.....	32
2.2	Použité chemikálie .....	33
2.3	Pracovní postup.....	34
2.3.1	Derivatizace polyolů .....	34
2.3.2	Příprava polyolů k analýze .....	37
2.4	Podmínky při separaci.....	37
2.4.1	Podmínky při analýze s izokratickou elucí v RP-HPLC-UV .....	37
2.4.2	Podmínky při analýze s gradientovou elucí v RP-HPLC-UV .....	38
2.4.3	Podmínky při analýze s gradientovou elucí v HILIC-UV .....	39
2.4.4	Podmínky při analýze s gradientovou elucí v RP-HPLC-MS .....	41
2.4.5	Podmínky při analýze s gradientovou elucí v HILIC-MS .....	42
3.	Výsledky a diskuze.....	44
3.1	Zhodnocení derivatizačních postupů.....	44
3.2	Analýzy pomocí RP-HPLC-UV s izokratickou elucí .....	45
3.3	Analýzy pomocí RP-HPLC-UV s gradientovou elucí .....	48
3.4	Analýzy pomocí HILIC-UV s gradientovou elucí .....	50
3.5	Analýzy pomocí RP-HPLC-MS s gradientovou elucí .....	51
3.6	Analýzy pomocí HILIC-MS s gradientovou elucí .....	54
	Závěr .....	57
	Seznam použité literatury .....	58
	Přílohy.....	63



## Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma HPLC kolony [1] .....	18
Obrázek 2 Struktura stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně [8].....	19
Obrázek 3 Schematické znázornění polykondenzace [28,30] .....	27
Obrázek 4 Strukturální vzorec PEG a PPG [34].....	30

## Seznam rovnic

Rovnice 1 Výpočet rozlišení látek i, j [2] .....	21
Rovnice 2 Skutečná rovnice rozlišení [1,2] .....	22
Rovnice 3 Výpočet tlakového spádu na koloně [13] .....	22
Rovnice 4 Rovnice permeability kolony [2,13] .....	22
Rovnice 5 Retenční faktor [13] .....	46
Rovnice 6 Výpočet odchylky m/z .....	53

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Některé společné iniciátory pro polyetherpolyoly [25] .....	29
Tabulka 2 Přehled pracovních postupů derivatizace .....	36
Tabulka 3 Molekulové hmotnosti derivátů PEG s PIC pro PEG 400 a PEG 600 .....	53
Tabulka 4 Molekulové hmotnosti derivátů PPG s PIC pro PPG 400 a PPG 800 .....	54
Tabulka 5 Molekulové hmotnosti derivátů PEG s PIC pro PEG 400.....	56

## **Seznam grafů**

Graf 1 Gradienty pro RP-HPLC-UV .....	39
Graf 2 Gradienty pro HILIC-UV .....	40
Graf 3 Gradienty pro RP-HPLC-MS .....	42
Graf 4 Gradient pro HILIC-MS .....	43

## Seznam použitých zkratek

<b>ACN</b>	acetonitril
<b>EG</b>	ethylenglykol
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GPC</b>	gelově permeační chromatografie
<b>HILIC</b>	hydrofilní interakční chromatografie
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IEC</b>	iontově výměnná chromatografie
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>NP-HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
<b>ODS</b>	oktadecylsilikagel
<b>PEG</b>	polyethylenglykol
<b>PEO</b>	polyethylenoxid
<b>PG</b>	propylenglykol
<b>PIC</b>	fenyloxykarbonyl
<b>PPG</b>	polypropylenglykol
<b>PU</b>	polyuretan
<b>RP-HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s reverzními fázemi
<b>SFC</b>	superkritická fluidní chromatografie
<b>TOF</b>	time-of-flight (analyzátor doby průletu)
<b>UV</b>	ultrafialová oblast spektra
<b>Vis</b>	viditelná oblast spektra

## Seznam použitých symbolů

$\Delta m/z$	odchylka m/z
$\Delta p$	tlakový spád na koloně
$\eta$	viskozita mobilní fáze
$\sigma_D^2$	objemový mimokolonový příspěvek cely detektoru
$B$	permeabilita kolony
$d_c$	průměr kolony
$d_p$	průměr částic náplně
$F_m$	průtok mobilní fáze
$k$	retenční faktor
$L$	délka kolony
$n$	účinnost kolony (počet teoretických pater kolony)
$R_{i,j}$	rozlišení
$r$	vnitřní poloměr kolony
$r_{j,i}$	retenční poměr
$t_M$	mrtvý retenční čas kolony
$t_R$	retenční čas
$Y$	šířka píku na úrovni nulové linie

## Úvod

Polykondenzované alkoholy, tedy polyoly připravené pomocí polykondenzační reakce se v dnešní době využívají především pro výrobu polyuretanu. Samotné polyuretany, nejčastěji vyrobené z polyetherpolyolů mají řadu možných využití (polyuretanové pěny, vlákna atd.). Polyethylenglykoly pak našly uplatnění například v kosmetickém či farmaceutickém průmyslu, zatímco polypropylenglykoly s koncovými hydroxylovými skupinami se staly důležitými složkami pro výrobu polyuretanových pěn.

V této práci budou separovány deriváty vybraných polykondenzovaných alkoholů, jenž jsou vhodné pro spektrofotometrickou detekci v UV oblasti a stejně tak i pro MS. Cílem je optimalizace separačních podmínek pro dané deriváty polyolů. Separace jednotlivých polyolů budou provedeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi a chromatografií s hydrofilními interakcemi.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie, zkráceně HPLC (z angl. High Performance Liquid Chromatography) představuje nejčastěji užívané experimentální uspořádání v rámci kapalinové chromatografie. Řadí se mezi separační metody, jenž jsou založeny na rozdílné distribuci separovaných látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze, a to fází mobilní neboli pohyblivou a fází stacionární, která je umístěna v chromatografické koloně. HPLC zahrnuje soubor metod, které jsou založeny na různých separačních mechanismech a mezi jejichž společné rysy se řadí užití vysokotlaké techniky, kapalně mobilní fáze a využití účinných kolon pro rychlou analýzu. Tyto metody lze dělit na chromatografii v systému kapalina – kapalina, kde stacionární fází je kapalina zakotvená na vhodném nosiči, dále pak chromatografie v systému kapalina – tuhá fáze, iontově výměnná chromatografie, gelově permeační chromatografie a afinitní chromatografie [1,2].

### 1.1.1 Instrumentace pro HPLC

Sestava kapalinového chromatografu se skládá ze základních částí, které mohou být doplněny dalšími částmi. Mezi základní části se řadí ty, jenž zajišťují uchovávání a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze a vysokotlaká čerpadla), dávkování vzorku (manuální dávkovací ventily či autosamplery), separaci látek (chromatografická kolona se stacionární fází), detekci látek, registraci signálu a vyhodnocování získaných chromatogramů. Mezi doplňkové části se řadí například zařízení pro odplynění mobilní fáze, zařízení pro tvorbu koncentračního gradientu mobilní fáze či různé předkolonové filtry [2,3].

#### 1.1.1.1 Transport mobilní fáze

Tato část chromatografu je zastoupena zásobníky mobilních fází, odplyňovačem, vysokotlakým čerpadlem, tlumičem pulzů a směšovači mobilních fází [1].



Čerpadla musí zajišťovat plynulé dávkování mobilní fáze bez kolísání jejího průtoku při tlacích v rozmezí 30 až 60 MPa, u moderních systémů se jedná o tlaky až do 150 MPa. Nejčastěji užívanými materiály pro jejich výrobu jsou nerezová ocel či titan, to znamená materiály odolné vůči korozi. Čerpadla mobilních fází se dělí na dva typy dle toho, zda pracují za konstantního tlaku anebo za konstantního objemového průtoku. U obou typů se principiálně jedná o vytlačování mobilní fáze ze zásobníků membránou či pístem, rozdíl spočívá ve způsobu dosažení pohybu pístu čerpadla. Zatímco čerpadla pracující za konstantního tlaku využívají k pohybu pístu tlak plynu nebo hydraulické kapaliny jenž na něj působí, čerpadla s konstantním objemovým průtokem využívají k jeho pohybu mechanický pohon [2,4,5].

#### **1.1.1.2 Dávkování vzorku**

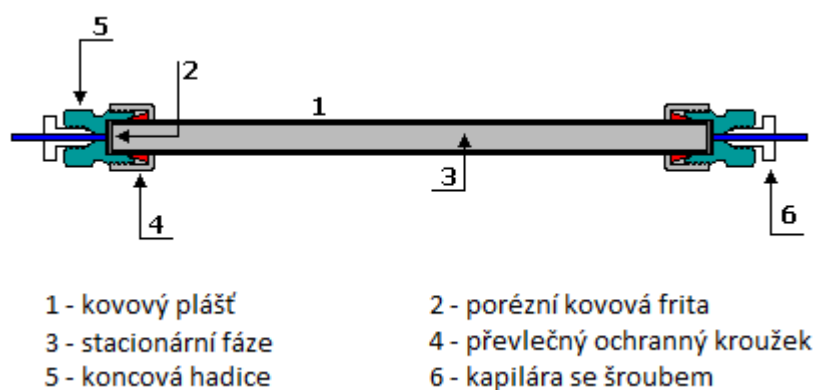
Dávkování vzorků do značné míry ovlivňuje i účinnost chromatografického procesu. Vlivem nedokonalého dávkování může docházet k rozšiřování elučních zón, jenž je způsobeno mimokolonovým příspěvkem dávkovacího zařízení, a to zejména při užití vysoce účinných kolon, krátkých kolon či mikrokolon. Pro dávkování vzorků se dnes nejvíce užívají autosamplery, jenž nám umožňují analyzovat velké množství vzorků v krátkém čase. Dále jsou užívány i manuální smyčkové dávkovače, které umožňují dávkovat jak konstantní, tak i různě nastavitelné objemy vzorků [3,4].

#### **1.1.1.3 Chromatografické kolony**

Výsledek chromatografické analýzy určuje především kvalita kolony a typ její náplně, a právě proto má volba vhodné kolony rozhodující význam. V HPLC se jako kolony užívají rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem nebo pak kapiláry, které jsou rovnoměrně naplněny částicemi stacionární fáze. Plášť kolony musí nejenom udržet stacionární fázi pohromadě uvnitř kolony, ale jsou na něj kladeny i další nároky, jako dostatečně hladký vnitřní povrch, chemická inertnost a odolnost vůči vysokým tlakům až do 100 MPa. Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jsou nejčastěji vyráběny z materiálu jako je nerezová ocel, borosilikátové sklo, kov či inertní plast. Rozměry kolon, tzn. délka a vnitřní průměr kolony jsou voleny s ohledem na typ chromatografické aplikace, požadovanou rychlost analýzy, náročnost separace a také s ohledem na množství vzorku, jenž je k dispozici pro danou analýzu. Běžně jsou užívány kolony o rozměrech 5 – 30 cm na délku a 2 – 6 mm ve vnitřním

průměru pro konvenční analytické kolony; s vnitřním průměrem 1 – 2 mm pro mikrokolony a průměry pod 500 μm se užívají pro kapilární kolony. Délka kolony ovlivňuje dobu analýzy a rozlišení, zatímco v závislosti na vnitřním průměru je volen objemový průtok mobilní fáze. Společně pak oba tyto parametry ovlivňují tlakový spád na koloně, šířku píku a mez stanovitelnosti [3 – 5].

Vlastní klasická kolona pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, jejíž schématické znázornění je na obrázku 1, je složena z kovového pláště (1), který je uzavřen kovovou porézní fritou (2), jenž zabraňuje úniku stacionární fáze (3) a zároveň umožňuje plynulý průtok mobilní fáze kolonou. Konce kolony jsou zakončeny ochranným převlečným kroužkem (4) a koncovkou, v níž je vyvrtán otvor pro kapiláru se šroubem (6) [1].



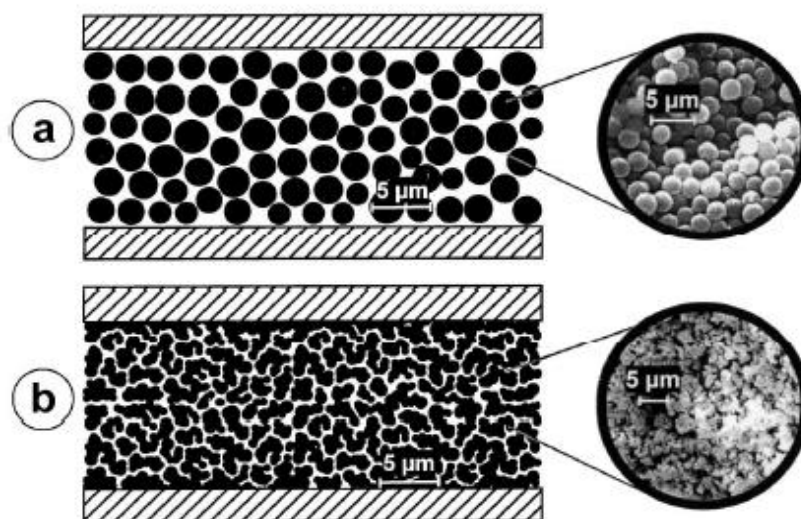
Obrázek 1 Schéma HPLC kolony [1]

Kolony pro kapalinovou chromatografii lze dělit dle různých hledisek. Z hlediska velikosti je rozdělujeme na preparativní, semipreparativní, analytické, mikrokolony, kapilární plněné a kapilární prázdné (otevřené) kolony, které mají na stěnách chemicky vázanou fázi. Dle zrnění částic stacionární fáze je pak dělíme na plně porézní a na kolony s povrchově porézními částicemi. Podle uspořádání stacionární fáze v koloně je rozdělujeme na kolony náplňové s diskretními, nejčastěji sferickými částicemi a na kolony monolitické neboli polymerní. U náplňových kolon mohou být částice zcela porézní nebo povrchově porézní s plným neporézním jádrem. Monolitické kolony jsou tvořeny jedním kusem pórovitého materiálu, který zaplňuje celou její vnitřní část. Porovnání náplňových a monolitických kolon je znázorněno na obrázku 2 [3,6,7].

Povrchově porézní částici tvoří pevné neporézní silikagelové jádro a slabá obalová vrstva porézního silikagelu, v jejichž pórech dochází k samotné separaci. Póry obalové vrstvy mají velikost cca 9 nm a zaujímají přibližně 75 % celého objemu porézní částice. Mezi jejich hlavní výhody patří vysoká účinnost separace a také rychlost analýzy

bez nárůstu zpětného tlaku v systému. Nevýhodou je pak skutečnost, že jsou založeny na bázi silikagelu, což sebou přináší značná omezení v rámci teplotní a chemické stability a také nižší kapacitu pro dávkování vzorku [1].

Monolitické kolony obsahují velké póry neboli makropóry, jejichž velikost se pohybuje mezi 50 nm až 1  $\mu\text{m}$  a protéká jimi mobilní fáze. Dále pak malé póry, jenž se dělí na mikropóry (menší než 2 nm) a mezopóry (o velikosti 2 – 50 nm). Tyto malé póry zajišťují dostatečně specifický povrch pro interakci s analytem. Díky této struktuře je možné při práci s monolitickými kolonami využívat vysokou průtokovou rychlost mobilní fáze bez výrazného zvýšení tlaku a zároveň bez snížení separační účinnosti [8,9].



Obrázek 2 Struktura stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně [8]

#### 1.1.1.4 Detekce látek

Detekční zařízení je v kapalinovém chromatografu umístěno za kolonou a jeho úkolem je zaznamenat rozdíl signálu mezi procházející čistou mobilní fází a mezi mobilní fází obsahující analyt. Detektory užívané v rámci HPLC se řadí do skupiny koncentračních detektorů, tzn. detektorů, jenž reagují na změnu hmotnostní koncentrace analytu, a to nezávisle na rychlosti přítoku složky do detekční cely. Základní dělení je rozděluje na detektory univerzální a selektivní. U selektivních detektorů je signál úměrný koncentraci analyzované látky v eluátu, zatímco signál univerzálního detektoru je úměrný konkrétní vlastnosti celkového eluátu [2,5].

Mezi vlastnosti ideálního detektoru v HPLC se řadí vysoká citlivost, odezva pro všechny analyty (tzn. univerzálnost), linearita, specifita, snadná použitelnost,

nedestruktivnost (bez chemické změny detekované složky) či například nezávislost signálu na změně teploty a průtoku mobilní fáze [1].

V kapalinové chromatografii jsou využívány různé typy detektorů, jako například spektrofotometrický, elektrochemický, refraktometrický, fluorimetrický, vodivostní či hmotnostní spektrometr [3,4,10].

Spektrofotometrický detektor pracuje na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek 190 až 800 nm. Podstatou správné činnosti UV/VIS detektorů je dobrá konstrukce cely detektoru, která by měla eliminovat smísení separovaných elučních zón. Požadavkem je minimální objemový mimokolonový příspěvek cely detektoru ( $\sigma_D^2$ ), který přispívá k rozšiřování eluční zóny. Optika cely soustřeďuje světelný paprsek do středu cely, kde je drift průtoku nejmenší. Využití maximální energie a její směřování z cely detektoru do fotočidla zajišťuje dostatečná šířka cely. Podle vlnové délky, jež je užívána k měření, odlišujeme čtyři konstrukční typy UV/VIS detektorů. Hovoříme o detektorech pracujících za konstantní vlnové délky (nejčastěji pak 254 nm), o detektorech, u nichž je možné volit mezi několika různými vlnovými délkami, dále o detektorech, jež jsou vybaveny monochromátorem, a nakonec o detektorech s diodovým polem. Spektrofotometrické detektory jsou vhodné i při využívání gradientové eluce. Pro kvantitativní vyhodnocení se využívá Lambert-Beerova zákona a z hlediska nevýhod hovoříme u tohoto typu detekce o tom, že tento detektor není schopen zaznamenat složky, jež neabsorbují ultrafialové záření [1,3,4].

Počátky užívání kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) byly podníceny velkým úspěchem ve spojení GC-MS. Hlavními problémy zde bylo převedení analyzovaných látek do plynného stavu a odstraňování velkých přebytků mobilní fáze. Zatímco jsou analyzované látky z kapalinového chromatografu unášeny proudem kapaliny za atmosférického tlaku, hmotnostní spektrometr pracuje za vysokého vakua ( $10^{-3} - 10^{-12}$  Pa). Principem MS je interakce nabitých částic s magnetickým či elektrickým polem ve vakuu. Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí. První část MS představuje iontový zdroj, jehož podstatou je tvorba kladně či záporně nabitých iontů, ať už molekulárních nebo aduktových, u některých málo stabilních látek pak mohou vznikat i fragmenty ionizované molekuly. Pro spojení HPLC s MS lze zmínit například ionizaci elektrosprejem či chemickou ionizaci za atmosférického tlaku. Další částí hmotnostního spektrometru je takzvaný hmotnostní

analyzátor, v němž se za vakua separují ionty na základě svého poměru hmotnosti ku náboji neboli  $m/z$ . Jedná se například o kvadrupólový analyzátor nebo analyzátor doby průletu (TOF, z angl. time-of-flight). Třetí, a tedy poslední základní část MS představuje detektor. Detektor zaznamenává ionty, jenž byly vybrány hmotnostním analyzátozem a získaný signál je pak následně převáděn do digitálního formátu. U detektorů lze zmínit například elektronový násobič či Faradayovu klec [10 – 12].

#### 1.1.1.5 Zařízení pro zpracování získaných dat

Získaná data se zpracovávají pomocí počítače, jenž je spojen s chromatografem a dále je vybaven programem pro sběr a vyhodnocování chromatografických dat. Dříve se v chromatografii pro vyhodnocování dat využívaly jedno- i vícekanálové integrátory, které byly vybaveny mikroprocesorem [3,5].

### 1.1.2 Hodnocení chromatografické separace

U chromatografických metod je hlavním cílem dosáhnout co nejlepšího rozdělení separovaných vzorků v přijatelném čase. Odlišujeme dva typy rozdělení látek, a to rozdělení dokonalé a nedokonalé. Parametrem, jenž charakterizuje míru kvality separace dvou sousedících elučních křivek je rozlišení. Hovoříme o tom, že separace látek je tím lepší čím vyšší je hodnota rozlišení. Pro sousedící píky  $i, j$  lze definici rozlišení ( $R_{i,j}$ ) vyjádřit rovnicí 1, kde  $t_R$  jsou retenční časy látek  $i, j$  a  $Y$  pak odpovídá šířkám píků těchto látek na úrovni nulové linie [1 – 3].

$$R_{i,j} = \frac{t_{R,j} - t_{R,i}}{0,5 \cdot (Y_j - Y_i)}$$

*Rovnice 1 Výpočet rozlišení látek  $i, j$  [2]*

Rovnice 1 nám sice umožňuje kvantitativní vyjádření rozlišení, ovšem nevypovídá nic o parametrech chromatografického systému, jenž ho ovlivňují. Pro tento účel je odvozována rovnice 2, která se pak také označuje jako skutečná rovnice rozlišení. Z rovnice 2 je patrné, že rozlišení ovlivňují tři faktory. Prvním faktorem je účinnost (kinetický faktor), který vypovídá o tom, že rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině počtu teoretických pater kolony ( $n$ ). Druhým je selektivita (termodynamický faktor), z něhož je patrné, že je rozlišení přímo úměrné retenčnímu poměru ( $r_{j,i}$ ).

Poslední faktor je kapacitní a vyplývá z něj skutečnost, že rozlišení sousedících píků stoupá s rostoucí hodnotou retenčního faktoru ( $k$ ) [1 – 3].

$$R_{i,j} = \frac{\sqrt{n_i}}{4} \cdot (r_{j,i} - 1) \cdot \left( \frac{k_i}{1 + k_i} \right)$$

*Rovnice 2 Skutečná rovnice rozlišení [1,2]*

Objemový průtok mobilní fáze kolonou ovlivňuje pouze účinnost kolony neboli počet teoretických pater ( $n$ ). Snížením průtoku se většinou dosáhne zvýšení účinnosti separace, ovšem přináší to sebou i značné prodloužení doby analýzy [2].

S objemovým průtokem na koloně souvisí také velikost pracovního tlaku. Ten by neměl přesáhnout 40 MPa pro běžné HPLC systémy, a to pro kovové kolony a kolony typu „cartridge“. Rozdíl mezi skutečným a vypočteným tlakem na koloně je přijatelný, pokud nepřesahuje 10 – 15 %. Výpočet tlakového spádu na koloně ( $\Delta p$ ) pro vodnou mobilní fázi při jejím průtoku 1 ml/min je znázorněn rovnicí 3, kde  $L$  je délka kolony (mm);  $f$  je faktor, jenž pro kovovou kolonu nabývá hodnoty 10,13 a pro kolony typu „cartridge“ pak 20,26;  $d_p$  průměr částic náplně ( $\mu\text{m}$ );  $d_c$  průměr kolony (mm) a  $\eta$  je dynamická viskozita [1,13].

$$\Delta p = \frac{2,1 \cdot L \cdot f}{d_p^2 \cdot d_c^2} \cdot \eta$$

*Rovnice 3 Výpočet tlakového spádu na koloně [13]*

S typem náplně chromatografické kolony souvisí takzvaná permeabilita kolony. Z hlediska permeability kolony hovoříme o konstantě, jenž nezávisí na rozměrech kolony, tlakovém spádu, teplotě a ani na složení mobilní fáze. Z toho vyplývá, že hodnotu permeability stanovenou v jedné mobilní fázi je možné využít i pro jinou mobilní fázi. Výpočet permeability ( $B$ ) je patrný z rovnice 4, kde  $F_m$  je průtok mobilní fáze,  $\eta$  je viskozita mobilní fáze,  $L$  délka kolony,  $\Delta p$  je tlakový spád na koloně a  $r$  je vnitřní poloměr kolony [2,13].

$$B = \frac{F_m \cdot \eta \cdot L}{\Delta p \cdot \pi \cdot r^2}$$

*Rovnice 4 Rovnice permeability kolony [2,13]*

### 1.1.3 Fázové systémy v kapalinové chromatografii

V HPLC rozhoduje o kvalitě separace především využitý chromatografický fázový systém, to znamená správná a vhodná kombinace mobilní a stacionární fáze. Dle polaritý těchto fází rozlišujeme dva typy chromatografie, a to chromatografii v systému s normálními fázemi (NP-HPLC) a chromatografii v systému s reverzními fázemi (RP-HPLC). Dále lze hovořit o takzvané hydrofilní interakční chromatografii, která je zjednodušeně řečeno založena na propojení principů NP-HPLC a RP-HPLC, ovšem jedná se o separační metodu, jenž je vhodná převážně pro separaci polárních látek [2,14].

#### 1.1.3.1 Chromatografie v systému s normálními fázemi (NP-HPLC)

Základní podstatou je zde skutečnost, že stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní. Principem retence je soutěž mezi dělenou látkou a mobilní fází o lokalizovaná adsorpční centra na povrchu fáze stacionární. Hovoříme o tom, že s rostoucí polaritou analytů se zvyšuje retence látek na koloně a dále pak o tom, že retence látek na koloně klesá se zvyšující se koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi. Tento typ vysokoúčinné kapalinové chromatografie je nejvíce vhodný pro separace málo až středně polárních látek a také pro separace látek neiontových. Mezi výhody NP-HPLC patří především poměrně malý tlakový spád na koloně, z hlediska nevýhod zde pak hovoříme o vysokých pořizovacích nákladech organických rozpouštědel a také pak o závislosti retence na velmi nízkých koncentracích vody v organických rozpouštědlech [1,2,15].

Stacionární fází je zde nejčastěji silikagel, dále to mohou být polární chemicky modifikované fáze na bázi silikagelu (modifikace např. diolovou nebo nitrilovou skupinou) či stacionární fáze na bázi jiných oxidů kovů, než je oxid křemičitý (oxid hlinitý, oxid zirkoničitý anebo oxid titaničitý) [16 – 18].

Jako mobilní fáze se nejčastěji užívají směsi dvou či více rozpouštědel, jenž mají odlišnou polaritu. Příkladem nepolární složky mobilní fáze může být nasycený uhlovodík, hexan či heptan a polární částí pak je acetonitril, dioxan, propanol či dichlormethan. Velikost retence i selektivita separace jsou výrazně ovlivňovány právě typem užitého polárnějšího rozpouštědla [2,15].

### 1.1.3.2 Chromatografie v systému s reverzními fázemi (RP-HPLC)

V rámci separačních HPLC modů je chromatografie v systému s reverzními fázemi nejrozšířenější, a to díky tomu, že umožňuje separace velké škály látek. Tato škála se pohybuje od nepolárních přes středně polární, silně polární až k iontovým či ionizovatelným látkám a v případě, že upravíme pH mobilní fáze přidáním vhodného pufru je možné separovat na RP-HPLC i slabé kyseliny či zásadité látky. Podstata tohoto systému je opačná, než je tomu u NP-HPLC, tedy že mobilní fáze je více polární než fáze stacionární. U stacionárních fází pro RP-HPLC hovoříme téměř o úplné absenci aktivních adsorpčních center, jenž by byla schopna polárních interakcí. Vyskytují se zde pouze slabé disperzní síly, tzn. nespecifické mezimolekulové interakce typu analyt-sorbent. Selektivita separace a velikost retence jsou ovlivňovány nejenom vlastnostmi organického rozpouštědla, ale také typem chemicky vázané nepolární stacionární fáze [1,15,19].

Chromatografie v systému s reverzními fázemi nejčastěji jako stacionární fáze využívá vázané fáze na bázi silikagelu. Z nichž pak převažuje použití takzvaného ODS neboli oktadecylsilikagelu ( $C_{18}$ ), dále pak  $C_8$ ,  $C_4$ , fenylové fáze, fáze fluorované či alkylové fáze s počtem uhlíku větším než 18. Vedle těchto fází na bázi silikagelu lze uvést i anorganicko-organické hybridy, modifikované oxidy kovů či monolitické kolony [15,19].

Nejběžněji se jako mobilní fáze v chromatografii s reverzními fázemi užívají směsi složené z vodné složky a jednoho či více polárních organických rozpouštědel. Vodnou složkou může být voda, pufr nebo zředěný vodný roztok báze či kyseliny. Organické rozpouštědlo musí být mísitelné s vodou, jedná se například o acetonitril, nižší alifatické alkoholy či pak tetrahydrofuran [1,15].

### 1.1.3.3 Hydrofilní interakční chromatografie

Označení hydrofilní interakční chromatografie, zkráceně známé také jako HILIC (z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) bylo poprvé použito na počátku 90. letech minulého století. Jedná se o metodu kapalinové chromatografie, která je založena na hydrofilních interakcích mezi separovanými látkami a stacionární fází. V rámci této metody jsou využívány stacionární fáze, které jsou polární. Z hlediska mobilní fáze se zde pak hovoří o vodných fázích s podílem organického rozpouštědla,



jenž přesahuje 60 objemových % tohoto rozpouštědla v mobilní fázi. Z toho vyplývá, že jak stacionární, tak i mobilní fáze jsou polárního charakteru. Ovšem aby bylo možné tuto metodu použít pro separaci polárních látek je zde důležité, aby stacionární fáze byla přece jen o něco polárnější než fáze mobilní. Díky této skutečnosti se pak polární látky separují s vysokým rozlišením, zatímco látky nepolární, které nemají ke stacionární fázi žádnou afinitu prochází kolonou bez zadržení [14,20].

V HILIC chromatografii se setkáváme s polárními chemicky vázanými fázemi na monolitickém či partikulárním nosiči. Zřejmě nejvíce je užíván klasický silikagel nebo pak stacionární fáze, které jsou modifikované například diolovými, aminovými, amidovými či pak nitrilovými funkčními skupinami. Dále se užívá silikagel modifikovaný hydrofilními polymery, jedná se o polymery typu poly(sulfoethyl) nebo pak poly(hydroxyethyl). Nakonec lze zmínit takzvané zwitteriontové stacionární fáze označované také jako ZIC<sup>®</sup>-HILIC. Podstata těchto stacionárních fází spočívá v chemicky vázaných funkčních skupinách, které nesou jak pozitivní, tak i negativní náboj a vyznačují se vysokou afinitou k vodě a také vysokou polaritou (např. betainová nebo sulfobetainová skupina) [14,20,21].

## **1.1.4 Eluce**

### **1.1.4.1 Gradientová eluce**

Princip gradientové eluce je založen na změně složení mobilní fáze v čase, tzn. že během samotné separace dojde ke zvýšení eluční síly mobilní fáze. Gradientová eluce se řadí mezi nejpoužívanější, a především pak nejúčinnější techniky, jenž jsou užívány pro změnu selektivity na chromatografické koloně. Změny složení mobilní fáze v čase se dociluje smícháváním několika různých složek, jejichž poměr je řízen vhodně zvoleným časovým programem. Odlišujeme dva typy gradientu, a to gradient stupňovitý a gradient spojitý. Spojitý gradient lze pak ještě dále rozdělit na gradient lineární a méně častý gradient exponenciální [5,22].

Zařízení pro tvorbu gradientu se dle principu, na němž je založeno dělí na dva typy. Prvním typem je takzvaný vysokotlaký gradient, který využívá toho, že každá složka mobilní fáze se dávkuje vlastním vysokotlakým čerpadlem do směšovací komůrky, jenž je umístěna těsně před chromatografickou kolonou. Druhý typ zařízení

pro tvorbu gradientu (tzv. nízkotlakého gradientu) pak mísí složky mobilní fáze ve směšovací komůrce ještě před vstupem do vysokotlakého čerpadla, to znamená, že ke smíchání složek dochází za atmosférického tlaku [2,22].

#### **1.1.4.2 Izokratická eluce**

Méně často užívaná, takzvaná izokratická eluce je založena na principu, jenž spočívá ve skutečnosti, že složení mobilní fáze se v čase nemění. To znamená, že složení mobilní fáze zůstává konstantní po celou dobu analýzy. Využití izokratické eluce pro separace látek je sice jednoduché, ovšem často není možné s touto elucí docílit uspokojivých separací s přijatelnou dobou analýzy. U látek s vysokou retencí také dochází k výraznému rozšiřování píků, což má za následek vyšší mez detekce a stanovitelnosti [5,23].

#### **1.1.5 Derivatizace pro kapalinovou chromatografii**

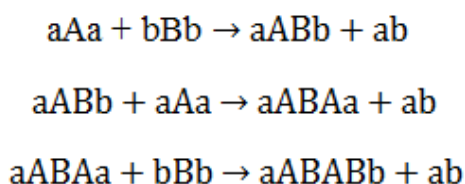
Derivatizace představuje proces při němž chemickou reakcí funkční skupiny s vhodným derivatizačním činidlem dochází k cílené přeměně chemické struktury analyzované látky, za vzniku takzvaného derivátu. Vzniklý derivát má definované složení a také požadované fyzikálně-chemické vlastnosti. Derivatizace je prováděna z důvodu umožnění separace (zvýšení rozlišení) či pak kvůli umožnění detekce (zvýšení citlivosti). Dle místa, kde dochází k chemické reakci dělíme derivatizaci na tři typy, a to na předkolonovou derivatizaci, derivatizaci na koloně a postkolonovou derivatizaci [1,24].

### **1.2 Polykondenzované alkoholy (polyoly)**

Pod pojmem polyoly v dnešní době rozumíme nejenom klasické polykondenzované alkoholy (technické polyoly), tedy sloučeniny vznikající v rámci polykondenzační reakce, ale pak také takzvané cukerné alkoholy, jenž se získávají redukcí aldehydové či ketonové skupiny na hydroxylovou. Mezi tyto látky se řadí manitol, arabitol, xylitol a řada dalších, jenž jsou užívány například jako náhrady klasických cukrů do nízkokalorických potravin [25 – 27].

## 1.2.1 Polykondenzace

Z hlediska polykondenzace hovoříme o násobně se opakující kondenzaci funkčních skupin výchozích nízkomolekulárních sloučenin neboli monomerů. Výchozí monomery musí být dostatečně stálé vůči okolním agresivním vlivům, zatímco jejich funkční skupiny, které jsou kondenzace schopné musí být reaktivní. Polykondenzace se řadí mezi stupňové reakce, kdy každý následující stupeň vede ke vzniku sloučeniny, která je schopná samostatné existence. Také nám tento typ reakce umožňuje ji v libovolném stádiu zastavit a později v ní případně pokračovat. Této skutečnosti se využívá především při přípravě zesíťovaných polymerů. Vlastnosti makromolekul připravených polykondenzací jsou velmi závislé na strukturním uspořádání molekuly, a i velmi malé defekty mohou jejich vlastnosti silně ovlivňovat. Možnost, jak schematicky znázornit polykondenzační reakci je uvedena na obrázku 3 [28 – 30].



Obrázek 3 Schematické znázornění polykondenzace [28,30]

### 1.2.1.1 Mechanismus polykondenzace

Nejprve dochází k reakci dvou funkčních skupin reaktantů, kdy tato část reakce je stejně jako všechny další části vratná. A právě proto nemůže dojít k současné reakci všech výchozích molekul, jenž by převedla původní navážku na dimery. Ve směsi nám tedy zůstává určitá část výchozích monomerů. V dalších krocích se množství výchozích monomerů postupně snižuje a následně pak dochází především k reakcím dimerů, trimerů a dále pak vyšších oligomerů. Koncové skupiny mají po prodloužení řetězce stále stejnou reaktivitu, a díky tomu se mohou snadno prodlužovat reakcí jak s monomery, tak i s delšími řetězci [28 – 30].

## 1.2.2 Technické polyoly

V rámci technických polyolů hovoříme o tom, že jejich největší část je užívána pro průmyslovou výrobu polyuretanu (PU). Pro tuto výrobu jsou nejčastěji použity polyetherpolyoly, jež jsou získávány prostřednictvím polymerace propylen-, ethylen- a butylenoxidů. Mezi nejčastěji užívané polyetherpolyoly se řadí poly(propylenoxid), kopolymery (propylenoxid/ethylenoxid) glykolů a dále pak i jiné polyetherpolyoly, jako je například poly(tetramethylenoxid) glykol. Poly(tetramethylenoxid) glykol je využíván pro výrobu vysoce výkonných elastomerů a PU vláken, zatímco polymerní polyoly jsou používány pro výrobu vysoce odolných pěn, jež se vyznačují velkou pružností. Dále lze zmínit polyoly na bázi ricinového oleje, polybutadieny zakončené hydroxyem či pak polyesterové polyoly, které našly uplatnění ve vysoce výkonných aplikacích [25,31,32].

Průmyslově jsou vyráběny polyuretanové pěnové hmoty jejichž pevnost se pohybuje od elastických (neboli pružných) přes polotuhé až po vysoce tuhé. Podstata tuhosti / pružnosti pěnových PU hmot spočívá v kontrole počtu míst v nichž dochází k rozvětvení a také ve vzdálenosti mezi bočními řetězci a jejich délkou. Do pružných pěn a elastomerů se nejčastěji používají polyoly, jejichž molární hmotnost se pohybuje mezi 1 000 až 6 000 g/mol s funkčností od 1,8 do 3,0. Naopak polyoly s molární hmotností pohybující se pouze mezi 250 až 1 000 g/mol a funkčností od 3 do 12 jsou užívány pro výrobu tuhých pěn a vysoce odolných povlaků [25,32].

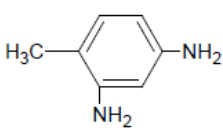
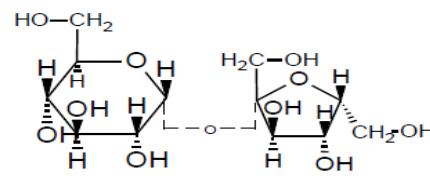
### 1.2.2.1 Výroba polyetherpolyolů

Během výroby polyetherpolyolů jsou užívány různé iniciátory (viz tabulka 1). Při výrobě polyetherových diolů jsou běžně jako iniciátory užívány dioly, jako je například polypropylenglykol (PPG). Trioly (trimethylolpropan a glycerol) jsou používány pro přípravu polyetherových triolů. Při přípravě vysoce funkčních polyetherpolyolů se jako iniciátory užívají sacharóza či sorbitol. Dále je možné jako iniciátory pro získání polyetherpolyolů využít také primární aminy, ovšem díky jejich silnějšímu nukleofilnímu charakteru není zapotřebí užívat jako katalyzátor hydroxid draselný. Mezi další možné iniciátory se řadí také ethylendiamin či toluendiamin, jež jsou užívány pro získání funkčních tetra polyetherpolyolů [25,31].

Komerční výroba běžných polyetherpolyolů na bázi propylenoxidu je založena na využití bazické katalýzy s pomocí hydroxidu alkalického kovu, jako je například hydroxid draselný. U takzvané propoxylace se využívávají iniciátory, které obsahují dvě či více hydroxylových skupin. Běžně se propylenglykol využívá k syntéze diolů a glycerol k výrobě triolů, ovšem jejich funkčnost je nižší než funkčnost iniciátorové sloučeniny. Snížená funkčnost je způsobena přítomností malého množství vody v reakčních činidlech. V rámci bazické katalýzy hovoříme o tom, že báze katalyzuje nejenom vznik vazby mezi propylenoxidem a zvětčující se molekulou polyolu, ale následně i vedlejší reakci, kdy se propylenoxid přeměňuje na allylalkohol [25,33].

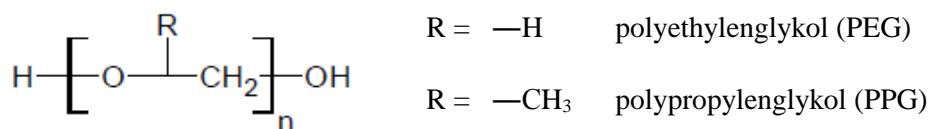
Jak propoxylace tak i ethoxylace jsou hojně využívány k průmyslové výrobě velkého množství produktů, jako jsou například polyethylenglykoly či polypropylenglykoly. Tyto reakce mohou být ovlivňovány užíváním různých katalyzátorů, jenž působí rozdílnými mechanismy [33].

Tabulka 1 Některé společné iniciátory pro polyetherpolyoly [25]

Iniciátor	Struktura	Funkčnost
Voda	$\text{H}-\text{O}-\text{H}$	2
Ethylenglykol	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	2
Propylenglykol	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2 \end{array}$	2
Glycerol	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	3
Trimethylolpropan	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$	3
2,4-diaminotoluen		4
Sorbitol	$\text{HO}-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{H} \end{array}-\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{OH} \end{array}-\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{H} \end{array}-\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{OH} \end{array}-\text{CH}_2-\text{OH}$	6
Sacharóza		8

### 1.2.2.2 Polyethylenglykol

Pro polyethylenglykol, zkráceně označovaný jako PEG (strukturní vzorec viz obrázek 4), jsou užívány i další názvy, například polyethylenoxid (PEO) či pak polyoxyethylen neboli POE. Tyto názvy jsou z chemického hlediska totožné, jedná se spíše o historicky zažitý pojmy, kdy jako PEG jsou označovány látky s molární hmotností do 20 000 g/mol, pro látky s molární hmotností vyšší než 20 000 g/mol je užíváno označení POE a nakonec označení PEO se užívá pro polymery s libovolnou molární hmotností. V rámci polyethylenglykolů tedy hovoříme buďto o nízkomolekulárních viskózních kapalinách, výšemolekulárních voskovitých látkách nebo pak o vysokomolekulárních krystalických látkách s teplotou měknutí okolo 67 °C. Jedná se o oligomery či polymery, jenž jsou rozpustné ve vodě, ale nerozpouští se v benzínu a také nepodléhají hydrolyze [28,34].



Obrázek 4 Strukturní vzorec PEG a PPG [34]

PEG našel své využití ve farmaceutickém, kosmetickém či potravinářském průmyslu, jako zahušťovací činidlo, mazadlo či jako flokulant pro čištění vod. Dále lze hovořit o tom, že vlákna a fólie z polyethylenglykolu jsou užívány pro speciální účely nejenom v medicíně, ale také v potravinářství. PEG s jednou esterovou či etherovou skupinou jsou využívány také jako neiontové tenzidy [28,34,35].

### 1.2.2.3 Polypropylenglykol

Molární hmotnost připravovaného polypropylenglykolu (zkráceně PPG, strukturní vzorec viz obrázek 4), jenž je označován také jako polypropylenoxid, se pohybuje v rozmezí 400 – 4 000 g/mol. Nízkomolekulární PPG se vyskytují jako bezbarvé kapaliny, vyšší pak jako voskovité látky a polypropylenglykoly s molární hmotností nad 900 g/mol se nerozpouští ve vodě. Molekula PPG je složena z opakujících se jednotek propylenoxidu, jehož methylové a ethylové skupiny jsou hydrofobní povahy, zatímco kyslík hydroxylové skupiny v propylenoxidové jednotce má povahu hydrofilní. Výroba PPG je založena na otevření propylenoxidového kruhu, na nějž následně navazuje polymerace. Jako iniciátor reakce je využíván alkohol a katalýzu zajišťuje báze, kterou je nejčastěji hydroxid draselný. Pokud jako iniciátor užijeme například

ethylenglykol či vodu, vznikne lineární polymer, v případě že využijeme glycerin nebo například sorbitol dojde ke vzniku rozvětveného polymeru [25,34,36].

Z hlediska využití PPG hovoříme o tom, že polypropylenglykol s koncovými hydroxylovými skupinami je jednou ze složek pro výrobu polyuretanových pěn. Využívané polypropylenglykoly se liší podle toho, zda jde o výrobu měkkých či tvrdých PU pěn. Pro výrobu měkkých PU pěn jsou využívány PPG s molární hmotností 1 000 – 6 000 g/mol, jenž se vyznačují funkčností 2 až 3. Zatímco pro výrobu tvrdých pěn se využívají rozvětvené polypropylenglykoly o molární hmotnosti 250 – 1 000 g/mol a funkčností 3 až 7 [34].

### **1.2.3 Možnosti separace polyolů**

Z hlediska separace polykondenzovaných alkoholů se v odborných člancích hovoří především o využití kapalinové chromatografie. V rámci kapalinové chromatografie byly pro tyto separace využity různé módy, řeč může být jak o kapalinové chromatografii v systému s normálními fázemi, tak i s fázemi reverzními, dále lze zmínit iontově výměnnou chromatografii (IEC, z angl. Ion-Exchange Chromatography), superkritickou fluidní chromatografii (SFC, z angl. Supercritical Fluid Chromatography) či gelově permeační chromatografii (GPC, z angl. Gel Permeation Chromatography) [35,37 – 40]. Je třeba také zmínit, že separace byly prováděny jak s deriváty jednotlivých polyolů, tak i s nederivatizovanými polyoly [37]. Pro detekci byla úspěšně využita celá řada detektorů, které jsou založeny na různých principech, jenž se od sebe liší buďto citlivostí nebo pak selektivitou. Lze zmínit například detektory založené na měření indexu lomu, UV absorpce, rozptylu světla, fluorescence a řadu dalších. Nejčastěji jsou ovšem využívány dva typy detekce, a to UV detekce a hmotnostní spektrometrie [37,39,40].

## 2. Experimentální část

### 2.1 Přístroje a zařízení

Separace polykondenzovaných alkoholů byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1290 infinity II (Agilent, Pab Alto, CA, USA) s UV detekcí.

Kapalinový chromatograf se skládal z:

- vysokotlakého čerpadla,
- automatického dávkovače vzorků,
- termostatu kolon,
- UV detektoru s proměnnou vlnovou délkou.

Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1290 infinity II byl ovládán prostřednictvím počítačového softwaru 1D LC OpenLAB, a to jak v online verzi tak i v offline verzi.

Dále byly separace provedeny i na modulárním kapalinovém chromatografu Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), který se skládal z:

- dvou vysokotlakých čerpadel LC-20ADXR,
- autosampleru SIL-20A HT,
- UV detektoru SPD-20A.

Kapalinový chromatograf Shimadzu byl doplněn o termostat kolon LCO102 (ECOM, Praha, ČR) a byl propojen s hmotnostním spektrometrem QTrap 4500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

Nastavení hmotnostního spektrometru QTrap 4500 bylo následující: záznam spekter v režimu kladných iontů v rozsahu 100 – 1500 m/z, ionizace elektrosprejem, Curtain Gas 30 PSI, Gas 1 40 PSI, Gas 2 50 PSI, teplota 400 °C, napětí u zdroje 4500 V, klastrační potenciál 100 V, vstupní potenciál 10 V, kolizní energie 10 V a skenovací rychlost 10 000 dat za sekundu.



Deriváty polyolů byly separovány na kolonách od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) a to přesně na kolonách:

- Ascentis® Express C18, 15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 μm,
- Ascentis® Express C8, 15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,7 μm,
- Supelcosil™ LC-18-DB, 25 cm x 4,6 mm s velikostí částic 4,6 μm,
- Ascentis® RP AMIDE, 15 cm x 1 mm s velikostí částic 3 μm,
- Ascentis® Express ES-CN, 10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 μm,
- Ascentis® Express OH5, 10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 μm.

Dále byly některé separace provedeny i na kolonách od firmy Phenomenex (Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA):

- Kinetex® HILIC, 10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7 μm,
- Kinetex® C18, 10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6 μm.

Jednotlivé vzorky byly připravovány pomocí mikropipet Biohit-Proline (Biohit, Finsko) s nastavitelným objemem.

Byly využity analytické digitální váhy (Sartorius, Německo) a sušárna (Nüve, Turecko).

## 2.2 Použité chemikálie

Acetonitril 99,9 % pro HPLC	Honeywell, (New Jersey, USA)
Denaturovaný ethanol	(FCHT – Univerzita Pardubice)
Fenylisokyanát	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kyselina mravenčí	TCI America (Portland, USA)
Kyselina octová	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Octan amonný	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Polyethylenglykol	Honeywell, (New Jersey, USA)
Polypropylenglykol	(FCHT – Univerzita Pardubice)

Redestilovaná voda	(FCHT – Univerzita Pardubice)
Thiomočovina	(FCHT – Univerzita Pardubice)
Triethylamin	Lach:ner (Neratovice, ČR)

## 2.3 Pracovní postup

V rámci měření dat pro tu to diplomovou práci bylo pracováno s polyoly jako je polyethylenglykol (dále jen PEG) a polypropylenglykol (dále jen PPG) a to přesně s PEG 400, PEG 600 a PEG 1000. V rámci PPG se pak jednalo o PPG 400, PPG 800, PPG 1000, PPG 2700 a PPG 4000.

### 2.3.1 Derivatizace polyolů

Derivatizace polykondenzovaných alkoholů (viz úvod kapitoly 2.3) byly provedeny pomocí fenylisokyanátu (PIC) za vzniku příslušných uretanů jednotlivých polyolů. Byly vyzkoušeny následující postupy 1 až 8, jejich přehled je uveden v tabulce 2:

Postup 1: pro derivatizaci jednotlivých standardů vzorků (PEG a PPG) bylo na analytických vahách naváženo přibližně 20 mg daného polyolu. K tomuto množství polyolu bylo napipetováno 10  $\mu$ l fenylisokyanátu, jako derivatizačního činidla a dále pak ještě 10  $\mu$ l triethylaminu, který zde sloužil jako katalyzátor reakce. Vialky s takto připravenou směsí byly uzavřeny, promíchány a zahřívány při 70 °C po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. Derivatizované standardy byly doplněny 500  $\mu$ l acetonitrilu (ACN) a promíchány. Z takto připravených vzorků se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 2: v druhém případě byly vyzkoušeny derivatizace pro standardy PEG 400, kdy bylo do tří vialek nadávkováno 10  $\mu$ l PEG 400. Do první vialky se přidalo 10  $\mu$ l PIC, do druhé 20  $\mu$ l PIC a do třetí 50  $\mu$ l PIC. Vialky s takto připravenou směsí byly uzavřeny, promíchány a zahřívány při 70 °C po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. Derivatizované standardy PEG 400 byly doplněny 500  $\mu$ l acetonitrilu a promíchány. Z takto připravených vzorků se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 3: do vialek bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  (případně naváženo 20 mg) daného polyolu (viz úvod kapitoly 2.3) a k tomu bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  ACN (pro každý polyol tři vialky). Do první vialky bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  PIC, do druhé 20  $\mu\text{l}$  PIC a do třetí 50  $\mu\text{l}$  PIC. Vialky s takto připravenou směsí byly uzavřeny, promíchány a zahřívány při 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. Z takto připravených vzorků se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 4: do tří vialek se pipetovalo 500  $\mu\text{l}$  acetonitrilu, k tomu 50  $\mu\text{l}$  kyseliny mravenčí, jako katalyzátoru a 10  $\mu\text{l}$  PEG 400. Derivatizace byla opět provedena pomocí 10; 20 a 50  $\mu\text{l}$  fenylisokyanátu. Směs byla promíchána a zahřívána při 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. Z takto připravených vzorků se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 5: do vialek bylo dáno 10  $\mu\text{l}$  (případně 20 mg) daného polyolu (viz úvod kapitoly 2.3) k němu bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  kyseliny mravenčí, jako katalyzátoru (pro každý polyol tři vialky). Derivatizace byla opět provedena pomocí 10; 20 a 50  $\mu\text{l}$  fenylisokyanátu. Směs byla promíchána a zahřívána při 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. K takto připraveným derivátům se přidalo 500  $\mu\text{l}$  ACN a poté se určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 6: do vialek bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  (případně naváženo 20 mg) daného polyolu (viz úvod kapitoly 2.3), k tomu bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  ACN a 50  $\mu\text{l}$  triethylaminu, jako katalyzátoru (pro každý polyol tři vialky). Do první vialky bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  PIC, do druhé 20  $\mu\text{l}$  PIC a do třetí 50  $\mu\text{l}$  PIC. Vialky s takto připravenou směsí byly uzavřeny, promíchány a zahřívány při 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. Z takto připravených vzorků se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 7: do vialek bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  (případně naváženo 20 mg) daného polyolu (viz úvod kapitoly 2.3) a k tomu bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  ACN (pro každý polyol dvě vialky). Do první vialky byly pipetovány 2  $\mu\text{l}$  PIC a do druhé 5  $\mu\text{l}$  PIC. Vialky s takto připravenou směsí byly uzavřeny, promíchány a zahřívány při 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 120 minut, aby proběhla derivatizace. Z takto připravených vzorků se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.3.2).

Postup 8: tento postup je stejný jako postup 7, s výjimkou toho, že připravené směsi se nezahřívaly 120 minut (tedy 2 hodiny), ale 5 hodin.

Tabulka 2 Přehled pracovních postupů derivatizace

	ACN před derivatizací [μl]	Polyol	PIC [μl]	Katalyzátor [μl]	ACN po derivatizaci [μl]	Délka zahřívání [h]
<b>Postup 1</b>	/	20 mg	10	10 (T)	500	2
<b>Postup 2</b>	/	10 μl	10; 20 a 50	/		
<b>Postup 3</b>	500	10 μl či 20 mg	10; 20 a 50	/	/	2
<b>Postup 4</b>		10 μl		50 (M)	/	
<b>Postup 5</b>	/	10 μl či 20 mg	10; 20 a 50	50 (M)	500	2
<b>Postup 6</b>	500			50 (T)	/	
<b>Postup 7</b>	500	10 μl či 20 mg	2; 5	/	/	2
<b>Postup 8</b>				/	/	5

ACN...acetonitril; PIC...fenylisokyanát; T...triethylamin; M...kyselina mravenčí

Dále byly pro analýzu pomocí RP-HPLC-MS a HILIC-MS připraveny následující vzorky. Vzorek fenylisokyanátu, jenž byl připraven smícháním 10 μl PIC a 500 μl acetonitrilu a řádně promíchán. Následně pak ještě deriváty methanolu a denaturovaného ethanolu, jenž byly připraveny smícháním 10 μl příslušného alkoholu s 500 μl ACN a 2 či 5 μl fenylisokyanátu. Deriváty alkoholů byly po promíchání zahřívány 2 hodiny (120 minut) v sušárně při 70 °C. Z takto připravených derivátů a PIC se pak určitý objem pipetoval do vialek pro analýzy pomocí RP-HPLC-MS a HILIC-MS (viz kapitola 2.3.2).

### 2.3.2 Příprava polyolů k analýze

Pro gradientovou eluci v systému RP-HPLC-UV na kolonách Ascentis® Express C18, Ascentis® Express C8 a Supelcosil™ LC-18-DB se ze směsí připravených postupem 1 (viz kapitola 2.3.1) pipetovalo 50 µl do vialky určené pro analýzu kapalinovou chromatografií. Toto množství vzorku bylo doplněno 250 µl acetonitrilu, 200 µl redistilované vody a promícháno.

Z předem připravené směsi (viz kapitola 2.3.1 postupy 1 – 8, vzorky PIC a deriváty methanolu a denaturovaného ethanolu) bylo pipetováno 25 µl vzorku do vialky určené pro analýzu kapalinovou chromatografií. Toto množství vzorku bylo doplněno 475 µl acetonitrilu a promícháno.

## 2.4 Podmínky při separaci

### 2.4.1 Podmínky při analýze s izokratickou elucí v RP-HPLC-UV

Analýzy byly provedeny pro všechny typy polyolů, jenž jsou uvedeny v úvodu kapitoly 2.3 a připraveny dle postupů 1; 2 a 3 (viz kapitola 2.3.1). Jako mobilní fáze byla využita kombinace acetonitril-voda při izokratické eluci. Kolona byla vždy vyhřívána na 25 °C. U všech analýz byl využit UV detektor zaznamenávající absorpenci při 254 nm. Hodnota mrtvého retenčního času kolony byla zjištěna pomocí thiomocoviny, jejíž analýza byla provedena vždy při nejvyšší koncentraci acetonitrilu.

Polyoly (připravené postupem 1, viz kapitola 2.3.1) byly separovány při konstantních 60 – 40 obj. % acetonitril-voda na kolonách Ascentis® Express C18 a Ascentis® Express C8 u nichž byl nastaven průtok mobilní fáze na 0,4 ml/min a dávkoval se 1 µl vzorku. Dále byly využity kolony Supelcosil™ LC-18-DB (průtok 1 ml/min, dávkování 5 µl); Ascentis® RP AMIDE (průtok 0,1 ml/min, dávkování 1 µl), Ascentis® Express ES-CN a Ascentis® Express OH5 (obě kolony s průtokem 0,2 ml/min a dávkováním 1 µl). Vzhledem k tomu, že na koloně Ascentis® Express ES-CN byly retenční časy polyolů při koncentracích 60 – 40 obj. % acetonitril-voda nízké, byly následně vyzkoušeny i analýzy při 40 – 20 obj. % acetonitril-voda (opět s krokem po 5 obj. % ACN) a pak ještě při 18 – 12 obj. % acetonitril-voda

(s krokem po 2 obj. % ACN). Při separacích na koloně Ascentis® Express OH5 s koncentrací acetonitrilu 60 – 40 obj. % byly retenční časy polyolů nižší než mrtvý retenční čas kolony, proto byly vyzkoušeny separace při 35 – 15 obj. % acetonitril-voda (opět s krokem po 5 obj. % ACN).

Deriváty PEG 400 (připravené postupem 2, viz kapitola 2.3.1) byly separovány na koloně Ascentis® Express ES-CN (s průtokem mobilní fáze 0,2 ml/min a dávkováním 1 µl) při konstantních 60 – 5 obj. % acetonitril-voda (s krokem po 5 obj. % ACN).

Deriváty PEG 400 (viz kapitola 2.3.1 postup 3) byly separovány na koloně Ascentis® Express C18 (s průtokem mobilní fáze 0,4 ml/min a dávkováním 1 µl vzorku). Separace byly provedeny při konstantních 80 – 10 obj. % acetonitrilu (s krokem po 5 obj. % ACN). Dále pak všechny ostatní polyoly připravené stejným postupem s 20 µl PIC byly separovány také na koloně Ascentis® Express C18 za stejných podmínek, a to při konstantních 35 – 20 obj. % ACN-voda (s krokem po 5 obj. % ACN).

#### **2.4.2 Podmínky při analýze s gradientovou elucí v RP-HPLC-UV**

Analýzy byly provedeny pro všechny typy polyolů, které jsou uvedeny v úvodu kapitoly 2.3 a připraveny postupy 1 – 8 (viz kapitola 2.3.1). Jako mobilní fáze byla využita kombinace acetonitril-voda s gradientovou elucí (průběh jednotlivých gradientů je uveden na grafu 1). Kolona byla vyhřívána vždy na 25 °C. Všechny typy analýz byly detekovány UV detektorem při 254 nm.

Analýzy polyolů (viz postup 1 kapitola 2.3.1) byly provedeny na kolonách Ascentis® Express C18 (dávkování vzorku 0,1 µl; průtok mobilní fáze 0,4 ml/min; gradient 50 – 100 obj. % acetonitril-voda, doba analýzy 15 minut), Ascentis® Express C8 (dávkování 0,1 µl; průtok 0,4 ml/min; gradient 50 – 100 obj. % a 20 – 70 obj. % acetonitril-voda, doba analýzy 15 minut) a Supelcosil™ LC-18-DB (dávkování 5 µl, průtok 1 ml/min, gradient 50 – 100 obj. % ACN-voda, doba analýzy 20 minut).

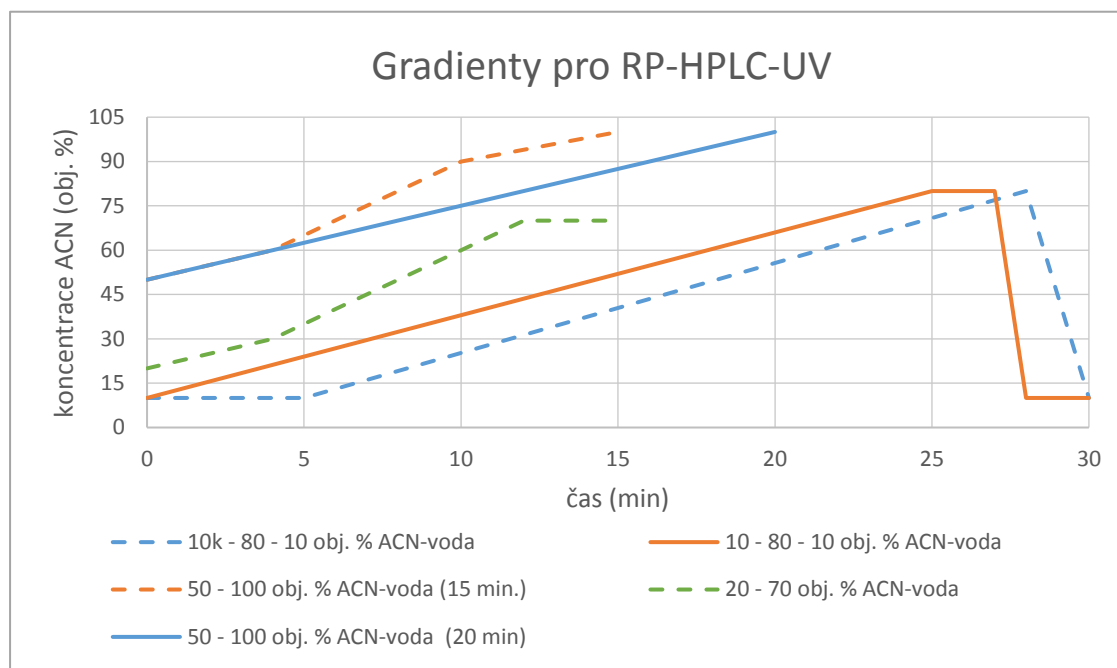
Deriváty polyolů (viz postupy 2 – 7 kapitola 2.3.1) byly separovány na koloně Ascentis® Express C18 (dávkování vzorku 1 µl; průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut). Gradient na této koloně byl nastaven následovně 0. minuta 10 obj. % ACN, 25. – 27. minuta při 80 obj. % acetonitrilu a 28. – 30. minuta

opět při 10 obj. % acetonitrilu (tento typ gradientu bude dále v textu označován jako 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda).

Deriváty polyolů (viz postup 8 kapitola 2.3.1) byly separovány na koloně Ascentis® Express C18 (dávkování vzorku 0,5  $\mu$ l; průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut) s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda.

Deriváty polyolů (viz postup 7 a 8 kapitola 2.3.1) byly separovány na koloně Ascentis® Express C18 (dávkování vzorku 0,5  $\mu$ l; průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut). Gradient na této koloně byl nastaven následovně 0. – 5. minuta 10 obj. % ACN, 28. minuta 80 obj. % acetonitrilu a 30. minuta opět při 10 obj. % acetonitrilu (dále jen 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda).

Graf 1 Gradienty pro RP-HPLC-UV



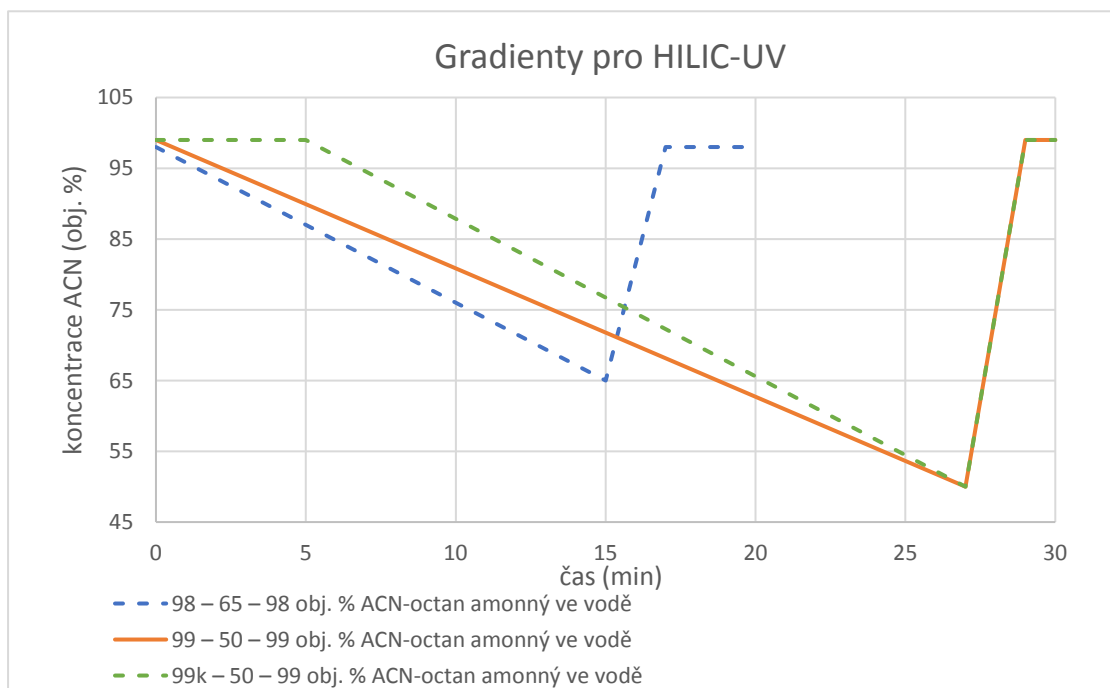
### 2.4.3 Podmínky při analýze s gradientovou elucí v HILIC-UV

Analýzy byly provedeny pro všechny typy polyolů, které jsou uvedeny v úvodu kapitoly 2.3 a připraveny postupem 1 a 7 (viz kapitola 2.3.1). Jako mobilní fáze byla využita kombinace acetonitril-octan amonný ve vodě s gradientovou elucí (průběh jednotlivých gradientů je uveden na grafu 2). Kolona byla vyhřívána vždy na 25 °C a všechny typy analýz byly detekovány UV detektorem při 254 nm.

Separace polyolů připravených postupem 1 byly provedeny na koloně Kinetex® HILIC s dávkováním vzorku 0,2 µl. Průtok mobilní fáze acetonitril-octan amonný ve vodě (75 mmol/l) byl nastaven na 0,3 ml/min a doba analýzy na 20 minut. Gradient byl nastaven následovně: 0. minuta 98 obj. % ACN, 15. min 65 obj. % ACN a 17. minuta 98 obj. % ACN (dále jen 98 – 65 – 98 obj. % ACN-octan amonný ve vodě).

Analýzy polyolů připravených postupem 7 byly provedeny na koloně Ascentis® Express OH5 s dávkováním vzorku 0,1 µl. Průtok mobilní fáze acetonitril-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) byl nastaven na 0,2 ml/min a doba analýzy na 30 minut. Pro separace polyolů připravených postupem 7 byly využity 2 různé gradienty. Gradient 1 byl nastaven následovně 0. minuta 99 obj. % ACN, 27. min 50 obj. % ACN, 29. minuta 99 obj. % ACN (dále jen 99 – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě) a gradient 2 pak 0. – 5. minuta při konstantních 99 obj. % ACN, 27. min 50 obj. % ACN a 29. minuta 99 obj. % ACN (dále jen 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě).

Graf 2 Gradienty pro HILIC-UV





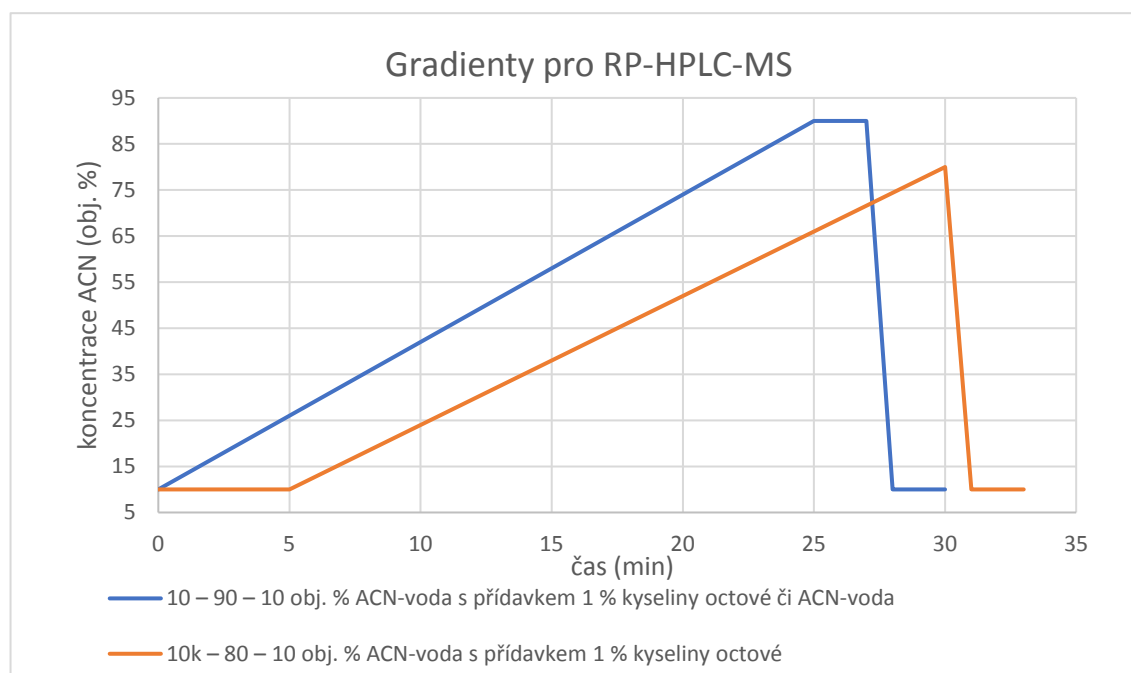
#### 2.4.4 Podmínky při analýze s gradientovou elucí v RP-HPLC-MS

Analýzy byly provedeny pro polyoly, které jsou uvedeny v úvodu kapitoly 2.3 a připraveny postupem 1; 2 a 8, dále pak pro vzorek fenylisokyanátu a deriváty methanolu a denaturovaného ethanolu (viz kapitola 2.3.1). Jako mobilní fáze byla využita kombinace acetonitril-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové či acetonitril-voda s gradientovou elucí (průběh jednotlivých gradientů je uveden na grafu 3).

Při separacích polyolů připravených postupem 1 byla jako mobilní fáze využita kombinace acetonitril-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové. Kolona byla vyhřívána na 40 °C. Všechny typy analýz byly detekovány UV detektorem při 254 nm a následně pak i hmotnostním spektrometrem. Analýzy byly provedeny na koloně Kinetex® C18 (dávkování 0,5 µl; průtok 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut). Gradient na této koloně byl nastaven následovně 0. minuta analýzy při 10 obj. % acetonitrilu, 25. – 27. minuta při 90 obj. % acetonitrilu a 28. – 30. minuta opět při 10 obj. % acetonitrilu (dále jen 10 – 90 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové).

Separace derivátů PEG 400 připravených postupem 2 byly provedeny na koloně Kinetex® C18, jež byla vyhřívána na 40 °C. Dávkování bylo nastaveno na 0,5 µl; průtok byl 0,4 ml/min a doba analýzy 30 minut. Jako mobilní fáze byla využita kombinace ACN-voda. Všechny typy analýz byly detekovány UV detektorem při 254 nm a následně pak i hmotnostním spektrometrem. Byl využit gradient 10 – 90 – 10 obj. % ACN-voda.

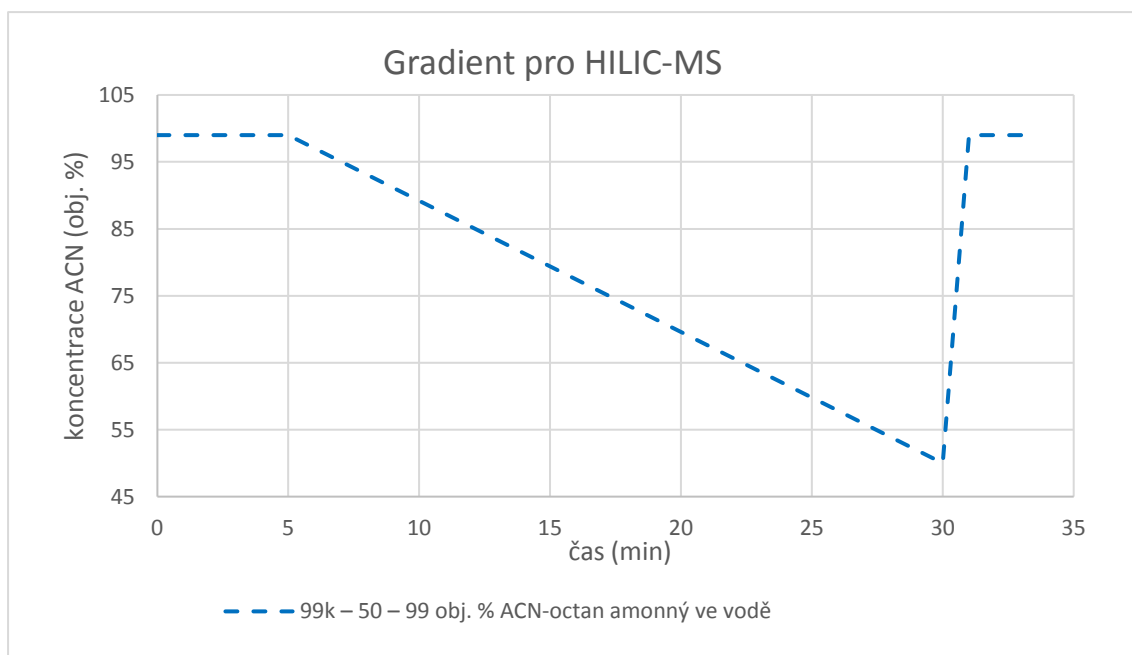
Separace polyolů připravených postupem 8, vzorku PIC a derivátů methanolu a denaturovaného ethanolu byly provedeny na koloně Kinetex® C18, jež byla vyhřívána na 40 °C. Dávkování bylo nastaveno na 0,5 µl; průtok byl 0,4 ml/min a doba analýzy 33 minut. Jako mobilní fáze byla využita kombinace acetonitril-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové. Všechny typy analýz byly detekovány UV detektorem při 254 nm a následně pak i hmotnostním spektrometrem. Gradient byl nastaven následovně 0. – 5. minuta analýzy při konstantních 10 obj. % acetonitrilu, od 5. do 30. minuty se koncentrace ACN zvyšovala na 80 obj. % a při 31. minutě byla koncentrace acetonitrilu zase na 10 obj. % (dále jen 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové).



### 2.4.5 Podmínky při analýze s gradientovou elucí v HILIC-MS

Analýzy byly provedeny pro polyoly, které jsou uvedeny v úvodu kapitoly 2.3 a připraveny postupem 8 (viz kapitola 2.3.1), dále pak pro vzorek PIC a deriváty methanolu a denaturovaného ethanolu. Jako mobilní fáze byla využita kombinace acetonitril-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) s gradientovou elucí (průběh gradientu je uveden na grafu 4). Kolona byla vyhřívána na 40 °C. Všechny typy analýz byly detekovány UV detektorem při 254 nm a následně pak i hmotnostním spektrometrem. Analýzy byly provedeny na koloně Kinetex® HILIC (dávkování 0,5 µl; průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, doba analýzy 33 minut). Gradient na této koloně byl nastaven následovně 0. – 5. minuta konstantních 99 obj. % acetonitril-octan amonný ve vodě, 30. min 50 obj. % ACN-octan amonný ve vodě a 33. min opět 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (dále jen 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě).

Graf 4 Gradient pro HILIC-MS



### 3. Výsledky a diskuze

Cílem diplomové práce bylo nalézt optimální separační podmínky, při kterých by bylo možné rozdělit jednotlivé oligomery přítomné ve směsích polykondenzovaných alkoholů. Při přípravě těchto alkoholů polykondenzační reakcí (viz kapitola 1.2.1) vznikají směsi, které obsahují alkoholy s různou distribucí počtu monomerních jednotek v okolí průměrné molekulové hmotnosti. V závislosti na typu monomerní jednotky byla testována vhodnost systémů s obrácenými fázemi a chromatografie hydrofilních interakcí pro získání dostatečné selektivity separace oligomerů.

#### 3.1 Zhodnocení derivatizačních postupů

Celkem bylo vyzkoušeno osm derivatizačních postupů (viz kapitola 2.3.1 a tabulka 2). Původní postup čili postup 1 byl v mírně pozměněné podobě převzat z článku publikovaného v Chemických Listech [41] a z bakalářské práce na téma Separace polykondenzovaných alkoholů pomocí kapalinové chromatografie [42].

Postup 1 spočíval ve smíchání daného množství polyolu s PIC a triethylaminem, jež byly v poměru 1:1. Celá směs se pak zahřívala při 70 °C po dobu 2 hodin a následně se doplňovala acetonitrilem. Tento postup se při separacích neukázal jako vhodný, neboť jak při izokratické eluci, tak i při gradientu byly na chromatogramech zaznamenány pouze jeden až tři píky (viz kapitoly 3.2 a 3.3)

V rámci postupu 2 (proveden pouze pro PEG 400) se k polyolu přidávaly tři různá množství fenyloxykarbonylátu (viz tabulka 2), celá reakční směs se pak zahřívala při 70 °C po dobu 2 hodin. Po zahřátí se už jen směs doplňovala acetonitrilem. Tento postup bez využití katalýzy se ukázal při izokratické eluci jako vhodnější, protože na chromatogramech bylo zaznamenáno více píků i když většinou splývajících do jednoho širokého píku (viz kapitola 3.2). Zajímavých výsledků bylo následně dosaženo i na RP-HPLC-MS.

Postup 3 byl obdobný jako postup 2 až nato, že acetonitril se přidával ještě před zahříváním. Tento postup se ukázal jako vhodný pro izokratickou i gradientovou eluci pro PEG 400, u ostatních derivátů polyolů již takových výsledků dosahováno nebylo (viz kapitoly 3.2 a 3.3)

V rámci postupu 4 (proveden jen pro PEG 400), kdy se jako katalyzátor využívala kyselina mravenčí se na chromatogramech vyskytovaly dva vzdálené píky (viz kapitola 3.3). Z tohoto důvodu nebyl tento postup zkoušen pro další polyoly.

V případě postupu 5, jenž byl až na čas přidavku acetonitrilu stejný jako postup 4 se žádných velkých zlepšeníh nedosáhlo. Náznaků separace zde bylo sice více, ovšem v porovnání s nejvyšším píkem šlo o zanedbatelné píky (viz kapitola 3.3).

V postupu 6 byl jako katalyzátor opět využit triethylamin tentokrát ovšem ve vyšším množství. Účinnost separace byla sice lepší, než tomu bylo u postupu 1 ovšem odezva nejvyššího píku ve spektru byla v porovnání s postupem 3 velmi vysoká (viz kapitola 3.3).

Postup 7 byl proveden bez katalýzy a s množstvím PIC, jenž bylo nižší než množství polyolů. Tento postup byl využit jako pokus o snížení odezvy nejvyššího píku a zároveň zvýšení nižších píků ve spektrech. Odezva vysokého píku se sice snížila ovšem vliv na malé píky se neprojevil (viz kapitola 3.3).

Postup 8, jenž se od postupu 7 liší pouze v délce zahřívání byl proveden jako pokus, zda se s delší dobou zahřívání nezlepší separace vyšších polyolů. Tato hypotéza se v systému RP-HPLC-UV ukázala jako možná jen u PPG 2700 na ostatní polyoly tento postup neměl žádný významný vliv (viz kapitola 3.3). Ovšem při separacích v systému RP-HPLC-MS, kde byla využita i UV detekce bylo dosaženo částečné separace u všech osmi zkoušených polyolů (viz kapitola 3.5 a k ní náležící přílohy).

## **3.2 Analýzy pomocí RP-HPLC-UV s izokratickou elucí**

Na kapalinovém chromatografu v systému s obrácenými fázemi a UV detekcí (Agilent Technologies 1290 infinity II) byly při izokratické eluci separovány deriváty polyolů, jenž byly připraveny postupem 1 – 3 (viz kapitola 2.3.1).

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 1 byly provedeny na kolonách Ascentis® Express C18, Ascentis® Express C8, Supelcosil™ LC-18-DB, Ascentis® RP AMIDE, Ascentis® Express ES-CN a Ascentis® Express OH5. Separace se prováděly při konstantních koncentracích 60 – 40 obj. % ACN-voda (s krokem po 5 obj. % ACN), případně pak ještě při koncentracích 40 – 15 obj. %

acetonitril-voda (s krokem po 5 obj. % ACN) či 18 – 12 obj. % ACN-voda (s krokem po 2 obj. % ACN). Na získaných chromatogramech byly ve většině případů dva píky. Retenční časy polyolů byly na jednotlivých kolonách různé, ovšem časy různých polyolů na jedné koloně byly shodné (odlišnost maximálně o setinu minuty). Výsledky těchto měření, respektive retenční časy a vypočtené retenční faktory (dle rovnice 5, kde  $t_R$  je retenční čas a  $t_M$  mrtvý retenční čas kolony) jsou uvedeny v příloze v Tabulkách P 1 až P 8. V závislostech logaritmu retenčního faktoru na koncentraci ACN v mobilní fázi (Grafy P 1 až P 8) je vidět, že s rostoucí koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi klesá hodnota logaritmu retenčního faktoru. Tento trend se tedy objevuje ve všech grafech vyjma Grafu P 7, kde je trend obrácený, tedy že s rostoucí koncentrací ACN roste i hodnota logaritmu retenčního faktoru.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

*Rovnice 5 Retenční faktor [13]*

Lineární trend závislosti logaritmu retenčního faktoru na koncentraci organického rozpouštědla v mobilní fázi indikuje typ mechanismu, podle kterého interagují analyzované látky se stacionární fází. V případě lineární závislosti s klesajícím trendem s rostoucí koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi, podporují naměřená data hydrofobní interakce mezi deriváty PEG / PPG a stacionární fází.

Separace derivátů PEG 400 připravených postupem 2, byly provedeny na koloně Ascentis® Express ES-CN při konstantních koncentracích 60 – 5 obj. % ACN-voda (s krokem po 5 obj. % ACN). Při vyšších koncentracích acetonitrilu v mobilní fázi (60 – 30 obj. % ACN) se na chromatogramech vyskytovaly ve většině případů dva píky, viz Tabulka P 9. Při koncentracích 25 – 15 obj. % ACN-voda se na chromatogramu zobrazovalo 5 až 8 píků často splývajících do jednoho širokého píku (viz Obrázek P 1), nejlepší rozlišení jednotlivých píků bylo při 20 obj. % ACN u derivátu PEG 400, kdy bylo použito 20  $\mu$ l PIC (viz Obrázek P 2 a Tabulka P 10). Při koncentracích 10 a 5 obj. % acetonitrilu se adekvátní píky objevily pouze u derivátu PEG 400, k jehož přípravě bylo využito 50  $\mu$ l PIC. V těchto dvou záznamech se pak objevily čtyři píky při 10 obj. % ACN a tři při 5 obj. % ACN. V závislosti logaritmu retenčního faktoru na koncentraci ACN v mobilní fázi (Graf P 9) je vidět, že se snižující se koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi roste hodnota logaritmu retenčního faktoru, a to až do 20 obj. % ACN, kdy dochází k výraznému poklesu a následně zase k vzrůstu

při koncentraci 15 obj. % ACN. Poslední dvě hodnoty logaritmu retenčního faktoru náležící 10 a 5 obj. % ACN jsou si velmi blízké (liší se jen o 0,04) a opět jsou nižší, než tomu bylo při 15 obj. % ACN.

Separace derivátů PEG 400 připravených postupem 3 byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 při konstantních koncentracích 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (s krokem po 5 obj. % ACN). Při vyšších koncentracích acetonitrilu v mobilní fázi (80 – 55 obj. % ACN) se na chromatogramech vyskytovaly ve většině případů dva až čtyři píky, viz Tabulka P 11. Při koncentracích 50 – 30 obj. % ACN-voda se na chromatogramu zobrazovaly 4 až 9 píků, jenž byly velmi nízké (viz Tabulky P 12 a P 13). Dále pak při koncentracích 25 a 20 obj. % ACN-voda byly viditelné čtyři až osm píků, jenž byly dobře rozděleny, a navíc byly i poměrně vysoké (viz Obrázek P 3 a Tabulka P 13). Při posledních dvou koncentracích, tedy při 15 a 10 obj. % ACN v mobilní fázi se na chromatogramu zobrazovaly dva maximálně tři píky (Tabulka P 13). V závislosti logaritmu retenčního faktoru na koncentraci ACN v mobilní fázi (Graf P 10) je vidět, že se snižující se koncentrací ACN v mobilní fázi roste hodnota logaritmu retenčního faktoru, a to až do 25 obj. % ACN (přičemž hodnota při 30 obj. % ACN je vynechaná, neboť nejvyšší pík byl detekován ještě před mrtvým retenčním časem kolony), poté dochází k mírnému poklesu. Poslední dvě hodnoty logaritmu retenčního faktoru náležící 15 a 10 obj. % ACN jsou oproti předchozím velmi nízké.

Separace ostatních polyolů připravených postupem 3 s 20  $\mu$ l PIC (PEG 600 a 1000; PPG 400 až 4000) byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 při konstantních koncentracích 35 – 20 obj. % acetonitril-voda (s krokem po 5 obj. % ACN). Pro PEG 600 a PEG 1000 se na chromatogramech při konstantních koncentracích 35 – 20 obj. % ACN (s krokem po 5 obj. % ACN) objevovaly dva až tři píky (viz Tabulka P 14), pro PPG 400 až 4000 to byly maximálně dva píky. Retenční časy, a tudíž i retenční faktory jednotlivých polyolů byly shodné (odlišnost maximálně o setiny). V závislosti logaritmu retenčního faktoru na koncentraci ACN v mobilní fázi (Graf P 11) je patrné, že logaritmus retenčního faktoru má tendenci se snižující se koncentrací ACN stoupat, vyjma tedy hodnoty při 30 obj. % ACN, kdy došlo k výraznému poklesu. Ovšem oproti Grafu P 10 byl retenční čas vyšší než mrtvý retenční čas kolony.

### 3.3 Analýzy pomocí RP-HPLC-UV s gradientovou elucí

Na kapalinovém chromatografu v systému s obrácenými fázemi a UV detekcí (Agilent Technologies 1290 infinity II) byly při gradientové eluci separovány deriváty polyolů, jež byly připraveny postupem 1 – 8 (viz kapitola 2.3.1).

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 1 byly provedeny na různých kolonách. V případě kolony Ascentis® Express C18 (s gradientem 50 – 100 obj. % ACN-voda) se na chromatogramu u většiny polyolů zobrazovaly dva píky, vyjma PPG 1000, kde byly patrné píky tři (viz Obrázek P 4) a u PEG 600 a PPG 4000 byl pak zase jen jeden vysoký pík. Retenční časy píků všech polyolů byly ovšem shodné. Na koloně Ascentis® Express C8 s gradientem 50 – 100 obj. % acetonitril-voda byly získány chromatogramy s dvěma píky u polyolů PPG 800, PPG 1000 a PPG 2700 (viz Obrázek P 5). Ostatní čtyři polyoly měly na chromatogramu pouze jeden pík. Retenční časy píků jednotlivých polyolů byly opět shodné. Na ty též koloně ovšem s gradientem 20 – 70 obj. % ACN-voda byl na chromatogramech zaznamenán jen jeden pík a to pouze u PPG 800 až PPG 4000, opět se shodnými retenčními časy. U kolony Supelcosil™ LC-18-DB s gradientem 50 – 100 obj. % ACN-voda byly u PEG 400 zaznamenány tři píky, u ostatních pak většinou dva píky (stejně retenční časy). Záznamy ze separací PEG 600 a PPG 400 nemohly být vyhodnoceny, protože při analýzách těchto polyolů byl pozorován výrazný šum nulové linie a nízká citlivost.

Separace PEG 400 připraveného postupem 2 byla provedena na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (doba analýzy 30 min). Na chromatogramech jak s 10  $\mu$ l; 20  $\mu$ l tak i s 50  $\mu$ l fenylosokyanátu se vyskytoval jeden vysoký úzký pík (ve všech třech případech se stejným retenčním časem) a následně pak řada malých píků. Nejlepší rozlišení těchto malých píků poskytl postup, kde bylo využito 10  $\mu$ l PIC (viz Obrázek P 6 a P 7).

Separace derivátů všech polyolů připravených postupem 3 byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (doba analýzy 30 min). Na chromatogramech jak s 10  $\mu$ l; 20  $\mu$ l tak i s 50  $\mu$ l fenylosokyanátu se vyskytovaly tři až osm píků, přičemž nejvyšší počet píků tedy osm se vyskytoval pouze u PEG 400 a to u všech třech objemů PIC (viz Obrázek P 8



a P 9). Nejvyšší pík na chromatogramech byl u všech polyolů s různými objemy PIC shodně průměrně ve 14,17 minutě.

Separace PEG 400 připraveného postupem 4 byla provedeny na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (doba analýzy 30 min). Na všech třech chromatogramech (tedy pro PEG 400 s 10; 20 i 50 µl PIC) se shodně vyskytovaly dva píky, kdy nejvyšší byl v čase 5,96 minut a další pak 14,27 min (viz Obrázek P 10).

Separace všech derivátů připravených postupem 5 byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (doba analýzy 30 min). Na chromatogramech se u všech derivátů polyolů shodně vyskytovaly tři až sedm píků z nich většina byla v porovnání s nejvyšším píkem velmi nízká. Nejvyšší úzký pík byl na všech záznamech okolo 5,89 minuty. Ukázka chromatogramu z těchto měření je na Obrázku P 11 a jeho detail pak na Obrázku P 12.

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 6 byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (doba analýzy 30 min). Na záznamech se vyskytovaly čtyři až osm píků, přičemž nejvyšší pík byl shodně u všech chromatogramů při průměrné 14,20 minutě. Ostatní píky byly v porovnání s tímto píkem velmi malé. Chromatogramy z této separace jsou na Obrázcích P 13 a P 15, jejich detailní záběry pak na Obrázcích P 14 a P 16.

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 7 byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda (doba analýzy 30 min). Na chromatogramech se vyskytovalo nejvíce osm píků, a to u PEG 400 připraveného jak se 2 µl tak i s 5 µl PIC (viz Obrázek P 17 a P 18). U ostatních polyolů se pak na chromatogramech vyskytovaly dva až tři píky (viz Obrázek P 19). Nejvyšší pík se u všech derivátů polyolů (připravených jak se 2 µl tak i s 5 µl PIC) vyskytoval shodně v průměrné 14,16 minutě.

Separace derivátů všech polyolů připravených postupem 8 byly provedeny na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda (doba analýzy 30 min). U derivátů, jenž byly připraveny postupem 8 s 2 µl PIC se objevilo 5 až 6 píků u PEG 400 a PPG 2700 (viz Obrázky P 20 a P 21) u separace ostatních polyolů se na chromatogramech objevily maximálně tři píky. V případě téhož postupu, ale s 5 µl fenylisokyanátu se nejvíce píků vyskytlo u PPG 2700 a to přesně sedm (viz Obrázek P 22

a P 23). U ostatních PEG a PPG se jednalo o dva až čtyři píky. Při separacích derivátů, jenž byly připraveny za pomoci 2 i 5  $\mu$ l PIC se nejvyšší pík vyskytoval v průměrné 14,18 minutě.

Deriváty připravené postupy 7 a 8 (viz kapitola 2.3.1) byly separovány na koloně Ascentis® Express C18 s gradientem 10k – 80 – 10 obj. % acetonitril-voda (doba analýzy 30 min). V obou případech došlo k posunu retence a nejvyšší pík spektra byl na chromatogramech zaznamenán u všech polyolů v průměrné 18,40 minutě. V případě postupu 8 se na chromatogramech zobrazovaly maximálně čtyři píky a k nejlepšímu rozlišení došlo opět u PEG 400 (viz Obrázek P 24 a P 25), podobné náznaky separace jako jsou u PEG 400 byly zaznamenány i u PEG 600 (viz Obrázek P 26). U postupu 7 se nejvíce píků objevilo na chromatogramu, jenž patřil PEG 400 (9 píků), dále se objevilo 6 píků u PPG 2700 a 5 píků u PPG 4000 (viz Obrázky P 27 – P 30), ve všech třech případech se jednalo o deriváty pro jejichž přípravu bylo využito 5  $\mu$ l PIC. U zbylých derivátů se jednalo většinou o dva až tři píky na chromatogramu.

### 3.4 Analýzy pomocí HILIC-UV s gradientovou elucí

Za využití hydrofilní interakční chromatografie s UV detekcí byly při gradientové eluci na kapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1290 infinity II separovány všechny deriváty polyolů, jenž byly připraveny postupem 1 a 7 (viz kapitola 2.3.1).

Separace derivátů připravených postupem 1 byly provedeny na koloně Kinetex® HILIC při gradientové eluci 98 – 65 – 98 obj. % acetonitril-octan amonný ve vodě (75 mmol/l) s dobou analýzy 20 minut. U všech separovaných polyolů se na chromatogramu zobrazoval pouze jeden pík, jenž měl u všech polyolů shodný retenční čas. Průměrný retenční čas ze dvou měření odpovídal 0,93 min (viz Obrázek P 31).

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 7 byly provedeny na koloně Ascentis® Express OH5. Byly využity dva typy gradientů, a to 99 – 50 – 99 obj. % acetonitril-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) a 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l), při obou gradientech byla délka analýzy 30 minut. V případě obou dvou gradientů byly výsledky

u všech polyolů totožné, na chromatogramech se vyskytovaly dva píky, a to jak u derivátů s 2  $\mu\text{l}$  tak i s 5  $\mu\text{l}$  fenylisokyanátu (viz Obrázek P 32). Výjimkou byly pouze separace PEG 400 a PEG 600 s 5  $\mu\text{l}$  PIC, kde se vyskytovaly 3 píky, a to u obou gradientů (viz Obrázek P 33). Nejvyšší pík se ve všech případech vyskytoval v průměrné 1,54 minutě.

### 3.5 Analýzy pomocí RP-HPLC-MS s gradientovou elucí

Na modulárním kapalinovém chromatografu Shimadzu v systému s obrácenými fázemi, UV a MS detekcí byly při gradientové eluci separovány deriváty polyolů, jenž byly připraveny postupem 1; 2; 8, dále pak vzorek fenylisokyanátu a deriváty methanolu a denaturovaného ethanolu (viz kapitola 2.3.1).

Separace derivátů všech polyolů připravených postupem 1 byly provedeny na koloně Kinetex® C18 s gradientem 10 – 90 – 10 obj. % ACN-voda s přídatkem 1 % kyseliny octové (doba analýzy 30 minut). Při separacích těchto derivátů nedocházelo k výrazné separaci vzorků, a proto nebyly separace vzorků připravených tímto postupem dále prováděny.

Separace derivátů PEG 400 připravených postupem 2 byly tak též provedeny na koloně Kinetex® C18 s gradientem 10 – 90 – 10 obj. % ACN-voda (doba analýzy 30 minut). V tomto případě se na záznamu z UV detektoru začalo objevovat více píků, tedy začalo docházet k separaci. Mírně pozměněný postup 2 byl pak v podobě postupu 3; 7 a 8 využíván k dalším separacím, a to jak na RP-HPLC-UV, HILIC-UV tak i v RP-HPLC-MS a HILIC-MS (viz kapitoly 3.2 až 3.6).

Separace vzorku fenylisokyanátu a derivátů methanolu a denaturovaného ethanolu byly provedeny na koloně Kinetex® C18 s gradientem 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přídatkem 1 % kyseliny octové (doba analýzy 33 minut). Při separaci vzorku fenylisokyanátu se na záznamu z UV detektoru objevily dva vysoké a jeden malý pík v časech 18,38 min, 24,69 min a 26,10 min (viz Obrázek P 34). Z tohoto záznamu byly extrahovány dvě hmotnostní spektra příslušící nejvyšším píkům v časech 18,38 a 24,69 minut. Tyto hmotnostní spektra jsou i s navrhovanými strukturami molekul, jenž náleží nejvyšším signálům ve spektrech zobrazeny na Obrázku P 35. Signály odpovídající molekulovým hmotnostem 235,1 a 354,0 odpovídají

pravděpodobně dimerům PIC a jejich aduktům se sodnými ionty. Separace derivátu methanolu jak se 2  $\mu$ l, tak i s 5  $\mu$ l PIC poskytla chromatogram s dvěma vysokými píky v časech 12,96 a 18,02 min a dvěma nízkými píky v časech nad 20 minut (viz Obrázek P 36). Pro tento záznam pak bylo získáno hmotnostní spektrum pro nejvyšší pík na chromatogramu, jenž se objevil ve 12,96 minutě. Na tomto záznamu se zobrazují dva vysoké signály, z nichž první s molekulovou hmotností 119,6 náleží fenylisokyanátu a druhý s molekulovou hmotností 152,0 pak derivátu methanolu s jednou molekulou PIC (hmotnostní spektra a návrhy struktur jednotlivých molekul viz Obrázek P 36). Při separaci derivátů denaturovaného ethanolu se na chromatogramu zobrazovaly čtyři píky, a to jak u derivátu s 2  $\mu$ l tak i s 5  $\mu$ l PIC. Jednalo se o dva nižší píky v časech 16,02 a 23,83 minut a dva vyšší píky s časy 18,18 a 24,89 minut (viz Obrázek P 37). Pro tento záznam byly extrahovány čtyři hmotnostní spektra příslušící jednotlivým píčkům. Tyto hmotnostní spektra jsou i s navrhovanými strukturami molekul, jenž náleží nejvyšším signálům ve spektrech zobrazeny na Obrázcích P 38 a P 39. Signál odpovídající molekulové hmotnosti 137,6 odpovídá molekule PIC po reakci s vodou, dále pak signály patřící k molekulovým hmotnostem 235,1; 185,5; 306,8 a 354,0 odpovídají pravděpodobně dimerům PIC a jejich aduktům se sodnými ionty.

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 8 byly provedeny na koloně Kinetex® C18 s gradientem 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové (doba analýzy 33 min). Separace derivátů jednotlivých polyolů zde byly lepší než v systému RP-HPLC-UV (viz kapitola 3.3), kde se řada menších píků zobrazovala pokaždé jen u PEG 400 a občas pak i u PEG 600 či PPG 2700. Záznamy chromatogramů všech osmi polyolů jsou zobrazeny na Obrázcích P 40 až P 44. Společně se záznamy z UV detektorů se zde pro PEG 400, PEG 600, PPG 400 a PPG 800 nalézají i rekonstruované iontové chromatogramy s přiřazenými teoretickými hodnotami m/z. Tyto teoretické hodnoty m/z společně s počtem EG / PG jednotek a pozorovanými hodnotami m/z jsou pro PEG 400 a PEG 600 uvedeny v tabulce 3, pro PPG 400 a PPG 800 pak v tabulce 4.

Díky separacím v módu RP-HPLC-MS se potvrdily předpoklady, jenž byly získány při separacích v RP-HPLC-UV, a to že skupina malých píků u PEG 400 vyskytujících se před nejvyšším píkem na chromatogramu (viz např. Obrázky P 6, P 17 či P 24) odpovídá derivátům PEG s fenylisokyanátem. Počet jednotek EG se pohyboval od 5 do 13 (viz rekonstruovaný iontový chromatogram na Obrázku P 40 a tabulka 3).

U PEG 600 pak bylo prokázáno, že náznaky separace, jenž jsou vyznačeny na Obrázku P 26 skutečně odpovídají derivátům PEG s PIC, přičemž počet jednotek EG se pohyboval od 7 do 14 (viz rekonstruovaný iontový chromatogram na Obrázku P 41 a tabulka 3). V tabulce 3 je z odchylek ( $\Delta m/z$  vypočtených dle rovnice 6) patrná shoda mezi naměřenými hodnotami  $m/z$  a teoreticky vypočtenými na základě navržené struktury derivatizovaných alkoholů.

$$\Delta m/z = \text{experimentální } m/z - \text{teoretická } m/z$$

Rovnice 6 Výpočet odchyly  $m/z$

Tabulka 3 Molekulové hmotnosti derivátů PEG s PIC pro PEG 400 a PEG 600

Počet EG jednotek	Teoretická $m/z$ [M+H <sup>+</sup> ]	Pozorovaná $m/z$ pro PEG 400	Odchylnka PEG 400	Pozorovaná $m/z$ pro PEG 600	Odchylnka PEG 600
5	358,18	358,3	0,12	/	/
6	402,21	402,5	0,29	/	/
7	446,23	446,3	0,07	446,6	0,37
8	490,26	490,3	0,04	490,6	0,34
9	534,28	534,4	0,12	534,6	0,32
10	578,31	578,4	0,09	578,6	0,29
11	622,34	622,4	0,06	622,4	0,06
12	666,36	666,6	0,24	666,6	0,24
13	710,39	710,6	0,21	710,6	0,21
14	754,41	/	/	754,6	0,19

PIC...fenylisokyanát, EG...ethylenglykol, / ... pozorovaná  $m/z$  není pro daný polyol zaznamenána

V případě polypropylenglykolů, respektive PPG 400 a PPG 800 k žádným separacím v systému RP-HPLC-UV nedocházelo, a tudíž získaná data z RP-HPLC-MS přinesla nové poznatky. Jak je patrné na Obrázku P 42 (patřícímu k PPG 400) deriváty PPG a PIC se začaly vyskytovat až za nejvyšším píkem na chromatogramu, přičemž počet jednotek PG se pohyboval od 5 do 10 (viz rekonstruovaný iontový chromatogram na Obrázku P 42 a tabulka 4). U PPG 800 (viz Obrázek P 43) je situace obdobná jako u PPG 400, tedy skupina derivátů PPG se vyskytuje až za nejvyšším píkem na chromatogramu a počet jednotek PG se pohybuje od 8 do 12 (viz rekonstruovaný iontový chromatogram na Obrázku P 43 a tabulka 4). V tabulce 4 je z odchylek ( $\Delta m/z$  viz rovnice 6) patrná shoda mezi naměřenými hodnotami  $m/z$  a teoreticky vypočtenými na základě navržené struktury derivatizovaných alkoholů.

Tabulka 4 Molekulové hmotnosti derivátů PPG s PIC pro PPG 400 a PPG 800

Počet PG jednotek	Teoretická m/z [M+H <sup>+</sup> ]	Pozorovaná m/z pro PPG 400	Odchylka PPG 400	Pozorovaná m/z pro PPG 800	Odchylka PPG 800
5	428,25	428,5	0,25	/	/
6	486,29	486,5	0,21	/	/
7	544,33	544,6	0,27	/	/
8	602,37	602,6	0,23	602,8	0,43
9	660,41	660,7	0,29	660,7	0,29
10	718,45	718,9	0,45	718,7	0,25
11	776,49	/	/	776,9	0,41
12	834,53	/	/	834,8	0,27

PIC...fenylisokyanát, PG...propylenglykol, / ... pozorovaná m/z není pro daný polyol zaznamenána

U polyolů s vyšší molekulovou hmotností tedy u PEG 1000, PPG 1000, PPG 2700 a PPG 4000 nejsou rekonstruované iontové chromatogramy k jednotlivým záznamům z UV detektoru přidány, neboť polyoly se na chromatogramech začaly vyskytovat až těsně před koncem gradientu. Pro detailnější charakterizaci výšemolekulárních PEG a PPG by byla pravděpodobně nutná změna mobilní fáze za rozpouštědlo s vyšší eluční silou (např. 2-propanol).

### 3.6 Analýzy pomocí HILIC-MS s gradientovou elucí

Na modulárním kapalinovém chromatografu Shimadzu za využití hydrofilní interakční chromatografie s UV a MS detekcí byly při gradientové eluci separovány deriváty polyolů, jenž byly připraveny postupem 8, dále pak vzorek fenylisokyanátu a deriváty methanolu a denaturovaného ethanolu (viz kapitola 2.3.1).

Separace vzorku fenylisokyanátu a derivátů methanolu a denaturovaného ethanolu byly provedeny na koloně Kinetex® HILIC s gradientem 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) a dobou analýzy 33 minut. Při separaci vzorku fenylisokyanátu se na záznamu z UV detektoru objevily dva píky, z nichž první pík v čase 1,35 min byl vyšší než pík druhý, jenž se zobrazil v čase 1,57 minut (viz Obrázek P 45). Přičemž je ze záznamu na Obrázku P 45 patrné, že oddělení píků není úplné. Pro tento záznam byly extrahovány dvě hmotnostní spektra, jenž jsou i s navrhovanými strukturami molekul, jenž náleží nejvyšším signálům ve spektrech zobrazeny na Obrázku P 46.

Separace derivátu methanolu a denaturovaného ethanolu jak se 2  $\mu$ l, tak i s 5  $\mu$ l PIC poskytla chromatogramy vždy s jedním vysokým píkem, a to u methanolu v čase 1,36 min a u denaturovaného ethanolu v čase 1,32 min (viz Obrázek P 47).

Separace všech derivátů polyolů připravených postupem 8 byly provedeny na koloně Kinetex® HILIC s gradientem 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) a dobou analýzy 33 minut. Při separacích v módu HILIC-MS došlo ke zlepšení separací pouze u polyethylenglykolů, kde je na jednotlivých chromatogramech vidět více malých píků (viz Obrázek P 48 a P 49). U polypropylenglykolů je výsledek separace stejný jako tomu bylo u HILIC-UV, tedy jeden vysoký pík na začátku chromatogramu lišící se maximálně o setinu minuty (viz Obrázek P 50 až P 52). Společně se záznamy z UV detektorů se zde pro PEG 400 a PPG 400 nalézají i rekonstruované iontové chromatogramy s přiřazenými hmotami (viz Obrázek P 48 a P 50). U PEG 600 a PEG 1000 nebylo možné rekonstruované iontové chromatogramy sestavit, neboť jednotlivé píky zaznamenané pomocí UV detektoru neodpovídaly retenčním časům daných píků s příslušnými hodnotami m/z u rekonstruovaných iontových chromatogramů. V případě ostatních polypropylenglykolů byla situace obdobná jako tomu je u PPG 400, tedy že všechny hmoty se překrývaly v jednom píku. Teoretické hodnoty m/z společně s počtem EG jednotek a pozorovanými hodnotami m/z jsou pro PEG 400 uvedeny v tabulce 5.

Využití separace v systému HILIC-MS se ukázalo pro PEG 400 výhodnější, než tomu bylo u HILIC-UV. Při separacích PEG 400 v systému HILIC-UV se na chromatogramech zobrazovaly maximálně dva spojené píky, jako je tomu například u PPG 800 na Obrázku P 32. V systému HILIC-MS nebyly sice jednotlivé deriváty PEG zcela rozseparovány, ale bylo jich tu zaznamenáno více (viz Obrázek P 48). Jak je patrné na rekonstruovaném iontovém chromatogramu (viz Obrázek P 48 a data v tabulce 5) počet detekovaných jednotek EG se pohyboval od 5 do 12. V tabulce 5 je pak z odchylek ( $\Delta$  m/z vypočtených dle rovnice 6) patrná shoda mezi naměřenými hodnotami m/z a teoreticky vypočtenými na základě navržené struktury derivatizovaných alkoholů.

Tabulka 5 Molekulové hmotnosti derivátů PEG s PIC pro PEG 400

Počet EG jednotek	Teoretická m/z [M+H <sup>+</sup> ]	Pozorovaná m/z pro PEG 400	Odchyka PEG 400
5	358,18	358,2	0,02
6	402,21	402,4	0,19
7	446,23	446,3	0,07
8	490,26	490,3	0,04
9	534,28	534,4	0,12
10	578,31	578,4	0,09
11	622,34	622,4	0,06
12	666,36	666,4	0,04

PIC...fenylisokyanát, EG...ethylenglykol

Z uvedených výsledků lze vyvodit závěr, že fázový systém HILIC chromatografie je vhodnější pro separaci PEG, zatímco selektivita pro PPG jednotky je docela nízká.



## Závěr

Tato diplomová práce se zabývala separací derivátů polykondenzovaných alkoholů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie především s UV detekcí, ale byly provedeny také separace, u nichž se k detekci využívala i hmotnostní spektrometrie. Cílem bylo nalézt optimální separační podmínky pro všechny zkoušené typy polyolů, při nichž by se jednotlivé oligomery přítomné ve směsích polyolů rozdělily.

V experimentální části byly vyzkoušeny separace polyolů na různých typech kolon v systému s obrácenými fázemi a následně pak i za využití hydrofilní interakční chromatografie. Bylo vyzkoušeno osm derivatizačních postupů, kde se vždy jako derivatizační činidlo využíval fenylisokyanát. Z hlediska nejvyšší odezvy derivátů se jako nejvhodnější ukázaly postupy, u nichž nebylo využito žádné katalyzační činidlo, tedy postupy 2; 3; 7 a 8.

V rámci separací při izokratické eluci pomocí RP-HPLC-UV bylo dosaženo uspokojivé separace pouze u PEG 400 (připraveného postupem 3), a to na koloně Ascentis® Express C18 při konstantních 20 obj. % ACN-voda. Při využití různých gradientů na RP-HPLC-UV došlo vždy k nejlepšímu rozseparování u PEG 400, ovšem nakonec se podařilo částečně rozseparovat i PEG 600 a k náznakům separace došlo i u PPG 2700 a PPG 4000. V rámci HILIC-UV k žádné výrazné separaci nedocházelo.

Při separacích na RP-HPLC-MS došlo k nejlepšímu rozseparování opět u PEG 400, ovšem náznaky separace zde jevily i všechny zbývající polyoly. Při HILIC-MS byly výsledky separací lepší pouze u polyethylenglykolů, u polypropylenglykolů byly výsledky separací stejné jako tomu bylo v případě HILIC-UV.

Z hlediska porovnání fázových systémů, respektive RP-HPLC a HILIC lze říci, že v případě separace jednotlivých polyolů se jako vhodnější ukázalo využití RP-HPLC, neboť u tohoto fázového systému bylo dosaženo vyšší retence a lepších separací než u HILIC. Příkladem může být separace PEG 400, kdy v případě RP-HPLC-UV došlo k separaci derivatizovaných oligomerů, zatímco u HILIC-UV byl na chromatogramu zaznamenán pouze jeden pík.

## Seznam použité literatury

- [1] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 1. vyd. Klatovy: Michal Douša, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [2] CHURÁČEK, J. Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [3] CHURÁČEK, J. Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod. Vyd. 1. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- [4] Základy analytické chemie. *Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem Fakulta životního prostředí* [online]. Ústí nad Labem: UJEP, 2014 [cit. 2017-07-03]. Dostupné z: [http://fzp.ujep.cz/ktv/uc\\_texty/zach/zach.pdf](http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/zach/zach.pdf)
- [5] FANALI, S. Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation. Waltham: Elsevier, 2013, 504 s. ISBN 978-0-12-415807-8.
- [6] LACOURSE, W. R. Column Liquid Chromatography: Equipment and Instrumentation. *Analytical Chemistry*. 2002, **74**(12), 2813-2832 s. DOI: 10.1021/ac020220q. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac020220q>
- [7] VOJTA, J., A. MUSILOVÁ-SVOBODOVÁ, M. FRANC, P. COUFAL a Z. BOSÁKOVÁ. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické listy*. 2013, (108), 127-134 s. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_02\\_127-134.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_02_127-134.pdf)
- [8] OBERACHER, H. Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002, **21**(3), 166-174 s. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00304-7](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00304-7)
- [9] ŠVEC, F. Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chemické listy*. 2004, (98), 232-238 s. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_05\\_01.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_01.pdf)

- [10] HOLČAPEK, M. a P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, **92**, 278-286 s. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_04\\_278-286.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf)
- [11] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2012, **2012**(3), 152-157. ISSN 1210-7921. Dostupné také z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- [12] JANDERA, P. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [13] DOUŠA, M. *HPLC* [online]. Česká republika, 1999 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [14] VACEK, J., L. ONOFREJOVÁ, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické listy*. 2009, **103**(5), 381 - 385. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_05\\_381-385.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_05_381-385.pdf)
- [15] PĚKNICOVÁ, M. a D. KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902-4329-0.
- [16] WEST, C. a E. LESELLIER. Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1110**(1-2), 200-213. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.109. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306002652>
- [17] YOSHIDA, T. a T. OKADA. Peptide separation in normal-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1999, **840**(1), 1-9. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00223-X. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196739900223X>
- [18] NAWROCKI, J., C. DUNLAP, A. MCCORMICK a P. W. CARR. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1028**(1), 1-30 s. DOI:

10.1016/j.chroma.2003.11.052. ISSN 00219673. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303021319>

- [19] SÝKORA, D., E. TESAŘOVÁ, M. VOSMANSKÁ a M. ZVOLÁNKOVÁ. Moderní Stacionární Fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*. 2007, (101), 190-199 s. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_03\\_190-199.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf)
- [20] JANDERA, P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Separation Science*. 2008, **31**(9), 1421-1437. DOI: 10.1002/jssc.200800051. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200800051>
- [21] JANDERA, P. HILIC chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodě-organických mobilních fázích. *CHEMAGAZÍN*. 2011, 21(2), 8-9 s. Dostupné také z: [http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin\\_2010/file/CHEMAGAZIN\\_XXI\\_2\\_cl1.pdf](http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_2_cl1.pdf)
- [22] JANDERA, P. a J. CHURÁČEK. *Gradient Elution in Column Liquid Chromatography Theory and Practice*. Burlington: Elsevier, 1985. ISBN 978-008-0858-340.
- [23] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova* [online]. Praha [cit. 2017-12-13]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>
- [24] KOMÁREK, K., J. FRANC a J. CHURÁČEK. *Reakční chromatografie v organické analýze*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1989. ISBN 80-030-0153-6.
- [25] *Chemistry and Technology of Polyurethanes* [online]. Brazílie, 2002 [cit. 2017-09-23]. Dostupné z: <http://www.poliuretanos.com.br/>
- [26] COELHO, A. G. a D. P. DE JESUS. A simple method for determination of erythritol, maltitol, xylitol, and sorbitol in sugar-free chocolates by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *ELECTROPHORESIS*. 2016, **37**(22), 2986-2991. DOI:

10.1002/elps.201600263. ISSN 01730835. Dostupné také z:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201600263>

- [27] *Informační centrum bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství* [online]. Praha, 2012 [cit. 2017-09-23]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/>
- [28] KUČERA, M. *Vznik makromolekul*. Brno: VUTIUM, 2003. ISBN 80-214-2127-4.
- [29] MLEZIVA, J. a J. KÁLAL. *Základy makromolekulární chemie: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty vysokých škol technických oborů 28-10-8 Technologie výroby a zpracování polymerů*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [30] ŠTĚPEK, J. *Polymery v obalové technice*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981. Makromolekulární látky.
- [31] IONESCU, M. *Chemistry and technology of polyols for polyurethanes*. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, U.K.: Rapra Technology, c2005. ISBN 18-595-7491-2.
- [32] DOMBROW, B. A. *Polyuretany*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1961. Makromolekulární látky.
- [33] DI SERIO, M., R. TESSER, A. DIMICCOLI a E. SANTACESARIA. Kinetics of Ethoxylation and Propoxylation of Ethylene Glycol Catalyzed by KOH. *Industrial*. 2002, **41**(21), 5196-5206. DOI: 10.1021/ie020082v. ISSN 0888-5885. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie020082v>
- [34] MLEZIVA, J. *Polymery – výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Praha: Sobotáles, 1993. ISBN 80-901-5704-1.
- [35] MURPHY, R., A. C. SELDEN, M. FISHER, E. A. FAGAN a V. S. CHADWICK. High-performance liquid chromatographic analysis of polyethylene glycols. *Journal of Chromatography A*. 1981, **211**(1), 160-165. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)81186-3. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300811863>
- [36] TAN, S. N., D. FORNASIERO, R. SEDEV a J. RALSTON. The interfacial conformation of polypropylene glycols and foam behaviour. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2004, **250**(1-3), 307-315. DOI:

10.1016/j.colsurfa.2004.04.085. ISSN 09277757. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775704005023>

- [37] RISSLER, K. High-performance liquid chromatography and detection of polyethers and their mono(carboxy)alkyl and -arylalkyl substituted derivatives. *Journal of Chromatography A*. 1996, **742**(1-2), 1-54. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00168-9. ISSN 00219673. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967396001689>
- [38] RISSLER, K., H.-P. KÜNZI a H.-J. GREETHER. Chromatographic investigations of oligomeric  $\alpha,\omega$ -dihydroxy polyethers by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering and UV detection. *Journal of Chromatography A*. 1993, **635**(1), 89-101. DOI: 10.1016/0021-9673(93)83118-C. ISSN 00219673. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739383118C>
- [39] BROSSARD, S., M. LAFOSSE a M. DREUX. Comparison of ethoxylated alcohols and polyethylene glycols by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography using evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 1992, **591**(1-2), 149-157. DOI: 10.1016/0021-9673(92)80232-J. ISSN 00219673. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739280232J>
- [40] STUTZMAN, J. R., M. C. CROWE, J. N. ALEXANDER, B. M. BELL a M. N. DUNKLE. Coupling Charge Reduction Mass Spectrometry to Liquid Chromatography for Complex Mixture Analysis. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**(7), 4130-4139. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00485. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b00485>
- [41] VAŇKOVÁ, N., Z. SZLAUEROVÁ, J. FISCHER a P. ČESLA. Determination of fatty alcohol ethoxylates in the Labe and Chrudimka rivers. *Chemické Listy*. 2014, 108, 187-191. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_s3\\_s151-s204.pdf#page=37](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014_s3_s151-s204.pdf#page=37)
- [42] JAREŠOVÁ, L. Separace polykondenzovaných alkoholů pomocí kapalinové chromatografie. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.

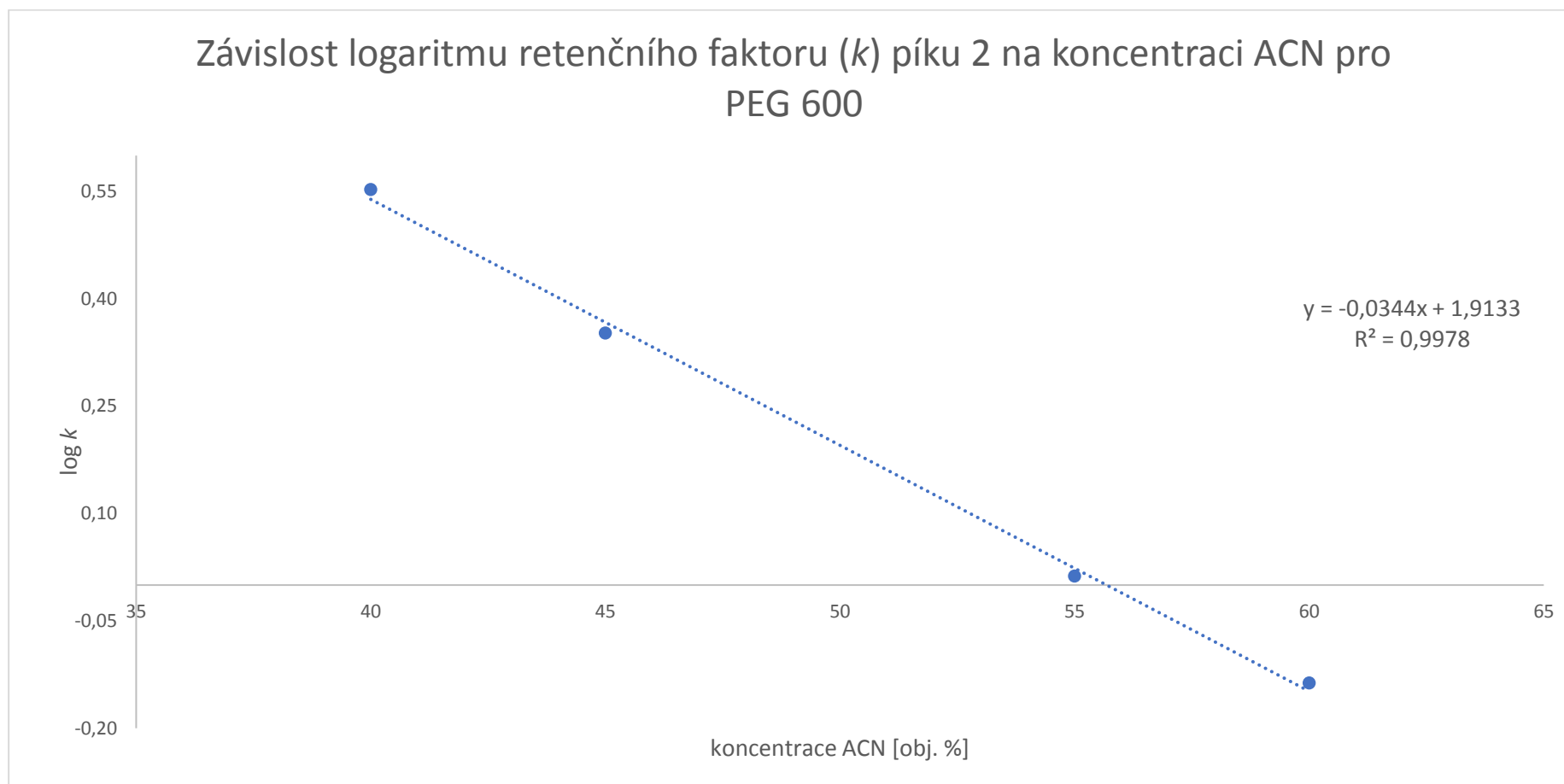
# **Přílohy**

**Tabulka P 1:** Retenční časy a faktory PEG 600 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,39 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [/ daný pík se na chromatogramu nezobrazoval]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1	2,33	0,003	0,67
	2	2,42	0,003	0,73
55	1	2,64	0,001	0,89
	2	2,83	0,002	1,03
50	1	3,47	0,001	1,49
	2	/	/	/
45	1	/	/	/
	2	4,53	0,004	2,25
40	1	4,83	0,009	2,47
	2	6,36	0,016	3,57



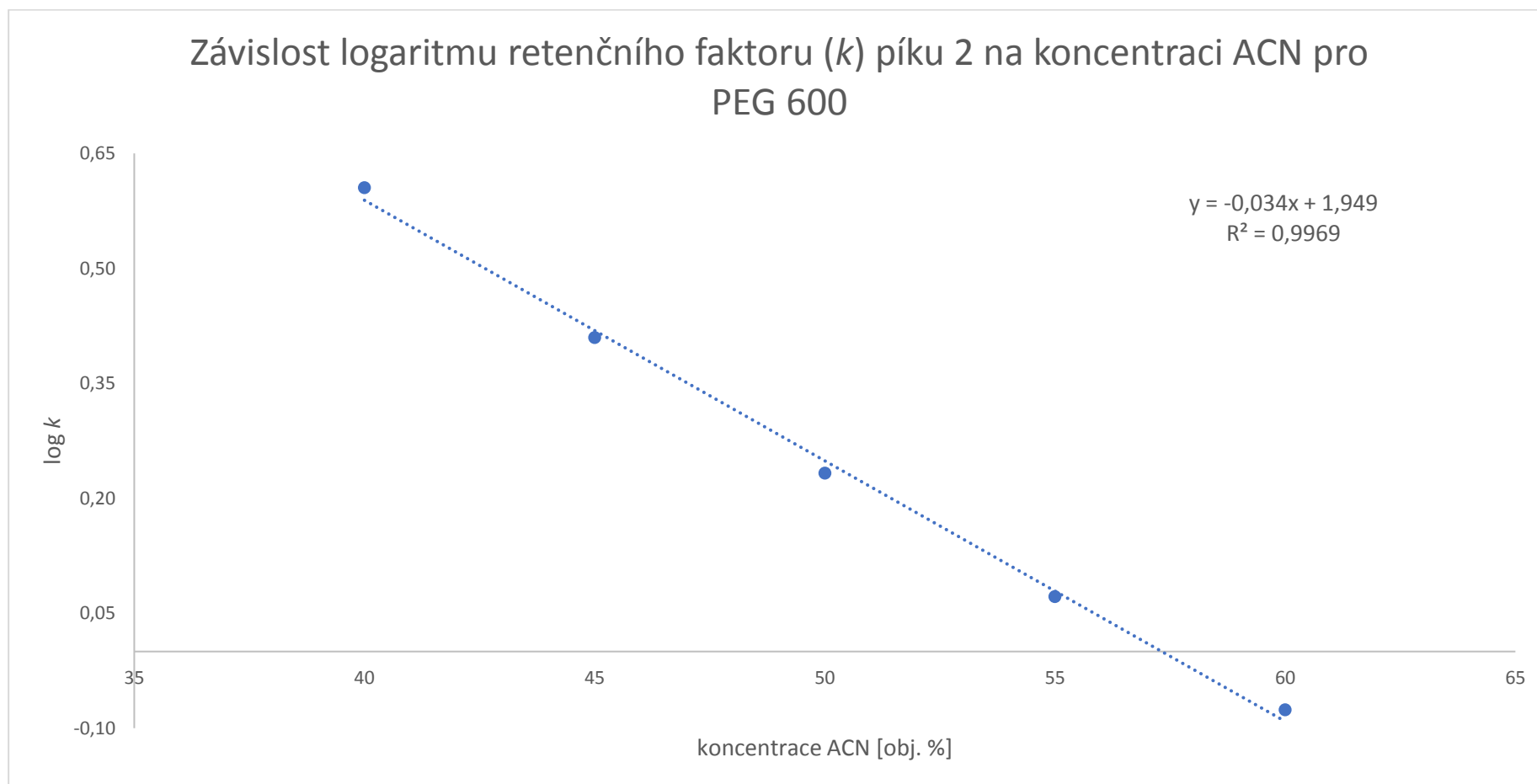
**Graf P 1:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PEG 600 (pro pík 2, viz Tabulka P 1) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 2:** Retenční časy a faktory PEG 600 (připraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express C8 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,7  $\mu$ m), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,55 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [/ daný pík se na chromatogramu nezobrazoval]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1	/	/	/
	2	2,87	0,000	0,84
55	1	3,18	0,001	1,05
	2	3,39	0,001	1,18
50	1	3,77	0,001	1,43
	2	4,21	0,002	1,71
45	1	4,65	0,001	1,99
	2	5,55	0,001	2,57
40	1	6,01	0,003	2,86
	2	7,82	0,001	4,03

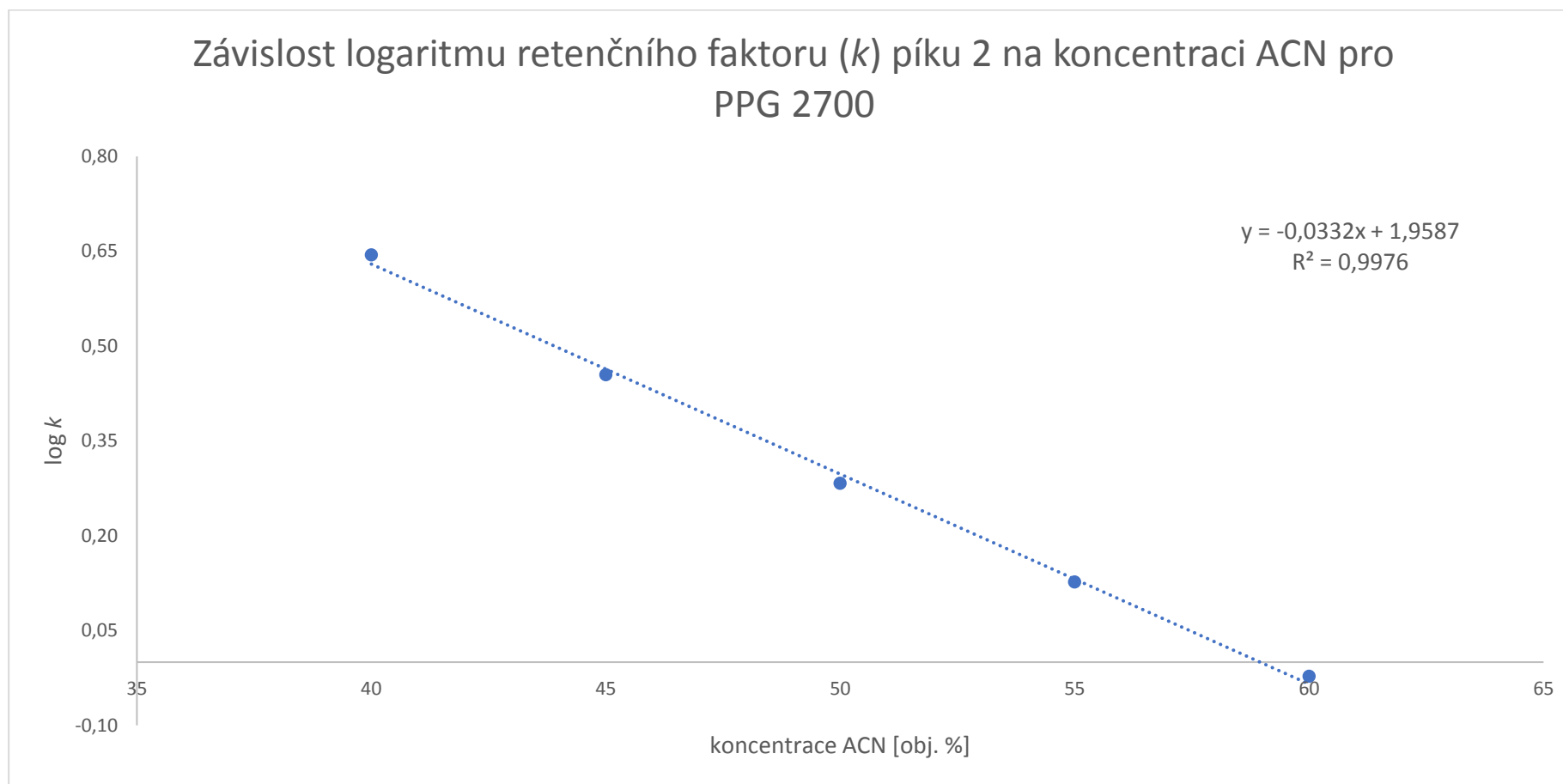
**Graf P 2:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PEG 600 (pro pík 2, viz Tabulka P 2) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express C8 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,7 μm), dávkovaný objem vzorku 1 μl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 3:** Retenční časy a faktory PPG 2700 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Supelcosil™ LC-18-DB (25 cm x 4,6 mm s velikostí částic 4,6 μm), dávkovaný objem vzorku 5 μl, průtok mobilní fáze ACN-voda 1 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 2,59 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné)

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1	4,81	0,001	0,86
	2	5,06	0,001	0,95
55	1	5,55	0,004	1,14
	2	6,05	0,006	1,34
50	1	6,60	0,005	1,55
	2	7,57	0,006	1,92
45	1	8,14	0,004	2,14
	2	9,97	0,004	2,85
40	1	10,46	0,008	3,04
	2	14,00	0,010	4,41

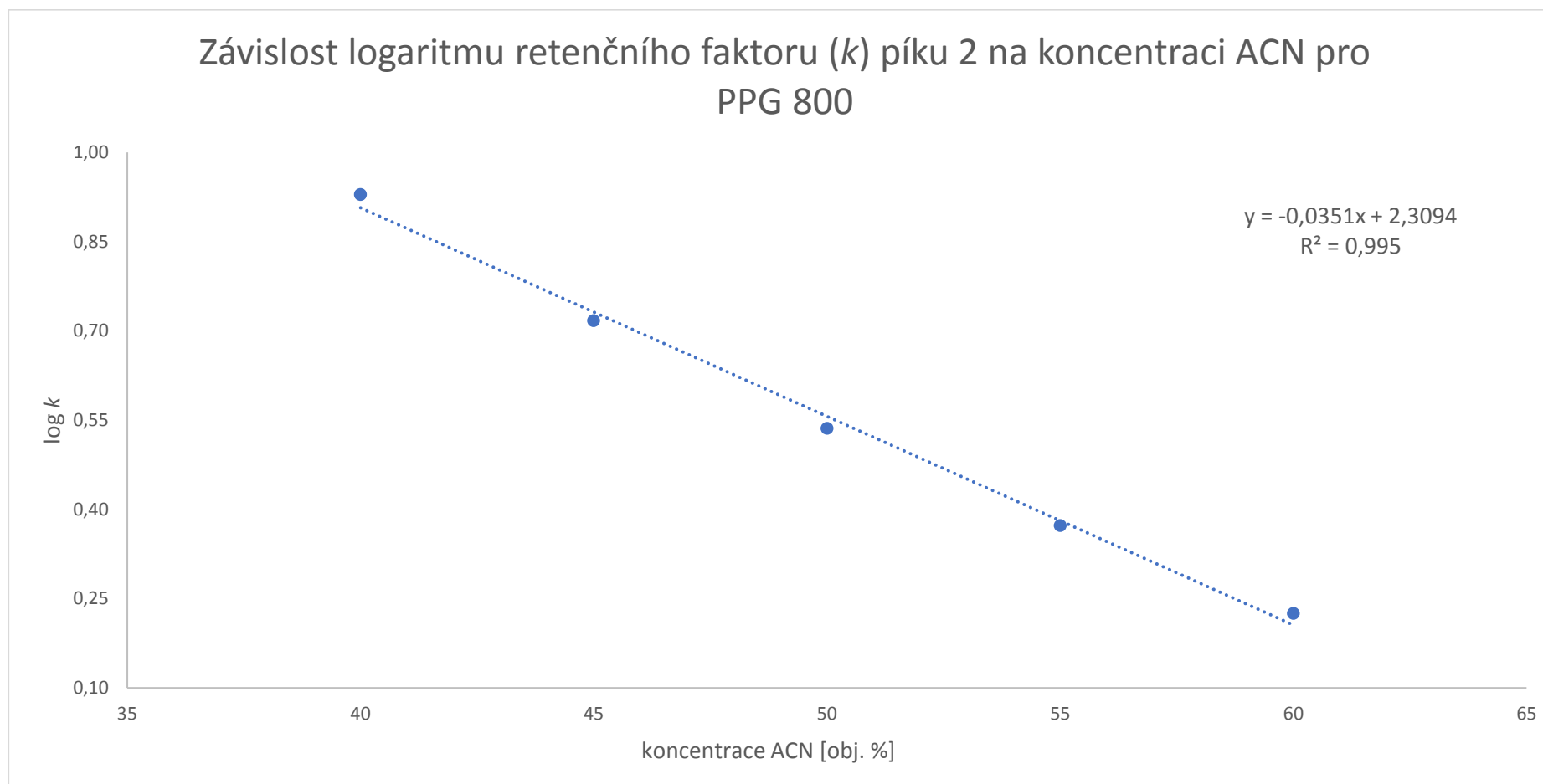
**Graf P 3:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PPG 2700 (pro pík 2, viz Tabulka P 3) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Supelcosil™ LC-18-DB (25 cm x 4,6 mm s velikostí částic 4,6 μm), dávkovaný objem vzorku 5 μl, průtok mobilní fáze ACN-voda 1 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 4:** Retenční časy a faktory PPG 800 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® RP AMIDE (15 cm x 1 mm s velikostí částic 3 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,1 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,40 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné)

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1	2,47	0,003	0,77
	2	3,75	0,006	1,68
55	1	2,83	0,002	1,03
	2	4,70	0,010	2,36
50	1	3,36	0,003	1,40
	2	6,21	0,006	3,44
45	1	4,12	0,041	1,95
	2	8,69	0,083	5,22
40	1	3,59	0,009	2,86
	2	13,27	0,002	8,50

**Graf P 4:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PPG 800 (pro pík 2, viz Tabulka P 4) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® RP AMIDE (15 cm x 1 mm s velikostí částic 3 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,1 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)

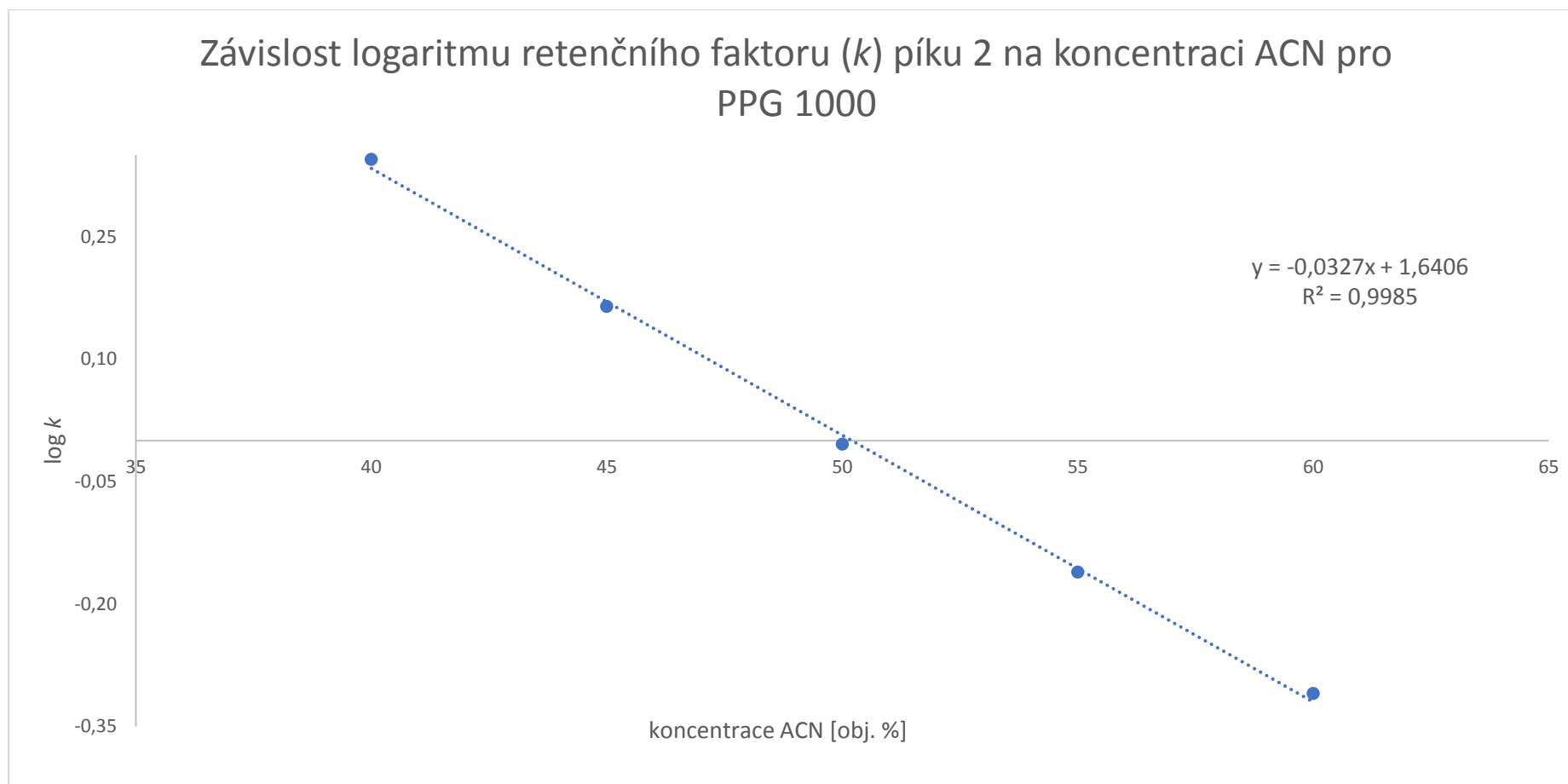


**Tabulka P 5:** Retenční časy a faktory PPG 1000 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 μm), dávkovaný objem vzorku 1 μl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,36 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [/ daný pik se na chromatogramu nezobrazoval]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1	/	/	/
	2	2,03	0,000	0,49
55	1	/	/	/
	2	2,30	0,001	0,69
50	1	2,35	0,001	0,73
	2	2,71	0,001	0,99
45	1	2,72	0,001	1,00
	2	3,35	0,000	1,46
40	1	3,25	0,002	1,39
	2	4,37	0,004	2,21



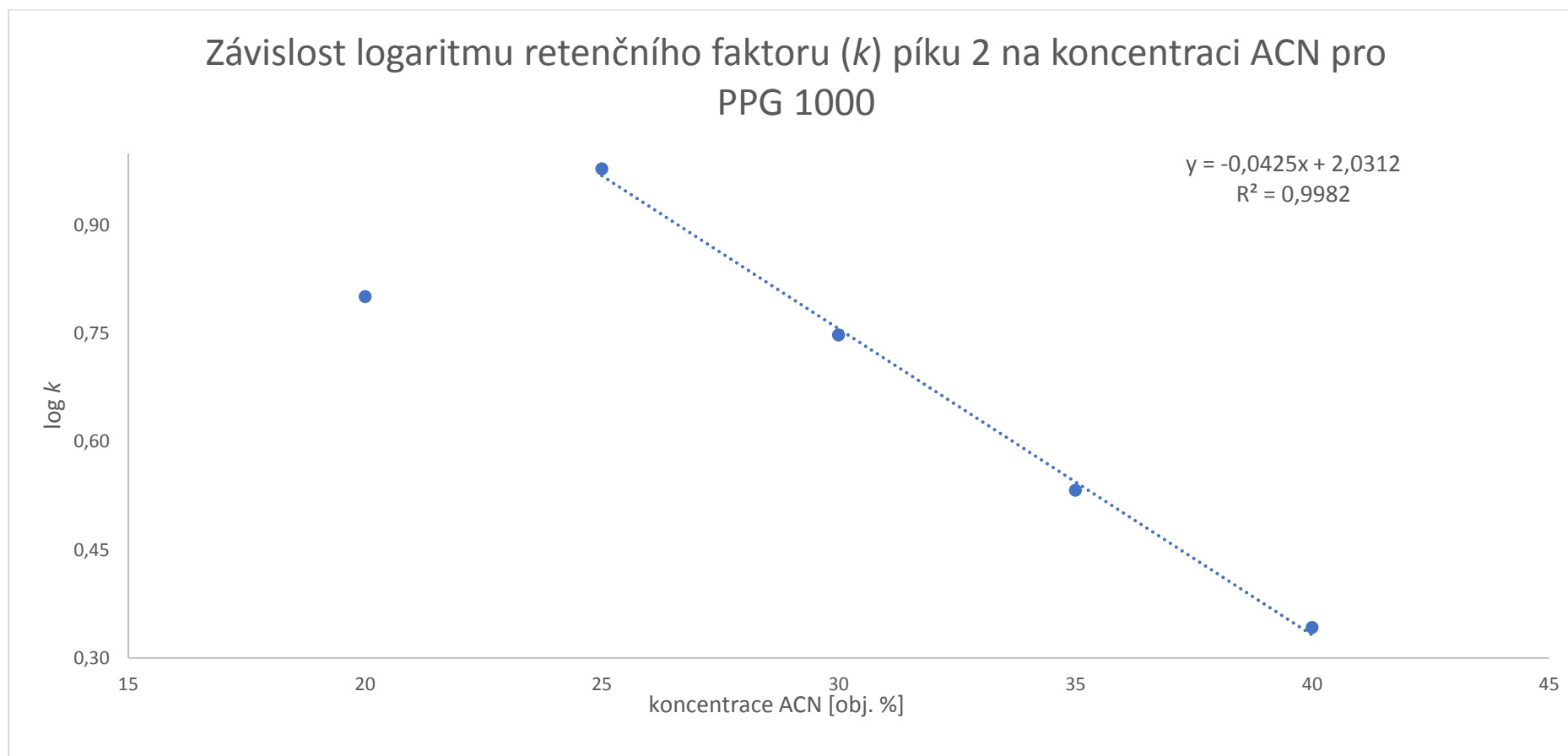
**Graf P 5:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PPG 1000 (pro pík 2, viz Tabulka P 5) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 6:** Retenční časy a faktory PPG 1000 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,36 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné)

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
40	1	3,25	0,001	1,39
	2	4,35	0,001	2,20
35	1	4,01	0,001	1,95
	2	6,01	0,004	3,41
30	1	5,22	0,007	2,83
	2	8,99	0,008	5,60
25	1	7,05	0,008	4,18
	2	14,31	0,004	9,52
20	1	8,48	0,042	5,23
	2	9,97	0,000	6,33

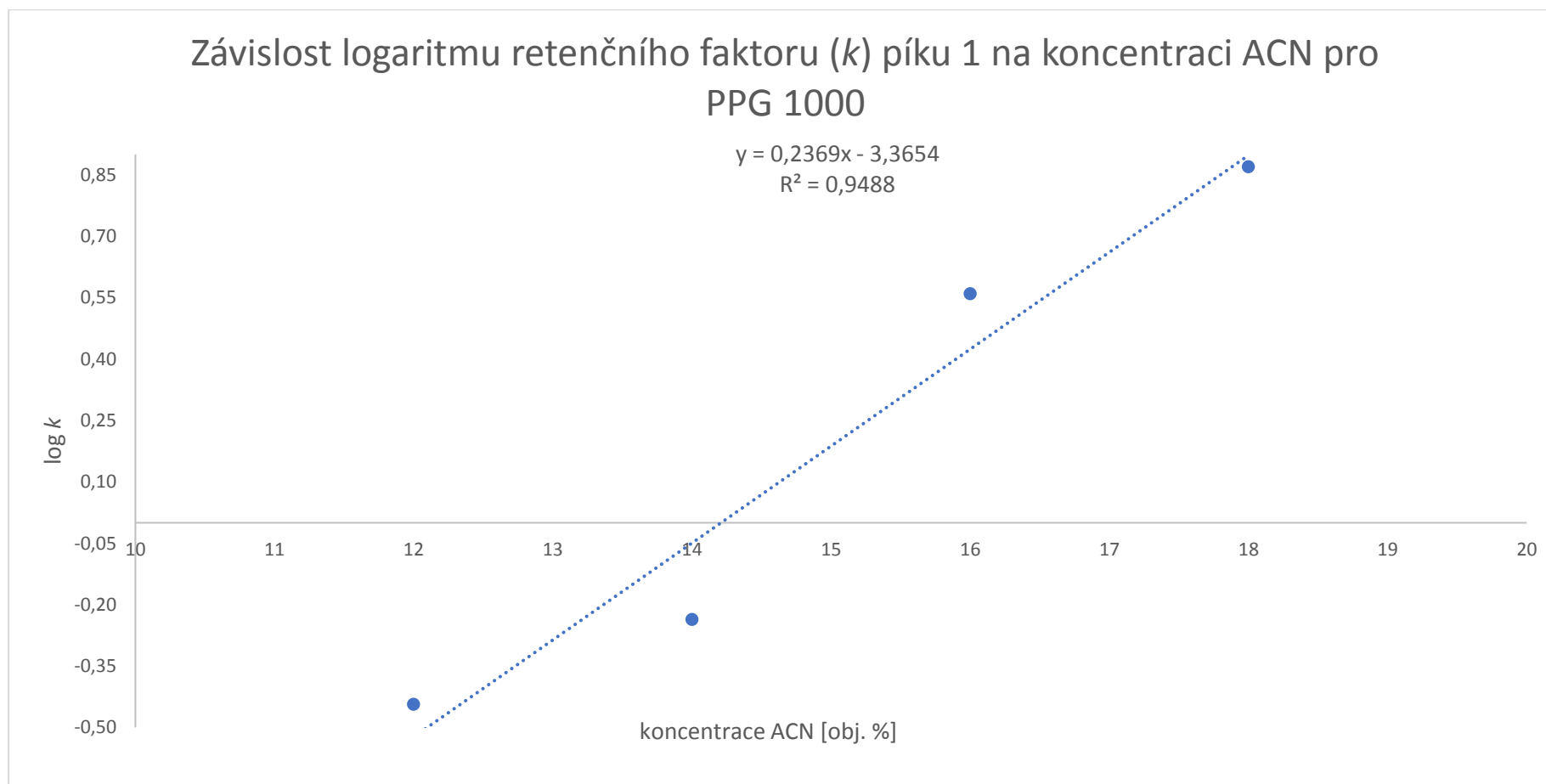
**Graf P 6:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PPG 1000 (pro pík 2, viz Tabulka P 6) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 7:** Retenční časy a faktory PPG 1000 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,36 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [/ daný pik se na chromatogramu nezobrazoval]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
18	1	11,45	0,008	7,41
	2	14,16	0,014	9,40
16	1	6,30	0,006	3,63
	2	13,38	0,020	8,83
14	1	2,14	0,002	0,58
	2	/	/	/
12	1	1,85	0,252	0,36
	2	3,28	0,173	1,41

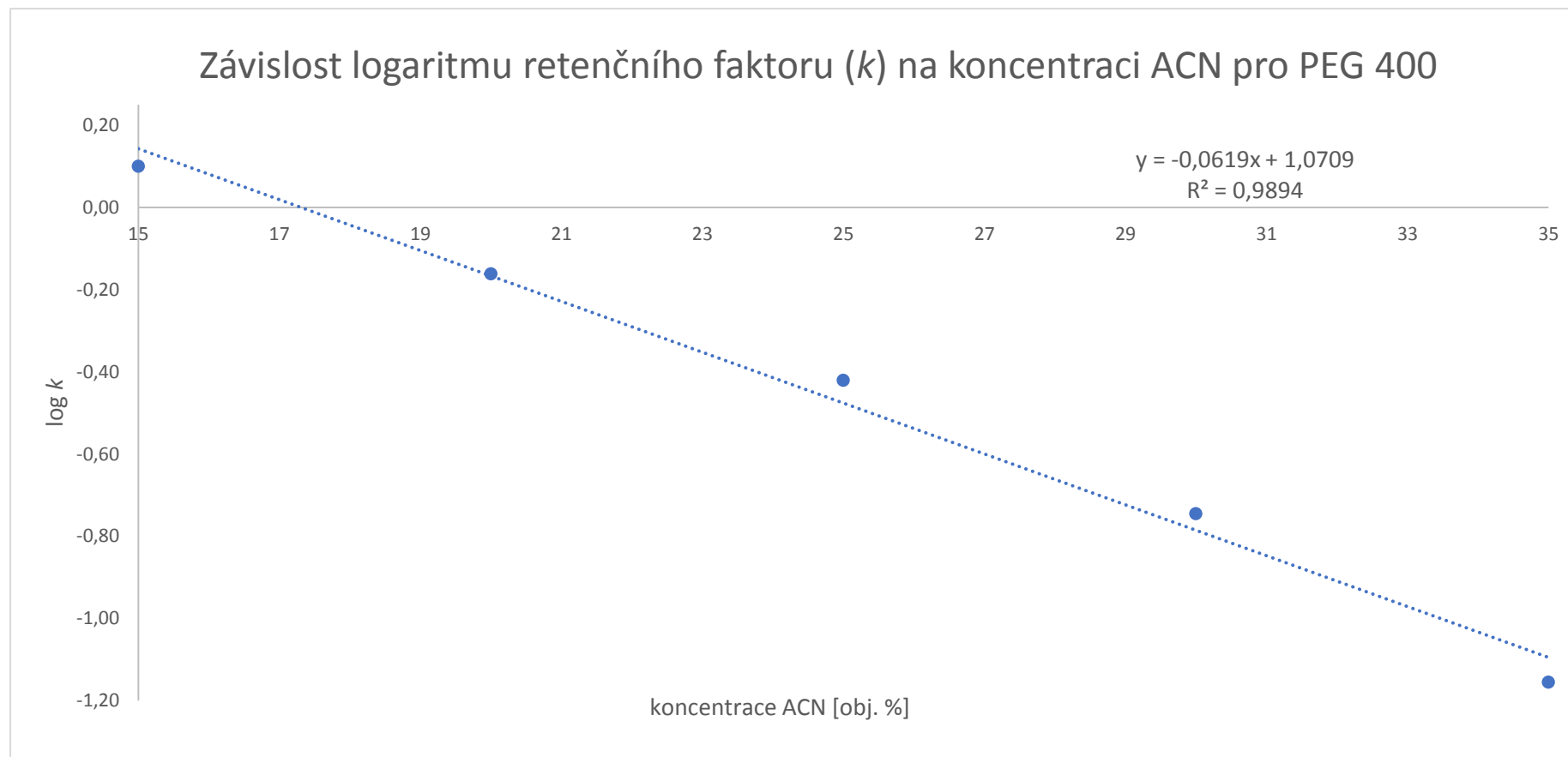
**Graf P 7:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PPG 1000 (pro pík 1, viz Tabulka P 7) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 8:** Retenční časy a faktory PEG 400 (přípraveného postupem 1) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express OH5 (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,50 min (analýza byla provedena pro všechny vzorky PEG a PPG, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [/ retenční faktor (*k*) nelze určit, neboť látky procházely kolonou bez zadržení, tzn. retenční časy vzorků byly nižší než mrtvý retenční čas kolony]

Koncentrace ACN [obj. %]	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1,30	0,001	/
55	1,32	0,001	/
50	1,35	0,001	/
45	1,41	0,000	/
40	1,48	0,001	/
35	1,60	0,004	0,07
30	1,77	0,003	0,18
25	2,07	0,006	0,38
20	2,53	0,049	0,69
15	3,39	0,018	1,26

**Graf P 8:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PEG 400 (viz Tabulka P 8) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express OH5 (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 μm), dávkovaný objem vzorku 1 μl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolů jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 9:** Retenční časy a faktory PEG 400 (přípraveného postupem 2 s 50 µl PIC) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,36 min (analýza byla provedena pro všechny 3 vzorky PEG 400 připravené postupem 2 viz kapitola 2.3.1, retenční časy byly ovšem vždy podobné) [/ daný pik se na chromatogramu nezobrazoval, hodnoty vyznačené tučným písmem odpovídají nejvyššímu píku na chromatogramu]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
60	1	<b>2,04</b>	<b>0,000</b>	<b>0,50</b>
	2	/	/	/
55	1	1,50	0,002	0,10
	2	<b>2,31</b>	<b>0,008</b>	<b>0,69</b>
50	1	1,58	0,001	0,16
	2	<b>2,72</b>	<b>0,004</b>	<b>1,00</b>
45	1	1,68	0,001	0,23
	2	<b>3,35</b>	<b>0,004</b>	<b>1,45</b>
40	1	1,87	0,001	0,37
	2	<b>4,36</b>	<b>0,004</b>	<b>2,20</b>
35	1	2,17	0,001	0,59
	2	<b>6,03</b>	<b>0,005</b>	<b>3,42</b>
30	1	2,84	0,004	1,08
	2	<b>8,90</b>	<b>0,002</b>	<b>5,52</b>

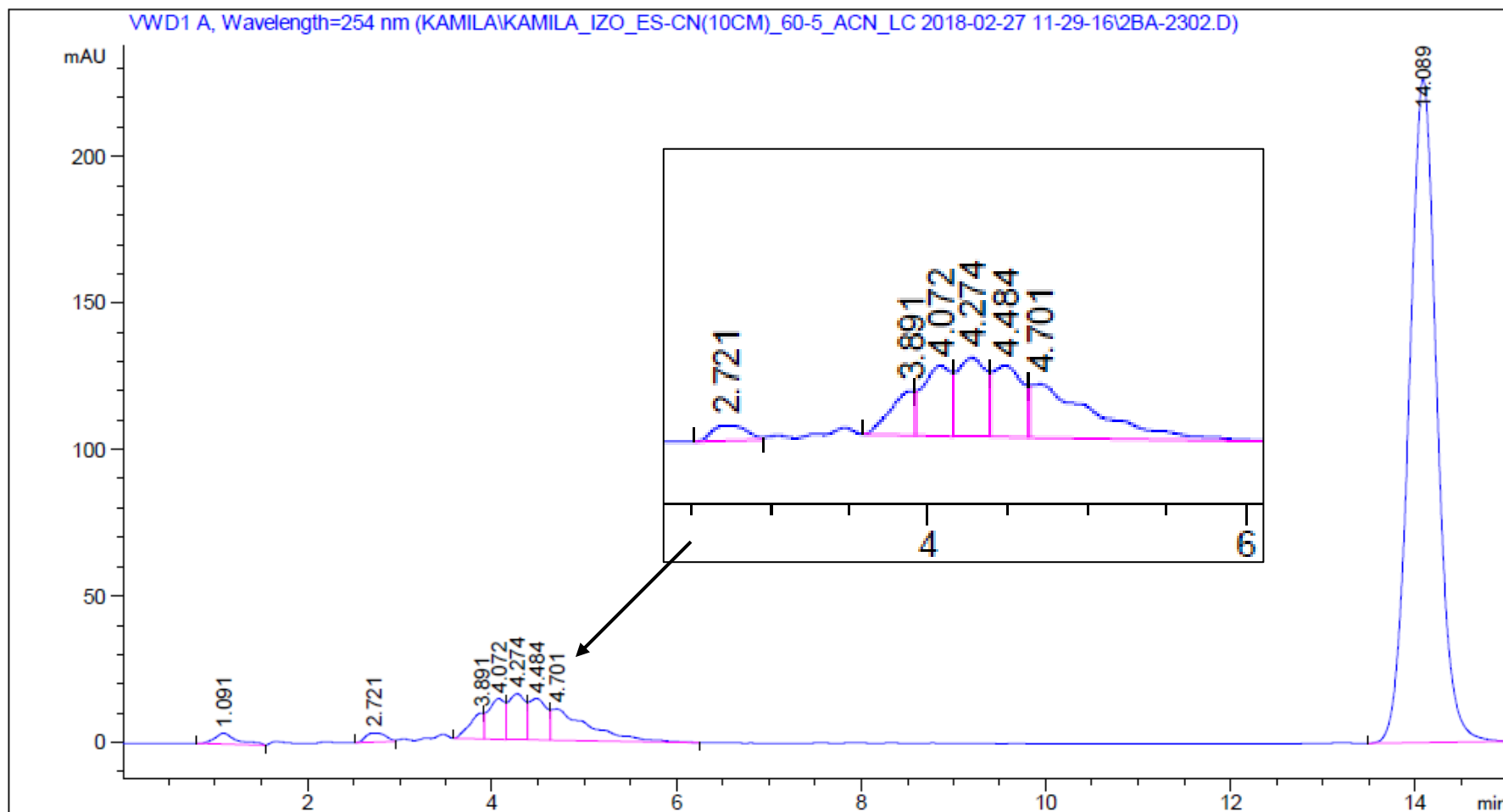


**Tabulka P 10:** Retenční časy a faktory PEG 400 (přípraveného postupem 2 s 50 µl PIC) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 60 obj. % ACN-voda 1,36 min (analýza byla provedena pro všechny 3 vzorky PEG 400 připravené postupem 2 viz kapitola 2.3.1, retenční časy byly vždy podobné, ovšem píky se při 10 a 5 obj. % ACN zobrazovaly jen v případě s 50 µl PIC)

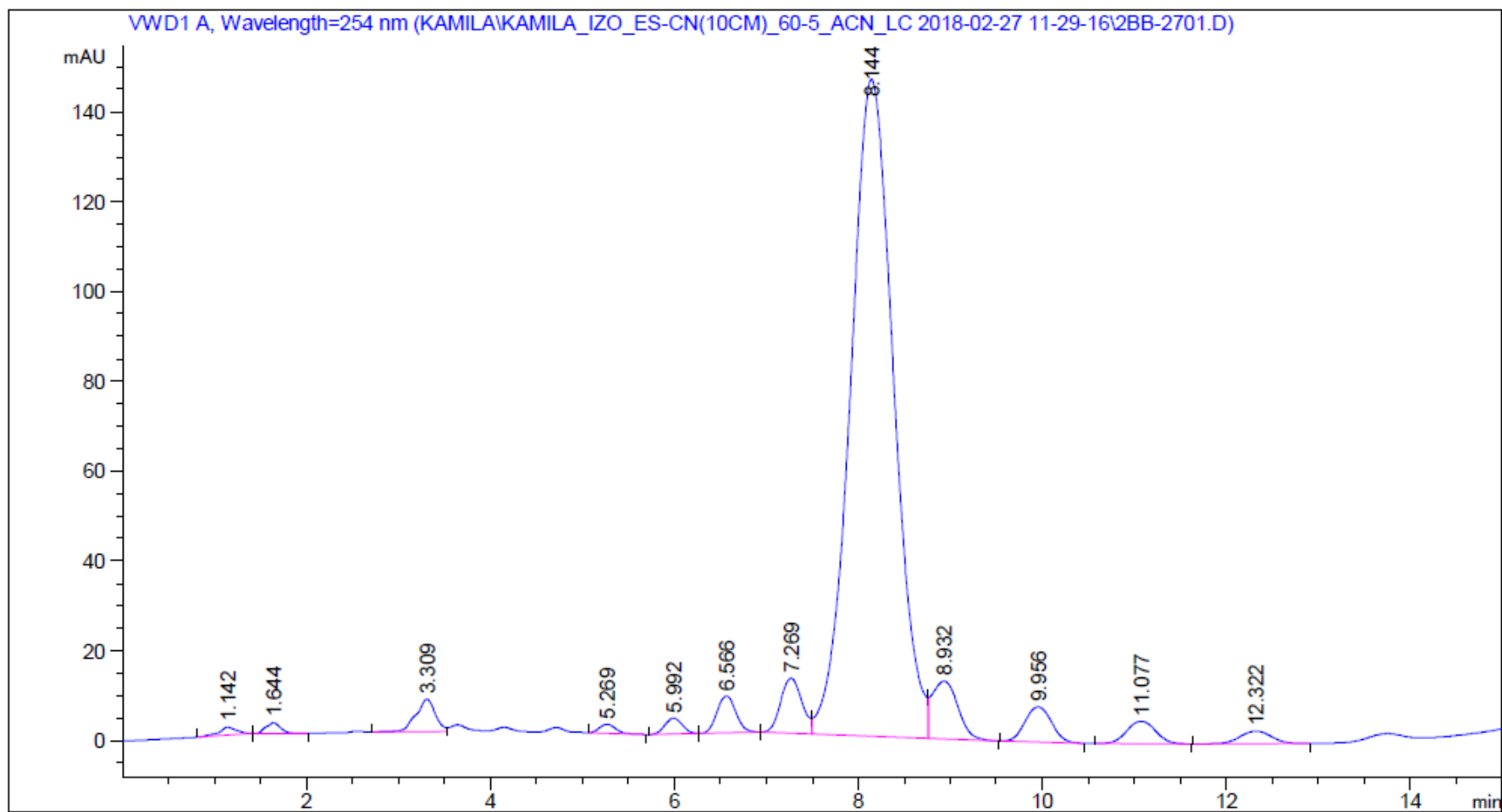
[ $t_R$  – retenční čas, / daný pík se na chromatogramu nezobrazoval, hodnoty vyznačené tučným písmem odpovídají nejvyššímu píku na chromatogramu]

P í k	25 obj. % ACN			20 obj. % ACN			15 obj. % ACN			10 obj. % ACN			5 obj. % ACN		
	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodat. odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodat. odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodat. odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodat. odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodat. odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )
1	2,74	0,002	1,01	3,29	0,025	1,41	4,17	0,000	2,05	1,74	0,000	0,28	1,76	0,002	0,29
2	4,07	0,005	1,98	6,48	0,088	3,75	4,51	0,000	2,31	5,09	0,007	2,73	7,03	0,001	4,15
3	4,26	0,004	2,13	<b>8,04</b>	<b>0,064</b>	<b>4,90</b>	8,50	0,213	5,23	5,55	0,005	3,07	<b>8,15</b>	<b>0,001</b>	<b>4,97</b>
4	4,47	0,002	2,28	9,81	0,115	6,19	<b>11,74</b>	<b>0,000</b>	<b>7,60</b>	<b>7,53</b>	<b>0,317</b>	<b>4,52</b>	/		
5	4,68	0,001	2,43	10,91	0,117	7,00	13,87	0,071	9,17	/					
6	<b>14,15</b>	<b>0,001</b>	<b>9,37</b>	/			/			/					

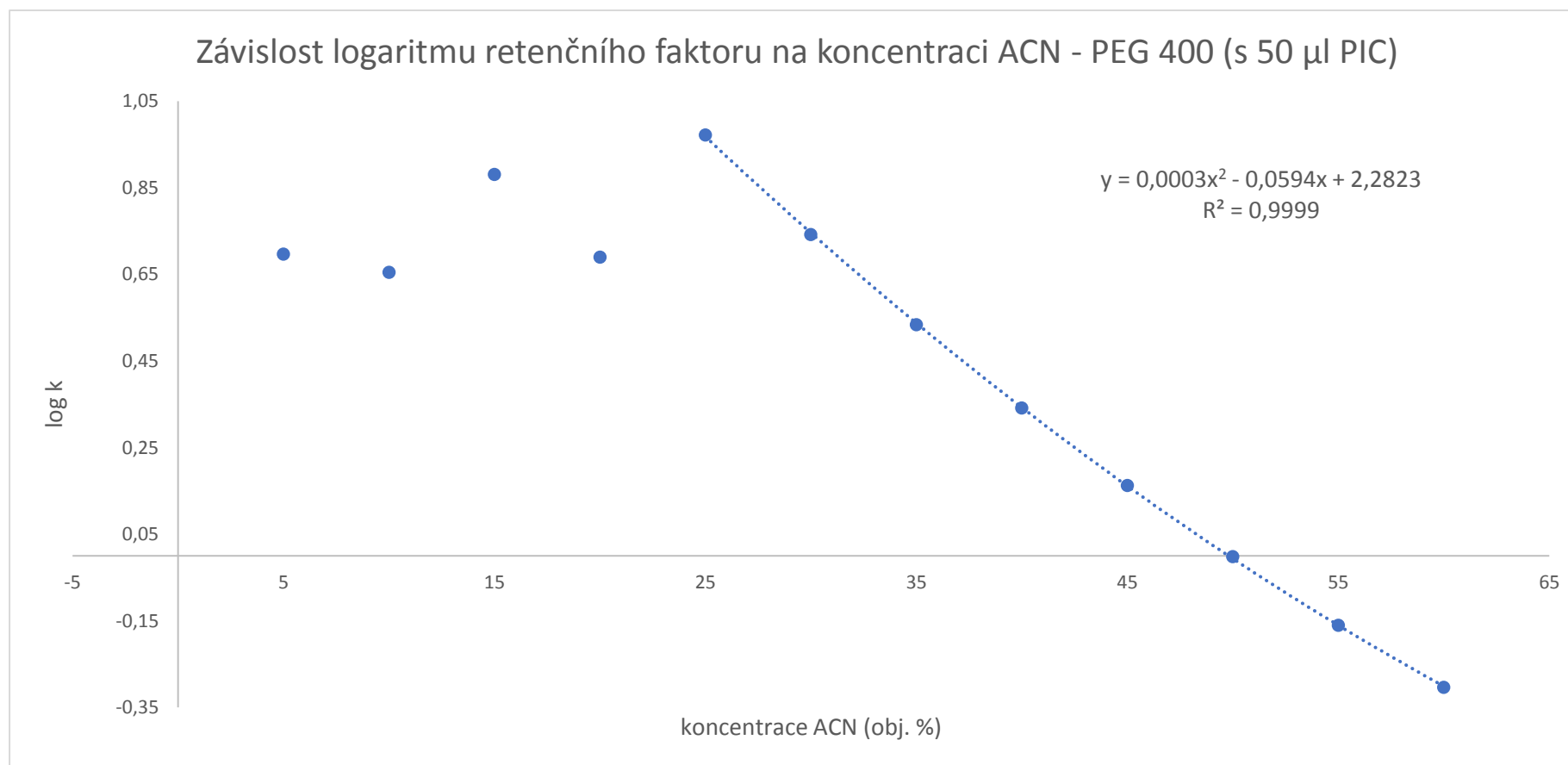
**Obrázek P 1:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 2 s 10 µl PIC, viz kapitola 2.3.1) při konstantní koncentraci 25 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 2:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 2 s 20  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při konstantní koncentraci 20 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7  $\mu$ m), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



**Graf P 9:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PEG 400 (pro nejvyšší pík na chromatogramu viz Tabulky P 9 a P 10) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express ES-CN (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých PEG 400 připravených postupem 2 (viz kapitola 2.3.1) jsou i tyto grafy totožné)



**Tabulka P 11:** Retenční časy a faktory PEG 400 (připraveného postupem 3 s 10  $\mu$ l PIC) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 80 obj. % ACN-voda 1,40 min (analýza byla provedena pro všechny 3 vzorky PEG 400 připravené postupem 3 viz kapitola 2.3.1, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [/ daný pik se na chromatogramu nezobrazoval, hodnoty vyznačené tučným písmem odpovídají nejvyššímu píku na chromatogramu]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
80	1	1,47	0,000	0,05
	2	<b>1,73</b>	<b>0,001</b>	<b>0,23</b>
75	1	1,47	0,001	0,05
	2	1,66	0,001	0,19
	3	<b>1,82</b>	<b>0,002</b>	<b>0,30</b>
70	1	1,48	0,000	0,06
	2	<b>1,96</b>	<b>0,001</b>	<b>0,40</b>
65	1	1,50	0,001	0,07
	2	<b>2,16</b>	<b>0,000</b>	<b>0,54</b>
60	1	1,54	0,000	0,10
	2	<b>2,43</b>	<b>0,002</b>	<b>0,74</b>
55	1	1,59	0,003	0,13
	2	1,96	0,004	0,40
	3	<b>2,85</b>	<b>0,002</b>	<b>1,04</b>
	4	3,33	0,004	1,38

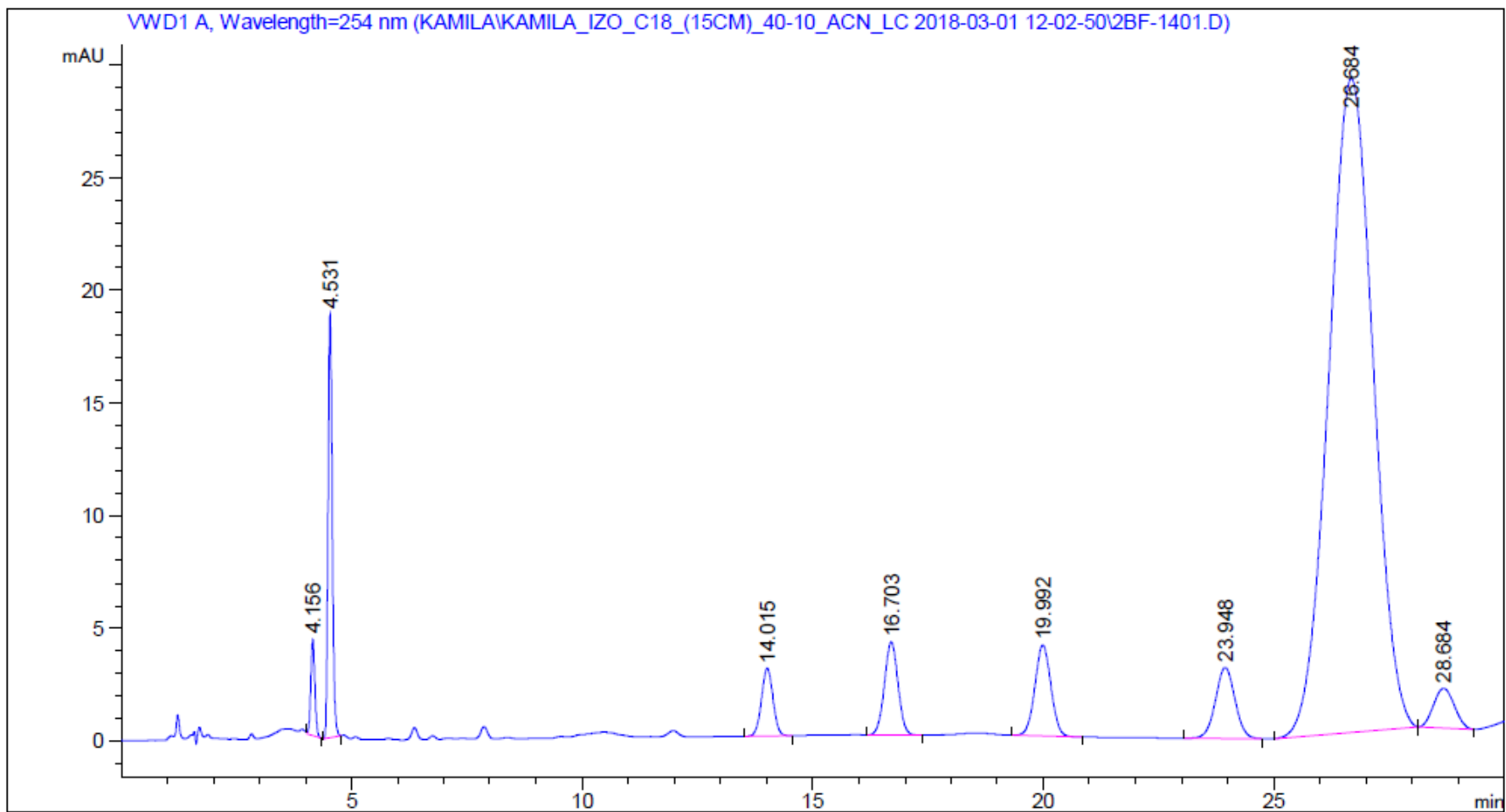
**Tabulka P 12:** Retenční časy a faktory PEG 400 (připraveného postupem 3 s 10 µl PIC) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 80 obj. % ACN-voda 1,40 min (analýza byla provedena pro všechny 3 vzorky PEG 400 připravené postupem 3 viz kapitola 2.3.1, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [ $t_R$  – retenční čas, / daný pik se na chromatogramu nezobrazoval, hodnoty vyznačené tučným písmem odpovídají nejvyššímu píku na chromatogramu]

Pík	50 obj. % ACN			45 obj. % ACN			40 obj. % ACN			35 obj. % ACN		
	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )
1	1,66	0,001	0,19	1,76	0,069	0,25	2,03	0,025	0,45	2,03	0,165	0,45
2	2,09	0,001	0,49	2,23	0,001	0,61	2,45	0,023	0,75	2,55	0,001	0,82
3	<b>3,50</b>	<b>0,006</b>	<b>1,50</b>	<b>4,56</b>	<b>0,005</b>	<b>2,26</b>	<b>6,31</b>	<b>0,098</b>	<b>3,51</b>	2,75	0,001	0,97
4	3,73	0,003	1,66	5,10	0,009	2,64	8,44	0,007	5,03	<b>9,59</b>	<b>0,001</b>	<b>5,85</b>
5	3,86	0,002	1,76	5,27	0,009	2,76	8,64	0,020	5,17	/		
6	3,99	0,001	1,85	5,44	0,008	2,89	8,86	0,025	5,33			
7	4,15	0,001	1,97	5,62	0,007	3,02	9,08	0,020	5,49			
8	4,49	0,004	2,20	6,65	0,005	3,75	9,30	0,020	5,64			

**Tabulka P 13:** Retenční časy a faktory PEG 400 (připraveného postupem 3 s 10 µl PIC) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 80 obj. % ACN-voda 1,40 min (analýza byla provedena pro všechny 3 vzorky PEG 400 připravené postupem 3 viz kapitola 2.3.1, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [ $t_R$  – retenční čas; / daný pik se na chromatogramu nezobrazoval; hodnoty vyznačené tučným písmem odpovídají nejvyššímu píku na chromatogramu; // retenční faktor ( $k$ ) nelze určit, neboť látky procházely kolonou bez zadržení, tzn. retenční časy vzorků byly nižší než mrtvý retenční čas kolony]

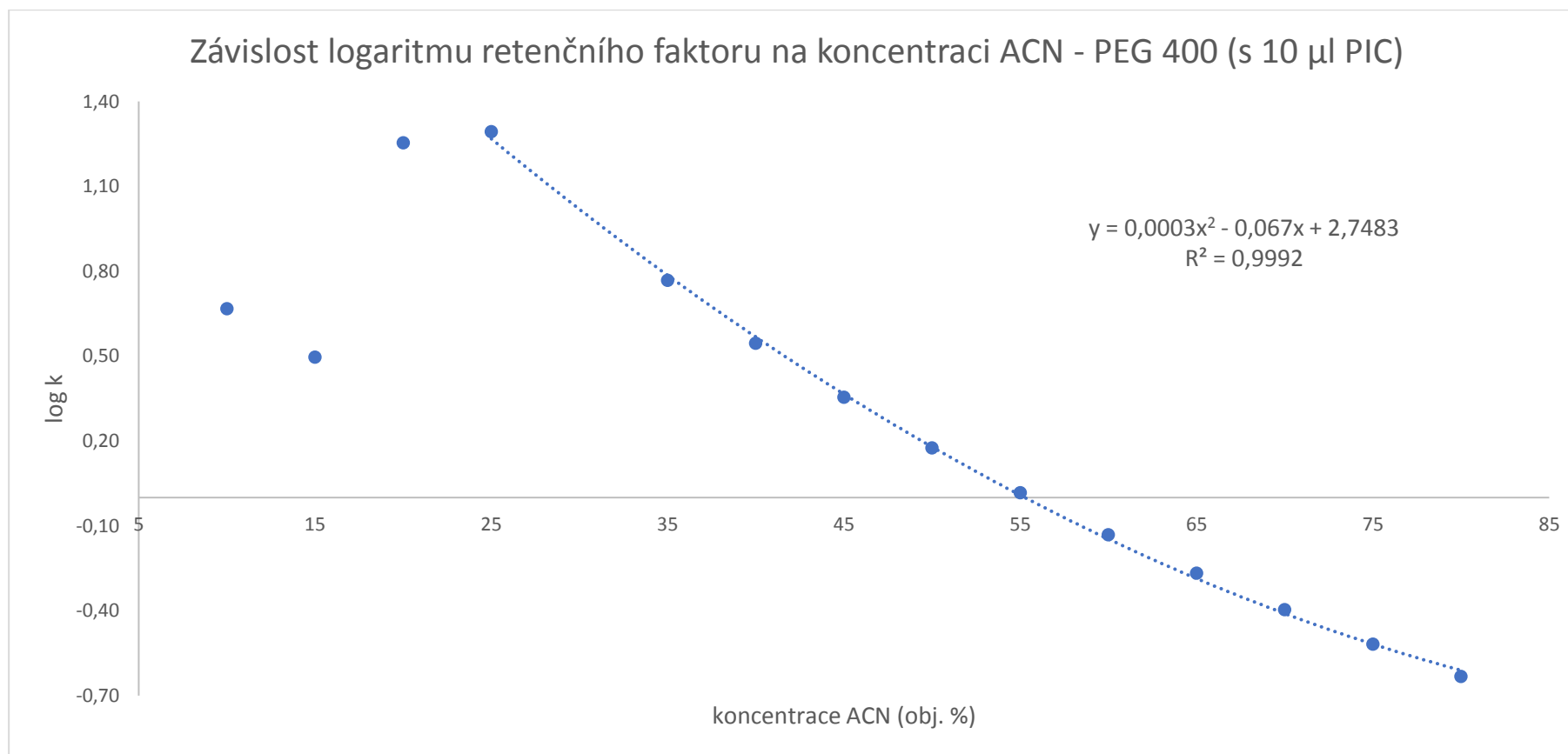
Pík	30 obj. % ACN			25 obj. % ACN			20 obj. % ACN			15 obj. % ACN			10 obj. % ACN		
	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )	Průměrný $t_R$ ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka $t_R$	Retenční faktor ( $k$ )
<b>1</b>	<b>0,23</b>	<b>0,128</b>	//	3,71	0,000	1,65	4,16	0,001	1,97	<b>5,79</b>	<b>0,001</b>	<b>3,13</b>	<b>7,90</b>	<b>0,002</b>	<b>4,64</b>
<b>2</b>	3,15	0,001	1,25	6,04	0,099	3,31	4,53	0,001	2,24	6,11	0,001	3,36	10,47	0,005	6,48
<b>3</b>	3,58	0,004	1,56	6,58	0,094	3,70	16,69	0,32	10,92	25,21	0,004	17,01	/		
<b>4</b>	3,86	0,005	1,76	7,21	0,098	4,15	<b>26,50</b>	<b>0,241</b>	<b>17,93</b>	/					
<b>5</b>	/			<b>28,86</b>	<b>0,223</b>	<b>19,62</b>	/								

**Obrázek P 3:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 3 s 20  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při konstantní koncentraci 20 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25  $^{\circ}$ C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm





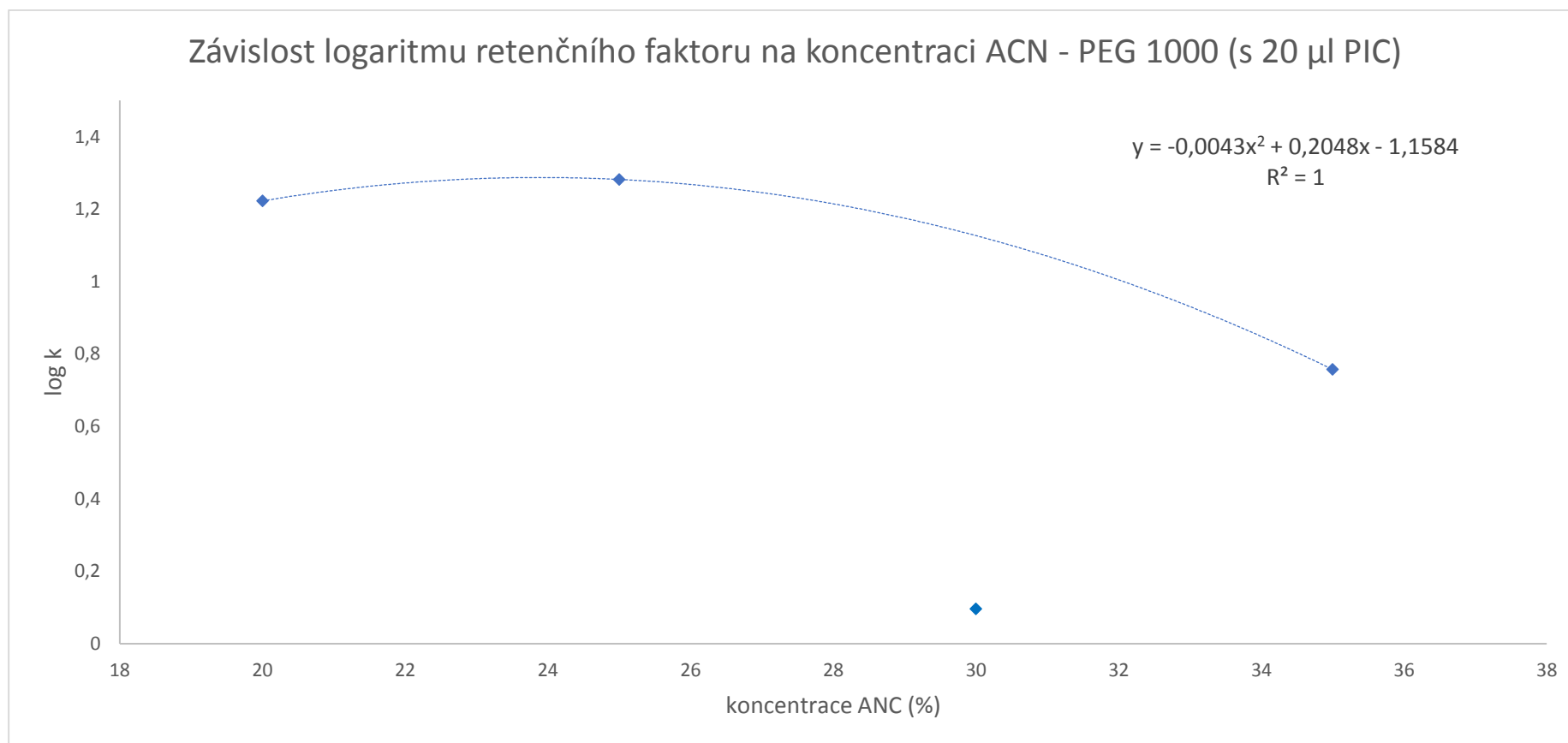
**Graf P 10:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PEG 400 (pro nejvyšší pík na chromatogramu viz Tabulky P 11 až P 13) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých PEG 400 připravených postupem 3 (viz kapitola 2.3.1) jsou i tyto grafy totožné)



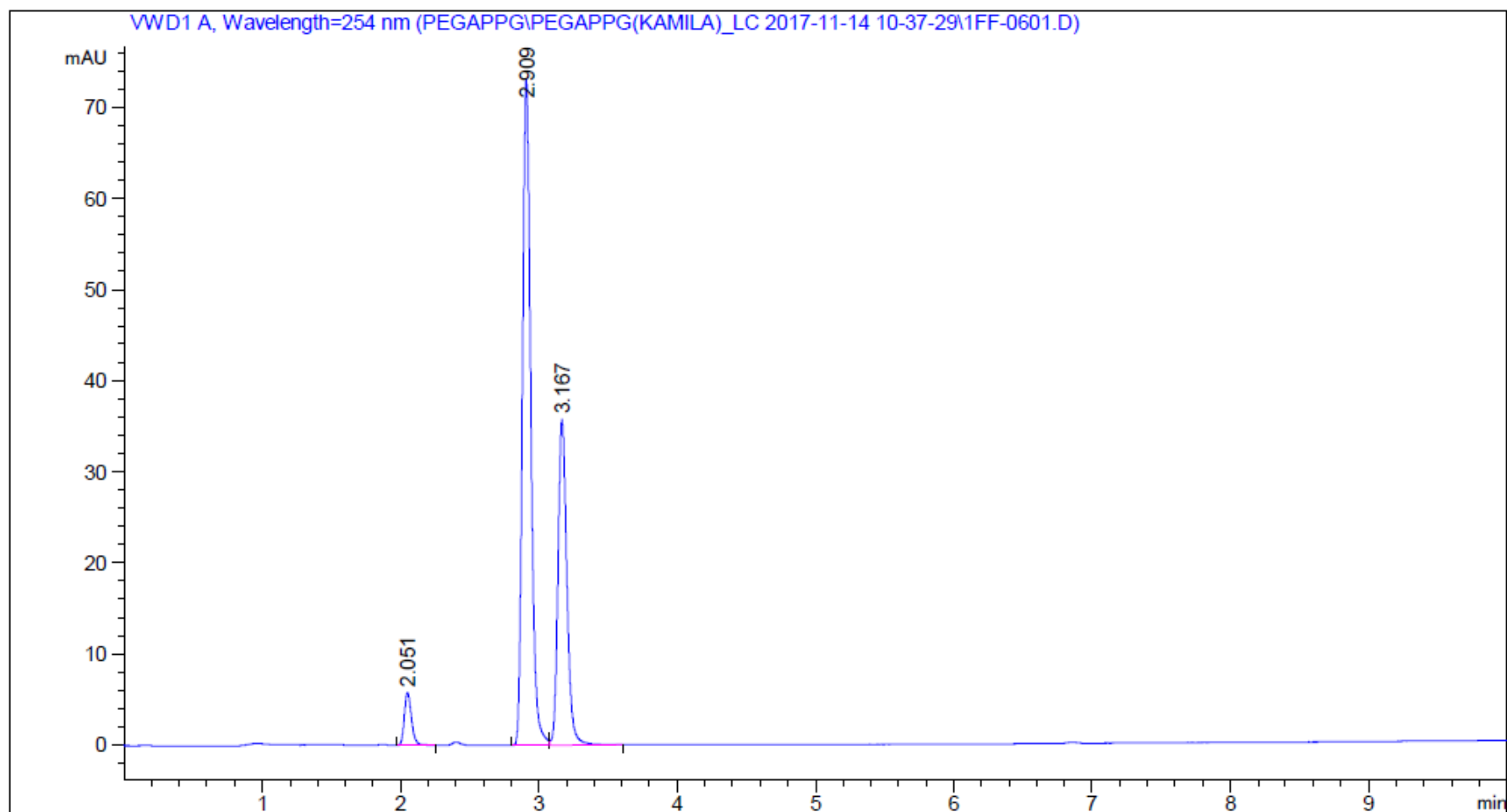
**Tabulka P 14:** Retenční časy a faktory PEG 1000 (připraveného postupem 3 s 20  $\mu$ l PIC) při různých koncentracích při izokratické eluci na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m), dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm, mrtvý retenční čas kolony byl při 80 obj. % ACN-voda 1,40 min (analýza byla provedena pro všechny zbývající polyoly připravené postupem 3 s 20  $\mu$ l PIC viz kapitola 2.3.1, retenční časy byly ovšem vždy stejné) [hodnoty vyznačené tučným písmem odpovídají nejvyššímu píku na chromatogramu]

Koncentrace ACN [obj. %]	Pík	Průměrný retenční čas ze 2 měření [min]	Směrodatná odchylka retenčního času	Retenční faktor ( <i>k</i> )
35	1	2,76	0,001	0,97
	2	3,20	0,001	1,28
	3	<b>9,40</b>	<b>0,004</b>	<b>5,72</b>
30	1	2,53	0,003	0,80
	2	<b>3,15</b>	<b>0,003</b>	<b>1,25</b>
	3	6,30	0,158	3,50
25	1	3,69	0,005	1,63
	2	<b>28,19</b>	<b>0,035</b>	<b>19,14</b>
20	1	3,99	0,005	1,85
	2	4,48	0,004	2,20
	3	<b>24,77</b>	<b>0,049</b>	<b>16,69</b>

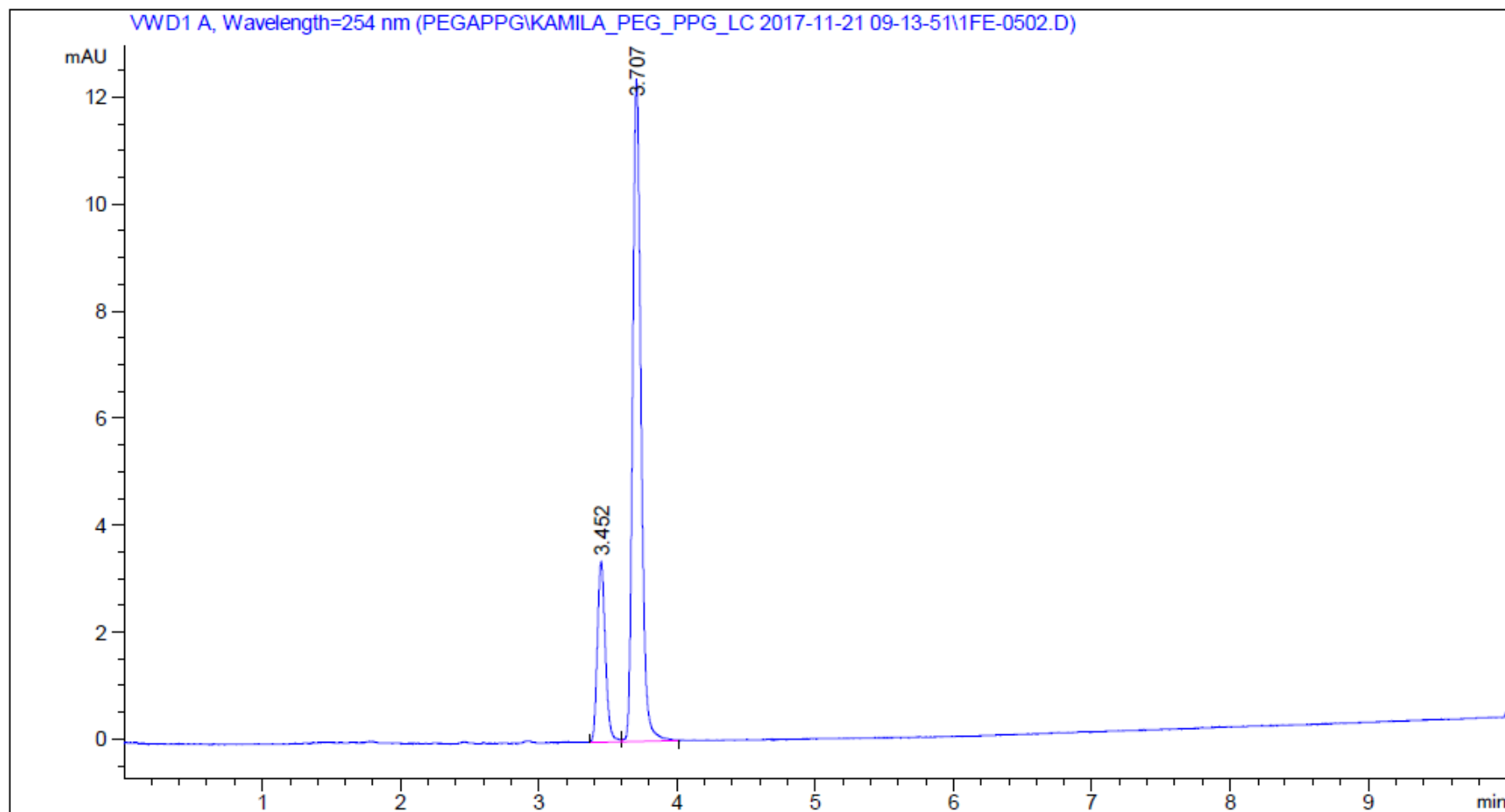
**Graf P 11:** Závislost logaritmu retenčního faktoru PEG 1000 (pro nejvyšší pík na chromatogramu viz Tabulka P 14) na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi během izokratické eluce na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5 µm), dávkovaný objem vzorku 1 µl, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm (vzhledem k srovnatelným retenčním faktorům jednotlivých polyolům připravených postupem 3 (viz kapitola 2.3.1 s 20 µl PIC) jsou i tyto grafy totožné)



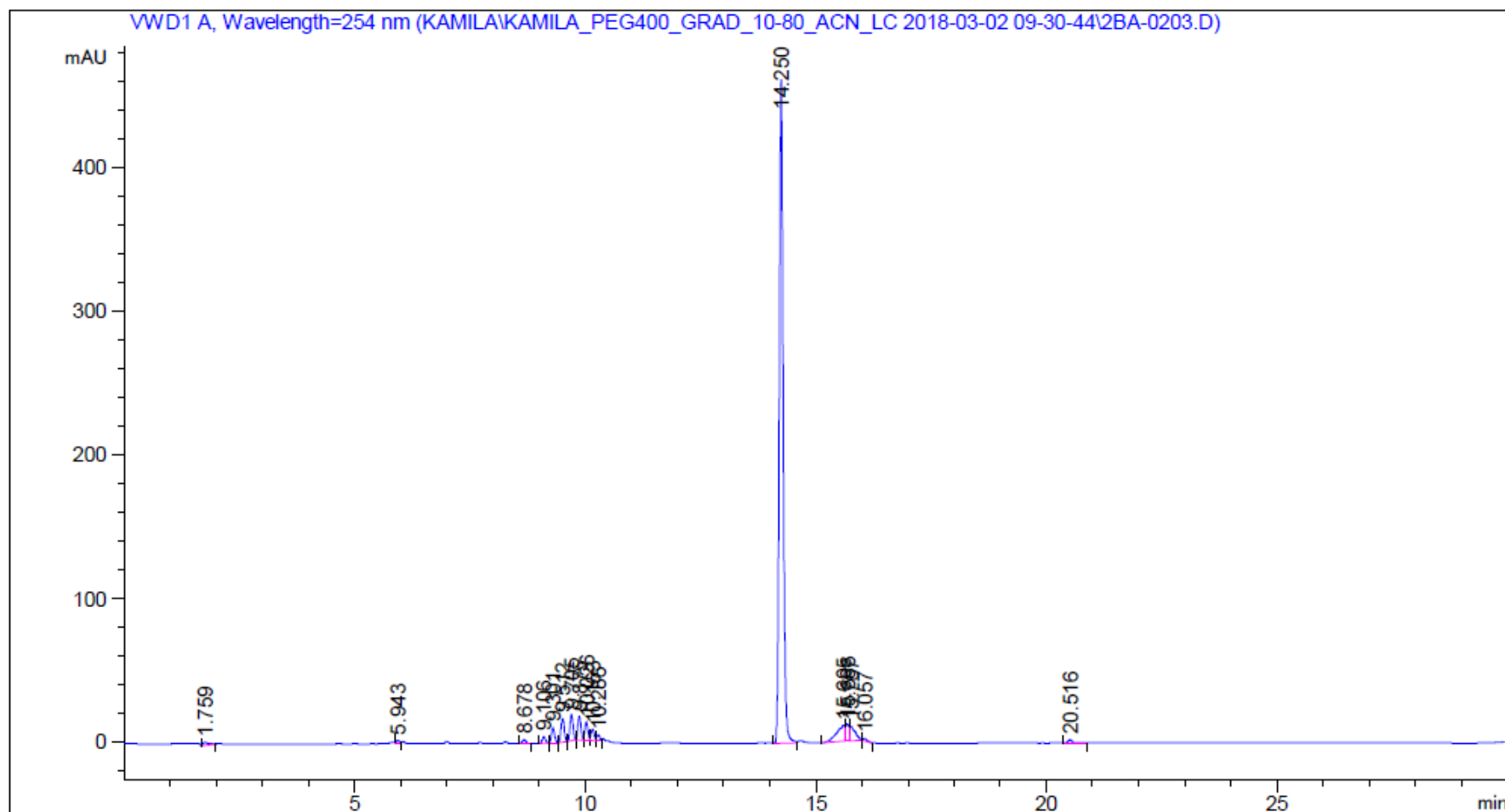
**Obrázek P 4:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 1000 (připraveného postupem 1, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci od 50 do 100 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25  $^{\circ}$ C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



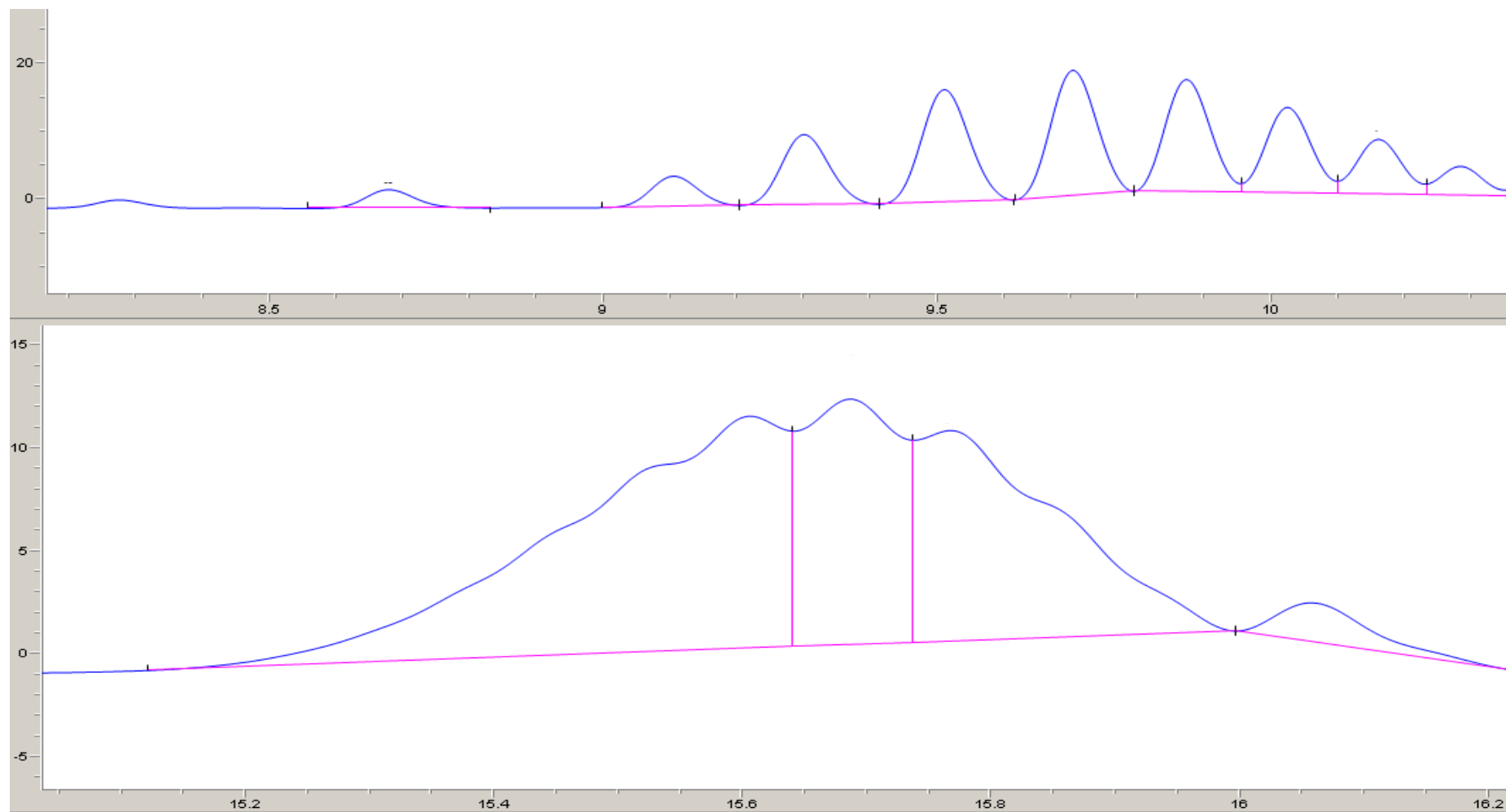
**Obrázek P 5:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 800 (přípraveného postupem 1, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci od 50 do 100 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C8 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,7  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, teplota kolony 25  $^{\circ}\text{C}$ , detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



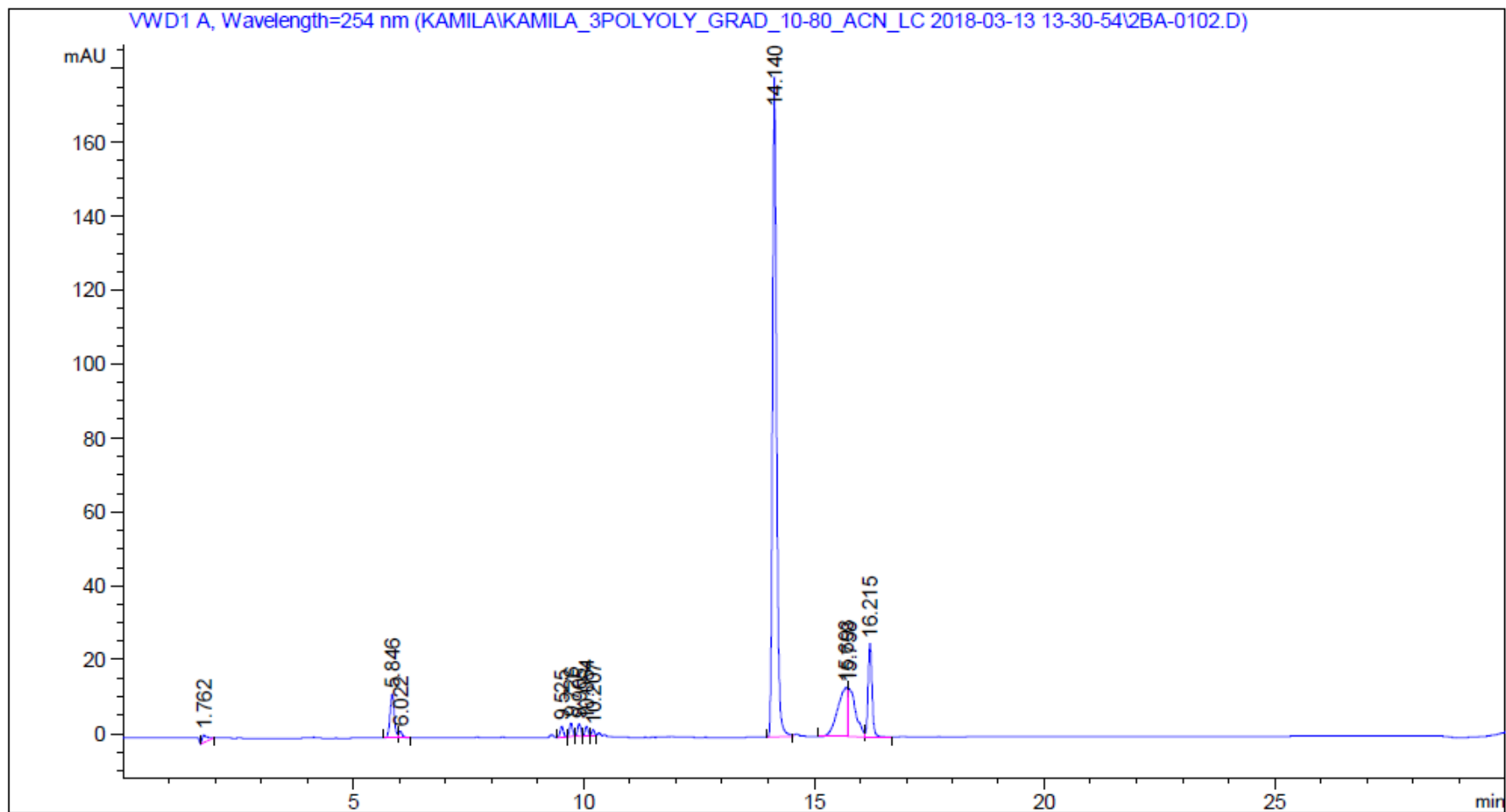
**Obrázek P 6:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (připraveného postupem 2 s 10  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 7:** Detailní záběr chromatogramu (Obrázek P 6) zaznamenaného při separaci PEG 400 (připraveného postupem 2, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25  $^{\circ}\text{C}$ , detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

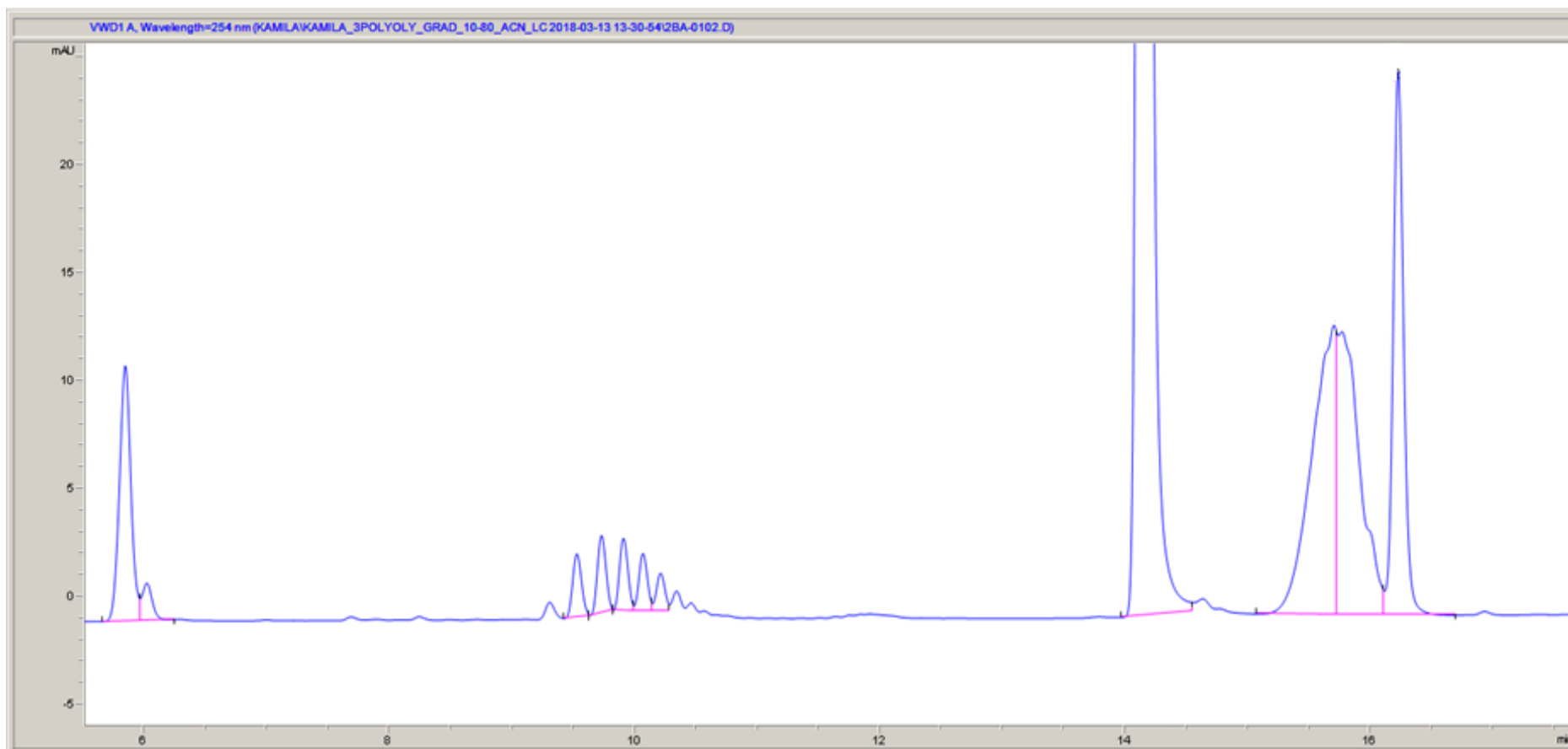


**Obrázek P 8:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (připraveného postupem 3 s 10  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

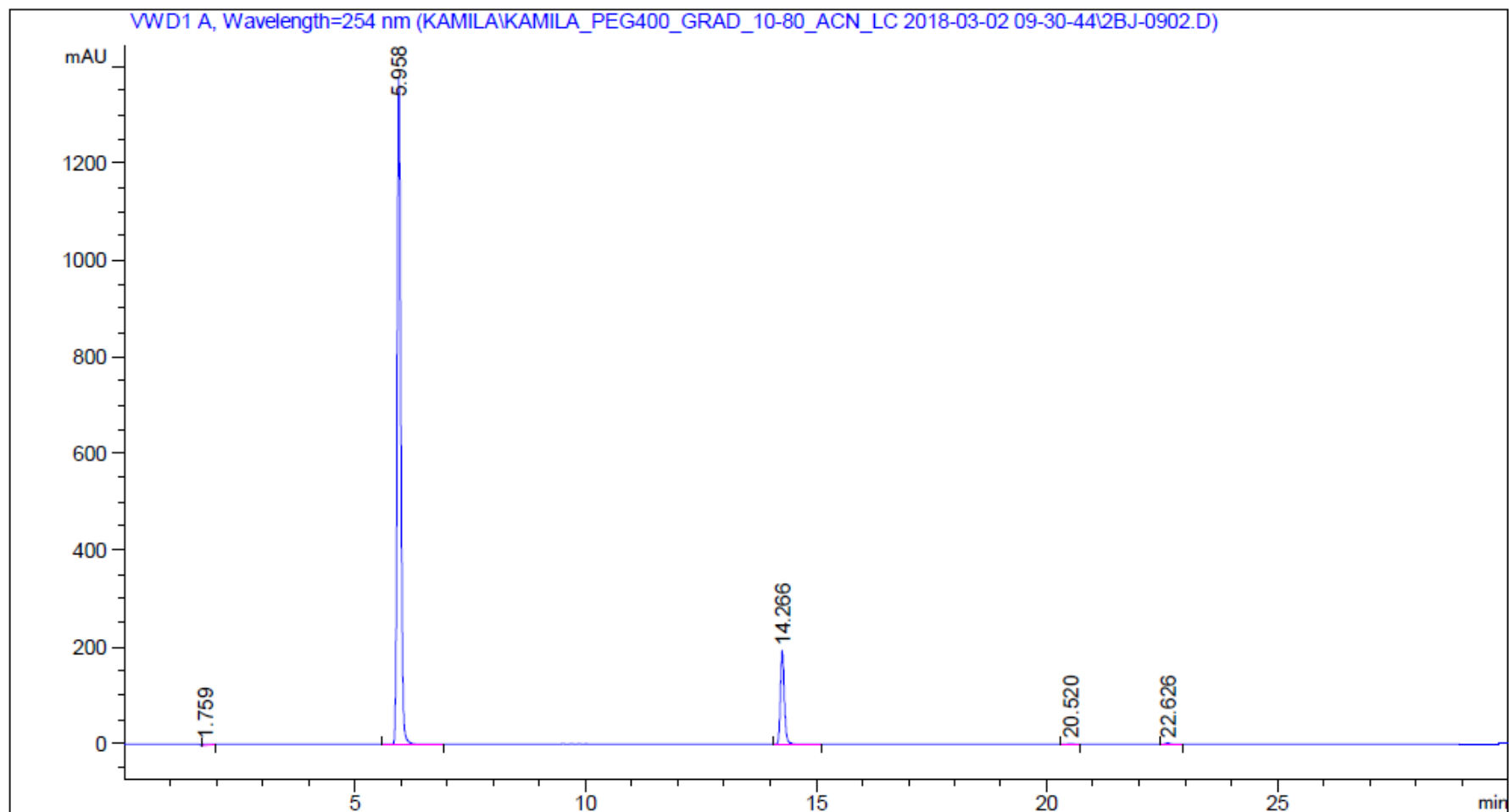




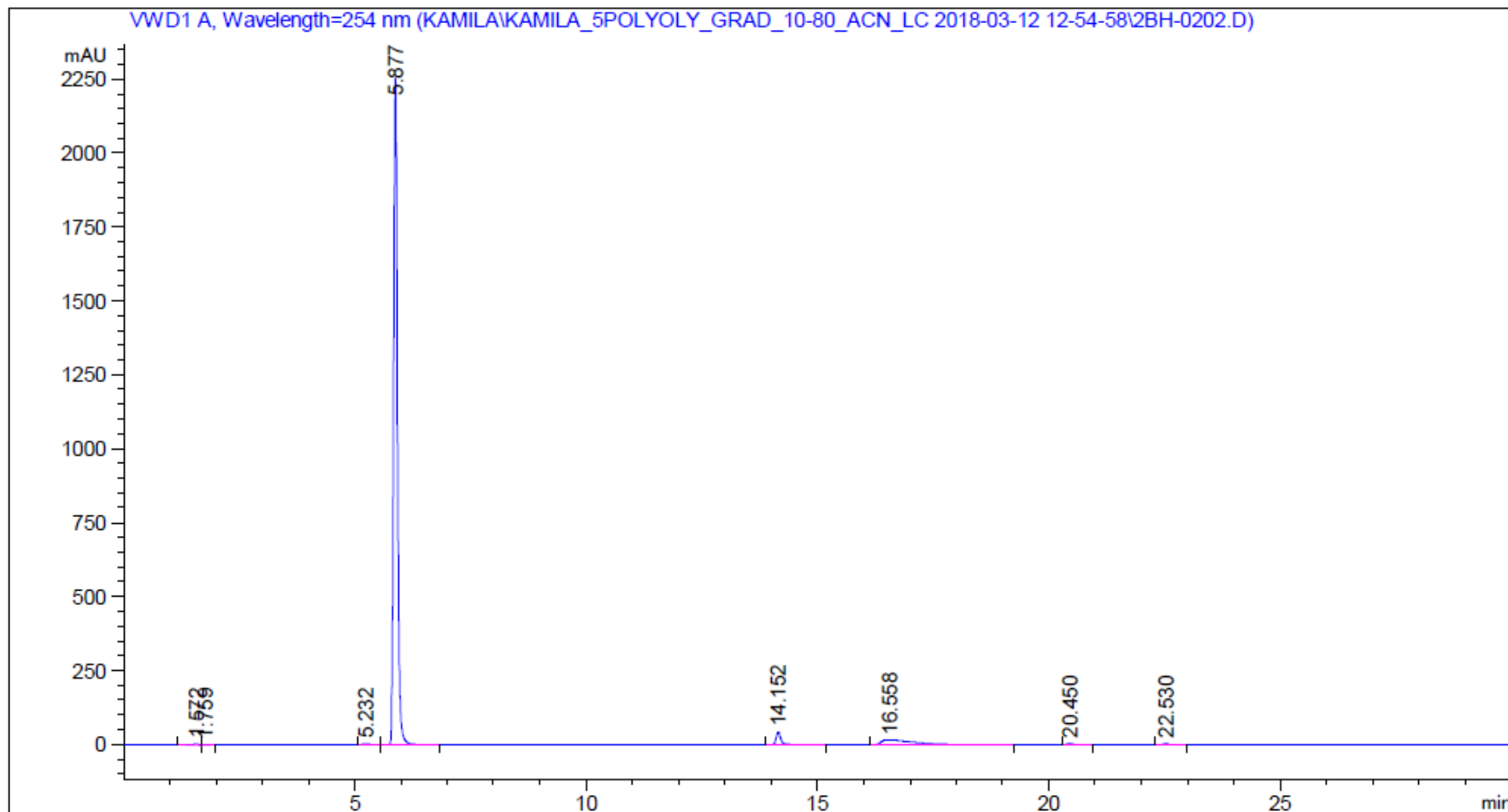
**Obrázek P 9:** Detailní záběr chromatogramu (Obrázek P 8) zaznamenaného při separaci PEG 400 (připraveného postupem 3 s 10  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



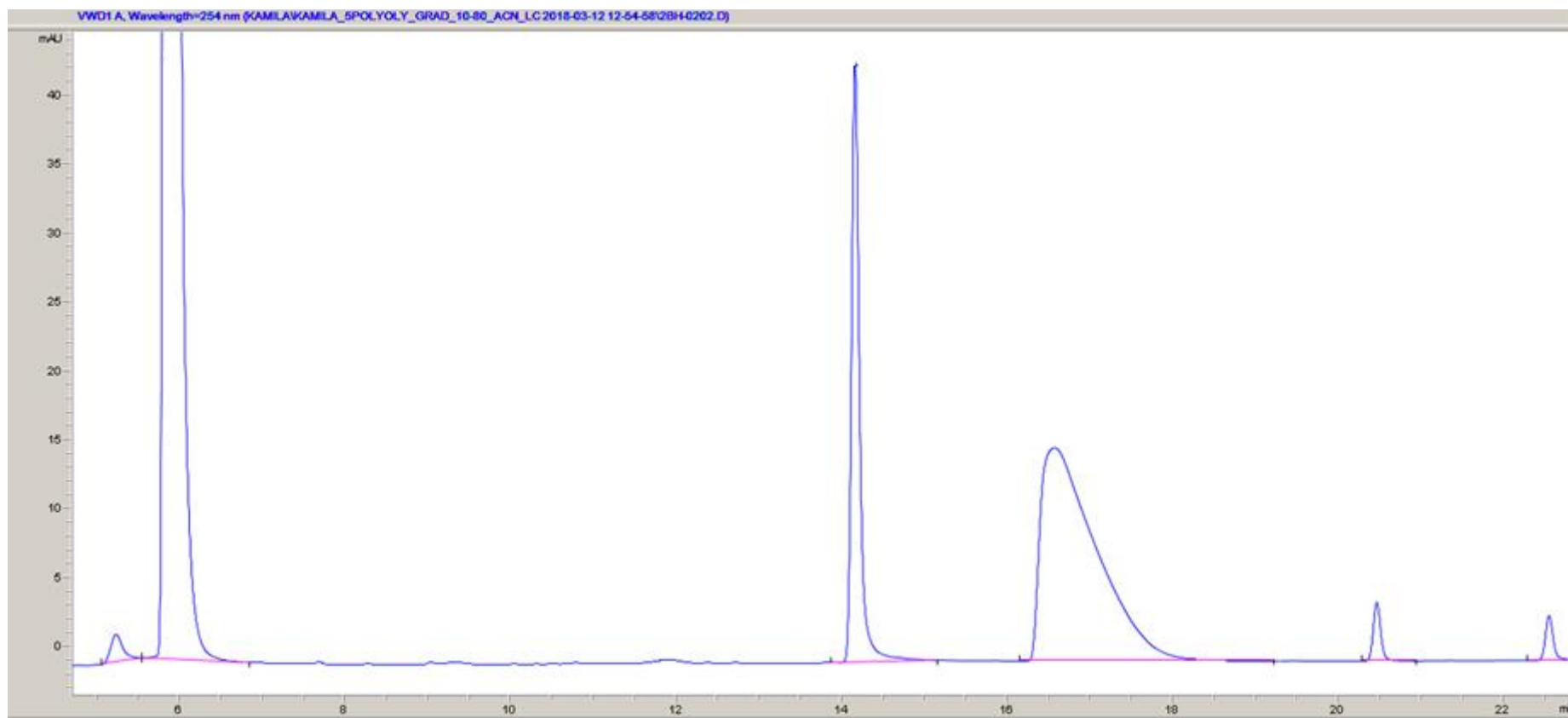
**Obrázek P 10:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (připraveného postupem 4 s 20  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



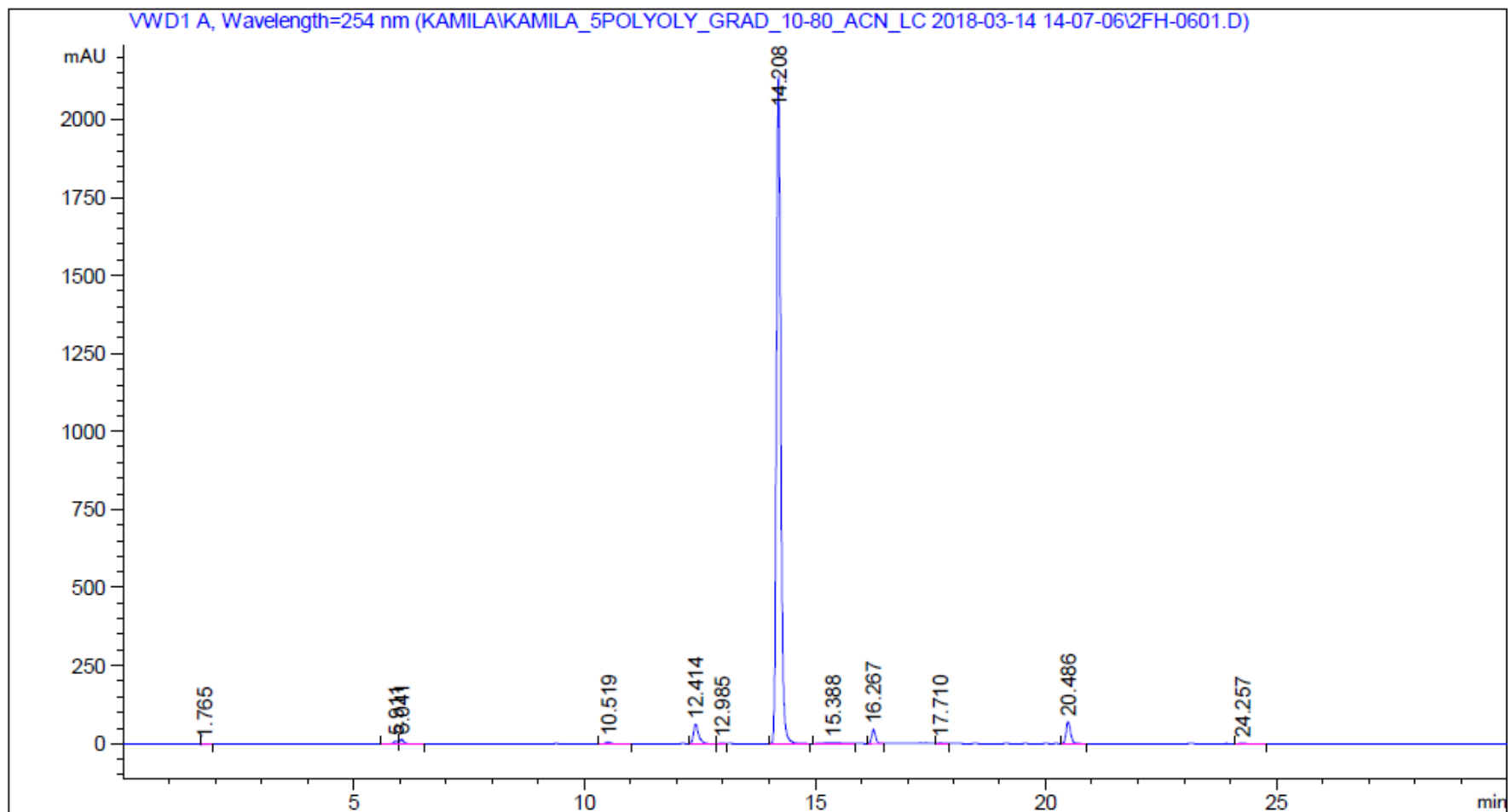
**Obrázek P 11:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (připraveného postupem 5 s 20  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



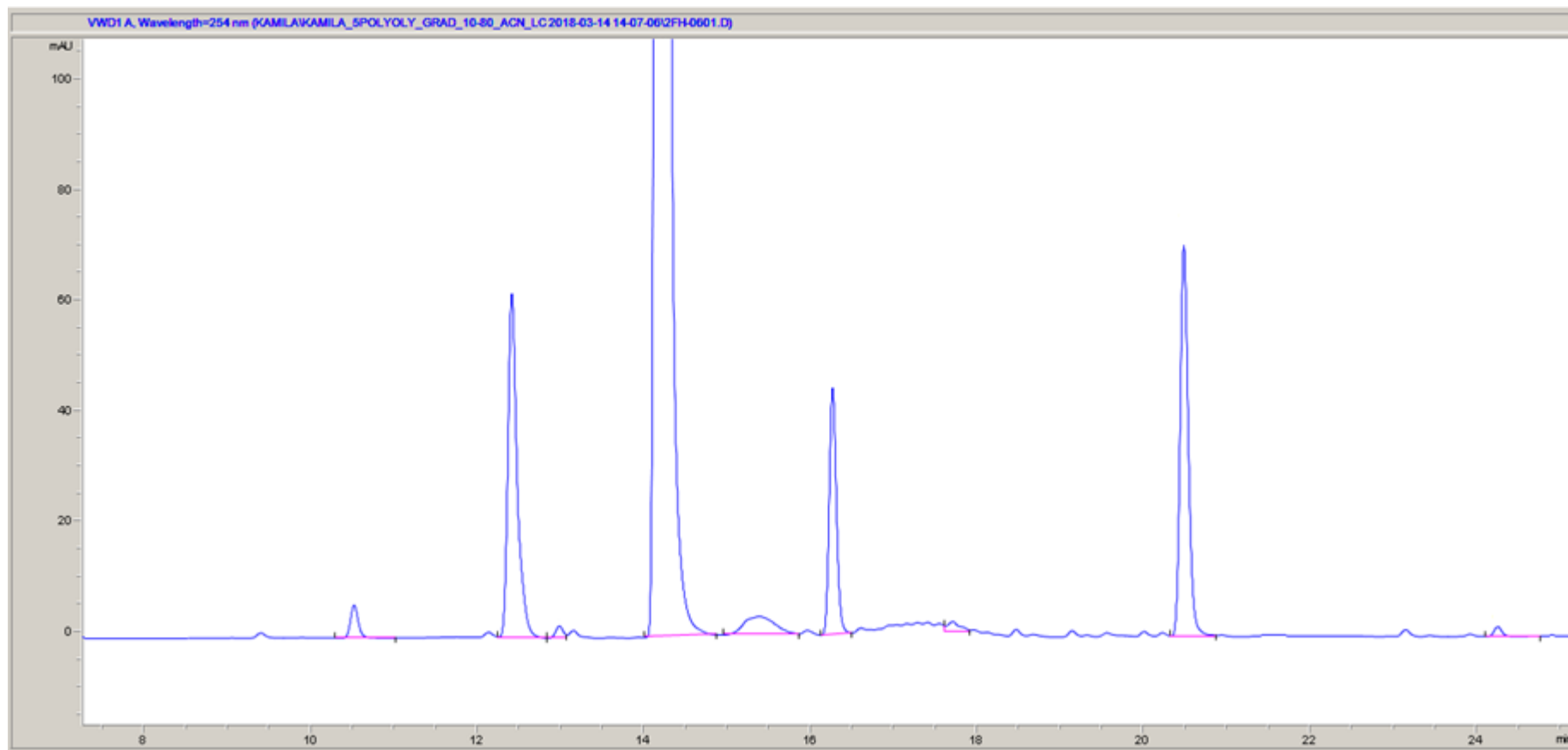
**Obrázek P 12:** Detailní záběr chromatogramu (Obrázek P 11) zaznamenaného při separaci PEG 400 (připraveného postupem 5, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



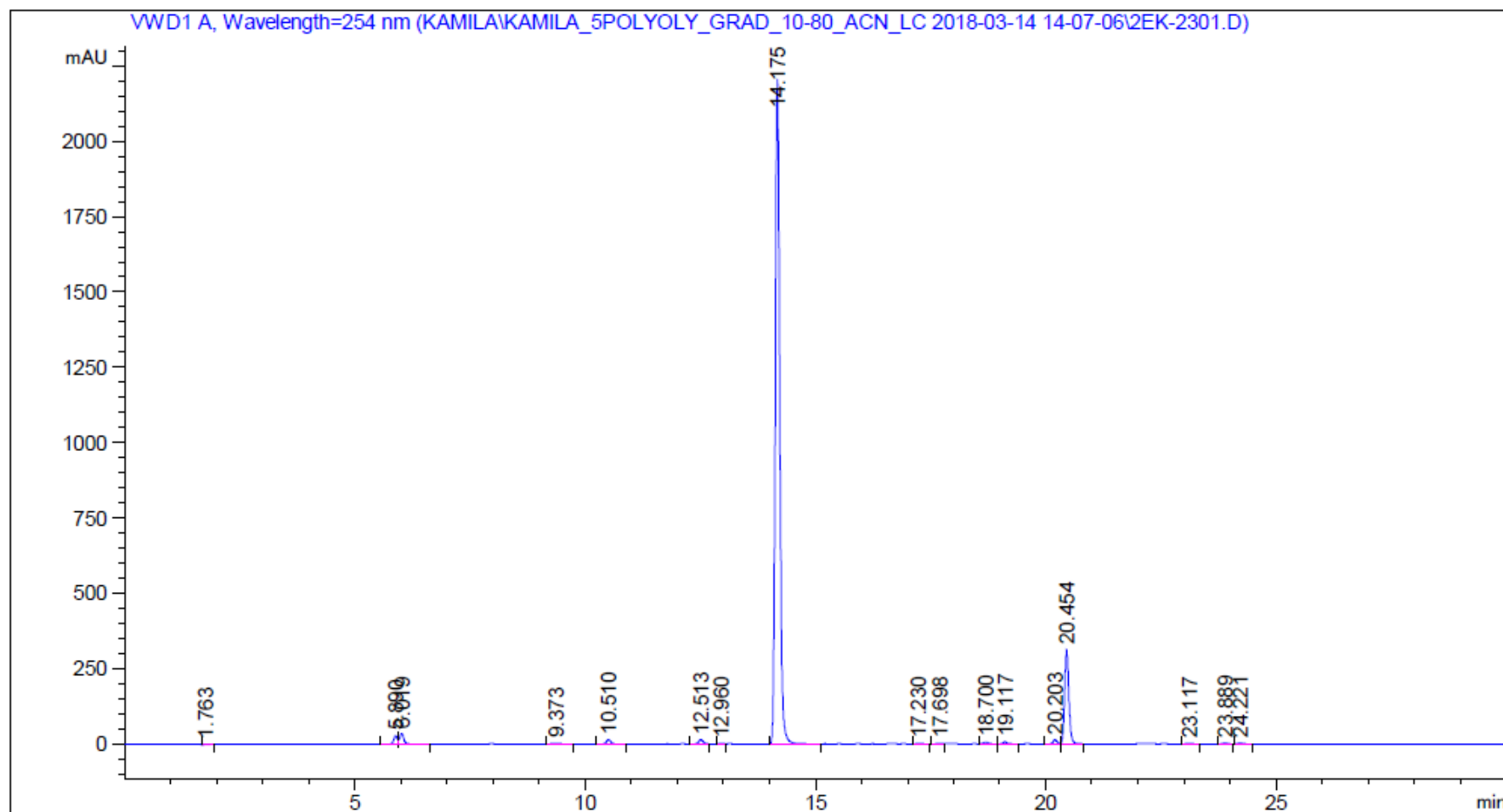
**Obrázek P 13:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 600 (připraveného postupem 6 s 50  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



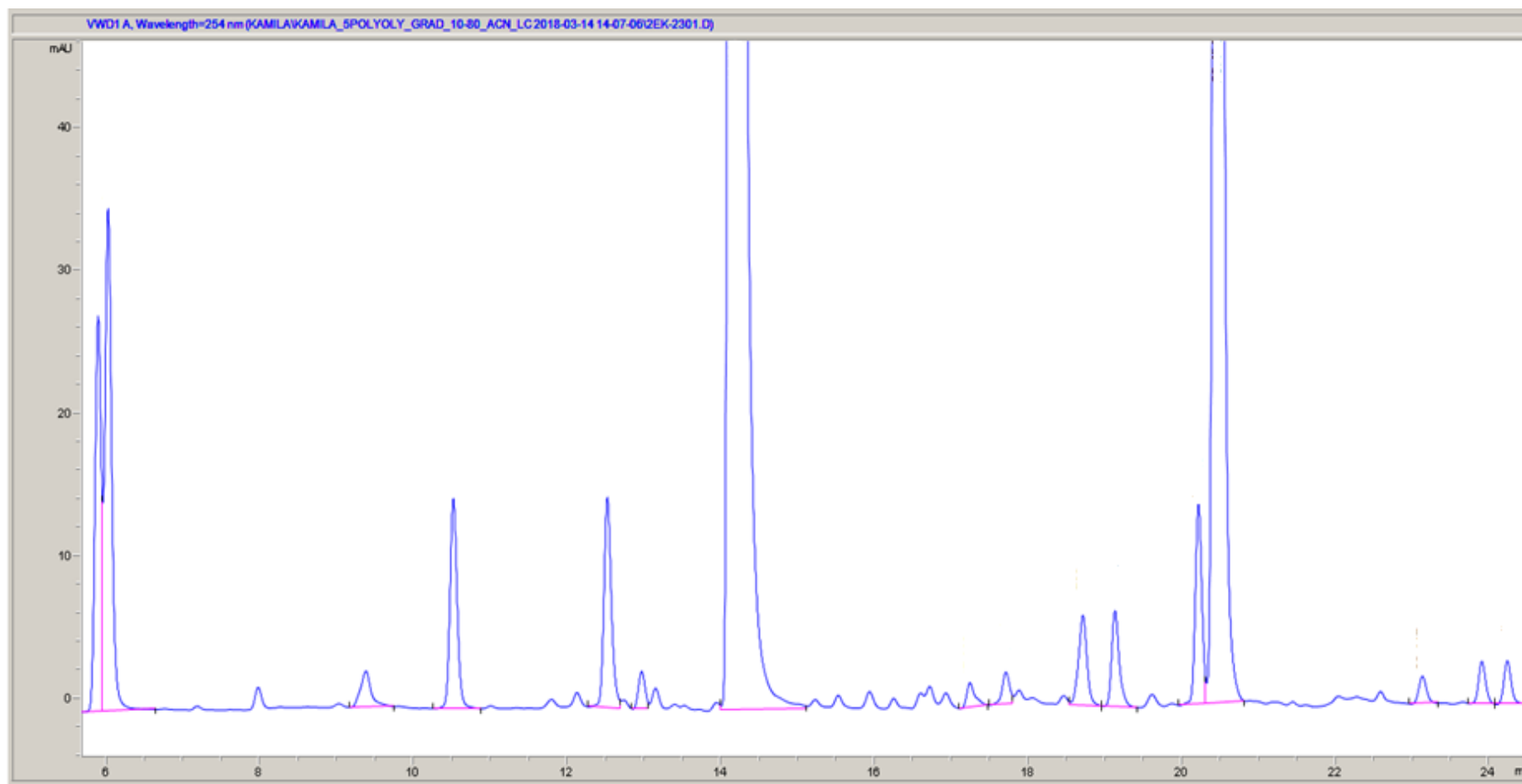
**Obrázek P 14:** Detailní záběr chromatogramu (Obrázek P 13) zaznamenaného při separaci PEG 600 (přípraveného postupem 6 s 50  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 15:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 4000 (přípraveného postupem 6 s 20  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

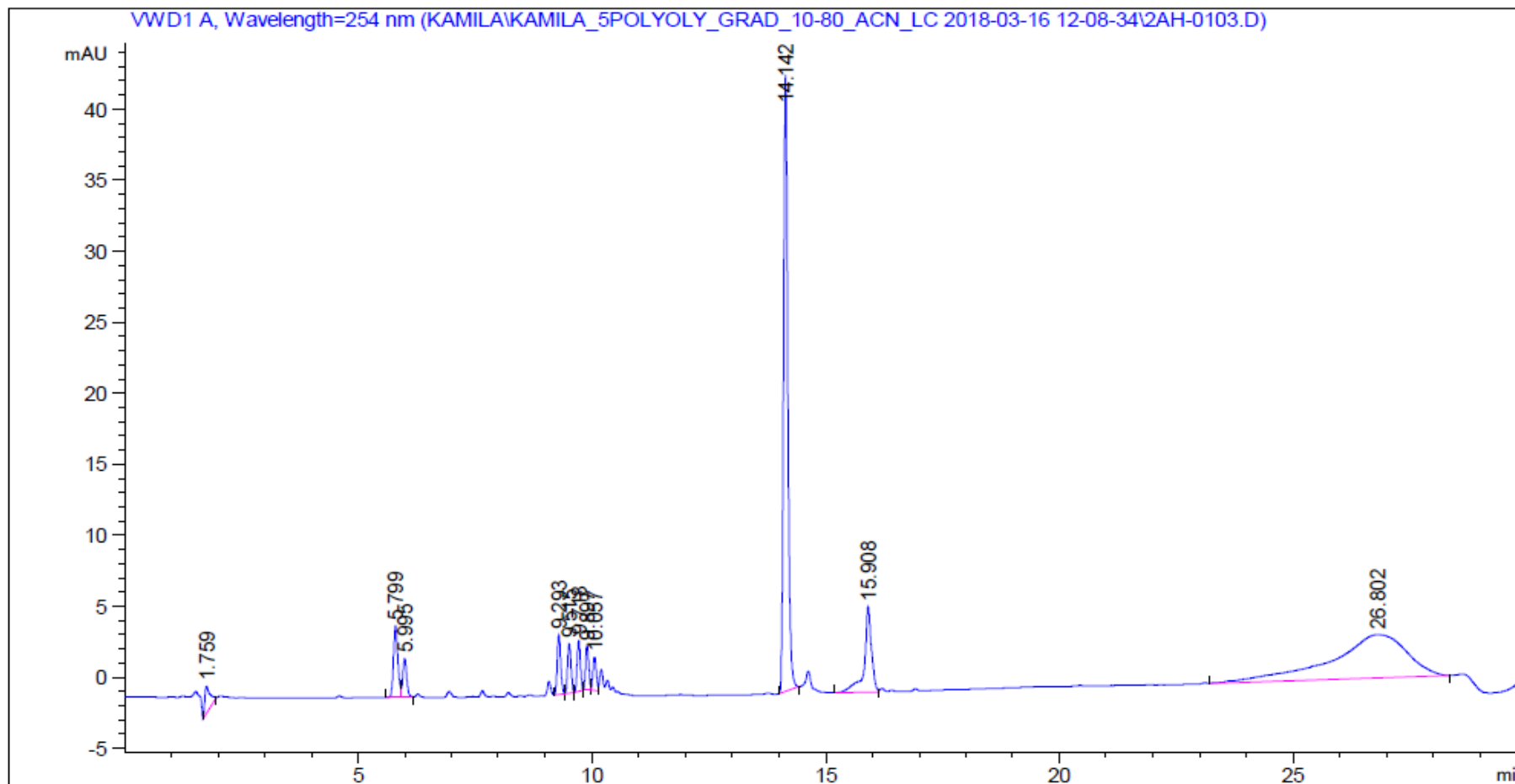


**Obrázek P 16:** Detailní záběr chromatogramu (Obrázek P 15) zaznamenaného při separaci PPG 4000 (připraveného postupem 6 s 20  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

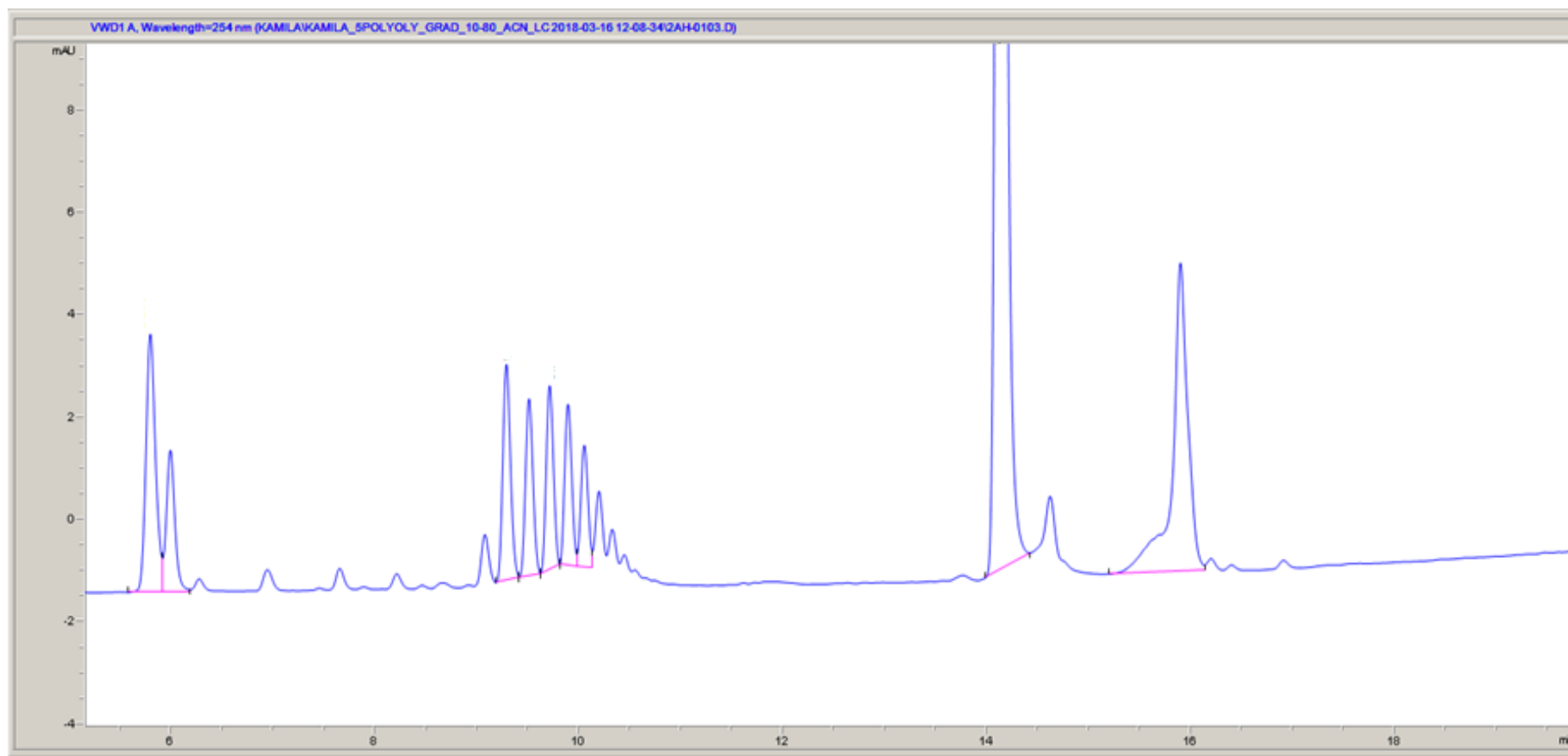




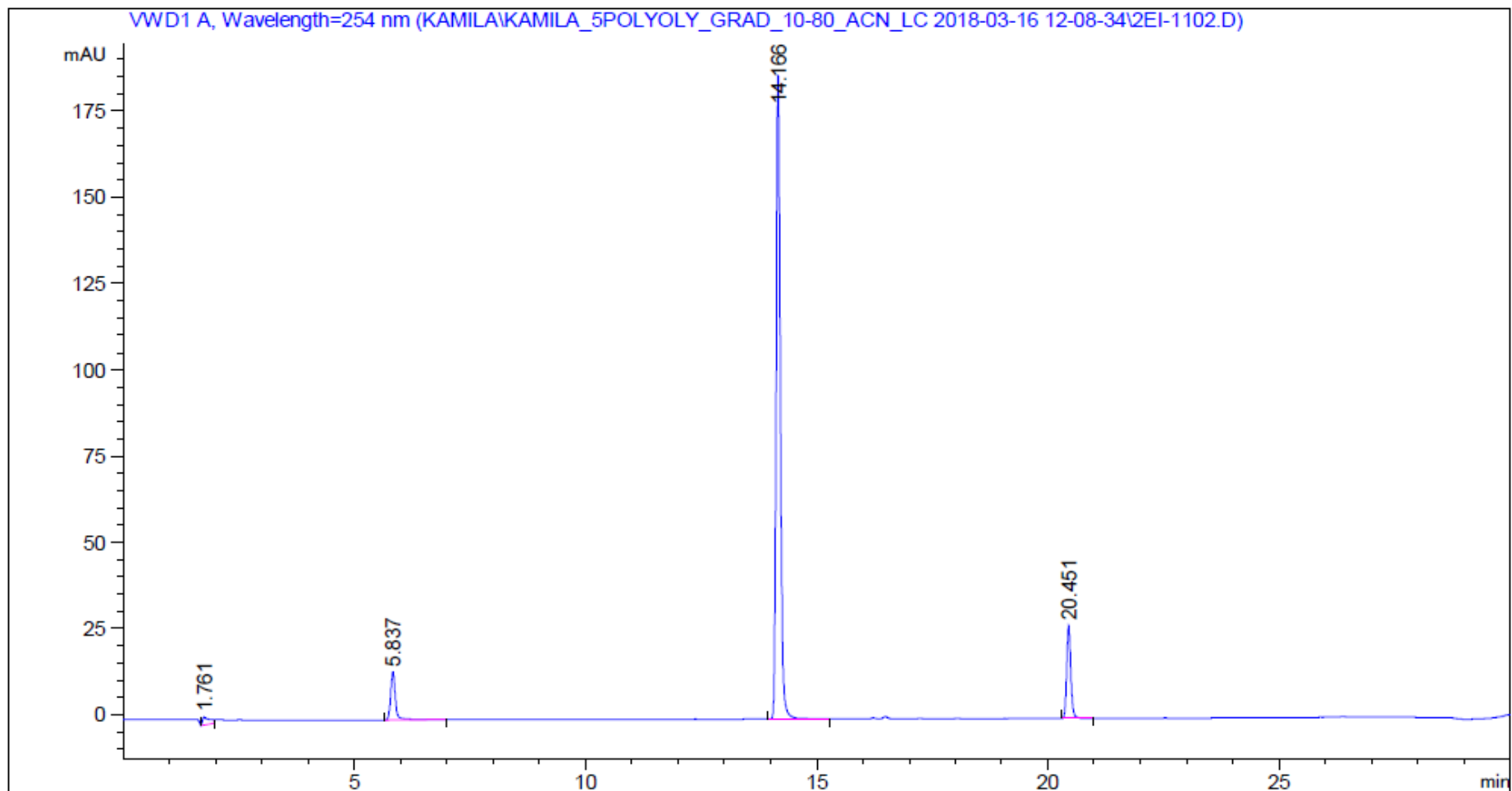
**Obrázek P 17:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 7 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



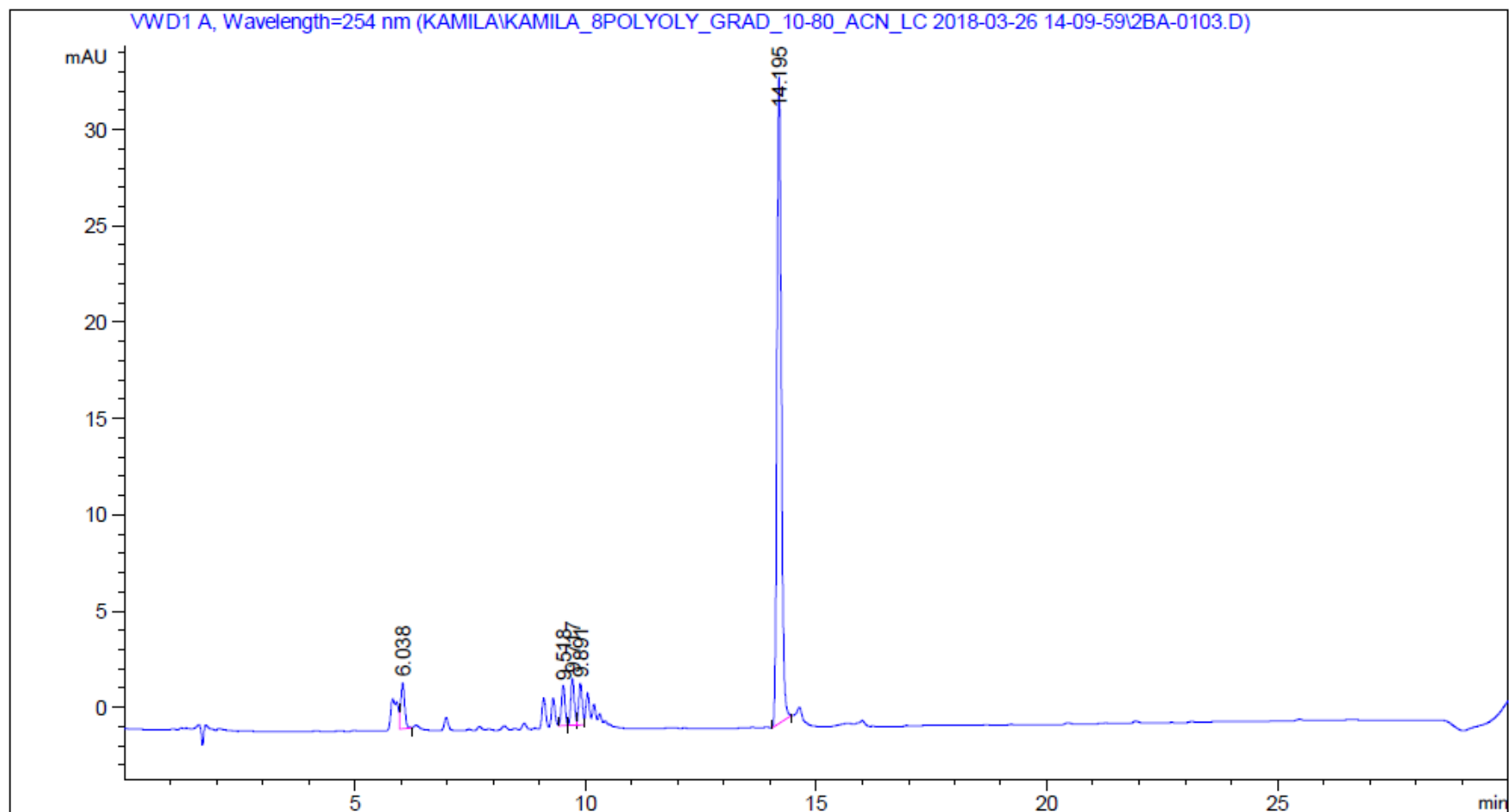
**Obrázek P 18:** Detailní záznam chromatogramu (Obrázek P 17) zaznamenaného při separaci PEG 400 (připraveného postupem 7 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



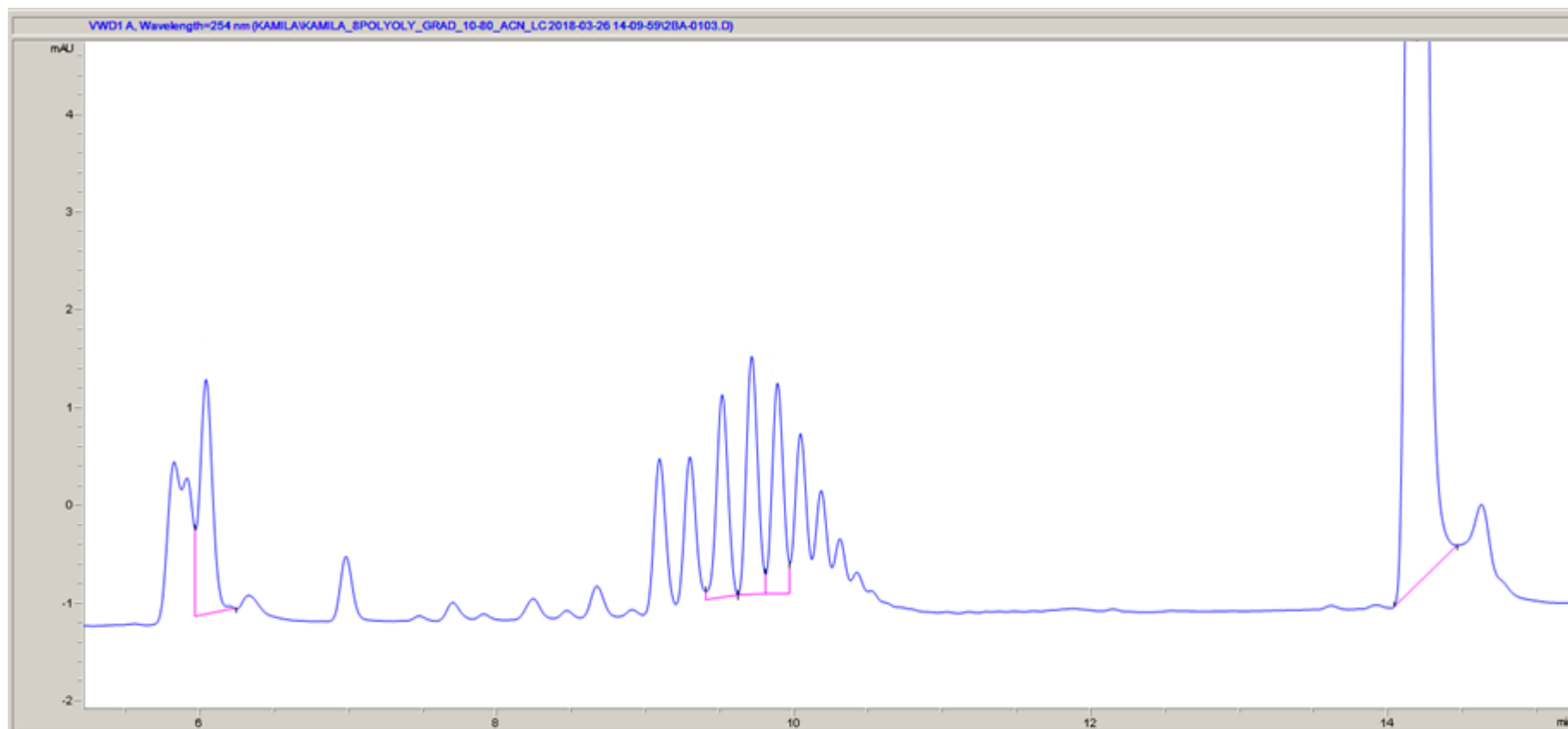
**Obrázek P 19:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 1000 (přípraveného postupem 7 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



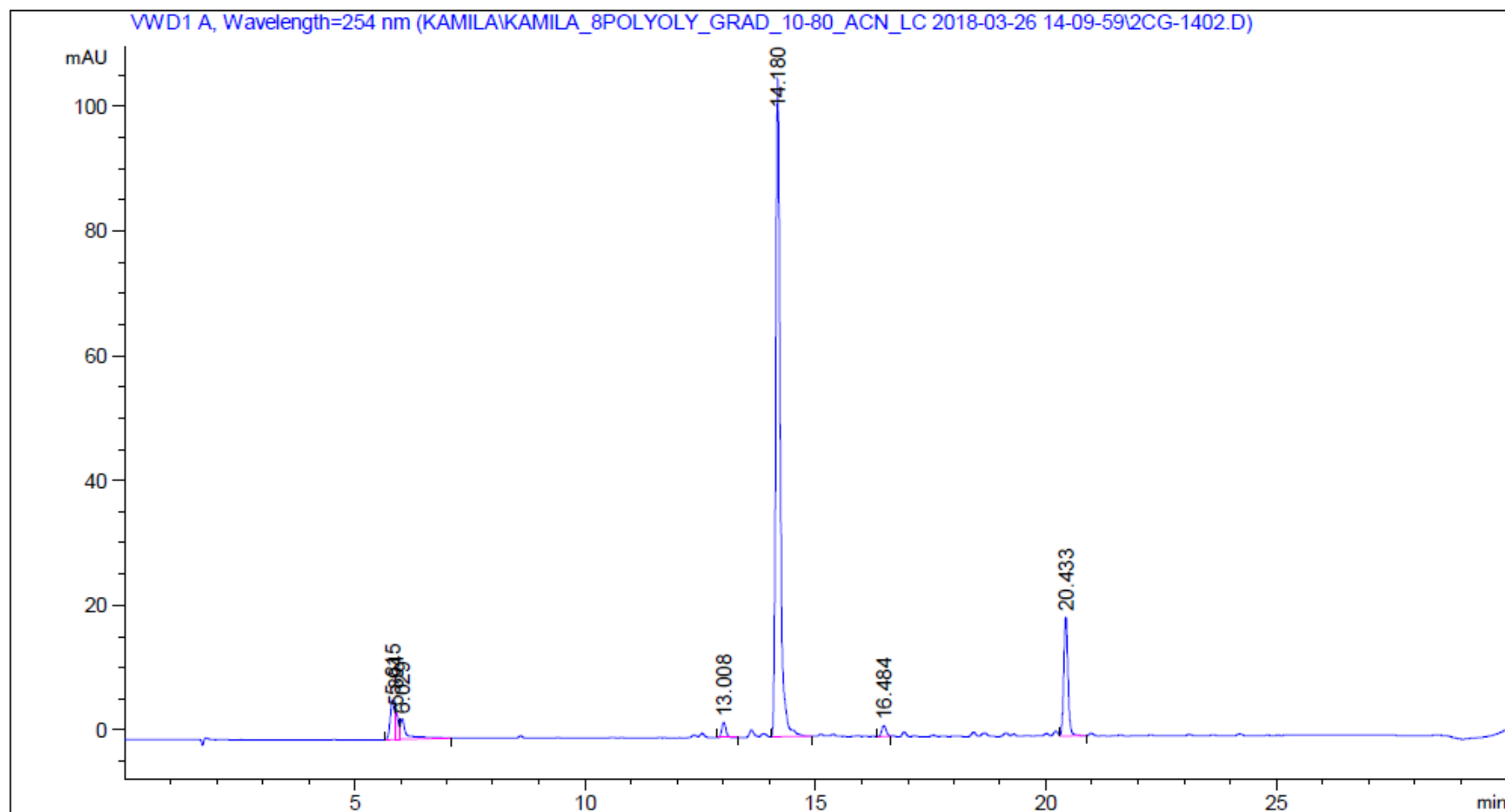
**Obrázek P 20:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



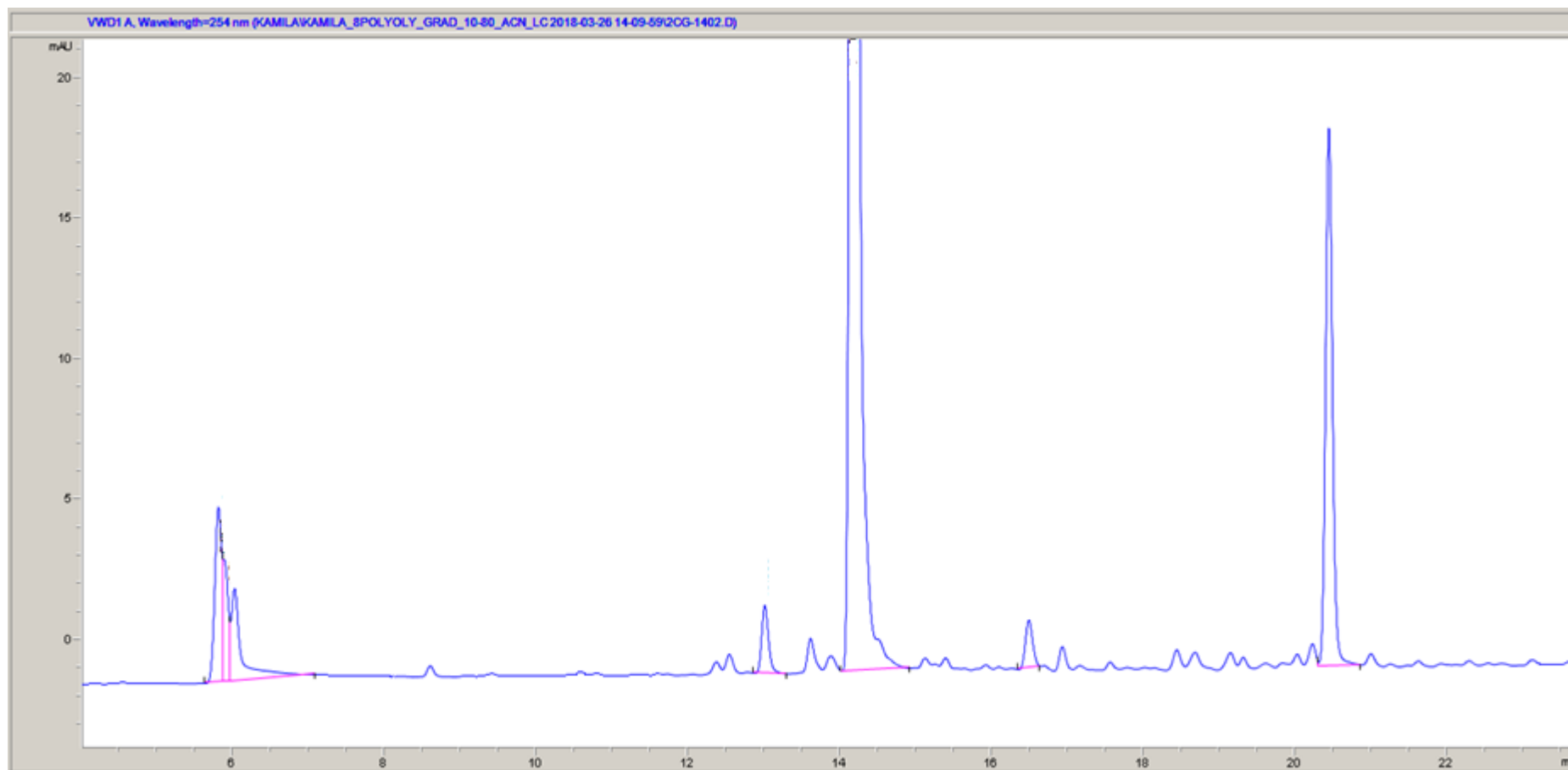
**Obrázek P 21:** Detailní záznam chromatogramu (Obrázek P 20) zaznamenaného při separaci PEG 400 (připraveného postupem 8 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



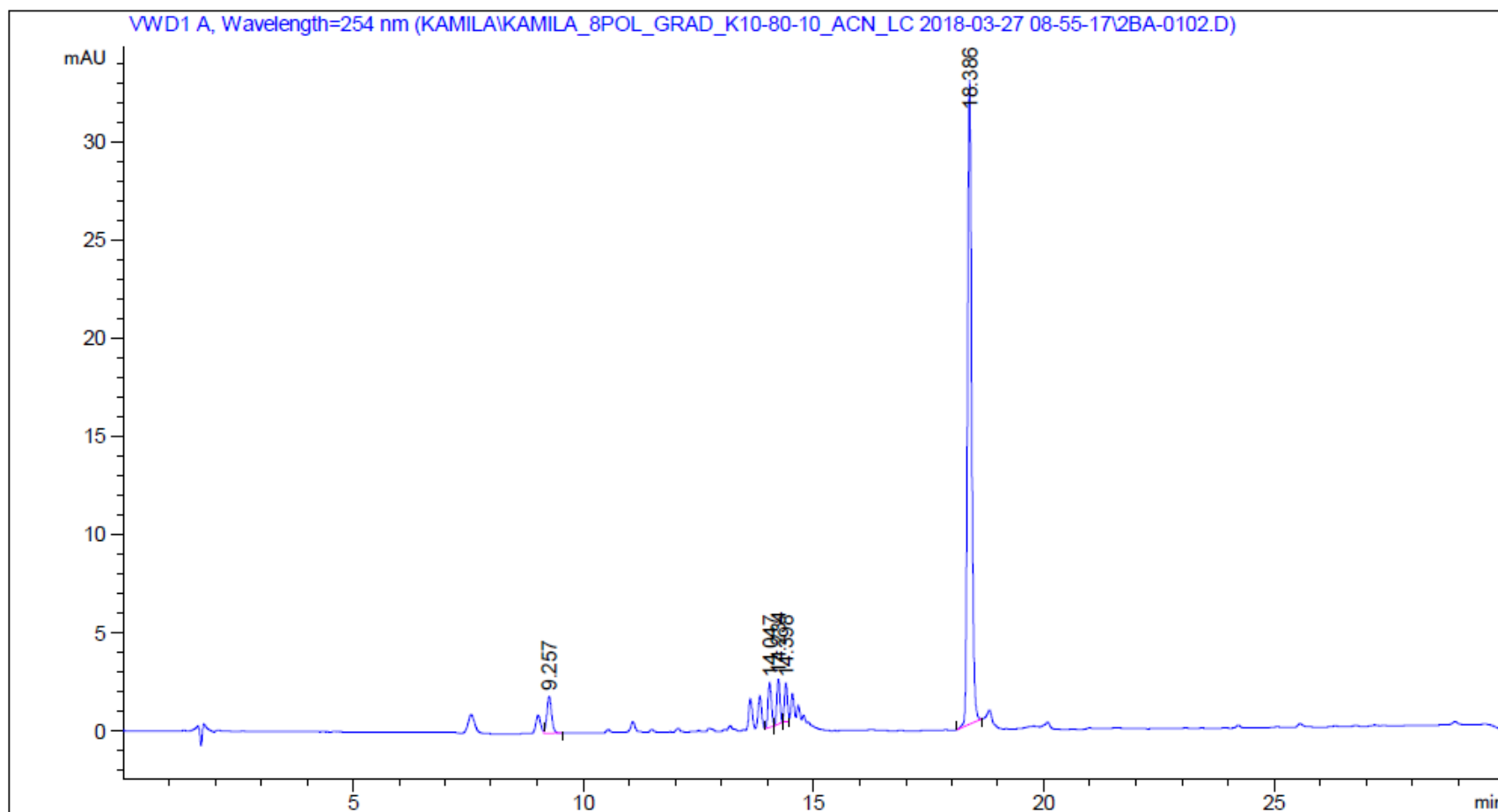
**Obrázek P 22:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 2700 (přípraveného postupem 8 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 23:** Detailní záznam chromatogramu (Obrázek P 22) zaznamenaného při separaci PPG 2700 (připraveného postupem 8 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10 – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

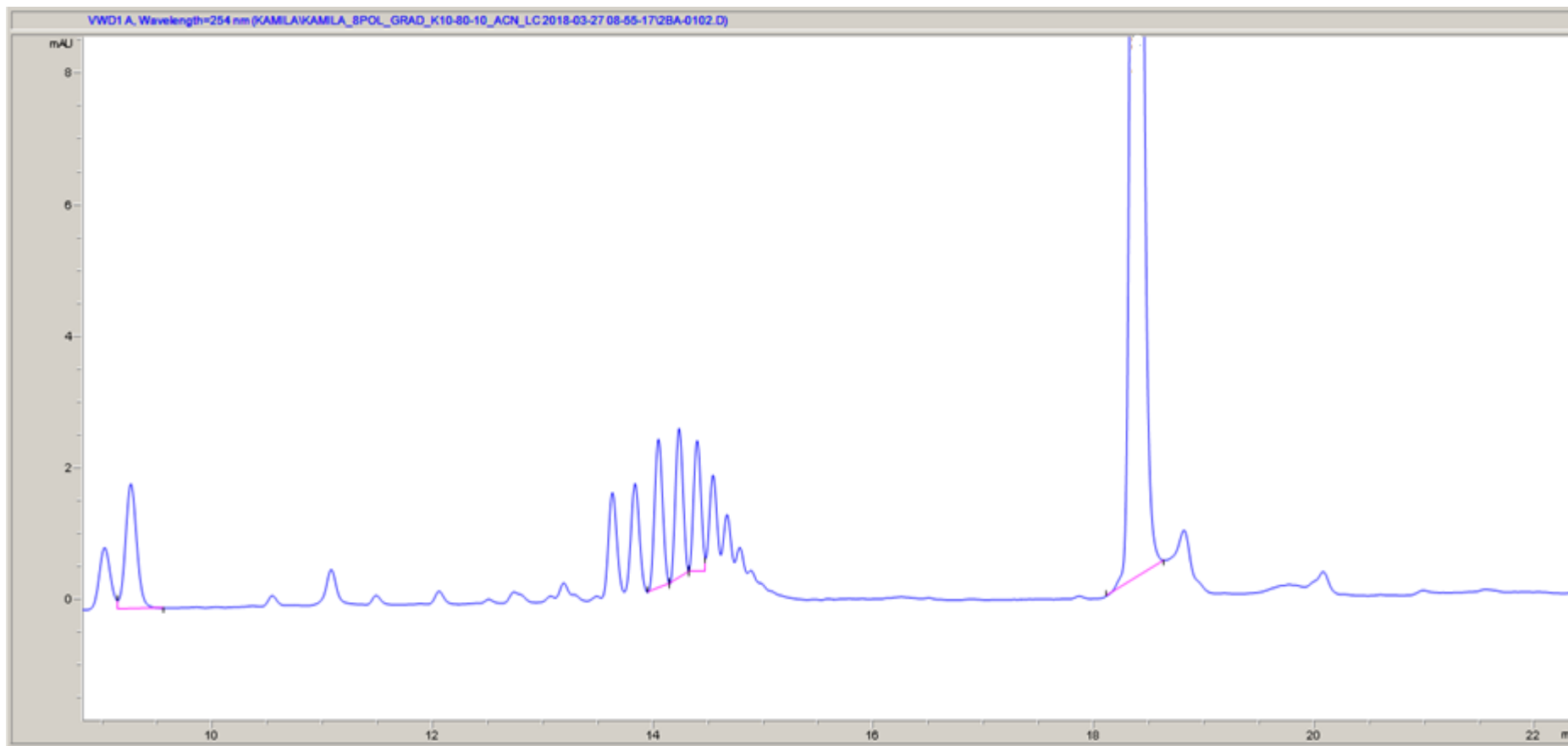


**Obrázek P 24:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

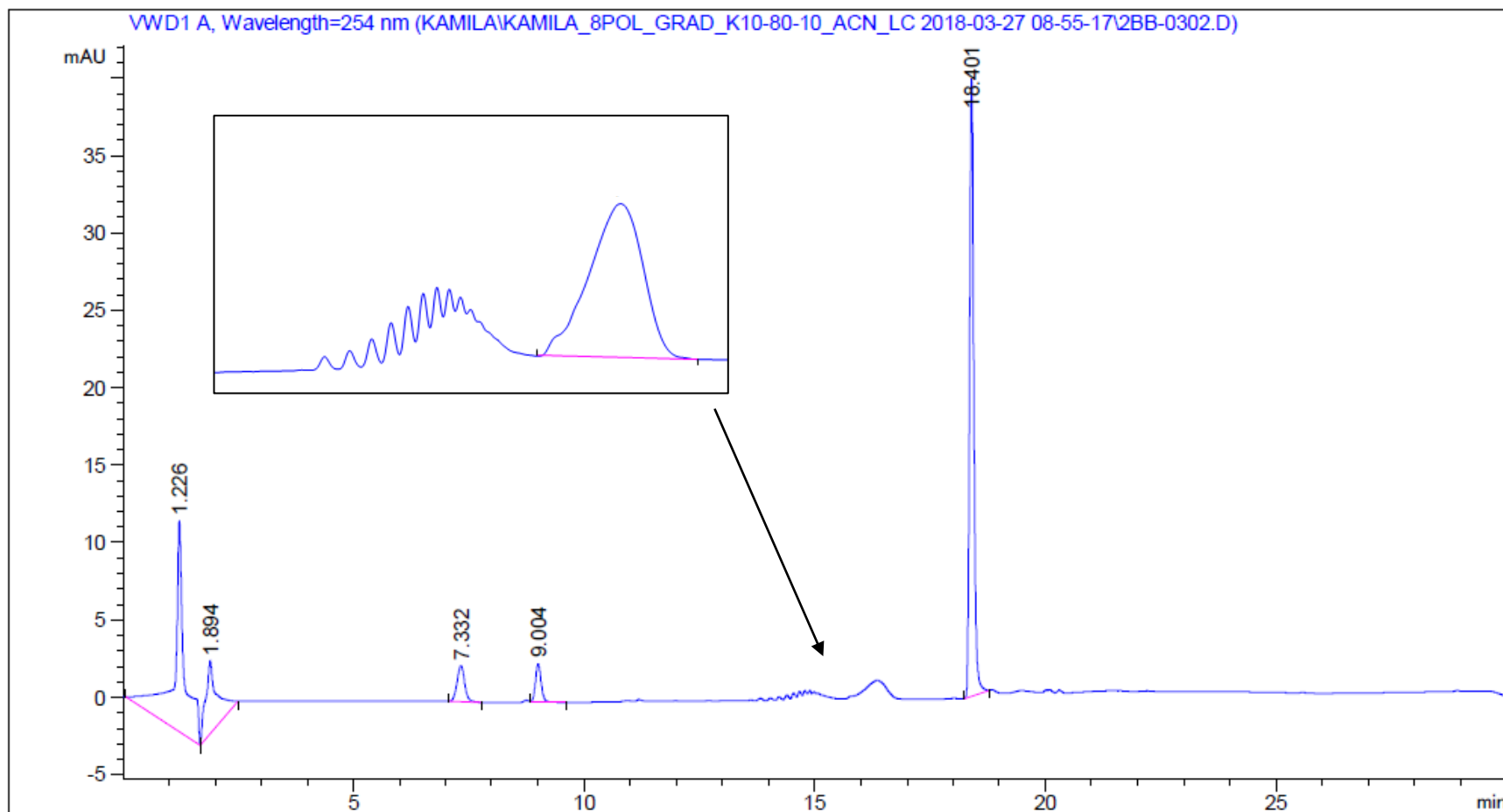




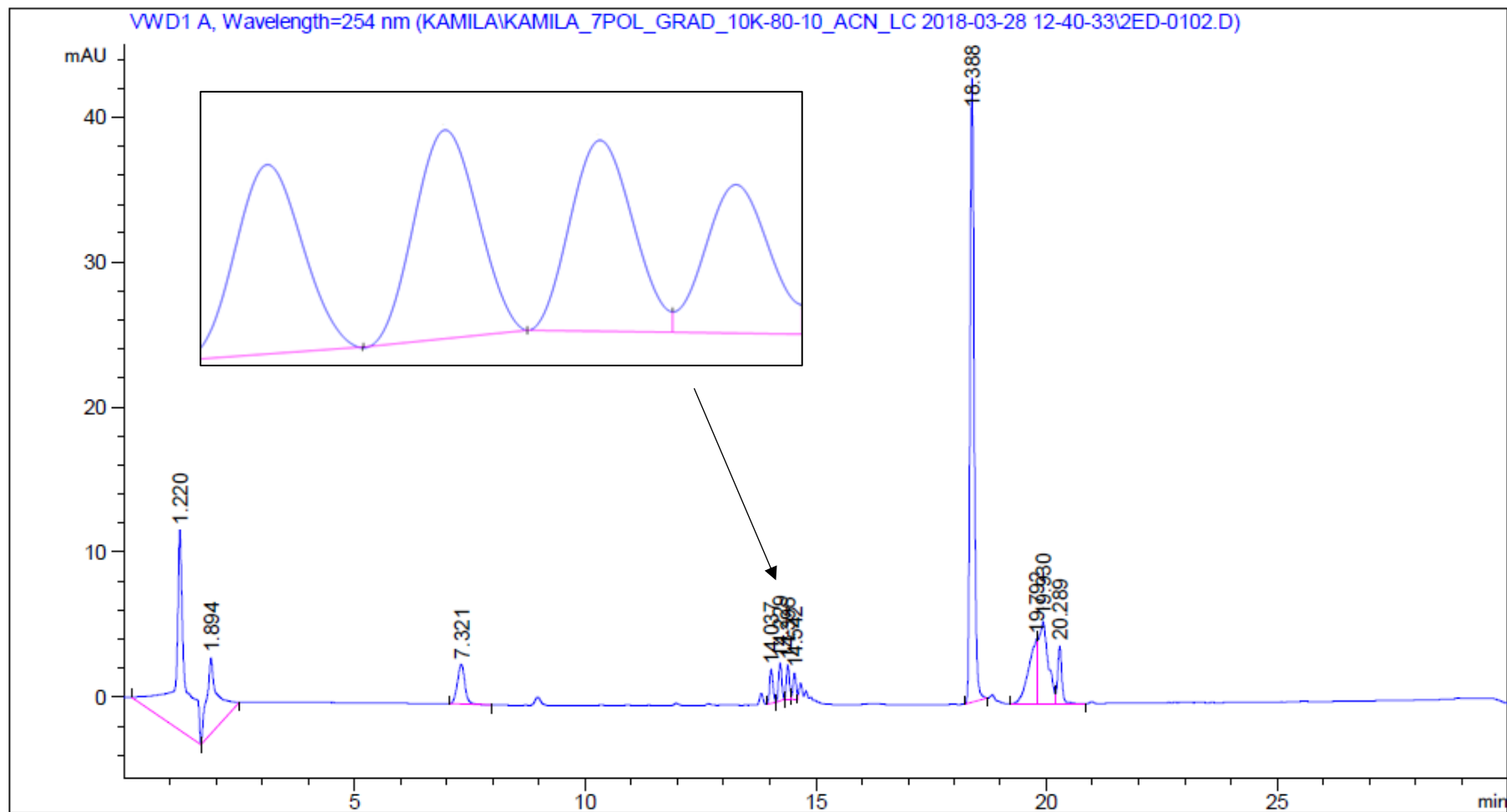
**Obrázek P 25:** Detailní záznam chromatogramu (Obrázek P 24) zaznamenaného při separaci PEG 400 (připraveného postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



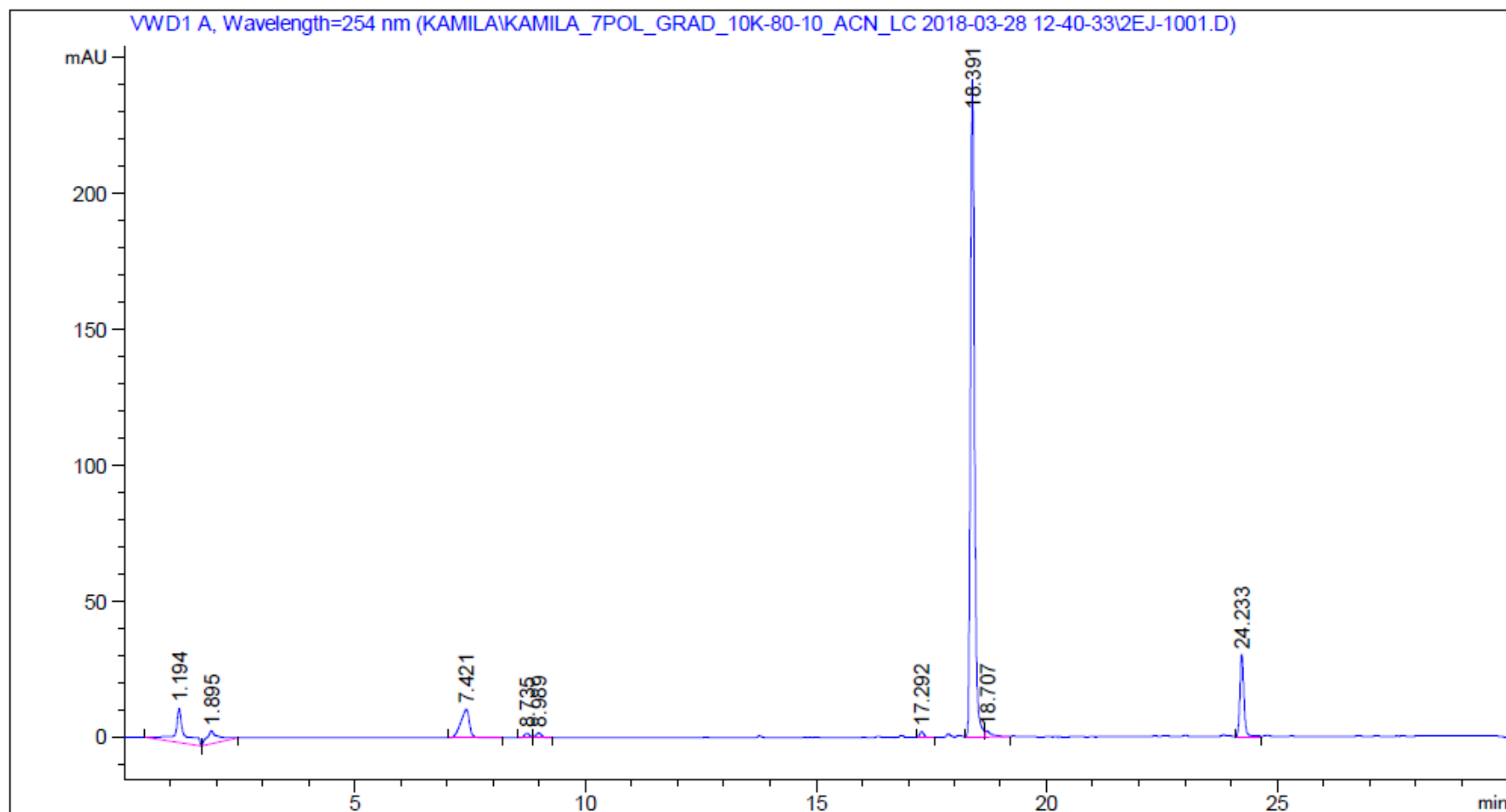
**Obrázek P 26:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 600 (připraveného postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



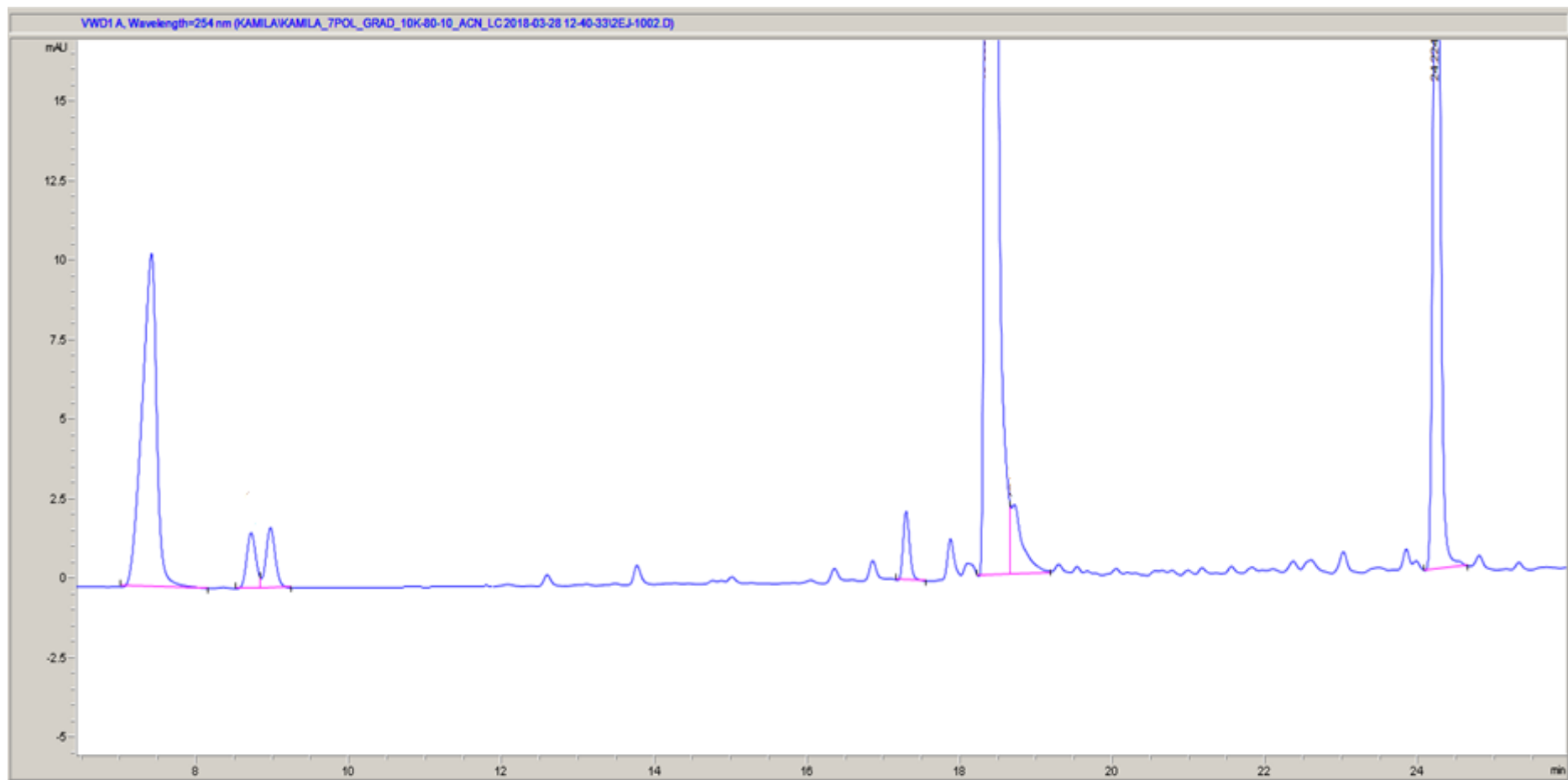
**Obrázek P 27:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (připraveného postupem 7 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



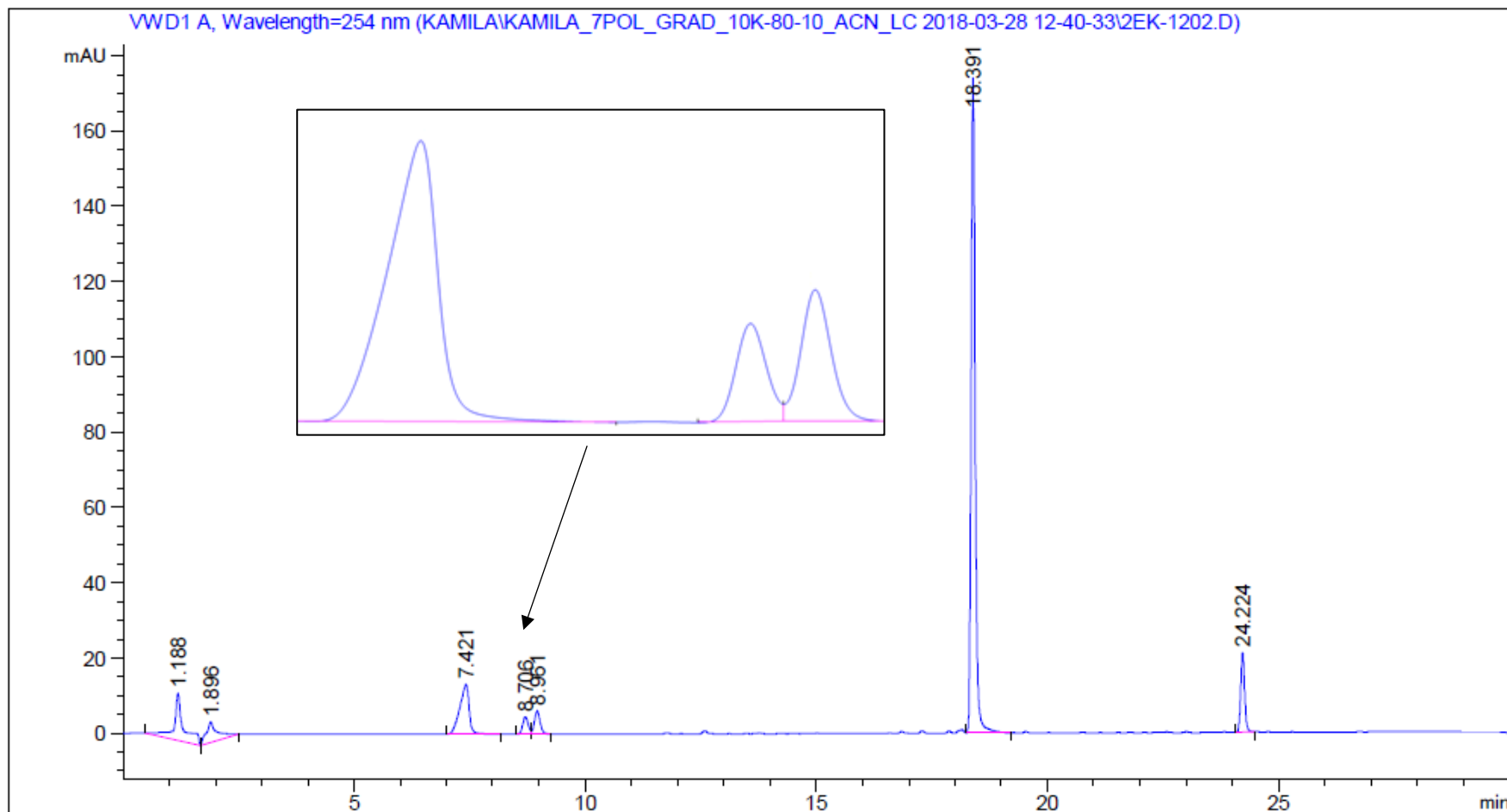
**Obrázek P 28:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 2700 (připraveného postupem 7 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



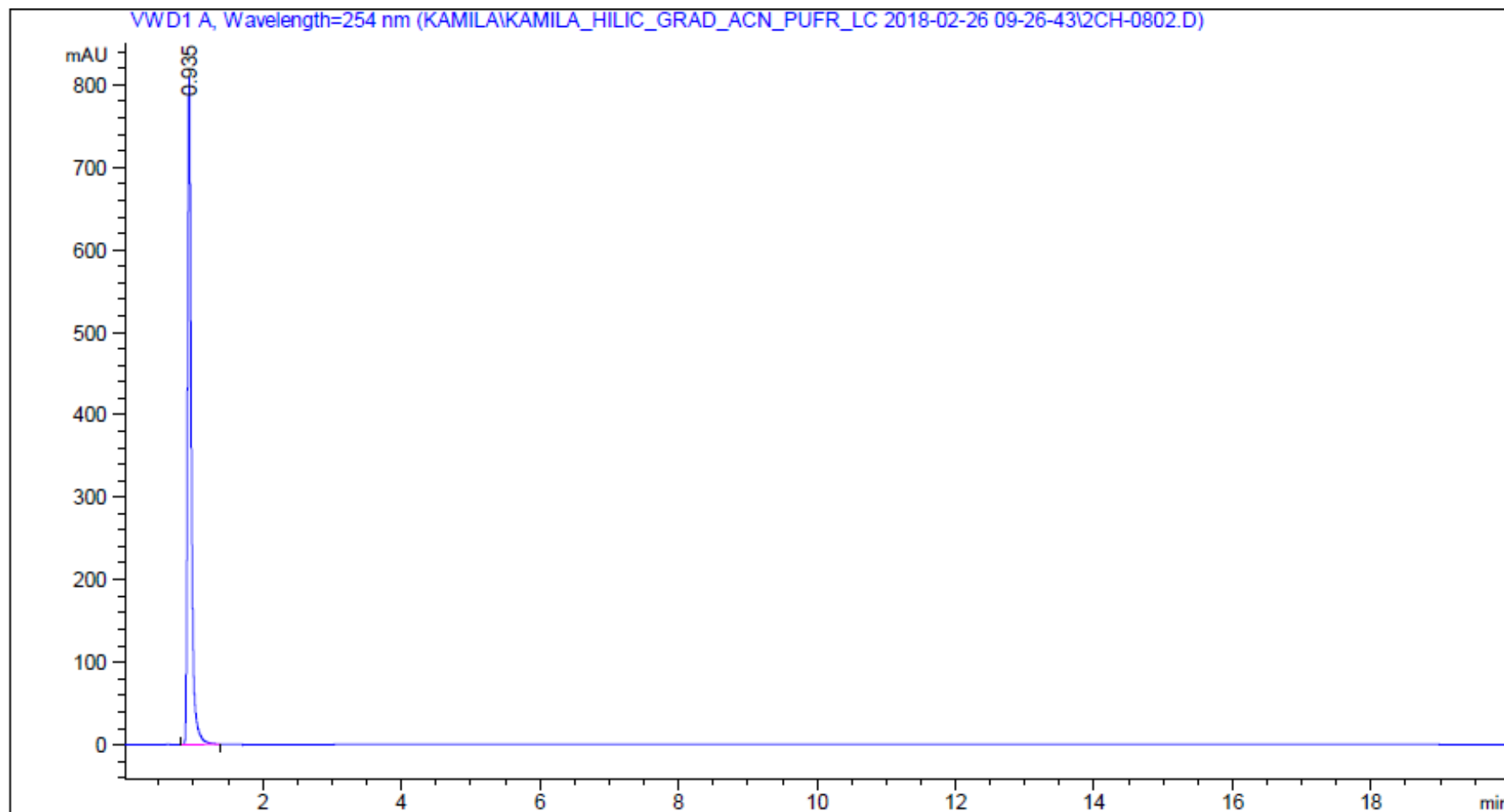
**Obrázek P 29:** Detailní záznam chromatogramu (Obrázek P 28) zaznamenaného při separaci PPG 2700 (připraveného postupem 7 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



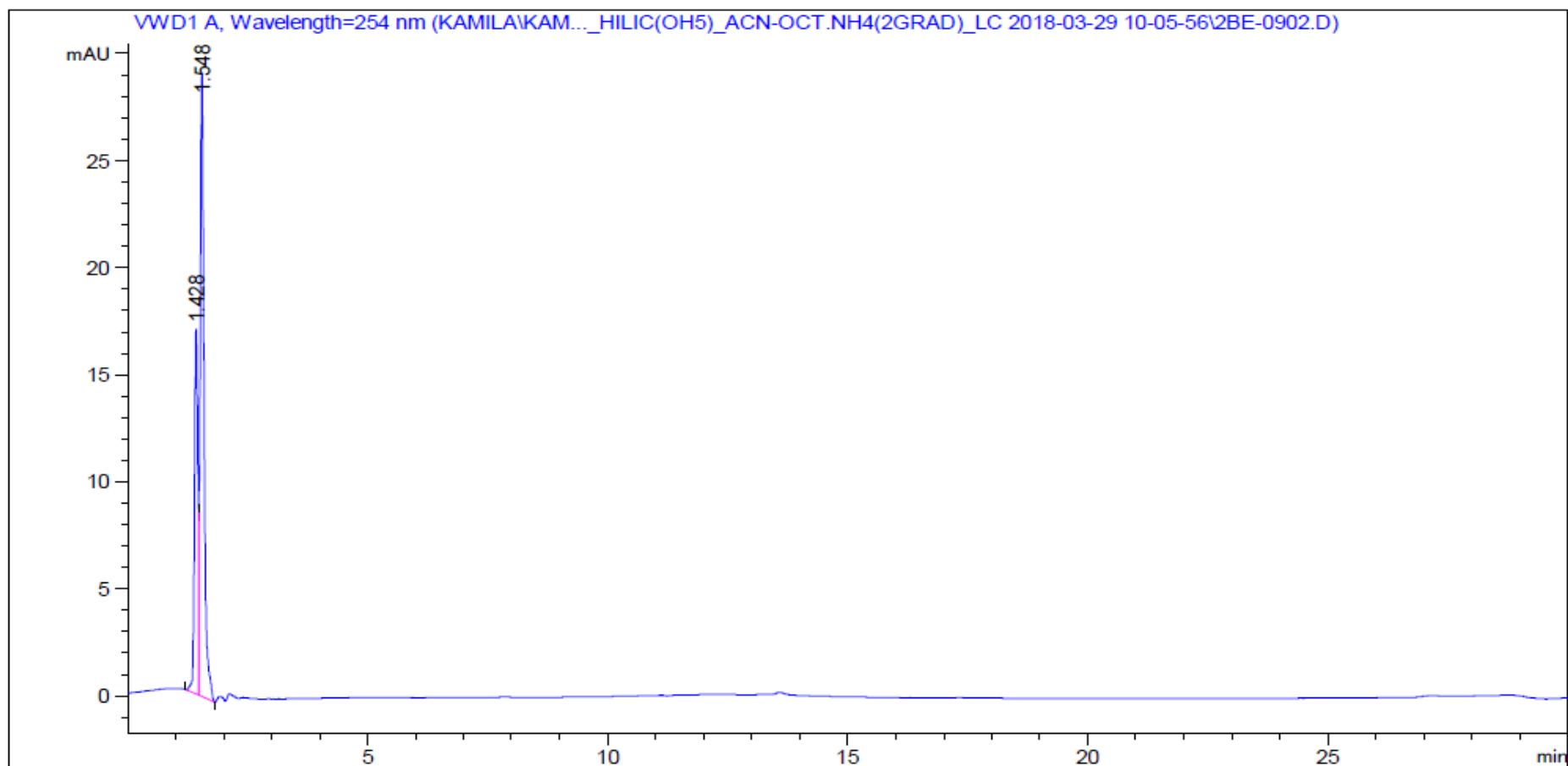
**Obrázek P 30:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 4000 (přípraveného postupem 7 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda na koloně Ascentis® Express C18 (15 cm x 3,0 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-voda 0,4 ml/min, doba analýzy 30 minut, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 31:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 4000 (přípraveného postupem 1, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 98 – 65 – 98 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (75 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7 μm) v systému HILIC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,2 μl, průtok mobilní fáze ACN-octan amonný ve vodě 0,3 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

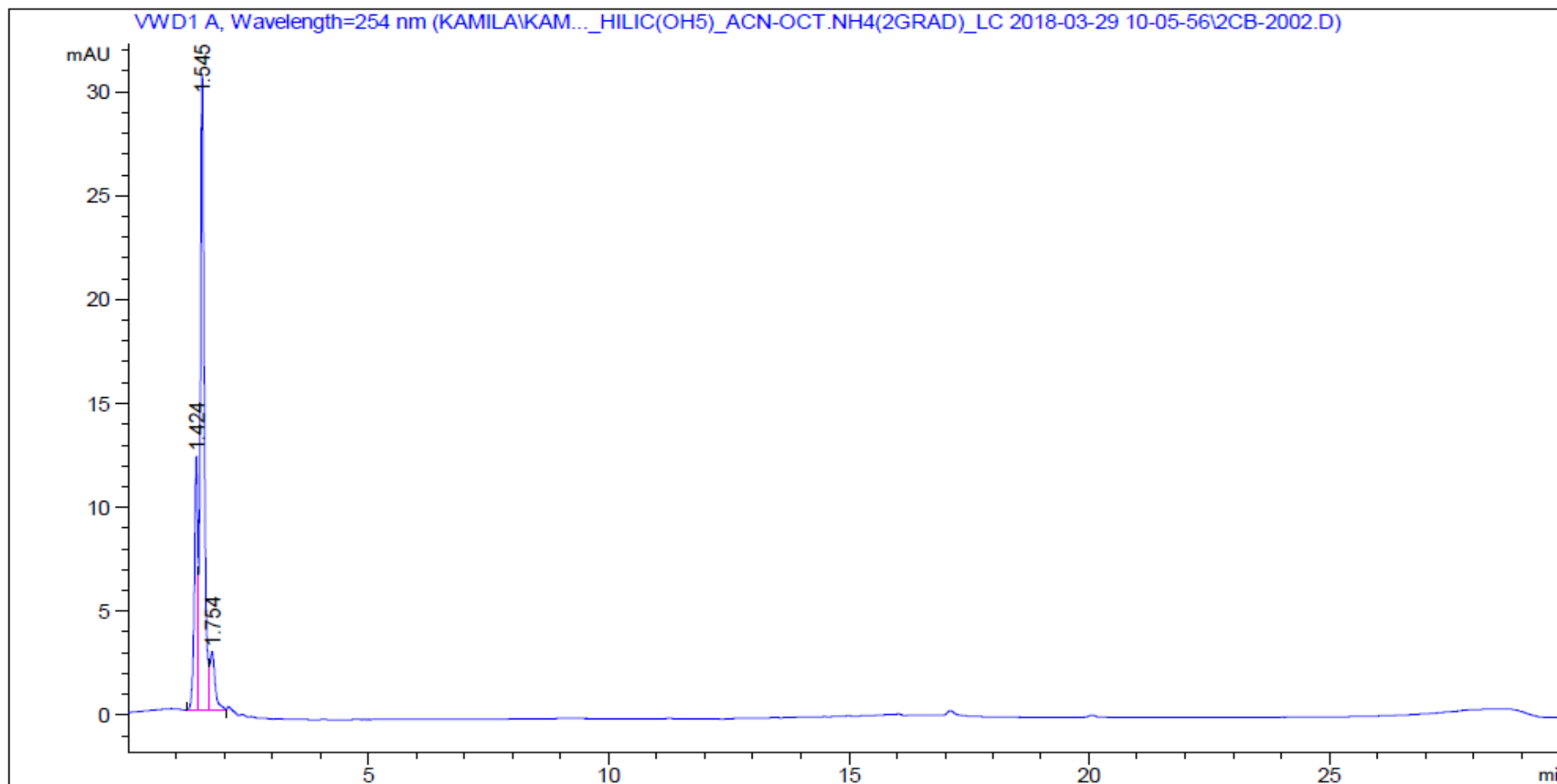


**Obrázek P 32:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 800 (připraveného postupem 7 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99 – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Ascentis® Express OH5 (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7  $\mu\text{m}$ ) v systému HILIC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,1  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze ACN-octan amonný ve vodě 0,2 ml/min, teplota kolony 25  $^{\circ}\text{C}$ , detekce pomocí UV detektoru při 254 nm

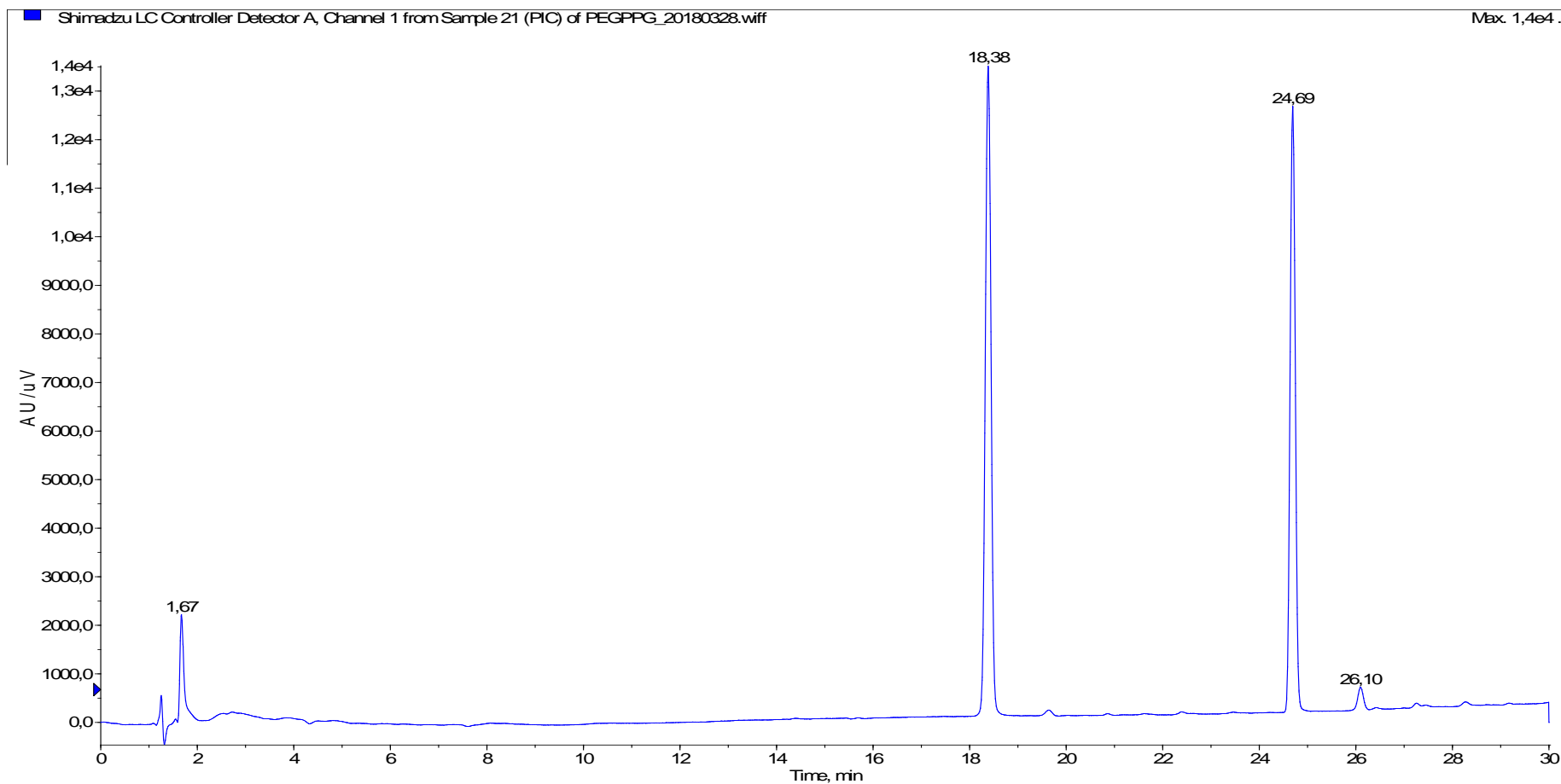




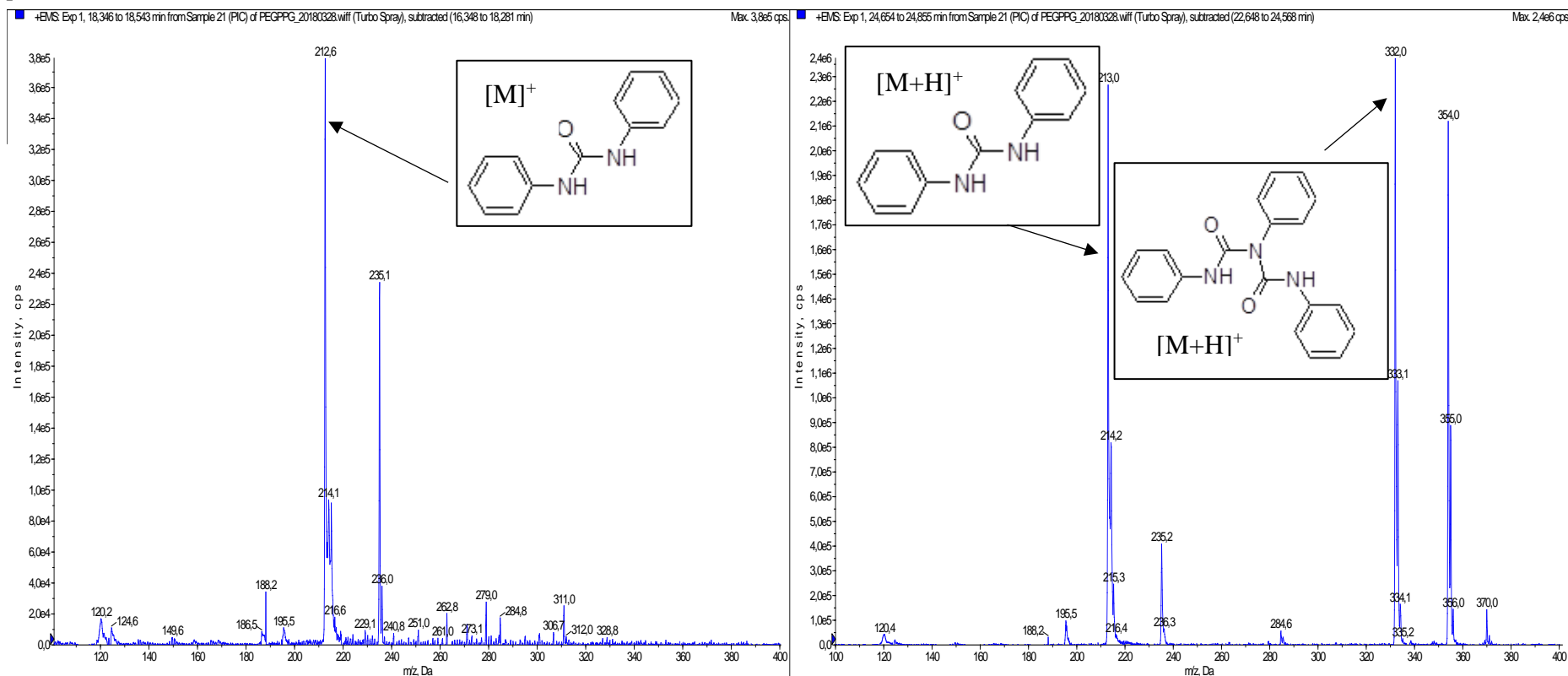
**Obrázek P 33:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 600 (připraveného postupem 7 s 5  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Ascentis® Express OH5 (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 2,7  $\mu$ m) v systému HILIC-UV, dávkovaný objem vzorku 0,1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze ACN-octan amonný ve vodě 0,2 ml/min, teplota kolony 25 °C, detekce pomocí UV detektoru při 254 nm



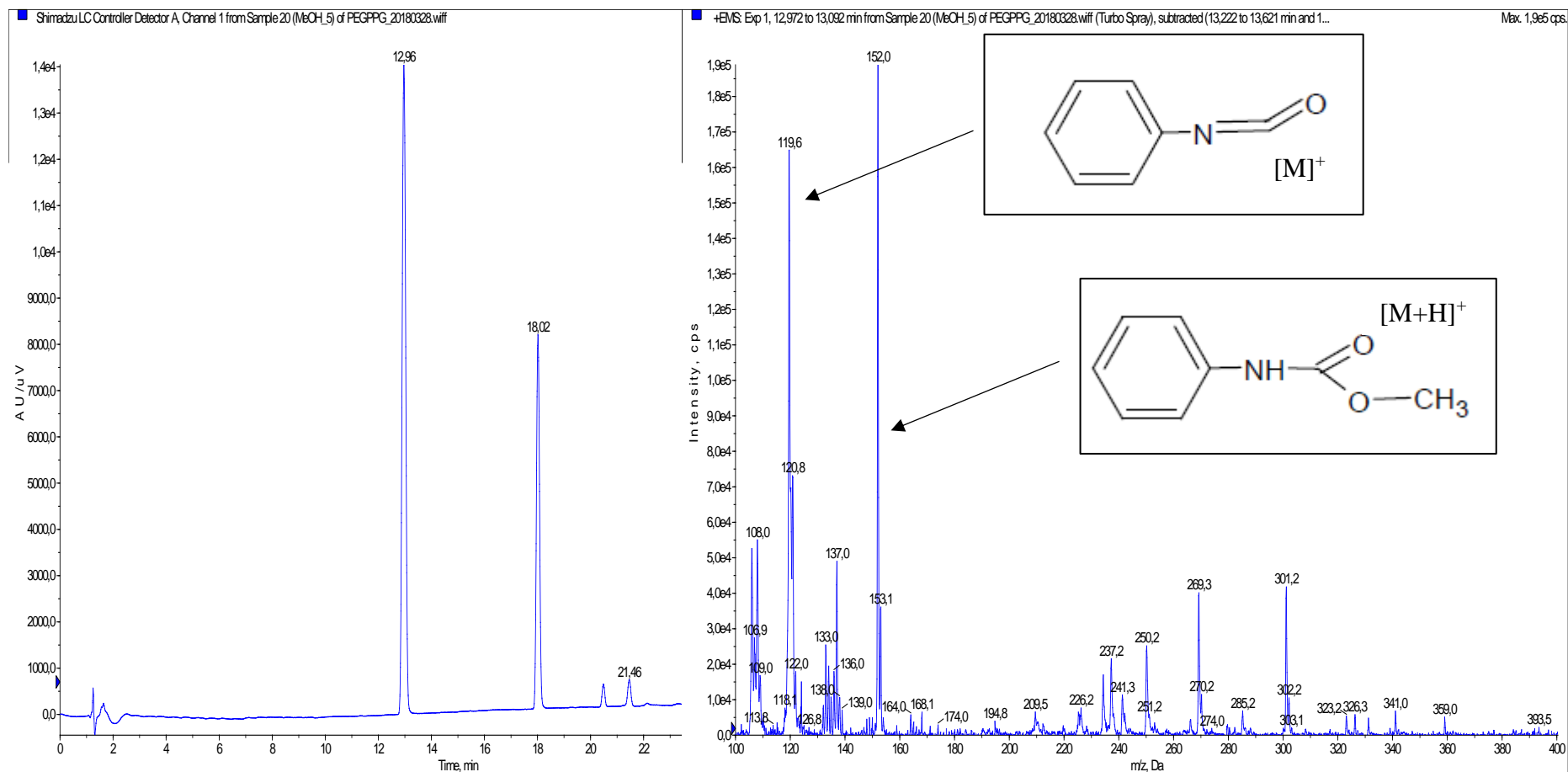
**Obrázek P 34:** Chromatogram zaznamenaný při separaci vzorku fenylisokyanátu (příprava viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



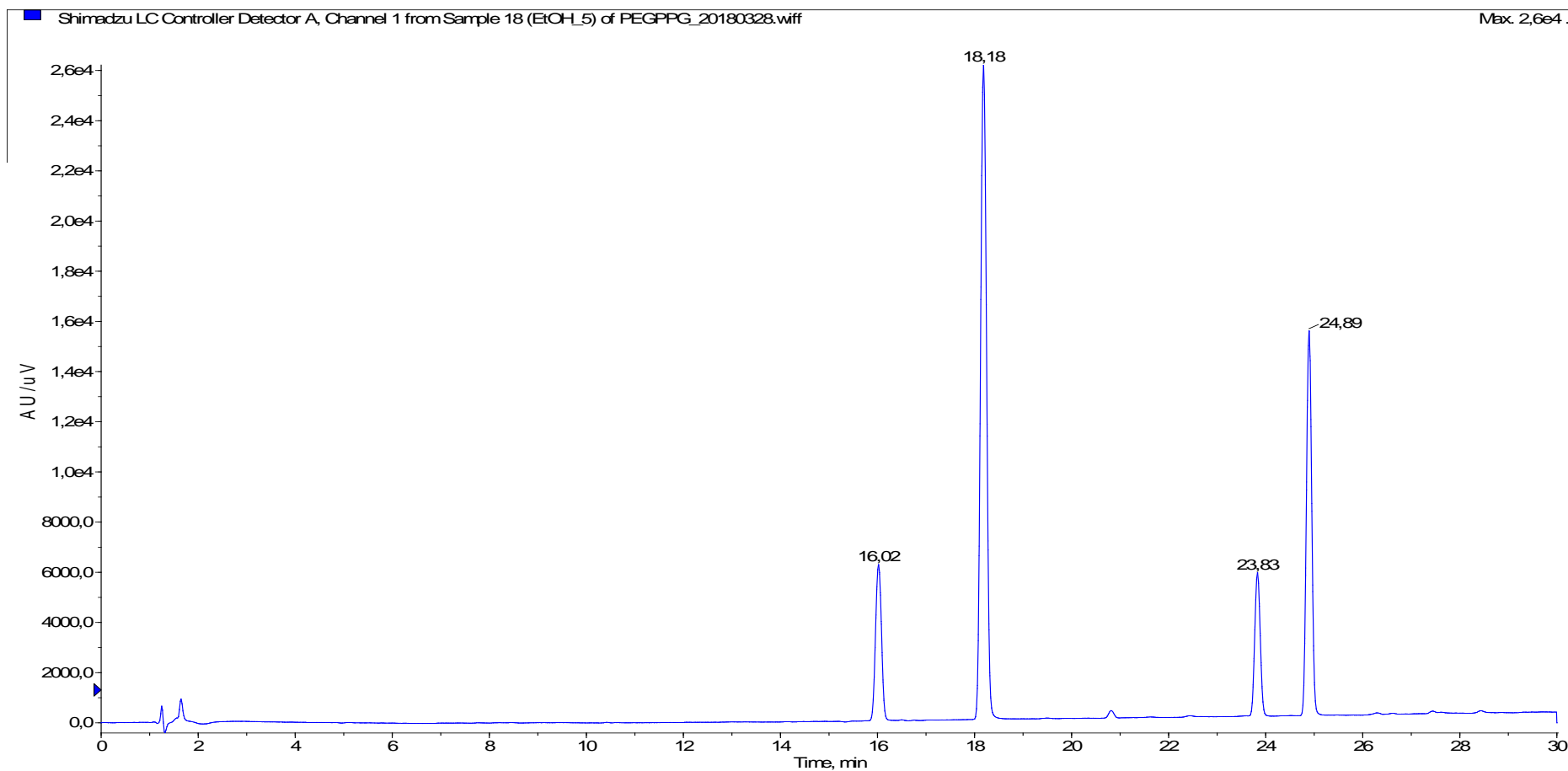
**Obrázek P 35:** Hmotnostní spektra (s navrhovanými strukturami) zaznamenaná při separaci vzorku fenyloisokyanátu při 18,39 a 24,69 minutě (příprava viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6 µm) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5 µl, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



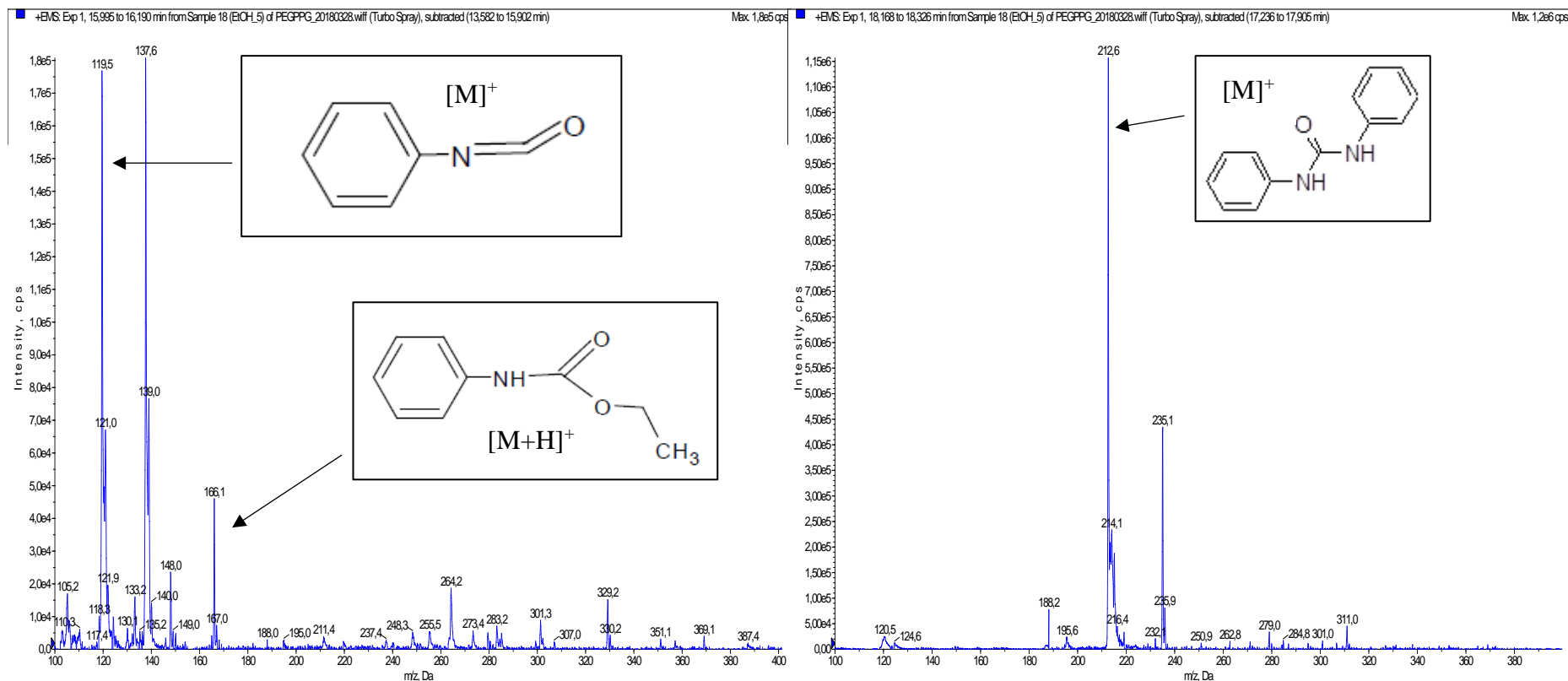
**Obrázek P 36:** Chromatogram a hmotnostní spektrum s navrženými strukturami (pro pík ve 12,96 min) zaznamenané při separaci methanolu (příprava viz kapitola 2.3.1 s 5  $\mu\text{l}$  PIC) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



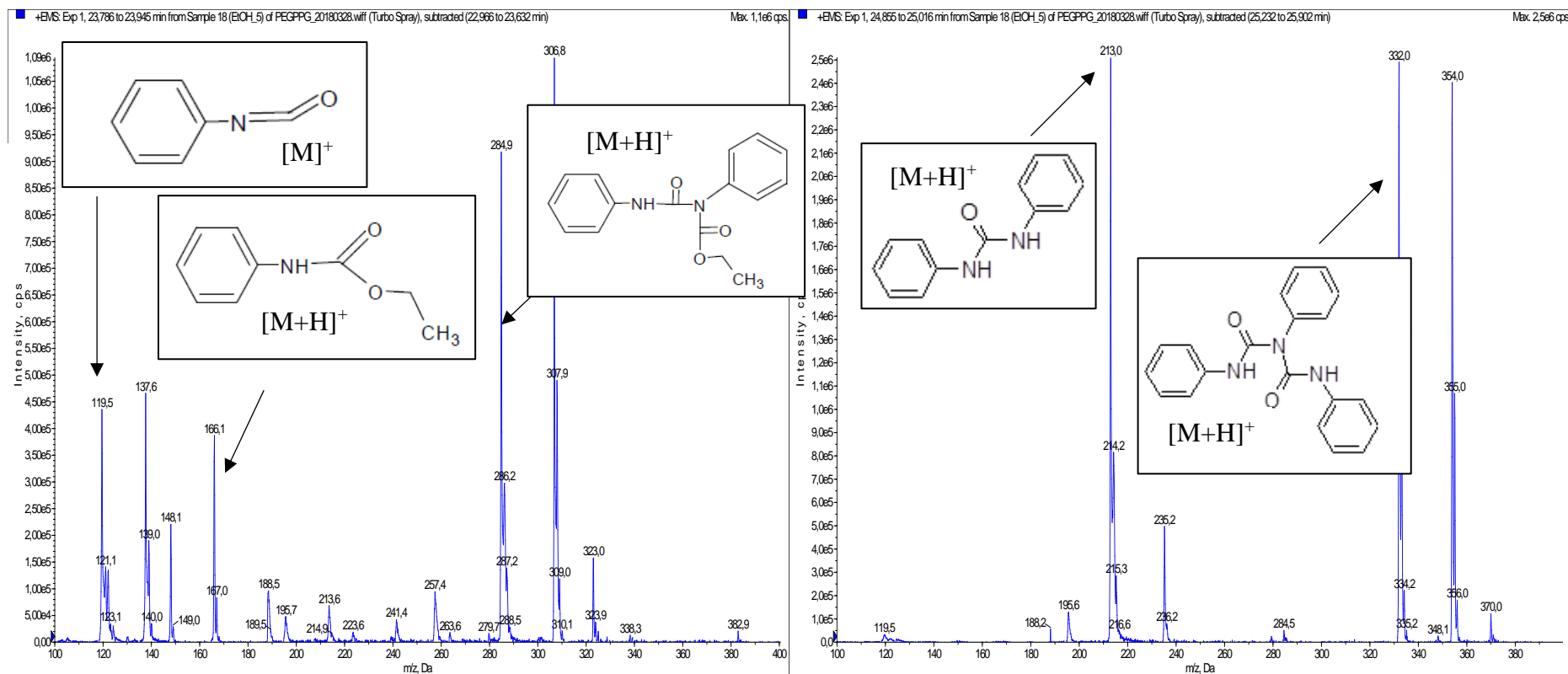
**Obrázek P 37:** Chromatogram zaznamenaný při separaci denaturovaného ethanolu (příprava viz kapitola 2.3.1 s 5  $\mu$ l PIC) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



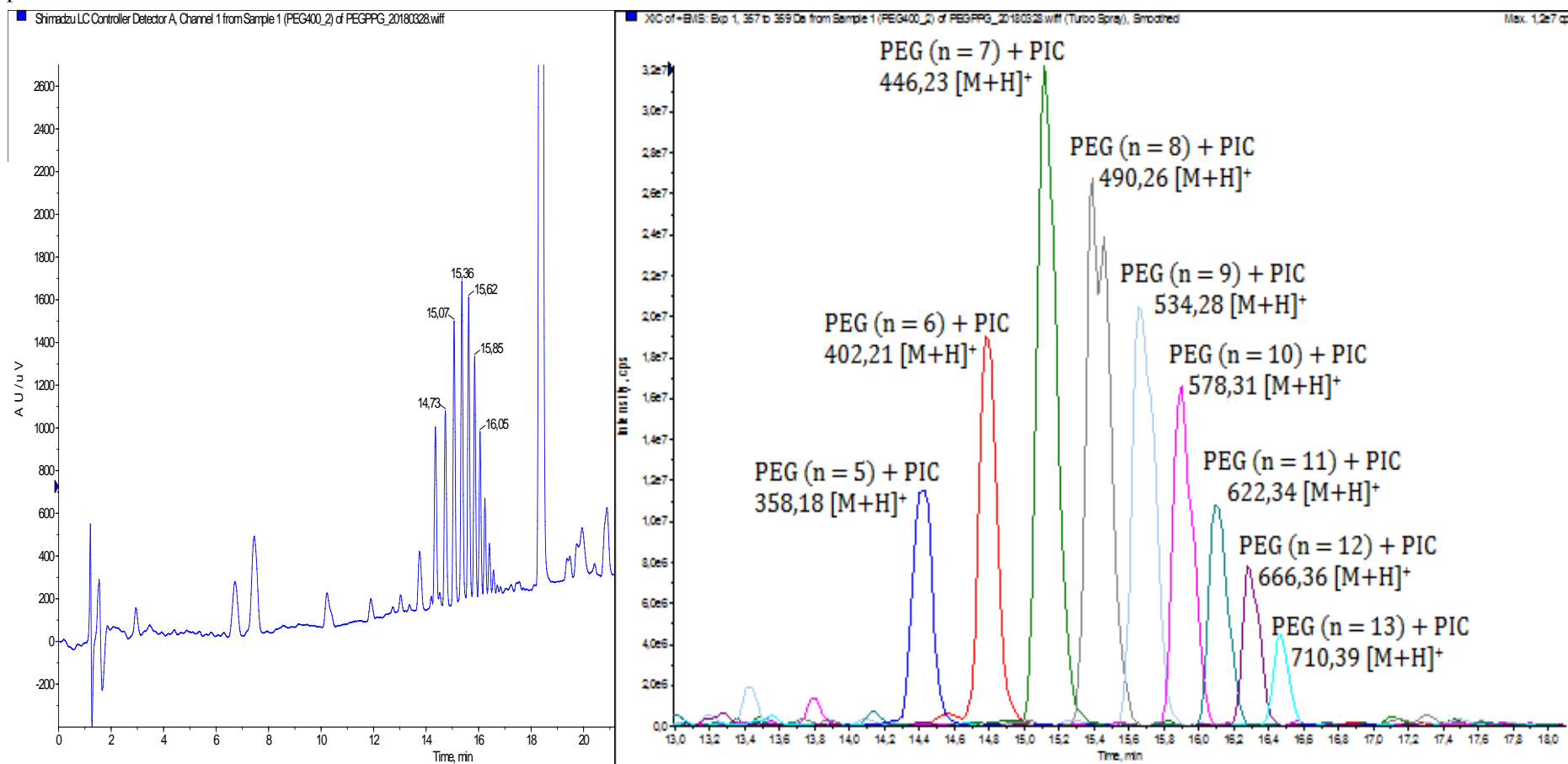
**Obrázek P 38:** Hmotnostní spektra (s navrhovanými strukturami) zaznamenaná při separaci denaturovaného ethanolu při 16,02 a 18,18 minutě (příprava viz kapitola 2.3.1 s 5  $\mu$ l PIC) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 39:** Hmotnostní spektra (s navrhovanými strukturami) zaznamenaná při separaci denaturovaného ethanolu při 23,83 a 24,89 minutě (příprava viz kapitola 2.3.1 s 5  $\mu$ l PIC) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm

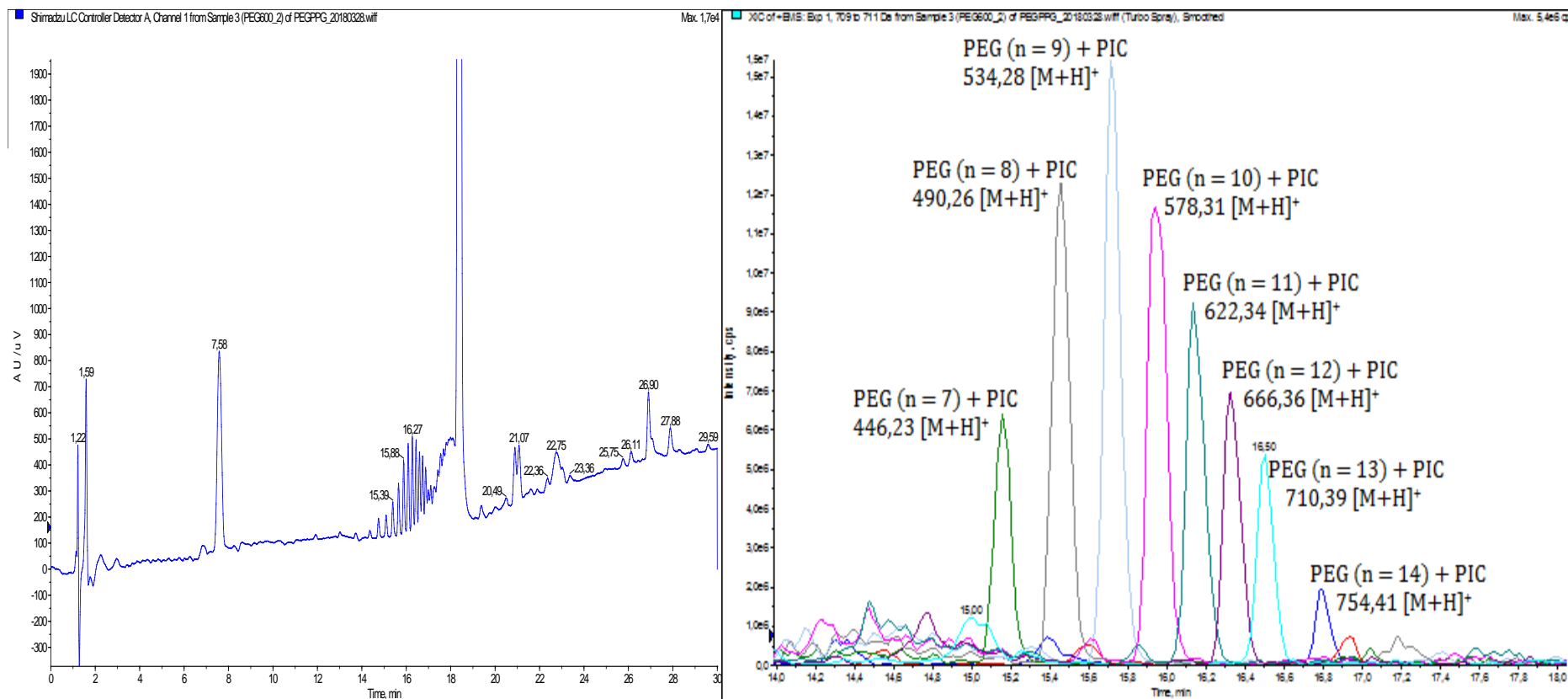


**Obrázek P 40:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 8 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) a rekonstruovaný iontový chromatogram při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm

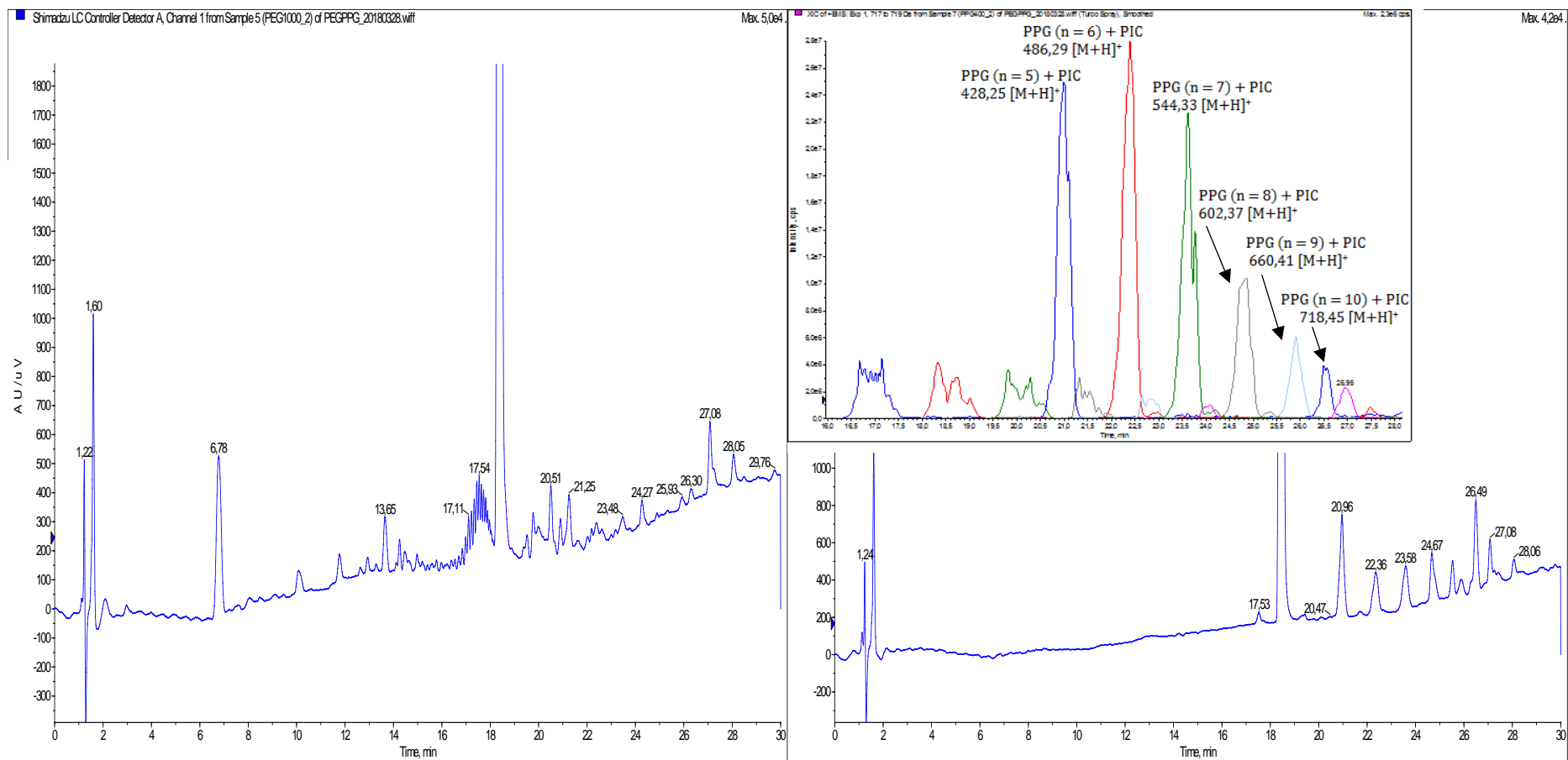




**Obrázek P 41:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 600 (přípraveného postupem 8 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) a rekonstruovaný iontový chromatogram při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu\text{m}$ ) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



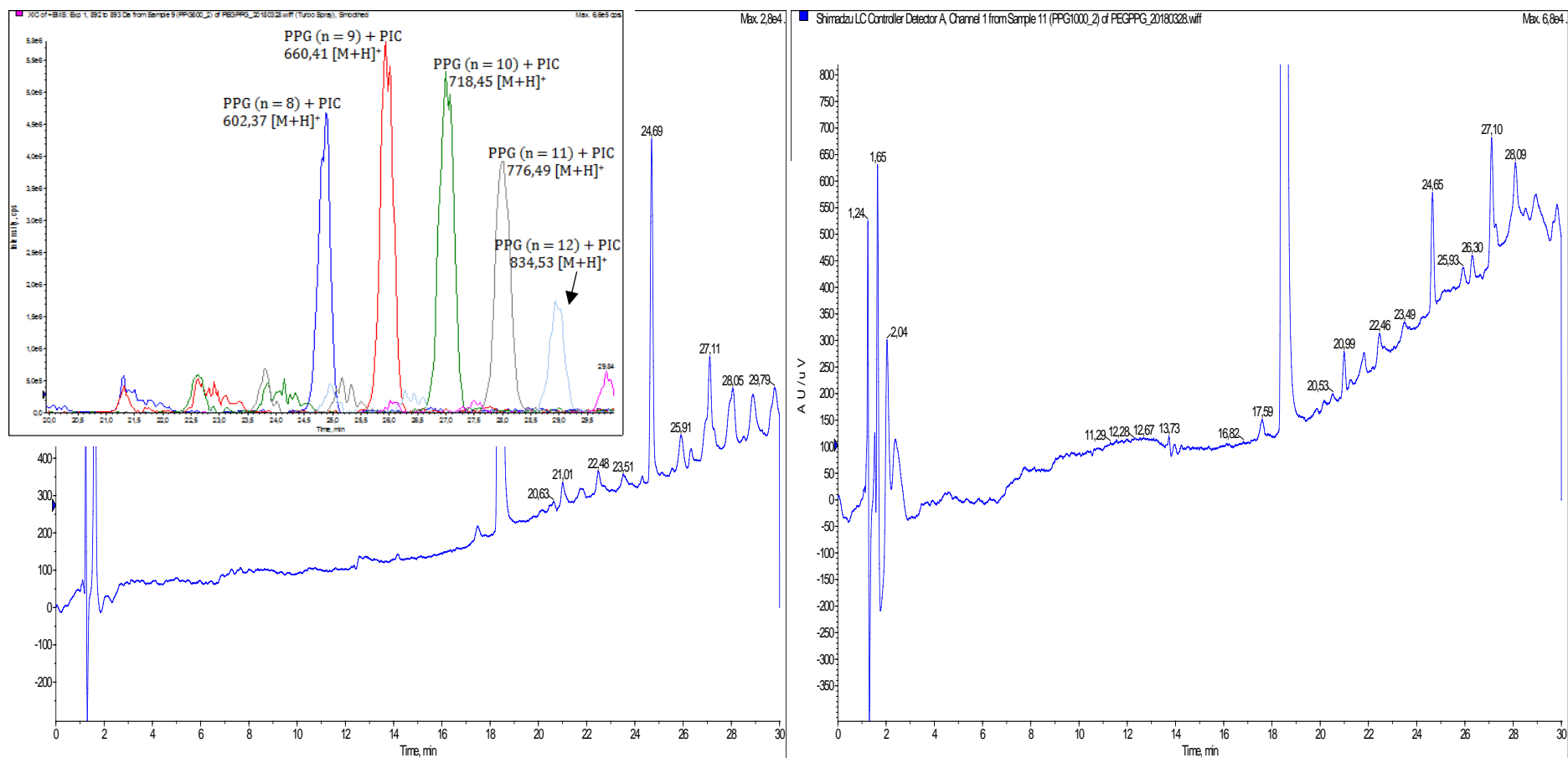
**Obrázek P 42:** Chromatogramy zaznamenané při separaci PEG 1000 a PPG 400 (připravených postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidávkem 1 % kyseliny octové Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



PEG 1000

PPG 400 + rekonstruovaný iontový chromatogram

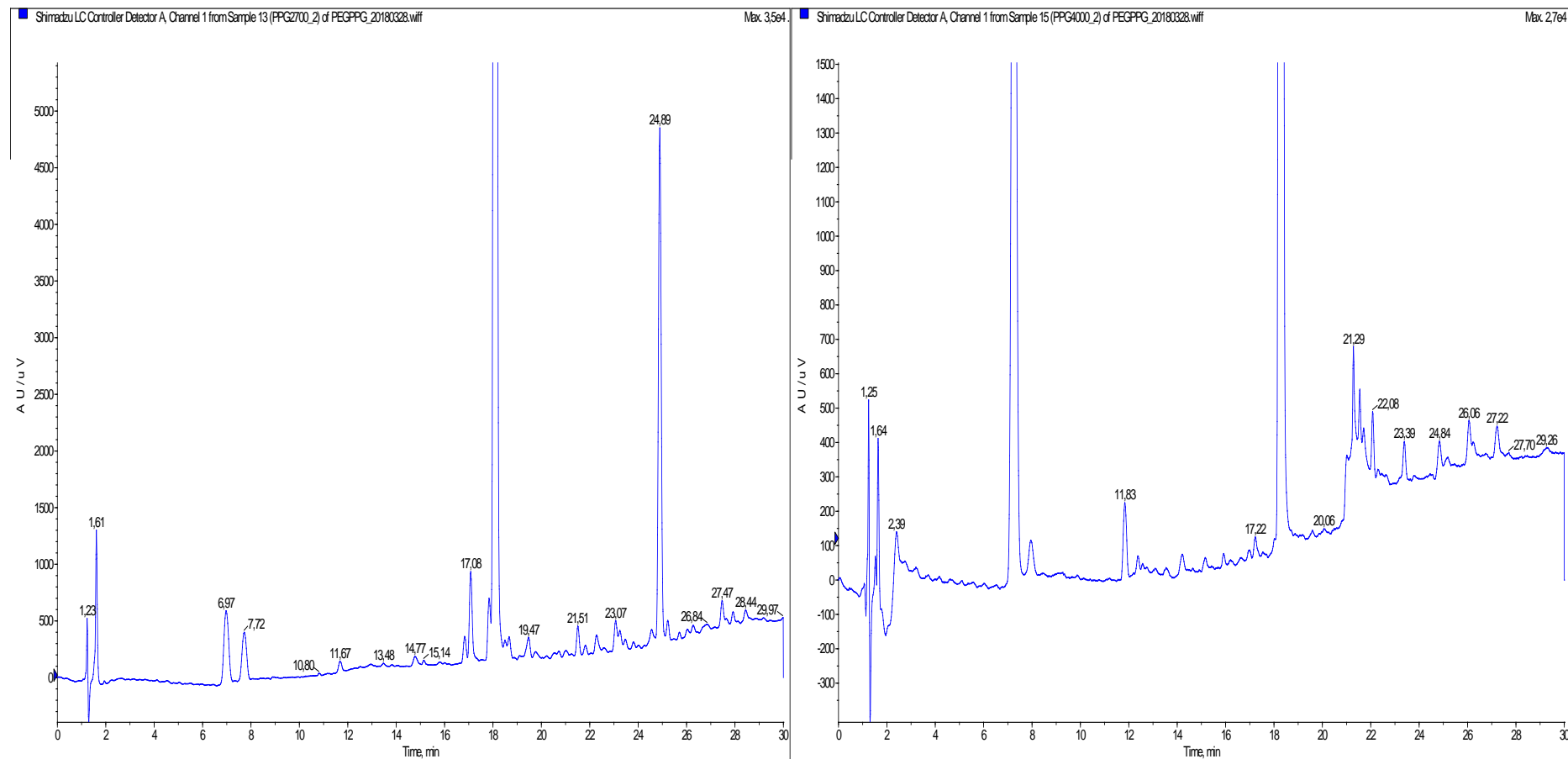
**Obrázek P 43:** Chromatogramy zaznamenané při separaci PPG 800 a PPG 1000 (připravených postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



PPG 800 + rekonstruovaný iontový chromatogram

PPG 1000

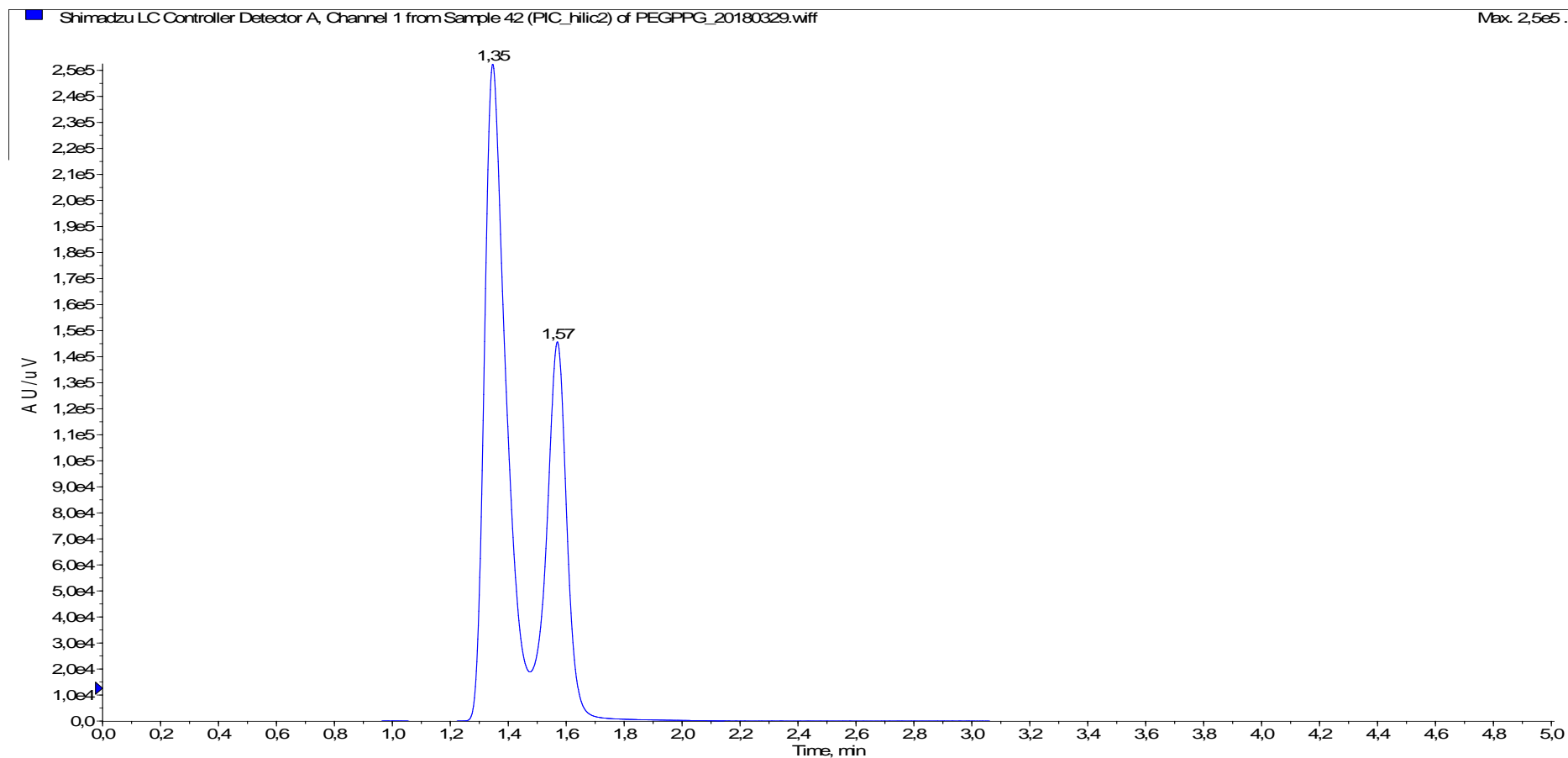
**Obrázek P 44:** Chromatogramy zaznamenané při separaci PPG 2700 a PPG 4000 (připravených postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 10k – 80 – 10 obj. % ACN-voda s přidavkem 1 % kyseliny octové na koloně Kinetex® C18 (10 cm x 3,0 mm s velikostí částic 2,6  $\mu$ m) v systému RP-HPLC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



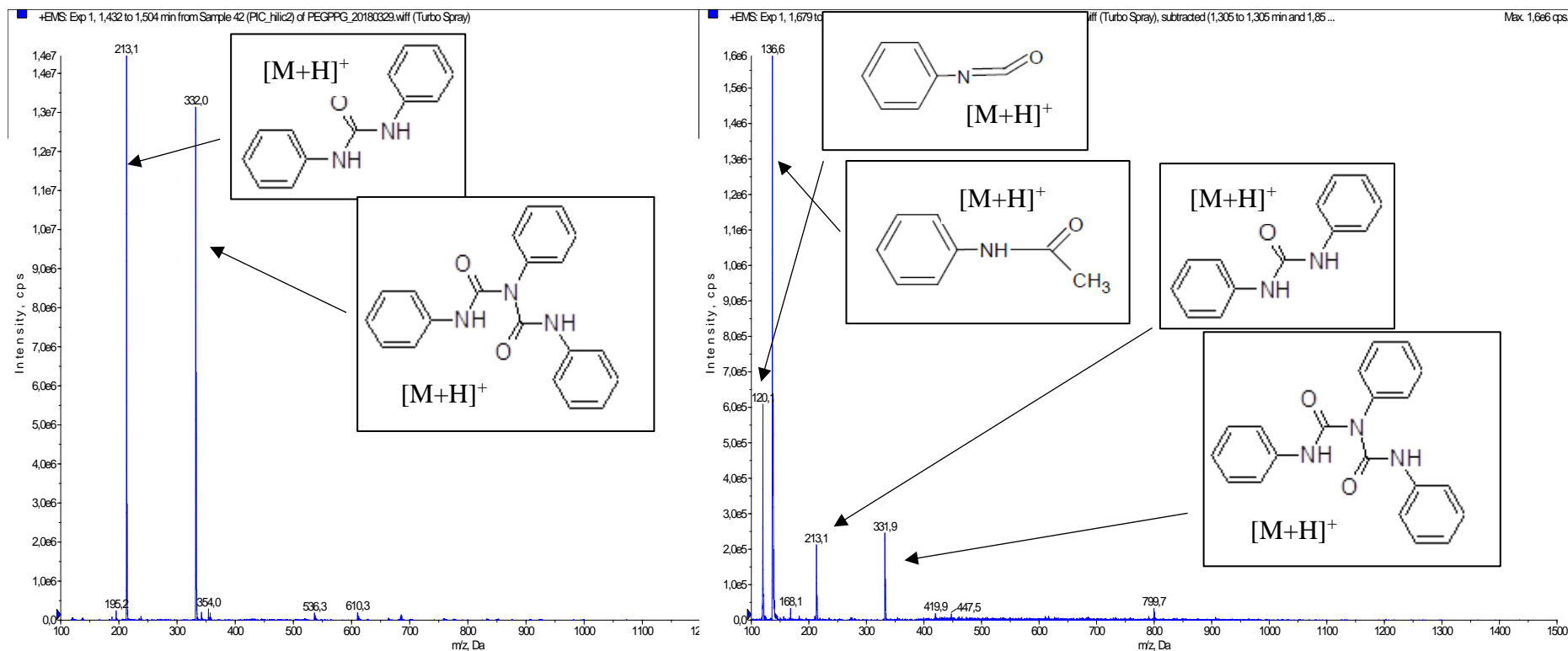
PPG 2700

PPG 4000

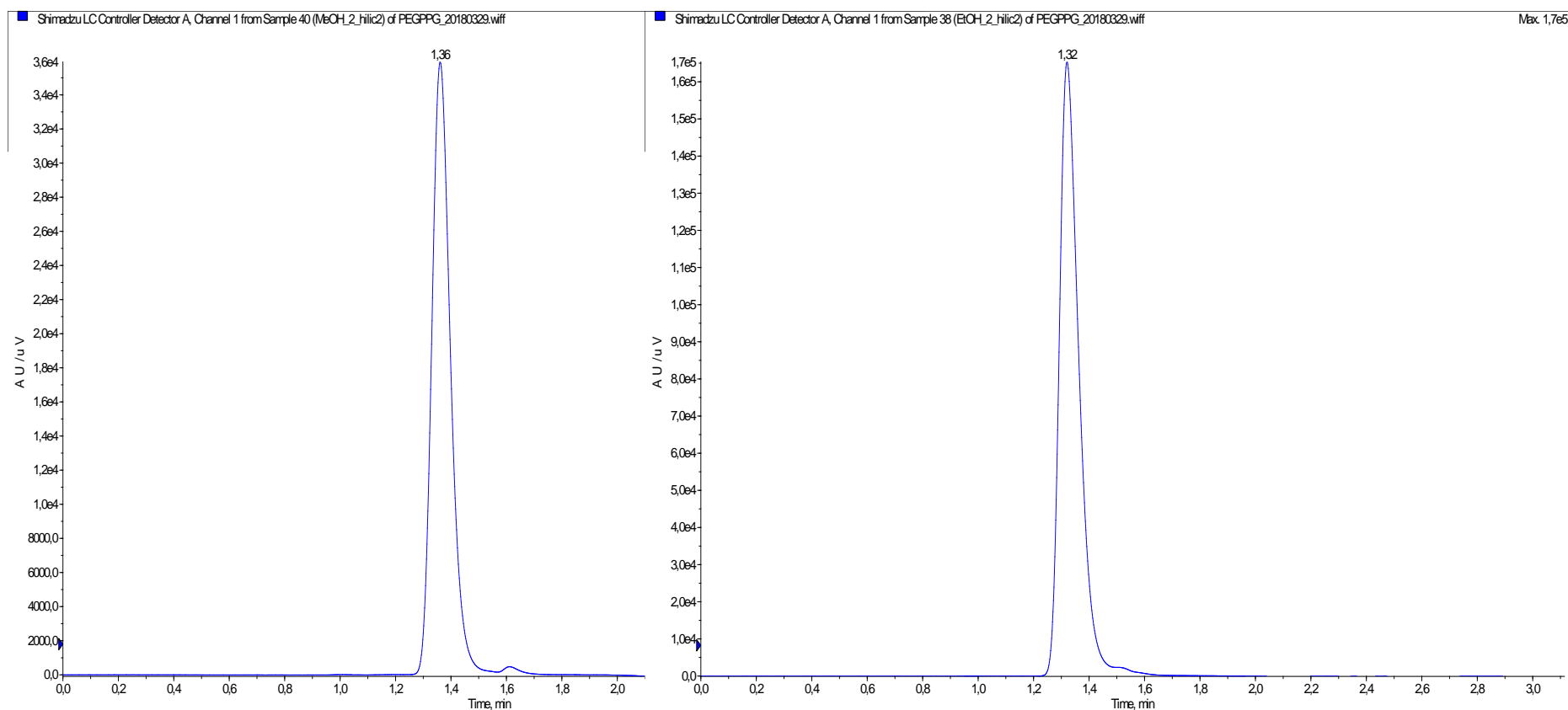
**Obrázek P 45:** Chromatogram zaznamenaný při separaci vzorku fenylisokyanátu (příprava viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7 μm) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5 μl, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



**Obrázek P 46:** Hmotnostní spektra (s navrhovanými strukturami) zaznamenaná při separaci vzorku fenylisokyanátu při 1,35 a 1,57 min (příprava viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7 µm) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5 µl, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



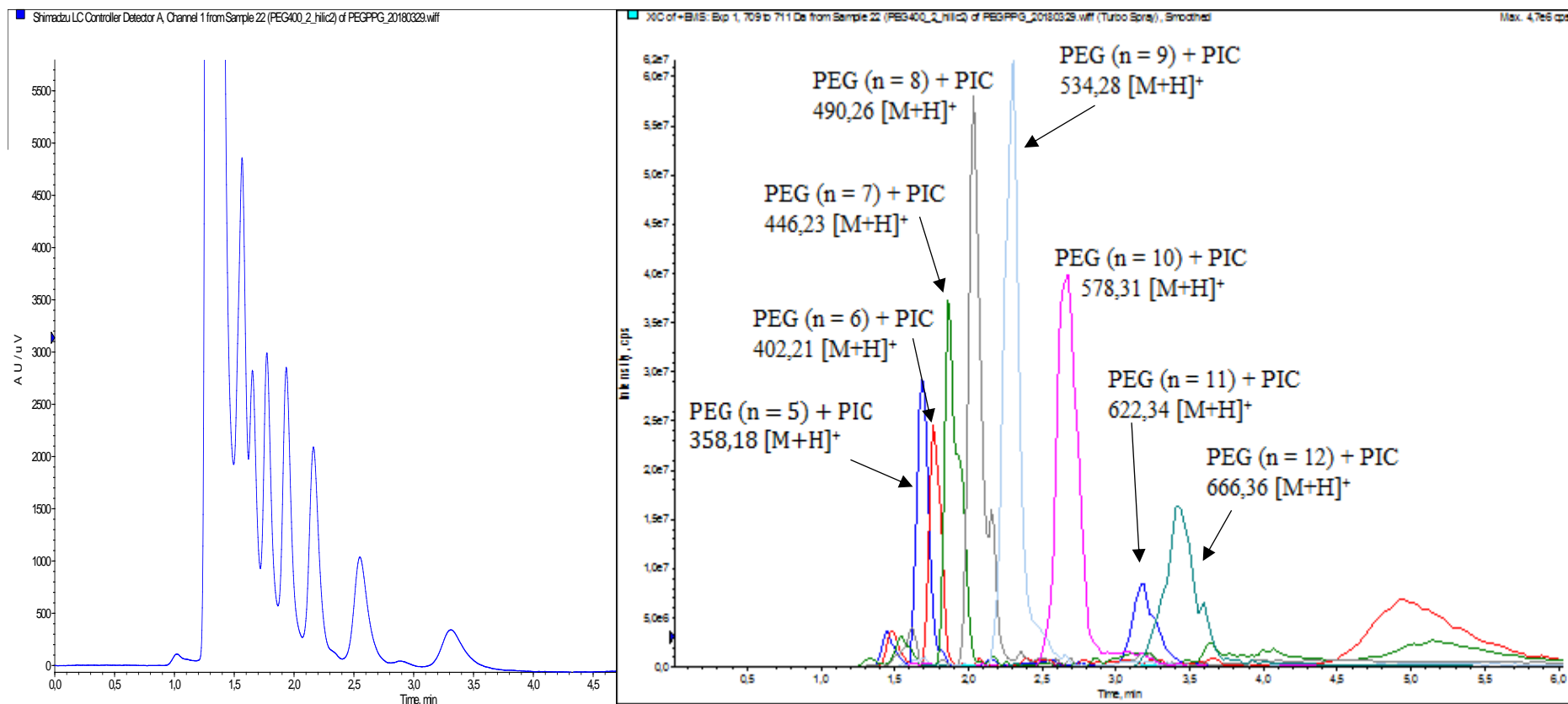
**Obrázek P 47:** Chromatogramy zaznamenané při separaci methanolu a denaturovaného ethanolu (příprava viz kapitola 2.3.1 s 2  $\mu$ l PIC) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7  $\mu$ m) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



Methanol

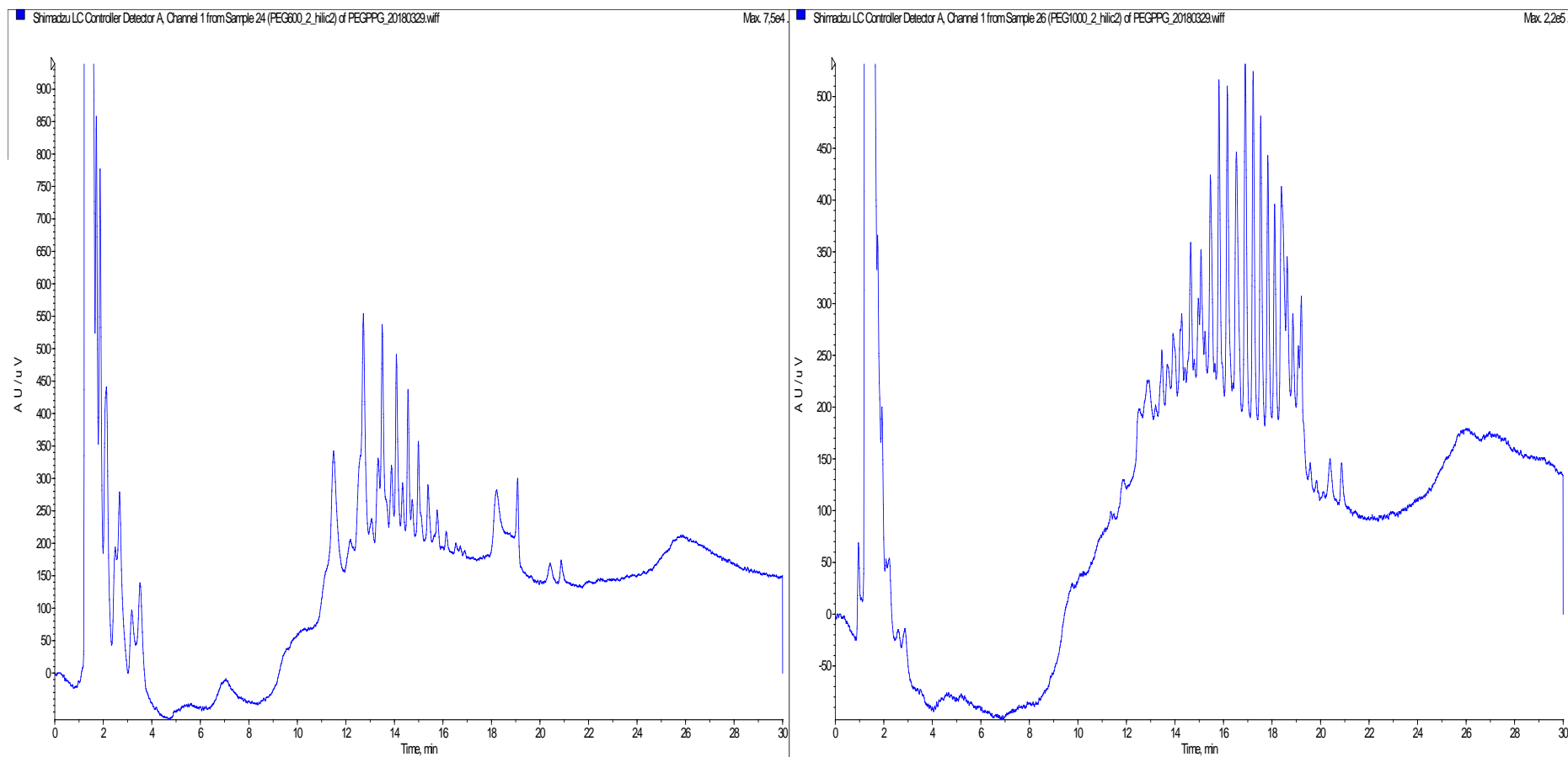
Denaturovaný ethanol

**Obrázek P 48:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PEG 400 (přípraveného postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) a rekonstruovaný iontový chromatogram při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7  $\mu$ m) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm





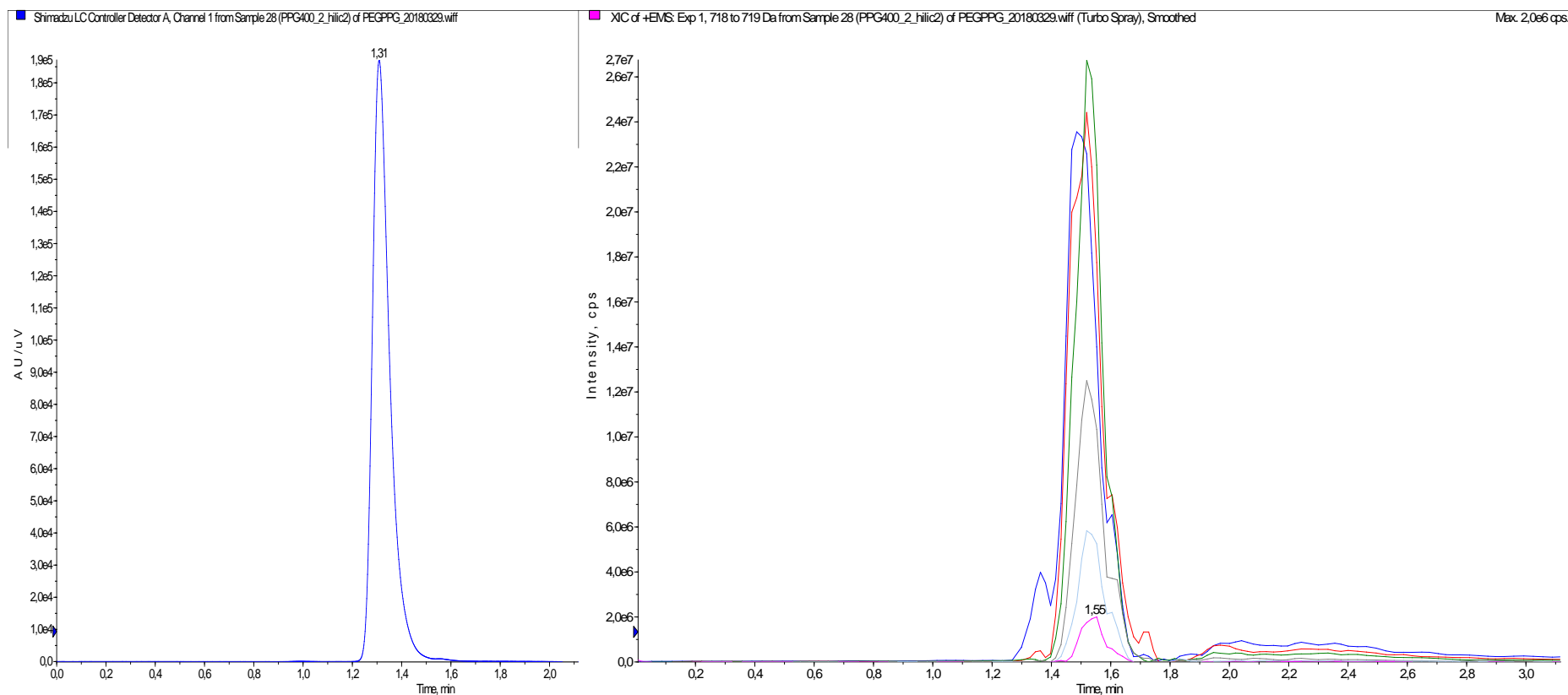
**Obrázek P 49:** Chromatogramy zaznamenané při separaci PEG 600 a PEG 1000 (připravených postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7  $\mu$ m) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



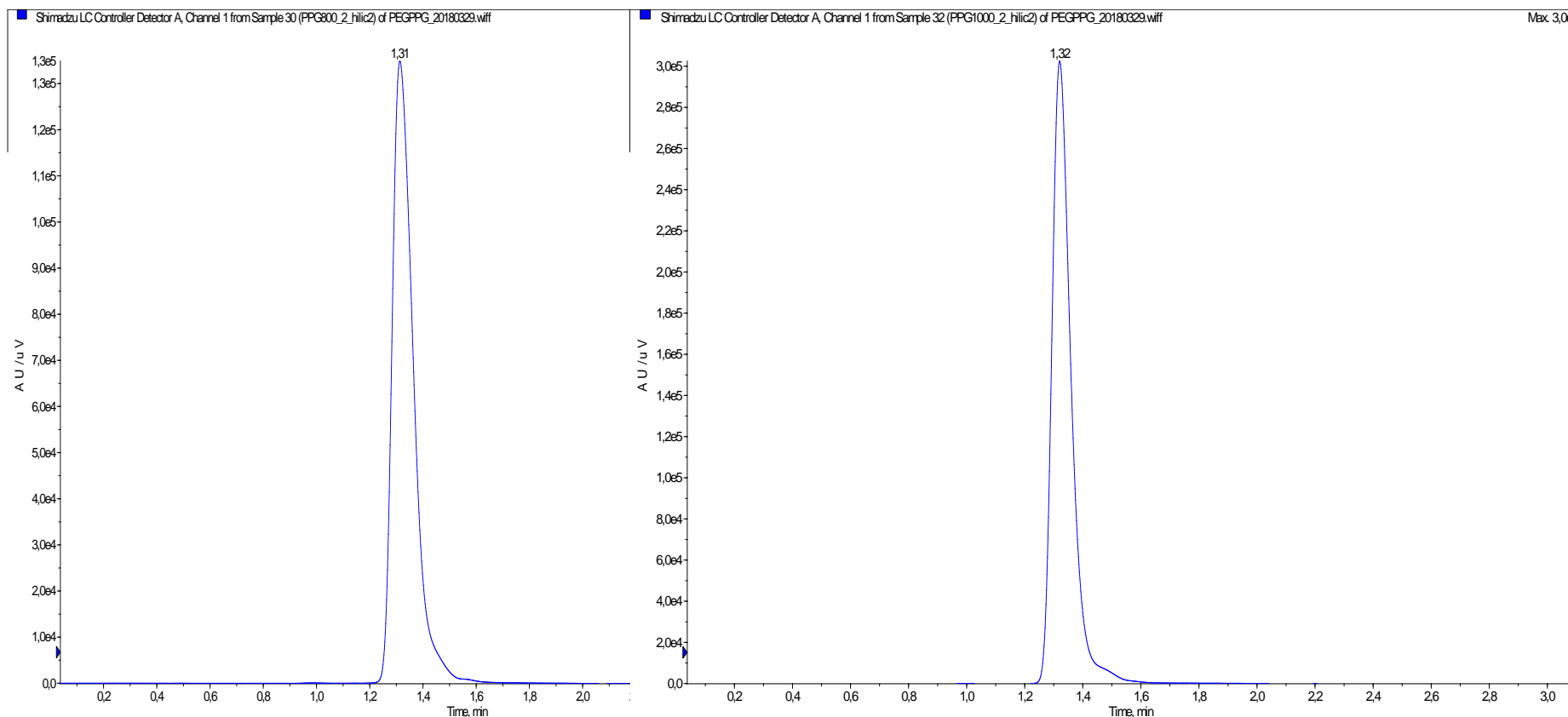
PEG 600

PEG 1000

**Obrázek P 50:** Chromatogram zaznamenaný při separaci PPG 400 (přípraveného postupem 8 s 2  $\mu\text{l}$  PIC, viz kapitola 2.3.1) a rekonstruovaný iontový chromatogram při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7  $\mu\text{m}$ ) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu\text{l}$ , průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



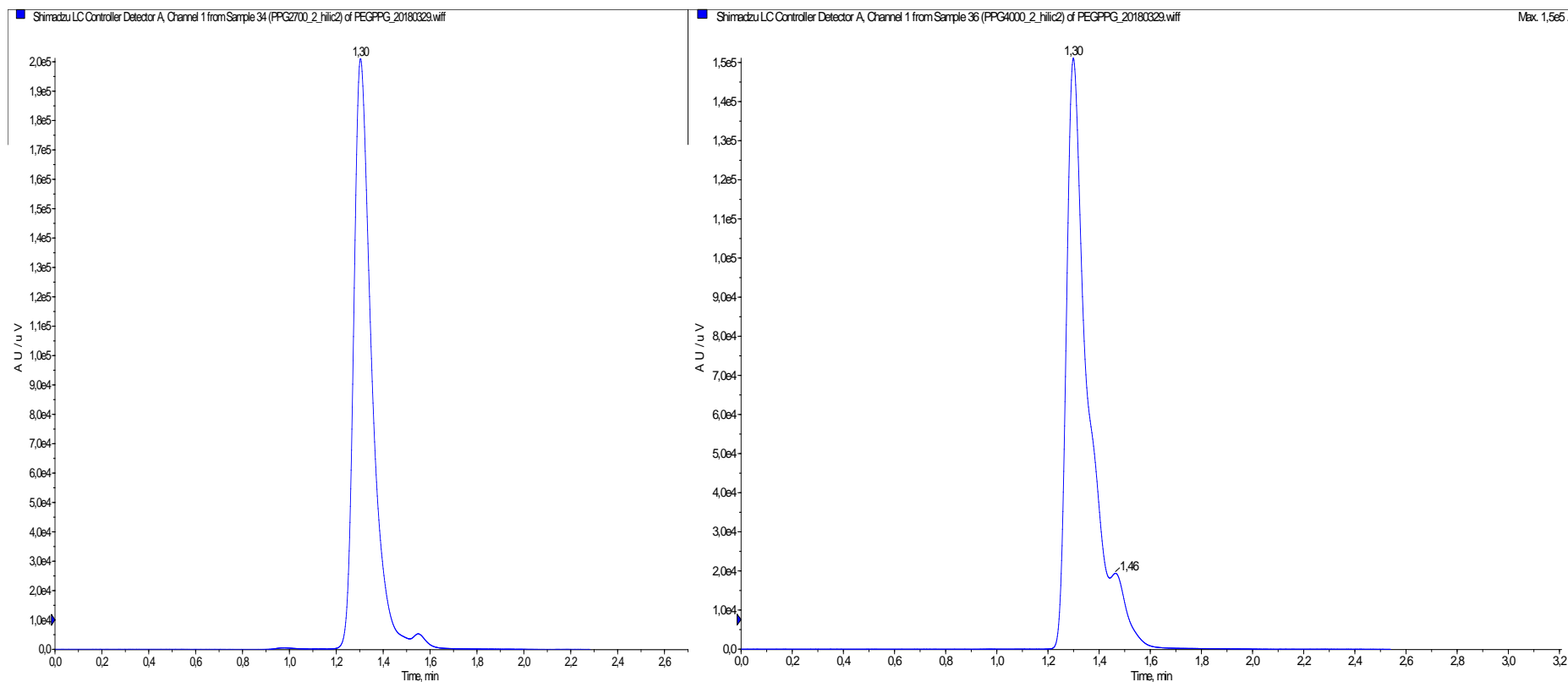
**Obrázek P 51:** Chromatogramy zaznamenané při separaci PPG 800 a PPG 1000 (připravených postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7  $\mu$ m) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



PPG 800

PPG 1000

**Obrázek P 52:** Chromatogramy zaznamenané při separaci PPG 2700 a PPG 4000 (připravených postupem 8 s 2  $\mu$ l PIC, viz kapitola 2.3.1) při gradientové eluci 99k – 50 – 99 obj. % ACN-octan amonný ve vodě (30 mmol/l) na koloně Kinetex® HILIC (10 cm x 2,1 mm s velikostí částic 1,7  $\mu$ m) v systému HILIC-MS, dávkovaný objem vzorku 0,5  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, teplota kolony 40 °C, detekce i pomocí UV detektoru při 254 nm



PPG 2700

PPG 4000