

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů
s využitím fokusační modulace

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Blažičková**
Osobní číslo: **C20525**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím fokusační modulace**
Téma práce anglicky: **Two-dimensional liquid chromatography of oxyethylenated acylglycerols with focusing modulation**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části práce stručně popište rozdělení tenzidů a možnosti jejich analýzy. Zaměřte se zejména na separační metody. V dostupné vědecké literatuře najděte a zpracujte formou literární rešerše informace týkající se dvourozměrné kapalinové chromatografie ve spojení s fokusační modulací.
2. Experimentálně stanovte parametry dvourozměrného kapalinového chromatografu – zpoždění gradientu a mimokolonové příspěvky v první a druhé dimenzi. S využitím testovací sady alkylbenzenů pro vybrané kolony v druhé dimenzi proměřte vlivy profilu gradientu na rozptýl elučních zón.
3. Pro vybrané systémy a gradienty proměřte a porovnejte celkovou dvourozměrnou separaci vzorků oxyethylenovaných acylglycerolů s běžnou modulací, a s fokusující modulací.
4. Získané výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím fokusační modulace 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 06.05.2022

Bc. Barbora Blažíčková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., za odborné vedení, ochotný přístup, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Poděkování patří i mé rodině a příteli za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá měřením neiontových oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím dvourozměrné kapalinové chromatografie bez i s použitím fokusující modulace. V rámci teoretické části byla vypracována rešerše na téma tenzidů se zaměřením na jejich rozdělení a fyzikálně chemické vlastnosti, a následně i popis 2D systému. V experimentální části byly nejprve změřeny parametry 2D systému, jako je zpoždění gradientu nebo mimokolonové příspěvky. Dále byly proměřeny vlivy různých profilů gradientu používaných ve 2D na vybrané kolony. Následně byly pomocí 2D chromatografie změřeny neiontové tenzidy Levenol® nejprve s normálním rozhraním a následně s fokusující modulací.

KLÍČOVÁ SLOVA

neiontové tenzidy, dvourozměrná kapalinová chromatografie, zpoždění gradientu, mimokolonové příspěvky, fokusující modulace

TITLE

Two-dimensional liquid chromatography of oxyethylenated acylglycerols with focusing modulation

ANNOTATION

This thesis is about measurement of nonionic oxyethylenated acylglycerols using two-dimensional liquid chromatography without and with the use of focusing modulation. In the theoretical part are described types of surfactants and their physiochemical properties and then a description of the 2D system. In the experimental part, the parameters of the 2D system, such as gradient delay or off-column contributions, were first measured. Then were measured the effects of different gradient profiles used in 2D on selected columns. After that nonionic surfactants Levenol® were measured by 2D chromatography, first with a normal interface and then with focusing modulation.

KEYWORDS

non-ionic surfactants, two-dimensional liquid chromatography, dwell volume, extra-column volume, focusing modulation

OBSAH

OBSAH.....	7
SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1 Tenzidy.....	14
1.1.1 Klasifikace tenzidů	14
1.1.2 Klasifikace tenzidů podle biodegradability	14
1.1.3 Klasifikace tenzidů podle HLB.....	15
1.1.4 Klasifikace tenzidů podle iontového charakteru.....	16
1.1.4.1 Aniontové tenzidy	16
1.1.4.2 Karboxyláty.....	16
1.1.4.3 Alkylsulfáty.....	16
1.1.4.4 Alkansulfonáty, alkensulfonáty.....	17
1.1.4.5 Alkylbenzensulfonáty	17
1.1.4.6 Fosfáty.....	18
1.1.4.7 Kationtové tenzidy	18
1.1.4.8 Amfoterní tenzidy	19
1.1.4.9 Neiontové tenzidy	19
1.1.4.10 Oxyethylenované alkoholy.....	19
1.1.4.11 Oxyethylenované alkylfenoly.....	20
1.1.4.12 Oxyethylenované mastné kyseliny	20
1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti tenzidů.....	21
1.2.1 Adsorpce	21
1.2.2 Rozpustnost.....	21
1.2.3 Micely tenzidů	22
1.2.4 Smáčení.....	22
1.2.5 Emulze	23
1.2.6 Pěna.....	23
1.2.7 Solubilizace.....	24
1.2.8 Detergence	25
1.3 Metody stanovení neiontových tenzidů	25

1.3.1	Metody skupinového stanovení	25
1.3.2	Titrační metody	26
1.3.3	Fotometrické metody	26
1.3.4	Polarografie	26
1.3.5	Elektroforéza	26
1.3.6	Plynová chromatografie	27
1.3.7	Planární chromatografie	27
1.3.8	Kapalinová chromatografie	27
1.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	28
1.4.1	Chromatografie s normálními fázemi	28
1.4.2	Chromatografie s obrácenými fázemi	28
1.4.2.1	Porézní sorbenty	28
1.4.2.2	Povrchově porézní sorbenty	28
1.4.2.3	Monolitické kolony	29
1.4.3	Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)	29
1.5	Dvourozměrná kapalinová chromatografie	29
1.5.1	Píková kapacita	30
1.5.2	Heart-cutting chromatografie	31
1.5.3	Komplexní 2D chromatografie	32
1.5.4	Off-line chromatografie	32
1.5.5	On-line chromatografie	32
1.5.6	Gradientová eluce ve 2D	32
1.5.7	Dávkovací ventil	34
1.5.7.1	Rozhraní smyčky	34
1.5.7.2	Standardní modulace	35
1.5.7.3	Fokusující modulace	35
1.5.7.4	Aktivní modulace rozpouštědlem	36
1.5.7.5	Stop-flow rozhraní	37
1.5.7.6	Rozhraní s plněnou smyčkou	37
1.5.7.7	Paralelní druhá dimenze	38
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
2.1	Zařízení a přístroje pro 2D chromatografii	39
2.2	Použité kolony	39
2.3	Použité chemikálie	40
2.4	Tenzidy Levenol®	40

2.5	Příprava mobilních fází	41
2.6	Podmínky pro měření zpoždění gradientu	41
2.7	Podmínky pro měření mimokolonových objemů.....	42
2.8	Podmínky pro charakterizaci používaných kolon	42
2.9	Měření profilu FSM	44
2.10	Příprava vzorku	45
2.11	Podmínky pro analýzu tenzidů ve 2D	45
3	Výsledky a diskuse	48
3.1	Zpoždění gradientu.....	48
3.2	Mimokolonové objemy	51
3.3	Charakterizace používaných kolon	54
3.4	Měření s FSM.....	65
3.5	Analýza tenzidů ve 2D	67
3.5.1	Bez rozhraní FSM.....	67
3.5.2	S rozhraním FSM.....	70
4	ZÁVĚR.....	73
5	BIBLIOGRAFIE	74
	PŘÍLOHY	79

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Schématická struktura tenzidu [2].....	14
Obrázek 2 Vznik a rozpad micely [16].....	22
Obrázek 3 Typy emulzí [18].....	23
Obrázek 4 Schématické zobrazení solubilizačních míst [21].....	25
Obrázek 5 Schéma 2D chromatografu [30].....	30
Obrázek 6 Porovnání izokratické (A) a gradientové eluce (B) [30].....	31
Obrázek 7 Gradienty ve 2D kapalinové chromatografii [37].....	34
Obrázek 8 Asymetrická a symetrická konfigurace rozhraní [42].....	35
Obrázek 9 Rozhraní s fokusující modulací [39].....	36
Obrázek 10 Rozhraní s aktivní modulací rozpouštědlem [42].....	37
Obrázek 11 Schéma rozhraní s plněnou smyčkou [42].....	38
Obrázek 12 Schéma paralelního nastavení 2D [40].....	38
Obrázek 13 Předpokládaná struktura oxyethylenovaných glycerolů [52].....	41
Obrázek 14 Zapojení FSM.....	47
Obrázek 15 Záznam 2D chromatogramu tenzidu Levenol® F-200 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C.....	68
Obrázek 16 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-201 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C.....	69
Obrázek 17 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-301 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C.....	69
Obrázek 18 Záznam chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-421 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C.....	70
Obrázek 19 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® F-200 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 encapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55 °C.....	71
Obrázek 20 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-201 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55°C.....	71

Obrázek 21 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-301 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55 °C	72
Tabulka 1 Hodnoty HLB podle aplikačního použití [6]	15
Tabulka 2 Použité kolony ve druhé dimenzi	39
Tabulka 3 Gradient FIFa	43
Tabulka 4 Gradient FIFb	43
Tabulka 5 Gradient SIFa	43
Tabulka 6 Gradient SIFb	43
Tabulka 7 První použitý gradient ve 2D	44
Tabulka 8 Druhý použitý gradient ve 2D	44
Tabulka 9 Třetí použitý gradient ve 2D	44
Tabulka 10 Gradient ve 2D typ 1	45
Tabulka 11 Gradient ve 2D typ 2	45
Tabulka 12 Gradient v 1D	45
Tabulka 13 Vypočtená zpoždění gradientu pro obě čerpadla při všech průtocích	49
Tabulka 14 Gradient mobilní fáze pro měření stupňovité změny gradientu	49
Tabulka 15 Měření mimokolonových objemů při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H ₂ O, teplota 30 °C	52
Tabulka 16 Vypočtené mimokolonové objemy pro obě čerpadla při všech měřených průtocích	53
Tabulka 17 Píková kapacita a ředění všech kolon při všech měřených průtocích s gradientem FIFa a FIFb (viz Tabulky 3 a 4)	58
Tabulka 18 Píková kapacita a ředění všech kolon při všech měřených průtocích s gradientem SIFa a SIFb (viz Tabulky 5 a 6)	59

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

1D-LC	Jednorozměrná kapalinová chromatografie
2D-LC	Dvourozměrná kapalinová chromatografie
ASM	Aktivní modulace rozpouštědlem
BSK	Biologická spotřeba kyslíku
cHLB	Kritická hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy
CMC	Kritická micelární koncentrace
EO	Ethoxylované jednotky
FIF	Full in fraction gradient
FSM	Fokusující modulace
GC	Plynová chromatografie
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LABS	Lineární alkylbenzensulfonáty
LC	Kapalinová chromatografie
LC-LC	Heart-cutting chromatografie
LCxLC	Komplexní chromatografie
MF	Mobilní fáze
NP-HPLC	Chromatografie s normálními fázemi
PAL	Povrchově aktivní látky
RP-HPLC	Chromatografie s obrácenými fázemi
SDS	Sodium dodecyl sulfát
SF	Stacionární fáze
SG	Shifted gradient
SIF	Segment in fraction gradient
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UV	Ultrafialové záření

ÚVOD

Tenzidy, označované také jako povrchově aktivní látky, jsou látky, které jsou běžnou součástí detergentů a čistících prostředků. Tenzidy se dají rozdělit do čtyř kategorií: aniontové, kationtové, amfoterní a neiontové. Kvůli tomu, že spousta tenzidů je toxická nebo špatně biologicky rozložitelná, se začali vyrábět ekologické neiontové tenzidy z přírodních surovin, které jsou netoxické a snadno rozložitelné.

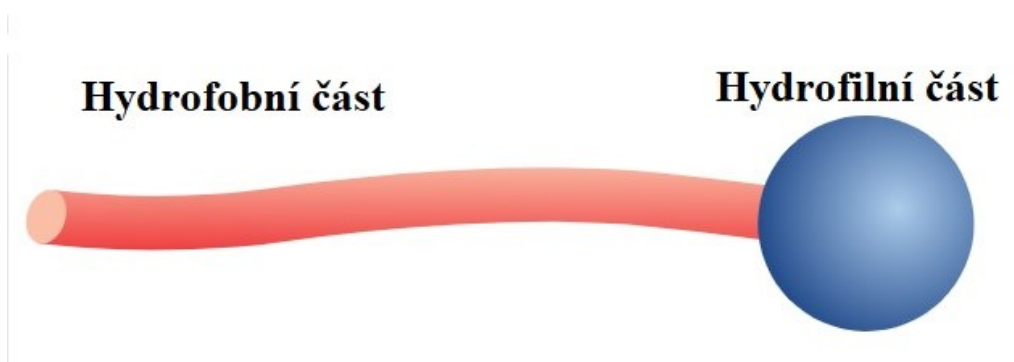
K analýze neiontových tenzidů byla v této diplomové práci použita dvourozměrná kapalinová chromatografie. Ve 2D LC vzorek projde dvěma různými separačními systémy, kde jsou použité různé mobilní fáze a různé kolony. Celková separace 2D LC je účinnější, než běžná HPLC separace. Pro přenos mezi první a druhou dimenzí se využívá rozhraní, které může být různě modifikováno za účelem lepší separace.

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat parametry dvourozměrného kapalinového chromatografu, jako je zpoždění gradientu nebo mimokolonové příspěvky. Následně se porovnávaly vlivy různých profilů gradientu používaných ve 2D chromatografii na kolony používané ve 2D. Jako poslední byla provedena analýza čtyř neiontových tenzidů Levenol® na pěti různých kolonách ve druhé dimenzi, se čtyřmi různými profily gradientu. Po vybrání nejlepších podmínek byla testována analýza neiontových tenzidů s rozhraním fokusující modulace.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Tenzidy

Tenzidy, označované také jako povrchově aktivní látky (PAL) jsou organické látky, které se už při velmi nízké koncentraci hromadí na mezifázovém rozhraní a tím snižují volnou mezifázovou energii soustavy. Tato schopnost je způsobena amfifilní strukturou tenzidů. Amfifilní struktura znamená, že tenzidy obsahují jak hydrofilní část, která má velkou afinitu k vodě, tak hydrofobní část, která má velkou afinitu k nepolárním rozpouštědlům (viz Obrázek 1) [1].



Obrázek 1 Schématická struktura tenzidu [2]

1.1.1 Klasifikace tenzidů

Klasifikace tenzidů je možná z několika pohledů, např.:

- Na základě jejich hydrofobní složky,
- Na základě iontového charakteru,
- Na základě hodnoty HLB,
- Na základě aplikačního použití,
- Na základě biodegradability,
- Na základě systematiky organických sloučenin [3].

V dalších kapitolách jsou popsány klasifikace podle biodegradability, podle hodnoty HLB a podle iontového charakteru.

1.1.2 Klasifikace tenzidů podle biodegradability

Biologická rozložitelnost vybraných tenzidů se posuzuje podle biologické spotřeby kyslíku (BSK) nebo podle výsledku biologického rozkladu aktivovaným kalem a reakcí na methylenovou modř. Podle těchto zkoušek se tenzidy rozdělují na:

- Lehko biologicky rozložitelné, tzv. měkké tenzidy,
- Středně biologicky rozložitelné, tzv. odbouratelné tenzidy,
- Těžko odbouratelné tenzidy, tzv. tvrdé tenzidy [3].

1.1.3 Klasifikace tenzidů podle HLB

V roce 1949 Griffin definoval hodnotu HLB jako rovnovážný poměr mezi hydrofilní a lipofilní částí molekuly. Poměr polárních skupin a nepolárního zbytku určuje afinitu molekuly tenzidu k vodě a k slabě polárním organickým rozpouštědlům. Poměr těchto afinit představuje hydrofilně-lipofilní rovnováhu sloučeniny a je vyjádřený bezrozměrným číslem [3].

Číslo HLB je tedy index afinity povrchově aktivní látky k rozpouštědлу. Např. vysoké číslo HLB znamená, že povrchově aktivní látka je více přitahována vodou (tzn. je rozpustná ve vodě) [4]. Použití dvou nebo více PAL s různými hodnotami HLB je běžné např. při výrobě emulzí [5].

Podle Griffinova rozdělení HLB bude směs nemísitelných kapalin, jako je olej a voda, považována za stabilní pouze tehdy, pokud hodnota HLB směsi PAL dosáhne optimálního skóre, kterému se říká kritická hodnota HLB (cHLB). cHLB závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech olejové fáze [5].

Neiontovým tenzidům je přiřazována hodnota 0-20. Podle hodnoty HLB se tenzidy rozdělují na emulgátory, smáčedla, detergenty a solubilizátory, viz Tabulka 1 [3].

Tabulka 1 Hodnoty HLB podle aplikačního použití [6]

Hodnota HLB	Aplikační použití
4-6	Emulgátory voda v oleji
7-15	Smáčedla
8-18	Emulgátory olej ve vodě
10-15	Detergenty
10-18	Solubilizátory

1.1.4 Klasifikace tenzidů podle iontového charakteru

Tenzidy jsou rozdělovány na iontové a neiontové. Iontové tenzidy se dále dělí na aniontové povrchově aktivní látky, kde se hydrofilní skupina disociuje na anionty ve vodných roztocích, kationtové povrchově aktivní látky, které se disociují na kationty a amfoterní povrchově aktivní látky, které se disociují na anionty a kationty, často v závislosti na pH. Neiontové tenzidy nedisociují na ionty ve vodných roztocích a jejich další rozdělení závisí na typu hydrofilní skupiny [7].

1.1.4.1 Aniontové tenzidy

Aniontové tenzidy jsou nejpoužívanější skupinou tenzidů v průmyslové aplikaci, a to díky jejich relativně nízké ceně a praktickému použití v jakémkoliv typu detergentu. Pro optimální detergenční účinek je hydrofobní řetězec lineární alkylová skupina s délkou řetězce 12–16 atomů uhlíku. Polární skupina je na konci řetězce. Lineární řetězce jsou upřednostňovány kvůli větší efektivitě a lepší degradaci než řetězce rozvětvené [8]. Ve vodném roztoku nesou aniontové tenzidy záporný náboj. Ionizovanou částí bývá nejčastěji karboxylát, sulfát, sulfonát nebo fosfát [9].

1.1.4.2 Karboxyláty

Jedná se o jedny z nejstarších tenzidů, jelikož tvoří mýdla [8]. Mýdla jsou soli vyšších alifatických kyselin s lineárním řetězcem. Obecná struktura mýdel je RCOONa nebo RCOOK [10]. Mýdla jsou vyráběna z řady tuků a olejů, jako například živočišný lůj, palmový nebo kokosový olej [11]. Jsou připravovány zmýdlením triglyceridů olejů a tuků. Hlavní výhodou mýdel je jejich nízká cena, lehká biologická rozložitelnost a nízká toxicita. Jejich největší nevýhodou je srážení ve vodě obsahující dvojmocné ionty jako Ca^{2+} nebo Mg^{2+} . Aby se předešlo jejich srážení, jsou karboxyláty modifikovány přidáním hydrofilního řetězce, např. na ethoxy karboxyláty, estery karboxylátů obsahující hydroxyl nebo více COOH skupin apod [8]. Přídavkem ethoxylátové skupiny dojde ke zvýšené rozpustnosti ve vodě a vylepšení chemické stability. Modifikované ethery jsou kompatibilnější s elektrolyty a dalšími neiontovými nebo amfoterními tenzidy. Karboxylové estery jsou rozpustné ve vodě, ale podléhají hydrolýze [12]. Mýdlo se používá jednak jako toaletní mýdlo pro osobní potřebu, jednak jako součást tekutých i práškových pracích prostředků [1].

1.1.4.3 Alkylsulfáty

Alkylsulfáty jsou největší a nejdůležitější skupinou syntetických tenzidů [12]. Vyrábějí se sulfatací vyšších alifatických alkoholů s řetězcem C8-C18 za vzniku primárních alkylsulfátů

s obecným vzorcem $R-CH_2-O-SO_3Na$. Sulfoskupina je vázaná na uhlík alkyly přes kyslík, díky čemuž je tato esterová vazba snadno hydrolyzovatelná [10].

Vlastnosti sulfátových tenzidů záleží na alkylovém řetězci a sulfátové skupině. Alkylsulfáty solí alkalických kovů jsou dobře rozpustné ve vodě, ale jsou ovlivňovány přítomností elektrolytů. Nejběžnější sulfátový tenzid je *sodium dodecyl sulfát* (zkráceně SDS, označováno také jako *sodium lauryl sulfát*), který je široce používán v průmyslových aplikacích. Alkylové sulfáty mají dobrou pěnovost s optimální délkou řetězce C12-C14 [8].

Stejně jako karboxyláty jsou i sulfáty chemicky modifikovány, aby došlo ke změně jejich vlastností. Nejpoužívanější modifikací je dodání oxyethylenové skupiny do řetězce. Sulfátové ethery jsou také stabilnější, než alkoholy [12].

Sodné alkylsulfáty je možné použít ve vlasových šamponech společně s betainy, používají se i v kapalných pracích a mycích prostředcích v kombinaci s neiontovými tenzidy [1].

1.1.4.4 Alkansulfonáty, alkensulfonáty

Alkansulfonáty a alkensulfonáty mají vazbu $-C-S-$, která nepodléhá hydrolyze, sulfoskupina je vázaná přímo na uhlík alkyly. Jedná se o směs homologů s lineárním alkylovým řetězcem a s blíže neurčeným počtem sulfoskupin v molekule. Alkylsulfonáty s přímým alkylem jsou biologicky snadno rozložitelné [10].

Alkansulfonáty se vyrábějí sulfochlorací nebo sulfooxidací. Při sulfooxidaci je vyrobená alkansulfonová kyselina, která se neutralizuje roztokem NaOH, následně se odpaří nezreagovaný alkan a voda, a získá se produkt obsahující 60-65 % alkansulfonátů [1].

1.1.4.5 Alkylbenzensulfonáty

Lineární alkylbenzen sulfonáty (tzv. LABS) mají délku alkylového řetězce od C8 do C15. Jejich vlastnosti jsou nejvíce ovlivňovány průměrnou molekulovou hmotností [8].

Alkylbenzensulfonáty se vyrábějí sulfonací alkylbenzenů oxidem sírovým, neutralizací alkylbenzensulfonové kyseliny vzniká sodná sůl – *natrium alkylbenzensulfonát*. Alkylbenzeny s rozvětveným alkylem jsou jen těžko biologicky rozložitelné, proto se pro výrobu používají pouze alkyly lineární. Jsou stabilní v alkalickém i kyselém prostředí [1].

Alkylbenzensulfonáty s alkylovým řetězcem C12-C14 jsou základní tenzidy v práškových pracích prostředcích. Pro kapalně prací prostředky jsou vhodnější alkylbenzensulfonáty s alkylem C9-C11 [1].

1.1.4.6 Fosfáty

Alkylfosfáty i arylfosfáty jsou vyráběny reakcí mastných kyselin nebo ethoxylátů s fosforylačním činidlem, obvykle s oxidem fosforečným P₄O₁₀ [12]. Výsledkem reakce je směs mono a diesterů. Poměr mezi estery je podmíněn poměrem výchozích látek a množstvím přítomné vody v reakční směsi. Fyzikálně-chemické vlastnosti alkylfosfátů závisí na poměru esterů [8].

Fosfáty jsou stabilní v alkalickém i kyselém prostředí, jsou rozpustné ve vodě. Používají se jako emulgátory v kosmetických emulzích [1]. Jsou používány při zpracování kovů díky jejich antikorozním vlastnostem [12].

1.1.4.7 Kationtové tenzidy

Mezi nejběžnější kationtové tenzidy patří kvartérní amoniové soli s obecným vzorcem RR'R''N⁺X⁻, kde X⁻ bývá většinou chloridový ion a R reprezentuje alkylovou skupinu [12]. Jsou vyráběny reakcí odpovídajícího terciálního aminu s organickým halidem nebo sulfátem [8].

Kationtové tenzidy jsou obecně rozpustné ve vodě, pokud je v molekule jeden dlouhý alkylový řetězec. Pokud má molekula dva řetězce, stává se rozpustnou v organických rozpouštědlech. Kationtové tenzidy jsou stabilní při různých hodnotách pH [8]. Kationtové tenzidy mají dobré dezinfekční účinky a na rozdíl od aniontových nebo neiontových tenzidů nemají smáčecí ani detergenční účinky [10].

Kationtové tenzidy jsou obsaženy v avivážních prostředcích, která po praní syntetická vlákna antistaticky upravují a vykazují i významný mikrobicidní prvek. Oproti aniontovým tenzidům jsou hůře biologicky rozložitelné [13]. Optimální avivážní efekt mají ty kationtové tenzidy, které obsahují dva alkyly s C18 a dva krátké alkyly (např. methyl) – příkladem je *dimethyldistearylamonium chlorid*. K dosažení lepší biologické rozložitelnosti byly klasické kvartérní amoniové soli nahrazeny tzv. estquaty – zástupcem je *hydroxyethyl-methyl-bis(stearoyloxyethyl)amonium-methosulfát*. V běžných prostředcích se jeho koncentrace pohybuje kolem 5 % [13].

Kationtové a aniontové tenzidy není možné v přípravcích kombinovat, jelikož se vzájemně srážejí na nerozpustné aglomeráty [13].

1.1.4.8 Amfoterní tenzidy

Tyto tenzidy obsahují jak kationtovou, tak aniontovou skupinu [8]. Obvykle jde o skupinu obsahující buď dusíkový atom a karboxylovou skupinu či sulfoskupinu [10]. Amfoterní tenzidy s karboxylovou skupinou se dělí na aminokyseliny, obsahující primární, sekundární a terciární aminovou skupinu, a na betainy s kvartérní amoniovou skupinou [1]. Amfoterní tenzidy jsou občas popisovány jako *zwitterionic* molekuly. Jsou rozpustné ve vodě a jsou výborně mísitelné s ostatními tenzidy, jsou chemicky stabilní [8].

Hlavní vlastností amfoterních tenzidů je jejich závislost na pH roztoku, ve kterém jsou rozpouštěny. V prostředí s kyselým pH získává molekula pozitivní náboj a chová se jako kationtový tenzid, v zásaditém pH získá molekula negativní náboj a chová se jako aniontový tenzid [12].

Alkylpolyglykolsulfáty v kombinaci s betainem tvoří základ víceméně všech kosmetických mycích přípravků – vlasové i tělové šampony, tekutá mýdla nebo koupelové pěny. Používají se také jako tenzidy v mycích prostředcích na nádobí. Betain v těchto prostředcích stabilizuje pěnivost, snižuje dráždivost kůže a působí jako regulátor viskozity. V kombinaci se zahušťováním chloridem sodným se díky regulaci viskozity mohou vyrábět přípravky s nižším obsahem tenzidů [13].

1.1.4.9 Neiontové tenzidy

Neiontové tenzidy v molekule neobsahují žádný náboj, hydrofilní skupina v molekule tenzidu vytváří s vodou vodíkové můstky, ale neionizuje se. Mohou se rozdělit na dvě skupiny – na polyhydroxysloučeniny a na oxyethylenáty. Neiontové tenzidy je možné kombinovat vzájemně mezi sebou, ale i s aniontovými, kationtovými i amfoterními tenzidy [1].

Nejběžnější neiontové tenzidy jsou ty založené na ethylen oxidu, označované jako oxyethylenové tenzidy. Mezi ně se řadí oxyethylenované alkoholy, oxyethylenované alkylfenoly, oxyethylenované mastné kyseliny, atd [8].

1.1.4.10 Oxyethylenované alkoholy

Obecně jsou vyráběny ethoxylací mastného řetězce alkoholu jako je např. dodekanol. Rozpustnost oxyethylenovaných alkoholů závisí na délce alkylového řetězce a na počtu oxyethylenových jednotek v molekule [8].

Molekuly s průměrnou délkou řetězce C12, které obsahují více než 5 oxyethylenových (EO) jednotek jsou běžně rozpustné ve vodě při pokojové teplotě [12]. Avšak jak teplota roztoku vstoupně roste, začíná být roztok zakalený. Teplota, při které k tomu dochází, se nazývá bod zákalu [8]. Čím větší je počet EO jednotek v molekule, tím vyšší teplota je potřeba, aby došlo k bodu zákalu. Neiontové tenzidy vykazují nejvyšší povrchové napětí blízko bodu zákalu. K oddálení bodu zákalu se dá do roztoku přidat malé množství aniontového tenzidu [12]

Oxyethylenované alkoholy jsou jedny ze základních tenzidů pro práškové a tekuté prací prostředky. Používají se jako emulgátory do kosmetických přípravků. Další využití mají jako odpěňovače a smáčedla v papírenském průmyslu. Používají se také jako emulgátory pro herbicidy a pesticidy [1].

1.1.4.11 Oxyethylenované alkylfenoly

Jsou připravovány reakcí ethylen oxidu s odpovídajícím alkyl fenolem. Nejběžnější tenzidy tohoto typu jsou připravovány z nonylfenolu [12]. Jsou levné na výrobu, ale nejsou dobře biologicky rozložitelné a jsou potenciálně toxické. I přesto jsou stále oxyethylenované nonylfenoly používány v průmyslové výrobě, a to hlavně díky tomu, že jsou rozpustné ve vodných i nevodných roztocích, jsou dobře emulzifikovatelné a mají dobré disperzní vlastnosti [8].

Oxyethylenované alkylfenoly jsou vhodné do mycích prostředků pro mytí průmyslových aparatur. Po použití by tyto prostředky neměly přijít do vodovodních odpadů, kvůli téměř nemožnému rozkladu, ale měly by se spalovat ve spalovnách [1].

1.1.4.12 Oxyethylenované mastné kyseliny

Jsou vyráběny reakcí ethylen oxidu a mastné kyseliny nebo polyglykolu. Obecný vzorec je $\text{RCOO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$. Pokud je použit k výrobě polyglykol, produktem je směs mono a diesterů [12] Monoestery jsou mnohem lépe rozpustné ve vodě než diestery. Tyto tenzidy podléhají hydrolýze ve vysoce zásaditých roztocích [8]. Oxyethylenované mastné kyseliny se používají v avivážních prostředcích, a jako emulgátory v kosmetice a farmacii [1].

Kromě oxyethylenátů se do neiontových tenzidů řadí také polyhydroxysloučeniny, které mají hydrofobní i hydrofilní část z obnovitelných surovin. Alkylpolyglykosidy jsou rychle a dokonale biologicky rozložitelné, používají se v mycích a čistících prostředcích jako tenzidy a v kosmetických emulzních prostředcích jako emulgátory [13].

1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti tenzidů

Fyzikálně chemické vlastnosti jsou dány protichůdným chováním hydrofobních a hydrofilních skupin. Hydrofobní skupiny se s molekulami vody vzájemně odpuzují, a naopak hydrofilní skupiny se s molekulami vody přitahují. Výsledkem toho je, že se molekuly tenzidu adsorbují na fázovém rozhraní a jednotlivé molekuly se spojují do micel [1].

1.2.1 Adsorpce

Charakteristickou vlastností tenzidů je jejich adsorpce z roztoku na rozhraní kapalina – plyn, kapalina – kapalina nebo kapalina – pevná látka. Účinkem sil v povrchu se zvyšuje koncentrace molekul rozpuštěné látky na fázovém rozhraní, kde se díky tomu výrazně mění jeho vlastnosti. Nejvýrazněji se to projevuje ve změně povrchového a mezipovrchového napětí [3].

Adsorpce tenzidů je do značné míry řízena třemi faktory, které souvisejí s danými materiály. Jako první je to chemická povaha látky, která se adsorbuje, včetně typu tenzidu (aniontový, kationtový nebo neiontový) a hydrofobní skupiny (délka a typ řetězce, stupeň větvení atd.) Dalším faktorem je povaha pevného povrchu, na který je tenzid adsorbován (polárnost apod.) a jako poslední je to povaha kapalného prostředí (hodnota pH, obsah elektrolytu, teplota atd.). Nepatrná změna jednoho z těchto faktorů může vést k velké změně adsorpční schopnosti systému [14].

1.2.2 Rozpustnost

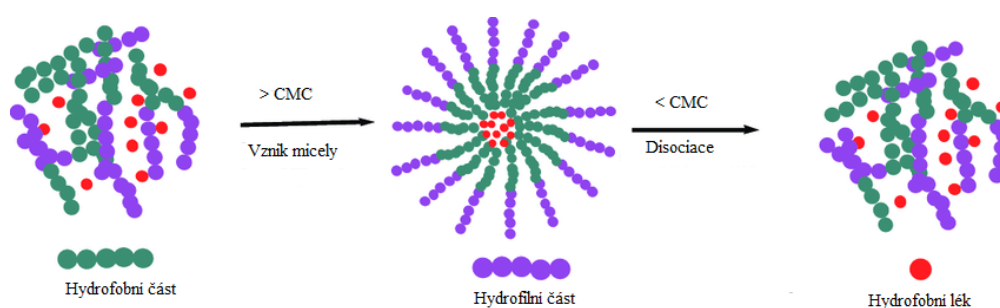
Rozpustnost patří mezi nejdůležitější vlastnosti tenzidů. Pro použití v komerčních kapalných prostředcích musí být rozpustné tak, aby byl přípravek připraven jako koncentrát, který se při použití může ředit až o tři řády. Struktura hydrofilní a hydrofobní části molekuly má vliv na rozpustnost tenzidu, stejně jako teplota, její vliv je ale odlišný pro iontové a neiontové tenzidy [1]. Rozpustnost tenzidů v polárních rozpouštědlech se zvětšuje s převahou hydrofilní části tenzidu a naopak, což souvisí s hodnotou HLB [3].

Rozpustnost závisí na typu chemické struktury tenzidů. Lipofilní část kromě délky řetězce má vliv na rozpustnost i tvarem a výskytem dvojných vazeb – rozvětvenost a přítomnost dvojných vazeb rozpustnost tenzidů zlepšuje. Rozpustnost iontových tenzidů ve vodě se zvyšuje s vyšší teplotou. Závislost rozpustnosti na teplotě není lineární, na křivkách je inflexní a označuje se jako tzv. Krafftův bod. Krafftův bod je teplotní interval, ve kterém se průhledný roztok mýdel nebo některých iontových tenzidů ochlazením zakalí. Vyšší rozpustnost od Krafftova bodu je podmíněna vznikem micel [3].

Se zvyšující se teplotou se snižuje pevnost interakce hydrofilní části molekuly s vodou. Rozpustnost neiontového tenzidu se sníží tak, že vzniknou dvě fáze – jedna obsahuje více tenzidu a druhá více vody. Čiré roztoky se při zahřátí zakalí a z roztoku se oddělí nová kapalná fáze. Teplota, při které vzniká zákal se nazývá teplota zákalu. Čím vyšší je teplota, tím hydrofobnější jsou neiontové tenzidy [1].

1.2.3 Micely tenzidů

Jednou z nejvýraznějších vlastností tenzidů je, že pokud dosáhnou určité koncentrace, začnou se molekuly tenzidů asociovat a tvořit micely (nejčastěji kulové). Koncentrace tenzidů, kdy se začnou tvořit micely se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC) [15].



Obrázek 2 Vznik a rozpad micely [16]

Kritická micelární koncentrace se zvyšuje s hodnotu HLB [3]. CMC aniontových a amfoterních tenzidů je obvykle 1-10 mmol/l, kationtových 10-50 mmol/l a neiontových 0,01-0,1 mmol/l [1].

Tvar micel závisí na koncentraci tenzidů v roztoku, na chemické struktuře molekuly tenzidu a na koncentraci přítomného elektrolytu [1]. Mezi specifické micelární struktury patří sférické micely, cylindrické micely, lamelární micely nebo inverzní micely [17].

1.2.4 Smáčení

Smáčením rozumíme vytvoření nového fázového rozhraní tuhé a kapalně fáze na místo původního fázového rozhraní tuhé a plynné fáze. Smáčení závisí na mnoha faktorech, kde rozhodující úlohu má především povrchové napětí kapaliny a dá se charakterizovat jako tendence kapaliny rozprostírat se na povrchu tuhé fáze. Smáčení tuhého povrchu kapalinou je důsledek silového působení mezi tuhou a kapalnou fází [3].

Obvykle nejlepšími smáčedly jsou středně rozpustné tenzidy s délkou řetězce C12. Tenzidy, které mají hydrofilní skupinu uprostřed hydrofobní části, mají lepší vlastnosti, příkladem je *natrium-alkansulfonát* [1].

1.2.5 Emulze

Emulze je disperzní soustava, ve které je disperzní prostředí i dispergovaná částice kapalinou. Emulze vzniká dispergováním malých kapek jedné kapaliny v druhé, které se navzájem mísí jen omezeně nebo vůbec. Podle velikosti kapek rozlišujeme emulze koloidní nebo hrubě dispergované. Nejčastější je typ hrubě dispergovaných emulzí, kde je průměr kapek asi 5 μm [3].

K vytvoření emulze je potřeba mechanické síly k rozptýlení jedné fáze do druhé. Emulze bez přídavku jakékoliv povrchově aktivní látky by nebyla stabilní a jednotlivé fáze by se od sebe začaly oddělovat. Přídavek povrchově aktivní látky je nutný k vytvoření dlouhodobě stabilní emulze [18]. Existují tři typy emulzí, první z nich je typ voda v olej (V/O), další olej ve vodě (O/V) a směs emulzí voda/olej/voda (V/O/V) viz Obrázek 3 [18].



Obrázek 3 Typy emulzí [18]

1.2.6 Pěna

Pěna je disperzní soustava složená z disperzní plynné fáze a disperzního kapalného prostředí [1]. Jedná se o soubor plynných komurek, které jsou od sebe oddělené jemnými vrstvami kapaliny, vznikající shlukováním bublinek z dispergovaného plynu [3]. Vznik pěny je podmíněn přítomností pěnотvorného činidla, který zajistí snížení mezifázového napětí a stabilizaci soustavy. Základem vzniku pěny je dostatečné snížení povrchového napětí – čím je povrchové napětí nižší, tím snadněji se pěna tvoří [19].

Pěna je termodynamicky nestabilní a pro její stabilitu je důležitá stabilita tenké vrstvy kapaliny. Ta je udržována povrchově aktivními látkami, aby nedocházelo k zániku bubliny.

Tvorba pěny se zvyšuje se zvyšující se koncentrací povrchově aktivní látky až do CMC, nad hodnotou CMC má koncentrace tenzidů na vznik pěny jen malý účinek [20].

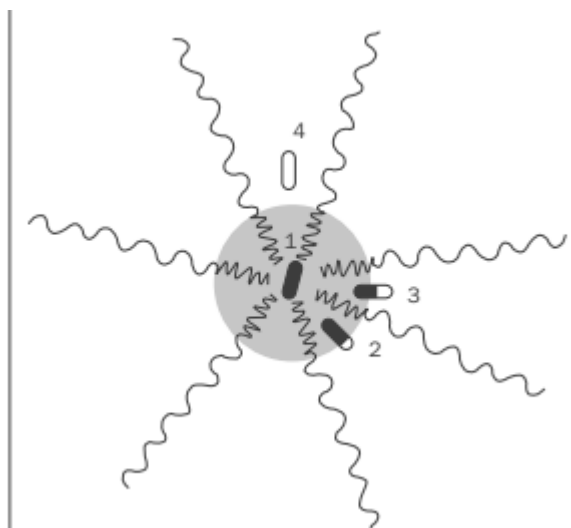
Pěny lze rozdělit podle obsahu dispergovaného plynu na zředěné disperze, kde je velmi malý obsah plynné fáze, na vlhkou pěnu a lamelární pěnu. V praxi jsou pro přípravky s tenzidy důležité dva údaje – pěnivost a stabilita vytvořené pěny. V prostředcích, jako jsou šampony, pěny do koupele, nebo prostředky na mytí nádobí, je vysoká pěnivost žádoucí. Používají se proto tenzidy s vysokou pěnivostí, jako je např. *natrium-laurylehtylenglykolsulfát* v kombinaci se stabilizátory pěny. Jako stabilizátory pěny se používají betainy, aminoxidy nebo alkanolamidy. V prostředcích, kde vysoká pěnivost není žádoucí, jako jsou prací prostředky apod., se používají tenzidy s nízkou pěnivostí anebo se mohou použít odpěňovače. Odpěňovače buď zabraňují vzniku pěny nebo působí proti pění, která již vznikla. Jako odpěňovače se používají buď oleje nebo hydrofobní tenzidy (např. *natrium-behenát*) [1].

Iontové tenzidy jsou pěnivější a jejich pěna je stabilnější, než pěna z neiontových tenzidů. Neiontové tenzidy z tohoto důvodu obvykle nejsou součástí mycích prostředků, ale jsou součástí prostředků na mytí podlah. Na pěnivost má vliv i teplota – iontové tenzidy jsou pěnivější při vyšší teplotě, u neiontových tenzidů pěnivost klesá s teplotou [1].

1.2.7 Solubilizace

Solubilizací se označuje rozpuštění nerozpustných, nebo nepatrně rozpustných organických látek ve vodě, ve vodných roztocích tenzidů. Tento jev probíhá v takových roztocích, ve kterých jsou přítomny micely, používá se proto i označení micelární solubilizace. Koncentrace tenzidu ve vzorku musí být vyšší, než je hodnota kritické micelární koncentrace [1].

Místo solubilizace v micelle je spojeno s chemickou strukturou solubilizované látky – nepolární látky jsou rozpuštěny v uhlovodíkovém jádře iontových i neiontových micel (viz Obrázek 4, pozice 1), ve vodě nerozpustné látky s polární skupinou jsou orientovány na rozhraní povrchu a jádra micely, hydrofobní skupina je ponořena uvnitř uhlovodíkového jádra micely (viz Obrázek 4, pozice 2 a 3). Solubilizace v neiontových polyoxyethylenových tenzidech může probíhat v polyoxyethylované schránce která obklopuje jádro (viz Obrázek 4, pozice 4) [21].



Obrázek 4 Schématické zobrazení solubilizačních míst [21]

Míra solubilizace dané látky je závislá na její chemické struktuře, na typu a na koncentraci tenzidu, který je obsažený ve vzorku [1].

1.2.8 Detergence

Detergence je proces, při kterém se odstraňuje nečistota z povrchu její solubilizací nebo převedením do suspenze nebo emulze [22]. Detergenci lze rozdělit do několika etap – rozpouštění detergentu, smáčení znečištěného povrchu detergentem, reakce mezi složkami detergentu a nečistotou, odstranění nečistoty z povrchu, a nakonec udržení nečistoty v roztoku detergentu. Detergent je pak směs tenzidu a další látky, která je schopna odstranit nečistotu z povrchu [1].

1.3 Metody stanovení neiontových tenzidů

1.3.1 Metody skupinového stanovení

Metodami skupinového stanovení se stanovují všechny druhy přítomných tenzidů. Výsledky se uvádí jako hmotnostní koncentrace zvoleného standardu v mg/l. Nejčastěji jsou využívány pro neiontové tenzidy. Jsou založeny na reakci polyethylenoxidového řetězce. Pokud jsou tenzidy ve vzorku pouze v nízké koncentraci nebo jsou přítomny interferující látky, je potřeba před analýzou provést separaci tenzidů ze vzorku, čímž dojde i k jejich zakonzentrování. Citlivost těchto metod je tím vyšší, čím vyšší je počet ethylenoxidových jednotek v řetězci tenzidu [19]. Nelze stanovit ty látky, které mají méně než 3 EO skupiny [23]. Metody skupinového stanovení neposkytují informace o délce hydrofobního a hydrofilního řetězce nebo o struktuře tenzidu [19].

1.3.2 Titrační metody

Neiontové tenzidy lze stanovit titrací s tetrakis(4-fluorofenyl)borátem, pokud vzorek neobsahuje také aniontové tenzidy, jelikož ion kovu tvoří pár s aniontovým tenzidem. Pokud vzorek obsahuje i aniontové tenzidy, využívá se dvoufázové titrace. Neiontové tenzidy přecházejí do dichlorethanu a aniontové zůstávají ve vodné fázi. Barevný přechod indikátoru probíhá v organické fázi, není ale ostrý [23].

Použitím potenciometrické titrace neiontových tenzidů je možné vyřešit problém s neostrým přechodem indikátoru. Nejčastěji se využívá potenciometrické titrace založené na tvorbě komplexů mezi tenzidem a dvojmocným kationtem (např. Ba^{2+} nebo Ca^{2+}). Koncentrace komplexu je sledována selektivními elektrodami [23].

1.3.3 Fotometrické metody

Jedním z častých způsobů stanovení neiontových tenzidů je stanovení vzniklého komplexu a měření intenzity jeho zbarvení nebo zákalu. Jako srážecí činidlo se může použít thiokyanatan amonný a dusičnan kobaltnatý. Spolu s polyoxyethylenovými sloučeninami vytvářejí modré komplexy. Vzniklé sloučeniny jsou následně extrahované do organického rozpouštědla a měřeny spektrofotometricky. Další možností je reakce neiontových tenzidů s aniontem BiI_4^- , kde vznikají žluté, málo rozpustné komplexní sloučeniny. Jejich koloidní roztok lze vyhodnotit turbidimetricky [23]. V analýze neiontových tenzidů jsou spektrofotometrické metody používané hlavně pro stopové stanovení ethoxylátů ve vodných vzorcích [24].

1.3.4 Polarografie

Polarograficky lze tenzidy stanovit, jelikož se shromažďují na rozhraní voda-rtuť. Odezva je závislá na hmotnostní koncentraci [23]. Polarograficky ale není možné rozlišit, jestli se jedná o aniontové, kationtové nebo neiontové tenzidy, odezva polarografu je závislá spíše na hmotnostní koncentraci než na molární. Tenzidy je možné převést na redukční deriváty, pokud nejsou schopné reagovat na klasickou polarografii [19].

1.3.5 Elektroforéza

V elektroforéze se molekuly nebo komplexy s nábojem separují od ostatních vlivem elektrického pole. Aniontové tenzidy se pohybují směrem k zápornému pólu, kationtové ke kladnému a neiontové tenzidy se nepohybují [23]. Složitost analyzovaných směsí a to, že jsou neiontové tenzidy bez náboje vede k tomu, že rozlišení píků bývá nedostatečné, a proto se tato metoda v praxi pro neiontové tenzidy příliš nepoužívá [19].

1.3.6 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je limitována nárokem na dostatečnou těkavost analyzovaných sloučenin a těkavost ethoxylovaných tenzidů je na hranici hodnot, které jsou pro GC potřeba. Tenzidy s nízkým stupněm ethoxylace lze stanovovat přímo, vysoce ethoxylované musejí být před analýzou derivatizovány a převedeny tak na těkavější sloučeniny. Detekce je nejčastěji plamenově ionizačním detektorem nebo hmotnostním spektrometrem [23].

1.3.7 Planární chromatografie

Při stanovení tenzidů planární chromatografií nebo také tenkovrstvou chromatografií (TLC), se vzorky zakoncentrují ve vhodném rozpouštědle a nanosou se na jeden konec chromatografického média, kde jsou vysušeny. Použití TLC závisí na vhodné volbě složení vyvíjecího činidla, na materiálu desky a způsobu detekce. Jako vyvíjecí činidlo se nejčastěji používá směs vody a organického rozpouštědla, jako destička silikagel nebo Al_2O_3 a pro detekci Dragendorffovo činidlo, páry jódu apod. [19].

TLC je široce používaná pro analýzu tenzidů, jelikož je jednoduchá na provedení a má vysokou separační schopnost i bez použití drahého vybavení [24]. Tenkovrstvá chromatografie využívá rozdělení jednotlivých složek vzorku na základě odlišné adsorpce [1].

Pomocí TLC lze analyzovat oxyethylenáty mastných alkoholů, lze rozlišit oligomery s různým počtem EO jednotek a u oxyethylenátů mastných kyselin lze rozlišit monosetery, diestery a polyethylenglykoly [1].

1.3.8 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie informuje přímo o rozložení a délce řetězců neiontových tenzidů. Výhodou chromatografické separace je také to, že dokáže zakoncentrovat sledované složky a jednotlivé složky od sebe separovat. Rozšířeným způsobem stanovení tenzidů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Nejběžnější používané detektory využívají indexu lomu, UV absorpenci nebo fluorescenci. Každý z detektorů má ovšem nějaké nevýhody: refraktometrický je málo citlivý, UV detektor je vhodný jen pro ty látky, které absorbují v UV oblasti a fluorescenční detektor je pro látky, které fluoreskují. Neiontové tenzidy některé z podmínek nespĺňují, proto je potřeba při použití těchto detektorů do jejich molekuly vnést chromoforní kruh např. reakcí s fenyliothiokyanátem pro detekci v UV nebo reakcí s 1-naftylisokyanátem pro fluorescenční detekce [23].

1.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) kombinuje kapalnou mobilní fázi a pevnou stacionární fázi, která má velmi malé částice. Aby mohla analýza probíhat i při dostatečně velkých průtocích, je potřeba pracovat s tlakem řádově v jednotkách až desítkách MPa [25]. HPLC umožňuje analýzu tepelně nestabilních látek, netěkavých látek nebo polymerů [26].

1.4.1 Chromatografie s normálními fázemi

Chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC) je nejstarším typem HPLC. V normální fázi HPLC je mobilní fáze nepolární a stacionární fáze polární. Stacionární fáze se skládá ze silikagelu, na kterém jsou chemicky vázané polární částice, např. krátké řetězce aminů nebo diolů. Typickou mobilní fází je např. hexan, heptan, chloroform apod [27]. V HPLC normálních fází jako první eluuje nejméně polární látka vzorku [25].

1.4.2 Chromatografie s obrácenými fázemi

Chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) má polární mobilní fázi a nepolární stacionární fázi. Stacionární fáze u obrácených fází má na silikagelu navázané nepolární částice, např. oktadecylový nebo oktylový řetězec. Typicky jsou pak kolony označovány jako C18 nebo C8. Jako mobilní fáze se používá směs vody s polárními organickými rozpouštědly, např. metanolem nebo acetonitrilem [27]. V chromatografii obrácených fází se jako první eluují látky nejvíce polární [25]. Různé typy stacionárních fází používaných v RP-HPLC jsou uvedené v následujících podkapitolách.

1.4.2.1 Porézní sorbenty

Nejpoužívanější stacionární fáze jsou vyráběny z porézních sorbentů. Částice silikagelu mají sférický tvar. Většina porézních sorbentů je tvořena difúzními póry. V porézní částici putuje solut z mobilní fáze do „stojící“ mobilní fáze mezi póry, pak do stacionární fáze (kde dochází k interakci) a následně se analyt uvolní a difunduje zpět do mobilní fáze. Tímto několikanásobně se opakujícím procesem postupuje analyt kolonou. V případě použití malých částic je celý difúzní proces rychlejší [28].

1.4.2.2 Povrchově porézní sorbenty

Povrchově porézní sorbenty jsou podobné neporézním, ale jádro mívá kolem 5 μm a vrstva stacionární fáze je silnější. Tlak na koloně, která je plněná povrchově porézními sorbenty, je nižší a sorpční kapacita je větší. Účinnost bývá větší, než na plně porézních materiálech [28].

1.4.2.3 Monolitické kolony

Monolitické stacionární fáze jsou vytvořeny z jednoho kusu pórovitého materiálu (nejčastěji z organického polymeru nebo oxidu křemičitého). Monolitická fáze vyplňuje celý vnitřní prostor kolony, MF tak protéká přímo stacionární fází, čímž se urychluje transport analytu kolonou. Monolitické kolony z organických polymerů jsou stabilní v širokém rozmezí pH a působením tlaku nesedávají tak, jako kolony náplňové [29].

1.4.3 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)

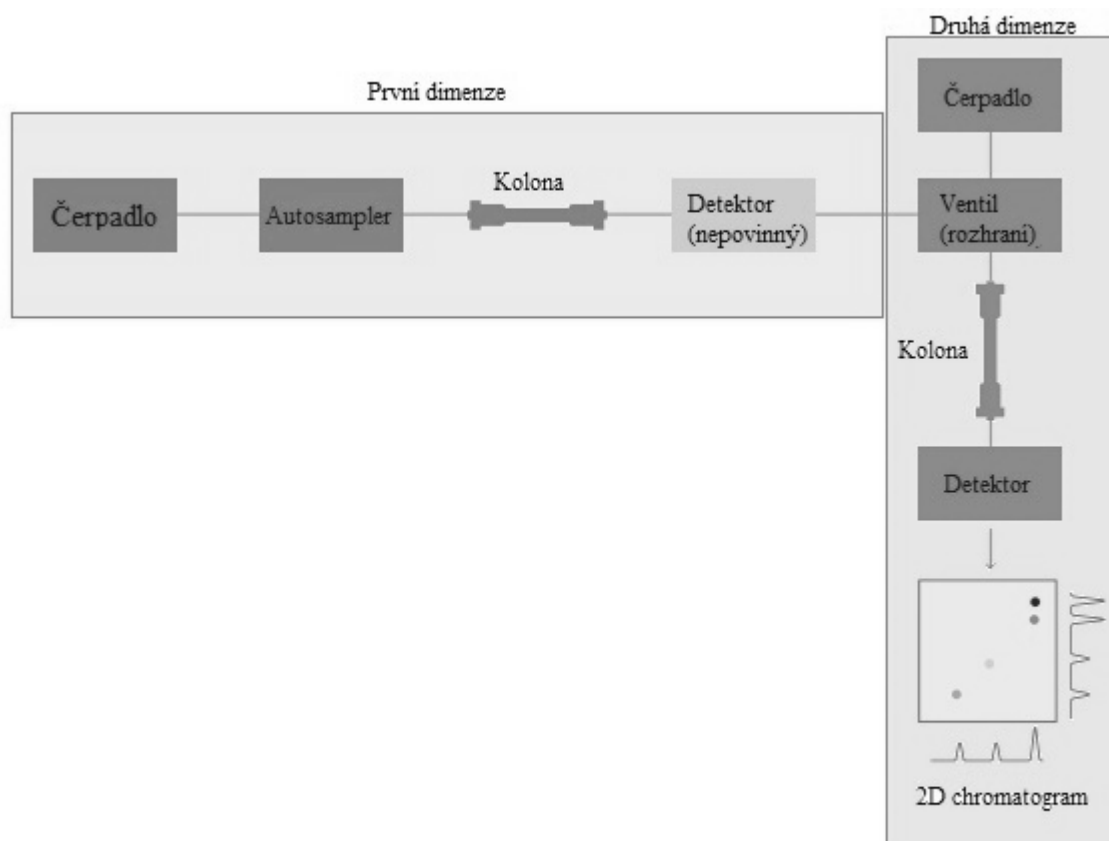
Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je metoda, která byla vyvinuta pro ty polární látky, které nejsou jednoduše analyzované na kolonách s obrácenými fázemi. HILIC využívá polární stacionární fázi jako v NP-HPLC a polární mobilní fázi jako v RP-HPLC [30].

V HILIC separacích se používají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze, obsahující vysoký podíl organického rozpouštědla. Stacionární fáze musí být více polární než fáze mobilní. Používaná stacionární fáze je nejčastěji klasická silikagelová nebo fáze modifikovaná diolovými, kyanovými, aminovými nebo amidovými funkčními skupinami. Novější stacionární fáze pro HILIC jsou tzv. zwitteriontové stacionární fáze, kde vázané funkční skupiny nesou pozitivní i negativní náboj. Jsou vysoce polární a mají vysokou afinitu k vodě. Separace HILIC je řízená hydrofilní interakcí mezi solutem a polární stacionární fází a k tomu, aby mohlo k hydrofilní interakci dojít, je třeba, aby se na povrchu SF vytvořila hydratovaná vrstva [31].

HILIC umožňuje separaci nenabitých hydrofilních nebo amfifilních sloučenin, které jsou příliš polární na to, aby byly dobře analyzovány pomocí RP-HPLC, ale nemají dostatečný náboj, aby se účinně separovaly v iontové chromatografii [32].

1.5 Dvourozměrná kapalinová chromatografie

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC) označuje techniku, při které se na vzorek aplikují dva nezávislé systémy pro separaci kapalných fází [33]. Na koloně v první dimenzi se provádějí běžné separace. Podíly eluentu z první kolony jsou pak vedeny do kolony druhé dimenze, která musí mít velmi odlišnou separační selektivitu ve srovnání s 1D kolonou. Vzhledem k tomu, že selektivita druhé kolony je odlišná od první kolony, je velmi pravděpodobné, že píky, které se částečně nebo zcela překrývaly, se ve druhé dimenzi oddělí [30]. Schéma 2D-HPLC je na Obrázku 5.

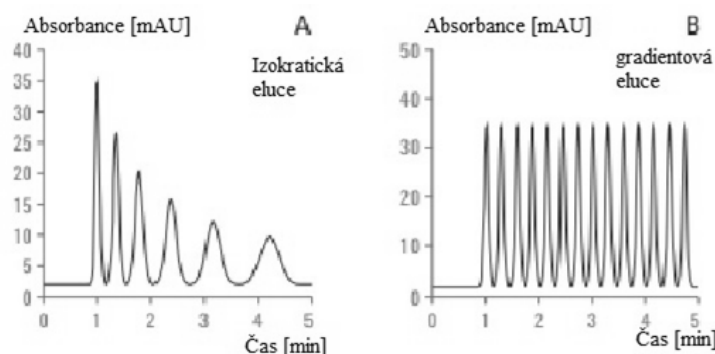


Obrázek 5 Schéma 2D chromatografu [30]

2D-LC může probíhat dvěma způsoby a to buď přenosem pouze části vzorku do druhé dimenze, což bývá označováno také jako „heart-cutting“ chromatografie nebo postupným přenosem celého vzorku v několika malých podílech do druhé dimenze, označováno také jako komplexní chromatografie [33].

1.5.1 Píková kapacita

Měřítkem výkonnosti chromatografického separačního systému je píková kapacita, která udává, kolik píků s konstantním chromatografickým rozlišením R se vejde do časového okna eluce. Zatímco u izokratické separace v 1D-LC závisí šířka píku na retenčním čase, u gradientové eluce 1D-LC se předpokládá, že šířka píků všech elujících složek je konstantní (viz Obrázek 6) [34].



Obrázek 6 Porovnání izokratické (A) a gradientové eluce (B) [30]

Píkovou kapacitu pro gradientovou eluci lze tedy vypočítat pomocí rovnice:

$$n_{c,1D} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{t_{R,n}}{t_{R,1}} \right) \quad (1)$$

kde $n_{c,1D}$ je teoretická píková kapacita, N je teoretický počet pater, $t_{R,n}$ a $t_{R,1}$ jsou retenční časy první a poslední látky analyzovaného vzorku. V praktických aplikacích je možné se setkat se zjednodušeným vzorcem:

$$n_{c,1D} = \frac{t_{R,n} - t_{R,1}}{W} \quad (2)$$

kde W je průměrná šířka píků jednotlivých složek analyzovaného vzorku [35].

Jako hlavní výhoda dvojrozměrné kapalinové chromatografie oproti 1D-LC je vyšší píková kapacita. Toto tvrzení platí, pokud se jedná o komplexní 2D-LC a předpokladu, že se jedná o ortogonální separační systém. Ortogonalita znamená, že separační mechanismy obou dimenzí jsou na sobě zcela nezávislé. Pokud se ortogonalita ve 2D-LC předpokládá, lze píkové kapacity obou rozměrů vynásobit a píkovou kapacitu pro 2D systém vypočítat podle rovnice 3 [34]:

$$n_{c,2D} = n_1 \times n_2 \quad (3)$$

1.5.2 Heart-cutting chromatografie

Při heart-cutting chromatografii je specificky zacílen jeden nebo několik píků a daný pík je nashromážděn a vnesen do druhé kolony. Heart-cutting 2D-LC je užitečná pro nepřilíš

složité vzorky, které obsahují sloučeniny s velmi podobným chováním. Nastavení systému a metody je obvykle méně složité a provozní náklady jsou ve srovnání s komplexní 2D-LC nižší. V závislosti na době analýzy ve druhém rozměru je také možnost vzorkovat více píků z prvního rozměru pro další separaci ve druhém rozměru, což je označováno jako „multiple heart-cutting“ 2D-LC. Pro heart-cutting chromatografii se používá zkratka LC-LC [30].

1.5.3 Komplexní 2D chromatografie

Komplexní 2D-LC (označována jako LCxLC) je založena na analýze celého vzorku typicky ve dvou odlišných separačních postupech. Oproti „heart-cutting“ metodě je u komplexní LCxLC analyzován celý vzorek. Komplexní analýza je umožněná spojením dvou různých separačních procesů pomocí rozhraní, které kontinuálně sbírá eluát z první dimenze a vnáší jej do kolony druhé dimenze. Mezi nevýhody LCxLC patří čas analýzy ve druhé dimenzi, jelikož separace musí skončit před tím, než je do druhé kolony přivedena další frakce. Další nevýhodou je rychlost přenosu z první dimenze do druhé, jelikož přenos musí být proveden co nejrychleji, aby se zabránilo ztrátám eluátu [36].

1.5.4 Off-line chromatografie

V off-line formě jsou frakce 1D eluentu shromažďovány a skladovány před tím, než jsou podrobeny 2D separaci. To má přirozeně za následek delší celkovou dobu analýzy než u on-line chromatografie. Skladování vzorků, dokud nejsou podrobeny 2D separaci, může mít za následek ztráty některých stopových vzorků nebo jejich kontaminaci. Jedná se o mnohem zdlouhavější metodu, než je on-line LC a často vyžaduje pozornost operátora [30].

1.5.5 On-line chromatografie

V on-line 2D-LC je eluent z 1D kolony vstřikován do 2D kolony ihned po té, co je nashromážděn [30]. U on-line metody se pro propojení dvou dimenzí používá rozhraní, které automaticky převede eluát z první dimenze do kolony druhé dimenze. Nejpoužívanějším rozhraním je přepínací ventil. Tato automatizace zlepšuje některé z nevýhod off-line metody, především má on-line metoda lepší reprodukovatelnost a nedochází při ní ke kontaminaci nebo ztrátě vzorku. I on-line metoda má své nevýhody, především mohou nastat problémy s nekompatibilitou nebo nemísitelností rozpouštědel v obou dimenzích. On-line metoda je také obtížnější na obsluhu [36].

1.5.6 Gradientová eluce ve 2D

Ve 2D chromatografii jsou eluenty z kolony z první dimenze shromažďovány přes rozhraní a následně přenášeny do oddělovací kolony druhého rozměru. Eluce v obou rozměrech

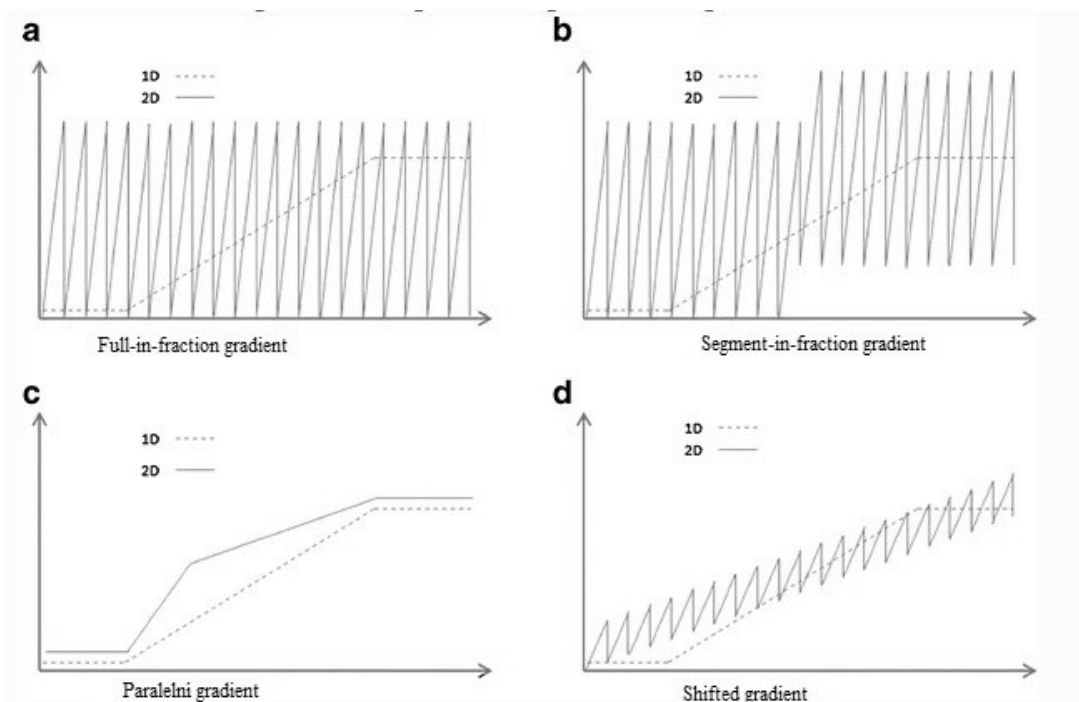
může být optimalizována samostatně jak izokraticky, tak gradientovou elucí. Gradientová eluce se využívá především u kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi. V 2D-LC mohou být použité různé typy gradientů [37].

Prvním typem gradientu je „*full in fraction*“ (FIF) (viz Obrázek 7a). V FIF dochází k úplné změně složení mobilní fáze v rámci každého cyklu. Gradientový program ve druhé dimenzi je stejný po celou dobu analýzy. Velmi strmá změna mobilní fáze probíhá ve velmi krátkých časech a díky tomu nedochází k velkému rozšíření píků. Nevýhodou toho typu gradientu je, že krátký čas, při kterém jsou používány velmi strmé gradienty, zvyšuje pravděpodobnost, že látky, které jsou velmi silně zadržované, nebudou mít dostatek času eluovat a mohou se dostat do dalších cyklů analýzy (tzv. „*wrap-around*“) [37]. Při použití gradientu FIF mohou sloučeniny, které byly slabě zadržované v první dimenzi, mít nízké retenční časy ve druhé dimenzi, zatímco sloučeniny, které byly silně zadržované v první dimenzi, mají dlouhé eluční časy ve druhém rozměru [38].

Druhým typem je „*segment in fraction*“ (SIF) (viz Obrázek 7b). SIF gradient je rozdělen do několika segmentů. V každém segmentu se používají jiné koncentrace MF. SIF má o něco méně strmé gradienty než FIF, i tak ale poskytuje významné potlačení šířky pásma [37]. Není omezen počet segmentů, které lze při SIF použít [38].

Paralelní gradient využívá změnu složení MF nezávisle na průběhu cyklů v druhé dimenzi (viz Obrázek 7c). V rámci jednoho cyklu probíhá tzv. kvazi-izokratická eluce, která poskytuje pozvolný průběh změny složení MF v rámci celé analýzy. Kvazi-izokratická eluce poskytuje delší čas pro analýzu ve druhé dimenzi, jelikož není nutné měnit složení mobilní fáze mezi jednotlivými cykly. Podmínky pozvolného gradientu mohou způsobovat větší rozšíření šířky píku a tím i nižší píkovou kapacitu druhé dimenze [37].

„*Shifted gradient*“ (SG) má užší rozsah složení mobilní fáze a kontinuálně mění koncentrace podle retence separovaných látek (viz Obrázek 7d). Shifted gradient je kombinací FIF a paralelního gradientu. Tento typ gradientu potlačuje rozšiřování píků a potlačuje vznik tzv. „*wrap-around*“ [37].



Obrázek 7 Gradienty ve 2D kapalinové chromatografii [37]

1.5.7 Dávkovací ventil

V každém 2D-LC systému je zařízení, které sbírá eluent z kolony první dimenze a přenáší ho do kolony druhé dimenze k další separaci. Toto zařízení je nejčastěji ventil vybavený jednou nebo více vzorkovacími smyčkami. Dávkovací ventil bývá také často označován jako modulátor nebo rozhraní [39].

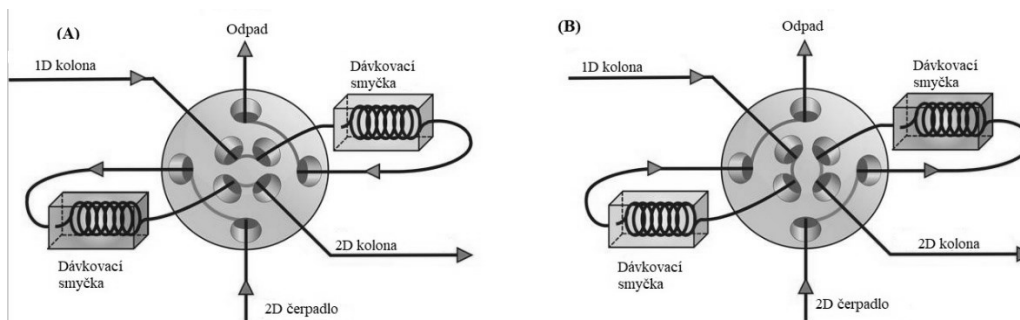
1.5.7.1 Rozhraní smyčky

Dávkovací smyčka je nejpoužívanějším rozhraním a je založena na dvupolohovém deseti nebo osmicestném přepínacím ventilu se dvěma smyčkami, které mají stejný objem [40].

Velikosti smyček jsou určeny množstvím mobilní fáze, potřebné pro analýzu v první dimenzi. Dvě smyčky jsou střídavě naplněny eluentem z první kolony a vyprazdňovány směrem k druhé koloně kontinuálně. Čas určený pro analýzu ve druhé dimenzi by měl odpovídat času plnění smyčky. Například pokud je průtok v první dimenzi nastaven na 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ a perioda vzorkování je nastavena na 1 minutu, měl by mít ventil smyčku o objemu 30 μl [41].

Existují dvě konfigurace plnění smyček. V asymetrické konfiguraci je jedna ze smyček vyprazdňována ve směru hodinových ručiček a druhá proti směru hodinových ručiček (viz Obrázek 8A). V symetrickém uspořádání jsou vyprazdňovány ve stejném směru (viz Obrázek 8B). U deseticestného dvupolohového ventilu má různý směr toku vliv

na výsledky analýzy. Při využití osmicestného dvoupolohového modulátoru jsou smyčky vždy asymetrické [41].



Obrázek 8 Asymetrická a symetrická konfigurace rozhraní [42]

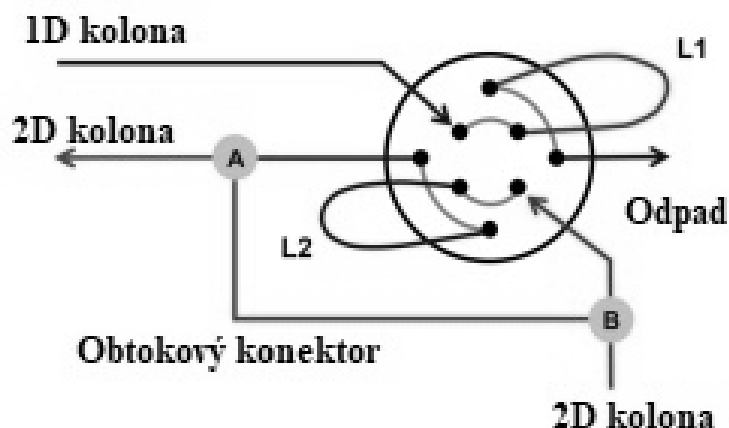
1.5.7.2 Standardní modulace

Standardní modulace je nejběžnějším a nejjednodušším způsobem přenosu 1D eluentu do 2D. Používají se dvě identické vstřikovací smyčky ve dvoupolohovém přepínacím ventilu. Tyto dvě smyčky nepřetržitě sbírají 1D eluent a vstřikují jej do 2D kolony. Tento modulační mechanismus lze považovat za pasivní, protože frakce vstřikována do 2D kolony závisí pouze na průtoku 1D eluentu a na průtoku mobilních fází [43].

Snaha o maximální ortogonalitu mezi dvěma separačními systémy často způsobí, že jsou použita dvě nekompatibilní rozpouštědla, například rozdíl ve viskozitě mezi dvěma systémy může vést k nestabilitě toku. Významný rozdíl v síle rozpouštědla může vést k deformaci píku. Překonání těchto nevýhod je provedeno úpravou modulačního procesu [42].

1.5.7.3 Fokusuující modulace

Při použití rozhraní s fokusuující modulací (FSM) je běžný ventil používaný ve 2D chromatografii (např. osmiportový/dvoucestný ventil) rozšířen o spojení, které vytváří tok mezi 2D pumpou a 2D kolonou, v paralelním spojení skrz ventil, tzv. obtokový konektor. Toto spojení může být uskutečněno T spojkou jako je zobrazeno na Obrázku 9 [39].

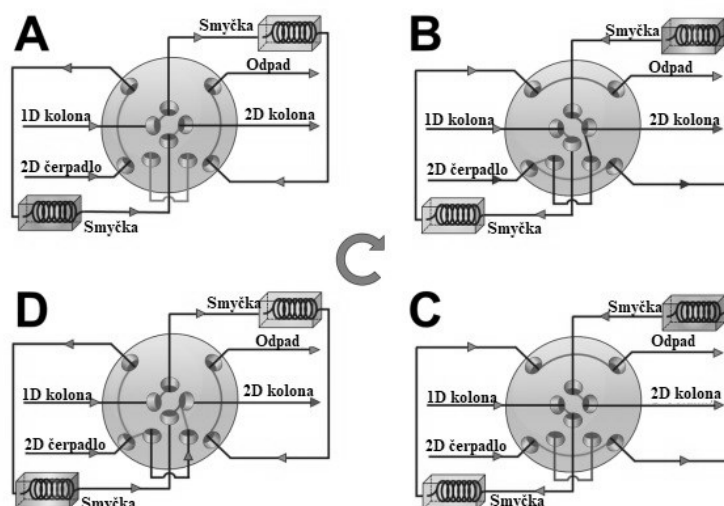


Obrázek 9 Rozhraní s fokusující modulací [39]

Pokud je průtok přes obtokový konektor a smyčku stejný, bude se eluent z 1D mísit v poměru 1:1 s MF druhé dimenze. Jedno z největších omezení FSM je, že je obtokové připojení pevné a tok mobilní fáze v průběhu analýzy bude procházet jak ventilem, tak obtokovým konektorem v průběhu celé analýzy. Protože celkový průtok z 2D čerpadla je rozdělen na dvě části, skutečný tok MF skrz vzorkovací smyčku je nižší, než skutečná rychlost toku MF a závisí tak na poměru rozdělení. Rozdělení na dvě části vede ke složitému profilu rozpouštědla, který prochází kolonou během eluce. Tento problém vedl k vytvoření ASM [39].

1.5.7.4 Aktivní modulace rozpouštědlem

V tomto případě jsou k typickému ventilu používanému pro 2D-LC přidány dva porty, spolu s odtokovou kapilárou. Na Obrázku 10 A a C je podobný postup jako u normálních dávkovacích smyček, kde veškerý eluent z první dimenze prochází jednou ze smyček a mobilní fáze druhé dimenze prochází druhou smyčkou, čímž posouvá 1D eluent do kolony druhé dimenze. V polohách na Obrázku 10 B a D je tok z čerpadla druhé dimenze rozdělen na dvě části. Jedna prochází smyčkou a druhá část smyčku obchází, takže 2D eluent ředí frakci 1D eluentu bez potřeby dalšího čerpadla. Díky ředění toku dojde ke zvětšení objemu a tím ke snížení síly MF z 1D, čímž dojde ke zlepšení tvaru píků [42].



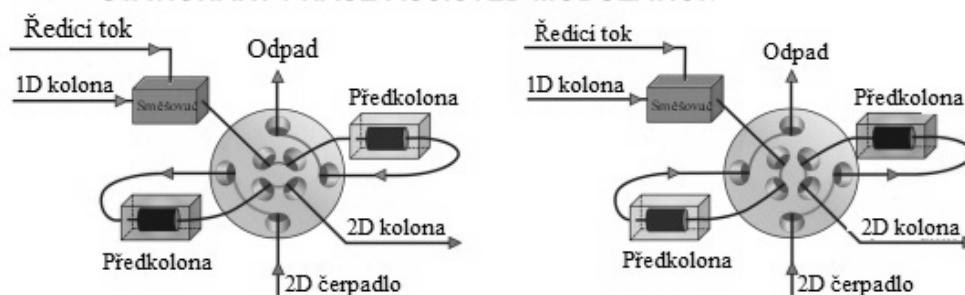
Obrázek 10 Rozhraní s aktivní modulací rozpouštědlem [42]

1.5.7.5 Stop-flow rozhraní

Ve stop-flow rozhraní jsou kolony spojeny přes rozhraní bez dávkovacích smyček. Konvenční rozhraní se smyčkou je možné v tomto přístupu také použít, ale negativně to ovlivňuje výsledek analýzy. Ventil v jedné poloze přímo spojuje dvě kolony a přenáší eluent z první dimenze do druhé. Když je ukončen přenos požadované frakce, rozhraní je přepnuto a simultánně je tok z první fáze přerušen, což umožní oddělení frakce druhé dimenze. V tomto rozhraní není omezena doba analýzy druhé dimenze, díky čemuž může být píkova kapacita druhé dimenze podstatně vyšší [40].

1.5.7.6 Rozhraní s plněnou smyčkou

Rozhraní dávkovací smyčky může být upraveno náhradou prázdných smyček smyčkami naplněnými stacionární fází, které zadržují látky před jejich analýzou ve druhé dimenzi (viz Obrázek 11). V praxi jsou místo smyček používány tzv. předkolony. Zatímco jedna předkolona zadržuje eluent z první dimenze, látky zadržené v předchozím cyklu jsou uvolněny do druhé předkolony a odtud jdou do druhé kolony [41]. Volitelně může být eluent z 1D kolony zředěn pomocí slabého elučního činidla, aby se usnadnila retence na předklonách [42]. Výběr adsorbentu na předkoloně závisí na typu analyzovaného vzorku a použitých mobilních fázích. Mobilní fáze v 1D by mělo být slabé rozpouštědlo ke stacionární fázi v předkoloně kvůli fokusaci, zatímco mobilní fáze ve 2D by měla zajistit desorpci [41]. Výhodou plněných smyček je, že snižují problém nekompatibility rozpouštědel v obou dimenzích, díky odstranění většiny mobilní fáze. Další výhodou je zlepšení detekce [40].

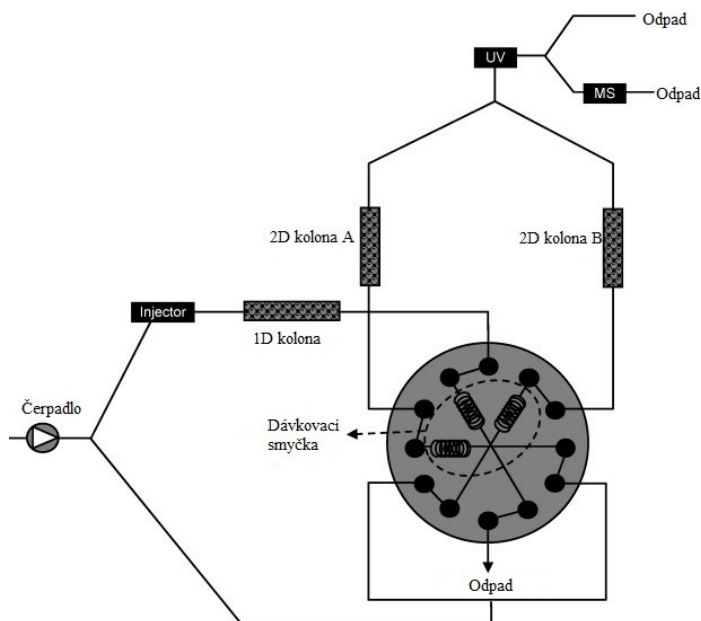


Obrázek 11 Schéma rozhraní s plněnou smyčkou [42]

1.5.7.7 Paralelní druhá dimenze

V běžném LCxLC systému má každá dimenze pouze jednu kolonu. Při použití rozhraní s paralelní druhou dimenzí jsou použity dvě nebo více kolon ve druhé dimenzi k provedení analýzy po sobě jdoucích látek paralelně (viz Obrázek 12) [41].

Paralelního nastavení lze dosáhnout náhradou dávkovacích smyček ve dvoupolohovém/deseticestném přepínacím ventilu samotnými kolonami. Část eluentu z kolony první dimenze jde do první sekundární kolony a po přepnutí ventilu jde další část do druhé sekundární kolony, což se opakuje po celou dobu analýzy. Chromatogramy získané analýzou na obou kolonách ve druhé dimenzi jsou kombinovány, je proto důležité, aby kolony poskytovaly identické retenční časy a měly stejnou účinnost. Obě kolony by měly mít nejlépe stejnou šarži [40].



Obrázek 12 Schéma paralelního nastavení 2D [40]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Zařízení a přístroje pro 2D chromatografii

Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1260 a 1290 Infinity II

- Autosampler G7129B
- Čerpadlo G1312B pro první dimenzi
- Čerpadlo G7120A pro druhou dimenzi
- Termostat G7130A
- Osmiportový/dvoucestný ventil G1170A
- Detektor s proměnnou vlnovou délkou G7114B

Ultrazvuková lázeň FisherBrand FB15052 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Analytické digitální váhy (Sartorius Analytic, Německo)

Systém pro přípravu destilované vody Milli-Q Reference System (MERCK, Německo)

Rozptylový detektor Sedex 75 (Sedere, Francie)

Termostat LCO 102 (Ecom, Praha)

2.2 Použité kolony

V první dimenzi byla použita kolona Ascentis® Express OH5 100x2,1 mm s velikostí částic 2,7 μm . Kolony použité ve druhé dimenzi jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 Použité kolony ve druhé dimenzi

Název kolony	Rozměry (mm)	Velikost částic (μm)	Výrobce kolony
Ascentis® Express C18	50 x 3,0	2,7	Supelco
Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped	50 x 4,6	-	Merck
Chromolith® SpeedeROD RP-18e	50 x 4,6	-	Merck
Kinetex® XB-C18	50 x 3,0	2,6	Phenomenex
Luna® Omega	30 x 2,1	1,6	Phenomenex

2.3 Použité chemikálie

- Acetonitril (LiChrosolv, Německo)
- Octan amonný (SigmaAldrich, Nizozemsko)
- Aceton (LachNer, Neratovice, ČR)
- Benzen (LachNer, Neratovice, ČR)
- Toluén (LachNer, Neratovice, ČR)
- Ethylbenzen (SigmaAldrich, USA)
- Propylbenzen (Aldrich Chemistry, Čína)
- Butylbenzen (Aldrich Chemistry, Čína)
- Pentylbenzen (Fluka Analytical, Švýcarsko)

2.4 Tenzidy Levenol®

Kao Chemicals Europe vyrábí velmi speciální skupinu neiontových tenzidů pojmenovaných Levenol®. Levenol® jsou polyoxyethylenestery glycerinu. Díky různým stupňům ethoxylace a esterifikace vzniká široká škála produktů s mnoha různými aplikačními použitími. Tenzidy Levenol® jsou charakterizovány ekologickými a toxikologickými výhodami při porovnání s ostatními neiontovými tenzidy. Tenzidy Levenol® jsou přírodního původu, jsou tekuté, bez barvy a bez zápachu, neobsahují konzervanty, neškodí kůži a jsou šetrné k životnímu prostředí [44].

Levenol® C-201 – polyoxyethylen(17) mono a diglycerid. Je to mírný neiontový tenzid, který má ekologické a toxikologické výhody oproti jiným neiontovým tenzidům. Má emulgační vlastnosti pro koncentrované formulace a nízkou pěnovitost. Používá se v pracích a čistících prostředcích. Hodnota HLB Levenolu® C-201 je 13 [45], [46].

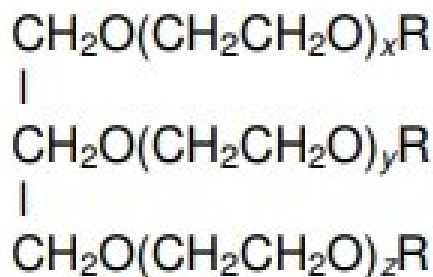
Levenol® C-421 – polyoxyethylen(2) mono a diglycerid. Neiontový tenzid s vysokou pěnovitostí a zahušťovacími vlastnostmi a detoxikačním účinkem. Je to alternativa APG a amidů v prostředcích do myček nádobí a tekutých čistících prostředků. Hodnota HLB Levenolu® C-421 je 11 [47], [48].

Levenol® F-200 – polyoxyethylen(6) mono a diglycerid. Je považován za nejvíce univerzální a nejefektivnější tenzid z řady Levenol®. Levenol® F-200 má perfektní hydrotropní vlastnosti, které umožňují redukci nebo dokonce úplnou eliminaci rozpouštědel (ethylalkoholu, glykolů apod.) z konečného výrobku. Další vlastností tohoto tenzidu je detergentce i při 15 °C, což je výhodou při umývání/praní při nízkých teplotách. Levenol® F-200 také změkčuje textilie, což je oproti jiným neiontovým tenzidům způsobené jeho

chemickou strukturou (ester a derivát glycerinu). Díky těmto vlastnostem se označuje jako „softergent“ (z anglického spojení slov detergent a softener), kde se spojuje jak detergence, tak změkčování, což vede k úspoře času, produktu a energií. Hodnota HLB Levenolu® F-200 je 12,5 [44], [49].

Levenol® C-301 – polyoxyethylen(7) mono a diglycerid. Mírný neiontový tenzid s nízkou pěnivostí. Má ekologické a toxikologické výhody oproti jiným neiontovým tenzidům. Používá se do tekutých čistících prostředků, vhodných na silné znečištění, nebo jako čistič tvrdých povrchů. Hodnota HLB Levenolu® C-301 je 14 [50], [51].

Na Obrázku 13 je zobrazena předpokládaná struktura oxyethylenovaných glycerolů.



Obrázek 13 Předpokládaná struktura oxyethylenovaných glycerolů [52]

Levenol C-201, $x+y+z=17$; Levenol C-301, $x+y+z=7$; Levenol C-421, $x+y+z=2$; Levenol F-200, $x+y+z=6$. R = H nebo R'-CO- (kokosový řetězec) [52].

2.5 Příprava mobilních fází

Vodný roztok octanu amonného o koncentraci 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,1927 g octanu amonného v 250 ml redestilované vody.

Octan amonný v acetonitrilu byl připraven stejným způsobem. Následně byla tato směs umístěna do ultrazvukové lázně a byla tam ponechána až do úplného rozpuštění (cca 20 minut).

2.6 Podmínky pro měření zpoždění gradientu

U vysokotlakých systémů skládajícího se ze dvou čerpadel probíhá mísení mobilních fází za čerpadly. V systému je měřitelný objem mezi místem, kde jsou rozpouštědla smíchána, a místem, kde vstupují do kolony. Tento objem se označuje jako zpoždění gradientu [53].

Je důležité znát objem zpoždění gradientu v každém LC systému, aby se předcházelo problémům v rozdílném objemu zpoždění při převodu gradientových metod na jiný LC systém [53].

Zpoždění gradientu bylo experimentálně určeno lineární změnou složení dvousložkové mobilní fáze – voda/voda +0,1% (v/v) aceton. K měření byla použita ocelová spojka s nulovým vnitřním objemem, která byla použita k propojení kapilár namísto kolony. Měření zpoždění gradientu bylo provedeno při třech průtocích: 0,5 ml/min; 0,75 ml/min a 1 ml/min. Zpoždění gradientu bylo určeno jako zlom na křivce absorbance (230 nm) v závislosti na čase. Zpoždění gradientu bylo měřeno jak na čerpadle G7120A, tak i na čerpadle G1312B.

2.7 Podmínky pro měření mimokolonových objemů

Jako mimokolonové objemy jsou označovány všechny objemy HPLC systému mimo kolonu, které ovlivňují separaci látek. Jedná se o objem injektoru, kapiláry mezi nástřikovým ventilem a kolonou, mezi kolonou a detektorem, celou detektoru, spojovacích součástí, popřípadě i kapiláry v termostatu a přepínacích ventilech.

$$\sigma_{celkem}^2 = \sigma_k^2 + \sigma_{inject}^2 + \sigma_{spoje}^2 + \sigma_{detektor}^2 \quad (4)$$

Mimokolonové objemy v systému by měly být minimální, jelikož negativně ovlivňují separaci – jsou jednou z příčin chvostování a rozšiřování píků. Tyto příspěvky rozšiřování píků jsou aditivní.

Mimokolonové objemy byly měřeny pomocí sady alkylbenzenů – benzen, toluen, ethylbenzen, propylbenzen, butylbenzen a pentylbenzen.

Alkylbenzeny byly připraveny jako 1% (v/v) roztoky – do 10 ml baňky bylo napipetováno 100 μ l každého alkylbenzenu a následně byla baňka doplněna acetonitrilem po rysku. Dávkovaný objem vzorku byl 1 μ l. Měření probíhalo izokraticky se 70 % ACN a 30 % vody. Průtoky mobilní fáze byly 0,3 ml/min; 0,4 ml/min a 0,5 ml/min, každé měření bylo zopakováno třikrát. K měření byla použita kolona Kinetex® XB-C18. Na koloně byla teplota 30 °C. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 265 nm. Měření probíhalo na čerpadle G7120A i na čerpadle G1312B.

2.8 Podmínky pro charakterizaci používaných kolon

Charakterizace používaných kolon (uvedených v Tabulce 2) byla experimentálně změřena pomocí acetonu a sady alkylbenzenů – benzen, toluen, ethylbenzen, propylbenzen,

butylbenzen a pentylbenzen. Aceton a alkylbenzeny byly připraveny jako 1% (v/v) roztoky – do 10 ml baňky bylo napipetováno 100 μ l každého alkylbenzenu a následně byla baňka doplněna acetonitrilem po rysku. Dávkovaný objem vzorku byl 1 μ l. Měření probíhalo na kolonách, které byly použity do druhé dimenze (viz Tabulka 2). Teplota na koloně byla 55 °C. Měření pro charakterizaci kolon bylo provedeno při čtyřech průtocích – 1 ml/min; 1,5 ml/min; 2 ml/min a 3 ml/min. Byly zvoleny dva typy gradientu. Gradient FIFa je uveden v Tabulce 3, FIFb v Tabulce 4, SIFa v Tabulce 5 a SIFb v Tabulce 6, kde mobilní fáze A je destilovaná voda a mobilní fáze B acetonitril. K detekci byl použit UV detektor nastavený na vlnovou délku 254 nm. Měření probíhalo na čerpadle G7120A. Každé měření bylo opakováno třikrát.

Tabulka 3 Gradient FIFa

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	90	10
1	0	100

Tabulka 4 Gradient FIFb

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	90	10
0,8	0	100

Tabulka 5 Gradient SIFa

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	50	50
1	0	100

Tabulka 6 Gradient SIFb

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	50	50
0,8	0	100

2.9 Měření profilu FSM

Pro důkaz ředění mobilní fáze pomocí rozhraní FSM bylo použito měření záznamu mobilní fáze s přidavkem acetonu. Toto měření probíhalo jednak bez rozhraní FSM, tak i s ním a výsledné záznamy byly následně porovnány.

Pro měření byla použita jako vzorek voda. Dávkovaný objem vody byl 1 μl . Měření probíhalo v režimu komplexní 2D. Měření probíhalo bez kolony, byla použita ocelová spojka s nulovým vnitřním objemem, stejně jako byla použita pro měření zpoždění gradientu. Pro měření byla zvolena izokratická eluce v první dimenzi, kde mobilní fází byla čistá voda. V druhé dimenzi byly měřeny tři typy gradientů, uvedené v Tabulce 7, 8 a 9, kde mobilní fáze A je destilovaná voda a mobilní fáze B je destilovaná voda + 0,02% (v/v) aceton. K detekci byl použit UV detektor nastavený na vlnovou délku 230 nm. Celková doba analýzy byla 10 minut.

Tabulka 7 První použitý gradient ve 2D

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	100	0
0,8	0	100

Tabulka 8 Druhý použitý gradient ve 2D

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	100	0
0,8	50	50

Tabulka 9 Třetí použitý gradient ve 2D

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	100	0
0,2	0	0
0,8	0	100

2.10 Příprava vzorku

Pro analýzu vzorků pomocí 2D chromatografie bez i s fokusační modulací byly zvoleny tenzidy Levenol® C-201, C-421, F-200 a C-300. Byl připraven 1% (v/v) roztok tenzidu v acetonitrilu – do 1,5 ml vialek bylo napipetováno 10 µl Levenolu a doplněno 1 ml acetonitrilu.

2.11 Podmínky pro analýzu tenzidů ve 2D

Analýzy pomocí dvourozměrné chromatografie byly realizovány v režimu komplexní 2D LC. Ve druhé dimenzi byly testovány dva typy gradientu uvedené v Tabulce 10 a 11. Gradient použitý v první dimenzi je uvedený v Tabulce 12.

Tabulka 10 Gradient ve 2D typ 1

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	90	10
0,8	0	100

Tabulka 11 Gradient ve 2D typ 2

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	50	50
0,8	0	100

Tabulka 12 Gradient v 1D

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	0	100
10	0	100
60	50	50

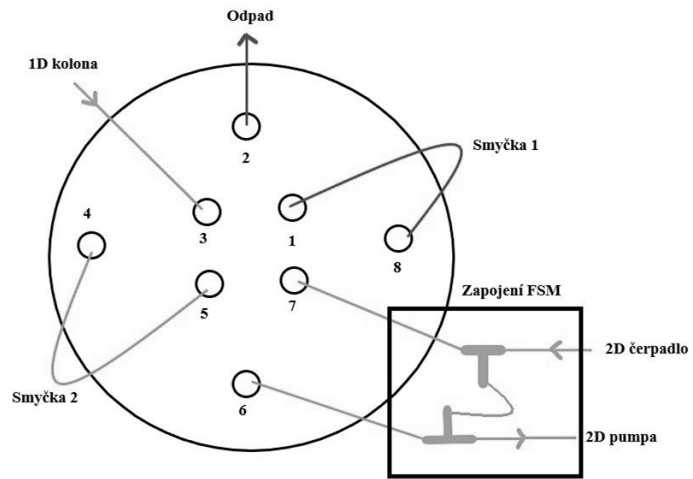
První dimenze

Mobilní fáze A:	Octan amonný ve vodě (10 mmol/l)
Mobilní fáze B:	Octan amonný v acetonitrilu (10 mmol/l)
Průtok mobilní fáze:	6 μ l/min
Dávkování vzorku:	5 μ l
Teplota na koloně:	25 °C
Použitá kolona:	Ascentis® Express OH5

Druhá dimenze

Mobilní fáze A:	Redestilovaná voda
Mobilní fáze B:	Acetonitril
Průtok mobilní fáze:	2ml/min nebo 2,5 ml/min
Teplota na koloně:	55 °C
Použité kolony:	Ascentis® Express C18, Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped, Chromolith® SpeedeROD RP-18e, Kinetex® XB-C18, Luna® Omega

Analýzy byly provedeny se smyčkami o objemu 60 μ l s časem přepnutí ventilu 60 s. Další analýzy byly provedeny pomocí rozhraní FSM. FSM bylo zapojeno pomocí osmiportového/dvoucestného ventilu. Za výstup z čerpadla druhé dimenze byla zapojena T spojka. Výstup na 2D kolonu byl také zapojen do T spojky. Tyto dvě spojky byly spojeny pomocí smyčky o objemu 60 μ l. Díky tomuto zapojení byl ředěn tok mobilní fáze druhé dimenze. Zapojení FSM je zobrazeno na Obrázku 14. Rozptylový detektor byl nastaven na 50 °C s tlakem dusíku 3,5 bar.



Obrázek 14 Zapojení FSM

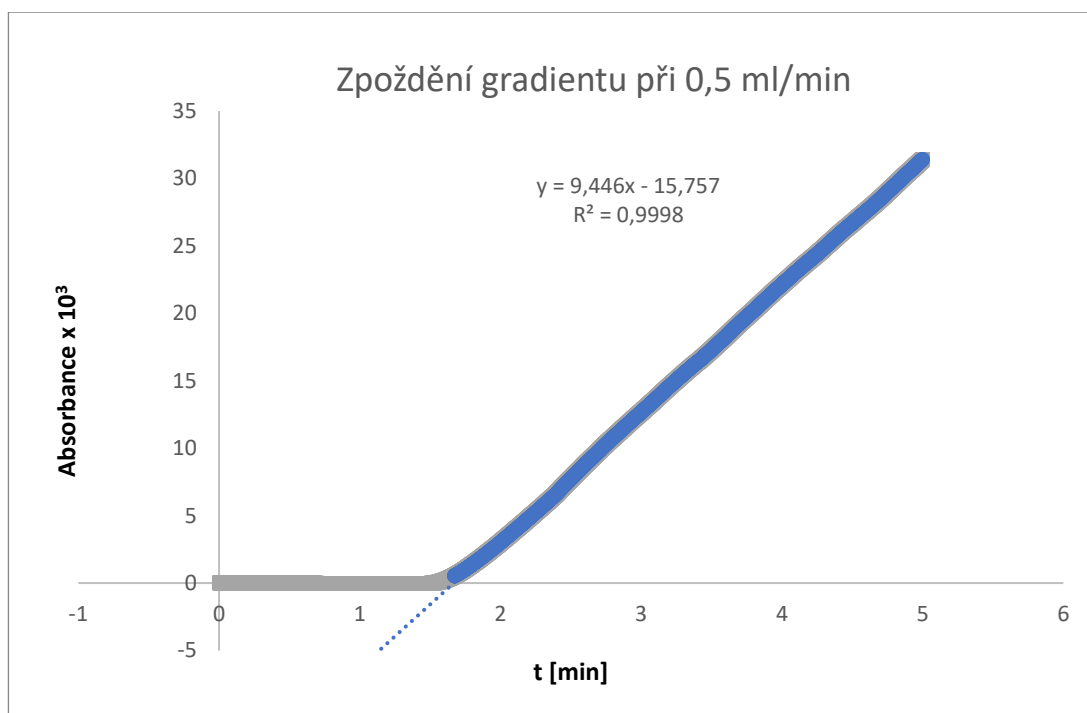
3 Výsledky a diskuse

3.1 Zpoždění gradientu

Zpoždění gradientu je důležitým údajem pro převod gradientových metod na jiné LC systémy. Pro zjištění zpoždění gradientu byla použita ocelová spojka s nulovým vnitřním objemem a měření bylo provedeno při třech průtocích. Jelikož při měření tenzidů byla použita dvourozměrná chromatografie se dvěma čerpadly, bylo zpoždění gradientu měřeno jak na čerpadle G7120A (čerpadlo ve druhé dimenzi), tak i na čerpadle G1312B (čerpadlo v první dimenzi).

Objem zpoždění gradientu byl zjištěn odečtením času, kdy došlo na křivce absorbance ke zlomu. Grafy měřených zpoždění jsou uvedené v příloze jako Grafy P1-P6.

Jako příklad je uvedený Graf 1, kdy byl objem zpoždění gradientu měřen při průtoku 0,5 ml/min na čerpadle G7120A. Zlom na křivce odpovídal cca 1,67 min. Při daném průtoku odpovídá objem zpoždění gradientu 0,334 ml.



Graf 1 Zpoždění gradientu na čerpadle G7120A při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min

Všechny vypočtené objemy zpoždění gradientu jsou uvedené v Tabulce 13.

Tabulka 13 Vypočtená zpoždění gradientu pro obě čerpadla při všech průtocích

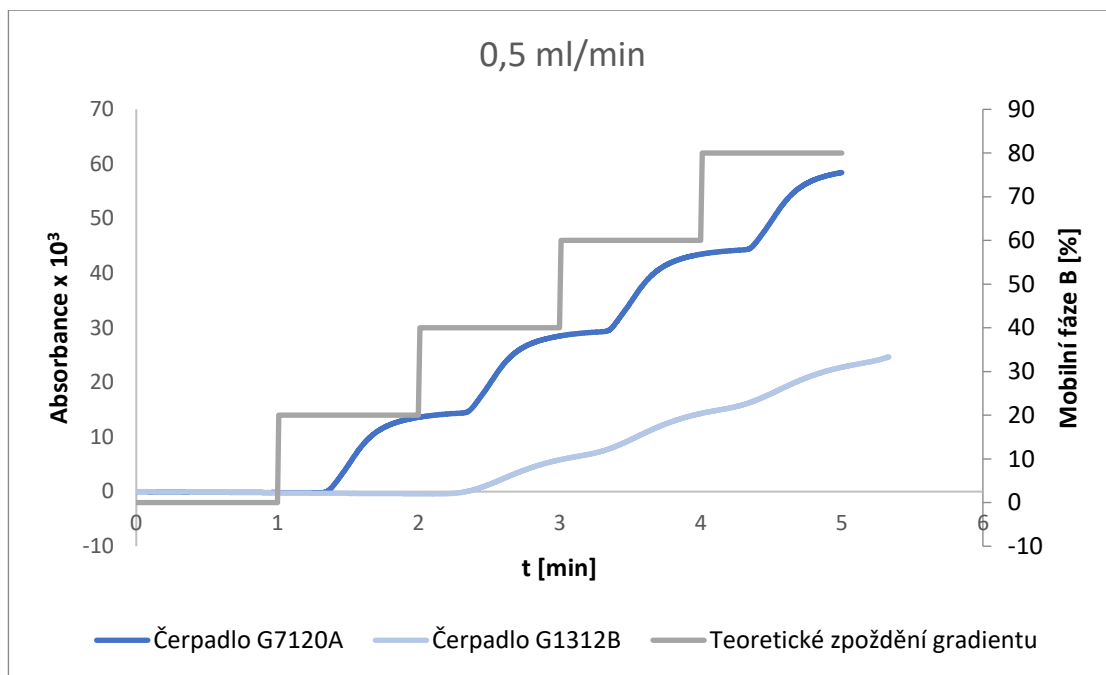
Průtok [ml/min]	Zpoždění gradientu [ml]	
	Čerpadlo G1720A	Čerpadlo G1312B
0,50	0,33	0,90
0,75	0,34	0,91
1	0,36	0,89

U obou čerpadel byl objem zpoždění gradientu víceméně neměnný se změnou objemového průtoku mobilní fáze. U čerpadla G1312B je objem zpoždění gradientu vyšší než u čerpadla G1720A.

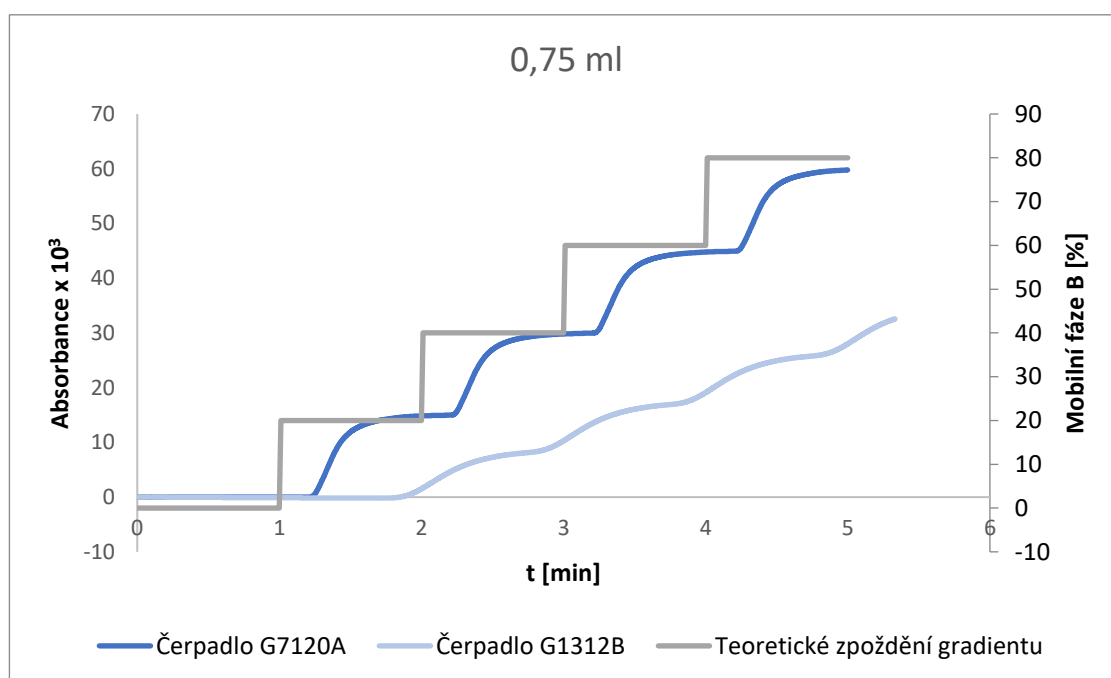
Zpoždění gradientu bylo měřeno i pomocí stupňovitého gradientu. I z tohoto měření je možné určit objem zpoždění gradientu, v tomto případě byl však použit k porovnání účinnosti mísení mobilní fáze na čerpadlech G7120A a G1312B oproti teoretickému předpokladu. V Grafu 2 je zobrazena skoková změna mobilní fáze na čerpadle G7120A, G1312B a teoreticky (nastavený profil gradientu) při průtoku 0,5 ml/min, v Grafu 3 při průtoku 0,75 ml/min a v Grafu 4 při průtoku 1 ml/min. Používaný gradient je uveden v Tabulce 14.

Tabulka 14 Gradient mobilní fáze pro měření stupňovité změny gradientu

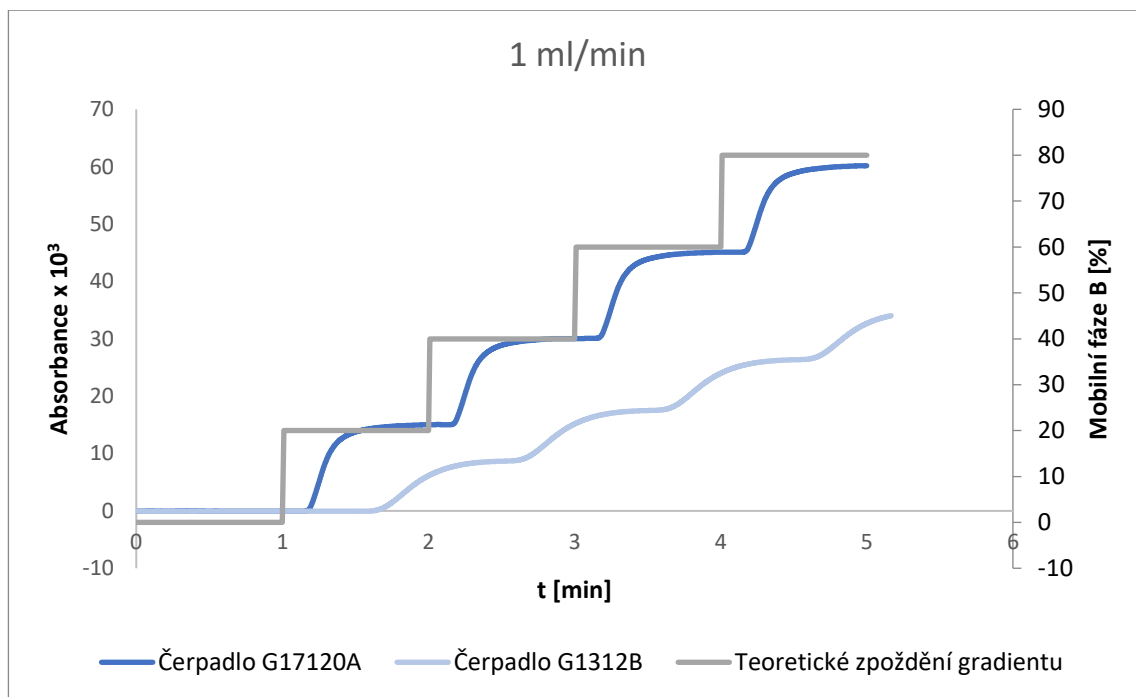
Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,00	0	100
1,00	0	100
1,01	20	80
2,00	20	80
2,01	40	60
3,00	40	60
3,01	60	40
4,01	80	20
5,00	80	20



Graf 2 Stupňovitá změna gradientu měřená při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min na čerpadle G7120A, G1312B, MF B: voda + 0,1% (v/v) aceton



Graf 3 Stupňovitá změna gradientu měřená při průtoku mobilní fáze 0,75 ml/min na čerpadle G7120A, G1312B, MF B: voda + 0,1% (v/v) aceton



Graf 4 Stupňovitá změna gradientu měřená při průtoku mobilní fáze 1 ml/min na čerpadle G7120A, G1312B, MF B: voda + 0,1% (v/v) aceton

K nejhoršímu mísení mobilních fází oproti teoretickému předpokladu docházelo na čerpadle G1312B při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Nejvíce teorii se pak přibližuje měření na čerpadle G7120A při průtoku mobilní fáze 1 ml/min.

U každého čerpadla mohou rozdíly v objemu zpoždění gradientu a rozdílné mísení mobilních fází ovlivňovat retenční časy při přenosu gradientových metod na jiné LC systémy. Typickým přístupem k řešení rozdílů v objemu zpoždění gradientu je např. zvýšení počáteční izokratické fáze nebo zkrácení doby trvání gradientu.

3.2 Mimokolonové objemy

Mimokolonové objemy negativně ovlivňují separaci látek – mohou snižovat účinnost separace a dochází kvůli nim k rozšiřování píků. Proto je pro každý LC systém důležité znát hodnotu mimokolonových objemů, aby se v případě významných hodnot mohly objemy minimalizovat (například úpravou délky a vnitřního průměru spojovacích kapilár).

K měření mimokolonových objemů bylo využito homologické řady alkylbenzenů, která byla separována izokratickou elucí na čerpadlech G7120A a G1312B, jelikož obě tato čerpadla byla používána ve 2D analýze tenzidů. Mimokolonové objemy obou čerpadel v rámci LC systému byly stanoveny jako mimokolonové příspěvky k rozptylu zón analyzovaných látek a byly stanoveny na základě metody publikované v článku Cohena a kol. [54]. Ze změřených

retenčních časů alkylbenzenů, t_m , a šířek píků v polovině výšky, $w_{0,5}$, byl vypočítán retenční faktor, k , retenční objem, V_r , a rozptyl, σ , podle následujících rovnic:

$$k = \frac{t_{rn} - t_m}{t_m} \quad (5)$$

$$V_r = f_m * t_r \quad (6)$$

$$\sigma = \frac{w_{0,5}}{2,355} \quad (7)$$

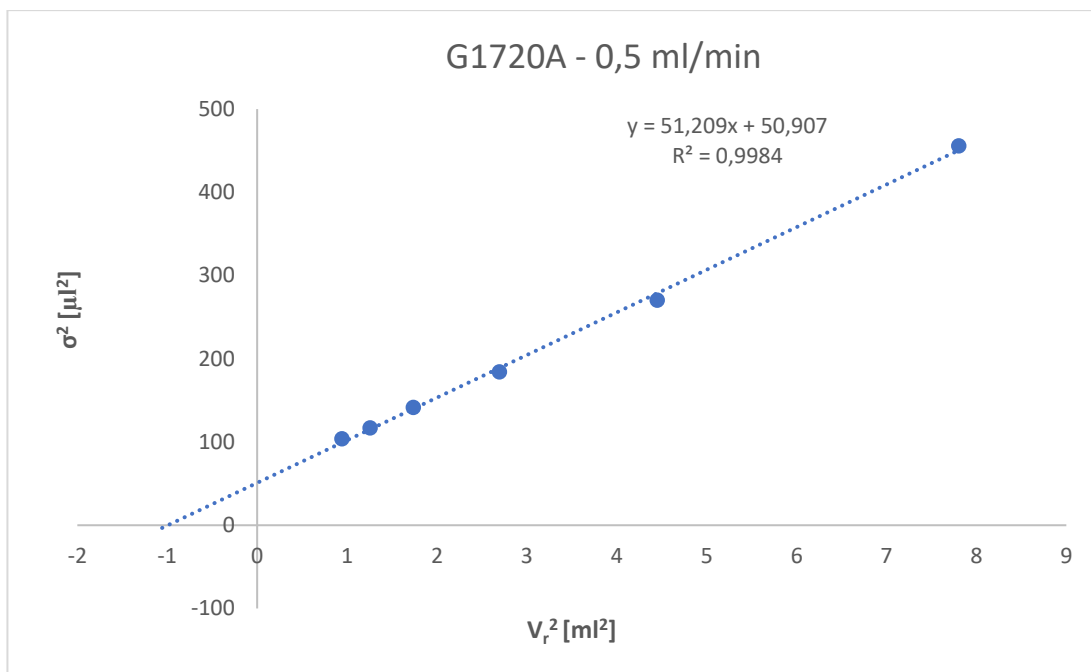
Retenční čas acetonu byl brán jako mrtvý čas kolony, t_m .

Z druhé mocniny retenčního objemu a druhé mocniny rozptylu byl vytvořen graf, který by měl vykazovat lineární trend. Z rovnice určené lineární regresi závislosti pak byl vypočítán objem mimokolonového příspěvku jako úsek lineární závislosti. Všechny tabulky s vypočtenými hodnotami a k nim příslušné grafy jsou uvedené v Příloze jako Tabulka P1-P6 a Grafy P7-P12.

Jako příklad je uvedené měření mimokolonových objemů při průtoku 0,5 ml/min na čerpadle G7120A. Z hodnot uvedených v Tabulce 15 je sestaven Graf 5. Z rovnice přímky byl pro průtok 0,5 ml/min vypočten mimokolonový objem 7,13 μ l.

Tabulka 15 Měření mimokolonových objemů při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

G1720A 0.5 ml/min							
	t_r [min]	$w_{0,5}$ [min]	k	V_r [ml]	V_r^2 [ml ²]	σ [μ l]	σ^2 [μ l ²]
benzen	1,94	0,048	0,457	0,971	0,94	10,19	103,84
toluen	2,24	0,051	0,682	1,121	1,26	10,81	116,92
ethylbenzen	2,64	0,056	0,977	1,318	1,74	11,89	141,36
propylbenzen	3,28	0,064	1,463	1,642	2,70	13,57	184,21
butylbenzen	4,22	0,077	2,165	2,109	4,45	16,45	270,54
pentylbenzen	5,59	0,101	3,191	2,794	7,80	21,35	455,72



Graf 5 Graf závislosti druhé mocniny retenčního objemu na závislosti druhé mocniny rozptylu pro výpočet mimokolonových objemů při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Hodnoty mimokolonových objemů při všech měřených průtocích stanovené pro obě čerpadla jsou uvedené v Tabulce 16.

Tabulka 16 Vypočtené mimokolonové objemy pro obě čerpadla při všech měřených průtocích

Průtok [ml/min]	Mimokolonové objemy [μl]	
	Čerpadlo G1720A	Čerpadlo G1312B
0,3	5,52	37,30
0,4	6,30	41,03
0,5	7,13	44,34

Ztráta účinnosti separace v důsledku účinků mimokolonových objemů závisí na rozměru kolony a velikosti částic v koloně. Kolony s nižším objemem (používané pro UHPLC) budou ovlivněny více než běžné HPLC kolony.

Mimokolonové příspěvky na čerpadle G7120A jsou velmi malé a díky tomu v podstatě zanedbatelné. Mimokolonové objemy při použití čerpadla G1312B už jsou větší a mohly by tak

mít vliv na rozšiřování píků. V obou případech je patrná závislost stanovených hodnot na objemovém průtoku mobilní fáze, kdy rostoucí hodnota určeného mimokolonového objemu jako příspěvku k rozšiřování zón, patrně souvisí se zvyšujícím se vlivem odporu vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní mobilní a stacionární fáze v koloně.

Mimokolonové objemy lze minimalizovat zejména použitím kratších spojovacích kapilár a rozptyl zón analyzovaných látek lze dále snížit např. snížením objemu dávkování vzorku nebo přizpůsobením rozpouštědla vzorku složení mobilní fáze.

3.3 Charakterizace používaných kolon

Pro charakterizaci používaných kolon ve druhé dimenzi byla opět použita sada alkylbenzenů, která byla analyzována při různých typech gradientu, které odpovídají gradientovým profilům ve druhé dimenzi při 2D separaci. Pro charakterizaci bylo vypočteno několik parametrů, a to účinnost kolony N , výškový ekvivalent teoretického patra H , píková kapacita n_c a ředění vzorku v průběhu analýzy DF (*dilution factor*).

Účinnost kolony se vyjadřuje jako počet pater N – čím větší je počet teoretických pater, tím méně je separovaná látka při průchodu kolonou rozmývána. Pro jednu kolonu je počet pater pro různé látky různý. Výškový ekvivalent teoretického patra H pak slouží k porovnání účinnosti kolon různé délky. Píková kapacita udává, kolik píků s konstantním chromatografickým rozlišením R se vejde do časového okna eluce (nejčastěji se uvažuje hodnota $R = 1$). Ředění udává poměr mezi koncentrací vzorku v nástřiku a koncentrací vzorku v eluovaném profilu píku.

Píková kapacita byla vypočítána podle vzorce:

$$n_{c,1D} = \frac{t_{R,n} - t_{R,1}}{W} \quad (8)$$

kde $t_{r,n}$ je retenční čas poslední zadržované látky (pentybenzenu), $t_{r,1}$ je retenční čas první látky v chromatogramu a odpovídá mrtvému času t_m (aceton) a W je průměrná šířka píků v chromatogramu. Uvedený vztah, který platí pro použití gradientové eluce předpokládá, že je průměrná šířka píku W v průběhu analýzy konstantní pro všechny eluované látky.

Dále byla změřena účinnost N , podle vzorce:

$$N = 5,54 * \left(\frac{t_r}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (9)$$

kde t_r je retenční čas zadržované látky a $w_{0,5}$ je šířka píku v polovině výšky.

Výškový ekvivalent teoretického patra, H , byl vypočítán podle vzorce:

$$H = \frac{L}{N} \quad (10)$$

kde L je délka kolony a N je počet teoretických pater.

Jako poslední bylo vypočítáno ředění (DF , *dilution factor*). Vzorec pro ředění byl odvozen následovně z poměru koncentrací na nástřiku, c_{inj} , a v eluční zóně při průchodu detektorem, c_n :

$$DF = \frac{c_{inj}}{c_p} = \frac{n_{inj}}{V_{inj}} * \frac{V_p}{n_{inj}} = \frac{8\sigma_v}{V_{inj}} \quad (11)$$

$$w_{0,5} = 2 * \sqrt{2 \ln 2} * \sigma_t = 2 * \sqrt{2 \ln 2} * \frac{\sigma_v}{F_m} \quad (12)$$

$$DF = \frac{8F_m * w_{0,5}}{V_{inj} * 2 * \sqrt{2 \ln 2}} \quad (13)$$

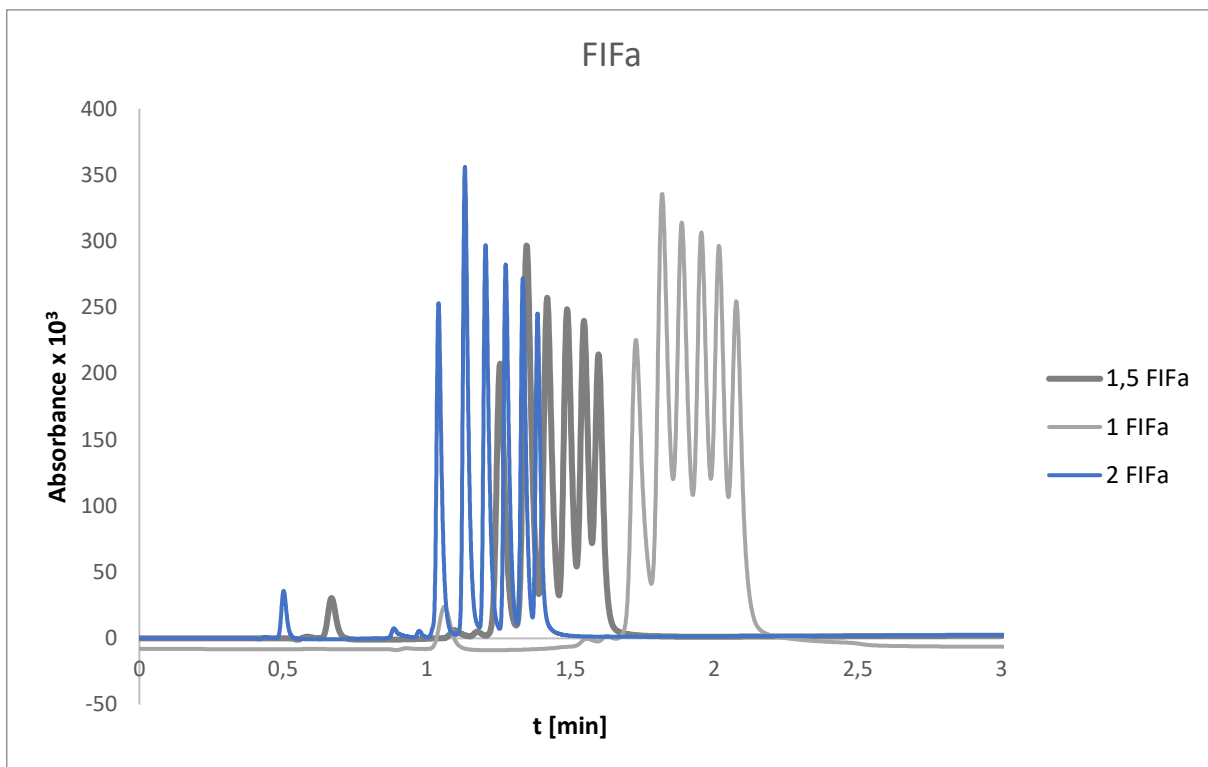
Po úpravě:

$$DF = \frac{4F_m * w_{0,5}}{V_{inj} * \sqrt{2 \ln 2}} \quad (14)$$

Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v příloze v Tabulkách P6-P25.

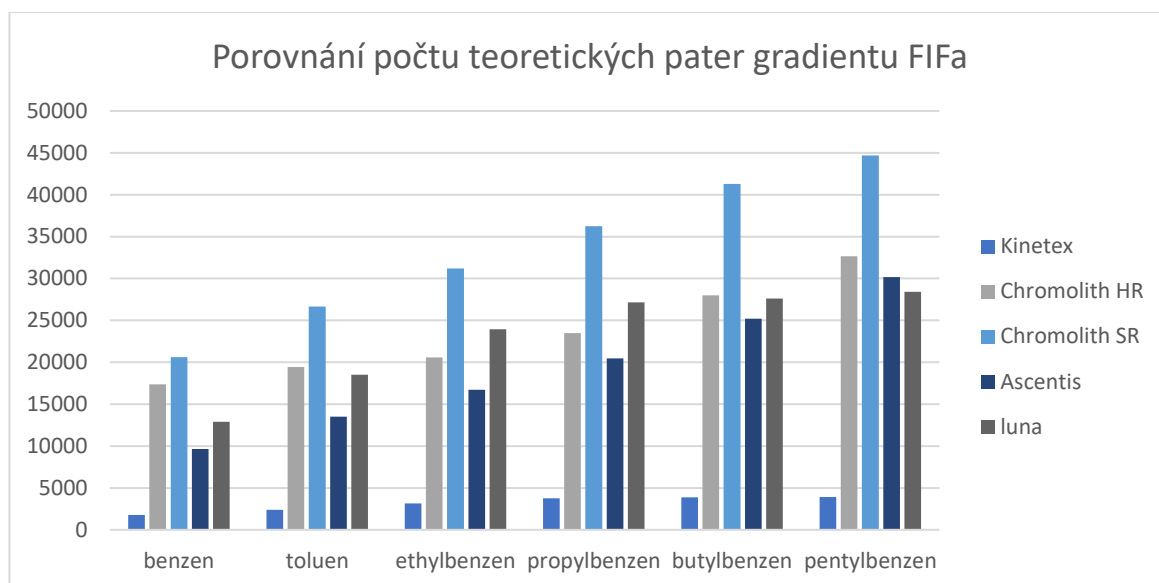
Jako příklad je zde uveden chromatogram separace alkylbenzenů na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped při průtoku 1 ml/min; 1,5 ml/min a 2 ml/min při použití gradientu FIFa (uvedený v Tabulce 3). Pro tuto kolonu již nebylo dále provedeno

měření při průtoku mobilní fáze 3 ml/min, jelikož byl na koloně tlak přesahující maximální tlak na koloně doporučený výrobcem.

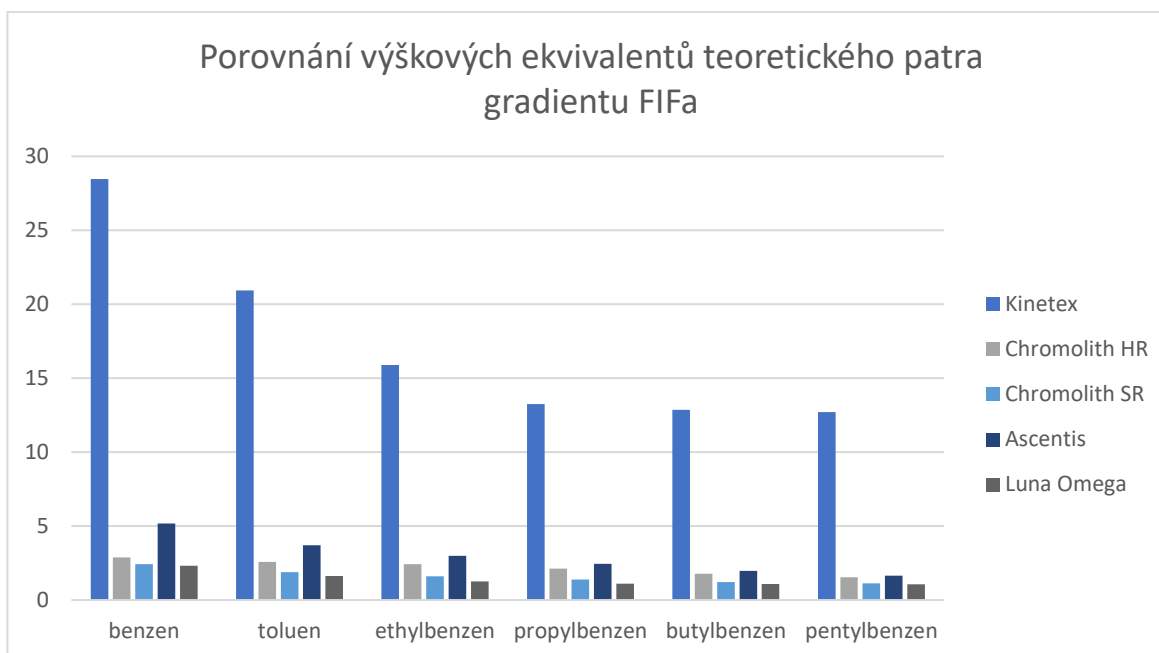


Graf 6 Chromatogram separace alkylbenzenů na koloně Chromolith® High Resolution RP-18 endcapped při průtoku mobilní fáze 1 ml/min, 1,5 ml/min a 2 ml/min za použití gradientu FIFa (viz Tabulka 3)

V Grafech 7 a 8 je porovnání počtu teoretických pater (N) a výškových ekvivalentů teoretického patra (H) jednotlivých kolon pro gradient FIFa (viz Tabulka 3). Nejvyšší účinnost vykazovala kolona Chromolith® SpeedROD RP-18e, naopak nejnižší kolona Kinetex® XB-C18. To potvrzují i výškové ekvivalenty teoretického patra, kde má kolona Kinetex® XB-C18 hodnotu nejvyšší. Nejnižší hodnotu H má kromě kolony Chromolith® SpeedROD RP-18e i kolona Luna® Omega, jelikož H zohledňuje i délku kolony, kterou má Luna® Omega nejmenší.



Graf 7 Porovnání počtu teoretických pater jednotlivých kolon pro gradient FIFa (viz Tabulka 3)



Graf 8 Porovnání výškových ekvivalentů teoretického patra jednotlivých kolon pro gradient FIFa (viz Tabulka 3)

Tabulka 17 Píková kapacita a ředění všech kolon při všech měřených průtocích s gradientem FIFa a FIFb (viz Tabulky 3 a 4)

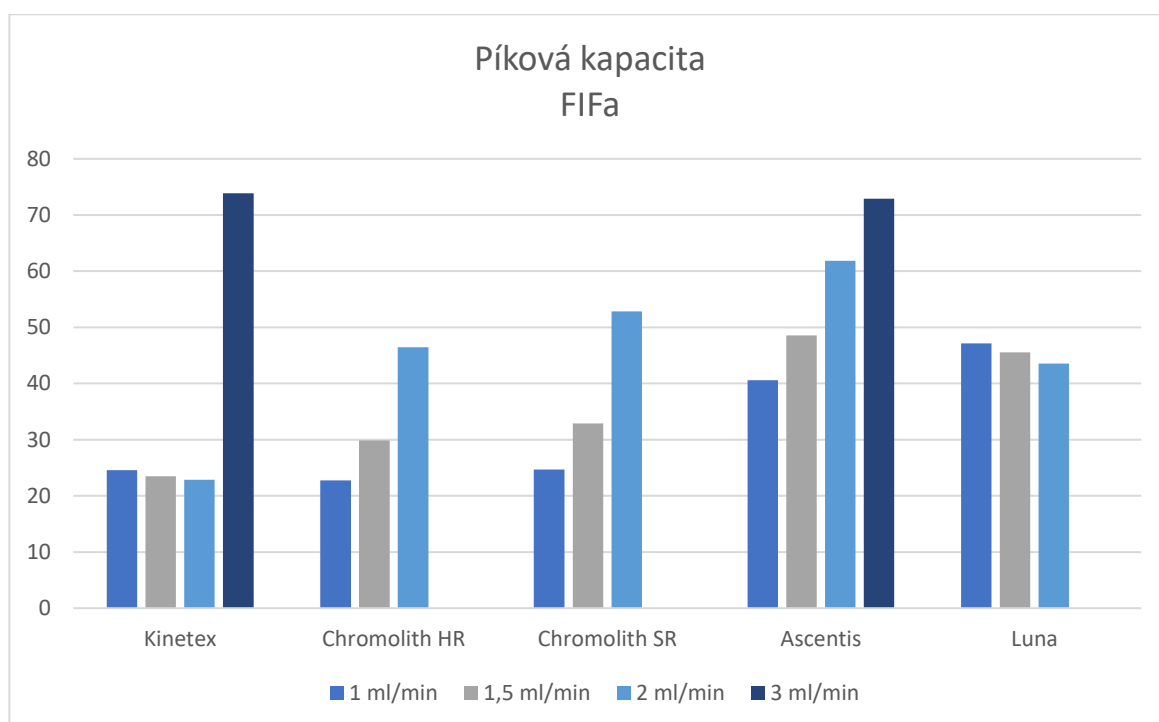
Gradient	Průtok	Kolona	Píková kapacita	Ředění
FIF a	1	Kinetex® XB-C18	24,56	39,07
		Chromolith® HighResolution RP-18	22,76	41,73
		Chromolith® SpeedROD RP-18	24,70	38,67
		Ascentis® Express C18	40,57	23,72
		Luna® Omega	47,13	34,55
	1,5	Kinetex® XB-C18	23,51	54,66
		Chromolith® HighResolution RP-18	29,89	43,83
		Chromolith® SpeedROD RP-18	32,88	39,96
		Ascentis® Express C18	48,58	26,42
		Luna® Omega	45,54	43,60
	2	Kinetex® XB-C18	22,89	69,97
		Chromolith® HighResolution RP-18	46,48	35,85
		Chromolith® SpeedROD RP-18	52,83	31,77
		Ascentis® Express C18	61,84	25,63
		Luna® Omega	43,57	52,92
3	Kinetex® XB-C18	73,89	29,69	
	Chromolith® HighResolution RP-18	-	-	
	Chromolith® SpeedROD RP-18	-	-	
	Ascentis® Express C18	72,89	29,39	
	Luna® Omega	-	-	
FIF b	1	Kinetex® XB-C18	22,52	37,65
		Chromolith® HighResolution RP-18	18,89	35,56
		Chromolith® SpeedROD RP-18	21,25	35,83
		Ascentis® Express C18	37,85	21,97
		Luna® Omega	46,17	33,39
	1,5	Kinetex® XB-C18	20,50	53,57
		Chromolith® HighResolution RP-18	26,61	41,31
		Chromolith® SpeedROD RP-18	28,64	41,56
		Ascentis® Express C18	43,69	25,82
		Luna® Omega	43,66	44,46
	2	Kinetex® XB-C18	19,73	24,09
		Chromolith® HighResolution RP-18	39,73	34,81
		Chromolith® SpeedROD RP-18	45,55	35,31
		Ascentis® Express C18	48,39	25,85
		Luna® Omega	42,35	55,61
3	Kinetex® XB-C18	65,27	28,14	
	Chromolith® HighResolution RP-18	-	-	
	Chromolith® SpeedROD RP-18	-	-	
	Ascentis® Express C18	65,03	29,34	
	Luna® Omega	-	-	

Tabulka 18 Píková kapacita a ředění všech kolon při všech měřených průtocích s gradientem SIFa a SIFb (viz Tabulky 5 a 6)

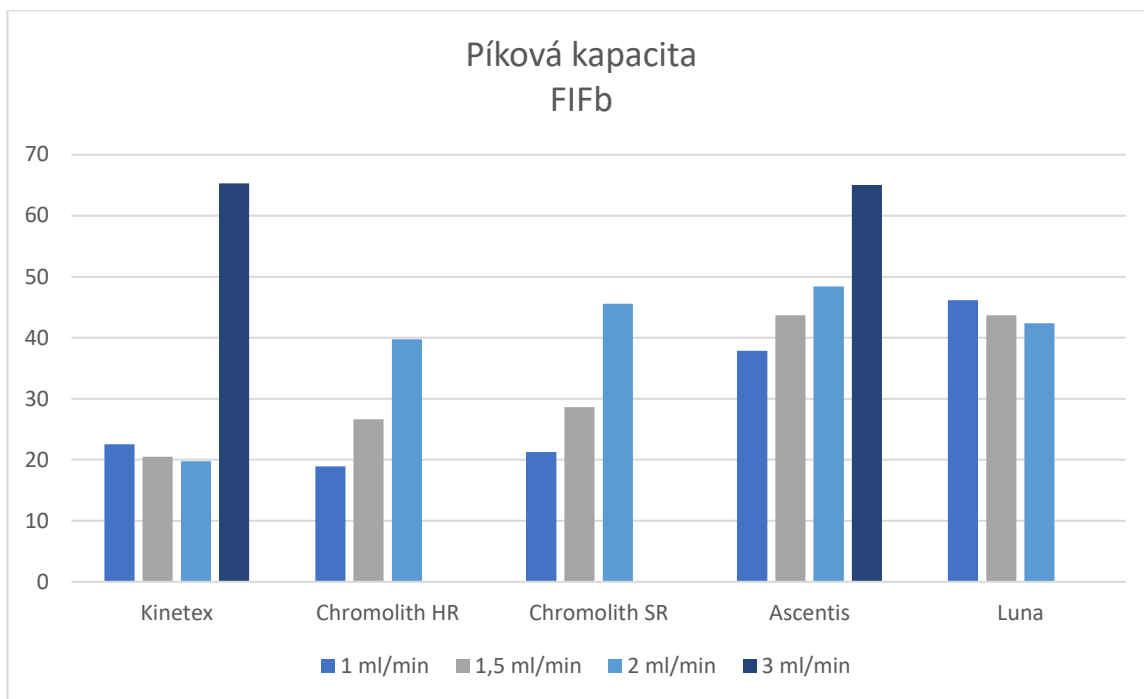
Gradient	Průtok	Kolona	Píková kapacita	Ředění
SIF a	1	Kinetex® XB-C18	20,99	36,43
		Chromolith® HighResolution RP-18	26,69	41,89
		Chromolith® SpeedROD RP-18	27,27	34,67
		Ascentis® Express C18	33,68	21,75
		Luna® Omega	38,49	30,92
	1,5	Kinetex® XB-C18	18,06	52,92
		Chromolith® HighResolution RP-18	29,03	40,19
		Chromolith® SpeedROD RP-18	29,85	40,33
		Ascentis® Express C18	34,29	25,05
		Luna® Omega	35,31	38,88
	2	Kinetex® XB-C18	46,01	68,15
		Chromolith® HighResolution RP-18	40,61	34,59
		Chromolith® SpeedROD RP-18	41,58	33,68
		Ascentis® Express C18	38,64	27,79
		Luna® Omega	33,22	47,01
3	Kinetex® XB-C18	47,56	28,24	
	Chromolith® HighResolution RP-18	-	-	
	Chromolith® SpeedROD RP-18	-	-	
	Ascentis® Express C18	40,17	27,88	
	Luna® Omega	-	-	
SIF b	1	Kinetex® XB-C18	28,47	25,09
		Chromolith® HighResolution RP-18	24,07	34,63
		Chromolith® SpeedROD RP-18	24,68	34,67
		Ascentis® Express C18	33,03	20,13
		Luna® Omega	37,33	32,14
	1,5	Kinetex® XB-C18	27,08	32,01
		Chromolith® HighResolution RP-18	25,98	40,44
		Chromolith® SpeedROD RP-18	26,88	40,32
		Ascentis® Express C18	34,85	22,97
		Luna® Omega	34,24	42,28
	2	Kinetex® XB-C18	42,11	23,62
		Chromolith® HighResolution RP-18	34,39	36,23
		Chromolith® SpeedROD RP-18	38,14	33,68
		Ascentis® Express C18	36,22	25,03
		Luna® Omega	30,01	59,46
3	Kinetex® XB-C18	43,74	27,52	
	Chromolith® HighResolution RP-18	-	-	
	Chromolith® SpeedROD RP-18	-	-	
	Ascentis® Express C18	38,10	28,29	
	Luna® Omega	-	-	

V Tabulce 17 a 18 jsou uvedené hodnoty píkových kapacit a ředění všech kolon při všech průtocích mobilní fáze všech čtyř testovaných gradientů.

V Grafech 9 a 10 je zobrazena píkova kapacita jednotlivých kolon při všech měřených průtocích při použití gradientu FIFa a FIFb (viz Tabulky 3 a 4). Píkova kapacita se pohybuje v rozmezí od 20 do 70. Píkove kapacity při použití gradientu FIFb jsou o něco málo menší, což pravděpodobně souvisí s kratší dobou gradientu. Nejvyšší píkovou kapacitu měla při použití FIFa i FIFb kolona Kinetex® XB-C18 při průtoku mobilní fáze 3 ml/min, stejně tak i kolona Ascentis® Express C18. Pro kolony Chromolith® High Resolution RP-18, Chromolith® SpeedROD RP-18e a Luna® Omega nemohl být použit průtok mobilní fáze 3 ml/min, jelikož při tomto průtoku byl na kolonách příliš velký tlak, který přesahoval mezní tlak udávaný výrobcem kolony. Kromě kolony Luna® Omega pro všechny kolony platí, že čím vyšší průtok mobilní fáze, tím vyšší je dosažená píkova kapacita. U kolony Luna® Omega se píkova kapacita lehce snižuje s průtokem mobilní fáze. Na rozdíl od ostatních kolon je tato kolona plněná jako jediná plně porézními částicemi a tento rozdíl tak může být způsoben rozdílným příspěvkem odporu vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní oproti monolitickým kolonám a kolonám plněným povrchově porézními částicemi.



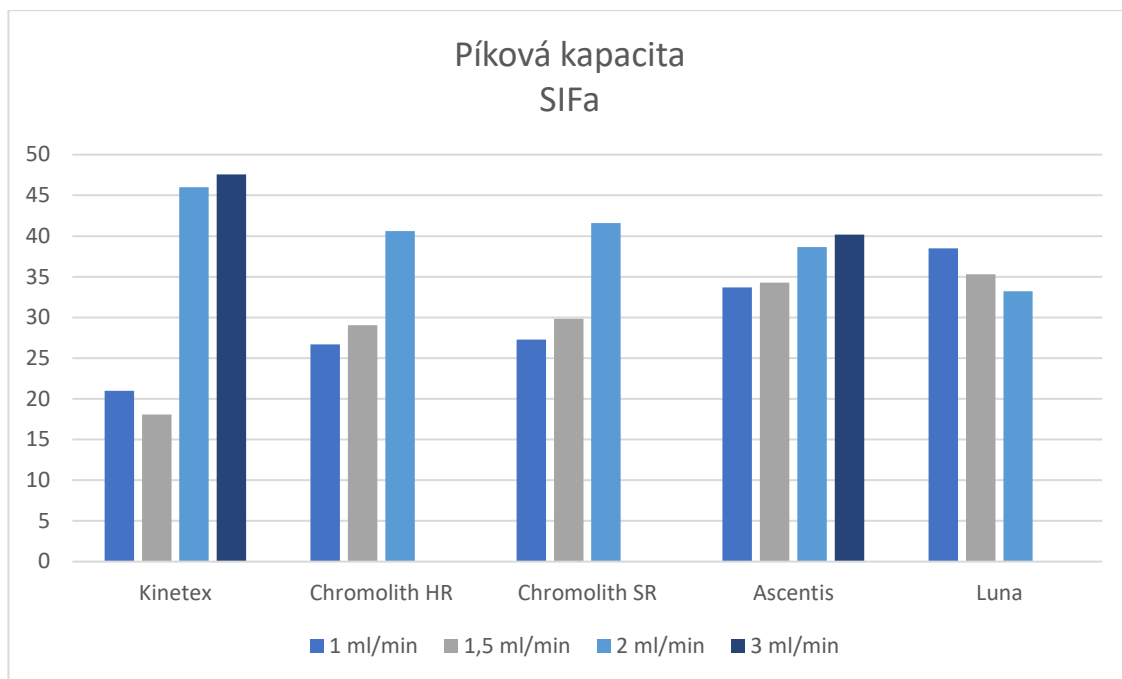
Graf 9 Graf píkových kapacit jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu FIFa (viz Tabulka 3)



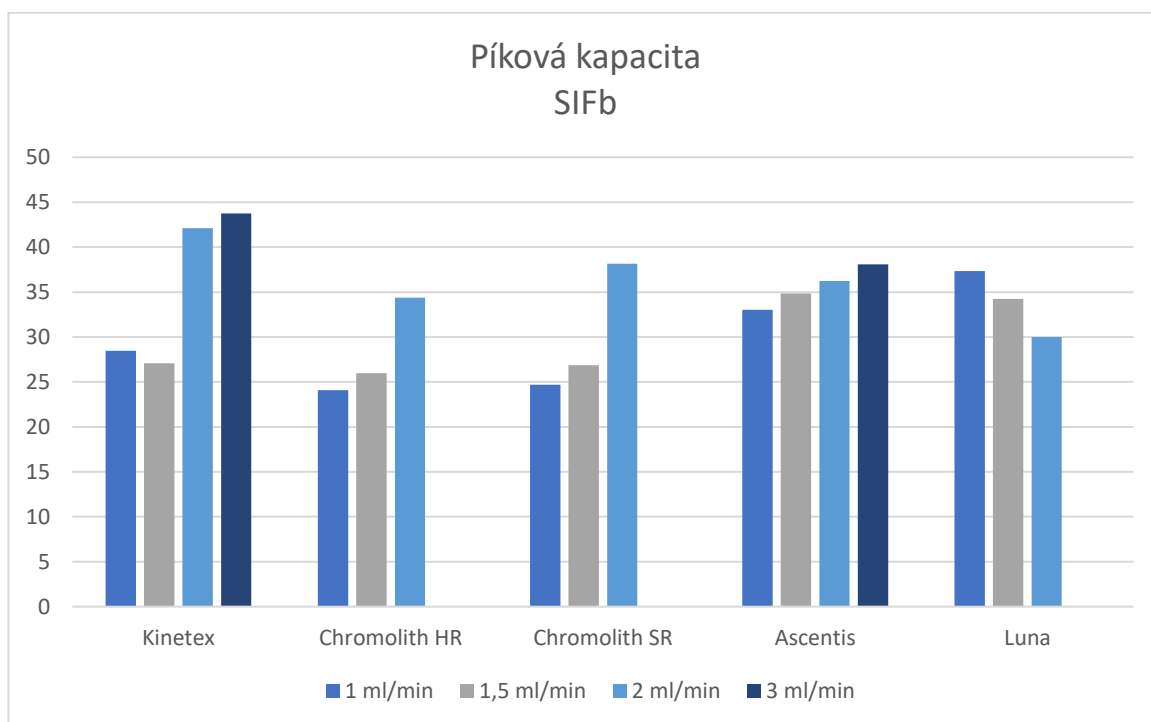
Graf 10 Graf píkových kapacit jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu FIFb (viz Tabulka 4)

V Grafech 11 a 12 je zobrazena píková kapacita jednotlivých kolon při všech měřených průtocích při použití gradientu SIFa a SIFb (viz Tabulky 5 a 6). Hodnoty píkových kapacit se pohybují v rozmezí 15 až 47. Celkově jsou naměřené píkové kapacity menší než při použití gradientu FIF.

Nejvyšší píkovou kapacitu měla kolona Kinetex® XB-C18 jak při průtoku mobilní fáze 3 ml/min, tak i při 2 ml/min. Při průtoku mobilní fáze 2 ml/min měla vysokou píkovou kapacitu i kolona Chromolith® SpeedROD RP-18e. Stejně jako při gradientu FIF se u všech kolon, kromě kolony Luna® Omega, se píková kapacita zvyšuje se zvyšujícím se průtokem mobilní fáze. U kolony Luna® Omega se píková kapacita mírně snižuje, stejně jako u gradientu FIF.

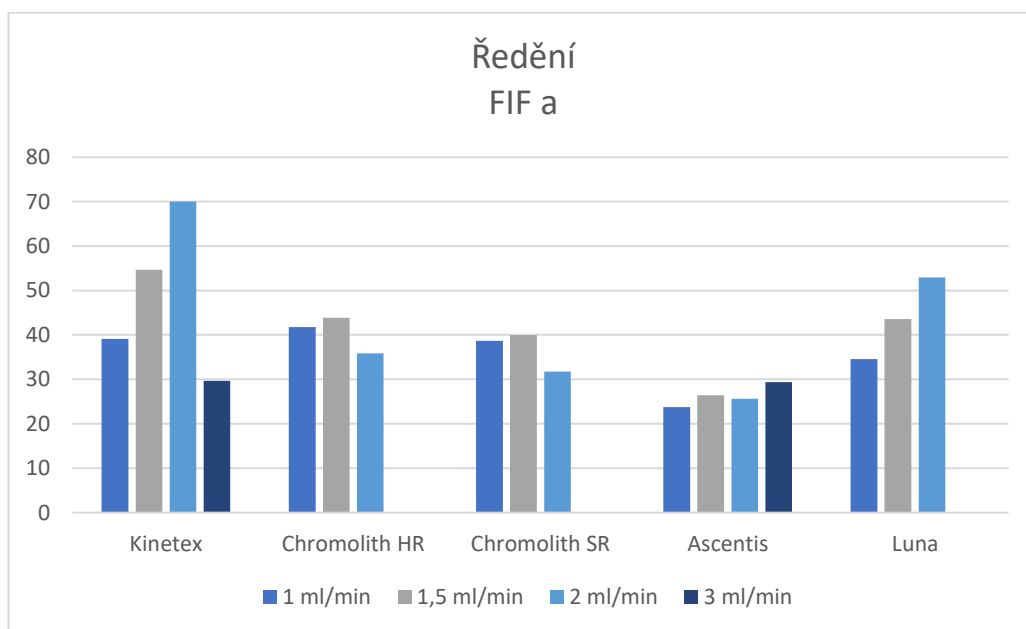


Graf 11 Graf píkových kapacit jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu SIFa (viz Tabulka 5)

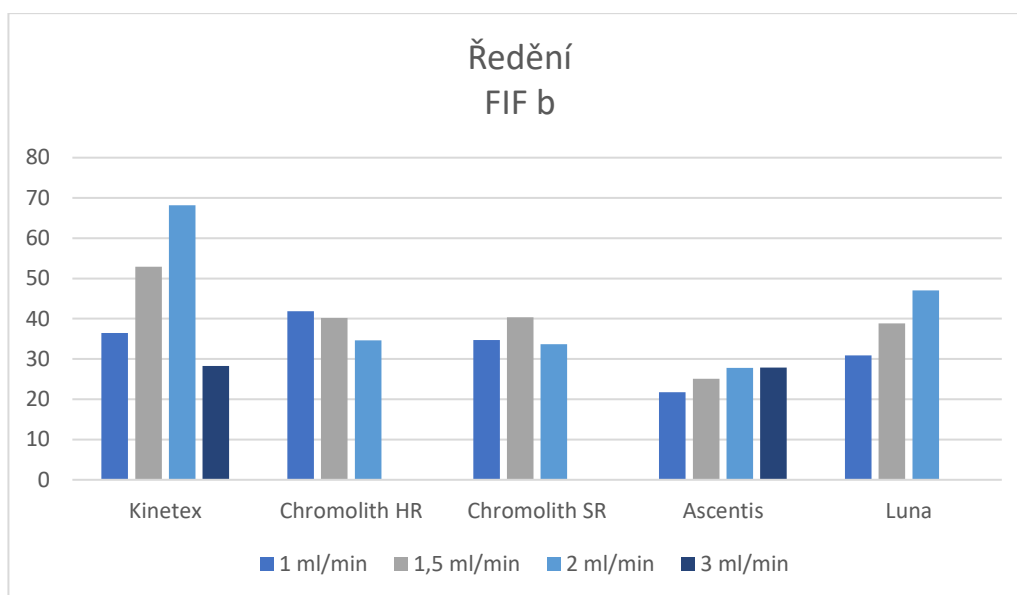


Graf 12 Graf píkových kapacit jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu SIFb (viz Tabulka 6)

V návaznosti na hodnocení píkové kapacity jednotlivých kolon pro druhou dimenzi 2D systému a její závislosti na profilu použitého gradientu bylo hodnoceno také ředění vzorků za pomoci ředícího faktoru, definovaného Rovnicí 14. Uvedený vztah a ředící faktor tak, jak je definován, zahrnuje ředění vzorku pouze při průchodu druhou dimenzí, a neuvažuje tak frakcionaci píků opouštějících kolonu v první dimenzi. V Grafech 13 a 14 je zobrazeno ředění látek na jednotlivých kolonách při všech měřených průtocích při použití gradientu FIFa a FIFb (viz Tabulky 3 a 4). Hodnota ředění se pohybuje od 20 do 70. K největšímu ředění dochází na koloně Kinetex® XB-C18 při průtoku mobilní fáze 2 ml/min a to jak u gradientu FIFa, tak i FIFb. Naopak nejmenší hodnotu ředění má kolona Ascentis® Express C18 při všech průtocích mobilní fáze i u gradientu FIFa i FIFb.

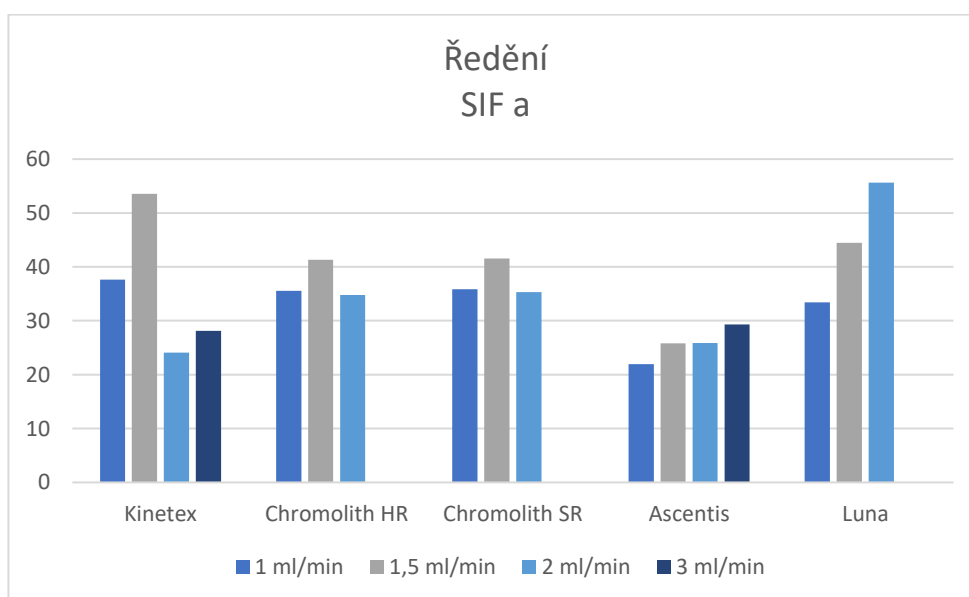


Graf 13 Graf ředění jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu FIFa (viz Tabulka 3)

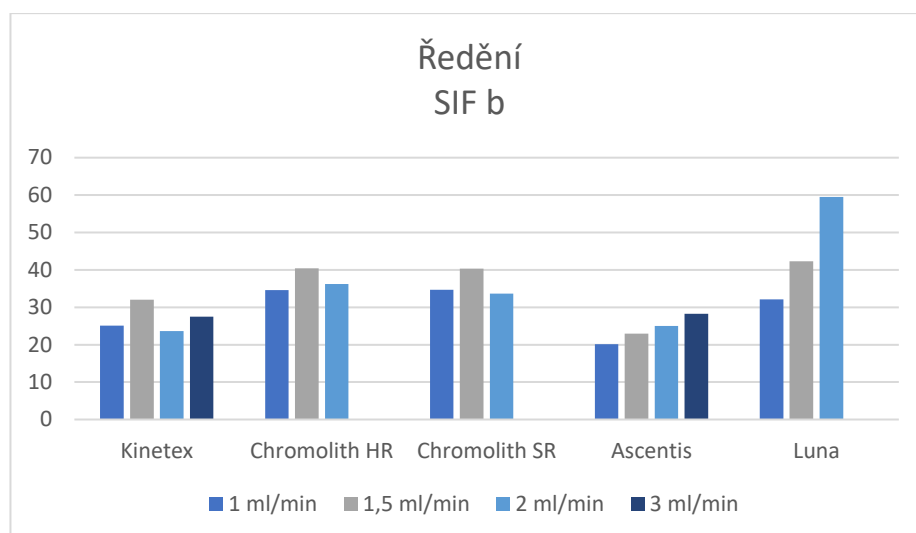


Graf 14 Graf ředění jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu FIFb (viz Tabulka 4)

V Grafech 15 a 16 jsou zobrazeny hodnoty ředění všech kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu SIFa a SIFb. (viz Tabulky 5 a 6). Hodnoty ředění jsou od 20 do 60 a jsou tak o něco málo nižší než u gradientu FIF. Nejvyšší hodnotu ředění u SIFa má kolona Kinetex® XB-C18 při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min a kolona Luna® Omega při průtoku 2 ml/min. U kolony Kinetex® XB-C18 se použitím gradientu SIFb hodnota ředění zmenšila, naopak u kolony Luna® Omega se hodnota lehce zvýšila. Nejmenší hodnotu ředění má kolona Ascentis® Express C18.



Graf 15 Graf ředění jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu SIFa (viz Tabulka 5)

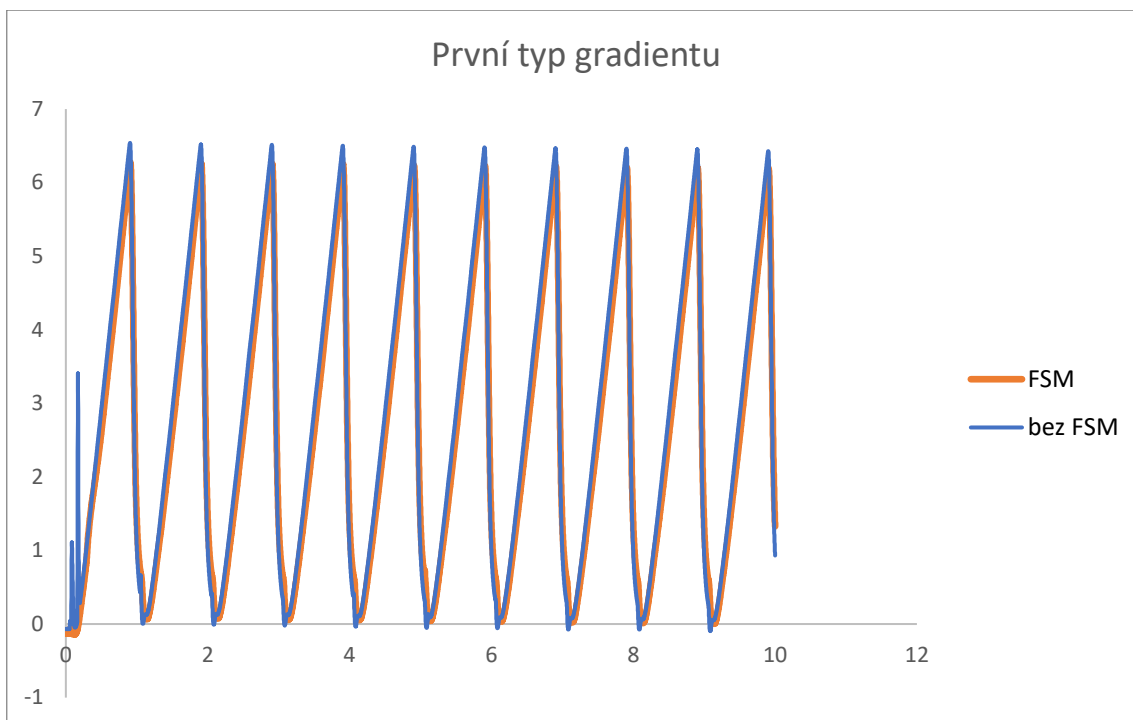


Graf 16 Graf ředění jednotlivých kolon při všech měřených průtocích s použitím gradientu SIFb (viz Tabulka 6)

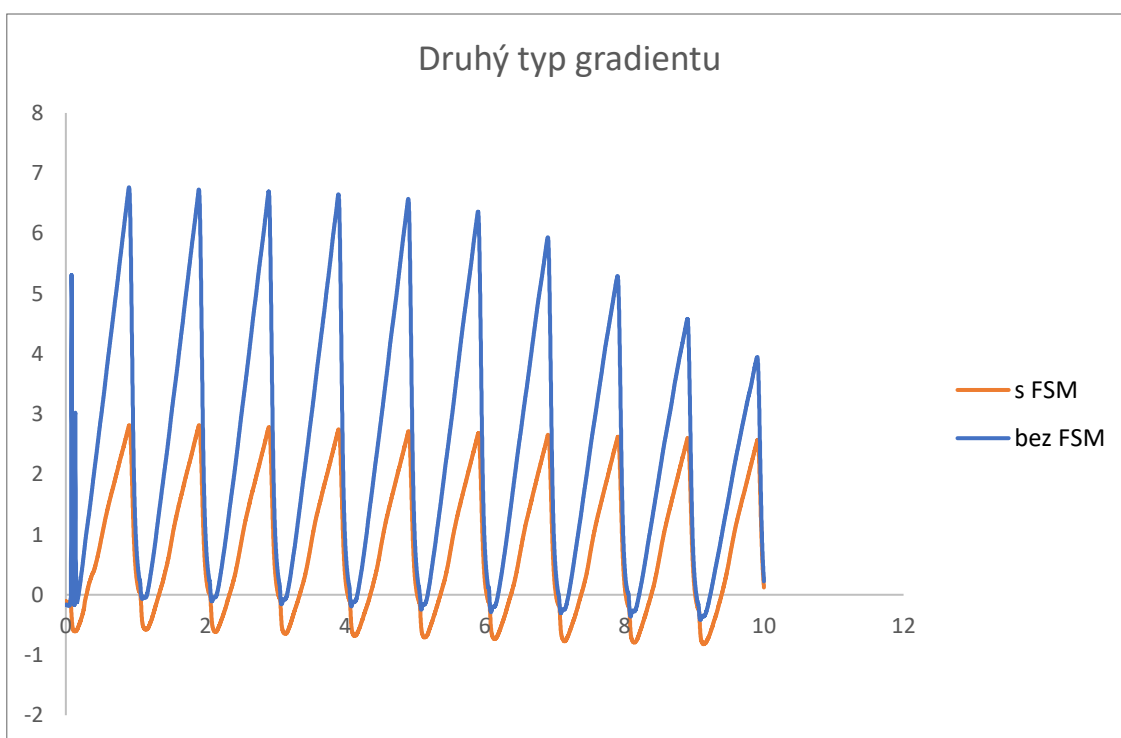
3.4 Měření s FSM

Pro zjištění, jak se budou ředit vzorky při použití rozhraní FSM, bylo využito měření destilované vody jako vzorku ve 2D, za použití mobilní fáze destilované vody s přidavkem acetonu. Byly stanoveny profily gradientů použitých v druhé dimenzi jak bez, tak i s použitím FSM. Profily jsou uvedeny na Grafech 17 až 19 pro jednotlivé typy gradientů. Při použití FSM dochází v rámci převodu frakcí k ředění frakcionované mobilní fáze z kolony první dimenze mobilní fází s nízkou eluční silou a k fokusaci následně dochází až na začátku kolony druhé dimenze díky snížené retenci látek v ředěné zóně. Protože následující experimenty byly prováděny bez kolony v druhé dimenzi, není na záznamech patrný efekt fokusace, ale pouze ředění mobilní fáze v druhé dimenzi, obsahující aceton.

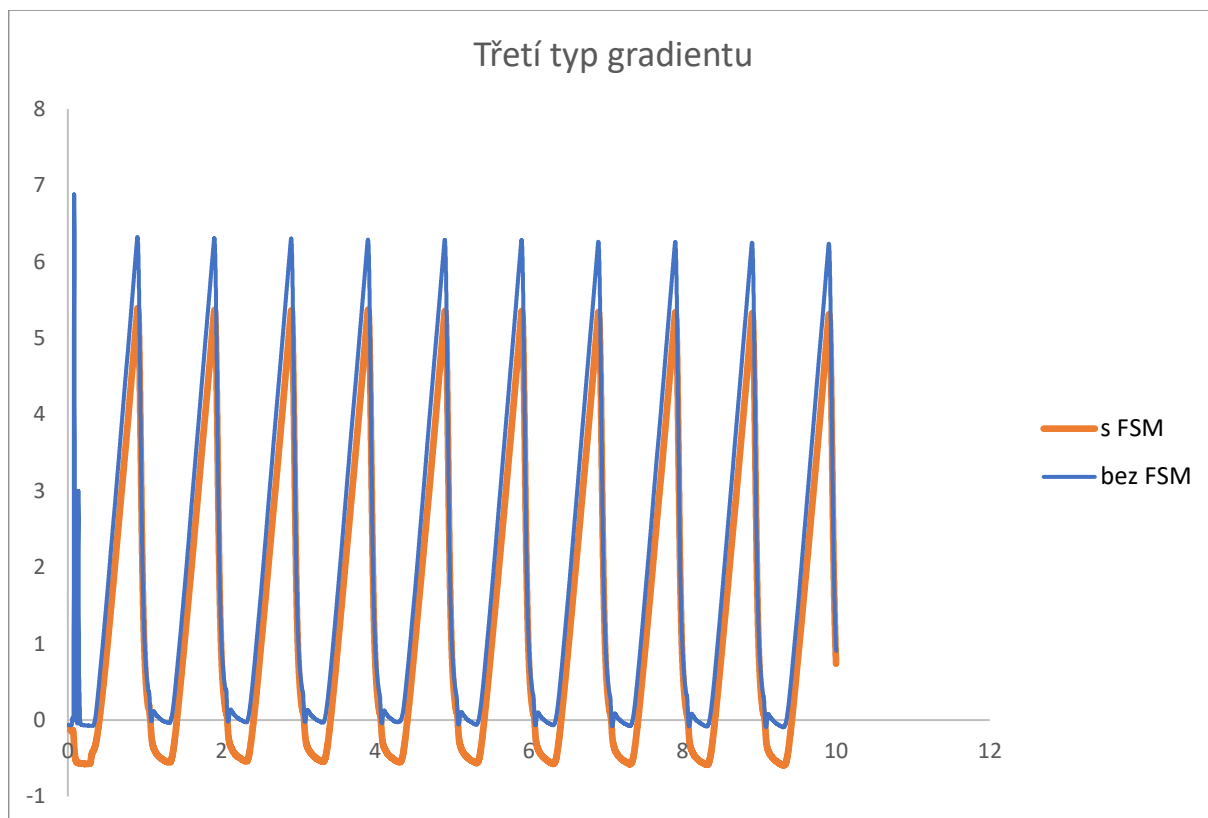
Z Grafu 17 a 19 je patrné, že použití FSM nemělo při použití těchto typu gradientů žádný vliv na ředění vzorku. Pouze z Grafu 18 lze vyčíst významné ředění při použití rozhraní FSM. Vedle ředění frakcí eluátu z kolony první dimenze, ke kterému dochází v rámci zapojení FSM, přispívá zvětšený objem kapilár také ke zpoždění gradientu, které by mělo být teoreticky větší právě o objem spojovací kapiláry mezi dvěma T-spojky. Vzhledem k tomu, že byla k propojení použita kapilára (smyčka) o objemu 60 μ l a experimenty zobrazené na Grafu 17 až 19 byly proměřovány při průtoku mobilní fáze 2 ml/min, je posun signálů v časové ose mezi zapojením bez a s FSM prakticky zanedbatelný.



Graf 17 První typ gradientu (viz Tabulka 7) použitý pro měření ředění při použití rozhraní FSM



Graf 18 Druhý typ gradientu (viz Tabulka 8) použitý pro měření ředění při použití rozhraní FSM



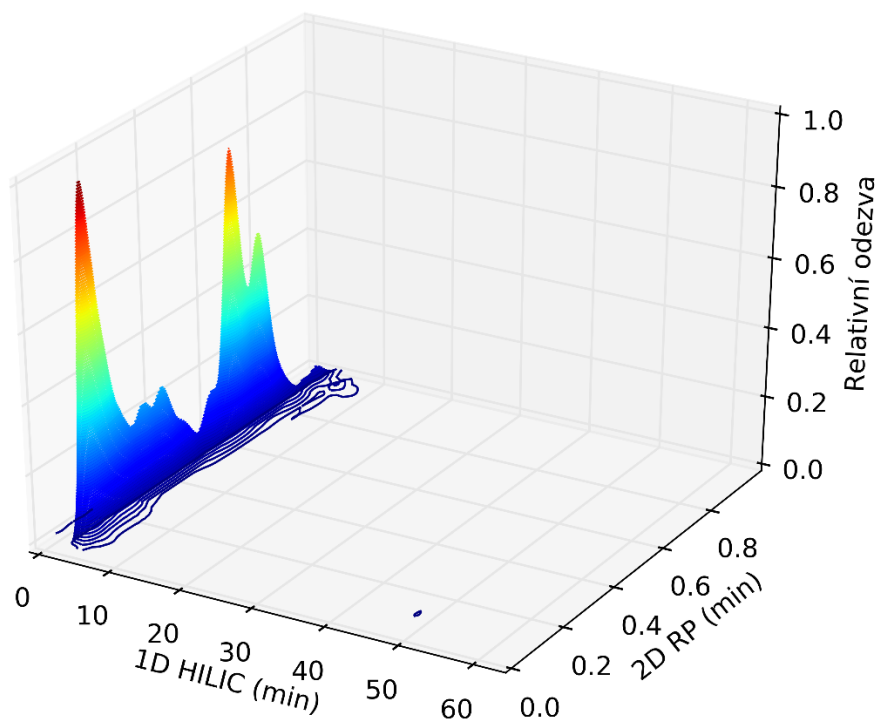
Graf 19 Třetí typ gradientu (viz Tabulka 9) použitý pro měření ředění při použití rozhraní FSM

3.5 Analýza tenzidů ve 2D

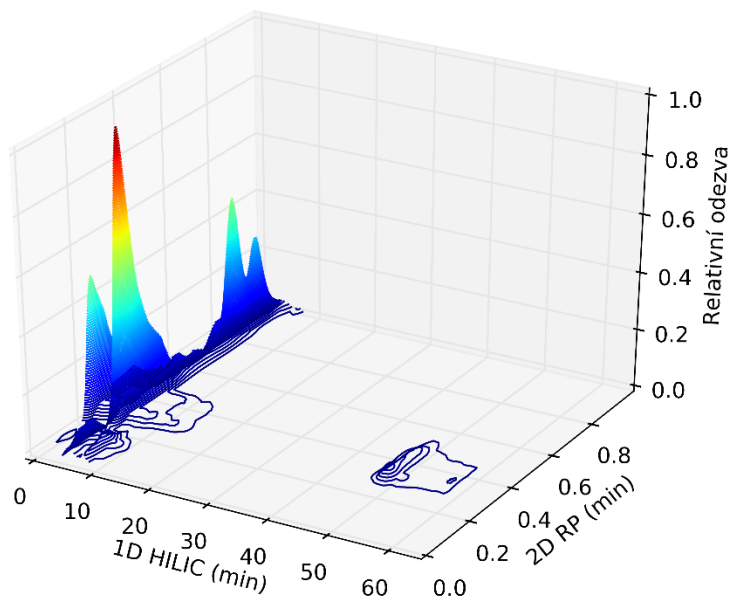
3.5.1 Bez rozhraní FSM

Analýza tenzidů byla provedena za použití komplexní 2D chromatografie s rozptylovým detektorem. Měření probíhalo na HILIC koloně v první dimenzi a na pěti různých RP kolonách v druhé dimenzi (viz Tabulka 2). Jako vzorky byly použity neiontové tenzidy Levenol®. Mobilní fáze v první dimenzi byla voda + 10 mM octan amonný/ acetonitril + 10 mM octan amonný. Jako mobilní fáze ve druhé dimenzi byla použita destilovaná voda a acetonitril, ve čtyřech typech gradientu (uvedené v Tabulce 3-6). Nejprve byly všechny vzorky proměřeny za všech podmínek na všech kolonách a podle 2D chromatogramů se vybraly dvě nejúčinnější kolony, se kterými bylo měřeno i 2D s FSM rozhraním. Jako nejúčinnější kolony se ukázaly kolony Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped a Luna® Omega. Na Obrázcích 15-18 jsou zobrazeny 2D chromatogramy analýzy všech tenzidů na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped v gradientu SIFb. Na 2D chromatogramu je patrné, že v první HILIC dimenzi dochází ke koeluci oligomerů tenzidů s rozdílnou délkou alkylového řetězce, což bylo pozorováno v rámci diplomové práce M. Humplíka [55], na kterou tato práce navazuje. V druhé dimenzi pak jsou na základě hydrofobních vlastností separovány právě oligomery s rozdílným alkylem. Při pozorování záznamů pro různé tenzidy je patrná

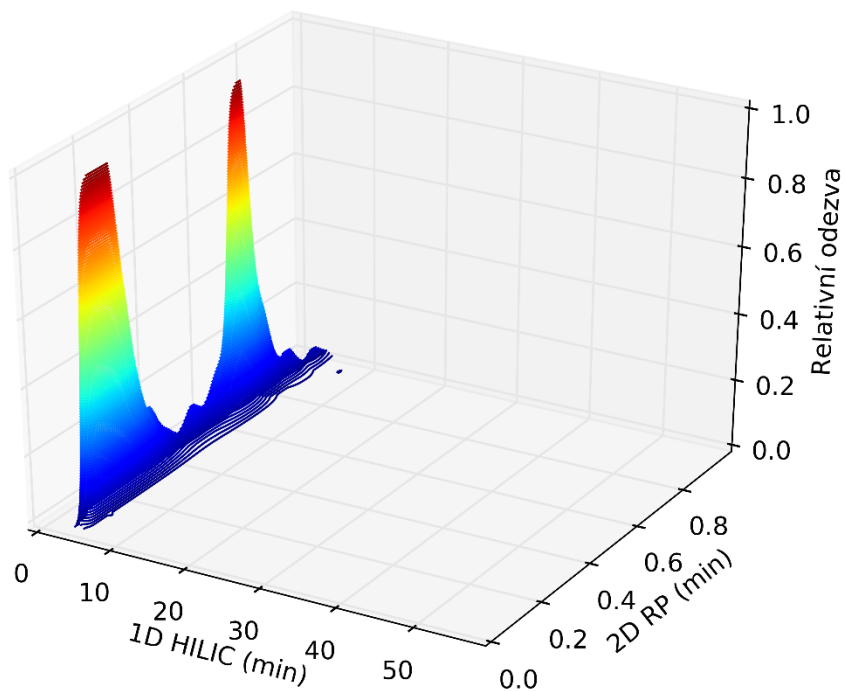
změna profilu 2D chromatogramu s rostoucí složitostí vzorku. Na 2D chromatogramu v retenčních časech první HILIC dimenze větších než 10 min eluuje minimální počet oligomerů, což může být u zapojení rozhraní bez fokusace způsobeno rovněž významným ředěním složek vzorků.



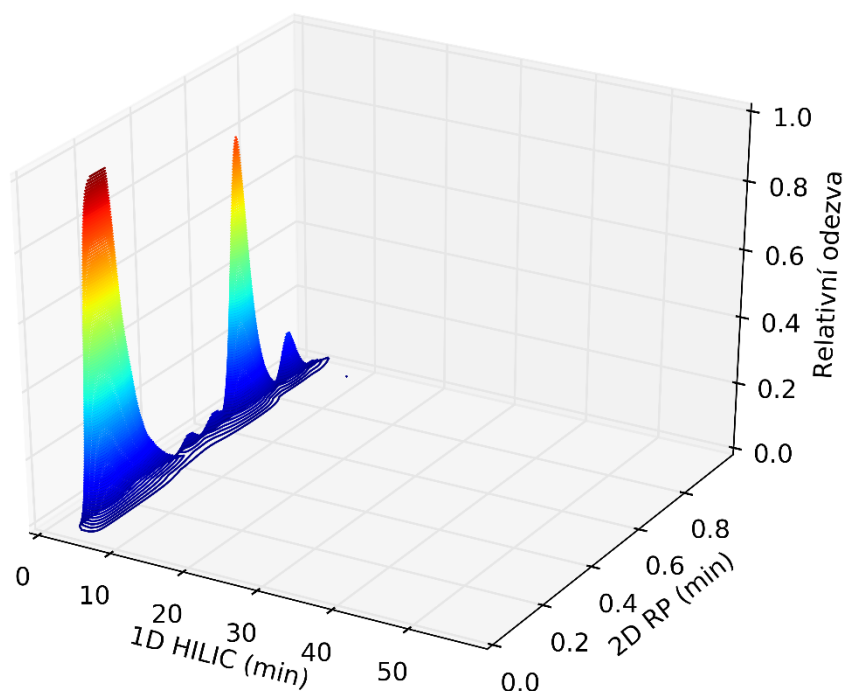
Obrázek 15 Záznam 2D chromatogramu tenzidu Levenol® F-200 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C



Obrázek 16 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-201 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C



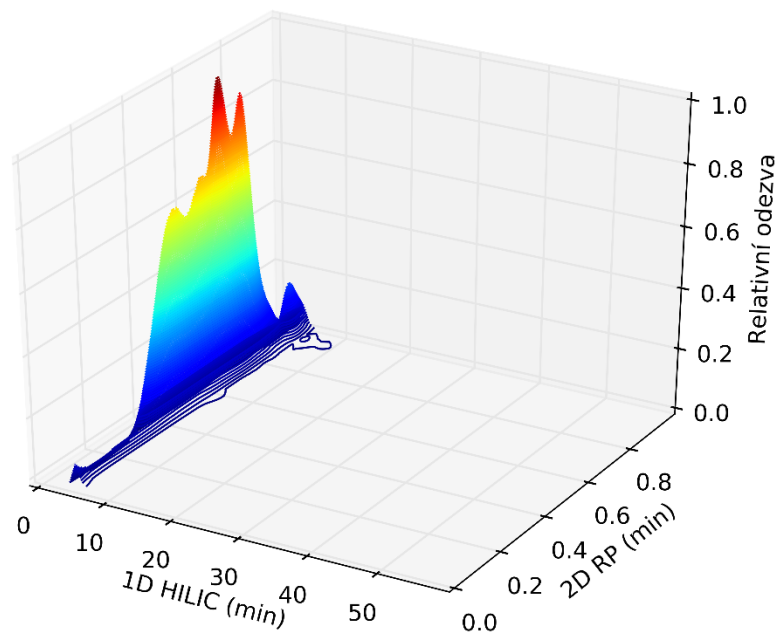
Obrázek 17 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-301 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C



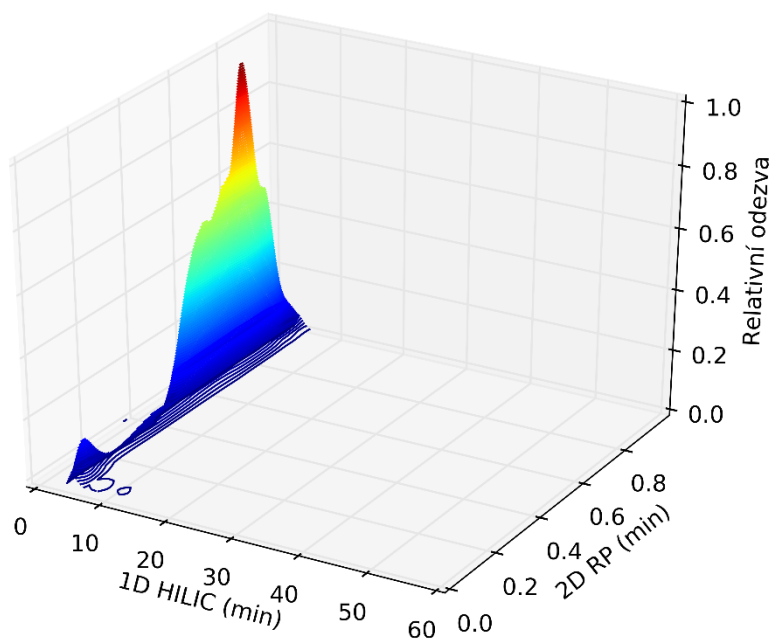
Obrázek 18 Záznam chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-421 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped bez použití FSM, teplota 55 °C

3.5.2 S rozhraním FSM

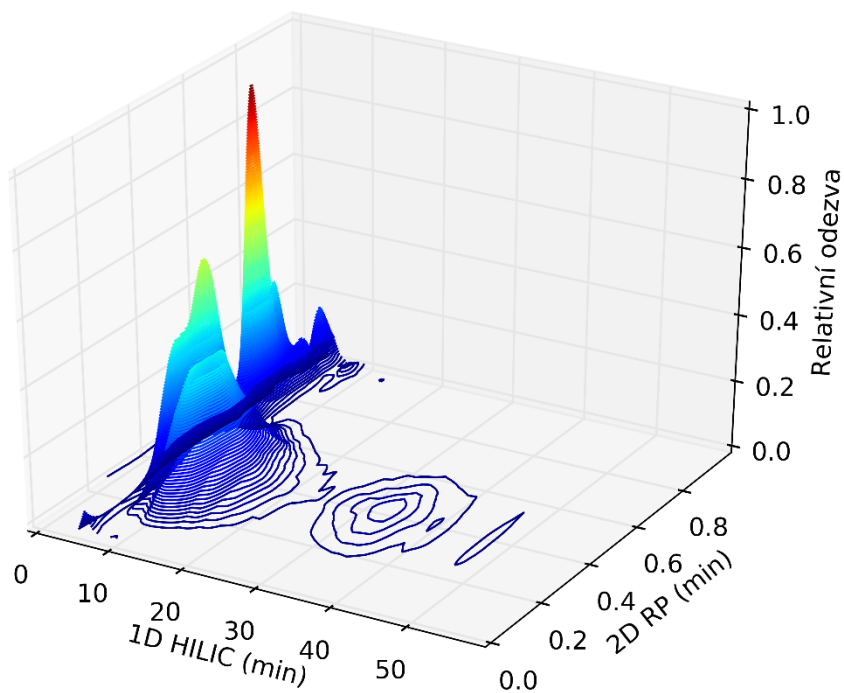
Pro měření s rozhraním FSM byly vybrány kolony Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped a Luna® Omega. Podmínky měření byly stejné jako u měření bez FSM. U rozhraní FSM se očekávalo, že analýzy budou účinnější a výsledné píky budou lépe rozdělené s vyšší intenzitou. Při porovnání 2D záznamů se separacemi bez FSM je patrný rozdílný profil záznamu zejména ve druhé RP dimenzi a pro vzorek Levenol® C-301 se na záznamu objevují také další píky v HILIC retenčních časech vyšších než 10 min. Pro jednoznačnou identifikaci oligomerů a zároveň detailní zhodnocení fokusace by bylo nutné provést analýzy v systému spojeném se spektrálním detektorem (např. hmotnostním spektrometrem), což však přesahovalo časové a přístrojové možnosti dostupné při vypracování této práce.



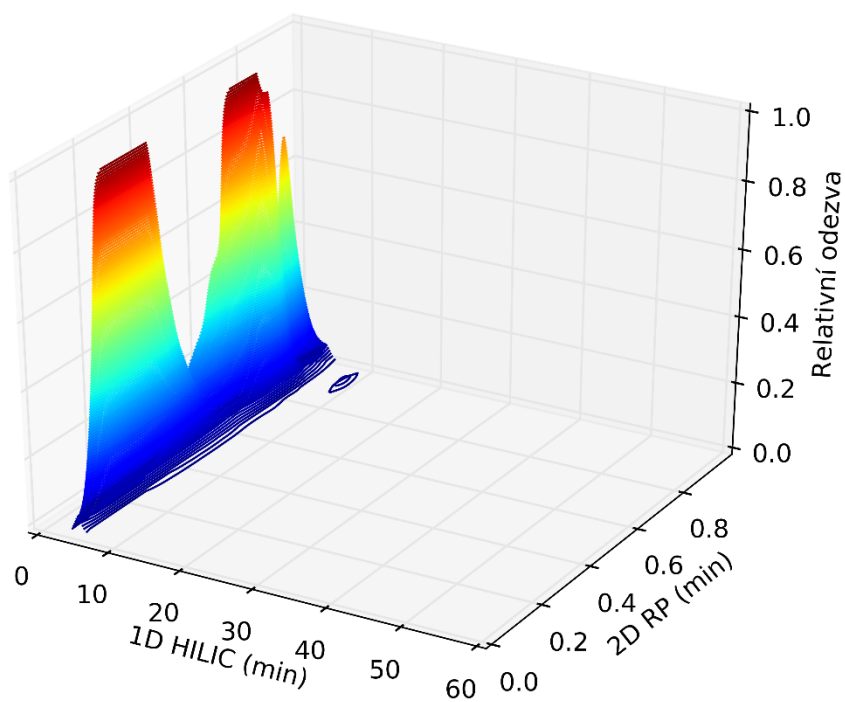
Obrázek 19 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® F-200 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 encapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55 °C



Obrázek 20 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-201 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 encapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55°C



Obrázek 21 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-301 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55 °C



Graf 20 Záznam 2D chromatogramu analýzy tenzidu Levenol® C-421 za použití gradientu SIFb (viz Tabulka 6) na koloně Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped s použitím rozhraní FSM, teplota 55 °C

4 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo otestovat rozhraní s fokusací pro komplexní dvourozměrnou kapalinovou chromatografii. V první části práce byly stanoveny parametry dvourozměrného kapalinového chromatografu jako je zpoždění gradientu a mimokolonové příspěvky. Objem zpoždění gradientu na čerpadle druhé dimenze (G7120A) se ukázal jako malý a při daných průtocích mobilní fáze ve 2D systému jako nevýznamný. Naopak zpoždění gradientu na čerpadle v první dimenzi (G1312B) mělo objem zpoždění gradientu poměrně velký a při daných průtocích mobilní fáze ve 2D systému mohl mít vliv na analýzu separovaných látek. Zjištěné mimokolonové příspěvky na rozšiřování elučních zón byly na čerpadle ve druhé dimenzi (G7120A) velmi malé a díky tomu v podstatě zanedbatelné. Mimokolonové příspěvky na čerpadle první dimenze (G1312B) už byly větší a mohly tak mít vliv na rozšiřování píků analyzovaných látek.

V další části práce byly proměřeny vlivy profilu gradientu (používaného ve druhé dimenzi) na rozptyl elučních zón. Z pěti používaných kolon měly největší účinnost monolitické kolony Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped a Chromolith® SpeedRod RP-18e. Kromě účinnosti byla pro kolony zhodnocena i píkovaná kapacita a ředění na jednotlivých kolonách.

Následně byly pro vybrané gradienty 2D systému proměřeny vzorky neiontových tenzidů Levenol® a to konkrétně C-201, F-200, C-421 a C-300. Tyto vzorky byly analyzovány na všech kolonách a po vyhodnocení 2D chromatogramů byly vybrány dvě kolony, na kterých se vzorky separovaly i s využitím fokusační modulace. Kolony použité pro měření s fokusační modulací (FSM) byly Chromolith® HighResolution RP-18 endcapped a Luna® Omega. Od rozhraní FSM se očekávalo, že výsledné separace budou účinnější. Na 2D chromatogramech byl patrný rozdíl zejména na RP dimenzi. Pro vzorek Levenol® C-301 se potvrdilo, že na výsledných chromatogramech byly nalezeny další píky v části 2D chromatogramu, ve které bez rozhraní FSM nebyly oligomery tenzidů zaznamenány.

5 BIBLIOGRAFIE

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0.
- [2] Schematická struktura tenzidu. In: Dataphysics Instruments: Understanding science [online]. Germany: DataPhysics Instruments GmbH [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/#Images-surfactant-1>
- [3] BLAŽEJ, Anton. Tenzidy. 1. vyd. Bratislava Praha: Alfa Státní nakladatelství technické literatury, 1977, 481 s..
- [4] YAMASHITA, Yuji a Kazutami SAKAMOTO. Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Classical Indexation and Novel Indexation of Surfactant. OHSHIMA, Hiroyuki. Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set [online]. 1. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2016, s. 570-574 [cit. 2022-03-16]. ISBN 9781119075691. Dostupné z: doi:10.1002/9781119075691.ch45
- [5] EGITO, Eryvaldo Socrates Tabosa, Lucas Amaral MACHADO, Iury EG FARIAS, K Gyselle H SILVA a Anselmo G OLIVEIRA. HLB Concept: A Way to Never Forget It. Biomedical [online]. 2018, 10(4) [cit. 2022-03-16]. ISSN 25741241. Dostupné z: doi:10.26717/BJSTR.2018.10.001983
- [6] Basics of the HLB system. In: J R Hess Company [online]. USA: J R Hess & Company, Inc., 2022 [cit. 2022-03-16]. Dostupné z: <https://www.jrhessco.com/hlb-system-basics/>
- [7] NAKAMA, Y. Surfactants. Cosmetic Science and Technology [online]. 1. Velká Británie: Elsevier, 2017, s. 231-244 [cit. 2022-03-06]. ISBN 9780128020050. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X
- [8] TADROS, Tharwat F. An Introduction to Surfactants. 1. UK: Walter de Gruyter, 2014. ISBN 9783110370591.
- [9] BAREL, André O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. Handbook of cosmetic science and technology. 3. USA: Informa Healthcare USA, Inc., 2009. ISBN 978-1-4200-6963-1.
- [10] PITTER, Pavel. Hydrochemie. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [11] FARN, Richard J. Chemistry and technology of surfactants. 1. UK: Blackwell Publishing Ltd, 2006. ISBN 9781405126960.
- [12] TADROS, Tharwat F. Applied Surfactants: Principles and Applications. 1. Germany: Wiley-VCH, 2005. ISBN 9783527604531.

- [13] Chemické listy: Tenzidy a detergenty dnes [online]. 1993, [cit. 2022-03-16]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf
- [14] MYERS, Drew. Surfactant science and technology. 1. Republic of Argentina: VCH Publishers, Inc., 1988. ISBN 0-89573-339-0.
- [15] Cosmetic Science and Technology [online]. 1. Velká Británie: Elsevier, 2017 [cit. 2022-03-06]. ISBN 9780128020050. Dostupné z: <https://booksc.eu/book/64581106/2dc786>
- [16] ZOU, Fen, Kun WEI a Xiaomin PENG. Thermodynamics of Micellization and Sustained Release of Folate Targeted Capecitabine Loaded Nanomicelles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology [online]. 2016, 16(8), 8519-8527 [cit. 2022-03-06]. ISSN 1533-4880. Dostupné z: doi:10.1166/jnn.2016.12710
- [17] MIDDLETON, James M., Ronald L. SIEFERT, Markie'Sha H. JAMES, Amanda M. SCHRAND a Manoj K. KOLEL-VEETIL. Micelle formation, structures, and metrology of functional metal nanoparticle compositions. AIMS Materials Science [online]. 2021, 8(4), 560-586 [cit. 2022-04-25]. ISSN 2372-0484. Dostupné z: doi:10.3934/matricsci.2021035
- [18] Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. International Journal of Innovative Research and Scientific Studies [online]. 2018, 1(1), 1-7 [cit. 2022-03-05]. ISSN 2617-6548. Dostupné z: doi:10.53894/ijirss.v1i1.4
- [19] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana. Chemie a technologie tenzidů II [online]. Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 1-167 [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
- [20] OSAMA A, El-Mahdy. Foamability and Foam Stability of Several Surfactants Solutions: The Role of Salinity and Oil Presence. Archives of Chemistry and Chemical Engineering [online]. 2019, 1(2) [cit. 2022-04-25]. ISSN 2572-4657. Dostupné z: <https://escientificpublishers.com/foamability-and-foam-stability-of-several-surfactants-solutions-the-role-of-salinity-and-oil-presence-ACCE-01-0012>
- [21] Chapter 4 Surfactants. ATTWOOD, David a Alexander Taylor FLORENCE. FASTtrack Physical Pharmacy [online]. 2. Velká Británie: Pharmaceutical Press, 2012, s. 43-62 [cit. 2022-03-06]. ISBN 9780857110640. Dostupné z: https://www.pharmpress.com/files/docs/FTphyspharm_sample.pdf
- [22] Cleaning Technology. In: Surfactant Associates Incorporated [online]. USA: SURFACTANT ASSOCIATES, INC., 2022 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: https://www.surfactantassociates.com/resources/cleaning_technology
- [23] Chemické listy: Přehled metod stanovení neiontových tenzidů v povrchových a odpadních vodách [online]. 2001, [cit. 2022-03-17]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/07-PDF/387-391.PDF>

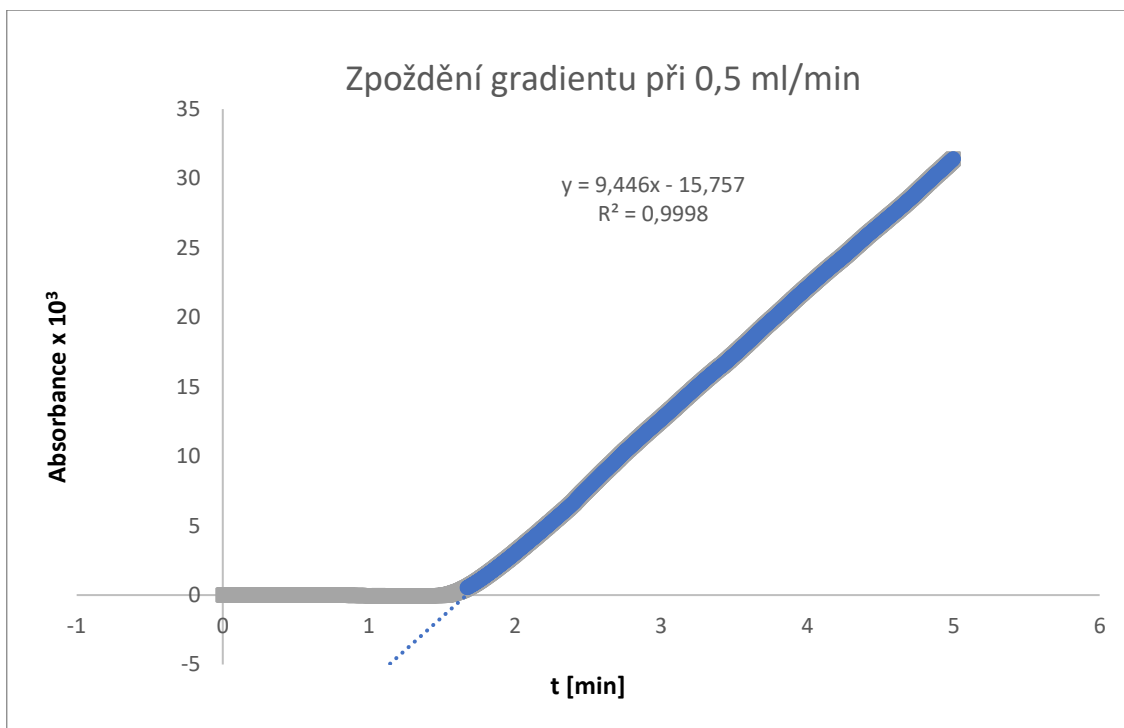
- [24] WALDHOFF, Heinrich a Rüdiger SPILKER. Handbook of Detergents: Part C: Analysis. 1. USA: Marcel Dekker, 2005. ISBN 0-8247-0351-0.
- [25] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. Fundamentals of analytical chemistry. Ninth edition. Australia: Brooks/Cole Cengage Learning, 2014. ISBN 978-049-5558-286.
- [26] KARLÍČEK, Rolf. Analytická chemie pro farmaceuty. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-802-4622-026.
- [27] KENKEL, John. Analytical chemistry for technicians. 3rd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. ISBN 15-667-0519-3.
- [28] SÝKORA, David, Eva TESAŘOVÁ, Magda VOSMANSKÁ a Monika ZVOLÁNKOVÁ. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. Chemické listy [online]. 2007, 101(3), 190-199 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: https://old.vscht.cz/chem_listy/docs/full/2007_03_190-199.pdf
- [29] VOJTA, Jiří, Adéla MUSILOVÁ-SVOBODOVÁ, Martin FRANC, Pavel COUFAL a Zuzana BOSÁKOVÁ. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. Chemické listy [online]. 2014, 108(2), 127-134 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_02_127-134.pdf
- [30] CARR, Peter W. a Dwight R. STOLL. Two-dimensional liquid chromatography: Principles, practical implementation and applications [online]. 1. Germany: Agilent Technologies, Inc., 2015 [cit. 2022-03-25]. ISBN 5991-2359EN. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-2359EN.pdf>
- [31] VACEK, Jan, Lucie ONOFREJOVÁ, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. Chemické listy [online]. 2009, 103(5), 381-385 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_05_381-385.pdf
- [32] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2012, 402(1), 231-247 [cit. 2022-03-25]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-011-5308-5](https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5)
- [33] STOLL, Dwight R., Xiaoping LI, Xiaoli WANG, Peter W. CARR, Sarah E.G. PORTER a Sarah C. RUTAN. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Journal of Chromatography A [online]. 2007, 1168(1-2), 3-43 [cit. 2022-03-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2007.08.054](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.054)
- [34] TEUTENBERG, Thorsten, Terence HETZEL a Juri LEONHARDT. Basics of 2D-LC. In: Wiley Analytical Science Magazine [online]. USA: John Wiley&Sons, Inc., c1999-2022 [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitlab.16194>

- [35] GUIOCHON, Georges, Nicola MARCHETTI, Khaled MRIZIQ a R.Andrew SHALLIKER. Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, 1189(1-2), 109-168 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.01.086
- [36] HERRERO, Miguel, Elena IBÁÑEZ, Alejandro CIFUENTES a Jose BERNAL. Multidimensional chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, 1216(43), 7110-7129 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.08.014
- [37] LI, Duxin a Oliver J. SCHMITZ. Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, 405(20), 6511-6517 [cit. 2022-03-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-013-7089-5
- [38] JANDERA, Pavel, Tomáš HÁJEK a Petr ČESLA. Comparison of various second-dimension gradient types in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, 33(10), 1382-1397 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200900808
- [39] STOLL, Dwight R., Konstantin SHOYKHET, Patrik PETERSSON a Stephan BUCKENMAIER. Active Solvent Modulation: A Valve-Based Approach To Improve Separation Compatibility in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, 89(17), 9260-9267 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b02046
- [40] FRANÇOIS, Isabelle, Koen SANDRA a Pat SANDRA. Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, 641(1-2), 14-31 [cit. 2022-03-27]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.03.041
- [41] MONDELLO, Luigi. *Comprehensive chromatography in combination with mass spectrometry*. 1. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011. ISBN 9781118003442.
- [42] PIROK, Bob W. J., Dwight R. STOLL a Peter J. SCHOENMAKERS. Recent Developments in Two-Dimensional Liquid Chromatography: Fundamental Improvements for Practical Applications. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, 91(1), 240-263 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b04841
- [43] CHEN, Yingzhuang, Lidia MONTERO, Jiang LUO, Junjie LI a Oliver J. SCHMITZ. Application of the new at-column dilution (ACD) modulator for the two-dimensional RP×HILIC analysis of *Buddleja davidii*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, 412(7), 1483-1495 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-020-02392-3
- [44] Levenol® Green Ingredients for Laundry Detergents: Guideline formulary. In: Yumpu [online]. Švýcarsko: Yumpu, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z:

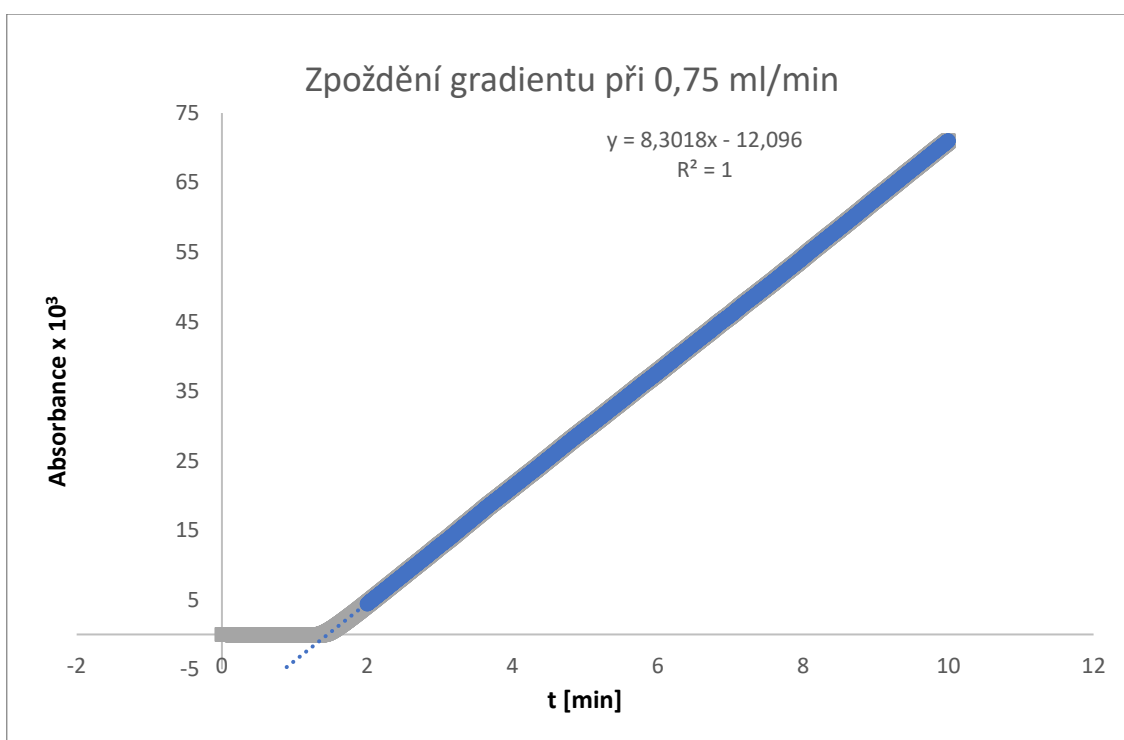
<https://www.yumpu.com/en/document/read/23764560/levenolr-for-laundry-care-kao-chemicals-europe>

- [45] LEVENOL C-201. In: Kao: Global Chemicals Japan [online]. Japan: Kao Corporation, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: https://chemical.kao.com/en/products/B0017204_en/?region=gl
- [46] LEVENOL C-201. In: Kao [online]. Europe: Kao Chemicals Europe, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.kaochemicals-eu.com/our-products/levenol-c-201>
- [47] LEVENOL C-421. In: Kao: Global Chemicals Japan [online]. Japan: Kao Corporation, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: https://chemical.kao.com/en/products/B0017205_en/?region=gl
- [48] LEVENOL C-421. In: Kao [online]. Europe: Kao Chemicals Europe, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.kaochemicals-eu.com/our-products/levenol-c-421>
- [49] LEVENOL F-200. In: Kao [online]. Europe: Kao Chemicals Europe, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.kaochemicals-eu.com/our-products/levenol-f-200>
- [50] LEVENOL C-301. In: Kao: Global Chemicals Japan [online]. Japan: Kao Corporation, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: https://chemical.kao.com/en/products/B0017498_en/?region=gl
- [51] LEVENOL C-301. In: Kao [online]. Europe: Kao Chemicals Europe, 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.kaochemicals-eu.com/our-products/levenol-c-301>
- [52] NEIONTOVÉ TENZIDY JAKO PRODUKTY OXYETHYLENACE GLYCEROLU – LC/MS ANALÝZA A POTENCIOMETRICKÉ TITRACE. BRANDSTEINOVÁ, Eva, Petr ČESLA, Tomáš MIKYSEK a Karel VYTRĚS. LI. seminář o tenzidech a detergentech (Strážnice, 7. – 9. 11. 2018). Sborník přednášek: NEIONTOVÉ TENZIDY JAKO PRODUKTY OXYETHYLENACE GLYCEROLU – LC/MS ANALÝZA A POTENCIOMETRICKÉ TITRACE. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2018, s. 5-17. ISBN 978-80-7395-173-5.
- [53] DOLAN, John W. Gradient Elution, Part IV: Dwell-Volume Problems. LC-GC North America [online]. United States: UBM Medica Periodical Publication, 1999, 31(6), 456-463 [cit. 2022-04-20]. ISSN 15275949. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/gradient-elution-part-iv-dwell-volume-problems-0>
- [54] COHEN, K. A. a J. D. STUART. A Practical Method to Predict the Effect of Extra-Column Variance on Observed Efficiency in High Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science [online]. 1987, 25(9), 381-390 [cit. 2022-05-04]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/25.9.381
- [55] HUMPLÍK, Matouš. Analýza neiontových tenzidů na bázi oxyethylenovaných acylglycerolů pomocí kapalinové chromatografie. Pardubice, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.

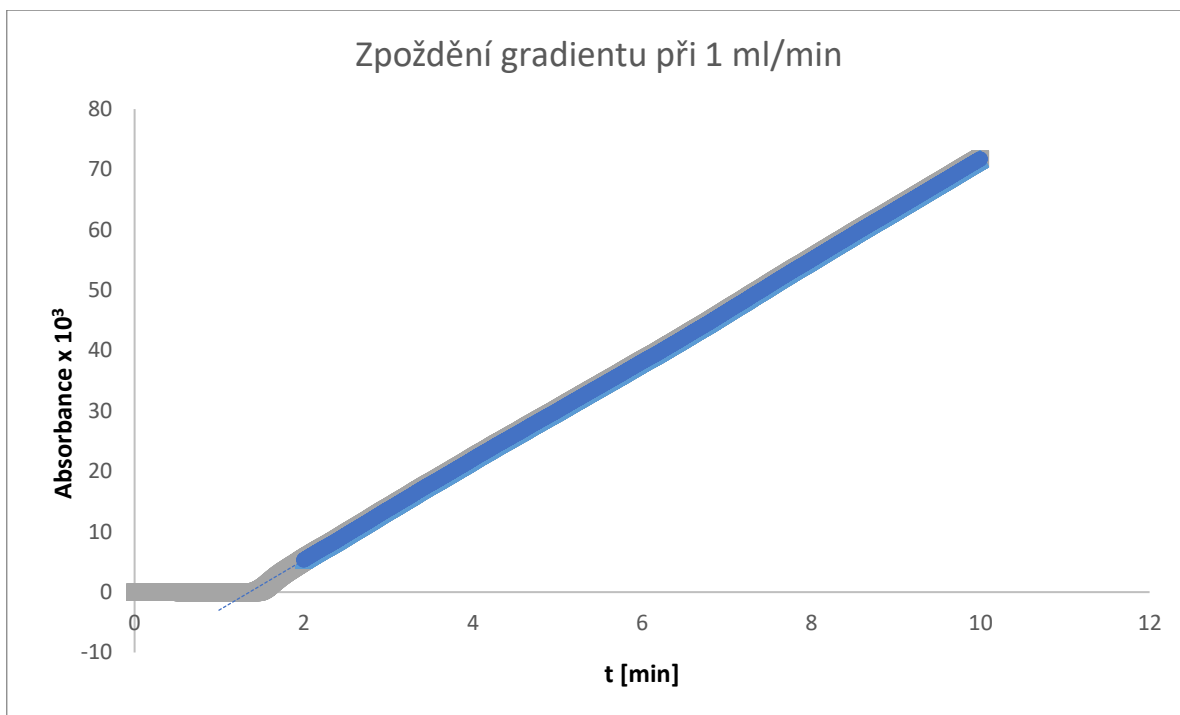
PŘÍLOHY



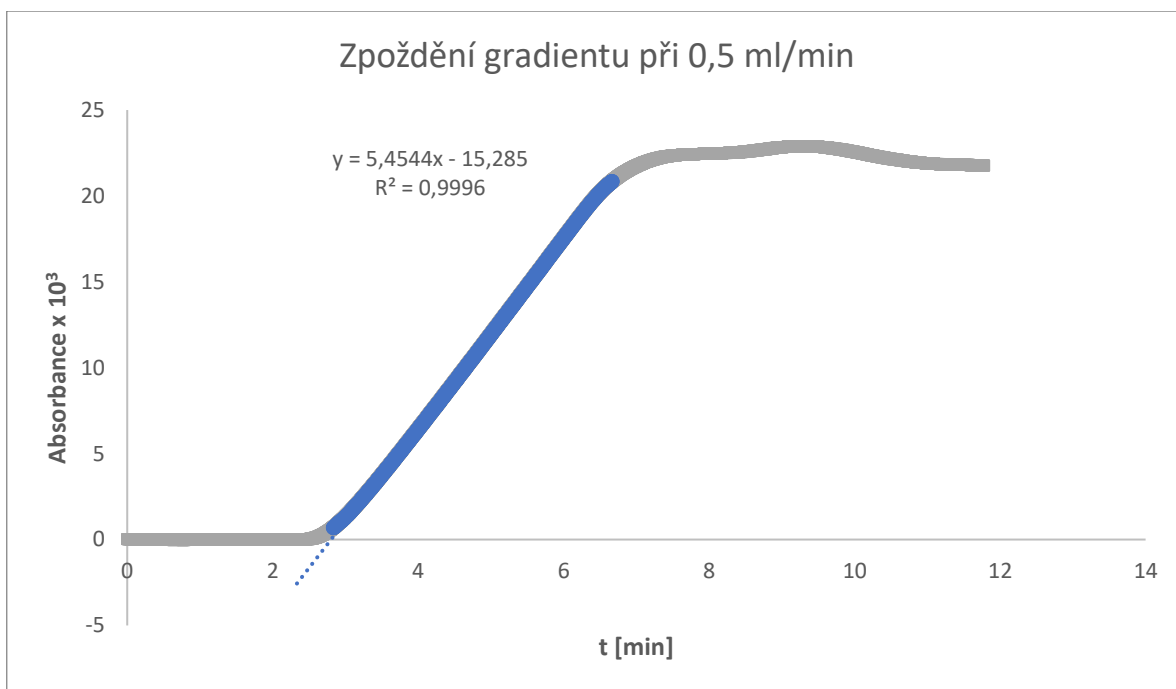
Graf P 1 Zpoždění gradientu na čerpadle G7120A při průtoku 0,5 ml/min



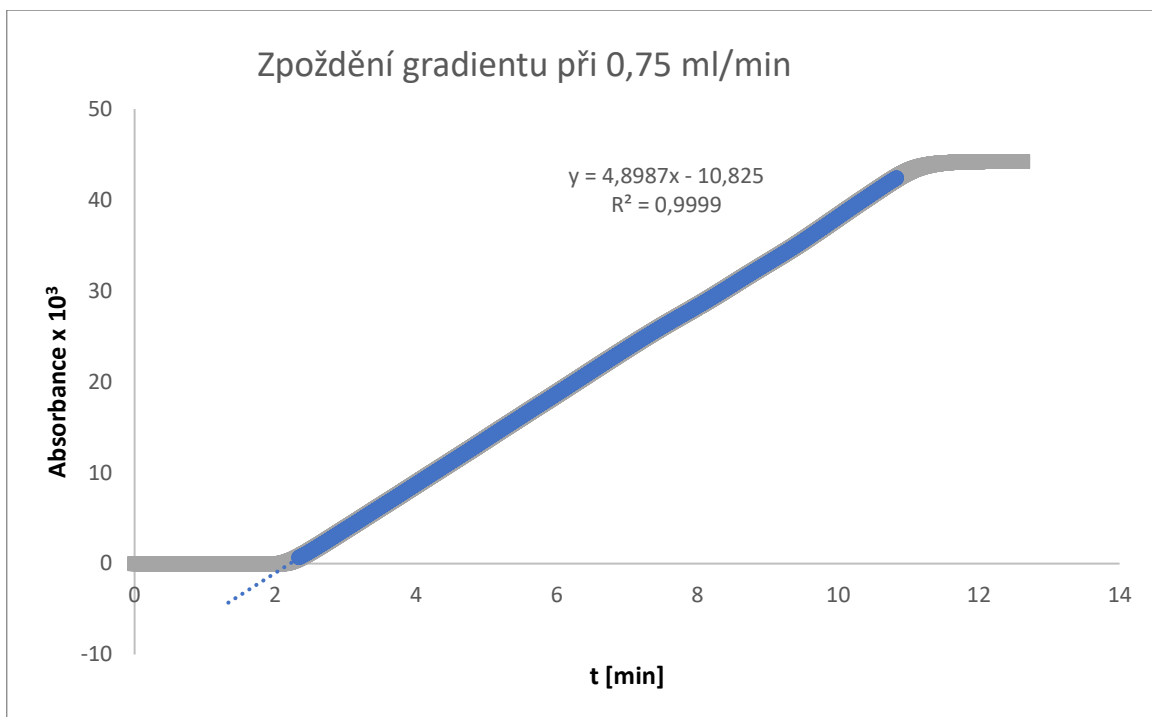
Graf P 2 Zpoždění gradientu na čerpadle G7120A při průtoku 0,75 ml/min



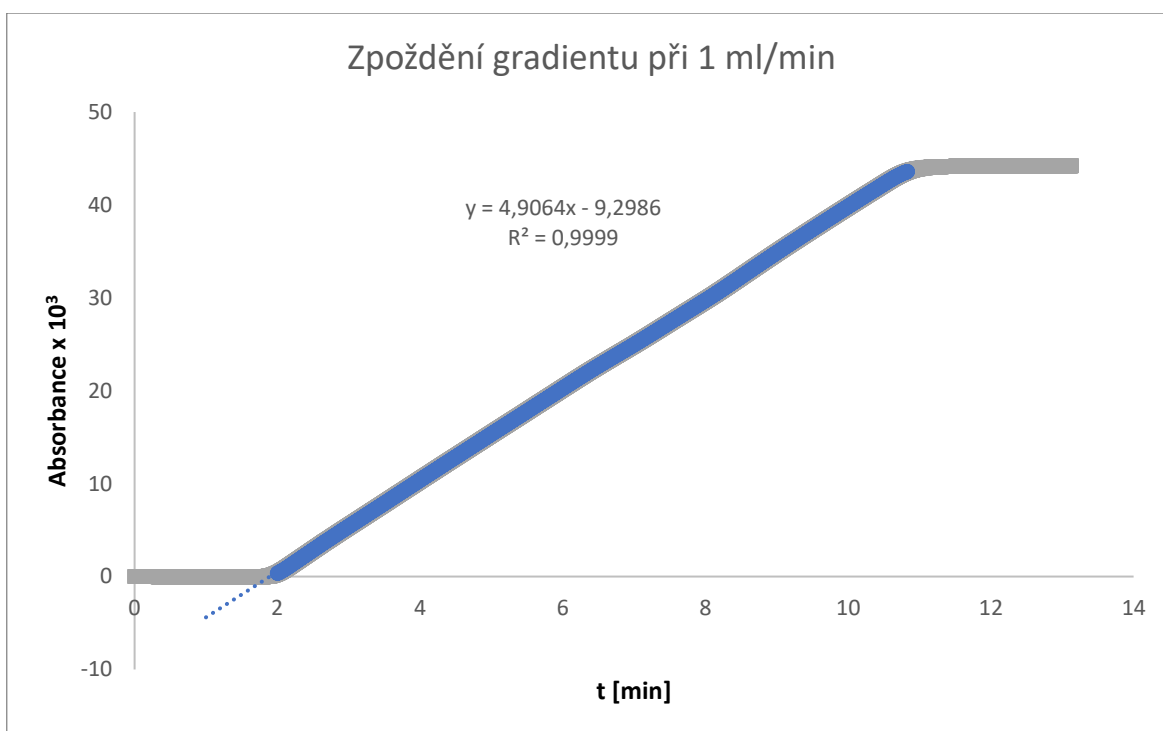
Graf P 3 Zpoždění gradientu na čerpadle G7120A při průtoku 1 ml/min



Graf P 4 Zpoždění gradientu na čerpadle G1312B při průtoku 0,5 ml/min



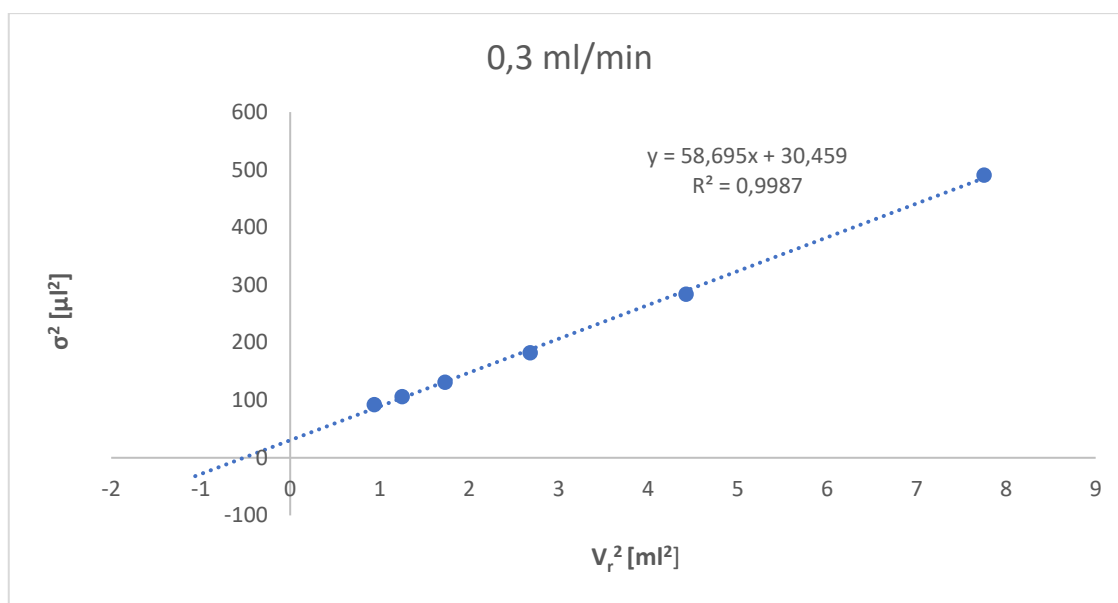
Graf P 5 Zpoždění gradientu na čerpadle G1312B při průtoku 0,75 ml/min



Graf P 6 Zpoždění gradientu na čerpadle G1312B při průtoku 1 ml/min

Tabulka P 1 Naměřené a vypočtené hodnoty pro výpočet mimokolonových objemů na čerpadle G7120A při průtoku 0,3 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

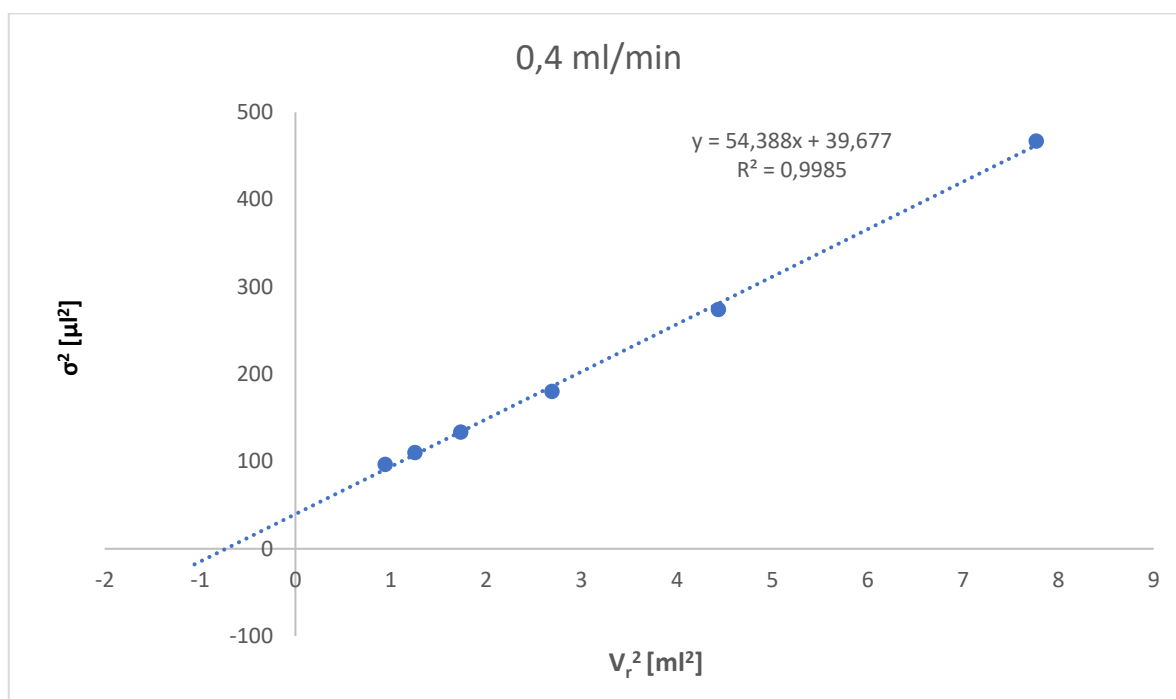
Průtok 0.3 ml/min							
	t_r [min]	$w_{0.5}$ [min]	k	V_r [ml]	V_r^2 [ml ²]	σ [μl]	σ^2 [μl ²]
benzen	3,23	0,075	0,457	0,969	0,939	9,60	92,12
toluen	3,73	0,081	0,682	1,118	1,251	10,29	105,85
ethylbenzen	4,38	0,089	0,978	1,315	1,729	11,44	130,88
propylbenzen	5,46	0,106	1,463	1,638	2,682	13,49	182,13
butylbenzen	7,01	0,132	2,164	2,103	4,424	16,84	283,44
pentylbenzen	9,28	0,174	3,188	2,784	7,753	22,15	490,45



Graf P 7 Graf závislosti druhé mocniny retenčního objemu na druhé mocnině rozptylu na čerpadle G7120A při průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min, kolona Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Tabulka P 2 Naměřené a vypočtené hodnoty pro výpočet mimokolonových objemů na čerpadle G7120A při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

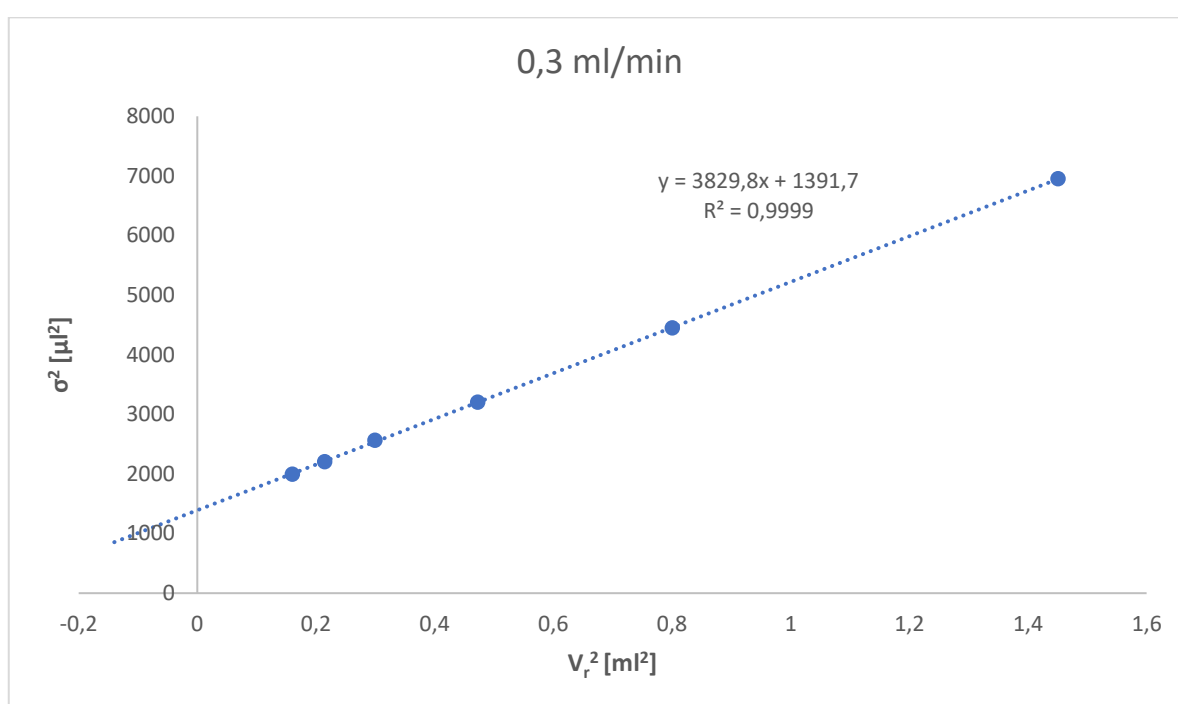
Průtok 0.4 ml/min							
	t_r [min]	$w_{0.5}$ [min]	k	V_r [ml]	V_r^2 [ml ²]	σ [μl]	σ^2 [μl ²]
benzen	2,43	0,058	0,457	0,970	0,942	9,83	96,72
toluen	2,80	0,062	0,681	1,120	1,254	10,49	110,20
ethylbenzen	3,29	0,068	0,977	1,317	1,734	11,56	133,60
propylbenzen	4,10	0,079	1,462	1,640	2,690	13,42	180,22
butylbenzen	5,27	0,097	2,162	2,106	4,437	16,55	274,01
pentylbenzen	6,97	0,127	3,183	2,787	7,767	21,61	467,07



Graf P 8 Graf závislosti druhé mocniny retenčního objemu na druhé mocnině rozptylu na čerpadle G7120A při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min, kolona Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Tabulka P 3 Naměřené a vypočtené hodnoty pro výpočet mimokolonových objemů na čerpadle G1312B při průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

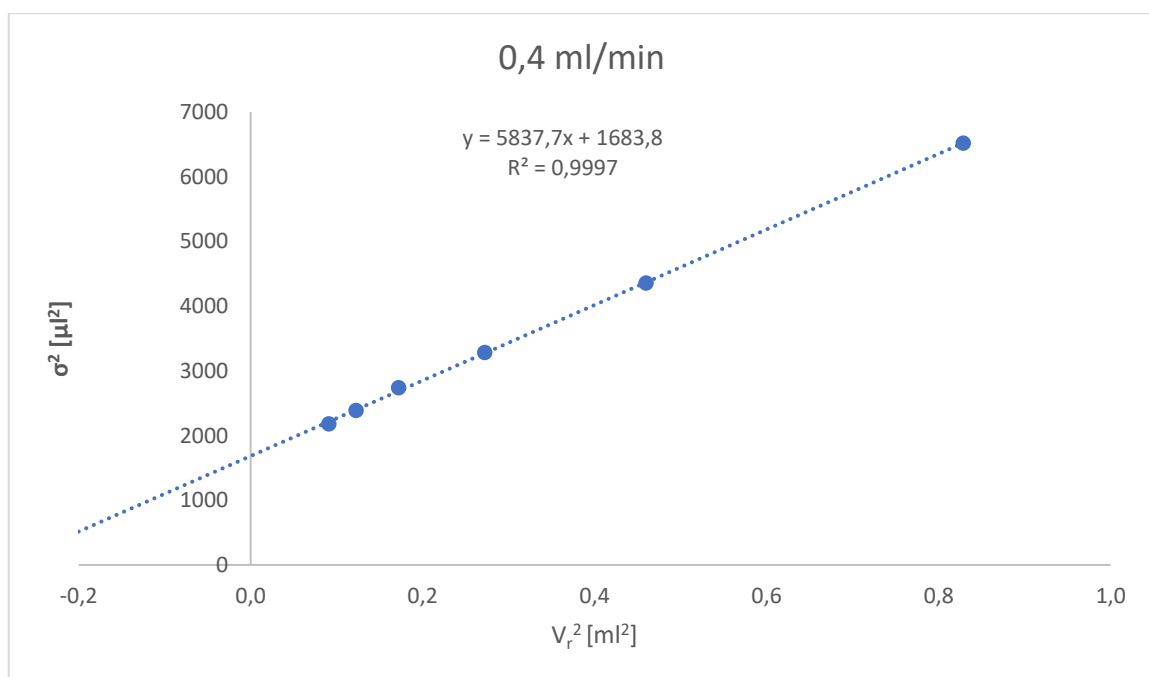
Průtok 0,3 ml/min							
	t_r [min]	$w_{0.5}$ [min]	k	V_r [ml]	V_r^2 [ml ²]	σ [μl]	σ^2 [μl ²]
benzen	1,34	0,063	0,413	0,400	0,160	44,68	1996,22
toluen	1,55	0,066	0,636	0,463	0,214	46,94	2202,91
ethylbenzen	1,82	0,072	0,933	0,547	0,299	50,63	2563,65
propylbenzen	2,29	0,080	1,428	0,688	0,473	56,61	3204,63
butylbenzen	2,98	0,094	2,161	0,895	0,800	66,68	4445,84
pentylbenzen	4,02	0,118	3,255	1,205	1,451	83,37	6951,24



Graf P 9 Graf závislosti druhé mocniny retenčního objemu na druhé mocnině rozptylu na čerpadle G1312B při průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Tabulka P 4 Naměřené a vypočtené hodnoty pro výpočet mimokolonových objemů na čerpadle G1312B při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

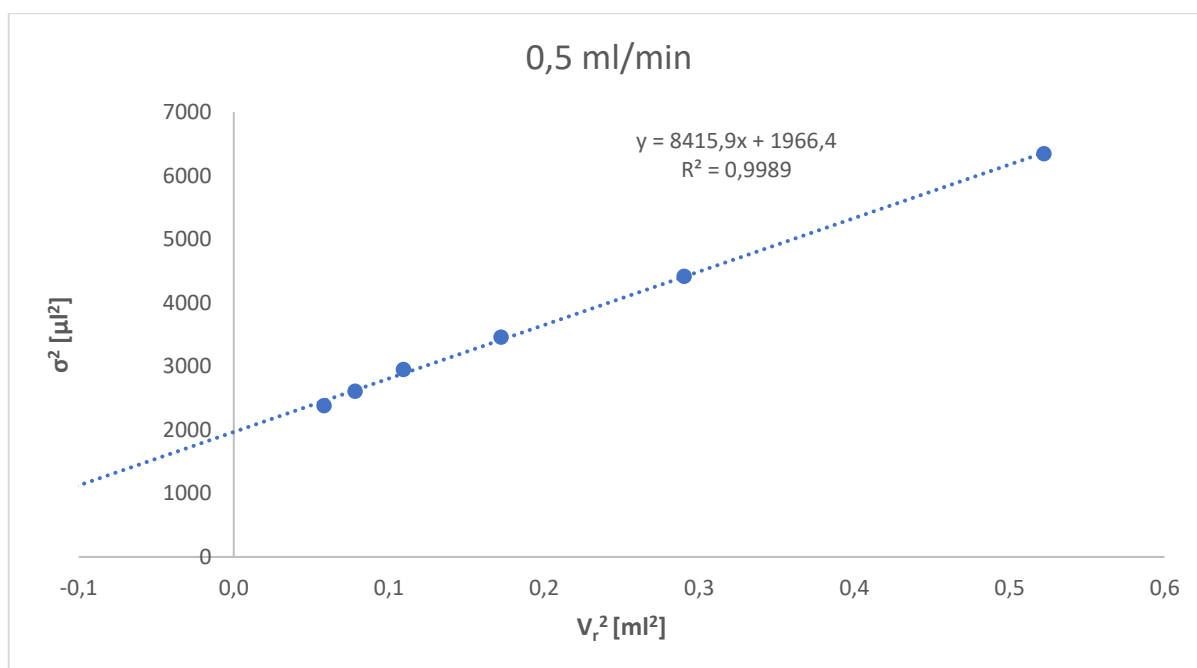
Průtok 0,4 ml/min							
	t_r [min]	$w_{0,5}$ [min]	k	V_r [ml]	V_r^2 [ml ²]	σ [μl]	σ^2 [μl ²]
benzen	1,01	0,050	0,420	0,302	0,091	46,70	2181,30
toluen	1,17	0,052	0,648	0,350	0,123	48,84	2385,61
ethylbenzen	1,38	0,056	0,952	0,415	0,172	52,34	2739,22
propylbenzen	1,74	0,061	1,455	0,522	0,272	57,29	3282,42
butylbenzen	2,26	0,070	2,191	0,678	0,460	66,01	4357,20
pentylbenzen	3,03	0,086	3,284	0,910	0,829	80,75	6519,77



Graf P 10 Graf závislosti druhé mocniny retenčního objemu na druhé mocnině rozptylu na čerpadle G1312B při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min, kolona Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Tabulka P 5 Naměřené a vypočtené hodnoty pro výpočet mimokolonových objemů na čerpadle G1312B při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Průtok 0,5 ml/min							
	t_r [ml]	$w_{0,5}$ [min]	k	V_r [ml]	V_r^2 [ml ²]	σ [μl]	σ^2 [μl ²]
benzen	0,80	0,041	0,415	0,241	0,058	48,80	2381,39
toluen	0,93	0,043	0,641	0,280	0,078	51,06	2607,56
ethylbenzen	1,10	0,046	0,940	0,331	0,109	54,29	2947,90
propylbenzen	1,38	0,050	1,435	0,415	0,172	58,81	3458,87
butylbenzen	1,80	0,056	2,161	0,539	0,290	66,43	4413,55
pentylbenzen	2,41	0,068	3,421	0,723	0,522	79,63	6341,63



Graf P 11 Graf závislosti druhé mocniny retenčního objemu na druhé mocnině rozptylu na čerpadle G1312B při průtoku 0,5 ml/min, Kinetex® XB-C18, MF 70 % ACN/ 30 % H₂O, teplota 30 °C

Tabulka P 6 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Kinetex® XB-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFa (viz Tabulka 3), teplota 55 °C

FIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,38	0,006	0,043	0,0000	416	120,28	24,56	40,81
benzen	1,03	0,012	0,041	0,0002	3420	14,62		38,91
toluen	1,13	0,014	0,041	0,0010	4233	11,81		38,35
ethylbenzen	1,20	0,015	0,038	0,0010	5446	9,18		36,18
propylbenzen	1,28	0,017	0,038	0,0004	6415	7,79		35,41
butylbenzen	1,34	0,018	0,044	0,0011	5088	9,83		41,70
pentylbenzen	1,39	0,018	0,045	0,0005	5381	9,29		42,13
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,25	0,003	0,040	0,0003	220	227,43	23,51	57,04
benzen	0,80	0,002	0,039	0,0002	2334	21,42		54,79
toluen	0,90	0,002	0,038	0,0000	3062	16,33		53,83
ethylbenzen	0,97	0,001	0,037	0,0001	3941	12,69		51,59
propylbenzen	1,05	0,001	0,036	0,0001	4759	10,51		50,51
butylbenzen	1,11	0,001	0,039	0,0001	4582	10,91		54,52
pentylbenzen	1,16	0,001	0,043	0,0015	4118	12,14		60,31
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,19	0,002	0,038	0,0003	143	350,66	22,89	71,17
benzen	0,67	0,001	0,038	0,0000	1756	28,47		70,96
toluen	0,77	0,001	0,037	0,0000	2390	20,92		69,97
ethylbenzen	0,85	0,000	0,036	0,0001	3148	15,88		67,18
propylbenzen	0,92	0,000	0,035	0,0001	3777	13,24		66,67
butylbenzen	0,99	0,000	0,037	0,0002	3889	12,86		70,18
pentylbenzen	1,04	0,000	0,039	0,0002	3933	12,71		73,68
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,13	0,002	0,011	0,0002	830	60,22	73,90	29,70
benzen	0,53	0,001	0,010	0,0001	14356	3,48		29,16
toluen	0,63	0,001	0,010	0,0002	20559	2,43		29,11
ethylbenzen	0,71	0,001	0,010	0,0003	25252	1,98		29,66
propylbenzen	0,78	0,000	0,011	0,0003	30040	1,66		30,05
butylbenzen	0,85	0,000	0,011	0,0004	35058	1,43		30,12
pentylbenzen	0,91	0,000	0,011	0,0005	40256	1,24		30,00

Tabulka P 7 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Kinetex® XB-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFb (viz Tabulka 4), teplota 55 °C

FIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,38	0,006	0,043	0,0002	432	115,75	22,52	40,29
benzen	0,94	0,003	0,038	0,0003	3330	15,02		35,96
toluen	1,02	0,002	0,036	0,0001	4339	11,52		34,19
ethylbenzen	1,08	0,005	0,032	0,0002	6128	8,16		30,47
propylbenzen	1,14	0,002	0,036	0,0006	5485	9,12		34,07
butylbenzen	1,19	0,002	0,048	0,0004	3382	14,78		45,26
pentylbenzen	1,25	0,036	0,037	0,0005	6342	7,88		34,76
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,252	0,001	0,040	0,0003	223	224,68	20,50	56,25
benzen	0,729	0,001	0,037	0,0003	2141	23,36		52,38
toluen	0,808	0,001	0,035	0,0000	2900	17,24		49,92
ethylbenzen	0,871	0,001	0,032	0,0001	4149	12,05		44,97
propylbenzen	0,930	0,001	0,034	0,0002	4117	12,15		48,20
butylbenzen	0,980	0,001	0,047	0,0000	2361	21,18		67,10
pentylbenzen	1,020	0,001	0,037	0,0001	4318	11,58		51,64
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,19	0,001	0,038	0,0000	146	341,73	19,73	70,87
benzen	0,61	0,000	0,036	0,0002	1569	31,86		68,72
toluen	0,69	0,000	0,035	0,0000	2220	22,52		65,31
ethylbenzen	0,76	0,001	0,031	0,0001	3249	15,39		58,86
propylbenzen	0,82	0,000	0,033	0,0001	3443	14,52		61,59
butylbenzen	0,87	0,000	0,044	0,0004	2160	23,14		82,52
pentylbenzen	0,91	0,000	0,037	0,0000	3381	14,79		69,16
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,13	0,001	0,010	0,0000	845	59,19	65,27	29,44
benzen	0,48	0,001	0,010	0,0001	13446	3,72		27,53
toluen	0,56	0,001	0,010	0,0001	18376	2,72		27,54
ethylbenzen	0,63	0,001	0,010	0,0001	21882	2,28		28,12
propylbenzen	0,69	0,000	0,010	0,0001	25635	1,95		28,46
butylbenzen	0,74	0,000	0,010	0,0002	29594	1,69		28,46
pentylbenzen	0,78	0,000	0,010	0,0002	34087	1,47		28,14

Tabulka P 8 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Kinetex® XB-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFa (viz Tabulka), teplota 55 °C

SIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,29	0,001	0,040	0,0002	297	168,37	20,99	37,90946
benzen	0,56	0,005	0,041	0,0002	1019	49,08		38,66615
toluen	0,67	0,005	0,040	0,0002	1557	32,11		37,86551
ethylbenzen	0,79	0,006	0,040	0,0002	2177	22,97		37,57351
propylbenzen	0,92	0,007	0,039	0,0002	2976	16,80		37,19988
butylbenzen	1,03	0,005	0,039	0,0000	3781	13,22		37,13708
pentylbenzen	1,13	0,004	0,040	0,0005	4557	10,97		37,23127
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,20	0,001	0,037	0,0000	156	319,78	18,05578	52,65849
benzen	0,37	0,005	0,038	0,0001	529	94,45		54,10435
toluen	0,47	0,004	0,038	0,0002	835	59,89		53,86415
ethylbenzen	0,57	0,004	0,038	0,0001	1215	41,14		53,95835
propylbenzen	0,68	0,003	0,038	0,0002	1782	28,05		53,24719
butylbenzen	0,78	0,003	0,038	0,0002	2403	20,80		53,11532
pentylbenzen	0,88	0,002	0,038	0,0006	2946	16,98		54,08551
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,15	0,002	0,012	0,0001	844	59,26	46,01	22,69
benzen	0,28	0,002	0,013	0,0001	2538	19,70		24,94
toluen	0,36	0,002	0,013	0,0001	4171	11,99		24,51
ethylbenzen	0,44	0,002	0,013	0,0001	6385	7,83		24,47
propylbenzen	0,54	0,002	0,013	0,0001	9832	5,09		24,21
butylbenzen	0,64	0,001	0,013	0,0001	13988	3,57		24,03
pentylbenzen	0,74	0,001	0,013	0,0001	18874	2,65		23,79
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,10	0,002	0,009	0,0000	716	69,88	47,56	24,79
benzen	0,19	0,003	0,010	0,0001	2088	23,95		27,85
toluen	0,24	0,002	0,010	0,0000	3334	15,00		28,18
ethylbenzen	0,31	0,002	0,010	0,0000	5197	9,62		28,66
propylbenzen	0,39	0,001	0,010	0,0001	8242	6,07		28,89
butylbenzen	0,48	0,001	0,010	0,0001	12145	4,12		29,19
pentylbenzen	0,57	0,001	0,010	0,0000	16815	2,97		29,41

Tabulka P 9 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Kinetex® XB-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFb (viz Tabulka 6), teplota 55 °C

SIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,29	0,002	0,027	0,0002	641	78,02	28,47	25,60
benzen	0,55	0,006	0,028	0,0006	2117	23,62		26,60
toluen	0,66	0,007	0,027	0,0008	3265	15,32		25,56
ethylbenzen	0,76	0,005	0,027	0,0007	4500	11,11		25,12
propylbenzen	0,87	0,003	0,026	0,0006	6187	8,08		24,45
butylbenzen	0,96	0,002	0,026	0,0005	7857	6,36		24,12
pentylbenzen	1,05	0,005	0,026	0,0004	9286	5,38		24,17
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,20	0,001732	0,022587	0,0000	421	118,64	27,08	31,91
benzen	0,37	0,002082	0,02345	0,0001	1412	35,42		33,13
toluen	0,46	0,002	0,022877	0,0002	2230	22,42		32,32
ethylbenzen	0,55	0,002	0,02262	0,0000	3228	15,49		31,96
propylbenzen	0,64	0,002082	0,022597	0,0003	4453	11,23		31,93
butylbenzen	0,73	0,002082	0,022193	0,0001	5972	8,37		31,36
pentylbenzen	0,81	0,002309	0,02222	0,0001	7368	6,79		31,39
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,15	0,002	0,012	0,0000	812	61,55	42,11	22,92
benzen	0,28	0,001	0,013	0,0001	2489	20,09		24,89
toluen	0,35	0,002	0,013	0,0001	4096	12,21		24,23
ethylbenzen	0,43	0,001	0,013	0,0000	6263	7,98		23,85
propylbenzen	0,51	0,001	0,012	0,0001	9397	5,32		23,44
butylbenzen	0,60	0,001	0,012	0,0001	13043	3,83		23,15
pentylbenzen	0,68	0,001	0,012	0,0001	17134	2,92		22,88
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,10	0,001	0,009	0,0000	735	68,03	43,74	24,94
benzen	0,19	0,001	0,010	0,0000	2096	23,85		27,80
toluen	0,24	0,002	0,010	0,0000	3356	14,90		27,90
ethylbenzen	0,30	0,002	0,010	0,0001	5179	9,65		28,00
propylbenzen	0,38	0,001	0,010	0,0001	8016	6,24		28,03
butylbenzen	0,45	0,001	0,010	0,0001	11593	4,31		28,00
pentylbenzen	0,53	0,001	0,010	0,0001	15749	3,17		27,97

Tabulka P 10 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® High Resolution RP-18 endcapped při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFa (viz Tabulka 3), teplota 55 °C

FIFa								
1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	1,02	0,038	0,041	0,0015	3401	14,70	22,76	38,73
benzen	1,67	0,049	0,041	0,0022	9302	5,38		38,43
toluen	1,77	0,047	0,043	0,0045	9404	5,32		40,36
ethylbenzen	1,84	0,046	0,047	0,0060	8326	6,01		44,59
propylbenzen	1,91	0,044	0,046	0,0059	9395	5,32		43,59
butylbenzen	1,97	0,044	0,046	0,0060	10137	4,93		43,31
pentylbenzen	2,03	0,044	0,046	0,0060	10869	4,60		43,11
1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,67	0,001	0,030	0,0004	2690	18,59	29,88	42,87
benzen	1,25	0,003	0,031	0,0005	8897	5,62		44,18
toluen	1,35	0,003	0,031	0,0008	10133	4,93		44,44
ethylbenzen	1,34	0,124	0,033	0,0038	9310	5,37		46,31
propylbenzen	1,61	0,203	0,030	0,0010	15867	3,15		42,38
butylbenzen	1,55	0,003	0,030	0,0009	14344	3,49		42,91
pentylbenzen	1,60	0,003	0,031	0,0011	14748	3,39		43,70
2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,50	0,001	0,019	0,0005	3737	13,38	46,48	36,36
benzen	1,04	0,001	0,019	0,0002	17346	2,88		35,06
toluen	1,13	0,000	0,019	0,0002	19447	2,57		36,03
ethylbenzen	1,21	0,000	0,020	0,0002	20588	2,43		37,24
propylbenzen	1,28	0,000	0,020	0,0002	23483	2,13		36,89
butylbenzen	1,34	0,000	0,019	0,0002	27985	1,79		35,39
pentylbenzen	1,39	0,000	0,018	0,0001	32641	1,53		34,02

Tabulka P 11 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® High Resolution RP-18 endcapped při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFb (viz Tabulka 4), teplota 55 °C

FIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,99	0,002	0,039	0,0002	3499	14,29	18,90	37,02
benzen	1,53	0,000	0,037	0,0013	9312	5,37		35,13
toluen	1,60	0,001	0,041	0,0042	8480	5,90		38,62
ethylbenzen	1,66	0,001	0,049	0,0067	6241	8,01		46,58
propylbenzen	1,74	0,040	0,049	0,0078	6916	7,23		46,48
butylbenzen	1,77	0,002	0,049	0,0075	7179	6,96		46,43
pentylbenzen	1,83	0,002	0,046	0,0035	8871	5,64		43,04
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,67	0,013	0,030	0,0005	2830	17,67	26,61	42,07
benzen	1,16	0,000	0,029	0,0002	8843	5,65		40,92
toluen	1,23	0,000	0,028	0,0001	10539	4,74		39,88
ethylbenzen	1,29	0,001	0,027	0,0001	12818	3,90		37,82
propylbenzen	1,34	0,001	0,026	0,0001	14594	3,43		36,95
butylbenzen	1,39	0,000	0,029	0,0001	13061	3,83		40,39
pentylbenzen	1,43	0,000	0,031	0,0004	12072	4,14		43,28
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,50	0,000	0,019	0,0002	3955	12,64	39,73	35,32
benzen	0,96	0,000	0,018	0,0000	15833	3,16		33,76
toluen	1,03	0,000	0,018	0,0002	17700	2,82		34,36
ethylbenzen	1,09	0,000	0,019	0,0002	18935	2,64		35,06
propylbenzen	1,14	0,001	0,021	0,0047	16803	2,98		39,12
butylbenzen	1,19	0,001	0,018	0,0002	25539	1,96		33,04
pentylbenzen	1,23	0,001	0,017	0,0001	29954	1,67		31,53

Tabulka P 12 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® High Resolution RP-18 endcapped při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFa (viz Tabulka 5), teplota 55 °C

SIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,81	0,001	0,035	0,0001	2972	16,82	26,69	32,90
benzen	1,24	0,002	0,039	0,0002	5690	8,79		36,37
toluen	1,37	0,003	0,039	0,0004	7018	7,12		36,28
ethylbenzen	1,49	0,004	0,039	0,0006	8195	6,10		36,46
propylbenzen	1,61	0,004	0,038	0,0004	9857	5,07		36,02
butylbenzen	1,72	0,003	0,038	0,0004	11505	4,35		35,59
pentylbenzen	1,82	0,003	0,037	0,0004	13034	3,84		35,27
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,54	0,001	0,027	0,0001	2265	22,07	29,03	37,82
benzen	0,86	0,001	0,030	0,0002	4600	10,87		41,94
toluen	0,97	0,001	0,030	0,0000	5893	8,48		41,99
ethylbenzen	1,07	0,001	0,030	0,0002	7194	6,95		42,12
propylbenzen	1,19	0,001	0,030	0,0000	8887	5,63		41,99
butylbenzen	1,30	0,001	0,030	0,0002	10665	4,69		41,71
pentylbenzen	1,39	0,000	0,029	0,0002	12356	4,05		41,59
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,41	0,001	0,016	0,0001	3656	13,68	40,61	29,90
benzen	0,66	0,001	0,019	0,0001	6813	7,34		35,22
toluen	0,76	0,001	0,019	0,0001	8837	5,66		35,64
ethylbenzen	0,85	0,001	0,019	0,0001	11122	4,50		35,85
propylbenzen	0,96	0,001	0,019	0,0000	14039	3,56		35,99
butylbenzen	1,06	0,000	0,019	0,0001	17282	2,89		35,89
pentylbenzen	1,16	0,000	0,019	0,0000	21305	2,35		35,18

Tabulka P 13 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® High Resolution RP-18 endcapped při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFb (viz Tabulka 6), teplota 55 °C)

SIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,81	0,001	0,035	0,0000	2990	16,72	24,07	32,67
benzen	1,21	0,002	0,038	0,0000	5611	8,91		35,79
toluen	1,32	0,002	0,038	0,0001	6750	7,41		35,74
ethylbenzen	1,42	0,002	0,038	0,0001	7871	6,35		35,59
propylbenzen	1,53	0,002	0,037	0,0003	9678	5,17		34,39
butylbenzen	1,61	0,002	0,036	0,0002	11235	4,45		33,75
pentylbenzen	1,69	0,002	0,037	0,0002	11845	4,22		34,43
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,54	0,001	0,027	0,0000	2271	22,02	25,98	37,71
benzen	0,84	0,001	0,029	0,0000	4566	10,95		41,21
toluen	0,94	0,001	0,029	0,0001	5705	8,76		41,27
ethylbenzen	1,03	0,000	0,029	0,0001	6886	7,26		41,16
propylbenzen	1,12	0,000	0,029	0,0001	8412	5,94		40,72
butylbenzen	1,21	0,001	0,029	0,0001	9839	5,08		40,52
pentylbenzen	1,28	0,000	0,029	0,0000	11112	4,50		40,51
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,41	0,001	0,016	0,0007	3350	14,92	34,39	31,08
benzen	0,64	0,004	0,020	0,0018	5855	8,54		37,30
toluen	0,73	0,004	0,020	0,0019	7507	6,66		37,50
ethylbenzen	0,82	0,004	0,020	0,0018	9242	5,41		37,62
propylbenzen	0,91	0,004	0,020	0,0018	11637	4,30		37,28
butylbenzen	0,99	0,004	0,019	0,0016	14323	3,49		36,72
pentylbenzen	1,07	0,004	0,019	0,0015	17205	2,91		36,07

Tabulka P 14 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® SpeedROD RP-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFa (viz Tabulka 3), teplota 55 °C)

FIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	1,02	0,002	0,042	0,0006	3329	15,02	24,70	39,25
benzen	1,68	0,001	0,041	0,0008	9065	5,52		39,03
toluen	1,77	0,001	0,043	0,0002	9588	5,21		40,10
ethylbenzen	1,84	0,002	0,043	0,0017	9948	5,03		40,93
propylbenzen	1,91	0,002	0,041	0,0037	12347	4,05		38,15
butylbenzen	1,97	0,002	0,039	0,0056	14276	3,50		36,63
pentylbenzen	2,04	0,002	0,039	0,0052	15179	3,29		36,63
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,69	0,001	0,031	0,0003	2687	18,61	32,88	44,27
benzen	1,28	0,000	0,029	0,0000	10858	4,60		40,82
toluen	1,37	0,000	0,028	0,0001	12917	3,87		40,12
ethylbenzen	1,44	0,001	0,028	0,0001	15071	3,32		39,07
propylbenzen	1,51	0,000	0,027	0,0001	17664	2,83		37,83
butylbenzen	1,57	0,001	0,027	0,0001	18613	2,69		38,26
pentylbenzen	1,62	0,000	0,028	0,0002	18714	2,67		39,38
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,52	0,000	0,020	0,0000	3716	13,45	52,83	37,68
benzen	1,07	0,001	0,017	0,0001	20616	2,43		32,93
toluen	1,16	0,001	0,017	0,0001	26642	1,88		31,47
ethylbenzen	1,23	0,001	0,016	0,0000	31184	1,60		30,88
propylbenzen	1,30	0,000	0,016	0,0001	36229	1,38		30,26
butylbenzen	1,36	0,000	0,016	0,0001	41291	1,21		29,63
pentylbenzen	1,41	0,000	0,016	0,0001	44677	1,12		29,56

Tabulka P 15 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® SpeedROD RP-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFb (viz Tabulka 4), teplota 55 °C)

FIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	1,02	0,001	0,041	0,0011	3448	14,50	21,25	38,58
benzen	1,56	0,007	0,039	0,0002	8903	5,62		36,76
toluen	1,64	0,001	0,042	0,0016	8556	5,84		39,40
ethylbenzen	1,70	0,001	0,046	0,0055	7691	6,50		42,98
propylbenzen	1,76	0,001	0,038	0,0049	11801	4,24		35,92
butylbenzen	1,82	0,001	0,037	0,0064	13314	3,76		34,87
pentylbenzen	1,87	0,001	0,037	0,0055	13974	3,58		35,10
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,69	0,001	0,030	0,0000	2842	17,59	28,64	42,85
benzen	1,18	0,001	0,028	0,0001	10019	4,99		39,35
toluen	1,26	0,001	0,027	0,0001	12235	4,09		37,83
ethylbenzen	1,32	0,000	0,025	0,0001	15146	3,30		35,53
propylbenzen	1,37	0,001	0,024	0,0000	17344	2,88		34,58
butylbenzen	1,42	0,001	0,026	0,0005	16093	3,11		37,10
pentylbenzen	1,46	0,001	0,028	0,0001	15355	3,26		39,14
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,52	0,000	0,020	0,0001	3904	12,81	45,55	36,76
benzen	0,98	0,001	0,016	0,0001	20129	2,48		30,70
toluen	1,06	0,001	0,016	0,0000	24622	2,03		29,82
ethylbenzen	1,11	0,001	0,016	0,0001	28431	1,76		29,22
propylbenzen	1,17	0,001	0,015	0,0001	33038	1,51		28,45
butylbenzen	1,21	0,001	0,015	0,0001	35366	1,41		28,58
pentylbenzen	1,25	0,001	0,015	0,0000	36541	1,37		29,05

Tabulka P 16 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® SpeedROD RP-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFa (viz Tabulka 5), teplota 55 °C)

SIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,83	0,001	0,037	0,0001	2767	18,07	27,27	35,02
benzen	1,28	0,003	0,040	0,0003	5706	8,76		37,68
toluen	1,42	0,004	0,039	0,0003	7262	6,88		36,98
ethylbenzen	1,54	0,004	0,039	0,0004	8737	5,72		36,54
propylbenzen	1,67	0,003	0,038	0,0003	10764	4,64		35,59
butylbenzen	1,77	0,002	0,037	0,0002	12958	3,86		34,54
pentylbenzen	1,87	0,001	0,037	0,0002	14471	3,46		34,43
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,56	0,001	0,028	0,0000	2144	23,33	29,85	39,98
benzen	0,89	0,001	0,031	0,0001	4729	10,57		43,10
toluen	1,01	0,001	0,030	0,0000	6177	8,09		42,69
ethylbenzen	1,12	0,001	0,030	0,0003	7678	6,51		42,37
propylbenzen	1,23	0,001	0,030	0,0002	9667	5,17		41,73
butylbenzen	1,34	0,001	0,029	0,0001	11913	4,20		40,82
pentylbenzen	1,43	0,001	0,028	0,0002	14088	3,55		40,20
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,42	0,001	0,017	0,0001	3253	15,37	41,58	32,55
benzen	0,68	0,001	0,020	0,0000	6696	7,47		37,08
toluen	0,79	0,001	0,019	0,0001	9219	5,42		36,45
ethylbenzen	0,88	0,012	0,019	0,0001	11740	4,26		36,11
propylbenzen	1,00	0,000	0,019	0,0000	15438	3,24		35,69
butylbenzen	1,10	0,001	0,019	0,0001	19515	2,56		35,02
pentylbenzen	1,20	0,000	0,018	0,0000	24013	2,08		34,28

Tabulka P 17 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Chromolith® SpeedROD RP-18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFb (viz Tabulka 6), teplota 55 °C)

SIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,83	0,001	0,037	0,0001	2770	18,05	24,68	34,90
benzen	1,25	0,000	0,039	0,0003	5728	8,73		36,74
toluen	1,37	0,000	0,038	0,0002	7190	6,95		35,87
ethylbenzen	1,47	0,001	0,037	0,0002	8587	5,82		35,21
propylbenzen	1,57	0,001	0,036	0,0003	10709	4,67		33,71
butylbenzen	1,66	0,001	0,035	0,0001	12689	3,94		32,68
pentylbenzen	1,74	0,001	0,036	0,0000	13132	3,81		33,60
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,56	0,000	0,028	0,0001	2157	23,18	26,88	39,82
benzen	0,87	0,001	0,030	0,0002	4757	10,51		42,08
toluen	0,98	0,001	0,029	0,0001	6177	8,10		41,27
ethylbenzen	1,07	0,001	0,029	0,0001	7506	6,66		40,93
propylbenzen	1,16	0,001	0,028	0,0001	9388	5,33		39,93
butylbenzen	1,25	0,001	0,028	0,0002	11268	4,44		39,12
pentylbenzen	1,32	0,000	0,028	0,0002	12650	3,95		39,12
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,42	0,000	0,017	0,0000	3243	15,42	38,14	32,55
benzen	0,67	0,000	0,019	0,0001	7019	7,12		35,57
toluen	0,76	0,001	0,018	0,0001	9574	5,22		34,61
ethylbenzen	0,85	0,001	0,018	0,0001	12098	4,13		34,20
propylbenzen	0,94	0,001	0,018	0,0000	15265	3,28		33,76
butylbenzen	1,02	0,001	0,017	0,0001	19192	2,61		32,79
pentylbenzen	1,10	0,000	0,017	0,0001	22747	2,20		32,34

Tabulka P 18 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Ascentis® Express C18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFa (viz Tabulka 3), teplota 55 °C)

FIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,24	0,001	0,028	0,0010	416	120,30	40,57	25,99
benzen	0,87	0,002	0,024	0,0015	7403	6,75		22,35
toluen	0,97	0,002	0,024	0,0017	8929	5,60		22,83
ethylbenzen	1,06	0,002	0,024	0,0017	10320	4,84		23,02
propylbenzen	1,13	0,002	0,025	0,0017	11399	4,39		23,55
butylbenzen	1,20	0,002	0,026	0,0023	12248	4,08		24,07
pentylbenzen	1,26	0,002	0,026	0,0023	13286	3,76		24,25
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,16	0,000	0,020	0,0000	359	139,27	48,58	28,26
benzen	0,67	0,001	0,018	0,0001	7450	6,71		25,95
toluen	0,78	0,001	0,018	0,0000	9878	5,06		26,11
ethylbenzen	0,86	0,001	0,019	0,0001	11765	4,25		26,45
propylbenzen	0,93	0,018	0,019	0,0003	13960	3,58		26,21
butylbenzen	1,01	0,001	0,018	0,0003	16639	3,00		26,03
pentylbenzen	1,07	0,001	0,018	0,0003	18813	2,66		25,93
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,12	0,001	0,014	0,0000	399	125,38	61,84	26,72
benzen	0,57	0,000	0,014	0,0000	9652	5,18		25,55
toluen	0,67	0,001	0,014	0,0002	13506	3,70		25,66
ethylbenzen	0,75	0,001	0,014	0,0000	16705	2,99		25,89
propylbenzen	0,83	0,001	0,014	0,0001	20444	2,45		25,85
butylbenzen	0,90	0,001	0,013	0,0001	25209	1,98		25,18
pentylbenzen	0,96	0,001	0,013	0,0001	30177	1,66		24,55
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,08	0,001	0,010	0,0001	361	138,50	72,90	28,59
benzen	0,44	0,006	0,010	0,0000	9914	5,04		29,37
toluen	0,55	0,001	0,010	0,0000	15808	3,16		29,08
ethylbenzen	0,63	0,000	0,010	0,0000	20393	2,45		29,44
propylbenzen	0,71	0,000	0,011	0,0000	25051	2,00		29,88
butylbenzen	0,78	0,000	0,011	0,0000	29958	1,67		29,93
pentylbenzen	0,84	0,000	0,010	0,0001	35911	1,39		29,48

Tabulka P 19 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Ascentis® Express C18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFb (viz Tabulka 4), teplota 55 °C)

FIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,24	0,001	0,027	0,0002	424	118,05	37,85	25,64
benzen	0,80	0,002	0,022	0,0002	7139	7,00		20,93
toluen	0,88	0,001	0,022	0,0001	8840	5,66		20,83
ethylbenzen	0,95	0,001	0,022	0,0001	10369	4,82		20,67
propylbenzen	1,01	0,001	0,022	0,0002	11548	4,33		20,89
butylbenzen	1,07	0,002	0,023	0,0002	12124	4,12		21,46
pentylbenzen	1,11	0,001	0,023	0,0003	12731	3,93		21,85
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,16	0,001	0,020	0,0000	358	139,85	43,70	28,26
benzen	0,62	0,001	0,018	0,0000	6733	7,43		25,07
toluen	0,70	0,001	0,018	0,0000	8824	5,67		24,95
ethylbenzen	0,77	0,001	0,018	0,0001	10687	4,68		24,79
propylbenzen	0,83	0,001	0,017	0,0002	12915	3,87		24,40
butylbenzen	0,89	0,001	0,017	0,0002	15134	3,30		24,00
pentylbenzen	0,94	0,001	0,017	0,0003	16895	2,96		23,94
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,12	0,001	0,016	0,0001	324	154,29	48,39	29,64
benzen	0,52	0,001	0,015	0,0000	6674	7,49		28,15
toluen	0,60	0,000	0,015	0,0001	9425	5,30		27,59
ethylbenzen	0,67	0,000	0,015	0,0001	11262	4,44		27,99
propylbenzen	0,73	0,000	0,015	0,0000	14002	3,57		27,47
butylbenzen	0,79	0,000	0,014	0,0001	16811	2,97		26,91
pentylbenzen	0,83	0,000	0,014	0,0001	19110	2,62		26,75
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,08	0,001	0,010	0,0001	347	144,09	65,03	29,04
benzen	0,41	0,001	0,010	0,0000	9415	5,31		27,85
toluen	0,49	0,000	0,010	0,0000	13822	3,62		27,83
ethylbenzen	0,56	0,001	0,010	0,0000	17894	2,79		27,71
propylbenzen	0,62	0,000	0,010	0,0000	21979	2,27		27,82
butylbenzen	0,67	0,001	0,010	0,0000	26284	1,90		27,66
pentylbenzen	0,72	0,000	0,010	0,0000	31141	1,61		27,25

Tabulka P 20 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Ascentis® Express C18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFa (viz Tabulka 5), teplota 55 °C)

SIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,20	0,001	0,022	0,0002	453	110,28	33,68	20,58
benzen	0,39	0,001	0,024	0,0003	1401	35,70		22,87
toluen	0,50	0,002	0,024	0,0003	2361	21,18		22,74
ethylbenzen	0,62	0,001	0,024	0,0001	3692	13,54		22,44
propylbenzen	0,75	0,001	0,023	0,0002	5679	8,80		21,96
butylbenzen	0,87	0,000	0,023	0,0002	7904	6,33		21,67
pentylbenzen	0,98	0,000	0,023	0,0002	10262	4,87		21,51
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H	n_c	DF
aceton	0,13	0,001	0,016	0,0000	365	137,06	34,29	23,16
benzen	0,26	0,001	0,018	0,0001	1087	45,99		25,99
toluen	0,34	0,000	0,019	0,0000	1847	27,08		26,16
ethylbenzen	0,43	0,000	0,019	0,0001	2911	17,18		26,51
propylbenzen	0,54	0,001	0,019	0,0000	4679	10,69		26,35
butylbenzen	0,65	0,001	0,019	0,0000	6792	7,36		26,34
pentylbenzen	0,76	0,001	0,019	0,0001	9274	5,39		26,23
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,10	0,001	0,012	0,0000	394	126,89	38,64	22,41
benzen	0,19	0,001	0,013	0,0001	1163	42,99		25,09
toluen	0,26	0,002	0,014	0,0000	1937	25,82		25,73
ethylbenzen	0,33	0,002	0,014	0,0000	3069	16,29		26,41
propylbenzen	0,43	0,002	0,014	0,0000	5031	9,94		26,76
butylbenzen	0,53	0,001	0,014	0,0001	7450	6,71		27,21
pentylbenzen	0,63	0,001	0,015	0,0000	10437	4,79		27,37
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w_{0,5}}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,07	0,001	0,009	0,0000	352	141,99	40,17	24,07
benzen	0,13	0,001	0,010	0,0000	1003	49,86		27,02
toluen	0,17	0,000	0,010	0,0000	1625	30,76		28,21
ethylbenzen	0,23	0,000	0,010	0,0000	2611	19,15		29,55
propylbenzen	0,31	0,000	0,011	0,0000	4298	11,63		30,94
butylbenzen	0,39	0,000	0,011	0,0000	6553	7,63		32,29
pentylbenzen	0,49	0,000	0,012	0,0000	9380	5,33		33,31

Tabulka P 21 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Ascentis® Express C18 při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFb (viz Tabulka 6), teplota 55 °C)

průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,20	0,001	0,020	0,0003	522	95,84	33,03	19,22
benzen	0,38	0,002	0,023	0,0002	1551	32,23		21,50
toluen	0,49	0,002	0,022	0,0002	2663	18,78		20,98
ethylbenzen	0,59	0,002	0,022	0,0002	4162	12,01		20,40
propylbenzen	0,71	0,001	0,021	0,0002	6226	8,03		19,87
butylbenzen	0,81	0,001	0,021	0,0002	8384	5,96		19,62
pentylbenzen	0,90	0,002	0,021	0,0002	10735	4,66		19,34
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,13	0,002	0,015	0,0001	444	112,73	34,85	20,90
benzen	0,26	0,001	0,017	0,0001	1298	38,53		23,63
toluen	0,33	0,001	0,017	0,0001	2195	22,78		23,68
ethylbenzen	0,42	0,002	0,017	0,0001	3475	14,39		23,60
propylbenzen	0,52	0,001	0,016	0,0001	5467	9,15		23,24
butylbenzen	0,61	0,001	0,016	0,0001	7782	6,42		23,02
pentylbenzen	0,70	0,000	0,016	0,0001	10464	4,78		22,72
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,10	0,001	0,012	0,0001	400	124,92	36,22	22,31
benzen	0,19	0,001	0,013	0,0001	1172	42,67		25,04
toluen	0,25	0,001	0,013	0,0000	1978	25,28		25,33
ethylbenzen	0,32	0,001	0,014	0,0001	3160	15,82		25,56
propylbenzen	0,41	0,001	0,014	0,0000	5061	9,88		25,60
butylbenzen	0,50	0,001	0,014	0,0000	7332	6,82		25,77
pentylbenzen	0,58	0,000	0,014	0,0000	10131	4,94		25,64
průtok 3 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μ m]	n_c	DF
aceton	0,07	0,001	0,008	0,0000	354	141,26	38,10	23,99
benzen	0,13	0,002	0,010	0,0001	1019	49,08		26,88
toluen	0,17	0,002	0,010	0,0000	1678	29,80		27,77
ethylbenzen	0,22	0,002	0,010	0,0000	2698	18,53		28,68
propylbenzen	0,30	0,002	0,010	0,0000	4409	11,34		29,55
butylbenzen	0,37	0,001	0,011	0,0000	6659	7,51		30,29
pentylbenzen	0,45	0,001	0,011	0,0000	9363	5,34		30,89

Tabulka P 22 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Luna® Omega při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFa (viz Tabulka 3), teplota 55 °C)

FIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,52	0,053	0,062	0,0082	383	78,24	47,13	58,61
benzen	1,94	0,050	0,036	0,0007	15965	1,88		34,02
toluen	2,04	0,058	0,035	0,0064	18442	1,63		33,25
ethylbenzen	2,09	0,039	0,033	0,0064	22317	1,34		31,03
propylbenzen	2,15	0,040	0,028	0,0025	32726	0,92		26,36
butylbenzen	2,20	0,039	0,031	0,0012	27301	1,10		29,53
pentylbenzen	2,25	0,038	0,031	0,0031	29405	1,02		29,04
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,44	0,036	0,055	0,0053	355	84,44	45,54	77,51
benzen	1,57	0,016	0,032	0,0003	13696	2,19		44,64
toluen	1,66	0,012	0,027	0,0002	20608	1,46		38,39
ethylbenzen	1,71	0,012	0,025	0,0001	26278	1,14		35,18
propylbenzen	1,77	0,010	0,025	0,0001	28505	1,05		34,79
butylbenzen	1,81	0,011	0,026	0,0007	26365	1,14		37,02
pentylbenzen	1,84	0,011	0,027	0,0012	26503	1,13		37,68
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,41	0,003	0,052	0,0002	342	87,70	43,57	98,37
benzen	1,37	0,016	0,028	0,0003	12904	2,32		53,63
toluen	1,46	0,016	0,025	0,0002	18505	1,62		47,45
ethylbenzen	1,51	0,016	0,023	0,0002	23948	1,25		43,30
propylbenzen	1,56	0,016	0,022	0,0001	27139	1,11		42,00
butylbenzen	1,60	0,016	0,023	0,0004	27604	1,09		42,70
pentylbenzen	1,63	0,015	0,023	0,0009	28407	1,06		43,00

Tabulka P 23 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Luna® Omega při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu FIFb (viz Tabulka 4), teplota 55 °C)

FIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,48	0,025	0,059	0,0033	370	81,01	46,17	55,34
benzen	1,74	0,030	0,031	0,0012	16869	1,78		29,63
toluen	1,81	0,030	0,028	0,0009	24044	1,25		25,90
ethylbenzen	1,87	0,030	0,025	0,0007	30072	1,00		23,84
propylbenzen	1,91	0,030	0,026	0,0017	29379	1,02		24,76
butylbenzen	1,96	0,031	0,030	0,0039	23922	1,25		28,05
pentylbenzen	2,00	0,031	0,031	0,0046	23408	1,28		28,92
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,40	0,010	0,051	0,0015	342	87,67	43,66	71,43
benzen	1,39	0,015	0,026	0,0002	15370	1,95		37,19
toluen	1,45	0,014	0,022	0,0002	23622	1,27		31,45
ethylbenzen	1,50	0,013	0,020	0,0001	31361	0,96		28,11
propylbenzen	1,54	0,013	0,021	0,0003	30629	0,98		29,20
butylbenzen	1,57	0,013	0,026	0,0023	19649	1,53		37,24
pentylbenzen	1,60	0,013	0,027	0,0026	20086	1,49		37,51
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,37	0,005	0,047	0,0006	334	89,86	42,35	89,23
benzen	1,23	0,010	0,024	0,0001	13910	2,16		46,05
toluen	1,29	0,010	0,021	0,0002	21528	1,39		38,91
ethylbenzen	1,33	0,010	0,019	0,0001	28363	1,06		35,01
propylbenzen	1,37	0,009	0,019	0,0001	28768	1,04		35,74
butylbenzen	1,40	0,009	0,022	0,0009	21734	1,38		42,05
pentylbenzen	1,42	0,009	0,022	0,0011	22567	1,33		42,04

Tabulka P 24 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Luna® Omega při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFa (viz Tabulka 5), teplota 55 °C)

SIFa								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,28	0,008	0,032	0,0007	423	70,91	38,50	29,89
benzen	0,53	0,020	0,038	0,0009	1077	27,85		35,98
toluen	0,70	0,027	0,040	0,0008	1673	17,93		38,05
ethylbenzen	0,96	0,035	0,045	0,0006	2517	11,92		42,24
propylbenzen	1,29	0,026	0,037	0,0004	6763	4,44		34,75
butylbenzen	1,50	0,023	0,030	0,0003	14258	2,10		27,89
pentylbenzen	1,64	0,021	0,026	0,0002	21340	1,41		24,92
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,25	0,001	0,029	0,0001	405	74,14	35,31	41,60
benzen	0,48	0,003	0,035	0,0001	1031	29,09		49,85
toluen	0,64	0,004	0,037	0,0000	1589	18,88		52,97
ethylbenzen	0,86	0,004	0,038	0,0001	2775	10,81		54,06
propylbenzen	1,09	0,004	0,030	0,0001	7263	4,13		42,60
butylbenzen	1,25	0,004	0,026	0,0001	12843	2,34		36,63
pentylbenzen	1,36	0,003	0,024	0,0000	18304	1,64		33,49
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,24	0,002	0,029	0,0000	396	75,73	33,22	53,77
benzen	0,46	0,003	0,034	0,0001	1010	29,70		64,50
toluen	0,61	0,005	0,036	0,0000	1604	18,70		67,50
ethylbenzen	0,80	0,005	0,034	0,0000	3168	9,47		63,37
propylbenzen	0,99	0,004	0,027	0,0001	7227	4,15		51,50
butylbenzen	1,12	0,004	0,024	0,0000	11680	2,57		45,91
pentylbenzen	1,22	0,004	0,023	0,0001	16111	1,86		42,69

Tabulka P 25 Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolonu Luna® Omega při všech měřených průtocích mobilní fáze gradientu SIFb (viz Tabulka 6), teplota 55 °C)

SIFb								
průtok 1 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,26	0,005	0,030	0,0006	417	71,98	37,33	28,45
benzen	0,49	0,017	0,037	0,0005	1002	29,95		34,60
toluen	0,65	0,022	0,039	0,0004	1531	19,60		36,89
ethylbenzen	0,89	0,027	0,044	0,0008	2276	13,18		41,30
propylbenzen	1,22	0,021	0,036	0,0012	6264	4,79		34,13
butylbenzen	1,42	0,012	0,028	0,0003	14298	2,10		26,24
pentylbenzen	1,54	0,010	0,025	0,0002	21183	1,42		23,40
průtok 1,5 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,24	0,002	0,028	0,0001	400	74,99	34,24	40,13
benzen	0,46	0,006	0,034	0,0002	1007	29,80		48,18
toluen	0,61	0,007	0,036	0,0000	1550	19,35		51,18
ethylbenzen	0,82	0,009	0,037	0,0002	2698	11,12		52,39
propylbenzen	1,04	0,006	0,028	0,0002	7563	3,97		39,69
butylbenzen	1,17	0,005	0,024	0,0000	13345	2,25		33,76
pentylbenzen	1,27	0,004	0,022	0,0000	18880	1,59		30,64
průtok 2 ml/min								
Látka	t_r [min]	σ_{tr}	$w_{0,5}$ [min]	$\sigma_{w0,5}$	N	H [μm]	n_c	DF
aceton	0,28	0,011	0,033	0,0016	398	75,44	30,01	62,93
benzen	0,55	0,028	0,041	0,0015	1027	29,20		76,74
toluen	0,73	0,036	0,040	0,0007	1879	15,97		74,81
ethylbenzen	0,92	0,032	0,033	0,0005	4363	6,88		61,49
propylbenzen	1,05	0,034	0,027	0,0005	8189	3,66		51,42
butylbenzen	1,16	0,023	0,025	0,0006	12292	2,44		46,19
pentylbenzen	1,23	0,021	0,023	0,0005	16376	1,83		42,62